

M792

c.1

**PROTEINAS CROMOSOMALES DE ALTA MOVILIDAD ELECTROFORETICA
(HMG) EN TRYPANOSOMA CRUZI**

Tesis entregada a la Universidad de Chile
en cumplimiento parcial de los requisitos
para optar al grado de Magister en Ciencias
Biológicas con mención en Genética

Facultad de Ciencias

por

MONICA GLORIA MORALES PENA

Director de Tesis: Prof. Norbel Galanti Garrone

1991



Facultad de Ciencias

Universidad de Chile

I N F O R M E D E A P R O B A C I O N
T E S I S D E M A G I S T E R

Se informa a la Escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias que la Tesis de Magister presentada por el candidato

Mónica Gloria Morales Peña

ha sido aprobada por la Comisión Informante de Tesis como requisito de Tesis para el grado de Magister en Ciencias Biológicas con Mención en Genética.

Director de Tesis
Prof. Norbel Galanti G.



Comisión Informante de Tesis

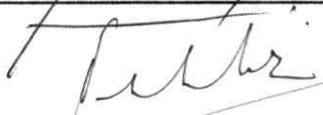
Dra. Alicia Carrasco



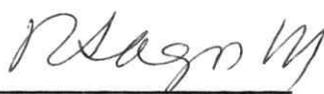
Dra. Margarita Carr



Dr. Nelson Díaz



Dra. Rosalba Lagos





Esta Tesis fué realizada en el Laboratorio de Biología Molecular del Departamento de Biología Celular y Genética de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile, bajo la dirección del Dr. Norbel Galanti G. y fué financiada por los siguientes proyectos:

Grant 820599 de UNDP/World Bank/WHO Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases; Grant TWAS RG 54-CHL-19; Proyectos FONDECYT-Chile 209-87 y 096-89; Proyecto del Departamento Técnico de Investigación (DTI) B-2365-8723, Universidad de Chile.



A mis padres y hermanos

A mi esposo



AGRADECIMIENTOS

Al finalizar esta Tesis, quiero expresar mis sinceros agradecimientos a aquellas personas, sin las cuales, no habría podido llevar a cabo esta labor. Deseo mencionar en forma especial a las siguientes.

Al Dr. Norbel Galanti G., por su constante apoyo, estímulo y confianza, y por los enriquecedores momentos vividos en su laboratorio.

Al Dr. Antonio Morello y Sra. Yolanda Repetto, por la generosa ayuda que siempre me brindaron.

A la Dra. María Imschenetzsky, quien gentilmente cedió los sueros empleados, a Eddie Ofate y a todos los demás miembros del Laboratorio de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Concepción.

A mis amigos, Cecilia Toro, M. Verónica Rojas, Esteban Ordenes, Héctor Díaz y José Grenet. Infinitas gracias por su amistad y apoyo.

A todos los integrantes de la Unidad de Biología Celular y Genética de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile, por su colaboración y afecto.

A Naty Salgado, Magaly Gómez y Amelia Barrios, por su desinteresada ayuda.



INDICE DE MATERIAS

	PAGS.
Lista de Tablas	iv
Lista de Figuras	v
Lista de Abreviaturas	viii
Resumen	ix
Introducción	1
Materiales y Métodos	19
Materiales	19
1. Material Biológico	19
2. Compuestos Químicos	19
Métodos	20
1. Cultivos	20
1.a Cultivo de <u>Trypanosoma cruzi</u>	20
1.b <u>Trypanosoma cruzi</u> en distintas fases de la curva de crecimiento	21
2. Recuento de células	22
3. Estimación de la actividad proliferativa en los cultivos de <u>Trypanosoma cruzi</u>	23
4. Síntesis de DNA	23

5. Extracción de proteínas cromosomales HMG	24
5.a Extracción de proteínas HMG de <u>Trypanosoma cruzi</u>	24
5.b Extracción de proteínas HMG de timo de ternero	26
6. Extracción de histonas	26
7. Determinación de proteínas	28
7.a Método de Luck	28
7.b Método de Bradford	28
8. Separación de proteínas por electroforesis en geles de poliacrilamida	29
8.a Sistema SDS (Dodecil Sulfato de Sodio)	29
8.b Sistema SDS-Mini geles	30
8.c Sistema Ácido acético-urea	31
9. Estimación del peso molecular de las proteínas	31
10. Inmunotransferencia	33
11. Estimación de las cantidades relativas de proteínas HMG por densitometría	35
Resultados	36
Discusión	65
Bibliografía	81

LISTA DE TABLAS

	PAGS.
Tabla No 1 Estimación de pesos moleculares de proteínas HMG de timo de ternero y de proteínas tipo-HMG de <u>Trypanosoma cruzi</u> por migración en geles de SDS-poliacrilamida.	52
Tabla No 2 Incorporación de timidina tritiada en DNA de <u>Trypanosoma cruzi</u> .	60

LISTA DE FIGURAS

	PAGS.	
Fig. No 1	Electroforesis en gel de poliacrilamida ácido acético-urea de proteínas tipo-HMG de <u>Trypanosoma cruzi</u> .	37
Fig. No 2	Electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida de proteínas HMG e histonas de timo de ternero y de <u>Trypanosoma cruzi</u> .	40
Fig. No 3	Electroforesis en geles de SDS-poliacrilamida de proteínas HMG de timo de ternero.	41
Fig. No 4	Electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida de proteínas HMG de timo de ternero extraídas a partir de cromatina.	43

Fig. No 5	Electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida de proteínas HMG de timo de ternero extraídas en presencia o ausencia de tiodiglicol.	45
Fig. No 6	Electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida de proteínas tipo-HMG de <u>Trypanosoma cruzi</u> .	47
Fig. No 7	Electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida de proteínas tipo-HMG de <u>T. cruzi</u> con marcadores de peso molecular.	49
Fig. No 8	Peso molecular versus movilidad electroforética en geles de SDS-poliacrilamida de marcadores de PM, proteínas HMG de timo de ternero y de <u>Trypanosoma cruzi</u> .	51
Fig. No 9	Electroforesis en mini-geles de SDS-poliacrilamida de proteínas HMG de timo de ternero.	54
Fig. No 10	Inmunotransferencia de proteínas tipo-HMG de <u>Trypanosoma cruzi</u> .	55

- Fig. No 11 Curva de crecimiento de epimastigotes de Trypanosoma cruzi. 57
- Fig. No 12 Incorporación de timidina tritiada en epimastigotes de T. cruzi mantenidos en diferentes medios de cultivo. 58
- Fig. No 13 Electroforesis de proteínas tipo-HMG de T. cruzi de cultivos exponenciales y estacionarios. 61
- Fig. No 14 Análisis densitométrico de proteínas tipo-HMG de T. cruzi de cultivos en fases exponencial y estacionaria de crecimiento. 63

LISTA DE ABREVIATURAS

HMG	:	Proteínas de Alta Movilidad Electroforética ("High Mobility Group")
DNA	:	Acido desoxiribonucleico
RNA	:	Acido ribonucleico
mRNA	:	Acido ribonucleico mensajero
rRNA	:	Acido ribonucleico ribosomal
pb	:	pares de bases
cpm	:	cuentas por minuto
rpm	:	revoluciones por minuto
EDTA	:	Etilen diamino tetraacetato de sodio
PBS	:	Buffer fosfato salino
PMSF	:	Fenilmetil-sulfonil fluoruro
SDS	:	Dodecil sulfato de sodio
TEMED	:	N,N,N',N'-tetrametilen diamina
TPCK	:	L-1-Tosilamida-2-fenil-etilclorometil cetona
3H-THY	:	timidina metil tritiada
PM	:	peso molecular

RESUMEN

El Trypanosoma cruzi es un protozoo hemoflagelado perteneciente al orden Kinetoplastidia. Es el parásito causante de la enfermedad de Chagas, ampliamente distribuida en Latinoamérica, y que causa principalmente lesiones al miocardio, sistema digestivo, sistema nervioso, y otros órganos.

La cromatina del parásito se organiza en nucleosomas, pero sus histonas poseen diferencias con respecto a las de eucariontes superiores.

No hay información sobre proteínas cromosomales de alta movilidad electroforética (HMG) en el Trypanosoma cruzi. Estas proteínas fueron descubiertas en 1973, y han sido asociadas en eucariontes superiores, con mecanismos de regulación génica. Se encuentran presentes en las células en baja cantidad (3,0 % en peso en relación a histonas), y se hallan asociadas a regiones de cromatina activa o potencialmente activa, participando en procesos de replicación del DNA y de transcripción de genes.

En esta tesis, mediante técnicas descritas para aislar y caracterizar proteínas HMG, se ha encontrado en epimastigotes de Trypanosoma cruzi, cuatro proteínas que

se han denominado tipo-HMG A, B, C y E. Estas proteínas presentan solubilidad en ácido perclórico, movi­lidades electroforéticas en geles de poliacrilamida en distintos sistemas y pesos moleculares, semejantes a las de eucariontes superiores. Mediante técnicas inmunológicas se determinó reacción cruzada entre las proteínas A y B de Trypanosoma cruzi, y sueros anti-HMG de timo de ternero, reafirmando la probable naturaleza de tipo HMG de estos polipéptidos. A su vez se observó que las cantidades relativas de las proteínas tipo HMG de T. cruzi, fluctúan según el estado de proliferación en que los cultivos de las células se encuentran. Esto es concordante con la literatura, donde se describe que algunas proteínas HMG disminuyen en proporción, cuando los tejidos de los cuales se aíslan dejan de proliferar.

Se concluye que en el ancestral Trypanosoma cruzi, se encuentran proteínas tipo-HMG con similitudes con las de eucariontes superiores. Posiblemente estas proteínas cromosomales realizan funciones semejantes a las descritas en éstos y participan en mecanismos de regulación de la expresión génica.

INTRODUCCION

Durante muchos años la enfermedad de Chagas se consideró propia del Brasil (1). Sin embargo, la Organización Mundial de la Salud, en 1984, calculó en 24.697.000 el número de infectados chagásicos en Latinoamérica (2). En Chile se estima que unas 700.000 personas estarían afectadas por esta enfermedad (3).

El Trypanosoma cruzi, agente causal de la enfermedad de Chagas, es un protozoo hemoflagelado perteneciente al orden Kinetoplastida (4), que presenta durante su ciclo de vida tres estados morfológicos bien diferenciados, dependiendo del medio en que se encuentra: amastigote, epimastigote y tripomastigote (1).

La forma amastigote es ovalada, con un diámetro de 2 a 4 μm , y generalmente sin flagelo evidente al microscopio de luz. Se divide intracelularmente en los tejidos del mamífero hospedador (1).

Los epimastigotes son de forma alargada, de 20 μm de largo, con flagelo libre, y su kinetoplasto se localiza anterior al núcleo. Se multiplican en el tracto digestivo del vector, así como también en medios de cultivo.

Los tripomastigotes son también flagelados y

alargados (20 um), poseen una membrana ondulante que se extiende a lo largo de todo el organismo, no se dividen y son infectantes. El kinetoplasto se ubica posterior al núcleo. Se encuentran en la sangre periférica de sus hospedadores (1,5,6).

El kinetoplasto o mitocondrion, posee DNA (kDNA) (7,8) que consiste en maxi-círculos, probablemente equivalentes a los de DNA mitocondrial de otros eucariontes, donde se encontrarían algunos genes estructurales y de rRNA, y en mini-círculos de función poco conocida. Sin embargo, se ha encontrado en Trypanosoma brucei, evidencias de transcripción de los mini-círculos (9).

Existen evidencias que indicarían que T. cruzi no es un grupo homogéneo de parásitos, sino que esta compuesto de varios grupos de organismos que exhiben distintas características (1,10,11). Probablemente debido en parte a ello, es que se ha observado polimorfismo clínico de la enfermedad a través de América. Se ha postulado que podrían estar involucrados en el polimorfismo, factores tanto del huésped como del parásito. En cuanto al parásito, se ha encontrado diferencias entre cepas de T. cruzi en su morfología (12), infectividad (11-14), patrones isoenzimáticos (zimodemas) (15-17) y fragmentos que se obtienen de los minicírculos del kDNA (kinetoplasto) cuando se digieren con enzimas de restricción (esquizodemas) (18-21).

Por diversos análisis se ha asumido que los tripanosomas son diploides (10,22,23), con un contenido de DNA nuclear de $2,8 \times 10^{-13}$ g (23).

Al contrario de lo que ocurre en otras células eucarióticas, la división celular del T. cruzi ocurre sin desaparición de la membrana nuclear (25). Durante la división de epimastigotes y amastigotes, se distinguen los estados preliminar, ecuatorial, elongacional y de reorganización nuclear (25). Durante este proceso se observan las llamadas placas mitóticas, que también están presentes en otros miembros de la familia Tripanosomatidae. Estas son estructuras intranucleares laminadas, dobles y simétricas. Durante el estado ecuatorial del núcleo en división, estas placas, que en T. cruzi son diez, se dividen en hemiplacas durante la metafase y migran hacia los polos del núcleo (26). Las placas estarían compuestas principalmente de proteínas y se encontrarían lateralmente asociadas con fibras de cromatina (27). En el T. cruzi no se han observado estructuras de cromosomas propiamente tales, como los caracterizados en eucariontes superiores.

Sin embargo, el T. cruzi presenta una cromatina organizada en nucleosomas (28,29), cada uno de ellos con un segmento de DNA de aproximadamente 200 pb (28), asociadas a histonas, que presentan características propias (28,30,31). El DNA del núcleo nucleosomal se compone de 140 pb (32).

Dentro del conjunto de proteínas no histonas asociadas a la cromatina en eucariontes superiores, se encuentran las de "alta movilidad" o HMG (High Mobility Group) denominadas así, por su alta movilidad relativa en electroforesis a bajos pH en geles de poliacrilamida (33).

Las proteínas cromosomales HMG fueron aisladas por primera vez en 1973 en timo de ternero (34). Actualmente se han encontrado en animales (33,35-41), plantas (38), hongos (38,42,43), y protozoos (44-47). En tejidos animales se ha calculado que existen alrededor de 10^{-5} a 10^{-6} moléculas de HMG por núcleo (33,34,48,49), lo cual corresponde a un 3 % en peso en relación a las histonas. Como las proteínas HMG son poco abundantes, es posible que estén asociadas con regiones específicas del genoma, y quizás estén presentes y funcionen sólo durante estados particulares del ciclo celular (50).

Algunas características de las proteínas HMG son : proteínas asociadas a cromatina, que pueden ser extraídas con NaCl 0,35 M (33,34,51), ácido tricloroacético (TCA) 5,0 % (36) o ácido perclórico (PCA) 0,75 M (50,52), y que presentan una composición de aminoácidos consistente en aproximadamente un 30 % ácidos y un 25 % básicos (34,53,54). Dentro de los aminoácidos más abundantes de estas proteínas, se encuentran el ácido aspártico y el ácido glutámico, y los aminoácidos alanina, arginina y lisina (33,42,51,55-57).

La distribución de los aminoácidos polares

en las proteínas HMG es claramente asimétrica, con un extremo C-terminal muy ácido y una región más básica en la zona N-terminal (57-59).

Dentro de las proteínas HMG, las más abundantes y mejor caracterizadas en eucariontes superiores son las denominadas HMG 1, 2, 14 y 17.

En eucariontes superiores se ha observado que las proteínas HMG no son tejido específicas (39,56,60); es decir, proteínas similares sino idénticas se han obtenido de diversos tejidos de un mismo organismo (56).

Las proteínas HMG 1 y 2 poseen un peso molecular de aproximadamente 26.000-28.000 daltons, estimado por técnicas de equilibrio de sedimentación (51) y por migración en geles de poliacrilamida-SDS (61,62).

Se ha demostrado que las proteínas HMG 1 y HMG 2 poseen estructuras primarias muy semejantes, siendo sin embargo proteínas distintas (63). Por estudios inmunológicos se ha determinado que difieren en su secuencia primaria en sólo un 6,0 % (61). Poseen estructura globular, con alrededor de un 45 % de sus residuos en configuración de alfa hélice (64-66). Ambas proteínas presentan dominios estructurales bien definidos, que son el N-terminal (V3), el central (V2), y un tercer dominio que incluye el central unido al extremo C-terminal (V1). El dominio V1 podría unirse a la histona H1 pero no al DNA (59). La existencia de diferentes dominios

funcionales dentro de HMG 1 y 2, puede explicar la habilidad de estas proteínas para interactuar tanto con el DNA como con las histonas (65).

Proteínas HMG 1 marcadas con ¹²⁵I han sido microinyectadas en células HeLa, pudiendo observarse su localización en el núcleo, donde permanecen asociadas a cromosomas metafásicos durante la mitosis (67).

Tanto HMG 1 como HMG 2 son liberadas de la cromatina por tratamientos cortos del núcleo con nucleasa de micrococcus (39,48,68,69), sugiriendo una posible localización de ellas en la región del DNA espaciador (48,68,69). También se libera con este tratamiento, HMG T de testículo de trucha, que es equivalente a HMG 1 y 2 (48,70). Ambas proteínas se unen al DNA en forma reversible (49) y dicha unión se llevaría a cabo probablemente mediante la interacción de aminoácidos básicos de las proteínas con los grupos fosfatos del DNA (51,64,71). Por datos de diversos autores, HMG 1 se uniría al DNA ocupando una región que abarca entre 13 y 20 pb (51,71,72), y HMG 2 sobre una región de aproximadamente 25 pb (71).

Posteriormente, H. Schroter y J. Bode (68) determinaron que HMG 1 y 2 se unen a partículas mononucleosomales de 140 y 180 pb. Las partículas del núcleo nucleosómico de 140 pb solo unen trazas de proteínas HMG 1 y 2. Esto es consistente con la idea que HMG 1 y 2

se unen preferentemente a DNA espaciador (48,68,69). Estas proteínas se unen nueve veces mas a DNA libre de 180 pb, que a partículas mononucleosomales de 180 pb (68). Han surgido posteriormente evidencias que postulan la formación de un complejo ternario compuesto de HMG 1-H1-DNA (73). Dada la existencia de información que asocia la condensación de cromatina por histona H1, se propone que HMG 1 podría modular la habilidad de H1 a condensar la cromatina en regiones localizadas, pudiendo tal vez afectar cambios generales en el funcionamiento de los genes (73). Se ha mostrado también, que "in vitro" se formaría un dímero entre HMG 1 y H1. La interacción sería principalmente iónica, realizándose probablemente entre el extremo C-terminal ácido de HMG 1 y la región C-terminal básica de la histona H1 (74).

Mediante el empleo de reactivos bifuncionales, se determinó que las proteínas HMG 1 y HMG 2 pueden interactuar con, o estar próximas al octámero de histonas, tanto en nucleosomas libres de H1 o H5, como en partículas nucleosomales (75). M. Stros y A. Kolibalova proponen que la interacción de proteínas HMG 1 y 2 con histonas puede explicar como funcionarían HMG 1 y HMG 2 "in vivo" (75). Esta interacción tal vez provoque el reemplazo de las histonas específicas del DNA espaciador (H1, H5) por proteínas HMG 1 y 2 en regiones de cromatina activa (66,70). La sustitución de H1 o H5 por HMG 1 y 2 hace una

región de la cromatina más soluble y probablemente más accesible a nucleasas (66). Otra probabilidad es que HMG 1 o HMG 2 actúen sobre la cromatina debilitando las interacciones DNA-histonas o desplazando las histonas de manera que la DNA polimerasa o la RNA polimerasa pueda pasar a lo largo del DNA. Estas serían algunas formas como estas proteínas podrían estar involucradas en procesos de replicación o transcripción de la cromatina (74). En el proceso de transcripción es muy posible que las HMG 1 y 2 interactúen con las histonas asociadas al DNA. Mediante experimentos de sedimentación, ha sido descrito que HMG 1 puede unirse a la histona H1 en una proporción 1:1 (51).

A pesar que la interacción de HMG 1 se realiza preferentemente con el DNA espaciador o con histonas asociadas a él, se determinó que esta proteína también puede asociarse a la histona H3 del octámero de histonas del nucleosoma, por medio del N-terminal de HMG 1 (péptido V3) (76).

Por otra parte, se ha observado que HMG 1 o HMG 2 disminuyen el sobreenrollamiento de DNA plasmidial (77). Otra evidencia de que HMG 1 y 2 desestabilizarían al DNA de doble hebra, se basa en la observación que ambas disminuyen su temperatura de fusión a fuerza iónica fisiológica (77). HMG 1 y HMG 2 poseen una afinidad selectiva por DNA de hebra simple (78,79). Esto sugiere que ellas podrían desestabilizar al DNA de doble hélice, en

virtud de su afinidad preferencial por DNA de hebra simple (79). Se ha señalado que la mayor afinidad de HMG 1 hacia DNA de hebra simple, es debida a la presencia de estructuras secundarias tipo cruciformes. La proteína podría reconocer y estabilizar este tipo de estructuras (80).

Hasta ahora se han citado de preferencia aquellas evidencias que le atribuyen a las proteínas HMG 1 y HMG 2, propiedades estructurales en su interacción con la cromatina activa. Sin embargo, existen algunas pruebas que señalan un posible rol funcional por parte de estas proteínas, en el proceso de transcripción. Así, al lavar la cromatina de mieloma de ratón con KCl 0,35 M, se observó que se reduce su capacidad de servir como templado para la RNA polimerasa endógena. Esta propiedad es recuperada por la adición de las proteínas HMG 1 y 2. Pudiera ser que la RNA polimerasa sea retenida en la fracción de cromatina después de la extracción con KCl, pero no sea totalmente activa sin la adición de las proteínas HMG 1 y 2 (81).

Trabajos posteriores realizados "in vitro", han señalado que HMG 1 y 2 pueden estimular la transcripción por parte de las RNA polimerasas II y III (82). Probablemente las proteínas HMG alterarían el templado permitiendo un incremento en la tasa de elongación de la hebra de RNA o una mejor accesibilidad de los factores de transcripción al templado (82). Esto es consecuente con los antecedentes que indican que las HMG 1 y 2 pueden

producir desenrollamientos del DNA de doble hélice (77). En un trabajo muy reciente, también realizado "in vitro", se ha demostrado que HMG 1 y 2 pueden estimular la transcripción de diversos genes (que poseen promotores para RNA polimerasa II). Se propone que el principal efecto de las proteínas HMG 1 y 2 estaría a nivel de estimular la iniciación de la transcripción de los diversos genes probados, más que a actuar sobre la elongación posterior de la fibra de RNA (83). Por otra parte se ha mostrado que aparentemente HMG 1 estaría involucrada en la replicación del DNA. En experimentos realizados con anticuerpos anti-HMG 1 se ha visto que HMG 1 es necesaria para la acción de la DNA polimerasa, aunque el modo como esto se realizaría no ha sido esclarecido aún (84).

Una de las propiedades de las proteínas HMG 1 y HMG 2 más establecida, es que afectan de algún modo, la configuración del DNA (77). Surge de esta manera la posibilidad que estas proteínas participen en procesos tales como transcripción o replicación de la cromatina, debido a las modificaciones estructurales que pueden causar en el DNA.

Las proteínas HMG 14 y 17, son de bajo peso molecular, aproximadamente 10.000 daltons (33,57). En timo de ternero poseen 100 y 89 (57) residuos de aminoácidos respectivamente, y exhiben entre sí un 60% de homología (85). Estas proteínas presentarían aproximadamente un

28% de sus aminoácidos involucrados en una estructura secundaria de tipo beta, y una corta región de tipo alfa hélice en su extremo C-terminal (86). HMG 14 y 17 se liberan de la cromatina cuando ésta es tratada con DNasa I, lo cual sugiere que estarían físicamente presentes en regiones de activa transcripción (51,60,87,88). Esta enzima también libera la proteína H6 de testículo de trucha, que es equivalente a HMG 17 (36,48,70). Se ha demostrado que la sensibilidad a DNasa I que presenta el gen de globina, que transcribe activamente en embrión de pollo, es conferida al menos en parte por las HMG 14 y 17 (60,87). La sensibilidad de los genes que transcriben activamente, a la DNasa I, probablemente refleja una estructura alterada del nucleosoma, que quizás es requerida para la elongación de la cadena de RNA. Es posible también, que la sensibilidad a dicha enzima refleje el potencial de un gen a ser transcrito (60). Mediante el uso de anticuerpos anti-HMG 17, ha sido posible deducir que proteínas HMG 17 están presentes en o cerca de regiones que transcriben. A su vez, el pasaje de la RNA polimerasa a lo largo de la fibra de cromatina es impedido por estos anticuerpos unidos a HMG 17 (89). Hay además evidencias que indican que sitios que transcriben activamente en cromosomas politénicos están asociados con proteínas que poseen relación inmunológica con HMG 14 de timo de ternero (35).

La sensibilidad a DNasa I de nucleosomas en

genes que transcriben activamente se pierde cuando se eliminan HMG 14 y 17, y se recupera con la adición de ellas (87). Esto muestra que los nucleosomas a los que se les han retirado estas proteínas, retienen la información que les permite reconocer nuevamente a HMG 14 y 17, durante el proceso de reconstitución (87). En experimentos similares en los que se emplean HMG 1 y HMG 2, no se restaura la sensibilidad por DNasa I. De experimentos del mismo tipo, pero utilizando partículas del núcleo nucleosomal, se infiere que la sensibilidad a DNasa I puede ser localizada en el DNA enrollado sobre el octámero de histonas. Estos resultados indican además, que HMG 14 y HMG 17 podrían interactuar con las histonas del octámero, tanto como con el DNA nucleosomal. Se sugiere que las regiones ácidas de HMG 14 y 17 podrían unirse a las regiones básicas de las histonas (87). Aunque HMG 14 y 17 también pueden unirse a histonas libres de DNA, la afinidad de estas proteínas HMG por los nucleosomas es mayor (66,87,90). Trabajos empleando reactivos bifuncionales, han aportado evidencias que sugieren la interacción de HMG 14 y 17 con el DNA en regiones terminales del núcleo nucleosómico (91). Dos moléculas de HMG 14 ó 17 podrían unirse fuerte (49,90) pero reversiblemente (87,90,92) con 15 pb de DNA contiguos al núcleo nucleosómico por sus regiones básicas N-terminales, reemplazando a la histona H1 en la región espaciadora del nucleosoma (49). Posteriormente se

determinó que los sitios de unión de HMG 14 y 17 al DNA, estarían ubicados a 25-27 y 125-127 pb del extremo 5', respectivamente. Hay otros sitios de unión que corresponden a los extremos 3' y 5' del nucleosoma (91).

Tanto HMG 14 como HMG 17 estabilizarían al DNA contra la denaturación. El efecto estabilizante también es observado cuando estas proteínas se unen a nucleosomas (90). Al parecer la unión de HMG 14 al nucleosoma causa cambios sutiles en la conformación superhéllice del DNA, y no induce a cambios consistentes en grandes rearrreglos del octámero de histonas. La alteración producida se evidencia en un incremento radial del DNA y un pequeño desenrollamiento de la superhéllice de DNA, pasando de aproximadamente 1,75 a 1,65 giros (93). Los cambios estructurales causados por las proteínas HMG 14 y 17, otorgarían al nucleosoma una polaridad distinta que podría contribuir al proceso transcripcional (94).

Aparentemente, HMG 14 y 17 se unirían al DNA principalmente a través interacciones iónicas, involucrando al menos algunos de sus 21 y 20 residuos de lisina respectivamente (57). Las proteínas actuarían en forma estequiométrica en nucleosomas que transcriben activamente (87).

Debido a que el empaquetamiento de la cromatina para constituir la estructura de solenoide de 30 nm es facilitada en parte por la interacción entre moléculas

de histona H1, es aparente que el reemplazo de H1 por HMG 14 y 17 en genes que transcriben, puede resultar en un desenrollamiento local del solenoide, facilitándose la transcripción (49).

La razón por la cual existe una unión preferencial de proteínas HMG 14 y 17 a nucleosomas activos, no es conocida aún. Sin embargo se ha observado que el DNA de nucleosomas que unen proteínas HMG, estaría menos metilado que el DNA de nucleosomas que no asocian proteínas HMG (88).

Proteínas HMG 14 y 17 purificadas de células de ratón, inhiben parcialmente desacetilasas de histonas de estas células, aunque el modo de esta acción no ha sido dilucidado (95). Se ha sugerido que la acetilación de histonas puede jugar un rol importante facilitando la activación y mantención de cromatina transcripcionalmente activa (96-98). El hecho que las proteínas HMG 14 y 17 estén de alguna manera involucradas en la acetilación de histonas, puede tener implicaciones muy importantes para posibles modelos de mecanismos de regulación de genes de eucariontes (95). En un trabajo realizado en células HeLa por N. Malik y cols.(99), se concluye que las histonas acetiladas están presentes en, o próximas a, nucleosomas que contienen proteínas HMG 17. Las proteínas HMG podrían afectar la acetilación de histonas, ya sea porque confieren una conformación particular a la cromatina necesaria para

este proceso, o por simple inhibición de la enzima desacetilasa, o por ambos procesos (99).

También se ha postulado que las interacciones entre las proteínas HMG y el DNA pudieran estar moduladas por modificaciones post-traduccionales de estas proteínas. Se encontró que arginina es el sitio preferente para la metilación de proteínas HMG 1 y 2. El 8,2 % del total de argininas existentes en HMG 2 de timo de ternero, se presenta como dimetil arginina. En el caso de HMG 1, dicha proporción corresponde a un 2,9 % (100).

Se ha descrito además, que proteínas HMG de timo de ternero (101) y de células de ratón en cultivo (101,102), pueden ser covalentemente modificadas por glicosilación y adición de poli ADP-ribosa (101). La función de modificaciones glicosídicas de proteínas HMG es desconocida. Las modificaciones de las HMG podrían influir la manera como las proteínas se unen al DNA, el modo como interactúan con otros componentes cromosomales y en la forma como diversos factores de transcripción se relacionan con la cromatina (103).

Un hecho especialmente interesante con respecto a las proteínas HMG, es que las cantidades de algunas de ellas fluctúa según el estado de diferenciación o de proliferación en que se encuentra la célula (52,104-109).

A pesar que no ha sido posible determinar en forma exacta, el rol de las proteínas cromosomales HMG de eucariontes, es innegable su asociación con regiones de cromatina activa o potencialmente activa y su participación, ya sea en forma estructural o funcional, en los procesos de replicación del DNA, y de transcripción de genes. Probablemente estas proteínas no son responsables de todo un mecanismo de regulación de la expresión génica, pero si deben tener una importante participación en algunos mecanismos más generales.

Ha sido demostrado que algunos eucariontes inferiores presentan proteínas HMG, similares pero diferentes a las ampliamente caracterizadas en tejidos de mamíferos. Algunos ejemplos de esto lo constituyen, Drosophila melanogaster (40), Tetrahymena (44), Physarum polycephalum (46) y Saccharomyces cerevisiae (42,43).

No ha sido encontrada en la literatura científica a nuestro alcance, ningún trabajo que se refiera a la existencia de proteínas cromosomales no histonas, de alta movilidad electroforética HMG, en Trypanosoma cruzi.

El hecho que el Trypanosoma cruzi sea un eucarionte muy ancestral, probablemente originado hace más de mil millones de años, con características tan singulares como su mecanismo de transcripción, su proceso de división, sus "cromosomas" y su cromatina, entre otros, hace

interesante investigar la presencia en este parásito de proteínas cromosomales de alta movilidad electroforética HMG.

Actualmente se conoce poco sobre aspectos básicos de la composición de la cromatina del T. cruzi. Por lo tanto, es importante ahondar en algunas áreas de la genética molecular del parásito, que puedan informar sobre los mecanismos que regulan su proliferación en vectores y hospederos, así como su diferenciación e infectividad.

En consecuencia, en esta tesis se plantearon los siguientes objetivos.

Objetivo General.

Estudiar la participación de proteínas HMG en los mecanismos de proliferación y diferenciación de Trypanosoma cruzi.

Objetivos Específicos.

1. Detectar y caracterizar las proteínas HMG que pudieran encontrarse en epimastigotes de Trypanosoma cruzi.
2. Probar reacción cruzada entre antisueros anti-HMG de tимо de ternero y las posibles proteínas HMG de Trypanosoma cruzi.

3. Conocer las proteínas HMG presentes en epimastigotes en activa proliferación y aquellos que se encuentren en reposo proliferativo.

MATERIALES Y METODOS

MATERIALES

1. Material Biológico.

Se empleó formas epimastigotes de Trypanosoma cruzi cepa Tulahuén (Tul 0), mantenidos en cultivo en el laboratorio.

2. Compuestos Químicos.

Se utilizó los siguientes reactivos:

Sigma Chemical Company Co. Ltd., USA:

Acrilamida, acetona, agar, albúmina de suero de bovino, anhidrasa carbónica, aprotinina, citocromo c, dodecil sulfato de sodio, etilén diamino tetraacetato de sodio (EDTA), fenil metil-sulfonil fluoruro (PMSF), fosfato monobásico de potasio, glicina, hemina, β -lactoglobulina, lisozima, N,N'-metilen-bis-acrilamida, 2- β -mercaptoetanol, peroxidasa, polioxietilen-sorbitanmonolaurato (Tween-20), 2,5-difeniloxazol (PPO), 1,4-bis (2-(5-feniloxazolyl)) benceno; 2,2'-p-fenilenebis (5-feniloxazol) (POPOP), sacarosa, suero fetal de bovino, Tris-hidroximetil-

aminometano, L-1-tosilamida-2-fenil- etilclorometil cetona (TPCK), tripsinógeno y urea.

Merck AG, Alemania: Acido Clorhídrico, Acido fosfórico, cloruro de sodio, hidróxido de potasio, hidróxido de sodio.

Bio-Rad Laboratories USA: Azul de Coomassie R-250, azul de Coomassie Brillante G-250, negro de amido 10B, persulfato de amonio, N,N,N',N'-tetrametilén diamina (TEMED) y triton X-100.

Difco Laboratories , USA: Extracto de levadura, triptosa y triptona.

Gibco Laboratories, USA: Estreptomina y penicilina.

Fluka Chemie AG. : Acetona y Acido sulfúrico p. a.

May & Baker Ltd., Inglaterra: Acido tricloroacético.

Lab. Cosmefar, Chile : Formalina

Drogueria Michelson, Chile: Saponina.

New England Nuclear (NEN), Inglaterra: Timidina metil tritiada.

MÉTODOS

1. Cultivos.

1.a Cultivo de Trypanosoma cruzi.

Los epimastigotes de Trypanosoma cruzi se cultivaron en medio Diamond estéril (110). Dicho medio contiene triptosa (6,25 g/l), triptona (6,25 g/l), extracto

de levadura (6,25 g/l), NaCl (0,107 M), KH₂PO₄ (0,0299 M) y K₂HPO₄ (0,093 M). El pH del medio de cultivo se ajustó a 7,2 con hidróxido de potasio 5,0 N.

Se empleó botellas de cultivo de vidrio de 1,0 litro con tapones de goma. A cada botella se agregó 80 ml de medio Diamond y se esterilizaron en autoclave, a 17 psi de presión y 124 °C durante 45 min. Después de 24 horas se adicionó con jeringa estéril, suero fetal de bovino (2,5 %), los antibióticos penicilina (75 unidades/ml) y estreptomicina (75 ug/ml) y hemina (7,5 uM) estériles. La hemina se preparó en Tris 0,1 M, pH 8,5, y los antibióticos en agua destilada estéril. Cada botella se inoculó con aproximadamente $3-5 \times 10^6$ células/ml bajo campana de flujo laminar.

Las botellas inoculadas se mantuvieron en posición horizontal de modo de aumentar la superficie.

Los cultivos se renovaron cada 7 días y se mantuvieron en incubadores a 28 °C.

1.b Trypanosoma cruzi en distintas fases de la curva de crecimiento.

Se utilizaron epimastigotes de alta y baja actividad proliferativa.

Las células en alta actividad proliferativa correspondían a cultivos de 5 días, lo que equivale a

aproximadamente a la etapa media de la fase logarítmica de crecimiento. En esta etapa, más del 70 % de las células se encontraban en activa proliferación (Grenet y Galanti, manuscrito en preparación). Las células de baja actividad proliferativa fueron aquellas pertenecientes a cultivos de 14 días. En este estado sólo alrededor del 20 % de las células estaban en activa proliferación. (Grenet y Galanti; manuscrito en preparación).

2. Recuento de células.

El recuento de parásitos se realizó en cámara de Neubauer. Se diluyó el cultivo de parásitos con formalina al 10%. La dilución empleada dependió de la concentración de células por ml, siendo la más usada de 1:100.

Se determinó el número de células por ml de cultivo, de acuerdo a la siguiente fórmula.

$$n = X \times FD \times vol$$

X : promedio del número de células contadas.

FD : factor de dilución.

vol : volumen de cámara de Neubauer (10⁻⁴ ml).

Alternativamente se estimó el número de células por turbidimetría. Para ello se empleó un turbidímetro o nefelómetro DTR-100B (HF Scientific, Inc., USA), que permite medir el incremento de la turbiedad del

cultivo, que es consecuencia del aumento del número de parásitos por unidad de volumen.

3. Estimación de la actividad proliferativa en los cultivos de Trypanosoma cruzi.

Para estimar la actividad proliferativa de los cultivos de T. cruzi, se determinó diariamente el número de células/ml midiendo la turbiedad del cultivo mediante nefelometría y por conteo de células en cámara de Neubauer. Paralelamente se observaron los cultivos con microscopio de luz, a fin de observar la movilidad de los parásitos, la cantidad de formas en división y la presencia o ausencia de rosetas (agrupaciones de numerosas células en torno a un punto), que son frecuentes en cultivos en activa proliferación.

4. Síntesis de DNA.

Se utilizó una metodología similar a la empleada por Astolfi (111). Se preincubó $1,5 \times 10^6$ ajustado con KOH 5,0 N), en un baño termorregulado a 28 C durante 20 minutos y con agitación. Posteriormente se adicionó 10 μ l de timidina (metil-3H), con una actividad específica de 60 Ci/m mol. Se incubó durante una hora en las mismas condiciones.

Se detuvo la incorporación centrifugando las muestras en Eppendorf a 10.000 x g durante 5 min. Se lavó las células 2 veces con PBS frío y se precipitaron con ácido tricloroacético (TCA) frío al 5,0%. Se colocaron las muestras durante 15 min. en agua con hielo, se centrifugaron a 10.000 x g /10 min. Se lavó el sedimento dos veces con TCA 5,0% y posteriormente en etanol 80% y etanol-éter (3:1, v/v). Finalmente, el sedimento se disolvió en hidróxido de sodio (NaOH) 1,0 N y se suspendió en solución de centelleo.

La solución de centelleo utilizada se preparó con Tritón X-100 y xileno en proporción 1:2. Se agregó 2,5-difeniloxazole (PPO) y 1,4-bis (2-(5-feniloxazolyl)) benceno; 2,2'-p-fenilenebis (5-feniloxazol) (POPOP) en concentraciones finales de 0,5% y 0,05% respectivamente.

La radiactividad de las muestras se determinó en un contador de centelleo líquido Beckman LCS 100. El contador posee una eficiencia del 47% para tritio.

5. Extracción de proteínas cromosomales HMG.

5.a Extracción de proteínas HMG de Trypanosoma cruzi.

Se utilizó básicamente el método descrito por C. Sanders (50), basado en la solubilidad de las proteínas cromosomales HMG en ácido perclórico (PCA) 0,75M.

Los cultivos de epimastigotes se colectaron por centrifugación a 2.500 x g durante 10 min, en una centrifuga refrigerada International B-20. Las células se lavaron en PBS pH 7,2, se pesaron y se resuspendieron en PCA 0,75 M frío. Se homogeneizaron durante 1,0 min. a 600 rpm y 2,0 min. más a 1.400 rpm en homogenizador Heidorf. La homogeneización se realizó en frío, manteniendo el vaso permanentemente sumergido en agua-hielo.

El homogeneizado se centrifugó a 2.000 x g durante 20 min. Se retuvo el sobrenadante (S1), y el sedimento se homogeneizó con PCA 0,75 M frío y se centrifugó en la forma antes descrita. Se conservó el sobrenadante (S2). Se reunieron ambos líquidos sobrenadantes (S1 + S2) y se agregó 3,5 volúmenes de acetona a -20 °C, y HCl hasta una concentración final de 0,07 M, con agitación constante. Esta etapa se realizó en cámara fría (4 °C).

El precipitado obtenido, consistente principalmente en la histona H1, se separó por centrifugación a 2.000 x g durante 15 min, se lavó una vez en acetona-HCl 0,1 M (3,5:1, v/v) y 3 veces con acetona a -20 °C. La proteína se secó al vacío y se guardó liofilizada (Liofilizador Labconco).

Al sobrenadante se agregó 2,5 volúmenes de acetona a -20 °C, basados en el volumen original del extracto. El precipitado obtenido que corresponde a

proteínas tipo HMG, se colectó por centrifugación a 2.000 x g durante 15 min, se lavó 3 veces con acetona fría y se liofilizó.

5.b Extracción de proteínas HMG de timo de ternero.

Los timos de ternero fureon obtenidos de animales recién sacrificados en el frigorífico O'Higgins, Santiago. Se lavaron en NaCl 0,154 M y se trasladaron al laboratorio en frío.

Previo a la extracción de las proteínas, el timo se pesó y se cortó en pedazos pequeños con tijeras. La metodología empleada para la extracción de proteínas HMG, fue la misma descrita para el caso de Trypanosoma cruzi (50).

6. Extracción de histonas.

Se empleó el procedimiento descrito por C. Toro y N. Galanti (30).

Los epimastigotes se colectaron por centrifugación, se lavaron en PBS pH 7,2 y se homogeneizaron en sacarosa 0,25 M; EDTA 1,0 mM; CaCl₂ 3,0 mM; Tris-HCl 10 mM; L-1 Tosylamide-2-Phenylethylchloromethyl ketone (TPCK) 0,5 mM y fenilmetil-sulfonil fluoride (PMSF) 1,0 Mm, pH 7,4. Se centrifugó a

3.200 x g por 10 min. en centrifuga refrigerada International B-20. Se descartó el sobrenadante y el sedimento se homogeneizó en la misma solución, pero adicionando saponina 0,5%. Se centrifugó a 3.200 x g por 10 min.

El sedimento se homogeneizó en una solución para lisar núcleos (Tritón X-100 1,0 %; NaCl 0,15 M; Tris 0,01 M; TPCK 0,5 mM; PMSF 1,0 mM), pH 8,0. Se centrifugó a 13.000 x g por 20 min.

El sedimento de cromatina se lavó con Tris 0,01 M pH 8,0 ; TPCK 0,5 mM; PMSF 1,0 mM. Se centrifugó a 13.000 x g por 20 min. Se repitió esta operación dos veces.

Posteriormente se suspendió el sedimento de cromatina en agua destilada y se agregó ácido sulfúrico, hasta una concentración final de 0,4 N. Se mantuvo esta mezcla en agitación en frío durante toda la noche. Se centrifugó a 35.000 x g / 20 min. El sedimento se descartó, y el sobrenadante se dializó contra agua destilada durante aproximadamente 48 horas.

Todos los procedimientos se llevaron a cabo en frío. Las proteínas se guardaron liofilizadas. Histonas de timo de ternero se obtuvieron empleando al mismo procedimiento.

7. Determinación de proteínas.

7.a Método de Luck (112).

Las muestras se suspendieron en la solución a emplear (buffer de muestra, PBS, según correspondiera). Se agregó 2,0 ml de agua destilada y 1,0 ml de ácido tricloroacético (TCA) 3,0 M. Se agitó y se dejó en reposo durante 15 min. a temperatura ambiente. Se midió la absorbancia a 400 nm en espectrofotómetro Spectronic 20. Se extrapolo en curva de calibración, realizada con histonas de timo como standard.

7.b Método de Bradford (113).

A una alícuota de la muestra se agregó 1,0 ml de reactivo (Azul de Coomassie Brillante G-250 0,001%; etanol 4,7% y ác. fosfórico 8,5 %). Se determinó la absorbancia a 595 nm en espectrofotómetro de doble haz Shimadzu UV-190. El valor obtenido se extrapolo en curva de calibración preparada con albúmina sérica de bovino (BSA).

8. Separación de proteínas por electroforesis en geles de poliacrilamida.

8.a Sistema SDS (Dodecil Sulfato de Sodio).

Se utilizó placas de poliacrilamida de 16 x 14 x 0,2 cm, empleando básicamente los sistemas descritos por U. K. Laemmli (114) y J. Bhoree (109).

El gel espaciador se preparó al 15% de acrilamida a partir de una solución madre al 30% y N,N'-bis-metilen acrilamida al 0,8%. Las concentraciones finales de los demás componentes fueron: Tris-HCl 0,375 M (pH 8,8); SDS 0,1%; urea 0,5 M y EDTA 0,005 M. El gel se polimerizó químicamente con TEMED 0,025% (v/v) y persulfato de amonio 0,05%.

El gel concentrador, de 1,0 cm de largo, se preparó al 5,0 % acrilamida, utilizando la misma solución madre descrita. Las demás concentraciones finales fueron: Tris-HCl 0,125 M (pH 6,8); SDS 0,1%; urea 0,5 M y EDTA 0,005 M, Se polimerizó con TEMED 0,025% y persulfato de amonio 0,05%.

Las muestras a separar se prepararon según la metodología descrita por U. K. Laemmli (114). Las concentraciones finales de la solución en la que se disolvieron las proteínas fueron: Tris-HCl 0,0625 M (pH 6,8); SDS 2,0% ; glicerol 10% y 2-β-mercaptoetanol 5,0%. Las muestras se mantuvieron en agua hirviendo durante 1,0

min.

La cantidad de proteínas que se utilizó en este tipo de electroforesis, fué habitualmente 50 ug HMG de timo, 50 ug de HMG de T. cruzi, 40 ug de histonas de timo y 40 ug de histonas de T. cruzi.

La solución de electroforesis empleada consistió en Tris 0,025 M; glicina 0,1917 M y SDS 0,1%; pH 6,8. Se utilizó azul de bromofenol como marcador de migración.

La electroforesis se realizó a 20 mA en la zona del gel concentrador, y a 25 mA en el gel espaciador.

Al término de cada electroforesis, los geles se fijaron en TCA 15% y metanol 45% por 12 horas. Seguidamente se lavaron 3 veces durante 20 min. con ácido acético 7,0% y se tñeron durante 5,0 horas con negro de amido 0,6% en ácido acético al 7,0%.

La descoloración de los geles se realizó mediante lavados sucesivos con ácido acético 7,0%.

8.b Sistema SDS-Mini geles.

Los geles fueron preparados del mismo modo descrito en 8.a, con las dimensiones 7 x 6 x 0,1 cm.

La electroforesis se realizó a 10 mA en el gel concentrador y a 15 mA en el gel espaciador.

Los geles se fijaron y tñeron en una

solución de metanol 45%, ácido acético 9,0% y Azul de Coomassie Brillante al 1,0 %. Se descoloraron con lavados sucesivos en metanol 45% y ácido acético 9,0%.

8.c Sistema ácido acético-urea.

Se utilizó la metodología de Panyim y Chalkley (115), empleando geles de poliacrilamida al 15% y una concentración final de urea de 2,5 M. Se efectuó una pre-electroforesis en ácido acético 0,9 N durante toda la noche a 12 mA. Las muestras se prepararon en ácido acético 0,9 N y sacarosa 15%. La electroforesis se realizó a 15 mA y se empleó como marcador de migración, el contaminante azul del verde de metilo.

Las proteínas se fijaron y tiñeron con una solución de negro de amido 0,1 %, etanol 20 % y ácido acético 7,0 %.

Habitualmente se colocaron en los carriles controles 40 ug de histonas de timo y 45 ug de HMG de timo de ternero.

9. Estimación del peso molecular de las proteínas.

Se estimó por comparación de la migración de las proteínas tipo HMG de T. cruzi con proteínas de peso molecular conocido, en geles de poliacrilamida-SDS al 15 % (116). Las electroforesis se realizaron como se

describió en (8.a).

Como marcadores de peso molecular conocido se empleó las siguientes proteínas : anhidrasa carbónica 29.000 D, tripsinógeno 24.000 D, β -lactoglobulina 18.400 D, lisozima 14.300 D, citocromo C 12.400 D y aprotinina 6.500 D.

Una vez finalizada la electroforesis, y antes de fijar, se marcó con tinta china el lugar donde llegó el marcador de migración (azul de bromofenol).

La movilidad de cada proteína, tanto de peso molecular conocido como marcadora, fue determinada mediante la siguiente ecuación (116):

$$\text{Movilidad} = A / B \quad \times \quad C / D$$

A : distancia de migración de la proteína

B : distancia de migración del colorante

C : largo del gel antes de teñirlo

D : largo del gel después de desteñirlo

Los valores de movilidad se graficaron contra los pesos moleculares conocidos, en una escala semilogarítmica. Los pesos moleculares de las proteínas HMG de T. cruzi se estimaron extrapolando sus valores de movilidad en el gráfico construido. Los valores obtenidos fueron confirmados y estimados con mayor precisión

mediante el uso del cálculo de regresión de Mínimos Cuadrados.

10. Inmunotransferencia.

Esta metodología se realizó siguiendo básicamente los trabajos de H. Towbin (117).

Las proteínas HMG de timo de ternero, HMG de T. cruzi e histonas de timo de ternero, se fraccionaron por electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS, empleando separadamente las metodologías de U. K. Laemmli (114) y J. Bhoree (109). Todos los carriles fueron sobrecargados, es decir, se empleó proteína en exceso (alrededor de diez veces más). Una vez finalizadas las electroforesis se eliminó los geles concentradores, y se transfirió las proteínas a papel de nitrocelulosa. La cámara de transferencia se cargó a partir del ánodo en el siguiente orden. Una esponja delgada, papel filtro grueso Whatman, y papel de nitrocelulosa, todos embebidos en buffer de transferencia, pH 8,5. Se colocó el gel humedecido previamente durante 5,0 min en buffer de transferencia y después otro papel filtro Whatman y esponja humedecidas. En cada paso se cuidó de eliminar burbujas. El buffer de transferencia consistió en Tris 0,025 M, glicina 0,1917 M, metanol 20 % y SDS 0,1 %. La transferencia se realizó durante 1,5 hrs. a temperatura ambiente, aplicando 40 V y

200 mA. Los geles se tñeron en la forma descrita en Materiales y Métodos (8.b). Los papeles de nitrocelulosa se bloquearon por 1,5 hrs. con TBS-gelatina al 3,0 % a 37 °C en agitación. El buffer TBS pH 7,5, consistió en Tris 0,1998 M y NaCl 5,0 M. Se lavó los papeles cinco veces por 5,0 min. con 50 ml de TBS-Tween 20 0,05 %, en agitación suave a temperatura ambiente. Se incubó con suero anti-HMG totales en la diluciones apropiadas durante 1,5 hrs. a temperatura ambiente en agitación suave. Se diluyó los sueros en TBS-gelatina 1,0 %. Se lavó nuevamente cinco veces. Se incubó con anticuerpo anti IgG de conejo biotinilado en una dilución 1/250 en buffer de anticuerpo. La incubación se realizó a temperatura ambiente con agitación suave. Se lavó cinco veces del modo señalado. Se incubó 1,0 hora con la enzima Streptoavidina-biotinilada diluida 1/400 en buffer de anticuerpo, a temperatura ambiente con agitación suave. Se lavó tres veces. Se reveló incubando en agitación suave durante aproximadamente 10 minutos, con una solución preparada en el momento, a partir de las siguientes:

- a) 50 ml TBS + 30 ul de agua oxigenada de 30 volúmenes
- b) 10 ml metanol p.a. + 30 mg HRP Color (Bio-Rad Lab.)

Se detuvo la reacción realizando lavados sucesivos con agua destilada.

11. Estimación de las cantidades relativas de proteínas HMG por densitometría.

Para determinar las cantidades relativas de las diversas proteínas tipo HMG de T. cruzi extraídas de cultivos de baja y alta actividad proliferativa, las proteínas se separaron en geles de poliacrilamida-SDS, se fijaron y se tiñeron como se indicó anteriormente (8.a). Los carriles correspondientes se cortaron y se sometieron a análisis densitométrico a 594 nm en un espectrofotómetro de doble haz Shimadzu UV-190.

RESULTADOS

Considerando que la cantidad de proteínas cromosomales HMG en eucariontes superiores es aproximadamente un 3,0% en peso, en relación a las histonas, se requirió de un mínimo de 3,5-4,0 g de epimastigotes (peso húmedo), para visualizar estas proteínas en una electroforesis.

Las proteínas HMG se analizaron en geles de poliacrilamida, inicialmente en el sistema ácido acético-urea, dado que se contaba con información referente al patrón esperable en este sistema, con proteínas HMG de timo de ternero (49,56,118) y de Physarum polycephalum (46). En la Figura No 1, se aprecia que las proteínas HMG de timo de ternero presentan una buena separación electroforética entre ellas. El patrón obtenido es coincidente con los descritos (46,49). Las proteínas HMG 1 y HMG 2 migran próximas entre sí. La histona H1 se ubica bajo HMG 2. Mas abajo se encuentra HMG 14 seguida de HMG 17, junto de otras HMG de menor importancia. En el carril 2 se observa las proteínas tipo-HMG de T. cruzi. Se aprecian seis bandas de las cuales dos presentan migración menor a las HMG 1 y HMG 2 de timo de

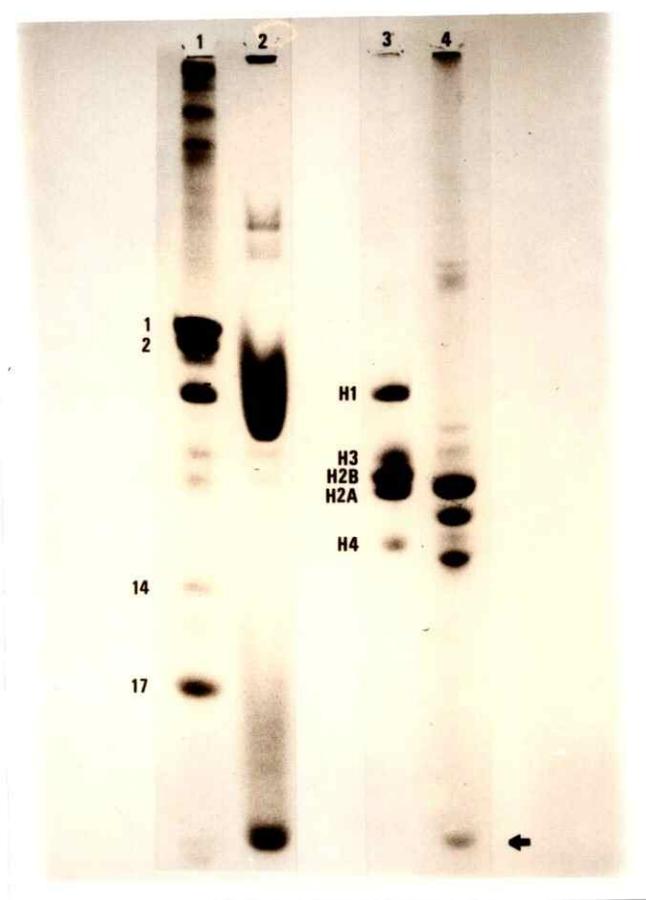


Figura No 1. Electroforesis en gel de poliacrilamida ácido acético-urea de proteínas tipo-HMG de Trypanosoma cruzi.

Electroforesis en gel de poliacrilamida al 15%, en sistema ácido acético-urea 2,5 M. Las proteínas HMG se extrajeron en PCA 0,75 M y las histonas en ácido sulfúrico 0,4 N. Carriles: (1) proteínas HMG de timo de ternero; (2) proteínas tipo-HMG de T. cruzi; (3) histonas de timo de ternero; (4) histonas de T. cruzi.

ternero (carril 1). Una tercera banda grande se localiza a la altura de la histona H1 de timo, seguida de dos bandas mucho más tenues, que comigran con dos proteínas de timo de ternero, a la altura de las histonas del núcleo nucleosomal. Hacia el extremo de este carril, se ubica una proteína de alta movilidad electroforética y bastante abundante, que comigra con una proteína obtenida en la preparación de histonas de T. cruzi (carril 4, flecha). En el carril 3 se presentan las histonas de timo de ternero, H1, H2A, H2B, H3 y H4. En el cuarto carril se encuentran las histonas obtenidas de T. cruzi, donde se observan las diferencias de migración con respecto a las histonas de timo de ternero. La banda de migración más rápida en esta preparación, es equivalente a la obtenida en la muestra de proteínas tipo-HMG de T. cruzi (carril 2).

Con este gel de poliacrilamida-urea-ácido acético, se logró buena separación de las proteínas HMG de timo de ternero y de Trypanosoma cruzi. Sin embargo, la proteína más abundante de T. cruzi que migra a la altura de H1 de timo (carril 2), se presentó como una banda no definida, que cubrió parte importante de la zona de resolución del gel. En esta situación no es posible definir el número de proteínas que puede encontrarse en la región del gel cubierta por la mancha. Debido a este problema y teniendo en cuenta que se ha descrito buena separación de proteínas HMG en geles de poliacrilamida-SDS, se implementó esta técnica. Este tipo de geles permite,

además, estimar el peso molecular de estas proteínas.

Originalmente se intentó el fraccionamiento de las proteínas tipo HMG de T. cruzi, en un sistema de poliacrilamida 12%-SDS, según describe U. K. Laemmli (114). Sin embargo, estas proteínas resultaron ser tan pequeñas como las de timo de ternero, y se desplazaron junto con el colorante de migración. En consecuencia, se empleó geles de poliacrilamida al 15%, en los que se logró buena separación. En la Figura No 2, en el carril 1 se muestra el fraccionamiento típico de las proteínas cromosomales HMG extraídas de timo de ternero. Una banda prominente corresponde a las HMG 1 y 2, mientras que las HMG 14 y 17 se localizan más abajo, hacia la mitad del gel. En el carril 2 se observa las proteínas cromosomales tipo HMG de T. cruzi, que se fraccionan en tres a cuatro bandas de movilidades electroforéticas similares a las HMG de timo. En los carriles 3 y 4 se muestran histonas de timo de ternera y de T. cruzi respectivamente, utilizadas como patrón.

Para incrementar la concentración de las bandas, se introdujo la modificación propuesta por J. Bhorjee (109), que consiste en adicionar a los geles de poliacrilamida-SDS, urea y EDTA. En la Figura No 3 se muestran dos geles realizados con preparaciones de proteínas HMG de timo de ternero. En el gel 1 se adicionó solo urea 0,5 M y se observa que las bandas de proteínas

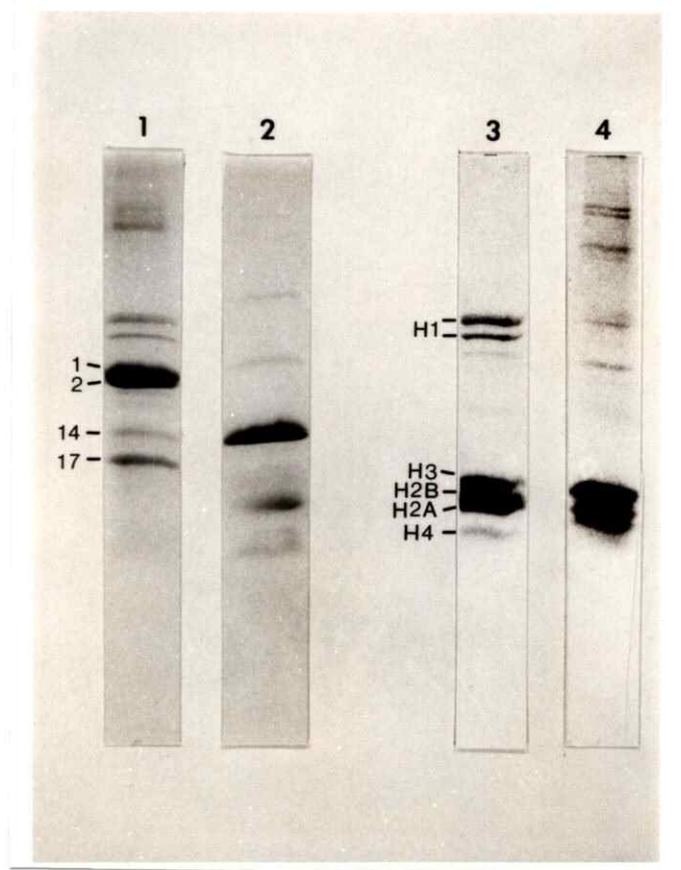


Figura No 2. Electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida de proteínas HMG e histonas de timo de ternero y de Trypanosoma cruzi.

Electroforesis realizada en geles de SDS-poliacrilamida al 15%, según técnica descrita por U. K. Laemmli (114). Las proteínas HMG fueron extraídas en PCA 0,75 M y las histonas en ácido sulfúrico 0,4 N. Se emplearon tripanosomas de cultivos de 7,0 días.

Carriles: (1) proteínas HMG de timo de ternero; (2) proteínas tipo HMG de T. cruzi, forma epimastigote; (3) histonas de timo de ternero; (4) histonas de T. cruzi, forma epimastigote.

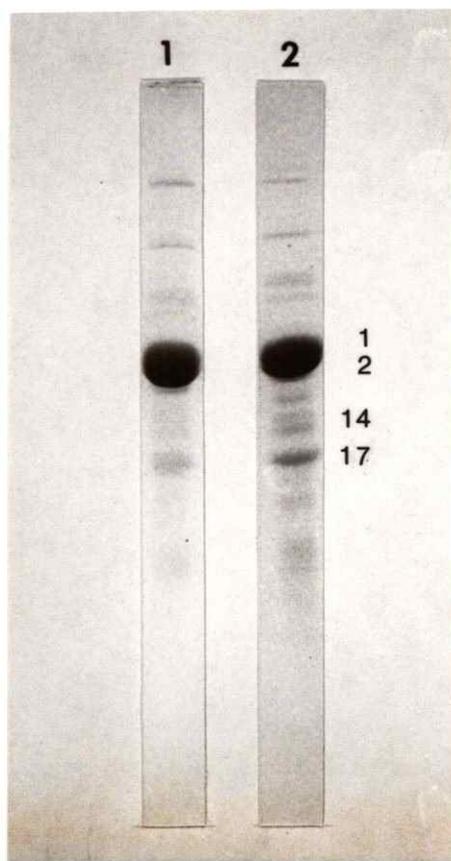


Figura No 3. Electroforesis en geles de SDS-poliacrilamida de proteínas HMG de timo de ternero.

Las proteínas HMG fueron extraídas en PCA 0,75 M.
Electroforesis en geles SDS-poliacrilamida al 15%.

(1) con urea 0,5 M

(2) con urea 0,5 M y EDTA 0,005 M.

más pequeñas son relativamente difusas. En el gel 2, se agregó urea 0,5 M y EDTA 5,0 mM; puede apreciarse ahora que las bandas de proteínas muestran mayor resolución y son más nitidas. Ambos se realizaron bajo las mismas condiciones de migración electroforética.

En cuanto a la extracción de las proteínas HMG, se hace habitualmente empleando el tejido o las células totales (35,44,46,47,50,52,90,109,119,120). Está descrito que en estas condiciones se obtiene mejor pureza y rendimiento que empleando núcleos o cromatina como material de extracción. Sin embargo, consideramos importante repetir estos experimentos, para demostrar que las proteínas extraídas en nuestro laboratorio procedían de la cromatina. En la Figura No 4, se demuestra que esta observación es correcta. El carril 1 muestra las histonas de timo de ternero, utilizadas como patrón. En el carril 2 se muestran las proteínas HMG de timo de ternero, aisladas con PCA 0,75 M directamente del tejido. En el carril 3 se observa las HMG extraídas de la misma manera, pero a partir de cromatina de timo de ternero. Se observa que, como había sido descrito anteriormente, se obtiene mayor pureza y mejor resolución de las HMG de timo en el extracto obtenido directamente del tejido. Por el contrario, cuando se extraen las proteínas HMG a partir de cromatina de timo, se observa mayor contaminación con histona H1, que impide visualizar las HMG 1 y 2. Aparecen además otras proteínas de difícil identificación (flechas).



Figura No 4. Electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida de proteínas HMG de timo de ternero extraídas a partir de cromatina.

Electroforesis en gel SDS-poliacrilamida al 15% con urea 0,5 M y EDTA 0,005 M.

Carriles: (1) histonas de timo de ternero; (2) proteínas HMG de timo de ternero extraídas en PCA 0,75 M, sin aislamiento previo de cromatina; (3) proteínas HMG de timo de ternero extraídas en PCA 0,75 M a partir de cromatina.

En consecuencia, para aislar las proteínas tipo HMG de T. cruzi se empleó la extracción directa de los parásitos con PCA 0,75 M. Esta técnica tiene además la ventaja de disminuir al mínimo la proteólisis, por cuanto las células se colocan directamente en PCA 0,75 M, sin manipulaciones previas (50).

Otro aspecto que fue necesario aclarar, se refiere a la posible oxidación de residuos de metionina de las proteínas cromosomales HMG, durante su extracción. En la Figura No 5 se muestra el fraccionamiento de HMG de timo de ternera extraídas en ausencia (carril 2) o en presencia (carril 3) de tiodiglicol, agente que previene la oxidación mencionada. Considerando que las HMG obtenidas en ausencia del antioxidante muestran bandas bien definidas, que corresponden a las encontradas en la literatura científica, no se empleó rutinariamente el tiodiglicol para la extracción de proteínas HMG. Las histonas totales de timo de ternero (carril 1), se emplearon como patrón.

Habiendo definido las condiciones técnicas de extracción y de separación electroforética, de las proteínas cromosomales HMG en un tejido patrón como el timo de ternero, se realizó una primera caracterización de las proteínas HMG de Trypanosoma cruzi. En la Figura No 6, carril 1, se muestra el fraccionamiento electroforético de poliacrilamida-SDS, 0,5 M urea y 0,005 M EDTA (109). Se observan dos bandas muy próximas entre sí, en la parte superior del gel, que corresponden a la histona H1. Las

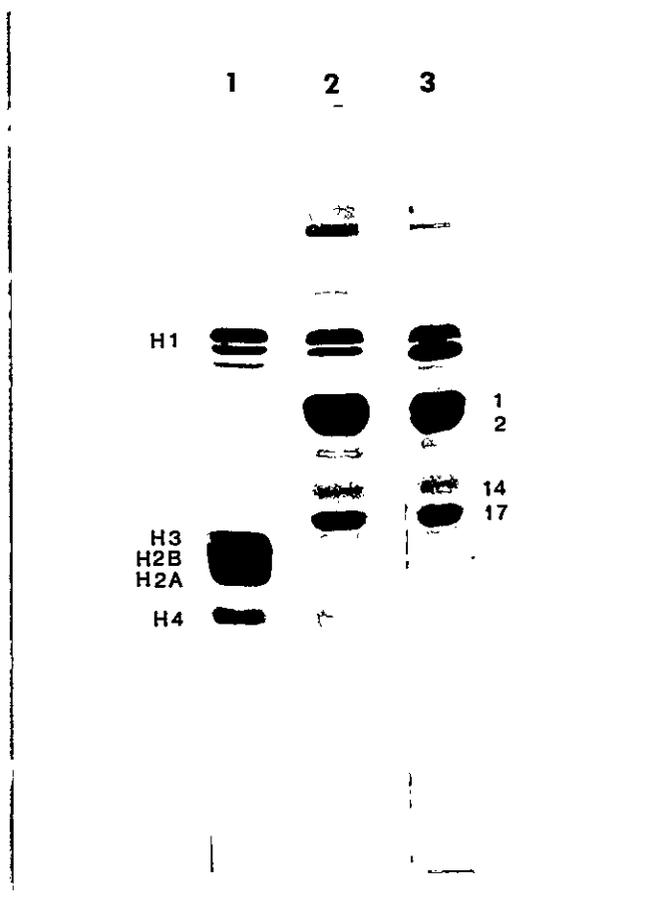


Figura No 5. Electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida de proteínas HMG de timo de ternero extraídas en presencia o ausencia de dodeciglicol.

Electroforesis SDS-poliacrilamida al 15% con urea 0,5 M y EDTA 0,005 M.

Carriles: (1) histonas de timo de ternero; (2) proteínas HMG de timo de ternero extraídas sin dodeciglicol 1,0%; (3) proteínas HMG de timo de ternero extraídas en presencia de dodeciglicol 1,0%.

histonas H2A, H2B y H3, no se separan claramente en este sistema y forman un conjunto. Un tanto separadas de éstas, se localiza la histona H4. Como se ha descrito anteriormente, la mayor parte de las histonas de T. cruzi migran juntas a la altura de las histonas del núcleo nucleosomal de timo de ternero (carril No 2). En el carril 3 se muestran las proteínas HMG de timo de ternero. Como se ha descrito (109), las HMG 1 y 2 migran juntas por debajo de la histona H1, mientras que las HMG 14 y 17 presentan mayor velocidad de migración y clara separación, hacia el extremo del gel. Cabe señalar que las proporciones de HMG 1 y 2 comparadas a HMG 14 y 17 son similares a las descritas, esto es, una mayor cantidad de HMG 1 y 2 con respecto a HMG 14 y HMG 17.

El patrón de migración de las proteínas tipo HMG de T. cruzi, obtenidas de cultivos de 7 días (carril 4), es diferente al presentado por las HMG de timo de ternero (carril 3). Se observan cinco bandas, que se denominaron A, B, C, D y E. La proteína A, que se aprecia como una banda muy tenue, presenta una movilidad electroforética menor que la histona H1 de timo de ternero; mientras que la proteína B, migra casi a la misma altura de HMG 1 de timo. La proteína C, que es la más abundante, se ubica un poco más arriba de HMG 14. La proteína D tiene una movilidad similar a las histonas del núcleo nucleosomal y la banda E, que se aprecia más difusa, presenta una movilidad mayor que ellas.

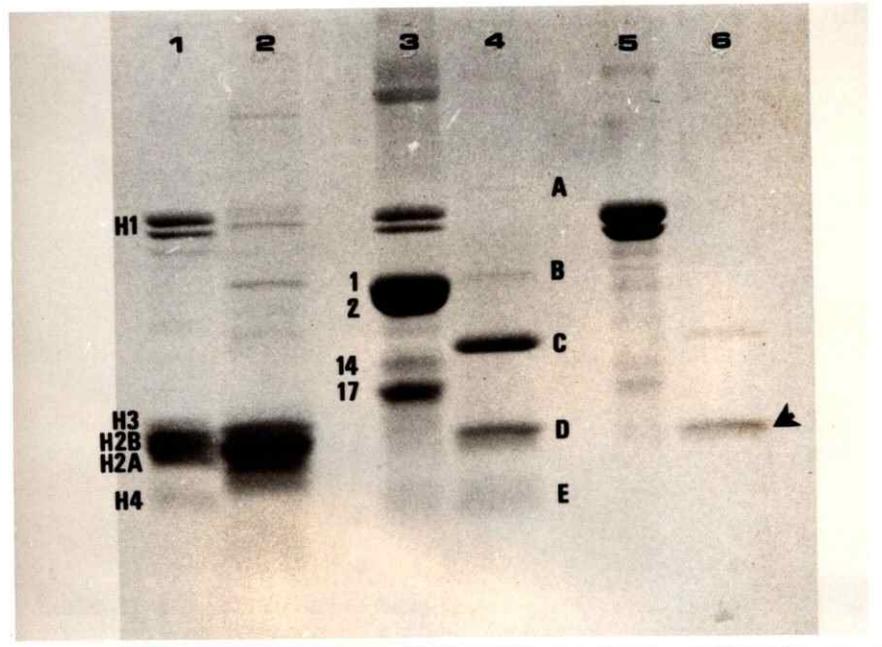


Figura No 6. Electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida de proteínas tipo-HMG de Trypanosoma cruzi.

Las muestras fueron analizadas por electroforesis en geles de SDS-poliacrilamida al 15%, con urea 0,5 M y EDTA 0,005 M. Las histonas se extrajeron en ácido sulfúrico 0,4 N. Las proteínas HMG se extrajeron en PCA 0,75 M y se precipitaron con 6,0 volúmenes de acetona; histona H1 se precipitó con 3,5 volúmenes de acetona.

Carriles: (1) histonas de timo de ternero; (2) histonas de T. cruzi; (3) proteínas HMG de timo de ternero; (4) proteínas HMG de T. cruzi; (5) histona H1 de timo de ternero; (6) histona H1 de T. cruzi (flecha).

Debido a que la histona H1 en eucariontes superiores puede ser parcialmente co-extraída en los procedimientos de extracción de las proteínas HMG, se obtuvieron preparaciones de la histona H1 tanto de timo de ternero como de T. cruzi, a fin de identificarlas en las muestras de proteínas HMG.

La preparación de histona H1 de timo de ternero, se muestra en el carril No 5. Se observan dos gruesas bandas que destacan sobre los contaminantes. En la preparación de H1 de T. cruzi, carril 6, puede observarse que aparece en forma relevante la proteína D (flecha), la que co-migra con las histonas del núcleo nucleosomal. Esta proteína podría corresponder a una histona H1 de T. cruzi, la que por presentar características distintas a la de eucariontes superiores migraría en dicha posición. Una segunda proteína, cuantitativamente menos importante, presenta una movilidad electroforética ligeramente menor que la banda C.

En la Figura No 7 se muestra una electroforesis, en sistema de poliacrilamida-SDS, donde se observan las proteínas HMG de T. cruzi (carril 2), junto a sus controles de timo de ternero (carril 1). La migración de estas proteínas es como se describió en la electroforesis anterior. En el carril 3 se muestra la migración electroforética de proteínas marcadoras de peso molecular conocido. Se midió la migración en el gel de las proteínas marcadoras de peso molecular, de las HMG de timo

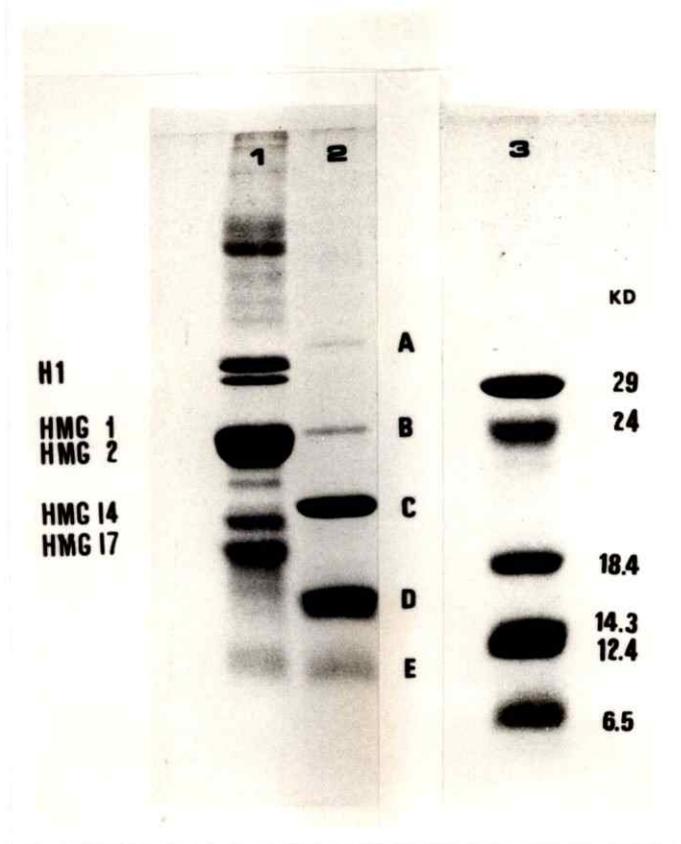


Figura No 7. Electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida de proteínas tipo-HMG de Trypanosoma cruzi con marcadores de peso molecular.

Las proteínas fueron analizadas por electroforesis en geles de SDS-poliacrilamida al 15%, con urea 0,5 M y EDTA 0,005 M. Carriles: (1) proteínas HMG de timo de ternero; (2) proteínas tipo HMG de T. cruzi; (3) marcadores de peso molecular: anhidrasa carbónica (29.000), tripsinógeno (24.000), β -lactoglobulina (18.400), lisozima (14.300), citocromo c (12.400), aprotinina (6.500).

de ternero y de las tipo-HMG de T. cruzi, y se calculó su movilidad. Se graficó los valores de peso molecular de los marcadores con sus respectivas movilidades. Se obtuvo una recta sobre la cual se interpoló las movilidades de las proteínas HMG de timo y tipo-HMG de T. cruzi, Figura No 8. Los valores de peso molecular estimados se presentan en la Tabla No 1. Puede apreciarse que los valores de pesos moleculares de las proteínas tipo-HMG de T. cruzi fluctúan entre aproximadamente 35.540 y 10.380 daltons. Los pesos moleculares para las proteínas HMG de timo de ternero varían en el rango comprendido entre 25.465 y 18.248 daltons. Los pesos moleculares estimados para proteínas HMG de timo, guardan bastante similitud con los registrados en la literatura, también obtenidos por migración electroforética (61,62).

Teniendo como antecedentes la solubilidad en ácido perclórico, la migración electroforética y el peso molecular, que indican una posible naturaleza de proteínas tipo-HMG para las proteínas aisladas de Trypanosoma cruzi, se procedió a estudiar una posible reacción inmunológica cruzada, con sueros anti-HMG de timo de ternero. Para ello se empleó suero de conejos inoculados con proteínas HMG de timo, obtenido en el laboratorio de la Dra. María Imschenetzski, Universidad de Concepción.

En la Figura No 9, se muestra la preparación de proteínas HMG de timo de ternero, con que se inoculó a los animales. Puede observarse que dicha preparación está

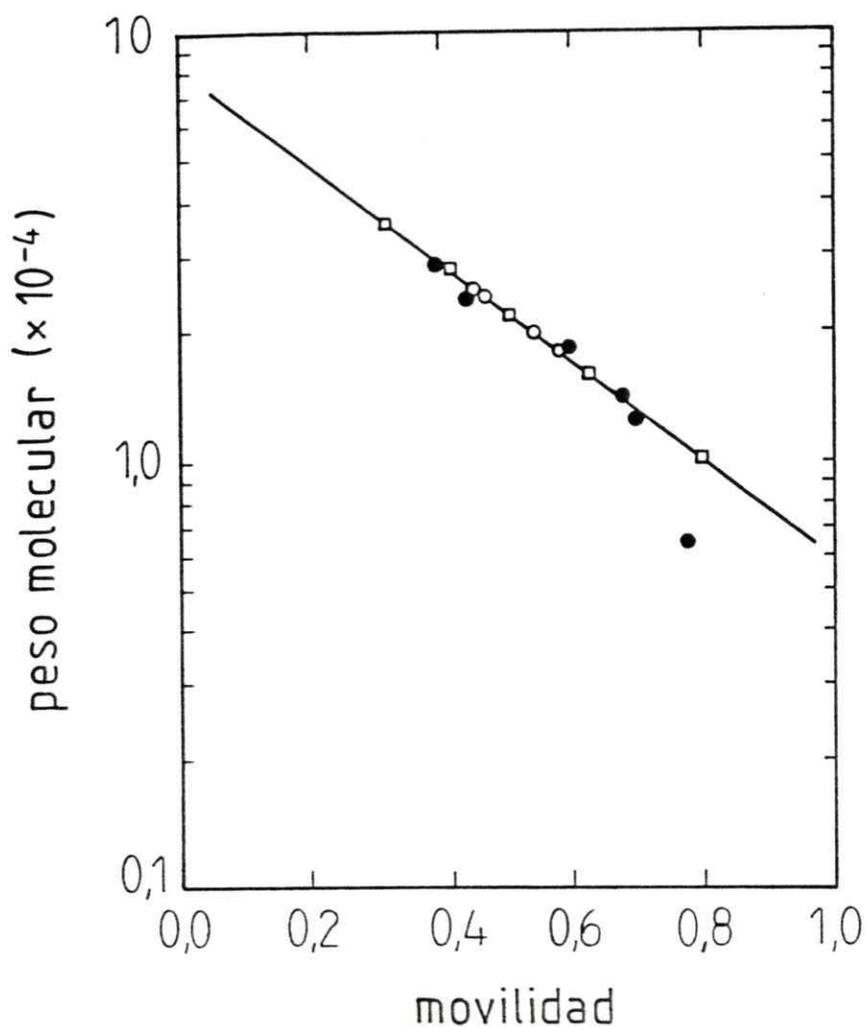


Figura No 8. Peso molecular versus movilidad electroforética en geles de SDS-poliacrilamida de marcadores de peso molecular, proteínas HMG de tino de ternero y de Trypanosoma cruzi.

La movilidad electroforética se determinó en geles de SDS-poliacrilamida al 15%, según se describió en Materiales y Métodos, sección No 9.

(●): marcadores de peso molecular; (○): proteínas HMG de tino de ternero; (□): proteínas tipo-HMG de Trypanosoma cruzi.

Tabla No 1

Estimación de pesos moleculares de proteínas HMG de timo de ternero y de proteínas tipo-HMG de Trypanosoma cruzi por migración en geles de SDS-poliacrilamida

HMG timo	PM	Tipo HMG <u>T. cruzi</u>	PM
1	25.456	A	35.538
2	24.821	B	27.501
14	20.219	C	21.835
17	18.248	D	16.053
		E	10.381

Las proteínas se extrajeron en PCA 0,75 M.
 La electroforesis se realizó en geles SDS-poliacrilamida al 15%. Los pesos moleculares se estimaron como se indica en Materiales y Métodos, sección No 9.

libre de histona H1, que comúnmente se co-extrae junto con las proteínas HMG. Es importante indicar que la preparación presenta una proporción de proteínas HMG 1 y HMG 2 mayoritaria sobre HMG 14 y HMG 17.

Se sometió las proteínas HMG de timo de ternero, HMG de Trypanosoma cruzi e histonas de timo, a separación electroforética en sistemas de poliacrilamida-SDS en mini-geles. Se transfirió las proteínas a papel de nitrocelulosa y se incubó con el suero de conejo anti-HMG de timo de ternero. En la Figura No 10, se muestra una fuerte reacción con las proteínas HMG 1 y HMG 2 de timo, que son mayoritarias en dichas preparaciones (carril 2). No se observa reacción cruzada con las histonas de timo, empleadas como control (carril 6). Con las proteínas tipo HMG de Trypanosoma cruzi (carril No 4), se detectó una marcada reacción inmunológica con la banda B (*), que presenta migración muy similar a HMG 1 y HMG 2 de timo de ternero. También hay reacción con el polipéptido A (*). Este resultado fue reiterativo en las cuatro oportunidades que el experimento se realizó. Los experimentos de inmunotransferencia se realizaron paralelamente empleando mini-geles de SDS-poliacrilamida, con y sin urea 0,5 M más EDTA 0,005 M, dado que no se tenía antecedentes si éstos interferían con las reacciones posteriores. Los resultados en ambos casos fueron totalmente equivalentes.

La ausencia de reacción cruzada con las histonas de timo de ternero (carril No 6), corrobora la



Figura No 9. Electroforesis en mini-geles de SDS-poliacrilamida de proteínas HMG de timo de ternero.

Los mini-geles se realizaron en SDS-poliacrilamida al 15% con urea 0,5 M y EDTA 0,005 M.

Carriles: (1) marcadores de peso molecular (albúmina de bovino (66.000), albúmina de huevo (45.000), tripsinógeno (24.000), β -lactoglobulina (18.000), lisozima (14.300)), (2) preparación de proteínas HMG de timo de ternero con que se preparó el suero anti-HMG, (3) histonas de timo de ternero.

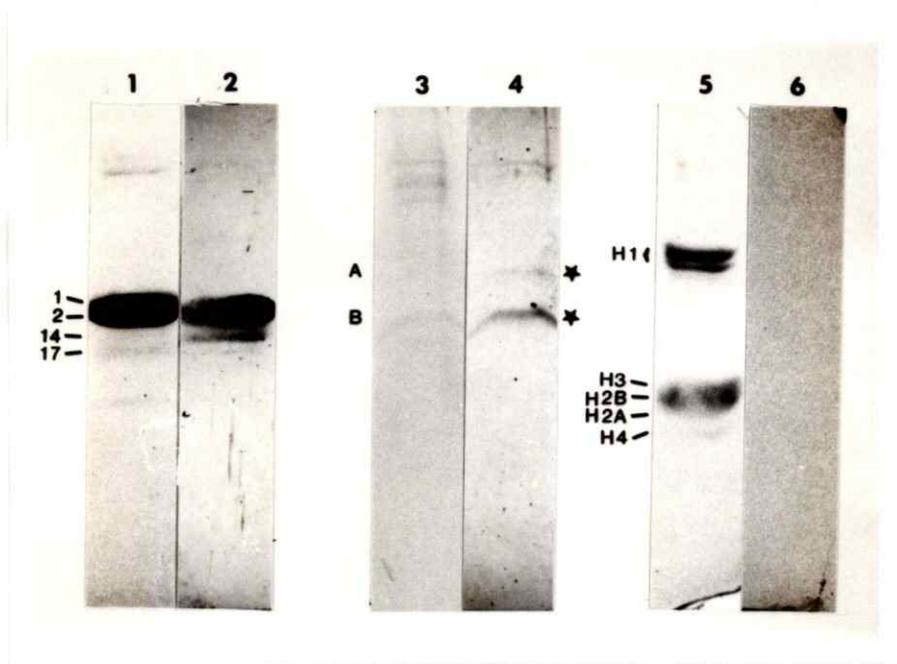


Figura No 10. Inmunotransferencia de proteínas tipo-HMG de Trypanosoma cruzi

Las proteínas HMG y las histonas se separaron por electroforesis en mini-geles de SDS-poliacrilamida al 15%, con urea 0,5 M y EDTA 0,005 M..

Proteínas remanentes en geles después de transferencia a papel de nitrocelulosa, carriles: (1) proteínas HMG de timo de ternero, (3) proteínas tipo HMG de T. cruzi, (5) histonas de timo de ternero.

Reacción inmunológica en papel de nitrocelulosa, carriles: (2) proteínas HMG de timo de ternero, (4) proteínas tipo HMG de T. cruzi, (6) histonas de timo de ternero.

Suero: anti-HMG de timo de ternero, dilución 1/25.

especificidad de las reacciones obtenidas.

Con estos resultados, se consideró interesante estudiar el tipo y cantidad relativa de las proteínas HMG de T. cruzi, en estados de reposo proliferativo o de alta actividad proliferativa.

En primer lugar se determinó la curva de crecimiento del parásito. En la Figura No 11, se observa que dicho cultivo tiene una fase de rápido crecimiento, de tipo exponencial, durante los días 3 a 8. En los días posteriores, el cultivo crece más lentamente, llegando a un estado estacionario en el cual prácticamente no se observa un crecimiento apreciable (día 14).

Considerando que la curva de crecimiento nos informa sobre la división de las células, se estudió además, la incorporación de timidina tritiada en el DNA de células que se encontraban en la fase exponencial de la curva de crecimiento, y en células en fase estacionaria, a fin de tener indicios sobre la síntesis de DNA en esas condiciones. Previamente se determinó la incorporación de timidina tritiada en el DNA del parásito en función del tiempo, y en tres medios de incubación diferentes: medio basal de Diamond, PBS con glucosa 0,5% (PSG) y PBS. En la Figura No 12 se muestra que la mejor incorporación del radiactivo se logra incubando las células en PBS. En todo caso, la incorporación en PSG es mejor que en el medio basal de Diamond, el cual es rico en nutrientes.

Con esta información se determinó la

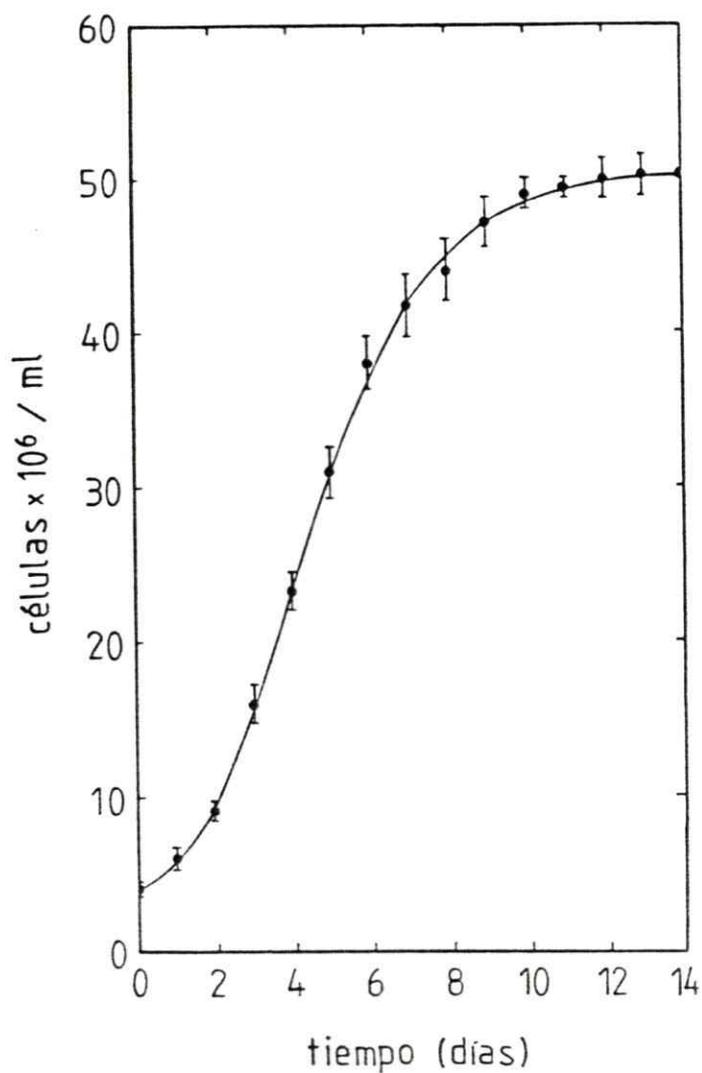


Figura No 11. Curva de crecimiento de epimastigotes de Trypanosoma cruzi.

Cultivo de epimastigotes de T. cruzi mantenido en medio Diamond, adicionado con hemina de bovino (7,5 uM) y suero fetal de bovino (2,5%), a 28 grados centigrados.

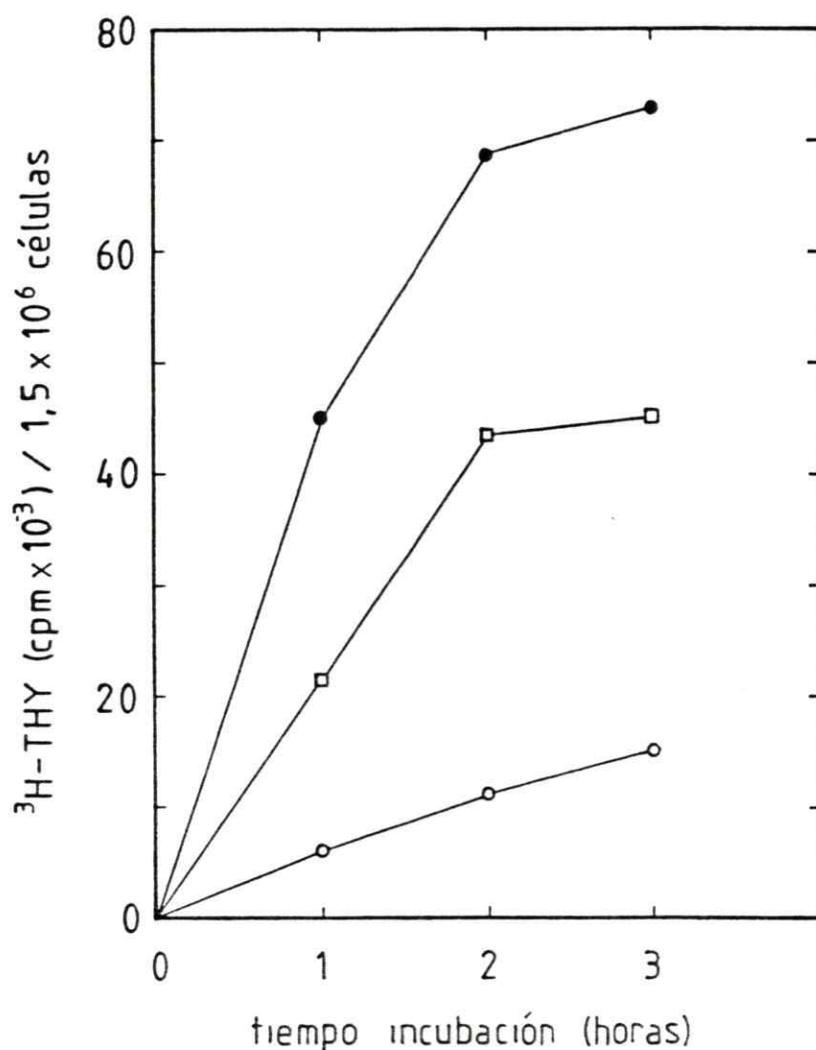


Figura No 12. Incorporación de timidina tritiada en epimastigotes de Trypanosoma cruzi mantenidos en diferentes medios de cultivo.

Se incubaron 1,5 millones de células/ml con 10 ul de timidina (metil tritiada)/ml, con una actividad específica de 60 Ci/m mol, a 28 grados centígrados.

Los medios de incubación fueron: (●) PBS pH 7,2; (□) PSG (PBS + glucosa 0,5%); y (○) medio Diamond.

incorporación de timidina tritiada, en el DNA de células provenientes de un cultivo en fase exponencial de crecimiento, y en fase estacionaria. Los valores se presentan en la Tabla No 2. Como era esperable, se observa que la cantidad de marca obtenida en células en fase exponencial de crecimiento, así como la velocidad de incorporación, son aproximadamente diez veces superior al registrado para células en fase estacionaria.

Con estos antecedentes se aislaron proteínas tipo-HMG de T. cruzi de cultivos de 5 y 14 días respectivamente; es decir, de cultivos en alta y baja actividad proliferativa. Las muestras obtenidas se analizaron en geles de poliacrilamida-SDS al 15%. El patrón de proteínas obtenido en cada caso se muestra en la Figura No 13. Como se mostró en la Figura No 6, las proteínas A y B son proporcionalmente menos evidentes. Analizando las proteínas C, D y E, que se obtienen en mayor cantidad, se observa que las proporciones relativas parecen ser diferentes en distintos estados proliferativos. Así, se aprecia en la Figura No 13 que las células en fase exponencial, presentan estas tres proteínas claramente. Las células en fase estacionaria, por el contrario, muestran la banda D menos intensa y la banda E apenas se distingue. Ambos carriles de la electroforesis fueron analizados por densitometría y los resultados obtenidos se encuentran en la Figura No 14. Se observa que en células en alta proliferación la proteína E es la

Tabla No 2

Incorporación de timidina tritiada en DNA de Trypanosoma cruzi

CULTIVO	TIMIDINA TRITIADA EN DNA	
	(cpm)	(pmoles/h)
Fase proliferativa	42.229 ± 14.952	0,674 ± 0,239
Fase estacionaria	4.345 ± 734	0,069 ± 0,012

La incubación se realizó en PBS pH 7,5 a 28 C, por una hora, con preincubación de 20 min. En la incorporación se utilizó 1,5 millones de epimastigotes/ml. Se empleó 10 ul de timidina (metil tritiada), con una actividad específica de 60 Ci/m mol. La velocidad de incorporación se expresa en pmoles/hora.

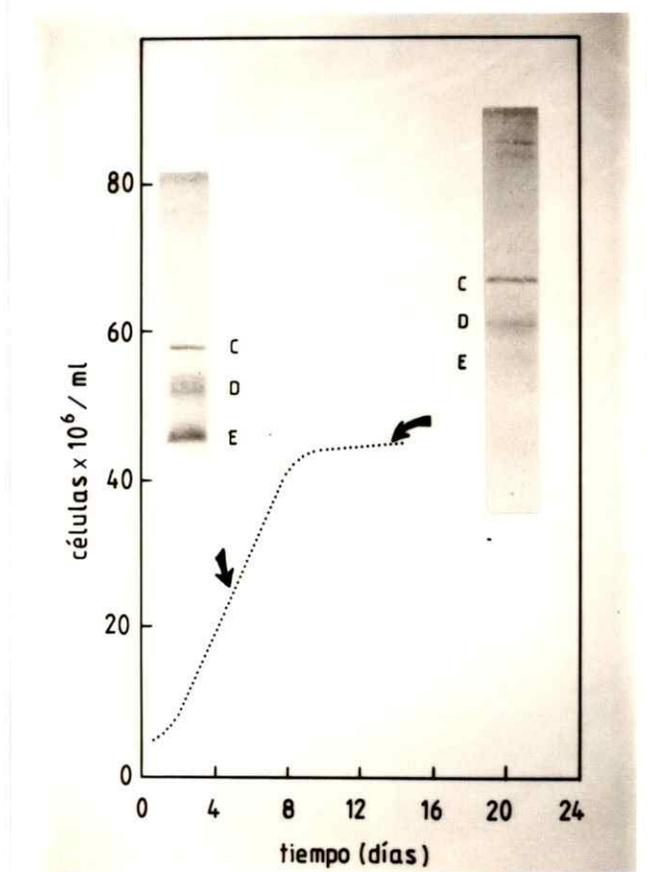


Figura No 13. Electroforesis de proteínas tipo-HMG de Trypanosoma cruzi de cultivos exponenciales y estacionarios.

Las proteínas se extrajeron en PCA 0,75 M, de cultivos de epimastigotes en fase exponencial y en fase estacionaria de crecimiento. Se analizaron en geles de SDS-poliacrilamida al 15%, con urea 0,5 M y EDTA 0,005 M.

mayoritaria, seguida de la proteína D y de la C, que aparece en pequeña cantidad relativa. En células con baja actividad proliferativa, la proteína C es aparentemente más abundante, seguida de D y finalmente de la E. Para corroborar esta apreciación, se recortó y pesó el área de cada curva. Los valores obtenidos, expresados en porcentaje, se señalan entre paréntesis sobre los picos de la densitometría, en la Figura No 14. Se reafirma que en células en activa proliferación, la proteína E es mayoritaria; la cantidad de esta proteína disminuye considerablemente en células con baja actividad proliferativa. Por el contrario, la proteína C que se encuentra en baja proporción en células en activa proliferación, incrementa considerablemente en células con baja actividad proliferativa. Más aún, la suma de las proteínas HMG-C y HMG-E, es mayor en células en activa proliferación que en aquellas en fase estacionaria (63,1% vs 56,6%). La proteínas HMG-D no se consideró porque su variación no es marcada en los dos estados proliferativos y porque pudiese corresponder a una histona H1 del parásito. Frecuentemente, al realizar extracciones de proteínas tipo-HMG de T. cruzi, a partir de cantidades equivalentes de parásitos, se obtuvo una cantidad de proteínas mayor en aquellos cultivos que se encontraban en activa proliferación, sobre los que estaban en fase estacionaria de crecimiento. Se determinaron valores de aproximadamente 32,5 ug HMG/g peso húmedo para cultivos en activa

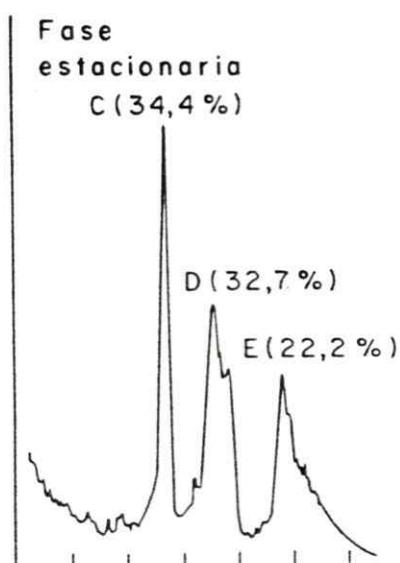
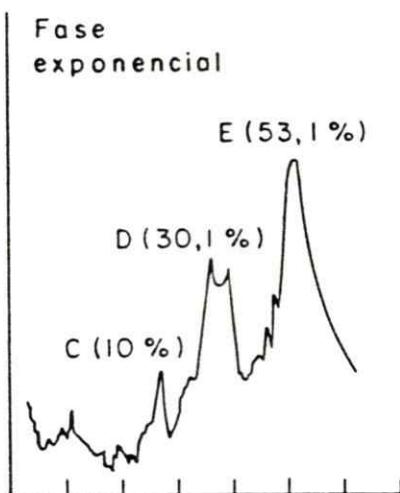


Figura No 14. Análisis densitométrico de proteínas tipo-HMG de Trypanosoma cruzi de cultivos en fase exponencial y estacionaria de crecimiento.

Proteínas tipo-HMG de T. cruzi fueron extraídas de cultivos en fase exponencial y en fase estacionaria de crecimiento. Se fraccionaron en geles de SDS-poliacrilamida al 15%. Se realizó análisis densitométrico en espectrofotómetro de doble haz Shimatzu UV-190 (Gel Scanner Model GSC-3). Los valores entre paréntesis corresponden al Área (%) de cada curva con respecto al total.

proliferación, y 21,04 ug HMG/g peso húmedo para cultivos en fase estacionaria.

DISCUSION

Por los datos obtenidos durante el desarrollo de esta tesis, puede informarse por primera vez, de la existencia de proteínas cromosomales de alta movilidad electroforética (HMG), en el parásito Trypanosoma cruzi.

En eucariontes superiores han sido bien estudiadas principalmente cuatro proteínas HMG, denominadas 1, 2, 14 y 17.

En Trypanosoma cruzi se aisló cinco polipeptidos, (A,B,C,D y E), con características de solubilidad y electroforéticas que corresponden a proteínas HMG, de los cuales el denominado D, es posiblemente histona H1 (30, 31). Descartando esta proteína, puede decirse que T. cruzi presenta cuatro proteínas tipo HMG, número equivalente a las de eucariontes superiores. Sin embargo, las proteínas obtenidas de T. cruzi presentan algunas características propias. Sus pesos moleculares están dentro de un mismo orden de magnitud, que las HMG de timo de ternero, pero guardan diferencias. Así, la proteína tipo

HMG de T. cruzi de mayor tamaño (A), es de aproximadamente 35.500 daltons, siendo HMG 1 de timo de ternero la más grande, con 25.500 daltons. La proteína B de T. cruzi, posee un peso molecular bastante similar al de HMG 2. HMG 14 y proteína C de T. cruzi también poseen un peso molecular parecido.

Los valores estimados de peso molecular de proteínas HMG de timo de ternero, en esta tesis, guardan buena relación con los resultados de otros autores (61,62). Este hecho valida la técnica empleada para estimar los pesos moleculares de las proteínas tipo-HMG de T. cruzi. En consecuencia, las estimaciones realizadas son suficientes para comparar pesos moleculares de las proteínas tipo HMG de T. cruzi, con las de timo de ternero.

En otros eucariontes inferiores también se han realizado estudios de los pesos moleculares de las proteínas HMG aisladas. Inicialmente se aisló en Physarum polycephalum, una proteína tipo HMG, con un peso molecular de 15.900 daltons, estimado en geles SDS (118). Posteriormente, en Physarum polycephalum, han sido encontradas principalmente cuatro proteínas tipo HMG (AS-1, AS-2, AS-3, AS-4), con movilidades electroforéticas distintas a las de HMG de organismos superiores. Sus pesos moleculares estimados por su migración en geles de SDS-poliacrilamida (46), son bastante similares a los de Trypanosoma cruzi. Así, AS-1 de Physarum polycephalum

tiene un peso molecular de 26.100 y HMG-B de T. cruzi 27.500, AS-2 es de 20.500 y HMG-C de 21.835, AG-3 y AG-4 poseen pesos moleculares de 16.500 y 16.000 respectivamente, y HMG-D es de 16.053 daltons.

Otros autores trabajando con Physarum polycephalum, han obtenido principalmente tres proteínas tipo HMG, (HMG-1P, HMG-2P y HMG-14/17P). Ninguna de ellas comigra con alguna de las HMG de timo de ternero. A pesar de ello, encuentran estas proteínas preferentemente asociadas con cromatina activa, ya que son liberadas al tratar núcleos con digestiones suaves con DNasa I (45).

Al revisar la literatura científica de 1973 en adelante, puede advertirse que si se compara con vertebrados, las proteínas tipo HMG de eucariontes inferiores, han sido poco caracterizadas con respecto a sus propiedades moleculares. Existen datos que demuestran claramente, que estas proteínas difieren de las de HMG de eucariontes superiores, al menos en su composición aminoacídica y conducta electroforética.

Aparentemente, el hecho de que T. cruzi presente proteínas tipo HMG con movilidades electroforéticas diferentes a las de vertebrados, no es una excepción. Además del caso de Physarum polycephalum, existen otros ejemplos.

En el hongo Saccharomyces cerevisiae, han sido analizadas principalmente cuatro proteínas HMG (S1,

S2, S3, S4), cuyas composiciones aminoacídicas son similares a las de timo de ternero. Sin embargo, las movilidades electroforéticas, tanto en sistemas ácido acético-urea como SDS, difieren de las de HMG de eucariontes superiores. A pesar de ello, S3 posee una movilidad electroforética similar a la de HMG 17, pero con una composición de aminoácidos diferentes (42).

En embriones de Drosophyla melanogaster, con las metodologías empleadas para la extracción de proteínas HMG, se obtuvo principalmente tres proteínas. La más prominente de ellas en cantidad es la histona H1, las otras dos son A63 y A13, cuyos pesos moleculares estimados por electroforésis en geles SDS-acrilamida, corresponden a 63.000 y 13.000 daltons respectivamente. Ambas proteínas son ricas en lisina, y contienen grandes cantidades de aminoácidos ácidos. Sin embargo, A63 es un poco menos básica que las HMG de vertebrados. Se ha propuesto que si las proteínas HMG de vertebrados tuviesen análogos funcionales en Drosophila, probablemente corresponderían a las proteínas tipo HMG encontradas (40).

Existen algunos estudios de proteínas HMG en protozoos. Se ha encontrado proteínas HMG (A, B, C, D) en Tetrahymena, un protozoo ciliado. Estas proteínas constituyen componentes estructurales de los nucleosomas del macronúcleo de Tetrahymena, y muestran propiedades de solubilidad, conducta cromatográfica en carboximetilcelulo-

sa, movilidad electroforética en diversos sistemas de geles y composición aminoacídica similar a la de mamíferos. A su vez, estas proteínas pueden sufrir modificaciones post-traduccionales, como fosforilación y ADP ribosilación (44).

Comparando los datos obtenidos en T. cruzi, con los registrados en la literatura científica, puede concluirse que en eucariontes inferiores, el número de proteínas tipo HMG fluctúa entre dos y cuatro, y sus pesos moleculares y migraciones electroforéticas, si bien no son en todos los casos diametralmente diferentes a eucariontes superiores, guardan diferencias con éstos.

Al realizar el análisis electroforético de las proteínas tipo HMG de Trypanosoma cruzi, en sistema ácido acético-urea, se visualizan seis bandas a diferencia de las cinco que se observan en geles SDS-poliacrilamida.

Las electroforesis en sistemas SDS, separan las proteínas principalmente por su tamaño molecular, y aquellas en sistema ácido acético-urea, por carga eléctrica. Esto implica que el patrón de bandeo de un mismo conjunto proteico, puede ser diferente dependiendo del sistema empleado. Ello se aprecia en el caso de las proteínas HMG 1 y HMG 2 de timo de ternero, que en geles SDS-acrilamida migran muy próximas, observándose muchas veces una sola banda grande. Las mismas proteínas fraccionadas en geles ácido acético-urea, se separan claramente una de la otra.

En el caso de T. cruzi, por la cantidad en

que se aprecia la tercera banda de los geles ácidos, es posible suponer que tal vez dicha proteína corresponde a la que se ha denominado tipo HMG-C, en geles SDS. La banda que migra más rápido en los geles ácidos, probablemente corresponda a la proteína tipo HMG-D, que en geles SDS comigra con una posible H1 de T. cruzi. En sistemas de geles ácidos, las preparaciones de histonas de T. cruzi presentan una banda de alta movilidad electroforética, que por diversas evidencias se ha asignado a una histona H1 (30,31). Posiblemente alguna de las otras proteínas tipo HMG de T. cruzi, que en sistemas SDS migran como una sola banda, se disocie en dos en sistemas ácidos, y por eso se obtendría un número mayor de bandas.

Por los resultados obtenidos de algunos de los experimentos de esta tesis, fué claro que la metodología más ventajosa para la obtención de proteínas HMG, fué la que implica la extracción directa con ácido perclórico. La obtención previa de cromatina da un rendimiento muy bajo en proteínas HMG, y aparece un mayor número de productos de degradación. Un trabajo similar realizado en timo de ternero por Goodwin y cols.(119), llevó a la conclusión que el tejido de timo posee un alto nivel de enzimas proteolíticas, que no son completamente inhibidas por PMSF. Demuestran también que el mejor método de extracción es empleando directamente ácido perclórico sobre el tejido total. Esto fué corroborado en esta tesis.

El hecho que las proteínas aisladas de T. cruzi, fueran extraídas por una metodología ampliamente utilizada para obtener proteínas HMG (35,47,50,52,119,121), además del número de bandas, su movilidad electroforética y sus pesos moleculares, indican con bastante probabilidad que las proteínas obtenidas corresponden a proteínas HMG, similares a las de eucariontes superiores.

El resultado de los experimentos inmunológicos es de gran relevancia, dado que reafirman la naturaleza de proteínas HMG de los polipéptidos obtenidos de T. cruzi. El que la reacción inmunológica sea de preferencia con los polipéptidos A y B, no descarta a las demás proteínas obtenidas de T. cruzi, como proteínas tipo HMG. Pudiera ser que las proteínas restantes no se asemejen tanto a HMG 1 y HMG 2 de eucariontes superiores, que son las constituyentes mayoritarias en las muestras con las que se preparó los sueros.

Se han realizado estudios inmunológicos entre proteínas HMG obtenidas de eucariontes inferiores, y HMG de eucariontes superiores. En un trabajo realizado en Saccharomyces cerevisiae en crecimiento exponencial, se aisló tres polipéptidos, C1, C2 y C3. La proteína C1 es preferentemente liberada en digestiones con nucleasa micrococcal y DNasa I, y su contenido de aminoácidos básicos es bastante menor que el contenido descrito para proteínas HMG. Uno de los polipéptidos aislados tiene reacción

cruzada con anticuerpos anti-HMG 1 de timo de ternero. No se detecta reacción cruzada entre anticuerpos anti-HMG 14 y 17 y los polipéptidos de tipo C o S (43).

De Tetrahymena termophila se aisló dos proteínas HMG, LG-1 y LG-2. Se preparó anticuerpos policlonales contra cada una de ellas. No se encontró reacción cruzada cuando se probaron los anticuerpos contra proteínas HMG aisladas de timo de ternero o eritrocitos de pollo. Estos anticuerpos tampoco tuvieron reacción cruzada con proteínas tipo HMG de levadura. Esto sugiere que en este caso, las proteínas tipo HMG LG-1 y LG-2 son significativamente diferentes a las proteínas HMG de eucariontes superiores (47). Este resultado es bastante sorprendente, si se toma en consideración que tanto T. cruzi como Tetrahymena pertenecen al reino Protozoa, aunque a distinto Phylum. T. cruzi pertenece al Phylum Sarcomastigofora y Tetrahymena al Phylum Ciliofora (121).

Se ha preparado anticuerpos monoclonales contra las proteínas HMG 1, 2a y 2b de cromatina de eritrocitos de gallina. Estos anticuerpos se probaron con proteínas HMG aisladas de diversas plantas, de vertebrados e invertebrados. Ninguno de los anticuerpos reaccionó con estas proteínas obtenidas de las especies de plantas e invertebrados utilizados (embriones de trigo, brotes de maíz, levadura y mosca de la fruta). Con las proteínas de los vertebrados empleados (peces, anfibios, reptiles, aves y

mamíferos), hubo reactividad preferencial de los anticuerpos, que fuè acorde a a la taxonomía tradicional, obteniéndose como resultado que las proteínas HMG de aves están aparentemente más estrechamente relacionadas con reptiles, y menos relacionadas con las de mamíferos, anfibios, peces óseos y peces sin mandíbula (41). Estos datos resultan útiles incluso como herramienta taxonómica, para estudiar las relaciones entre diversos grupos. Las proteínas HMG de trigo han sido analizadas por otros autores (38), encontrándose cuatro (a, b, c, d) con movilidades electroforéticas y composición de aminoácidos similares a las tejidos de mamíferos (38). Es curioso entonces, que no se registrara reacción cruzada con las proteínas HMG 1, 2a y 2b de aves. Quizás las HMG de trigo se asemejen más a las proteínas HMG 14 y 17 de eucariontes, no estudiadas en dicho trabajo (41). Sin embargo, la distancia filogenética entre aves y plantas es suficientemente extensa como para dar cuenta de los resultados. Volviendo al T. cruzi, este tiene un origen aún más ancestral que el de plantas y aves, y sus proteínas tipo HMG tienen reacción cruzada con las de eucariontes superiores. Un hecho sorprendente si se considera que los Trypanosomatidae se separaron de la línea principal del árbol filogenético de los eucariontes, hace alrededor de mil millones de años, no mucho después de la aparición de los primeros eucariontes, y por lo tanto, antes que se separaran los demás grupos eucariontes (4). Así, el

reino Protista es evolutivamente el más ancestral, y a su vez el más diverso (4). Esta enorme diversidad interna, podría dar cuenta del hecho de las proteínas HMG de distintos miembros de este reino, sean distintas entre sí, y que su grado de semejanza con las HMG de eucariontes también sea diferente.

Para las caracterizaciones realizadas en las proteínas tipo HMG de T. cruzi, se emplearon siempre células de cultivo de siete días, es decir, células que se encontraban en la fase media de la curva de crecimiento. Las células de cultivo pertenecientes al inicio de la fase exponencial de crecimiento, presentaban gran cantidad de formas de división, mucha movilidad del flagelo, abundancia de agrupaciones celulares sobre un punto ("rosetas"), y una alta incorporación de timidina tritiada. Con estos antecedentes, se los consideró como cultivos con gran cantidad de células con alta actividad proliferativa. A su vez, en los cultivos correspondientes a la fase final de la curva de crecimiento, se observó muy pocas formas en división, casi nunca se encontró "rosetas", el movimiento de las células es lento, poco vigoroso, y la incorporación de timidina tritiada es diez veces menor que en caso de cultivos exponenciales. Estos cultivos se los consideró entonces, formados mayoritariamente por células en reposo proliferativo. Se estudió los tipos y cantidades de

proteínas tipo HMG de T.cruzi en los dos tipos de cultivos referidos, es decir, cultivos de alta y baja actividad proliferativa. Analizando los patrones electroforéticos se observó que estos difieren en ambos estados, y que la cantidad total de proteínas tipo HMG es un tanto menor en cultivos en reposo proliferativo.

La fluctuación en las cantidades de proteínas HMG en algunas células, dependiendo del estado de diferenciación o proliferación en que se encuentran, ha sido investigado en algunos casos. Como ejemplo de ello, se demostró que en testículos de ratas, los niveles de HMG 2 aumentan de 2 a 5 veces en tejidos en proliferación del mismo órgano (104-106). Por otro lado en células de neuroblastoma de ratón, se ha observado que los niveles de HMG 1 y HMG 2 decrecen cuando se inhibe la mitosis. Esta disminución también ocurre cuando las células son inducidas a diferenciarse irreversiblemente (52). Seyedin y cols. postulan que aunque los niveles de HMG 1 y 2 no están correlacionados directamente con la actividad mitótica, parecen estar asociados con el potencial de la célula a dividirse (52). En el lenguado Pseudopleuronectes americanus, se ha detectado que el final de la espermatogénesis coincide con la pérdida de dos proteínas, equivalentes a H6 y HMG T de trucha (107). Este resultado es consistente con el postulado que las proteínas HMG se encuentran asociadas a porciones de la cromatina que es

transcripcionalmente competente (51,60,81,82,87,88). En experimentos muy recientes, donde se estudia la expresión de proteínas HMG 14 y 17 durante la diferenciación celular, en células cultivadas de mioblastoma de ratón, se constata que durante la miogénesis decrecen los niveles tanto de mRNA como de síntesis de las proteínas HMG 14 y 17; sin embargo no hay una alteración significativa de la concentración celular de ambas proteínas (108).

Han sido comparadas las proporciones relativas de histonas y proteínas HMG, durante la miogénesis de músculo esquelético de embriones de pollo (122). Las proteínas HMG fueron extraídas directamente con ácido perclórico del tejido muscular de embriones de 8 y 18 días. Las proporciones de HMG cambian durante la miogénesis "in vivo". La proteína HMG 2A decrece en relación a HMG 1 y HMG 2B entre el día 8, cuando el tejido miogénico consiste predominantemente de mioblastos proliferantes, hasta el día 18, cuando el tejido está diferenciado en músculo esquelético, con una disminución concomitante de la proliferación celular. Además, la proporción o razón de las proteínas HMG de bajo peso molecular (HMG 14 y 17), con respecto a las de alto peso molecular (HMG 1 y 2) también disminuye. Las proporciones entre HMG 14 y HMG 17 no sufren mayor cambio durante la miogénesis terminal. Durante el mismo periodo de tiempo, no se observa ningún cambio significativo en las variantes de histonas observadas

(H1 y H2A) (122). Los cambios en el patrón de proteínas HMG de elevado peso molecular durante la miogénesis terminal, sugiere que esta subclase de proteínas podría estar regulando un cambio en la configuración de la cromatina, necesario para la expresión del genotipo de este estado diferenciado (122). Coincidentemente se observó que la proteína HMG 2 se encontraba en forma abundante en el músculo esquelético de embriones de pollo (tejido altamente proliferativo), siendo mucho más escasa en éste que en pollos adultos jóvenes (tejido sin células en división). Estos trabajos llevaron a los autores a sugerir la implicancia de las proteínas HMG 2 en la replicación cromosómica (69).

Han sido examinados los niveles relativos de las proteínas HMG 1 y HMG 2 en once órganos distintos de ratas, advirtiéndose una importante correlación entre los niveles de HMG 2 y la actividad proliferativa de sus tejidos. Así, HMG 2 ha sido encontrada en alta cantidad comparada con HMG 1 en órganos tales como médula ósea, testículos, mucosa intestinal, timo y bazo. A su vez, en órganos relativamente no proliferantes, tales como riñón, hígado, pulmón, corazón y músculo esquelético, los niveles de HMG 2 son notoriamente inferiores a los de HMG 1. Las cantidades de HMG 1 no mostraron variabilidad marcada entre los distintos órganos (69).

J. Bhorjee encuentra que en células HeLa

sincronizadas, hay diferencias cuantitativas en la distribución de las proteínas HMG. Las cantidades totales de estas proteínas aumentan en un 20-25% durante las fases G1 y S en comparación con G2 del ciclo celular (109).

Puede decirse entonces, que a pesar que las proteínas tipo HMG de Trypanosoma cruzi guardan diferencias con las de eucariontes superiores, ellas se comportan de un modo similar, en cuanto a que sufren fluctuaciones en sus cantidades totales y en las proporciones relativas de algunas de ellas, según el estado proliferativo en que se encuentren las células.

El análisis de los niveles de mRNA de HMG 17 en células humanas, muestra que en diferentes estados del ciclo celular, la cantidad de éste fluctúa. Hay un pico de incremento de mRNA de HMG 17 al comienzo de la fase S, seguido de un segundo pico en S tardío. La mayor parte del mRNA de HMG 17 es transcrito durante S tardío, mientras que aún progresa la síntesis de histonas y de DNA. Sin embargo, la síntesis de mRNA de HMG 17, a diferencia de los mRNA de histonas, no está asociada a la síntesis de DNA, ya que cuando ésta es inhibida, no es afectada la síntesis de mRNA de HMG 17 (123).

En células humanas, el mRNA de HMG 17 es transcrito por uno o más miembros de la familia multigénica a la cual pertenece, que contiene 35 a 50 copias (124). Algunas copias podrían corresponder a pseudogenes

(125,126,127). La familia multigénica de la proteína HMG 14 posee de 69 a 90 copias del gen (85). En el genoma de pollo hay una sola copia tanto para el gen HMG 14 como para el gen HMG 17 (128).

En esta tesis, se han identificado cuatro proteínas de Trypanosoma cruzi, cuyas características permiten suponer que se trata de proteínas tipo-HMG. Se estudió su solubilidad en ácido perclórico, sus migraciones electroforéticas en distintos sistemas de geles de poliacrilamida y sus pesos moleculares. Se probó que algunas proteínas tipo-HMG de T. cruzi presentan reacción inmunológica con sueros anti-HMG de timo de ternero. También se determinó una fluctuación en las cantidades relativas de las proteínas tipo HMG de T. cruzi, dependiendo del estado proliferativo del parásito. Por los datos aportados por esta tesis, más la información disponible en la literatura científica, puede concluirse que Trypanosoma cruzi, protozoo causante de la enfermedad de Chagas, posee proteínas tipo HMG, cuyas características estudiadas, se asemejan a las de eucariontes superiores, pero guardando peculiaridades propias. Las causas de dichas diferencias caen en el campo especulativo por el momento.

El abordar el estudio de la cromatina del ancestral Trypanosoma cruzi, y por tanto de las proteínas asociadas a ella, implica buscar una mejor comprensión de la

biología básica del parásito. Evidentemente que este eucarionte, como todos, debe regular con precisión la expresión de sus genes para permitir su subsistencia, que comprende complejos cambios morfológicos y fisiológicos, relacionados con sus distintos estados de proliferación y diferenciación. El conocimiento de los mecanismos que gobiernan dichos cambios, además de contribuir a la ciencia básica, podría quizás dar con una forma de controlar al parásito como organismo patógeno para el hombre.

BIBLIOGRAFIA

1. Fife, E. (1977).
Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi.
pp. 135-173. En Parasitic Protozoa Vol. 1, Taxonomy,
Kinetoplastids and Flagellates of Fish. Ed. J.P.
Kreiser, Acad. Press.
2. Schofield, C.J. (1985).
Control of Chagas' Disease vectors.
Br. Med. Bull. 41(2):187-194.
3. Apt, W., Reyes, H. (1986).
Aspectos epidemiológicos de la enfermedad de Chagas
en Chile. Distribución geográfica, índices de
infección en vectores y humanos.
Parasitol. al Dia. 10:94-101.
4. Opperdoes, F. (1985).
Biochemical Peculiarities of Trypanosomes, African
and South American.
Br. Med. Bull. 41(2):130-136.
5. Cosgrove, W. (1971).
The Cell Cycle and Cell Differentiation in Trypa-
somatids.
"Developmental Aspects of the Cell Cycle". Ed. I.
Cameron, G. Padilla and A. Zimmerman. Acad. Press.
6. Brener, Z. (1973).
Biology of Trypanosoma cruzi.
Ann. Rev. Microbiol. 27:347-382.
7. Simpson, L. (1972).
The kinetoplast of the hemoflagellates.
Intern. Rev. Cytol. 32:139-207.

8. Simpson, L. (1987).
The Mitochondrial Genome of kinetoplastid Protozoa: Genomic Organization, Transcription, Replication and evolution.
Ann. Rev. Microbiol. 41:363-382.
9. Rohrer, S., Michelotti, E., Torri, A., Hajduk, S. (1987).
Transcription of Kinetoplast DNA minicircles.
Cell, 49:625-632
10. Vickerman, K. (1985).
Developmental Cycles and Biology of Pathogenic Trypanosomes.
Br. Med. Bull., 41(2):105-114.
11. Dvorak, J. (1984).
The Natural Heterogeneity of Trypanosoma cruzi: Biological and Medical Implications.
J. Cell. Biochem., 24:357-371.
12. Bertelli, M.S.M., Brener, Z. (1980).
Infection of tissue culture cells with bloodstream trypomastigotes of Trypanosoma cruzi.
J. Parasitol., 66(6): 992-997.
13. Doyle, P., Dvorak, J.A. Engel, J. (1984).
Trypanosoma cruzi: Quantification and Analysis of the Infectivity of Cloned Stocks.
J. Protozool., 31(2):280-283.
14. Tanuri, A., Andrades, P., Almeida, D. (1985).
Trypanosoma cruzi: Isolation of Cloned Strains and Characterization of their Infectivity.
J. Parasit., 71(4):397-402.
15. Lemesre, J.L., Tibayrenc, M. (1983).
Trypanosoma cruzi: Measurement of DNA Quantity in Different Isoenzyme Strains. Inferences on the Ploidy of these Strains.
Ann. Soc. Belge Méd. trop., 63:313-317.

16. Tibayrenc, M., Le Ray, D. (1984).
General Classification of the isoenzymic strains of Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi and comparison with T. (S.) c. marinkellei and T. (Herpetosoma rangeli).
Ann. Soc. Belge Méd. trop., 64:239-248.

17. Miles, M.A., Apt, W., Widmer, P., Povoas, M. (1984).
Isozyme heterogeneity and numerical taxonomy of Trypanosoma cruzi stocks from Chile.
Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, 78:526-535.

18. Frasch, A., Góijman, S., Cazzulo, J., Stoppani, A. (1981).
Constant and Variable Regions in DNA Mini-Circles from Trypanosoma cruzi and Trypanosoma rangeli: Application to Species and Stock Differentiation.
Mol. Biochem. Parasitol. 4:163-170.

19. Sánchez, D., Frasch, A., Carrasco, A., González-Cappa, S., Isola, E., Stoppani, A. (1984).
Rapid Evolution of Kinetoplast DNA mini-circle Subpopulations in Trypanosoma cruzi.
Mol. Biochem. Parasitol., 11:169-178.

20. Macina, R., D. Sánchez, Gluschankof, D., Burrone, O., Frasch, A. (1986).
Sequence Diversity in the Kinetoplast DNA minicircles of Trypanosoma cruzi.
Mol. Biochem. Parasit., 21:25-32.

21. Morel, C.M., Deana, M.P., Gógalves, A.M. (1986).
The Complexity of Trypanosoma cruzi Populations revealed by Schizodeme Analysis.
Parasitology Today, 2(4):97-101.

22. Castro, C., Craig, S., Castañeda, M. (1981).
Genome Organization and Ploidy Number in Trypanosoma cruzi.
Molecular and Chemical Parasitology, 4:273-282.

23. Lanar, D. Levy, L.S., Manning, J. (1981).
Complexity and Content of the DNA and RNA in
Trypanosoma cruzi.
Mol. Biochem. Parasit. 3:327-341.
24. Borst, P., Van Ploeg, M., Van Hoek, J., Tas, J.,
James, J. (1982).
On the DNA Content and Ploidy of Trypanosomes.
Mol. Biochem. Parasit., 6:13-23.
25. De Souza, W. (1981).
Ultraestructura de Trypanosoma cruzi.
Ciência e Cultura, 31:35-47.
26. Solari, A., De Souza, W. (1983).
Presence and Comparative Behavior of Mitotic
Plaques in five Species of Trypanosomatidae.
Microsc. Electron. Biol. Celular, 7:29-40.
27. Solari, A.J., Tandler, C. Duschak, V. (1985).
Fine structure and cytochemistry of the mitotic
plaques of Trypanosoma cruzi and crithidia fascicu-
lata.
J. Submicrosc. Cytol. 17(4):583-591.
28. Astolfi Filho, S. Martins de Sá, C., Gander, E.
(1985).
On the Chromatin Structure of Trypanosoma cruzi.
Molecular and Chemical Parasitology. 1:45-53.
29. Belnat, P., Paoletti, J., Riou, G. (1981).
Subunit Organization of Chromatin from Trypanosoma
cruzi Sensitive and Resistant to Ethidium Bromide.
Mol. Biochem. Parasit., 2:167-176.
30. Toro, G.C., Galanti, N. (1988).
H₁ Histone and Histone Variants in Trypanosoma
cruzi.
Exp. Cell Res. 174:16-24.

31. Toro, G.C., Galanti, N. (1990).
Trypanosoma cruzi histones. Further Characterization and Comparison with higher eukaryotes.
Biochem. Internatl., 21(3):481-490.
32. Rubio, J., Rosado, Y., Castañeda, M. (1980).
Subunit Structure of Trypanosoma cruzi Chromatin.
Canadian J. Biochem. 58(11):1247-1251.
33. Goodwin, G., Nicolas, R. Johns, E. (1975).
An improved large scale fractionation of High Mobility Group non-histone chromatin proteins.
Biochim. Biophys. Acta. 405:280-291.
34. Goodwin, G., Sanders, C., Johns, E. (1973).
A New Group of Chromatin Associated Proteins with Content of Acidic and Basic Amino Acids.
Eur. J. Biochem., 38:14-19.
35. Westermann, R., Grossbach, U. (1984).
Localization of nuclear proteins released to high mobility group protein 14 (HMG 14) in polytene Chromosomes.
Chromosoma (Berl), 90:355-365.
36. Watson, D., Wong, N., Dixon, G. (1979).
The complete amino acid sequence of a trout-testis nonhistone protein, H6, localized in a subset of nucleosomes and its similarity to calf-thymus non-histone proteins HMG 14 and 17.
Eur. J. Biochem., 95:193-202.
37. Rabbani, A., Goodwin, G., Johns, E. (1978).
High Mobility Group non-histone chromosomal proteins from chicken erythrocytes.
Biochem. Biophys. Res. Comm. 81:351-358.
38. Spiker, S., Mardian, J. Isenberg, J. (1987).
Chromosomal HMG protein occur in three eukaryotic Kingdoms.
Biochem. Biophys. Res. Comm., 82:129-135.

39. Levy, B. Gordon, D. (1978).
A. Study of the localization of High Mobility Group proteins in chromatin.
Can. J. Biochem., 56:480-491.
40. Bassuk, J. Mayfield, J. (1982).
Major High Mobility Group like proteins of Drosophila melanogaster embryonic nuclei.
Biochemistry, 21:1024-1027.
41. Vanderbilt, J. N., Anderson, J. (1985).
Monoclonal antibodies as probes for the complexity, phylogeny, and chromatin distribution of High Mobility Group chromosomal proteins.
J. Biol. Chem., 260(16):9336-9345.
42. Weber, S., Isenberg, I. (1980).
High Mobility Group Proteins of Saccharomyces cerevisiae.
Biochemistry, 19:2236-2240. 1980.
43. Estruch, F., Pérez-Ortín, M., Puidomenech, P, Franco, L. (1986).
On the presence of HMG proteins in yeast.
FEBS Letters, 197:179-182.
44. Levy-Wilson, B., Denker, M. Ito, E. (1983).
Isolation, Characterization, and Postsynthetic Modifications of Tetrahymena High Mobility Group Proteins.
Biochemistry, 22:1715-1721.
45. Czupryn, M., Toczko, K. (1984).
HMG-like proteins of Physarum polycephalum. Association with the transcriptionally active chromatin.
FEBS letters 169(2):174-178.
46. Côté, S., Neelin, J., Pallotta, D. (1985).
High Mobility Group like chromosomal proteins from amoebas of the acellular Slime mold Physarum polycephalum.
Biochemistry, 24:1806-1812.

47. Schulman, I., Cook, F., Richman, R., Allis, D. (1987).
Tetrahymena contain two distinct and unusual High Mobility Group (HMG) -like proteins.
 J. Cell Biology, 104:1485-1494.
48. Levy-Wilson, B., Wong, N., Dixon, G. (1977).
 Selective association of the trout-specific H6 protein with chromatin regions susceptible to DNase I and DNase II: Possible location of HMG-T in the spacer region between core nucleosomes.
 Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 74: 2810-1814.
49. Goodwin, G., Mathew, C., Wright, C., Venkov, C., Johns, E. (1979).
 Analysis of the High Mobility Group proteins associated with salt-soluble nucleosomes.
 Nucleic Acids Res., 7:1815-1825.
50. Sanders, C. (1977).
 A method for the fractionation of the High-Mobility Group non-histone chromosomal protein.
 Biochem. Biophys. Res. Comm, 78:1034-1042.
51. Shooter, K., Goodwin, G., Johns, E. (1974).
 Interactions of a purified non-histone chromosomal protein with DNA and histone.
 Eur. J. Biochem., 47:263-270.
52. Seyedin, S., Perhson, J., Cole, D. (1981).
 Loss of chromosomal High Mobility Group proteins HMG 1 and HMG 2 when mouse neuroblastoma and Friend erythroleukemia cells become committed to differentiation.
 Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 78(10):5988-5992.
53. Bustin, M., Neihart, N. (1979).
 Antibodies against chromosomal HMG proteins stain the cytoplasm of mammalian cells.
 Cell, 16:181-189.
54. Weisbrod, S. (1982).
 Active Chromatin.
 Nature, 297:289-295.

55. Goodwin, G., Johns, E. (1973)
Isolation and characterization of two calf-thymus chromatin non-histone proteins with high contents of acidic and basic amino acids.
Eur. J. Biochem., 40:215-219.
56. Rabbani, A., Goodwin, G. Johns, E. (1978).
Studies on the tissue specificity of the High-Mobility-Group non-histone chromosomal proteins from calf.
Biochem. J., 173:497-505.
57. Walker, J., Hastings, R., Johns, E. (1977).
The primary structure of a non-histone chromosomal protein.
Eur. J. Biochem., 76:461-468.
58. Walker, J., Hastings, J., Johns, E. (1978).
A novel continuous sequence of 41 aspartic and glutamic residues in a non-histone chromosomal protein.
Nature, 271(19):281-282.
59. Carballo, M., Puigdomenech, P., Palau, J. (1983).
DNA and histone H₁ interact with different domains of HMG 1 and 2 proteins.
EMBO J., 2(10):1759-1764.
60. Weisbrod, S., Weintraub, H. (1979).
Isolation of a subclass of nuclear proteins responsible for conferring a DNase I-sensitive structure on globin chromatin.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76:630-634.
61. Bustin, M., Hopkins, R., Isenberg, I. (1978).
Immunological relatedness of High Mobility Group chromosomal proteins from calf thymus.
J. Biol. Chem., 253:1694-1699.

62. Pipkin, J. Hinson, W., Hudson, J., Anson, J., Dave Pack, L. (1981).
The modulating effect of isoproterenol on DNA replication and protein synthesis. Synthesis patterns of the HMG proteins from electrostatically sorted salivary gland nuclei during the in vivo cell cycle.
Biochim. et Biophys. Acta, 655:421-431.
63. Walker, J., Goodwin, G., Johns, E. (1976). The similarity between the primary structures of two non-histone chromosomal proteins.
Eur. J. Biochem., 63:461-469.
64. Cary, P., Crane-Robinson, C., Bradbury, M., Javaheerian, K., Goodwin, G., Johns, E. (1976).
Conformational studies of two non-histone chromosomal proteins and their interactions with DNA. Eur. J. Biochem., 62:583-590.
65. Baker, C., Isenberg, I., Goodwin, G., Johns, E. (1976).
Physical studies of the nonhistone chromosomal proteins HMG 1 and HMG 2.
Biochemistry, 15:1645-1649.
66. Jackson, J., Rill, R. (1981).
Circular dichroism thermal denaturation, and deoxyribonuclease I digestion studies of nucleosomes highly enriched in High Mobility Group proteins HMG 1 and HMG 2.
Biochemistry, 20:1042-1046.
67. Rechsteiner, M. Kuehl, L. (1979).
Microinjection of the nonhistone chromosomal protein HMG 1 into bovine fibroblasts and HeLa cells.
Cell, 16:901-906.
68. Schroter, H., Bode, J. (1982).
The binding sites for large and small High-Mobility Group (HMG) proteins.
Eur. J. Biochem., 127:429-436.

69. Seyedin,., Kistler, S. (1979).
Levels of chromosomal proteins High Mobility Group 2 parallel the proliferative activity of testis, skeleton muscle, and other organs.
J. Biol. Chem., 254(22): 11264-11271.
70. Levy, B., Connor, W., Dixon, G. (1979).
A subset of trout testis nucleosomes enriched in transcribed DNA sequences contains High Mobility Group proteins as major structural components.
J. Biol. Chem., 254(3):609-620.
71. Yu, S., Li, H., Goodwin, G., Johns, E. (1977).
Interaction of non-histone chromosomal proteins HMG 1 and HMG 2 with DNA.
Eur. J. Biochem., 78:497-502.
72. Butler, A., Mardian, J., Olins, D. (1975).
Nonhistone Chromosomal Protein HMG 1 interactions with DNA.
J. Biol. Chem., 260:10613-10620.
73. Kohlstaedt, A., Sung, E., Fujishige, A., Cole, D. (1987).
Non-histone chromosomal protein HMG 1 modulates the histone H₁-induced condensation of DNA.
J. Biol. Chem., 262(2):524-526.
74. Cary, P., Shooter, K., Goodwin, G., Johns, E., Olayemi, J., Hartman, P., Bradbury, M. (1979).
Does High-Mobility-Group non-histone protein HMG 1 interact specifically with H₁ subfractions?.
Biochem. J., 183:657-662.
75. Stros, M., Kolbalova, A. (1987).
Interaction of non-histone proteins HMG 1 and HMG 2 with core histones in nucleosomes and core particles revealed by chemical cross-linking.
Eur. J. Biochem., 162:111-118.

76. Stros, M. (1987).
Binding of non-histone chromosomal protein HMG 1 to histone H₃ in nucleosomes detected by photochemical cross-linking.
Biochem. Biophys. Res. Comm. 147(1):301-308.
77. Javaherian, K., Liu, L., Wang, J. (1978).
Nonhistone proteins HMG 1 and HMG 1 change the DNA helical structure.
Science, 199:1345-1346.
78. Bidney, D. Reeck, G. (1978).
Purification from culture hepatoma cells of two nonhistone chromatin proteins with preferential affinity of single-stranded DNA: Aparent analogy with calf thymus HMG proteins.
Biochem. Biophys. Res. Comm., 85(3):1211-1218.
79. Isackson, P., Fishback, J., Bidney, D., Reeck, G. (1979).
Preferential affinity of high molecular weight High Mobility Group non-histone chromatin proteins for single-stranded DNA.
J. Biol. Chem., 254(3):5569-5572.
80. Bianchi, M. Beltrame, M. Paonessa, G. (1989).
Specific recognition of cruciform DNA by nuclear protein HMG 1.
Science, 243:1056-1059.
81. Stoute, J., Marzluff, W. (1982).
HMG-proteins 1 and 2 are required for transcription of chromatin by endogenous RNA polymerase.
Biochem. Biophys. Res. Comm., 107(4):1279-1284.
82. Tremelhick, D., Molloy, P. (1986).
High Mobility Group proteins 1 and 2 stimulate transcription in vitro by RNA polymerases II and III.
J. Biol. Chem. 261(5):6986-6992.

83. Tremelhick, D., Molly, P. (1989).
Stimulation of transcription from different RNA polymerase II promoters by High Mobility Group proteins 1 and 2.
FEBS Letters, 242(2):346-350.
84. Alexandrova, E., Marekov, L., Beltchev, B. (1984).
Involvement of protein HMG 1 in DNA replication
FEBS Letters. 178(1):153-156.
85. Landsman, D., Bustin, M. (1986).
Chromosomal proteins HMG-14 and HMG-17. Distinct Multigene families coding for similar types of transcripts.
J. Biol. Chem., 261(34):16087-160991.
86. Querol, E., Espel, E., Buernués, J., Palau, J. (1984).
Secondary structure of non-histone proteins HMG14 and HMG 17.
Studie Biophysica, 102(1):75-80.
87. Weisbrod, S., Groudine, M., Weintraub, H. (1980).
Interaction of HMG 14 and HMG 14 and HMG 17 with actively transcribed genes.
Cell, 19:289-301.
88. Weisbrod, S., Weintraub, H. (1981).
Isolation of actively transcribed nucleosomes and an analysis of -globin chromatin.
Cell. 23:391-400.
89. Einck, L., Bustin, M. (1983).
Inhibition of transcription in somatic cells by microinjection of antibodies to chromosomal proteins.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 80:6735-6739.
90. Sandeen, G., Wood, W., Felsenfeld, G. (1980).
The interaction of High Mobility proteins HMG 14 and 17 with nucleosomes.
Nucleic Acids Res., 8:3757-3778.

91. Shick, V. Belyavsky, A., Mirzabekov, A. (1985).
Primary organization of nucleosomes. Interaction of
non-histone High Mobility Group proteins 14 and 17
with nucleosomes, as revealed by DNA-protein
crosslinking and immunoaffinity isolation.
J. Mol. Biol., 185:329-339.
92. Mardian, J., Paton, A., Bunick, G., Olins, D.
(1980).
Nucleosome core have two specific binding sites for
non-histone chromosomal proteins HMG 14 and 17.
Science, 209:1534-1536.
93. Uberbacher, E., Mardian, J., Rossi, R., Olins, D.,
Budnick, G. (1982).
Neutron scattering studies and modeling of High
Mobility Group 14 core nucleosomes complex.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 79:5258-5262.
94. Weisbrod, S. (1982).
Properties of active nucleosomes as revealed by HMG
14 and 17 chromatography.
Nucleic Acids Res., 10(6):2017-2042.
95. Reaves, R., Candido, E. (1980).
Partial inhibition of histone deacetylase in active
chromatin by HMG 14 and HMG 17.
Nucleic Acids. Res., 8(9):1947-1963.
96. Loidl, P. (1988).
Towards an understanding of the biological function
of histone acetylation.
FEBS Letters, 227(2):91-95.
97. Ridsdale, J. Hendzel, M., Delcuve, P., Davis, J.
(1990).
Histone acetylation alters the capacity of the H₁
histone to condense transcriptionally active/competent
chromatin.
J. Biol. Chem., 265(9):5150-5156.

98. Csordas, A. (1990).
On the biological role of histone acetylation.
Biochem. J., 265:23-38.
99. Malik, N., Smulson, M. Bustin, M. (1984).
Enrichment of acetylated histones in polynucleosomes containing High Mobility Group protein 17 revealed by immunoaffinity chromatography.
J. Biol. Chem., 259(2):699-702.
100. Boffa, L., Sterner, R., Vidali, G., Allfrey, V. (1979).
Post-synthetic modifications of nuclear proteins. High Mobility Group are methylated.
Biochem. Biophys. Res. Comm., 98(4):1322-1327.
101. Reeves, R., Chang, D., Chung, S. (1981).
Carbohydrate modifications of High Mobility Group proteins.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78(11):6704-6708.
102. Tanuma, S., Johnson, G. (1983).
ADP-Ribosylation of nonhistone High Mobility Group proteins in intact cells.
J. Biol. Chem. 258(7):4067-4070.
103. Einck, L., Bustin, M. (1985).
The intracellular distribution and function of the High Mobility Group chromosomal proteins.
Exp. Cell Res., 156:295-310.
104. Seyedin, S., Kistler, S. (1978).
Simplified extraction procedure shows HMG-2 levels to vary markedly depending upon the functional state of the rat.
Federation Proceeding, 37(6):1787 (Abstract).
105. Seyedin, S. Kistler, S. (1980).
Isolation and characterization of rat testis H₁t.
J. Biol. Chem., 255(2):5949-5954.

106. Bucci, L., Brock, W., Goldknopf, I., Meistrich, M. (1984).
Characterization of High Mobility Group protein levels during spermatogenesis in the rat.
J. Biol. Chem., 259(14):8840-8846.
107. Kennedy, B., Davies, P. (1980).
Acid-soluble nuclear proteins of the testis during spermatogenesis in the Winter Flounder.
J. Biol. Chem., 255(6):2533-2539.
108. Pash, J. Bhorjee, J., Patterson, B., Bustin, M. (1990).
Persistence of chromosomal proteins HMG 14/17 in myotubes following differentiation-dependent reduction of HMG mRNA.
J. Biol. Chem 265(8):4197-4199.
109. Bhorjee, J. (1981).
Differential phosphorylation of nuclear nonhistone High Mobility Group proteins HMG 14 and 17 during cell cycle.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 78(11):6944-6948.
110. Diamond L.S. (1968).
Improved method for the monoaxemi cultivation of Entamoebae histolytica Schaudinn (1903) and E. histolytica-like amoebae with trypanosomatids.
J. Parasit., 54:715-719.
111. Astorfi Filho, S.; F.G. de Sá, M.; Gander, E.S.G. (1984).
Protein synthesis in purified trypto- and epimastigote forms.
Acta Tropica, 41:109-115.
112. Luck, J., M.; Rasmussen, P. S.; Satake, K., Tsevetikov, A.N. (1958).
Fisher studies on the fractionation of calf thymus histone.
J. Biol. Chem., 233:1407-1414.

113. Bradford, M. (1976).
A rapid and sensitive method for the quantitation
of microgram quantities of protein utilizing the
principle of protein-dye binding.
Anal. Biochem. 72:248-254.
114. Laemmli, U.K. (1979).
Cleavage of structural proteins during the assembly
of the head of bacteriophage T₄.
Nature, 227:680-685.
115. Panyim, S.; Chalkley, C. (1969).
High resolution acrylamide gel electrophoresis of
histones.
Arch. Biochem. Biophys., 130:337-346.
116. Weber, K.; Osborn, M. (1969).
The reliability of molecular weight determinations
by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophore-
sis.
J. Biol. Chem., 244(16):4406-4412.
117. Towbin, H.; Staehelin, T.; Gordon, J. (1979).
Electrophoretic transfer of proteins from polyacri-
lamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and
some applications.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76:4350-4354.
118. Côté, S.; Nadeau, P.; Neelin, J.; Pallota, D.
(1982). Isolation and characterization of histones
and other acid-soluble chromosomal proteins from
Physarum polycephalum.
Can. J. Biochem., 60:263-271.
119. Goodwin, G.; Walker, J.; Johns, E. (1978).
Studies on the degradation of high mobility group
non-histone chromosomal proteins.
Biochem. Biophys. Acta, 519:233-242.

120. Lund, T., Holtlund, J., Laland, S. (1985).
On the phosphorylation of low molecular mass HMG
(High Mobility Group) proteins in Ehrlich ascites
cells.
FEBS Letters, 180(2):275-279.
121. Goodwin, G., Brown, E., Johns, E. (1980).
The isolation of three new high mobility group
nuclear proteins.
Biochemic. and Biophys. Acta, 329:329-338.
122. Kreier, J., Baker, J. (1987).
"Parasitic Protozoa", Allen & Unwin, Inc. USA.
123. Gordon, J., Kaufman, R., Rosenfeld, B. (1981).
Independent control during myogenesis of histone
and high-mobility-group (HMGs) chromosomal protein
heterogeneity.
Arch. Biochem. Biophys., 211:709-721.
124. Bustin, M., Soares, N., Landsman, D., Srikantha,
T., Collins, J. (1987).
Cell cycle regulated synthesis of an abundant
transcript for human chromosomal protein HMG 17.
Nucleic Acids Res., 15(8): 3549-3561.
125. Landsman, D.; Soares, N.; Gonzalez, F.; Bustin, M.
(1986).
Chromosomal protein HMG 17. Complete human cDNA
sequence and evidence for a multigene family.
J. Biol. Chem., 16:7479-7484.
126. Srikantha, T.; Landsman, D.; Bustin, M. (1987).
Retropseudogenes for human chromosomal protein HMG
17.
J. Biol. Chem., 197:405-413.
127. Vanin, E. (1985).
Processed pseudogenes: characteristics and evolu-
tion. Ann. Rev. Genet., 19:253-272.

128. Wen-Hsiung, L.; Gojabori, T.; Nei, M. (1981).
Pseudogenes as a paradigm of neutral evolution.
Nature, 292:237-239.
129. Landsman, D.; Srikantha, T.; Bustin, M. (1988).
Single copy gene for the chicken non-histone
chromosomal protein HMG-17.
J. Biol. Chem., 263(8):3917-3923.