

T68622  
c.1

"EXPRESION DE GENES DE HISTONAS EN TRYPANOSOMA CRUZI:  
CARACTERIZACION DE HISTONAS"

Tesis

Entregada a la

Universidad de Chile

en cumplimiento parcial de los requisitos  
para optar al grado de  
Doctor en Ciencias con Mención en Biología

Facultad de Ciencias

por

Gabriela Cecilia Toro Acuña

Mayo, 1991



Patrocinante: Prof. Norbel L. Galanti Garrone.

FACULTAD DE CIENCIAS  
UNIVERSIDAD DE CHILE

INFORME DE APROBACION  
TESIS DE DOCTORADO

Se informa a la Escuela de Post-Grado de la Facultad de Ciencias que la Tesis de Doctorado presentada por la candidata

**Gabriela Cecilia Toro Acuña**

ha sido aprobada por la Comisión Informante de Tesis como requisito de Tesis para el grado de Doctor en Ciencias con Mención en Biología.

Director de Tesis

Dr. Norbel Galanti

*N. Galanti*  
.....

Comisión Informante:

Dr. Guido Pincheira

*G. Pincheira*  
.....

Dra. Catherine Connelly

*Catherine Connelly*  
.....

Dra. Alicia Carrasco

*Alicia Carrasco*  
.....

Dra. María Imschenetzky

*M. Imschenetzky*  
.....



Esta Tesis fue 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 Garrone y fue financiada por los siguientes proyectos:

Research Training Grant 840024 de la OMS; el Grant 820599 de UNDP/World Bank/WHO Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases; un Grant de OEA; Grants 209 y 096 de FONDECYT-Chile; Grants del DTI - Universidad de Chile; Grant RG 54-CHL-19 DE TWAS; por el Acuerdo Universidad de Chile - CSIC de España; por un Grant de SAREC y por el Re-Entry Grant 890378 de la OMS.



A BERTA, ROLANDO Y NORBEL

A TANIA Y PEDRO, MIS HIJOS MARAVILLOSOS

## AGRADECIMIENTOS

Deseo expresar mis sinceros agradecimientos a todas las personas que contribuyeron a la realización de esta tesis, muy especialmente:

Al Dr. Norbel Galanti G. por su guía y apoyo incondicional que me ha permitido desarrollar una actividad creativa tanto en mi trabajo, como en mi estar en el mundo.

A los Drs. Antonio Morello, Yolanda Repetto y Jorge Aldunate cuya amistad y apoyo ha sido importante en el desarrollo de nuestro trabajo.

A los Drs. Gustavo Hoecker y Alicia Ramos con quienes siempre pude contar.

A la Dra. María Imschenetzky por su enorme generosidad al proveer con diferentes antisueros y orientación teórica-práctica a nuestro grupo de trabajo.

A Carlos Medina, gran amigo e interlocutor "desde los intrones a Francisco de Quevedo".

A mis amigos del Laboratorio, especialmente a Cristián Daszenies, Marcelo Cáceres y Mario Galindo.

Al Dr. Gonzalo Giménez-Martín, Caballero español, por su apoyo científico y cultural, lleno de fuerza y entusiasmo.

A los Drs. Gary y Janet Stein, Enrique Palacián y Patricio Aller, por brindarme su apoyo y amistad durante mis estadías en sus Laboratorios.

Al Dr. Juan José Cazzulo cuyas conversaciones siempre resultan importantes para nuestro trabajo.

A Magaly Gómez y Héctor Muñoz, quienes con su paciencia y su hacer han contribuido a la mejor presentación de esta tesis. A Alicia Pinilla y Marisol Latorre, buenas amigas de estudiantes de Postgrado desesperados.

## INDICE

	Página
RESUMEN .....	1
ABSTRACT .....	3
ABREVIATURAS .....	5
A. INTRODUCCION	
1. Biología del <u>Trypanosoma cruzi</u> .....	8
2. Caracterización de la cromatina .....	11
3. Propósito de la tesis .....	30
B. MATERIALES Y METODOS	
1. Procedencia de los Reactivos .....	31
2. Cultivos celulares .....	32
3. Preparación de cromatina y obtención de histonas .....	34
4. Inhibidores de proteasas .....	36
5. Caracterización de las histonas	
1. Espectrofluorometría .....	36
2. Análisis de aminoácidos .....	36
6. Extracción de histona H <sub>1</sub> de <u>T. cruzi</u> y de timo de ternera .....	36
7. Electroforesis en geles de Poliacrilamida bajo diferentes condiciones denaturantes.	
1. Tritón DF16-urea-ácido .....	37
2. Dodecil sulfato de sodio (SDS).....	37
3. Urea-ácido .....	37

	Página
8. Determinación de proteínas .....	38
9. Estimación de los pesos moleculares .....	38
10. Otros métodos de caracterización	
1) Inmunodifusión .....	39
2) Western blot .....	39
11. Fosforilación de histonas de <u>T. cruzi</u> .....	41

### C. RESULTADOS

1. Obtención de cromatina y extracción de las histonas de <u>T. cruzi</u> .....	42
2. Etapas de purificación alternativas.	
1. Preparación de histonas en presencia de diferentes inhibidores de proteasas ...	44
2. Obtención de histonas en presencia de Mg <sup>++</sup> .....	46
3. Extracción de histonas en HCl 0,35 N .....	48
3. Caracterización de la preparación de histonas	
1. Análisis espectrofluorométrico .....	48
2. Análisis de composición de aminoácidos ...	50
4. Presencia de H <sub>1</sub> en <u>T. cruzi</u>	
1. Uso de las propiedades de solubilidad para identificar la histona H <sub>1</sub> .....	52
2. Uso de propiedades inmunológicas para identificar la histonas H <sub>1</sub> .....	56
5. Presencia de variantes de histonas .....	61
6. Fosforilación de histonas de <u>T. cruzi</u> .....	64
7. Análisis comparativo de histonas de <u>T. cruzi</u> , espermatozoides de erizo de mar, de hígado de rata y de timo de ternera, en tres sistemas de electroforesis. ....	66



	Página
8. Estimación de los pesos moleculares de histonas de <u>T. cruzi</u> .....	70
9. Comparación de las histonas en diferentes trypanosomátidos .....	76
10. Presencia de variantes de histonas en distintos estados proliferativos y de diferenciación de <u>T. cruzi</u> .....	78
 D. DISCUSION .....	 84
E. REFERENCIAS .....	117
F. APENDICE .....	135
1. Curva de crecimiento de <u>T. cruzi</u> .....	136
2. Tabla comparativa de composición de aminoácidos de <u>T. cruzi</u> y timo de ternera ....	137
3. Trabajos publicados de esta tesis .....	138
a) <u>Toro, C.G.</u> and Galanti, N. (1988) " <u>H<sub>1</sub> histone and histone variants in Trypanosoma cruzi</u> ". Exp. Cell Res. 174, 16-24.	
b) <u>Toro, C.G.</u> and Galanti, N. (1990) " <u>Trypanosoma cruzi histone</u> Further characterization and comparison with higher eucaryotes". Biochem. International. 21, 481-490.	

## INDICE DE FIGURAS

		Página
Fig. 1.	Electroforesis en geles de poliacrilamida de histonas purificadas. ....	43
Fig. 2.	Electroforesis en geles de poliacrilamida de histonas de <u>T. cruzi</u> extraídas en presencia de distintos inhibidores de proteasas. ....	45
Fig. 3.	Electroforesis en geles de poliacrilamida de histonas de <u>T. cruzi</u> extraídas en presencia de diferentes cationes bivalentes. ....	47
Fig. 4.	Electroforesis en geles de poliacrilamida de histonas extraídas de cromatina de <u>T. cruzi</u> en distintas condiciones. ....	49
Fig. 5.	Espectros de excitación y de emisión de histonas de <u>T. cruzi</u> .....	51
Fig. 6.	Propiedades de solubilidad de las histonas de <u>T. cruzi</u> .....	55
Fig. 7.	Electroforesis en geles de poliacrilamida de histona H <sub>1</sub> de <u>T. cruzi</u> . ....	57
Fig. 8.	Electroforesis en geles de poliacrilamida de histonas enriquecidas en fracción H <sub>1</sub> . ....	58
Fig. 9.	Test de inmunodifusión de sueros anti-histonas de erizo de mar contra histonas de erizo de mar y de <u>T. cruzi</u> .....	59
Fig. 10.	Electroforesis bidimensional e inmunoblotting de las histonas de <u>T. cruzi</u> ....	62
Fig. 11.	Histonas de <u>T. cruzi</u> analizadas por electroforesis en geles de poliacrilamida en dos dimensiones .....	63

	Página
Fig. 12. Fosforilación de las histonas de <u>T. cruzi</u> .....	65
Fig. 13. Análisis comparativo de histonas en electroforesis en geles de poliacrilamida 15% Tritón DF16-urea-ácido. ....	67
Fig. 14. Análisis comparativo de histonas en electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones denaturantes (SDS). ....	69
Fig. 15. Análisis comparativo de histonas en electroforesis en geles de poliacrilamida urea-ácido. ....	71
Fig. 16. Disociación selectiva de histonas de la cromatina de <u>T. cruzi</u> por NaCl ....	75
Fig. 17. Estudios comparativos de las histonas de distintos géneros de trypanosomátidos y distintas cepas de <u>T. cruzi</u> .....	77
Fig. 18. Análisis comparativo de histonas de <u>T. cruzi</u> , cepa Tulahuén, en distintos estados proliferativos .....	79
Fig. 19. Análisis comparativo de histonas de <u>T. cruzi</u> , clon DM 28c en proliferación. ....	81
Fig. 20. Análisis de histonas de tripomastigotes del clon DM 28c. ....	83

## RESUMEN

Trypanosoma cruzi es un protozoo hemoflagelado que produce la enfermedad de Chagas. En la naturaleza se encuentra en tres formas: amastigote, epimastigote y tripomastigote. Estos cambios en la forma y función del parásito deben estar relacionados a modificaciones en la expresión génica.

La cromatina de T. cruzi está organizada en nucleosomas, sin embargo, la cromatina no se condensa en cromosomas durante la mitosis.

En estudios anteriores, una histona H<sub>1</sub> típica no fué encontrada en geles de poliacrilamida en condiciones denaturantes (SDS) o ácido-urea. Como consecuencia, se propuso que el comportamiento particular de la cromatina de T. cruzi durante la división era debido a la ausencia de una histona H<sub>1</sub>.

En este trabajo, las histonas de este parásito fueron sistemáticamente caracterizadas por espectrofluorometría, composición de aminoácidos, electroforesis en geles de poliacrilamida en una y dos dimensiones, extracción diferencial con ácido perclórico y ácido tricloroacético, reactividad cruzada con antisueros y Western blot. Por otro lado, las histonas de T. cruzi se compararon con histonas

de diferentes especies usando diferentes sistemas electroforéticos. Se observó que las histonas de T. cruzi presentaban características diferentes a las histonas de los eucariontes superiores.

Se concluye que T. cruzi posee el conjunto de las histonas conocidas, incluyendo una  $H_1$  que presenta propiedades inmunológicas y de solubilidad similares a las de otras especies (espermatozoides de erizo de mar, timo de ternera, hígado de rata) pero con movilidad electroforética diferente en geles de poliacrilamida.

Más aún, en este trabajo, se describen variantes de histonas en geles en dos dimensiones y se identifica el proceso de fosforilación post-traducciona1 en tres de las histonas de T. cruzi.

Por otro lado, se comprueba la presencia de variantes de histonas en estados proliferativos y de diferenciación del parásito, en diferentes generos de la familia Trypanosomatidae y en diferentes cepas de T. cruzi.

La presencia de variantes de histonas sugiere que ellas podrían participar en la regulación de la proliferación celular y la diferenciación del parásito.

## ABSTRACT

Trypanosoma cruzi is a protozoan which produces Chagas disease. It may be found in three phenotypes: amastigote, epimastigote and trypomastigote. These changes should be related to modifications in the expression of certain genes in this parasite.

T. cruzi chromatin is organized in nucleosomes, however, chromatin is not condensed in chromosomes during mitosis. In previous studies a characteristic H<sub>1</sub> was not found in denaturing conditions or in acid-urea polyacrylamide gel electrophoresis. Consequently, it was proposed that the particular behavior of T. cruzi chromatin in dividing cells was due to the absence of an H<sub>1</sub> histone.

In the present work, histones from this parasite were systematically characterized by spectrofluorometric analysis, amino acid composition, polyacrylamide gel electrophoresis in one and in two dimensions, differential extraction with perchloric or trichloroacetic acid, immunological cross-reactivity with antisera and western blot. It is shown that they presented different characteristics as compared to histones from higher eukaryotes.

It is concluded that T. cruzi contains all histones

fractions, including H<sub>2</sub> with solubility and immunological properties similar to those in other species (sea urchin sperm, calf thymus, rat liver), but with a particular electrophoretic mobility in polyacrylamide gel electrophoresis. Moreover, in this work, histone variants are described by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis and one histone post-translational chemical modification: three T. cruzi's histones are phosphorylated.

On the other hand, the presence of histone variants is shown in different proliferative and differentiated stages of this parasite, in different Genus of the Trypanosomatidae family and in different strains of T. cruzi. The presence of histone variants suggests that they may participate in the regulation of cell proliferation and differentiation of this parasite, in a similar way as it has been postulated for higher eukaryotes.

## ABREVIATURAS

BME	: $\beta$ mercapto etanol
Ci	: Curie
cm	: Centímetro
cpm	: Cuentas por minuto
d CTP	: Deoxicitidina trifosfato
DNA	: Acido desoxirribonucleico
DNA K	: DNA del kinetoplasto
DNA n	: DNA nuclear
EDTA	: ácido etilendiaminotetraacético
FBS	: Suero fetal de bovino
gr	: Gramo
HCl	: Acido clorhídrico
hr	: Hora
K Cl	: Cloruro de potasio
$K_2HPO_4$	: Fosfato dipotásico
$KH_2PO_4$	: Fosfato monopotásico
Kpb	: Kilo pares de bases
M	: Molar
mg	: Miligramo
Mg $Cl_2$	: Cloruro de magnesio
mM	: Milimolar
MOPS	: Acido 3-N-morpholinopropanesulfónico



N	: Normal
Na Cl	: Cloruro de sodio
NaHCO <sub>3</sub>	: Fosfato monosódico
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	: Fosfato disódico
ng	: Nanogramo
PAGE	: Gel electroforesis en geles de poliacrilamida
pb	: Pares de bases
PBS	: solución de fosfato-salino
PCA	: ácido perclórico
pg	: Picogramo
PM	: Peso molecular
PMSF	: Phenylmethylsulfonyl fluoride
POPOP	: (1,4 - bis -(2-(5 - fenil - 2 oxazolil)) benceno, p-fenileno - bis (5-feniloxazol))
PPD	: 2,5 - difeniloxazol
P/V	: Peso/volumen
R. Nasa	: Ribonucleasa
RNA	: Acido ribonucleico
RNasa	: desoxirribonucleasa
SDS	: Dodecil sulfato de sodio
t RNA	: RNA de transferencia
<u>T. brucei</u>	: <u>Trypanosoma brucei</u>
<u>T. cruzi</u>	: <u>Trypanosoma cruzi</u>
TCA	: ácido tricloroacético

TEMED	: NNN'N' - tetrametilén - etilén - diamino
TLOK	: Tosyl-L-lysine chlormethyl ketone
TPCK	: L-1- Tosylamide - 2 - phenyl-ethylchloro- methyl ketone.
Tris	: Tris (hidroximetil) aminometano
U	: Unidad
uCi	: Microcurie
ug	: Microgramo
uM	: Micromolar
UV	: Ultravioleta
V/V	: Volumen/volumen

## A. INTRODUCCION

### 1.- Biología del Trypanosoma cruzi

T. cruzi es un protozoo hemoflagelado causante de la enfermedad de Chagas. Su clasificación se ha determinado por características morfológicas, fisiológicas, moleculares y de comportamiento (como patogenicidad para el hombre). La posición taxonómica del T. cruzi es la siguiente (1) : Reino : Protista; Sub-Reino : Protozoa; Phylum : Sarcomastigophora; Subphylum : Mastigophora; Clase : Zoomastigophorea; Orden : Kinetoplastida; Suborden : Trypanosomatina; Familia : Trypanosomatidae; Género : Trypanosoma; Grupo : Stercoraria; Subgénero : Schizotrypanum; Especie : cruzi.

Las enfermedades producidas por protozoos del género Trypanosoma son exclusivas de los continentes africano y sud-americano. Las tripanosomiasis africanas causadas por T. brucei, afectan humanos y algunos animales domésticos, mientras las especies de T. cruzi afectan sólo a humanos en áreas de América Central y Sud-América, desde el río Grande por el Norte hasta el paralelo 33 por el sur. En esta zona la enfermedad de Chagas es endémica. El parásito se mantiene en animales domésticos (gatos, perros, conejos, cabras, etc.) y salvajes, que sirven como

reservorios (zoonosis). El hombre es parte importante en este ciclo.

Se ha estimado que de 35.000.000 de habitantes expuestos al riesgo, 12.000.000 están infectados. La enfermedad de Chagas es una enfermedad de áreas rurales, donde las condiciones sociales favorecen la multiplicación de las especies de artrópodos de la familia Reduviidae que actúan como vectores.

El Trypanosoma cruzi comprende, por tanto, un conjunto de poblaciones de parásitos que circula entre hombres, vectores, reservorios salvajes y animales domésticos. Estudios experimentales con aislados de T. cruzi de varios hospedantes muestran una gran variación intraespecífica, la que se manifiesta por diferencias en la morfología de las formas sanguíneas, virulencia, habilidad para inducir lesiones, susceptibilidad a los agentes quimioterapéuticos, constitución antigénica e infectividad a las células hospedadoras (2). Aún más, al realizar una caracterización de parámetros biológicos, bioquímicos, inmunológicos, parasitológicos e histopatológicos de estos aislados, se han encontrado diferencias de hasta 10 veces en la tasa de crecimiento de los parásitos, diferencia de hasta 40% en la cantidad de DNA total por parásito, y sólo 5 antígenos comunes de 35 ensayados (3). Todos estos datos implican que características del parásito y del hospedante

modulan el curso de la infección. Esto ha llevado a intentar una caracterización general de las cepas de T. cruzi.

Con este objeto se han desarrollado métodos para la identificación de perfiles enzimáticos de tripanosomas y se han diseñado varios métodos de análisis de DNA del kinetoplasto, que permiten agrupar los parásitos de acuerdo a rasgos comunes. Así se han descrito poblaciones de T. cruzi en términos de sus perfiles enzimáticos (zimodemas) (4), y poblaciones clasificadas en función del número de fragmentos de restricción obtenidos por digestión del DNA del kinetoplasto con diferentes enzimas (esquizodemas) (5). El DNA del kinetoplasto, aproximadamente un 15% del DNA total (6), corresponde en un 95% a minicírculos concatenados.

La interpretación genética de los zimodemas de 524 cepas de T. cruzi sugiere que este parásito tiene estructura diploide (7). Esta sugerencia fué confirmada por Miles y col. (8) y Pettersson y col. (9). La estructura poblacional de T. cruzi parece ser multiclinal y compleja. Los datos disponibles sugieren que la variabilidad genética del T. cruzi refleja la evolución separada de múltiples clones ya que, por definición, un clon es "el agregado de la progenie producida asexualmente por un individuo" (7).

T. cruzi se encuentra en 3 estados principales de

diferenciación, considerando las formas en el vector y en el hospedante mamífero. Los tripanosomas que se encuentran en el estómago del vector (forma epimastigote), se multiplican en el lumen antes de transformarse en tripomastigotes metacíclicos en la cloaca (forma no replicativa e infectiva). La transmisión ocurre a través de las deposiciones del vector en el momento de alimentarse y resulta en tripomastigotes circulantes en el hospedante humano. Estos desaparecen rápidamente de la sangre y se encuentran principalmente dentro de macrófagos donde forman amastigotes intracelulares y replicativos. Después de numerosas divisiones dentro de las células, se transforman en tripomastigotes que son liberados a la sangre, diseminando la infección a otros tejidos. Sólo unos pocos tripomastigotes se encuentran en la sangre y sirven como reservorio para la transmisión por el vector (10).

Todos estos cambios de forma y función deben estar relacionados con modificaciones en la expresión de ciertos genes en este parásito.

## 2.- Caracterización de la cromatina.

La cromatina es el complejo DNA-proteínas que se encuentra en el núcleo de todas las células eucarióticas. En la mayoría de los casos sufre cambios estructurales

durante el ciclo celular, variando desde cromosomas altamente compactados en metafase a estructuras más laxas presentes en el núcleo interfásico. Sin embargo, aún esta estructura laxa involucra una considerable compactación del DNA nuclear. Esta compactación se lleva a cabo por una serie de niveles de plegamiento de la fibra de cromatina. En un primer nivel de organización el DNA interacciona con las histonas para formar una estructura repetitiva; el "nucleosoma" (11).

En el descubrimiento y caracterización de esta estructura se han empleado diferentes metodologías. En primer lugar, estudios de difracción de rayos X mostraron que había estructuras que se repetían cada 10 nm a lo largo de la fibra de cromatina (12,13).

Este hecho se confirmó mediante observación con microscopía electrónica, detectándose cadenas de partículas globulares (14). Por otra parte, la digestión de cromatina con nucleasas endógenas o nucleasa micrococcal produce la liberación de fragmentos de DNA múltiples de un tamaño unidad de, aproximadamente, 200 pares de bases (15,16). Estos datos llevaron a proponer un modelo para el nucleosoma, según el cual estaría formado por un octámero de histonas alrededor del cual se encontraría DNA de doble cadena de un tamaño aproximado de 200 pares de bases (11). Sin embargo, hay variaciones en la longitud del DNA de la

partícula en las distintas especies, lo cual indica que debe tener una unidad estructural menor. En efecto, aumentando la digestión con nucleasa micrococcal se obtiene una partícula, el "cromatosoma" (17) con aproximadamente 166 pares de bases de DNA, asociadas a un octámero de histonas. Este comprende 2 moléculas de cada uno de los cuatro tipos de histonas; aquellas medianamente ricas en lisina, H<sub>2</sub>A y H<sub>2</sub>B, y las ricas en arginina, H<sub>3</sub> y H<sub>4</sub> (11). El DNA está organizado alrededor de este núcleo proteico en dos vueltas de aproximadamente 166 pb, las cuales están unidas por una molécula de la histona H<sub>1</sub> en el punto de entrada y salida del DNA (18,19). Se encuentra además un segmento de DNA que une un nucleosoma con otro y que también contribuye en parte al sitio de unión de la H<sub>1</sub>. La H<sub>1</sub>, histona muy rica en lisina, afecta la estabilidad conformacional y térmica del DNA de los nucleosomas (20) así como la estabilidad conformacional del octámero de histonas (21). La H<sub>1</sub> también juega un rol esencial en el plegamiento de la cadena de polinucleosomas de 10 nm en la fibra solenoidal de cromatina de 30 nm de diámetro (22). El DNA internucleosomal puede variar entre los diferentes tipos celulares desde 0 hasta 80 pares de bases, siendo lo más común 35 pares de bases (22,23,24). No está claro el significado de estas variaciones.



En eucariontes superiores se ha definido a las histonas como proteínas de bajo peso molecular, con un contenido de aminoácidos básicos superior al 20%. En general carecen de triptófano y cisteína, excepto H<sub>3</sub> que posee este último aminoácido. Su tamaño varía entre 102 a 135 aminoácidos excepto en la histona H<sub>1</sub> que sobrepasa los 200 aminoácidos (25).

A partir de las secuencias aminoacídicas de las proteínas H<sub>2</sub>A, H<sub>2</sub>B, H<sub>3</sub> y H<sub>4</sub> del núcleo nucleosomal (25) se ha observado dos características comunes: en primer lugar, estas histonas presentan una distribución de aminoácidos en la cual dos tercios de la molécula tiene una composición correspondiente a una estructura globular, mientras que en el extremo amino terminal se encuentra un alto contenido de aminoácidos básicos.

La segunda característica general de las histonas del núcleo nucleosomal, es el alto grado de conservación de la secuencia, especialmente en el caso de las histonas H<sub>3</sub> y H<sub>4</sub>. Es así como De Lange y col (26) encontraron que al comparar la histona H<sub>4</sub> de arveja con la de timo de ternera existían sólo dos sustituciones en 102 residuos.

Sin embargo, no todas las histonas del núcleo nucleosomal son tan conservadas. El análisis de 248 secuencias aminoacídicas de histonas y secuencias de nucleótidos de los genes de histonas de diferentes

especies (27) revela que las histonas H<sub>2</sub>A y H<sub>2</sub>B no son tan conservadas en secuencia como las H<sub>3</sub> y H<sub>4</sub>.

En contraste con esta distribución de carga observada en las histonas del "core", la histona H<sub>1</sub> presenta tres dominios fundamentales. Las regiones amino y carboxilo terminales son muy abundantes en aminoácidos ácidos y básicos y presentan alta variabilidad en estas secuencias (28). La región central de la proteína es globular, rica en aminoácidos hidrofóbicos.

Los cambios evolutivos no son uniformemente distribuidos dentro de la secuencia de aminoácidos de cada histona. En H<sub>2</sub>A, H<sub>2</sub>B y H<sub>1</sub> los dominios terminales ricos en lisina y arginina muestran una divergencia evolutiva mayor. El dominio central de estas moléculas es mucho más conservado. Sin embargo los datos disponibles para H<sub>3</sub> y H<sub>4</sub> muestran una distribución mucho más uniforme de las sustituciones de aminoácidos (27).

La heterogeneidad en la composición de las histonas se refleja en la existencia de múltiples formas de las histonas H<sub>1</sub>, H<sub>2</sub>A, H<sub>2</sub>B y H<sub>3</sub>, las cuales difieren en su secuencia de aminoácidos y que reciben los nombres de variantes, subtipos o isoformas. La segunda es la modificación postsíntesis de estas proteínas tales como acetilación, metilación, fosforilación, ubiquitinación y ADP-ribosilación.

El rol funcional de las distintas variantes no es conocido, pero hay indicios que la variación tendría relación con aspectos de la fisiología del genoma. Esta suposición se basa en la distinta capacidad de los subtipos para compactar el DNA y la cromatina (29,30) y en los cambios observados en la proporción de los distintos subtipos en células de distintos tejidos (31,32), en distintas etapas del desarrollo (33) y en distintas etapas de diferenciación de los organismos (34). Aún más, las variantes de histonas han demostrado tener efecto en la estructura de la cromatina, aún en el nivel más básico, el núcleo nucleosomal. Así, se ha observado cambios en los rasgos estáticos y dinámicos de su estructura en términos de sitios susceptibles a corte con DNasa I, así como a fuerza iónica de desplazamiento y/o denaturación térmica, sugiriendo que estas alteraciones estructurales tendrían consecuencias fisiológicas "in vivo" (20,29).

En la mayoría de los organismos, los genes de histonas están presentes en copias múltiples. Se ha demostrado que aún individuos producto de endocria pueden portar genes que codifican para diferentes variantes de la secuencia primaria de una histona dada (35a). Nuevamente se encuentra una situación no uniforme para las diferentes histonas. Mientras para H<sub>4</sub> se ha informado sólo de dos variantes en Tetrahymena (36), en el resto de las histonas del núcleo

nucleosomal las variantes son numerosas, con H<sub>2</sub>A y H<sub>2</sub>B mostrando la variabilidad mayor. Curiosamente, existe una preservación de algunas variantes, a través de distintos phyla. Este es otro argumento que sugiere que las variantes podrían jugar un rol en la función de la cromatina (35b).

Se han descrito subtipos o variantes de todas las histonas. En varios mamíferos, se ha encontrado hasta 8 subtipos de H<sub>1</sub> (37) y 3 o 4 subtipos de H<sub>2</sub>A, H<sub>2</sub>B, y H<sub>3</sub> (38). Un nivel similar de variación se encuentra en pollo (39,40). En espermatozoides de erizo de mar se ha encontrado 6 subtipos de H<sub>1</sub>, 8 de H<sub>2</sub>A, 5 de H<sub>2</sub>B y 3 de H<sub>3</sub> (41). Algunos eucariontes inferiores (42,43,44) y Drosophila tienen menor número de subtipos (45). Se ha comprobado que durante el curso de desarrollo temprano en espermatozoides de erizo de mar (41,46), mamíferos (32,38,47) y pollo (39,40) ocurre síntesis e incorporación secuencial en la cromatina de diferentes subtipos de las histonas H<sub>1</sub>, H<sub>2</sub>A, H<sub>2</sub>B y H<sub>3</sub>. Otros cambios parecen estar relacionados con la diferenciación, como, por ejemplo, los que ocurren durante la espermatogénesis de los mamíferos (48).

Otro enfoque ha sido desarrollado por Grunstein y col., quienes han estudiado la relación estructura - función, realizando mutagénesis de los genes de histonas "in vitro", utilizando cepas de levadura mutantes, y/o transformando con plásmidos que contienen genes de histonas

bajo control del promotor galactosa. Estos autores observan el efecto producido por los cambios de las histonas en la segregación cromosómica, replicación y transcripción (49).

Llama la atención la gran heterogeneidad encontrada en las variantes de histona H<sub>1</sub>. Por ejemplo, en eritrocitos de aves, reptiles, anfibios y peces, la histona H<sub>1</sub> es reemplazada por otra clase de histona rica en lisina: la H<sub>5</sub>. Esta histona H<sub>5</sub> de eritrocitos es un caso extremo en que hay diferencias de secuencias significativas en la región globular apolar. Mientras existe una homología de 86% entre la H<sub>5</sub> de pollo y la de ganso, existe una homología de sólo 49% entre la H<sub>5</sub> de ganso y la H<sub>1</sub> de timo (50). Por otra parte, se ha descrito que la H<sub>1</sub><sup>o</sup> en mamíferos, constituiría una molécula con características intermedias entre H<sub>5</sub> y H<sub>1</sub>, ya que tiene una región globular semejante a H<sub>5</sub> (70% de homología en secuencia), mientras las regiones terminales serían similares a H<sub>1</sub> de timo (50).

La proporción de las variantes de histonas H<sub>1</sub> cambia con el progreso de la diferenciación en el desarrollo embrionario de espermatozoides de erizo de mar (51), de ratón (37) y de pollo (52). En mamíferos se ha descrito que la tasa de síntesis de diferentes variantes de H<sub>1</sub> cambia dramáticamente cuando el estado funcional del organismo se altera en respuesta a hormonas (53). Lo mismo ocurre en espermatogénesis (48,49), en tejidos que están o

no en división (54,55) y en la diferenciación terminal en algunos sistemas (56,57).

Como se indicó anteriormente, un segundo mecanismo de generación de heterogeneidad está dado por las modificaciones post-traduccionales de las histonas: acetilación, fosforilación, metilación, ADP-ribosilación y, en el caso de la histona H<sub>2</sub>A, la unión covalente a la proteína ubiquitina.

Se ha encontrado varios aminoácidos modificados por fosforilación en las histonas: serina, treonina, lisina e histidina (35c), estando claro que la mayoría de los sitios fosforilados son serina y treonina. La fosforilación de histonas H<sub>1</sub> ha sido asociada al crecimiento y división celulares (58,59). Más aún, la fosforilación de H<sub>1</sub> parece estar relacionada con el paso de las células por G<sub>1</sub>, S, condensación de cromatina y mitosis (60,61). El significado biológico de la fosforilación de histonas H<sub>1</sub> depende del subtipo involucrado y de la proximidad de los aminoácidos fosforilados a los terminales -COOH ó -NH<sub>2</sub> (60,62). Más aún, la fosforilación de menos de un 0.1% del total de H<sub>1</sub> puede ser suficiente para activar la transcripción de genes específicos (62).

La acetilación se encuentra en los grupos amino terminales libres (ε-amino) de los residuos de lisina. El grupo acetilo neutraliza la carga positiva de la lisina,

disminuyendo la fuerza iónica entre los nucleosomas de la fibra de cromatina de 30 nm. Se ha propuesto que la hiperacetilación de las histonas H<sub>2</sub>B, H<sub>3</sub> y/o H<sub>4</sub> está implicada en la expresión génica (63,64). Así, secuencias de DNA en transcripción aparecen asociadas a histonas hiperacetiladas (63,65); estas regiones presentan sensibilidad preferencial a digestión con DNasa (66). Más aún, la acetilación de histonas está relacionada con la ubicación de histonas recientemente sintetizadas en la hebra de DNA naciente durante la replicación del DNA (67,68), en el reemplazo de histonas por otras proteínas específicas durante la diferenciación (69,70). Actualmente se propone que la acetilación no ocurre al azar, sino que es altamente específica. Sitios diferentes serían acetilados para favorecer determinadas funciones biológicas (71).

Las histonas pueden modificarse por ADP-ribosilación tanto "in vivo" como "in vitro" (72,73,74). Las histonas más susceptibles a esta modificación química son la H<sub>1</sub> y la H<sub>2</sub>B. La ADP-ribosa se une al residuo de ácido glutámico en posición 2 de la H<sub>2</sub>B (75). Además puede unirse a los residuos de ácido glutámico en posición 2, 14 y 116 y a la lisina en posición 213 de la histona H<sub>1</sub> (76,77). Las otras histonas también pueden ADPribosilarse, pero en menor grado. Se ha propuesto que la ADP-ribosilación de histonas puede facilitar la transcripción de genes por relajamiento

de la cromatina en áreas específicas (78).

La ubiquitina es un polipéptido pequeño que se encuentra en el 5 al 20% de las histonas H<sub>2</sub>A, dando origen a un complejo que se denomina A-24 (uH<sub>2</sub>A), o en el 2 al 6% de la histona H<sub>2</sub>B (uH<sub>2</sub>B) (79,80). La unión ocurre entre la glicina en posición 76 de la ubiquitina y el grupo ε-amino de la lisina en posición 119 de la H<sub>2</sub>A (81), o en posición 120 de la H<sub>2</sub>B (82). Aproximadamente el 10-30% de los nucleosomas contienen histonas modificadas por ubiquitinación. Se ha sugerido que la uH<sub>2</sub>A está localizada preferencialmente en nucleosomas de genes en activa transcripción (83). La ubiquitinación puede también relacionarse a procesos de degradación selectiva de proteínas, dependientes de ATP (84).

Se ha detectado metilación de lisinas ubicadas en las posiciones 9 y 27 de H<sub>3</sub> y 20 de H<sub>4</sub>. También se ha visto metilación de histidinas en las histonas H<sub>1</sub> y H<sub>5</sub> en eritrocitos de pato, la que al parecer tendría lugar en las fases S y G<sub>2</sub> del ciclo celular. Se ha propuesto que la metilación de las histonas juega un rol en la maduración de la cromatina recientemente sintetizada (35d).

Lo anteriormente expuesto, unido a estudios bioquímicos y de microscopía electrónica, y a estudios de digestión con nucleasas, indican la presencia de nucleosomas o estructuras parecidas a nucleosomas en la mayoría de



los genes activos en la transcripción (85,86,87).

En 1976, Weintraub y Groudine (88) demostraron que el gen para la globina de eritrocito de pollo presentaba una mayor susceptibilidad a la digestión por DNasa I, pero no a la nucleasa micrococcal durante la transcripción. Esta resistencia sugería que el gen de globina estaba empaquetado en partículas "como nucleosomas". Su sensibilidad a DNasa I indicaba que estas partículas eran conformacionalmente diferentes al resto de los nucleosomas. Posteriormente, este mismo autor, encuentra que partículas supranucleosomales, obtenidas con digestión con nucleasa micrococcal se resolvían en partículas que contenían genes inactivos y partículas que contenían genes activos. Ambos tipos de partículas presentaban las histonas del núcleo nucleosomal y la histona H<sub>1</sub>. La diferencia significativa, entre estas partículas, era el tipo de interacción de la H<sub>1</sub> con el templado (89).

Se ha tratado de establecer las bases estructurales de estas diferencias, estudiando las histonas alteradas o modificadas y/o la presencia de proteínas no histónicas en el nucleosoma. Dentro de estas últimas, la fracción detectada más a menudo en nucleosomas activos corresponden a las proteínas de alta movilidad "HMG", entre las cuales las HMG 1 y 2, 14 y 17 han sido las más estudiadas (90).

Investigaciones complementarias se están realizando

para determinar la influencia de modificaciones y cambios estructurales en el DNA, entre los que se podrían citar: la metilación del DNA, la influencia de las conformaciones A, B o Z del DNA, el superenrollamiento y la tensión torsional del DNA. (85,87,35e).

Los experimentos con nucleasas indican que los nucleosomas de los genes activos poseen una conformación alterada con respecto a los nucleosomas canónicos. La presencia de variantes de las histonas podría afectar significativamente la estructura del nucleosoma y de la cromatina. Aunque no se conoce la función de estas variantes, su conservación evolutiva y sus cambios regulados de forma precisa durante el ciclo celular o el desarrollo embriogénico, sugieren una significación funcional de estas variantes.

Resulta interesante el comentario que hace Van Holde, al examinar las probables combinaciones de las variantes de histonas somáticas encontradas en rata; este autor calcula que habría 2025 diferentes partículas nucleosómicas posibles de obtener (35f).

Lo anteriormente expuesto sugiere que el estudio de las histonas y sus variantes en T. cruzi podría dar ideas acerca de los mecanismos básicos involucrados en algunos aspectos de la regulación y de la proliferación celular y diferenciación de este parásito.

Características de la cromatina en T. cruzi.

Las estructuras nucleares de los tripanosomátidos son diferentes de las de eucariontes superiores. La membrana nuclear persiste durante la división celular, el huso microtubular se sitúa dentro de la membrana nuclear (91,92) y los cromosomas no han sido visualizados por técnicas corrientes en células en división (93). Además, se ha descrito estructuras llamadas placas mitóticas en núcleos de tripanosomátidos en división (94,95). Se ha propuesto que estas placas actúan como cinetocoros, en base a su composición, a su asociación a las fibras de cromatina y a los microtúbulos, (96), a la constancia de su número en cada especie de tripanosomátido, a la división regular en mitades y a su migración como hemiplacas a los polos del núcleo (93,94,95).

El contenido de DNA nuclear en T. cruzi ha sido estimado en 0,2 pg (97). Por otro lado, en 1978 se sugirió que este DNA estaría organizado en nucleosomas, ya que se localizaron proteínas básicas en el núcleo de T. cruzi por medio de microscopía electrónica y técnicas citoquímicas. Además estas proteínas no estaban presentes en el kinetoplasto de epimastigote de T. cruzi (98).

Se conoce poco acerca de la estructura y organización de los cromosomas en tripanosomas. El análisis citogenético

directo es difícil ya que los cromosomas no compactan en ningún estado del ciclo celular (96). Sin embargo, por electroforesis en gradiente de campo pulsado, se ha logrado fraccionar por tamaño los cromosomas de tripanosomátidos (93,99,100). Se postula que estos fragmentos de DNA corresponderían a cromosomas intactos, demostrado por el uso de pruebas específicas de telómeros, combinado con la reproducibilidad del patrón de bandeo (93,99,100). Al examinar 6 cepas y 6 clones de T. cruzi se determinó su cariotipo molecular describiéndose al menos 15 diferentes fragmentos de DNA, en el rango de 200 pares a más de 2000 pares de kilobases, y pocos "minicromosomas" en el rango de 50-150 Kb, en contraste con lo encontrado en la mayoría de los tripanosomas africanos. Además se encontró diferencias intra e intercepas en el cariotipo molecular y en la localización de genes en los cromosomas (93), que podrían estar relacionados con el alto grado de heterogeneidad fenotípica previamente descrita en este parásito.

Recientemente se ha propuesto que la cromatina de T. cruzi está organizada en nucleosomas, como en otros eucariotes (101,102). Astolfi y col. (101) examinaron la estructura de la cromatina de T. cruzi usando digestión exhaustiva o limitada con nucleasa micrococcal. El análisis de la digestión exhaustiva mostraba mononucleosomas con

coeficientes de sedimentación 11 S y con 200 pares de bases, iguales a los productos obtenidos por digestión de cromatina de hígado de rata. Sin embargo, los productos de digestión limitada con nucleasa micrococcal, analizados en gradientes de sacarosa, diferían en las dos especies. Así, mientras de la cromatina de hígado de rata se obtuvo hasta pentanucleosomas, en la de T. cruzi no se observó picos definidos de oligonucleosomas. Este hecho, sumado a que T. cruzi presentó 4 histonas diferentes a las de hígado de rata, especialmente 2 bandas de alta movilidad electroforética, y que no se ha podido demostrar la presencia de cromosomas como los encontrados en eucariontes superiores, llevó a plantear diferencias esenciales en la compactación del DNA de este parásito en niveles de organización superiores y a sugerir que los espacios internucleosomales estarían organizados de diferentes formas en protozoos y metazoos (101).

Por su parte Rubio y col. (102) demostraron la presencia de nucleosomas por microscopía electrónica, la existencia de fragmentos monoméricos y oligoméricos de DNA y describieron 4 proteínas básicas nucleares en T. cruzi. En ningún caso se detectó una histona similar a las H<sub>1</sub> de eucariontes superiores ni fragmentos discretos de DNA de 140 pares de bases después de digestión con nucleasa micrococcal. En contraste con el material (cromatina de

eritrocito de pollo) usado como control se encontró que la preparación nuclear de T. cruzi era física y enzimáticamente frágil, y que las proteínas básicas mostraban diferente movilidad electroforética.

Hecker y Gander (103) también estudiaron el patrón de compactación de la cromatina y el contenido de histonas en T. cruzi y en T. brucei en comparación con hígado de rata. Se encontró diferencias fundamentales en la organización de la cromatina de tripanosomas y rata. Así, mientras la cromatina de hígado de rata se condensa en la fibra solenoidal en 100 mM NaCl, la cromatina de T. cruzi muestra menor grado de condensación y la cromatina de T. brucei no condensa. En general, los nucleosomas de tripanosomas parecen estar menos regularmente ordenados (103). La histona H<sub>1</sub> de hígado de rata aumenta la compactación de la cromatina de T. cruzi pero no la de T. brucei. Al analizar las histonas de estas especies en geles denaturantes de poliacrilamida (SDS) no aparece una histona semejante a la histona H<sub>1</sub> de rata y las demás histonas tienen distinta movilidad electroforética comparativamente. Estos resultados, podrían explicar las diferencias especie-específicas en la organización estructural fina y en el patrón de compactación de las diferentes cromatinas.

En los trabajos citados es posible detectar diferencias entre las histonas de T. cruzi y las histonas usadas

como patrón. Esto no parece ser tan sorprendente considerando que se ha encontrado diferencias significativas, tanto en número como en movilidad electroforética de histonas en otros protistas, respecto a histonas de timo usadas como control. (42,43,44,104,105,106,107). Más aún, teniendo en cuenta que los tripanosomátidos se habrían originado en el Precámbrico, alrededor de 1400 millones de años atrás (108), es razonable imaginar diferencias en las proteínas que estaban apareciendo como un mecanismo para organizar y compactar el DNA, por una parte y de asegurar, por otra, una distribución de este DNA en las células hijas. Mucho se ha insistido sobre la semejanza y conservación de las histonas entre plantas terrestres y animales (109). Sin embargo, hay que considerar que estos linajes aparecieron sobre la Tierra durante el Paleozoico, hace 500 millones de años y que, por consiguiente, la divergencia entre ellos es mucho más cercana en el tiempo que la de los tripanosomas respecto a ambos. (110). Aún más, se ha observado que en los Procariontes contemporáneos, tanto en eubacterias como arqueobacterias, existen ciertas proteínas "tipo histonas" que no sólo unen el DNA sino que también lo compactan (111,112,113,114,115). A pesar de que entre estas proteínas bacterianas y las histonas (o entre el nucleóide y la estructura de cromatina) hay enormes diferencias, sería razonable imaginar que para que el nucleosoma se

desarrollara, un conjunto de proteínas básicas ha tenido que evolucionar y podría pensarse que en los Protistas encontramos una etapa de la historia del nucleosoma, reflejada por la diversidad de estas proteínas (36,104, 105,106,107).



## PROPOSITO DE LA TESIS

El propósito del presente trabajo es: Caracterizar sistemáticamente las histonas de T. cruzi en relación a procesos de proliferación y diferenciación de este organismo.

Los objetivos específicos son:

- a) Detectar las diferentes histonas en T. cruzi; en especial la presencia de la histona H<sub>1</sub>.
- b) Detectar la presencia de variantes de estas histonas y posibles modificaciones post-traduccionales de estas proteínas.
- c) Comparar las histonas de T. cruzi con las de otras especies, utilizando estas últimas como patrón.
- d) Comparar las histonas en diferentes estados proliferativos y de diferenciación del parásito.

## B. MATERIALES Y METODOS

### 1.- Procedencia de los reactivos:

Los siguientes reactivos se obtuvieron en Sigma Chemical Company, ST. Louis, Mo. : Azul brillante de Coomassie G., glucosa, 2 mercaptoetanol, N, N'-metileno-bis-acrilamida, Tris base, Urea, SDS, Amido Black, Acido aspártico, Acido glutámico, Prolina, Tritón DF-16, Tritón X-100, TPCK, TLCK, PMSF, Bisulfito de sodio, N-etylmaleimida, Agarosa (tipo V), DEAE-celulosa (DE-52).

Los reactivos usados en la preparación de los medios de cultivos se obtuvieron en Difco, Detroit, Michigan, USA : Tryptose, Tryptone, Yeast extract, Liver infusion broth.

Los siguientes reactivos se obtuvieron de Merck, Darmstadt, Alemania: EDTA,  $K_2HPO_4$ ,  $KH_2PO_4$ , KCl,  $MgCl_2$ , NaCl, Glicerol, Azul de bromofenol, TEMED.

La fosfatasa alcalina se obtuvo de Boehringer Mannheim.

El suero anticonejo biotinilado y el complejo streptavidina-biotina-peroxidasa se obtuvieron en Amersham, Buckinghamshire England. El HRP color y la acrilamida se obtuvieron en Bio Rad, Richmond, California, USA.

## 2.- Cultivos Celulares.

2.A.- Se utilizaron cultivos de T. cruzi, cepa Tulahuén, mantenidos en medio Diamond (116).

Medio Diamond: NaCl: 12,5 g; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>: 8,125 g; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>: 8,125 g; Tryptose: 12,5 g; Tryptone: 12,5 g; Yeast extract: 12,5 g; agua destilada hasta 1000 ml. (pH: 7,2).

Este medio se distribuyó en botellas de cultivos de 80 ml, se tapó con tapones de gomas y se esterilizó en autoclave a 120°C durante 45 minutos, a una presión de 20 libras.

Al medio Diamond estéril se agregó hemina 3,5 µM, suero fetal de bovino 2,5% V/V, antibiótico y epimastigotes de Trypanosoma cruzi (cepa Tulahuén) a una concentración de 3-5 millones por ml. Los cultivos se mantuvieron a 28°C.

Recuento de Células: se realizó en una cámara de Neubauer, diluyendo las células en formalina al 10%.

Las células se colectaron por centrifugación al día 5 ó 7 (fase exponencial de cultivo) o día 14 (fase estacionaria de cultivo), se lavaron 3 veces en PBS y se usaron inmediatamente. En algunos experimentos las células se congelaron a -20°C. Una curva típica de crecimiento se presenta en el Apéndice.

2.B.- Alternativamente se utilizó el clon de T. cruzi DM 28c (117,118,119) el cual se mantuvo en Medio Lit. Este

clon presenta la propiedad de cambiar desde la forma epimastigotes a la forma tripomastigote "in vitro" al ser sometido a estrés nutricional, manteniendo las características morfológicas y biológicas correspondientes a estas formas.

Medio Lit: NaCl 4,0 g; KCL 0,4 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  8,0 g; glucosa 2,0 g; Tryptosa 5,0 g; Liver infusión broth 5,0 g; Hemina 25,0 mg; Suero 100 ml; Agua destilada a 1000 ml. (pH: 7,2).

Se esterilizó a través de filtros de miliporo, bajo presión negativa. Antes o después de filtrar, el medio se incubó por 60 minutos a 68°C para inactivar el suero y finalmente se agregó gentamicina a concentración final de 22 mg/ml.

Los cultivos se cambiaron de medio de cultivo cada 7 días. Para extraer las histonas de epimastigotes las células se colectaron a los 5 días y se lavaron 3 veces en PBS.

Para obtener las formas tripomastigotes del parásito se realizó el protocolo de diferenciación de epimastigotes a tripomastigotes "in vitro", descrito por Contreras y col. (117,118). Para esto se colectaron epimastigotes de 8 días de crecimiento, se centrifugaron en forma estéril a 8.000 rpm durante 15 minutos a 10°C. y se resuspendieron en medio TAU a una concentración de  $5 \times 10^9$  células/ml.

Medio TAU: NaCl 190 mM; KCl 17 mM; MgCl<sub>2</sub> 2 mM; NaHCO<sub>3</sub> 0,035%; Tampón fosfato de Na 8 mM; Rojo de Fenol 10 mg/ml; Gentamicina 22 mg/ml.

Los epimastigotes se mantuvieron por 2 horas a 28°C y luego se distribuyeron en medio de transformación que corresponde al medio TAU más L-prolina 10 mM, L-aspartico 2 mM, L-glutámico 50 mM y glucosa 10 mM, agregando  $1 \times 10^7$  parásitos/ml. Se dejaron a 28°C, durante 96 horas. Se cosecharon por centrifugación a 9.000 rpm por 15'.

Los tripomastigotes se separaron de los epimastigotes mediante una columna de DE-52 celulosa (120), obteniéndose con una pureza de 95%.

### 3.- Preparación de cromatina y obtención de histonas.

Básicamente, se usó el procedimiento de Stein y col. (121) con algunas modificaciones. Las células se homogeneizaron en sacarosa 0,25 M; EDTA 0,001 M, CaCl<sub>2</sub> 0,003 M; Tris-HCl 0,010 M pH 7,4 y 0,5% saponina. Se usó un homogeneizador Potter - Elvehjem, a 1.200 rpm por 3 minutos. Luego se centrifugó a 3000 x g por 10 min. La fracción nuclear se lavó en el mismo amortiguador pero sin saponina. Posteriormente se homogeneizó en Tritón X-100 1% ; NaCl 0,15 M; EDTA 0,025 M; Tris-HCl 0,01 M pH 8, y se centrifugó 12000 g por 20 minutos. Esta suspensión se lavó 3 veces en Tris - HCl 0,01 M pH 8. Todo este procedimiento

se realizó a 4°C.

Extracción de histonas: Se utilizó el procedimiento de Panyim and Chalkey (122). El sedimento de cromatina se resuspendió en agua destilada, se llevó a  $H_2SO_4$  0,4 N (con  $H_2SO_4$  3,6 N), y se dejó extrayendo durante la noche. Luego se centrifugó a 30.900 g por 20 minutos y el sobrenadante, que contenía las histonas, se dializó contra agua destilada. El dializado se liofilizó y guardó a 4°C. El mismo procedimiento se utilizó para obtener las histonas de timo de ternera y de hígado de rata.

Para descartar la posible activación de proteasas por calcio, en algunos experimentos (indicado en el texto) se empleó  $MgCl_2$  0,005 M en vez de  $CaCl_2$  0,003 M.

Alternativamente se obtuvo histonas extrayendo la cromatina con HCl 0,35 N y precipitándolas con TCA y acetona como describe Zweidler (38). Asimismo se realizaron experimentos para evaluar el factor tiempo durante la extracción, realizándose ésta, ya sea por 5 min. o durante toda la noche.

Para evitar oxidación de residuos de aminoácidos en las preparaciones de histonas, se agregó tiodiglicol 1% en todas las soluciones. Sin embargo, no se observó diferencias en el patrón de histonas obtenido con o sin este agente.

4.- Inhibidores de Proteasas: Se utilizó los siguientes inhibidores: PMSF 1 o 2,2 mM; TLCK 0,5 mM o 1,5 mM; TPCK 1 mM; N-etilmaleimida 1 mM y bisulfito de Sodio 50 mM. Se usaron sólo o combinados como se indica en los experimentos particulares, incorporándolos al último lavado antes de romper las células y posteriormente a través de todo el proceso. En el caso de conservar células a  $-20^{\circ}\text{C}$ , los inhibidores se agregaron en el último lavado con PBS.

#### 5.- Caracterización de las histonas:

5.1.- Se analizó la presencia de triptófano por espectrofluorometría empleando el método de Brand y Withholt (123) en un espectrofluorómetro Perkin - Elmer MPF-2A. Se usó como patrón una preparación de histonas de espermatozoides de erizo de mar y soluciones patrón de triptófano y tirosina 10 mM.

5.2.- Se realizó el análisis de aminoácidos de las histonas totales de T. cruzi. Para esto las histonas se hidrolizaron en HCl 6 N a  $110^{\circ}\text{C}$  por 22 horas, en la presencia de 4% de ácido tioglicólico, como describe Matsubara y Sasaki (124). Bajo estas condiciones el triptófano no es degradado. Las muestras se analizaron en un analizador Beckman 120 C.

6.- Extracción de histonas H<sub>1</sub> de T. cruzi y de timo de ternera.

La preparación de cromatina se extrajo con NaCl

0,35 M, con PCA 5% ó con TCA 5%. La mezcla se agitó por 45 minutos a 0°C para promover la solubilización de las proteínas y la fracción soluble se recobró después de una centrifugación por 30 minutos a 12.000 x g.

Los extractos se dializaron contra agua destilada y se liofilizaron. Por otro lado, los sedimentos remanentes después de la extracción se suspendieron en H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,4 N y se extrajeron las histonas. Todas las muestras se analizaron en geles de poliacrilamida Tritón DF16-urea-ácido en una dimensión.

La histona H<sub>1</sub> se aisló de la cromatina por extracción en PCA 0,75 M y precipitación diferencial en acetona ácida, siguiendo el procedimiento de Sanders (125). Posteriormente este precipitado se lavó tres veces en acetona y se secó al vacío.

7.- Electroforesis en geles de poliacrilamida . Se usó tres sistemas de análisis.

Para geles en una dimensión:

- 1) poliacrilamida 15%, Urea 6 M, ácido acético 0,9 N, Tritón DF-16 0,38%, según Alfageme y col. (126).
- 2) poliacrilamida 15%, SDS 0,1%, según Laemmli (127), modificado por Kornberg (128).
- 3) poliacrilamida 15%, urea 2,5 M , ácido acético 0,9 M según Panyin y Chalkey (122). En los sistemas 1 y 3 se



realizó una pre-corrída en ácido acético 0,9 N hasta llegar a voltaje constante.

Para la segunda dimensión se usó una tira de gel de la primera dimensión (sistema 1) que se equilibró en Tris-HCl 0,06 M pH8, SDS 2%, BME 5%, glicerol 10% y se colocó sobre el gel concentrador del sistema 2), que luego se selló agregando 1% de agarosa. La electroforesis se realizó durante la noche, a temperatura ambiente, a 20 mA.

8.- Para determinar la concentración de histonas en la muestra, se usó el método de Luck, descrito por Hnilica (129), usando histonas de timo preparadas según Materiales y Métodos (121,122), como patrón. Los geles se tiñeron 4 horas con Amido Black al 0,2% disuelto en ácido acético 10% y metanol 45% según Zweidler (130) y se destiñeron en ácido acético 5% y metanol 25%.

Alternativamente se empleó la tinción con Coomassie Brilliant Blue (G.250) descrita por Reisner y col. (131), a una concentración 0,04% (w/v) en PDA 3,5% (w/v) final. Con este colorante las bandas de proteínas aparecen en 2 a 5 minutos.

9.- Estimación de los pesos moleculares de las histonas de I. cruzi. Se utilizó la técnica de Hamana y Iwai (132) Geles cilíndricos de 0,5 cm de diámetro por 11 cm de largo

conteniendo poliacrilamida al 10%, 15% ó 20%, N-N metylenbisacrilamida 0,66%, Urea 6,25 M y ácido acético 0,9 M, se pre-corrieron por 4 horas en ácido acético 0,9 M. Se empleó histonas de timo de ternera como patrón. Los geles se tiñeron como describe Zweidler (130). Para la estimación de los pesos moleculares se aplicó el procedimiento de Ferguson (133).

10.- Otros métodos de caracterización de histonas.

10.1.- Inmunodifusión: Se siguió el procedimiento descrito en Hudson y Hay (134). Se disolvió agarosa al 1% en una solución que contenía amortiguador fosfato de potasio 5 mM (pH 7,0), EDTA 0,5 mM y azida sódica 0,02%. Se prepararon placas para inmunodifusión agregando 3,5 ml de la agarosa fundida sobre un portaobjeto. Una vez solidificado el gel se perforaron pocitos de 15  $\mu$ l, en disposición hexagonal, en los cuales se colocaron las muestras por analizar. Se dejaron difundir antígeno y antisuero por 48 horas a 4°C, colocando la placa en una cámara húmeda. Los sueros anti H<sub>1</sub> y anti histonas del núcleo nucleosomal de espermatozoides de erizo de mar se prepararon en conejos en el laboratorio de la Dra. María Imschenestky, quien gentilmente donó estos antisueros.

10.2.- Immunoblotting: Se siguió el procedimiento descrito por Towbin y Col. (135). El gel de la segunda dimensión

(SDS) que contenía las histonas de T. cruzi fué lavado brevemente en agua destilada y luego en Tris 0,025 M, glicina 0,2 M (pH: 8,3) que contenía SDS 0,001% y metanol 20%. La transferencia a nitrocelulosa se realizó durante toda la noche a 200 mA en el mismo amortiguador en una cámara para transferencia Bio Rad. Después de transferir, el filtro se saturó con TBS: NaCl 0,5 M, Tris 0,02 M, pH: 7,5 que contenía 3% de gelatina, por 1 hr. a 37°C. Posteriormente se lavó 5 veces con TBS con Tween-20 0,05% y se incubó 1 hr. a temperatura ambiente en TBS que contenía gelatina 1% con suero de conejo anti H<sub>1</sub> de espermatozoide de erizo de mar diluido 1:50. Luego se lavó 5 veces (5 min. cada vez), con TBS 0,05% Tween 20 y se incubó 1 hr. a temperatura ambiente en TBS, gelatina 1%, y suero anticonejo biotinilado, diluido 1:200. Posteriormente el filtro se lavó 5 veces como se describió anteriormente y se incubó 1 hr. a temperatura ambiente con TBS, 1% de gelatina y el complejo streptavidina-biotina-peroxidasa diluido 1:400. En seguida se lavó 5 veces como se mencionó y se detectó el complejo antígeno-anticuerpo incubando a temperatura ambiente por 15 min. con HRP color, un sustrato cromogénico de peroxidasa. La reacción fué detenida lavando el filtro con agua destilada (136).

#### 11.- Fosforilación de histonas de T. cruzi.

Cultivos de T. cruzi de 5 días y de 14 días que contenían  $4,57 \times 10^8$  células, se incubaron 33 horas a 28°C con ( $^{32}\text{P}$ ) Ortofosfato de 58 uCi/ml, en un volumen de 15 ml de medio de cultivo. Posteriormente las células se colectaron y lavaron en PBS. Se agregó células sin marcar (carrier) y las histonas se extrajeron como se describió en la sección anterior, en presencia de PMSF 2,2 mM y TLCK 1,5 mM.

Una alícuota correspondiente a la mitad de las histonas obtenidas en cada caso se trató con fosfatasa alcalina. Para esto las muestras: 160  $\mu\text{g}$  de histonas totales provenientes de células cosechadas el día 5 de cultivo, (13.180 c.p.m.), y 160  $\mu\text{g}$  de histonas totales provenientes de células cosechadas el día 14 de cultivo, (9.157 c.p.m.) se incubaron con 5 unidades de fosfatasa alcalina bacteriana (Boehringer Mannheim) por 90 minutos a 37°C, en Tris-HCl 0,010 M pH 8,0,  $\text{MgCl}_2$  1 mM,  $\text{ZnCl}_2$  1 mM, PMSF 1 mM (137). La reacción se detuvo colocando la solución a -70°C. Posteriormente los resultados se analizaron en geles de poliacrilamida al 15%, Tritón DF16-urea-ácido. Se tiñó con Amido-Black según Zweidler (130), se decoloró, y se procesó para autoradiografía; Para esto, los geles se secaron en un secador de geles, en vacío y se expusieron a -70°C con film Kodak XR-5, que posteriormente se reveló según procedimientos corrientes.

## C. RESULTADOS

### 1.- Obtención de cromatina y extracción de las histonas de Trypanosoma cruzi.

Las preparaciones de cromatina se realizaron según el procedimiento de Stein y col. (121) y la extracción de las histonas se realizó según Panyim y col. (122), como se describe en Materiales y Métodos.

La figura 1 muestra histonas obtenidas de espermatozoides de erizo de mar (carril 1), de T. cruzi obtenidas en presencia de PMSF 2,2 mM y TLCK 1,5 mM (carril 2) o en ausencia de inhibidores de proteasas (carril 3), fraccionadas por electroforesis en un gel de poliacrilamida. En el análisis de las histonas representadas en el carril 2, se observa seis bandas. Cinco de estas bandas presentan movilidades en el rango de las histonas de espermatozoides de erizo de mar (carril 1). La sexta banda (f) de alta movilidad (flecha) se observa en la preparación de T. cruzi. Esta banda se resuelve en 2 cuando la electroforesis transcurre por mayor tiempo. El carril 3 muestra la ausencia de una de las bandas observadas en el carril 2 y es probable que ésta se degrade en ausencia de inhibidores de enzimas proteolíticas. Aportando a esta suposición

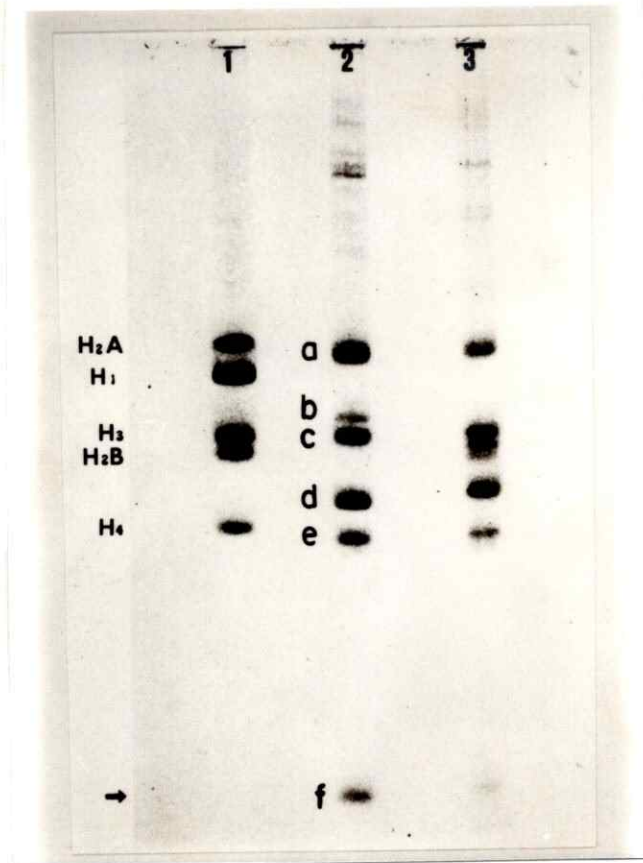


Figura 1.-Electroforesis en geles de poliacrilamida de histonas purificadas. Las preparaciones de cromatina se realizaron según el procedimiento de Stein y col. (121) como se describe en Materiales y Métodos. La extracción de las histonas se realizó según Panyim y col. (122). Las muestras se analizaron por electroforesis en gel de poliacrilamida al 15 %, Tritón DF16-urea-ácido, descrito por Alfageme y col. (126). La figura presenta en el carril 1: histonas de espermatozoides de erizo de mar (50  $\mu$ g); Carril 2: histonas de epimastigotes de *T. cruzi*, cepa Tulahuén (65  $\mu$ g), obtenidas en presencia de 2,2 mM PMSF y 1,5 mM TLCK; carril 3: histonas de epimastigotes de *T. cruzi*, cepa Tulahuén (65  $\mu$ g) obtenidas en ausencia de inhibidores de proteasas. Las histonas se tiñeron con 0.2% amido Black 10B en ácido acético, 45% metanol. La secuencia de las histonas a la izquierda de la Figura corresponde a histonas de espermatozoides de erizo de mar, usadas como estandar, cuya caracterización y orden de migración corresponde a las publicadas por Imschenetzky y col. (138). Las histonas de *T. cruzi* se nombraron a,b,c,d,e y f según su orden de migración desde el origen.

se observa una nueva banda de más alta movilidad. Asimismo, en general, las histonas disminuyen su intensidad, indicando proteólisis parcial. Por otro lado, en general las bandas no presentan cambios en sus movilidades electroforéticas.

## 2.- Etapas de purificación alternativas.

Se ha descrito que proteasas unidas a la cromatina y proteasas citoplasmáticas son fuente potencial de error en la preparación de histonas de diferentes especies biológicas (139, 140). Este problema tiene importancia especial en la cepa Tulahuén de T. cruzi que presenta un contenido importante de proteasas (141, 142, 143). En consecuencia, se realizaron una serie de experimentos tendientes a conocer y minimizar posibles efectos de proteólisis sobre las histonas de T. cruzi.

### 2.1.- Preparación de histonas en presencia de diferentes inhibidores de proteasas.

La figura 2, carril 1 muestra histonas obtenidas de T. cruzi en ausencia de inhibidores de proteasas, separadas en un gel de poliacrilamida-Tritón DF16-urea-acido. Se observa un perfil parecido al de la figura 1, carril 3. El carril 2 muestra el patrón característico de las histonas de T. cruzi cuando han sido obtenidas en presencia de PMSF

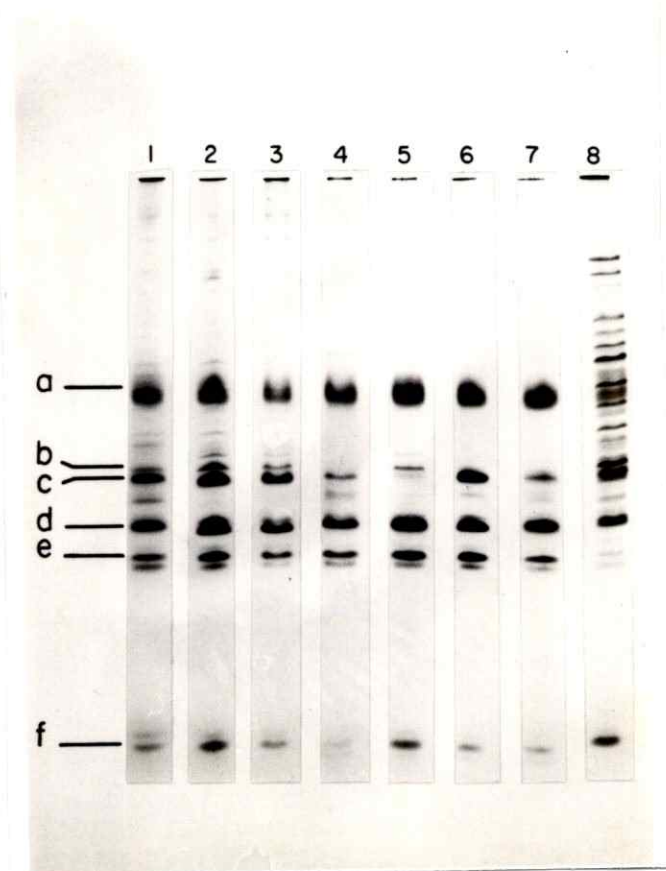


Figura 2.-Electroforesis en geles de poliacrilamida de histonas de epimastigotes de *T. cruzi*, extraídas en presencia de distintos inhibidores de proteasas. La preparación de cromatina se realizó según el procedimiento de Stein y col. (121) como se describe en Materiales y Métodos. La extracción de las histonas se realizó según Panyim y col. (122). La figura presenta las muestras obtenidas en las siguientes condiciones; carril 1: sin inhibidores; Carril 2: PMSF 2,2 mM más TLCK 1,5 mM; carril 3: TLCK 1,5 mM; carril 4: PMSF 2,2 mM; carril 5: TPCK 1 mM; carril 6: N-ethylmaleimida 1 mM y carril 7: bisulfito de sodio 0,05 M. Se colocó 65  $\mu$ g en todos los casos anteriores. En el carril 8, se presentan las proteínas totales extraídas de epimastigotes frescos en 0,4 N  $H_2SO_4$ , durante 3 min. (100  $\mu$ g). Las histonas se fraccionaron en geles de poliacrilamida al 15%, Tritón DF16-urea-ácido. Según el orden de migración desde el origen, las histonas de *T. cruzi* se nominan a, b, c, d, e y f, como en figura 1.



y TLCK. Todas estas proteínas están presentes en el extracto ácido obtenido directamente de epimastigotes vivos (carril 8), mostrando que los inhibidores de proteasas utilizados, (PMSF y TLCK) preservan las histonas de la degradación. Más aún, el TLCK a concentración 1,5 mM (carril 3) parece ser suficientemente eficiente para preservar el patrón de histonas. Este inhibidor resulta eficiente a concentraciones aún menores: 0,5 mM, (datos no mostrados).

Cuando se usa PMSF, TPCK (a concentraciones menores), N-etilmaleimida o bisulfito de sodio (carriles 4,5,6 y 7) se observa cambios en el patrón electroforético de las histonas de T. cruzi. Algunas veces las histonas obtenidas en presencia de bisulfito de sodio presentan degradación marcada. Al respecto se ha propuesto que el bisulfito, utilizado usualmente como inhibidor de proteasas durante la extracción de histonas de mamíferos, activaría algunas proteasas en otros sistemas biológicos (139).

## 2.2.- Obtención de histonas en presencia de $Mg^{++}$ .

Se ha descrito activación de proteasas en presencia de  $Ca^{++}$  (144,145). Considerando que la ruptura de las células se realiza en un amortiguador que lleva  $Ca^{++}$ , en algunos experimentos se sustituyó éste por  $Mg^{++}$ . La figura 3 presenta el análisis electroforético de las histonas de



Figura 3.-Electroforesis en geles de poliacrilamida de histonas de *I. cruzi* extraídas en presencia de diferentes cationes bivalentes. La preparación de cromatina se realizó según el procedimiento de Stein y col. (121) como se describe en Materiales y Métodos, utilizando en la obtención de la muestra presentada en el carril 1:  $MgCl_2$  0,005 M y en la obtención de la muestra presentada en el carril 2:  $CaCl_2$  0,003 M. La extracción de histonas se realizó según Panyim y col. (122). Los geles se cargaron con 65  $\mu g$  de proteínas estimadas según el método de Luck, descrito por Hnilica (129). Las histonas se fraccionaron en geles de poliacrilamida al 15%, Tritón DF16-urea-ácido.

T. cruzi obtenidas en presencia de  $Mg^{++}$  (carril 1) o  $Ca^{++}$  (carril 2). No se observan diferencias en el patrón obtenido.

### 2.3.- Extracción de histonas en HCL 0,35 N.

Como procedimiento alternativo se empleó el protocolo descrito por Zweidler (38), en el que las histonas se extraen en HCL 0,35 N, se precipitan con TCA 20% y por último, se lavan con acetona. Como control se extrajeron histonas de T. cruzi en  $H_2SO_4$  0,4 N.

La extracción en HCL 0,35 N o en  $H_2SO_4$  0,4 N se llevó a cabo por 5 minutos o durante la noche. La figura 4 presenta el análisis electroforético de las histonas obtenidas en las distintas condiciones mencionadas. Básicamente se obtuvo el mismo patrón cuando se empleó HCL (carriles 1 y 2) o  $H_2SO_4$  (carriles 3 y 4). Sin embargo, la extracción de la histona p parece ser menos eficiente a tiempos cortos en ambos ácidos (carriles 1 y 3).

### 3.- Caracterización de la preparación de histonas.

#### 3.1.- Análisis de los espectros de emisión y excitación.

Como se mencionó anteriormente, una de las características de las histonas sería que, en general son

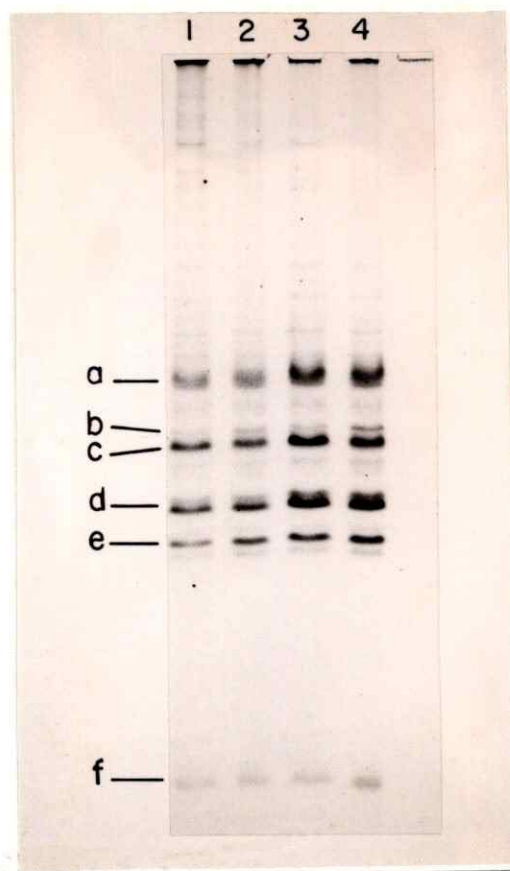


Figura 4.-Electroforesis en geles de poliacrilamida de histonas extraídas de cromatina de *I. cruzi* en distintas condiciones. La extracción de las histonas se realizó según Zweidler (38), carriles 1 y 2 o según Panyim y col. (122), carriles 3 y 4. Los tiempos de extracción corresponden a: 5 min. carriles 1 y 3 o a toda la noche: carriles 2 y 4. Las histonas se fraccionaron en geles de poliacrilamida al 15%. Tritón DF16-urea-ácido descrito por Alfageme y col. (126).

proteínas que carecen de triptófano. Para examinar esta situación en las histonas obtenidas de T. cruzi se realizó el espectro de excitación y de emisión de las proteínas que aparecen en la figura 1, carril 2. Como control de proteínas que carecen de triptófano, se empleó una solución de histonas de espermatozoides de erizo de mar, en cantidades equivalentes, además de una solución de triptófano 10 mM, para así conocer los máximos de ambos espectros. Analizando el espectro de excitación de las muestras descritas (Fig. 5) se observa que las histonas de T. cruzi y de espermatozoides de erizo de mar presentan un máximo similar (288 nm), alejado del máximo encontrado para el triptófano (308 nm) y muy cercano al encontrado para tirosina (290 nm), también utilizada como control.

En el espectro de emisión de las histonas de T. cruzi y de espermatozoides de erizo de mar se observan máximos a 340 nm y 324 nm, respectivamente. Ambos están desplazados respecto al máximo encontrado para triptófano (354 nm).

Estos resultados no permiten excluir la presencia de triptófano en la preparación de proteínas.

### 3.2.- Análisis de la composición de aminoácidos.

Se ha descrito rasgos característicos en la composición de aminoácidos para las preparaciones de histonas de varias especies (31). Para analizar estos rasgos, y también

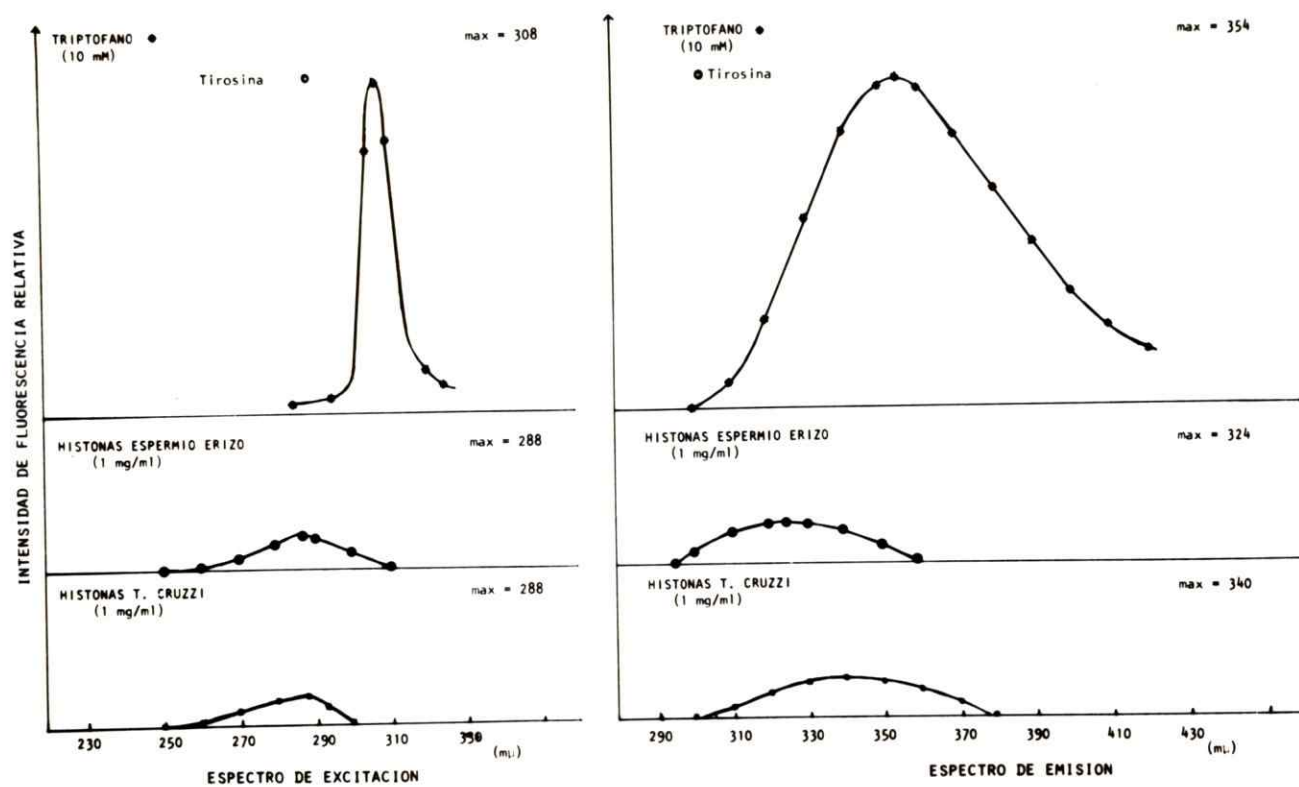


Figura 5.-Espectros de excitación y de emisión de histonas de *T. cruzi*. Se realizaron los espectros de muestras de histonas de *T. cruzi* y de espermatozoides de erizo de mar en cantidades equivalentes (1mg/ml). Además de utilizarse histonas de espermatozoides de erizo de mar como control, se utilizó una solución de triptófano 10 mM y de tirosina 10 mM.

para comprobar la ausencia de triptófano, se realizó el análisis de aminoácidos de la muestra presentada en la figura 1, carril 2.

La composición de aminoácidos de la preparación de histonas totales de T. cruzi se presenta en la Tabla 1. Se observó ausencia de triptófano y un elevado contenido de aminoácidos básicos. El análisis de estos resultados está de acuerdo con otros rasgos característicos para histonas de otros orígenes. Así, la suma de lisina, prolina, valina, isoleucina y arginina da cuenta aproximadamente del 50% de todos los aminoácidos en las histonas de varias especies estudiadas (31). En la preparación de histonas de T. cruzi se obtiene aproximadamente un 50% (estimando la prolina en 8%, este aminoácido no se determinó por razones experimentales). Otros rasgos, como la relación aminoácidos básicos/aminoácidos ácidos (1,83), el porcentaje de aminoácidos apolares (27,8%), de lisina (19,9%) o de arginina (8%) también están de acuerdo con los aceptados para las histonas de diferentes orígenes.

#### 4.- Presencia de H<sub>1</sub> en T. cruzi.

4.1.- Uso de las propiedades de solubilidad para identificar la histona H<sub>1</sub>.

Se ha descrito que la histona H<sub>1</sub> se disocia de la

TABLA 1

Composición de aminoácidos de histonas de T. cruzi.

Aminoácido	%
Lys	19,87
His	2,12
Arg	7,97
Asp	6,36
Glu	9,97
Thr	4,93
Ser	11,09
Pro	N.D.
Gly	9,82
Ala	9,14
Cys	N.D.
Val	4,54
Met	0,57
Ile	2,54
Leu	6,82
Tyr	2,22
Phe	1,96
Trp	0

Nota: Las histonas se hidrolizaron en 6 N H Cl a 110°C por 22 horas, en presencia de ácido tioglicólico al 4%, que preserva el Trp. (122).



cromatina con NaCl en el rango de 0,4 a 0,6 M (146,147). Por lo tanto, la histona H<sub>1</sub> es pobremente extraída de la cromatina con NaCl 0,35 M, mientras las proteínas conocidas como HMG (high mobility group) son, por definición, solubles en esta concentración de sal (148). Más aún, tanto la histona H<sub>1</sub> como las proteínas HMG son solubles en PCA o en TCA al 5% (125,149).

Considerando estos datos, la cromatina previamente extraída con NaCl 0,35 M, debería carecer de HMG y retener la histona H<sub>1</sub>. Por su parte, la cromatina previamente extraída con PCA o TCA al 5% debería carecer tanto de H<sub>1</sub> como de HMG. Estas propiedades de solubilidad diferencial en NaCl 0,35 M y en PCA y TCA al 5% permiten separar la histona H<sub>1</sub> de las proteínas HMG.

La figura 6 muestra las histonas remanentes en la cromatina después de la extracción con NaCl 0,35 M (carril 2), PCA 5% (carril 3) o TCA 5% (carril 4). Claramente, la banda f no es extraída con NaCl 0,35 M (carril 2) pero si lo es en PCA 5% (carriles 3 y 6) y en TCA 5% (carriles 4 y 7). Más aún, la banda c es parcialmente extraída de la cromatina en PCA 5% (carril 6) y en TCA 5% (carril 7). Por lo tanto, la banda f no presenta propiedades típicas de las HMG, mientras que las bandas c y f presentan propiedades de solubilidad características de la histona H<sub>1</sub>. Estos resultados se confirmaron aplicando el método de Sanders para la



Figura 6.-Propiedades de solubilidad de las histonas de *T. cruzi*. La figura presenta en el carril 1: histonas de *T. cruzi* control, obtenidas como en figura 1 carril 2; carril 2: histonas de *T. cruzi* obtenidas de cromatina previamente extraída con NaCl 0,35 M; carril 3: histonas obtenidas de cromatina previamente extraída con PCA 5%; carril 4: histonas obtenidas de cromatina previamente extraída con TCA 5%. Carriles 5,6 y 7 son proteínas solubilizadas, es decir, presentes en extractos obtenidos de cromatina de *T. cruzi* con NaCl 0,35 M, con PCA 5% o TCA 5% respectivamente. Las histonas se fraccionaron en geles de poliacrilamida al 15%, Tritón DF16-urea-ácido, descrito por Alfageme y col. (126).

purificación de histona  $H_1$  (125) a la cromatina de T. cruzi. La histona  $H_1$ , solubilizada en PCA 0,75 M (5%) junto con las proteínas HMG, fué diferencialmente precipitada en acetona ácida, donde las HMG permanecen solubles. Los resultados se muestran en la figura 7. Claramente, la banda f es precipitada en estas condiciones preferencialmente con un alto grado de pureza.

Resultados similares se obtuvieron al solubilizar preferencialmente las histonas totales de T. cruzi en PCA 5%. En estas condiciones se espera que la  $H_1$  permanezca soluble. Como control se realizó el mismo experimento con histona totales de espermatozoides de erizo de mar y con histonas totales de timo, obteniéndose en todos los casos un conjunto de histonas enriquecida en la fracción  $H_1$  (Fig.8).

4.2.- Uso de propiedades inmunológicas para identificar la histona  $H_1$ .

Se ensayó la probable reacción cruzada entre histonas totales de T. cruzi y un suero preparado contra histona  $H_1$  o contra histonas del núcleo nucleosomal, de espermatozoides de erizo de mar.

En la figura 9A (izquierda) se muestra que las histonas de espermatozoides de erizo de mar producen arcos de precipitación, en todas las diluciones probadas, con un



Figura 7.-Electroforesis en geles de poliacrilamida de histona  $H_1$  de T. cruzi. El carril 1: presenta las histonas obtenidas por extracción de la cromatina con PCA 0,75 M y posteriormente precipitada con acetona ácida, según el método de Sanders (125). El carril 2: presenta las histonas totales de T. cruzi (control) obtenidos como en Figura 1, carril 2. Las muestras fueron analizadas en geles de poliacrilamida al 15%, Tritón DF16-urea-ácido según Alfageme y col. (126).



Figura 8.-Electroforesis en geles de poliacrilamida de histonas enriquecidas en fracción H<sub>1</sub>. La figura presenta en el carril 1: histonas de timo de ternera (control), obtenidas según se explica en Materiales y Métodos. La secuencia de las histonas a la izquierda de la Figura corresponde a histonas de timo cuyo orden de migración corresponde al publicado por Franklin y Zweidler (150). Los carriles 2, 3 y 4 corresponden a muestras de histonas obtenidas a partir de histonas totales de, carril 2: histonas de espermatozoides de erizo de mar; carril 3: histonas de *I. cruzi*; carril 4: histonas de timo de ternera, que han sido reextraídas con PCA 5% durante 10 min. a 4°C, centrifugadas a 3.000 g. durante 20 min. y cuyo sobrenadante ha sido dializado y liofilizado.

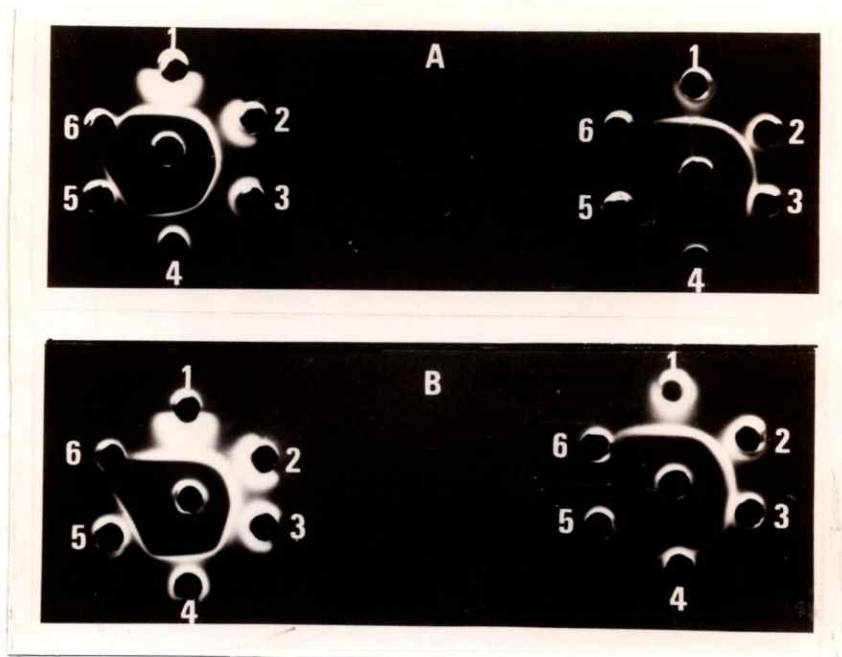


Figura 9.—(A) Inmunodifusión doble de un antisuero preparado por la inyección en conejos de histonas  $H_1$ , purificada de espermatozoides de erizo de mar, contra histonas de espermatozoides de erizo de mar (izquierda) y contra histonas totales de *I. cruzi* (derecha). (B). Inmunodifusión doble de un antisuero preparado en conejos contra histonas del core de espermatozoides de erizo de mar (izquierda) o contra las histonas de *I. cruzi* (derecha). Se usaron diferentes concentraciones de histonas: de espermatozoides de erizo de mar: 1, concentración inicial 10 mg/ml; 2 a 6, diluciones 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32. De *I. cruzi*: 1, concentración inicial 6,5 mg/ml; 2 a 6, diluciones 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32. El antisuero se colocó en el pocillo central.

antisuero preparado en conejos contra la histona H<sub>1</sub> de espermatozoides de erizo de mar. De manera similar, las histonas de T. cruzi muestran reacción cruzada con el mismo antisuero hasta una dilución 1/16, figura 9A (derecha).

Un resultado similar se obtuvo cuando las histonas obtenidas de espermatozoides de erizo de mar, figura 9B (izquierda) o de T. cruzi, (Fig. 9B, derecha), se probaron con un antisuero preparado en conejos contra las histonas del núcleo nucleosomal de espermatozoides de erizo de mar.

Para identificar las proteínas responsables de esta reacción cruzada, las histonas se separaron por electroforesis en geles de poliacrilamida en dos dimensiones. Para esto, las muestras de histonas de T. cruzi se corrieron en un gel de poliacrilamida al 15%, Tritón DF16-urea-ácido, obteniéndose un patrón semejante al de la Figura 1, carril 2, como se observa en la parte superior de la figura 11 (primera dimensión). El gel con las histonas así fraccionadas, se colocó sobre un gel en condiciones denaturantes (SDS), como se describe en Materiales y Métodos y se realizó una segunda electroforesis que se presenta en la figura 11. Las histonas así fraccionadas se transfirieron a papel de nitrocelulosa y se incubaron con el suero anti-histona H<sub>1</sub> de espermatozoide de erizo de mar. Posteriormente, el complejo antígeno-antisuero se reveló utilizando el sistema biotina streptavidina-biotina

peroxidasa como se describe en Materiales y Métodos.

La figura 10 muestra que las bandas c y f, las mismas que presentaban propiedades de solubilidad correspondientes a histonas H<sub>1</sub>, son reconocidas por el suero anti-histonas H<sub>1</sub> de espermatozoide de erizo de mar. La banda a presenta reacción cruzada, y se supone es una histona del núcleo nucleosomal. Resulta interesante comentar, que si bien la banda f presenta una reacción muy clara, la señal se observa más débil que las señales correspondientes a las otras histonas (a y c). Al respecto, cabe señalar que en las condiciones experimentales en que se realizó la transferencia de las histonas al filtro de nitrocelulosa (descrito en Materiales y Métodos) se ha encontrado que las histonas ricas en lisinas (particularmente H<sub>5</sub>) presentan una transferencia ineficiente (151). Además, la histona correspondiente a la banda f, se encuentra siempre en menor concentración relativa respecto a las otras histonas.

##### 5.- Presencia de variantes de histonas.

En los últimos años se ha descrito variantes de histonas en diversas especies (29, 30, 31, 33, 34, 36). Para examinar la posible presencia de variantes de histonas en I. cruzi, las histonas de este parásito se analizaron en geles de poliacrilamida en dos dimensiones. En la figura 11



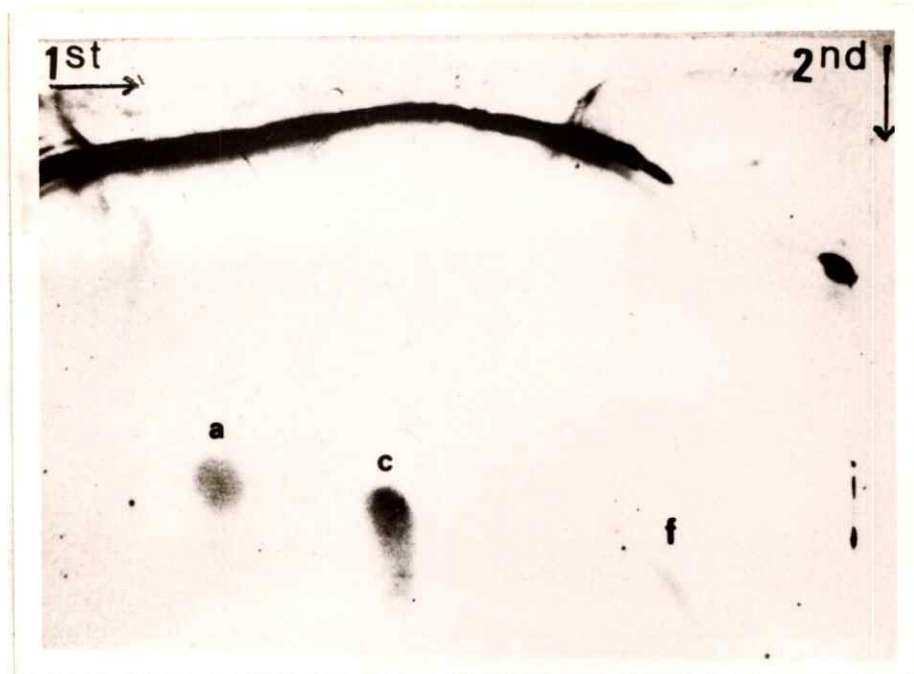


Figura 10.-Electroforesis bidimensional e inmunoblotting de las histonas de *T. cruzi*. Las muestras de histonas de *T. cruzi* se corrieron en primera dimensión en un gel de poliacrilamida al 15%, Tritón DF16-urea-ácido, (ésto se observa en la parte superior de la figura 11). Posteriormente este gel se colocó sobre un gel de poliacrilamida al 15% en condiciones denaturantes (SDS) según Laemmli (127) (segunda dimensión), que se muestra en la figura 11. Las histonas se transfirieron electroforéticamente a papel de nitrocelulosa y se incubaron con el suero de conejo anti histona H<sub>1</sub> de espermatozoides de erizo de mar. Los complejos antígeno-anticuerpo se detectaron por el sistema biotina-estreptavidina-biotina-peroxidasa como se describe en Materiales y Métodos. a, c y f corresponden a la primera, tercera y sexta banda del gel en primera dimensión.

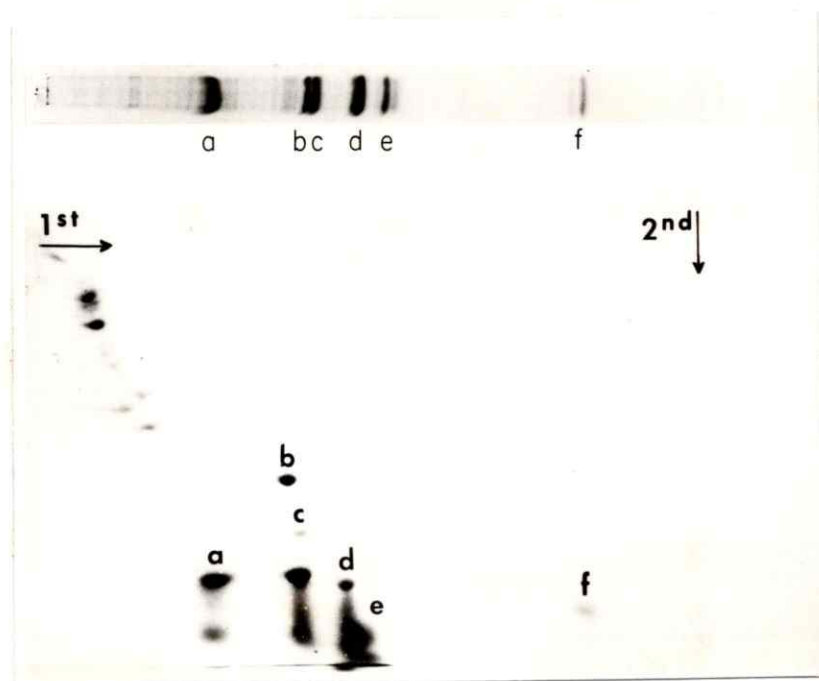


Figura 11.-Histonas de *T. cruzi* analizadas por electroforesis en geles de poliacrilamida en dos dimensiones. Las muestras de histonas de *T. cruzi* se corrieron en primera dimensión en un gel de poliacrilamida al 15%, Tritón DF16-urea-ácido, como se observa en la parte superior de la figura. Posteriormente este gel se colocó sobre un gel de poliacrilamida al 15% en condiciones denaturantes (SDS) según Laemmli (127) (segunda dimensión). El gel se fijó en TCA 15%, metanol 45% y las histonas se tiñeron con Amido-Black 0,6%.

se observa que las bandas obtenidas en la primera dimensión (Tritón DF16-urea-ácido) se resuelven en 2 o más bandas en la segunda dimensión, sugiriendo la presencia de variantes de las histonas en la cromatina de T. cruzi. No se ha determinado si la heterogeneidad obtenida corresponde a modificaciones post-síntesis de las histonas o a diferencias en la composición de aminoácidos de tales proteínas.

#### 6.- Fosforilación de histonas de T. cruzi.

Se acepta que la fosforilación de histonas influye en la estructura y función de la cromatina en eucariontes superiores (58,59). La figura 12 muestra la fosforilación de las histonas de T. cruzi analizadas en geles de poliacrilamida Tritón DF16-urea-ácido. Las histonas marcadas con  $^{32}\text{P}$  y obtenidas a partir de cultivos de 5 días se observan en el carril 1. Las histonas obtenidas después de 14 días de cultivo se observan en el carril 2. La marca observada puede corresponder a fosforilación de aminoácidos o ADP-ribosilación. Las muestras del carril 3 y 4 fueron tratadas con fosfatasa alcalina y la pérdida de marcación debiera indicar la desfosforilación de fosfoaminoácidos. Aquellas bandas de histonas cuya radioactividad se mantiene después del tratamiento con fosfatasa alcalina, probablemente corresponden a marcación por ADP-ribosilación. Además de observar varias proteínas de más alto peso molecular, se

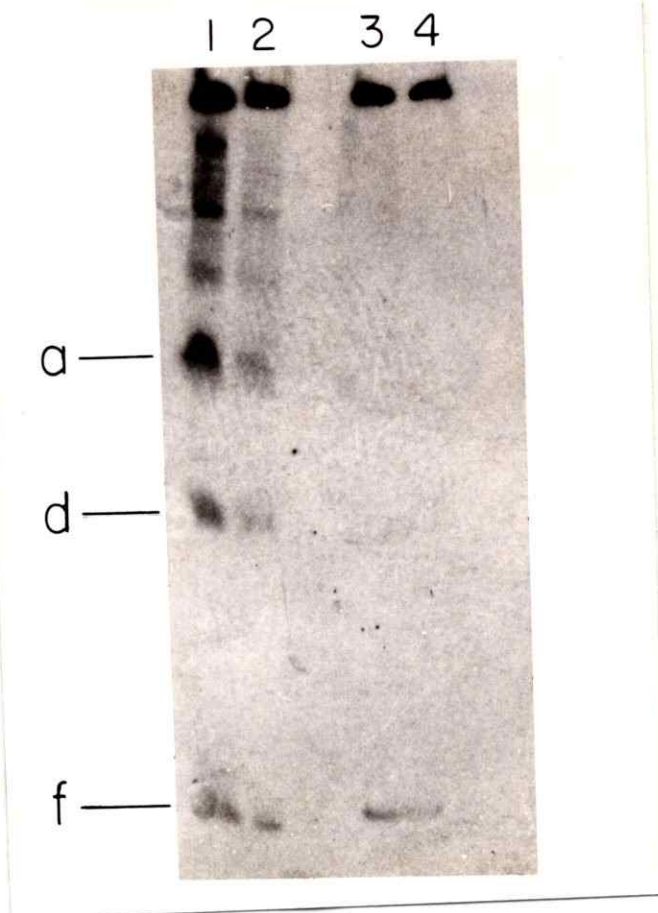


Figura 12.-Fosforilación de las histonas de T. cruzi. Epimastigotes de día 5: carriles 1 y 3 (alta actividad proliferativa) y de día 14: carriles 2 y 4 (baja actividad proliferativa) se incubaron con ácido ortofosfórico  $^{32}\text{P}$  como se describe en Materiales y Métodos. Las histonas marcadas con  $^{32}\text{P}$  se analizaron en electroforesis en geles en poliacrilamida al 15% Tritón DF16-urea-ácido; posteriormente el gel se secó y se realizó una autorradiografía. En los carriles 3 y 4, las histonas se trataron fosfatasa alcalina según se especifica en Materiales y Métodos.

observan tres bandas (a, d y f) que corresponderían a histonas fosforiladas provenientes de células que se encuentran en fase exponencial o fase estacionaria. La intensidad de todas las bandas es mayor en el material obtenido a los 5 días. Por la persistencia de la marca en la banda f se podría concluir que esta histona está ADF-ribosilada.

7.- Análisis comparativo de histonas de T. cruzi, de espermatozoides de erizo de mar, de hígado de rata y de timo de ternera en tres sistemas de electroforesis.

Un criterio utilizado por Rizzo y col. (104) para caracterizar histonas de protistas es la comparación con patrones electroforéticos de histonas de organismos superiores en distintos sistemas electroforéticos. La figura 13 muestra los resultados de una electroforesis en un gel poliacrilamida Tritón DF16-urea-ácido, de muestras de histonas de T. cruzi (carril 1), espermatozoides de erizo de mar (carril 2), hígado de rata (carril 3) y timo de ternera (carril 4). Como se describió anteriormente (figura 1), 5 histonas de T. cruzi están presentes en el rango de migración de las histonas de eucariontes superiores. Una sexta histona de alta movilidad se observa en la preparación de T. cruzi, la que se resuelve en dos bandas. Estas histonas de rápida migración se identificaron

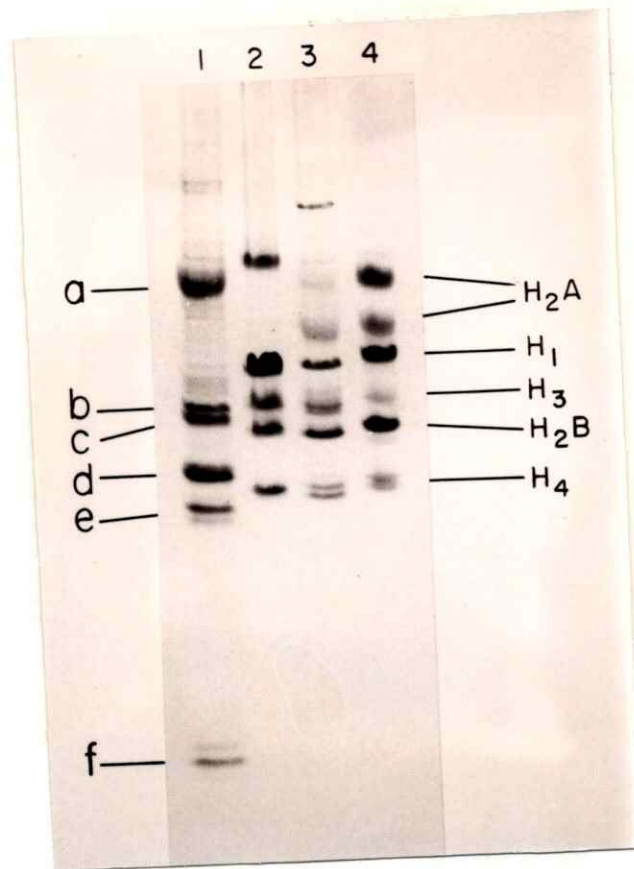


Figura 13.-Análisis comparativo de histonas en electróforesis en geles de poliacrilamida 15%, Tritón DF16-urea-ácido. Las preparaciones de cromatina se realizaron según el procedimiento de Stein y col. (121) como se describe en Materiales y Métodos. La extracción de las histonas se realizó según Pamyin y col. (122). La figura muestra en el carril 1: histonas de epimastigotes de *T. cruzi* (75  $\mu$ g), carril 2: histonas de espermatozoides de erizo de mar (60  $\mu$ g), carril 3: histonas de hígado de rata (60  $\mu$ g) y carril 4: histonas de timo de ternera (65  $\mu$ g). El orden migración de las histonas de timo de ternera es: H<sub>2</sub>A, H<sub>1</sub>, H<sub>3</sub>, H<sub>2</sub>B y H<sub>4</sub>.

como histonas  $H_1$  por purificación empleando el método de Sanders (123); por sus propiedades de solubilidad y por sus características inmunológicas. Con la posible excepción de la banda a, no se observan movilidades similares cuando se compara las histonas de T. cruzi con las de espermatozoides de erizo mar, hígado de rata o timo de ternera.

La figura 14 muestra las histonas extraídas de T. cruzi (carril 1), espermatozoides de erizo de mar (carril 2), hígado de rata (carril 3) y timo de ternera (carril 4) separadas por electroforesis en un gel de poliacrilamida-SDS, según Laemmli (127). En la muestra obtenida de T. cruzi (carril 1) se observa dos bandas (indicadas por flechas) de migración intermedia entre la histona  $H_1$  y las histonas del núcleo nucleosomal de timo y de hígado de rata. Hay una tercera banda sobre tres bandas prominentes, que están localizadas a nivel de migración de las histonas del núcleo nucleosomal de las histonas de timo e hígado de rata.

Cuando la histona  $H_1$  se extrae de la cromatina de T. cruzi y de timo de ternera empleando el método de Sanders (125), se obtiene las 2 bandas esperadas de  $H_1$  de timo (carril 5), mientras se observan 3 bandas en T. cruzi (carril 6). Dos de estas bandas comigran con las indicadas por flechas en el carril 1, mientras la tercera banda está localizada al nivel de las histonas del core. Ninguna de estas

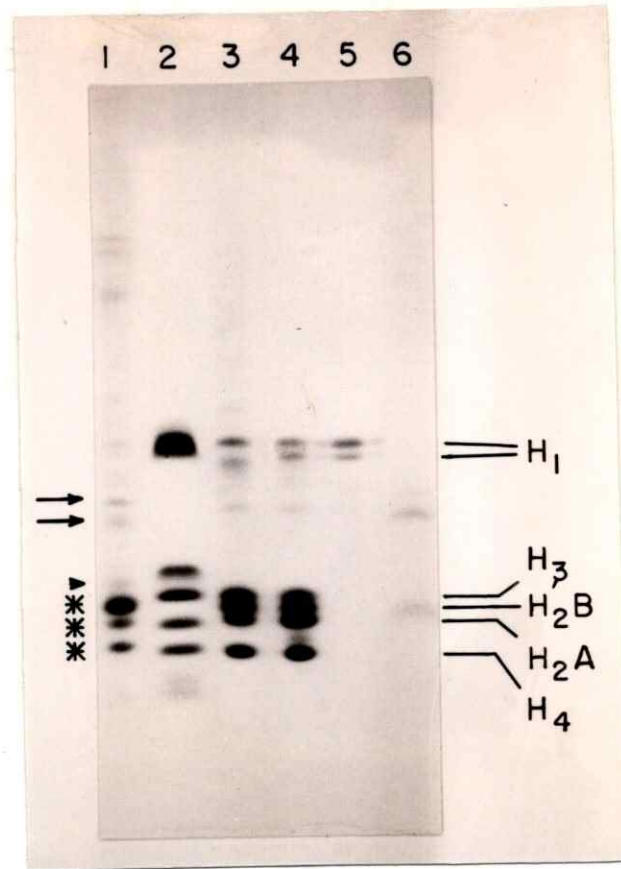


Figura 14.-Análisis comparativo de histonas en electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones denaturantes (SDS). Las preparaciones de cromatina se realizaron según el procedimiento de Stein y col. (121) como se describe en Materiales y Metodos. La extracción de las histonas se realizó según Panyim y col. (122). La figura muestra en el carril 1: histonas de epimastigotes de *T. cruzi* (40 µg), carril 2: histonas de espermatozoides de erizo de mar (50 µg), carril 3: histonas de hígado de rata (50 µg), carril 4: histonas de timo de ternera (50 µg). Carril 5: histonas H<sub>1</sub> de timo de ternera (10 µg) y de epimastigotes de *T. cruzi*; carril 6 (10 µg) que se extrajeron por la técnica de Sanders. La electroforesis se realizó en un gel de acrilamida al 15%, en condiciones denaturantes, en presencia de 0,1% SDS, según Laemmly. El orden de migración para histonas de timo es: H<sub>1</sub>, H<sub>3</sub>, H<sub>2</sub>B, H<sub>2</sub>A y H<sub>4</sub>.



posibles  $H_1$  comigra con la histona  $H_1$  de timo de ternera. Sin embargo, las histonas extraídas en T. cruzi por el mismo método han sido identificadas como posibles  $H_1$ . (Fig. 7).

La figura 15 muestra las histonas obtenidas de T. cruzi (carril 1), espermatozoides de erizo de mar (carril 2), hígado de rata (carril 3) y timo de ternera (carril 4), fraccionadas por electroforesis en un gel de poliacrilamida urea-ácido (122). Nuevamente, se observan 6 bandas en la muestra obtenida de T. cruzi. Ninguna de ellas comigra con  $H_1$  o con  $H_4$  de las muestras obtenidas de eucariontes superiores. La banda de rápida migración corresponde a la observada en los geles Tritón DF16-urea-ácido (banda f) y es extraída por el método de Sanders (carril 6). En el carril 5 se muestra la histona  $H_1$  de timo de ternera, usando el mismo procedimiento de purificación.

8.- Estimación de los pesos moleculares de las histonas de T. cruzi.

Para estimar los pesos moleculares de las histonas de T. cruzi se utilizó el método descrito por Hamana e Iwai (132). Para esto se realizaron electroforesis en geles a distintas concentraciones de acrilamida conteniendo ácido acético 0,9 M y urea 6,25 M. Se utilizaron histonas de timo

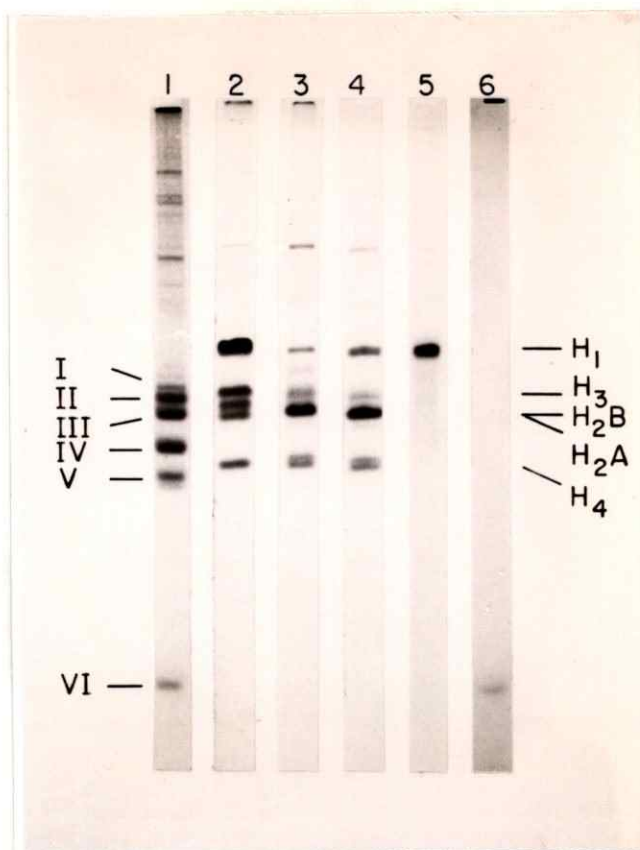


Figura 15.-Análisis comparativo de histonas en electroforesis en geles de poliacrilamida urea-ácido. Las preparaciones de cromatina se realizaron según el procedimiento de Stein y col. (121) como se describe en Materiales y Métodos. La extracción de las histonas según Panyim y col. (122). La figura muestra en el carril 1: histonas de epimastigotes de *T. cruzi* (65  $\mu$ g), carril 2: histonas de espermatozoides de erizo de mar (50  $\mu$ g), carril 3: histonas de hígado de rata (50  $\mu$ g), carril 4: histonas de timo de ternera (50  $\mu$ g), carril 5: histonas H<sub>1</sub> de timo de ternera (14  $\mu$ g) y de epimastigotes de *T. cruzi*; carril 6 (10  $\mu$ g) que se extrajeron por la técnica de Sanders (125). La electroforesis se realizó en un gel de acrilamida al 15%, 2,5 M Urea 0,9 N ácido acético, según Panyim y col. (122). El orden de migración para timo de ternera es: H<sub>1</sub>, H<sub>3</sub>, H<sub>2</sub>B, H<sub>2</sub>A y H<sub>4</sub>.

de ternera como patrón. Posteriormente se graficó la movilidad relativa de las histonas de timo (Rf) contra sus respectivos pesos moleculares (133) y se extrapoló el valor correspondiente a las histonas de T. cruzi.

En la Tabla 2 se presenta la estimación de los pesos moleculares de 5 histonas de T. cruzi, en relación a las histonas de timo de ternera. No es posible estimar el peso molecular de la histona de rápida migración debido a que no puede compararse con las histonas de timo.

TABLA 2

Estimación de los pesos moleculares de las histonas del T. cruzi

Timo de Ternera	<u>Trypanosoma cruzi</u>		
P.M	En ácido-urea	Equivalencia a Tritón DF-16	Posible equivalencia a timo.
H <sub>1</sub> : 21,000	Banda I : 16,000	(b)	N.D.
H <sub>3</sub> : 15,324	Banda II : 14,900	(c)	H <sub>3</sub>
H <sub>2A</sub> : 14,002	Banda III: 14,000	(a)	H <sub>2A</sub>
H <sub>2B</sub> : 13,775	Banda IV : 12,000	(d)	H <sub>2B</sub>
H <sub>4</sub> : 11,282	Banda V : 10,700	(e)	H <sub>4</sub>

Tabla 2: Se utilizó el procedimiento descrito por Ferguson. El peso molecular de la banda f de los geles Tritón, ácido-urea no pudo ser estimado por este procedimiento.

Para establecer la equivalencia entre las bandas de proteínas separadas en el sistema urea-ácido y las bandas de histonas fraccionadas en geles de Tritón DF16-urea-ácido (a,b,c,d,e,f), estas últimas se cortaron y se eluyeron. Posteriormente cada proteína se analizó en un gel urea-ácido. Estos resultados permiten realizar una asignación tentativa a través de los pesos moleculares, de las bandas de proteínas encontradas en I. cruzi, a sus análogas en timo. Así la banda a en gel tritón DF16-urea-ácido podría corresponder a H<sub>2</sub>A de timo; la banda c a la H<sub>3</sub> de timo; la banda d a H<sub>2</sub>B y la banda e a H<sub>4</sub> de timo. Faltarían por asignar la banda b, de peso molecular 16,000. Por otra parte no es posible conocer el peso molecular de la banda f. Si bien por este criterio la banda c podría corresponder a una histona H<sub>3</sub>, hay que recordar que esta misma proteína presenta solubilidad en PCA y TCA 5% y reacciona inmunológicamente contra el suero anti H<sub>1</sub> (que tiene reacción cruzada con proteínas del núcleo nucleosomal). Esto presenta el problema de que estaríamos frente a una histona H<sub>3</sub> atípica, que también ha sido descrita en espermatozoides de erizo de mar (138); o bien en ausencia de una H<sub>3</sub>. Es interesante acotar que mediante procedimientos de extracción preferencial de histonas de la cromatina en concentraciones de NaCl crecientes (146,147), se esperaría que las histonas H<sub>1</sub>, H<sub>2</sub>A y H<sub>2</sub>B se extrajeren de la cromatina en

concentraciones de NaCl inferiores a las necesarias para extraer las histonas H<sub>3</sub> y H<sub>4</sub>. Al realizar este experimento esta proteína (banda c) no forma parte de la fracción que se extrae a concentraciones bajas de NaCl, figura 16. Ello implicaría que está unida a la cromatina más fuertemente que una H<sub>1</sub>, sugiriendo, por lo tanto, que la banda c fuese una H<sub>3</sub> atípica. Asimismo al estudiar la fosforilación de las histonas, la banda c no es fosforilada, mientras la banda f si lo es (Fig. 12). Esto indicaría, que estamos frente a dos proteínas diferentes, de las cuales la banda f correspondería a una histona H<sub>1</sub> que se fosforila y la banda c una H<sub>3</sub> atípica que no se fosforila.

Otro rasgo interesante de las histonas es el hecho de que presentan metacromasia. Así, las propiedades de tinción de las histonas, también pueden aportar información acerca de ellas (104). Se ha descrito metacromasias específicas para H<sub>1</sub> al teñir con Coomassie Brilliant Blue R-250. Una situación análoga ha sido descrita por Zweidler (130), después de destinción exhaustiva de histonas de vertebrados teñidas con Amino Black. En este caso H<sub>2</sub>A y H<sub>3</sub> aparecen verdes, H<sub>1</sub> y H<sub>2</sub>B púrpura y H<sub>4</sub> de color intermedio. En nuestras preparaciones, ambos tipos de metacromasias han sido observadas, siendo muy notorias y claras las de H<sub>1</sub> de timo y de la banda f de I. cruzi. Así, se ha observado la metacromasia de H<sub>1</sub> y H<sub>2</sub>B de timo, correspondiéndose con la

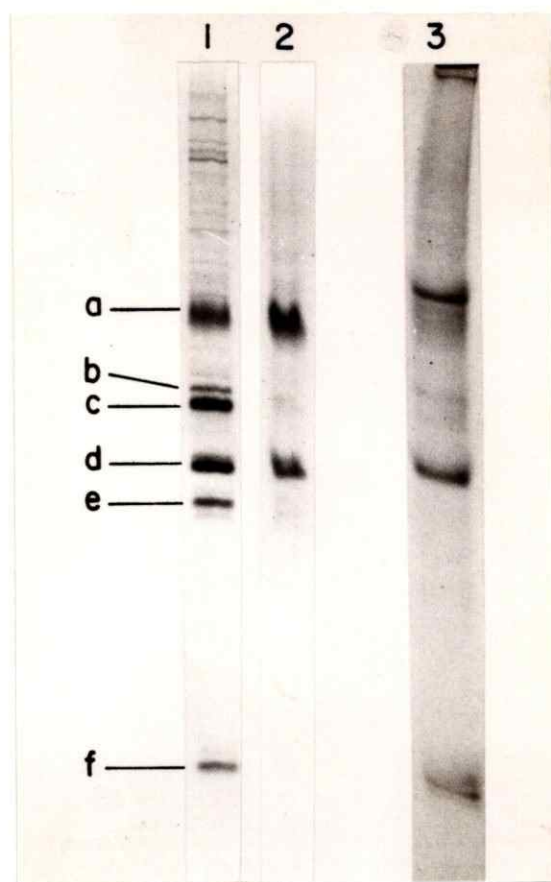


Figura 16.-Disociación selectiva de histonas de la cromatina de *T. cruzi* por NaCl. Electroforesis en poliacrilamida 15% Tritón DF16-urea-ácido. La figura muestra en el carril 1: histonas totales de *T. cruzi*. (75  $\mu$ g). La preparación de cromatina se realizó según el procedimiento de Stein y col. (121). La extracción de las histonas se realizó según Panyim y col. (122). Carril 2: histonas obtenidas de la fracción soluble de la cromatina en NaCl 0,8 M, previa extracción de la cromatina con NaCl 0,6 M.; carril 3: histonas obtenidas de la fracción soluble de la cromatina en NaCl 0,6 M, sin previa extracción de H<sub>1</sub>.

banda f y la banda d de T. cruzi respectivamente.

9.- Comparación de las histonas en diferentes Tripanosomátidos.

Dadas las diferencias observadas en las histonas obtenidas en Chritidia fasciculata en el laboratorio del Dr. J.J. Cazzulo, Argentina, y las histonas de T. cruzi en nuestro laboratorio, se programó un experimento conjunto, utilizando diferentes géneros de tripanosomátidos y diferentes cepas de T. cruzi. La figura 17 muestra las histonas obtenidas de tres protozoos pertenecientes a diferentes géneros de Trypanosomátidos, (Chritidia fasciculata, Leishmania mexicana y T. cruzi), analizadas por electroforesis en geles de poliacrilamida Tritón DF16--urea-ácido. Los carriles 1 y 2 muestran histonas de timo de ternera y de espermatozoides de erizo de mar respectivamente. El carril 3 corresponde a las histonas de L. mexicana, el carril 4 a C. fasciculata y los carriles 5 a 9 a diferentes cepas de T. cruzi (Tulahuén, Tul 0, LG, Tul 2 y Kai-72).

En los tres géneros estudiados se observan diferencias a nivel de las histonas del núcleo nucleosomal. En todos hay presencia de bandas con alta migración electrofórica, las que también presentan diferencias apreciables. Más aún, existen diferencias claras entre las histonas de



Figura 17.- Estudios comparativos de las histonas de distintos géneros de trypanosomatidos y de distintas cepas de T. cruzi. Electroforesis en geles de poliacrilamida 15%, Tritón DF16-urea-ácido. Las preparaciones de cromatina se realizaron según el procedimiento de Stein y col. (121) como se describe en Materiales y métodos. La extracción de las histonas se realizó según Panyim y col. (122). Se usaron como controles, carril 1: histonas de timo de ternera, carril 2: histonas de espermatozoides de erizo de mar. A continuación se presentan, carril 3: L. mexicana, carril 4: C. fasciculata, carril 5: T. cruzi cepa Tulahuen, carril 6: T. cruzi cepa Tul O, carril 7: T. cruzi cepa LQ, carril 8: T. cruzi cepa Tul 2 y carril 9: T. cruzi cepa Kai-72.



los tres géneros de Trypanosomátidos y los eucariontes superiores estudiados (carriles 1 y 2).

10.- Presencia de variantes de histonas en distintos estados proliferativos y diferenciados de T. cruzi.

Como se dijo anteriormente, se han descrito variantes de histonas en muchas especies. En este trabajo también se observa variantes de histonas de T. cruzi en geles bidimensionales y se describe una modificación post-traduccionaI de ellas. A las variantes de histonas se les han asignado propiedades funcionales, relacionándolas con estados específicos de proliferación y diferenciación celulares (28,29, 30,31, 33, 34).

Para examinar la primera posibilidad, se extrajo histonas de cultivos de T. cruzi de 5 días (fase exponencial de crecimiento) y de 14 días (fase estacionaria de crecimiento). Las histonas obtenidas se analizaron en geles de poliacrilamida Tritón DF16-urea-ácido. Como se puede observar en la figura 18, mientras las histonas obtenidas el día 5 (carril 1) presentan el patrón convencional, las obtenidas el día 14 (carril 2), muestran dos bandas nuevas, una bajo la banda c y otra bajo la banda e (flechas). En estas condiciones, no está claro si estas bandas son variantes específicas de este estado, o si corresponden a un producto de degradación producido por una proteasa



Figura 18.-Análisis comparativo de histonas de *T. cruzi*, cepa Tulahuén, en distintos estados proliferativos. Las preparaciones de cromatina se realizaron según el procedimiento de Stein y col. (121) como se describe en Materiales y Métodos. La extracción de las histonas se realizó según Fanyim y col. (122). La figura muestra en el carril 1: histonas extraídas de cultivos de *T. cruzi* en fase exponencial de crecimiento (5 días), carril 2: histonas extraídas de cultivos en fase estacionaria de crecimiento (14 días). Las muestras se analizaron por electroforesis en gel de poliacrilamida al 15%, Tritón DF16-urea-ácido según Alfageme y col. (126).

específica de este estado, o si ellas corresponden a variantes que son producto de un proceso proteolítico fisiológicamente regulado y relacionado con el metabolismo de las histonas. Un proceso de este tipo ha sido descrito para  $H_3$  y para histonas tipo  $H_1$  del micronúcleo de Tetrahymena (153,154,155)

Para examinar la presencia de variantes de histonas relacionadas con la diferenciación celular, se extrajo las histonas de T. cruzi del clon Dm 28c. Como se explicó en Materiales y Métodos, este clon presenta la propiedad de diferenciarse en cultivos de laboratorio.

Una vez purificados los tripomastigotes, (forma no replicativa e infectiva del parásito), se extrajo las histonas y se compararon con las histonas obtenidas de epimastigotes, (forma replicativa y no infectiva del parásito); tanto de 5 como de 14 días de cultivo. Los resultados se muestran en la figura 19. Al comparar las histonas de día 5 de cultivo (carril 1) con las histonas de día 14 de cultivo (carril 2) nuevamente se observa el fenómeno descrito en la cepa Tulahuén; esto es, aparecen dos nuevas bandas de proteínas en el día 14, bajo la banda c y bajo la banda e, que se indican con flechas.

Al analizar las bandas obtenidas de los tripomastigotes se observó ausencia de la banda a (dato no mostrado).

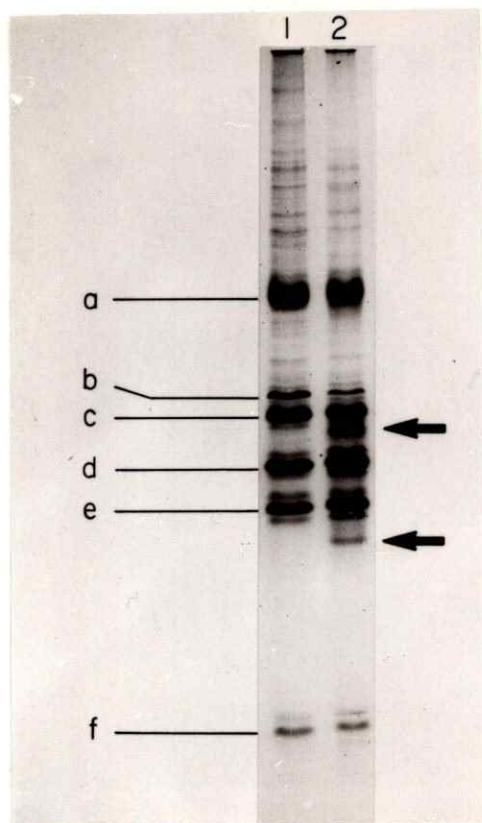


Figura 19.-Análisis comparativo de histonas de *T. cruzi*, clon DM 28c en proliferación. Las preparaciones de cromatina se realizaron según el procedimiento de Stein y col. (121) como se describe en Materiales y Métodos. La extracción de las histonas se realizó según Panyim y col. (122). La figura muestra en el carril 1: histonas extraídas de cultivos en fase exponencial de crecimiento y carril 2: histonas extraídas de cultivos en fase estacionaria de crecimiento. Las muestras se analizaron por electroforesis en gel de poliacrilamida al 15%, Tritón DF16-urea-ácido. La electroforesis se realizó en geles de poliacrilamida Tritón, ácido-urea.

Este experimento se repitió en la presencia de 4 inhibidores de proteasas. El resultado se muestra en la figura 20. Aparecen diferencias a nivel de la banda f. Esta proteína presenta alto grado de heterogeneidad, una característica más que la semeja a las histonas H1 de eucariontes superiores.

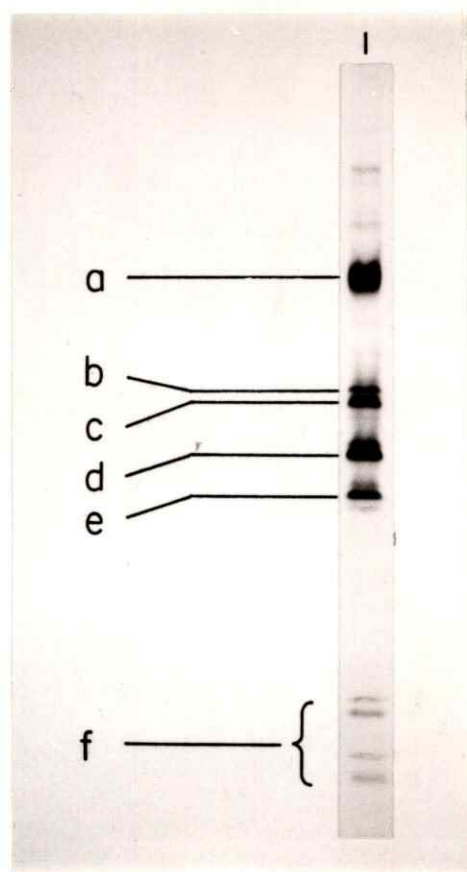


Figura 20.-Análisis de histonas de tripomastigotes del clon DM 28c. La figura muestra en el carril 1 las histonas de tripomastigotes del col DM 28c. La preparación de cromatina se realizó según el procedimiento de Stein y col. (121) como se describe en Materiales y Métodos. La extracción de las histonas se realizó según Panyim y col. (122). La muestra se obtuvo en presencia de PMSF 2,2 mM; TLCK 1,5 mM; TPCK 1 mM y N-ethylmaleimida 1 mM. La muestra se analizó en geles de poliacrilamida al 15%, Tritón DF16-urea-ácido.

#### D. DISCUSION

Las histonas de T. cruzi fueron sistemáticamente caracterizadas mediante técnicas de espectrofluorometría, composición de aminoácidos, electroforesis en geles de poliacrilamida en una y dos dimensiones, extracción diferencial con ácido perclórico y ácido tricloroacético, reactividad cruzada con antisueros y Western blot.

Se concluye que T. cruzi presenta 6 histonas principales, incluyendo una H<sub>1</sub> que presenta propiedades inmunológicas y de solubilidad similares a las de otras especies (espermatozoides de erizo de mar, timo de ternera, hígado de rata) pero con movilidad electroforética particular en geles de poliacrilamida.

En este trabajo se describen además, 8 variantes de histonas (a:1; b:0; c:2; d:2; e:2 y f:1) y se detecta fosforilación post-síntesis de tres histonas de T. cruzi.

Por otro lado, ha sido posible identificar la presencia de 2 variantes de histonas relacionadas con proliferación y 2 con diferenciación del parásito. Asimismo, se observa variantes de histonas en diferentes géneros de la familia Trypanosomatidae y en diferentes cepas de T. cruzi.

La presencia de variantes de histonas sugiere que ellas podrían participar en la regulación de la proliferación celular y la diferenciación del parásito, como ha sido postulado para eucariontes superiores.

Por otro lado, en el estudio comparativo de las histonas de T. cruzi con histonas de otras especies, usando diferentes sistemas electroforéticos, se observó la existencia de algunas diferencias en las características de las histonas con respecto a los eucariontes superiores.

Los eucariontes se clasifican en cuatro grandes divisiones: los Protistas, los Hongos, las Plantas y los Animales. El orden de sucesión de estos linajes eucarióticos puede ser cuestionado; sin embargo, se acepta generalmente que los primeros eucariontes fueron más similares a ciertos miembros de los Protistas de hoy día (156). No obstante, en estos Protistas la diversidad citológica, fisiológica, bioquímica y genética excede cualquier supuesto. Por ejemplo, es interesante señalar dentro de este marco conceptual, el hecho que en ciertos tripanosomátidos la secuencia génica correspondiente a ciertos productos mitocondriales, está incompleta en el genoma mitocondrial. Así, el RNA mensajero debe incorporar, en ciertos casos, hasta un 50% de las bases durante el proceso de transcripción (157,158). Para identificar este fenómeno se introdujo el término "RNA editing" (158) que describe el



proceso resultante de la adición de residuos de uridina no codificados en el genoma.

Esta diversidad extrema en el proceso transcriptivo y en el concepto de "gen" que introduce este mecanismo, se encuentra igualmente en casi cualquier aspecto que se estudie en los Protistas. Problemas tan interesantes como las peculiares transformaciones fenotípicas en diferentes ambientes, los intrincados y finos mecanismos de evasión de la respuesta inmune del huésped, la división mitótica sin condensación de la cromatina, la organización de ribosomas en base a numerosas partículas de rRNA de tamaños diversos, la transcripción discontinua del mensaje genético, la asignación de ciertos genes a fragmentos de DNA denominados "miniexones" (2,91,158,159), convierten a los tripanosomátidos en uno de los centros de investigación biológica.

En esta tesis y en trabajos de otros investigadores se ha descrito una diversidad en las histonas encontradas en Protistas (104,105,106,107), lo que permite suponer que algunos de estos organismos podrían representar formas de transición entre los modos de compactar el DNA que tienen los procariontes y los eucariontes.

Se ha descrito varios problemas en el estudio de las histonas de Protistas, los que incluyen dificultad en aislar núcleos, degradación proteolítica de estas proteínas cromosomales y migración electroforética diferente a las

histonas de timo de ternera, hecho que dificulta su identificación. Por estos problemas se ha sugerido el uso de diferentes criterios para la identificación de las histonas de protistas (36,104,105,106,107).

La dificultad de obtener núcleos limpios e intactos en protistas eucarióticos para la extracción de histonas fue señalada por Rizzo (104). Mientras en hígado de mamíferos se obtiene núcleos con 70% (160) y 90% de recuperación (161), en eucariontes inferiores los rendimientos no superan el 20% (162). Aún más, Rubio y col. (104) observaron, por microscopía óptica de contraste de fases, que los núcleos purificados de I. cruzi eran particularmente frágiles. Con estos rendimientos bajos, las histonas no pueden ser extraídas cuantitativamente. Esto, unido al bajo contenido de DNA en el núcleo de I. cruzi, que se ha estimado entre 0,28 pg (99) y 0,17 pg (163) nos llevó a elegir la extracción de histonas a partir de cromatina, procedimiento ampliamente utilizado en eucariontes superiores (121,122). Este método produce un rendimiento razonable de histonas de I. cruzi, con un patrón electroforético constante.

Otro problema es la degradación proteolítica de las histonas. Prevenir la proteólisis es un problema general en el análisis de proteínas de cualquier organismo. En

el caso específico de las histonas se han descrito proteasas citoplasmáticas y nucleares que constituyen fuente potencial de error en la preparación de estas proteínas cromosomales en distintas especies (139,140). Este problema es de especial importancia en la cepa Tulahuén de T. cruzi, que contiene un activo conjunto de proteasas (141,142,143).

Si bien no existe una técnica que garantice la eliminación de la proteólisis durante la purificación de proteínas, se han desarrollado con éxito diferentes estrategias tendientes a minimizar este problema (144,145).

Entre los elementos que podrían indicar proteólisis está la obtención de patrones electroforéticos diferentes con el mismo, o con distintos métodos de purificación. Considerando este hecho, se empleó diferentes métodos de obtención de las histonas de T. cruzi, obteniéndose siempre el mismo patrón electroforético.

Así mismo, una manera de enfrentar la proteólisis es obtener la cromatina y extraer las histonas a 4°C y en tiempos reducidos. Al respecto, se obtuvieron patrones electroforéticos similares utilizando tiempos cortos o largos de extracción, siempre a baja temperatura. En consecuencia se utilizó como protocolo la extracción de las histonas durante toda la noche.

Otros indicadores de proteólisis son la pobre resolución de bandas y alto fondo de tinción a lo largo del

carril, la pérdida de bandas de alto peso molecular, la discrepancia en las movilidades relativas aparentes de las proteínas obtenidas en preparaciones crudas y aquellas obtenidas en preparación purificadas o la ausencia de bandas específicas en la muestra cruda, la diferencia en las movilidades relativas observadas para la misma proteína purificada por procedimientos alternativos y la aparición de bandas nuevas.

En general nuestros resultados están acordes con los criterios mencionados, puesto que se obtienen bandas definidas y constantes empleando diferentes condiciones de extracción de las histonas de T. cruzi así como distintas técnicas de separación electroforética. Más aún, las bandas extraídas de la cromatina están también presentes en extractos ácidos del protozoo entero.

Una de las formas más eficientes para enfrentar el problema de la proteólisis es reducir la actividad de las proteinasas empleando inhibidores específicos. Considerando que existen diferentes proteasas en distintos organismos, e incluso en diferentes tejidos de un mismo organismo, es aconsejable conocer el tipo de enzimas proteolíticas presentes en el material de trabajo con el objeto de diseñar una estrategia racional y efectiva.

Las proteasas se han clasificado en cuatro tipos según su mecanismo catalítico: aspártico, cisteín, serín y

metalo proteinasas. Cada uno de éstas es susceptible a diferentes inhibidores. Entre los inhibidores estudiados se ha descrito que N-etilmaleida inactivaría cistein-proteinasa, mientras que TLCK, TPCK y PMSF, entre otros, inactivarían tanto cistein como serin proteasas. Las metalo proteinasas serían inhibidas por EDTA ó EGTA. También se han descrito calpain proteinasas, las cuales son activas sólo en presencia de calcio (144).

En la familia Trypanosomatidae se ha determinado diferentes actividades proteolíticas (141,143). En T. cruzi la mayoría de ellas pueden clasificarse como cistein proteinasas.

Reemplazando el ión calcio por el ión magnesio en el tampón empleado en la preparación de cromatina para la extracción de histonas, se obtuvo patrones electroforéticos idénticos, resultado que sugiere que las calpain proteinasas no actuarían sobre las histonas de T. cruzi en las condiciones usadas para preparar el extracto (Fig.3). Por otra parte se empleó diversos inhibidores de proteasas, solos o combinados, presentes durante todo el procedimiento de obtención de cromatina y extracción de histonas en concentraciones usualmente efectivas en otros sistemas. En concordancia con lo descrito por Bongertz (142) y Cazzulo (143), encontramos que el TLCK es el inhibidor más efectivo, aún a bajas concentraciones (Fig.2).

El bisulfito de sodio por su parte, no inhibe sino más bien aumenta la proteólisis, dando patrones con diferente grado de degradación en experimentos similares. La presencia de proteasas que degradan histonas en la preparación de cromatina y que son activadas por bisulfito de sodio fué previamente descrita en huevos no fertilizados de erizo de mar (139). Nuestros resultados fueron confirmados por J.J. Cazzulo (comunicación personal) quien demostró que la cistein proteinasa principal de T. cruzi es activada por bisulfito de sodio 50 mM en un grado similar a la máxima activación de esta misma proteasa con 2-mercaptoetanol. A pesar que el patrón de histonas se mantiene utilizando sólo TLCK, se seleccionó la combinación TLCK 1,5 mM- PMSF 1 mM para realizar las extracciones considerando que el PMSF es un inhibidor contra todas las serin proteasas, ampliamente empleado en otros estudios realizados en T. cruzi y que también logra inhibir las cistein proteasas (145).

La observación (Fig.1) que las histonas aisladas de T. cruzi presentan diferente movilidad electroforética en geles de poliacrilamida, respecto a las histonas de espermatozoides de erizo de mar, empleadas como control, unido a la información existente acerca de la diversidad encontrada en Protistas (104,105,106) hacía necesario utilizar distintos criterios para caracterizar las histonas

del *T. cruzi*. Esto había sido señalado previamente por Rizzo, (104) y Gorovsky (106) entre otros, al trabajar con histonas de eucariontes inferiores, y por Alfageme y col. (126) quienes encontraron que las histonas de *Drosophila* presentan patrones electroforéticos diferentes a las histonas de timo de ternera. Más aún, Caplán (105) encontró que en *Oxytrichia*, la histona H<sub>1</sub> migraba más rápido que la H<sub>4</sub> en geles urea-ácido. Los criterios propuestos por estos autores (104,105,106) para caracterizar las histonas de organismos inferiores son: espectro de absorción UV, composición de aminoácidos, ausencia de triptófano, solubilidad diferencial en ácidos y solventes orgánicos, reactividad inmunológica cruzada con anticuerpos contra histonas patrón, fraccionamiento electroforético en distintos sistemas de geles de poliacrilamida (con SDS, o con urea-ácido acético, o en presencia de diferentes detergentes no iónicos), tinciones diferenciales y estimación de pesos moleculares, entre otros.

Estos criterios fueron utilizados para la caracterización de histonas de *T. cruzi*.

Los espectros de emisión y excitación de las histonas de *T. cruzi* se compararon con aquellos de histonas de espermatozoides de erizo de mar y de una solución de triptófano 10 mM. Los resultados obtenidos no excluyeron la presencia de triptófano; pero sí señalaron diferencias en el

microambiente de los aminoácidos que emiten fluorescencia, sugiriendo que las histonas de ambas especies eran diferentes. La marcada diferencia en las movilidades electroforéticas de ambas preparaciones en geles de poliacrilamida Tritón-urea-ácido confirmó esta observación. Por otra parte, el análisis de la composición de aminoácidos de las histonas de espermatozoides de erizo de mar, que se usaron como control, difieren de las fracciones análogas de otras especies (138). Por su parte, el análisis de la composición global de aminoácidos de las proteínas básicas aisladas de T. cruzi, presenta características comunes con las descritas para histonas en otras especies. Esto se deduce al comparar la composición de aminoácidos de las proteínas básicas de T. cruzi con las histonas timo de ternera (164). (Se observa en la Tabla situada en el Apéndice).

Una situación análoga se presenta cuando se compara la composición de aminoácidos de las histonas de T. cruzi con aquellas descritas en otros Protistas (165, 166, 167, 168).

Al respecto Zweidler (34) describe que la suma de Lys, Arg, Pro, Val, Ileu y Leu corresponde aproximadamente al 50% de los aminoácidos totales de histonas examinadas de distintos orígenes. En la preparación de histonas de T. cruzi, el total para estos aminoácidos representa un 51,7%, estimando la prolina como un 8%, valor usualmente



obtenido para este aminoácido en preparaciones de histonas). Otra característica, como la proporción aminoácidos básicos/aminoácidos ácidos, es 1,83, similar al 1,7 obtenido para las histonas de S. cerevisiae (166), 1,7 de O. luteus (167) y menores a 2,1 de Euglena gracilis (168) y 1,96 de timo de ternera (164). El porcentaje de aminoácidos apolares es 27,8%, el porcentaje de Lys es 19,9% y el de arginina es 8% dando una proporción Lys/Arg 2,47, más alta que 1,7 encontrada para timo de ternera y más cercana a 2,2 encontrada para O. luteus o E. gracilis (2,1). Por lo tanto las histonas de T. cruzi podrían considerarse como ricas en Lys.

Por otra parte la suma de Lys + Ala es igual al 29%, siendo 28,5% en timo de ternera y variando entre un 25%-30% en las histonas de todos los organismos descritos. La ausencia de Trp es una característica de todas las histonas estudiadas, con algunas excepciones. En el análisis de aminoácidos de la preparación de histonas de T. cruzi se demostró la ausencia de triptófano, por cuanto la técnica de hidrólisis empleada previene la destrucción de este aminoácido. (124).

Todos estos rasgos están en general de acuerdo con aquellos aceptados para las histonas de distintas especies.

### Caracterización de histonas H<sub>1</sub> de T. cruzi.

Un problema muy interesante en T. cruzi es el comportamiento particular de la cromatina durante su ciclo celular. Como se describió anteriormente, durante la división del parásito la cromatina no se condensa ni forma cromosomas (91,92,93,94). Esta observación, unida al hecho que no se encontró una banda de proteínas que comigrara con H<sub>1</sub> de timo en un sistema de electroforesis en poliacrilamida SDS (102,103) ó en ácido-urea (101,102) llevó a cuestionar la presencia de histona H<sub>1</sub> en T. cruzi (101,102,103). No obstante, la presencia de una H<sub>1</sub> atípica también podría explicar la mantención de la cromatina decondensada durante la división de T. cruzi.

Basándose en las propiedades de solubilidad descritas para histonas H<sub>1</sub> (125,146,148,149) se diseñó un experimento que se describe en la Fig.6. Las propiedades de solubilidad de las bandas c y f en PCA y TCA unido al hecho de no estar presentes en el extracto de NaCl 0,35 M nos indicó que estaríamos en presencia de histonas H<sub>1</sub>. Más aún, utilizando un método preparativo para purificar histona H<sub>1</sub> de timo de ternera (125), se obtuvo la banda f con gran rendimiento y pureza (Fig.7). Al utilizar este método preparativo se extraen de la cromatina, en la primera etapa, la histona H<sub>1</sub> y las HMG (proteínas de la cromatina, de alta movilidad electroforética). Posteriormente la H<sub>1</sub> se aísla de las HMG

precipitando con acetona ácida y centrifugando, de tal forma que la H<sub>1</sub> se encuentre en el precipitado y las HMG en el sobrenadante. Se ha descrito que estas últimas proteínas (HMG) se encuentran en una proporción aproximada de 5% con respecto a las histonas (86).

Los resultados obtenidos, confirmaron estos datos, ya que la H<sub>1</sub> purificada de este conjunto es la proteína mayoritaria. A su vez, las HMG que se purifican con un segundo tratamiento con acetona se encuentran en pequeñas cantidades, apareciendo contaminadas con distintas proporciones de H<sub>1</sub> remanente. Aún más, al analizar estas proteínas con un antisuero anti-HMG de timo de ternera, se comprobó reacción cruzada con dos HMG de T. cruzi, no dando reacción cruzada con la supuesta histona H<sub>1</sub> (banda f) ni con ninguna otra histona de T. cruzi. (Mónica Morales, comunicación personal).

Es probable que anteriormente no haya sido posible detectar una proteína con propiedades de H<sub>1</sub> en T. cruzi porque se empleó como único criterio la separación electroforética en geles de poliacrilamida con SDS, en el que las histonas no se separan claramente. Por el contrario, en geles Tritón DF16-urea-ácido se obtiene una excelente resolución. Bajo estas condiciones electroforéticas, la movilidad de las histonas depende no sólo de la carga y

tamaño de las moléculas, sino también del número y distribución de los residuos hidrofóbicos en el polipeptido, por su propiedad de formar complejos micelares con el detergente no iónico (130).

En cierta forma, la H<sub>1</sub> es la fracción de histonas más interesante encontrada en eucariontes. Cuando se compara las histonas de organismos diferentes, la H<sub>1</sub> muestra gran variabilidad en la movilidad electroforética respecto a las otras histonas junto con diferencias cuantitativas y un grado mayor de diversidad en la secuencia aminoacídica (25,47). Así, empleando geles de poliacrilamida con Tritón-urea-ácido. Alfageme y col. (45) describieron la histona H<sub>1</sub> de embriones de Drosophila con una migración anómala respecto a la H<sub>1</sub> de timo de ternera. Esta misma H<sub>1</sub> analizada en geles SDS presentaba nuevamente movilidad electroforética alterada.

Una situación similar describen Gorovsky y col. (169) respecto a la H<sub>1</sub> de Tetrahymena, Caplan (105) respecto a la H<sub>1</sub> de Oxtrichia sp. y Rizzo respecto a la H<sub>1</sub> de Olisthodiscus luteus (107). Sin embargo, estos autores hacen notar que aunque se encuentre variabilidad en la movilidad electroforética de la histona H<sub>1</sub>, de especie a especie, hay que enfatizar el sorprendente número de propiedades físico-químicas, bioquímicas e inmunológicas de esta fracción que aparece común en todos los organismos. La

mayoría, tal vez todos los organismos eucarióticos examinados, contienen una fracción de histona H<sub>1</sub> que a) es la única soluble en 5% PCA o 5% TCA b) es la más rica en lisina c) generalmente es la de mayor peso molecular (una excepción es la H<sub>1</sub> del anélido Platynereis dumerilii (170). d) en organismos tan diversos como mamíferos y ciliados, esta es la única histona que se disocia fácilmente de la cromatina con sales o ácidos y e) es altamente fosforilada. Resulta muy interesante el estudio de Gorovsky y col. sobre la histona H<sub>1</sub> del macronúcleo de Tetrahymena thermophila, la cual cumpliendo con los criterios antes mencionados, carecía sin embargo del dominio globular, que es conservado en el resto de las histonas H<sub>1</sub> descritas. Este autor sugiere que el dominio globular conservado de las histonas H<sub>1</sub> descritas en todas las otras especies jugaría un rol en las estructuras de orden superior de la cromatina (171). Es interesante considerar aquí que el macronúcleo de Tetrahymena, al igual que el núcleo de I. cruzi, se divide sin condensación de la cromatina.

Utilizando otro criterio para identificar la histona H<sub>1</sub> se empleó un antisuero preparado en conejos contra H<sub>1</sub> de espermatozoides de erizo mar, observándose reacción cruzada con las histonas de I. cruzi, transfiriendo electroforéticamente las histonas separadas en un gel en dos dimensiones a papel de nitrocelulosa, e incubando con

el antisuero antes mencionado, se observó reactividad cruzada con tres proteínas, dos de las cuales (bandas c y f) correspondían a las proteínas con características de solubilidad en 5% TCA, 5% PCA y de purificación con el método de Sanders, específico para H<sub>1</sub>. Una tercera proteína (banda a) dió reacción cruzada, correspondiendo muy probablemente a una histona del núcleo nucleosomal, que presenta reacción cruzada con este antisuero (M. Imshetzki, comunicación personal). Es interesante acotar que la histona H<sub>1</sub> de espermatozoide de erizo de mar, que sirvió como antígeno en la producción del antisuero, usado en este experimento, es una proteína muy básica, rica en lisina y arginina (138).

#### Presencia de variantes de histonas en T. cruzi.

En algunos genes activos se ha propuesto una alteración en la conformación de sus nucleosomas (85,86,87,88), los que se han considerado como estructuras dinámicas, con cambios reversibles en su organización. El origen de esta plasticidad es, entre otros, la presencia de variantes de histonas diferentes en nucleosomas activos e inactivos. Estas modificaciones han sido involucradas en la regulación de diferentes funciones biológicas: transcripción, crecimiento, replicación y diferenciación celulares (60,61,68, 76,79).

Se examinó la presencia de variantes de histonas en I. cruzi observándose que las bandas de la primera dimensión se resolvieron en dos o más manchas en la segunda dimensión, sugiriendo la presencia de variantes para cada una de estas histonas. Por el momento, no sabemos si estas proteínas cromosomales son variantes no alélicas, o modificaciones químicas post-traduccionales de las histonas del parásito. Sin embargo, estos resultados son similares a los encontrados en eucariontes superiores en los que se propone la presencia de variantes en relación a proliferación y diferenciación celular. La caracterización de estas variantes y sus propiedades funcionales, específicamente en lo que respecta a proliferación y diferenciación del parásito, corresponden a un nuevo proyecto iniciado en función de estos resultados.

La fosforilación de las histonas se ha asociado a diferentes procesos celulares. En células en división, la fosforilación de  $H_1$  y  $H_3$  afecta a una gran fracción de estas histonas. Otro tipo de fosforilación descrito para histonas, es la fosforilación transiente de  $H_2A$  y  $H_4$  durante y luego de su síntesis en células en división. Se piensa que estaría relacionado con el transporte de estas histonas al núcleo desde el citoplasma y/o su ensamblaje en la cromatina recién replicada. También hay fosforilación de  $H_2A$  que no está relacionada al crecimiento. La

fosforilación de H<sub>2</sub>B es limitada, se ha descrito con bajos niveles y ha sido poco estudiada.

En un estudio preliminar se examinó la fosforilación de las histonas de T. cruzi, en cultivos en activa proliferación (5 días de cultivos) y en estado estacionario (14 días de cultivo). Se observó que tres histonas de T. cruzi (bandas a, d y f) son fosforiladas, tanto si las células se encuentran en fase exponencial de crecimiento como cuando están en fase estacionaria, al mismo tiempo la histona designada H<sub>1</sub> (banda f), podría estar ADP-ribosilada.

Por otro lado, se ha descrito heterogeneidad tanto en carga, como en tamaño de histonas Poly-ADP-ribosiladas, que decrecen su movilidad en el sistema urea-ácido, apareciendo progresivamente una familia de bandas de proteínas, con movilidades menores (77, 152); ésto podría explicar la aparición de las proteínas de más alto peso molecular en la figura. Esta heterogeneidad debiese desaparecer si las histonas ADP-ribosiladas son incubadas en NADH 0.1 N previo a la electroforesis, ya que el tratamiento hidroliza la unión entre la ADP-ribosa y la histona eficientemente (77).

La excelente resolución de las histonas de T. cruzi, obtenida en geles de poliacrilamida Tritón-urea-ácido, en una primera dimensión mostró claramente seis histonas en T. cruzi. Al comparar las movilidades electroforéticas de las histonas del parásito con aquellas de espermatozoides de



erizo de mar, hígado de rata o timo de ternera, se observaron diferencias netas, con la posible excepción de la banda a.

Por otra parte, los resultados obtenidos en geles de poliacrilamida -SDS concuerdan con los de Rubio y Castañeda (102), y con los de Hecker y Gander (103) excepto por la presencia de las dos bandas superiores en nuestra preparación (Fig.14, carril 6, flechas). Esta discrepancia podría deberse a que estos autores no usan el inhibidor de proteasas TLCK, que en este y otros trabajos se demuestra es imprescindible para la inhibición de las proteasas del parásito. Estas dos bandas son extraídas con PCA 0,75M y precipitadas de este extracto, con acetona ácida, procedimiento empleado usualmente para aislar histona H<sub>1</sub> en diferentes organismos (125). Una situación similar se ha descrito en el alga unicelular D. luteus (107) en Peridinium foliaceum (104), en Clamydomona reinhardii (104) y en Feridinium balticum (172), en los que la histona H<sub>1</sub> se ubica entre la H<sub>1</sub> y las histonas nucleosomales de timo. Finalmente en Chritidia fasciculata, bandas con movilidades similares a las indicadas con la doble flecha (fig.14, carril 6) son extraídas de la cromatina o de núcleos purificados por el procedimiento de Sanders y presentan una composición de aminoácidos característica de histona H<sub>1</sub> (173).

Por otro lado, como producto de esta misma técnica, aparece en la misma figura una proteína que en geles SDS migra en el rango de pesos moleculares de las histonas nucleosomales. Es improbable que estas proteínas sean productos de degradación de otras proteínas de mayor debido a que en geles de poliacrilamida SDS presenta una migración menor a las histonas del núcleo nucleosomal.

En cuanto al fraccionamiento en geles de poliacrilamida ácido-urea, los resultados están de acuerdo con los descritos por Astolfi (101), quien también observa las bandas de alta movilidad electroforética. Estas bandas, extraídas de la cromatina del parásito con PCA 0,75 M y precipitadas en acetona ácida, comigran con la banda f observada en geles de poliacrilamida Tritón-urea-ácido y caracterizada como histona H<sub>1</sub> por diferentes criterios (104). Una banda similar, en geles de poliacrilamida ácido-urea, de alta movilidad electroforética se ha descrito en Oxytrichia (105). Esta banda se resuelve en dos y presenta una composición de aminoácidos propia de una histona H<sub>1</sub>. De esta manera, se puede concluir que en I. cruzi hay una histona con propiedades de solubilidad y electroforéticas similares a la histona H<sub>1</sub> de Oxytrichia.

Considerando la alta conservación de las histonas, a menudo se ha dicho que una determinada histona, preparada de diferentes organismos tendría la misma movilidad en

geles de poliacrilamida. Esta aseveración sería correcta para algunas especies, pero claramente hay diferencias en la movilidad de la misma clase de histonas, como por ejemplo  $H_1$ , cuando se prepara de embriones de Drosophila, de timo de ternera (126) o de Oxytrichia (105). Sin embargo, tanto en I. cruzi como en Oxytricha esta variación de  $H_1$  es extrema cuando se estudia en geles de poliacrilamida ácido-urea. Más inesperada es la falta de conservación en  $H_4$  de I. cruzi, en relación a lo observado en espermatozoides de erizo de mar, hígado de rata y timo, ello se deduce por comparación de las movilidades electroforéticas de  $H_4$  en 3 sistemas de geles diferentes, cuyos rangos varían levemente en geles SDS y más notoriamente en geles de Tritón-urea-ácido y ácido-urea (Figs. 13 y 15). Al respecto, se ha descrito una gran diferencia en la secuencia de aminoácidos de la  $H_4$  de Tetrahymena en relación a los eucariontes superiores. Esta diferencia alcanzaría a un 22% de sustitución de aminoácidos con respecto a la histona  $H_4$  de timo (36,106). Por otro lado, en levadura se ha descrito un 7,8% de sustituciones de aminoácidos en la histona  $H_4$ , al comparársela con la histona  $H_4$  de timo (174).

Estos resultados en tres sistemas de geles diferentes dejan pocas dudas acerca de las diferencias claras en el patrón de migración electroforético de las histonas de I. cruzi con respecto a otras especies.

Así también, el cálculo de los pesos moleculares de las histonas de T. cruzi, inferidos de sus movilidades en geles ácido urea, muestran, en términos numéricos las diferencias previamente observadas en las movilidades electroforéticas, en comparación con las histonas de timo de ternera.

Rubio y col. (102) informa el peso molecular de 4 bandas de histonas de T. cruzi, las cuales migran en geles SDS en la misma región que las histonas del núcleo nucleosomal de hígado de rata y de eritrocito de pollo. Sobre esa base, él sugiere que este grupo contiene las histonas H<sub>4</sub>, H<sub>3</sub>, H<sub>2</sub>A y H<sub>2</sub>B cuyos pesos moleculares serían: 14.100 y 13.900, 12.700 y 11.600 respectivamente. Además sugiere que dos bandas de migración rápida en geles de poliacrilamida-urea-ácido, que él considera contaminantes, tendrían en geles con SDS pesos moleculares de aproximadamente 20 y 21 KDa. Cuando se comparan los valores dados por estos autores con los presentados en este trabajo se observan diferencias, pese a encontrarse dentro de un rango cercano. Esto podría explicarse por la técnica usada para inferir los PM de las histonas en ambos casos (geles SDS en Rubio y col.; geles ácido-urea en este trabajo). Se ha descrito que el sistema de geles con SDS no procede en caso de las histonas, ya que la carga neta positiva de las histonas puede afectar la movilidad electroforética (132). En este

trabajo se utilizó el método descrito por Hamana e Iwai (132), quienes indican que sólo la electroforesis en geles con urea muestra una relación lineal entre pesos moleculares conocidos de histonas, y su coeficiente de retardo, aportando así una curva patrón para estimar pesos moleculares desconocidos. Esta técnica ha sido ampliamente utilizada para calcular P.M. de histonas.

A pesar de que la técnica utilizada por Rubio y col. (102). pueda ser cuestionada, resulta interesante la observación de que existirían dos proteínas de alta migración en geles ácido-urea con pesos moleculares superiores a las de las histonas del núcleo nucleosomal.

Tomando en consideración los datos presentados se sugiere que las histonas de T. cruzi son proteínas cromosómicas conservadas más respecto a su función que a su probable secuencia aminoacídica (trabajo en realización), lo que también ocurriría en otros protozoos (104, 105, 106, 107). Parecería posible seguir un patrón evolutivo de proteínas básicas que interactúan con el DNA, que comienza con las "proteínas parecidas a histonas" en los procariontes (111, 112, 113, 114, 115), pasando a través de la diversidad encontrada en protozoos y haciéndose más estable en la secuencia aminoacídica en los eucariontes superiores.

Otro de los aspectos estudiados en este trabajo correspondió al estudio de las histonas en relación a la

proliferación y la diferenciación celulares de este parásito, esperando conocer mejor uno de los mecanismos moleculares involucrados en la regulación del ciclo biológico del T. cruzi.

El análisis electroforético unidimensional en geles de PAA, de histonas provenientes de cultivos en fase estacionaria, tanto de cepa Tulahuén, como de clon DM 28c, mostró la aparición de 2 nuevas bandas de histonas (Figs. 18 y 19). Estas dos nuevas bandas de proteínas podrían corresponder a variantes específicas de células quiescentes (175), o bién a proteólisis estado específica (176) o podrían corresponder a variantes, producto del metabolismo de las histonas, como ha sido descrito para histonas H<sub>3</sub> y H<sub>1</sub> de Tetrahymena, en que existe un evento proteolítico fisiológicamente regulado (153,154,155).

Por otra parte, al analizar las histonas obtenidas en el estado infectivo y no replicativo del parásito, el tripomastigote, se obtuvo dos diferentes resultados. En dos experimentos en las condiciones usuales de extracción se obtuvo la ausencia de la banda a. Este resultado sugiere la presencia de proteasas estado específico, que estarían actuando durante la extracción y que no serían absolutamente inhibidos por los inhibidores utilizados. Al respecto, se ha descrito un aumento de proteólisis en la cromatina de

células quiescentes y en células terminalmente diferenciadas (175,176). Se ha sugerido que por medio de este mecanismo de quiebre de los enlaces peptídicos dentro de la molécula, sería posible el reemplazo de una proteína por otra, permitiendo en el caso de las histonas la reorganización del nucleosoma durante la reprogramación celular reversible, o bien, en la diferenciación terminal. Es interesante además hacer notar que se ha descrito una proteasa específica de H<sub>2</sub>A en algunos sistemas (177) y que en nuestro caso, la banda a, que desaparece en el Tripanomastigote, ha sido asignada como H<sub>2</sub>A por diferentes criterios (PM, metacromasia, hidrofobicidad).

Estas observaciones crearon la necesidad de extraer las histonas con un conjunto de 4 inhibidores, tratando de saturar los sistemas proteolíticos que podrían estar actuando en estos estados específicos. Mientras el patrón de histonas obtenido a partir de material de 5 días de cultivo o del material obtenido de 14 días de cultivos de ambas cepas no sufrió modificaciones. Una situación diferente se presentó al analizar las histonas obtenidas en el estado infectivo y no replicativo del parásito, el tripomastigote. En este caso apareció la banda a y un conjunto de proteínas en región de la banda f. Como se ha discutido anteriormente estas corresponderían a histonas

H<sub>1</sub>. Es esta proteína la que presenta mayor grado de heterogeneidad en todos los casos descritos, siendo también la proteína más cuestionada en cuanto a sus probables funciones (22,29,47,54,178).

Como anteriormente se mencionó, una de las funciones de la histona H<sub>1</sub> sería la de unir nucleosomas adyacentes y así jugar un rol en la formación de la estructura de la cromatina, tanto al nivel de la partícula nucleosómica misma y en la formación de estructuras de orden superior de la fibra de cromatina. Por otro lado algunos variantes de H<sub>1</sub> se acumulan preferencialmente en células quiescentes o diferenciadas, remplazando los subtipos de H<sub>1</sub> sintetizados inicialmente (32,37). Aún más, la H<sub>1</sub> se ha visto como parte de un mecanismo represor general, que asegura de forma fuerte y estable la represión de la expresión génica (179,180). Además de servir como un represor general a fragmentos relativamente largos de cromatina, la H<sub>1</sub> estaría involucrada en controlar la actividad transcripcional de genes individuales, (178,179,180). Con estos antecedentes no resulta sorprendente encontrar la mayor heterogeneidad en el patrón de histonas de tripomastigotes, respecto a las de epimastigotes antes analizados, justamente, en las proteínas descritas en este trabajo como H<sub>1</sub>; existiendo una lógica muy directa en cuanto a la posible participación de esta proteína y la regulación de la expresión génica de una



forma diferenciada del parásito.

Una situación análoga sucede cuando se comparan las histonas en diferentes trypanosamátidos, donde se observan diferencias a nivel de las histonas nucleosomales en los tres géneros estudiados entre sí y también respecto a otros eucariontes. Asimismo estas diferencias se manifiestan en la zona de proteínas de alta movilidad que se ha caracterizado como H<sub>1</sub> en T. cruzi, (cepa Tulahuén) y en Crithidia fasciculata (173). Por otro lado es en esta zona donde aparecen las diferencias más notorias entre las distintas cepas de T. cruzi. Estos estudios abren la posibilidad de utilizar el análisis de las histonas para una tipificación a nivel de género y posiblemente de especies y cepas. Esta posibilidad se encuentra en estudio.

Los resultados obtenidos en este trabajo corresponden a un nivel de análisis del problema, éste es, la caracterización del producto de los genes de histonas.

Históricamente los genes de histonas de erizo de mar fueron las primeras secuencias codificantes de proteínas aisladas y clonadas. Dado el alto grado de conservación de la secuencia de las histonas de diferentes especies, estos genes clonados fueron usados en la identificación y aislamiento de la mayoría de los genes de eucariontes superiores identificados en este momento (181).

Por su parte los RNA mensajeros de histonas son

inusuales entre los RNA mensajeros eucarióticos. Con la excepción de los expresados en levadura, Tetrahymena y Xenopus, los RNA mensajeros de histonas no contienen la secuencia de poli-A encontrada en el extremo 3' de la mayoría de los RNA mensajeros eucarióticos.

Por su parte, los genes de histonas también difieren de la mayoría de los genes eucarióticos. Con la excepción de un gen de histona para H<sub>3</sub> descrito por Engel (182), los RNA mensajeros de histonas son codificados en el genoma por secuencias nucleotídicas contiguas.

En cuanto a la ubicación y número de los genes para histonas, se ha encontrado una gran diversidad, siendo ésta, una de las familias génicas estudiadas que presenta mayor variedad (183).

El estudio de los genes de histonas como un sistema modelo para estudiar regulación, se basa, en el alto número de copias de estos genes, los altos niveles de RNA mensajeros y la regulación fina de los niveles tanto de la síntesis como de la degradación de los RNA mensajeros.

Respecto al número de genes de histonas en vertebrados, es relativamente bajo, Xenopus presenta 20 a 50 copias de genes de histonas. En pollo, el número de genes de histonas reiterados es cerca de 10 veces por genoma haploide; en ratón 10 a 20 veces; en humano 30 a 40 veces. En el caso de los invertebrados, los genes para histonas

son reiterados, 300 a 1000 veces, por ejemplo, en diferentes especies de erizo de mar y en los pocos eucariontes inferiores estudiados el número de genes es pequeño (184).

Una mayor complejidad en la estructura de los genes de histonas, es introducida por la existencia de un número de variantes de proteínas cuyas secuencias son no alélicas y que son producto de genes independientes (38,150,41,184). Varias de estas proteínas son expresadas en la misma célula bajo control independiente (41,150,184,185). La estructura de esos genes debe diferir de uno a otro y está en estudio la elucidación de las estructuras y regulación de los diferentes genes.

Entre los genes para histonas en eucariontes inferiores se han estudiado los de levadura (174), erizo de mar (41), Drosophila (185), Artemia (186), Tetrahymena (187) y Stylonychia mytilus (188). Entre los eucariontes intermedios, se ha estudiado, Xenopus (184) y entre los eucariontes superiores han sido ampliamente estudiados los genes de histonas de pollo (182), ratón (38) y humano (189,190).

El aislamiento de los genes de histonas de los eucariontes inferiores no ha sido fácil. Así, por ejemplo, en levadura, los estudios iniciados por Hereford y col. en que buscó los genes para H<sub>2</sub>A y H<sub>2</sub>B en una genoteca de levadura, hibridizando con genes de histonas de erizo de

mar, determinó el aislamiento de numerosos recombinantes que eran falsos positivos y que no contenían secuencias de genes de histonas. Posteriormente estos genes se identificaron mediante la selección de tres plásmidos, por traducción "in vitro" de los RNA mensajeros poli-A de pequeño peso molecular (174). Los productos de traducción se separaron en geles de poliacrilamida en dos dimensiones. De esta manera se seleccionó los plásmidos que codificaban para las histonas H<sub>2</sub>A y H<sub>2</sub>B.

La búsqueda de los genes para histonas H<sub>3</sub> y H<sub>4</sub> presentó problemas similares al tratar de aislar los genes con sondas heterólogas de erizo de mar o de Drosophila. El problema se abordó usando un procedimiento de doble "screening" (174).

Por su parte, estudios de genes y expresión de genes de histonas en Tetrahymena, se están realizando usando como sondas los genes clonados de levaduras (187). Se ha encontrado semejanza con éstos, en cuanto a su secuencia codificadora (80% para H<sub>4</sub>) y los RNA mensajeros también estarían poliadenilados (187).

Por otra parte, la regulación de la expresión de los genes de histonas ocurriría a varios niveles (184,185). Los RNA mensajeros y la síntesis de histonas a menudo aparecen coordinadas durante el ciclo celular, probablemente debido a regulación a nivel transcripcional (190).

Sin embargo, también se han descrito situaciones en que la síntesis no estaría coordinada (184). También ocurre regulación de la expresión génica de histonas en el desarrollo, tanto cuantitativa como cualitativa (variantes específicas) (38,41). Al parecer, no existiría un mecanismo único de control que regule las modulaciones ontogenéticas cuantitativas y cualitativas de la expresión de los genes de histonas (184).

Durante la realización de esta Tesis, se realizaron estudios tendientes a la caracterización de los genes y transcritos de histonas de T. cruzi, con sondas heterólogas, correspondientes a los genes H<sub>1</sub>, H<sub>3</sub> y H<sub>4</sub> de células HeLa, para que, una vez clonados, fuesen usados para establecer las relaciones entre la expresión de estos genes y los distintos estados proliferativos y diferenciados del parásito. Sin embargo, la complicación introducida en el sistema por el hecho de encontrarse con histonas que poseen diferencias con respecto a las histonas de eucariotes superiores, generó complicaciones experimentales, lo que determinaría que los resultados obtenidos con las sondas heterólogas revistiesen sólo un cierto grado de aproximación al problema. Aún así, una información rescata-ble de los experimentos realizados, correspondería a la identificación por medio de un Northern blot ( con una señal débil), de un mensajero para H<sub>4</sub> de T. cruzi, más

pequeño que el mensajero para H<sub>4</sub> de células HeLa. Esto estaría de acuerdo con los datos presentados en este trabajo, en que la histona H<sub>4</sub> de T. cruzi presente un peso molecular menor que la histona H<sub>4</sub> de timo de ternera (Tabla II).

Un nuevo enfoque, cuyo trabajo experimental se encuentra en inicio, corresponde a la secuenciación de los extremos terminales de las histonas de T. cruzi detectadas en nuestros análisis. Con estos datos podrán construirse oligo-nucleótidos que podrán ser usados como "Primers" para poder obtener los genes de histonas de T. cruzi por PCR (Polymerase Chain Reaction Amplification of DNA) (191,192) y así, una vez realizada la clonación "in vitro", secuenciar los genes y utilizarlos como sondas para examinar su expresión tanto en proliferación como en diferenciación.

Por otro lado, estos oligonucleótidos podrán ser utilizados para buscar los genes de histonas en una genoteca de T. cruzi, que se encuentra en uso en el Laboratorio de Biología Molecular del Dr. Carlos Frasch, en Campomar, Argentina.

Sin embargo, los datos existentes acerca de los genes de histonas estudiados, apuntan a que el secuenciamiento de estos genes, a partir de DNA total o de DNA aislado con sondas, tiene limitaciones, por el hecho de que, a menudo,

los genes existen en copias múltiples, no idénticas, y no todas estas copias pueden ser transcritas. Un gen tomado al azar de una genoteca, puede representar una variante mínima o aún un pseudogen silente, más que el producto celular mayor. Esto implica, que la detección de un gen de histona fisiológicamente significativo, involucra la identificación de su producto génico, lo que puede llevarse a cabo por medio de un Western Blot del producto génico (proteína) de la genoteca de expresión, por medio de antisueros específicos.

## E. REFERENCIAS

- 1.- Dinah, M.J., Gilles, H.M. (1985). Human Antiparasitic Drugs: Pharmacology and Usage. John Wiley and Sons, New York. (Pág.4).
- 2.- Brener, Z. (1982). Recent developments in the field of Chagas' disease. Bulletin of the World Health Organization. 60 (4), 463-473.
- 3.- Dvorak, J.A. (1984). The Natural Heterogeneity of *Trypanosoma cruzi*: Biological and Medical Implications. J. Cell. Biochem. 24, 357-371.
- 4.- Miles, M.A. (1985). Isozyme Characterization. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. 18 (Suplemento), 53-59.
- 5.- Goncalves, A.M., Nehme, N.S., Morel, C.M. (1985). Schizodeme Analysis of *Trypanosoma Cruzi*. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. 18, 67-73.
- 6.- Englund, P.T., Hajduk, S.L., Marini, J.C. (1982). The molecular biology of Trypanosomes. Ann. Rev. Biochem. 51, 695-726.
- 7.- Tibayrenc, M., Ward, P., Moya, A., Ayala, F.J. (1986). Natural populations of *Trypanosoma cruzi*, the agent of Chagas disease, have a complex multiclonal structure. Proc. Natl. Acad. Sci. (USA). 83, 115-119.
- 8.- Gibson, C.W., Miles, M.A. (1986). The karyotype and ploidy of *T. cruzi*. EMBO J. 5, 1299-1305.
- 9.- Henriksson, J., Aslund, L., Macina, R., Cazzulo, B., Cazzulo, J.J., Frasch, C.C., Pettersson, U. (1990). Chromosomal localization of seven cloned antigen genes provides evidence of diploidy and further demonstration of karyotype variability in *T. cruzi*. Mol. Biochem. Parasitol. 42, 213-224.
- 10.- Molyneux, D.H., Ashford, R.W. (1983). The Biology of *Trypanosoma* and *Leishmania*, Parasites of Man and Domestic Animals. Taylor and Francis. London. (Pág.67).



- 11.-Kornberg, R.D. (1974). Chromatin structure: a repeating unit of histones and DNA. *Science*. 184, 868-871.
- 12.-Pardon, J.F., Wilkins, M. H.F., Richards, B.M. (1967). Super-helical model for nucleohistone. *Nature*. 215, 508-509.
- 13.-Richards, B.M., Pardon, J.F. (1970). The Molecular Structure of Nucleohistone (DNH). *Exp. Cell. Res.* 62, 184-196.
- 14.-Olins, A.L., Olins, D.E. (1974) Spheroid chromatin units (u bodies). *Science*. 183, 330-334.
- 15.-Hewish, D.R., Burgoyne, A.L. (1973). Chromatin substructure. The digestion of chromatin DNA at regularly spaced sites by a nuclear deoxyribonuclease. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 52, 504-510.
- 16.-Maniatis, T., Jeffrey, A., Van de Sande, H. (1975). Chain length determination of small double and single-stranded DNA molecules by polyacrilamide gel electrophoresis. *Biochemistry*. 14, 3787-3794.
- 17.-Simpson, R.T. (1978). Structure of the chromatosome, a chromatin particle containing 160 base pairs of DNA and all the histones. *Biochemistry*. 17, 5524-5531.
- 18.-Suau, P., Bradbury, E.M., Baldwin, J.P. (1979). Higher-order structures of chromatin in solution. *Eur. J. Biochem.* 97, 593-602.
- 19.-Belyavsky, A.V., Bavykin, S.G., Goguadze, E.G., Mirzabekov, A.D. (1980). Primary organization of nucleosomes containing all five histones and DNA 175 and 165 base pairs long. *J. Mol. Biol.* 139, 519-536.
- 20.-Cowman, M.K., Fasman, G.D., (1980) Dependence of mononucleosome deoxyribonuclei acid conformation on the deoxyribonuclei acid length and H<sub>1</sub>/H5 content. Circular dichroism and thermal denaturation studies. *Biochemistry*, 19, 532-540.
- 21.-Mc cleary, A.R., Fasman, G.D. (1980). The effect of H<sub>1</sub> on mononucleosome conformation. *Arch. Biochem. Biophys.* 201, 603-670.

- 22.-Thoma, F., Koller, T., Klug, A. (1979). Involvement of histone H<sub>1</sub> in the organization of the nucleosome and of the salt dependent superstructures of chromatin. *J. Cell. Biol.* 83, 403-428.
- 23.-Van Holde, K.E., Allen, J.R., Corden, J., Lohr, D., Tatchell, K., Weichert, W.O. (1979). "Chromatin Structure and Function". Eds. C. Nicolini. Plenum Press, N. York. Parte B, pp. 389.
- 24.-Kornberg, R.D. (1977). Structure of chromatin. *Ann. Rev. Biochem.* 46, 931-954.
- 25.-Isenberg, I. (1979). Histones. *Ann. Rev. Biochem.* 48, 159-191.
- 26.-De Lange, R.J., Famborough, D.M., Smith, E.L., Bonner, J. (1969). Calf and pea histone IV: Complete amino acid sequence of pea seedling histone IV; Comparison with the homologous calf thymus histone. *J. Biol. Chem.* 244, 5669-5679.
- 27.-Wells, D., Mc Bride, C. (1989). A comprehensive compilation and alignment of histones and histone genes. *Nucleic Acids Research.* 17, 311-347.
- 28.-Mc Ghee, J.D., Felsenfeld, G. (1980). Nucleosome Structure. *Ann. Rev. Biochem.* 49, 1115-1156.
- 29.-Cole, R.D. (1984). A minireview of microheterogeneity in H<sub>1</sub> and its possible significance. *Anal. Biochem.* 136, 24-30.
- 30.-Hannon, R., Bateman, E., Allan, J., Harborne, N., Gould, H. (1984). Control of RNA polymerase binding to chromatin by variations in linker histone composition. *J. Mol. Biol.* 180, 131-149.
- 31.-Russanova, V., Venkov, C., Tsanev, R. (1980). A comparison of histone variants in different rat tissues. *Cell Differentiation.* 9, 339-350.
- 32.-Lennox, R.W., Cohen, L.W. (1988). The production of tissue specific histone complements during development. *Biochem. Cell. Biol.* 66, 636-649.
- 33.-Newrock, K.M., Alfageme, C.R., Nardi, R.V., Cohen, L.H. (1978). Histone changes during chromatin remodeling in embryogenesis. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 42, 421-431.

- 34.-Grove, G.W., Zweidler, A. (1984). Regulation of nucleosomal core histone variant levels in differentiating murine erythroleukemia cells. *Biochemistry*, 23, 4436-4443.
- 35.-Van Holde, K.E. (1989). "Chromatin". Springer-Verlag, New York Inc. (Pág.a:92, b:109, c:125, d:120, e:355-408, f:228).
- 36.- Gorovsky, M.A. (1986). "The Molecular Biology of Ciliated Protozoa. Academic Press, Inc. Cap.9 (Pág.244).
- 37.-Lennox, R.W., Cohen, L.H. (1984). The H<sub>1</sub> subtypes of mammals: Metabolic characteristics and tissue distribution. *Histone Genes, Structure, Organization and Regulation*, Stein, G.S., Stein, J.L., Marzluff, W.F. Eds., John Wiley and Sons, New York. 373-395.
- 38.-Zweidler, A. (1984). Core histones variants of the mouse: Primary structure and differential expression. *Histone Genes, Structure, Organization and Regulation*, Stein, G.S., Stein, J.L., and Marzluff, W.F. Eds., John Wiley and Sons, New York. 339-372.
- 39.-Urban, M.K., Zweidler, A. (1983). Changes in nucleosomal core histone variants during chicken development and maturation. *Dev. Biol.* 95, 421-428.
- 40.-Urban, M.K., Franklin, S.G., Zweidler, A. (1979). Isolation and characterization of the histone variants in chicken erythrocytes. *Biochemistry*, 18, 3852-3960.
- 41.-Von Holt, C., De Groot, P., Schwager, S., Brandt, W.F. (1984). The structure of sea urchin histones and considerations on their function. *Histones Genes, Structure, Organization and Regulation*, Stein, G.S., Stein, J.L., Marzluff, W.F., Eds., John Wiley and Sons, New York. (Pág.65-105).
- 42.-Allis, C.D., Glover, C.V.C., Bowen, J.K., Gorovsky, M.A. (1980). Histone variants specific to the transcriptionally active, amitotically dividing macronucleus of the unicellular eucaryote, *Tetrahymena thermophila*. *Cell*, 20, 609-617.
- 43.-Fusauchi, Y., Iwai, K. (1983). Tetrahymena Histone H<sub>2</sub>A. Isolation and two variant sequences. *J. Biochem.* 93, 1487-1497.

- 44.-Hayashi, T., Hayashi, H., Fusauchi, Y., Iwai, K. (1984). Tetrahymena Histone H<sub>3</sub>. Purification and two variant sequences. *J. Biochem.* 95, 1741-1749.
- 45.-Alfageme, C.R., Zweidler, A., Mahowald, A., Cohen, L.H. (1974). Histones of Drosophila embryos. *J. Biol. Chem.* 249, 3729-3736.
- 46.-Newrock, K.M., Alfageme, C.R., Nardi, R.V., Cohen L.H. (1978). Histone changes during chromatin remodeling in embryogenesis. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 42, 421-431.
- 47.-Lennox, R.W. (1984) Differences in evolutionary stability among mammalian H<sub>1</sub> subtypes. *J. Biol. Chem.* 259, 669-672.
- 48.-Seyedin, S.M., Cole, R.D., Kistler, W.S. (1981). H<sub>1</sub> histones from mammalian testes. *Exp. Cell. Res.* 136, 399-405.
- 49.-Han, M., Chang, M., Kim, U.J., Grunstein, M. (1987). Histone H<sub>2</sub>B repression causes cell-cycle-specific arrest in Yeast: effects on chromosomal segregation, replication, and transcription. *Cell.* 48, 589-597.
- 50.-Cary, P.D., Hines, M.L., Bradbury, E.M., Smith, B.J., Johns, E.W. (1981). Conformational Studies of histone H<sub>1</sub><sup>o</sup> in comparison with histones H<sub>1</sub> and H<sub>5</sub>. *Eur. J. Biochem.* 120, 371-377.
- 51.-Cohen, L.H., Newrok, K.M., Zweidler, A. (1975). Stage-specific switches in histone synthesis during embryogenesis of the sea urchin. *Science.* 190, 994-1005.
- 52.-Urban, M.K., Neelin, J.M., Betz, T.W. (1980). Correlation of chromatin composition with metabolic changes in nuclei of primitive erythroid cells from chicken embryos. *Can. J. Biochem.* 58, 726-731.
- 53.-Gjerset, R., Gorku, C., Hasthorpe, S., Lawrence, J.J., Eisen, N. (1982). Developmental and hormonal regulation of protein H<sub>1</sub><sup>o</sup> in rodents. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 79, 2333-2337.
- 54.-Pehrson, J., Cole, R.D. (1980). Histone H<sub>1</sub><sup>o</sup> accumulates in growth-inhibited cultured cells. *Nature.* (London). 285, 43-44.

- 55.-Lennox, R.W., Cohen, L.H. (1983). The histone H<sub>1</sub><sup>o</sup> complements of dividing and nondividing cells. *J. Biol. Chem.* 258, 262-268.
- 56.-Winter, E., Levy, D., Gordon, J.S. (1985). Changes in the H<sub>1</sub> histone complement during myogenesis. *J. Cell. Biol.* 101, 167-174.
- 57.-Pieler, C., Adolf, G.R., Swetly, P. (1981). Accumulation of histone H<sub>1</sub><sup>o</sup> during chemically induced differentiation of murine neuroblastoma cells. *Eur. J. Biochem.* 115, 329-333.
- 58.-Allis, C.D., Gorovsky, M.A. (1981). Histone phosphorylation in macro- and micronuclei of *Tetrahymena thermophila*. *Biochemistry*, 20, 3828-3833.
- 59.-Davie, J.R., Saunders, C.A. (1981). Chemical composition of nucleosomes among domains of calf thymus chromatin differing in micrococcal nuclease accessibility and solubility properties. *J. Biol. Chem.* 256, 12574-12580.
- 60.-Harrison, J.J., Schowock, G., Schwegel, J.L., Jungmann, R.A. (1982). Phosphorylative modification of histone H<sub>1</sub> subspecies following isoproterenol and N<sup>6</sup>, O<sup>2'</sup>-dibutyryl cyclic AMP stimulation of rat C6 glioma cells. *J. Biol. Chem.* 257, 13602-13609.
- 61.-Gurley, L.R., Walters, R.A., Tobey, R.A. (1975). Sequential phosphorylation of histone subfractions in the Chinese hamster cell cycle. *J. Biol. Chem.* 250, 3936-3944.
- 62.-Iwasa, I., Takai, Y., Kikkawa, V., Nishizuka, Y. (1980). Phosphorylation of calf thymus H<sub>1</sub> histone by calcium activated, phospholipid-dependent protein kinase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 96, 180-187.
- 63.-Georgieva, E.I., Pashev, I.G., Tsanev, R.G. (1982). Distribution of acetylated forms of nucleosomal histones in fractionated chromatin. *Arch. Biochem. Biophys.* 216, 88-92.
- 64.-Johnson, E.M., Sterner, R., Allfrey, V.G. (1987). Altered nucleosomes of active nucleolar chromatin contain accessible histone H<sub>3</sub> in its hyperacetylated forms. *J. Biol. Chem.* 262, 6943-6946.

- 65.-Simpson, R.T. (1981). Modulation of nucleosome structure by histone subtypes in sea urchin embryos. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*. 78, 6803-6807.
- 66.-Sealy, L., Chalkley, R. (1978). DNA associated with hyperacetylated histone is preferentially digested by DNase I. *Nucleic acids Res.* 5, 1863-1876.
- 67.-Chicoine, L.G., Richman, R., Cook, R.G.; Gorovsky, M.A., Allis, C.D. (1987). A single histone acetyltransferase from *Tetrahymena* macronuclei catalyzes deposition - related acetylation of free histones and transcription-related acetylation of nucleosomal histones. *J. Cell Biol.* 105, 127-135.
- 68.-Loidl, P., Grobner, P. (1987). Postsynthetic acetylation of histones during the cell cycle: a general function for the displacement of histones during chromatin rearrangements. *Nucleic Acids Res.* 15, 8351-8366.
- 69.-Zhang, D., Nelson, D.A., (1986). Histone acetylation in chicken erythrocytes. *Biochem. J.* 240, 857-862.
- 70.-Piña, B., Martínez, P., Suau, P. (1988). Differential acetylation of core histones in rat cerebral cortex neurons during development and aging. *Eur. J. Biochem.* 174, 311-315.
- 71.-Loidl, P. (1988). Towards an understanding of the biological function of histone acetylation. *Febs. Letters.* 227, 91-95.
- 72.-Baron, M.H., Maniatis, T. (1986). Rapid reprogramming of globin gene expression in transient heterokaryons. *Cell.* 46, 591-602.
- 73.-Burzio, L.O., Riquelme, P.T., Koide, S.S. (1979). ADP Ribosylation of rat liver nucleosomal core histones. *J. Biol. Chem.* 254, 3029-3037.
- 74.-Ueda, K., Hayaishi, O. (1985). ADP-Ribosylation. *Ann. Rev. Biochem.* 54, 73-100.
- 75.-Ogata, N., Ueda, K., Hayaishi, O. (1980). ADP-Ribosylation of histone H<sub>2</sub>B. *J. Biol. Chem.* 255, 7610-7615.
- 76.-Ogata, N., Ueda, K., Kagamiyama, H., Hayaishi, O. (1980). ADP. ribosylation of histone H<sub>1</sub>. *J. Biol. Chem.* 255, 7616-7620.

- 77.-Riquelme, P.T., Burzio, L.O., Koide, S.S. (1979). ADP Ribosylation of Rat Liver Lysine-rich Histone in Vitro. *J. Biol. Chem.* 254, 3018-3028.
- 78.-Niedergang, C.P., De Murcia, G., Ittel, M.E., Pouyet, J., Mandel, P. (1985). Time course of polynucleosome relaxation and ADP-ribosylation. *Eur. J. Biochem.* 146, 185-191.
- 79.-Piña, B., Suau, P. (1985). Core histone variants and ubiquitinated histones 2A and 2B of rat cerebral cortex neurons. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 133, 505-510.
- 80.-West, M.H., Bonner, W.M. (1980). Histone H<sub>2</sub>B can be modified by the attachment of ubiquitin. *Nucl. Acids Res.* 8, 4671-4677.
- 81.-Goldknopf, I.L., Bush, H. (1977). Isopeptide linkage between nonhistone and histone 2A polypeptides of chromosomal conjugateprotein A24. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 74, 864-868.
- 82.-Thorne, A.W., Sautiere, P., Briand, G., Crane-Robinson C. (1987). The structure of ubiquitinated histone H<sub>2</sub>B. *E.M.B.D.* 6, 1005-1010.
- 83.-Levinger, L., Varshavsky, A. (1982). Selective arrangement of ubiquitinated and D1 Protein-containing nucleosomes within the *Drosophila* genome. *Cell.* 28, 375-385.
- 84.-Bachmair, A., Finley, D., Varshavsky, A. (1986). "In vivo half-life of a protein is a function of its amino-terminal residue". *Science.* 234, 179-186.
- 85.-Reeves, R. (1984). Transcriptionally Active Chromatin. *Biochim. Biophys. Acta.* 782, 343-393.
- 86.-Weisbrod, S. (1982). Active Chromatin. *Nature.* 297, 289-295.
- 87.-Weintraub, H. (1985). Assembly and Propagation of Repressed and Derepressed Chromosomal States. *Cell.* 42, 705-711.
- 88.-Weintraub, H., Groudine, M. (1976). Chromosomal Subunits in Active genes have an altered Conformation. *Science.* 193, 848-856.

- 89.-Weintraub, H. (1984). Histone-H<sub>1</sub>- dependent chromatin superstructures and the suppression of gene activity. *Cell*. 38, 17-27.
- 90.-Goodwin, G.H., Johns, E.W. (1978). Are the High Mobility Group non-histone chromosomal proteins associated with "active" chromatin ?. *Biochim. Biophys. Acta*. 519, 279-284.
- 91.-Solari, A.J., De Souza, W. (1983). Presence and comparative behavior of mitotic plaques in five species of Trypanosomatidae. En *Microscopía Electrónica y Biología Molecular*. 7, 29-38.
- 92.-Solari A.J., (1980). Function of the dense plaques during mitosis in *Trypanosoma cruzi*. *Exp. Cell. Res.* 127, 457-460.
- 93.-Engman, D.M., Reddy, L.V., Donelson, J.E. Kirchoff, L.V. (1987). *Trypanosoma cruzi* exhibits inter- and intra- strain heterogeneity in molecular karyotype and chromosomal gene location. *Molecular and Biochemical Parasitology*. 22, 115-123.
- 94.-De Souza, W., Meyer H. (1974). On the fine structure of the nucleus in *Trypanosoma cruzi* in tissue culture forms. Spindle fibers in the dividing nucleus. *J. Protozool.* 21, 48-52.
- 95.-Vickerman, K., Preston, T.M. (1970). Spindle microtubules in the dividing nuclei of trypanosomes. *J. Cell. Sci.* 6, 365-383.
- 96.-Solari, A.J., Tandler, C.J., Duschak, V. (1985). Fine structure and cytochemistry of the mitotic plaques of *Trypanosoma cruzi* and *Crithidia fasciculata*. *J. Submicrosc. Cytol.* 17, 583-591.
- 97.-Borst, P., Van Der Ploeg, M., Van Hoeck, J.F.M., Tar, J.; James, J. (1982). On the DNA content and ploidy of trypanosomes. *Mol. Biochem. Parasit.* 6, 13-23.
- 98.-Souto-Padrón, T., De Souza, W. (1978). Ultrastructural localization of basic proteins in *Trypanosoma cruzi*. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry*. 26, 349-358.
- 99.-Van Der Ploeg, L.H.T., Cornelissen, A.W.C.A., Barry, D., Borst, P. (1984). Chromosomes of Kinetoplastida. *E.M.B.O. Journal*. 3, 3109-3115.



- 100.-Gibson, W.C., Borst, P. (1986). Size - fractionation of the small chromosomes of Trypanozoon and Nannomomas Trypanosomes by pulsed field gradient gel electrophoresis. *Mol. Biochem. Parasitol.* 18, 127-140.
- 101.-Astolfi Filho, S., Martins de Sa, C., Gander, E.S. (1980). On the chromatin structure of Trypanosome cruzi. *Mol. Biochem. Parasitol.* 1, 45-53.
- 102.-Rubio, J., Rosado, Y., Castañeda, M. (1980). Subunit structure of Trypanosome cruzi chromatin. *Can. J. Biochem.* 58 (11), 1247-1251.
- 103.-Hecker, H., Gander, E.S. (1985). The compaction pattern of the chromatin of Trypanosomes. *Biol. Cell.* 53, 199-208.
- 104.-Rizzo, P.J. (1985). Histones in Protistan Evolution. *Bio. Systems.* 18, 249-262.
- 105.-Caplan, E.B. (1975). A very rapidly migrating f<sub>1</sub> histone associated with gene-sized pieces of DNA in the macronucleus of Oxytricha sp. *Biochem. Biophys. Acta.* 407, 109-113.
- 106.-Claiborne, V.C., Glover., Gorovsky, M.A. (1979) Amino-acid sequence of Tetrahymena histone H<sub>4</sub> differs from that of higher eukaryotes. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA).* 76, 585-589.
- 107.-Rizzo, P.J., Bradley, W., Morris, R.L. (1985). Histones of the Unicellular alga Olisthodiscus luteus. *Biochemistry.* 24, 1727-1732.
- 108.-Mc Laughlin, P.J., Dayhoff, M.D. (1973). Eukaryote Evolution: A view based on cytochrome c sequence data. *J. Molec. Evolution.* 2, 99-116.
- 109.-Spiker, S., Key, J.L. Wakin, B. (1976). Identification and fractionation of plant histones. *Arch. Biochem. Biophys.* 176, 510-518.
- 110.-Mayr, E. (1978). La Evolución. Investigación y Ciencia, (Edición en español de Scientific American) N926, pp. 6-16.

- 111.-Hubscher, U., Lutz, H., Kornberg, A. (1980). Novel histone H<sub>2</sub>A-like protein of *Escherichia coli*. Proc. Natl. Acad. Sci. (USA). 77, 5097-5101
- 112.-Griffith, J.D. (1976). Visualization of prokaryotic DNA in a regularly condensed chromatin - like fiber. Proc. Nat. Acad. Sci. (USA). 73, 563-567.
- 113.-Latthe, R., Buc, H., Lecocq, J.P., Bautz, E.K.F. (1980). Prokaryotic histone-like protein interacting with RNA polymerase. Proc. Natl. Acad. Sci. (USA). 77, 3548-3552.
- 114.-De Lange, R.J., Williams, L.C., Searcy, D.G. (1981). A histone like protein (HTa) from *Thermoplasma acidophilum*. J. Biol. Chem. 256, 905-911.
- 115.-Broyles, S.S., Pettijohn, D.E. (1986). Interaction of the *Escherichia coli* HV Protein with DNA. Evidence for formation of nucleosome-like structures with altered DNA helical pitch. J. Mol. Biol. 187, 47-60.
- 116.-Diamond, L.S. (1968). Improved method for the monoaxeni cultivation of *Entamoeba histolytica* Schaudinn and *E. histolytica*-like amoeba with trypanosomatids. J. Parasitol. 54, 715-719.
- 117.-Contreras, V.T., Salles, J.M., Thomas, N., Morel, C.M. and Goldenberg, S. (1985). In vitro differentiation of *T. cruzi* under chemically defined conditions. Mol. and Biochem. Parasitol. 16, 315-327.
- 118.-Contreras, V.T., Morel, C.M. and Goldenberg, S. (1985). Stage specific gene expression precedes morphological changes during *T. cruzi* metacyclogenesis. Mol. and Biochem. Parasitol. 14, 83-96.
- 119.-Goldenberg, S., Salles, J.M., Contreras, V.T., Lima Franco, M.P., Katziu, A.M., Colli, W. and Morel, C.M. (1985). Characterization of messenger RNA from epimastigotes and metacyclic trypomastigotes of *T. cruzi*. FEBS. 180, 265-270.
- 120.-De Sousa, M.A. (1983). A simple method to purify biologically and antigenically preserved bloodstream trypomastigotes of *T. cruzi* using DEAE-cellulose columns. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro. 78, 317-333.

- 121.-Stein, G.S., Mans, R.J., Gabbay, E.J., Stein, J.L., Davis, J. and Adawadkar, P.D. (1975). Evidence for fidelity of chromatin reconstitution. *Biochemistry*, 14, 1859-1966.
- 122.-Panyim, S. and Chalkley, R. (1969). High resolution acrylamide gel electrophoresis of histones. *Arch. Biochem. Biophys.* 130, 337-346.
- 123.-Brandt, L. and Withoholt, B. (1967). *Methods in Enzymology*. Vol. XI. 776, Academic Press. New York.
- 124.-Matsubara, H. and Sasaki, R.M. (1969). High recovery of tryptophan from acid hydrolysates of proteins. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 35, 175-181.
- 125.-Sanders, C. (1977). A method for the fractionation of the high-mobility-group non-histone chromosomal proteins. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 78, 1034-1042.
- 126.-Alfageme, C.R., Zweidler, A., Mahowald, A. and Cohen, L.H. (1974). Histones of *Drosophila* Embryos. *J. Biol. Chem.* 249, 3729-3736.
- 127.-Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-685.
- 128.-Thomas, J.D. and Kornberg, R.D. (1975). An octamer of histones in chromatin and free in solution. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 72, 2626-2630.
- 129.-Hnilica, L. (1975). In *methods in Enzymology* (O'Malley, B. W. and Hardman, J.G., Eds.) Academic Press. New York. Vol. XL, p. 102.
- 130.-Zweidler, A. (1978). Resolution of histones by polyacrylamide gel electrophoresis in presence of nonionic detergents. *Methods in Cell Biology*, 17. Chapter 16, 223-233.
- 131.-Reisner, A.H., Nemes, P. and Bucholtz, C. (1975). The use of Coomassie Brilliant Blue G-250 perchloric acid solution for staining in electrophoresis and isoelectric focusing on polyacrylamide gels. *Anal. Biochem.* 64, 509-516.

- 132.-Hamana, K. and Iwai, K. (1974). Gel chromatography and gel electrophoresis of histones in denaturing solvents. *J. Biochem.* 76, 503-512.
- 133.-Ferguson, K.A. (1964). Starch-gel electrophoresis--application to the classification of pituitary proteins and polypeptides. *Metabolism.* 13, 985-1002.
- 134.-Hudson, L. and Hay, F.C. (1979). *Inmunología Práctica.* Editorial J.Y.M.S.. Barcelona, España.
- 135.-Towbin, H., Stachelin, T. and Gordon, J. (1979). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 76, 4350-4360.
- 136.-Imschenetzky, M., Fuchi, M., Massone, R., Roco, M., Gamboa, S. (1988). The fate of sperm specific non-histone chromosomal proteins after fertilization in sea urchins. *Arch. Biol. Med. Exp.* 21, 241-245.
- 137.-Levy-Wilson, B. (1981). Enhanced phosphorylation of high-mobility-group proteins in nuclease-sensitive mononucleosomes from butyrate-treated HeLa cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 78, 2189-2193.
- 138.-Imschenetzky, M., Fuchi, M., Oyarce, A.M., Massone, R. and Inostroza, D. (1984). A comparative study of the histones isolated from sperm of the sea urchin Tetrapygus niger. *Comp. Biochem. Physiol.* 78B, 393-399.
- 139.-Imschenetzky, M., Fuchi, M., Massone, R., Gamboa, S. (1981). Proteolysis of sea urchin nuclear histones during isolation. *Cellular and Molecular Biology.* 27, 491-493.
- 140.-Holzer, H. (1980). Control of proteolysis. *Ann. Rev. Biochem.* 49, 63-91.
- 141.-Rangel, H.A., Araújo, P.M.F., Repka, D., Costa, M.G. (1981). T. cruzi: Isolation and characterization of a Proteinase. *Exp. Parasitol.* 52, 199-209.
- 142.-Bongertz, V., Hungerer, K.D. (1978). T. cruzi: Isolation and characterization of a protease. *Exp. Parasitol.* 45, 8-18.
- 143.-Cazzulo, J.J. (1984). Protein and amino acid catabolism in T. cruzi. *Comp. Biochem. Physiol.* 79B, 309-320.

- 144.-North, M.J. (1989). Prevention of unwanted proteolysis. In Chapter 6 of "Proteolytic Enzymes". Practical Approach Series. IRL Press. London.
- 145.-Beynon, R.J. and Salvesen, G. (1989). In Appendix III of "Proteolytic Enzymes". Practical Approach Series. IRL. London.
- 146.-Ohlenbusch, H.H., Olivera, B.M., Tuan, D., Davidson, N. (1967). Selective Dissociation of histones from calf thymus nucleoprotein. *J. Mol. Biol.* 25, 299-315.
- 147.-Smart, J.E. and Bonner, J. (1971). Selective dissociation of histones from chromatin by sodium deoxycholate. *J. Mol. Biol.* 58, 651-659.
- 148.-Levy-Wilson, B., Denker, M.S. and Ito, E. (1983). Isolation, characterization and postsynthetic modifications of Tetrahymena High Mobility Group Proteins. *Biochemistry.* 22, 1715-1721.
- 149.-Watson, D.C., Wong, N.W, Dixon, G.H. (1979). The complete amino-acid sequence of a Trout-Testis non-histone protein, H<sub>2</sub>, Localized in a subset of nucleosomes and its similarity to calf-thymus Non-histone proteins HMG-14 and HMG-17. *Eur. J. Biochem.* 95, 193-202.
- 150.-Franklin, S.G., Zweidler, A. (1977). Non-allelic variants of histones 2a, 2b and 3 in mammals. *Nature.* 266, 273-275.
- 151.-Shay, D.E., Foster, P.G., Neelin, J. (1988). Immunological relationships among vertebrate lysine-rich histones. *Comp. Biochem. Physiol.* 91B, 69-78.
- 152.-Murcia, G., Huletsky, A., Lamarre, D., Gaudreau, A., Pouget, J., Daune, M., Poirier, G.G. (1986). Modulation of Chromatin Superstructure Induced by Poly (ADP-ribose) Synthesis and Degradation. *J. Biol. Chem.* 261, 7011-7017.
- 153.-Allis, C.D., Bowen, J.K., Abraham, G.N., Glover, C.V.C., Gorovsky, M.A. (1980). Proteolytic processing of histone H<sub>3</sub> in Chromatin: a Physiologically Regulated Event in Tetrahymena micronuclei. *Cell.* 20, 55-64.

- 154.-Allis, C.D., Wiggins, J.C. (1984). Proteolytic Processing of Micronuclear H<sub>2</sub> and Histone Phosphorylation during conjugation in *Tetrahymena thermophila*. *Exp. Cell Res.* 153, 287-298.
- 155.-Allis, C.D., Allen, R.L., Wiggins, J.C., Chicoine, L.G., Richman, R. (1984). Proteolytic Processing of H<sub>2</sub>-like Histones in Chromatin: A Physiologically and Developmentally Regulated Event in *Tetrahymena* Micronuclei. *J. Cell Biol.* 99, 1669-1677.
- 156.-Sogin, M.L., Elwood, H.J. and Gunderson, J.H. (1986). Evolutionary diversity of eukaryotic small-subunit rRNA genes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 83, 1383-1387.
- 157.-Feagin, J.E., Abraham, J.M. and Stuart, K. (1988). Extensive editing of the cytochrome c oxidase III transcript in *T. brucei*. *Cell.* 53, 413-422.
- 158.-Simpson, L. and Shaw, J. (1989). RNA editing and the mitochondrial cryptogenes of kinetoplastid protozoa. *Cell.* 57, 355-366.
- 159.-Castro, C., Hernández, R. and Castaneda, M. (1981). *T. cruzi* ribosomal RNA: internal break in the large-molecularmass species and number of genes. *Mol. Biochem. Parasitol.* 2, 219-233.
- 160.-Tata, J.R. (1974). Isolation of nuclei from liver and other tissue. *Methods in Enzymology* (Colowicks, S.P. and Kaplan, N.O. Eds.). Academic Press, New York, 31, 253-262.
- 161.-Blobel, G. and Potter, V.R. (1966). Nuclei from rat liver: Isolation method that combines purity with high yield. *Science.* 154, 1662-1665.
- 162.-Gealt, M.A., Scheirneiss, G. and Morris, N.R. (1976). The isolation of nuclei from the filamentous fungus *Aspergillus nidulans*. *J. Gen. Microbiol.* 94, 204-210.
- 163.-Laurent, M., Van Assel, S. and Steinert, M. (1971). Kinetoplast DNA: A unique macromolecular structure of considerable size and mechanical resistance. *Biochem. Biophys. Res. Com.* 43, 278-284.
- 164.-Bradbury, E.M., Inglis, R.J., Mathews, H.R. and Garner, N. (1973). Phosphorylation of very-lysine-rich histone in *Physarum polycephalum*. *Eur. J. Biochem.* 33, 131-139.

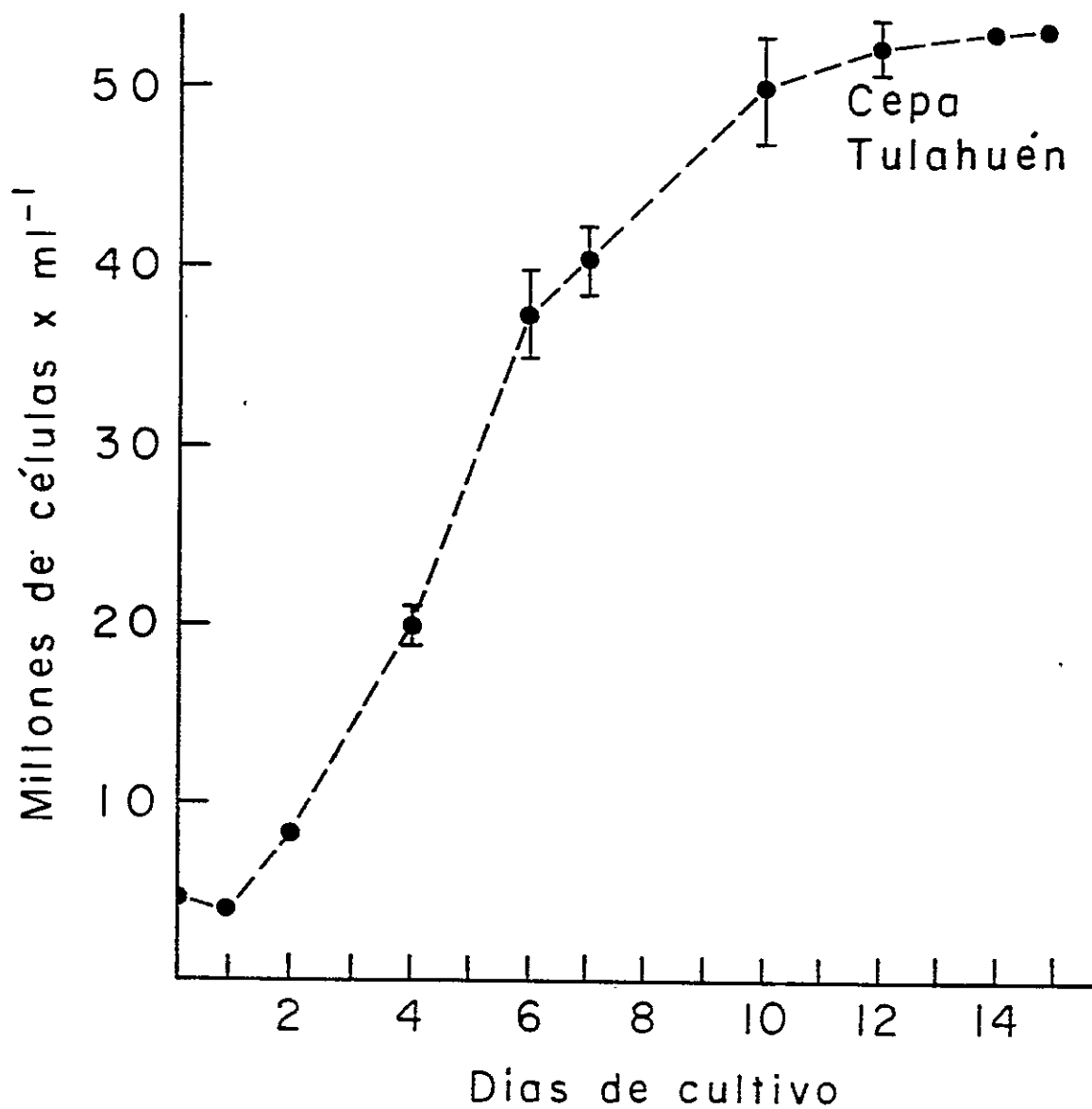
- 165.-Goff, C.G. (1976). Histones of Neurospora crassa. J. Biol. Chem. 251, 4131-4138.
- 166.-Mardian, J.K.W. and Isemberg, I. (1978). Yeast inner histones and the evolutionary conservation of histone-histone interaction. Biochemistry. 17, 3825-3833.
- 167.-Rizzo, P.J. (1980). Electrophoretic study of histones in the unicellular alga Olisthodiscus luteus. Biochim. Biophys. Acta. 624, 66-77.
- 168.-Jardine, N.J. and Leaver, J.L. (1977). The isolation of nuclei and histones from Euglena gracilis. Exp. Cell Res. 106, 423-426.
- 169.-Gorovsky, M.A., Bowen Keevert, J. and Pleger, G.L. (1974). Histone F<sub>1</sub> of Tetrahymena macronuclei. J. Cell Biol. 61, 134-145.
- 170.-Kmiecik, D., Sellos, D., Belaiche, D. and Lautiere, P. (1985). Primary structure of the two variants of a sperm-specific histone H<sub>1</sub> from the annelid Platynereis dumerilii. Eur. J. Biochem. 150, 359-370.
- 171.-Wu, M., Allis, C.D., Richman, R., Cook, R.G. and Gorovsky, M.A. (1986). An intervening sequence in an unusual histone H<sub>1</sub> gene of Tetrahymena thermophila. Proc. Natl. Acad. Sci. 83, 8674-8678.
- 172.-Rizzo, P.J. (1982). Analysis of histones from the endosymbiont nucleus of a binucleate dinoflagellate. J. Protozool. 29, 98-103.
- 173.-Duschack, V.G.; Cazzullo, J.J. (1990). The histones of the insect trypanosomatid, Crithidia fasciculata. Biochim. Biophys. Acta. 1040, 159-166.
- 174.-Smith, M.M. (1984). The organization of the yeast histone genes. Histone Genes, Structure, Organization and Regulation, Stein, G.S., Stein, J.L., Marzluff, W.F. Eds., John Wiley and Sons, New York. Pag. 3-33.
- 175.-Djondjurov, L.P., Yancheva, N.Y., Ivanova, E. Ch. and Christov, K. (1984). Increased proteolysis in chromatin of terminally differentiated and quiescent cells. Exp. Cell Res. 152, 134-147.
- 176.-Baserga, R. and Surmacz, E. (1987). Oncogenes, cell cycle genes and the control of cell proliferation. Biotechnology. 5, 355-358.

- 177.-Davie, J.R., Numerow, L. and Deleuve, G.P. (1986). The non-histone chromosomal protein, H<sub>2</sub>A-specific protease, is selectively associated with nucleosomes containing histone H<sub>1</sub>. *J. Biol. Chem.* 261, 10410-10416.
- 178.-Zlatanova, J. (1990). Histone H<sub>1</sub> and the regulation of transcription of eukaryotic genes. *TIBS*, Julio. 273-276.
- 179.-Wolffe, A.P. and Brown, D.D. (1987). Differential 5 S RNA gene expression in vitro. *Cell*. 51, 733-740.
- 180.-Wolffe, A.P. (1989). Dominant and specific repression of *Xenopus* oocyte 5 S RNA genes and satellite I DNA by histone H<sub>1</sub>. *EMBO J.* 8, 527-537.
- 181.-Stein, G.S., Stein, J.L., Marzluff, W.F. (1984). Histone Genes, Structure, Organization and Regulation, Stein, G.S., Stein, J.L., Marzluff, W.S. Eds. John Wiley and Sons, New York. Pág X.
- 182.-Engel, J.D. (1984). Organization and expression of chicken histone genes. Histone Genes, Structure, Organization and Regulation, Stein, G.S., Stein, J.L., Marzluff, W.S. Eds. John Wiley and Sons, New York. Pág. 263-279.
- 183.-Maxson, R., Cohn, R. and Kedes, L. (1983). Expression and organization of histone genes. *Ann. Rev. Genet.* 17, 239-277.
- 184.-Hentschel, C.C., Birnstiel, M.L. (1981). The Organization and Expression of histone gene families. *Cell*. 25, 301-313.
- 185.-Anderson, K.V., Lengyel, J.A. (1984). Histone gene expression in *Drosophila* development: multiple levels of gene regulation. Histone Genes, Structure, Organization and Regulation, Stein, G.S., Stein, J.L., Marzluff, W.F. Eds. John Wiley and Sons, New York. Pág. 135-162.
- 186.-Bagshaw, J.C., Andrews, M.T., Ferry, B.A. (1984). Organization and expression of histone genes in the brine shrimp, *Artemia*. Histone Genes, Structure, Organization and Regulation, Stein, G.S., Stein, J.L., Marzluff, W.F. Eds. John Wiley and Sons, New York. Pág. 181-196.



- 187.-Bannon, G.A., Gorovsky, M.A. (1984). Tetrahymena histones: Proteins, Messages, and Genes. Histone Genes, Structure, Organization and Regulation, Stein, G.S., Stein, J.L., Marzluff, W.F. Eds. John Wiley and Sons, New York. Pág. 163-179.
- 188.-Elsevier, S. M. Lipps, H.J. and Steinbrück, G. (1978) Histone genes in macronuclear DNA of the ciliate Stylonychia mytilus. Chromosoma. 69, 291-306.
- 189.-Sierra, F. Lichtler, A., Marashi, F., Rickles, R., Van Dyke, T., Clark, S., Wells, J., Stein, G. and Stein, J. (1982). Organization of human histone genes. Proc. Natl. Acad. Sci. 79, 1795-1799.
- 190.-Baumbach, L.L., Stein, G.S. and Stein, J.L. (1987). Regulation of human histone gene expression. Biochemistry. 26, 6178-6187.
- 191.-Bruijn, M.H.L. (1988). Diagnostic DNA amplification no respite for the elusive parasite. Parasitology Today. 4, 293-295.
- 192.-Mullis, K.B. and Faloona, F.A. (1987). Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. Methods in Enzymology. 155, 335-350.

F. APENDICE



Gráfica del crecimiento en cultivo de epimastigotes de *T. cruzi*, cepa Tulahuén. El medio de cultivo es Diamond con suero fetal de bovino 2,5% y hemina 7,5  $\mu$ M.

Tabla comparativa de composición de aminoácidos de  
T. cruzi y timo de ternera.

Aminoácido	<u>T. cruzi.</u>	Timo de ternera *
Lys	19.87	14.9
His	2.12	2.3
Arg	7.97	8.9
Asp	6.36	4.9
Glu	9.97	8.4
Thr	4.93	5.3
Ser	11.09	5.0
Pro	N.D.	4.8
Gly	9.82	8.7
Ala	9.14	13.6
Cys	N.D.	Trazas
Val	4.54	6.2
Met	0.57	0.9
Ile	2.54	4.4
Leu	6.82	7.7
Tyr	2.22	2.3
Phe	1.96	1.7
Trp	0	0

\* (164)

3. Trabajos publicados de esta tesis:

- a) Toro, C.G. and Galanti, N. (1988)  
"H<sub>1</sub> histone and histone variants in  
Trypanosoma cruzi". Exp. Cell Res.  
174, 16-24.
- b) Toro, C.G. and Galanti, N. (1990)  
"Trypanosoma cruzi histone Further  
characterization and comparison with  
higher eucaryotes". Biochem. Interna-  
tional. 21, 481-490.

## H 1 Histone and Histone Variants in *Trypanosoma cruzi*

G. CECILIA TORO<sup>1</sup> and NORBEL GALANTI<sup>2</sup>

Department of Cell Biology and Genetics, School of Medicine, University of Chile,  
Casilla 70061, Santiago 7, Chile

*Trypanosoma cruzi* chromatin is not condensed in chromosomes during mitosis. In previous studies a characteristic H 1 was not found in SDS or in acid-urea-PAGE. Consequently, it was proposed that the particular behavior of *T. cruzi* chromatin in dividing cells was due to the absence of an H 1 histone. In the present work, histones from this parasite were systematically characterized by spectrofluorometric analysis, amino acid composition, PAGE in one and in two dimensions, differential extraction with PCA and TCA, immunological cross-reactivity with antisera, and immunoblotting. We conclude that *T. cruzi* contains all five histones, H 1 presenting solubility and immunological properties similar to those in other species, but with a particular electrophoretic mobility in Triton-PAGE. Thus an explanation other than the absence of H 1 should be offered in order to understand the behavior of *T. cruzi* chromatin during mitosis. Moreover, histone variants were described by two-dimensional PAGE. The presence of histone variants suggests that they may participate in the regulation of cell proliferation and differentiation of this parasite, as it has been postulated for higher eukaryotes. © 1988 Academic Press, Inc.

*Trypanosoma cruzi*, the protozoan which causes American trypanosomiasis or Chagas disease, is probably one of the most intriguing and complex systems of eukaryotic cell differentiation. During the life-cycle of this organism there are three phenotypes: amastigote (intracellular and replicative form in the host), epimastigote (extracellular and replicative form in the vector), and trypomastigote (extracellular, nonreplicative and infective form). Changes in cellular forms under different environmental conditions should be the result of adaptive activation or repression of the parasite metabolic routes, which in turn should depend on modification in gene expression. In this regard histones represent a target by which both chromatin structure or function and gene-directed metabolic activities may be altered.

On the other hand, mitosis in *T. cruzi* occurs without disruption of the nuclear envelope, microtubules being assembled into the nucleus. Interestingly, condensed chromatin is dispersed at the beginning of division and remains in this state during mitosis, except for 10 dense plaques formed at the nucleolar periphery [1-3]. This pattern of chromatin condensation also points to the presence of histones and/or other nuclear proteins with special characteristics in this parasite.

Astolfi *et al.* [4] and Rubio *et al.* [5] have described that *T. cruzi* chromatin is organized in nucleosomes, as in other eukaryotes. These authors also described, on the bases of polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) in acid-urea or in

<sup>1</sup> Recipient of Research Training Grant 840024 from UNDP/World Bank/WHO.

<sup>2</sup> To whom reprint requests should be addressed.

sodium dodecyl sulfate (SDS), the presence of three to five proteins which presented electrophoretic mobilities similar to rat liver or chicken erythrocyte histones, though there was no strict correspondence among the different bands. These authors, as well as Hecker and Gander [6], failed to demonstrate an electrophoretic band that could possibly be histone H 1. However, Astolfi *et al.* [4] and Rubio *et al.* [5] described a putative H 1 as two fast-migrating bands with molecular weights of approximately 20,000 and 21,000 Da. These bands were also described in *Oxytricha* as H 1 histones [7]. As stated by Hecker and Gander [6], these results remain speculative. Clearly, a better characterization of *T. cruzi* histones is necessary in order to understand their possible role in cell differentiation as well as in cell division.

In this report we describe the systematic characterization of *T. cruzi* histones by spectrofluorometric analysis, amino acid composition, polyacrylamide gel electrophoresis in the presence of a detergent, differential extraction with acids, two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis, immunological cross-reactivity with antisera raised against histones extracted from sea urchin sperm cells, and immunoblotting using the same antisera. We conclude that *T. cruzi* contains all five histones, H 1 having antigenic determinants shared with the histone H 1 of sea urchin sperm cells. We also show the presence of histone variants in the chromatin of this parasite.

## MATERIALS AND METHODS

**Cell culture.** *T. cruzi* strain Tulahuen was grown in 80 ml of Diamond medium [8] supplemented with 2.5% fetal calf serum at 27°C. The cells were collected by centrifugation at the end of the exponential growing phase (7 days) and washed three times with phosphate-buffered saline (PBS).

**Preparation of chromatin and extraction of histones.** Basically, the procedure of Stein *et al.* [9] was used for the preparation of chromatin.

Histones were extracted overnight in 0.4 *N* H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, following Panyim and Chalkey [10]. Protease inhibitors Phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF, 0.001 *M*) and tosyl-L-lysine chloromethyl ketone (TLCK, 0.0005 *M*) were added to all solutions. All operations were carried out at 4°C.

**Characterization of histones.** The presence of tryptophane was analysed by spectrofluorometry according to Brand and Witholt [11] in a MPF-2A Perkin-Elmer spectrofluorometer. A well-characterized histone preparation from sea urchin sperm cells was used as standard as well as 0.01 *M* solutions of tryptophane or tyrosine.

For the amino acid analysis, histones were hydrolyzed in 6 *N* HCl at 110°C for 22 h, in the presence of 4% thioglycolic acid, as described by Matsubara and Sasaki [12]. Under these conditions, tryptophane is not degraded. Samples were analyzed in a Beckman 120C amino acid analyzer, Spackman *et al.* [13].

**Gel electrophoresis.** PAGE at low pH was performed at room temperature by the nonionic detergent method of Alfageme *et al.* [14]. The gels were prerun in 0.9 *M* acetic acid for 4 h, and in 1 *M* cysteamine in 0.9 *M* acetic acid for 1 h to scavenge free radicals [14]. To determine histone concentration in the samples, the method of Luck as described by Hnilica [15] was used.

Electrophoresis was carried out overnight at 10 mA. The gels were stained with 0.2% amido black 10B [16]. Alternatively, Coomassie blue R-250 was used as described [17].

For the second dimension, a strip of gel from the first dimension was equilibrated in 0.06 *M* Tris-HCl, pH 8, at 20°C, 2% SDS, 5% β-mercaptoethanol, 10% glycerol and sealed on a 5% polyacrylamide gel in 0.1% SDS with 1% agarose [18]. This stacking gel was over a 15% polyacrylamide gel in 0.1% SDS, as described by Laemmli [19]. Electrophoresis was carried out overnight at room temperature and at 20 mA. The gel was stained with 0.6% amido black in 7% acetic acid.

**Extraction of H 1 histone from *T. cruzi* chromatin.** Chromatin preparations were extracted with 0.35 *M* NaCl, 5% perchloric acid (PCA), or 5% trichloroacetic acid (TCA). After centrifugation, extracts were dialysed against distilled water and lyophilized. On the other hand, sediments remaining after

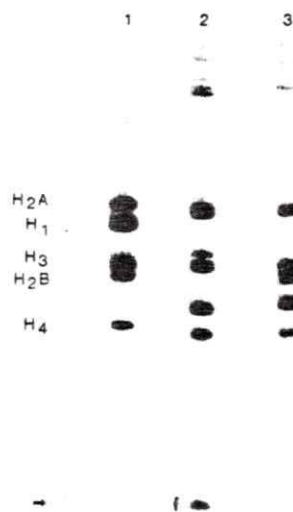


Fig. 1. Polyacrylamide gel electrophoresis of histones extracted from sea urchin sperm cells (lane 1) and from *T. cruzi* epimastigotes, with (lane 2) or without (lane 3) protease inhibitors. The gel contained 15% acrylamide-0.38% Triton DF 16-6.0 M urea in acetic acid and it was prerun in 1 M cysteamine to scavenge free radicals. Histones were stained with 0.2% amido black 10B acetic acid-45% methanol. Sequence of histones from top to bottom at the left of the figure corresponds to sea urchin sperm cells histones, used as standard. *T. cruzi* histones were labeled a, b, c, d, e, and f from top to bottom of the gel.

extraction were suspended in 0.4 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and histones were extracted as indicated. All samples were analysed by PAGE in one dimension.

Furthermore, histone H 1 was isolated from chromatin by extraction in 0.75 M PCA and differential precipitation in acid-acetone, following the procedure of Sanders [20].

**Immunodiffusion tests.** Double diffusion tests were carried out as described by Ouchterlony [21]. Antisera prepared in rabbits against H 1 or against core sea urchin sperm cell histones were kindly supplied by Dr. Maria Imschenetzki. Diffusion was for 48 h at 4°C.

**Immunoblotting.** Immunoblotting was carried out essentially following Towbin *et al.* [22]. *T. cruzi* histones were separated by two-dimensional gel electrophoresis and transferred electrophoretically to nitrocellulose paper. The filter was blocked with 3% gelatin and probed with a rabbit antiserum raised against H 1 histone from sea urchin sperm cells. Detection of the antigen-antibody complexes was achieved using the biotin-streptoavidin system.

## RESULTS

### Characterization of *T. cruzi* Histones

Excitation spectra of *T. cruzi* and of sea urchin sperm cell histones were similar (288 nm), away from the maximum found for tryptophane (308 nm) and very near of that of tyrosine (290 nm). On the other hand, emission spectra of these preparations presented different maxima (324 nm for sea urchin sperm cell histones and 340 nm for *T. cruzi* histones) (not shown). These differences in the maximum of emission spectra between both preparations may indicate differences in the microenvironment in which the fluorescent residues are located. This



TABLE 1

*Amino acid composition of Trypanosoma cruzi histones*

Amino acid	%
Lys	19.87
His	2.12
Arg	7.97
Asp	6.36
Glu	9.97
Thr	4.93
Ser	11.09
Pro	?
Gly	9.82
Ala	9.14
Cys	?
Val	4.54
Met	0.57
Ile	2.54
Leu	6.82
Tyr	2.22
Phe	1.96
Trp	0

*Note.* Histones were hydrolyzed in 6*N* HCl at 110°C for 22 h, in the presence of 4% thioglycolic acid. Samples were analyzed in a Beckman 120 C amino acid analyzer.

result suggests that sea urchin sperm cell histones are different from *T. cruzi* histones.

Amino acid analysis of *T. cruzi* histone preparations showed absence of tryptophane as well as other features characteristics of histones of other origins (Table 1). Thus, the addition of lysine, proline, valine, isoleucine, and arginine should account for about 50% of the amino acidic residues in all histone species [23]. In the *T. cruzi* histone preparation, a figure of 51.75% is obtained (proline is not read under the experimental conditions used and is estimated as 10%). All other features, as basic/acidic ratio (1.83), percentage of apolar amino acids (27.8%), and of lysine (19.9%) or arginine (8%), strictly agree with those accepted for all histone species (Table 1).

Figure 1 shows a polyacrylamide gel electrophoresis of histones obtained from sea urchin sperm cells (lane 1) or from *T. cruzi*, with (lane 2) or without protease inhibitors (lane 3). Five histones are evident in *T. cruzi* (lane 2) with mobilities both similar and different to those of histones from sea urchin sperm cells (lane 1). A sixth histone of high mobility is observed in the *T. cruzi* preparation (*f*, arrow), which in gels run at a higher intensity, is resolved in two bands (not shown). Lane 3 shows that the second band of lane 2 is degraded in the absence of proteolytic enzyme inhibitors, while the other bands do not present major changes in their electrophoretic mobilities. As expected from the spectrofluorometric analysis, the electrophoretic pattern obtained when these two histones preparations are compared by gel electrophoresis is different (Fig. 2, lanes 1 and 2).

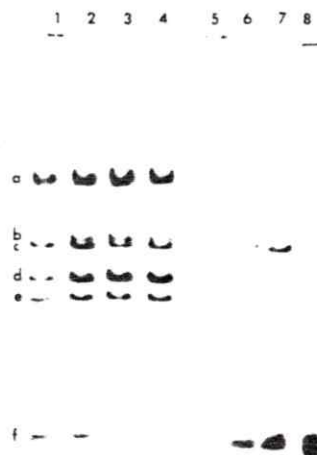


Fig. 2. Solubility properties of *T. cruzi* H1 histone. All samples were analyzed by PAGE as described under Fig. 1. Lane 1, *T. cruzi* histones; lanes 2, 3, and 4, *T. cruzi* histones obtained from chromatin which was previously extracted with 0.35 M NaCl, with 5% PCA, or with 5% TCA, respectively. Lanes 5, 6, and 7, histones present in extracts obtained from *T. cruzi* chromatin with 0.35 M NaCl, with 5% PCA, or with 5% TCA, respectively. Lane 8, *T. cruzi* H1 histones purified by the method of Sanders [20].

#### Use of Solubility Properties to Identify H1 Histone

It has been described that histone H1 is dissociated from chromatin by NaCl in the range of 0.4 to 0.6 M [24, 25]. Thus, histone H1 is poorly extracted with 0.35 M NaCl while high mobility group chromosomal proteins (HMG) are soluble at this salt concentration [26, 27]. Furthermore, both H1 histone and HMG proteins are soluble in 5% PCA or in 5% TCA [28, 30]. Considering these data, chromatin extracted with 0.35 M NaCl should be devoid of HMG proteins while still retaining most of the H1 histones. These solubility properties permit the separation of H1 histone from HMG proteins.

Figure 2 shows histones remaining in chromatin after extraction with 0.35 M NaCl (lane 2), 5% PCA (lane 3), or 5% TCA (lane 4). Clearly, band *f* is not extracted by 0.35 M NaCl while it is fully soluble in 5% PCA or in 5% TCA. Moreover, band *c* is extracted from the chromatin in 5% PCA (lane 6) and in 5% TCA (lane 7). Therefore, bands *c* and *f* present solubility properties characteristic of an H1 histone.

These results were confirmed by applying the method of Sanders for the preparation of histone H1 to the *T. cruzi* chromatin. By this technique, histone H1 is solubilized in PCA and differentially precipitated in acid-acetone from the HMG proteins that remain soluble. Results are shown in Fig. 2 (lane 8). Clearly, band *f* is preferentially extracted with a high yield and purity.

#### Use of Immunological Properties to Identify H1 Histone

To further explore this problem, we have investigated whether there is cross-reactivity between *T. cruzi* histones and antisera prepared against H1 or against

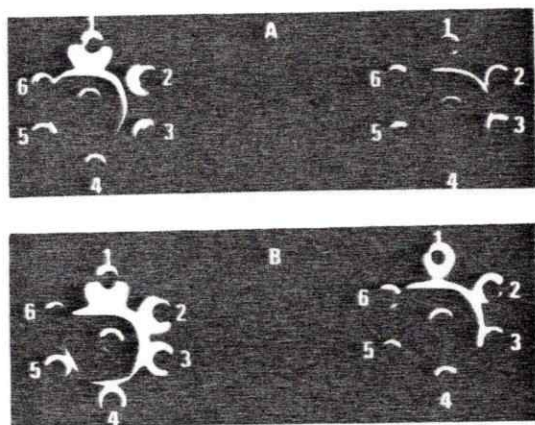


Fig. 3. (A) Immunodiffusion test of an antiserum prepared by the injection into rabbits of H1 histone purified from sea urchin sperm cells, against histones from sea urchin sperm cells (left) and histones from *T. cruzi* (right). (B) Immunodiffusion test of an antiserum prepared by the injection into rabbits of core histones from sea urchin sperm cells, against histones from sea urchin sperm cells (left) and histones from *T. cruzi* (right).

core histones from sea urchin sperm cells. In Fig. 3A (left) it is shown that histones from sea urchin sperm cells give precipitation lines at all dilutions tested, with an antiserum prepared against H1 from sea urchin sperm cells. Similarly, *T. cruzi* histones show cross-reactivity with the same antiserum when diluted to 1/16 (Fig. 3A, right). The same results were obtained when histones prepared from sea urchin sperm cells (Fig. 3B, left) or from *T. cruzi* (Fig. 3B, right) were tested with an antiserum prepared against core histones from sea urchin sperm cells.

In order to define the proteins responsible for this cross-reactivity, histones were separated by two-dimensional gel electrophoresis, transferred to nitrocellulose paper, and challenged against an antiserum to H1. Figure 4 shows that bands



Fig. 4. Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis and immunoblotting of H1 histones from *T. cruzi*. Conditions for gel electrophoresis were as described under Fig. 5. Histones were transferred electrophoretically to nitrocellulose paper and probed with a rabbit antiserum against sea urchin sperm cell H1 histone. The antigen-antibody complexes were detected by the biotin-streptavidin system. *a*, *c*, and *f* correspond to the first, third, and sixth band of Fig. 1, lane 2, respectively.

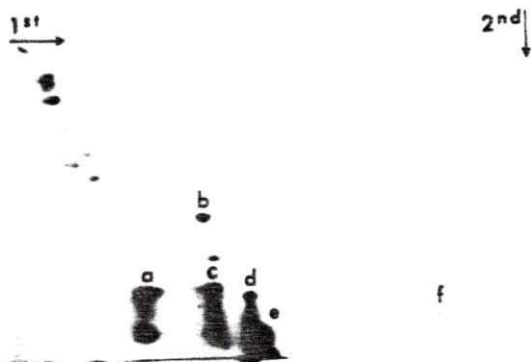


Fig. 5. *T. cruzi* histones analyzed by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. A strip of gel from the first dimension, as described under Fig. 1, lane 2, was put on a 15% polyacrylamide-0.1% SDS, following Laemmli [19]. The gel was fixed in 15% TCA-45% methanol and histones were stained with 0.6% amido black.

*c* and *f*, the same which were assigned as H1 histones from their solubility properties (Fig. 2), are recognized by the antiserum against H1 histone. Band *a* also gives cross-reactivity, and is supposed to be a core histone. This protein cross-reacts with the antiserum used in these experiments (M. Imschenetzki, unpublished results).

#### *Presence of Histone Variants in T. cruzi*

In the last few years, variants of histones were described in several species. Functional properties have been assigned to these histone variants, specifically in cell proliferation and differentiation [31-35].

Figure 5 shows a two-dimensional gel electrophoresis of the *T. cruzi* histone preparation. Clearly, bands from the first dimension (Fig. 1, lane 2) are resolved in two or more spots, indicating the presence of variants for each of these histones.

## DISCUSSION

The difficulty in obtaining clean intact nuclei in eukaryotic protists for histone extraction was reviewed by Rizzo [35]. Yield is usually low, histones cannot be quantitatively extracted and variable gel patterns result. Thus, a two-step procedure widely used for chromatin extraction in higher eukaryotes was applied. This procedure is highly repetitive and produce a good yield of *T. cruzi* histones.

During the whole procedure, care must be taken to prevent contamination with cytoplasmic or chromatin-bound proteases. As it is known, histones are very sensitive to proteolytic enzymes, especially H1 [36-38]. Different proteases inhibitors were tested, as for example 0.001-0.002 M PMSF, 0.0005-0.001 M TLCK, 0.0005-0.001 M TPCK, and 0.001 M *N*-ethylmaleimide. Though the majority of these protease inhibitors protected the *T. cruzi* histones, a mixture of 0.001 M PMSF and 0.0005 M TLCK was shown to be more effective.

One of the most intriguing problems in *T. cruzi* is the particular behavior of its

chromatin. The lack, or the presence, of a noncharacteristic H 1 may explain the maintenance of decondensed chromatin during mitosis. Previous failure in detecting H 1 in this parasite was probably a consequence of using SDS-PAGE or acid-urea-PAGE. These gels do not clearly resolve the different histone bands. On the contrary, when Triton is added to the gel as it was in the present report, a good resolution is achieved.

The solubility properties of bands *c* and *f* in PCA and in TCA, leave little doubt of both being H 1 histones. Moreover by using a preparative method for H 1 histone [20], band *f* is obtained with great yield and purity.

Finally, the cross-reactivity observed between our *T. cruzi* histone preparation and an antiserum prepared in rabbits against H 1 of sea urchin sperm cells, clearly points to the presence of H 1 in *T. cruzi* chromatin. Interestingly enough, those proteins which present solubility properties that are characteristic to H 1 histones (bands *c* and *f*) are recognized by an antiserum raised against purified H 1 histone.

Considering that our results point out to the existence of H 1 histone in *T. cruzi*, arguments other than the absence of this chromosomal protein should be looked at to explain the peculiar behavior of chromatin during cell division in this protozoan.

On the other hand, bi-dimensional gel electrophoresis shows the presence of histone variants in *T. cruzi*. At present, we are not able to show whether these protein species are nonallelic variants, or post-translational modifications of more conservative histones. However, our results are consistent with similar mechanisms for chromatin organization and function in *T. cruzi*, as in higher eukaryotes.

In conclusion, (1) we have systematically characterized *T. cruzi* histones from epimastigote form; (2) the presence of chromosomal proteins with characteristics that correspond to H 1 histones in other species has been demonstrated; and (3) we have also shown the presence of variants in *T. cruzi* histones. These results suggest again that these chromosomal proteins share their most important characteristics with those of other eukaryotes. Moreover, it is now possible to propose that histone variants may participate in the regulation of cell proliferation and differentiation of *T. cruzi*, as it has been postulated for higher eukaryotes.

This investigation received financial support by Grant 820599 from UNDP/World Bank/WHO Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases, by Grants 1088 and 209 from FONDECYT, Chile, and by Grant B2365 DIB, Universidad de Chile. We thank Dr. Maria Imschenetzki for providing the antisera against H 1 and core histones as well as histones from sea urchin sperm cells, Dr. Eduardo Silva for his assistance for the aminoacid analysis, and Mrs. Natacha Saigado for typing this manuscript.

## REFERENCES

1. Solari, A. J. (1980) *Exp. Cell Res.* **127**, 457.
2. Solari, A. J., and De Souza, A. (1983) *Microsc. Electron. Biol. Cell.* **7**, 29.
3. Solari, A. J., Tandler, C. J., and Duschak, V. K. (1985) *Submicrosc. Cytol.* **17**, 583.
4. Astolfi Filho, S., Martins de Sa, C., and Gander, E. (1980) *Mol. Biochem. Parasitol.* **1**, 45.
5. Rubio, J., Rosado, Y., and Castañeda, M. (1980) *Canad. J. Biochem.* **58**, 1247.
6. Hecker, H., and Gander, E. (1985) *Biol. Cell.* **53**, 199.
7. Caplan, E. (1975) *Biochim. Biophys. Acta* **407**, 109.
8. Diamond, L. S. (1968) *J. Parasitol.* **54**, 715.

9. Stein, G. S., Mans, R. J., Gabbay, E. J., Stein, J. L., Davis, J., and Adawaskar, P. D. (1975) *Biochemistry* **14**, 1859.
10. Panyim, S., and Chalkey, R. (1969) *Arch. Biochem. Biophys.* **130**, 337.
11. Brandt, L., and Withholt, B. (1967) *In Methods in Enzymology* (Hirs, C. H. W., Ed.) Vol XI, p. 776, Academic Press, New York.
12. Matsubara, H., and Sasaki, R. (1969) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **35**, 175.
13. Spackman, D., Stein, W., and Moore, S. (1958) *Anal. Chem.* **30**, 1190.
14. Alfageme, C. R., Zweidler, A., Mahowald, A., and Cohen, L. J. (1974) *J. Biol. Chem.* **249**, 3729.
15. Hnilica, L. (1975) *In Methods in Enzymology* (O'Malley, B. W., and Hardman, J. G., Eds.), Vol. XL, p. 102, Academic Press, New York.
16. Zweidler, A. *In Methods in Cell Biology* (Prescott, D. M., et al., Eds.), Vol. 17, p. 223, Academic Press, New York.
17. Duhamel, R. C., Meezan, E., and Brendel, K. (1980) *Biochim. Biophys. Acta* **626**, 432.
18. Allis, C. D., Glover, V. C., and Gorovsky, M. A. (1979) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**, 4857.
19. Laemmli, U. K. (1970) *Nature (London)* **227**, 4857.
20. Sanders, C. (1977) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **78**, 1034.
21. Ouchterlony, O. (1967) *In Handbook of Experimental Immunology* (Weir, D. M., Ed.), p. 665, Blackwell, Oxford.
22. Towbin, H., Staehelin, T., and Gordon, J. (1979) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**, 4350.
23. Grove, G., and Zweidler, A. (1984) *Biochemistry* **23**, 4436.
24. Ohlenbusch, H. H., Olivera, B. M., Tuan, D., and Davidson, N. (1967) *J. Mol. Biol.* **25**, 299.
25. Weisbrod, S., Groudine, M., and Weintraub, H. (1980) *Cell* **19**, 289.
26. Goodwin, G. H., Nicolas, R. H., and Johns, E. M. (1975) *Biochim. Biophys. Acta* **405**, 280.
27. Levy-Wilson, B., Denker, M. S., and Ito, E. (1983) *Biochemistry* **22**, 1715.
28. Panyim, S., and Chalkley, R. (1969) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **37**, 1042.
29. Watson, D. C., Wong, N. C. W., and Dixon, G. H. (1979) *Eur. J. Biochem.* **95**, 193.
30. Goodwin, G. H., Brown, E., Walker, J. M., and Johns, E. W. (1980) *Biochim. Biophys. Acta* **623**, 329.
31. Newrock, K. M., Alfageme, C. R., Nardi, R. V., and Cohen, L. H. (1978) *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **42**, 421.
32. Zweidler, A. (1984) *In Histone Genes and Histone Gene Expression* (Stein, G., Stein, J. L., and Marzluff, W. F., Eds.), p. 339.
33. Poccia, D., Greenough, T., Green, G. R., Nash, E., Erikson, J., and Gibbs, M. (1984) *Dev. Biol.* **104**, 274.
34. Schumperli, D. (1986) *Cell* **45**, 471.
35. Rizzo, P. (1985) *Biosystems* **18**, 249.
36. Imschenetzki, M., Puchi, M., Massone, R., and Gamboa, S. (1981) *Cell. Mol. Biol.* **27**, 491.
37. Bongertz, V., and Hungerer, K. (1978) *Exp. Parasitol.* **45**, 8.
38. Rangel, H. A., Araujo, P. M. F., Repka, D., and Costa, M. G. (1981) *Exp. Parasitol.* **52**, 199.

Received May 25, 1987

Revised version received June 12, 1987

TRYPANOSOMA CRUZI HISTONES. FURTHER CHARACTERIZATION AND  
COMPARISON WITH HIGHER EUKARYOTES.

G. Cecilia Toro<sup>1</sup> and Norbel Galanti\*

Departamento de Biología Celular y Genética, Facultad de Medicina,  
Universidad de Chile, Santiago, Chile.

Received January 15, 1990

Received after revision, April 23, 1990

SUMMARY.

Histones extracted from *T. cruzi* chromatin were analyzed in three electrophoretic systems.

Our results show that a basic protein with some properties similar to those of histone H1 from higher eukaryotes is present in *T. cruzi*. However this protein presents different electrophoretic mobilities than H1 histone from higher eukaryotes in all three electrophoretic systems tested.

Considering the marked differences observed in the electrophoretic mobilities of *T. cruzi* histones as compared with those from higher eukaryotes, it is proposed that histones are conservative proteins primarily with regard to their function.

INTRODUCTION

The presence of histones in *Trypanosoma cruzi* was reported by Astolfi et al. (1) and Rubio et al. (2). Moreover, it was evident that chromatin was organized in nucleosomes in this parasite, as in higher eukaryotes (1-3). However, several fundamental problems remained unsolved, such as a systematic characterization of the full set of *T. cruzi* histones, particularly the presence of H1 histone and histone variants and a comparison of *T. cruzi* histones with those of higher eukaryotes. These are relevant problems since a clear understanding of the organization of chromatin in this protozoan may contribute to explain the mechanism of its unusual condensation-decondensation during its life cycle.

Recently, a more detailed characterization of *T. cruzi* histones as well as the identification of H1 and histone variants was reported by us (4). In this paper we present information on some other properties of *T. cruzi* histones, specifically regarding their stability during acid extraction and to intrinsic proteases. Moreover, additional evidence for the presence and characteristics of H1

<sup>1</sup> Recipient of Research Training Grant 840024 from UNDP/World Bank/WHO.

\* To whom reprints should be requested

histones in this parasite is presented. Finally, considering the marked differences observed in the electrophoretic mobilities of T. cruzi histones in different gel systems as compared with those from higher eukaryotes, we propose that these chromosomal proteins are conservative primarily with regard to their function: that is, nucleosome organization.

#### MATERIAL AND METHODS.

Cell Cultures: T. cruzi epimastigotes strain Tulahuen were grown in Diamond medium (5) supplemented with 2.5% fetal calf serum at 28° C. Cells were routinely harvested by centrifugation at day 7 of culture, washed three times in phosphate buffered saline (PBS) and used immediately. In some experiments, cells maintained at -20°C for 15 days, were used.

Preparation of chromatin: Basically, the procedure of Stein et al. (6) was used, with some modifications. Cells were homogenized in 0.25M sucrose; 1 mM EDTA; 3 mM CaCl<sub>2</sub>; 0.01M Tris HCl pH 7.4 at 20°C and 0.5% saponine, using a Potter-Elvehjem homogenizer, at 1,200 rpm for 3 min. After centrifugation at 3000 xg for 10 min., nuclei were washed in the same buffer but without saponine and further homogenized in 1% Triton X-100; 0.15 M NaCl; 0.025 M EDTA; 0.01 M Tris HCl pH 8 at 20°C. This suspension was centrifuged at 12000 xg for 20 minutes and the sediment was washed three times in 0.01 M Tris HCl pH 8 at 20°C. This procedure was performed at 4°C. To discard the possible activation of proteases by calcium, in some experiments 5 mM MgCl<sub>2</sub> was used instead of 3 mM CaCl<sub>2</sub>. No differences were observed in the electrophoretic pattern of T. cruzi histones when this modified protocol was used. The following inhibitors of proteases were used: 2.2 mM phenylmethylsulfonylfluoride (PMSF); 1.5 mM tosyl-lysine chloromethyl ketone (TLCK); 1 mM tosylamide-2-phenylethylchloromethyl ketone (TPCK); 1 mM N-ethylmaleimide, and 0.05 M sodium bisulfite. PMSF and TLCK were used alone and combined. The inhibitors were added after the last wash (before cell disruption) and maintained throughout the whole procedure.

Extraction of histones: The procedure of Panyim and Chalkey (7) which uses 0.4 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, or the technique described by Zweidler (8) that extracts histones in 0.35 N HCl, were applied. Extraction of histones from chromatin was for 5 minutes, or overnight. Analysis of extraction conditions showed that both HCl and H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> are appropriate for complete release of all histones, however the longer extraction proved to be more effective. Consequently, histones from T. cruzi as well as those from other sources were extracted overnight in 0.4 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. To avoid oxidation of amino acid residues in histone preparations, 1% of thiodiglycol was used in all the solutions during the whole procedure. However, as no differences were observed between preparations obtained with or without the antioxidant, the thiodiglycol was not used further.

Extraction of H1 histone. The technique of Sanders (9) was used. Chromatin was extracted in 0.75 M perchloric acid (PCA) and H1 was differentially precipitated in acid-acetone, from the high mobility group chromosomal proteins that remained soluble in the extract.

Gel electrophoresis: The following electrophoretic systems were used: 1) a 15% polyacrylamide-6M urea-0.9N acetic acid-0.38% Triton DFL-16, as indicated by Alfageme et al (10); 2) a 15% polyacrylamide gel in 0.1% SDS, as descri-



bed by Laemmli (11) and modified by Kornberg (12); and 3) a 15% polyacrylamide-2.5 M urea-0.9 M acetic acid gel, following Panyim and Chalkey (7). Systems 1 and 3 required pre-electrophoresis in 0.9 N acetic acid up to constant voltage. Sixty  $\mu$ g of total histones per slot for system 1 and 50  $\mu$ g for systems 2 and 3 were used. To determine histone concentration in the samples, the method of Luck as described by Hnilica (13) was used. Gels were stained with 0.2% amido black 10 B, as indicated by Zweidler (14).

Estimation of *T. cruzi* histones molecular weights: The technique of Hamana and Iwai was used (15). Cylindric gels (0.5 x 11 cm) containing 10, 15 or 20% polyacrylamide-0.66% N-N-methylene-bisacrylamide-6.25 M urea-0.9 M acetic acid were prepared and pre-electrophoresis performed for 4 hrs in 0.9 M acetic acid. Histones from calf thymus were used as standards. The gels were stained as described by Zweidler (14). For the estimation of *T. cruzi* histones molecular weights, the procedure of Ferguson was applied (16).

## RESULTS.

Effect of different protease inhibitors on histone extraction. Fig. 1A shows the result of electrophoresis in a Triton-acid-urea system of histones obtained from *T. cruzi* (lane 1), sea urchin sperm cells (lane 2), rat liver (lane 3) and calf thymus (lane 4). As described before (4), five histones are present in *T. cruzi* in the range of migration of higher eukaryote histones. A sixth histone of high mobility is observed in the *T. cruzi* preparation, which resolves in two bands. These fast migrating bands were identified as H1 histones by extraction in 0.75 M PCA and differential precipitation in acid-acetone, as well as by their immunological properties (4). With the possible exception of band a, no similar mobilities are evident between *T. cruzi* histones compared to sea urchin, rat liver or calf thymus histones.

Fig. 1B lane 1, shows migration of *T. cruzi* histones extracted from chromatin without the use of protease inhibitors. Band b is faintly visible or absent, and a new band appears below band c. Sometimes diffuse bands typical of degradative processes are located between bands c and f. In lane 2, the characteristic pattern of *T. cruzi* histones is shown (4). All of these bands are present in the acid extract from whole epimastigotes (lane 8), showing that the protease inhibitors used (PMSF and TLCK) preserve the histones from degradation. Moreover, TLCK alone at 1.5 mM (lane 3) and up to a concentration of 0.5 mM seems to be efficient enough to preserve a neat pattern.

When PMSF, TPCK, N-ethylmaleimide or sodium bisulfite were used (lanes 4, 5, 6 and 7, respectively), a change of the electrophoretic pattern was observed which is especially evident with TPCK. Sometimes, histones obtained in the presence of sodium bisulfite are very much degraded (not shown). An activation of

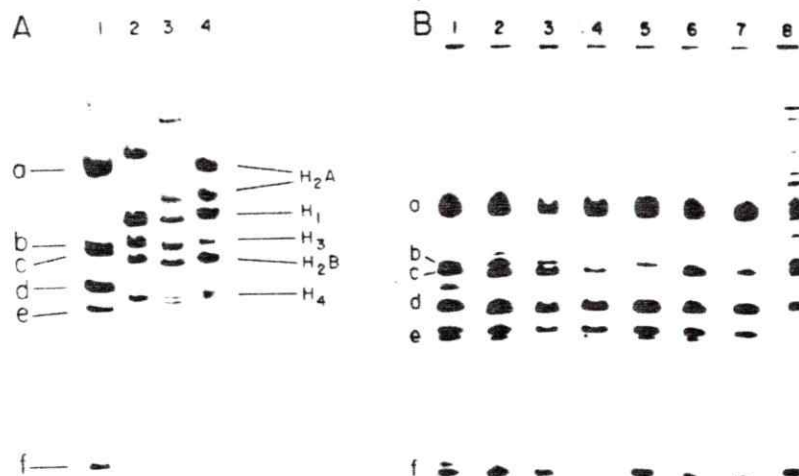


Figure 1A (left): Triton-acid-urea-gel of histones extracted from *T. cruzi* epimastigotes (lane 1), sea urchin sperm cells (lane 2), rat liver (lane 3) and calf thymus (lane 4). Electrophoresis was performed on a 15% acrylamide-6.0 M urea-0.9 M acetic acid-0.38% Triton DFL16 gel. Order of migration for calf thymus: H<sub>2</sub>A, H<sub>1</sub>, H<sub>3</sub>, H<sub>2</sub>B and H<sub>4</sub>. a, b, c, d, e and f: *T. cruzi* histones.

Figure 1B (right): Chromatin was obtained and histones were extracted under the presence of the following protease inhibitors: Lane 1: No inhibitors; lane 2: 2.2 mM PMSF plus 1.5 mM TLCK; lane 3: 1.5 mM TLCK; lane 4: 2.2 mM PMSF; lane 5: 1 mM TPCK; lane 6: 1 mM N-ethylmaleimide; and lane 7: 0.05 M Sodium bisulphite. In lane 8, total proteins extracted from live epimastigotes in 0.4 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> for 3 min. Histones were fractionated as indicated under Fig. 1A.

proteases by this chemical rather than their inhibition was already reported (17). Considering these results, 2.2 mM PMSF plus 1.5 mM TLCK were further used.

Fig. 2 shows the electrophoretic pattern of histones extracted from *T. cruzi* (lane 1), sea urchin sperm cells (lane 2), rat liver (lane 3) and calf thymus (lane 4) as separated by the SDS-PAGE system. Several bands are seen in the *T. cruzi* preparation, along the range of migration of higher eukaryote histones. The two slow migrating proteins (double arrows) are below rat liver or calf thymus H<sub>1</sub>. There is a third faint band (arrow-head) just above three prominent bands (stars). These last three bands are located at the level of migration of the core histones from either rat liver or calf thymus.

When either calf thymus or *T. cruzi* chromatin were extracted with 0.75 M PCA, and histones H<sub>1</sub> were differentially precipitated from the extract with

1 2 3 4 5 6

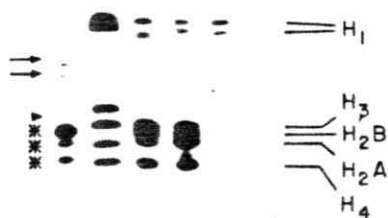
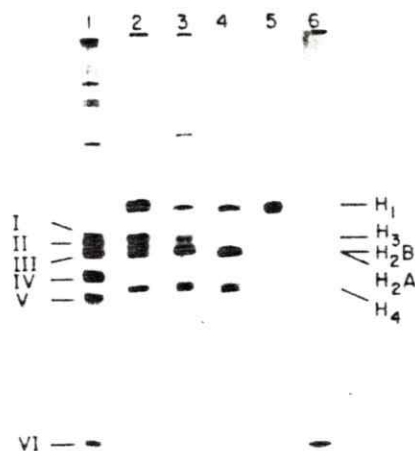


Figure 2: SDS-PAGE of histones extracted from *T. cruzi* epimastigotes (lane 1), sea urchin sperm cells (lane 2), rat liver (lane 3) and calf thymus (lane 4). H1 histone from calf thymus (lane 5) and from *T. cruzi* epimastigotes (lane 6) were extracted by the Sanders technique. A 15% polyacrylamide gel in 0.1% SDS was used. Order of migration for calf thymus: H1, H3, H2B, H2A and H4.

acid-acetone (9), the two expected bands for H1 were obtained from calf thymus (lane 5) while two bands were observed in *T. cruzi* (lane 6). One of these bands co-migrates with one of those indicated by double arrows in lane 1, while the second band is located at the level of core histones. Sometimes the upper band is resolved into two. Neither of these putative *T. cruzi* H1 histones co-migrated with calf thymus H1. However *T. cruzi* histones which were extracted with 0.75 M PCA were identified as H1 (4).

Fig. 3 shows the histones obtained from *T. cruzi* (lane 1), sea urchin sperm cells (lane 2), rat liver (lane 3) and calf thymus (lane 4), as fractionated by electrophoresis in acid-urea gels (7). Again, six bands are seen in *T. cruzi*. None of these bands co-migrate with either H1 or H4 from higher eukaryotes. The appearance of a very fast migrating band (VI) is interesting. This band is resolved into two when a longer time of electrophoresis is used. When *T. cruzi* chromatin was extracted using the Sanders technique (9), this fast migrating band was present in the PCA extract and it was precipitated with acid-acetone, thus presenting solubility characteristics proper of an H1 histone (lane 6). In lane 5, calf thymus H1 obtained by using the same procedure is shown for comparison.



**Figure 3:** Acid-urea-PAGE of histones extracted from *T. cruzi* epimastigotes (lane 1), sea urchin sperm cells (lane 2), rat liver (lane 3) and calf thymus (lane 4). H1 histone from calf thymus (lane 5) and from *T. cruzi* epimastigotes (lane 6) were purified by PCA extraction and differential precipitation in acid-acetone. A 15% polyacrylamide-2.5 M urea- 0.9 N acetic acid gel was used. Order of migration for calf thymus: H1, H3, H2B, H2A and H4.

In Table 1, the estimation of molecular weights in 5 out of 6 bands of *T. cruzi* histones fractionated in acid-urea gels is shown. Bands are numbered considering their mobilities, (see Fig. 3). The molecular weight of band VI cannot be estimated by this procedure, considering that it is out of the mobility range of calf thymus histones used as standards. To assign the molecular weights to the histones fractionated in Triton-acid-urea gels, histones bands a, b, c, d, and e were cut out, eluted and each of them run separately in acid-urea gels, using calf thymus histones as standards.

#### DISCUSSION

Cytoplasmic or chromatin-bound proteases are potential sources of error in the preparation of histones from any biological species (17-18). This problem is of special importance in the strain Tulahuén of *T. cruzi* which contains an active pool of proteases (19-23).

In this work, a battery of protease inhibitors was tested, being remarkable the effectiveness of TLCK. This result is in agreement with Bongertz

Table 1 : Estimation of *T. cruzi* histones molecular weights.

Calf thymus	Trypanosoma cruzi	
	in acid urea	equivalence to Triton DFL-16
H <sub>1</sub> : 21,000	band I : 16,000	(b)
H <sub>2</sub> : 15,324	band II : 14,900	(c)
H <sub>2</sub> A : 14,002	band III : 14,000	(a)
H <sub>2</sub> B : 13,775	band IV : 12,000	(d)
H <sub>4</sub> : 11,282	band V : 10,700	(e)

Histones molecular weights are expressed in daltons.

Table 1: Calf thymus and *T. cruzi* epimastigote histones were separated in 10%, 15% and in 20% polyacrylamide-0.66% N-N-methylenebisacrylamide-6.25 M urea- 0.9 M acetic acid. *T. cruzi* histones molecular weights were estimated by the procedure of Ferguson (15). Bands a, b, c, d, and e from the Triton DFL16-urea-acid gel were eluted and re-run in an acid-urea gel, using total *T. cruzi* histones as a reference. Considering the high mobility of band VI on acid-urea gels and of band f on Triton DFL16-acid-urea gels (which is the same protein, not shown), its molecular weight cannot be estimated.

(19). On the other hand, sodium bisulfite does not inhibit but rather enhanced proteolysis. The presence of histone degrading proteases in chromatin preparations which are activated by bisulfite were previously described in sea urchin sperm cells (17).

In a high resolution electrophoretic system, six histones which were extracted from *T. cruzi* chromatin are clearly seen (Fig. 1A, lane 1 and ref. 4). With the possible exception of band a, no identical mobilities are evident between *T. cruzi* histones and either sea urchin, rat liver or calf thymus histones.

Our results in the SDS-PAGE system are in accordance with those of Rubio et al. (2), and of Hecker et al. (3), except for the two upper bands present in our preparation (see Fig. 2, double arrows). This discrepancy may be due to the fact that these authors did not use the protease inhibitor TLCK.

One, or both upper bands are extracted with 0.75 M PCA and precipitated from this extract in acid-acetone, suggesting that they may correspond to T. cruzi H1 histones. This is supported by findings of Rizzo, who described similar bands in SDS-PAGE in Peridinium foliaceum (24). Moreover, histone bands of intermediate mobility between H1 and core histones from calf thymus were found in Clamydomonas reinhardii and in Peridinium balticum (24). In this last binucleate dinoflagellate, these histone bands present a violet rather than the usual blue color with Coomassie Brilliant Blue, and they are soluble in 0.75 M PCA (25). These two characteristics are proper of H1 histones (25). Both properties, methachromasia and solubility in 0.75 M PCA, were previously found in a couple of basic proteins which presented cross-reactivity with an antiserum prepared in rabbits against sea urchin histone H1 (4). Finally, in Chritidia fasciculata bands with similar mobility to those indicated with double arrows in Fig. 2 were soluble in 0.75 M PCA and presented an amino acid composition characteristic of an H1 histone (V. Dushak and J.J. Cazzulo, personal communication).

On the other hand, our results in acid-urea gels fully agree with those of Astolphi et al (1). These authors also shows the presence of a high mobility band which can be resolved into two when a longer electrophoresis time is used. In our hands, this high mobility band presents the same solubility properties as H1 from calf thymus (see Fig. 3) and is the same protein which was described as band f in T. cruzi, in non-ionic detergent gels and characterized as H1 (4). When this band is eluted from the Triton gels and run in acid-urea gels, it presents an Rf which corresponds to the high mobility band VI (Fig. 3, lane 6). A similar band of high mobility was also described in Oxytricha (26). Surprisingly enough, this band also resolves into two and presents an amino acid composition proper of an H1 histone. Consequently, in T. cruzi there is a histone with solubility and electrophoretic properties similar to the one described for H1 histone in Oxytricha.

Our results with three different gel systems give little doubts on the clear difference in the pattern of electrophoretic migration of T. cruzi histones with regard to other species. The comparison of the molecular weights of T. cruzi and calf thymus histones confirms, in numerical terms, these differences. This result is not fully unexpected. Thus, histones extracted from protozoa show a different pattern than the one of calf thymus, when analyzed in SDS-gels (24). In some cases 6, or even 8 histones have been described in Peridinium and in Clamydomonas (24), some of them presenting very different patterns of migration as compared to calf thymus. Clearly enough, the idea of high conservation cannot

be maintained with regard to electrophoretic mobility and it should be focused to other properties.

Taking all these data in consideration, we propose that T. cruzi histones are conservative chromosomal proteins with regard to their function more than with regard to their amino acidic sequence as is commonly argued. This proposal is not only in agreement with T. cruzi but it also seems to fit in with other protozoa.

#### ACKNOWLEDGEMENTS

This investigation was supported by Grants from UNDP/World Bank/WHO Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases; by a Grant from OAS; by Grants 209 and 096 from FONDECYT, Chile; by a Grant from DTI, U. de Chile; by a Grant from the TWAS and by the Acuerdo Universidad de Chile - C.S.I.C. de España.

#### REFERENCES

1. Astolphi Filho, S., Martins de Sa, C. and Gander, E. (1980) *Mol. Biochem. Parasitol.* 1, 45-53.
2. Rubio, J., Rosado, Y. and Castañeda, M. (1980) *Canadian J. Biochem.* 58, 1247-125.
3. Hecker, H. and Gander, E. (1985) *Biol. Cell.* 53, 199-208.
4. Toro, G.C. and Galanti, N. (1988) *Exp. Cell Res.* 174, 16-24.
5. Diamond, L. J. (1968) *Parasitol.* 54, 715-717.
6. Stein, G.C., Mans, R.J., Gabbay, E. J., Stein, J.L., Davis, J. and Adawaskar, P.D. (1975) *Biochemistry* 14, 1859-1866.
7. Panyim, S. and Chalkey, R. (1969) *Arch. Biochem. Biophys.* 130, 337-346.
8. Urban, M. and Zweidler, A. (1983) *Develop. Biol.* 95, 421-428.
9. Sanders, C. (1977) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 78, 1034-1042.
10. Alfageme, C.R., Zweidler, A., Mahowald, A. and Cohen, L.J. (1974) *J. Biol. Chem.* 249, 3729-3736.
11. Laemmli, U.K. (1970) *Nature (London)* 227, 680-685.
12. Thomas, J.O. and Kornberg, R.D. (1975) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 72, 2626-2630.
13. Hnilica, L. (1975) in *Methods in Enzymology* (B.W. O'Malley and J.G. Hardman, eds.), Vol. XL, p. 102, Academic Press, New York.
14. Zweidler, A. (1980) in *Methods in Cell Biology* (D.M. Prescott et al., eds.), Vol. 17, p. 223-233, Academic Press, New York.
15. Hamana, K. and Iwai, K. J. (1974) *Biochem.* 76, 503-512.
16. Ferguson, K. (1964) *Metabolism* 13, 985-1002.
17. Imschenetzki, M., Pucci, M., Massone, R. and Gamboa, S. (1981) *Cell. Mol. Biol.* 27, 491-493.
18. Sanchez-Chiang, L., Ponce, O., Raddatz, O. and Merino, V. (1983) *Biochemistry Internatl.* 6, 21-28.
19. Bongertz, V. and Hungerer, K. (1978) *Exp. Parasitol.* 45, 8-18.
20. Rangel, H.A., Araujo, P.M., Repka, D. and Costa, M.G. (1981) *Exp. Parasitol.* 52, 199-209.
21. Rangel, H.A., Araujo, P.M., Camargo, I.J., Bonfitto, M., Repka, D., Sakurada, J.K. and Atta, A.M. (1981) *Tropenmed. Parasit.* 32, 87-92.

22. O'Daly, J., Serrano, L. and Rodriguez, M. (1983) *Internatl. J. for Parasit.* 13, 433-440.
23. Bontempi, E., Franke de Cazzulo, B., Ruiz, A. and Cazzulo, J.J. (1984) *Comp. Biochem. Physiol.* 77B, 594-604.
24. Rizzo, P. (1985) *BioSystems* 18, 249-262.
25. Rizzo, P. (1981) *BioSystems* 14, 433-443.
26. Caplan, E. (1975) *Biochim. Biophys. Acta* 407, 109-113.