

1-FC
-B
SS P

PURIFICACION, CARACTERIZACION BIOQUIMICA Y
CLONAMIENTO DEL GEN DE LA DNA POLIMERASA TIPO β DE
TRYPANOSOMA CRUZI.

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

Juan Venegas Hermosilla

1995

DIRECTOR DE TESIS: Dr. Aldo Solari Illescas



FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD DE CHILE

INFORME DE APROBACION
TESIS DE DOCTORADO

Se informa a la Comisión de Postgrado de la Facultad de Ciencias que la Tesis de Doctorado presentada por el candidato

JUAN ANTONIO VENEGAS HERMOSILLA

Ha sido aprobada por la Comisión de Evaluación de la Tesis como requisito de tesis para optar al grado de **Doctor en Ciencias con mención en Biología**, en el Examen de Defensa de Tesis rendido el

Director de Tesis:

Dr. Aldo Solari I.

Comisión de Evaluación de la Tesis

Dra. Catherine Connely

Dr. Norbel Galanti

Dr. Arturo Yudelevich

Dr. Octavio Monasterio

Catherine Connely
Norbel Galanti
Arturo Yudelevich
Octavio Monasterio

AGRADECIMIENTOS

Mis sinceros agradecimientos:

Al Dr. Aldo Solari, por acogerme en su laboratorio, apoyarme todos estos años y depositar su confianza en mí.

A la Dra. Gittith Sánchez, por su gran lucidez y ejemplo de perseverancia a toda prueba que me impulsaron siempre a seguir adelante.

A la Dra. Lena Aslund y Maria Ridaker, por su certera dirección de mi trabajo del clonamiento del gen de *T.cruzi* realizado en Suecia.

Al Dr. Ulf Pettersson, por la oportunidad de trabajar en el laboratorio que dirige en el Centro de BioMedicina, Uppsala, Suecia.

A la Dra. Marta Gajardo y Dra. Anne Wallace, por su valiosa ayuda en técnicas inmunológicas y su fraternal apoyo.

A Inés Zulantay, Erik Díaz, Gladys Tapia, Silvia Ortiz, Rodrigo Gálvez y Loreto Moraga, por su colaboración en algunos experimentos y acompañarme incondicionalmente.

Al Dr. Carlos Jerez, por su entusiasmo y generosidad en compartir sus vastos conocimientos.

A la Dra. Catherine Connelly por su sabios consejos y enseñanzas.

Al Dr. Marcelo Antonelli, por su amabilidad y su experta ayuda con los programas PC/GENE.

Al Dr, Manuel Raices, Betina Porcel y Jan Henriksson, por su fraternal ayuda durante mi estadía en Suecia.

A Juan Salas, Gino Corsini y Rodrigo Fernandez, colaboradores en algunas "maratones" de purificación.

A Patricio Rodriguez, por su experta colaboración en la obtención de los perfiles hidrofóbicos y de una estructura terciaria.

A los Académicos, estudiantes y amigos del Departamento de Bioquímica Patricia Varela, Claudio Berrios, Ismael Correa, Ana María Amaro, Alberto García, Héctor Toledo, Sergio Muñoz, Mónica Delgado y Gonzalo Osorio. Por brindarme su permanente cooperación, experiencia profesional y resolverme interminables problemas.

A los integrantes del laboratorio del Dr. Allende, en especial a la Dra. Germain Jacob, Dra. Rowena Tellez, Vivian Wilhelm y María Plaza, por su colaboración en la utilización de algunos instrumentos y constante estímulo.

Al Dr. Norbel Galanti, por su gentil ayuda en la realización del experimento de "Northern-blot".

A la Dra. Pilar Carvallo, por su apreciable donación de los marcadores de RNA.

A Héctor Muñoz, José Mondaca y Patricio Aguilera por su irremplazable y perfecto trabajo de fotografías y dibujo técnico.

A Juan Araos y Luisa López, ejemplos de humanidad y solidaridad verdadera.

A Lorenzo Retamales, Ana Obreque, Ana Novoa y Nancy Sotelo por su buena voluntad en múltiples labores de secretaria.

A Claudia, Rodrigo y Mariela Toro, jóvenes talentosos con los cuales he tenido la alegría de compartir.

Finalmente a los miembros de la Comisión de Evaluación por la diligente y eficiente corrección de esta tesis.

A todos, Muchas Gracias.

"...Pero hay los que luchan toda la vida:

Esos son los imprescindibles"

Bertold Brecht

A Gittith Sánchez

A mis Padres,

Juan y Eva

A mis hermanos

A mis tios

A mis amigos

INDICE DE MATERIAS

	Pag.
LISTA DE TABLAS.....	i
LISTA DE FIGURAS.....	ii
LISTA DE ABREVIATURAS.....	v
RESUMEN.....	vi
ABSTRACT.....	ix
INTRODUCCION.....	1
1.- <i>Trypanosoma cruzi</i>	1
1.1.- Clasificación.....	1
1.2.- Ciclo vital.....	2
1.3.- Enfermedad de Chagas.....	6
2.- DNA polimerasas.....	7
3.- Características Generales de las DNA polimerasas de vertebrados.....	14
3.1.- DNA polimerasa α	14
3.2.- DNA polimerasas δ y ϵ	16
3.3.- DNA polimerasa γ	17
3.4.- DNA polimerasa β	18
4.- Estructura de las DNA polimerasas.....	19
5.- DNA polimerasas de eucariotes inferiores.....	26
5.1.- DNA polimerasas tipo α y tipo δ de eucariotes inferiores.....	27
5.2.- Probables DNA polimerasas tipo β de eucariotes inferiores.....	28
5.3.- DNA polimerasas tipo γ y DNA polimerasas mitocondriales de eucariotes inferiores.....	31
5.4.- DNA polimerasas de alta masa molecular insensibles a afidicolina.....	32
5.5.- DNA polimerasas de alta masa molecular no clasificables dentro de las categorías descritas para enzimas de vertebrados.....	33
5.6.- DNA polimerasas de <i>Trypanosoma cruzi</i>	33
6.- Hipótesis.....	34
7.- Objetivos.....	34

MATERIALES Y METODOS.....	36
Reactivos.....	36
Ensayo de DNA polimerasas.....	37
Electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de SDS.....	38
Detección de actividad DNA polimerásica en geles de poliacrilamida en presencia de SDS.....	39
Activación de DNA.....	40
Parásitos.....	40
Purificación de una DNA polimerasa α de <i>Xenopus laevis</i>	41
Producción de anticuerpos.....	41
Análisis mediante "Western-blot".....	42
Cuantificación de proteínas.....	42
Sedimentación en gradientes de glicerol.....	42
Tratamiento de <i>Stafilococcus aureus</i> para ser utilizado en inmunoprecipitación.....	43
Inmunoprecipitación de actividad DNA polimerásica.....	43
Tampones utilizados en la purificación de DNA polimerasas de <i>T.cruzi</i>	44
Aislamiento de tres fracciones con actividad DNA polimerásica, denominadas fracción A, B y C.....	44
Purificación cercana a homogeneidad de una DNA polimerasa tipo β de <i>T.cruzi</i>	50
Microsecuenciación de péptidos de la DNA polimerasa tipo β de <i>T.cruzi</i>	51
Ensayos de PCR.....	52
a) Ensayo con oligonucleótidos degenerados.....	52
b) Ensayo con partidores biotinilados para secuenciación automática.....	52
c) Ensayo directo con muestras procedentes de colonias bacterianas.....	53
Purificación de fragmentos de DNA.....	53
Ligamiento de fragmentos de DNA en vectores pT7Blue(R) y pUC-19.....	53
Transformación de bacterias competentes.....	54
Marcación de fragmento de 550 pb con [32 P] para ser utilizado como sonda.....	54
Búsqueda de clones portadores del gen de la DNA polimerasa tipo β de <i>T.cruzi</i> en una genoteca genómica construida en λ gt11.....	55
Purificación de DNA de fagos recombinantes.....	56
Clonamiento de insertos recombinantes de fagos λ gt11 en vector pUC-19.....	57
Minipreparaciones de plásmido de pUC-19.....	58
Mapa físico de clones recombinantes pUC-7-2, pUC-8-1 y pUC-4-3500.....	58
Subclonamiento de fragmentos conteniendo el gen de la DNA polimerasa tipo β de <i>T.cruzi</i>	59

Análisis de la organización del gen de la DNA polimerasa tipo β de <i>T.cruzi</i> mediante técnicas de "Southern-blot".....	60
Análisis mediante la técnica de "Northern-blot" de la expresión del gen de la DNA polimerasa tipo β de <i>T.cruzi</i> en diferentes formas del parásito.....	60
RESULTADOS	62
Capítulo I: Aislamiento y caracterización parcial de tres DNA polimerasas presentes en la forma proliferativa epimastigote de <i>T.cruzi</i>.....	62
Análisis de las DNA polimerasas fracciones A y C mediante sedimentación en gradientes de glicerol.....	65
Utilización de distintos tipos de matrices como DNA sustratos por las DNA polimerasas fracción A, B y C.....	65
Estudio de la DNA polimerasa fracción A mediante inmunoprecipitación con antisueros generados en contra de la fracciones A, B y C....	68
Capítulo II: Purificación cercana a homogeneidad de una DNA polimerasa tipo β de <i>T.cruzi</i>.....	70
Análisis de diferentes etapas de purificación mediante electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturantes.....	70
Identificación del polipéptido catalítico de la DNA polimerasa de <i>T.cruzi</i>	72
Análisis mediante técnicas de "Western-blot" de fracciones correspondientes a diferentes etapas de purificación de la DNA polimerasa de <i>T.cruzi</i>	76
Caracterización de la DNA polimerasa de baja masa molecular de <i>T.cruzi</i> mediante la utilización de inhibidores.....	78
Utilización de matrices de DNA.....	81
Capítulo III: Clonamiento del gen de la DNA polimerasa tipo β de <i>T.cruzi</i>.....	84
Microsecuenciación de varios péptidos de la DNA polimerasa tipo β de <i>T.cruzi</i> y su similitud con distintos segmentos de la estructura primaria de la DNA polimerasa β de rata.....	84
Síntesis de los oligonucleótidos degenerados 18s y 27as a partir de la información de la secuencia aminoacídica de los péptidos 18 y 27.....	88
Amplificación mediante PCR de un fragmento específico de 550 pares de bases utilizando	

los partidores 18s y 27as.....	90
Clonamiento del producto de amplificación de 550 pb en el vector pT7Blue(R) para ser secuenciado mediante sistema automático.....	92
Identificación de una secuencia aminoacídica deducida del fragmento de PCR de 550 pb, homóloga con péptidos de la DNA polimerasa tipo β de <i>T.cruzi</i> y algunos segmentos de la estructura primaria de la DNA polimerasa β de rata.....	98
Aislamiento de tres clones de λ gt11 conteniendo insertos que hibridan con la sonda de 550 pb....	99
Mapa físico de los clones recombinantes pUC-7-1, pUC-8-1 y pUC-4-3500 que portan el gen de la DNA polimerasa tipo β de <i>T.cruzi</i>	102
Secuenciación inicial del gen de la DNA polimerasa tipo β de <i>T.cruzi</i> contenido en los insertos de 3500 pb de los vectores pUC-4-3500 y pUC-7-2.....	106
Comparación de la secuencia aminoacídica deducida del gen de la DNA polimerasa tipo β de <i>T.cruzi</i> con la estructura primaria descrita para la DNA polimerasa β de rata.....	111
Comparación de perfiles de hidrofobicidad de la secuencia aminoacídica deducida del gen de la DNA polimerasa tipo β de <i>T.cruzi</i> y la estructura primaria de la DNA polimerasa β de rata.....	114
Análisis mediante "Southern-blot" del gen de la DNA polimerasa tipo β de <i>T.cruzi</i>	117
Análisis mediante "Northern-blot" de la expresión del gen de la DNA polimerasa tipo β de <i>T.cruzi</i>	119
DISCUSION	121
Aislamiento de tres fracciones con actividad DNA polimerásica de epimastigote de <i>T.cruzi</i>	122
Purificación cercana a homogeneidad y caracterización de una DNA polimerasa tipo β de <i>T.cruzi</i>	124
Clonamiento del gen que codifica para el dominio catalítico de la DNA polimerasa tipo β de <i>T.cruzi</i>	128
Comparación de los perfiles de hidrofobicidad de las secuencias aminoacídicas homólogas de la DNA polimerasa tipo β de <i>T.cruzi</i> y la DNA polimerasa β de rata.....	138
Probable clonamiento del gen completo que codifica para la DNA polimerasa tipo β de <i>T.cruzi</i>	139
Estudio de la organización del gen de la DNA polimerasa tipo β de <i>T.cruzi</i>	140

Expresión del gen de la DNA polimerasa
tipo β de *T.cruzi* en diferentes formas
celulares del parásito..... 142

CONCLUSIONES Y PROYECCIONES 144

BIBLIOGRAFIA..... 147

LISTA DE TABLAS

		Pag.
Tabla I	DNA polimerasas eucarióticas.....	15
Tabla II	Posibles DNA polimerasas tipo β de eucariotes inferiores.....	29
Tabla III	Aislamiento de DNA polimerasas fracción A, B y C de <i>Trypanosoma cruzi</i>	64
Tabla IV	Utilización de distintas matrices- partidores por las DNA polimerasas fracciones A, B y C de <i>T.cruzi</i>	67
Tabla V	Purificación de una DNA polimerasa tipo β de <i>T.cruzi</i>	71
Tabla VI	Utilización de distintos tipos de matrices por la DNA polimerasa tipo β de <i>T.cruzi</i> y una DNA polimerasa α de ovarios de <i>Xenopus laevis</i>	82

LISTA DE FIGURAS

	Pag.
Figura 1. Dendograma que muestra las probables relaciones filogenéticas entre especies que componen la clase Kinetoplastae.....	4
Figura 2. Esquema del ciclo vital del parásito causante de la enfermedad de Chagas, <i>Trypanosoma cruzi</i>	5
Figura 3. Dibujo esquemático de la estructura terciaria del fragmento Klenow que muestra como se uniría al DNA sustrato (Joyce y Steitz, 1987)....	20
Figura 4. Representación esquemática del subdominio "palma" de la DNA polimerasa β de rata (Davies y col., 1994).....	23
Figura 5. Estructura primaria de la DNA polimerasa β indicando la posición de las estructuras secundarias de acuerdo a Davies y col. (1994)...	24
Figura 6. Esquema de purificación de las DNA polimerasas fracción A, B y C, aisladas de la forma proliferativa epimastigote de <i>T. cruzi</i>	46
Figura 7. Perfil de elusión de las DNA polimerasas fracción A, B y C desde la cromatografía en la segunda fosfocelulosa.....	49
Figura 8. Análisis mediante sedimentación en gradientes de glicerol de las DNA polimerasas fracción A y C.....	66
Figura 9. Inmunoprecipitación de la DNA polimerasa fracción A con sueros inmunes contra las fracciones A, B y C.....	69
Figura 10. Análisis electroforéticos en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturantes de muestras procedentes de distintas etapas de purificación de la DNA polimerasa de baja masa molecular de <i>T. cruzi</i>	73
Figura 11. Correlación entre actividad DNA polimerásica eluida desde una columna de DNA-celulosa y el análisis electroforético en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturantes.....	74

Figura 12. Identificación del polipéptido catalítico de la DNA polimerasa de baja masa molecular de <i>T. cruzi</i>	75
Figura 13. Análisis mediante "Western-blot" de muestras procedentes de diferentes etapas de purificación de la DNA polimerasa de baja masa molecular de <i>T. cruzi</i>	77
Figura 14. Efecto de inhibidores sobre la actividad enzimática de la DNA polimerasa de baja masa molecular de <i>T. cruzi</i>	79
Figura 15. Comparación de péptidos de la DNA polimerasa tipo β de <i>T. cruzi</i> con segmentos de la estructura primaria de la DNA polimerasa β de rata.....	85
Figura 16. Esquema de la estructura primaria de la DNA polimerasa β de rata y la probable localización de distintos péptidos de la DNA polimerasa tipo β de <i>T. cruzi</i>	87
Figura 17. Oligonucleótidos degenerados sintetizados a partir de las secuencias de los péptidos 18 y 27 de la DNA polimerasa tipo β de <i>T. cruzi</i>	89
Figura 18. Productos de PCR originados del análisis de una genoteca de cDNA y muestras de DNA genómico utilizando los oligonucleótidos 18s y 27as.....	91
Figura 19. Diagrama del plásmido comercial pT7Blue(R).....	93
Figura 20. Esquema del clonamiento del producto de PCR de 550 pares de bases en el vector para secuenciación automática pT7Blue(R).....	95
Figura 21. Detección mediante PCR de colonias recombinantes, transformadas con plásmidos pT7Blue(R) conteniendo el inserto de 550 pares de bases.....	96
Figura 22. Productos de PCR conteniendo el inserto de 550 pares de bases clonado en el vector pT7Blue(R) para ser sometidos a secuenciación automática (Lagerkvist y col., 1994).....	97

Figura 23. Estimación mediante PCR del largo de los insertos que hibridaron con la sonda 550, transportados por los fagos recombinantes λ gt11.....	100
Figura 24. Diagrama del plásmido comercial pUC-19.....	101
Figura 25. Perfil electroforético de fragmentos de restricción y el análisis mediante la técnica de "Southern-blot" utilizando como sonda el fragmento de PCR de 550 pares de bases, de los plásmidos recombinantes pUC-7-2 y pUC-4-3500.....	103
Figura 26. Mapa físico de los plásmidos recombinantes pUC-4-3500 y pUC-7-2.....	105
Figura 27. Subclones de los plásmidos recombinantes pUC-4-3500 y pUC-7-2, y localización de los segmentos secuenciados, respecto al mapa físico de ambos vectores.....	108
Figura 28. Secuencia nucleotídica y secuencia aminoacídica deducida, de un segmento del gen de la DNA polimerasa tipo β de <i>T. cruzi</i>	110
Figura 29. Comparación de secuencias aminoacídicas del fragmento de 224 aminoácidos deducida del gen de la DNA polimerasa tipo β de <i>T. cruzi</i> con la estructura primaria descrita para la DNA polimerasa β de rata.....	112
Figura 30. Comparación de los perfiles de hidrofobicidad de la secuencias aminoacídicas deducida del gen de la DNA polimerasa tipo β de <i>T. cruzi</i> y un segmento de la DNA polimerasa β de rata.....	115
Figura 31. Estudio mediante técnicas de "Southern-blot" de la organización del gen de la DNA polimerasa tipo β de <i>T. cruzi</i> en el clon Dm28c.....	118
Figura 32. Análisis mediante "Northern-blot" de muestras de RNA procedentes de distintas formas celulares de <i>T. cruzi</i> utilizando como sonda el fragmento de PCR de 550 pares de bases.....	120
Figura 33. Esquema de la estructura primaria de la DNA polimerasa β de rata mostrando la localización de las estructuras secundarias y los residuos catalíticos (D190, D192, R254, D256 y R258), comparada con los péptidos y segmentos deducidos del gen de la DNA polimerasa tipo β de <i>T. cruzi</i>	137

ABREVIATURAS

BCIP	5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato
berenil	4',4'-diazamino-dibenzamidina diaceturato
BSA	seroalbumina de bovino
BuPdGTP	butilfenil-dGTP
ddTTP	didesoxitimidin 5'-trifosfato
DEAE	dietilaminoetilo
dNTP	desoxinucleósido 5'-trifosfato
DTT	ditiotreitól
EDTA	ácido etilendiaminotetracético
NBT	tetrazolio de "nitroblue"
PCR	reacción DNA polimerásica en cadena
PMSF	fenilmetilsulfonil-fluoruro
PPO	2,5-difeniloxazol
POPOP	1,4-bis-2-(5-feniloxazol)
TCA	ácido tricloroacético
TEMED	N,N',N'-tetrametilendiamina
TLCK	tosilisin-clorometilcetona
Tris	Tris-(hidroximetil)-aminometano

RESUMEN

Con el objetivo de estudiar el grado de similitud bioquímica y estructural que existe entre las DNA polimerasa de *Trypanosoma cruzi* y vertebrados, se procedió a aislar las diferentes DNA polimerasas existentes en la forma proliferativa epimastigote, purificar y caracterizar bioquímicamente una de ellas, y clonar el gen que codifica para la enzima más extensamente purificada.

De la forma proliferativa epimastigote, se logró aislar tres fracciones enzimáticas las que fueron denominadas, DNA polimerasas fracción A, B y C. Dichas fracciones mostraron características bioquímicas distintas, lo que sugirió que se trataba de tres entidades moleculares diferentes. Posteriormente, la fracción A se purificó extensamente, se identificó el polipéptido catalítico y se caracterizó bioquímicamente. Las propiedades bioquímicas de esta enzima, constituida por un polipéptido de 50 kDa, fueron concordantes con las características descritas para las DNA polimerasas β de vertebrados, lo que sugirió fuertemente que la enzima del parásito correspondía a una DNA polimerasa tipo β . Utilizando la información de secuencias aminoacídicas de péptidos de esta enzima de *T. cruzi*, se sintetizaron oligonucleótidos degenerados, los que se usaron en técnicas de PCR con el fin de clonar el gen de dicha enzima. Se logró amplificar un fragmento de 550 pares de bases cuya secuencia aminoacídica, deducida de su secuencia nucleotídica, tenía identidad

casi perfecta con péptidos de la enzima de *T.cruzi* e identidad parcial con segmentos de la estructura primaria de la DNA polimerasa β de rata. Utilizando como sonda el fragmento de PCR de 550 pares de bases, desde una genoteca genómica en λ gt11 construida a partir de DNA del parásito, se aislaron tres clones cuyos insertos fueron clonados en el vector pUC-19. Se determinó el mapa físico de estos plásmidos y se localizaron los fragmentos que hibridaron con la sonda de 550 pares de bases. Con el fin de secuenciar aquellos segmentos que contenían al gen de la DNA polimerasa tipo β de *T.cruzi*, se procedió al subclonamiento de estos plásmidos. Se logró secuenciar un segmento de 664 nucleótidos cuya secuencia aminoacídica deducida al ser comparada con la estructura primaria de la DNA polimerasa β de rata, reveló un porcentaje de similitud e identidad de 52,2 y 37,5%, respectivamente. Esta comparación, no sólo mostró que residuos fundamentales para la catálisis estarían conservados en la enzima de *T.cruzi*, sino que además fue concordante con nueva información en la cual se postula a otros residuos posiblemente implicados en la unión del desoxinucleótido y la matriz-partidor.

Se realizaron estudios iniciales con el fin de analizar la organización del gen que codifica para la mencionada enzima de *T.cruzi*. Experimentos de "Southern-blot" sugieren la posibilidad que exista más de una copia de dicho gen, sin embargo, es muy improbable que dichos genes puedan estar organizados en "tandem". Asimismo, se realizaron estudios de "Northern-blot" con el propósito de estudiar la expresión

de dicho gen, en distintas formas celulares de *T.cruzi*. Los resultados preliminares sugieren que, los mayores niveles de expresión del gen que codifica para dicha enzima ocurrirían en la forma no proliferativa tripomastigote de cultivo celular.

ABSTRACT

With the aim of describing the biochemical and structural similarities between *Trypanosoma cruzi* and vertebrate DNA polymerases, the isolation of different DNA polymerases from epimastigote proliferative forms, the purification to homogeneity of one of them and the gene cloning of the the most purified one, were undertaken.

Three DNA polimerases fractions were isolated from epimastigote cells , initially described DNA polymerases Fractions A, B and C. The biochemical properties of these enzyme fractions suggested that they correspond to three distinct entities. The fraction A was extensively purified, characterized and the catalytic polypeptide chain identified. The biochemical properties of this low molecular mass enzyme (50 kDa), agreed with those described for vertebrate DNA polymerases β . This fact strongly suggested that this parasite enzyme corresponded to a β -like DNA polymerase. Peptides of this enzyme were sequenced and the information utilized for designing degenerate oligonucleotide for PCR synthesis. A 550 base pair PCR fragment from *T.cruzi* genomic DNA was amplified and sequenced. The deduced amino acid sequence showed almost a perfect identity with some *T.cruzi* β -like DNA polymerase peptides and with some segments of rat DNA polymerase β primary structure. A λ gt11 *T.cruzi* genomic library

was analyzed and three phage clones were isolated using this PCR fragment as probe. The λ gt11 inserts were cloned into pUC-19 plasmids and their restriction maps were determined. These inserts were subcloned into the same pUC-19 plasmid for sequencing. A segment of 664 nucleotide was sequenced and its deduced amino acid sequence was compared with the rat DNA polymerase β . The similarity and identity between this two amino acid sequences were 52.2 and 37.5%, respectively. Furthermore, the results indicated not only that fundamental catalytic residues are conserved in the *T. cruzi* enzyme but also other new ones, presumably involved in the deoxynucleotide and DNA binding sites, would be conserved in the parasite enzyme.

Preliminary studies were conducted to know the organization of the *T. cruzi* β -like DNA polymerase gene. Southern-blot analysis suggested that more than one gene could exist in this parasite. However, the experiments indicate that these genes are not organized in tandem. On the other hand, a Northern-blot analysis was performed to address the question of the gene expression among different *T. cruzi* form cells. The initial results suggested that the nonproliferative tissue culture trypomastigote forms expressed the highest level of the β -like DNA polymerase gene.

INTRODUCCION

1.- *Trypanosoma cruzi*

1.1.- Clasificación: *T.cruzi* es un organismo eucariotico unicelular perteneciente al reino Protozoa, Phylum Euglenozoa, clase Kinetoplastae, la cual se divide en dos ordenes: el orden Bodonida y el orden Trypanosomida (Cavalier y Smith, 1993). Este último está compuesto exclusivamente por especies de vida parasitaria entre las cuales se encuentran parásitos de gran relevancia para la salud humana, tales como *Trypanosoma brucei*, agente causal de la enfermedad del sueño y la *Leishmania*, causante de graves afecciones a la piel y daños viscerales.

La clase Kinetoplastae se separó tempranamente de los eucariotes superiores localizandose a grandes distancias filogenéticas de los vertebrados (Cavalier-Smith, 1993). Este grupo de organismos se caracteriza por poseer una única y gran mitocondria llamada kinetoplasto. Son organismos flagelados que además poseen propiedades biológicas y bioquímicas muy particulares, entre las cuales se pueden citar la compartimentalización de una parte de la via glicolítica en un organelo llamado glicosoma (Opperdoes, 1985), procesamiento discontinuo de RNA mensajeros llamado "trans-splicing" (Borst, 1986), especial organización y replicación del DNA kinetoplastídico (Simpson, 1987; Pérez-Morga y Englund, 1993), abundante expresión de RNA policistrónicos (Sloof y Benne, 1993) y presencia del procesamiento postranscripcional de mensajeros llamado "editing"

(Simpson y Maslov, 1994).

Una relación filogenética que se postula entre las especies que componen la orden Kinetoplastae se muestra en la Figura 1 (Henriksson, 1995). Todavía no es clara la exacta relación que existe entre *T.cruzi* y los tripanosomatideos *Trypanosoma brucei* y *Trypanosoma rangeli*.

1.2.- Ciclo vital.

El protozoo parásito *T.cruzi* posee un ciclo vital complejo, compuesto por sucesivas diferenciaciones desde formas celulares proliferativas a formas celulares no proliferativas (Brenner, 1973; Brenner y Alvarenga, 1976). En su ciclo vital el parásito involucra a un hospedero invertebrado, el cual corresponde a un insecto vector, y a un hospedero vertebrado, el cual puede ser el hombre u otros mamíferos. En Chile sólo se han descrito dos insectos vectores comunmente llamados "vinchucas" los cuales son los reduvidos *Triatoma spinolai* y *Triatoma infestans*. Las formas celulares proliferativas están constituidas por los epimastigotes y amastigotes intracelulares. En cambio, las no-proliferativas corresponden a los tripomastigotes metacíclicos y tripomastigotes sanguíneos. Un esquema del ciclo vital del parásito está representado en la Figura 2. Este ciclo se puede describir de la siguiente manera: Los epimastigotes que proliferan en la zona media del intestino del insecto vector se diferencian a tripomastigotes metacíclicos. Estos al ser eliminados por las heces, y contaminar la herida del mamífero picado por el insecto, pasan al torrente sanguíneo del hospedero vertebrado. A

través de dicho torrente, el parásito invadirá células de diversos órganos y se diferenciará a amastigote. Los amastigotes proliferarán dentro de las células invadidas hasta que estas se lisan y liberan los parásitos a la circulación. En tales circunstancias los parásitos volverán a diferenciarse, esta vez a la forma tripomastigote sanguíneo, los cuales podrán invadir otros tejidos ó pasar nuevamente al insecto vector a través de su picada. En esta alternativa el parásito podrá nuevamente realizar otro ciclo a través del insecto vector.

Un aspecto importante de mencionar es que en el laboratorio se puede reproducir el ciclo vital del parásito bajo ciertas condiciones. Por ejemplo, la forma proliferativa epimastigote se puede mantener indefinidamente en medios de cultivo líquido. Asimismo, las formas tripomastigota metacíclicas se pueden obtener por diferenciación espontánea de los cultivos de epimastigotes envejecidos ó diferenciación inducida mediante medios mínimos (Contreras y col., 1985). Por otro lado, formas equivalentes a los amastigotes se pueden obtener a partir de cultivos celulares. Sin embargo, no necesariamente estas formas de laboratorio corresponden exactamente a las formas celulares naturales del parásito. Esto es importante tenerlo presente, pues ciertos comportamientos de las formas de laboratorio no necesariamente son extrapolables a lo que sucede en la naturaleza.

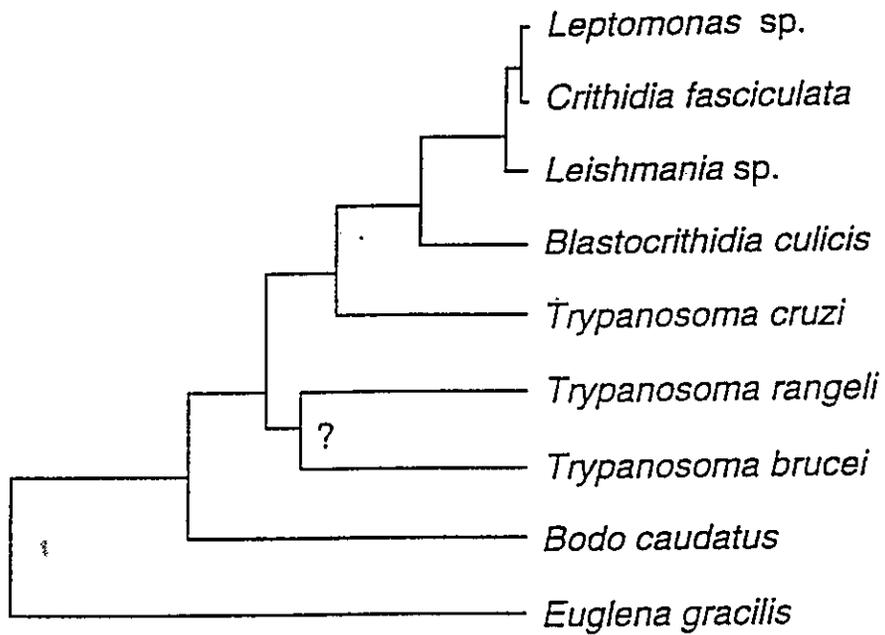


Fig.1. Dendrograma que muestra las probables relaciones filogenéticas entre especies que componen la clase Kinetoplastae (Henriksson, J., 1995).

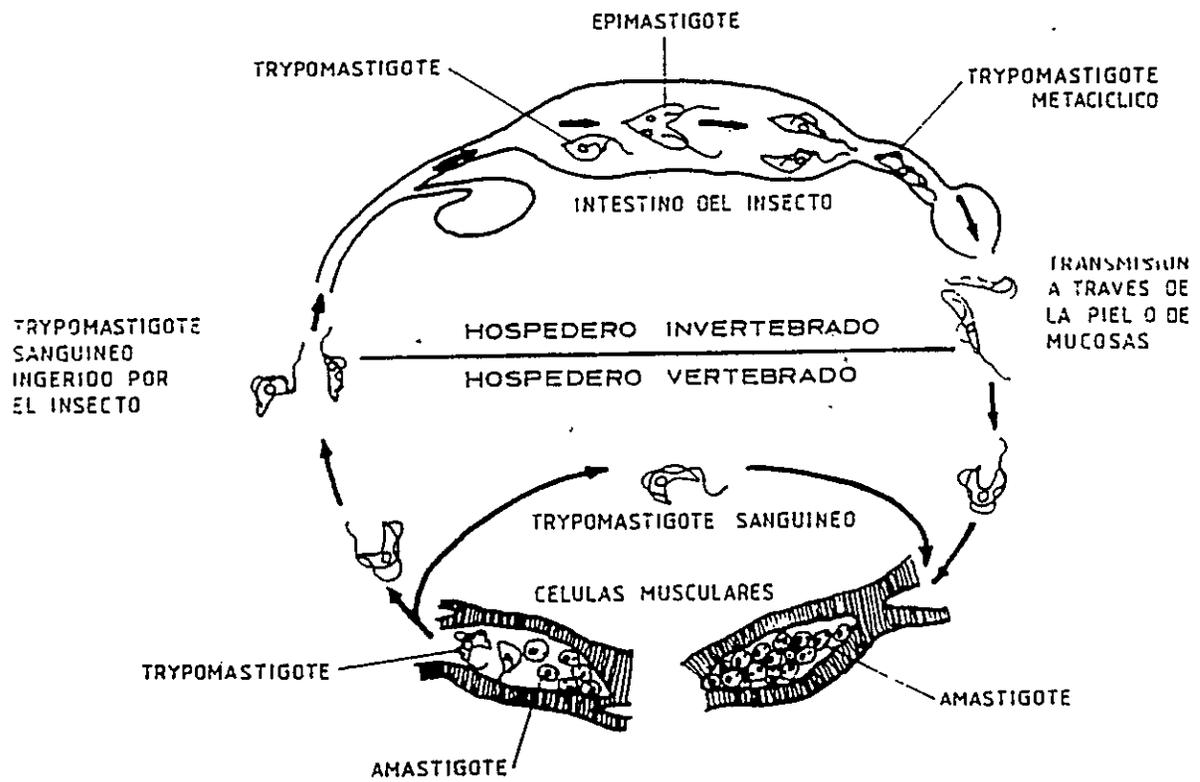


Fig.2. Esquema del ciclo vital del parásito causante de la enfermedad de Chagas, *Trypanosoma cruzi*.

1.3.- Enfermedad de Chagas

De acuerdo a estudios de la Organización Mundial de la Salud (OMS), 16-18 millones de personas están infectadas con el parásito y habrían 90 millones en riesgo de contraer la enfermedad de Chagas (Schofield, 1994). Esta enfermedad provoca enormes daños en la salud humana en una gran parte del continente americano .

En la enfermedad de Chagas se pueden distinguir dos fases: una fase aguda caracterizada por elevadas parasitemias y una fase crónica que se desarrolla durante los años posteriores a la infección con el parásito. Durante la fase aguda, si el paciente no es tratado a tiempo puede llegar hasta la muerte, en cambio si se trata oportunamente, la parasitemia puede ceder totalmente lograndose la curación de la enfermedad. Sin embargo, en muchos casos la fase aguda sigue un curso inaparente sin signos evidentes (Brener, 1984).

En la etapa crónica, un importante porcentaje de las personas infectadas por este parásito sufren daños cardiacos progresivos, los cuales los incapacita para realizar una vida normal. En otros casos la enfermedad se manifiesta con afecciones a distintos niveles del aparato digestivo, siendo las más características el megacolon y el megaesófago (Apt y Reyes, 1986). También en algunos casos se han reportado afecciones a otro tipo de órganos como el cerebro (Solari y col., 1993). Un aspecto relevante de destacar, es que en nuestro país la fase aguda no se manifiesta con signos clínicos aparentes, por lo que es difícil detectar pacientes recientemente infectados (Apt y Reyes, 1986). De acuerdo a algunos autores es muy probable que estas diferencias observadas en las manifestaciones clínicas de la

enfermedad de Chagas reflejen los distintos grados de virulencia que tendrían los parásitos presentes en distintas regiones de latinoamérica (Tibayrenc y Ayala, 1988).

Actualmente, pese a que existen fármacos que en la etapa aguda pueden eliminar los parásitos circulantes, y por lo tanto impedir el desarrollo de la fase crónica de la enfermedad de Chagas, estos fármacos muchas veces provocan importantes efectos colaterales en los pacientes tratados. Además se ha informado en la literatura que existen cepas de *T.cruzi* resistentes a la acción de las drogas actualmente utilizadas (Filardi y Brener, 1987). Por otro lado, ya que en la mayoría de los casos la infección con el parásito no es detectada en sus inicios, la infección avanza inadvertidamente hacia la fase crónica de la enfermedad. Por todas las razones anteriormente expuestas, actualmente no se cuenta con fármacos eficaces para el tratamiento de la fase crónica de la enfermedad (Brener, 1984). Entre las estrategias más promisorias para combatir la enfermedad de Chagas, se encuentra la búsqueda de nuevos agentes quimioterapéuticos (Fairlamb, 1990). Un posible blanco quimioterapéutico importante de investigar en estos parásitos son las DNA polimerasas. Esto se basa en que las DNA polimerasas son enzimas esenciales en la biosíntesis del DNA, en todos los organismos estudiados hasta la época, y que de acuerdo a las particularidades biológicas del parásito *T.cruzi* podría existir la posibilidad que DNA polimerasas de dicho parásito fueran distintas a las de su hospedero vertebrado.

2.- DNA polimerasas

Las DNA polimerasas son las enzimas que catalizan la síntesis de

DNA en base a la secuencia especificada por una hebra preexistente de ácido nucleico denominada matriz, molde ó templado. De acuerdo con esta definición, serán DNA polimerasas aquellas enzimas que sintetizan DNA utilizando como templado tanto DNA como RNA. De esta forma podríamos distinguir dos grupos de DNA polimerasas: DNA polimerasas dependientes de DNA, y DNA polimerasas dependientes de RNA. Entre las primeras estarán todas las DNA polimerasas eucarióticas que discutiremos en esta tesis y entre las segundas están todas las DNA polimerasas virales denominadas transcriptasas reversas, siendo una de las más importantes la codificada por el virus del SIDA, HIV (TR-HIV). A pesar de esta clasificación en base a la dependencia de la matriz, es importante tener presente que ésta no es rígida, pues en condiciones "in vitro" existen DNA polimerasas-dependientes de DNA que pueden utilizar RNA como templado, como es el caso de la DNA polimerasa I de *Escherichia coli* (Joyce y Steitz, 1994), algunas DNA polimerasas de mamíferos como la tipo γ (Burgers, 1989) ó la tipo β (Fry, 1983). Asimismo transcriptasas reversas como la del virus HIV, pueden utilizar alternativamente RNA ó DNA como matriz (Joyce y Steitz, 1994). En esta tesis a las DNA polimerasas-dependientes de DNA las llamaremos simplemente DNA polimerasas.

La reacción química catalizada por todo tipo de DNA polimerasas consiste en la polimerización de DNA utilizando como sustratos desoxiribonucleósidos 5'-trifosfatos y un extremo 3'-OH libre de una cadena preexistente complementaria a la matriz la cual se denomina partidor. La incorporación del desoxiribonucleótido ocurre por un

ataque nucleofílico del oxígeno del grupo 3'-OH al fosfato unido al carbono 5' de la desoxiribosa del nucleótido (Kornberg y Baker, 1991). De esta manera el nuevo desoxiribonucleótido quedará unido al extremo 3' del partidor a través de un enlace fosfodiéster, formado por el fosfato α 5' de dicho nucleótido y el oxígeno 3' de la desoxiribosa del partidor. Así el crecimiento ó elongación del partidor, realizada por la síntesis de DNA llevado a cabo por todas las DNA polimerasas será siempre en el sentido 5'→3'.

En base a lo expuesto anteriormente queda claro que el concepto de matriz y partidor involucra procesos totalmente diferentes. Es así como dependiendo de las distintas matrices y partidores, no sólo se pueden distinguir distintas clases de DNA polimerasas, sino que no cualquier matriz ó partidor será sustrato de las DNA polimerasas. En este sentido podríamos distinguir las siguientes posibilidades: a) DNA doble hebra ó duplex (dhDNA), b) DNA mono hebra, simple hebra ó monocatenario (shDNA), c) DNA doble hebra con muescas ("nicked DNA"), d) DNA doble hebra con segmentos mono hebra ("Gapped DNA"), y e) polinucleótido-oligonucleótido (poli(N)-oligo(N)). Los dos primeros no serán sustrato para las DNA polimerasas, pues no reúnen las condiciones de un extremo 3'OH libre y una matriz complementaria. Los tres siguientes son sustratos de DNA polimerasas y se pueden obtener tanto desde DNA naturales como por síntesis química ó enzimática. Es necesario indicar que tanto el DNA con muescas como aquel con segmentos mono hebra serán llamados DNA "activado".

Es importante señalar que generalmente las DNA polimerasas poseen otras actividades enzimáticas asociadas, ya sea contenidas en

una misma cadena polipeptídica ó en otras subunidades que forman parte de un complejo multiproteico. Como ejemplo de la primera alternativa está el caso clásico de la DNA polimerasa I de *E. coli*, la cual en una misma cadena polipeptídica contiene tres actividades enzimáticas distintas, la mencionada actividad DNA polimerásica y dos actividades exonucleolíticas antagónicas (actividades que degradan DNA a partir de sus extremos, ya sea 3' ó 5'). Sin embargo, estudios más profundos de esta enzima han demostrado fehacientemente que cada una de estas actividades es llevada a cabo por distintos dominios de la cadena polipeptídica (Kornberg y Baker, 1992). Tanto es así que una de sus actividades, correspondiente a la 5'→3' exonucleásica, puede ser separada del resto de la enzima mediante proteólisis controlada sin afectar casi en absoluto a las otras dos actividades enzimáticas. A este segmento se le denomina fragmento Klenow (Klenow y Henningsen, 1970). Esto es muy importante, pues ratifica el hecho fundamental de que la actividad DNA polimerásica no es la reacción inversa de la actividad exonucleolítica. De hecho, múltiples estudios han demostrado claramente, no sólo que ambos tipos de actividades son excluyentes, sino que tanto la base molecular como la base genética de estas actividades enzimáticas son distintas (Burgers, 1989; Wang, 1991 Kornberg y Baker, 1992).

Otra actividad asociada a algunas clases de DNA polimerasas es la denominada actividad DNA primasa (Conaway y Lehman, 1982). Esta actividad posee la capacidad de sintetizar "de novo" el partidor que servirá de sustrato a todas las DNA polimerasas. Esta enzima sólo requiere la presencia de una matriz para sintetizar el partidor

correspondiente. En el caso de un tipo de DNA polimerasas animales denominadas tipo α , la actividad DNA primasa asociada está contenida en subunidades que forman la enzima nativa (Wang, 1991; Kornberg y Baker, 1992).

Dentro de las propiedades bioquímicas más importantes que poseen las DNA polimerasas se encuentran la procesividad y la fidelidad. La procesividad se refiere a la capacidad de elongar partidores en un sólo evento de unión de la enzima a la matriz, sin necesidad de que la enzima se suelte en cada incorporación de un nuevo desoxiribonucleótido. El proceso antagónico se denomina distributividad, en el que la enzima debe soltarse y volver a unirse a la matriz después de la incorporación de cada desoxiribonucleótido.

Fidelidad se refiere al proceso mediante el cual la adición de cada nuevo nucleótido al partidore está estrictamente regida por su complementariedad de base con la matriz.

Las DNA polimerasas participan en dos procesos biológicos imprescindibles para la célula llamados replicación y reparación del material genético. Basicamente la replicación consiste en la duplicación de los ácidos nucleicos que constituyen el material genético hereditario de una determinada célula. Este proceso es llevado a cabo por múltiples enzimas entre las cuales generalmente participan más de un tipo de DNA polimerasas las que realizan distintas tareas en el proceso de replicación (Kornberg y Baker, 1992). Una de las características generales de la replicación de los genomas bacterianos y eucarióticos es la diferencia que existe en la síntesis de la hebra $5' \rightarrow 3'$ y la hebra complementaria $3' \rightarrow 5'$. Así las

hebra 5'→3' se sintetiza continuamente sin interrupciones, en cambio la otra hebra, cada ciertos trechos requiere la presencia de partidores de RNA. La hebra sintetizada continuamente se llama hebra líder, en cambio la que se sintetiza discontinuamente se llama hebra retardada. Es así como en uno de los sistemas replicativos más estudiados, el cual corresponde a la replicación del DNA cromosomal de *E.coli*, la DNA polimerasa replicadora (DNA pol III) lleva a cabo tanto la síntesis de la hebra líder como la hebra retardada correspondiente al DNA doble hebra que está siendo duplicado (Kornberg y Baker, 1992). En cambio, la DNA polimerasa I actuaría rellenando los segmentos monohebra dejados por la remoción de los partidores utilizados en la síntesis de la hebra retardada. Una situación análoga ocurriría con el papel que llevarían a cabo las DNA polimerasas eucarióticas en la replicación del genoma nuclear (Wang, 1991; Bambara y Jessee, 1991). Es decir, que las distintas tareas que implica tal proceso serían realizadas por distintos tipos de DNA polimerasas. En este sentido se ha postulado, a diferencia de lo que se ha observado en *E.coli*, que el "complejo replicador" que llevaría a cabo la síntesis tanto de la hebra retardada como de la hebra líder estaría constituido por dos DNA polimerasas diferentes, las cuales corresponderían a las DNA polimerasas α y δ , respectivamente (So y Downey, 1988; Tsurimoto y col., 1990; Wang, 1991; Bambara y Jessee, 1991). Es posible que una tercera DNA polimerasa, denominada ϵ , también participe en la replicación del genoma (Bambara y Jessee, 1991).

En los últimos años ha quedado claro que el fenómeno biológico

llamado "reparación del material genético" es un proceso muy complejo que involucra distintos tipos de mecanismos y, consecuentemente, a distintas entidades genéticas y moleculares (Culotta y Koshland, 1994; Sancar, 1994; Hoeijmakers y Bootsma, 1994). Básicamente se entiende por reparación del material genético, corregir todo tipo de alteración que implique cambios en la secuencia nucleotídica original del material genético de una célula. Estas alteraciones llamadas mutaciones, pueden ocurrir por errores durante procesos fisiológicos como la duplicación y recombinación del DNA, ó por efecto de diversas causas exógenas provocadas por agentes químicos y físicos. Dependiendo del tipo de lesión que se provoca al DNA, actúan distintos sistemas reparadores (Culotta y Koshland, 1994; Sancar, 1994; Hoeijmakers y Bootsma, 1994; Hanawalt, 1994; Modrich, 1994). De acuerdo a algunos autores, es posible que en determinados sistemas reparadores que implican síntesis de DNA, algunos tipos de DNA polimerasas tendrían un papel importante (Sancar, 1994; Fornace y col., 1989; Singhal y Wilson, 1993). Es así como se ha postulado que en *E. coli* la DNA polimerasa reparadora sería la tipo II (Kornberg y Baker, 1991). Sin embargo también las DNA polimerasas I y III, en determinadas circunstancias, actuarían en procesos de reparación (Kornberg y Baker, 1992).

En eucariotes no está cual sería el verdadero papel que jugarían las DNA polimerasas en el proceso reparador. Empero, existen fuertes evidencias indirectas que vinculan a la DNA polimerasa tipo β (Sancar, 1994) y a la DNA polimerasa tipo ϵ en algún sistema reparativo (Fornace y col., 1989; Singhal y Wilson, 1993).

3.- Características generales de las DNA polimerasas de vertebrados.

En vertebrados se han descrito cinco tipos de DNA polimerasas las cuales se han denominado, de acuerdo al orden histórico en que fueron aisladas, DNA polimerasas α , β , γ , δ y ϵ (Fry, 1983; Hubscher, 1984; Burgers, 1989; Wang, 1991; Kornberg y Baker, 1992). Estas enzimas se diferencian claramente en base a sus propiedades bioquímicas, funcionales y genéticas.

Entre las propiedades bioquímicas más importantes están la sensibilidad a inhibidores, la utilización de matrices, actividades enzimáticas asociadas, la procesividad, la fidelidad, sus masas moleculares y el tamaño de los polipéptidos catalíticos (Tabla I).

3.1 - DNA polimerasa α

La DNA polimerasa α fue la primera en ser descrita en organismos vertebrados y en ser implicada en la replicación del genoma nuclear (Fry, 1983; Burgers, 1989). Esta enzima está compuesta de varias subunidades entre las cuales se cuenta la subunidad catalítica de 165-180 kDa y un par de subunidades de 48 y 50 kDa responsables de la actividad DNA primasa (Wang, 1991). Esta enzima pertenece al grupo de las tres DNA polimerasas sensibles al diterpeno tetracíclico derivado de hongos llamado afidicolina (Spadari y col., 1982). Sin embargo se puede diferenciar fácilmente de las DNA polimerasas δ y ϵ en base a su fuerte sensibilidad al inhibidor BuPdGTP y la ausencia de actividad exonucleolítica 3'→5' asociada (Wang, 1991; Kornberg y Baker, 1992).

Otras características bioquímicas importantes de las DNA polimerasas α son su fuerte sensibilidad al agente modificador de

Tabla I

DNA polimerasas eucarióticas

	α	δ	ϵ	β	γ
Designación en levadura	Pol I	Pol III	Pol II		Mitocondria
Genes de levadura	Pol I (CDC17)	Pol 3 (CDC2)	Pol 2		Mip I
Masa (kDa)					
Nativo	> 250	170	256	36-38	160-300
Polipéptido catalítico	165-180	125	215	36-38	125
Otras subunidades	70,60,60	48	55	No tiene	35 y 47
Localización	Núcleo	Núcleo	Núcleo	Núcleo	Mitocondria
Funciones asociadas					
Actividad exonucleásica 3'→5'	No	Si	Si	No	Si
Primasa	Si	No	No	No	No
Propiedades					
Respuestas a factores auxiliares	Si	No	No	No	No
Respuestas a PCNA	No	Si	No	No	No
Matriz preferida	DNA activado	Poli dA-oligo dT	Poli dA-oligo dT	DNA activado	Poli rA-oligo dT
Cationes divalentes	Mg	Mg	Mg	Mg / Mn	Mn / Mg
Procesividad	Baja	Alta	Alta	Baja	Alta
Fidelidad	Alta	Alta	Alta	Baja	Alta
Inhibidores					
NaCl (0.15 M)	Fuerte	Fuerte	Fuerte	Insensible	Insensible
Afidicolina	Fuerte	Fuerte	Fuerte	Insensible	Insensible
N-etilmaleimida	Fuerte	Fuerte	Fuerte	Insensible	Fuerte
Butilfenil dGTP (I ₅₀)	1 μ M	100 μ M	100 μ M	100 μ M	Insensible
Didesoxi- NTPs	Insensible	Débil	Débil	Fuerte	Fuerte
Replicación	Si	Si	Si	No	Si
Reparación	No	No	No	Si	No

Tabla traducida de Kornberg y Baker (1992).

^a Actualmente el clonamiento de genes de DNA polimerasas β , se restringe a sólo tres especies de mamíferos (Sengupta y col., 1986; Matsukage y col., 1987; Widen y col., 1988).

grupos sulfidrilos N-etilmaleimida (NEM), la resistencia al análogo de desoxiribonucleótido ddTTP, la preferencia por DNA activado, su capacidad de elongar partidores de RNA, su baja procesividad y alta fidelidad (Fry, 1983; Hubscher, 1984; Burgers, 1989; Wang, 1991).

Estudios de homología de secuencias han demostrado que las DNA polimerasas α estarían distribuidas en un amplio espectro de organismos, abarcando desde el hombre hasta diversos virus animales (Wang y col., 1989; Wang, 1991).

3.2 DNA polimerasas δ y ϵ

Mediante diversos estudios se ha planteado que las DNA polimerasas δ y ϵ , al igual que la DNA polimerasa α estarían implicadas en la replicación del genoma nuclear (Bambara y Jessee, 1991). A su vez existen evidencias indirectas que sugieren que tanto la DNA polimerasa ϵ como la δ tendrían un papel importante en algún proceso de reparación del DNA (Nishida y col., 1988; Bambara y Jessee, 1991; Sancar, 1994). Estas enzimas se diferencian claramente de las otras enzimas de vertebrados por poseer actividad exonucleolítica 3'→5' asociada. Sin embargo en un principio no estaba claro si estas dos enzimas realmente correspondían a dos entidades moleculares distintas ó eran simplemente productos proteolíticos unos de otros. Más tarde quedó claramente demostrado que no sólo poseían distintas propiedades bioquímicas sino que incluso se aislaron sus respectivos genes, tanto de células de mamíferos como sus homólogos presentes en levadura (Boulet y col., 1989; Sitney y col., 1989; Bambara y Jesse, 1991; Wang, 1991; Kornberg y Baker, 1992). Una

cualidad bioquímica que permite diferenciar entre sí a estas enzimas, es el requerimiento por un factor auxiliar conocido como PCNA. Así, sólo una de ellas, la DNA polimerasa δ requiere para su actividad la presencia de dicho factor (Bambara y Jesse, 1991; Wang, 1991). Posteriormente se demostró que dicho factor actuaba como subunidad en el complejo replicativo formado por la DNA polimerasa δ (Kornberg y Baker, 1992). Otra diferencia entre estas enzimas es su masa molecular nativa y la de su subunidad catalítica. Así la tipo δ tendría una masa molecular nativa de 170 kDa con una subunidad catalítica de 125 kDa, en cambio la tipo ϵ tendría una masa molecular nativa de aproximadamente 256 kDa y una subunidad catalítica de 215 kDa (Bambara y Jesse, 1991; Kornberg y Baker, 1991).

3.3. DNA polimerasa γ

La DNA polimerasa γ ha sido asociada a la síntesis del DNA mitocondrial aunque su gen se encuentra codificado en el genoma nuclear (Wang, 1991). La enzima nativa posee una masa molecular de aproximadamente 160-300 kDa y un polipéptido catalítico de 125-140 kDa (Insdorf y Bogenhagen, 1989; Kornberg y Baker, 1992). Sin embargo, se han informado en la literatura casos de DNA polimerasa γ de masa molecular de alrededor 47 kDa (Yamaguchi y col., 1980). En algunos trabajos se demostró claramente que dichas enzimas de baja masa molecular correspondían a productos proteolíticos generados a partir de cadenas polipeptídicas intactas de 125-140 kDa (Wernette y Kaguni, 1986; Indorf y Bogenhagen, 1989). Estos resultados sugieren que en otros casos donde se han informado DNA polimerasas γ de baja masa molecular también podrían corresponder a productos de

degradación. De todas maneras estos estudios no descartan la posibilidad que en algunas especies realmente existan DNA polimerasas y de baja masa molecular.

Bioquímicamente las DNA polimerasas y se caracterizan por: su marcada preferencia por la matriz sintética conocida como poli(A), ser muy sensible al inhibidor N-etilmaleimida (NEM), ser insensibles a afidicolina y BuPdGTP, ser altamente procesiva y carecer de otras actividades enzimáticas asociadas (Wernette y Kaguni, 1986, Burgers, 1989; Kornberg y Baker, 1992).

3.4. DNA polimerasa β

Está enzima ha sido vinculada a alguno de los procesos reparativos del material genético (Wilson y col., 1988; Wang, 1991; Kornberg y Baker, 1992) y es la DNA polimerasa más simple y pequeña de todas las aisladas en organismos vertebrados. Posee una masa molecular de 39 kDa y se caracteriza por ser la única resistente al inhibidor N-etilmaleimida. Además es fuertemente inhibida por ddTTP y en la mayoría de los casos puede utilizar eficientemente la matriz sintética de RNA poli(A) (Chang, 1974; Stalker y col., 1976; Suzuki y col., 1977; Joenje y Benbow, 1978; Fry, 1983; Hubscher, 1984). Por otro lado, no posee actividades enzimáticas asociadas y es una enzima poco procesiva. A diferencia de otras DNA polimerasas de vertebrados (Burgers, 1989; Wang, 1991), el conocimiento de los genes que codifican para esta enzima ha sido limitado a aquellas secuencias obtenidas del clonamiento de cDNA provenientes de sólo algunas especies de mamíferos (Zmudzka y col., 1986; Matsukage y col., 1987; Abbot y col., 1988; Widen y col., 1988; Wang, 1991). Esto ha impedido

evaluar el grado de conservación evolutiva de esta enzima a lo largo de un gran espectro de organismos. Sin embargo, la cristalización de DNA polimerasas β recombinantes, provenientes de cDNA de rata, ha permitido conocer por primera vez la estructura terciaria de una DNA polimerasa de eucariotes (Davies y col., 1994; Pelletier y col., 1994; Sawaya y col., 1994).

4.- Estructura de las DNA polimerasas

La estructura terciaria de la DNA polimerasa I de *E.coli* fue una de las primeras en conocerse (Kornberg, 1980; Ollis y col., 1985). Los estudios de cristalografía del fragmento Klenow pusieron en evidencia una estructura tridimensional cuya forma se podía analogar, a la de una mano (Joyce y Steitz, 1987). Así se observó que el dominio correspondiente a la DNA polimerasa, se podía subdividir en tres subdominios los que fueron llamados subdominios "dedos", "palma" y "pulgar" (Fig.3, Joyce y Steitz, 1987). Los estudios mostraron que en el dominio palma estaban localizados importantes residuos catalíticos, alguno de los cuales correspondían a ácidos aspárticos (Joyce y Steitz, 1987; Polesky y col., 1992). Los otros subdominios constituían las paredes del subdominio central los cuales en conjunto daban origen a una especie de canal correspondiente al sitio de unión del DNA (Fig. 3).

Basados en estudios de secuencias aminoacídicas de distintos tipos de DNA polimerasas, se llegó a postular la existencia de tres sitios conservados denominados motivos A, B y C (Joyce y Steitz, 1994). Los motivos A y C estarían presentes en todas las categorías de DNA

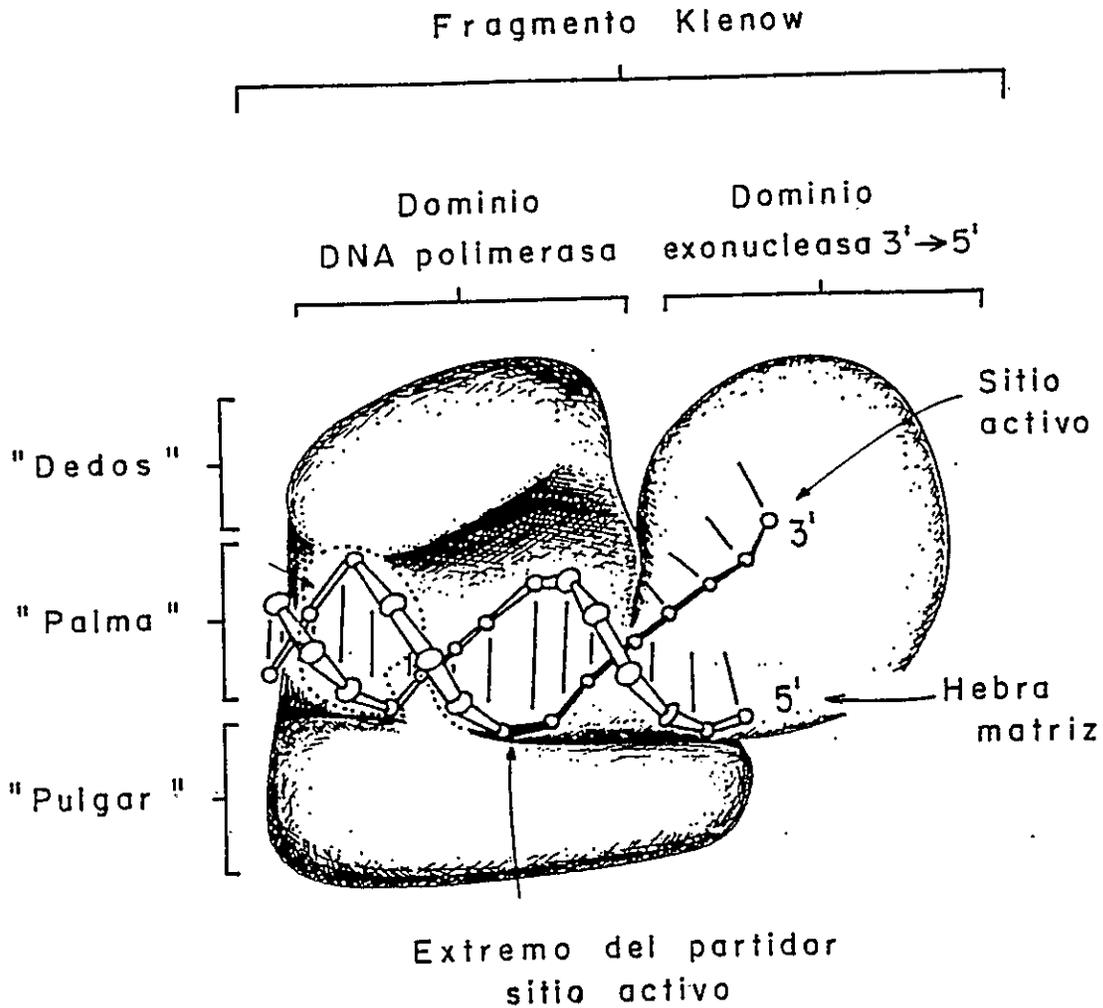


Fig.3. Dibujo esquemático de la estructura terciaria del fragmento Klenow que muestra como se uniría al DNA sustrato (Joyce y Steitz, 1987). En la figura se indican los distintos dominios y la probable localización de los sitios activos de la actividad DNA polimerásica y exonucleásica 3'→5'.

polimerasas, incluyendo enzimas virales RNA-dependientes como la del virus HIV. Estos motivos se caracterizaban por uno ó dos ácidos aspárticos conservados en todas las secuencias de DNA polimerasas analizadas, los que coincidían con estudios previos de mutagénesis dirigida, y análisis de la estructura terciaria de dichas enzimas (Polesky y col., 1992; Joyce y Steitz, 1994).

Estudios mediante proteólisis controlada habían demostrado que la estructura terciaria de las DNA polimerasas β de mamíferos podía dividirse en un dominio N-terminal de 8 kDa, con capacidad de unirse a DNA monohebra, y un dominio C-terminal de 31 kDa responsable de la actividad catalítica (Kumar y col., 1990a; Kumar y col., 1990b). Recientemente se describió la estructura terciaria de la DNA polimerasa β de rata (Davies y col., 1994; Sawaya y col., 1994; Pelletier y col., 1994). Los análisis derivados de la cristalización del dominio C-terminal de 31 kDa, mostraron que este dominio podía subdividirse en tres subdominios. Al compararse con las estructuras terciarias descritas para el fragmento Klenow de la DNA polimerasa I de *E. coli*, la transcriptasa reversa del virus HIV y la RNA polimerasa del virus T7, se observó que todas ellas compartían una estructura básica tridimensional común. Esta estructura básica era la descrita para el Fragmento Klenow, es decir la estructura en forma de mano con sus correspondientes subdominios, "dedos", "palma" y "pulgar". Al compararse con más detalle el dominio central ó palma de estas distintas polimerasas, se observó que el núcleo que daba origen a este subdominio estaba compuesto por una organización muy similar de estructuras secundarias (Sawaya y col., 1994; Davies y col., 1994).

En el caso de la DNA polimerasa β , el núcleo del subdominio central, estaba compuesto por cinco hojas β flanqueadas a cada lado por una α -helice (Fig. 4, Davies y col. 1994). El mismo esquema fue descrito por Sawaya y col. (1994), sin embargo, la numeración adjudicada tanto a las hojas β como a las α -helices fue distinta. De acuerdo a Davies y col., 1994, los residuos catalíticos fundamentales del motivo C, los ácidos aspárticos 190 y 192 (D190 y D192), se localizan cercanos al extremo N-terminal y al principio de la hoja β número 4 (β 4), respectivamente (Fig. 5). En cambio el residuo D256, correspondiente al motivo A, se localiza casi al medio de la hoja β número 7 (β 7). Todos ellos muy cercanos en la estructura tridimensional del subdominio central (Fig.4). Otro residuos con importancia catalítica localizados en el motivo A y motivo C fueron las argininas 254 y 258 (R254 y R258), y la glicina 189 (G189), respectivamente. Sin embargo es importante destacar, que no todos los residuos catalíticamente importantes se localizan en los motivos A ó C. De acuerdo a estudios mediante nucleótidos marcados (Basu y col., 1989), mutagénesis dirigida (Date y col., 1990) ó estudios de la estructura terciaria de la enzima con sus sustratos (Davies y col., 1994; Pelletier y col., 1994), mostraron que otros residuos importantes no necesariamente estarían localizados dentro de dichos motivos. Tal es el caso de las argininas 182 y 183 (R182 y R183) probablemente implicadas en la unión del fosfato β del desoxiribonucleósido 5'-trifosfato unido a la DNA polimerasa, las cuales estan localizados en la pequeña α -helice G del subdominio central (Fig.5, Davies y col., 1994). Entre los residuos R182 y R183 estaría la serina 180 (S180) cuya

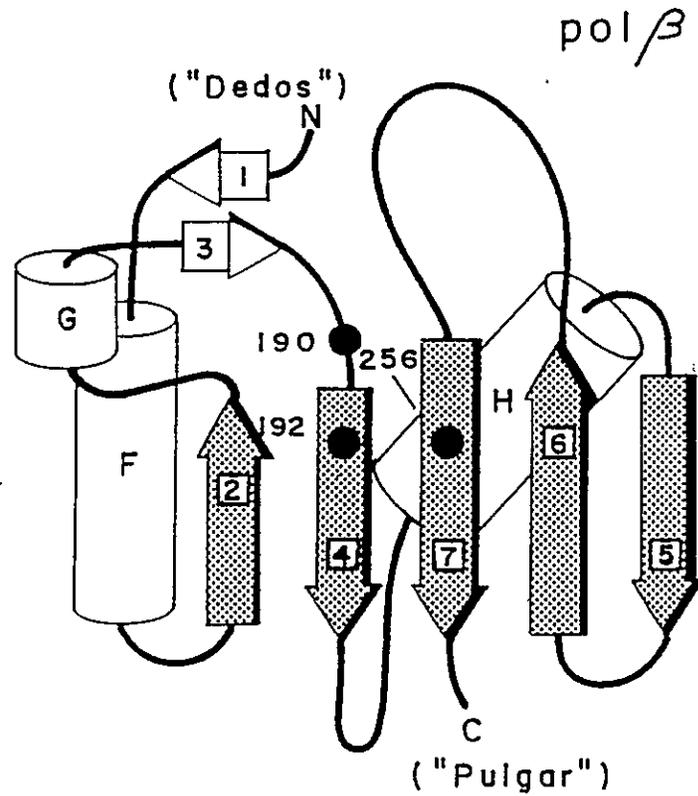


Fig.4. Representación esquemática del subdominio "palma" de la DNA polimerasa β de rata (Davies y col., 1994). En la figura las hojas betas se representan como flechas rectangulares numeradas del 1 al 7, respecto a su posición del extremo N-terminal. Las α -hélices, se representan como cilindros identificados por letras mayúsculas. La posición de los residuos catalíticos Asp 190, 192 (motivo C) y 256 (motivo A), se indican con un círculo lleno.

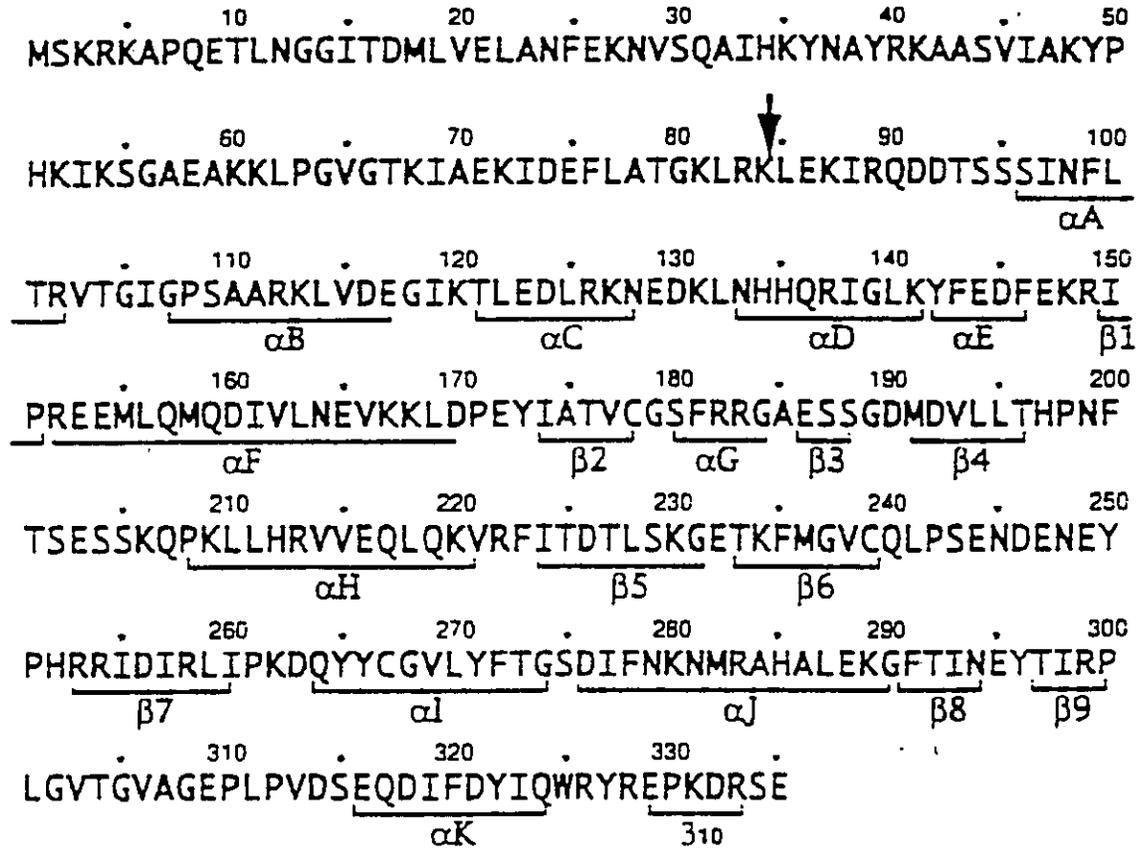


Fig.5. Estructura primaria de la DNA polimerasa β de rata indicando la posición de las estructuras secundarias de acuerdo a Davies y col. (1994). En la figura la ubicación de hojas β y α -hélice se simbolizan con las letras griegas alfa y beta, debajo del subrayado que indica la posición inicial y final de cada estructura. La flecha indica el sitio sensible a proteólisis que separa el dominio N-terminal de 8 kDa del dominio C-terminal de 31 kDa.

función sería similar a la descrita para los dos residuos anteriores (Davies y col., 1994). Más alejado de todos estos residuos estaría la arginina 149 (R149) localizada en el límite entre el subdominio N-terminal y el subdominio central, la cual también estaría implicada en la unión del desoxiribonucleótido (Fig.5). Es importante señalar que de acuerdo a Pelletier y col. (1994), el dominio N-terminal correspondería a los dedos y el C-terminal al pulgar de esta hipotética "mano molecular". Sin embargo, existe controversia que esto efectivamente sea así, pues tal designación dependería de la correcta orientación que asumiría la enzima durante la realización de su actividad catalítica (Steitz y col., 1994).

Finalmente es interesante destacar que en el caso de la DNA polimerasa β , las hojas β_4 y β_7 que contienen los residuos catalíticos fundamentales de los motivos C y A, son paralelas, en cambio en todas las otras DNA polimerasas analizadas las correspondientes hojas β son antiparalelas (Sawaya y col., 1994). Otra diferencia importante es que en la DNA polimerasa β , los tres subdominios que forman el dominio catalítico están ordenados consecutivamente, sin la existencia de segmentos intercalados. En cambio en las otras tres enzimas analizadas, los segmentos de la estructura primaria que forman el subdominio central están separados por segmentos que forman el subdominio "dedos" (Sawaya y col., 1994). Estas evidencias sugieren fuertemente que la DNA polimerasa β podría corresponder a un ejemplo de evolución convergente, pues la organización de los segmentos aminoacídicos que originan las estructuras terciarias son distintos a la de las otras enzimas, lo

cual implica que la organización de los genes que codifican dichas estructuras primarias son distintos y por ende es muy improbable que hayan tenido un ancestro genético común (Sawaya y col., 1994). Es decir, la DNA polimerasa β podría haber llegado por convergencia a la misma estructura básica común en forma de mano, a partir de la evolución de un gen independiente y distinto al de las otras polimerasas analizadas.

5.- DNA polimerasas de eucariotes inferiores

Las DNA polimerasas de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* han sido ampliamente estudiadas (Burgers, 1989; Wang, 1991; Kornberg y Baker, 1992). Se han purificado a homogeneidad cada una de ellas, se han aislado sus respectivos genes (Johnson y col., 1985; Sitney y col., 1989; Foury, 1989; Boulet y col., 1989; Morrison y col., 1990) y estudiado profundamente, mediante mutantes condicionales, el papel fisiológico que cada una de estas enzimas llevaría a cabo en dicha célula (Budd y col., 1989; Wang, 1991; Burgers, 1989). Debido al gran conocimiento de estas enzimas y al hecho que sus propiedades bioquímicas y genéticas son muy similares a las de sus congeneres descritas en vertebrados, las DNA polimerasas de *S.cerevisiae* han servido de modelo de las clásicas DNA polimerasas α , δ , ϵ y γ descritas en eucariotes superiores. La única excepción en este cuadro, lo había constituido la DNA polimerasa tipo β , la cual hasta hace muy poco tiempo no había sido purificada de estos organismos unicelulares (Shimizu y col., 1993). Sin embargo, en un grupo importante de eucariotes inferiores constituido por algas, protozoos

y algunos hongos el conocimiento de sus DNA polimerasas ha sido controvertido y muy limitado. Un factor importante en esta situación ha sido la gran dificultad que ha existido para purificar a homogeneidad dichas enzimas, debido a factores de diversa índole, tales como dificultad para obtener grandes cantidades de material biológico, problemas para controlar la acción proteolítica y probablemente factores intrínsecos derivados de las mismas DNA polimerasas.

5.1. DNA polimerasas tipo α y tipo δ de eucariotes inferiores

DNA polimerasas sensibles a afidicolina han sido aisladas de *Tetrahymena pyriformis* (Sakai y Watanabe, 1982), *Plasmodium falciparum* (Abu-Elheiga y col., 1990; Chavalitsheewinkoon y col., 1993) *Plasmodium berghei* (De Vries y col., 1991) y *Physarum polycephalum* (Weber y col., 1988). Asimismo, estudios mediante inmunoprecipitación con anticuerpos monoclonales contra la DNA polimerasa α de humanos, mostraron que la constitución molecular de la DNA polimerasa α de *P.falciparum* era muy similar a las de sus homólogas de mamíferos (Choi y Mikkelsen, 1991). Recientemente tanto los genes que codifican para la DNA polimerasa α de *Trypanosoma brucei* (Leegwater y col., 1991) como los genes de las DNA polimerasas α y δ de *P.falciparum* fueron clonados (White y col., 1993; Ridley y col., 1991). Todos estos antecedentes muestran claramente que las DNA polimerasas α y δ están presentes en eucariotes inferiores y que sus propiedades bioquímicas serían similares a las de sus congéneres descritas en vertebrados.

5.2. Probables DNA polimerasas tipo β de eucariotes inferiores

DNA polimerasas tipo β aisladas de un amplio intervalo de eucariotes inferiores han sido informada en la literatura (Holmes y col., 1984; Stauder y col., 1983; Nolan y Rivera, 1991; Torri y Englund, 1992; Furukawa y col., 1979; Schiebel y Raffael, 1980; Baril y col., 1980; Shimizu y col., 1993; Ganz y Pearlman, 1980; Sakai y Watanabe, 1982a; Sakai y watanabe, 1982b; Holler y col., 1987). No solamente varias de estas enzimas poseen masas moleculares muy superiores a las descritas en vertebrados (Tabla 2), sino que incluso, varias de ellas no son resistentes a N-etilmaleimida (Shimizu y col., 1993; Ganz y Pearlman, 1980; Sakai y Watanabe, 1982a), en contraposición con las características clásicas descritas para las DNA polimerasas β de vertebrados (Tabla I). Es probable que alguno de estos casos puedan ser explicados por el bajo grado de purificación de dichas enzimas. Sin embargo, existen dos casos en los cuales , enzimas purificadas a homogeneidad fueron también sensibles a ese inhibidor, tal es el caso de una enzima purificada de *Tetrahymena thermophila* (Ganz y Pearlman, 1980) y la de *Saccharomices cerevisiae* (Shimizu y col., 1993). Estos antecedentes sugieren fuertemente la posibilidad que efectivamente existan DNA polimerasas tipo β parcialmente sensibles a NEM, como es el caso de una enzima purificada del tripanosomatideo *Crithidia fasciculata* (Torri y Englund ,1992), ó totalmente sensibles a dicho inhibidor, como correspondería a las enzimas purificadas de levadura (Shimizu y col., 1993) y a la enzima de *T.thermophila* (Ganz y Pearlman, 1980). En este aspecto es pertinente señalar la controversia existente con

Tabla II

Posibles DNA polimerasas tipo β de eucariotes inferiores

Especie	Masa molecular		NEM	ddTTP	Afidicolina	BuPdGTP	PolI(A)-oligo(dT)	Bromuro de etidio	Referencia
	nativa (kDa)	Polipeptido catalítico (kDa)							
<i>Crithidia fasciculata</i>	45	ND ^a	R ^b	S ^c	R	ND	f -	ND	Holmes y col., 1984
<i>Neurospora crassa</i>	40	ND	R	S	R	ND	+++ ^e	ND	Stauder y col., 1983
<i>Leishmania mexicana</i>	45	ND	R	S	R	S	-	S	Nolan y Rivera, 1991
<i>Crithidia fasciculata</i>	38	43	P ^d	ND	ND	ND	-	ND	Torri y Englund, 1992
<i>Tetrahymena pyriformis</i>	70	ND	R	ND	R	ND	+	ND	Furukawa y col., 1979
<i>Physarum polycephalum</i>	81	ND	R	ND	R	ND	ND	S	Schlebel y Raffael, 1980
<i>Dictyostellium discoideum</i>	70	ND	R	S	R	R	+	ND	Barll y col., 1980
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	ND	68	S	S	R	R	-	ND	Shimizu y col., 1993
<i>Tetrahymena thermophila</i>	90	45	S	ND	ND	ND	-	S	Ganz y Peariman, 1980
<i>Tetrahymena pyriformis</i>	70	70	S	S	R	ND	ND	S	Sakai y Watanabe, 1982 a
<i>Physarum polycephalum</i>	200(H51)	135	R	R	R	R	+++	S	idem, 1982 b
	170(H52)	100	R	R	R	R	+++	S	Holler y col., 1987

^aND, no determinado^bR, resistente de acuerdo a los criterios establecidos para DNA polimerasas de eucariotes superiores (Kornberg y Baker, 1992).^cS, sensible^dP, parcialmente sensible ($I_{50} = 2$ mM NEM)^e+++ , prefiere poli(A)-oligo(dT); +, lo utiliza como sustrato.^f- no utiliza como sustrato poli(A)-oligo(dT).

respecto a dos DNA polimerasas de *Tetrahymena pyriformis*. Como se observa en la Tabla II, existen dos enzimas tipo β con similar masa molecular, una resistente (Furukawa y col., 1979) y otra sensible a NEM (Sakai y Watanabe, 1982a). De acuerdo a estos últimos autores es probable que en *Tetrahymena* no existan DNA polimerasas resistentes a NEM y que los resultados obtenidos por Furukawa y col. (1979), se deban a una interpretación errada de sus datos experimentales (Sakai y Watanabe, 1982b).

Otro ejemplo de contradicciones entre propiedades de DNA polimerasas β de vertebrados y posibles DNA polimerasas tipo β de eucariotes inferiores, es el caso de una enzima aislada de *Leishmania mexicana* (Nolan y Rivera, 1991). Aunque dicha enzima fue resistente a NEM y posee una masa molecular cercana a las descritas en vertebrados (Tabla II), tal enzima fue sensible a BuPdGTP (5,4 μ M de BuPdGTP inhibió en un 50%), el clásico inhibidor de las DNA polimerasas α de mamíferos (Khan y col., 1984; Wang, 1991).

Una idea interesante de estudiar es la posibilidad que efectivamente en eucariotes inferiores existan dos clases de DNA polimerasas tipo β : enzimas de baja masa molecular, como serían las procedentes de *Crithidia fasciculata* (Holmes y col., 1984; Torri y Englund, 1992), *L. mexicana* (Nolan y Rivera, 1991), y enzimas de alta masa molecular tales como las procedentes de *T. pyriformis* (Furukawa y col., 1979), *Physarum polycephalum* (Schiebel y Raffael, 1980; Holler y col., 1987), *Dictyostelium discoideum* (Baril y col., 1980), *Tetrahymena thermophila* (Ganz y Pearlman, 1980) y *Saccharomyces cerevisiae* (Shimizu y col., 1993). En este punto es interesante

señalar que la DNA polimerasa β de *Drosophila melanogaster* es una enzima cuyo polipéptido catalítico es de 110 kDa (Sakaguchi y Boyd, 1985). Por lo tanto no sería extraño que en algunas especies de eucariotes inferiores existieran DNA polimerasas tipo β de alta masa molecular. Coherente con esta idea son los resultados obtenidos del estudio de una probable DNA polimerasa tipo β procedente del hongo *P.polycephalum* (Holler y col., 1987). De este organismo se purificó cercano a homogeneidad una DNA polimerasa de 200 kDa compuesta por una subunidad catalítica de 135 kDa y una subunidad, de función desconocida, de 60 kDa. Estos antecedentes sugieren fuertemente la necesidad de descartar un efecto proteolítico sobre las enzimas estudiadas, pues existe la posibilidad que algunas DNA polimerasas de baja masa molecular descritas en la literatura puedan corresponder a productos proteolíticos de enzimas de mayor tamaño.

Hasta el momento no se ha logrado clonar ningún gen que codifique para alguna DNA polimerasa tipo β de eucariotes inferiores. Información relevante respecto a algunas de las interrogantes anteriores, así como interesante información sobre la evolución de estas enzimas, podrían ser reveladas con el conocimiento de sus genes.

5.3. DNA polimerasas tipo γ y DNA polimerasas mitocondriales de eucariotes inferiores.

Existen antecedentes de DNA polimerasas tipo γ procedentes de algunos protozoos como *T. thermophila* (Ostergaard y col., 1987) y *Plasmodium falciparum* (Chavalitsheewinkoon y col., 1993). Sólo en uno

de estos casos, a partir de preparaciones mitocondriales, se logró purificar cercano a homogeneidad esta enzima y se obtuvieron anticuerpos monoclonales contra ella (Ostergaard y col., 1987). La enzima presentó una masa molecular nativa de 100 kDa compuesta probablemente por dos subunidades de 47 kDa. En base a la localización mitocondrial de esta enzima los autores plantearon que esta enzima sería del tipo γ . Sin embargo, de acuerdo a los estudios recientemente realizados en el protozoo *C. fasciculata*, donde se postula que una DNA polimerasa tipo β de 43-47 kDa tendría un papel importante en el metabolismo del DNA mitocondrial (Torri y Englund, 1992; Torri y col., 1994), es posible que en ciertos eucariotes inferiores no necesariamente una enzima mitocondrial debería corresponder a una DNA polimerasa tipo γ .

5.4 DNA polimerasas de alta masa molecular insensibles a afidicolina.

Un pequeño grupo de enzimas de alta masa molecular e insensibles a afidicolina ha sido descrito en algunos protozoos (Holmes y col., 1984; Makioka y col., 1993; Nolan y col., 1992). Sus masas moleculares nativas oscilan desde 300 kDa, correspondiente al tripanosomatideo *C. fasciculata* (Holmes y col., 1984), hasta 130-150 kDa, correspondiente a los protozoos *Toxoplasma gondii* (Makioka y col., 1993) y el tripanosomatideo *L. mexicana* (Nolan y col., 1992). Las tres enzimas fueron sensibles a NEM y una de ellas utiliza eficientemente el sustrato poli(A)-oligo(dT) (Holmes y col., 1984). Es probable que esta última enzima, purificada de *C. fasciculata*,

pudiera ser una DNA polimerasa tipo γ . Sin embargo se requieren, más antecedentes para probar dicha hipótesis. Por otro lado, de acuerdo a los autores, la enzima de *Leishmania* (Nolan y col., 1992) podría corresponder a una DNA polimerasa tipo α , empero las evidencias aportadas no son concórdantes con dicha clasificación. Similar situación se podría adjudicar a la enzima aislada de *T.gondii* (Makioka, 1993).

5.5. DNA polimerasas de alta masa molecular no clasificables dentro de las categorías descritas para enzimas de vertebrados.

Un grupo importante de DNA polimerasas de alta masa molecular, ha sido aisladas de un amplio espectro de eucariotes inferiores (Mc Lennan y Keir, 1975; Tait y Cummings, 1975; Ross y Harris, 1978; Dube y col., 1979; Furukawa y col., 1979; Marcus y col., 1980; Sakay y Watanabe, 1982; Aoshima y col., 1984). La mayor parte de esta información proviene de estudios antiguos, de enzimas poco purificadas y caracterizadas. Es probable que algunas de ellas puedan corresponder a DNA polimerasas tipo α , δ ó γ . Sin embargo como en estos casos no se estudió el efecto de afidicolina ni BuPdGTP, no se puede saber con certeza a cual de estos tipos de enzimas podrían corresponder.

5.6 DNA polimerasas de *Trypanosoma cruzi*.

En estudios iniciales realizados en nuestro laboratorio en *T.cruzi*, se aisló una única DNA polimerasa de masa molecular nativa aparente de 180 kDa y características complejas que no permitieron

clasificarla entre ninguno de los diferentes tipos de DNA polimerasa descritas en vertebrados (Solari y col., 1983). Posteriormente, se aislaron dos fracciones enzimáticas las cuales fueron denominadas DNA polimerasa fracción I y II (Rojas y col., 1992). Ambas fracciones fueron diferenciadas en base a distintas propiedades bioquímicas, sugiriendo que dichas enzimas correspondían a distintas entidades moleculares. Sin embargo, ninguna de ellas pudo ser asignada a los clásicos tipos α , β , γ , δ y ϵ , descritos en DNA polimerasas de eucariotes superiores.

6. Hipótesis

En eucariotes superiores se han descrito cinco tipos de DNA polimerasas las cuales han sido denominadas, DNA polimerasas α , β , γ , δ y ϵ . El estudio de estas enzimas sugiere fuertemente que estarían presentes en todos los organismos eucarióticos. Por lo tanto, es muy probable que muchas de las DNA polimerasas atípicas ó diferentes aisladas de eucariotes inferiores sean producto de la insuficiente purificación y caracterización de ellas. En consideración de estos antecedentes se plantea la siguiente hipótesis:

En el protozoo parásito *Trypanosoma cruzi* existen DNA polimerasas cuyas propiedades bioquímicas y estructurales son homólogas a las descritas en vertebrados.

7. Objetivos

Objetivo general: Estudiar el grado de similitud bioquímica y estructural existente entre una DNA polimerasa de *T.cruzi* y sus homólogas de vertebrados. Como objetivos específicos se pretende

purificar a homogeneidad una DNA polimerasa de *T.cruzi*, caracterizarla bioquímicamente mediante: la identificación de su subunidad catalítica, el efecto de distintos inhibidores y la utilización de matrices sintéticas. Una vez realizado dichos objetivos se procederá a determinar la estructura primaria mediante la microsecuenciación de péptidos de ésta enzima a fin de obtener información para la síntesis de oligonucleótidos degenerados que permitan el clonamiento del gen de dicha enzima. La secuencia aminoacídica deducida del gen de la DNA polimerasa de *T.cruzi* permitirá determinar el grado de similitud con sus homólogas de vertebrados. Asimismo se estudiará la organización del gen y su expresión en diferentes formas celulares del parásito.

MATERIALES Y METODOS

Reactivos: acrilamida, N,N'-metilenbisacrilamida, TEMED, SDS, fragmento Klenow de la DNA polimerasa I de *Escherichia coli*, 4-vinilpiridina, afidicolina, ddTTP, berenil, DNAsa I, poli(dC), anticuerpo anti-conejo conjugado a fosfatasa alcalina, suspensión 10% de *Staphilococcus aureus*, polietilenglicol (peso molecular 6.000 - 8.000), doble hebra DNA-celulosa, X-gal, IPTG, RNAsa, aceite mineral fueron comprados a Sigma Chemical Co. DEAE-celulosa (DE-52), fosfocelulosa (P11) y filtros GF/A fueron comprados a Whatman. Los homopolímeros sintéticos de DNA y RNA, la DNA polimerasa T7, el dextransulfato fueron obtenidos de Pharmacia. Digoxigenina-11-dUTP, el anticuerpo anti-digoxigenina conjugado a fosfatasa alcalina, DNA ligasa T4 fueron comprados a Boehringer-Mannheim Biochemicals. Los desoxinucleótidos tritiados fueron comprados a New England Nuclear Corp. Los filtros de nitrocelulosa y el sistema de electroforesis en minigeles Mini-Protean II fueron comprados a Bio-Rad Laboratories. El DNA de timo de ternera fue obtenido de Worthington Biochemicals Corp. La tinta china fue obtenida de Pelikan Industries. El reactivo Butilfenil-dGTP fue donado amablemente por G. Wright (Worcester, Massachusetts). Taq DNA polimerasa y termociclador Perkin Elmer. Agarosa fue obtenida de Beckman, Geneline Agarose. Filtros de nylon "Hybond", [α -³²P]dCTP y sistema de marcación radioactiva "Rediprime" fueron de Amersham. DNA polimerasa T7, Sephadex G-50, Dextransulfato de Pharmacia. Sistema de secuenciación automática (ABI). Plásmidos pT7Blue(R), pUC-19 fueron de Novagen. Placas fotográficas Kodak,

XOMAT-S, XOMAT-AR. Las enzimas de restricción provinieron de diversas fuentes (Pharmacia, Novagen, Amersham y New England Biolabs). Partidores biotinilados JS1B y JS2B, ó sin biotinilar, JS1 y JS2 y método de secuenciación automática, desorrollados por Lagerkvist y col., 1994. Plásmido pUC-19 (Yanisch-Perron y col., 1985), partidores universales del fago λ gT11 de 24 nucleótidos, "reverse" y "forward", números 1218 y 1222 fueron de New England BioLabs. Genoteca de DNA genómico de *T. cruzi* (cepa Miranda) construida en λ gT11 donada por R. Marcina (Ibañez y col., 1987).

Ensayo de DNA polimerasa

Se utilizaron los tres ensayos siguientes:

- a) Ensayo con DNA activado. En un volumen final de 50 μ l el ensayo contenía 50 mM Tris-HCl pH 8,0; 10 mM ditiotreitól, 10 mM $\text{Mg}(\text{CH}_3\text{COO})_2$, 100 μ g/ml BSA, 12 μ [3H]TTP (74 cpm/pmol), 530 μ g/ml de DNA activado de timo de ternera, 20 μ M de cada desoxinucleósido 5'-trifosfato dATP, dCTP y dGTP. Después de incubar por 30 min a 37 $^\circ\text{C}$, la reacción se detenía agregando 2 ml de 10% ácido tricloroacético frío, se incubaba durante 20 min a 0-4 $^\circ\text{C}$ y el material radioactivo ácido-insoluble se colectaba sobre filtros de fibra de vidrio GF/A. Luego, los discos eran lavados seis veces con 2 % de ácido tricloroacético, secados y depositados en una solución de líquido de centelleo conteniendo 4 g/l PPO y 100 mg/l POPOP en tolueno. La radioactividad se cuantificó en un contador de centelleo apropiado.
- b) Ensayo con polidesoxinucleótidos sintéticos. En este ensayo el sustrato utilizado fue un templado-partidor compuesto de un

homopolímero de desoxinucleótido (poli(dN)) hibridado con un oligodesoxinucleótido complementario (oligo(dN)). La concentración de este híbrido poli(dN):oligo(dN) fué 0,2:0,08 A_{260} /ml en cada ensayo. Además del respectivo [3 H]dNTP usado a una concentración de 12 μ M (40-60 cpm/pmol). Todos los demás componentes del ensayo fueron idénticos a los descritos en el ensayo anterior.

c) Ensayo con ácido poliriboadenílico, poli(A). En un volumen final de 50 μ l el ensayo contenía 50 mM tris-HCl pH 8,9; 10 mM $MnCl_2$; 0,1 M KCl, 300 μ g/ml BSA, 0,4:0,2 A_{260} poli(A):oligo(dT) $_{12-18}$ 50 μ M [3 H]dTTP (60cpm/pmol). El ensayo se incubaba 1 h a 28 $^{\circ}$ C y se continuaba como fué descrito anteriormente.

Una unidad de actividad DNA polimerásica se definió como la cantidad de enzima que cataliza la incorporación de 1 nmol de los cuatro dNTP en un material ácido-insoluble en 1 h a 37 ó 28 $^{\circ}$ C cuando se utilizaba como sustrato DNA activado ó un homopolímero sintético, respectivamente.

Electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de SDS (SDS-PAGE). La electroforesis se realizó de acuerdo al sistema discontinuo descrito por Laemmli (1970), adaptado para el sistema de minigeles (7x8x0,05 cm) Bio-Rad mini-Protean II. El gel separador contenía 7,5% acrilamida; 0,15% bis-acrilamida; 0,28 M Tris-HCl pH 8,8; 0,075% SDS; 0,3 mg/ml persulfato de amonio y 0,2% (v/v) TEMED. El gel concentrador era de 1 cm de alto y contenía 3% acrilamida; 0,16% bis-acrilamida; 0,125 M Tris-HCl pH 6,8; 0,10% SDS; 0,4 mg/ml persulfato de amonio y 0,25% (v/v) TEMED. Cada muestra (5-10 μ l) se disolvía en un volumen del tampón de muestra el cual contenía 2,9%

SDS; 2,5% 2-mercaptoetanol, 10% (v/v) glicerol y 0,08 mg/ml azul de bromofenol. Posteriormente las muestras se sometían a electroforesis a voltage constante de 100V hasta que el azul de bromofenol alcanzara el limite inferior del gel separador (1-1,5 h).

Detección de actividad DNA polimerásica en geles de poliacrilamida en presencia de SDS. Esta técnica, desarrollada en el curso de esta tesis, está basada en el sistema de "geles de actividad" descrito por Karawya y col. (1983) utilizando desoxinucleótidos no-radioactivos como sustrato marcado (Venegas y Solari, 1994). Cada muestra de DNA polimerasa (5 μ l) se mezclaba con 10-20 μ g de suero fetal de bovino (2 μ l) antes de agregar 5 μ l de tampón de muestra descrito anteriormente. Luego, las muestras eran sometidas a electroforesis en un gel separador de poliacrilamida, descrito anteriormente, el cual contenía 21 μ g/ml de DNA activado. Posteriormente, el gel se lavaba dos veces en 50 ml de 50 mM Tris-HCl pH 7,5; por 15 min a temperatura ambiente y con agitación constante. Luego, cada gel se incubaba por 3 h en 40 ml de solución renaturadora (50 mM Tris-HCl pH 8,0; 10 mM 2-mercaptoetanol, 10 mM $Mg(CH_3COO)_2$, 400 μ g/ml BSA; 0,4 mM EDTA y 16% (v/v) glicerol), bajo las mismas condiciones descritas anteriormente. Después de la renaturación de las enzimas, cada gel se lavaba tres veces con 50 ml de 50 mM Tris-HCl pH 8,0 y se incubaba por 20 h a 37 °C sin agitación en 25 ml del tampón de reacción que contenía 50 mM Tris-HCl pH 8,0; 10 mM DTT, 10 mM $Mg(CH_3COO)_2$, 400 μ g/ml BSA; 0,4 mM EDTA, 16% (v/v) glicerol, 10-44 nM Dig-dUTP, 10 μ M de cada desoxinucleótido dATP, dCTP y dGTP.

Para detectar las bandas con actividad DNA polimerásica cada gel

se lavaba tres veces con tampón TN que contenía 0,1 M Tris-HCl pH 7,5; y 0,15 M NaCl y luego se bloqueaba incubando 1 h con 4% de leche descremada en tampón TN, a temperatura ambiente y con agitación constante. Luego, los geles eran lavados tres veces con tampón TN y se incubaban 10-15 h con tampón TN conteniendo 0,75 U/ml de anti-digoxigenina conjugada a fosfatasa alcalina (<Dig>AP). A continuación los geles se lavaban tres veces con tampón AP compuesto por 0,1 M Tris-HCl pH 9,5; 5 mM MgCl₂ y 0,1 M NaCl, por 20 min cada lavado, a temperatura ambiente y con agitación constante. Para desarrollar la reacción colorimétrica llevada a cabo por la fosfatasa alcalina, cada gel se incubó en tampón AP conteniendo 100 µg/ml NBT y 60 µg/ml BCIP. La visualización de las bandas con actividad DNA polimerásica ocurría después de 2-4 días de incubación a temperatura ambiente y en oscuridad sin agitación. La reacción se detenía lavando los geles con un tampón compuesto por 10 mM Tris-HCl pH 8,0 y 1 mM EDTA, los que posteriormente eran secados entre dos láminas de celofán y fotografiados.

Activación del DNA. Se llevó a cabo mediante incubación con DNasa I de acuerdo al tratamiento descrito en la literatura (Schlabach y col., 1971).

Parásitos. a) Formas proliferativas epimastigotas de *T. cruzi* (clon Dm-28). Estas formas celulares se cultivaron en un medio LIT (Chiari y Camargo, 1984) a 28 °C con agitación constante hasta fase exponencial (alrededor de 50x 10⁶ parásitos/ml). Las células fueron colectadas por centrifugación a 5000xg por 10 min, lavadas dos veces con PBS conteniendo 50 mM fosfato de sodio pH 7,2 y 30 mM NaCl. Los

parásitos fueron almacenados a -80°C hasta que fueron utilizados para purificar las DNA polimerasas de *T.cruzi*.

b) Formas metacíclicas. Se obtuvieron por diferenciación inducida, mediante el sistema descrito por Contreras (1985), ó por purificación de metacíclicos espontáneos mediante columnas de DEAE-celulosa (De Souza, 1983).

c) Formas tripomastigotas de cultivo celular. Se obtuvieron infectando monocapas de células Vero (línea celular de epitelio de riñón) las cuales eran cultivadas en medio RPMI-1640 suplementado con 10% de SBF. Para iniciar las infecciones se utilizaban tripomastigotes sanguíneos procedentes de ratón.

Purificación de una DNA polimerasa α de *Xenopus laevis*. Se purificó parcialmente una DNA polimerasa α desde ovarios (26 g) de dos ranas esencialmente como fue descrito por Nelson y col., (1983), pero con algunas modificaciones, tales como la elusión en una etapa de la primera columna DEAE-celulosa y la incorporación de una etapa adicional utilizando una columna de DNA-celulosa.

Producción de anticuerpos. Los antisueros en contra de tres DNA polimerasas de *T.cruzi* se obtuvieron inoculando conejos con tres preparaciones parcialmente purificadas correspondientes a las fracciones A, B y C de DNA polimerasas, y contra una fracción altamente purificada correspondiente a la fracción A. Todas las inoculaciones fueron hechas por via intramuscular. La primera inyección se realizó con adyuvante de Freund completo y luego de un mes se realizaron dos sucesivas inoculaciones, cada un mes, sin adyuvante. Las cantidades de proteínas utilizadas en cada inoculación

fueron: para la fracción A altamente purificada, primera inoculación 10 µg y en las tres siguientes, inoculaciones de 5 µg cada una. Fracción A parcialmente purificada, se realizaron tres inoculaciones cada una con 100 µg de proteína. Fracción B, tres inoculaciones, cada una con 55 µg de proteína. Finalmente para la Fracción C, las dos primeras con 23 µg cada una y la última con 12 µg. Dos semanas después de la última inoculación los conejos fueron sangrados para obtener el suero, el cual se alicuotó y se congeló a -80°C .

Análisis mediante "Western-blot". Se realizó de acuerdo a la técnica descrita en la literatura (Towbin y col., 1978; Harlow y Lane, 1988), adaptada para el sistema de mini geles descrito anteriormente y utilizando el sistema de transferencia semi-seco Sartoblot II-S de Sartorius. La transferencia se realizó a filtros de nitrocelulosa utilizando diluciones de los antisueros indicadas en cada figura y un segundo anticuerpo anticonejo conjugado a fosfatasa alcalina (1:2000).

Cuantificación de proteínas. La concentración de proteínas fue determinada utilizando el método descrito por Bradford (1976).

Sedimentación en gradientes de glicerol. Los gradientes de glicerol (4 ml) se realizaron en un tampón que contenía 50 mM Tris-HCl pH 8,0; 2 mM 2-mercaptoetanol; 0,1 mM EDTA, 0,5% polietilenglicol; 0,1 mM TLCK, 1 µg/ml leupeptina, 10 mM NaHSO₃; 0,2 µM pepstatina, 1 mM PMSF y 0,2 M KCl. Se cargaron muestras de DNA polimerasa de 100-200 µl en 4 ml de gradientes de 10-30% y 20-40% de glicerol, los que fueron centrifugados a 45.000 rpm durante 20 h y 16 h respectivamente, en un rotor Sorvall AH-650 a $0-4^{\circ}\text{C}$. Al término de

la centrifugación se introdujo un capilar hasta el fondo del tubo mediante el cual se colectaron diversas fracciones utilizando una bomba peristáltica. Alícuotas de 5 μ l de cada fracción se utilizaron para detectar actividad DNA polimerásica de acuerdo a las condiciones descritas en cada figura.

Con el objetivo de estimar la masa molecular de las DNA polimerasas de *T. cruzi* se realizaron gradientes en paralelo con las siguientes proteínas: citocromo c de corazón de bovino (12,4 kDa), albumina de huevo (45 kDa), fosfatasa alcalina de mucosa intestinal de bovino (116 kDa) y , alcohol deshidrogenasa de levadura (150 kDa).

Tratamiento del *Staphylococcus aureus* para ser utilizado en inmunoprecipitación (proteína A insoluble). Este tratamiento se realizó de acuerdo a los descrito por Goding y Handman (1984). Brevemente, un volumen de *S.aureus* (suspensión al 10%) se centrifuga a 5000xg durante 20 min. El sedimento se disuelve en un volumen de solución NET-0,5 compuesta por 0,15 M NaCl, 10 mM EDTA y 50 mM Tris-HCl pH 7,4 suplementada con 0,5% NP-40. La suspensión resultante se dejaba incubar durante 15 min a temperatura ambiente con agitación ocasional. Luego se centrifugaba por 15 min a 5000xg y el sedimento se resuspendía en solución NET suplementada con 0,05 % de NP-40 y 1mg/ml BSA. Este último procedimiento se repetía una vez más y la suspensión de *S.aureus* así tratada se guardaba a 0-4 °C antes de ser usada en el mismo dia.

Inmunoprecipitación de actividad DNA polimerásica. El suero utilizado en estos experimentos fue concentrado con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ a 50% de

saturación de acuerdo a métodos descritos (Harlow y Lane, 1988). La concentración final de cada suero concentrado fue aproximadamente de 50 µg/µl. Cada ensayo de inmunoprecipitación se realizaba a 0-4°C, de la siguiente forma: 5 µl de muestra de DNA polimerasa , se mezclaba con 5 µl de antisuero concentrado y 5 µl de PBS. La solución se mezclaba y se incubaba por 2 h. A continuación, se agregaba 5 µl de proteína A insoluble (suspensión de *S.aureus* al 20%), y se dejaba incubar 1 h. Posteriormente se centrifugaba durante 10 min a 10.000xg, se recuperaba el sobrenadante y alícuotas de 5 µl se ensayaban para detectar actividad DNA polimerásica remanente en esta fase.

Tampones utilizados en la purificación de DNA polimerasas de *T. cruzi*.

Tampón A: 50 mM Tris-HCl pH 8,0; 2mM 2-mercaptoetanol; 0,1 mM EDTA; 0,5% polietilenglicol; 0,1 mM TLCK, 1 µg/ml leupeptina, 10 mM NaHSO₃; 0,2 µM pepstatina, 1 mM PMSF, 10% glicerol y 50 mM KCl)

Tampón B: La misma composición que el tampón A pero conteniendo una concentración de glicerol al 20%.

Tampón C: La misma composición que el tampón A pero conteniendo una concentración de glicerol al 30%

Aislamiento de tres fracciones con actividad DNA polimerásica, denominadas fracción A, B y C.

Todos los procedimientos fueron realizados a 0-4 °C (ver Fig.6). 46 g de epimastigotes fueron resuspendidos en 100 ml del tampón de

lisis anteriormente descrito (Materiales y Métodos) y homogenizados con Potter mediante procedimiento manual. El extracto total se centrifugó a 10.000xg y el sobrenadante (Fracción S₁₀, 110 ml) se cargó en una columna de fosfocelulosa (18x4,2 cm) equilibrada en tampón A. La columna se lavó con 4 volúmenes del mismo tampón anterior y se eluyó en dos etapas. En la primera etapa se eluyó con 3 volúmenes de tampón A conteniendo 100 mM KCl, y en la segunda etapa se eluyó con tampón A conteniendo 600 mM KCl. Se colectaron fracciones de 15 ml y se ensayaron alícuotas de 5 µl. Toda la actividad DNA polimerásica se colectó en el eluido con 600 mM de KCl. Las fracciones con actividad enzimática se juntaron (300 ml) y cada 100 ml se pasaron por una columna de G-25 (3,2 x 26 cm) equilibrada en tampón A. Las fracciones con actividad DNA polimerásica con fuerza iónica similar al tampón A se juntaron (350 ml, Fracción I-P11) y se cargaron en una columna de DEAE-celulosa (10 x 3,6 cm) equilibrada en tampón A. En esta etapa de purificación la actividad DNA polimerásica se dividió en una fracción no-retenida (a) y retenida (b) por esta columna (ver Fig.6).

a) La fracción no retenida (DEAE-NR, 320 ml) se cargó en una columna de DNA-celulosa (6,5 x 2 cm) equilibrada en tampón B. La columna se lavó con 10 volúmenes del mismo tampón anterior y se eluyó en una sola etapa con tampón B conteniendo 600 mM de KCl. Se colectaron fracciones de 10 ml y se ensayaron alícuotas 5 µl. Las fracciones con actividad DNA polimerásica se juntaron (11,5 ml, Fracción DNA-cel.) y se dializaron de un día para otro en 200 volúmenes de tampón C. La solución dializada se cargó en una segunda columna de fosfocelulosa

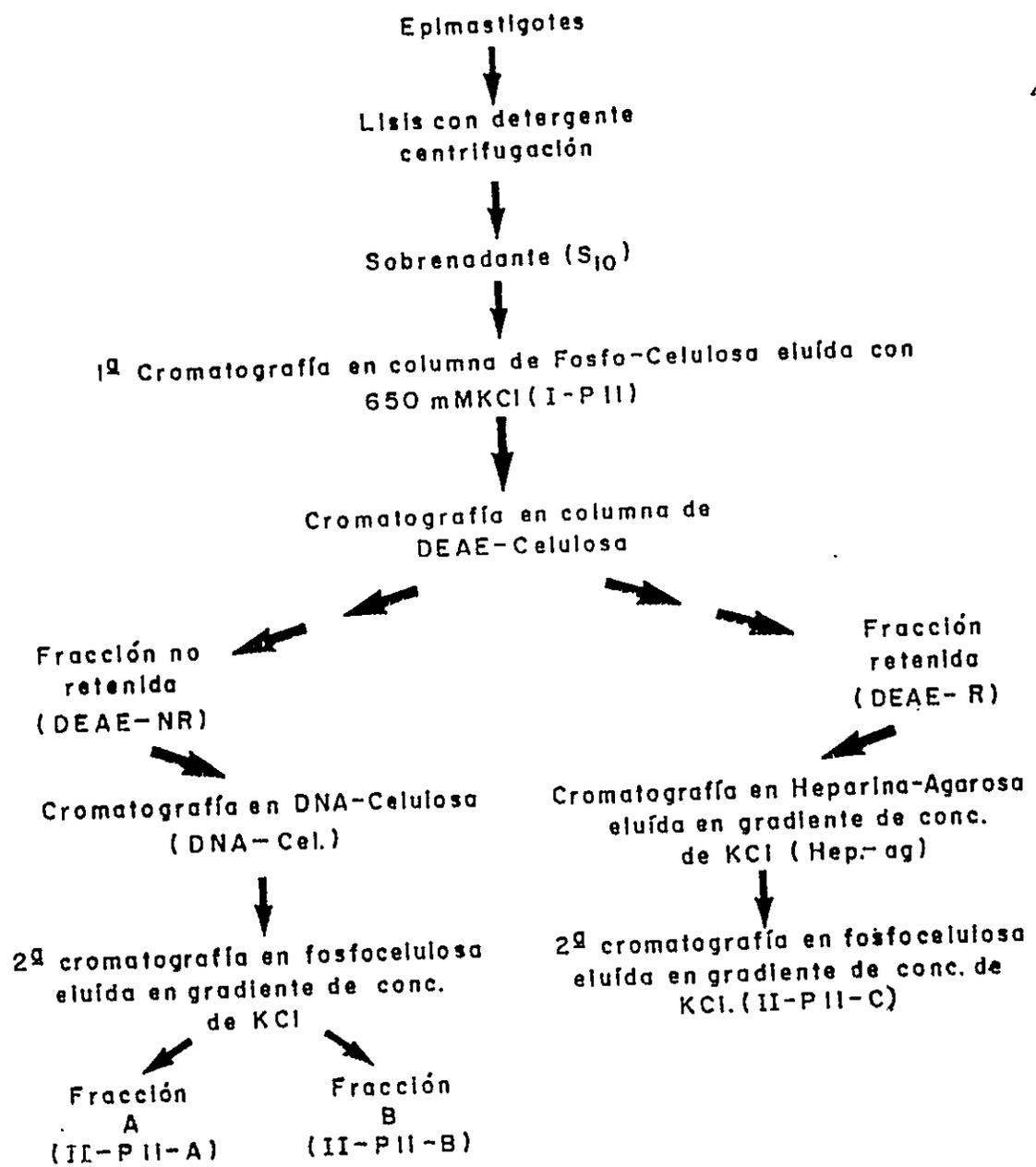


Fig.6. Esquema de purificación de las DNA polimerasas fracción A, B y C, aisladas de la forma proliferativa epimastigote de *Trypanosoma cruzi*.

(5,2 x 1,6 cm) equilibrada en el mismo tampón anterior. La columna se lavó con 10 volúmenes del tampón anterior y se eluyó con gradiente de 50-600 mM KCl en tampón C. En esta etapa, nuevamente, la actividad DNA polimerásica se dividió en dos fracciones: una fracción mayoritaria que eluye a aproximadamente 150 mM KCl (Fracción A) y otra fracción minoritaria que eluye a aproximadamente 270 mM KCl (Fracción B, Fig.7). Dichas fracciones se dializaron por separado en 200 volúmenes de tampón A suplementado con 50% glicerol y se dividieron en pequeñas alícuotas las que fueron almacenadas a -20 °C durante varios meses sin pérdida aparente de actividad.

b) Fracción retenida por la columna de DEAE-celulosa (DEAE-R):

Purificación de la DNA polimerasa fracción C.

La columna de DEAE-celulosa se lavó con 5 volúmenes de tampón A. Luego, la fracción retenida en dicha columna (DEAE-R, Fig.6) fue eluida en una etapa con tampón A conteniendo 400 mM KCl. Las fracciones con actividad DNA polimerásica se juntaron (Fracción DEAE-R, 16 ml) y se dializaron de un día para otro en 200 volúmenes de tampón B. La fracción dializada se cargó en una columna de heparina-agarosa (5,2 x 1,6 cm) equilibrada en el mismo tampón anterior. La columna se lavó con 10 volúmenes del tampón señalado y se eluyó con 10 volúmenes de un gradiente de 50-600 mM KCl en tampón B. Las fracciones con actividad DNA polimerásica se juntaron en una solución (Fracción HEP-ag., 12 ml) la que fue dializada en 200 volúmenes de tampón B. La fracción dializada se cargó en una segunda columna de fosfoceulosa (Fig. 6) equilibrada en el tampón anterior, la que fue lavada con 10 volúmenes de dicho tampón. La actividad DNA

polimerásica unida a la columna se eluyó con 10 volúmenes de un gradiente de 50-600 mM KCl en tampón B. Toda la actividad enzimática eluyó en un sólo pico de actividad a aproximadamente 150 mM KCl (Fig. 7). Las fracciones correspondientes al pico de actividad se juntaron (Fracción II-P11-C, 20 ml), se dializaron en 200 volúmenes de tampón A conteniendo 50% glicerol, se alicuotaron y se almacenaron a -20 °C. Las muestras así conservadas fueron estables durante varios meses.

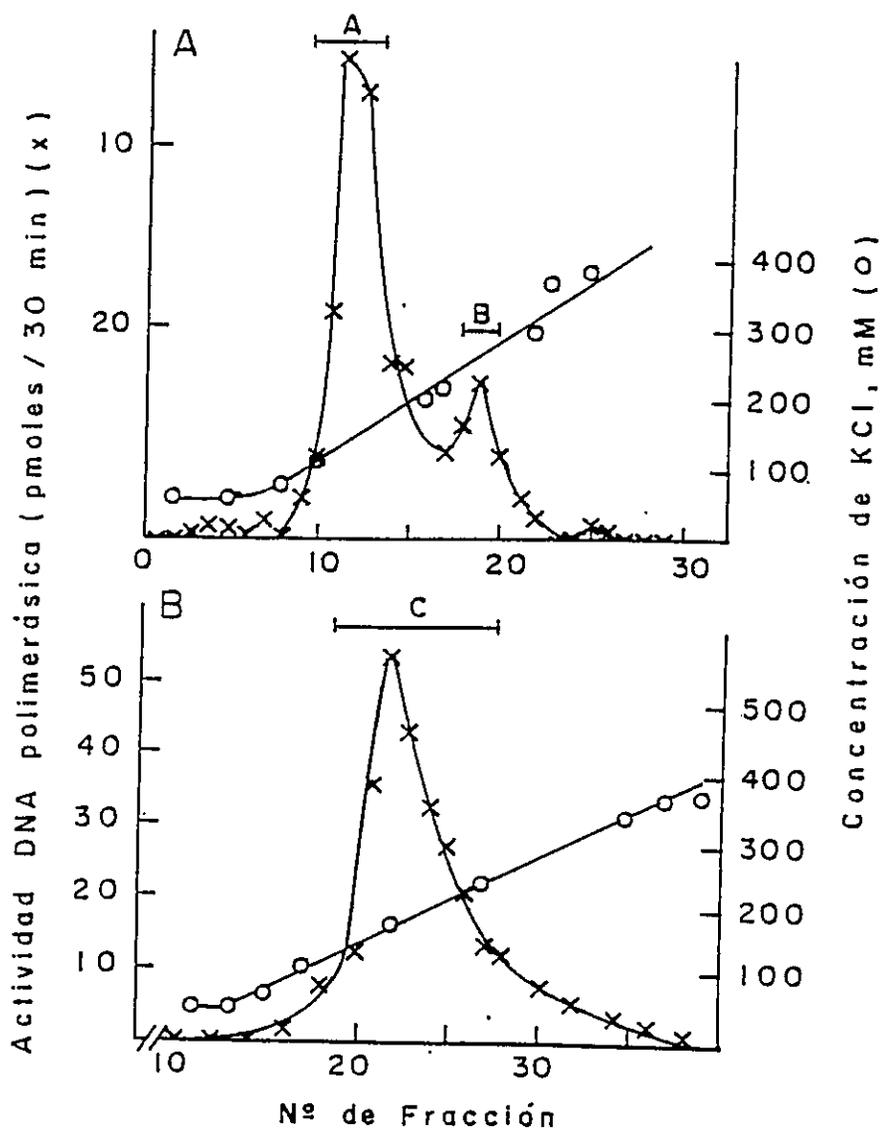


Fig.7. Perfil de elución de las DNA polimerasas fracción A, B y C, desde la cromatografía en la segunda columna de fosfocelulosa. Aliquotas de cada fracción (5 μ l) fueron ensayadas para determinar actividad DNA polimerásica con DNA activado (Gráfico A) ó poli(dC)-oligo(dG) (Gráfico B), respectivamente, de acuerdo a como fue descrito en Materiales y Métodos.

Purificación cercana a homogeneidad de una DNA polimerasa tipo β de *T. cruzi*.

Todos los procedimientos se realizaron a 0-4 °C. Epimastigotes (20g) se disolvieron en 60 ml de tampón de lisis descrito anteriormente. Las células se homogenizaron en un sistema "Potter" manualmente y el extracto total resultante, se centrifugó 15 min a 10.000 x g. El sobrenadante (Fracción I, 60 ml) se cargó en una columna de fosfoceulosa (3,5 x 14 cm) equilibrada en tampón A. La columna fue lavada con tres volúmenes de tampón A conteniendo 0,1 M KCl, y eluida con el mismo tampón anterior conteniendo 0,2 M KCl. La actividad DNA polimerásica eluida de la columna anterior (320 ml) fue precipitada con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ de la siguiente manera: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ sólido se agregó lentamente a la solución eluida hasta alcanzar un 80% de saturación. La mezcla resultante se centrifugó 20 min a 10.000 x g, el sedimento se resuspendió en 60 ml de tampón A, esta solución se centrifugó nuevamente en las mismas condiciones anteriores y el sobrenadante se cargó en una columna de G-25 (3,2 x 26 cm) equilibrada en tampón A. Las fracciones eluidas de esta columna se ensayaron para detectar actividad DNA polimerásica y se midió su conductividad. Las fracciones activas con conductividad equivalente al tampón A de equilibrio, se juntaron en una misma solución (Fracción II, 70 ml) que se cargó en una columna de DEAE-celulosa (2,5 x 8 cm) equilibrada con tampón B. Las fracciones con actividad DNA polimerásica que no se unieron a dicha columna, se juntaron en una misma solución (Fracción III, 66 ml) la que se cargó en una columna de DNA(doble hébra)-celulosa (1,5 x 6 cm) equilibrada en

tampón B. La columna se lavó con 20 volúmenes del mismo tampón indicado anteriormente y se eluyó con 10 volúmenes de un gradiente de 50-600 mM KCl en tampón B. Las fracciones con actividad DNA polimerásica eluyeron en un sólo pico de actividad a alrededor de 0,15 M KCl. Estas fracciones se juntaron (Fracción IV, 12 ml) y se dializaron en 40 volúmenes de tampón B. Luego, la solución dializada se cargó en una segunda columna de fosfoceulosa (0,35 x 5 cm) equilibrada en tampón B. A continuación, la columna se lavó con 10 volúmenes del mismo tampón de equilibrio y se eluyó con 10 volúmenes de un gradiente de 50-600 mM KCl en tampón B. La actividad DNA polimerásica eluyó en un sólo pico a alrededor de 200 mM KCl. Las fracciones activas se juntaron en una misma solución y se dializaron en 100 volúmenes de tampón A suplementado con 50% glicerol y con omisión del polietilenglicol. Las fracciones dializadas se alicuotaron y se almacenaron a -20 °C durante varios meses sin pérdida aparente de actividad.

Microsecuenciación de péptidos de la DNA polimerasa tipo β de *T. cruzi*

Muestras de DNA polimerasa tipo β de *T. cruzi* fueron microsecuenciadas por el Dr. Ulf Hellman, Ludwig Institute for Cancer Research, Uppsala Suecia. La técnica utilizada, desarrollada por el mismo autor, consiste en la separación de la proteína a secuenciar en geles de poliacrilamida y su posterior digestión "in situ" mediante proteólisis controlada (Hellman, y col., 1995).

Ensayos de PCR.

a) **Ensayo con oligonucleótidos degenerados:** En un volumen total de 50 μ l, se agregaba 0,5-2 μ l de la muestra a analizar, 5 μ l de tampón 10x PCR (0,5 M KCl, 100 mM Tris-HCl pH 8,3; 15 mM MgCl₂, 0,1% gelatina, 2 mM dNTP), 2-5 μ g/ml partidó 18s, 2-5 μ g/ml partidó 27as, H₂O hasta completar volumen. La solución anterior se mezclaba, se incubaba por 10 min a 98 °C, se enfriaba rápidamente hasta 0-4 °C, se agregaba 0,25 μ l de Taq DNA polimerasa, se mezclaba cuidadosamente, se agregaba 50 μ l de aceite mineral y se procedía a la amplificación en cadena (PCR) de acuerdo a las siguientes condiciones estándar o como se indica en cada Figura: 2 min de desnaturación a 94 °C, 2 min de hibridación a 55 °C. y 3 min de elongación a 72 °C durante 25-35 ciclos en un termo ciclador Perkin Elmer (Cetus Instruments). Una vez terminada la amplificación, las muestras se analizaban mediante electroforesis en geles de agarosa al 1-1,5 % teñidos con bromuro de etidio de acuerdo a condiciones descritas en la literatura (Sambrook, Fritch y Maniatis, 1989).

b) **Ensayo con partidóes biotinilados para secuenciación automática.**

Se utilizaron los partidóes JS1 y JS2 descritos en la literatura (Lagerevist y col., 1994) que hibridan con segmentos aledaños al sitio de clonamiento del vector pT7 Blue(R) y serie de vectores pUC. Cada uno de ellos se utilizaba a concentraciones finales de 0,2 μ M ó 5 μ g/ml. Para secuenciación automática en uno u otro sentido, sólo uno de los partidóes utilizados estaba biotinilado (JS1B ó JS2B) y los producto de amplificación por PCR se secuenciaban mediante un sistema no-radioactivo fluorescente descrito

en la literatura (Lagerekvist y col., 1994). Las condiciones de amplificación utilizadas eran 1 min de desnaturalización a 94 °C, 1 min de hibridación a 55 °C. y 2 min de elongación a 72 °C durante 25 ciclos.

c) Ensayo directo con muestras procedentes de colonias bacterianas ("Colony-PCR").

Colonias individuales transformadas con plásmidos pT7Blue(R) fueron transferidas desde placas de agar a tubos Eppendorf que contenían 100 µl de H₂O. Las muestras se hervían por 5 min, se enfriaban rápidamente en hielo, se centrifugaban 5 min a 10.000 x g y se tomaba una alícuota de 1 µl del sobrenadante para ser analizada por PCR de acuerdo a las condiciones descritas anteriormente y utilizando los partidores del plásmido JS1 y JS2 (Lagerekvist y col., 1994) a una concentración de 0,2 µM, ó como se indica en cada figura.

Purificación de fragmentos de DNA

Se realizó mediante electroforesis en geles de agarosa de bajo punto de fusión y posterior purificación de los fragmentos incluidos en el gel a través de sucesivas extracciones con fenol cloroformo de acuerdo a protocolos descritos en la literatura (Sambrook y col., 1989).

Ligamiento de fragmentos de DNA en vectores pT7 Blue(R) y PUC-19

En un volumen final de 10 µl se agregaba 1 µl de tampón 10x de ligamiento T4 (Promega), 50 ng de vector pT7 Blue(R) ó pUC-19; 2,5 unidades de DNA ligasa T4 y 1-2 µl (50-100 ng) del fragmento de DNA proveniente directamente de un ensayo de PCR ó purificado mediante

electroforesis en agarosa, como se indicó anteriormente. Se agregaba H₂O hasta completar 10 µl y se incubaba a 15 °C durante 8-15 h.

Transformación de bacterias competentes

Se realizó de acuerdo a técnicas descritas en la literatura (Sambrook y col., 1989). En breve, una alícuota de 200 µl conteniendo aproximadamente 2×10^7 bacterias competentes (cepa DH5α) se mezclaba con 5 µl de reacción de ligamiento y se incubaba 30 min a 0-4 °C. Luego se calentaba 2 min a 42 °C, se dejaba en hielo por 5 min y a cada tubo se agregaba 0,8 ml de medio LB, se mezclaba suavemente y se dejaban 1 h a 37 °C. Posteriormente, 100 µl de cada muestra se sembraba sobre placas Petri con agar LB sin glucosa conteniendo ampicilina, 100 µg/ml X-gal y 2 mM de IPTG. Las placas se incubaban toda la noche a 37 °C, hasta la aparición de colonias las cuales eran seleccionadas de acuerdo a su fenotipo blanco ó azul, en colonias recombinantes y no-recombinantes, respectivamente.

Marcación de fragmento de 550pb con [³²P] para ser utilizado como sonda

Se realizó según el método "rediprime" (Amersham) basado en la técnica de partidores al azar descrita en la literatura (Fienberg y Vogelstein, 1983). Brevemente, 50 ng de fragmento PCR de 550 pb (0,5 µl) se diluían en 45 µl de H₂O, se hervía 10 min, se enfriaba rápidamente en hielo y se disolvía en la mezcla "rediprime" conteniendo el fragmento Klenow de la DNA polimerasa I de *E. coli*, los componentes del tampón de reacción y los partidores al azar. A continuación se procedía a agregar 50 µCi de [³²P]dGTP y se incubaba

por 10 min a 37°C. A continuación se separaba la sonda del medio de reacción mediante cromatografía en Sephadex G-50 de acuerdo a un sistema en la cual la sonda se eluía mediante centrifugación. Mediante este sistema se obtenían sondas con actividad específica de hasta $1,0 \times 10^9$ cpm/ μ g DNA.

Búsqueda de clones portadores del gen de la DNA polimerasa tipo β de *T. cruzi* en una genoteca genómica construida en λ gt11

Se analizaron aproximadamente 1×10^5 fagos de acuerdo a técnica descritas (Sambrook, 1989) y utilizando como sonda el fragmento de 550 pb. En síntesis, una alícuota de 2 μ l que contenía alrededor de $1-2 \times 10^4$ fagos se disolvía en 98 μ l de tampón SM y se mezclaba con 600 μ l de un cultivo fresco de bacterias Y1090 crecidas en medio LB suplementado con 35 μ g/ml ampicilina. La mezcla de bacterias y fagos se dejaba absorbiendo por 20 min a 37°C, se disolvía rápidamente en 7 ml de agar blando (medio LB conteniendo 0,7% agarosa; 0,4% maltosa y 2,5 mM CaCl_2) a 45 °C y se esparcía en placas Petri (14 cm) conteniendo agar LB al 1,5% previamente secadas durante 1 h a 37°C. Una vez agregada la mezcla de fagos y bacterias, las placas se dejaban secar 1 h a temperatura ambiente y se incubaban toda la noche a 37°C. Al otro día se detectaban las placas de lisis provocada por cada fago.

La detección de los fagos recombinantes se realizaba obteniendo réplicas en filtros de nylon de cada placa. El DNA de los fagos adosados a los filtros se desnaturaba con una solución alcalina y se fijaba irreversiblemente a esta matriz mediante irradiación con luz

uv. Luego los filtros se incubaban 4-6 h a 65°C con una solución de Bloqueo (6% SSC, 5% Denhart, 25% formamida, 10% dextransulfato y 0,1% SDS), se agregaba la sonda radioactiva ($1-3 \times 10^6$ cpm/20 ml) y se dejaba hibridando durante 8-12 h a 65 °C. Posteriormente, los filtros se lavaban repetidamente con 2X SSC conteniendo 0,5% SDS durante 2-4 h a 65 °C hasta desaparición completa de radioactividad en el lavado. Finalmente los filtros se guardaban dentro de una bolsa plástica sellada y se dejaban durante varios días exponiendo para autoradiografía a -70°C con una placa fotografica apropiada (Kodak XomatS ó XomatAR).

Las placas de lisis bacterianas originadas por la acción de fagos individuales (unidad formadora de placa, UFP) que hibridaron con la sonda, se purificaron por sucesivas aplicaciones del protocolo anterior utilizando diluciones seriadas de cada UFP aislada desde la placa de agar.

Purificación de DNA de fagos recombinantes

Se realizó de acuerdo a protocolos descritos en la literatura (Sambrook y col., 1989) el cual, esencialmente consistió en lo siguiente: 10 µl de solución SM conteniendo 10^4-10^5 fagos se mezcló con 200 µl de un cultivo fresco de bacterias Y1090, se dejó incubando 15 min a 37°C y se agregó a 50 ml de medio NZY conteniendo 10 mM $MgSO_4$. El cultivo se dejó incubando a 37°C durante varias horas con agitación hasta su clarificación producida por la lisis masiva de bacterias. Una vez ocurrido lo anterior, se agregaba 1 ml de cloroformo a cada frasco, se dejaba incubando por otros 15 min y se

centrifugaba durante 10 min a 10.000 x g a 0-4°C. Se recuperaba el sobrenadante, con los fagos suspendidos en él, se agregaba RNasa A y DNasa, hasta una concentración final de 1 µg/ml de cada una de ellas y se incubaba durante 30 min a 37°C. La precipitación de las partículas virales se realizaba agregando un volumen de solución TF (1x SM, 20% PEG, 2 M NaCl), incubando 1 h a 0-4°C y centrifugando 20 min a 10.000 x g a la misma temperatura anterior. El precipitado se resuspendía en 0,5 ml de tampón SM, se centrifugaba 2 min en centrifuga Eppendorf, y al sobrenadante se agregaba 10 µl de SDS al 10% y 10 µl de 0,5 M EDTA. La mezcla se incubaba 15 min a 68°C y se agregaba un volumen de fenol-cloroformo (1:1), se agitaba, se centrifugaba y se recuperaba la fase acuosa. A esta fase se agregaba RNasa hasta concentración final de 50 µg/ml y se incubaba durante 30 min a 37°C. Nuevamente se realizaba una extracción con fenol-cloroformo, se recuperaba la fase acuosa, se agregaba un volumen de isopropanol, se dejaba 20 min a -70°C y se centrifugaba a 10.000 x g durante 15 min a 0-4°C. El DNA de fago precipitado se lavaba con 70% etanol frío y se secaba mediante centrifugación al vacío.

Clonamiento de insertos recombinantes de fagos λgt11 en vector pUC-19

Los insertos de los fagos λgt11 fueron liberados mediante digestión con la enzima de restricción EcoRI. Luego, dichos insertos fueron purificados mediante electroforesis en agarosa de bajo punto de fusión. Los insertos puros se ligaron al vector pUC-19, con el producto de esta reacción se transformaron las bacterias competentes DH5α y los clones recombinantes se seleccionaron según su fenotipo color blanco. Todos los procedimientos indicados, se realizaron de

acuerdo a protocolos descritos anteriormente en Materiales y Métodos.

Minipreparaciones de plásmido pUC-19

Se realizó de acuerdo a protocolos descritos en la literatura (Sambrook y col., 1989). Una muestra de 1-3 ml de cultivo con bacterias transformadas con plásmidos recombinantes se centrifugaba por 10 min a 10.000 x g a temperatura ambiente. Las bacterias sedimentadas se resuspendían en 0,3 ml de tampón P1 (50 mM Tris-HCl, pH 8,0; 10 mM EDTA; 400 µg/ml RNasa), se agregaba 0,3 ml de tampón P2 (200 mM NaOH y 1% SDS), se mezclaba suavemente y se incubaba 5 min a temperatura ambiente. Luego se agregaba tampón P3 (2,55 M tampón acetato de potasio, pH 4,8), se mezclaba y centrifugaba 15 min a 10.000 x g a 0-4°C. Se recuperaba el sobrenadante, se agregaba 0,8 volúmenes de isopropanol, se centrifugaba durante 15 min a 10.000xg y se lavaba con 70% de etanol helado. El DNA plasmidial se secaba al vacío y se resuspendía en un volumen adecuado de agua estéril.

Mapa físico de clones recombinantes pUC-7-2, pUC-8-1 y pUC-4-3500

Plásmidos pUC recombinantes conteniendo insertos de DNA genómico de *T. cruzi* fueron digeridos con distintas enzimas de restricción, de acuerdo a las siguientes condiciones: 2 µg de plásmido, 10 unidades de enzima, 1µl del tampón adecuado (tampones Amershan L, M, H, K ó T) y H₂O hasta completar 10µl. Esta solución se incubaba por 2 h a 37°C, al cabo de la cual se procedía a separar los fragmentos mediante electroforesis en geles de agarosa, como se describió anteriormente.

Una vez terminada la electroforesis se procedía a la desnaturación del DNA mediante incubación del gel durante 1 h en solución Gelsoak I (1,5 M NaCl y 0,5 M NaOH) y posterior neutralización en Gelsoak II (1 M Tris-HCl y 1,5 M NaCl). A continuación, se procedía a la transferencia, de los fragmentos de DNA separados en el gel, a filtros de nylon "Hybon-N+" en base al sistema por capilaridad descrito por Southern (1975). Posteriormente, los filtros eran irradiados con luz uv a fin de que el DNA se uniera irreversiblemente a dicha matriz. A continuación los filtros se bloqueaban, se incubaban con la sonda de 550 pb, se lavaban y se dejaban exponiendo para autoradiografía, según protocolos descritos anteriormente en Materiales y Métodos.

Subclonamiento de fragmentos conteniendo el gen de la DNA polimerasa tipo β de *T. cruzi*.

Una vez conocido el mapa físico de los clones pUC-7-2, pUC8-1 y pUC-4-3500, se procedió a realizar digestiones de los plásmidos con enzimas de restricción apropiadas. Los fragmentos así generados, se separaron y purificaron mediante electroforesis en agarosa de bajo punto de fusión y sucesivas extracciones con fenol cloroformo. Luego los fragmentos purificados se ligaron a pUC-19 digeridos con las mismas enzimas utilizadas para generar dichos fragmentos. Con los productos de ligación se transformaron bacterias competentes adecuadas las que posteriormente fueron seleccionadas en base a su fenotipo y análisis con PCR. Todas las metodologías señaladas se realizaron tal como fue descrito en secciones anteriores.

Análisis de la organización del gen de la DNA polimerasa tipo β de *T. cruzi* mediante técnicas de "Southern-blot".

Las técnicas de "Southern-blot" se realizaron de acuerdo a protocolos descritos en la literatura (Sambrook y col., 1989). Brevemente, muestras de DNA genómico de epimastigotes de *T. cruzi* (clon Dm28c) fueron digeridas por diferentes enzimas de restricción, tal como se describe en la figura respectiva. Cada muestra (2 μ g) fue digerida durante 2 h a 37°C con 10 unidades de enzima en un volumen total de 10 μ l con el tampón indicado por el proveedor (New England Biolabs) para obtener digestión completa ó parcial, de acuerdo a cada experimento. Posteriormente, las muestras fueron sometidas a electroforesis en geles de agarosa al 1% en tampón TAE (40 mM Tris-acetato pH 8,0; 1 mM EDTA). Una vez terminada la electroforesis, se procedía a la desnaturación del DNA mediante incubación en Gelsoak 1 (1,5 M NaCl y 0,5 M NaOH) durante 1 h a temperatura ambiente. Luego se neutralizaba el gel incubando en Gelsoak 2 (1 M Tris-HCl pH 8,0 y 1,5 M NaCl) durante 1 h en las mismas condiciones anteriores. A continuación, se depositaba el gel invertido sobre el sistema de transferencia por capilaridad descrito en la literatura (Sambrook y col., 1989). Una vez concluida la transferencia después de 12-24 h, los filtros se irradiaban con luz uv y se procedía a bloquear e incubar con la sonda apropiada de acuerdo a como ya fue descrito en secciones anteriores.

Análisis mediante la técnica de "Northern" de la expresión del gen de la DNA polimerasa tipo β de *T. cruzi* en diferentes formas del parásito

Distintas formas celulares del parásito *T.cruzi* fueron estudiadas mediante la técnica de "Northern-blot" descrita en la literatura (Sambrook y col., 1989). Para lo cual, RNA total de dichos parásitos fue purificado según protocolo que utiliza tiocianato de guanidina. Posteriormente este RNA fue separado por electroforesis en geles de agarosa al 1% conteniendo formaldehído y transferidos a filtro de nylon "Hybon-N+" en base al sistema por capilaridad descrito en la literatura (Sambrook y col., 1989). El RNA transferido fue unido covalentemente a los filtros mediante irradiación con luz uv los cuales fueron bloqueados, incubados con la sonda de 550pb, lavados y expuestos para radioautografía de acuerdo a similares condiciones ya descritas.

RESULTADOS

Capítulo I : Aislamiento y caracterización parcial de tres DNA polimerasas de la forma proliferativa epimastigote de *T.cruzi*.

Utilizando un nuevo esquema de purificación se logró aislar tres fracciones con actividad DNA polimerásica las que fueron denominadas DNA polimerasa fracción A, B y C. Varias modificaciones fueron introducidas respecto a protocolos de purificación descritos (Solari y col., 1983, Rojas y col., 1992). La primera de estas modificaciones fue la ruptura de los parásitos en un tampón de lisis con baja fuerza iónica y en presencia de inhibidores de proteasas más efectivo. Esto permitió la inmediata realización de la primera cromatografía lo cual redundó en un importante ahorro de tiempo, evitando de esta manera una excesiva exposición de las DNA polimerasas a las proteasas del extracto. Otra modificación importante fue utilizar como primera etapa de purificación una columna de fosfocelulosa. Este paso permitió eliminar tempranamente inhibidores contaminantes y estabilizar la actividad DNA polimerásica para las futuras etapas de purificación. Finalmente, otra modificación relevante, fue la utilización de una columna de DEAE-celulosa equilibrada a baja fuerza iónica. Esto facultó la separación de la actividad DNA polimerásica total en dos fracciones: una fracción unida (fracción R-DEAE) y otra no-unida (NR-DEAE) a dicha columna (Fig.6), lo cual correspondió a la separación de las fracciones A y B de la fracción C.

El protocolo mostrado en la Figura 6 representa el mejor resultado después de múltiples intentos para purificar a homogeneidad

dichas fracciones enzimáticas. Un factor limitante en la purificación de dichas fracciones fue el material biológico. Por ejemplo, en este protocolo se utilizó 46 g en peso húmedo de epimastigotes (aproximadamente 6×10^{11} parásitos) los cuales provienen de más o menos 20 litros de cultivo. Además es importante tener en cuenta que un cultivo alcanza su fase exponencial en alrededor de una semana. Por todas estas consideraciones la obtención de cantidades elevadas de material biológico es una importante limitación en la purificación de enzimas de estos parásitos.

En la Tabla III se presenta un resumen del aislamiento de las tres fracciones enzimáticas. De acuerdo a esta Tabla, mediante este protocolo de purificación se obtuvo una actividad específica de las Fracciones A, B y C correspondiente a 536, 154 y 322 unidades/mg, respectivamente. Notese que la actividad DNA polimerásica de la fracción C fue ensayada con el substrato sintético poli(dC)-oligo(dG). Una etapa clave en la separación de la fracción C de las otras dos actividades, fue la cromatografía en DEAE-celulosa, tal como se ilustra en el esquema (Fig.6) y la Tabla de purificación correspondiente. Esto originó que dicha fracción se separara tempranamente de las otras dos. En cambio, las fracciones A y B copurificaron durante varias etapas hasta llegar a la segunda columna de fosfoceululosa, mediante la cual fueron claramente separadas por su elusión a diferentes concentraciones de KCl (Fig.7). En contraste con esta situación, las fracciones A y C eluyeron a similares condiciones de fuerza iónica, alrededor de 150 mM de KCl, en este mismo tipo de cromatografía (Fig.7).

Tabla III

Aislamiento de DNA polimerasas fracción A, B y C de *Trypanosoma cruzi*

Etapa	Facción	Volumen Proteínas (ml)	(mg)	Actividad (Unidades)	Actividad específica (Unidades/mg)
Extracto	S ₁₀	110	1276	660	0,52
1ª Fosfofelulosa	I-P11	350	116	2.520	21,7
DEAE-Celulosa-Fracción no retenida	DEAE-NR	320	45,1	1.280	28,4
DNA-Celulosa	dsDNA-Cel	11,5	2,77	1.256	453
2ª Fosfofelulosa::					
Facción A	II-P11-A	15,5	1,12	600	536
Facción B	II-P11-B	8,0	0,27	41,6	154
DEAE-Celulosa-Fracción retenida	DEAE-R ^b	16	8,6	832	97
Heparina-Agarosa	HEP-ag	12	5,0	780	156
2ª Fosfofelulosa-Fracción C	II-P11-C	20	2,3	740	322

^a Una unidad de actividad DNA polimerásica fue definida como la cantidad de enzima necesaria para catalizar la incorporación de un nmol de dNTP totales, cuando DNA activado o poli(dC)-oligo (dG) fue utilizado como sustrato, de acuerdo a las condiciones descritas en Materiales y Métodos

^b Las fracciones DEAE-R, HEP-ag, II, P11-C fueron ensayadas con poli(dC)-oligo (dG).

Es importante señalar que no se pudo realizar una estimación adecuada del número de veces que cada fracción fue purificada debido a la fuerte inhibición de la actividad DNA polimerásica en el extracto total (Fracción S₁₀).

Análisis de las DNA polimerasas fracciones A y C mediante sedimentación en gradientes de glicerol.

Con el objetivo de estimar la masa molecular de las DNA polimerasas nativas purificadas de *T. cruzi* se realizaron estudios en gradientes de glicerol (Fig.8). El análisis de la Fracción A mostró un perfil de sedimentación caracterizado por un pico único de actividad cuya masa molecular estimada correspondió a aproximadamente 45 kDa (gráfico A). En cambio el análisis de la fracción C mostró un perfil más heterogéneo caracterizado por un pico mayoritario de actividad y un significativo nivel basal de actividad de alta velocidad de sedimentación (gráfico B). La masa molecular estimada del pico mayoritario correspondió a aproximadamente 100 kDa. Debido a la inestabilidad de la DNA polimerasa B no fue posible estimar la masa molecular nativa de esta fracción enzimática.

Utilización de distintos tipos de matrices como DNA sustrato por las DNA polimerasas fracción A, B y C.

Como se observa en la Tabla IV, las fracciones enzimáticas A y B pueden utilizar diversos tipos de matrices, sin embargo mostraron una significativa diferencia en la preferencia por ellas. Así la fracción A presentó mayor actividad con poli(dC)-oligo(dG), en cambio la fracción B fue más activa con DNA activado. A diferencia de lo observado con las fracciones enzimáticas anteriores, la fracción C

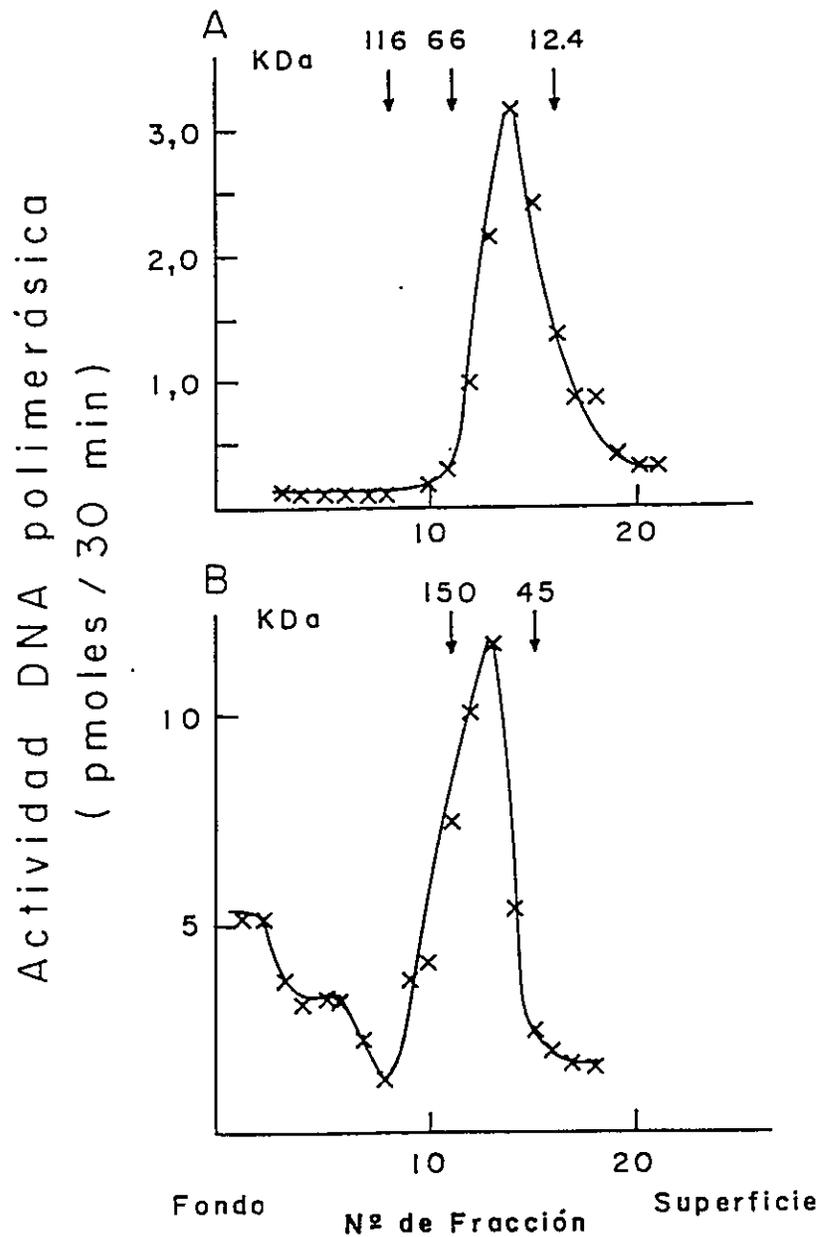


Fig.8. Análisis mediante sedimentación en gradientes de glicerol de las DNA polimerasas fracción A y C. Alícuotas de 200 μ l de la fracción A y 250 μ l de la fracción C fueron analizadas en gradientes de glicerol de 10-30% y 20-40%, respectivamente, conteniendo 0,2 M KCl. La fracción A y C correspondieron a muestras de la segunda fosfoelulosa (II-P11-A) y heparina-agarosa (Hep.-ag.), respectivamente (ver Fig.6).

Tabla IV
Utilización de distintas matrices-partidores por las DNA polimerasas
fracciones A, B y C de *Trypanosoma cruzi*

Matriz - Partidor	$[^3\text{H}]d\text{NTP}$	Actividad DNA polimerásica (nmol/h / mg proteínas)		
		Fracción:		
		A	B	C
DNA activado	dTTP	536	154	24,4
Poli(dC)-oligo(dG)	dGTP	592	71	322
Poli(dA)-oligo(dT)	dTTP	432	52	0
Poli(dT)-oligo(A)	dATP	0	0	0

Las fracciones enzimáticas A, B y C corresponden a las fracciones
II - P11 - A, II - P11 - B y II - P11 - C, respectivamente (Ver tabla III).

mostró una fuerte preferencia por el sustrato sintético poli(dC)-oligo(dG), no se detectó actividad con poli(dA)-oligo(dT) y, sólo una leve actividad se observó con DNA activado. Ninguna de las fracciones enzimáticas fue activa con el sustrato poli(dT)-Oligo(A).

Estudio de la DNA polimerasa fracción A mediante inmuno precipitación con antisueros generados en contra de las fracciones A, B y C.

Con el objetivo de establecer el grado de similitud estructural que podría existir entre estas tres fracciones enzimáticas, se realizaron estudios de inmunoprecipitación con antisueros generados en contra de dichas fracciones (Fig.9). La figura muestra un experimento de inmunoprecipitación en el cual la DNA polimerasa fracción A fué incubada con distintas diluciones de antisueros en contra de las fracciones A, B y C. Los complejos inmunes formados en dicha incubación fueron inmunoprecipitados con *Staphylococcus aureus* conteniendo proteína A. Los resultados de la figura se expresaron como el porcentaje de actividad remanente en los sobrenadantes respecto a un control realizado en las mismas condiciones con suero preinmune. El gráfico muestra que la mayor pérdida de actividad en el sobrenadante ocurrió con el suero anti DNA polimerasa A en todas las diluciones ensayadas.

Con el objetivo de identificar la entidad molecular correspondiente a la DNA polimerasa A, y establecer el grado de homología estructural y bioquímica que existe con las DNA polimerasas descritas en eucariotes superiores, se procedió a purificar a homogeneidad esta molécula.

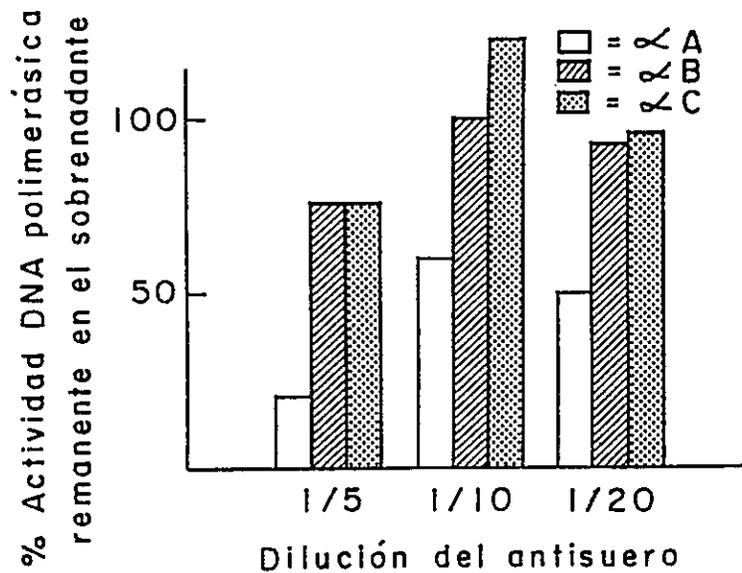


Fig.9. Inmunoprecipitación de la DNA polimerasa fracción A con sueros inmunes contra las fracciones A, B y C. Alícuotas de 5 μ l de la DNA polimerasa fracción A fue incubada con los distintos sueros e inmunoprecipitada con proteína A, tal como se describió en Materiales y Métodos. Los resultados del histograma representan el porcentaje de actividad DNA polimerásica remanente en los sobrenadantes, después de ser inmunoprecipitados con los distintos sueros. Dichos porcentajes se calcularon respecto al promedio de varios controles realizados con sueros preinmunes.

Capítulo II: Purificación cercana a homogeneidad y caracterización de una DNA polimerasa tipo β de *T. cruzi*.

El protocolo utilizado en este caso fue muy similar al utilizado para aislar las tres fracciones con actividad DNA polimerásica descrito anteriormente. Dos fueron las modificaciones fundamentales que se introdujeron. La primera de ellas consistió en eluir selectivamente a la actividad DNA polimerásica fracción A, desde la primera etapa de purificación. Para lograr esto se eluyó la primera columna de fosfocelulosa con un intervalo de fuerza iónica entre 0,1 y 0,2 M KCl. La segunda modificación consistió en aumentar al máximo la capacidad de separación de la columna de DNA-celulosa, para lo cual esta columna se eluyó con un amplio gradiente de fuerza iónica, a diferencia del protocolo general en el cual esta columna se eluyó en una sola etapa con 600 mM KCl.

Con este esquema de purificación se obtuvo en pocas etapas una preparación de DNA polimerasa con una actividad específica de 6,705 unidades/mg, un rendimiento de 28,8% (Tabla V) y un porcentaje de pureza estimado mediante densitometría (Amaro y col., 1994) de 85%. Tal como se observó en el caso anterior, la actividad DNA polimerásica en el extracto fue muy inhibida por factores de naturaleza desconocida, la mayoría de los cuales fueron removidos en el primer paso de purificación (Fracción II).

Análisis de las diferentes etapas de purificación mediante electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturantes.

Alícuotas de cada fracción provenientes de las diferentes etapas

Tabla V Purificación de una DNA polimerasa tipo β de *Trypanosoma cruzi*

Fracción	Etapa	Volumen		Proteínas		Actividad ^a		Rendimiento
		ml		mg		Unidades total	Actividad específica	
I	Extracto	60		654		1.224	1,87	ND ^b
II	1 ^a Fosfocelulosa	70		29,7		2.212	74,5	100
III	DEAE-celulosa	66		9,0		2.746	305	124
IV	DNA-celulosa	120		0,216		1.344	6.222	61
V	2 ^a Fosfocelulosa	2.5		0,095		637	6.705	28,8

^a Todos los ensayos fueron realizados usando DNA activado, de acuerdo como se describió en Materiales y Métodos

^b No determinado

de purificación fueron sometidas a electroforesis (Fig.10). Los patrones electroforéticos muestran que la fracción más purificada tiene una banda mayoritaria de 50 kDa y otra minoritaria de 45 kDa (carril 4).

Identificación del polipéptido catalítico de la DNA polimerasa de *T.cruzi*. Alícuotas de las diferentes fracciones eluidas desde la columna de DNA-celulosa fueron analizadas mediante electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalantes (Fig.11). La figura muestra una clara correlación entre el polipéptido de 50 kDa y la actividad DNA polimerasa determinada en dichas fracciones. Mas aún, esta figura también muestra que en las fracciones más activas sólo la cadena polipeptídica de 50 kDa está presente (carriles 13 y 14). La proteína de 45 kDa se une más fuertemente a la columna y eluye después del pico de actividad enzimática (carril 16).

Con el objetivo de identificar directamente la banda de proteína que correspondía a la DNA polimerasa de baja masa molecular de *T.cruzi*, se desarrolló una técnica colorimétrica para detectar actividad DNA polimerásica "in situ" en muestras analizadas por electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalante (Venegas y Solari, 1994). Fracciones enzimáticas de diferentes etapas de purificación se analizaron mediante geles de actividad (Fig.12). La figura muestra que las fracciones más purificadas presentan una única banda de actividad DNA polimerásica correspondiente al polipéptido de 50 kDa.

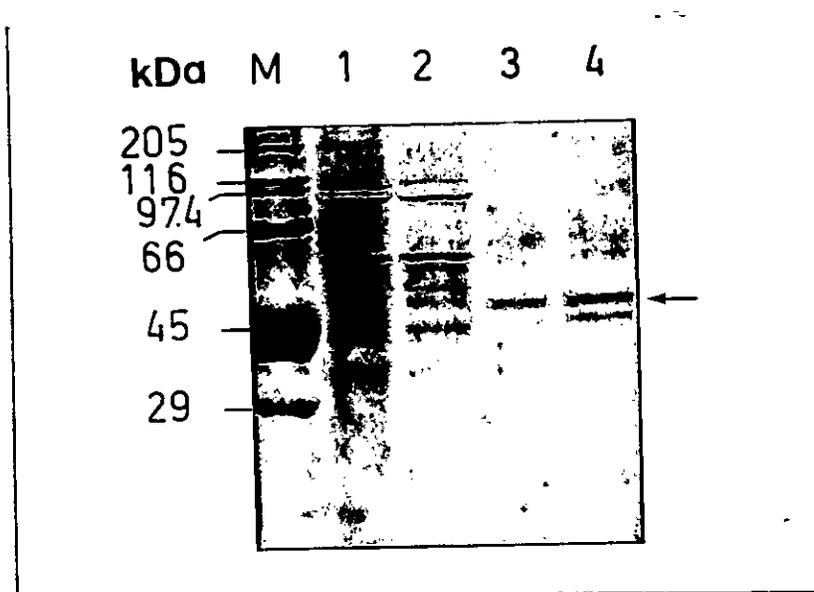


Fig.10. Análisis electroforético en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalantes de muestras procedentes de distintas etapas de purificación de la DNA polimerasa de baja masa molecular de *T.cruzi*. Los carriles 1-4 corresponden a las siguientes muestras: Fracción II (2,1 μg), Fracción III (0,8 μg), Fracción IV (0,2 μg) y Fracción V (0,4 μg). Las proteínas fueron evidenciadas por tinción con azul de Coomassie. El carril M corresponde a los marcadores de masa molecular siguientes: anhidrasa carbónica (29 kDa), ovalbúmina (45 kDa), BSA (66 kDa), fosforilasa b (97,4 kDa), β -galactosidasa (116 kDa) y miosina (205 kDa). Todos los procedimientos se realizaron de acuerdo a como se describió en Materiales y Métodos.

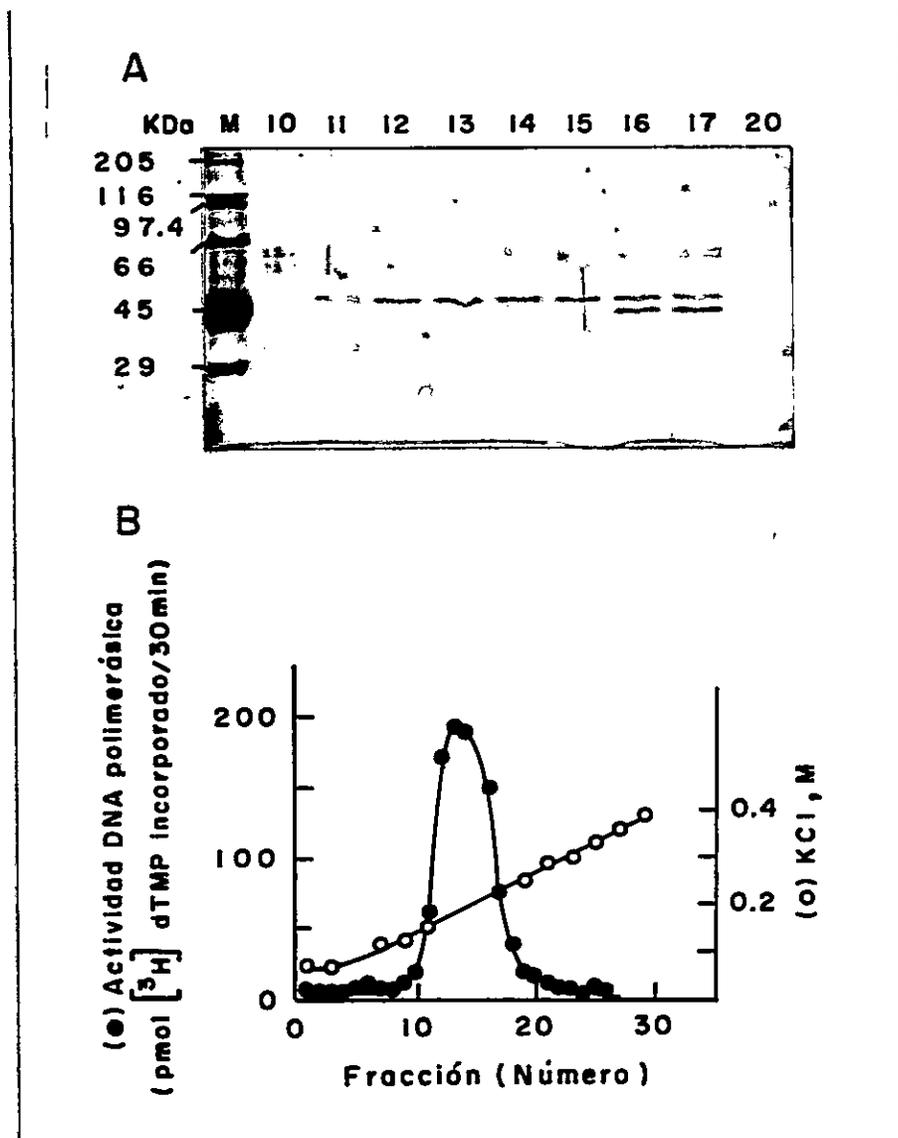


Fig.11. Correlación entre actividad DNA polimerásica eluida desde una columna de DNA-celulosa y el análisis electroforético en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturantes. Alícuotas de 5 μ l de fracciones eluidas de la mencionada columna (Fig.B) fueron analizadas mediante electroforesis y teñidas con azul de Coomassie (Fig.A), tal como fue descrito en Materiales y Métodos. Los números de los carriles en la Figura A corresponden a las fracciones eluidas de la columna (Fig.B). Carril M, marcadores de masa molecular.



Fig.12. Identificación del polipéptido catalítico de la DNA polimerasa de baja masa molecular de *T.cruzi*. Mediante una técnica colorimétrica que detecta actividad DNA polimerásica "in situ" en muestras sometidas a electroforesis en condiciones desnaturalantes, se analizaron las siguientes muestras: Carril 1, Fracción II (2,1 μ g); carril 2, Fracción III (0,8 μ g); carril 3, Fracción IV (0,2 μ g); carril 4 Fracción V (0,4 μ g) y carril 5, Fragmento Klenow (2 ng). El carril 0 corresponde a Fracción V (0,4 μ l) teñida con azul de Coomassie. Todos los procedimientos se realizaron tal como fue descrito en Materiales y Métodos.

Análisis mediante técnica de "Western-blot" de fracciones correspondientes a diferentes etapas de purificación de la DNA polimerasa de *T.cruzi*.

Las mismas fracciones mostradas en la Figura 12 fueron estudiadas por técnica de "Western-blot". Las muestras fueron sometidas a electroforesis, transferidas a filtros de nitrocelulosa e incubadas con sueros de conejos anti DNA polimerasa fracción A altamente purificada. Luego, los filtros de nitrocelulosa se incubaron con un segundo anticuerpo anti IGg de conejo, conjugado a fosfatasa alcalina. Se observa en la Figura 13, que el antisuero reconoce fuertemente el polipéptido de 50 kDa y que presenta una reacción débil pero significativa contra el péptido de 45 kDa (carril 4), el cual no fue detectado en las fracciones menos purificadas (carriles 1 y 2). También es importante mencionar que en ninguna de las fracciones analizadas se detectó reacción cruzada con moléculas de mayor masa molecular. Resultados similares se obtuvieron usando un extracto crudo de epimatigotes de *T.cruzi* (datos no mostrados). En conjunto estos resultados apoyan fuertemente la idea que el polipéptido de 50 kDa correspondería a una DNA polimerasa intacta de baja masa molecular de *T.cruzi*.

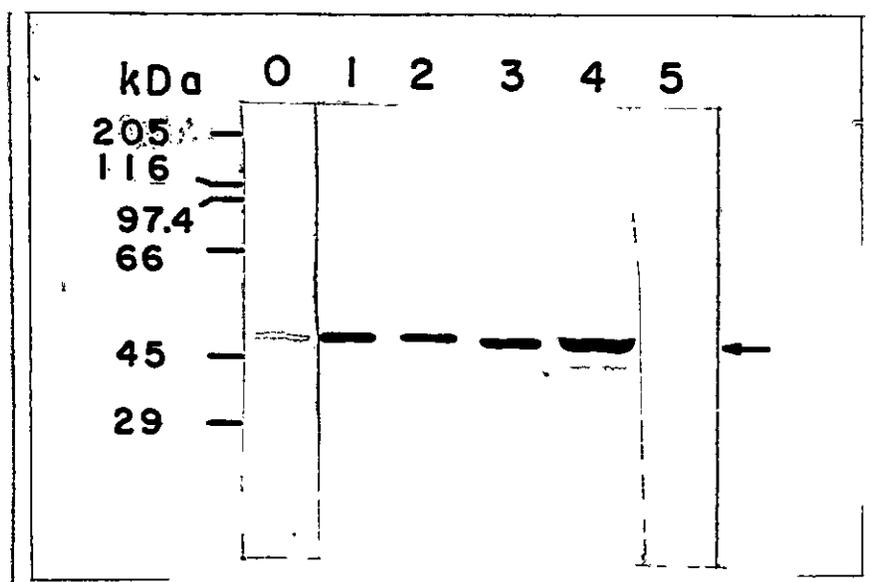


Fig.13. Análisis mediante "Western-blot" de muestras procedentes de diferentes etapas de purificación de la DNA polimerasa de baja masa molecular de *T.cruzi*. El estudio se realizó utilizando un antisuero contra una fracción extensamente purificada de esta enzima (carriles 1-4), suero preinmune (carril 5) y tinción con tinta china (carril 0), de acuerdo a los procedimientos descritos en Materiales y Métodos. Carril 1, Fracción II (2,1 μg); carril 2, Fracción III (0,8 μg); carril 3, Fracción IV (0,2 μg) y carriles 0, 4 y 5, Fracción V (0,4 μg). La dilución de ambos sueros fue de 1:200.

Caracterización de la DNA polimerasa de baja masa molecular de *T.cruzi* mediante la utilización de inhibidores.

Para investigar si esta DNA polimerasa de *T.cruzi* posee características análogas a alguna de las DNA polimerasas descritas en vertebrados, se analizó el efecto de algunos inhibidores clásicos de DNA polimerasas (Fig.14). Como enzima control de estos estudios se utilizó una DNA polimerasa α parcialmente purificada de oocitos de *Xenopus laevis* (ver Materiales y Métodos). La Figura 14 muestra que afidicolina, el inhibidor clásico de las DNA polimerasas α , δ y ϵ (Burgers, 1989; Wang, 1991; Kornberg y Baker, 1991), no tiene efecto en la enzima de *T.cruzi*. Por el contrario, la enzima control de *X.laevis* fue inhibida a niveles comparables a los descritos en la literatura (Nelson y col., 1983). Resultados análogos se observaron al usar un inhibidor específico de las DNA polimerasa tipo α , como el BuPdGTP (Burgers, 1989; Wang, 1991).

El agente intercalante bromuro de etidio es utilizado para identificar a las DNA polimerasas γ , debido a que esta enzima es fuertemente inhibida por esta droga (Fry, 1983; Tarragó-Litvak, 1978). La Figura 14 muestra que, a la máxima concentración de esta droga, la DNA polimerasa de *T.cruzi* sólo se inhibió en alrededor de un 30%. A diferencia de la enzima de *X.laevis* la cual fue más sensible, aunque sólo a concentraciones muy alta de este fármaco se logró una inhibición de más de un 50%. Es importante mencionar que una típica DNA polimerasa γ de vertebrado es casi completamente inhibida por concentraciones de bromuro de etidio a 20 μ M (Tarragó-Litvak, 1978). En este intervalo la

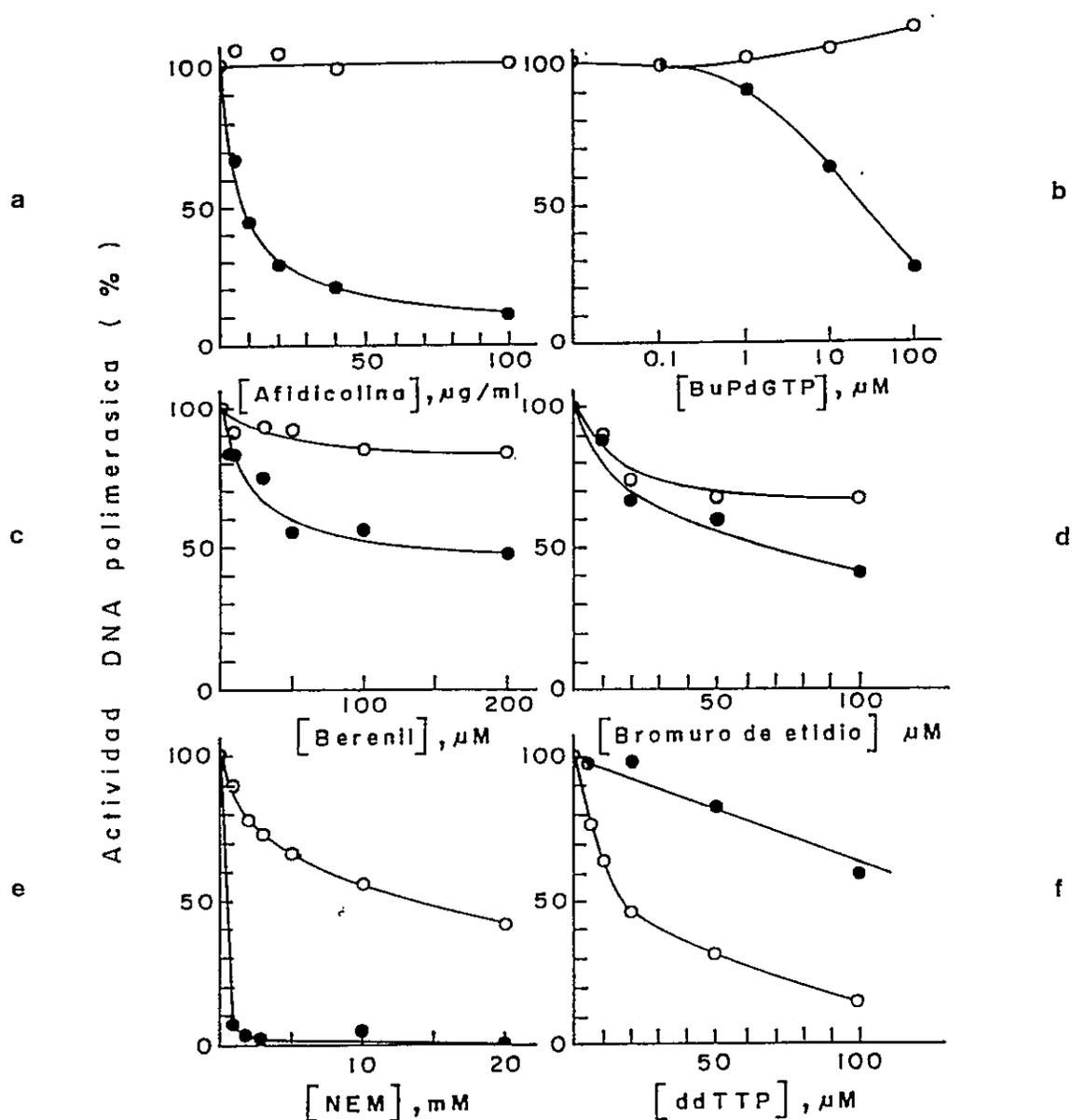


Fig.14. Efecto de inhibidores sobre la actividad enzimática de la DNA polimerasa de baja masa molecular de *T. cruzi*. En cada ensayo se utilizó 0,5 unidades de la fracción V de la enzima de *T. cruzi* (o) y 0,5 unidades de la DNA polimerasa α parcialmente purificada de *Xenopus leavis* (●), utilizada como enzima control. Todos los ensayos se realizaron con DNA activado de acuerdo a las condiciones estipuladas en cada caso: a) experimento con afidicolina, ensayo con 5 μM dCTP y 4% DMSO procedente de cada muestra del inhibidor, b) experimento con BuPdGTP, ensayo con 10 μM dGTP, c) y d) ensayo en condiciones estandar, e) experimento con N-etilmaleimida (NEM), ensayo sin DTT y f) experimento con ddTTP, ensayo con 10 μM dTTP. Las muestras fueron preincubadas con los respectivos inhibidores a 4°C por 30 min antes de echar a andar la reacción enzimática. Con excepción de las modificaciones señaladas, todos los ensayos se realizaron de acuerdo a las condiciones descritas en Materiales y Métodos.

enzima de *T.cruzi* sólo fué inhibida alrededor de un 25% (Fig.14).

Otro agente intercalante usado fue el Berenil. Los primeros estudios "in vivo" realizados con esta droga en *Trypanosoma brucei*, mostraron una fuerte inhibición de la síntesis de DNA mitocondrial del parásito (Newton y Le Page, 1967). Los resultados muestran que la DNA polimerasa de *T.cruzi* es débilmente inhibida por este compuesto. En todo el intervalo de concentración utilizado el máximo porcentaje de inhibición no fue superior a un 20%.

N-etilmaleimida (NEM) es utilizado para identificar a las DNA polimerasas de tipo β de vertebrados, ya que es la única resistente a esta droga (Fry, 1983; Hubscher, 1984; Burgers, 1989; Wang, 1991; Kornberg y Baker, 1992). Se ha encontrado que a 10 mM de NEM, y en ausencia de reductores de grupos sulfidrilos, las DNA polimerasas tipo β de vertebrados conservan, al menos, el 65% de su actividad (Waser y col., 1979). La Figura 14 muestra que a dicha concentración, la DNA polimerasa de *T.cruzi* conserva más del 50% de su actividad, e incluso al doble de esa concentración, la actividad enzimática no fué inferior a 40%. Por el contrario, a concentraciones muy bajas de NEM la DNA polimerasa α de *X.laevis* es fuertemente inhibida a niveles comparables a los descritos en la literatura para una preparación enzimática similar (Nelson y col., 1983).

En contraste con los resultados anteriores, ddTTP provocó los mayores niveles de inhibición de la DNA polimerasa de *T.cruzi* (Fig.14). A concentraciones tan bajas como 20 μ M, correspondiente a una proporción de dTTP:ddTTP de 1:2, se logró una inhibición de más del 50% de la actividad enzimática. Por el contrario, a la misma

concentración de esta droga, la enzima de *X.laevis* se inhibió sólo en un 10%. Sin embargo, el nivel de sensibilidad de la enzima de *T.cruzi* a dTTP, está lejos de los descritos para DNA polimerasas β de vertebrados, pues razones de concentración dTTP:dTTTP= 1, pueden inhibir completamente a dichas enzimas (Fry, 1983).

Utilización de matrices de DNA.

La Tabla VI muestra que el mejor templado para la DNA polimerasa de *T.cruzi*, fue el DNA activado de timo de ternera, independientemente del metal bivalente utilizado como cofactor. Sin embargo, cuando se utilizó como sustrato homopolímeros sintéticos, la actividad enzimática dependió del tipo de metal bivalente usado como cofactor. El caso más claro se observó con poli(dA)-oligo(dT), en el cual la enzima de *T.cruzi* fue casi diez veces más activa con Mn^{2+} que con Mg^{2+} . Es importante puntualizar que con ninguno de estos cationes se pudo detectar actividad con el sustrato poli(dT)-oligo(A), en cambio la enzima de *X.laevis* alcanzó niveles elevados de actividad. Mas aún, estos resultados indican que esta diferencia entre las dos enzimas se debe a la naturaleza del partidó, pues cuando se utilizó el mismo DNA molde hibridizado con el polímero de desoxinucleótido, oligo(dA), la enzima de *T.cruzi* alcanza un nivel significativo de actividad.

Poli(A)-oligo(dT) fue un muy mal sustrato para la enzima de *T.cruzi* (Tabla VI). Este hecho no se debería al partidó oligo(dT), pues el mismo partidó hibridizado con el polímero de desoxinucleótido, poli(dA), permite que este sustrato sea eficientemente utilizado por

Tabla VI

Utilización de distintos tipos de matrices por la DNA polimerasa tipo β de *Trypanosoma cruzi* y una DNA polimerasa α de ovarios de *Xenopus laevis*

Matriz	Partidor	$[^3\text{H}]d\text{NTP}$	Actividad DNA polimerásica			
			Tipo β		α	
			Mg ²⁺	Mn ²⁺	Mg ²⁺	Mn ²⁺
DNA activado	—	dTTP	285	332	928	159
Poli (dA)	Oligo(dT) ₁₂₋₁₈	dTTP	5,9	52	117	56
Poli (A)	Oligo(dT) ₁₂₋₁₈	dTTP	ND ^b	6,3	ND	40
Poli (dT)	Oligo(A) ₁₂₋₁₈	dATP	0	0	357	400
Poli (dT)	Oligo(dA) ₉	dATP	12,5	21	0	5,4
Poli (dC)	Oligo(dG) ₁₂₋₁₈	dGTP	56	28	82	120

^aLos ensayos fueron realizados utilizando alrededor de 0,3 unidades de la DNA polimerasa de *T. cruzi* (Fracción V) y 0,9 unidades de la DNA polimerasa α parcialmente purificada de *X. laevis*, de acuerdo a como se describió en Materiales y Métodos

^bNo determinado

dicha enzima. Estos resultados indican que, en estas condiciones el ribopolímero poli(A) es un sustrato pobre para esta enzima. Se descarta la posibilidad que estos resultados se deban a degradación del poli(A) ó a una hibridación deficiente entre poli(A) y oligo (dT), debido a que alícuotas del mismo sustrato son utilizadas eficientemente por la preparación enzimática de *X. laevis*.

Capítulo III: Clonamiento del gen de la DNA polimerasa tipo β de *T.cruzi*.

Microsecuenciación de varios péptidos de la DNA polimerasa tipo β de *T.cruzi* y su similitud con distintos segmentos de la estructura primaria de la DNA polimerasa β de rata.

Muestras de DNA polimerasa tipo β de *T.cruzi* fueron microsecuenciadas por el Dr. Ulf Hellman del Instituto Ludwig, Uppsala, Suecia, de acuerdo al procedimiento descrito en Materiales y Métodos. En la Fig.15 se muestra la secuencia aminoacídica de cinco péptidos procedentes de la enzima de *T.cruzi* comparados con segmentos de la DNA polimerasa de rata descrita en la literatura (Matsukage y col., 1987). La comparación se realizó mediante un programa de computación (UWGCG, BESFIT, Deverux y col., 1984) que busca el mayor grado de similitud entre dos secuencias. Los péptidos de la enzima fueron denominados con los números 18, 21, 27 y 30. Los porcentajes de similitud se refieren al número total de aminoácidos que tienen similar ó idéntica composición química (I, :). Los porcentajes de identidad sólo consideran el número de aminoácidos idénticos (I). Nótese que un péptido que tenga un alto porcentaje de similitud no necesariamente implica un alto porcentaje de identidad. Por ejemplo, en el péptido 21 la identidad sólo alcanzó un 20%, correspondiendo a la mitad del porcentaje de similitud. Otro aspecto muy importante a tener en cuenta en la comparación de dos secuencias, es que tanto los porcentajes de similitud como los de identidad dependen del largo de la secuencias comparadas. Así por ejemplo, si se comparara sólo siete aminoácidos del péptido 27 y se considerara el

1	AIQELTQVHGFGPR	14	Péptido 18
96	SINFLTRVTGIGPS	109	DNA pol.β rata
Porcentaje de Similitud 57,143		Porcentaje de Identidad: 50,000	
1	NYLEATMAQG	10	Péptido 21
	:		
222	RFITDTRSKG	231	DNA pol.β rata
Porcentaje de Similitud 40,000		Porcentaje de Identidad: 20,000	
1	SVPTALLTFTGS	12	Péptido 27
	:		
264	QYYCGVLYFTGS	275	DNA pol.β rata
Porcentaje de Similitud 58,333		Porcentaje de Identidad: 41,167	
1	VEDSGDVDG	9	Péptido 30
185	AESSGDMDV	193	DNA pol. β rata
Porcentaje de Similitud 55,555		Porcentaje de Identidad: 55,555	

Fig.15. Comparación de distintos péptidos de la DNA polimerasa tipo β de *Trypanosoma cruzi* con segmentos de la estructura primaria de la DNA polimerasa β de rata. Las líneas verticales (|) indican aminoácidos idénticos y dos puntos indican aminoácidos químicamente similares (:). El porcentaje de identidad se calcula considerando exclusivamente los aminoácidos idénticos. El porcentaje de similitud se calcula considerando los aminoácidos idénticos y similares (:). Los números a cada lado de la secuencia aminoacídica de la DNA polimerasa β de rata, indican la posición del aminoácido inicial y final del segmento analizado. La comparación se realizó utilizando el programa de computación UWGCG Bestfit (Ridley y col., 1991).

segmento del residuo 6 al 12, los porcentajes de similitud e identidad serían de 85,71 y 71,42%, respectivamente. Mucho mayores que los porcentajes de 58,33 y 41,16% observados con el péptido completo. Si se considera el promedio de los valores de similitud e identidad de todos los péptidos analizados se obtiene los porcentajes de 52,8 y 38,9%, respectivamente. Suponiendo que dichos valores reflejan los grados de similitud e identidad que existe entre la DNA polimerasa tipo β de *T.cruzi* y su homóloga de rata, sería esperable que al comparar otras secuencias de ambas enzimas, los valores de similitud e identidad se mantuvieran dentro de los rangos promedio señalados. Sin embargo, considerando las variaciones que se observan en la comparación de los diferentes péptidos, es posible esperar que entre las enzimas de ambas especies existan regiones con grandes diferencias en el grado de identidad.

La localización de dichos péptidos de *T.cruzi*, con respecto a la estructura primaria de la DNA polimerasa de rata (Matsukage y col., 1987), se muestra en la Figura 16. Se observa que todos ellos estarían distribuidos en una región que abarcaría todo el sub-dominio central y parte importante del sub-dominio N-terminal. Esta región comprende 179 aminoácidos lo que equivale al 53,4 % de la enzima de rata. Se observa que los péptidos que flanquearían esta región serían los número 18 y 27.

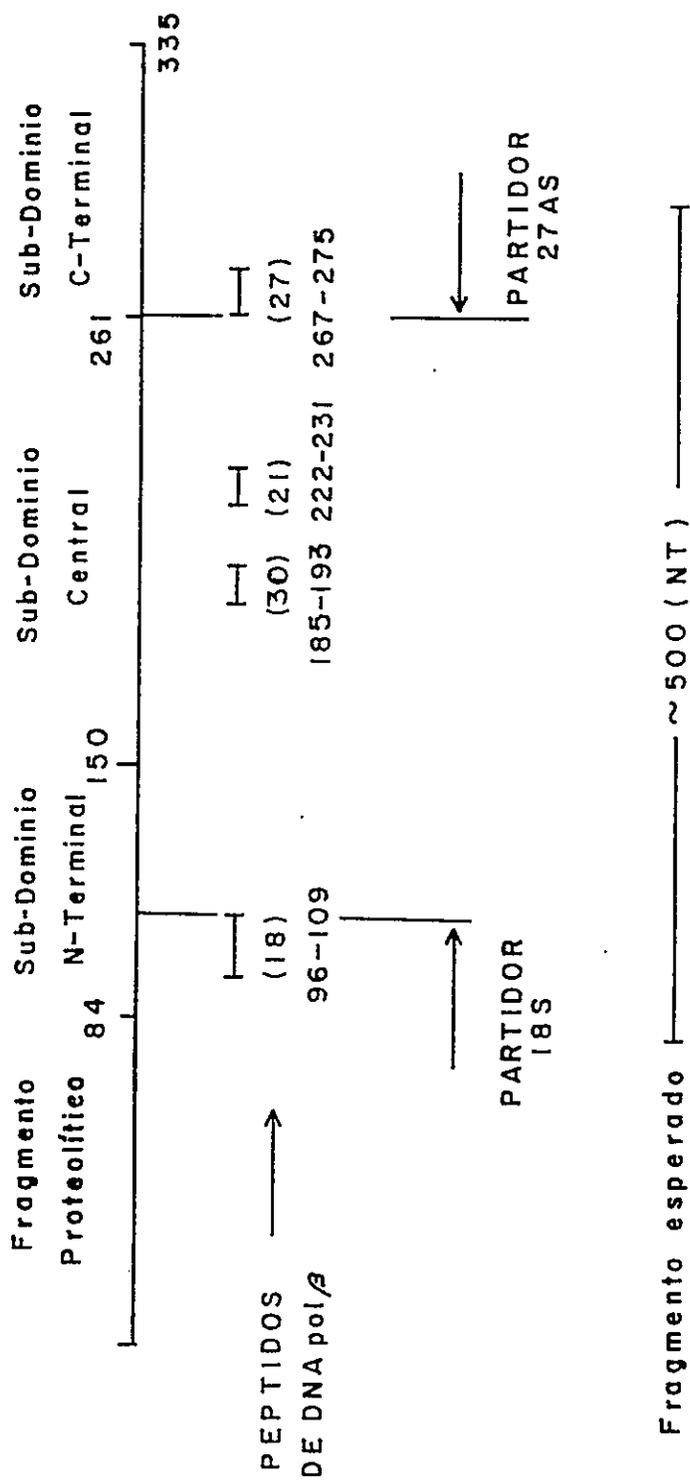


Fig.16. Esquema de la estructura primaria de la DNA polimerasa β de rata y la probable localización de distintos péptidos de la DNA polimerasa tipo β de *T.cruzi*.

Síntesis de los oligonucleótidos degenerados 18s y 27as a partir de la información de la secuencia aminoacídica de los péptidos 18 y 27.

Con el objetivo de clonar el gen de la DNA polimerasa tipo β de *T. cruzi* se sintetizaron oligonucleótidos degenerados a partir de la información de la secuencia aminoacídica de los péptidos 18 y 27. Estos oligonucleótidos, denominados 18s y 27as (Fig.17) corresponden a mezclas de oligonucleótidos con las secuencias alternativas de los distintos codones que codifican para un determinado aminoácido. En la figura, el nucleótido alternativo para un determinado codón se muestra entre paréntesis. Es importante destacar que en la síntesis de los oligonucleótidos no sólo se consideró el grado de similitud entre las secuencias aminoacídicas comparadas, sino que también el grado de degeneración de los codones que codifican para los aminoácidos de un determinado péptido. Por tal motivo nótese, que en el caso del péptido 18 sólo se consideraron 7 aminoácidos y correspondió a la secuencia que se muestra en la figura. En el caso del péptido 27, se consideraron casi todos los aminoácidos. Cuando el codón correspondiente resultó demasiado degenerado se reemplazó las distintas alternativas con un nucleótido de Inosina (I). Finalmente los oligonucleótidos del partidor 18s y 27as, correspondieron a secuencias a favor o en contra del sentido 5'→3' del gen de la DNA polimerasa de rata, tal como se muestra en la Figura 17.

SEGMENTO DE PEPTIDO 18

6 T - Q - V - H - G - F - G 14

5'- ACI CA(G/A) GTI CA(C/T) GGI TT(C/T) GG -3' : PARTIDOR 18s

SEGMENTO DE PEPTIDO 27

3 P - T - A - L - L - T - F - T - G 13

5'- CCI AC(G/A) GCI CTI CTI AC(G/A) TT(C/T) AC(G/A) GG_ -3': SECUENCIA
NUCLEOTIDI
DEDUCIDA3'- GGI TG(C/T) CGI GAI GAI TG(C/T) AA(A/G) TG(C/T) CC_ -5': PARTIDOR
ANTISENTID
27 (27as)

Fig.17. Oligonucleótidos degenerados sintetizados a partir de las secuencia de los péptidos 18 y 27 de la DNA polimerasa tipo β de *T.cruzi*. Los aminoácidos de la secuencia aminoácídica de los péptidos se representa con una sólo letra. Notese que sólo se consideró un segmento de cada péptido indicado por el residuo inicial y final, en cada caso (ver Fig.16). Los oligonucleótidos, denominados 18s y 27as, se utilizaron en técnicas de PCR con el fin de detectar el gen de la DNA polimerasa tipo β de *T.cruzi*.

Amplificación mediante PCR de un fragmento específico de 550 pares de bases utilizando los partidores 18s y 27as.

En la Figura 18 se muestran los productos de PCR obtenidos del análisis de una genoteca λ gt11 de cDNA y muestras de DNA genómico de epimastigotes de *T. cruzi*. Tanto el cDNA de la genoteca como las muestras de DNA provienen de parásitos de la cepa Tulahuén (Aslund y col., 1994). En la figura se observa que de las muestras de cDNA se obtuvieron tres productos de amplificación, uno mayoritario de aproximadamente 360 pares de bases (pb) y otros dos productos de menor intensidad de 490 y 550 pb (carril 2). En cambio, el análisis del DNA genómico arrojó como resultado un único e intenso producto de amplificación específico de 550 pb (carriles 9 y 10). La banda difusa y ancha detectada hacia el frente de la migración electroforética podría tener como origen contaminantes de RNA presente en la preparación de DNA genómico, pues no depende de ninguno de los partidores y se encuentra principalmente en las muestras de DNA genómico (carriles 9-12). Sin embargo, no se puede descartar otro origen, como por ejemplo amplificaciones inespecíficas provocada por interacciones entre los partidores y el mencionado DNA, pues al analizar muestras de otro origen, como es el cDNA, también se observaron productos similares a los mencionados anteriormente (carril 6). Lo más importante de este análisis fue que tanto al examinar cDNA como DNA genómico se detectó un producto de 550 pb muy cercano al tamaño esperado, de acuerdo a la localización de los partidores 18s y 27as con respecto al gen de la DNA polimerasa β de rata (Fig. 16).

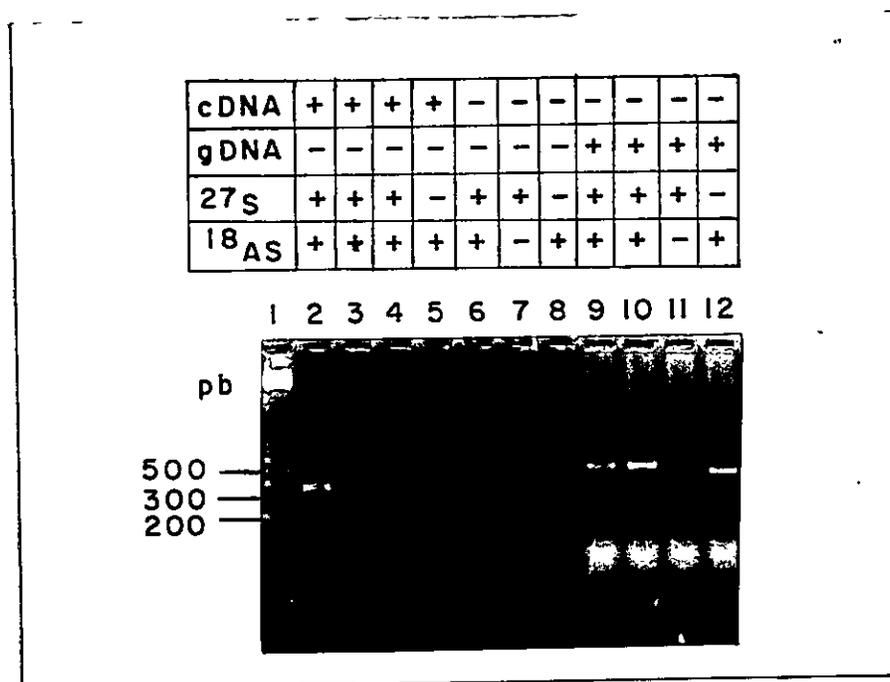


Fig.18. Productos de PCR originados del análisis de una genoteca de cDNA y muestras de DNA genómico utilizando los oligonucleótidos 18s y 27as. Los oligonucleótidos se sintetizaron a partir de la información de péptidos de la DNA polimeras tipo β de *T.cruzi*. La figura corresponde a una electroforesis en un gel de agarosa al 1% y analizando muestras de 5 μ l de cada ensayo de PCR. Los signos + y - simbolizan la presencia ó ausencia de los componentes indicados en el panel de la figura. Todos los procedimientos se realizaron de acuerdo a como fue descrito en Materiales y Métodos. Al costado de la figura se indica el largo, en pares de bases (pb), de los fragmentos del marcador (carril 1).

Clonamiento del producto de amplificación de 550 pb en el vector pT7Blue(r) para ser secuenciado mediante sistema automático.

Con el objetivo de secuenciar y aprovechando el hecho que en general los productos de amplificación originados por la DNA polimerasa Taq poseen en sus extremos 3' uno ó dos desoxinucleótidos extras constituidos por adeninas (Hengen, 1995), se procedió a clonar el fragmento de 550 pb en un vector apropiado que en su sitio de clonamiento 3' posee un desoxinucleotido de timina complementario. El vector utilizado fue el pT7Blue(R) el cual se muestra en la Figura 19. Este vector posee un gen que confiere resistencia a ampicilina y en el cual su sitio de clonamiento para productos de PCR, "sitio T", está localizado en el gen marcador lacZ, coincidiendo con el sitio de restricción para EcoR V. Esto implica que los vectores que transporten insertos no expresaran el péptido lacZ- α , necesario para la generación de una β -galactosidasa activa al complementarse con el fragmento lacZ- ω codificado por la bacteria hospedadora. Esto permite seleccionar entre las bacterias que han sido transformadas con vectores recombinantes (colonias blancas) de las transformadas con plásmidos recircularizado que no transportan ningún inserto (colonias azules), debido a que las primeras, al no poseer una β -galactosidasa activa, no degradan el compuesto cromogénico X-gal.

Es importante mencionar que los partidores utilizados para amplificar insertos clonados en el vector anterior, originan productos de PCR con un largo extra de aproximadamente 200 pb, debido a la distancia de los partidores JS1 y JS2 del sitio de clonamiento.

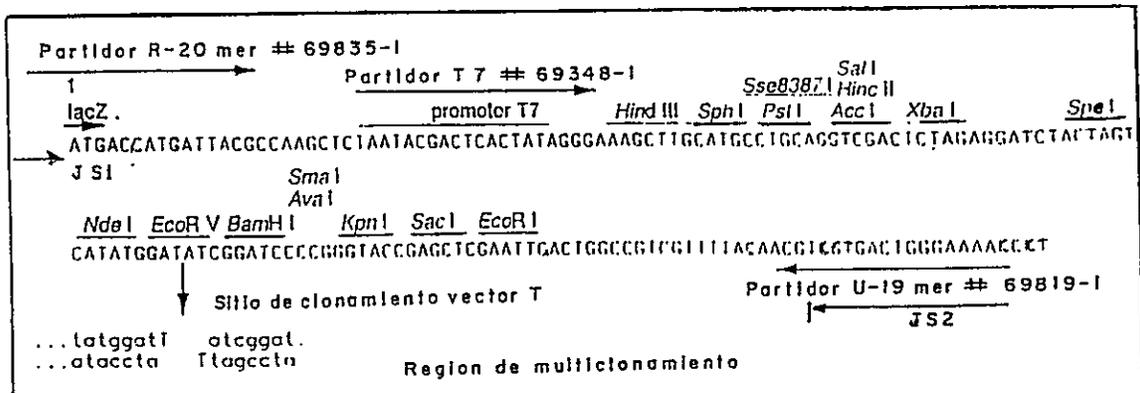
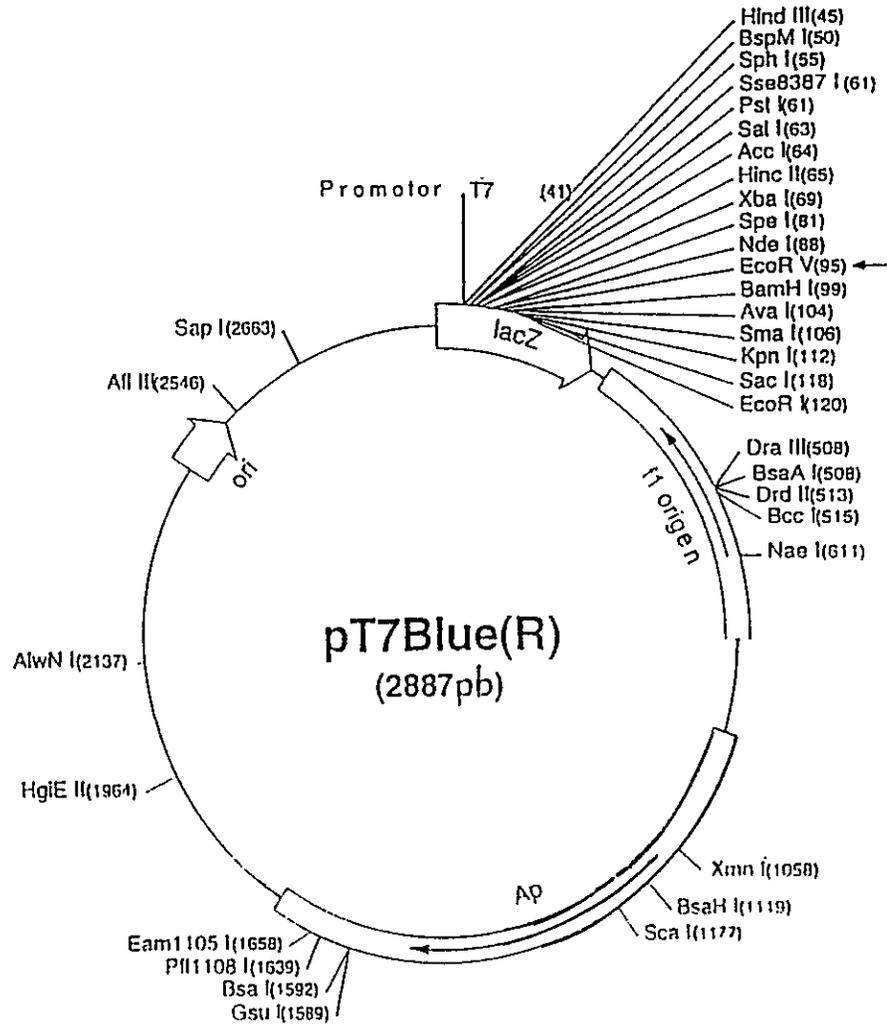


Fig.19. Diagrama del plásmido comercial pT7Blue(R). En la figura se señalan la localización de los partidores JS1 y JS2, y el sitio-T de clonamiento para productos de PCR. También la serie de sitios de restricción, la posición de los genes lacZ y de resistencia a ampicilina Ap, y la localización del origen de replicación (ori) y el promotor T7.

El esquema de clonamiento utilizado para el fragmento de 550 pb se muestra en la Figura 20. Como se puede apreciar, una vez obtenido el producto de 550 pb, se purificó mediante electroforesis en agarosa de bajo punto de fusión y se ligó al vector mencionado anteriormente. Finalmente las bacterias recombinantes se seleccionaron por su fenotipo blanco y análisis de PCR con partidores internos (18s y 27 as) y partidores del vector (JS1 y JS2). Es necesario mencionar que utilizando los partidores JS1 y JS2, los productos de amplificación de los insertos transportados por el plásmido tendrán un segmento extra de aproximadamente 200 pb. Por ejemplo, en la Figura 21 se muestra el análisis de cinco colonias obtenidas durante el clonamiento del fragmento de 550 pb. Cuatro de ellas eran blancas (carriles 2-5) y una azul (carril 6). Se observa que sólo una de las cuatro colonias blancas, denominada 1-4, originó un producto de amplificación de 750 pb, esperado para el clonamiento del fragmento de 550 (carril 5). En cambio, una colonia azul, correspondiente a bacterias que transportan plásmidos no-recombinantes, originó un producto de PCR de aproximadamente 200 pb, esperado para vectores sin insertos.

En la Figura 22 se muestran los productos de PCR generados directamente a partir de la colonia recombinante 1-4 y los partidores para secuenciación automática de la hebra 5'→3', JS1B-JS1 (carriles 2 y 3) y de la hebra complementaria, JS1-JS2B (carriles 4 y 5). Como control negativo, en el carril 6 y 7 se observan los productos

Fragmento de 550 pb amplificado por PCR usando primarios 18S 27A y DNA genómico de epimastigote de *T. cruzi*.



Purificación de fragmento que porta extremos 3'-A



Ligamiento en vector pT7 Blue (R) a través de extremos 3'-T



Transformación de bacterias competentes



Plaqueo



Selección de colonias recombinantes



Mediante fenotipo (Blancas) y análisis por PCR

Fig.20. Esquema de clonamiento del producto de PCR de 550 pares de bases en el vector para secuenciación automática, pT7Blue(R).

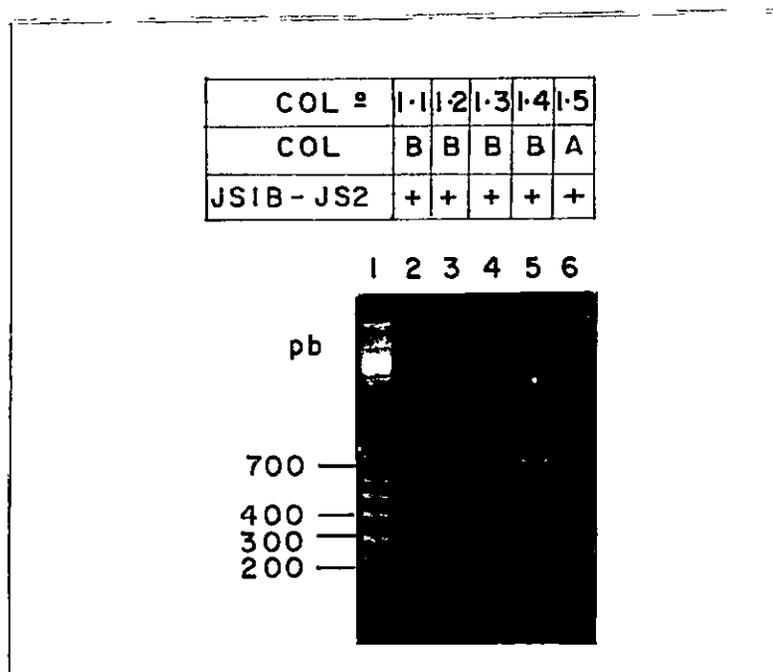


Fig.21. Detección mediante PCR de colonias recombinantes, transformadas con plásmidos pT7Blue(R) conteniendo el inserto de 550 pares de bases. Muestras tomadas directamente de colonias bacterianas fueron analizadas mediante la técnica de PCR con partidores del vector JS1B y JS2 de acuerdo a como fue descrito en Materiales y Métodos. El panel indica el número de distintas colonias (col \square), el fenotipo blanco (B) ó azul (A), y los partidores señalados. Al costado de la figura se indica el largo, en pares de bases (pb), de los fragmentos del marcador (carril 1).

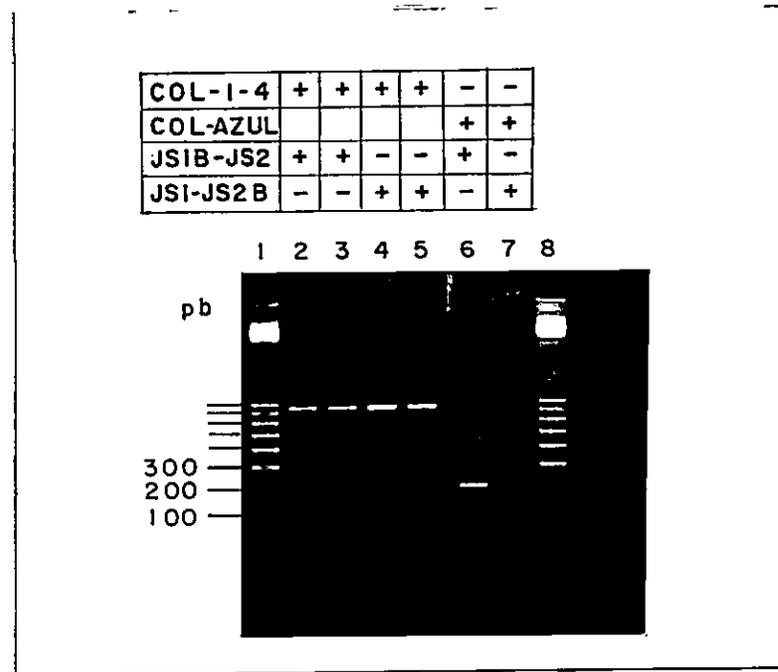


Fig.22. Productos de PCR conteniendo el inserto de 550 pares de bases clonado en el vector pT7Blue(R) para ser sometidos a secuenciación automática (Lagerkvist y col., 1994). El panel indica la colonia analizada y los pares de partidores utilizados. Para la hebra 5'→3', los partidores JS1B-JS2. Para la hebra complementaria, los partidores JS1-JS2B. La figura corresponde a una electroforesis en gel de agarosa al 1% y a muestras de 5 µl, de acuerdo a como fue descrito en Materiales y Métodos. Al costado de la figura se indica el largo, en pares de bases (pb), de los fragmentos del marcador (carril 1).

esperados de amplificación de 200 pb generados por una colonia azul al utilizar el mismo par de partidores descritos anteriormente. Es importante mencionar que la hebra secuenciada será la que porte el partidore biotinilado (JS1B ó JS2B).

Identificación de una secuencia aminoacídica deducida del fragmento de PCR de 550 pb, homóloga con péptidos de la DNA polimerasa tipo β de *T.cruzi* y algunos segmentos de la estructura primaria de la DNA polimerasa β de rata.

Con el objetivo de establecer si realmente el fragmento secuenciado pertenecía a un segmento del gen que codifica para la DNA polimerasa tipo β de *T.cruzi*, se procedió a comparar todas las posibles secuencias aminoacídicas deducidas de la hebra 5'→3' como de su hebra complementaria 3'→5'. Esto implicó estudiar seis secuencias aminoacídicas por cada hebra, considerando tres marcos de lectura en una dirección y otros tres en la orientación inversa. Como son dos hebras, el número total de secuencias analizadas fueron 12. El estudio de los distintos marcos de lectura permitió encontrar una secuencia aminoacídica casi totalmente idéntica al péptido 21 de la DNA polimerasa de *T.cruzi* (ver Fig.15). A partir de esta secuencia, se encontraron otros segmentos que tenían cierta identidad con algunas secuencias de la estructura primaria de la DNA polimerasa β de rata (Matsukage y col., 1987). Para estar seguros de que el fragmento de PCR de 550 pb realmente correspondía a un sector del gen de la DNA polimerasa tipo β de *T.cruzi*, se resecuenció dicho fragmento, con lo cual se obtuvo una identidad perfecta con el péptido 21, y una identidad parcial con el péptido 30 (Fig. 15).

Aislamiento de tres clones de λ gt11 conteniendo insertos que hibridan con sonda de 550pb.

Con el objetivo de aislar el gen completo que codifica para la DNA polimerasa de *T. cruzi* se analizó una genoteca genómica construida en λ gt11 a partir de DNA nuclear de epimastigotes de la cepa Miranda fragmentado mecánicamente (Aslund y col., 1994; Ibañez y col., 1987). Utilizando como sonda el fragmento de PCR de 550 pb (sonda 550), se analizaron alrededor de 1×10^5 fagos de los cuales 7 hibridaron con la sonda indicada. Se purificaron dichos fagos y tres de estos, denominados λ 4-1, λ 7-2 y λ 8-1, fueron analizados en profundidad. El análisis mediante PCR del DNA de los fagos λ 4-1, λ 7-2 y λ 8-1, utilizando partidores aledaños al sitio de clonamiento, se obtuvieron productos de PCR correspondiente a fragmentos de 4400, 3500 y 3500 pb, respectivamente (Fig.23, carriles 3-5). Con el objetivo de secuenciar los insertos contenidos en los fagos mencionados anteriormente, se procedió a clonar dichos insertos en el vector pUC-19 (Yanisch-Perron y col., 1985). Al liberar los insertos contenidos en los fagos mencionados, mediante digestión con EcoR1, se observó que el inserto de 4400pb se fragmentó en uno de aproximadamente 900 y 3500 pb (datos no mostrados). Cada uno de estos insertos fueron purificados y ligados al vector pUC-19 (Fig.24). Se aislaron cuatro plásmidos recombinantes los que fueron denominados pUC-4-900, pUC-4-3500, pUC-7-2 y pUC-8-1. El análisis mediante PCR utilizando partidores aledaños al sitio de

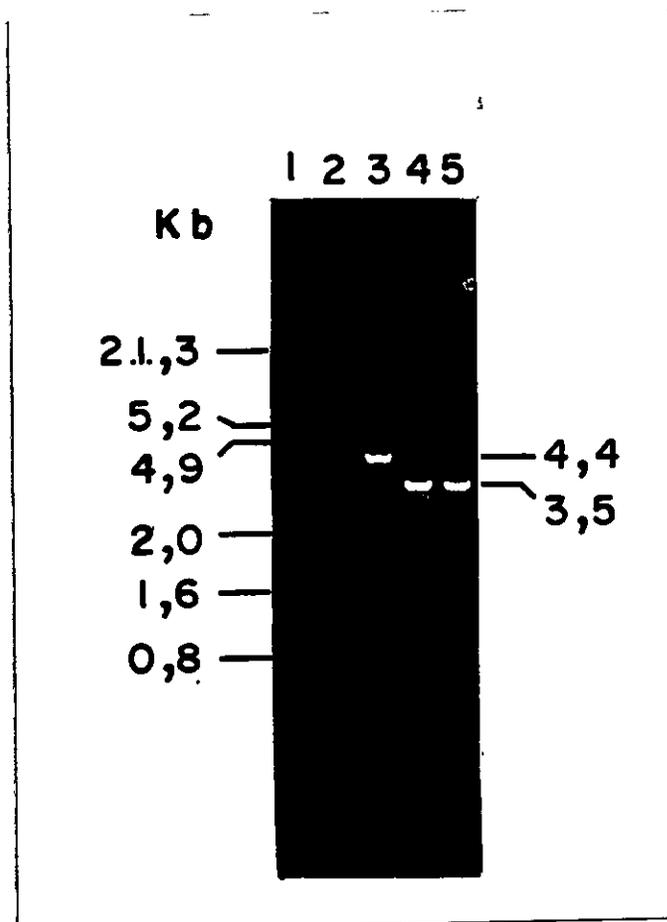


Fig.23. Estimación mediante PCR del largo de los insertos que hibridizaron con la sonda 550, transportados por fagos recombinantes λ gt11. DNA purificado de tres fagos recombinantes denominados λ -4-1 (carril 3), λ -7-2 (carril 4) y λ -8-1, (carril 5) fueron analizados mediante PCR de acuerdo a las condiciones descritas en Materiales y Métodos. Para el análisis de PCR se utilizaron dos partidores comerciales del fago λ gt11, aledaños al sitio de clonamiento EcoRI, a una concentración de 20 ng por ensayo, y concentraciones de cada muestra de DNA de aproximadamente 25 ng. Los carriles 1 y 2 corresponden a DNA de fagos λ gt11 no recombinantes. Al lado de la figura se indican en kilo bases (Kb) los largos estimados de cada fragmento de DNA.

inserción comprobó que todos los plásmidos recombinantes contenían insertos del tamaño esperado. Es decir que con excepción del pUC-4-900, el cual contenía un inserto de 900pb, todos los demás poseían insertos de aproximadamente 3500pb (datos no mostrados).

Mapa físico de los clones recombinantes pUC-7-1, pUC-8-1 y pUC-4-3500 que portan el gen de la DNA polimerasa tipo β de *T.cruzi*.

Con el fin de establecer la localización del segmento de DNA que hibridaba con la sonda 550, se procedió a determinar el mapa físico de los cuatro clones recombinantes. Para tal efecto, se procedió a digerir el DNA plasmidial de dichos clones con un conjunto de diferentes enzimas de restricción, separar los fragmentos mediante electroforesis en geles de agarosa y transferirlos a filtros de nylon según el método descrito por Southern (1975). Para determinar el mapa físico de cada plásmido se eligieron 9 enzimas de restricción en base a la información sobre la secuencia nucleotídica del fragmento de 550pb y los siguientes criterios: a) enzimas que no cortaran el fragmento de 550 pb y que tuvieran sólo un sitio de corte en el plásmido (Hind III, PstI, SmaI, KpnI) ó varios (MspI) y, b) enzimas que cortaran el fragmento de 550pb sin (EcoRV, XhoI y NsiI) ó con pocos sitios de corte en el plásmido (BglI, sólo dos sitios). En la Figura 25 (panel superior) se muestra el perfil de restricción del plásmido pUC-7-2 y del plásmido pUC-4-3500 obtenido por la digestión con las 9 enzimas mencionadas. Considerando que el vector pUC-19 posee 2.686 pb y los insertos aproximadamente 3.500 pb, el largo total del vector linealizado debería ser de 6.000 pb, como se

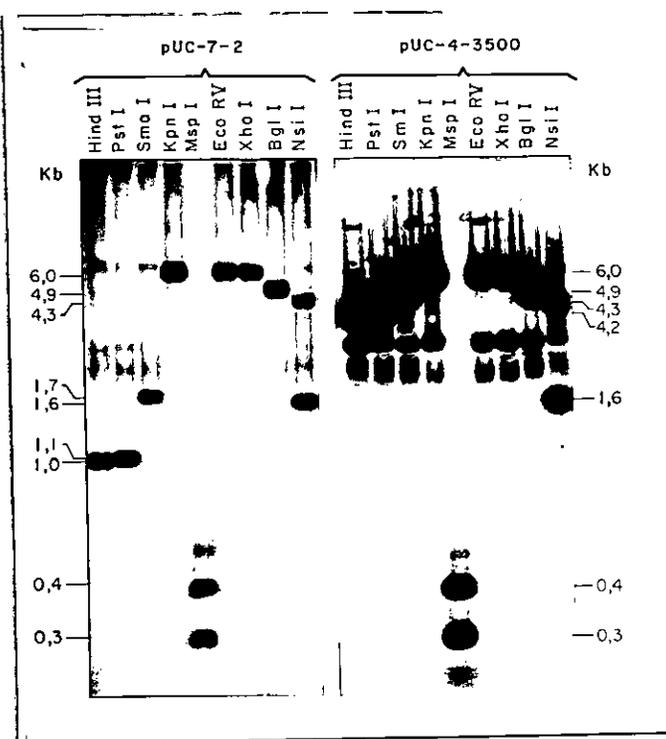
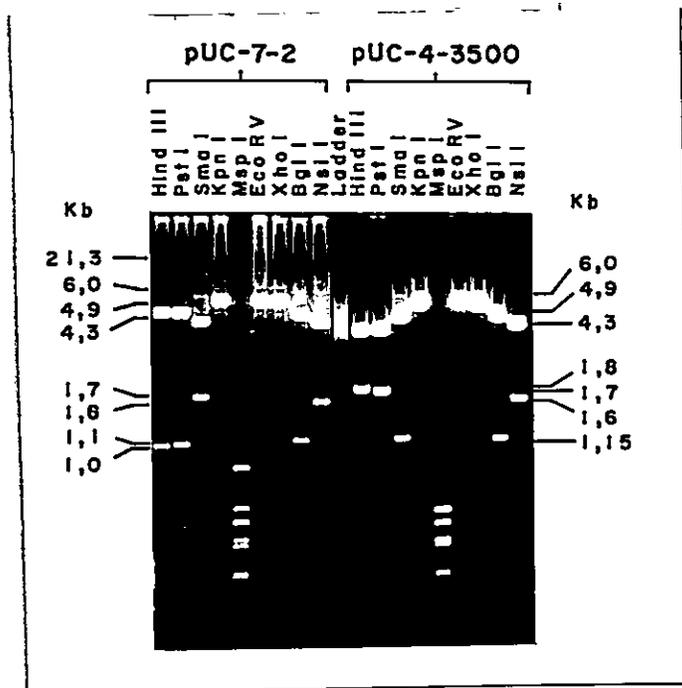


Fig.25. Perfil electroforético de fragmentos de restricción (panel superior) y el análisis mediante la técnica de "Southern-blot" utilizando como sonda el fragmento de PCR de 550 pares de bases (panel inferior), de los plásmidos recombinantes pUC-7-2 y pUC-4-3500. Cada muestra de DNA (2 μ g), fue digerida con 10 unidades de cada enzima de restricción y sometida a electroforesis en geles de agarosa al 1% el cual fue teñido con bromuro de etidio (panel superior). Posteriormente, los fragmentos de DNA fueron transferidos a filtros de nylon y analizados con la sonda mencionada (Panel inferior), de acuerdo a como fue descrito en Materiales y Métodos. Al lado de la figura se indican en kilo bases (Kb) los largos estimados de cada fragmento de DNA.

observa en la digestión con KpnI (carril 4), EcoRV (carril 6) y XhoI (carril 7), en ambos plásmidos. Con la mayoría de las demás enzimas se obtuvieron sólo dos cortes (carriles 1-3, 8 y 9).

El "Southern-blot" respectivo de los geles anteriores se muestra en la Figura 25 (panel inferior). Notese que en el análisis del plásmido pUC-7-2, en la mayoría de los casos la sonda de 550 pb sólo hibridizó con uno de los dos fragmentos generados por la enzima de restricción (carriles 1-3 y 8) y sólo al usar la enzima NsiI se observa que los dos fragmentos de restricción hibridizaron con la sonda (carril 9). En el caso de pUC-4-3500, el "Southern-blot" mostró un perfil totalmente distinto al anterior. Considerando solamente las bandas más intensas, aquí se observa que cuando existían dos fragmentos de restricción la sonda hibridizó con el de mayor tamaño (carriles 1-3 y 8). Similar patrón se observó con la enzima NsiI en ambos plásmidos. Las bandas de menor intensidad podrían corresponder a digestiones parciales de los plásmidos recombinantes mencionados.

Ninguno de los fragmentos generados del plásmido pUC-4-900 hibridizó con la sonda 550, por tal motivo el patrón de cortes con enzimas de restricción de este plásmido ni el correspondiente "Southern" se muestran en las figuras anteriores.

La interpretación de estos resultados se muestra en el mapa de restricción presentado en la Figura 26. En la figura, los rectángulos punteados simbolizan los segmentos del vector, la línea doble a el inserto y el rectángulo con líneas, al mínimo segmento que hibridó con la sonda 550. Al respecto, se observa que el segmento mínimo de

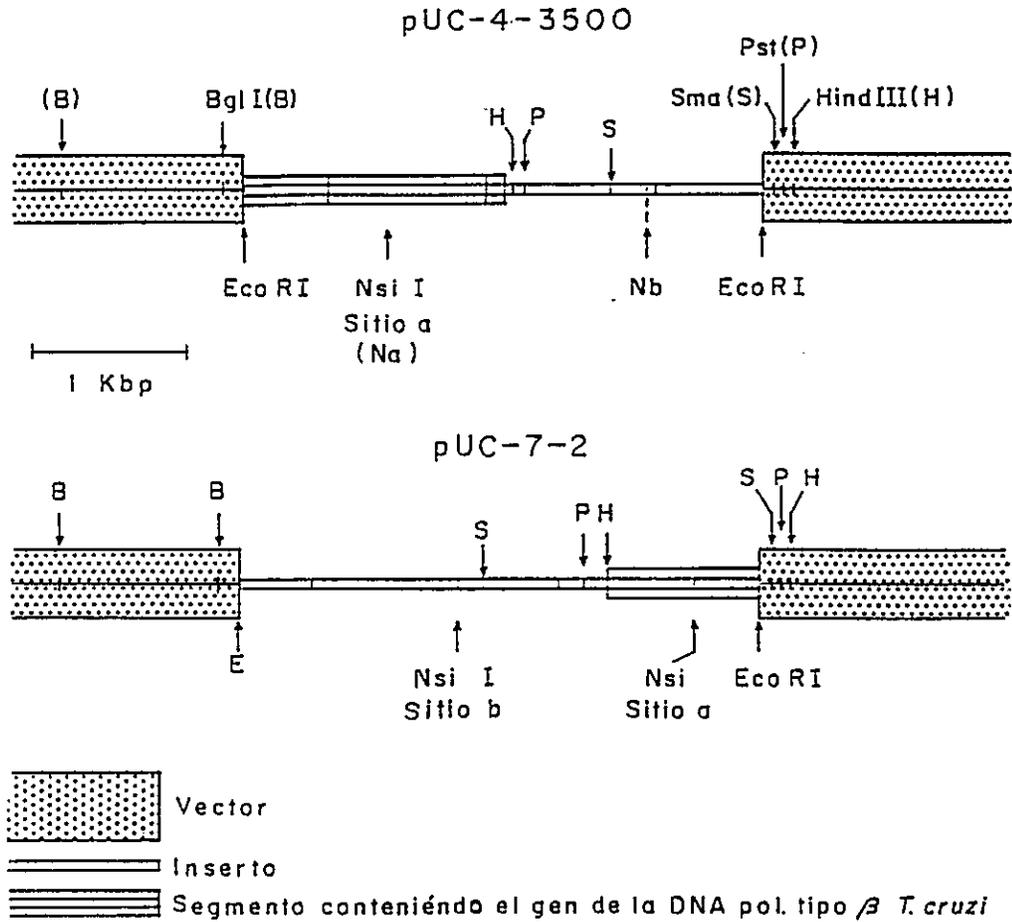


Fig.26. Mapa físico de los plásmidos recombinantes pUC-4-3500 y pUC-7-2. Ambos plásmidos portan insertos de aproximadamente 3500 pares de bases. En la figura se indican los sitios de corte de cada enzima y el segmento que hibridizó con la sonda de PCR de 550 pares de bases.

restricción que contendría el gen de la DNA polimerasa de *T. cruzi* sería el limitado por las enzimas EcoRI e HindIII (fragmento E-H), tanto en el plásmido pUC-4-3500 como en el PUC-7-2. Sin embargo, el fragmento E-H del plásmido pUC-4-3500 sería de un largo aproximado a 1700 pb, en cambio en el plásmido pUC-7-2 el segmento E-H sería de aproximadamente 1000 pb. Otro hecho importante es que el orden de los sitios de corte en ambos insertos es el mismo y que la única diferencia estaría en la distinta orientación de ambos insertos en sus respectivos vectores. Por ejemplo, en el caso del pUC-4-3500 la secuencia de los sitios de corte es E, NsiI sitio a (Na), H, Pst I (P), Sma (S) y Nb. En el otro plásmido es la misma pero en sentido inverso. Otro hecho muy importante, y que se discutirá posteriormente, es que la enzima NsiI fragmenta en dos al segmento que hibrida con la sonda 550. La posición exacta de este sitio de corte fue determinada en un análisis posterior digiriendo cada plásmido simultáneamente con las enzimas NsiI y Pst I y realizando una subsecuente hibridación con la sonda mencionada anteriormente. El resultado de estos experimentos indicó que el sitio NsiI estaría a una distancia de aproximadamente 500 pb del sitio P del inserto. Esto coincidió con la ubicación de dicho sitio señalada por la secuencia nucleotídica del fragmento de 550 pb.

Secuenciación inicial del gen de la DNA polimerasa tipo β de *T. cruzi*, contenido en los insertos de 3500 pb de los vectores pUC-4-3500 y pUC-7-2

Con el fin de secuenciar dicho gen de *T. cruzi* contenido en los plásmidos recombinantes anteriormente señalados, se procedió a

subclonar en pUC-19 los segmentos E-Na, Na-P, P-Nb y Nb-P(vector) del plásmido pUC-4-3500 y los segmentos análogos del plásmido pUC-7-2 (Fig. 26). Para realizar esta tarea cada plásmido fue digerido simultáneamente con las enzimas NsiI y PstI. De cada plásmido se obtuvieron cuatro fragmentos, los que fueron purificados y ligados al vector pUC-19. Los subclones del vector pUC-4-3500, de acuerdo al largo de sus insertos, se denominaron pUC-4-500, pUC-4-650, pUC-4-1100 y pUC-4-1300. De forma análoga, los subclones del vector pUC-7-2 se denominaron pUC-7-500, pUC-7-600, pUC-7-1100 y pUC-1300. En base al mapa físico de los plásmidos pUC-4-3500 y pUC-7-2, y a estudios de "Southern-blot" con la sonda de 550 pb se confirmó la localización de cada uno de los insertos subclonados, tal como se muestra en la Figura 27. Los subclones pUC-4-1300, pUC-4-500, pUC-7-500 y pUC-7-600 fueron secuenciados utilizando partidores del vector pUC-19 en el sentido indicado por las flechas onduladas (Fig. 27). Producto de estas secuencias se obtuvo un segmento de 664 nucleótidos (nt), correspondiente a un segmento de 167 nt río arriba del sitio de corte Nsi(a) y al inserto de 497 nt del subclon pUC-4-500.

Las secuencias de los subclones pUC-7-500 y pUC-7-600 fueron casi idénticas a las obtenidas de la secuenciación de los subclones pUC-4-1300 y pUC-4-500. La única diferencia correspondió al sentido de la hebra codificante, como se muestra en la Figura 27. Sin embargo, como sólo se secuenció un extremo del subclon pUC-7-500, regiones internas del gen de la DNA polimerasa tipo β de *T. cruzi* transportada por este plásmido, quedaron sin secuenciar. Por lo que no se puede descartar que en dichas regiones no secuenciadas del gen

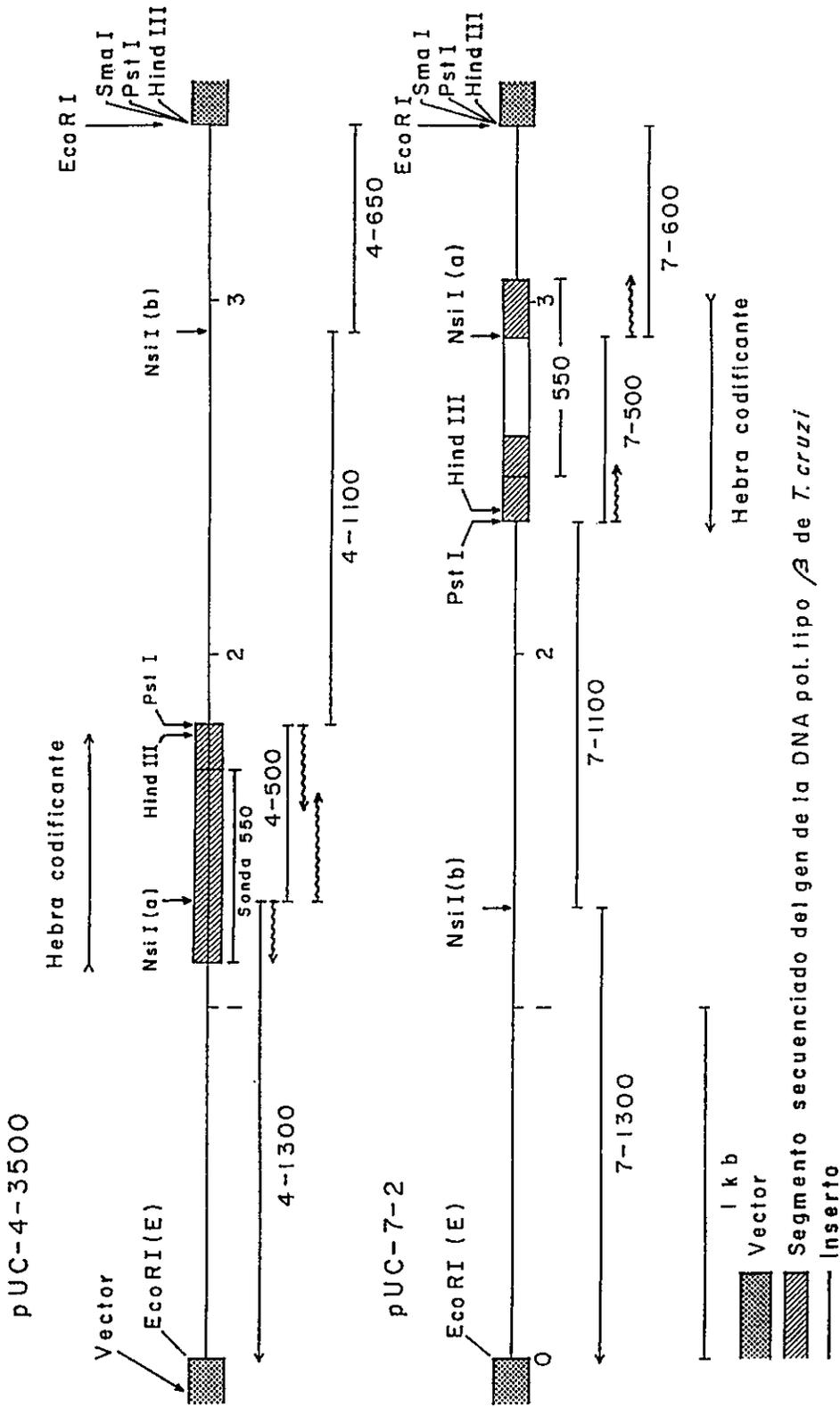


Fig.27. Subclones de los plásmidos recombinantes pUC-4-3500 y pUC-7-2 y localización de los segmentos secuenciados, respecto al mapa físico de ambos vectores. Los insertos de cada subclon se indican con una línea debajo de cada plásmido con el largo estimado de dichos insertos. Las flechas ondulantes indican el sentido y alcance de cada secuenciación.

transportado por el plásmido pUC-7-2, existan algunas diferencias con el gen transportado por el plásmido pUC-4-3500.

En la Figura 28 se muestra la secuencia nucleotídica y la secuencia aminoacídica deducida del segmento de 664 nucleótidos transportado por el plásmido recombinante, pUC-4-3500. La deducción de la secuencia aminoacídica se basó en buscar aquellos marcos de lectura con los cuales se obtuviera la mayor identidad con los distintos péptidos de la DNA polimerasa tipo β de *T.cruzi*, descritos anteriormente, y con la estructura primaria de la DNA polimerasa β de rata descrita en la literatura (Matsukage y col., 1987). Se puede observar que, como la secuencia nucleotídica todavía no es perfecta, la secuencia aminoacídica deducida posee varios cortes o corrimientos del marco de lectura (Fig.28). Sin embargo, en todos aquellos casos en que existen fracturas de dichos marcos se obtuvo identidad casi perfecta con determinados péptidos de la DNA polimerasa de *T.cruzi*. Es así como todos los aminoácidos de los péptidos 21 y 27 coincidieron perfectamente con la secuencia aminoacídica deducida del segmento de 664 nucleótidos contenido en el plásmido pUC-4-3500 (Fig.28). Asimismo, otras secuencias importantes coincidieron exactamente con segmentos de los péptidos 18 y 30.

Finalmente, se indican en la Figura 28, los sitios de corte para las enzimas de restricción NsiI (nucleótidos 167-168), Hind III (nucleótidos 629-630) y Pst I (nucleótidos 663-664). Es importante señalar que el largo del fragmento NsiI-PstI corresponde a 496 nucleótidos, el cual coincidió casi exactamente con el largo de 500 pb determinado mediante estudios de "Southern-blot" (Fig.27).

TCG	CCA	GTG	CAT	GGG	TTC	GGT	CCA	CGC	GCA	CGA	GCT	GCA	CTC	TTT	GAT	CGA	51
S	<u>Q</u>	<u>V</u>	<u>H</u>	<u>G</u>	<u>F</u>	<u>G</u>	<u>P</u>	<u>R</u>	A	R	A	A	L	F	D	R	17
PEPTIDO 18 (Segmento 7-14)																	
GAG	GGC	ATA	TTT	ACC	GTG	GAG	GAA	CTC	ATA	GAG	AAG	GCC	GAT	CGT	ATT	CAG	102
E	G	I	F	T	V	E	E	L	I	E	K	A	D	R	I	Q	34
TTG	ACA	GAC	CAG	CAG	CGC	GTG	GGC	GTA	AAA	TAC	TTC	CAC	GAT	ATC	AAT	GAG	153
L	T	D	Q	Q	R	V	G	V	K	Y	F	H	D	I	N	E	51
NsiI \downarrow																	
AAG	ATT	CCT	ATG	CAT	GAG	TCC	GTC	TTG	CAT	GAA	AAT	TTC	CTC	CGC	GAA	AGT	204
K	I	P	M	H	E	S	V	L	H	E	N	F	L	R	E	S	68
GTG	CAG	GCT	CGG	CTC	ACC	TCC	GAT	TAT	GAA	ATT	CAA	GTG	TGC	GGT	ACG	T	253
V	Q	A	R	L	T	S	D	Y	E	I	Q	V	C	G	T		84
AGT	CGT	CGC	CGG	CAT	CCG	TTC	AGC	GGT	GAT	GTG	GAC	GCC	ATT	CTT	GCA	CGC	304
S	R	R	R	H	P	F	<u>S</u>	<u>G</u>	<u>D</u>	<u>V</u>	<u>D</u>	A	I	L	A	R	101
PEPTIDO 30 (Segmento 4-8)																	
ACA	TTA	AGT	GCC	CCA	CCA	CTT	GA-C-TG	CCC	AGT	GTA	CGA	ATA	CCG	GGG	TGC		354
T	L	S	A	P	P	L	D	L	P	S	V	R	I	P	G	C	118
CTC	GGT	ACG	CTT	GTG	GAT	TAC	CTT	CAG	GAG	CGA	AAC	TAC	CTC	GAG	GCA	ACA	405
L	G	T	L	V	D	Y	L	Q	E	R	<u>N</u>	<u>Y</u>	<u>L</u>	<u>E</u>	<u>A</u>	<u>T</u>	135
PEPTIDO 21																	
ATG	GCA	CAG	GGG	CCA	CTC	AAG	TAC	ATG	GGC	ATG	GGT	CGT	CTG	CCT	CCT	CGC	456
<u>M</u>	<u>A</u>	<u>Q</u>	<u>G</u>	<u>P</u>	<u>L</u>	<u>K</u>	<u>Y</u>	<u>M</u>	<u>G</u>	<u>M</u>	<u>G</u>	<u>R</u>	<u>L</u>	<u>P</u>	<u>P</u>	<u>R</u>	152
ACA	ACA	AAT	GGG	ACG	ACA	AAG	CAC	TAC	AAG	GCC	CGT	CGC	GTG	GAT	ATT	CGA	507
T	T	N	G	T	T	K	H	Y	K	A	R	R	V	D	I	R	169
CTT	ATT	GAG	GCC	-----GA	TCG	GTG	CCC	ACT	GCC	CTT	CTC	ACG	TTT	ACC	GGC		554
L	I	E	A		<u>S</u>	<u>V</u>	<u>P</u>	<u>T</u>	<u>A</u>	<u>L</u>	<u>L</u>	<u>T</u>	<u>F</u>	<u>T</u>	<u>G</u>		184
PEPTIDO 27																	
AGC	AAG	AAC	TTT	AA-T-GT	GAT	CAT	CGT	CAA	GCC	GCC	ATC	AGT	AAA	GGA	TAC		604
S	K	N	F	N	C	D	H	R	Q	A	A	I	S	K	G	Y	201
HindIII																	
CTT	TTG	AAC	GAA	TAC	GGC	CTT	TTT	<u>AAG</u>	<u>CTT</u>	GGC	AGC	CCG	GAG	GAG	GTG	AAG	655
L	L	N	E	T	G	L	F	K	L	G	S	P	E	E	V	K	218
PstI \downarrow																	
GCG	CTG	CAG															664
A	L	Q															221

Fig. 28. Secuencia nucleotídica y secuencia aminoacídica deducida de un segmento del gen de la DNA polimerasa tipo β de *Trypanosoma cruzi*. Los segmentos subrayados corresponden a los péptidos secuenciados de muestras de la DNA polimerasa tipo β del parásito (ver Fig.15). La secuencia aminoacídica deducida corresponde a la secuencia con mayor similitud a los péptidos y a la estructura primaria de la DNA polimerasa β de rata (Davies y col., 1994). Debido a imperfecciones de la secuencia nucleotídica provocada por condensaciones de bandas ó baja resolución de zonas de la electroforésis para secuenciación (Sambrook y col., 1989), en algunos sectores hay corrimiento del marco de lectura a fin de obtener el mejor ajuste posible con las secuencias señaladas. Asimismo, se indican los sitios de restricción para las endonucleasas NsiI, Hind III y Pst I.

Comparación de la secuencia aminoacídica deducida del gen de la DNA polimerasa tipo β de *T. cruzi* con la estructura primaria descrita para la DNA polimerasa β de rata.

En la Figura 29 se muestran los resultados de una comparación entre la estructura aminoacídica deducida del segmento de 664 nucleótidos del gen de la DNA polimerasa tipo β de *T. cruzi*, y un segmento equivalente entre los aminoácidos 94 y 317 de la mencionada enzima de rata (Davies y col., 1994). Los resultados corresponden al mejor ajuste de dos secuencias comparadas, aunque para lograr tal ajuste fuera necesario cortar ambas secuencias. La comparación se realizó mediante inspección visual y la ayuda de un programa computacional que busca la mayor identidad entre dos secuencias comparadas (PC/GENE). Utilizando dicho procedimiento se logró un porcentaje de similitud e identidad de un 37,5 y 52,2%, respectivamente. En general se observa que, los mayores grados de similitud entre ambas secuencias tienden a concentrarse en las regiones donde existen estructuras secundarias α -hélices u hojas β . En este sentido se destacan los altos grados de similitud observados en la hoja β número siete ($\beta 7$) y la α -hélice αI . Es interesante observar que, precisamente, es en esta hoja β donde se localizan los importantes residuos catalíticos D256, R258 y R254 correspondientes al motivo A descrito en la estructura terciaria de la DNA polimerasa de rata (Davies y col., 1994; Pelletier y col., 1994; Sawaya y col., 1994). Sin embargo, también se destaca por su alto grado de similitud el segmento entre las hojas β número tres y cuatro ($\beta 3$ y $\beta 4$), el cual también coincide con la ubicación de tres importantes residuos

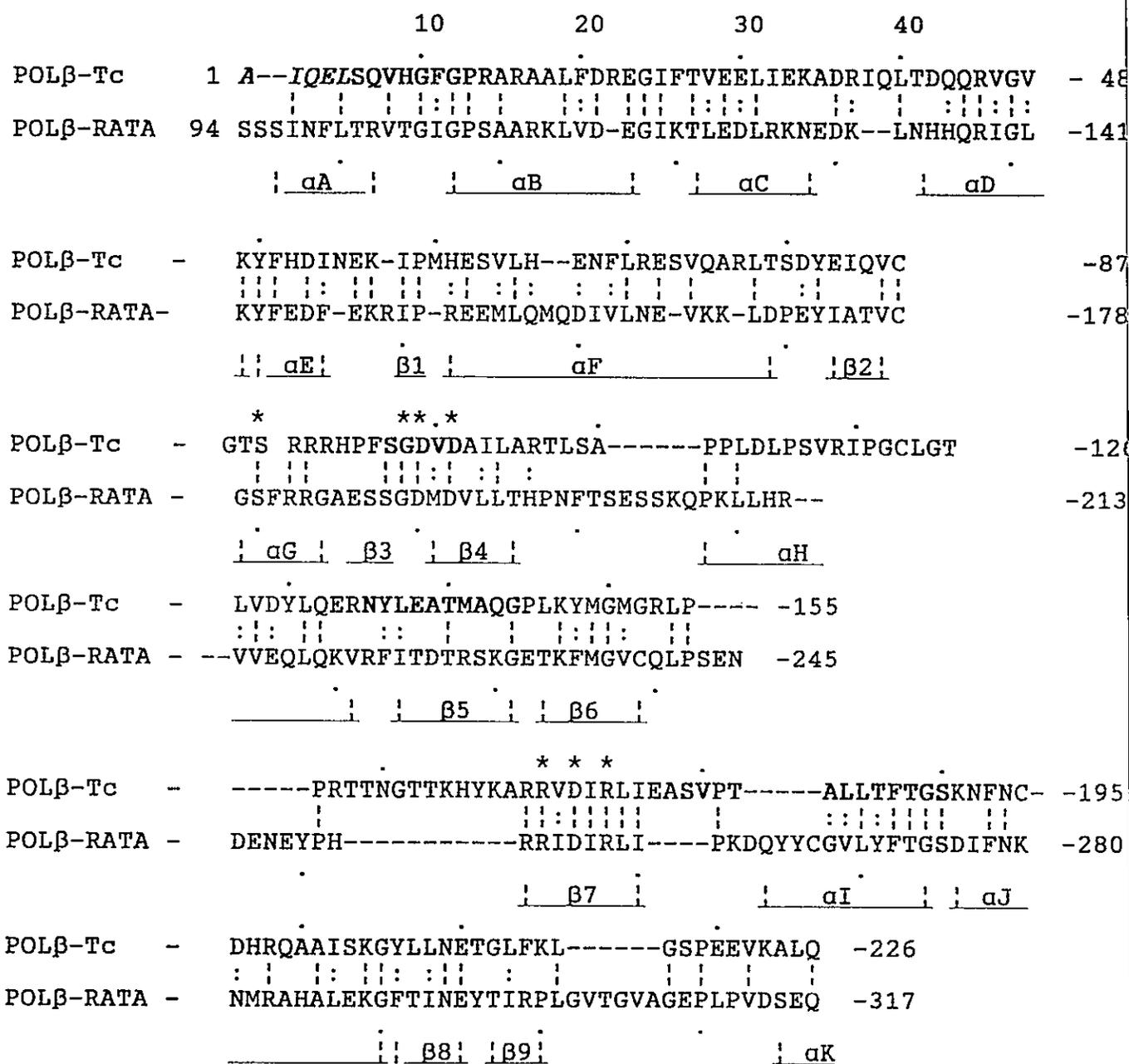


Fig. 29. Comparación de secuencias aminoácidas del fragmento de 226 aminoácidos deducidas del gen de la DNA polimerasa tipo β de *T. cruzi* (POL β -Tc) con la estructura primaria descrita para la DNA polimerasas β de rata (POL β -RATA, Davies y col., 1994). En la figura se muestran la localización de las α -hélice (α A, α B...) y hojas β (β 1, β 2...) de acuerdo a la nomenclatura de Davies y col., 1994. Los porcentajes de indentidad y similitud entre ambas secuencias fue de 37,5% (!) y 52,2% (:), respectivamente. La comparación se realizó mediante un programa de computación (PC/GENE) e inspección visual tratando de obtener el máximo de similitud. Notese que los cinco primeros aminoácidos corresponden al péptido 18 (en cursiva). Los aminoácidos con importancia catalítica se señalan con *. Los péptidos 18, 30, 21 y 27 se destacan con negritas (ver Fig.15).

catalíticos, correspondientes a los ácido asparticos 190 y 192 (D190 y D192), y la glicina 189 (G189), los cuales son componentes del fundamental motivo catalítico C (Davies y col., 1994; Pelletier y col., 1994; Sawaya y col., 1994).

Como se señaló anteriormente, los bajos porcentajes de identidad y similitud observados en la comparación de los péptidos de la DNA polimerasa tipo β de *T.cruzi* con la enzima de rata, comprueban nuevamente el bajo grado de similitud e identidad que existe entre ambas enzimas. Por ejemplo, a pesar de la perfecta homología del péptido 21 con la secuencia aminoacídica deducida del gen de la DNA polimerasa tipo β de *T.cruzi*, este péptido tiene un bajo porcentaje de identidad con el segmento respectivo de la DNA polimerasa de rata. Es interesante destacar que, de acuerdo a esta comparación, dicho péptido abarcaría todo el segmento correspondiente a la hoja β 5 de la enzima de rata. Asimismo es interesante señalar que el segmento del péptido 30 correspondería exactamente al motivo catalítico C descrito para la DNA polimerasa de rata (Davies y col., 1994; Sawaya y col., 1994). Esto ratifica que la secuencia aminoacídica deducida para ese importante segmento de la DNA polimerasa de *T.cruzi*, efectivamente sería la señalada en las Figura 28 y 29. Finalmente, tal como se había predicho en la comparación de los péptidos de la enzima de *T.cruzi* con la enzima de rata, el promedio general de los porcentajes de similitud e identidad de dichos estudios (52,8 y 38,9%, respectivamente) fueron muy cercanos a los determinados en esta nueva comparación, correspondiente a un segmento de aproximadamente 221 aminoácidos de la cadena polipéptidica de la DNA polimerasa tipo β de

T. cruzi.

Comparación de los perfiles de hidrofobicidad de la secuencia aminoácídica deducida del gen de la DNA polimerasa tipo β de *T. cruzi* y la estructura primaria de la DNA polimerasa β de rata.

Los perfiles de hidrofobicidad de ambas DNA polimerasas se obtuvieron de acuerdo al método descrito por Kyte y Doolittle (1982) y utilizando una ventana de 7 residuos (Fig. 30). En la parte superior de la figura se indica la posición de las estructuras secundarias descrita en la enzima de rata (Davies y col., 1994). Los números en la parte inferior de la figura corresponden a la ubicación de los residuos del segmento de la enzima de *T. cruzi*. En general se observa que el perfil de la enzima de *T. cruzi* (panel inferior) es muy similar al perfil del segmento que comprende los aminoácidos 94 y 317 de la enzima de rata (panel superior). Sin embargo, después del aminoácido 150 se observa que existe un corrimiento del perfil de la DNA polimerasa de *T. cruzi*. Este desplazamiento coincide con los cortes realizados en la secuencia de la enzima de rata para lograr un buen alineamiento con el segmento de la enzima de *T. cruzi* (Fig. 29). Como se aprecia en la figura, la localización de los motivos catalíticos A y C tienen un muy similar perfil hidrofóbico. Otro hecho importante es que el carácter hidrofóbico de las estructuras secundarias es variable y que, en la mayoría de los casos, la mayor similitud entre los perfiles generados por ambas secuencias coincide con la posición de una estructura secundaria determinada. Por ejemplo, una zona de gran similitud entre ambos perfiles localizada entre los residuos 115 y 146, coincide con la

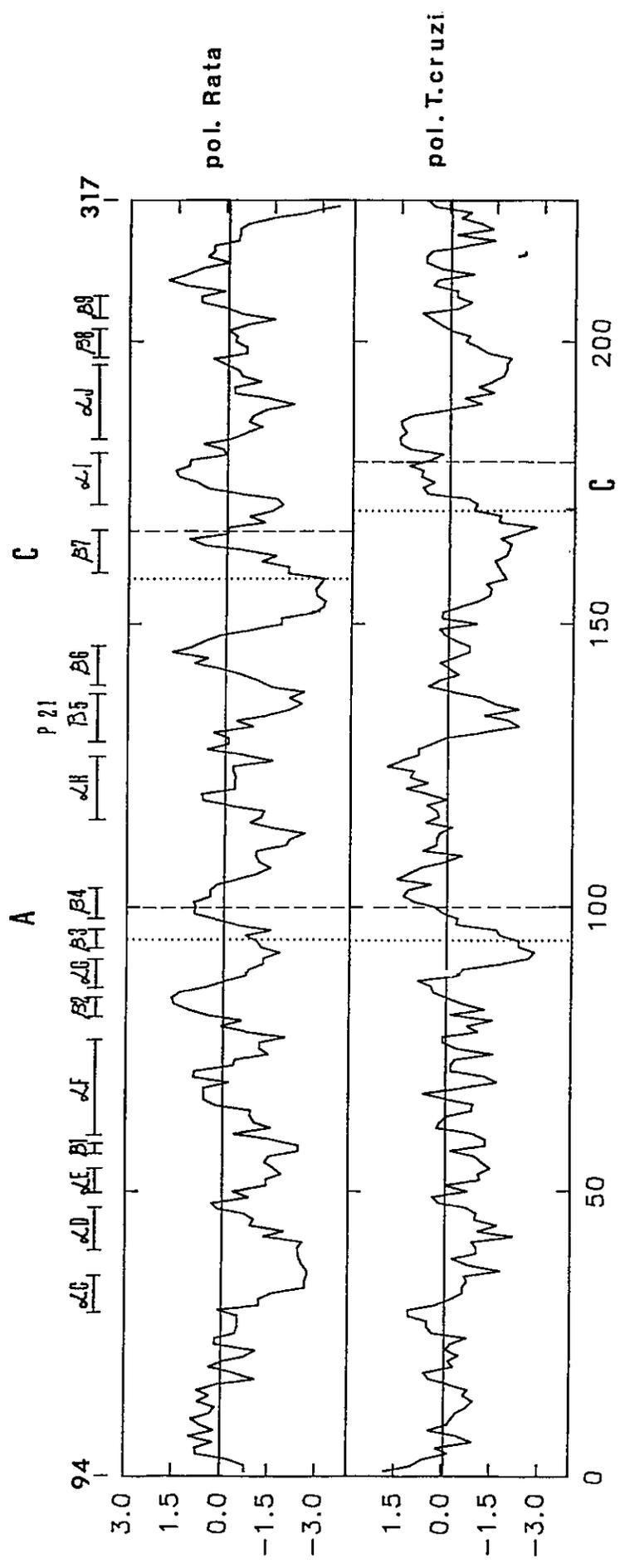


Fig.30. Comparación de los perfiles de hidrofobicidad de la secuencia aminoacídica deducida del gen de la DNA polimerasa tipo β de *T.cruzi* y un segmento de la DNA polimerasa β de rata. Los perfiles de hidrofobicidad se obtuvieron por el método de Kyte y Doolittle (1982) utilizando una ventana de 7 residuos. El panel superior corresponde al segmento de la DNA polimerasa β de rata comprendido entre los aminoácidos 94 y 317 (Matsukage y col., 1987). El panel inferior corresponde al segmento de 226 residuos deducidos del gen de dicha enzima del parásito (Fig. 29). Sobre la figura se indica la posición de las estructuras secundarias α -hélice ($\alpha C-\alpha J$) y hojas β ($\beta 1-\beta 9$) de acuerdo a la nomenclatura de Davies y col. (1994).

ubicación de la α -hélice αH y las hojas $\beta 5$ y $\beta 6$. Similar situación ocurre con otras zonas de los perfiles, como la región entre los residuos 28 y 47, 183 y 202.

Análisis mediante "Southern-blot" del gen de la DNA polimerasa tipo β de *T. cruzi*

DNA total de formas celulares epimastigotes de *T. cruzi* fue digerido con distintas enzimas de restricción, sometido a electroforesis en un gel de agarosa y transferido a filtros de nylon, tal como se describió en Materiales y Métodos. Los filtros fueron analizados utilizando como sonda el fragmento de PCR de 550 pb, anteriormente mencionado. Se observa (Fig.32) que en la mayoría de los casos la sonda hibridó con fragmentos de gran tamaño, en un rango de 21,1 a 5,2 kilo bases (kb). Incluso cuando las enzimas utilizadas fueron EcoRI, Hind III y SmaI. Sin embargo, las enzimas Dsa V, HpaI, MspI y NsiI generaron fragmentos de menor tamaño que hibridaron con la sonda mencionada. Es importante destacar que en todos los casos las enzimas generaron fragmentos de una amplia gama de longitudes, como se observó en el gel teñido con bromuro de etidio antes de ser transferido al filtro correspondiente (no mostrado). Con respecto a las digestiones observadas con las enzimas Dsa V y NsiI, se debe mencionar que en ninguno de los dos casos la serie de bandas observadas corresponden a múltiplos de una misma banda (Fig.31). Es claro que en el caso de NsiI, la serie de bandas fue generada por digestión parcial de la muestra de DNA y que cuando se realizó digestión total sólo se observaron dos bandas de aproximadamente 1,0 y 1,6 kb.

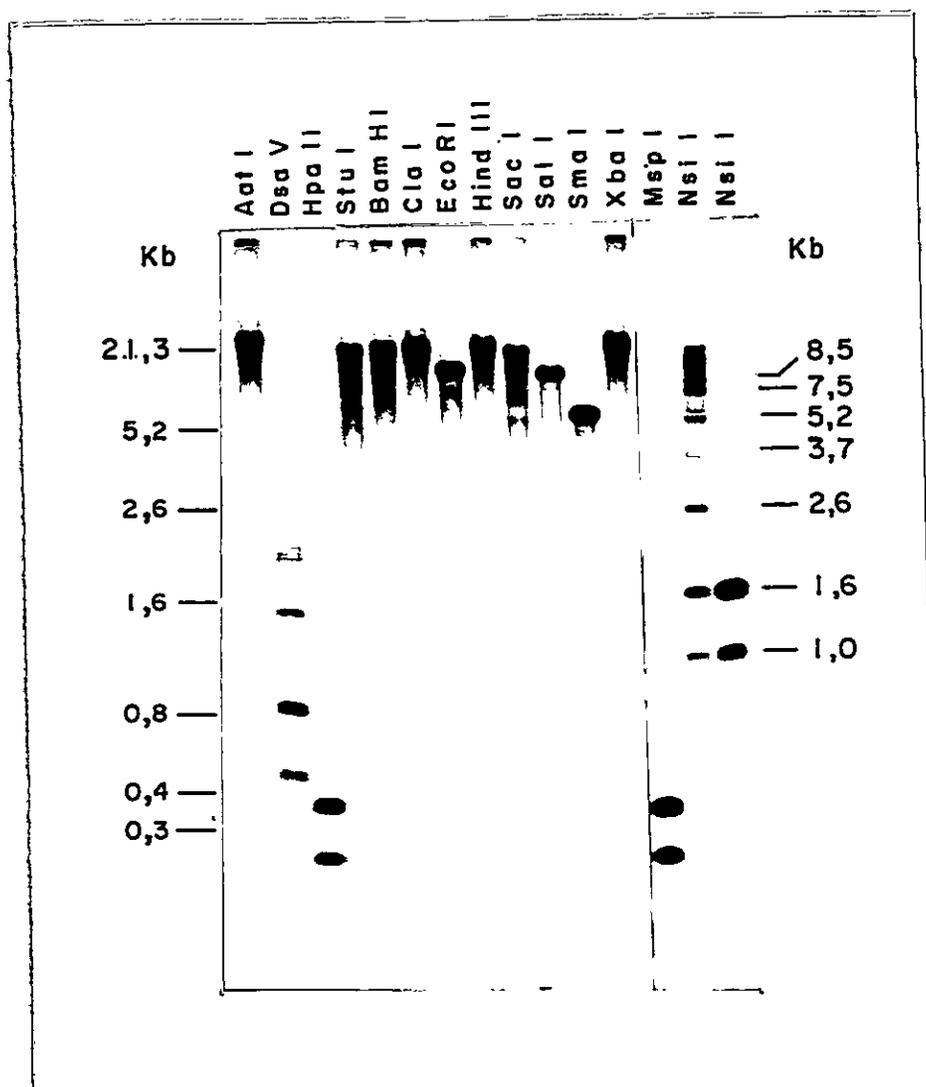


Fig.31. Estudio mediante técnicas de "Southern-blot" de la organización del gen de la DNA polimerasa tipo β de *T.cruzi* en el clon Dm28c. Cada muestra de DNA (2 μ g) de epimastigotes fue digerida con 10 unidades de cada enzima de restricción indicada en la figura, sometida a electroforesis, transferidas a filtros de nylon y analizadas con el fragmento de PCR de 550 pares de bases el cual fue utilizado como sonda, tal como se describió en Materiales y Métodos. Al lado de la figura se indican en kilo bases (Kb) los largos estimados de cada fragmento de DNA.

Análisis mediante "Northern-blot" de la expresión del gen de la DNA polimeras tipo β de *T.cruzi*.

En la Figura 32 se muestra el análisis mediante "Northern-blot" de tres muestras de RNA total provenientes de tres formas celulares del parásito *T.cruzi*. La sonda utilizada en este experimento fue preparada a partir del fragmento de PCR de 550 pb, anteriormente mencionado. Las muestras de RNA fueron preparadas de 500, 150 y 500 millones de epimastigotes (carril 1), tripomastigotes de cultivo celular (carril 2) y metacíclicos (carril 3), respectivamente. Se observa que la muestra proveniente de tripomastigotes de cultivo celular (carril 2) originó una intensa señal con la sonda mencionada. Esta señal fue varias veces superior a la originada por las otras dos muestras provenientes de las otras formas celulares. Notese que una muestra de RNA purificada de células de cultivo Vero (carril 4) sólo se observó una leve mancha, totalmente fuera del intervalo de longitud observada para las otras muestras. La longitud estimada de los RNA que hibridan con la sonda de 550, sería alrededor de 1,77 kilo bases (kb).

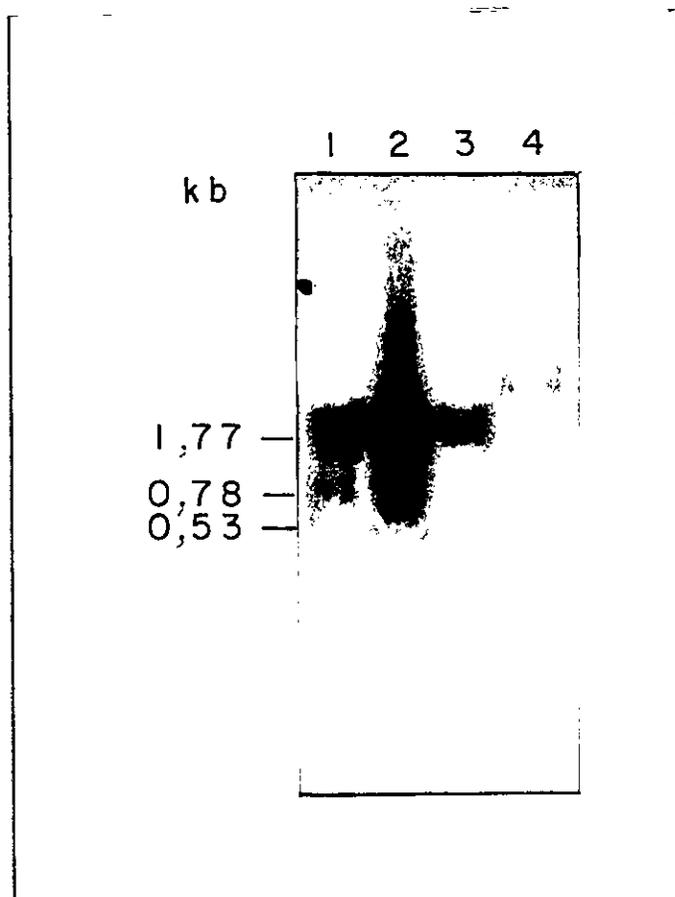


Fig.32. Análisis mediante "Northern-blot" de muestras de RNA procedentes de distintas formas celulares de *T.cruzi* utilizando como sonda el fragmento de PCR de 550 pares de bases. RNA total aislado de epimastigotes (carril 1), tripomastigotes de cultivo celular (carril 2), metacíclicos (carril 3) y células Vero (carril 4), correspondientes a 500, 150 y 500 millones de parásitos, respectivamente. Los marcadores señalados en la figura en kilo bases (Kb).

DISCUSION

Durante mucho tiempo el conocimiento sobre las DNA polimerasas de un importante grupo de eucariotes inferiores, constituido por algas, protozoos y algunos hongos, ha sido muy limitado. En parte importante estas limitaciones se han debido a las grandes dificultades que han existido para lograr purificar a homogeneidad dichas enzimas. Esto no sólo ha sido consecuencia de las dificultades para obtener el material biológico, a la acción proteolítica ó la presencia de inhibidores endógenos, sino que también algunas veces a particularidades de las mismas enzimas estudiadas. Producto de estas limitaciones, la información disponible en la literatura sugería que en algas y protozoos podrían existir DNA polimerasas distintas a las descritas en eucariotes superiores (Mc Lennan y Keir, 1975; Tait y Cummings, 1975; Ross y Harris, 1978; Dube y col., 1979; Marcus y col., 1980; Aoshima y col., 1984). En este cuadro, un caso de particular importancia ha sido la situación respecto a las DNA polimerasa tipo β . Al comienzo de los estudios se llegó a postular que este tipo de enzimas no existían en eucariotes unicelulares debido a que eran producto de un estado evolutivo superior correspondiente a los metazoos (Chang, 1976). Posteriormente los mismos autores demostraron que este tipo de enzimas no sólo se encontraban presentes en organismos unicelulares sino que su baja masa molecular era altamente conservada (Chang y col., 1982). Desde esa época, hasta ahora, se han descrito múltiples posibles DNA

polimerasas tipo β en eucariotes inferiores (Ganz y Pearlman, 1980, Schiebel y Raffael, 1980; Sakai y Watanabe, 1982a; Sakai y Watanabe, 1982b; Stauder y col., 1983; Holmes y col., 1984; Holler y col., 1987; Nolan y Rivera, 1991; Torri y Englund, 1992; Shimizu y col., 1993). De todas estas posibles DNA polimerasas tipo β , sólo tres de ellas fueron purificadas a homogeneidad y caracterizadas. Estas corresponden a una DNA polimerasa de *Tetrahymena thermophila* (Ganz y Pearlman, 1980), otra de *Critidia fasciculata* (Torri y Englund, 1992) y una última de *Saccharomyces cerevisiae* (Shimizu y col., 1993). Cabe hacer notar que ninguna de estas tres probables DNA polimerasas tipo β reúne las clásicas propiedades descritas para las DNA polimerasas β de vertebrados, pues aunque dos de ellas poseen masas moleculares cercanas a las de sus congeneres de vertebrados, como es el caso de las enzimas de *T.thermophila* (Ganz y Pearlman, 1980) y de *C.fasciculata* (Torri y Englund, 1992), sus sensibilidades a NEM no fueron concordantes.

Aislamiento de tres fracciones con actividad DNA polimerásica de epimastigotes de *T.cruzi*.

Con el objetivo de estudiar el grado de similitud que existe entre las DNA polimerasas de protozoos y las DNA polimerasas de vertebrados, se emprendió el estudio de estas enzimas en el parásito causante de la enfermedad de Chagas, *T.cruzi*. Producto de esta tesis se aislaron tres fracciones enzimáticas mayoritarias, las que fueron denominadas DNA polimerasas fracción A, B y C. Las características

bioquímicas, así como algunos experimentos con antisueros, sugirieron fuertemente que dichas fracciones correspondían a distintas entidades moleculares. Las fracciones A y B copurificaron a lo largo de la mayor parte del protocolo de purificación, sin embargo en la última etapa fueron claramente separadas mediante cromatografía en fosfoceulosa. Además, al estudiarse la utilización de matrices se observó que ambas fracciones enzimáticas tenían diferente preferencia por ellas. Concordante con estos resultados, experimentos de inmunoprecipitación apoyan fuertemente la idea que las DNA polimerasas contenidas en la fracción A y B corresponden a distintas entidades moleculares.

A diferencia de las dos fracciones anteriores, la fracción C fue tempranamente separada de ellas mediante cromatografía en DEAE-celulosa. Estudios de sedimentación en gradientes de glicerol mostraron claramente que la fracción A y C poseían distintas masas moleculares. Lamentablemente, debido a la inestabilidad de la fracción B, no se pudo determinar su masa molecular para el estado nativo. Otro punto de diferencia muy importante entre la fracción C y las otras dos fracciones fue la utilización de matrices. Se observó que esta actividad enzimática utilizaba casi exclusivamente poli(dC)-oligo(dG) como substrato. No existe en la literatura información sobre alguna DNA polimerasa con similares características proveniente de organismos unicelulares. Sólo algunos informes antiguos de estudios en extractos de células de mamíferos describen a una actividad DNA polimerásica dependiente de poli(dC)-oligo(dG) probablemente asociada a un complejo replicador (Kaftory y Fry, 1978;

Yagura y col., 1980).

Es posible que la Fracción I, descrita anteriormente en *T. cruzi* (Rojas y col., 1992), pueda corresponder a una mezcla de la actual fracción A y C considerando que todas ellas eluyen a una similar fuerza iónica desde una columna de fosfocelulosa. Esto se basa en el hecho que en los protocolos anteriores (Solari y col., 1983; Rojas y col., 1992) no se fraccionaba la actividad DNA polimerasa total mediante cromatografía en DEAE-celulosa, la cual separa la fracción A y B de la C, antes de realizar la cromatografía en fosfocelulosa. Por lo tanto, la fracciones A y C podían eluir juntas de la misma columna de fosfocelulosa. Esta idea es concordante con la preferencia por poli(dC)-oligo(dG) descrita para la Fracción I (Rojas y col., 1992), sin embargo, mayores estudios son necesarios para probar esta posibilidad.

Purificación cercana a homogeneidad y caracterización de una DNA polimerasa tipo β de *T. cruzi* .

Con el objetivo de establecer si la DNA polimerasa de baja masa molecular aislada en la fracción A podría corresponder a una DNA polimerasa tipo β presente en *T. cruzi*, se procedió a purificar extensamente esta enzima. Para lograr esto se introdujeron algunas modificaciones al protocolo original. La más importante de ellas fué eluir en un rango estrecho de fuerza iónica la primera columna de fosfocelulosa con el propósito de separar tempranamente la DNA polimerasa de la fracción A de las otras dos actividades enzimáticas , y la segunda modificación importante fué eluir con un gradiente de

fuerza iónica la columna de DNA-celulosa. Bajo estas condiciones se logró, en pocas etapas, un alto grado de pureza, obteniéndose una actividad específica final de 6,705 unidades/mg, con un rendimiento de 28,8%.

El análisis mediante electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturantes de la fracción más purificada mostró que ésta contenía una banda mayoritaria y otra minoritaria de masas moleculares aproximadas de 50 y 45 kDa, respectivamente. Estudios de correlación entre actividad enzimática y composición polipeptídica, así como el análisis mediante una nueva técnica de geles de actividad demostraron que únicamente la cadena polipeptídica de 50 kDa poseía actividad DNA polimerásica. Asimismo, estudios de "Western-blot" apoyaron fuertemente la idea que dicha cadena polipeptídica de 50 kDa corresponde a una DNA polimerasa intacta de baja masa molecular.

Con el objetivo de investigar si esta enzima de *T.cruzi* podría ser una DNA polimerasa tipo β análoga a las descritas en vertebrados, se procedió a estudiar el efecto de distintos tipos de inhibidores y su preferencia por matrices.

En general, se observó que el conjunto de resultados obtenidos con inhibidores es concordante con las características descritas para DNA polimerasas β de eucariotes superiores (Fry, 1983; Hubscher, 1984; Burgers, 1989; Kornberg y Baker 1991; Wang, 1991). Al respecto la enzima fue totalmente insensible, tanto al inhibidor específico de las DNA polimerasas α , como afidicolina, así como al inhibidor de las DNA polimerasas α , δ y ϵ replicadoras del genoma nuclear, BuPdGTP (Burgers, 1989; Wang, 1991). Asimismo, la enzima de *T.cruzi* fue poco

inhibida por dos agentes intercalantes del DNA, tales como Berenil y bromuro de etidio. El primero de ellos descritos como fuerte inhibidor de la replicación mitocondrial en *Trypanosoma brucei* (Newton y Le Page, 1967), y el segundo como fuerte inhibidor de la DNA polimerasa y de mamíferos (Tarragó-Litvak y col., 1978; Fry, 1983).

De particular importancia fueron los resultados obtenidos con los reactivos N-etilmaleimida (NEM) y ddTTP. De acuerdo a los criterios descritos para identificar a la DNA polimerasa β de mamíferos (Waser y col., 1979; Fry, 1983; Burgers, 1989; Wang, 1991;), a una concentración 10 mM de dicha droga la enzima de *T.cruzi* preservó su actividad en más de un 50%. Por tal razón la enzima del parásito fué considerada resistente a NEM y por lo tanto concordante con una de las principales características de las DNA polimerasas β de vertebrados. Asimismo, aunque la enzima de *T.cruzi* no alcanzó los niveles de sensibilidad descritos para sus congeneres de vertebrados frente al ddTTP (Fry, 1983; Hubscher, 1984; Burgers, 1989; Kornberg y Baker 1991; Wang, 1991), éste resultó ser su más potente inhibidor.

Con respecto a la utilización de matrices, la DNA polimerasa de *T.cruzi* prefirió DNA activado en vez del substrato sintético poli(A)-oligo(dT), como ocurre generalmente en el caso de las DNA polimerasas β de mamíferos (Chang, 1974; Tsuruo y col., 1974; Stalker y col., 1976; Suzuki y col., 1977; Wang y col., 1977; Joenje y Benbow, 1978; Ikeda y col., 1980; Fry, 1983; Hubscher, 1984). Una posibilidad para explicar dicha diferencia podría estar relacionada con la capacidad para formar homodímeros u oligómeros, tal como ha sido descrito por

algunos autores (Yoshida y col., 1979). Sin embargo, se requieren más estudios para establecer verdaderamente cuál es la causa de dicho resultado.

Otro punto importante de comparación entre los distintos tipos de DNA polimerasas de vertebrados es la capacidad de elongar partidores de RNA (Spadari y Weissbach, 1975; Ikeda y col., 1980; Fry, 1983; Hubscher, 1984). En este sentido concordante con las características descritas para DNA polimerasas β de mamífero, la enzima de *T.cruzi* tampoco pudo elongar estos partidores.

En conjunto la gran mayoría de los resultados anteriores apoyan fuertemente la idea que la enzima de baja masa molecular de *T.cruzi* correspondería a una DNA polimerasa tipo β presente en este parásito. Es claro que la enzima de este protozoo no podría corresponder a una DNA polimerasa α , δ ó ϵ en base a su resistencia a afidicolina, BuPdGTP y su baja masa molecular, pero también existen poderosas evidencias en contra de la posibilidad de que sea una enzima tipo γ . En esta línea no sólo se puede considerar su baja masa molecular, en contraposición con la alta masa molecular descrita para enzimas tipo γ de vertebrados (Wernette y Kaguni, 1986; Insdorf y Bogenhagen, 1989; Burgers, 1983; Wang, 1991), sino que también su resistencia a NEM, la incapacidad de utilizar poli(A) como matriz y su escasa sensibilidad a bromuro de etidio, características que se contraponen con las descritas para DNA polimerasas γ de vertebrados (Tarragó-Litvak y col., 1978; Burgers, 1983; Kornberg y Baker, 1991; Wang, 1991).

Sí comparamos esta DNA polimerasa tipo β de *T.cruzi* con otras

enzimas similares purificadas a homogeneidad desde el tripanosomatideo *Critidia fasciculata* (Torri y Englund, 1992; Torri y col., 1994) y la levadura *Saccharomyces cerevisiae* (Shimizu y col., 1993), podemos observar que la enzima de *C. fasciculata* sería la más semejante en base a su sensibilidad parcial a NEM (50% de actividad a 2 mM del inhibidor) y su masa molecular de 43 kDa. En cambio, la enzima de levadura fue sensible a dicho compuesto y presentó una masa molecular de 68 kDa (Shimizu y col., 1993). Empero, otras propiedades bioquímicas fueron muy similares entre la enzima de *T. cruzi* y la enzima de levadura. Por ejemplo, ambas enzimas prefirieron DNA activado como sustrato y ninguna de las dos pudo utilizar poli(A)-oligo(dT). Además, el bajo grado de sensibilidad a ddTTP en ambas enzimas fue similar, pero lejos de los altos grados de sensibilidad descritos para DNA polimerasas β de vertebrados (Fry, 1983; Burgers, 1989; Wang, 1991). Estos resultados son muy interesantes, pues ellos muestran que efectivamente existen diferencias entre las propiedades bioquímicas de las DNA polimerasas tipo β de organismos unicelulares y sus congeneres de vertebrados, las cuales podrían ser explotadas como blancos quimioterapéuticos en la búsqueda de nuevos fármacos contra importantes enfermedades parasitarias que afectan al hombre.

Con el objetivo de establecer el grado de similitud estructural que existen entre la DNA polimerasa tipo β de *T. cruzi* y sus homólogas de vertebrados se procedió al clonamiento del gen que codifica para dicha enzima en este parásito.

Clonamiento del gen que codifica para el dominio catalítico de la DNA

polimerasa tipo β de *T. cruzi*.

Estudios mediante proteólisis controlada habían mostrado que la estructura terciaria de la DNA polimerasa β de rata podía dividirse en un dominio N-terminal de 8 kDa, responsable de la unión a DNA monohebra, y otro dominio C-terminal de 31 kDa, responsable de la actividad catalítica (Kumar y col., 1990a; Kumar y col., 1990b). La secuenciación de un cDNA y del gen de dicha enzima reveló un marco de lectura de 1.005 nucleótidos que codificaban para una proteína de 335 aminoácidos cuya masa molecular era de 38,269 kDa (Matsukage y col., 1987). Recientemente se informó en la literatura la descripción de la estructura terciaria de la DNA polimerasa β de rata (Pelletier y col., 1994; Sawaya y col., 1994; Davies y col., 1994). En estos trabajos se informa que la estructura terciaria del dominio catalítico se puede dividir en tres subdominios constituidos por: un subdominio N-terminal formado por los aminoácidos 85 al 149, un subdominio central formado por los aminoácidos 150 al 261 y un subdominio C-terminal formado por los aminoácidos 262 al 335. En base a una analogía con la forma de una mano, al subdominio N-terminal se le denominó "subdominio dedos", al central "subdominio palma" y al C-terminal "subdominio pulgar". De acuerdo a la descripción de Davies y col., 1994 (Fig.5), el subdominio N-terminal estaría compuesto por cinco α -hélices (α A, α B, α C, α D y α E); el subdominio central por tres α -hélices (α F, α G y α H) y siete hojas β (β 1, β 2, β 3, β 4, β 5, β 6 y β 7); y el subdominio C-terminal por tres α -hélice (α I, α J y α K), dos hojas β (β 8 y β 9) y una estructura 3_{10} . Sin embargo, el núcleo del subdominio central estaría compuesto sólo por cinco hojas β

alternadas entre sí ($\beta 2$, $\beta 4$, $\beta 7$, $\beta 6$ y $\beta 5$) flanqueadas por el par de α -hélices αF y αH (Fig.4). De acuerdo a estos autores (Pelletier y col., 1994; Sawaya y col., 1994; Davies y col., 1994), tres residuos fundamentales para la catálisis enzimática, correspondiente a los ácido aspárticos D190, D192 y D256, estarían localizados cercano a la hoja $\beta 4$, en la misma hoja $\beta 4$ y en la hoja $\beta 7$, respectivamente. De acuerdo a Davies y col., 1994, otros dos residuos que participarían indirectamente en la unión del metal bivalente, a través de la formación de interacciones iónicas con los residuos D192 y R256, serían las argininas 254 y 258 (R254 y R258). Al igual que el residuo R256, estas argininas también están localizadas en la hoja $\beta 7$.

Residuos importantes que estarían implicados en la unión del desoxinucleótido como, las argininas 149, 182 y 183 (R149, R182 y R183), la serina 180 (S180) ó la glicina 189 (G189) estarían localizadas en diferentes posiciones, tanto fuera como dentro de las estructuras secundarias descritas por dichos autores (Pelletier y col., 1994; Sawaya y col., 1994; Davies y col., 1994). Así por ejemplo, el residuo G189 estaría localizado entre las hojas $\beta 3$ y $\beta 4$. En cambio los residuos R182 y R183 estarían formando parte de la α -hélice αG . Por otro lado, los residuos R149 y S180, el primero estaría justo antes del comienzo de la hoja $\beta 1$ y el segundo al comienzo de la α -hélice αG .

Utilizando la información derivada de la secuencia aminoacídica de dos péptidos de la DNA polimerasa tipo β de *T.cruzi* se sintetizaron oligonucleótidos degenerados, con el fin de ser utilizados como partidores en ensayos de PCR. Mediante el uso de

estos oligonucleótidos, denominados partidores 18s y 27as, se logró amplificar un fragmento de 550 pb desde una muestra de DNA genómico procedente de epimastigotes de *T.cruzi*. El clonamiento, posterior secuenciación de este fragmento y su comparación con secuencias aminoácídicas de péptidos de la DNA polimerasa tipo β de *T.cruzi* y la estructura primaria descrita para la DNA polimerasa β de rata (Matsukage y col., 1987) permitió establecer que efectivamente el fragmento de 550 pb codificaría para un segmento importante del gen de la DNA polimerasa tipo β de este parásito. Utilizando este fragmento de PCR como sonda se analizó una genoteca de DNA genómico de *T.cruzi* construida en el vector λ gt11. Se aislaron tres clones los que fueron denominados pUC-7-2, pUC-8-1 y pUC-4-3500. El mapa físico de los insertos contenidos por estos clones, reveló que pUC-4-3500 y pUC-8-1 eran idénticos, en cambio pUC-7-2 era diferente a los otros dos. Se observó que la secuencia de sitios de restricción tanto en el plásmido pUC-4-3500 como en el plásmido pUC-7-2 era la misma pero orientadas en distinto sentido. Asimismo el mapa físico indicó que el gen de la DNA polimerasa tipo β de *T.cruzi* estaba localizados en un segmento de aproximadamente 1,7 y 1,0 kb contenidos en los plásmidos pUC-4-3500 y pUC-7-2, respectivamente.

Con el fin de localizar exactamente la posición del gen de la enzima de *T.cruzi* en ambos insertos y comenzar la secuenciación de dicho gen, se procedió al subclonamiento de ambos insertos. Se obtuvieron cuatro subclones de cada plásmido y aquellos que, de acuerdo al mapa físico contenían el fragmento que hibridaba con la sonda de 550 pb, fueron secuenciados. Se obtuvo una secuencia de 664

nucleótidos de los cuales 540 correspondieron exactamente a la secuencia del fragmento de PCR de 550 y el resto a secuencias desconocidas del extremo 3' del gen de *T.cruzi*. La gran mayoría de esta secuencia se obtuvo de la secuenciación completa de uno de los clones conteniendo un inserto de 500 pb y el resto a la secuenciación parcial de un subclon vecino conteniendo un inserto de 1,3 kb. La secuencia aminoacídica deducida del segmento de 664 nucleótidos mostró una identidad casi perfecta con distintos péptidos de la DNA polimerasa tipo β de *T.cruzi*. Al compararse dicha secuencia de aminoácidos con la estructura primaria de la DNA polimerasa β de rata (Matsukage y col., 1987; Davies y col., 1994) se obtuvo un porcentaje de identidad y similitud de 38,9% y 52,8%, respectivamente. De acuerdo a esta comparación, el segmento secuenciado del gen de la DNA polimerasa de *T.cruzi* abarcaría desde el residuo 94 al 317 de la enzima de rata, lo que correspondería a casi el 90% del dominio C-terminal de dicha enzima de mamíferos compuesto por 250 residuos (Davies y col., 1994). Esto significa que el segmento secuenciado del gen de la DNA polimerasa tipo β de *T.cruzi* abarcaría todo el subdominio central denominado "palma" comprendido entre los residuos 150 al 261 en la enzima de rata, casi todo el subdominio C-terminal y parte importante del subdominio N-terminal (Davies y col., 1994; Pelletier y col., 1994; Sawaya y col., 1994).

Al realizarse un estudio más detallado de la secuencia aminoacídica derivada del segmento de 664 nucleótidos, se observó un alto grado de divergencia entre dicha secuencia y la secuencia

descrita para la DNA polimerasa β de rata (Matsukage y col., 1987). Se observó que los mayores grados de identidad coincidían con los segmentos que forman estructuras secundarias, principalmente α -hélice. Sin embargo, uno de los segmentos más conservados, de acuerdo a la comparación con la enzima de rata, coincide con la posición de la hoja β 7. Como se mencionó anteriormente, esta estructura es fundamental para la catálisis debido a la ubicación de los residuos R254, D256 y R258, los cuales estarían presentes en la secuencia de este fragmento de *T.cruzi*.

Es interesante que otra región con un alto grado de similitud entre las enzimas de ambas especies correspondió al segmento que forma el motivo catalítico C el cual está constituido por los importantes residuos D190 y D192 (Davies y col., 1994; Joyce y Steitz 1994; Pelletier y col., 1994; Sawaya y col., 1994). La comparación de ambas secuencias aminoacídicas reveló que en la enzima de *T.cruzi* no sólo estarían presentes residuos correspondientes a los aminoácidos D190 y D192, sino que también el residuo G189, postulado como posible participante en la unión de los fosfatos del desoxinucleótido durante la síntesis de DNA (Sawaya y col., 1994).

Otros residuos localizados afuera de los motivos A ó C pero que de acuerdo a estudios mediante modificación química (Basu y col., 1989), mutagénesis dirigida (Date y col., 1990) y análisis de la estructura terciaria de la DNA polimerasa β de rata (Sawaya y col., 1994) serían fundamentales en la catálisis de la enzima, son las argininas 182 y 183 (R182 y R183). De acuerdo a la comparación de la secuencia aminoacídica deducida del gen de la DNA polimerasa tipo β

de *T. cruzi* con la estructura primaria de la enzima de rata, estos residuos también estarían presentes en la enzima del parásito.

El análisis de la estructura terciaria de la DNA polimerasa β de rata cristalizada con dTTP (Davies y col., 1994) ó el análogo ddCTP (Pelletier y col., 1994) mostró una serie de residuos probablemente implicados en la unión de la desoxiribosa y la base de aquellos sustratos. De acuerdo a Davies y col., (1994) los residuos tirosina 271 (Y271), fenilalanina 272 (F272), D276 y asparagina 279 (N279) formarían un sitio de unión de la desoxiribosa. Sin embargo, Pelletier y col., (1994) postulan que los residuos D276 y N279 interaccionarían con la base del desoxinucleótido y sólo los residuos Y271, F272, además de una glicina 274, interaccionarían con la desoxiribosa. Al comparar estos residuos con la secuencia aminoacídica deducida del gen de la DNA polimerasa tipo β de *T. cruzi* (Fig.29), se observa que los residuos F272, G274 y N279 estarían conservados en la enzima del parásito. Otros residuos no mencionados por dichos autores (Davies y col., 1994; Pelletier y col., 1994), localizados en el mismo segmento que interaccionaría con la desoxiribosa y conservados en la enzima de *T. cruzi* son el Y173 y la serina 175 (S175). Asimismo otro residuo conservado, no mencionado por dichos autores y que formaría parte del segmento que interaccionaría con la base del desoxinucleótido sería la fenilalanina 178. Estos resultados son muy importantes, pues no sólo apoyan la idea que algunos de los residuos postulados por Davies y col. (1994) y Pelletier y col. (1994) participarían en la interacción de la desoxiribosa y la base del desoxinucleótido, sino que además

sugieren fuertemente que otros residuos desconocidos, también tendrían un papel relevante en dichas interacciones. Asimismo, estos resultados, sugieren que aquellos residuos no conservados en la enzima de *T.cruzi* no tendrían ningún papel en las interacciones postuladas por dichos autores.

Otros residuos que, de acuerdo a los estudios de la estructura terciaria de la enzima de rata, participarían en la interacción con los fosfatos del desoxinucleótido serían la arginina 149 y la serina 180 (Davies y col., 1994; Pelletier y col., 1994). De acuerdo a la comparación con la secuencia aminoacídica deducida del gen de la mencionada enzima de *T.cruzi* (Fig.29), sólo el residuo S180 estaría conservado en la enzima del parásito. De acuerdo a Pelletier y col. (1994) este residuo, junto con el mencionado residuos R183, participaría en la unión del fosfato β del desoxinucleótido.

Estudios de la estructura terciaria de la DNA polimerasa de rata cristalizada junto con una matriz-partidor (Pelletier y col., 1994) revelaron a un conjunto de residuos posiblemente involucrados en la interacción con dicho sustrato. Estos residuos localizados en distintos subdominios de dicha enzima corresponden a los aminoácidos G105, G107, S109, A110, R254, lisina 230 (K230), treonina 233 (T233), K234, T292, Y296, Y271 y R283. De acuerdo a Pelletier y col. (1994), los diez primeros aminoácidos mencionados interactuarían con los fosfatos de la matriz de DNA, en cambio los dos últimos, junto con el residuo K234, interactuarían con las bases nitrogenadas de dicha matriz. Al comparar la secuencia aminoacídica deducida del gen de *T.cruzi* con la estructura primaria de la DNA polimerasa β de rata

(Fig. 29) se observa que los aminoácidos G105, G107, A110, R254, L234 y R283, estarían conservados en la DNA polimerasa tipo β de *T.cruzi*. Notese que, como lo mencionamos anteriormente, la tirosina 271 también aparece relacionada con la interacción de la desoxiribosa del nucleótido, y no estaría conservada en la enzima de *T.cruzi*. Al igual que las conclusiones anteriores respecto a otros residuos conservados, estos resultados apoyan fuertemente la hipótesis que dichos residuos tendrían un importante papel en la unión de la matriz-partidor en todas las DNA polimerasa β y tipo β existentes en organismos eucarióticos. Sin embargo, es necesario señalar que en el caso de aquellos residuos no conservados en la secuencia aminoacídica deducida de este gen de *T.cruzi*, todavía no se puede descartar que dichos resultados se puedan deber a imperfecciones de la secuencia nucleotídica obtenida actualmente. Para descartar tal posibilidad y conocer el verdadero grado de divergencia de la DNA polimerasa tipo β de *T.cruzi* con respecto a sus homólogos de vertebrados, será necesario, no sólo, secuenciar el gen completo que codifica para dicha enzima, sino que además resecuenciar varias veces aquellos segmentos que sean imperfectos o dudosos, tarea que estamos ciertos, lograremos en un futuro muy cercano.

Un resumen de la comparación entre la estructura primaria de la DNA polimerasa β de rata y la secuencia deducida del gen de la DNA polimerasa tipo β de *T.cruzi*, se muestra en la Figura 33. En este esquema sólo se destacan los residuos catalíticos de los motivos A y C y la localización relativa de los péptidos de la enzima de *T.cruzi*.

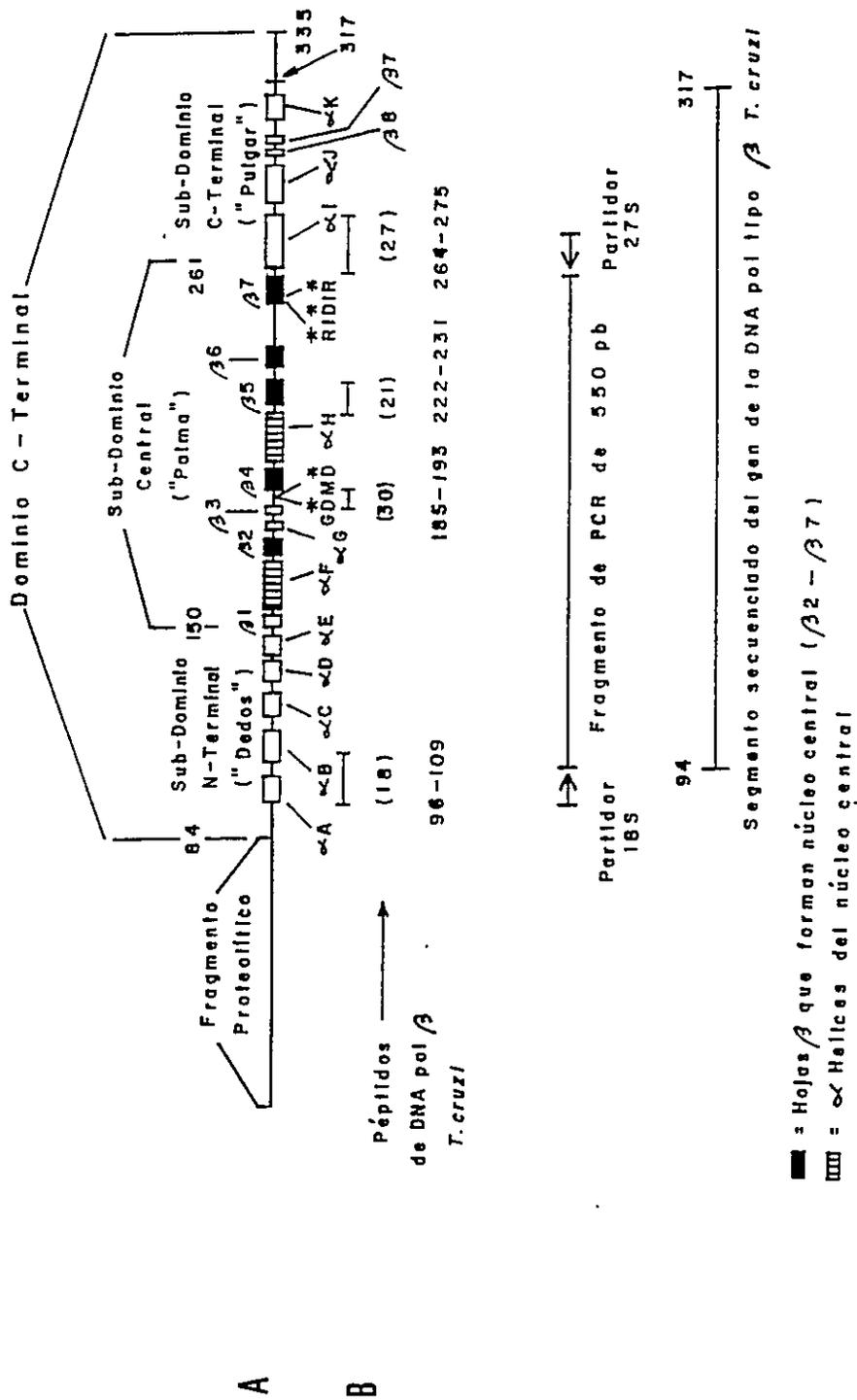


Fig.33. Esquema de la estructura primaria de la DNA polimerasa β de rata (A) mostrando la localización de las estructuras secundarias y los residuos catalíticos (D190, D192, R254, D256 y R258)(*), comparada con los péptidos (B) y segmentos deducidos del gen de la DNA polimerasa tipo β de *T.cruzi*.

Comparación de los perfiles de hidrofobicidad de las secuencias aminoácídicas homólogas de la DNA polimerasa tipo β de *T.cruzi* y la DNA polimerasa β de rata.

Es muy interesante que a pesar de la gran divergencia entre las estructuras primarias de estas enzimas, sus perfiles de hidrofobicidad

fueron muy similares. En este sentido es muy ilustrativo mencionar como ejemplo el segmento correspondiente al péptido 21 de la enzima de *T.cruzi*, el cual coincide con la hoja β 5 descrita en la enzima de rata (Davies y col., 1994). Este segmento de 10 aminoácidos tiene sólo un 20% de identidad con el correspondiente segmento de la enzima de rata. Sin embargo el perfil de hidrofobicidad de ambas secuencias es muy similar. Esto reafirma los resultados obtenidos por el alineamiento de ambas secuencias aminoácídicas y apoya fuertemente la idea que en la enzima de *T.cruzi* existirían las mismas estructuras secundarias descritas en la enzima de rata, a pesar del alto grado de divergencia entre ambas enzimas (Davies y col., 1994; Pelletier y col., 1994; Sawaya y col., 1994).

Claramente se observó que los perfiles de hidrofobicidad de los segmentos que forman el sitio catalítico, denominados motivos A y C (Davies y col., 1994), fueron muy similares entre ambas enzimas. Tal como era de esperar debido al alto grado de similitud entre las secuencias aminoácídicas de dichas enzimas.

Otro hecho interesante evidenciado por los perfiles hidrofóbicos de estas enzimas es que, las zonas de mayor similitud de ambos

perfiles coinciden con la ubicación de estructuras secundarias, ya sea α -hélice u hojas β . Sin embargo no existe un patrón común asociado a un determinado tipo de estructura secundaria. En algunos casos α -hélices poseen un carácter altamente hidrofílico, en otros, presentan un carácter totalmente inverso. Similar situación se puede adjudicar a las hojas β , sin embargo la mayoría de ellas presentan una tendencia hacia un carácter hidrofóbico.

Probable clonamiento del gen completo que codifica para la DNA polimerasa tipo β del parásito *T.cruzi*.

Es muy probable que, al menos, el plásmido pUC-4-3500 contenga el gen completo de la mencionada DNA polimerasa de *T.cruzi*. Esto se basa en las siguientes consideraciones: a) de acuerdo al estudio comparativo entre las estructuras primarias de las DNA polimerasas mencionadas anteriormente, gran parte del dominio C-terminal de la DNA polimerasa tipo β del parásito estaría contenida en el segmento de 500 nucleótidos NsiI-PstI de ambos plásmidos recombinantes, b) en pUC-4-3500, el segmento NsiI-PstI está localizado casi en el centro del inserto contenido por dicho vector, el cual está flanqueado por segmentos de más de 1200 pares de bases, c) si se realiza una estimación del posible largo del gen de dicha enzima a partir de su masa molecular de 50 kDa y considerando una masa molecular promedio de cada aminoácido de 126,7 Da (Sambrook, 1989) se obtiene un valor de 395 aminoácidos, lo que equivale a un marco de lectura compuesto por 1185 nucleótidos. Suponiendo una desviación máxima de hasta 1500 nucleótidos y considerando que en general los genes de *T.cruzi* no

poseen intrones (Campetella y col., 1992; Aslund y col., 1994), faltaría por secuenciar no más de 900 nucleótidos de dicho gen. Esto sería plenamente satisfecho por el plásmido pUC-4-3500 cuyo inserto posee más de 1200 nucleótidos a cada lado del mencionado gen.

Estudio de la organización del gen de la DNA polimerasa tipo β de *T. cruzi*

En el estudio de diferentes genes de *T. cruzi* se ha observado que muchos de ellos están organizados en conjuntos de varias copias localizados uno detrás de otro y orientados en un mismo sentido, organización denominada genes en "tandem" (Aslund y col., 1994; Campetella y col., 1992; Henriksson y col., 1990). Con el objetivo de obtener una primera evidencia sobre el número de copias y la organización del gen de la DNA polimerasa de *T. cruzi* se realizó el análisis del DNA total del parásito mediante la técnica de Southern (1975) utilizando como sonda el fragmento de PCR de 550 pb, anteriormente descrito. La interpretación de los resultados sugiere la posibilidad de que pudiera existir más de un gen, sin embargo, es muy improbable que dichos genes pudieran estar organizados en "tandem". La primera posibilidad se basa en los resultados obtenidos por digestión total del DNA con la enzima NsiI. En este experimento la sonda de 550 pb hibridó con una banda de 1,6 kb y otra de 1,0 kb. De acuerdo al mapa físico de los plásmidos recombinantes pUC-4-3500 y pUC-7-2, el fragmento de 1,6 kb, observado en el "Southern-blot", correspondería al segmento NsiI(a)-NsiI(b) descrito en ambos plásmidos. Sin embargo, en ninguno de los dos vectores señalados

existe un segmento NsiI-NsiI de 1,0 kb. Una interesante alternativa para explicar la presencia de dicho fragmento de 1,0 kb es que el segmento de DNA, correspondiente al inserto del plásmido pUC-7-2, tuviera un tercer sitio NsiI localizado a 1 kb río abajo del sitio NsiI(a). Esto implicaría que los insertos de los plásmidos pUC-7-2 y pUC-4-3500 serían diferentes, pues en el inserto del plásmido pUC-4-3500 no existe ningún sitio NsiI localizado a 1 kb río arriba del sitio NsiI(a). Esto sería coherente con las diferentes distancias entre los sitios EcoRI-HindIII en los insertos de ambos plásmidos, lo cual es otro hecho que indica la diferencia que existe entre ambos insertos, y por ende en los segmentos de DNA que contienen el gen de la DNA polimerasa tipo β de *T. cruzi*.

Con respecto a la distribución en "tandem" de posibles diferentes genes de DNA polimerasa tipo β de *T. cruzi*, esta posibilidad es muy improbable debido a que, si así fuera, las enzimas Hind III y Sma I deberían haber generado, al menos, dos fragmentos que hibridaran con la sonda de 550 pb. Esto se basa en que, de acuerdo al mapa físico de los insertos contenidos en los plásmidos pUC-7-2 y pUC-4-3500, hacia el extremo 3' del gen existe un sitio para Hind III y otro para SmaI. Por lo tanto si dos ó más de estos genes estuvieran organizados en "tandem" en el DNA del parásito, necesariamente un par de dichos sitios de restricción quedarían entremedio de dos genes de DNA polimerasa tipo β . Por consiguiente, al digerir el DNA con cualquiera de las dos enzimas mencionadas y utilizando la sonda de 550pb, se deberían detectar, al menos dos fragmentos. Sin embargo, no podemos descartar la posibilidad que

exista otra copia del gen que no contenga ninguno de los dos sitios de restricción mencionados. En tal circunstancia si sería posible que existieran dos genes localizados en "tandem" que al ser digeridos con tales enzimas y analizados con la sonda, sólo se detectara una única señal. Para dilucidar completamente estas interrogantes se requieren mayores estudios ampliando el espectro de enzimas de restricción y analizando muestras de DNA procedentes de distintas cepas de parásitos. Asimismo, la secuenciación completa y fidedigna de los genes contenidos en los plásmidos pUC-7-2 y pUC-4-3500 demostrará fehacientemente si corresponden a distintas copias del gen, tales como alelos, ó simplemente reflejan el polimorfismo de regiones no codificantes.

Expresión del gen de la DNA polimerasa tipo β de *T.cruzi* en diferentes formas celulares del parásito.

Muestras de RNA totales aislados de tres formas celulares de *T.cruzi* fueron analizados mediante "Northern-blot" (Sambrook, 1989). Las muestras analizadas provenían de la forma proliferativa epimastigote y de las dos formas no-proliferativas tripomastigote de cultivo celular y tripomastigotes metacíclicos. Se observó que la muestra procedente de la forma no proliferativa, tripomastigote de cultivo celular, originó una señal de hibridación varias veces superior a la de las otras dos formas analizadas. Esto sugiere que en aquella forma celular no-proliferativa el gen de la DNA polimerasa tipo β se expresaría con mucha mayor intensidad. Sin embargo, es necesario realizar más estudios para descartar que dichas diferencias observadas en este experimento puedan deberse a degradación del RNA

extraído de las otras formas de parásitos.

Otro punto importante de analizar en el experimento de "Northern-blot" es el posible tamaño de los mensajeros que codificarían para el gen de la DNA polimerasa tipo β de *T.cruzi*. De acuerdo a los resultados de este experimento, el tamaño de los RNA que hibridaron con la sonda de 550 pb sería alrededor de 1770 pb. Si la estimación es correcta y suponemos que estos RNA son los mensajeros que se traducen en la enzima nativa, la DNA polimerasa tipo β de *T.cruzi* estaría constituida por aproximadamente 590 aminoácidos. Considerando una masa molecular promedio de 126,7 Da para cada aminoácido (Sambrook, 1989), al multiplicarlo por 590 nos daría una masa molecular estimada de 74.753 Da, la cual no concordaría con los 50 kDa determinada para la enzima purificada del parásito. Para determinar si efectivamente existen mensajeros de tal magnitud que codifiquen para la enzima de *T.cruzi*, ó estos resultados se deben solamente a problemas técnico, se requieren realizar más estudios.

CONCLUSIONES Y PROYECCIONES

El conjunto de resultados muestra que en *T. cruzi* existirían, al menos tres DNA polimerasas y que una de ellas sería homóloga a la DNA polimerasa β descrita en vertebrados. Las propiedades bioquímicas de esta enzima fueron similares a la de vertebrado. Entre los aspectos diferentes se pueden nombrar su mayor masa molecular, sensibilidad parcial a N-etilmaleimida, baja sensibilidad a ddTTP e incapacidad de utilizar como matriz sustrato al ribopolímero poli(A). En principio estas diferencias sugieren la posibilidad que la DNA polimerasa tipo β de *T. cruzi* podría ser utilizada como blanco quimioterapéutico, sin embargo para establecer hasta que punto la enzima de *T. cruzi* es similar a su homóloga de vertebrado, es muy importante analizar otras propiedades bioquímicas como la fidelidad, la procesividad, la presencia de actividades asociadas como la exonucleolítica y el efecto de otros inhibidores. Asimismo, estudiar cual es la importancia fisiológica de esta enzima en el parásito.

El clonamiento y secuenciación de un importante segmento del gen de la DNA polimerasa tipo β de *T. cruzi* revela que la secuencia aminoacídica codificada por dicho gen tendría un alto grado de divergencia con su homóloga de vertebrado, conservándose aquellos residuos implicados directa o indirectamente en la catálisis enzimática, la unión del desoxinucleótido y el DNA. Es probable que otros residuos conservados correspondan a puntos vitales para la

mantención de la estructura nativa, lo cual sería concordante con la gran similitud observada entre los perfiles hidrofóbicos de segmentos homólogos de las secuencias aminoácídicas deducidas del gen de *T.cruzi* y del gen de la DNA polimerasa β de rata. Con el objetivo de dilucidar si efectivamente los residuos conservados son imprescindibles en la mantención de la actividad catalítica ó la estructura terciaria de esta enzima, será necesario realizar estudios de mutagénesis dirigida y analizar la tolerancia de la DNA polimerasa a las mutaciones de aquellos residuos. Es posible que otros residuos conservados sean vitales para el cumplimiento del papel fisiológico de la DNA polimerasa en el parásito, y no tengan relación directa con la catálisis ni con la estructura de la enzima. En tal caso, para analizar dichos residuos se podría intentar la anulación de los genes endógenos mediante técnicas de "nock-out" y transformar dichos parásitos con genes mutantes de la enzima.

Otros estudios de dicho gen del parásito sugieren que podría existir más de una copia de él, los cuales no estarían organizados en "tandem", a diferencia de lo que es usual para genes multicopias en *T.cruzi* (Henriksson y col., 1990; Campetella y col., 1992; Aslund y col., 1994). Sin embargo, es posible que dada la gran heterogeneidad en las poblaciones del parásito, existan cepas de *T.cruzi* que posean distintos número de copias ó variabilidad en la organización del gen. Con el fin de analizar este aspecto se podrían realizar estudios de "Southern-blot", campo pulsado y PCR en diferentes poblaciones y clones del parásito.

Finalmente, estudios preliminares plantean la posibilidad que los

mayores niveles de expresión del gen que codifica para la DNA polimerasa tipo β ocurran en una forma celular no proliferativa del parásito. Es decir, que a diferencia de lo observado en mamíferos, exista una expresión diferencial del gen dependiendo del tipo celular analizado. Además, es posible que el mencionado gen se exprese en distintos niveles según las condiciones fisiológicas ó experimentales del parásito tales como: "stress", efecto de agentes mutagénicos, etapas del ciclo celular ó envejecimiento celular. Para dilucidar estas interrogantes se podría analizar mediante técnicas de "Northern-blot" el RNA de parásitos sometidos a dichas condiciones utilizando como punto de referencia sondas de genes que se expresen constitutivamente.

En resumen, los resultados generados por esta tesis constituyen un importante avance en el conocimiento de un componente esencial de la biosíntesis de los ácidos nucleicos en eucariotes inferiores.

BIBLIOGRAFIA

- Abbotts, J., SenGupta, D.N., Zmudzka, B., Widen, S.G., Notario, V. y Wilson, S.H. (1988) Expression of human DNA polymerase β in *Escherichia coli* and characterization of the recombinant enzyme. *Biochemistry* 27, 901-909.
- Abu-Elheiga, L., Spira, D.T., y Bachrach, U. (1990) *Plasmodium falciparum*: properties of an α -like DNA polymerase, the key enzyme in DNA synthesis. *Exp. Parasitol.* 71, 21-26.
- Amaro, A.M., Hallberg, K.B., Lindstrom, E. B. y Jerez, C.A. (1994) An immunological assay for detection and enumeration of thermophilic biomining microorganisms. *Appl. Environ. Microbiol.* 53, 660-664.
- Amorim, M. I. Momen, H. y Traub, C.Y. (1993) *Trypanosoma rangeli*: Sequence analysis of tubulin gene suggest closer relationship to *Trypanosoma brucei* than to *Trypanosoma cruzi*. *Acta Tropica* 53, 99-105.
- Apt, W. y Reyes, H. (1986) Aspectos epidemiológicos de la enfermedad de Chagas en Chile. I: El territorio afectado, los vectores y la infección humana. *Parasitología al Día* 10, 94-99.
- Aoshima, J., Kubota, M Nishimura, T. y Iwamura, T. (1984) DNA polymerase of *Chlorella*. II. Characterization to distinguish the two enzyme. *J. Biochem.* 96, 461-473.
- Aslund, A., Carlsson, L., Henriksson, J., Rydaker, M., Toro, G.C., Galanti, N. y Pattersson, U. (1994) A gene family encoding heterogeneous histone H1 proteins in *Trypanosoma cruzi*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 65, 317-330.
- Bambara, R.A. y Jessee, C.B. (1991) Properties of DNA polymerases δ and ϵ , and their roles in eukaryotic DNA replication. *Biochim. Biophys. Acta* 1088, 11-24.
- Basu, A., Kedar, P., Wilson, S.H. y Modak, M.J. (1989) Active-site modification of mammalian DNA polymerase β with pyridoxal 5'-phosphate: mechanism of inhibition and identification of lysine 72 in the deoxynucleoside triphosphate binding pocket. *Biochemistry* 28, 6305-6309.
- Baril, E.F., Scheiner, C. y Pederson, T. (1980) A β -like DNA polymerase activity in the slime mold *Dictyostelium discoideum*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77, 3317-3321.
- Borst, P. (1986) Discontinuous transcription and antigenic variation in trypanosomes *Ann. Rev. Biochem.* 66, 147-151.

Boulet, A., Simon, M., Faye, G., Bauer, G.A. y Burgers, P.M.J. (1989) Structure and function of the *Saccharomyces cerevisiae* CDC2 gene encoding the large subunit of DNA polymerase III. *EMBO J.* 8, 1849-1854.

Burgers, P.M. (1989) Eukaryotic DNA polymerases α and δ : Conserved properties and interactions, from yeast to mammalian cells *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* 37, 235-280.

Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254.

Brener, Z. (1973) Biology of *Trypanosoma cruzi* *Ann. Rev. Microbiol.* 27, 347-382.

Brener, Z. y Alvarenga, N.T. (1976) Life cycle of *Trypanosoma cruzi* in vector. Symposium of new approach in American Trypanosomiasis research. Ed. Pan. Health Organization. 83-86

Brener, Z. (1984) Recent advances in the chemotherapy of Chagas' Disease. *Mém. Inst Oswaldo Cruz.* 79, 149-155

Budd, M.E., Wittrup, K.D., Bailey, J.E. y Campbell, J.L. (1989) DNA polymerase I is required for premeiotic DNA replication and sporulation but not for X-ray repair in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 9, 365-376.

Campetella, O., Henriksson, J., Aslund, L., Frasch, A.C.C., Pettersson, U. y Cazzulo, J.J. (1992) The major cysteine proteinase (cruzipain) from *Trypanosoma cruzi* is encoded by multiple polymorphic tandemly organized genes located on different chromosomes. *Mol. Biochem. Parasitol.* 50, 225-234.

Cavalier-Smith, T. (1993) Kingdom protozoa and its 18 phyla. *Microbiol. Rev.* 57, 953-994.

Chang, L.M.S. (1973) Low molecular weight deoxyribonucleic acid polymerase from calf thymus chromatin *J. Biol. Chem.* 248, 3789-3795.

Chang, L.M.S. (1974) Replication of initiated polyriboadenylic acid by mammalian low molecular weight deoxyribonucleic acid polymerase. *J. Biol. Chem.* 249, 7441-7446.

Chang, L.M.S. (1976) Phylogeny of DNA polymerase β . *Science* 191, 1183-1185.

- Chang, L.M.S., Cheriathundam, E., Mahoney, E. y Cerami, A. (1980) DNA polymerases in parasitic protozoans differ from host enzyme. *Science* 208, 510-511.
- Chang, L.M.S., Plevani, P. y Bollum, F.J. (1982) Evolutionary conservation of DNA polymerase β structure. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 79, 758-761.
- Chavalitsheewinkoon, P., De Vries, E., Stam, J.G., Franssen, F.F.J. Van der Vliet, P.C. y Overdulve, J.P. (1993) Purification and characterization of DNA polymerase from *Plasmodium falciparum* *Mol. Biochem. Parasitol.* 61, 243-254.
- Chiari, E. y Camargo, E. P. (1984) In Genes and Antigens of Parasites, a Laboratory Manual, 2nd Ed. by Morel, C.M.,
- Choi, I. y Mikkelsen, R.B. (1991) Cell cycle-dependent biosynthesis of *Plasmodium falciparum* DNA polymerase- α *Exp. Parasitol.* 73, 93-100.
- Conaway, R.C. y Lehman, I.R. (1982) A DNA primase activity associated with DNA polymerase from *Drosophila melanogaster*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79, 2523-2527.
- Contreras, V.T., Salles, J.M., Thomas, N., Morel, C.M. y Goldenberg, S. (1985) "In vitro" differentiation of *Trypanosoma cruzi* under chemically defined conditions. *Mol. Biochem. Parasitol.* 16, 315-327.
- Culotta, E. y Koshland, D.E. (1994) DNA repair works its way to the top. *Science* 266, 1926-1929.
- Date, T., Yamamoto, S., Tanihara, K., Nishimoto, Y., Liu, N. y Matsukage, A. (1990) Site-directed mutagenesis of recombinant rat DNA polymerase β : involvement of arginine-183 in primer recognition. *Biochemistry* 29, 5027-5034.
- Davies, J.F., Almasy, R.J., Hostomska, Z., Ferre, R.A. y Hostomsky, Z. (1994) 2.3 Å Crystal structure of the catalytic domain of DNA polymerase β . *Cell* 76, 1123-1133.
- De Souza, M.A. (1983) A simple method to purify biologically and antigenically preserved bloodstream trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi* using DEAE cellulose columns. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro* 78, 317-333.
- De Vries, E., Stam, J.G., Franssen, F.F.J., Van der Vliet, P.C. y Overdulve, J.P. (1991) Purification and characterization of DNA polymerases from *Plasmodium berghei* *Mol. Biochem. Parasitol.* 45, 223-232.

- Devereux, J., Haeberli, P. y Smithies, O. (1984) A comprehensive set of sequence analysis programs for the VAX. *Nucleic Acids Res.* 12, 387-395.
- Du, Y. y Maslov, D. A. (1994) Monophyletic origin of B-division proteobacterial endosymbionts and their coevolution with insect trypanosomatid protozoa *Blastocrithidia culicis* and *Crithidia ssp.* *Proc. Nactl. Acad. Sci. USA* 91, 8437-8441
- Dube, D.K., Williams, R., Seal, G. y Williams, S.C. (1979) Detection and characterization of DNA polymerase from *Trypanosoma brucei*. *Biochim. Biophys. Acta.* 561, 10-16.
- Fairlamb, A.H. (1990) Future prospects for the chemotherapy of human trypanosomiasis *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 84, 613-617.
- Fienberg, A.P. y Vogelstein, B. (1983) A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal. Biochem.* 132, 6-13.
- Filardi, L.S. y Brener, Z. (1987) Susceptibility and natural resistance to *Trypanosoma cruzi* strains to drugs used clinically in Chagas' disease. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 81, 755-759.
- Fornace, A., Zmudzka, B., Hollander, M.C. y Wilson, S. (1989) Induction of β -Polymerase mRNA by DNA-Damaging agents in chinese hamster ovary cells. *Mol. Cell. Biol.* 9, 851-853.
- Foury, F. (1989) Cloning and sequencing of the nuclear gene MIP1 encoding the catalytic subunit of the yeast mitochondrial DNA polymerase. *J. Biol. Chem.* 264, 20552-20560.
- Fry, M., (1983) Eukaryotic DNA Polymerases in: "Enzyme of DNA Synthesis and Modification". vol. 1 DNA synthesis Samson T. Jacob Ed. pp39-92. CRC Press. Inc., Boca Raton.
- Furukawa, Y., Yamada, R. y Kohno, M. (1979) Presence of two DNA polymerases in *Tetrahymena pyriformis* *Nucleic. Acid. Res.* 7, 2387-2398.
- Ganz, P.R. y Pearlman, R.E. (1980) Purification from *Tetrahymena thermophila* of DNA polymerase and a protein which modifies its activity *Eur. J. Biochem.* 113, 159-173.
- Gershoni, J.M. y Palade, G.E. (1983) Protein blotting: Principles and application. *Anal. Biochem.* 131, 1-15.
- Goding, J. y Handman, E. (1984) Electrophoretic analysis of protein antigens. In: Genes and antigens of parasites. A Laboratory Manual, 2nd edition, UNDP/World Bank/WHO Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases, Geneva. 95-109.

- Hanawalt, P.C. (1994) Transcription-coupled repair and human disease. *Science* 266, 1957-1958.
- Hancock, K. y Tsang, V.C.W. (1983) India ink staining of proteins on nitrocellulose paper. *Anal. Biochem.* 133, 157-162.
- Harlow, E. y Lane, D. (1988). *Antibodies: A Laboratory Manual*, pp 471-504, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.
- Hellman, U., Wernstedt, C., Gomez, J. y Heldin, C.H. (1995) Improvement of an in-gel digestion procedures for the micropreparation of internal protein fragments for amino acid sequencing. *Anal. Biochem.* 224, 451-455.
- Hengen, P.N. (1995) Methods and reagents: cloning PCR product using T-vectors. *Trens in Biochem. Sci.* 20, 85-86.
- Henriksson, J., Aslund, L., Macina, R.A., Franke, B.M., Cazzulo, J.J., Frash, A.C.C. y Pettersson, U. (1990) Chromosomal localization of seven cloned antigen genes provides evidence of diplody and further demonstration of karyotype variability in *Trypanosoma cruzi*. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 42, 213-224.
- Henriksson, J. (1995) Genomic variation in american trypanosomes. Tesis doctoral, Universidad de Uppsala, Suecia.
- Hoeijmakers, J.H.J. y Bootsma, D. (1994) Incisions for excision. *Nature* 371, 654-655.
- Holler, E., Fischer, H., Weber, C., Stopper, H., Steger, H. y Simek, H. (1987) A DNA polymerase with unusual properties from the slime mold. *Physarum polycephalum*. *Eur. J. Biochem.* 163, 397-405.
- Holmes, A.M., Cheriathundam, E., Kalinski, A. y Chang, L.M.S. (1984) Isolation and partial characterization of DNA polymerases from *Crithidia fasciculata* *Mol. Biochem. Parasitol.* 10, 195-205.
- Hubscher, U. (1984) DNA polymerases in prokaryotes and eukaryotes: Mode of action and biological implications *Experientia* 39, 1-25.
- Ibañez, C.F., Affranchino, J.L. y Frash, C.C. (1987) Antigenic determinants of *Trypanosoma cruzi* defined by cloning of parasite DNA. *Mol. Biochem. Parasitol.* 25, 175-184.
- Ikeda, J.E., Longiaru, M., Horwitz, M. y Hurwitz, J. (1980) Elongation of primed DNA templates by eukaryotic DNA polymerases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 77, 5827-5831.

- Insdorf, N.F. y Bogenhagen, D.F. (1989) DNA polymerase γ from *Xenopus laevis*. *J. Biol. Chem.* 264, 21491-21497.
- Joenje, H. y Benbow, R.M. (1978) A low molecular weight DNA polymerase from ovaries of the frog *Xenopus laevis*. *J. Biol. Chem.* 253, 2640-2649.
- Johnson, L.M., Snyder, M., Chang, L.M.S., Davis, R.W. y Campbell, J.L. (1985) Isolation of the gene encoding yeast DNA polymerase I. *Cell* 43, 369-377.
- Joyce, C.M. y Steitz, T.A. (1987) DNA polymerase I: from crystal structure to function via genetics. *Trends in Biochem Sci.* 12, 288-292.
- Joyce, C.M. y Steitz, T.A. (1994) Function and structure relationship in DNA polymerases. *Annu. Rev. Biochem.* 63, 777-822.
- Kaftory, A. y Fry, M. (1978) Highly efficient copying of single-stranded DNA by eukaryotic cell chromatin. *Nucleic Acids Res.* 5, 2679-2693.
- Karawya, E., Swack, J.A. y Wilson, S.H. (1983) Improved conditions for activity gel analysis of DNA polymerase catalytic polypeptides. *Anal. Biochem.* 135, 318-325.
- Khan, N.N., Wright, G.E., Dudycz, L.W. y Brown; N.C. (1984) Butylphenyl dGTP: a selective and potent inhibitor of mammalian DNA polymerase alpha. *Nucleic Acids Res.* 12, 3695-3706.
- Klenow, H. y Henningsen, I. (1970) Selective elimination of the exonuclease activity of the deoxyribonucleic acid polymerase from *Escherichia coli B* by limited proteolysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 65, 168-175.
- Kyte, J. y Doolittle, R.F. (1982) A simple method for displaying the hydropathic character of a protein *J. Mol. Biol.* 157, 105-132.
- Kornberg, A. (1980) DNA replication, Freeman Publications, san Francisco.USA.
- Kornberg, A. y Baker, T. (1992) DNA Replication, second Ed. W.H. Freeman, USA.
- Kumar, A., Widen, S.G., Williams, K.R., Kedar, P., Karpel, R.L. y Wilson, S.H. (1990a) Studies of the domain structure of mammalian DNA polymerase β : identification of a discrete template binding domain. *J. Biol. Chem.* 265, 2124-2131.
- Kumar, A., Abbotts, J., Karawya, E.M. y Wilson, S.H. (1990b) Identification and properties of the catalytic domain of mammalian DNA polymerase β . *Biochemistry* 29, 7156-7159.

- Laemmli, R. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 *Nature* 227, 680-685.
- Lagerkvist, A., Stewart, J., Lagerstrom-Fermér, M. y Landgren, U. (1994) Manifold sequencing: efficient processing of large sets of sequencing reactions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 2245-2249.
- Larder, B.A., Purifoy, D.J.M., Powell, K.L. y Darby, G. (1987) Site-specific mutagenesis of AIDS virus reverse transcriptase. *Nature* 327, 716-717.
- Larder, B.A., Kemp, S.D. y Purifoy, D.J.M. (1989) Infectious potential of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase mutant with altered inhibitor sensitivity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 4803-4807.
- Leegwater, P.A.J., Strating, M., Murphy, N., Kooy, R.F., Van der Vliet, P.C. y Overdulve, J.P. (1991) The *Trypanosoma brucei* DNA polymerase α core subunit gene is developmentally regulated and linked to a constitutively expressed open reading frame *Nucleic. Acid. Res.* 19, 6441-6447.
- Makioka, A., Stavros, B., Ellis, J.T. y Johnson, A.M. (1993) Detection and characterization of DNA polymerase activity in *Toxoplasma gondii*. *Parasitology* 107, 135-139.
- Marcus, S., Lipschik, G., Trueba, G. y Bacchi, C.J. (1980) Chromatographic resolution of two DNA polymerase activities from bloodstream forms of *Trypanosoma brucei*: differential responses to exogenous polyamine addition. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 93, 1027-1035.
- Marcus, S.L., Kopelman, R., Koll, B. y Bachi, C.J. (1982) Effect of exogenous polyamine and trypanocides on the DNA polymerase activities from *Trypanosoma brucei brucei*, mouse thymus and murine leukemia virus. *Mol. Biochem. Parasitol.* 5, 231-243.
- Maslov, D.A. y Simpson, L. (1995) Evolution of parasitism in kinetoplastid protozoa. *Parasitol. Today* 11, 30-32
- Matsukage, A., Nishikawa, K., Ooi, T., Seto, Y. y Yamaguchi, M. (1987) Homology between mammalian DNA polymerase β and terminal deoxynucleotidyltransferase. *J. Biol. Chem.* 262, 8960-8962.
- Mc Lennan, A.G. y Keir, H.M. (1975) Deoxyribonucleic acid polymerases from *Euglena gracilis*. *Biochem. J.* 151, 227-238.
- Modrich, P. (1994) Mismatch repair, genetic stability, and Cancer. *Science* 266, 1959-1960.

- Morrison, A., Araki, H., Clark, A.B., Hamatake, R.K. y Sugino, A. (1990) A third essential DNA polymerase in *S. cerevisiae*. *Cell* 62, 1143-1151.
- Nelson, E.M., Stowers, D. J., Bayne, M. L. y Benbow, R.M. (1983) Classification of DNA polymerase activities from ovaries of the frog, *Xenopus laevis*. *Develop. Biol.* 96, 11-22
- Newton, B. A. y Le Page, R.W.F. (1967) Preferential inhibition of extranuclear deoxyribonucleic acid synthesis by the Trypanocide berenil. *Biochem. J.* 105, 50P
- Nishida, C., Reinhard, P. y Linn, S. (1988) DNA repair synthesis in human fibroblasts requires DNA polymerase δ . *J. Biol. Chem.* 263, 501-510.
- Nolan, L. y Rivera, J.H. (1991) Partial purification and characterization of a β -like DNA polymerase from *Leishmania mexicana* *Biochem. Intern.* 25, 499-508.
- Nolan, Rivera, J.H. y Khan, N.N. (1992) Isolation and partial characterization of a high-molecular-weight DNA polymerase from *Leishmania mexicana*. *Biochim. Biophys. Acta.* 1120, 322-328.
- Okita, T.W. y Volcani, B.E. (1977) The Deoxyribonucleic Acid Polymerase from the diatom *Cylindrotheca fusiformis*. *Biochem. J.* 167, 601-619.
- Ollis, D.L. Brick, P., Hamlin, R., Xuong, N.G. y Steitz, T.A. (1985) Structure of large fragment of *Escherichia coli* DNA polymerase I complexed with dTMP. *Nature*, 313, 762-766.
- Opperdoes, F.R. (1985) Biochemical peculiarities of Trypanosomas, African and South American. *Br.Med.Bull.* 41, 130-136.
- Ostergaard, E., Brams, P., Westergaard, O. y Nielsen, O.F. (1987) Purification and characterization of a inducible mitochondrial DNA polymerase from *Tetrahymena thermophila*. *Biochem. Biophys. Acta* 908, 150-157.
- Pelletier, H., Sawaya, M.R., Kumar, A., Wilson, S.H. y Kraut, J. (1994) Structure of ternary complexes of rat DNA polymerase β , a DNA template-primer, and ddCTP. *Science* 264, 1891-1903.
- Pérez-Morga, D. y Englund, P.T. (1993) The structure of replicating kinetoplast DNA networks. *J.Cell Biol.* 123, 1069-1079.
- Polesky, A.H., Dahlberg, M.E., Benkovic, S.J., Gridley, N.D.F. y Joyce, C.M. (1992) Side chains involved in catalysis of the polymerase reaction of DNA polymerase I from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 267, 8417-8428.

- Ridley, R., White, J.H. Mc Aleese, S.M. Goman, M., Alano, P., Vries, E. y Kilbey, B. J. (1991) DNA polymerase δ : gene sequences from *Plasmodium falciparum* indicate that this enzyme is more highly conserved than DNA polymerase α . *Nucleic Acids Res.* 19, 6731-6736.
- Rojas, C., Venegas, J., Litvak. S. y Solari, A (1992) Two DNA polymerases from *Trypanosoma cruzi* :Biochemical Characterization and effect of inhibitors *Comp. Biochem. Physiol.* 101, 27-33.
- Ross, C. y Harris, W.J. (1978) DNA polymerases from *Chlamydomonas reinhardtii*. *Biochem. J.* 171, 231-240.
- Sakai, A. y Watanabe, Y. (1982a) DNA polymerase of *Tetrahymena pyriformis*. I. Characterization of two N-Ethylmaleimide-sensitive DNA polymerases from exponentially growing cells. *J. Biochem.* 91, 845-853.
- Sakai, A. y Watanabe, Y. (1982b) DNA polymerase of *Tetrahymena pyriformis*. II. Does an N-ethylmaleimide-resistant polymerase exist in *Tetrahymena* ?. *J. Biochem.* 91, 855-863.
- Sakaguchi, K. y Boyd, J.B. (1985) Purification and characterization of a DNA polymerase β from *Drosophila* *J. Biol. Chem.* 260, 10406-10411.
- Sambrook, J., Fritch, E.T. y Maniatis, T. (1989) Molecular Cloning. A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.
- Sancar, A. (1994) Mechanisms of DNA excision repair. *Science* 266, 1954-1956.
- Sanger, F. y Coulson, A.R. (1975) A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase *J. Mol. Biol.* 94, 441-448.
- Sawaya, M.R., Pelletier, H., Kumar, A., Wilson, S.H. y Kraut, J. (1994) Crystal structure of rat DNA polymerase β : evidence for a common polymerase mechanism. *Science* 264, 1930-1935.
- SenGupta, D.N., Zmudzka, B.Z., Kumar, P., Cobianchi, F., Skowronski, J. y Wilson, S.H. (1986) Sequence of human DNA polymerase β mRNA obtained through cDNA cloning. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 136, 341-347.
- Schiebel, W. y Raffael, A. (1980) Two groups of deoxyribonucleic acid polymerases from *Physarum polycephalum* classified by differential sensitivity to n-ethylmaleimide, heparin, cytosine arabinoside triphosphate and ethidium bromide *FEBS letters* 121, 81-85.

- Shimizu, K., Santocanale, C., Ropp, P.A. Longhese, M.P., Plevani, P., Lucchini, G. y Sugino, A. (1993) Purification and Characterization of a new DNA polymerase from budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 268, 27148-271153.
- Schlabach, A., Fridlender, B., Bolden, A. y Weissbach, A. (1971) DNA-dependent DNA polymerases from HeLa cell nuclei II. Template and substrate utilization *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 44, 879-885.
- Schofield, C.J. (1994) Triatominae, Biología y Control. Eurocommunica Publications UK.
- Simpson, L. (1987) The mitochondrial genome of kinetoplastid protozoa: Genomic organization, transcription, replication, and evolution. *Ann. Rev. Microbiol.* 41, 363-382.
- Simpson, L. y Maslov, D.A. (1994) RNA editing and the evolution of parasites. *Science* 264, 1870-1871
- Singhal, R. y Wilson, S. (1993) Short gap-filling synthesis by DNA polymerase β is processive. *J. Biol. Chem.* 268, 15906-15911.
- Sitney, K., Budd, M.E. y Campbell, J.L. (1989) DNA polymerase III, a second essential DNA polymerase, is encoded by the *S.cerevisiae* CDC2 gene. *Cell* 56, 599-605.
- Sloof, P. y Benne, R. (1993) RNA editing in trypanosome mitochondria: guidelines for mosels. *FEBS lett.* 325, 146-151
- So, A.G. y Downey, K.M. (1988) Mammalian DNA polymerases α and δ : Current status in DNA replication. *Biochemistry* 27, 4591-4595.
- Solari, A., Tharaud, D., Repetto, Y., Aldunate, J., Morello, A., y Litvak, S. (1983) *In vitro* and *in vivo* studies of *Trypanosoma cruzi* DNA polymerase *Biochem. Inter.* 7, 147-157.
- Solari, A., Saavedra, H., Sepulveda, C., Oddó, Acuña, G., Labarca, J., Muñoz, S., Cuny, G., Brengues, C., Veas, F. y Bryan, R. (1993). Successful treatment of *Trypanosoma cruzi* encephalitis in a patient with hemophilia and AIDS. *Clinical Infectious Diseases* 16, 255-259.
- Southern, E. (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J.Mol. Biol.* 98, 503-505.
- Spadari, S. y Weissbach, A. (1975) RNA-primed DNA synthesis: Specific catalysis by HeLa cell DNA polymerase α . *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 72, 503-507.

- Spadari, S., Sala, F. y Pedrali-Noy, G. (1982) Aphidicoline: a specific inhibitor of nuclear DNA replication in eukaryotes. *Trends Biochem. Sci.* 7, 29-32.
- Stalker, D.M. Mosbaugh, D.W. y Meyer, R.R. (1976) Novikoff hepatoma deoxyribonucleic acid polymerase. Purification and properties of a homogeneous β polymerase. *Biochemistry* 15, 3114-3121.
- Stauder, G., Rieseemann, H. Joester, W.M. y Joester, K.E. (1983) Purification and properties of a low molecular weight DNA polymerase from *Neurospora crassa* *Biochim. Biophys. Acta* 741, 308-314.
- Steitz, T.A., Smerdom, S.J., Jager, J. y Joyce, C.M. (1994). A unified polymerase mechanism for nonhomologous DNA and RNA polymerases. *Science* 266, 2022-2025.
- Suzuki, C., Nagano, H. y Mano, Y. (1977) DNA polymerase- β from the nuclear fraction of the sea urchin embryos: Characterization of the purified enzyme. *J. Biochem* 82, 1613-1621.
- Tabor, S. y Richardson, C.C. (1987) DNA sequence analysis with a modified bacteriophage T7 DNA polymerase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84, 4767-4771.
- Tait, A. y Cummings, D.J. (1975) DNA-dependent DNA polymerase activity from *Paramecia macronuclei*. *Biochem. Biophys. Acta* 378, 282-295.
- Tanabe, K., Yamaguchi, M., Matsukage, A. y Takahashi, T. (1981) Structural homology of DNA polymerase β from various mammalian cells *J. Biol. Chem.* 256, 3098-3102.
- Tanabe, K., Yamaguchi, T., Saneyoshi, M., Yamaguchi, M., Matsukage, A. y Takahashi, T. (1984) Difference in the mechanism of poly(dT) synthesis by DNA polymerases β and γ *J. Biochem.* 96, 365-370.
- Tarragó-Litvak, L., Viratelle, O., Darriet, D., Dalibart, R. y Litvak, S. (1978) The inhibition of mitochondrial DNA polymerase γ from animal cells by intercalating drugs. *Nucleic Acid. Res.* 5, 2197-2210.
- Tibayrenc, M. y Ayala, F. (1988) Isozyme variability in *Trypanosoma cruzi*, the agent of Chagas' disease, Genetical taxonomical and epidemiological significance. *Evolution* 42, 277-292.
- Torri, A.F. y Englund, P. (1992) Purification of a mitochondrial DNA polymerase from *Crithidia fasciculata* *J. Biol. Chem.* 267, 4786-4792.

- Torri, A.F., Kunkel, T.A. y Englund, P.T. (1994) A β -like DNA polymerase from mitochondrion of the Trypanosomatid *Crithidia fasciculata*. *J. Biol. Chem.* 269, 8165-8171.
- Towbin, H., Staehelin, T. y Gordon, J. (1978) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some application *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 76, 4350-4354.
- Tsurimoto, T., Thomas, M. y Stillman, B. (1990) Sequential initiation of lagging and leading strand synthesis by two different polymerase complexes at the SV40 DNA replication origin. *Nature* 346, 534-539.
- Tsuruo, T., Hirayama, K., Kawaguchi, M., Satoh, H. y Ukita, T. (1974). Low molecular weight DNA polymerase of rat ascites hepatoma cells. *Biochim. Biophys. Acta* 366, 270-278.
- Venegas, J. y Solari, A. (1994) Colorimetric detection of DNA polymerase activity after sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis *Anal. Biochem.* 221, 57-60.
- Venegas, J. y Solari, A. Purification and characterization of a β -like DNA polymerase from *Trypanosoma cruzi*. *Mol. Biochem. Parasitol.* (aceptada para publicación).
- Wang, T.S.F., Eicher, D.C. y Korn, D. (1977) Effect of Mn^{2+} on the in vitro activity of human deoxyribonucleic acid polymerase β . *Biochemistry* 16, 4927-4934.
- Wang, T.S.F., Wong, S.W. y Korn, D. (1989) Human DNA polymerase α : predicted functional domains and relationships with viral DNA polymerases. *FASEB J.* 3, 14-21.
- Wang, T.S.F. (1991) Eukaryotic DNA polymerases *Annu. Rev. Biochem.* 60, 513-552.
- Waser, J., Hubscher, U., Kuenzle, C.C. y Spadari, S. (1979) DNA polymerase β from brain neurons is a repair enzyme *Eur. J. Biochem.* 97, 361-368.
- Weber, C., Fischer, H. y Holler, E. (1988) Purification and characterization of DNA polymerase α from plasmodia of *Physarum polycephalum*. *Eur. J. Biochem.* 176, 199-206.
- Wendel, S., Brener, Z., Camargo, A. y Rassi, A. (1992). Chagas disease (American trypanosomiasis). ISBT, Sao Paulo, Brazil.
- Wernette, C. y Kaguni, L. (1986) A mitochondrial DNA polymerase from embryos of *Drosophila melanogaster*: Purification, subunit structure, and partial characterization. *J. Biol. Chem.* 261, 14764-14770.

White, J.H., Kilbey, B.J., de Vries, E., Goman, M., Alano, P., Cheesman, S., Mc Aleese, S. y Ridley, R.G. (1993) The gene encoding DNA polymerase α from. *Plasmodium falciparum*. *Nucleic Acids res.* 21, 3643-3646.

Widen, S., Kedar, P. y Wilson, S.H. (1988) Human β -polymerase gene: structure of the 5'-flanking region and active promoter. *J. Biol. Chem.* 263, 16992-16998.

Wilson, S., Abbotts, J. y Widen, S. (1988) Progress toward molecular biology of DNA polymerase *Biochim. Biophys. Acta* 949, 149-157

Wong, R.C.K., Hudson, L. y Hindmarsh, J.E. (1986) Immune precipitation and immunoblotting for the detection of *Trypanosoma cruzi* antigens. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 80, 275-281.

Yagura, T., Kozu, T. y Seno, T. (1980) Partial purification and characterization of poly(dC)-dependent DNA polymerase and its stimulating factor. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 92, 1289-1296.

Yamaguchi, M., Hirose, F., Hayashi, Y., Nishimoto, Y. y Matsukage, A. (1987) Murine DNA polymerase β gene: mapping of transcription initiation sites and the nucleotide sequence of the putative promoter region. *Mol. Cell. Biol.* 7, 2012-2018.

Yanisch-Perron, C., Viera, J. y Messing, J., (1985) Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* 33, 103-119.

Yamaguchi, M., Matsukage, A. y Takahashi, T. (1980) Chick embryo DNA polymerase γ : purification and structural analysis of nearly homogeneous enzyme. *J. Biol. Chem.* 255, 7002-7009.

Yoshida, S., Yamada, M. y Masaki, S. (1979) Novel properties of DNA polymerase β with poly(rA)-oligo(dT) template-primer. *J. Biochem.* 85, 1387-1395

Zmudzka, B.Z., SenGupta, D., Matsukage, A., Cobianchi, F., Kumar, P., y Wilson, S.H. (1986) Structure of rat DNA polymerase β revealed by partial amino acid sequencing and cDNA cloning. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83, 5106-5110.