

030629
Leje.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO

COLEGIO DE CIENCIAS Y HUMANIDADES
UNIDAD ACADÉMICA DE LOS CICLOS
PROFESIONAL Y DE POSGRADO

**CARACTERIZACIÓN DE LAS HISTONAS DE
Trypanosoma cruzi**

T E S I S
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE
MAESTRO EN INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA BÁSICA
P R E S E N T A:
JAVIER ORTEGA CESEÑA

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

MEXICO, D. F.

DICIEMBRE DE 1994



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
COLEGIO DE CIENCIAS Y HUMANIDADES
UNIDAD ACADÉMICA DE LOS CICLOS PROFESIONAL Y DE POSGRADO

CARACTERIZACION DE LAS HISTONAS DE *Trypanosoma cruzi*

TESIS QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE
MAESTRO EN INVESTIGACION BIOMEDICA BASICA

PRESENTA
JAVIER ORTEGA CESEÑA

MEXICO, D.F., DICIEMBRE DE 1994

AGRADECIMIENTOS

A mi padre, por su ejemplo para enfrentar los desafíos con entusiasmo.

A mi mamá, por su cariño incondicional a mi y a todos sus hijos

A Juan Sebastián y a Xavier Ivan por haberme dado el privilegio de verlos crecer y disfrutar con ellos tiempos inolvidables

A Gilberto, Armida, Abel, Beatriz, Gustavo y Luis por el recuerdo de nuestros años maravillosos en que los días se hacían de chicle durante el verano

A Norma por su apoyo total

A Julieta por su amistad y estímulo

Al Dr. Lino Díaz de León, por sus consejos y ayuda en la elaboración de esta tesis

Al Dr. Miguel Pérez de la Mora, por su guía y dedicada revisión de esta tesis

A Margaro, por el buen sabor de las vivencias durante la Secundaria, la Preparatoria, la Universidad y los triunfos y derrotas en el basquetbol

A Javier Espinosa por su ayuda y amistad

A Jorge Pérez de la Mora por su inestimable apoyo

A María, Javier, Leslie, Karla, Javier Iván y Oscar, mi segunda familia

A Cielo, por la fortuna de conocerla

A Tania, por tantas desveladas compartiendo el mismo camino, por la fe en el futuro, por su apoyo y comprensión, por los sueños construidos y sobre todo, por su amor

INDICE DE CONTENIDOS

1. RESUMEN	1
2. INTRODUCCION	3
2.1 Estructura de la cromatina	3
2.2. Microscopía electrónica	4
2.3. Digestión con nucleasas	5
2.4. Reconstitución de cromatina	6
2.5. El nucleosoma y el filamento nucleosomal	6
2.6. La cromatina de tripanosomátidos	12
3. OBJETIVO	15
3.1. Objetivo General	15
3.2. Objetivos específicos	15
4. MATERIAL Y METODOS	17
4.1. Cultivos celulares	17
4.2. Aislamiento de núcleos	18
4.3. Obtención de la cromatina	19
4.4. Extracción de proteínas nucleares básicas	19
4.5. Electroforesis preparativa y electroelucion	20
4.6. Electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS	22
4.7. Enfoque isoelectrico	22
4.8. Aislamiento de proteínas ribosomales	23
4.9. Composición de aminoácidos	24

5. RESULTADOS	25
6. DISCUSION	39
7. BIBLIOGRAFIA	47

1. RESUMEN

La estructura de la cromatina ha sido estudiada extensamente, principalmente en eucariotes superiores. En base a dichas investigaciones, se ha planteado un modelo consistente para los diferentes niveles de organización de la cromatina en el que la unidad estructural es el nucleosoma. Esta entidad está constituida por un octámero de cuatro tipos de proteínas básicas, las histonas, y un segmento de ADN de alrededor de 200 pares de bases. El ADN da dos vueltas sobre la superficie externa del octámero y su trayectoria es sellada por un quinto tipo de histona.

Aunque el nucleosoma es una partícula bastante conservada en eucariotes superiores, hay cada vez mas evidencias de que existen diferencias importantes tanto morfológicas como bioquímicas en eucariotes inferiores. Dichas diferencias pueden ser atribuidas al componente proteico de la cromatina: las histonas.

Estudios previos en *Trypanosoma cruzi* muestran un comportamiento estructural de su cromatina que parece diferir sustancialmente al de otros eucariotes superiores, por lo que en el presente estudio se realizó una caracterización electroforética y de composición de aminoácidos de las histonas de este organismo. Se encontraron diferencias en el patron electroforético de las nucleoproteínas de *T. cruzi* en dos sistemas distintos. Se determinó la basicidad de cada una de las proteínas básicas mediante electroenfoque. La comparación de la composición de aminoácidos de estas proteínas con las histonas del núcleo nucleosomal de eucariotes superiores mostró un aceptable grado de homología con las histonas H3 y H4. No obstante la divergencia con H2A y H2B y las histonas tipo H1 es muy grande.

Una banda de alta movilidad, H6-u, que había sido reportada por otros autores como una posible H1 resultó tener un tamaño similar a las histonas del núcleo nucleosomal. Esta proteína posee características muy peculiares ya que su alta basicidad no refleja su contenido aparente de aminoácidos.

También se reporta, por primera vez, la presencia de una proteína que por su tamaño y riqueza relativa de lisina se asemeja más a las histonas del tipo H1 que las que describen otros autores.

Los resultados de este trabajo apoyan la noción de que *T. cruzi* posee un grupo completo de histonas que, aunque muestran diferencias notables con respecto a las de eucariotes superiores, comparten características funcionales esenciales. Estos datos plantean una caracterización más profunda de la estructura de la cromatina de este parásito a fin de tener un mayor entendimiento de sus mecanismos de expresión génica.

2. INTRODUCCION

2.1 Estructura de la cromatina

La cromatina de organismos eucariotes ha sido ampliamente estudiada a nivel morfológico y bioquímico. Esto ha conducido a establecer un modelo estructural que propone una organización en subunidades repetidas regularmente llamadas nucleosomas. Estas son el resultado de la interacción entre el ADN y un grupo de proteínas básicas llamadas histonas (Gasser, 1987).

Así pues, el nucleosoma es la unidad fundamental de la cromatina y está constituido por un segmento de ADN, cuatro pares de las histonas H2B, H2A, H3 y H4 que forman una estructura llamada núcleo nucleosomal, así como una molécula de un quinto tipo denominada H1 que se localiza en el espacio internucleosomal. Esta organización se encuentra consistentemente a través de las especies estudiadas (Richard, 1984).

El papel de las histonas del núcleo nucleosomal está asociado principalmente con la estructura del nucleosoma, mientras que la función más importante de la histona H1 es la formación del filamento nucleosomal y de la estructura solenoidal o condensada de la cromatina (Thomas, 1983).

Esta visión ha sido conformada principalmente de los estudios realizados en eucariotes superiores y plantas, debido a que la metodología utilizada en estos sistemas biológicos permitió un aislamiento relativamente fácil para la caracterización del material genético. Sin embargo, el estudio de la cromatina en eucariotes inferiores ha sido un proceso más lento debido a las

dificultades inherentes que implica su aislamiento, por lo que hasta recientemente se han encontrado cada vez más evidencias que revelan importantes diferencias estructurales de su cromatina con respecto a organismos filogenéticamente superiores.

A fin de realizar un análisis comparativo entre diferentes clases de organismos, es necesario revisar las características más relevantes que posee la cromatina de eucariotes superiores como sistema de referencia, haciendo énfasis en el papel de las histonas.

La elucidación de la estructura cromatínica en eucariotes superiores se llevó a cabo en base a evidencias experimentales surgidas de líneas independientes de investigación y que proporcionaron consistencia al modelo resultante. Esta estrategia se basó en estudios de microscopía electrónica, digestión de la cromatina con nucleasas y la reconstitución de la cromatina y partículas nucleosomales con histonas en solución (Kornberg, 1977).

2.2. Microscopía electrónica

Thoma y Cols. (Thoma, 1979), describieron los resultados de un estudio sistemático de los efectos de la fuerza iónica en la morfología de la cromatina íntegra y de la cromatina carente de la histona H1. Estos autores encontraron que la cromatina se repliega progresivamente desde un filamento de nucleosomas a una concentración de alrededor de 1mM de sal monovalente, pasando por estructuras intermedias helicoidales, hasta terminar como una fibra gruesa de 250 D de diámetro, a una concentración de 60 mM de sal.

La cromatina que carece de H1 también se condensa a medida que aumenta la fuerza iónica pero no de manera tan densa ni formando estructuras tan definidas como la cromatina completa.

En este estudio, se demostró que la trayectoria de la cadena de ADN iniciaba y terminaba en el mismo punto del nucleosoma, sugiriendo la existencia de un mecanismo para sellar el sitio de entrada y salida de la cadena de ADN, concluyéndose que la H1 estabiliza el nucleosoma.

Estos hallazgos concuerdan con los resultados de cristalografía de rayos X sobre la estructura interna del nucleosoma realizados por Finch y Klug (Finch, 1978a; Klug, 1977), generando el modelo del nucleosoma, donde la H1 está unida a la región en el punto en que se completan las dos vueltas del DNA. Esta partícula constituye el nucleosoma y tiene 166 pares de bases (pb).

2.3. Digestión con nucleasas

El uso de algunos tipos de nucleasas, principalmente la nucleasa de micrococos y la de estafilococos, en los estudios de Hewish y Lutter (Hewish, 1973; Lutter, 1979), proporcionaron la evidencia bioquímica de una estructura constituida por elementos repetidos de la cromatina. El patrón electroforético de digestión de cromatina con nucleasas genera segmentos de ADN que son múltiplos del fragmento más pequeño obtenido en condiciones controladas de la acción enzimática, que es de 166 pb y corresponde al mononucleosoma. Otra barrera a la digestión se encuentra a los 146 pb, denominado núcleo nucleosomal. Si la digestión continúa, desaparece esta partícula y se generan partículas sub-nucleosomales.

2.4. Reconstitución de cromatina

Por otra parte, Kornberg y Cols. (Kornberg, 1974a; Kornberg, 1974b) demostraron que las histonas se asocian en solución siguiendo un patrón específico. La H3 y la H4 de timo de ternera forman el tetrámero $(H3)_2(H4)_2$ al interactuar un par de cada una. Además, encontraron que un complejo de estos tetrámeros con oligómeros de H2A, H2B y DNA producen el patrón característico de rayos X que tiene la cromatina y que la presencia de tetrámeros y oligómeros es necesaria para generar esta estructura. Estos estudios mostraron que la histona H1, aparentemente no participa en la formación de la partícula nucleosomal.

Las conclusiones a que llegaron los autores son que la H3 y la H4 forman una estructura específica que constituye el núcleo del octámero. La H3, H4, H2A y H2B actúan juntas y forman con un segmento de DNA la estructura repetida responsable del patrón de rayos X que caracteriza de la estructura de la cromatina. Estos experimentos establecieron la manera en que están organizados los nucleosomas en la fibra de la cromatina.

2.5. El nucleosoma y el filamento nucleosomal

El arreglo lineal repetitivo de nucleosomas es una fibra de 10 nm de diámetro, llamada filamento nucleosomal. Cada nucleosoma contiene alrededor de 200 pb de ADN (la longitud varía desde 166 a 241 pb, dependiendo del organismo) asociado con el octámero de proteínas que se describió anteriormente. El DNA está organizado en 2 vueltas de alrededor de 166 pb, que son selladas por la unión de la histona H1 en los puntos de entrada y salida del ADN. Los 34 pb de bases restantes de DNA (cuando el valor de repetición es de 200 pb) comprenden el DNA concatenador que conecta un nucleosoma con el siguiente y aporta una región del sitio de enlace

de H1. La longitud del concatenador puede variar desde casi cero hasta alrededor de 80 pb de las cromatinas de diferentes fuentes (McGhee, 1980).

La estructura nucleoproteica de la cromatina aparenta un collar de cuentas observada al microscopio electrónico y la alternancia del ADN altamente protegido (núcleo nucleosomal) y el ADN más expuesto (concatenador), explica la susceptibilidad diferencial del ADN a las nucleasas, como la nucleasa micrococcal (Kornberg, 1977; Igo-Kemenes, 1982; Thomas, 1983).

La digestión completa de todos los DNA concatenadores da origen a una sola población de mononucleosomas, mientras que la digestión parcial genera poblaciones de oligonucleosomas de diversos tamaños, que pueden fraccionarse por sedimentación mediante gradientes de sacarosa. Los mononucleosomas que contienen la longitud completa de repetición del ADN (p. ej. de 200 pb en hígado de rata) pueden ser cortados exonucleolíticamente por nucleasa de micrococcos en dos etapas discretas, primero en 166 pb y finalmente en 146 pb, lo que indica que las interacciones histonas-ADN proporcionan obstáculos a una mayor digestión. Las partículas de 166 pb y 146 pb son denominadas, respectivamente, el cromatosoma y el núcleo nucleosomal. Esta última no contiene H1, demostrando que los 10 pb de los extremos del ADN del cromatosoma participan en la unión a H1 (Allan, 1980).

Los trabajos de difracción de rayos X de cristales simples, combinada con microscopía electrónica, realizados por Finch (Finch, 1977 y 1981) y los de difracción de neutrones hechos por Bentley (Bentley, 1981) muestran que la partícula del núcleo nucleosomal tiene forma cilíndrica de 11 nm de diámetro y 5.5 nm de altura y contiene dos vueltas de ADN con alrededor de 80 pb por vuelta.

La manera en que se encuentra la cadena de nucleosoma en la forma extendida de la cromatina se muestra en la figura 1. La unión de H1 en los puntos de entrada y salida del ADN en el nucleosoma, a través de su dominio central globular (Allan, 1980), explica la apariencia de zig-zag en micrográficas electrónicas del filamento nucleosomal en condiciones de baja fuerza iónica, en contraste con la apariencia de cuentas sobre un collar del filamento carente de H1 (Thoma, 1979).

Las micrográficas electrónicas de cromosomas en metafase y de secciones delgadas de núcleos en interfase en ausencia de agentes quelantes (Ris, 1979; Davis, 1976), así como las preparaciones de cromosomas en metafase (Rattner, 1978), sugieren que el siguiente nivel de plegamiento del filamento nucleosomal (la "estructura de orden superior") es la fibra de 25 a 30 nm. La naturaleza de este plegamiento ha sido objeto de cierto debate pero en general existe acuerdo en que la H1 es esencial para la formación del mismo. La mayor parte de la evidencia apoya el modelo solenoidal, en el que la fibra de 10 nm se enrolla continuamente en una hélice de contacto de alrededor de 6 nucleosomas por vuelta (Finch & Klug, 1976).

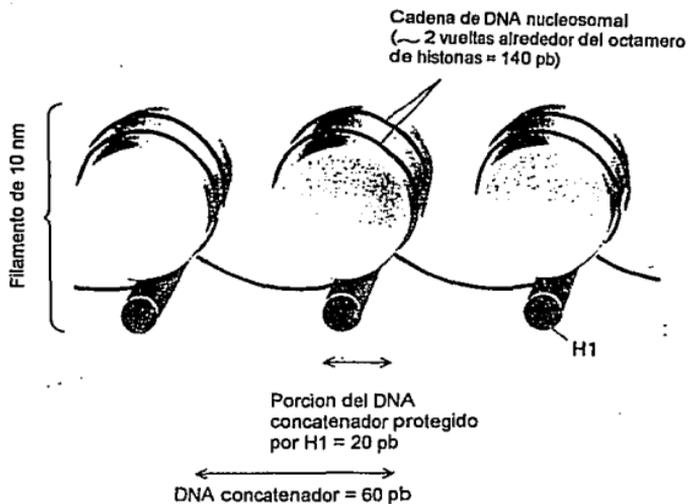


Figura 1. Modelo que ilustra los nucleosomas a lo largo de la fibra de la cromatina extendida (Alberts, 1994)

En resumen, hay bastante evidencia que apoya la visión de que la fibra de cromatina de 30 nm de diámetro es una hélice de contacto o solenoide conformada por alrededor de seis nucleosomas por vuelta. En base a los experimentos de microscopía electrónica de Finch (Finch, 1976) y a la reflexión de 11 nm en el patrón de de rayos X de fibras plegadas de cromatina (Sperling, 1977), se ha propuesto que los cromatosomas se ordenan a través del contacto de sus orillas en el solenoide proyectando radialmente sus caras del eje del solenoide y alineadas de forma más o menos paralela al eje, como se muestra en la figura 2 (Thoma, 1979).

En este contexto, es importante señalar que las características estructurales más conservadas en el nucleosoma son el tamaño del ADN que envuelve al octámero de histonas, que es de 166 pb, y la secuencia primaria de las histonas del núcleo nucleosomal, particularmente H4 y H3. Como ejemplo de este conservativismo se debe mencionar la diferencia de solamente tres residuos de aminoácidos entre la histona H4 de timo de ternera y la de chicharo (Isenberg, 1979).



Corte transversal

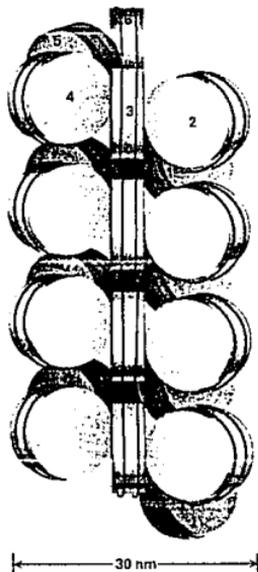


Figura 2. Empacamiento de los nucleosomas en un solenoide. Cuando la cromatina se extrae bajo condiciones apropiadas de fuerza iónica, se aísla en forma compacta. Los estudios físicos muestran que la estructura es una hélice con seis nucleosomas por cada vuelta, orientados en la manera que se muestra aquí. (Alberts, 1994)

2.6. La cromatina de tripanosomátidos

La mitosis en los tripanosomátidos está caracterizada por la carencia de cromosomas condensados, la presencia de la membrana nuclear durante el ciclo de división celular y de placas mitóticas densas asociadas a un huso intranuclear (Solari AJ, 1980; Solari AJ, 1985). Algunas de estas características son comunes a otros eucariotes inferiores, lo que ha dado lugar a un estudio más profundo del material genético de dichas especies por diversos grupos de investigación. Hasta ahora, esta búsqueda empieza a definir las semejanzas y diferencias estructurales que existen entre la cromatina de eucariotes superiores e inferiores.

Por su parte, los nucleosomas son las unidades básicas estructurales de la cromatina de los tripanosomas americanos y africanos (Rubio, 1980; Astolfi 1980; Pinheiro, 1981). Así pues, estos autores han reportado la presencia de cuerpos nucleosomales como perlas de un collar en preparaciones de microscopía electrónica de cromatina de tripanosomas, unidades discretas de digestión con nucleasa de micrococcos y la existencia de un conjunto de proteínas básicas nucleares con características electroforéticas similares a las histonas. *Trypanosoma cruzi* y *Trypanosoma brucei* también muestran un patrón de condensación cromatínica dependiente de la presencia de una histona H1 heteróloga (de hígado de rata) y de la fuerza iónica (Hecker, 1985). Estas características revelan semejanzas de una manera gruesa a la cromatina de eucariotes superiores; sin embargo, estudios más detallados muestran diferencias importantes.

Respecto a la digestión con nucleasa, no existen evidencias claras de la existencia de un fragmento de 146 pb en *T. cruzi* correspondiente al núcleo nucleosomal, ya que al continuar la digestión de la banda del monómero (el mononucleosoma, de aproximadamente 170 pb), no existe la pausa de 146 pb correspondiente al cromatosoma (Rubio, 1980).

Por otra parte, el patrón de compactamiento de la cromatina de tripanosomas en *T. brucei* y *T. cruzi* está notablemente menos condensado y muestra una forma más desordenada que el de eucariotes superiores cuando se reconstituye la cromatina en 100 mM de sal (Hecker, 1985). En lugar de las imágenes compactas y definidas, aparecen estructuras como masas enmarañadas al microscopio electrónico.

Como resultado de las diferencias anteriores, las investigaciones se enfocaron al estudio del componente proteico del nucleosoma, las histonas, a fin de explicar el comportamiento de la cromatina de estos tripanosomátidos. La caracterización de las proteínas básicas nucleares de tripanosomas, en el caso de las probables histonas que constituyen el núcleo nucleosomal, se ha realizado esencialmente a través del análisis electroforético en diferentes sistemas, la composición de aminoácidos y secuenciación de fragmentos peptídicos (Rubio, 1980; Toro, 1988 y 1990; Bender, 1991; Bender, 1992a).

En general, los tripanosomátidos contienen un grupo de proteínas básicas equivalentes a las histonas del núcleo nucleosomal, aunque con diferencias importantes. Estas características también son comunes a otros microorganismos eucariotes como *Crithidia fasciculata* (Duschak, 1990), *Neurospora crassa* (Goff, 1976), *Oxytricha* spp. (Caplan, 1975) y *Tetrahymena pyriformis* (Gorovsky, 1974). De esta manera, en las especies que se han estudiado más, *T. brucei* y *T. cruzi*, se han encontrado la mayor cantidad de datos sobre la composición y estructura de su cromatina.

En tanto, la caracterización de las probables histonas H1 se ha llevado a cabo mediante la evaluación de las propiedades funcionales de éstas, que consisten en inducir la condensación dependiente de sal de la cromatina (Burri, 1993) y su solubilidad diferencial en ácido perclórico (Toro, 1988). Los resultados muestran diferencias tanto en la cantidad de este tipo de histonas como en su comportamiento.

En *T. cruzi* y en *T. brucei* se han encontrado consistentemente un grupo de proteínas tipo histonas con un patrón electroforético muy semejante al de las histonas de eucariotes superiores. En geles de dodecil sulfato de sodio-poliacrilamida aparecen 4 bandas de movilidad muy parecida a las histonas del núcleo nucleosomal (Rubio, 1980; Toro 1988; Hecker, 1985); sin embargo, hasta ahora no se ha propuesto una equivalencia a la histona H1 en base a su migración (tamaño molecular) en este sistema de electroforesis.

Ya que la superestructura de cromatina es dependiente de la histona H1, los estudios posteriores han estado orientados en gran medida a la caracterización de las histonas de tripanosomas con objeto de elucidar sus propiedades estructurales y su posible impacto en la función de la cromatina. De esta manera, cada vez hay mayor cantidad de evidencias que revelan las diferencias estructurales entre eucariotes inferiores y superiores en varios niveles de organización de la cromatina.

Existen aún varias interrogantes sobre el papel que juegan las histonas de *T. cruzi* en la estructura y en consecuencia, en la función de la cromatina. Para obtener un mayor conocimiento que contribuya a esclarecer algunas de estas preguntas, en este estudio se plantearon los objetivos que se describen a continuación.

3. OBJETIVO

3.1. Objetivo General

Caracterizar las proteínas básicas nucleares de *Trypanosoma cruzi* y compararlas con las de eucariotes superiores para conocer sus diferencias y semejanzas en determinadas propiedades estructurales.

3.2. Objetivos específicos

1) Realizar un análisis comparativo del comportamiento electroforético entre las nucleoproteínas de *T. cruzi* en geles de poliacrilamida en dodecil sulfato de sodio y en urea-ácido acético.

2) Estimar la carga neta de las proteínas nucleares de *T. cruzi* mediante la determinación de sus puntos isoeléctricos.

3) Determinar la composición de aminoácidos de cada una de las nucleoproteínas de *T. cruzi*.

4) Comparar las nucleoproteínas de *T. cruzi* con las histonas de timo de ternera y eritrocito de pollo.

Los resultados aquí obtenidos confirman la semejanza de estas proteínas básicas con las histonas de eucariotes superiores en cuanto a que comparten características conservadas, esencialmente en las histonas del núcleo nucleosomal, H3 y H4. Por otra parte, se muestran diferencias importantes en la(s) proteína(s) del tipo de las H1, que se reflejan en su movilidad electroforética, composición de aminoácidos y carga neta. Estos resultados difieren de estudios similares realizados en tripanosomátidos incluyendo *T. cruzi*, ya que sugieren la existencia de una presunta histona del tipo H1 que no había sido descrita.

4. MATERIAL Y METODOS

4.1. Cultivos celulares

Un aislado mexicano de *T. cruzi* obtenido de *Triatoma barberi* en La Cruz, Jalisco, se cultivó primero en un medio bifásico NNN de agar-sangre y posteriormente se subcultivó al medio axénico libre de células llamado LIT (Camargo, 1964). El crecimiento celular se realizó a 28°C, proporcionando aereamiento por rotación constante en frascos de cultivo "roller" de 3.5 lts. y manteniendo el volumen de LIT menor a 450 ml. La duplicación de la población de tripanosomas en estas condiciones ocurrió aproximadamente cada 20 horas, alcanzando la fase estacionaria de crecimiento a los 100 millones de células por mililitro.

El seguimiento del crecimiento celular se realizó con un contador de células (Coulter Counter), utilizando como método de referencia para calibración una cámara de Neubauer en la que se colocaron 10 μ l de células previamente fijadas con formaldehído al 2%. Por cada preparación se cuentan 4 cuadros de cada cuadrante, orientados en diagonal (16 cuadros en total) en un rango de densidad poblacional de 15 a 35 células por cuadro.

Una vez alcanzada la mitad de la fase logarítmica ($45-50 \times 10^6$ células/ml) el cultivo se cosechó por centrifugación a 10,000 g. Se descartó el sobrenadante y el paquete celular se lavó dos veces por resuspensión con solución salina de cloruro y citrato de sodio SSC (0.15M de NaCl, 0.015M citrato de sodio) conteniendo 0.05 mM de fluoruro de fenil-metil sulfonilo (PMSF) como inhibidor de proteasas. Toda la operación se llevó a cabo a 0-5°C.

El paquete celular después del último lavado se dividió en alcuotas correspondientes a 20×10^9 células del conteo del cultivo con que se inició la cosecha (se estima una pérdida del 10% de células durante el proceso). Finalmente, se adicionó 1 ml de la solución de lavado al paquete celular y se homogeneizó por agitación en vortex e inmediatamente se congeló a -70°C .

4.2. Aislamiento de núcleos

El proceso de obtención de núcleos se realizó de acuerdo a Rubio y Cols. (Rubio, 1980) con ligeras modificaciones, el cual se describe a continuación.

El paquete de tripanosomas se empezó a descongelar a temperatura ambiente, quitando la tapa al tubo donde se cosechó. Inmediatamente después que la superficie del paquete se tornó brillante por la fusión del hielo, el tubo se volvió a tapar y se agitó en el vórtex a máxima velocidad hasta que el material presentaba una apariencia homogénea como una pasta color café oscuro. Este lisado se diluyó al equivalente de 1×10^9 células/mL con una solución de tris (tris hidroximetil amino metano como base libre, pH 7.3) 10 mM, KCl 0.15 M, MgCl_2 5.0 mM, CaCl_2 2.0 mM y PMSF 0.5 mM. En este paso se verificó la magnitud de la lisis observándose una preparación fresca al microscopio que presentaba un 80% de células destruidas. No se apreció aumento en la viscosidad de esta suspensión, indicando que no hubo una ruptura de núcleos importante.

4.3. Obtención de la cromatina

La suspensión se centrifugó a 2,500 x g por 10 min en rotor de columpio y se descartó el precipitado. Se centrifugó nuevamente el sobrenadante a 5,800 x g por 10 min y a 10,000 x g por 10 min. Se descartó el sobrenadante y se utilizó el precipitado de la última centrifugación. El precipitado se resuspendió en una solución de tris 50 mM, etileno diamino tetraacetato de sodio (EDTA) 20 mM, bisulfito de sodio 50 mM y PMSF 0.5 mM utilizando un homogeneizador Dounce con émbolo de teflón (5 golpes) y se centrifugó a 12,000 x g por 10 min. Este paso se realizó una vez más y el precipitado se resuspendió en PMSF 0.5 mM y se centrifugó a la misma velocidad del paso anterior. Esta operación se repitió dos veces más y se obtuvo un gel de aproximadamente 20 ml. En este punto, ya no se registró un aumento en el volumen del gel de cromatina.

4.4. Extracción de proteínas nucleares básicas

El gel obtenido anteriormente se pasó a través de una aguja hipodérmica del No. 21 tres veces y el volumen se llevó a 0.2 M de HCl con una solución de HCl 2.0 M. Esta suspensión se agitó durante una hora con barra magnética y se centrifugó a 12,000 x g durante 15 min. Se recuperó el sobrenadante y se ajustó a 0.4 M de H_2SO_4 con una solución de H_2SO_4 4.0 M y a continuación se agregaron 6 volúmenes de etanol al 95% previamente enfriado. La solución alcohólica se tornó turbia y se guardó en el congelador a $-20^{\circ}C - 10^{\circ}C$ durante toda la noche.

El precipitado se lavó dos veces con etanol frío al 95% recuperándose por centrifugación a 15,000 x g por 15 min. El residuo se secó con una corriente de nitrógeno.

4.5. Electroforesis preparativa y electroelución

La obtención preparativa de histonas se hizo en geles de poli(acrilamida) (30% acrilamida, 0.8% bis-acrilamida) en urea-ácido acético (2.5 M de urea, 0.9 M de ácido acético) de 1.5 mm de espesor (Panyim, 1969). Se hicieron dos tipos de corrida: una a 50 volts por 20 horas en la que se separan adecuadamente un grupo de 5 proteínas básicas que se denominaron H1-u, H2-u, H3-u, H4-u y H5-u, en ese orden de menor a mayor movilidad electroforética. La otra corrida se llevó a cabo a 65 volts por 8 horas para aislar H6-u, la banda de mayor movilidad.

Para recuperar cada histona del gel con un rendimiento apropiado en el paso siguiente que es la elución, se realizó una adaptación al método reportado por Higgins (Higgins, 1979), que utiliza el sistema de electroforesis de poli(acrilamida)-SDS (Laemli, 1970). Esta modificación consiste en que una vez terminada la corrida se recortaron 2 tiras de aproximadamente 2 cm de ancho de cada extremo del gel, paralelas a la dirección de la corrida. Enseguida, se sumergieron en una solución de 0.02 M de Tris-HCl (pH 8.3), glicina 0.192 M y dodecil sulfato de sodio (SDS) 0.1% por 30 min a temperatura ambiente, cambiando la solución cada 10 min. Las tiras de gel se lavaron con agua destilada para eliminar el exceso de la solución de tris-glicina-SDS (TGS). Esta parte del método se hizo para sustituir la solución de urea-ácido acético del gel por la de TGS y de esta manera facilitar la detección de las bandas de proteína *in situ*.

Las tiras del gel preparativo se visualizaron sumergiéndolas en una solución de acetato de sodio 4.0 M, precalentada a 26°C, durante 7 a 10 minutos. El acetato de sodio produce un precipitado opaco en las zonas del gel que no contienen proteína, distinguiéndose las regiones con proteína como bandas transparentes. Inmediatamente después, las tiras de gel recortadas se alinearon con la parte central del gel para utilizarlas como acotamiento y se recortaron las bandas de histonas sin revelar.

La alineación de las tiras del gel con la parte central del mismo se hace sobre una placa de vidrio transparente. El gel sobre la placa se coloca sobre la ventana de una caja negra que en su interior tiene una lámpara de luz blanca de 10 cm de longitud, cuyo ángulo de incidencia con respecto al plano horizontal del gel es de 20°. Esta operación se realizó en el menor tiempo posible para evitar una precipitación de acetato de sodio en toda la superficie de la tira de gel, lo cual impediría visualizar las bandas de proteína ya que éstas son transparentes.

La electroelución se llevó a cabo mediante el siguiente procedimiento. Cada rebanada del gel se fragmentó pasandola a través de una jeringa y enseguida se colocó en un tubo de vidrio que tenía una reducción de diámetro en un extremo, donde se colocó una cama de lana de vidrio. En el extremo inferior (cátodo) se insertó una bolsa de diálisis con un tamaño de corte de 12,000 a 14,000 daltones (Da) para retener la proteína. La electroforesis se llevó a cabo en una cámara de disco Bio-Rad por 20 horas a 1.5 mA por cada tubo usando como electrolito ácido acético 0.9 N. El eluado (0.8-1.0 ml) se dializó contra 100 volúmenes de solución de PMSF 0.5 mM, haciendo tres cambios de la misma. El eluado se liofilizó a una presión de 0.5-0.25 mm Hg.

4.6. Electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS

Las proteínas se corrieron en geles discontinuos de poliacrilamida-SDS (Laemli, 1970). La preparación de proteínas se disolvió en la solución de aplicación que contiene tris 0.2%, β -mercaptoetanol 1%, EDTA 0.02M, SDS 0.1% y azul de bromofenol 0.001% y se aplicó en un gel al 5% en su porción cocentradora (pH 6.8) y 15% en la separadora (pH 8.8). La corrida se realizó a 10 mA hasta llegar al gel separador y a 15 mA hasta el final. Después de la salida del azul de bromofenol, la corrida se continuó por 2 horas más. El gel se tiñó con azul de Coomassie 0.01% en una solución de ácido acético 10%/metanol 10% (v/v) y se destiñó en la misma solución pero sin azul de Coomassie.

4.7. Enfoque isoelectrico

El enfoque isoelectrico de las histonas de *T. cruzi* se llevó a cabo en geles de poliacrilamida con una composición de 5% de acrilamida, 0.16% de bis-acrilamida, 1.1% de anfolitos (de dos rangos de pH: 3-10 y 9-11 en proporción 1:10) y urea 6.25 M (Valkonen, 1980). Las muestras de proteínas básicas de *T. cruzi* purificadas se aplicaron a un gel de disco de 0.4 mm de diámetro y 10 cm de longitud. Se corrió un pre-enfoque a 0.5 mA/tubo por 2 horas y la corrida se desarrolló a 400 volts manteniendo la potencia constante y una temperatura de 4°C. A fin de evitar el desplazamiento catódico de pH debido a la formación de ácido carbónico por la presencia de CO₂, se burbujesó nitrógeno en el electrolito del tanque inferior. Después que terminó la corrida el gel se expulsó del tubo de vidrio inyectando agua desionizada, previamente enfriada y degasificada al vacío. El pH se midió directamente en el gel con un electrodo de superficie Multiphor LKB 2117-111 a partir del extremo catódico del gel. La lectura de pH se realizó inmediatamente después de sacar el gel del tubo de vidrio a fin de evitar modificaciones de pH con

el CO₂ ambiental. Cada valor de pH se consideró válido hasta que se estabilizó la lectura del potenciómetro, lo cual ocurría usualmente cuando la variación de pH era de ± 0.01 unidades de pH en un período de 5 segundos.

El gel se fijó en una solución recién preparada de ácido tricloroacético (TCA) al 12.5% por 24 horas con agitación. Los geles se tiñeron en azul de Coomassie 0.1% en el TCA 20% por 1 hora.

4.8. Aislamiento de proteínas ribosomales

Las proteínas ribosomales se aislaron siguiendo el método de Castro y Cols. (Castro, 1981) en la fase de preparación de ribosomas y polisomas. Las células se cosecharon por centrifugación a 10,000 x g por 10 min a 4°C y se lavaron dos veces con una solución de Tris-HCl 30 mM (pH 7.0), KCl 100 mM, MgCl₂ 5mM, CaCl₂ 3mM (solución amortiguadora de lavado), conteniendo 3 mg/ml de bentonita, 4 mg/ml de heparina y 10 µg/ml de dietil pirocarbonato. Esta última mezcla de inhibidores de RNAsas se usó posteriormente en todas las soluciones así como en el lavado de material de cristalería. Tanto las soluciones como el material de vidrio se esterilizaron en el autoclave. Las células se resuspendieron en el buffer de lavado y se lisaron por la adición de Nonidet P-40 a una concentración final de 0.3%. El lisado se centrifugó secuencialmente a 10,000, 20,000 y 100,000 x g por 10, 10, y 120 min respectivamente. El sobrenadante de 20,000 x g se utilizó como la fuente de polirribosomas y el precipitado de 100,000 x g como la fuente de ribosomas. Ambos precipitados se mezclaron y se sometieron a extracción con HCl 0.2M durante 1 hora, con agitación constante. A esta solución se le agregó etanol al 95% previamente enfriado y se ajustó a 0.4M de H₂SO₄. La solución se dejó precipitando toda la noche a 4°C. El

precipitado, conteniendo las proteínas ribosomales se centrifugó a 15,000 x g, se lavó con etanol frío tres veces y se secó con una corriente de N₂.

4.9. Composición de aminoácidos

Para llevar a cabo la hidrólisis, las proteínas purificadas se colocaron en una ampolleta previamente lavada con HCl y se adicionó una solución de HCl 6N, fenol 0.2%. La ampolleta se selló con un soplete de oxígeno-acetileno y se calentó a 110°C por 22 horas en un horno de temperatura constante. La composición de aminoácidos se determinó por el método de degradación de Edman (Edman, 1967) en un analizador automático de aminoácidos modelo Durrum D-500.

La cisteína fue determinada como ácido cisteico. El triptofano no se cuantificó. Los valores obtenidos de treonina y serina se corrigieron debido a las pérdidas hidrolíticas, adicionándoles un 5% y 10% respectivamente. Glutamina y asparagina no se determinaron; por lo tanto, si estos aminoácidos estuvieron presentes, fueron detectados como ácidos glutámico y aspártico.

Se utilizó a la norleucina como estándar interno para determinar la recuperación de los aminoácidos.

5. RESULTADOS

En la figura 3 se muestra el patrón de proteínas básicas nucleares de *Trypanosoma cruzi* en dos sistemas electroforéticos diferentes. En el carril 1 del panel B (electroforesis en urea-ácido acético) se puede observar un grupo compacto de cinco bandas prominentes en el orden siguiente de migración: H1-u, H2-u, H3-u, H4-u y H5-u. En este carril se encuentra una sexta banda, H6-u, que tiene una movilidad notablemente mayor aparece en una cantidad considerablemente menor. En virtud de que las proteínas se mueven en este sistema, esencialmente, en función de su carga neta, este resultado demuestra la naturaleza básica de las presuntas histonas de *T. cruzi*.

En el carril 1 del panel A se observa el patrón electroforético de las proteínas nucleares de *T. cruzi* en gel de poliacrilamida-SDS, señaladas como **a**, **b**, **c**, **d** y **e**. En este sistema, se estimó el peso molecular de cada una de las proteínas con respecto a las histonas de eritrocito de pollo obteniéndose los resultados siguientes:

a = 27,400 Da

b = 14,100 Da

c = 13,600 Da

d = 12,800 Da

e = 12,100 Da

En esta preparación se muestra un grupo de 4 bandas (**b**, **c**, **d**, y **e**) en la zona de las histonas del núcleo nucleosomal de eucariotes superiores. Se debe señalar que las bandas **b** y **c** no siempre se resuelven y aparecen como una sola banda, con una mayor concentración. Por otra parte, la banda **a** se localiza en la zona donde migran las histonas del tipo H1.

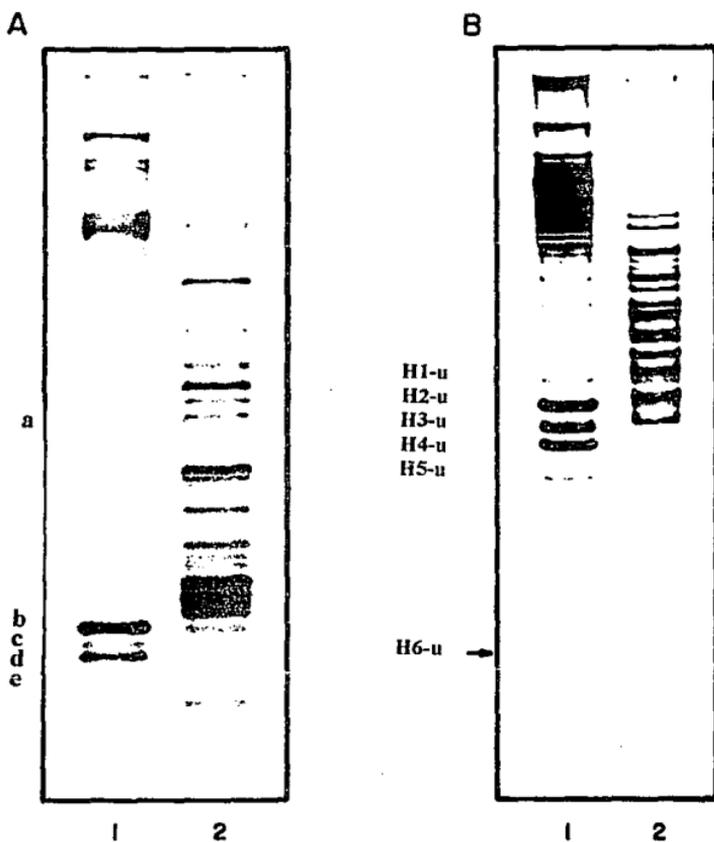


Figura 3. Electroforesis en gel de acrilamida-SDS (panel A) y en acrilamida-urea-ácido acético (panel B). Carriles 1: nucleoproteínas de *T. cruzi*; carriles 2: proteínas ribosomales de *T. cruzi*

Para investigar la posibilidad de contaminación por otras proteínas básicas, se corrieron preparaciones de las proteínas ribosomales en los dos sistemas de electroforesis, cuyos patrones aparecen en los carriles 2 de los paneles A y B. En el panel A (gel de acrilamida-SDS) no se encontró co-migración de las bandas **b**, **c**, **d** y **e**, que están localizadas en la zona de las histonas del núcleo nucleosomal. Sin embargo, la banda **a** aparece aproximadamente a la altura de una banda ribosomal.

La comparación entre los dos patrones de nucleoproteínas y proteínas ribosomales, que se presenta en el panel B (gel de urea-ácido acético), muestra co-migración solamente para H1-u. No se realizó una caracterización de las(s) bandas(s) ribosomal(es) de igual movilidad y tamaño que H1-u y **a** respectivamente.

A fin de determinar la equivalencia de cada una de las proteínas de nucleares de *T. cruzi* en los dos sistemas electroforéticos, éstas se separaron en escala preparativa en el sistema de urea-ácido acético debido a su mejor resolución y se electroeluyeron de acuerdo a como se describe en la sección de Materiales y Métodos. Después, las proteínas aisladas se corrieron en un gel de poliacrilamida-SDS como se muestra en la figura 4. En este gel se corrió paralelamente una preparación de de nucleoproteínas de *T. cruzi* para hacer la comparación y un carril con histonas de eritrocito de pollo como referencia. El resultado de esta correspondencia se presenta en la Tabla 1.

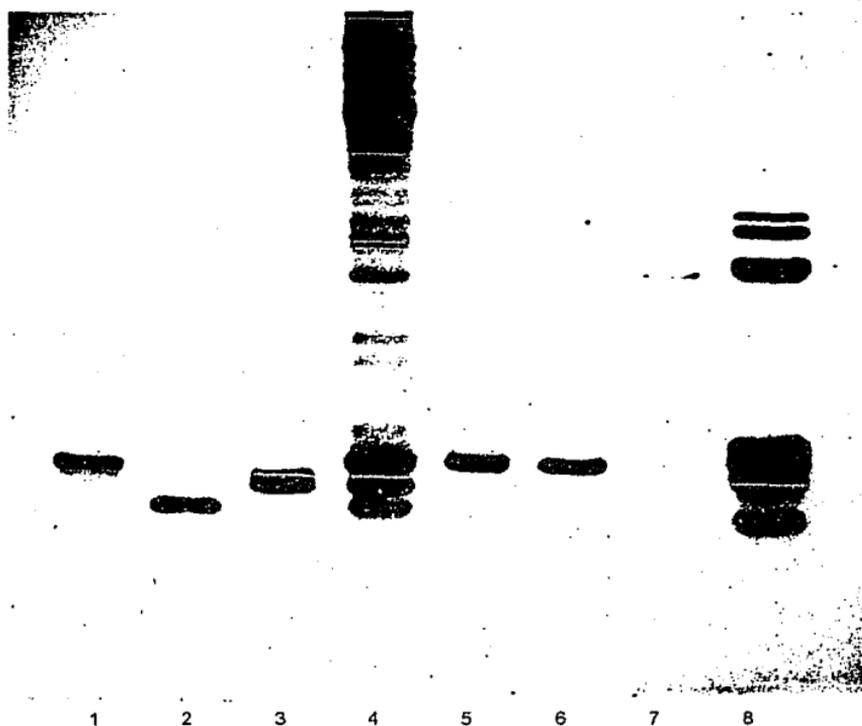


Figura 4. Electroforesis en gel de acrilamida-SDS de nucleoproteínas de *T. cruzi*. Las bandas H1-u, H2-u, H3-u, H4-u, H5-u y H6-u se aislaron de un gel preparativo de acrilamida-urea-ácido, y se corrieron en el siguiente orden: Carril 1: H6-u; carril 2: H5-u; carril 3: H4-u; carril 4: preparación de nucleoproteínas totales; carril 5: H3-u; carril 6: H2-u; carril 7: H1-u; y carril 8: histonas de eritrocito de pollo

Tabla 1. Correspondencia de las proteínas básicas nucleares de *T. cruzi* en geles de poliacrilamida-SDS y de urea-ácido acético

Electroforesis en SDS	Electroforesis en urea-ácido
a	H1-u
b	H2-u, H3-u y H5-u
c	H4-u
d	H5-u

H1-u, la banda de menor movilidad corresponde con la banda más lenta en el sistema de SDS, que además comigra con la histona H5 de eritrocito de pollo. Otra característica notable es la comigración de H6-u con el triplete contenido en la banda b, revelando un peso molecular semejante al de las histonas del núcleo nucleosomal de eucariotes superiores.

También cabe mencionar que en la re-electroforesis de H4-u, ésta se resuelve en dos bandas en el sistema de SDS (carril 3 de la figura 4). Se intentó determinar si estas dos bandas eran proteínas con secuencias diferentes o si sus diferencias en movilidad se debían a modificaciones ocurridas durante su aislamiento. Esto se realizó mediante digestión con tripsina *in situ*; sin embargo no se lograron resultados.

En la tabla 2 se muestra la composición de aminoácidos de cada una de las proteínas básicas nucleares de *T. cruzi*. No se determinaron glutamina y asparagina, mediante el método que protege la parte amida del aminoácido (Soby, 1981), por lo tanto el contenido de estos aminoácidos está incluido en los valores de ácido glutámico y ácido aspártico ya que las condiciones de hidrólisis en que se llevó la determinación impiden discriminar la presencia de estos aminoácidos amidados.

Tabla 2. Composición de aminoácidos de las nucleoproteínas de *Trypanosoma cruzi* (% molar)*

	H1-u	H2-u	H3-u	H4-u	H5-u	H6-u
Lis	18.2	10.9	11.5	10.6	13.3	12.6
Hís	1.5	2.6	3.1	3.6	0.4	1.8
Arg	10.0	10.5	8.9	10.2	13.5	6.9
Asx ^o	4.5	4.4	5.1	9.3	5.8	7.1
Glx ^o	7.0	10.4	5.6	5.3	8.1	9.4
Tre ^m	5.1	6.4	5.8	6.2	6.0	5.3
Ser ^m	7.4	7.2	9.0	12.4	5.3	6.2
Pro	3.5	4.8	5.2	3.4	traz	7.4
Gly	7.8	6.4	8.0	4.9	12.2	7.6
Ala	11.5	12.9	4.0	10.4	8.0	13.9
Cys ^b	traz	1.3	traz	traz	traz	ND
Val	7.1	6.5	7.1	7.2	10.8	6.6
Met	1.5	0.6	2.0	3.2	0.4	1.8
Ile	2.0	3.6	2.0	9.3	5.2	2.8
Leu	8.3	9.0	9.6	6.7	4.1	5.9
Tyr	2.2	1.2	2.1	1.4	5.0	2.2
Phe	2.1	2.1	1.1	1.9	1.4	2.6
AA	14.5	14.8	10.6	14.	13.9	16.5
AB	29.7	24.0	23.6	24.5	27.2	21.3
B/A	2.0	1.6	2.2	1.7	1.9	1.3
Lis/Arg	1.8	1.0	1.3	1.0	1.0	1.8

AA = suma de ac. aspártico + ac. glutámico; AB = suma de lisina + arginina + histidina; B/A = relación de los aminoácidos básicos entre los aminoácidos ácidos; Lis/Arg relación de lisina entre arginina; ^o glutamina y asparagina se determinaron como glutámico y aspártico; ^m treonina y serina se corrigieron por pérdidas hidrofílicas en 0% y 5% respectivamente; ^b cisteína se determinó como ácido cistéico; *no se determinó triptofano. Se reportó traz (trazas) cuando apareció respuesta en el cromatograma pero no alcanzó el límite de detección y ND cuando no se detectó ninguna respuesta.

Mediante un análisis de los parámetros que usualmente se utilizan para identificar las histonas, se pueden apreciar varias diferencias de las proteínas básicas nucleares de *T. cruzi* con respecto a las histonas de timo de ternera y de eritrocito de pollo, como se muestran en la tabla 3. La primera de estas características muestra que la basicidad de las proteínas de *T. cruzi*, expresada por la relación de la suma de sus aminoácidos básicos arginina, lisina e histidina entre la suma de los aminoácidos ácidos glutámico y aspártico, es menor que en la de las histonas de eucariotes superiores. De acuerdo a la composición de aminoácidos, la movilidad de las bandas de *T. cruzi* resulta mayor de lo esperado, ya que su carga neta es aparentemente menor que la de las histonas de pollo.

Tabla 3. Composición de aminoácidos de las histonas de timo de ternera y de eritrocito de pollo (Johns, 1977)*

	H1 ^a	H2B ^a	H2A ^a	H4 ^a	H3 ^a	H5 ^a
Lys	26.8	16.0	11.4	10.8	9.7	23.6
His	0.0	2.4	3.0	2.0	1.5	1.9
Arg	1.8	6.4	9.2	13.7	13.5	12.4
Asx ^b	2.5	4.8	6.9	4.9	4.1	1.7
Glx ^c	3.7	8.0	9.2	5.9	11.3	4.3
Thr ^d	5.6	6.4	3.8	6.9	6.8	3.2
Ser ^e	5.6	11.2	3.0	2.0	3.8	11.9
Pro	9.2	4.8	3.8	1.0	4.5	4.7
Gly	7.2	5.6	10.7	16.7	5.3	5.3
Ala	24.3	10.4	13.0	6.9	13.5	16.3
Cys ^b	0.0	0.0	0.0	0.0	1.5	0.0
Val	5.4	7.2	6.1	8.8	4.5	4.2
Met	0.0	1.6	0.0	1.0	1.5	0.4
Ile	1.5	4.8	4.6	5.9	5.3	3.2
Leu	4.5	4.8	12.2	7.8	9.0	4.7
Tyr	0.9	4.0	2.3	3.9	2.3	1.2
Phe	0.9	1.6	0.8	2.0	3.0	0.6
AA	6.2	12.8	16.1	10.8	15.4	6.0
AB	28.6	24.8	23.6	26.5	24.7	37.9
B/A	4.6	1.9	1.4	2.4	1.6	6.3
Lis/Arg	14.9	2.5	1.2	0.79	0.72	1.9

AA = suma de ac. aspártico + ac. glutámico; AB = suma de lisina + arginina + histidina; B/A = relación de los aminoácidos básicos entre los aminoácidos ácidos; Lis/Arg relación de lisina entre arginina; ^b glutamina y asparagina se determinaron como glutámico y aspártico; ^c treonina y serina se corrigieron por pérdidas hidrolíticas en 10% y 5% respectivamente; ^d cisteína se determinó como ácido cistéico; ^e no se determinó triptofano. Se reportó traz (trazas) cuando apareció respuesta en el cromatograma pero no alcanzó el límite de detección y ND cuando no se detectó ninguna respuesta. ^a Histonas de timo de ternera. ^a Histona de eritrocito de pollo

Otro parámetro utilizado para la identificación de histonas es la relación lisina/arginina que define la riqueza relativa de lisina y que históricamente se ha utilizado para clasificar este tipo de proteínas. Esta relación es sustancialmente menor en las proteínas de *T. cruzi* comparada con las que poseen las de las histonas H1 y H5 reportadas (por arriba de 4), siendo H1-u y H6-u las proteínas con los valores más altos de este cociente, con 1.82. Respecto a la abundancia relativa de arginina, tampoco hay proteínas de *T. cruzi* que se puedan considerar ricas en arginina como ocurre en H3 y H4 de eucariotes superiores.

Un hallazgo importante que se observa es que la cisteína solamente se encuentra en una de las proteínas: H2-u (ver tabla 2). La presencia de este aminoácido establece una de las características distintivas que posee la histona H3, ya que es la única que contiene un residuo de cisteína en todos los eucariotes hasta ahora reportados (William, 1972).

Ya que la movilidad de las proteínas de *T. cruzi* es más alta que la de las histonas de eritrocito de pollo (Rubio, 1980), se esperaba que la relación de aminoácidos básicos/ácidos también fuera mayor; sin embargo esto ocurre a la inversa y en el caso de la banda H6-u esta característica es más acentuada. A fin de explicar esto, se decidió evaluar con mayor precisión la carga de las proteínas nucleares de *T. cruzi*, mediante la determinación de los puntos isoeléctricos de las mismas. Se realizó un método de enfoque isoeléctrico en gel de poliacrilamida, manteniendo la estabilidad del gradiente de pH. Como se muestra en la figura 5, las seis proteínas de *T. cruzi* resultaron altamente básicas destacando H6-u con la mayor carga neta positiva. La variabilidad que adopta la curva en la parte final del gradiente (cátodo) se debe al desplazamiento catódico que ocurre durante la corrida (Delincee, 1978). Como estándar se corrió citocromo C de corazón de equino, obteniéndose un punto isoeléctrico de acuerdo al reportado (Kopelovich, 1976).

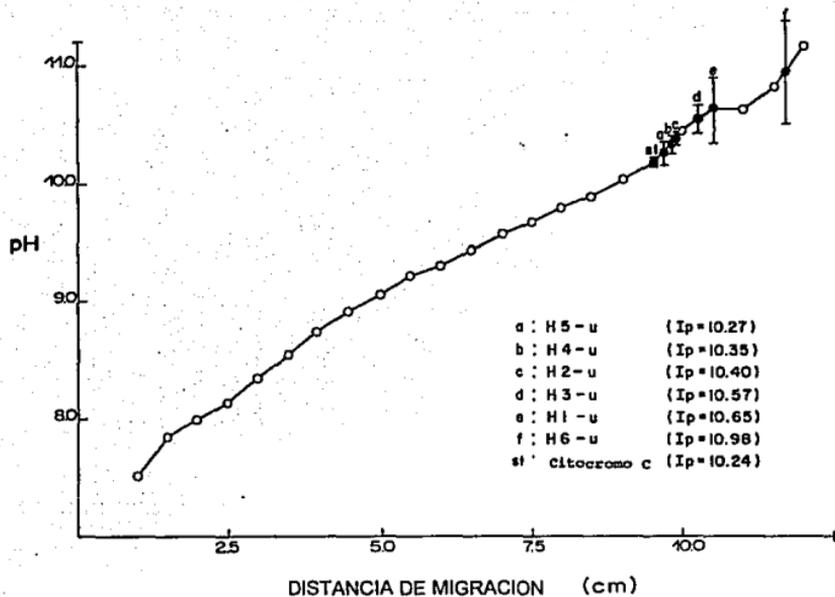


Figura 5. Enfoque isoelectrico de las proteínas nucleares básicas de *T. cruzi*. Las bandas H1-u, H2-u, H3-u, H4-u, H5-u y H6-u se corrieron individualmente en un gradiente de 7 a 11.5 unidades de pH en un gel de acrilamida al 5%. Se determinó el pH cada 0.5 cm de la longitud del gel y se determinó la posición de la proteína al teñirse ésta con azul de Coomassie

Los resultados del electroenfoque establecen una consistencia con el patrón electroforético de bandeo de estas proteínas en el sistema de urea-ácido acético, en el que la separación de las proteínas depende esencialmente en la diferencia de carga neta de las mismas. Las implicaciones de este resultado se discuten adelante.

Anteriormente se había reportado la presencia de un grupo de cuatro proteínas básicas nucleares de *T. cruzi* (Rubio, 1980). En la preparación de la cromatina para dicho estudio se empleó el detergente no iónico Nonidet P-40 durante el paso de la ruptura celular. En esas condiciones no se pudo detectar una proteína que migrara en el rango de mayor peso molecular, semejante al de la familia de las histonas tipo H1. Es probable que el uso del detergente haya producido la liberación de la(s) proteína(s) que tienen una unión más débil a la cromatina. En virtud de la facilidad con que las histonas del tipo de las H1 se pueden desprender, en esta ocasión se evitó el uso de detergente durante la obtención de proteínas nucleares básicas. Así pues, utilizando sólo métodos físicos para lograr la lisis celular, se obtuvieron núcleos en rendimiento similar al de las condiciones anteriores (80-90%). En estas condiciones, se puede observar la presencia de la banda a, que aparece en la zona de mayor peso molecular y que comigra con la histona H5 de eritrocito de pollo.

En base a los resultados del comportamiento electroforético, enfoque isoelectrico y composición de aminoácidos de las proteínas de *T. cruzi*, se realizó un análisis comparativo considerando las histonas de timo de ternera como prototipo de las histonas de eucariotes superiores (Johns, 1977). También se utilizaron como referencia las histonas de eritrocito de pollo debido a que poseen un subtipo de histonas H1 que se han reportado en reptiles y aves. Esto permitió comparar las composiciones de aminoácidos de las nucleoproteínas de *T. cruzi* contra todos los tipos de histonas reportados.

Las histonas de eucariotes superiores tienen una gran homología en secuencia de aminoácidos entre las H4 y H3, en menor grado para H2A y H2B, y las que menos semejanza tienen son las H1. Se eligieron las histonas de ternera y de pollo porque son las que más se han caracterizado, incluidas las propiedades estructurales de sus dominios (Allan, 1980). Esta información puede ser útil para la explicación del comportamiento de las proteínas con las que se comparan.

En gel de poliacrilamida-SDS la banda H1-u (ver figura 3) tiene baja movilidad, indicando un peso molecular relativo mayor. En gel de poliacrilamida-urea H1-u es también la proteína de menor movilidad, probablemente debido a su tamaño.

La comparación de las composiciones de aminoácidos entre las proteínas nucleares básicas de *T. cruzi* y las histonas, se realizó de dos maneras. Una de éstas consiste en sobreponer las gráficas del contenido de aminoácidos para apreciar visualmente la homología entre las proteínas (ver Apéndice) y en la otra se determina el coeficiente de correlación entre cada uno de los pares descritos en el método gráfico y se tabulan estos valores (ver tabla 4).

Tabla 4. Coeficientes de correlación de la composición de aminoácidos entre las nucleoproteínas de *T. cruzi* y las de timo de ternera y eritrocito de pollo (Johns, 1977)

	H1	H5	H2A	H2B	H3	H4
H6-u	0.8520	0.7950	0.8316	0.8376	0.7799	0.5263
H1-u	0.8211	0.9207	0.8165	0.8962	0.7541	0.6648
H3-u	0.4763	0.6796	0.6915	0.7439	0.5470	0.6616
H4-u	0.4971	0.7199	0.5820	0.7714	0.5875	0.4387
H2-u	0.6887	0.7860	0.8765	0.7891	0.9293	0.6064
H5-u	0.4740	0.6466	0.7229	0.6930	0.6649	0.9003

La homologa de H1-u con H5 de eritrocito de pollo es de las más altas, con un coeficiente de correlación de 0.9207 (ver tabla 4 y apéndice A-I). También es la proteína con mayor contenido de lisina, característica principal de la familia de H1s, a la cual también pertenece H5. Este resultado puede indicar que H1-u está menos alejada evolutivamente de la H5 de pollo que de la H1 de ternera.

Asignar la identidad de H3-u y H4-u ha sido más difícil ya que las diferencias con sus contrapartes son muy grandes. Básicamente, el único criterio que relaciona H3-u con H2A es la comparación de la composición de aminoácidos entre ellas (ver tabla 4 y apéndice A-III). Sin embargo; el coeficiente de correlación de este par es bajo.

La histona H4-u también guarda menos similitud con las histonas de referencia (ver apéndice A-IV). Como se observa en la tabla 4, su correlación es baja ($r = 0.7714$) y no existen otros elementos para establecer su identidad.

Aunque H2-u no tiene un contenido relativo de arginina alto, muestra una gran semejanza con H3 de ternera ya que en composición de aminoácidos es la que más homología presenta de todas las histonas aquí comparadas, (apéndice A-II) y su r es de 0.9293 (tabla 4). Este par es muy similar también en su relación de aminoácidos básicos/aminoácidos ácidos. Sin embargo, la característica más importante para establecer su identidad es la presencia de cisteína, un aminoácido que solamente se encuentra en la histona H3, donde se propone que tiene un papel esencial en el mantenimiento de la estructura del octámero que constituye el cromatosoma. Estos resultados concuerdan con el grado de conservación de H3.

Bajo el criterio de contenido relativo de arginina, basado en el cociente lisina/arginina, la banda H5-u no se puede considerar como una histona rica en arginina. Esto se debe al mayor contenido en lisina que en H4 de ternera. Sin embargo, el contenido absoluto de arginina de H5-u es similar al de H4. Por otra parte la composición de aminoácidos de H5-u es la más parecida a H4 (ver apéndice A-V) con una $r=0.9003$ (tabla 4). Su comportamiento electroforético en el sistema de poliacrilamida-SDS muestra que H5-u es la proteína nuclear de menor tamaño en *T. cruzi*, al igual que la histona H4 en timo de ternera y en todos los demás eucariotes superiores.

Finalmente, se encontró que H6-u tiene más semejanza con H1 de timo de ternera considerando que su r es de 0.8520. Cabe señalar que los coeficientes de correlación de los pares de las histonas H2B, H2A, H5 y H3 tienen valores cercanos al del par H6-u/H1 (ver tabla 4 y apéndice). En contraste, esta proteína migra en la zona de las histonas del núcleo nucleosomal, indicando que tiene un peso molecular bajo.

6. DISCUSION

El análisis electroforético de las proteínas básicas nucleares de *T. cruzi* mostró diferencias tanto en la cantidad de bandas como en el patrón de bandeo, comparado con las histonas de eucariotes superiores. La identidad de cada una de las proteínas básicas de *T. cruzi* no se pudo establecer con precisión, en base a los parámetros que tradicionalmente se utilizan para la clasificación de las histonas; a saber la basicidad, medida por la relación entre aminoácidos básicos y aminoácidos ácidos, y el contenido relativo de arginina y lisina.

Los resultados aquí presentados coinciden con los reportados en *T. cruzi* por Toro (Toro, 1990) y por Schlimme y Cols. en *T. brucei* (Schlimme, 1993) ya que apoyan la existencia de un juego completo de histonas en tripanosomátidos y la similitud con las histonas del núcleo nucleosomal de eucariotes superiores. Como se mencionó anteriormente, a partir de los hallazgos de Rubio y Cols. (Rubio, 1980) y de Astolfi (Astolfi, 1980), en los que se encontró solamente la presencia de un grupo de proteínas nucleares que migraban en el rango de tamaño de las histonas del núcleo nucleosomal, se postuló que la ausencia de una proteína tipo H1 en *T. cruzi* era la causa del menor compactamiento de la cromatina con respecto a eucariotes superiores. La búsqueda de una(s) proteína(s) con las características del tipo de las H1 se realizó en diferentes especies de tripanosomátidos, desarrollando métodos que permitieran aislar la cromatina en su forma original.

Hasta ahora se han estudiado diversas especies de microorganismos eucariotes que muestran un grupo de proteínas con características electroforéticas y de composición de aminoácidos similares a las histonas del núcleo nucleosomal (Johmann, 1976; Charlesworth, 1977; Felden, 1976; Jardine, 1977; Duschak, 1990; Goff, 1976; Caplan, 1975; Gorovsky,

1974). En *T. brucei* y en otros microorganismos, se han identificado regiones homólogas de estas proteínas con las histonas de eucariotes superiores, a través de la secuenciación de fragmentos peptídicos (Bender, 1992a; Nomoto, 1992). Estos trabajos muestran, esencialmente, que no obstante las diferencias encontradas, existen características comunes entre estas proteínas y las histonas.

En contraste con las histonas del núcleo nucleosomal, los resultados de la caracterización de las nucleoproteínas básicas asociadas con las histonas tipo H1 son más controversiales. A la fecha, se han propuesto algunas proteínas básicas nucleares de diferentes tripanosomátidos como las probables H1. Los primeros reportes de la existencia de este tipo de proteínas (Rubio, 1980; Astolfi, 1980) describieron dos bandas de alta movilidad en geles de urea-ácido. Proteínas con estas características ya habían sido descritas como posibles H1s en *Oxytricha*, las cuales tienen pesos moleculares de 20,000 y 21,000 Da (Caplan, 1975). Posteriormente, al estudiar el patrón de condensación de la cromatina de *T. cruzi* y *T. brucei* con fracciones heterólogas de cromatina de hígado de rata conteniendo H1, Hecker y Gander no pudieron demostrar la presencia de una proteína con la capacidad de formar estructuras de orden superior de la cromatina en estas dos especies (Hecker, 1985).

En un estudio posterior en *T. cruzi*, Toro y Galanti encontraron 5 bandas en la región de las histonas del núcleo nucleosomal (denominadas a, b, c, d y e) más otra banda (f) con migración mucho mayor que la de este grupo en geles de ácido-urea (Toro, 1988). Las bandas c y f fueron extraídas en ácido perclórico (PCA) y ácido tricloroacético. Además, estas bandas reaccionaron con suero anti-H1 de células de espermatozoos de erizo de mar, aunque también detectaron reactividad cruzada con la banda a. En virtud de estas características inmunológicas y de solubilidad, los autores consideraron las bandas a y f como histonas H1. Después, estos mismos autores, a través de un análisis electroforético en tres sistemas, reportaron resultados coincidentes con los estudios

anteriores con excepción de la presencia de una banda con menor migración que las proteínas de la zona del núcleo nucleosomal en un gel de SDS, soluble en ácido perclórico, y a la que se le asignó un peso molecular de 6,000 Da (Toro, 1990).

Por su parte, Burri y Cols. (Burri, 1993) reportaron recientemente en *T. brucei* cuatro bandas de alta movilidad en geles de urea-acido-Triton que tienen composición de aminoácidos con cierta homología en algunos fragmentos de estas variantes con respecto a las histonas tipo H1. Estas proteínas, aunque contribuyen a condensar en cierto grado la cromatina de este protozoario, tienen capacidad muy restringida y no alcanzan a formar la fibra de 30 nm.

Sin embargo, un análisis comparativo más detallado de la composición de aminoácidos de las proteínas que Burri propone como variantes de H1, muestra diferencias grandes en tres de las especies estudiadas con respecto a la histona H1 de timo de ternera en los siguientes parámetros:

- i) Alrededor de 15% de lisina en los eucariotes inferiores, contra 27% en ternera
- ii) La relación de aminoácidos básicos entre aminoácidos ácidos es de alrededor de menos de 2 contra 4.6 en eucariotes inferiores y ternera, respectivamente.
- iii) El contenido de aminoácidos ácidos determinados como aspártico y glutámico en eucariotes inferiores es del doble que en ternera

Estas características de eucariotes inferiores también están presentes en un grado importante en la banda H6-u, como se puede observar en la tabla 5.

Tabla 5. Composición de aminoácidos de las proteínas de tipo histonas H1 de *Trypanosoma cruzi* (H6-u) [T.c.], *Crithidia fasciculata* [C.f.] (Duschak, 1990), *Neurospora crassa* [N.c.] (Goff, 1976), *Saccharomyces carlsbergensis* [S.c.] (Pastink, 1979), y timo de ternera (Johns, 1977).

Amino ácido	T.c.	C.f.	N.c.	S.c.	timo de ternera
Lys	18.2	15.4	16.8	14.5	26.8
His	1.5	2.1	1.5	2.9	0.0
Arg	10.0	3.6	3.4	4.7	1.8
Asx ^a	4.5	5.3	6.2	7.9	2.5
Glx ^a	7.0	8.7	8.5	9.7	3.7
Thr	5.1	3.3	6.3	3.8	5.6
Ser	7.4	6.7	5.7	7.4	5.6
Pro	3.5	6.2	7.6	7.6	9.2
Gly	7.8	16.7	5.8	17.8	7.2
Ala	11.5	18.9	21.1	6.1	24.3
Cys	ND	ND	ND	ND	0.0
Val	7.1	3.4	4.9	4.8	5.4
Met	1.5	1.1	1.2	1.6	0.0
Ile	2.0	1.9	2.0	4.2	1.5
Leu	8.3	3.5	4.8	6.8	4.5
Tyr	2.2	1.4	1.5	1.7	0.9
Phe	2.1	2.0	1.8	3.4	0.9
AA ^b	29.7	21.1	21.7	22.1	28.6
AB ^c	14.5	14.0	14.7	17.6	6.2
B/A	2.0	1.5	1.5	1.2	4.6

^aContenido en mol% de los aminoácidos básicos lisina + arginina + histidina.

^bContenido en mol% de los aminoácidos ácidos glutámico + aspártico. ^cNo se

determinaron glutamina y asparagina, por lo tanto Asx y Glx incluyen ac. glutámico + glutamina y ac. aspártico + asparagina

Los resultados de este trabajo apoyan varios de los hallazgos previos con respecto a la existencia de una histona H1 de *T. cruzi*; sin embargo, nosotros encontramos discrepancias importantes que se discuten a continuación. En relación a la banda de mayor movilidad en geles de urea-ácido (H6-u), su peso molecular se estimó en alrededor de 14,000 Da. Esta es la primera vez se tiene una estimación de su tamaño, el cual está comprendido en el rango de las histonas del núcleo nucleosomal.

Por otra parte, el contenido relativo de lisina de H6-u, determinado mediante la relación lisina/arginina, es de los más altos entre las proteínas nucleares básicas de *T. cruzi*. La validez de este parámetro para la identificación de histonas resulta cuestionable en este caso, tomando en cuenta los siguientes hechos. H6-u tiene el menor índice de aminoácidos básicos/aminoácidos ácidos (ver tabla 2), sin embargo se comporta como la más básica de todas. Esta alta basicidad puede ser debido a un contenido extensivo de glutamina y asparagina en la proteína. Como se mencionó en la sección de Materiales y Métodos, durante la determinación de aminoácidos de las proteínas de *T. cruzi*, tanto glutamina como asparagina no se cuantificaron debido a que no se realizó un método específico (el cual consiste en proteger de la hidrólisis ácida a los residuos amida), por lo tanto estos aminoácidos se detectan finalmente como ácido aspártico y glutámico.

Considerando lo anterior, la alta carga positiva de H6-u puede ser el resultado de la presencia de los residuos amida de glutamina y asparagina, que a su vez ocasiona un incremento en la carga neta de la proteína en virtud de que no solo abate la carga negativa que le confieren los aminoácidos glutámico y aspártico sino que la invierte.

Estas características de H6-u son consistentes con su conducta electroforética en los sistemas que se emplearon en este estudio, esto es, con un tamaño similar a las proteínas del

núcleo nucleosomal así como un contenido semejante de aminoácidos básicos, H6-u es la proteína con la mayor carga positiva.

Existe una analogía con otras proteínas básicas nucleares de este tipo en otros microorganismos, que se puede observar en la tabla 3. Aquí, el contenido de aminoácidos ácidos de las proteínas tipo histonas H1 es abundante; no obstante, su movilidad electroforética es muy alta, hecho que concuerda con lo que encontramos en H6-u. Incluso, Duschak y Cols. (Duschak, 1990) reportaron otra banda de alta movilidad en *Crithidia fasciculata* cuyo contenido de aminoácidos ácidos es el doble de los básicos y su movilidad es muy similar a las otras proteínas propuestas como H1.

Por otra parte, H6-u no es una proteína rica en lisina en términos absolutos sino con respecto al contenido de ácido glutámico y aspártico de sí misma. Esto se ejemplifica mejor si consideramos que H1 de timo de ternera contiene más del 27% de lisina y H6-u tiene alrededor del 12%.

Otro de los hallazgos de este trabajo es la presencia de una proteína nuclear de *T. cruzi*: la banda H1-u, la cual tiene características que la identifican más con la familia de la histonas H1 que las demás proteínas nucleares básicas de *T. cruzi*, incluyendo a H6-u. Así pues, H1-u tiene el mayor contenido de lisina en términos absolutos y su peso molecular es prácticamente igual a la histona H5 de eritrocito de pollo. Además, su composición de aminoácidos es la que más homología tiene con H5.

Los experimentos de Toro (Toro, 1990) no muestran ninguna banda soluble en ácido perclórico o tricloroacético con la movilidad electroforética de H1-u en preparaciones de proteínas básicas nucleares de *T. cruzi*. Esto puede deberse a que esta proteína se desprendió de la cromatina

por la utilización del detergente Triton X-100 durante la obtención de núcleos, ya que como se discutió anteriormente, esta banda apareció en nuestras preparaciones de núcleos solamente cuando no se empleó detergente.

La controversia sobre la existencia de histonas del tipo de las H1 en *T. cruzi* prevaleciente hasta hace pocos años ha adoptado una dirección diferente con el descubrimiento de diferentes nucleoproteínas básicas con características similares en eucariotes inferiores. Esta diversidad de posibles histonas H1 podría significar la existencia de variantes que se expresan en los estadios de diferenciación del parásito.

El mantenimiento de la estructura superior de la cromatina en tripanosomátidos puede depender en gran medida de las histonas que forman parte del núcleo nucleosomal. Se ha sugerido que la mayor parte de la histona H4 está localizada internamente y participa más bien en la estabilización del octámero (Hacques y Cols, 1990a y 1990b). En contraste, la histona equivalente de *T. brucei* (banda d), se localizó en la superficie de la partícula del núcleo nucleosomal (Bender, 1992c) Así pues, las diferencias entre la región N-terminal de la histona d y la de H4 sugieren diferentes interacciones con las otras histonas del DNA comparadas con las de H4 en la cromatina de eucariotes superiores (Burri, 1993). Además, las interacciones de las histonas ricas en arginina, H3 y H4, con el DNA se pueden desestabilizar por concentraciones de sal de 1.2 y 2 M (Burton, 1978), mientras que las histonas equivalentes de *T. brucei* (proteínas a y d) fueron removidas completamente del DNA a 1 M de NaCl (Bender, 1992c) debido a las interacciones más débiles con el DNA comparadas con las de H3 y H4. Estas diferencias entre las histonas a y d y sus contrapartes de eucariotes superiores, así como la localización externa de a y d en la superficie de la partícula del núcleo nucleosomal indican un papel importante de estas histonas más bien en la compactación de la cromatina que en mantener la integridad del nucleosoma.

Los datos que aquí se presentan sugieren que las nucleoproteínas de *T. cruzi* y *T. brucei* comparten en una medida importante las características estructurales y funcionales y éstas se pueden estar reflejando en la cromatina de ambas especies. Por otra parte, no obstante las diferencias estructurales con eucariotes superiores, las histonas de estos tripanosomas mantienen características funcionales conservadas, como son su papel en la constitución del núcleo nucleosomal y, aunque de manera limitada, la capacidad de condensar la cromatina.

El conocimiento actual de la cromatina de *T. cruzi* requiere de una investigación más profunda de sus características estructurales para poder comprender su función. Los resultados que aquí se muestran y los que al respecto se han reportado abren una interesante perspectiva para abordar el estudio de la organización del material genético de este parásito a fin lograr un mayor entendimiento de sus mecanismos de expresión génica.

7. BIBLIOGRAFIA

Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson JD. 1994. Molecular Biology of the Cell. New York: Garland Publishers.

Allan J, Hartman PG, Crane-Robinson C, Aviles FX. 1980. The structure of H1 and its location in chromatin. *Nature*, (London) 288:675-679.

Astolfi FS, DeSa CM, Gander E S. 1980. On the chromatin structure of *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol* 1:45-53.

Bender K, Betschart B, Schaller J, Kampfer U, Hecker H. 1991. Biochemical properties of histone-like proteins of procyclic *Trypanosoma brucei brucei*. *Acta Tropica* 50:169-184.

Bender K, Betschart B, Schaller J, Kampfer U, Hecker H. 1992a. Sequence differences between histones of procyclic *Trypanosoma brucei* and higher eukaryotes. *Parasitol* 105:97-104.

Bender K, Betschart B, Marion C, Michalon P, Hecker H. 1992b. Structural differences between the chromatin of procyclic *Trypanosoma brucei brucei* and of higher eukaryotes as probed by immobilized trypsin. *Acta Tropica* 52:69-78.

Bender K, Betschart B, Hecker H. 1992c. Histone-DNA interactions in the chromatin of procyclic *Trypanosoma brucei brucei*. *Parasitol Res* 78:495-500.

Bentley GA, Finch JT, Lewit-Bentley A. 1978. Neutron diffraction studies on crystals of nucleosome cores using contrast variation. *J Mol Biol* 45:77-784.

Burri M, Schlimme W, Betschart B, Kampfer U, Schaller J, Hecker H. 1993. Biochemical and functional characterization of histone H1-like proteins in procyclic *Trypanosoma brucei brucei*. *Parasitol Res* 79:649-659.

Burton DR, Butler MJ, Hyde JE, Phillips D, Skidmore CJ, Walker JO. 1978. The interactions of core histones with DNA : equilibrium binding studies. *Nucleic Acid Res* 5:3643-3663.

Camargo EP. 1964. Growth and differentiation in *Trypanosoma cruzi*. Origin of metacyclic trypanosomes in liquid media. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 6:93.

Caplan EB. 1975. A very rapid migrating f histone associated with gene-sized pieces of DNA in the nucleus of *Oxytricha* sp. *Biochim Biophys Acta* 407:109-113.

Castro C, Hernández R, Castañeda M. 1981. *Trypanosoma cruzi* ribosomal RNA: internal break in the large-molecular-species species and number of genes. *Mol Biochem Parasitol* 2:219-233.

Charlesworth MC, Parish RW. 1977. Further studies on basic nucleoproteins from the cellular slime mold *Dictyostelium discoideum*. *Eur J Biochem* 75:241-250.

Corbett S, Miller S, Robinson VJ, Matthews HR, Bradbury EM. 1977. *Physurum polycephalum* histones. *Biochemical Society Transactions* 569th meeting. Vol 5, pp. 943-946.

Delincee H, Radola BJ. 1978. Determination of isoelectric points in thin layer isoelectric focusing: The importance of attaining the steady state and the role of CO₂ interference. *Anal Chem* 90:609-623.

Duschak VG, Cazzulo JJ. 1990. The histones of the insect trypanosomatid, *Crithidia fasciculata*. *Biochim Biophys Acta* 1040:59-66.

Edman P, Begg G. 1967. A protein sequenator. *Eur J Biochem* 1:80-91

Felden RA, Sanders MM, Morris R. 1976. Presence of histones in *Aspergillus nidulans*. *J Cell Biol* 68:430-439.

Finch JT, Lutter LC Rhodes D, Brown RS, Rushton B, Levitt M, Klug A. 1977. Structure of nucleosome core particles of chromatin. *Nature (London)* 269:29-36.

Finch JT, Brown RS, Rhodes D, Richmond T, Rushton B, Lutter LC, Klug A. 1981. X-ray diffraction study of a new crystal form of the nucleosome core showing higher resolution. *J Mol Biol* 45:757-769.

Finch JT, Klug A. 1978a. X ray and electron microscope analyses of crystals of nucleosomes cores. *Cole Spring Harbor Symp Quant Biol* 42:1-9.

Gasser SM, Laemmli UK. 1987. A glimpse at chromosomal order. *Trend Genet.* 3:16-22

Goff CG. 1976. Histones of *Neurospora crassa*. *J Biol Chem* 25:431-438.

Gorovsky MA, Bowen Keevert J, Pleger GL. 1974 Histone f of *Tetrahymena macronuclei*. J Cell Biol 6:34-45.

Hacques M-F, Muller S, De Murcia G, Van Regenmortel MHV, Marion C. 1990a. Accessibility and structural role of histone domains in chromatin. Biophysical and Immunochemical studies of progressive digestion with immobilized proteases. J Biomol Struct Dynam 8:619-641.

Hacques M-F, Muller S, De Murcia G, Van Regenmortel MHV, Marion C. 1990b. Use of an immobilized enzyme and specific antibodies to analyse the accessibility and role of histone tails in chromatin structure. Biochem Biophys Res Commun 168:637-643.

Hecker H, Gander S. 1985. The compaction pattern of the chromatin of Trypanosomes. Biol Cell 53:199-208.

Hewish DR, Burgoyne LA. 1973. Chromatin sub-structure. The digestion of chromatin DNA at regularly spaced sites by a nuclear deoxyribonuclease. Biochem Biophys Res Commun 52:504-510.

Higgins RC, Dahmus ME. 1979. Rapid visualization of protein bands in preparative SDS-polyacrylamide gels. Anal Biochem 93:257-260.

Igo-Kemenes T, Hörz W, Zachau HG. 1982. Chromatin. Ann Rev Biochem 51:89-112.

Isenberg I. 1979. Histones. Ann Rev Biochem 48:159-191.

Jardine NJ, Leaver JL. 1977. The isolation of nuclei and histones from *Euglena gracilis*. *Exp Cell Res* 106:423-426.

Johmann CA, Gorovsky A. 1976. Purification and characterization of the histones associated with the macronucleus of *Tetrahymena*. *Biochemistry* 15:1249-1256.

Johns EW. 1977. The isolation and purification of histones. In: *Methods in Cell Biology* Vol. XVI *Chromatin and Chromosomal Proteins*. Stein G, Stein J (Eds.). Academic Press (New York).

Klug A, Lutter LC, Rhodes D, Brown RS, Rushton B, Finch JT. 1977. X-ray crystallographic and enzymatic analysis of nucleosome cores. *FEBS 11th Meeting*. Copenhagen, Vol 43, *Gene Expression*, 233-244.

Kopelovich L, Wolfe G, Pfefer L. 1976. Segregation of histone fractions from purified rat pancreas nuclei by isoelectric focusing. *Proc Soc Exp Biol Med* 151:400-406.

Kornberg RD, Thomas JO. 1974a. Chromatin structure: Oligomers of the histones. *Science* 184:865-868.

Kornberg RD. 1974b. Chromatin structure: A repeating unit of histones and DNA. *Science* 184:868-871.

Kornberg RD. 1977. Structure of chromatin. *Ann Rev Biochem* 46:931-954.

Laemli UK. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T₄. *Nature (London)* 227:680-685.

Lutter LC. 1979. Precise location of DNAase I cutting sites in the nucleosome core determined by high resolution gel electrophoresis. Nucl Acid Res 6:41-56.

McGhee JD & Felsenfeld G. 1980. Nucleosome structure. Ann Rev Biochem 49:5-56.

Nomoto N, Hayashi H, Iwai K. 1982. *Tetrahymena* histone H2B. Complete amino acid sequence. J Biochem 91:897-904.

Olins AL, Olins DE. 1974. Spheroid chromatin units (bodies). Science (Washington) 183:330-332.

Panyim S, Chalkley R. 1969. High resolution acrylamide gel electrophoresis of histones. Arch Biochem Biophys 130:337-350.

Pastink A, Berkhout TA, Mager WH, Planta RJ. 1979. Analysis of histones from the yeast *Saccharomyces carlsbergensis*. Biochem J 177:917-923.

Pinheiro ML. 1981. Estrutura da cromatina de *Trypanosoma cruzi*. Master's thesis, Universidade de Brasilia, Brasil.

Richard TJ, Finch JT, Rushton B, Rhodes D, Klug A. 1984. Structure of the nucleosome core particle at 7 D resolution. Nature 311:532-537.

Ris H, Korenberg J. 1979. Chromosome structure and levels of chromosome organization. In: Cell Biology, Vol. 2. Prescott DM Goldstein L. (Eds.), pp. 267-361. New York: Academic Press

- Rubio J, Rosado Y, Castañeda M. 1980. Subunit structure of *Trypanosoma cruzi* chromatin. *Can J Biochem* 58:1247-1251.
- Schlimme W, Burri M, Bender K, Betschart B, Hecker H. 1993. *Trypanosoma brucei brucei*: differences in the nuclear chromatin of bloodstream forms and procyclic culture forms. *Parasitology* 107:237-247.
- Soby LM, Johnson P. 1981. Determination of asparagine and glutamine in polypeptides using bis(1,1-trifluoroacetoxy)iodobenzene. *Anal Biochem* 113:149-153.
- Solari AJ. 1980. The 3-dimensional fine structure of the mitotic spindle in *Trypanosoma cruzi*. *Chromosoma* 78:239-255.
- Solari AJ, Tandler CJ, Duschak VG. 1985. Fine structure and cytochemistry of the mitotic plaques of *Trypanosoma cruzi* and *Crithidia fasciculata*. *J Submicrosc Cytol* 17:583-591.
- Sperling L, Klug A. 1977. X-ray studies on "native chromatin". *J Mol Biol* 112: 253-263.
- Thoma F, Koller TH, Klug A. 1979. Involvement of histone H1 in the organization of the nucleosome and of the salt-dependent superstructures of chromatin. *J Cell Biol* 83:403-427.
- Thomas JO. 1983. Chromatin structure and superstructure. In: *Eukaryotic Genes: Their Structure Function and Regulation*. Maclean N, Gregory SP Flavell RA (Eds.), pp. 9-30. London: Academic Press.

Toro GC, Galanti N. 1988. H1 histone and histone variants in *Trypanosoma cruzi*. Exp Cell Res 174:16-24.

Toro GC, Galanti N. 1990. *Trypanosoma cruzi* histones. Further characterization and comparison with higher eukaryotes. Biochem Int:481-490.

Valkonen KH, Piha RS. 1980. Isoelectric focusing and isoelectric points of bovine liver histones. Anal Biochem 104:499-505.

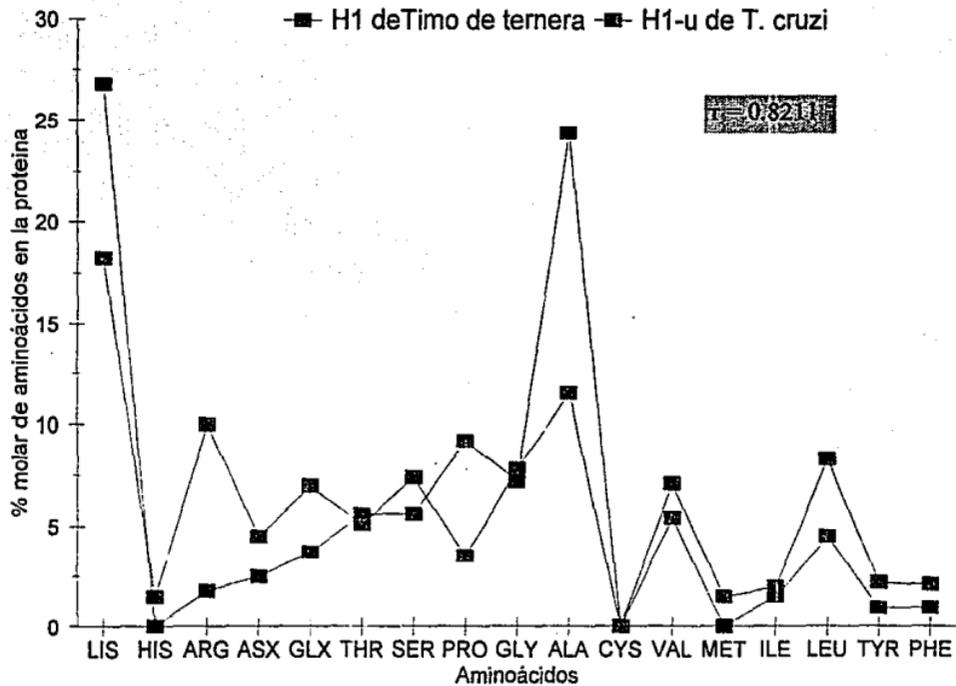
William FM, Sanders LA, Miller DM, McCarthy KS. 1972. Two chemically and metabolically distinct forms of calf thymus histone H3. J Biol Chem 247:2026-2033.

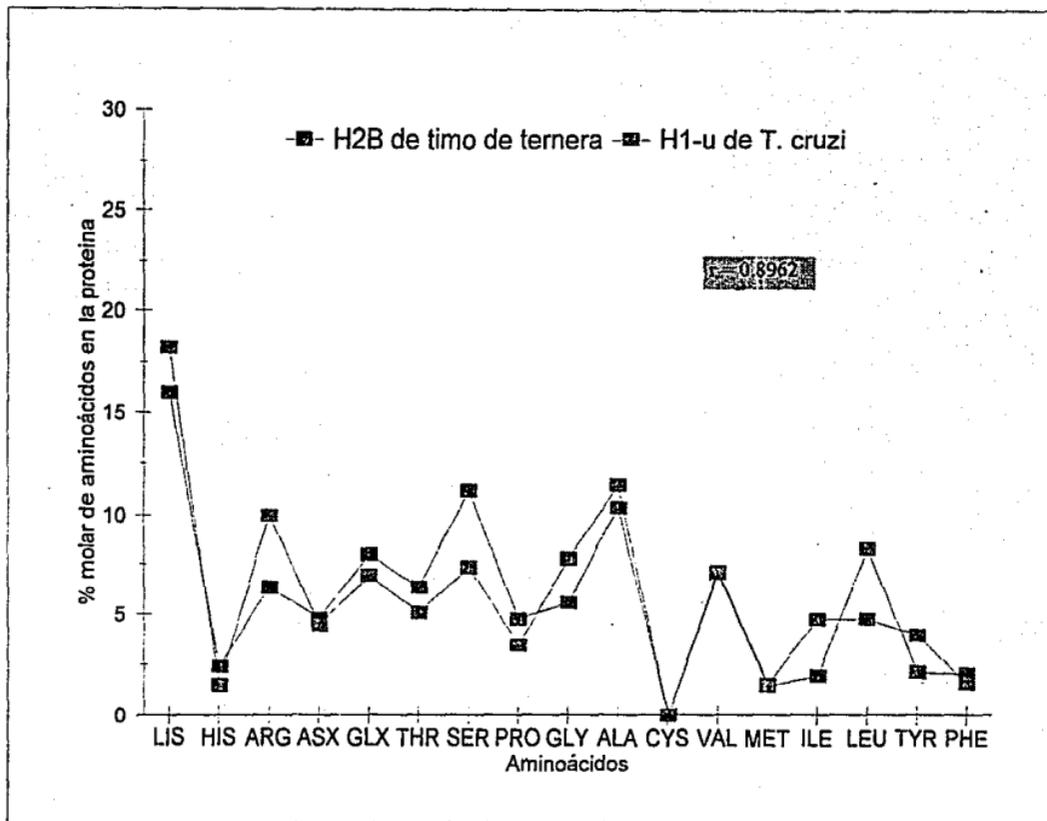
APENDICE

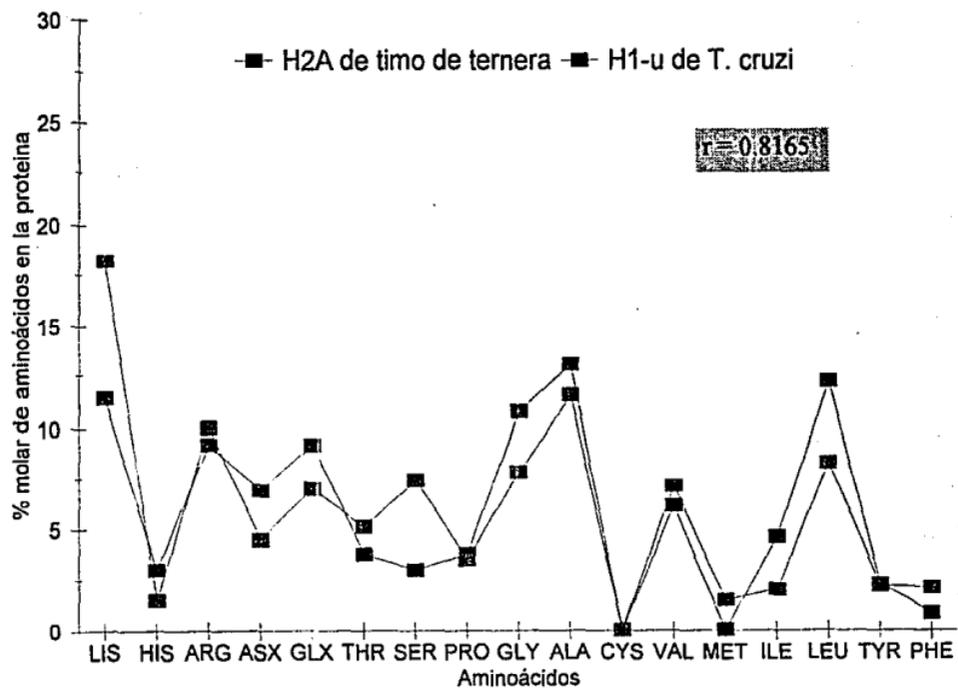
**COMPARACION DE LAS COMPOSICIONES DE AMINOACIDOS ENTRE LAS
NUCLEOPROTEINAS DE *Trypanosoma cruzi* Y LAS HISTONAS DE TIMO DE
TERNERA Y H5 DE ERITROCITO DE POLLO**

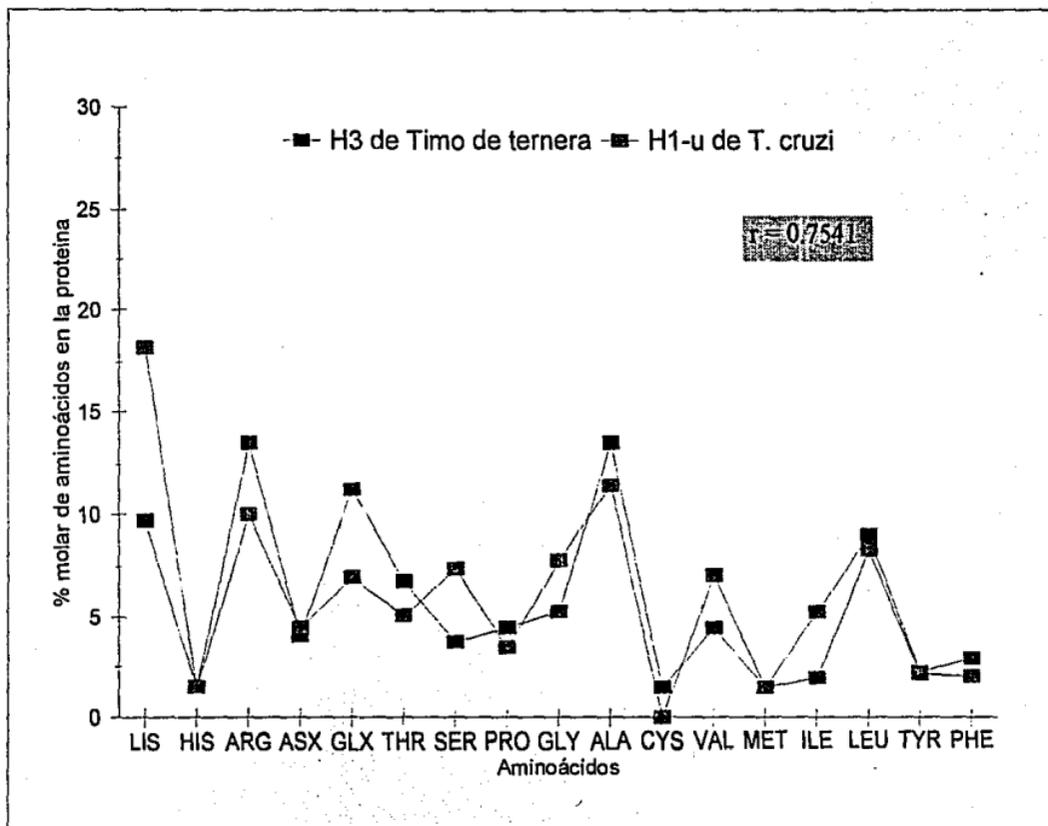
APENDICE A-I

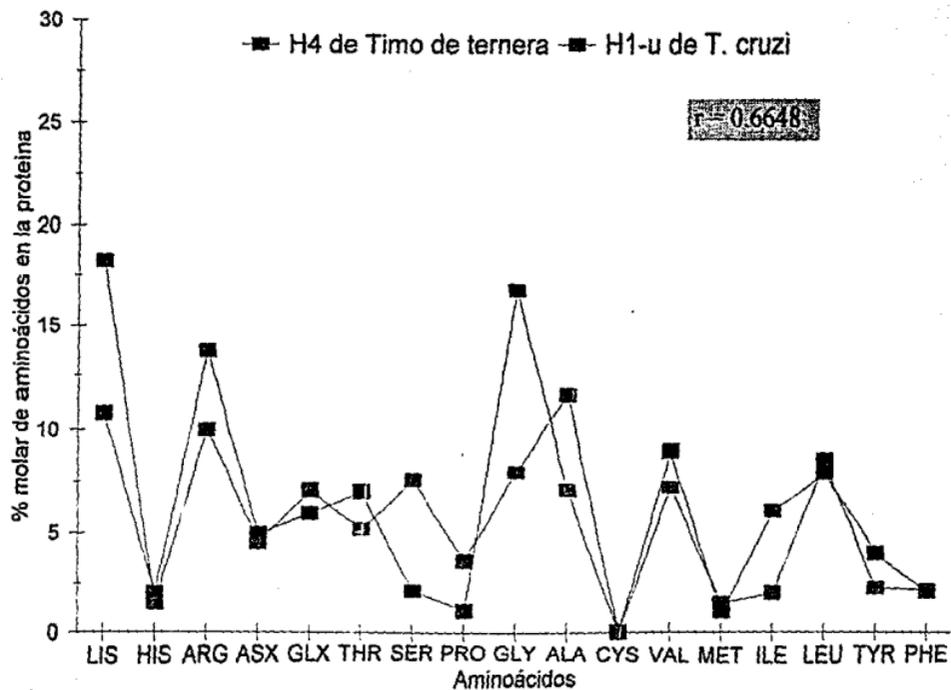
**COMPARACION ENTRE LA BANDA H1-u DE *Trypanosoma cruzi*
Y LAS HISTONAS DE TIMO DE TERNERA Y H5 DE ERITROCITO DE POLLO**

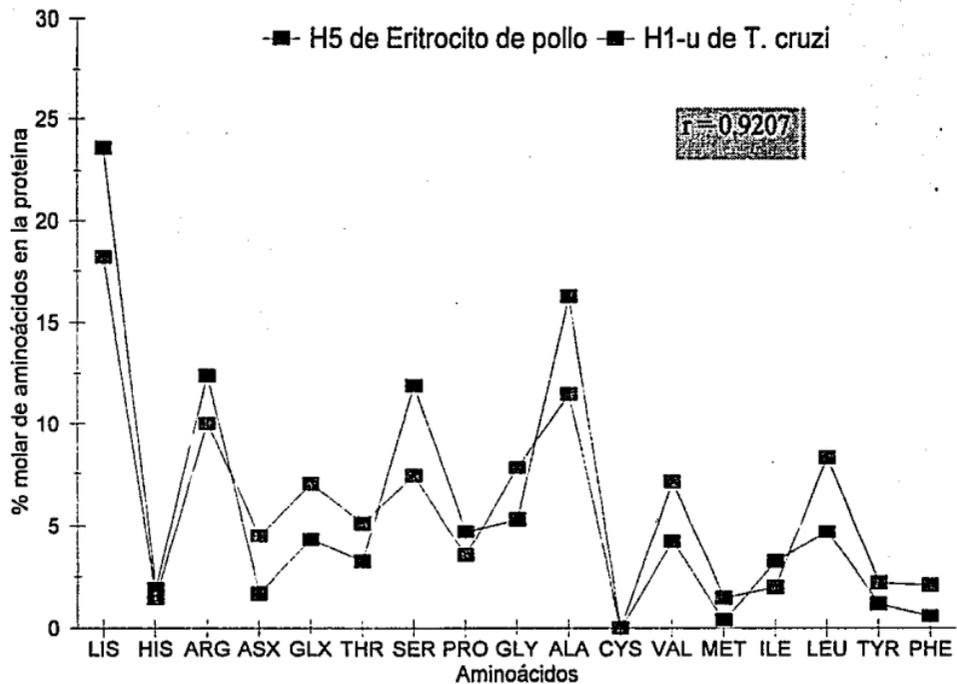






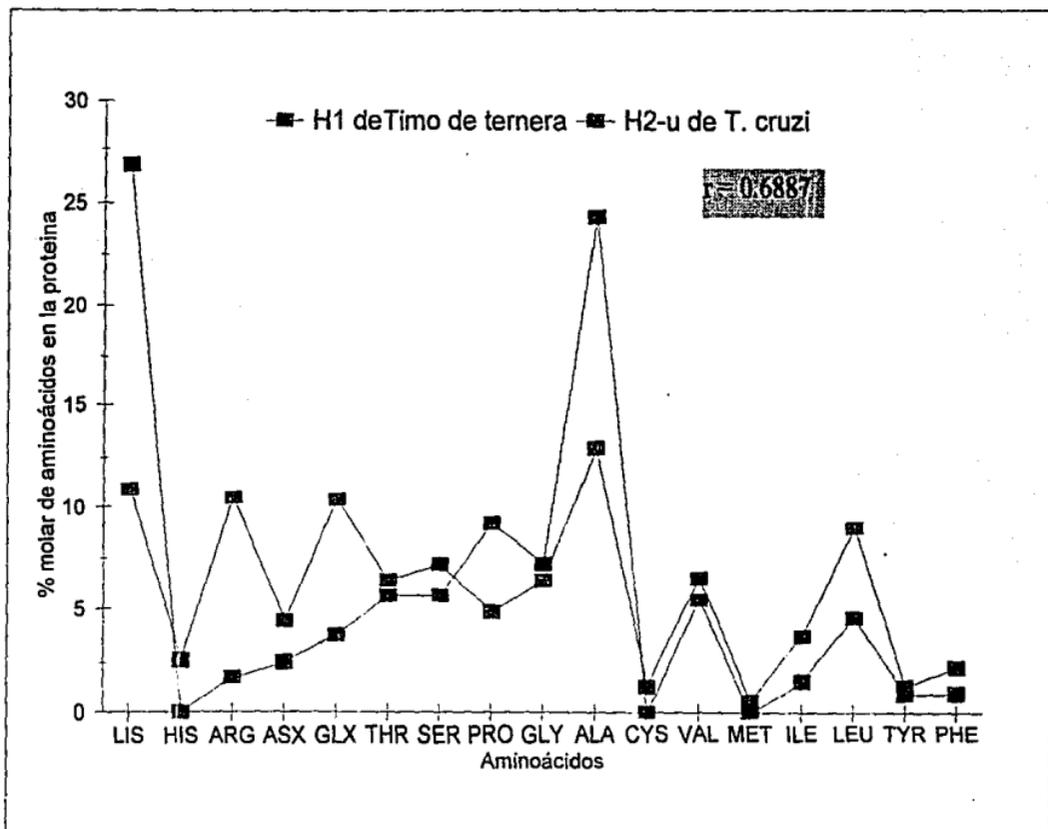


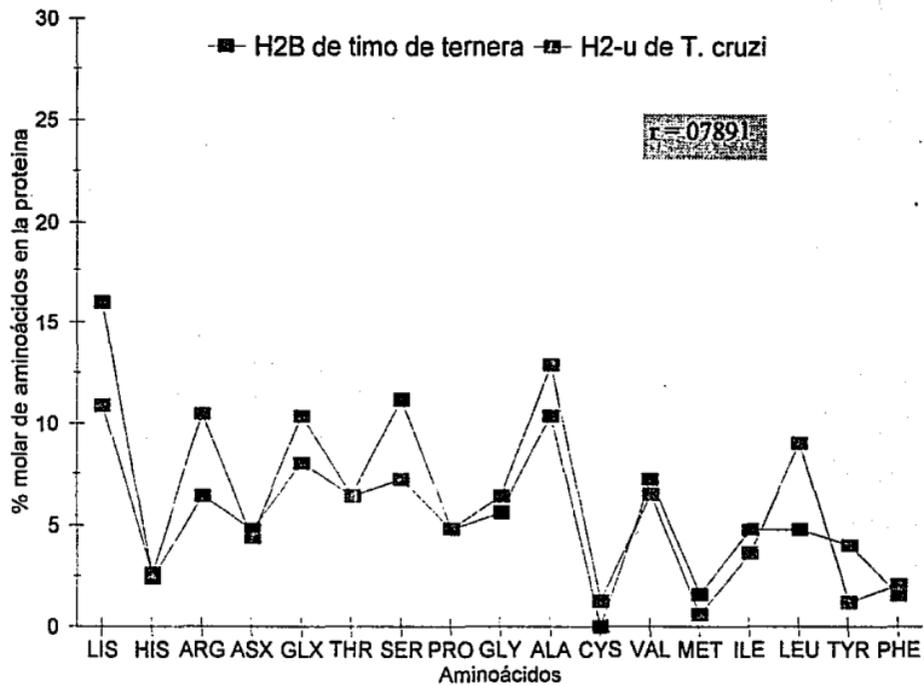


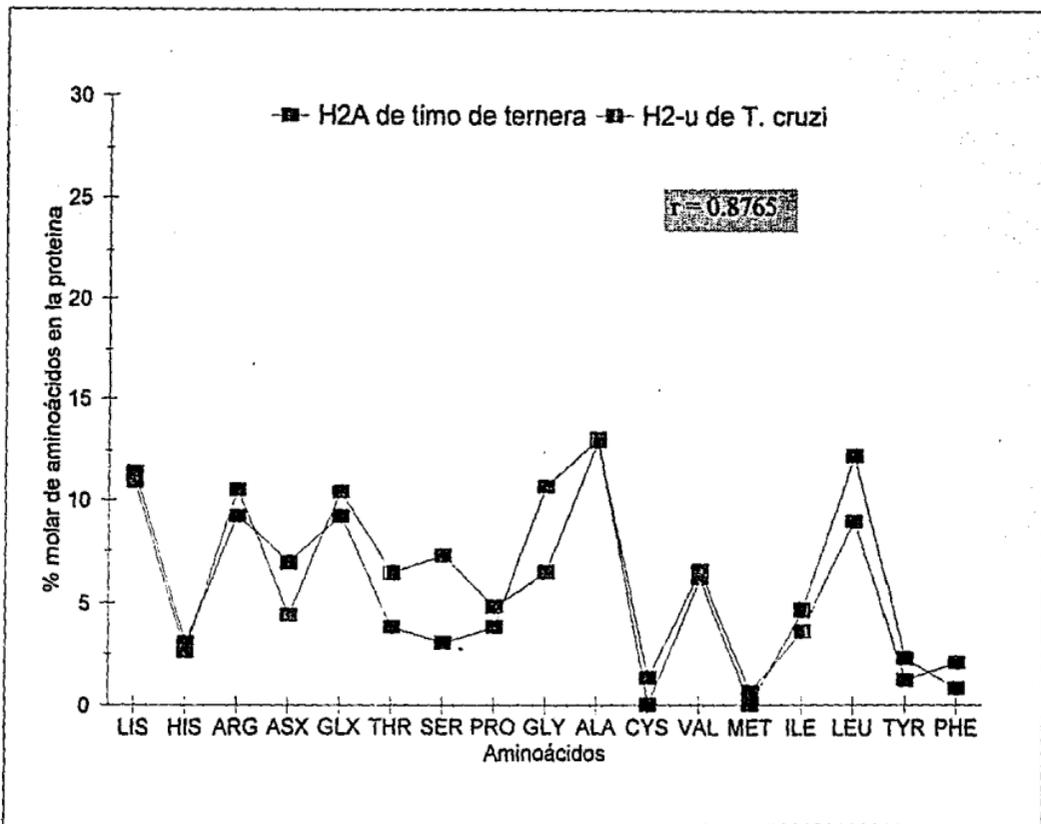


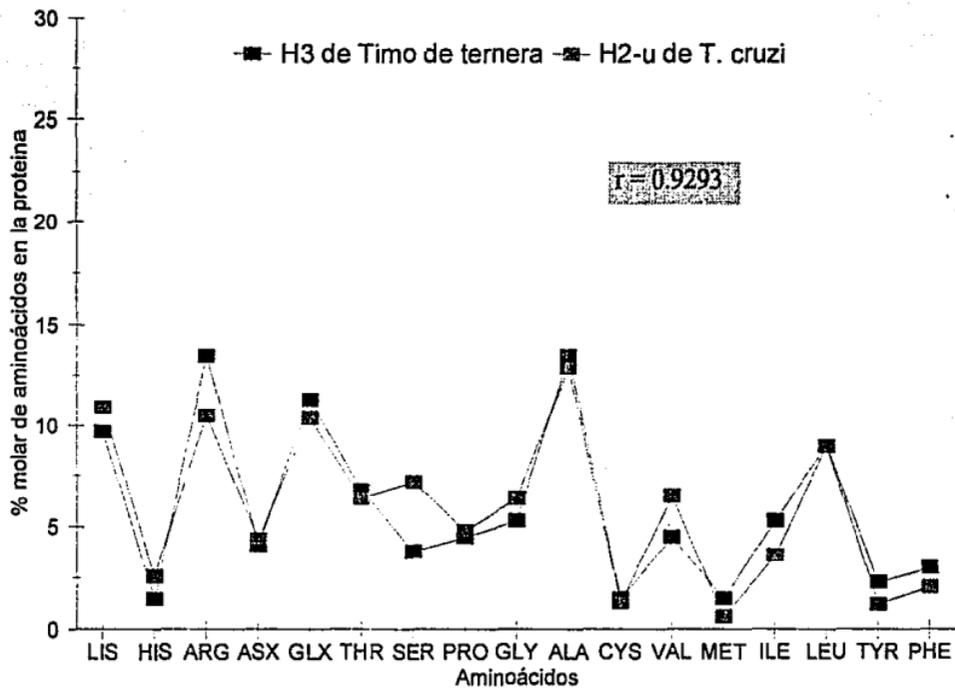
APENDICE A-II

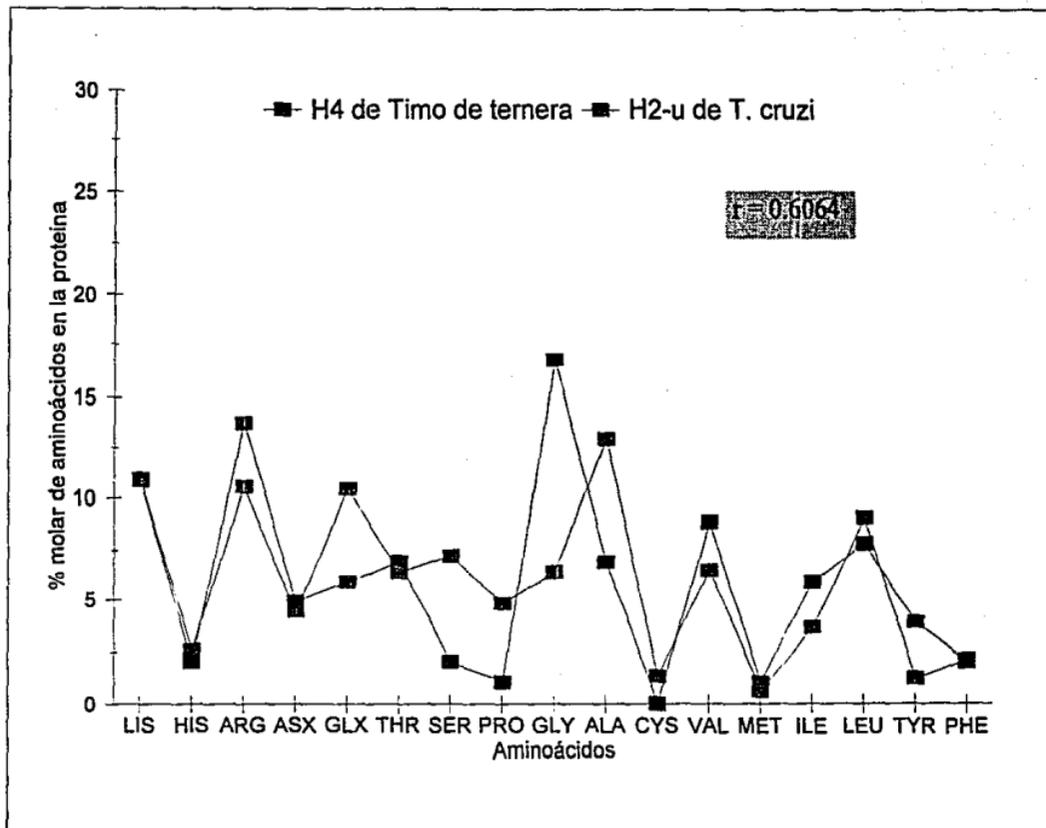
**COMPARACION ENTRE LA BANDA H2-u DE *Trypanosoma cruzi*
Y LAS HISTONAS DE TIMO DE TERNERA Y H5 DE ERITROCITO DE POLLO**

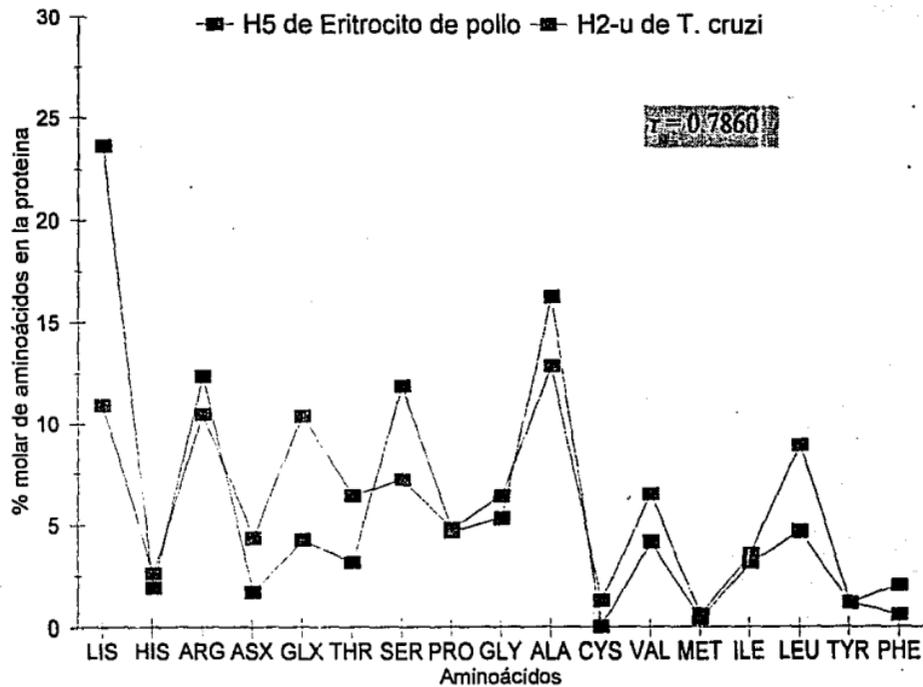






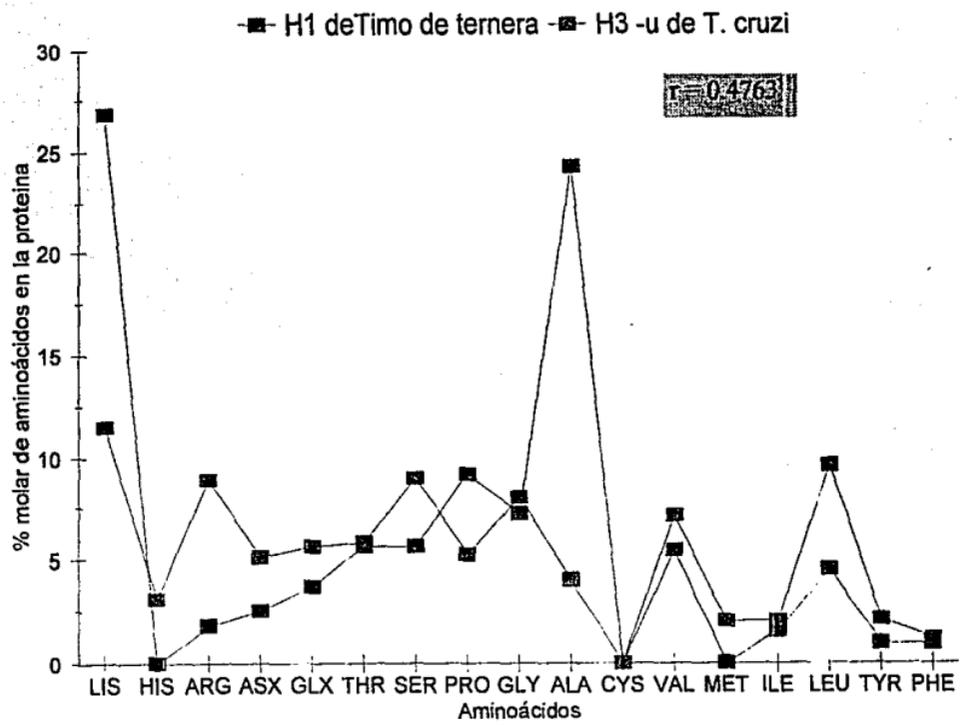


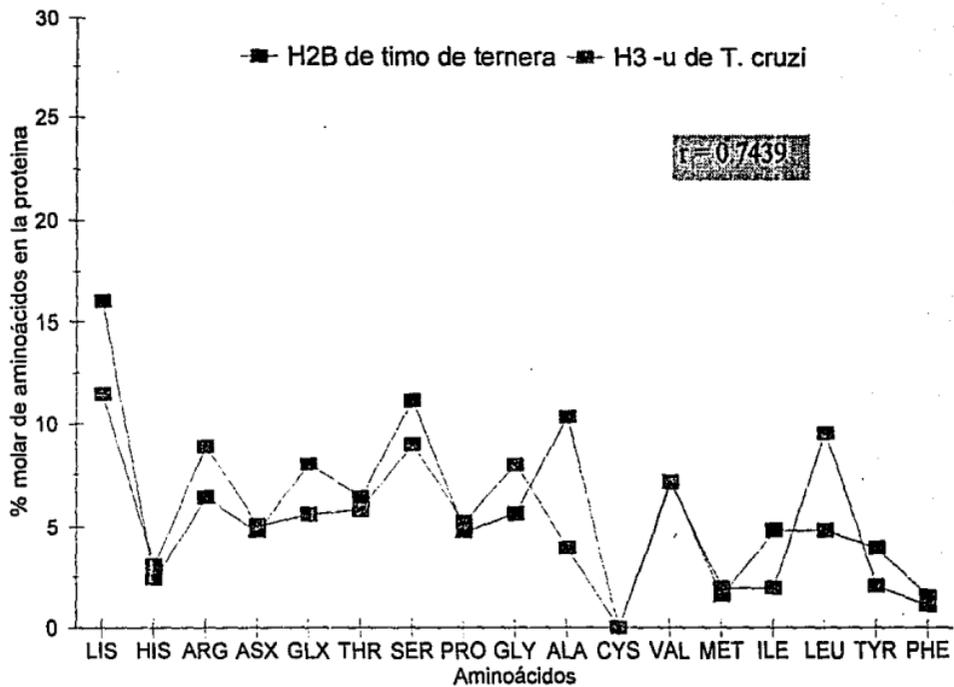


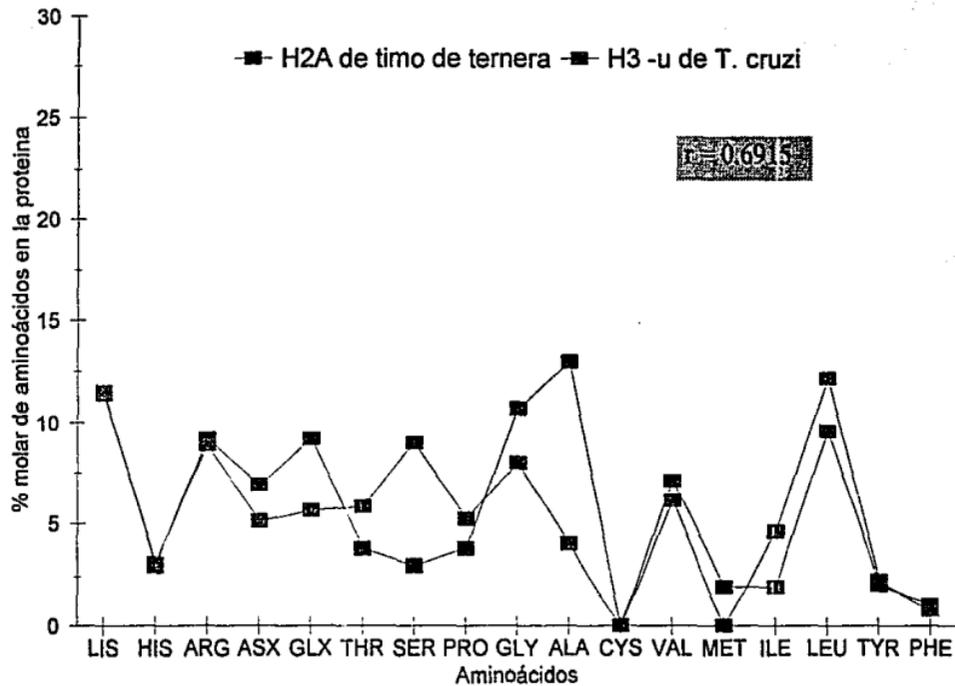


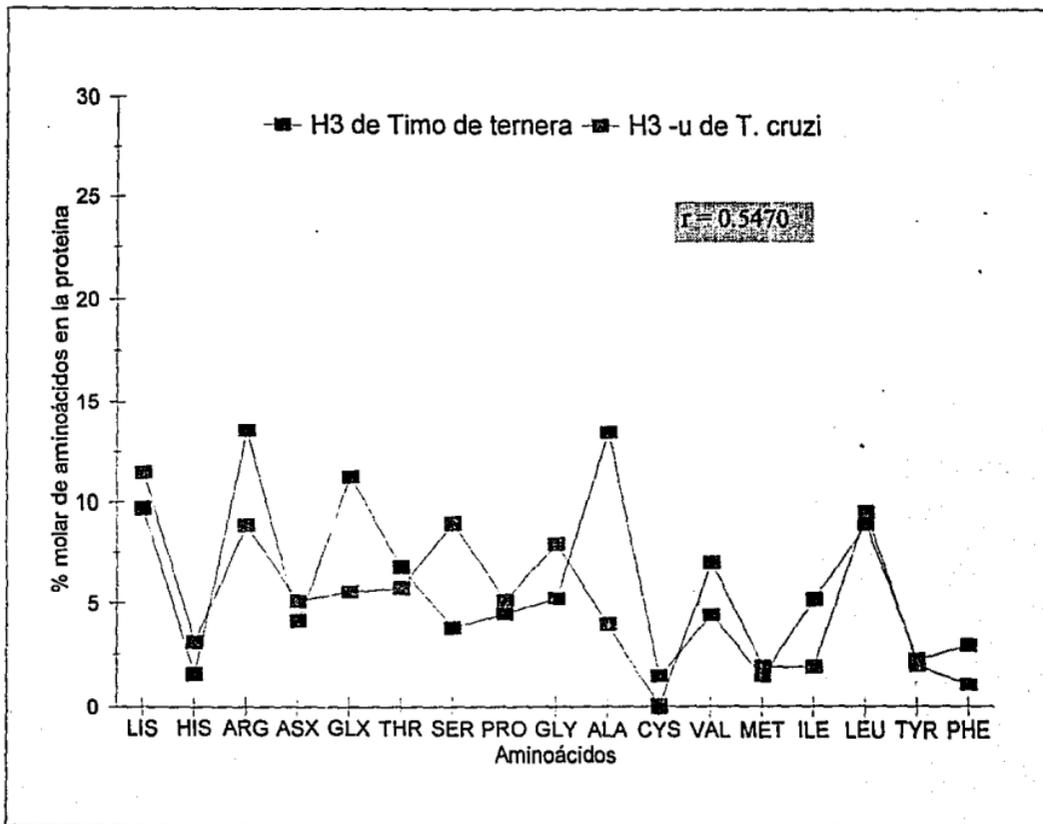
APENDICE A-III

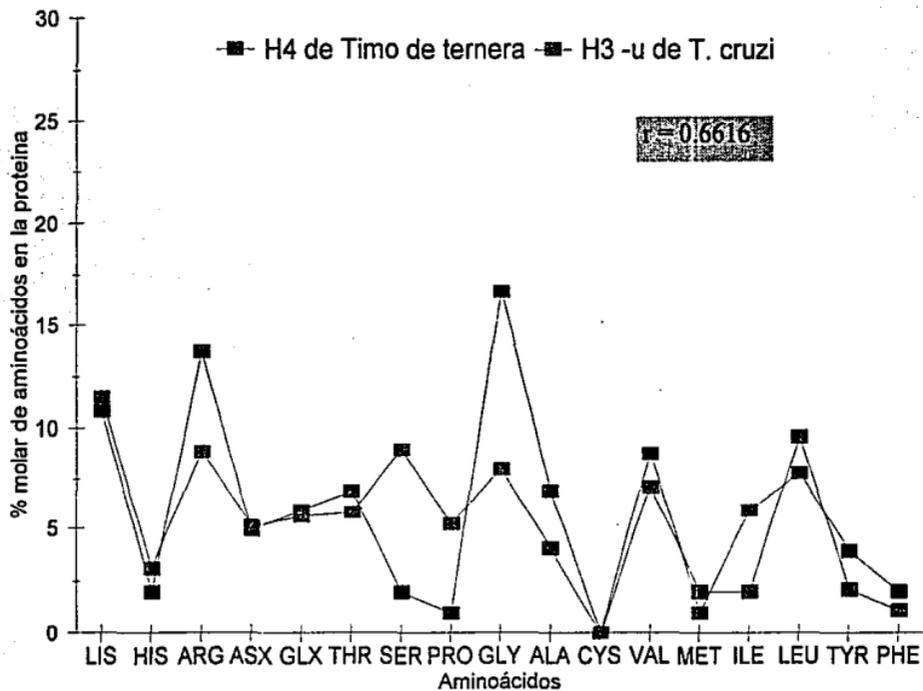
**COMPARACION ENTRE LA BANDA H3-u DE *Trypanosoma cruzi*
Y LAS HISTONAS DE TIMO DE TERNERA Y H5 DE ERITROCITO DE POLLO**





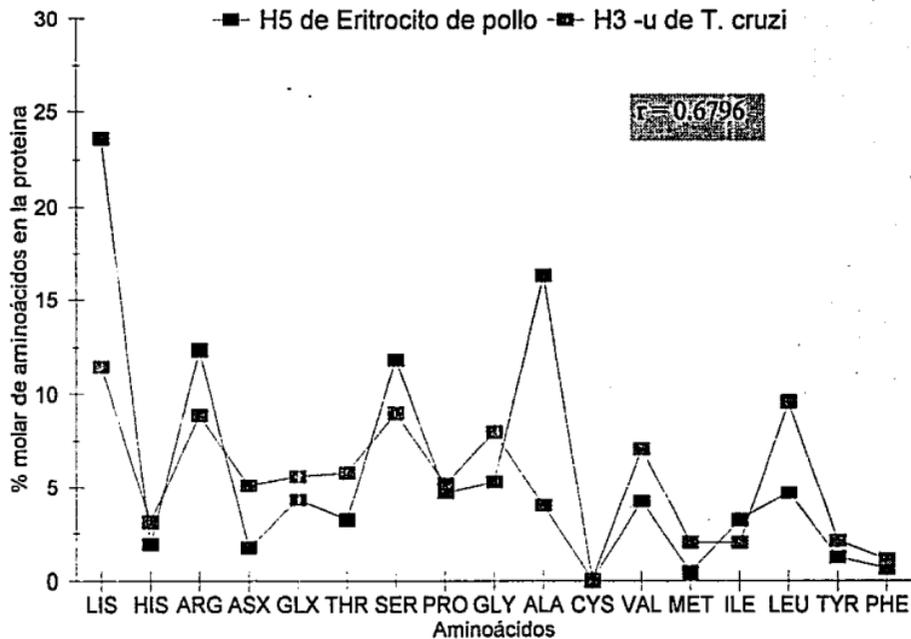


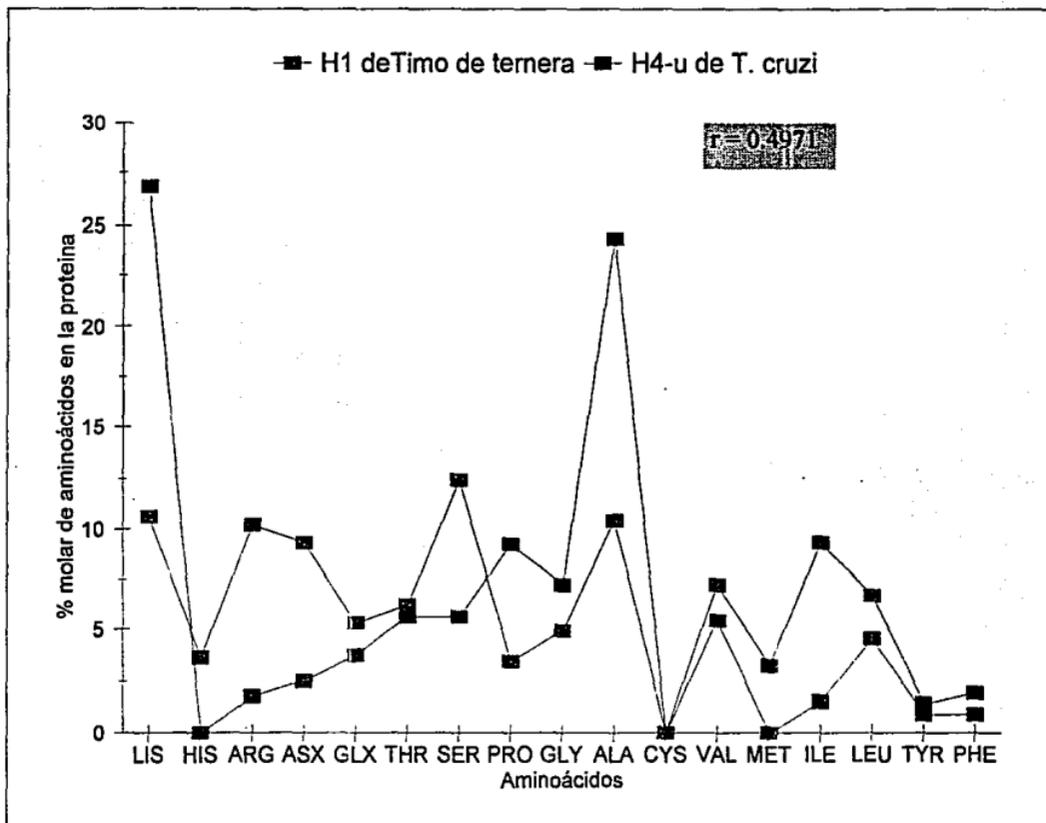


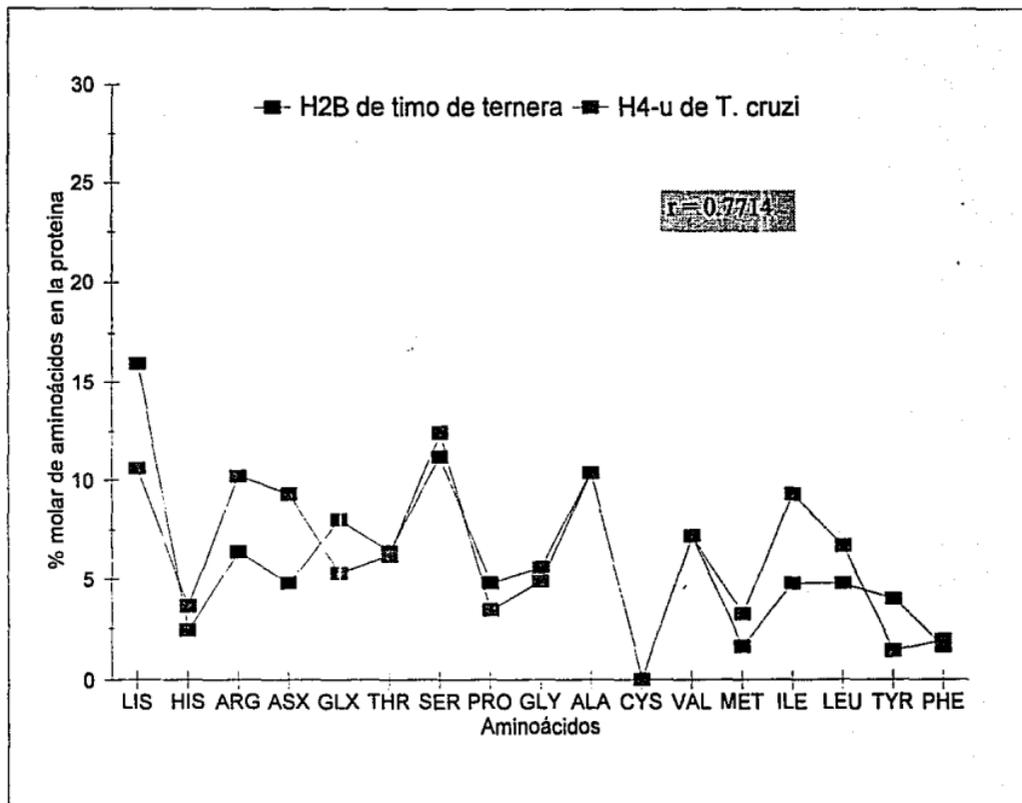


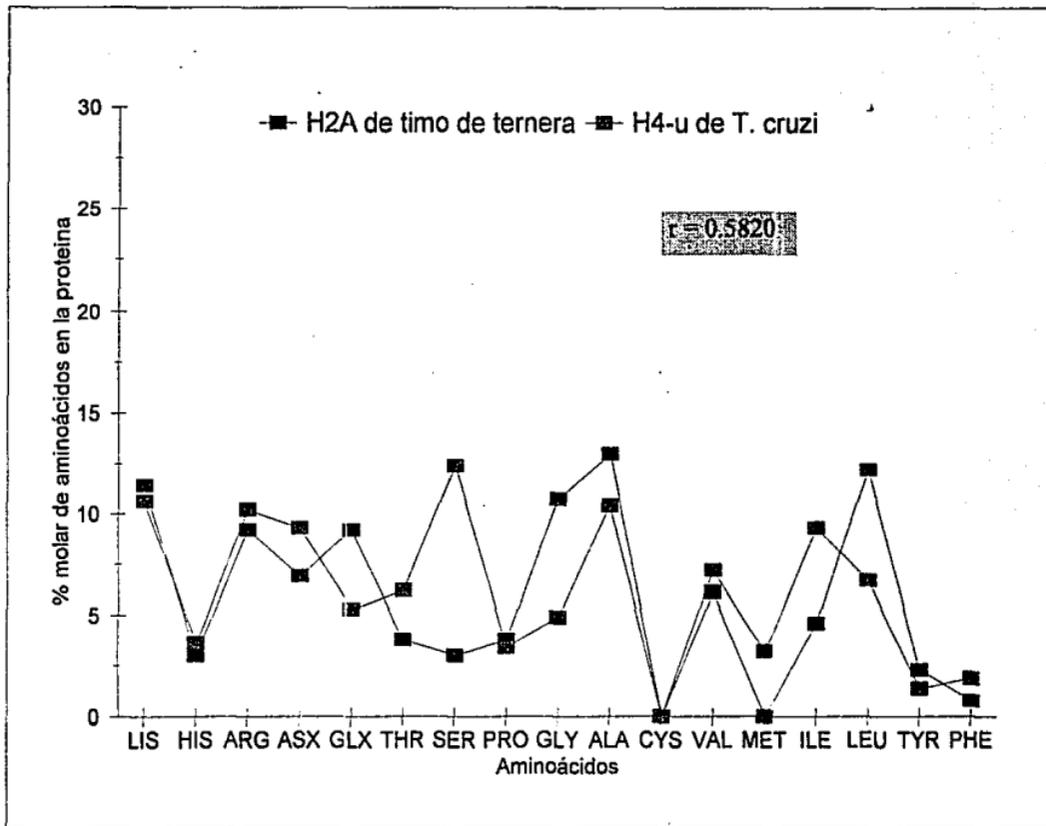
APENDICE A-IV

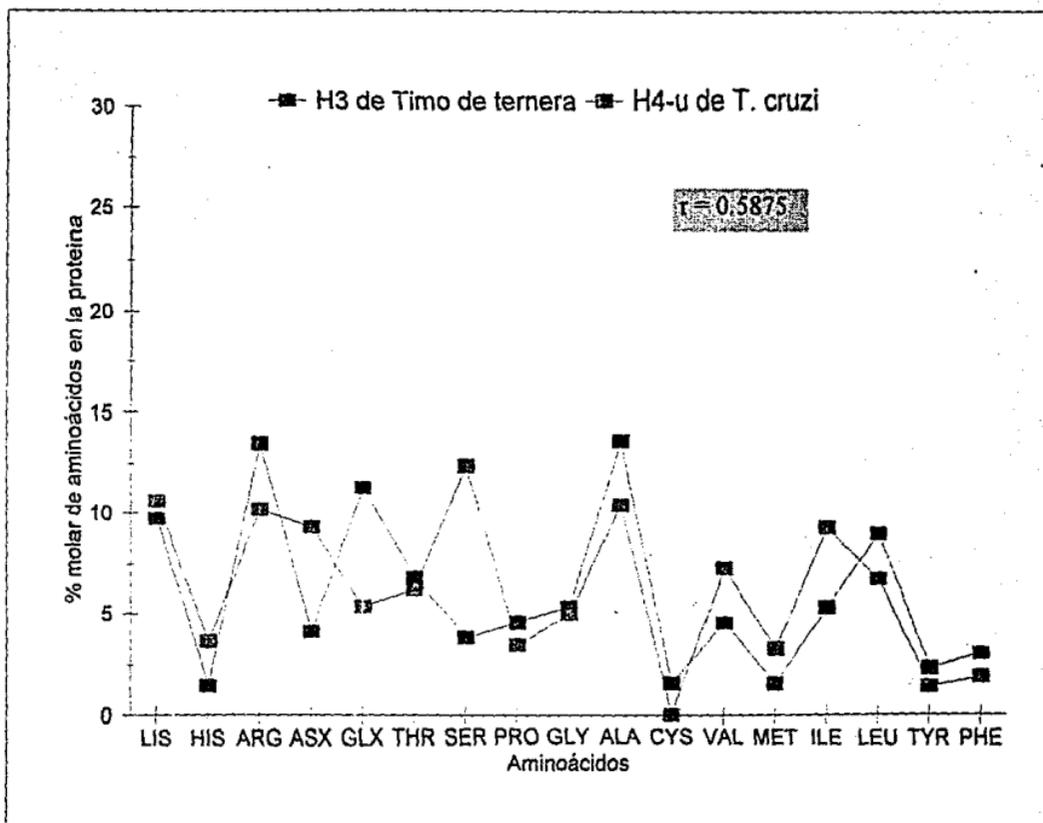
COMPARACION ENTRE LA BANDA H4-u DE *Trypanosoma cruzi*
Y LAS HISTONAS DE TIMO DE TERNERA Y H5 DE ERITROCITO DE POLLO

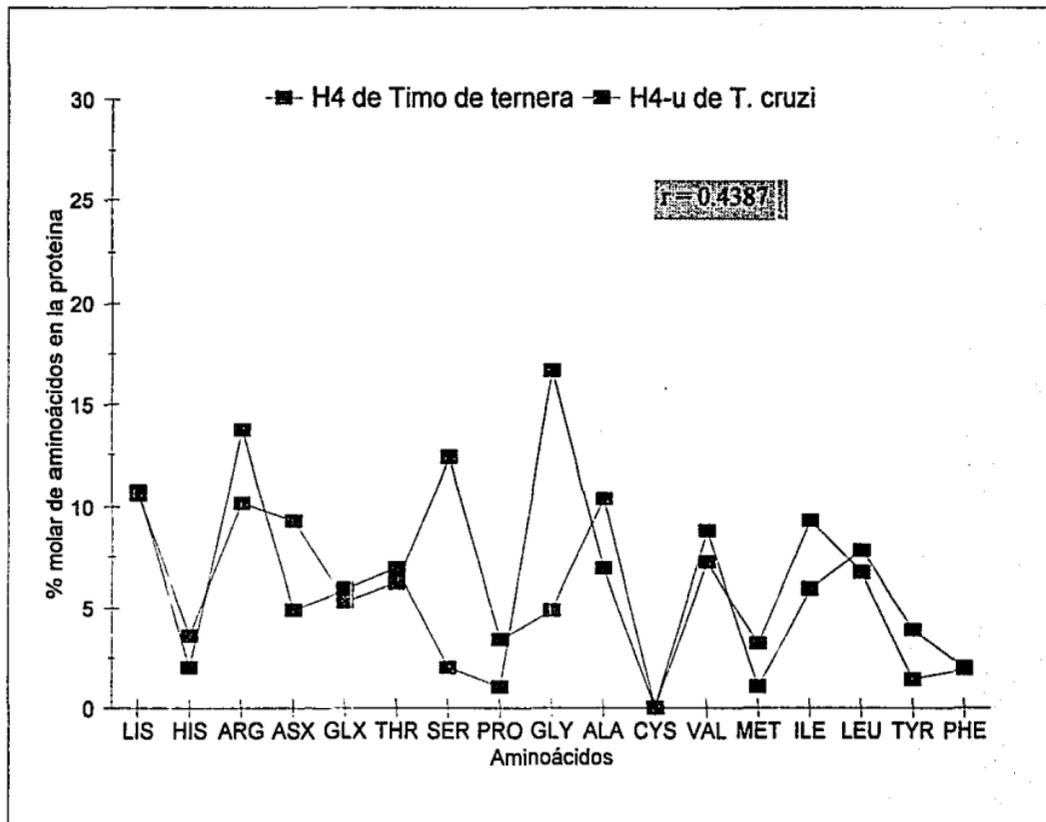


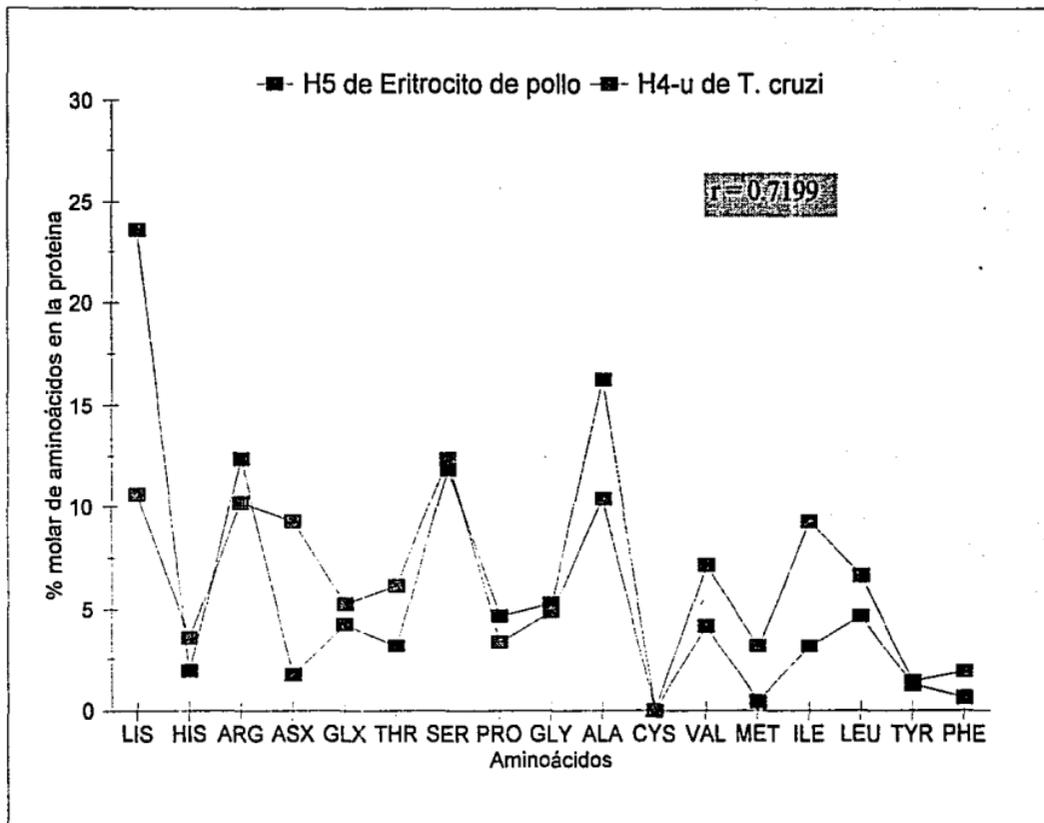






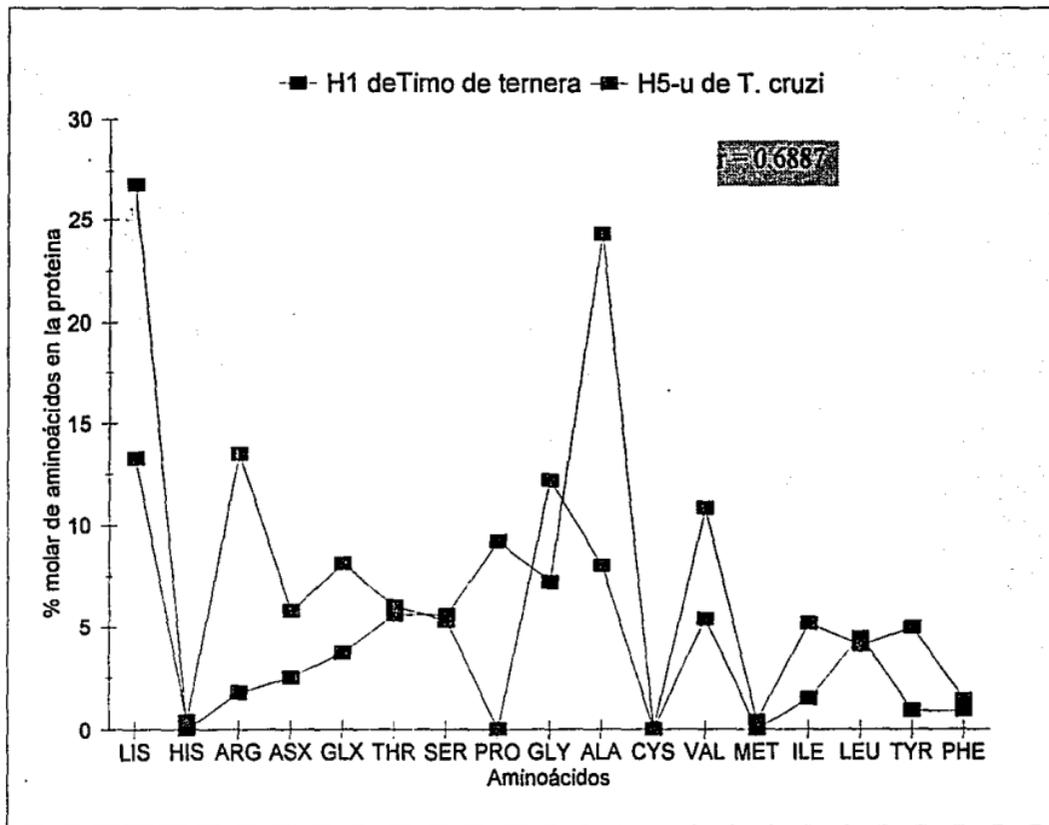


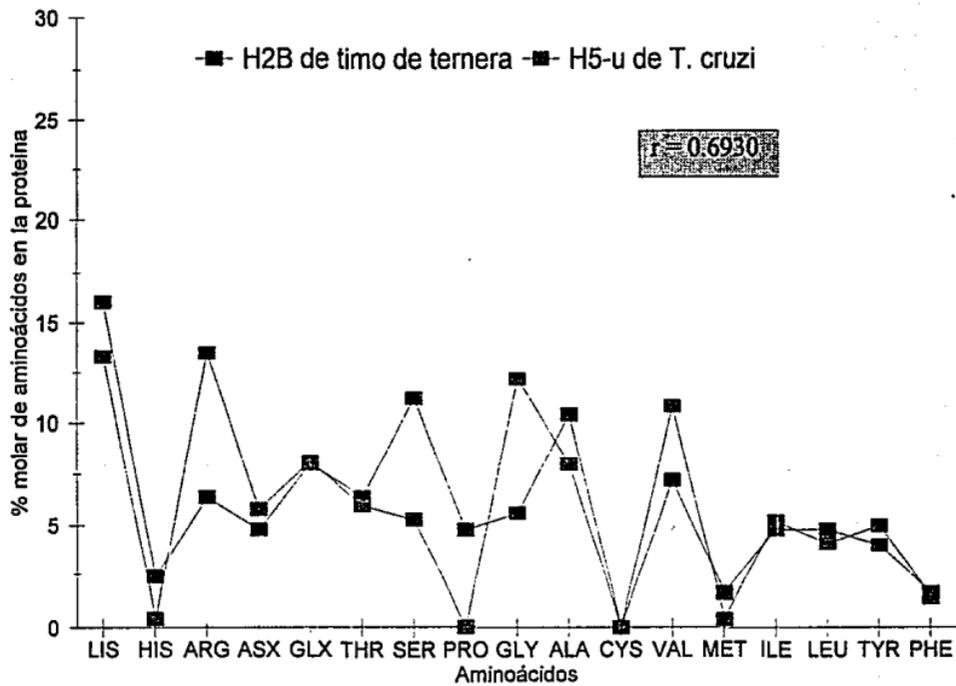


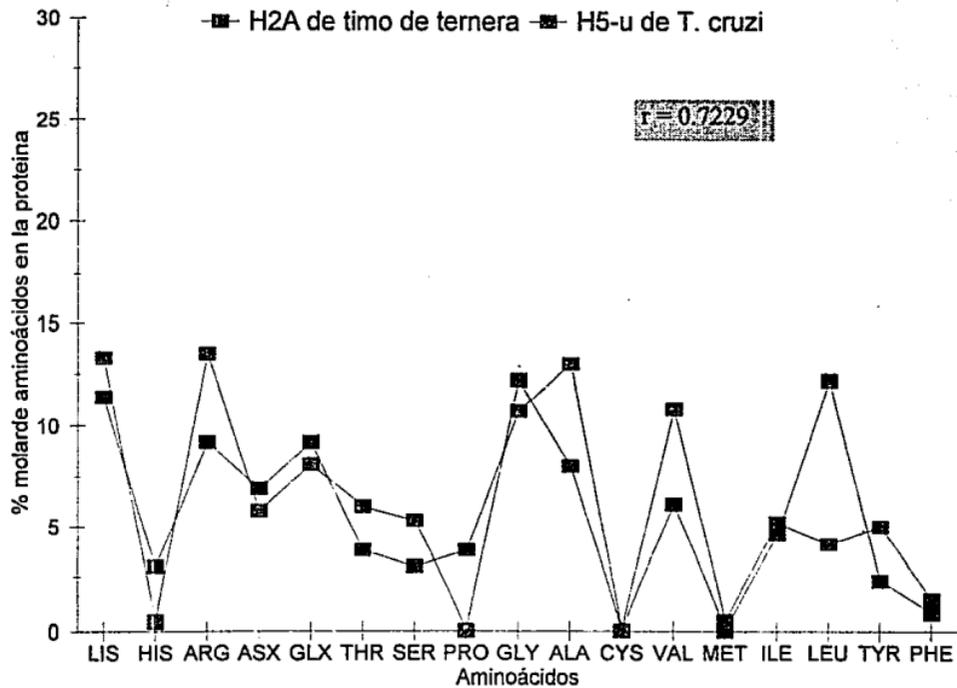


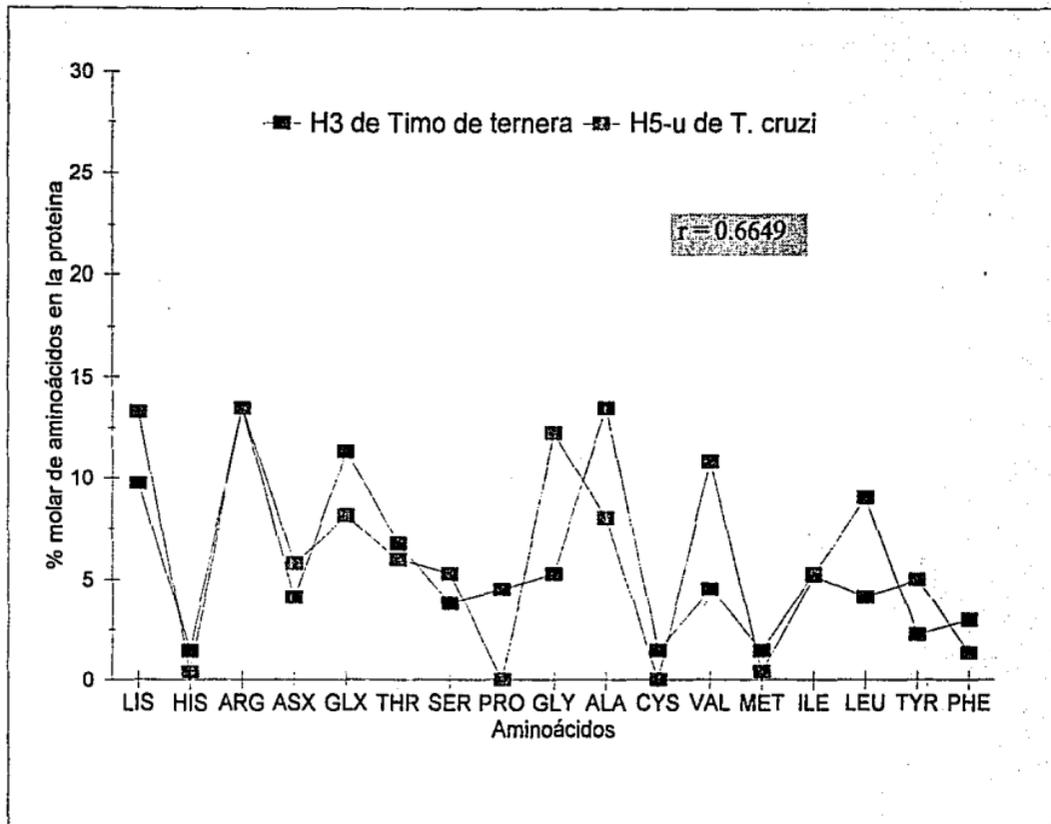
APENDICE A-V

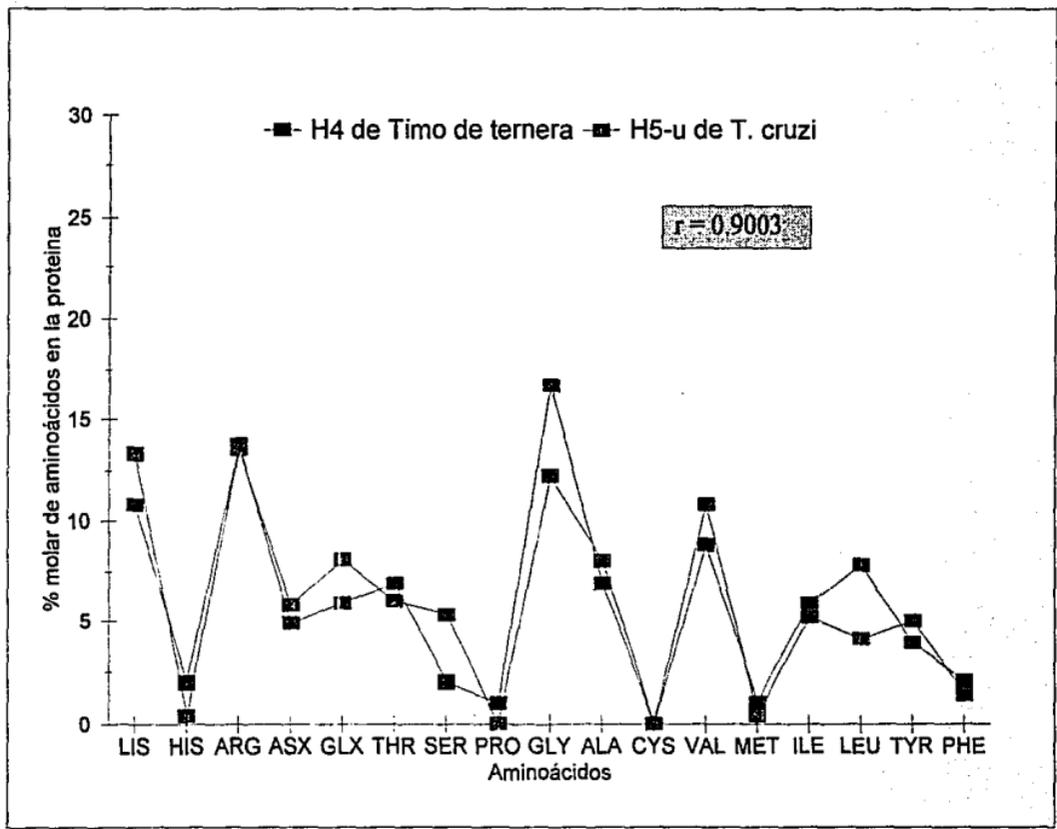
**COMPARACION ENTRE LA BANDA H5-u DE *Trypanosoma cruzi*
Y LAS HISTONAS DE TIMO DE TERNERA Y H5 DE ERITROCITO DE POLLO**

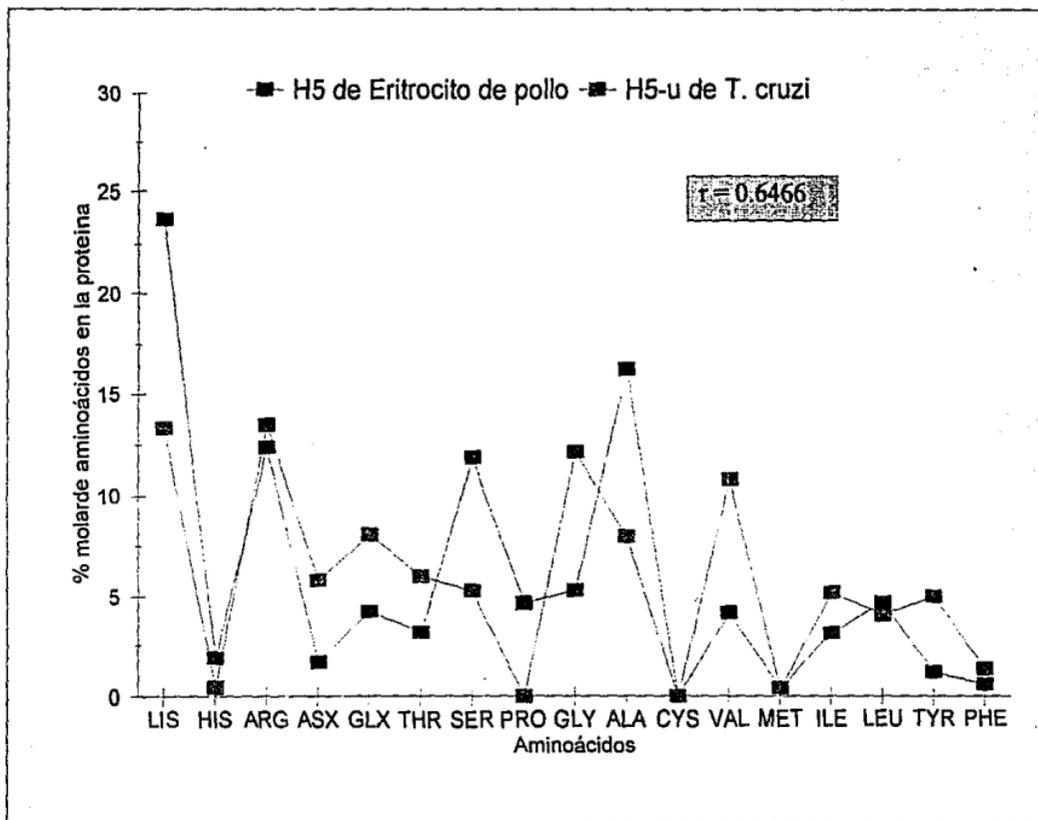












APENDICE A-VI

**COMPARACION ENTRE LA BANDA H6-u DE *Trypanosoma cruzi*
Y LAS HISTONAS DE TIMO DE TERNERA Y H5 DE ERITROCITO DE POLLO**

