

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

Caracterización de Especies Menores
Nuevas de RNA Ribosomal en
Trypanosoma cruzi.

Tesis para optar
por el título de Biólogo
que presenta
Gabriel Ramiro Nava Pinto

México, D.F., 1982



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 esta 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.

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

CARACTERIZACION DE ESPECIES MENORES NUEVAS
DE RNA RIBOSOMAL DE Trypanosoma cruzi.

INTRODUCCION

Aspectos Generales

Trypanosoma cruzi es un protozoario hemoflage-
lado causante de la enfermedad de Chagas, contra la --
cual hasta la fecha no se ha encontrado protección qui-
mioterapéutica ni inmunológica (2).

Este organismo pertenece al reino Protista y
se le clasifica de la siguiente manera:

phylum Protozoa
subphylum Sarcomastigófora
superclase Mastigófora
clase Zoomastigófora
orden Cinetoplástida
familia Trypanosomatidae (18).

T. cruzi es un parásito de una gran variedad
de animales dentro de los cuales se incluye al hombre.
Presenta un ciclo de vida complejo tanto en el hospede-

ro vertebrado como en el insecto vector. En el hospede-
ro vertebrado, T. cruzi se multiplica discontinuamente,
en el estado intracelular (forma amastigote), prolifera
por división binaria, luego cambia a la forma tripomasti-
gote que no se divide, la cual surge de los tejidos afec-
tados hacia el torrente sanguíneo, donde ésta circula --
por un período variable de tiempo, antes de penetrar nue-
vamente a la célula a reanudar su ciclo de vida.

Los tripomastigotes, que son la forma infecti-
va del protozoario, pueden penetrar en un amplio rango -
de células hospederas, no obstante, las células de glía
y musculares parecen ser más frecuentemente parasitadas
(2).

Es importante estar conciente, que la enferme-
dad de Chagas es muy difícil de detectar, pues casi uni-
camente el 1% de las personas afectadas presentan sínto-
mas clínicos suficientes para llamar la atención del mé-
dico, ya que en la mayoría de los casos, el período "agu-
do" de la enfermedad presenta un proceso silencioso o le-
ve y los síntomas pueden manifestarse solamente después
de varios años.

Por esto es comprensible que en algunos países donde se detecta la enfermedad, ésta sea subestimada o tratada con negligencia, y por lo tanto no se le reconozca como un problema de salud pública.

T. cruzi es un organismo plifacético, no tan solo morfológicamente, sino también por los efectos que produce en el hospedero, pues la severidad de la enfermedad varía en cierto grado con la región geográfica donde se localiza. De tal forma tenemos que en el sur de Brasil y algunas áreas de Chile éste produce cardiomiopatías; alteraciones del tracto digestivo (mega esófago y mega colon) se presentan en algunas zonas de Brasil, mientras que estas son raras o nulas en otras zonas o países; por otro lado, en las regiones sureñas de Estados Unidos, T. cruzi raramente infecta al hombre y cuando lo hace provoca signos clínicos muy leves y sin notables afectos patológicos a largo plazo (30).

Como se ha hecho notar, la tripanosomiasis se extiende desde Estados Unidos hasta Argentina y Chile, afectando por lo menos a 12 millones de personas en Centro y Sur América (13).

La población de México no esta exenta de esta enfermedad, y en 15 estados de la república se han localizado casos de tripanosomiasis. Por datos aportados -- por el Centro de Investigaciones Ecológicas de Sureste -- se sabe que en estos estados la incidencia de la enfermedad en el hombre varía del 1.2% al 50%, lo cual indica -- que tenemos un serio problema de salud al que no se le -- ha dado la importancia que merece.

Aspectos Particulares

El ribosoma es una estructura altamente espe-- cializada y compleja, en la cual se da el intrincado proceso de la síntesis de proteínas.

Las células eucariotas contienen varios sitios donde se da la síntesis proteica: el citoplasma y la mitocondria y, en el caso de las plantas, en el cloroplas-- to; en donde cada uno de esos compartimientos celulares usa sus propios ribosomas (25).

Los ribosomas de todos los organismos estan -- compuestos de dos subunidades ribonucleoproteicas que difieren en tamaño y que estan asociadas reversiblemente -- durante la síntesis de proteínas, cada subunidad contie--

ne una especie de RNA de alto peso molecular y varias --
proteínas (en eucariotes hay de 70 a 80 y en procariotes
55).

La más grande de las dos subunidades contiene
además una especie de RNA de bajo peso molecular, RNA --
5S. En eucariotes, la subunidad mayor del ribosoma cito
plásmico contiene también otro componente, RNA 5.8S. Es
ta especie surge de la segmentación del precursor del --
RNA ribosomal de alto peso molecular, y a diferencia del
RNA 5S está unido en la unidad ribosomal al RNA 28S por
puentes de hidrógeno. Ningún RNA de tal tipo (5.8S) ha
sido encontrado en las ribosomas de los organismos proca
riotes, por lo cual, se le puede considerar como caracte
rístico de eucariotes (28).

Organización de los Genes Ribosomales.- En la
mayoría de los eucariotes, los genes que codifican para
los RNAs ribosomales (RNAsr) están organizados en varios
cientos de copias codificadoras, las cuales están agrupa
das en "tandem" (extremo 3' de un gen unido al extremo --
5' del siguiente) en uno ó varios sitios cromosomales. -
Las unidades de repetición ribosomal (DNAr) contienen --
los genes que codifican los RNAsr 18S, 5.8S y 28S, trans
critos en este orden como un gran precursor (fig.1).

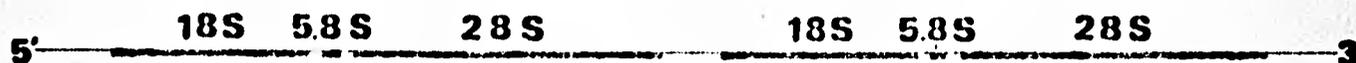


Fig. 1.- Unidad de repetición ribosomal (DNAr)

Los genes que codifican para el RNA 5S se encuentran generalmente en otro loci. En Saccharomyces cerevisiae estos genes están localizados dentro del DNAr; no obstante, aún en este caso el RNA 5S se transcribe in dependientemente del precursor mayor del RNA ribosomal - que contiene a las otras tres secuencias.

De las proteínas ribosomales solo muy pocos genes estructurales son conocidos en eucariotes, de los - - cuales hay cierta evidencia de que no se encuentran en - grupos tal como en el caso de Escherichia coli (25).

Biosíntesis de los Ribosomas.- La estructura, función y biogénesis de los ribosomas de procariotes están ahora bien documentados, especialmente en E. coli; - mucho menos es conocido de éstos en eucariotes, no obstante los mayores pasos en la biosíntesis de ribosomas - han sido identificados en diferentes eucariotes, los cua

les son similares desde los protistas hasta los metazoarios superiores.

Tres de las cuatro especies de RNA ribosomal - (RNAr) surgen de sucesivos cortes de un gran precursor. La transcripción, procesamiento y modificaciones químicas de los RNAsr ocurren en el nucleolo. Las proteínas ribosomales son sintetizadas en el citoplasma; la mayoría, si no todas ellas, tienen que migrar hacia el nucleolo donde son necesarias para el correcto procesamiento de los RNAsr y, para la formación de las partículas preribosomales en asociación con proteínas no ribosomales. Entonces estas subunidades ribosomales son transferidas al citoplasma, donde su maduración final origina las partículas maduras 40S y 60S (33).

Aunque los rasgos generales de esta vía han sido conocidos por muchos años, los mecanismos moleculares involucrados en cada conjunto de reacciones permanecen oscuros. Se desconoce como los componentes moleculares son ensamblados y como el gran número de subunidades ribosomales son transferidas a través de la membrana nuclear (25).

Función de los RNAs Menores.- Por lo que res--

pecta al funcionamiento o papel que desempeñan los RNAs de bajo peso molecular, se ha sugerido su participación en la unión al RNA de transferencia (RNAt) (19), así como a la asociación de las subunidades ribosomales (1,32). Recientes resultados demuestran la participación del RNA 5S y complejo proteico en la actividad del factor de elongación 2 (EF-2) dependiente de GTPasa de los ribosomas eucariotes (21).

De tal forma es de asumirse que los RNAs 5.8S y 5S están localizados cerca o en el centro peptidil transferasa del ribosoma eucariote (31,29). Por estos antecedentes nos percatamos que estas moléculas son de importancia en la síntesis de proteínas.

Al analizar algunos miembros de la familia trypanosomatidae se hacen patentes diferencias por lo que respecta al patrón ribosomal general; entre estas se encuentra que la especie ribosomal 24S se disocia en dos fragmentos al analizarse ésta en condiciones desnaturantes (3,11); pero el caso más llamativo es que en Crithidia fasciculata (11) y Trypanosoma brucei (5) se han hallado 5 moléculas de RNAr de bajo peso molecular que oscilan en un rango de 100 - 300 nucleótidos, la existencia de estas cinco moléculas se ha sugerido tam--

bién en el caso de Leishmania tarentolae (26,11), y en cualquiera de los casos se ignora su estructura y función.

Por datos preliminares obtenidos en el laboratorio, se sabe de la presencia de éstas moléculas en las preparaciones de RNA total y polisomal de T. cruzi.

Tomando como base estos precedentes y considerando el escaso conocimiento de la biología de T. cruzi, a la diversidad de su virulencia, a la falta de fármacos contra éste y por el grupo tan singular al que pertenece, me he avocado al estudio de las especies menores del RNA de tipo ribosomal en este protozooario.

OBJETIVO

Ya que el sistema de traducción del RNA mensajero en T. cruzi es aparentemente diferente al de la mayoría de las células eucariotes superiores, este estudio puede ayudar al tratamiento de la trypanosomiasis; así como informar acerca de la filogenia de este grupo de organismos, y puesto que la purificación y caracterización de los componentes es necesaria para el análisis de la estructura y función del ribosoma, el presente trabajo tiene como finalidad, purificar y caracterizar las moléculas de RNAr de bajo peso molecular, así como determinar las posibles asociaciones que puedan existir entre estas y las especies mayores ribosomales.

MATERIALES Y METODOS

Medio de Cultivo

Se utilizó un aislado mexicano de T. cruzi proveniente de la Cruz, Jalisco. Este aislado se creció en medio líquido de infusión de hígado con triptosa, suplementado al 10% con suero bovino inactivado (55°C) y agitado en botellas a 20°C.

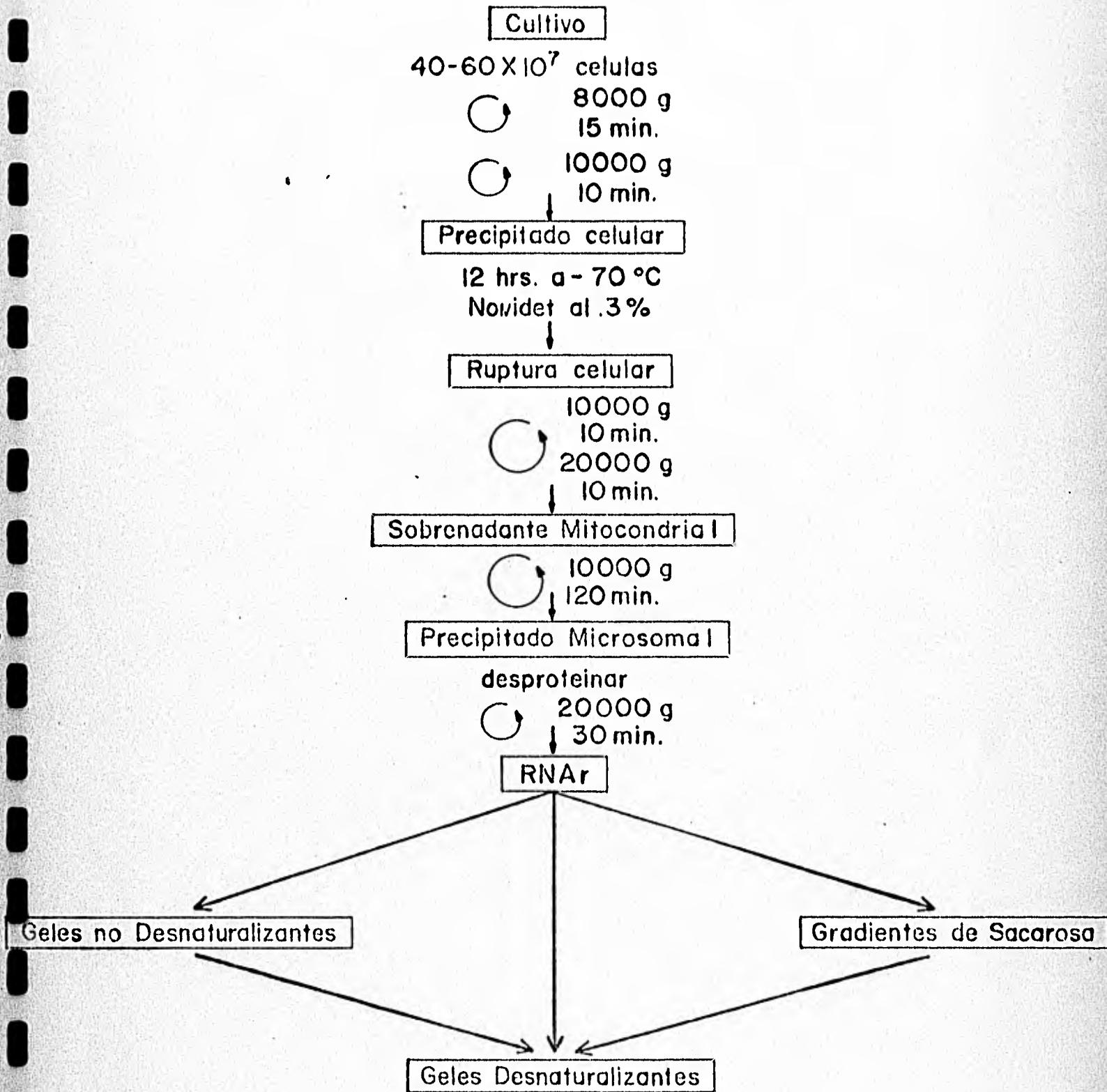
Purificación del RNAr

El proceso que se siguió para la extracción -- del RNA ribosomal se representa en el cuadro 1 y es como sigue.

Las células se cosechan en fase media logarítmica de crecimiento (40-60 X 10⁶ células/ml) mediante centrifugación a 8000 X g por 15 min. a 4°C. El precipitado proveniente de esta centrifugación se lava y resuspende en la siguiente solución:

KCl	100mM
Mg (CH ₃ COO) ₂	5mM
Tris pH 7.0	30mM

Cuadro I



Esquema del Proceso de Extracción y Analisis del RNAr

CaCl	3mM
Heparina	1mg/ml

Estas células ya resuspendidas se centrifugan nuevamente, pero ahora a 10000 X g por 10 min. a 4°C, - el precipitado obtenido de esta manera se guarda a --- -70°C.

Posteriormente se resuspende el precipitado - en la solución anterior y ya estando bien resuspendido se le agrega Nonidet NP 40 al .3% final, y se verifica - al microscopio la ruptura celular.

Se centrifuga a 10000 X g por 10 min. a 4°C y 10 min. más a 20000 X g a 4°C.

El sobrenadante se centrifuga a 100000 X g -- por 2 hrs. a 4°C; del precipitado resultante se obtiene la fuente de ribosoma (3).

Los ribosomas son desproteínados con 2 ml de:

LiCl	2M
Urea	4M
Heparina	4mg/ml

Tris pH 7.0 20mM

esta mezcla se guarda durante la noche a 4°C, después es
ta se centrifuga a 20000 X g por 30 min. a 4°C de cuyo -
precipitado se obtiene el RNAr. El precipitado se resus
pende con agua tratada con dietilpirocarbonato y leído -
en un espectrofotómetro Zeiss a 280, 260 y 230 nm para -
determinar su pureza. A este material en adelante lo --
trataré como el RNA del precipitado de 100000 X g.

Geles Desnaturalizantes

El RNA es analizado en geles de placa de polia
crilamida al 3%, disuelta en solución TBE (15,22):

Acido bórico	2.75 g.
EDTA	0.465 g. 1L pH 8.2
Tris	5.4 g.

a la solución se le agrega urea 7M como agente desnatura
lizante (5,15).

El gel se precorre a 20V durante la noche para
quitar los iones adicionales contenidos en el gel (22).
El reservorio superior de la cámara de electroforesis se

llena con solución TBE/urea, mientras que en el inferior solo con solución TBE.

Las muestras se corren a 30V durante 8 hrs. -
Los geles al final de la corrida son lavados con agua bi destilada y teñidos con bromuro de etidio a una concen-- tración de 3 µg/ml y fotografiados.

Geles no Desnaturalizantes

Los geles se preparan con agarosa al 1.5% en - solución Tris boratos:

Ac. Bórico	2.74 g.
EDTA	0.465 g. 1L agua tratada con DPC
Tris	5.40 g. pH 8.3

Las placas previo a su uso se hornean a 150°C durante la noche. La electroforesis se efectua durante 4.5 hrs. a 4°C y 100V.

Gradientes de Sacarosa

El RNA precipitado de 100000 X g se corre en un gradiente isocinético de sacarosa, formado con 6 ml -

de sacarosa al 20% en el recipiente de mezclado y 12 ml de sacarosa al 5% en el depósito. La sacarosa se disuelve en la siguiente solución:

Tris	10 mM pH 7.0
EDTA	1 mM
LiCl	50 mM
Sarkosyl	0.1 %
Heparina	1 mg/ml

La solución se filtra y esteriliza en autoclave y el agua se trata con DPC.

Los gradientes se centrifugan en el rotor Beckman SW 27.1 a 26000 rpm durante 17 hrs. a 4°C.

NOTA: Todas las soluciones fueron tratadas -- con dietilpirocarbonato (DPC) y en el caso de la solución de cosecha se esterilizó en autoclave. Por lo que respecta al material de cristalería, éste se hornó a -- 150°C durante la noche.

RESULTADOS

Electroforesis en Geles Desnaturalizantes de Poliacrilamida

Cuando el precipitado de 100000 X g (RNAr) extraído de T. cruzi, con una relación de absorbencia de $260/280 = 2$ y $260/230 = 2.4$, fué sometido a electroforesis bajo condiciones desnaturalizantes en geles de poliacrilamida 7M de urea, se observaron seis moléculas de bajo peso molecular, además de las especies ribosomales ya reportadas por Castro et al, o sea, la molécula denominada 18S y los fragmentos α y β que conforman a la molécula 24S (fig. 2).

Por lo que respecta a las moléculas de bajo peso molecular, las denominaré en adelante m1, m2, m6 en orden descendente con el objeto de facilitar su localización.

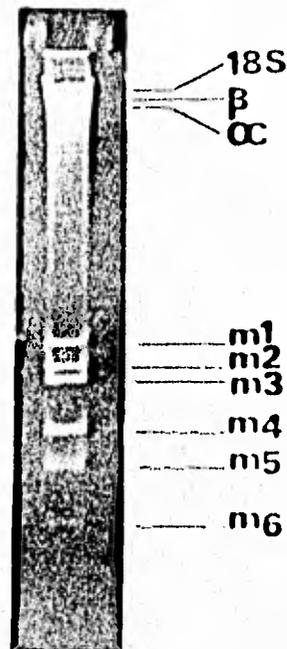


Fig. 2.- Electroforesis del gel de poliacrilamida al 3% bajo condiciones desnaturalizantes, en el cual se colocaron 10 μ g del precipitado de 100000 X g de T. cruzi.

Con este primer dato se determinó que T. cruzi también posee varias moléculas de RNAr de bajo peso molecular, al igual que los organismos reportados previamente.

Bajo éstas características se manifestaba la - incógnita ¿será el tamaño de estas moléculas, similar a

los ya reportados?. Para contestar esta pregunta y conociendo la relación lineal que existe entre el logaritmo del tamaño molecular y la movilidad de la molécula (15), se procedió a determinar el tamaño de estas moléculas de gran movilidad.

Así pues, una muestra del precipitado de 100000 X g se sujetó a coelectroforesis con marcadores de peso molecular conocido, como lo son los RNAs de ratón 5S y - 5.8S, así como con RNA de transferencia (RNAt) de levadura (fig.3).

En esta electroforesis se observa a primera -- instancia que las moléculas m1, m2 y m3 poseen un tamaño mayor al RNA 5.8S de ratón, y que las moléculas m4 y m5 tienen un tamaño similar a la molécula 5S de ratón, pero sin llegar a comigrar con esta. Por lo que respecta a - la molécula m6, se aprecia que ésta comigra con el RNAt de levadura y el RNAt de ratón, por tanto puede considerarsele como el RNAt de T. cruzi; y puesto que el presente estudio se enfoca el RNAr, los subsecuentes análisis excluyen a ésta molécula.

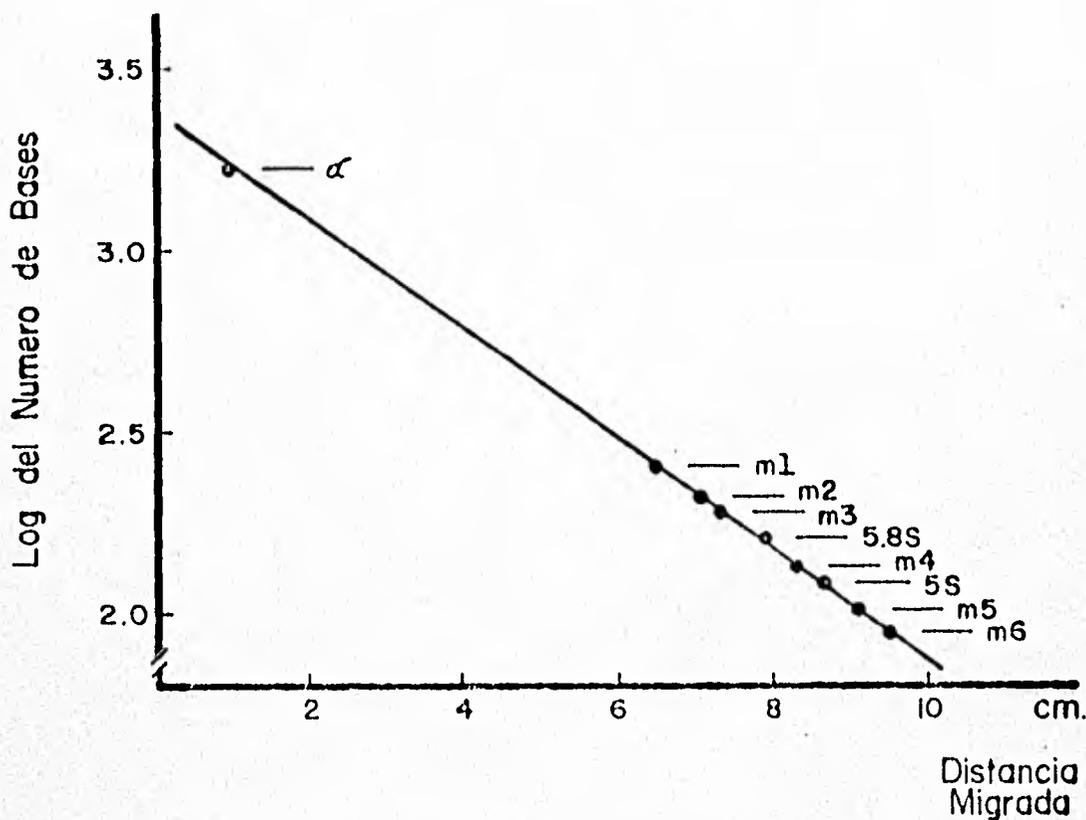
A partir de estos datos se procedió a determinar los tamaños de estas moléculas, tomando como puntos

de referencia a los RNAs de ratón y al fragmento α del RNA de T. cruzi (gráfica 1), de la cual se obtiene una recta que se ajusta muy bien a estos puntos.



Fig. 3.- Electroforesis del RNAr de T. cruzi con marcadores de peso molecular conocido. En los carriles 1 y 4 se muestra RNAr de ratón con 30 y 20 μ g por carril respectivamente, en los carriles 2 y 5 se observa RNAr de T. cruzi con 30 y 20 μ g por carril respectivamente y en el carril 3 se ven 10 μ g de RNAt de levadura.

Habiendo realizado esta correlación e interpolando nuestros puntos a discernir, obtuve que las moléculas en cuestión, por lo que respecta a tamaño, son similares a las reportadas para los demás miembros de la familia Trypanosomatidae (Tabla 1).



Gráfica 1.- Relación del logaritmo del peso molecular vs la distancia migrada de la electroforesis del precipitado de 100000 X g de T. cruzi y los marcadores de peso molecular conocido (fig.3) en geles de poliacrilamida/urea

Determinación de Asociaciones Intermoleculares

I.- Gradientes de sacarosa

Ya establecida la longitud en nucleótidos de las moléculas menores, se procedió a determinar las aso-

ciaciones que pudieran existir entre estas moléculas y las especies ribosomales 18S y 24S.

Para aclarar esta duda, se prepararon gradientes isocinéticos de sacarosa bajo condiciones que minimizaran la disociación de fragmentos de RNA asociados de forma no covalente. Bajo estos parámetros, se depositaron 200µg el precipitado de 100000 X g en la parte superior de un gradiente de sacarosa del 5 - 20% de 12 ml.

TABLA I

RNA	Peso molecular (X 10 ⁶)	Longitud de la cadena (nucleótidos)
ribosomal		
m1	0.087	265±8 (4)
m2	0.072	219±5 (4)
m3	0.062	190±10 (4)
m4	0.046	142±7 (4)
m5	0.036	111±4 (4)

La longitud de la cadena fué determinada mediante electroforesis en geles de poliacrilamida bajo condiciones desnaturalizantes, asumiendo una relación lineal entre la movilidad y el logaritmo del peso molecular. Las moléculas de RNA tomadas como marcadores fueron: el fragmento α del RNAr de *T. cruzi* y los RNAs de ratón 5.8S y 5S de 1661 nucleótidos (3), 159 nucleótidos (10) y 121 nucleótidos (9) respectivamente.

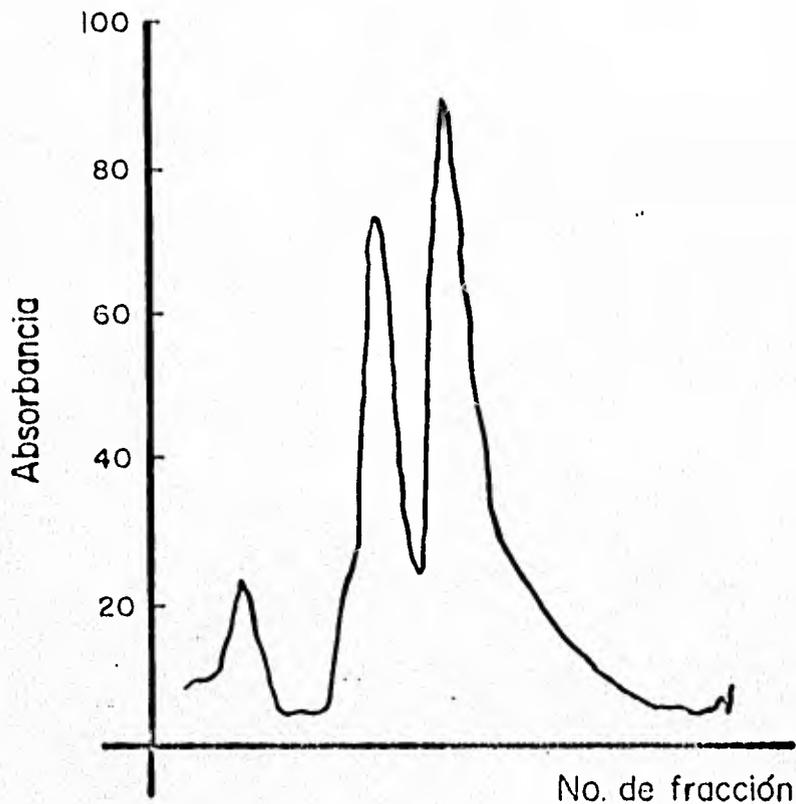
Los valores enlistados se dan en promedio \pm la desvia---

ción estandar y, el número entre paréntesis representa el número de determinaciones.

El perfil obtenido al analizar el gradiente -- por espectrofotometría (gráfica 2) muestra dos picos muy conspicuos los cuales corresponden a las especies ribosomales 24S y 18S ya caracterizadas por Castro y colaboradores (4), además, en la región ligera se observa un pico pequeño que en primera instancia se le puede considerar contenedor de por lo menos una de las moléculas de bajo peso molecular.

Después de haber caracterizado espectrofotométricamente al gradiente, se concentraron las fracciones que contenían a los picos correspondientes a las especies ribosomales 24S y 18S así como aquel pequeño pico de la región ligera. Para esto se formaron conjuntos correspondientes a cada pico. agregándoles 1/10 de volumen de acetato de potasio y 2 volúmenes de etanol; se guardó a 20°C durante la noche, se centrifugó y los precipitados de alcohol se resuspendieron en un volumen mínimo de solución de corrida TBE/urea.

Las muestras correspondientes a cada pico se analizaron en geles de placa de poliacrilamida (fig.4).



Gráfica 2.- Perfil del gradiente isocinético de sacarosa de 5 - 20%, mostrando la distribución del material que absorbe en ultravioleta, durante la fraccionación del precipitado de 100000 X g de T. cruzi.

El resultado de la electroforesis muestra en el carril correspondiente al pico de la región ligera solo cuatro bandas (m1, m2, m4 y m5) de bajo peso molecular, faltando la banda correspondiente a la molécula m3; en el carril asignado a la especie ribosomal 18S solo se observa a ésta contaminada con la especie 24S; por últi-

no en el carril donde se colocó la muestra extraída del pico correspondiente a la especie 248, se halló además - de las moléculas α , β y 18S a la molécula μ 3, completándose así el conjunto de moléculas de bajo peso molecular de RNA que interna al ribosoma.

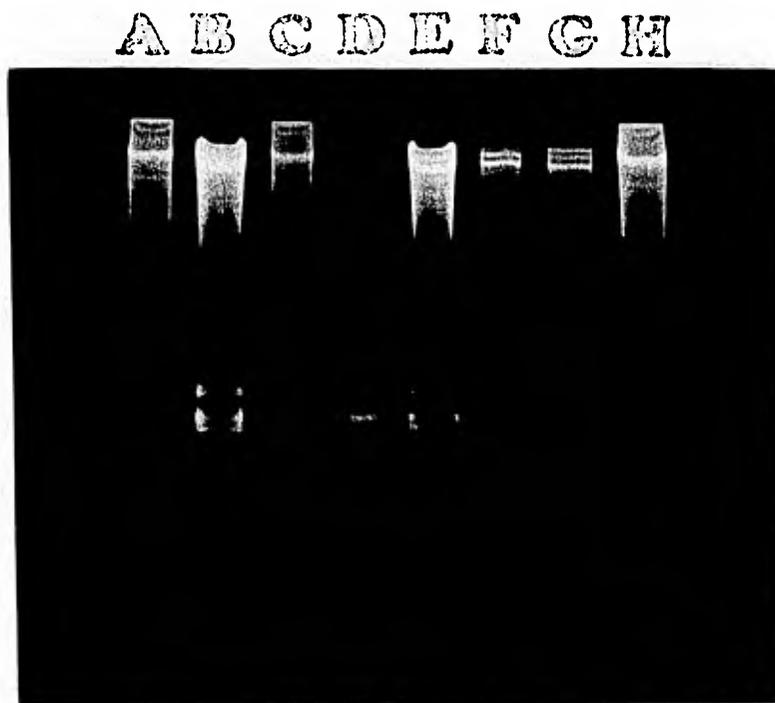


Fig. 4.- Electroforesis en geles de poliacrilamida al 3% de las fracciones del RNAr de T. cruzi obtenidas del gradiente de sacarosa. Las muestras aplicadas fueron en el carril A: 20 μ g de RNAr de ratón; carril B: 30 μ g del precipitado de 100000 X g; carril C: 10 μ g de RNAr de ratón; carril D: 4 μ g de RNAr de bajo peso molecular de T. cruzi; carril E: 20 μ g del precipitado de 100000 X g; carril F: 10 μ g de la fracción 248; carril G: 7 μ g de la fracción 18S y en el carril H: 10 μ g de RNAr de ratón. - Las muestras aplicadas en los carriles correspondientes

a los picos 18S, 24S y RNAr de bajo peso molecular fueron en cantidades equimolares.

II.- Geles no desnaturalizantes

Habiendo constatado que la molécula m3 se encuentra ligada a la especie ribosomal 24S y sabiendo que la especie mayor ribosomal se disocia en los fragmentos α y β , se plantea la interrogante ¿la molécula ó especie ribosomal m3 se encuentra asociada al fragmento α ó al β ?

Para solucionar esta pregunta se procedió a -- analizar una muestra del precipitado de 100000 X g en geles no desnaturalizantes y posteriormente reanalizar estas bandas mediante geles analíticos desnaturalizantes.

El hecho de seguir esta metodología se debe a que en los geles no desnaturalizantes se dan las condiciones para mantener unidos aquellos fragmentos asociados de forma no covalente, no obstante se sacrifica la resolución por lo que deben recromatografiarse las moléculas en geles de poliacrilamida para obtener mejor resolución.

De tal modo se procedió a correr muestras de -

RNAr en geles de agarosa al 1.5% (fig.5).

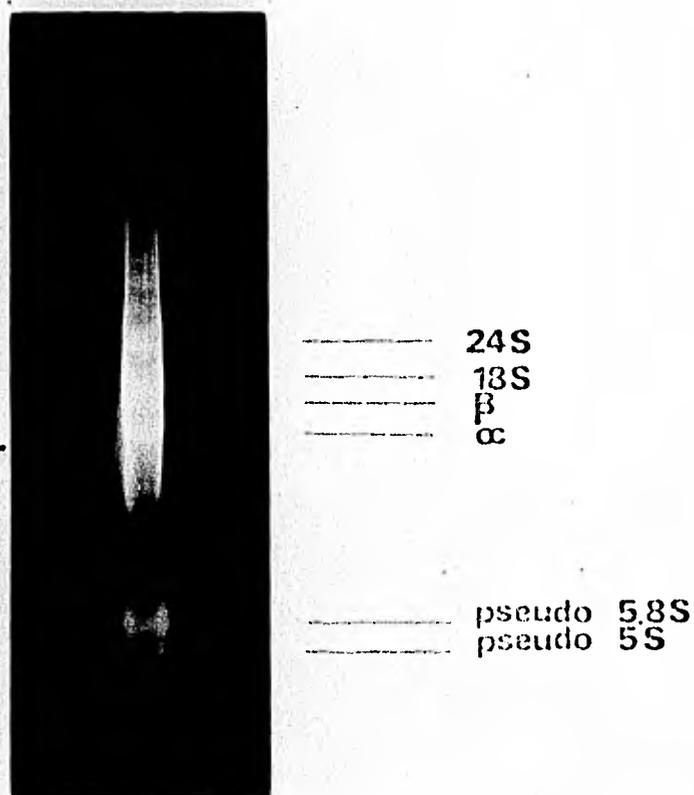


Fig. 5.- Electroforesis en geles preparativos de agarosa al 1.5% de RNAr de T. cruzi. Los geles fueron en placa - con una longitud de 20 cm. y con espaciadores de 3 mm.

En estos geles se ven primordialmente dos grupos de bandas, uno de poca movilidad y otro de gran movilidad; en el caso del primero éstas corresponden a la especie 24S completa, a la especie 18S y otras dos correspondientes a los fragmentos de la mayor; por lo que res-

pecta al segundo, se ven dos bandas que por ser de RNA - asociado a ribosomas se le "podría" considerar como las especies 5.8S y 5S de Trypanosoma.

Este conjunto de bandas se recortaron y se -- transfirieron a un gel analítico y desnaturizante de poliacrilamida en el cual se incluyó un carril con muestra del precipitado de 100000 X g como índice de correlación (figs. 6 y 7).

En estos geles se observa que en el carril donde se transfirió la banda que podría considerarse 5S, se da una mejor resolución y se definen las bandas correspondientes a las moléculas m4 y m5. Por lo que corresponde al carril donde se colocó lo que podría ser la especie 5.8S, se resuelven las moléculas m1 y m2, como era de esperarse falta la banda m3.

Pasando al carril donde se colocó el fragmento o, no se observa más que la banda correspondiente a ésta. Por último, los carriles donde se transfirieron las bandas b, 18S y 24S se aprecia a la especie 18S contaminada con los fragmentos α y β , y a la 24S contaminada con la 18S, observandose en estos carriles una banda no muy -- bien definida en la región correspondiente a la molécula

m3, por lo que se deduce que la molécula m3 está asociada al fragmento β de la especie 24S.

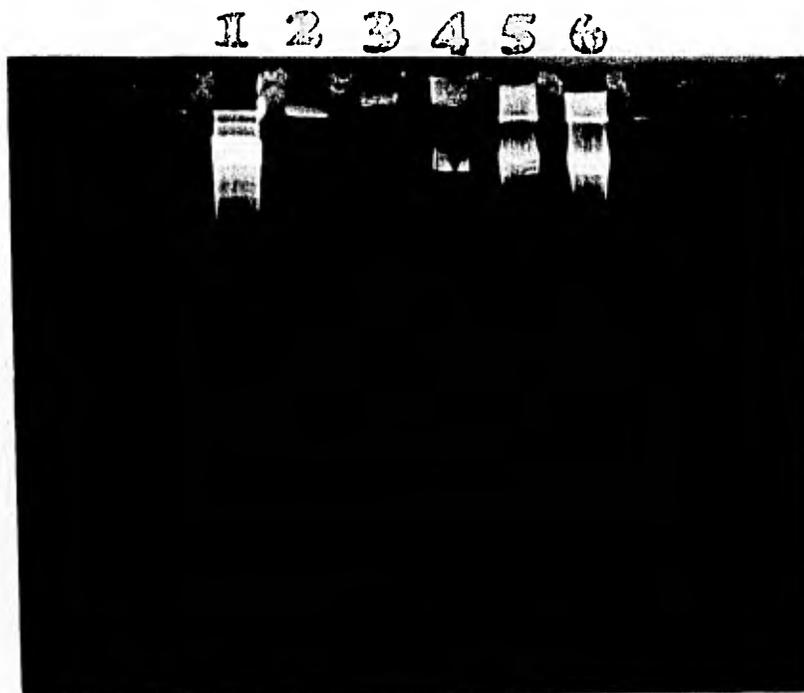


Fig. 6.- Electroforesis en geles analíticos de poliacrilamida de las bandas extraídas de los geles no desnaturantes de agarosa. Las muestras fueron en el carril 1: EMAr total de *T. cruzi*; carril 2: pseudo 5S; carril 3: pseudo 5,8S; carril 4: fragmento α ; carril 5: especie 18S y fragmento β ; y carril 6: especie 24S.

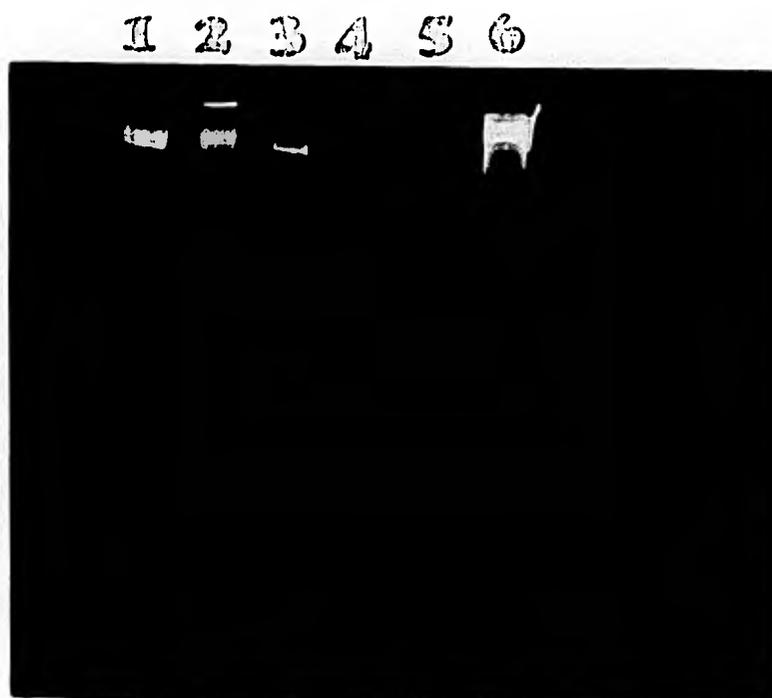


Fig. 7.- Electroforesis en geles de poliacrilamida de las bandas extraídas de geles de agarosa. Las muestras aplicadas fueron en el 1: la especie 249; en el 2: la especie 183 y fragmento P; en el 3: el fragmento α ; en el 4: muestra blanco; en el 5: 28As de gran movilidad y en el 6: precipitado de 100000 X e de I. cruzi.

DISCUSION

Castro y colaboradores (4) han mostrado que el RNAr citoplásmico de Trypanosoma cruzi consta de dos componentes de alto peso molecular, que son las especies ribosomales 24S y 18S, las que tienen un peso molecular de 1.3×10^6 y 0.8×10^6 respectivamente. También, que la especie mayor se disocia en dos componentes que tienen pesos moleculares de 0.69 y 0.56×10^6 . Los resultados mostrados aquí adicionan cinco moléculas de RNA asociadas permanentemente al ribosoma y una más que podría estar asociada transitoriamente a este, o sea el posible RNA de transferencia.

El hecho de que éste organismo presente cinco moléculas de RNAr de bajo peso molecular en lugar del par de moléculas característico de la gran mayoría de organismos eucariotes, lleva a pensar que estas se deban a productos de degradación de las especies mayores del RNAr. Esto es bastante improbable ya que de haber existido degradación, ésta se hubiese manifestado al variar la abundancia relativa de las moléculas así como por patrones electroforéticos diferentes, los cuales se han reportado en otros sistemas (7 y 14), pero que en este caso no se presentan.

DISCUSION

Castro y colaboradores (4) han mostrado que el RNAr citoplásmico de Trypanosoma cruzi consta de dos componentes de alto peso molecular, que son las especies ribosomales 24S y 18S, las que tienen un peso molecular de 1.3×10^6 y 0.8×10^6 respectivamente. También, que la especie mayor se disocia en dos componentes que tienen pesos moleculares de 0.69 y 0.56×10^6 . Los resultados mostrados aquí adicionan cinco moléculas de RNA asociadas permanentemente al ribosoma y una más que podría estar asociada transitoriamente a este, o sea el posible RNA de transferencia.

El hecho de que éste organismo presente cinco moléculas de RNAr de bajo peso molecular en lugar del par de moléculas característico de la gran mayoría de organismos eucariotes, lleva a pensar que estas se deban a productos de degradación de las especies mayores del RNAr. Esto es bastante improbable ya que de haber existido degradación, ésta se hubiese manifestado al variar la abundancia relativa de las moléculas así como por patrones electroforéticos diferentes, los cuales se han reportado en otros sistemas (7 y 14), pero que en este caso no se presentan.

Los resultados obtenidos por mí son acordes al patrón electroforético de estas moléculas con el mostrado por Simpson y Simpson en Leishmania tarentolae y su tamaño es muy parecido con el reportado para T. brucei y C. fasciculata.

No. de bases en:

Molécula	<u>T. brucei</u>	<u>C. fasciculata</u>	<u>T. cruzi</u>
m1	215	239	265
m2	190	193	219
m3	180	176	190
m4	125	134	142
m5	115	120	111

En el caso de las moléculas m4 y m5 se podría discutir que estas moléculas se presentan por una migración diferente en el gel, debido a cambios conformacionales que adquiere una sola molécula (12,24), sin embargo estas suposiciones se descartan por completo, pues se han mapeado estas moléculas y el patrón restrictivo que muestran indica que se trata de moléculas diferentes (datos aún no publicados).

De estas moléculas de bajo peso molecular, se

pregunta uno, ¿cuál de ellas es la homóloga a la molécula 5S de la mayoría de los organismos eucariotes?

Una de las formas en que se puede distinguir a la molécula 5S es tratar al ribosoma con EDTA ó con altas concentraciones de iones monovalentes, lo cual provoca la liberación de ésta; en T. brucei al tratar al ribosoma con EDTA, se libera la molécula que en mi sistema considero la m2, de tal modo que operacionalmente es la m2 la que se comporta como la molécula 5S. Otro aspecto que nos puede ayudar para determinar a la molécula 5S, es su tamaño, y si tomamos en cuenta este parametro, se puede ponderar que la molécula en cuestión es la m5, -- pues Gray ha demostrado que la correspondiente a esta molécula en C. fasciculata comigra con el RNAR 5S de trigo, además de que por secuencia (17), su homología es muy -- grande con la de otros protozoarios (6).

Ya que la abundancia relativa de los RNAs menores entre sí y con las especies ribosomales 18S y 24S es cualitativamente similar (fig.4), es muy probable que éstas moléculas esten asociadas exclusivamente con los ribosomas en cantidades equimolares.

Por lo que se refiere al problema de determi--

nar con cual de los fragmentos α o β se encuentra asociada m_3 , se tuvieron que sobrecargar los geles de agarosa para poder visualizar las moléculas menores en el gel desnaturalizante de poliacrilamida (figs. 4, 5 y 6). Bajo estas circunstancias se perdió la resolución entre el fragmento β y la especie 18S, por tal motivo, estas se transfirieron al gel de poliacrilamida en un solo carril, por tanto, a pesar de que la molécula m_3 aparece en el carril donde se haya la especie 18S, se deduce que tal molécula esta asociada al fragmento β , pues en el α (que no esta contaminado) no se observa tal molécula, además de que al analizar a la especie 18S obtenida del gradiente de sacarosa, no se detecta a la molécula m_3 .

Los resultados obtenidos mediante los gradientes de sacarosa, sugieren fuertemente que la especie ribosomal 24S es un agregado molecular formado por tres moléculas de RNA, dos de las cuales son los fragmentos α y β , y la tercera es la molécula m_3 . Las tres moléculas de RNA parecen estar asociadas debilmente por regiones limitadas de uniones no covalentes, posiblemente enlaces de puentes de hidrógeno (3,5,7,23 y 27).

Con estos datos a la molécula m_3 se le puede -

considerar homóloga con la especie ribosomal 5.8S, además de que por datos aún no publicados se ha encontrado que esta molécula está codificada dentro del gen ribosomal, tal como sucede con la especie 5.8S (16).

En el caso de las moléculas m1, m2, m4 y m5, - las cuales en preparaciones libres de proteínas ribosomales no presentan asociación alguna a especie ribosomal - (gráfica 2 - fig. 4), y que a partir de la desproteína- ción del precipitado de 100000 X g ya se encuentran li- bres, es de suponerse que si estas moléculas interactúan con otro ácido ribonucleico del ribosoma, tal interac- ción debe ser de una estabilidad baja, la cual puede es- tar mediada o estabilizada por proteínas ribosomales (20).

De las cinco moléculas de bajo peso molecular presentes en los ribosomas de T. cruzi surge la pregunta ¿cómo se originan estas moléculas? ¿resultan de la ex- presión de genes nuevos? ó ¿constituyen productos nuevos de procesamiento?

Hemos mapeado restrictivamente las moléculas - menores del RNAr, y encontramos que las moléculas m1, m2 y m3 se encuentran codificadas dentro del gen ribosomal, mientras que las moléculas m4 y m5 son codificadas sepa-

radamente y fuera de dicho gen; lo que indica que m4 y m5 son el producto de la expresión de genes independientes, siendo uno de estos un gen nuevo; en el caso de m1, m2 y m3 es posible que surjan del procesamiento del gen ribosomal.

Concluyendo, se ha mostrado que los ribosomas de T. cruzi contienen cinco moléculas de RNA de bajo peso molecular, y que de ellas, la molécula m3 se encuentra asociada al fragmento β de la especie ribosomal 24S, comportandose como la especie ribosomal 5.8S de los organismos eucariotes.

De estos datos se desprenden las preguntas:

¿El hecho de que los organismos pertenecientes a la familia Trypanosomatidae sean tan diferentes, indicará que estos siguieron una línea evolutiva diferente a las ya establecidas?

¿Si los RNAs ribosomales pequeños juegan un papel importante en la síntesis proteica, el hecho de que los tripanosomatidios tengan 5 de estos, podría sugerir que el mecanismo de la síntesis de proteínas en éstos sea diferente?

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Azad, A. A. and Lane, B. G. (1973) A possible role for 5S rRNA as a bridge between ribosomal subunits. *Can. J. Biochem.* 51: 1669-1672.
- 2.- Brener, Z. (1973) Biology of Trypanosoma cruzi. *Ann. Rev. Microbiol.* 347-382.
- 3.- Castro, H. C. Tesis profesional: Características de aislamiento y posible rompimiento oculto de la subunidad mayor de ARN ribosomal de epimastigotes de -- Trypanosoma cruzi. C.C.H. e I.I.B.M. de la U.N.A.M. 1980.
- 4.- Castro, C., Hernández, R. and Castañeda, M. (1981) Trypanosoma cruzi ribosomal RNA: internal break in the large molecular-mass species and number of genes. *Mol. Biochem. Parasitol.* 2: 219-233.
- 5.- Cordingley, J. S. and Turner, M. R. (1980) 6.5 RNA; preliminary characterisation of unusual small RNAs in Trypanosoma brucei. *Mol. Biochem. Parasitol.* 1 (2).
- 6.- Delihás, N., Andersen, J., Andresini, W., Kaufman, L. and Lyman, H. (1981) The 5S ribosomal RNA of -- Euglena gracilis cytoplasmic ribosomes is closely homologous to the 5S RNA of the trypanosomatid protozoa.

- Nucleic Acids Res. 9 (23): 6627-6633.
- 7.- Eckert, W. A., Kaffenberger, W., Krohne, G. and Franke, W. W. (1978) Introduction of hidden breaks during rRNA maturation and ageing in Tetrahymena pyriformis Eur. J. Biochem. 87: 607-616.
 - 8.- Enfermedad de Chagas en México, Centro de Investigaciones Ecológicas del Sureste, # 1 serie Documentos, San Cristobal Las Casas, Chis., México, 1978.
 - 9.- Erdmann, V. A. (1978) Collection of published 5S - and 5.8S ribosomal RNA sequences. Nucleic Acids -- Res. 5 (1): r1-r13.
 - 10.- Erdmann, V. A. (1981) Collection of published 5S - and 5.8S RNA sequences and their precursors. Nu-- cleic. Acids Res. 9 (1): r25-r42.
 - 11.- Gray, M. W. (1979) The ribosomal RNA of the trypanosomatid protozoa Crithidia fasciculata: physical characteristics and methylated sequences. Can. J. Biochem 57: 914-926.
 - 12.- Hindley, J. (1967) Fractionation of ³²P labelled - ribonucleic acids on polyacrylamide gels and their characterization by fingerprinting. J. Mol. Biol. - 30: 125-136.
 - 13.- Hudson, L. (1981) Immunobiology of Trypanosoma -- cruzi infection and Chagas's disease. Trans. Royal Soc. Trop. Med. and Hygiene 75 (4): 493-498.

- 14.- Ishikawa, H. (1975) Polynucleotide fragments from the 28S ribosomal RNA of insects. *Nucleic Acids Res.* 2: 87-100.
- 15.- Lehrach, H., Diamond, D., Wozney, J. M. and Boedtker, H. (1977) RNA molecular weight determinations by gel electrophoresis under denaturing conditions, a critical reexamination. *Biochemistry* 16: 4723-4751.
- 16.- Long, E. O. and Dawid, I. B. (1980) Repeated genes in eukaryotes. *Ann. Rev. Biochem.* 49: 727-764.
- 17.- MacKay, R. M., Gray, M. W. and Doolittle, W. F. -- (1980) Nucleotide sequence of Crithidia fasciculata cytosol 5S ribosomal ribonucleic acid. *Nucleic Acids Res.* 8 (21): 4911-4918.
- 18.- McGhee, B. and Cosgrove, W. B. (1980) Biology and physiology of the lower trypanosomatidae. *Microbiol. Rev.* 44 (1): 140-173.
- 19.- Nishikawa, K. and Takemura, S. (1974) Nucleotide - sequence of the 5S RNA from Torulopsis utilis. -- *FEBS lett.* 40: 106-109.
- 20.- Oakden, K. M., Azad, A. A. and Lane, B. C. (1977) Wheat embryo ribonucleates, VII. Rapid, efficient and selective formation of 5S-18S and 5.8S-26S hybrids in an aqueous solution of the four ribosomal polynucleotides, and the results of a search for -

the corresponding hybrids in wheat embryo ribosomes. *Can. J. Biochem.* 55: 99-108.

- 21.- Ogata, K., Terrao, K. and Uchiumi, T. (1980) Stimulation by aminoacyl-tRNA of the GTPase and ATPase activities of rat liver 5S RNA protein particles - in presence of EF-2. *J. Biochem.* 87: 517-524.
- 22.- Peacock, A. C. and Dingman, C. W. (1967) Resolution of multiple ribonucleic acid species by polyacrylamide gel electrophoresis. *Biochemistry* 6: -- 1818-1827.
- 23.- Pene, J. J., Knight, E. and Darnell, J. E. (1968) Characterization of a new low molecular weight RNA in HeLa cell ribosomes. *J. Mol. Biol.* 33: 609-623.
- 24.- Phillips, G. R. and Timko, J. L. (1972) Simple -- method for the characterization of 5S RNA. *Anal. Biochem.* 45: 319-325.
- 25.- Picard-Bennoun, M. and Begueret, J. (1981) Genetic analysis of cytoplasmic ribosomes in fungi. *Trends in Biochemical Sciences* 6 (10): 272-274.
- 26.- Simpson, L. and Simpson, A. M. (1978) Kinetoplast RNA of *Leishmania tarentolae*. *Cell* 14: 169-178.
- 27.- Stevens, A. R. and Pachler, P. F. (1972) Discontinuity of 26S rRNA in *Acanthamoeba castellanii*. *J. Mol. Biol.* 66: 225-237.

- 28.- Stewart, P. B. and Lethan, D. S. (1977) The ribonucleic acids. 2nd. ed. Springer-Verlag, New York -- Inc.
- 29.- Touts, I., Metspalu, A., VILLEMS, R. and Saarma, M. (1981) Location of single-stranded and double-stranded regions in rat liver ribosomal 5S RNA and 5.8S RNA. Nucleic Acid Res. 9 (20): 5331-5343.
- 30.- Trypanosomiasis and Leishmaniasis, Ciba Foundation Symposium 20, Associated Scientific Publishers, P. O. Box 211, Amsterdam, 1974.
- 31.- Ulbrich, N. and Wool, I. G. (1978) Identification by affinity chromatography of the eukaryotic ribosomal proteins that bind to 5S ribosomal ribonucleic acid. J. Biol. Chem. 253: 9049-9052.
- 32.- VILLEMS, R., Saarma, M., Metspalu, A. and Touts, I. (1979) New aspects of the eukaryotic ribosomal interaction. FEBS Lett. 107 (1): 66-68.
- 33.- Wool, I. C. (1979) The structure and function of eukaryotic ribosomes. Ann. Rev. Biochem. 48: 719-754.