

11261

lej
11/2

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

Unidad Académica de los Ciclos Profesionales y de Postgrado del
Colegio de Ciencias y Humanidades
Instituto de Investigaciones Biomédicas



**ANALISIS POR ENDONUCLEASAS DE RESTRICCIÓN
DE LOS GENES DE RNA RIBOSOMAL DE
TRYPANOSOMA CRUZI**

tesis

FAILA DE ORIGEN

Que para obtener el grado de:
Maestría en Investigación Biomédica Básica
Presenta

Roberto José Rafael Hernández Fernández

México, D. F.

1982



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.

C O N T E N I D O

	Página
Introducción	1
Materiales y Métodos	21
Resultados	28
Discusión	51
Referencias	64

I N T R O D U C C I O N

ANTECEDENTES GENERALES

Trypanosoma cruzi, sistema biológico de nuestro interés, es un protozooario hemoflagelado que parasita al hombre. El padecimiento que origina es la enfermedad de Chagas o Tripanosomiasis americana. Este padecimiento constituye en Centro y Sudamérica un serio problema de Salud Pública (1). La situación en México no ha sido lo suficientemente estudiada para comprender la magnitud del problema (2), pero cabe enfatizar que por lo menos en 15 Estados de la República se han localizado los insecto-triatomíneos vectores infectados.

El parásito completa, tanto en el hombre como en el insecto vector, un ciclo de vida complejo que incluye división celular y diferenciación a estadios infectivos morfológicamente identificables. El tripomastigote que es la forma sanguínea del parásito, identificable por la emergencia del flagelo en posición anterior al núcleo, es el único estadio competente en la infección (1). Esta célula no se divide, y en este sentido es terminal, a menos que siga uno de los siguientes caminos:

a) La infección de alguna célula del hospedero mamífero, dentro de la cual adopta las formas replicativas y secuenciales de amastigote y epimastigote. Estos estadios son morfológicamente identificables por tener la emergencia del flagelo en posición posterior al núcleo de la célula. El ciclo en esta línea se cierra con la diferenciación intracelular de epimastigote a tripomastigote, lisis de la célula y liberación al torrente sanguíneo de nuevas formas infectantes.

b) La transferencia al triatoma hematófago por medio de la picadura de hospederos infectados. El parásito, en la luz intestinal del vector, se multiplica y presenta una serie de transformaciones que producen un nuevo tripomastigote. Las formas infectivas así generadas se denominan tripomastigotes metacíclicos por completar, en el vector, un ciclo posterior al del hospedero mamífero.

La transmisión del padecimiento se realiza cuando a consecuencia de una nueva ingestión sanguínea, el vector infectado defeca in situ tripomastigotes metacíclicos. Si por alguna razón extraparasitaria, estas formas alcanzan conjuntivas, mucosas, o el torrente sanguíneo, los ciclos de infección - lisis celular se llevarán a cabo, y la parasitosis se establece.

La fisiopatología del padecimiento reside en el tipo de tejido destruido. En este sentido mencionaré que existe un tropismo positivo del parásito hacia diferentes tejidos musculares: músculo esquelético, músculo liso de tubo digestivo y músculo cardiaco. Cuando la lisis celular alcanza tejido de conducción se presenta pérdida de la tonicidad y de la relajación del órgano afectado (mega esófago, mega cardias y mega colon) originando así trastornos digestivos y arritmias cardíacas respectivamente.

La respuesta inmune del hospedero, solo es capaz de controlar la infección aguda ya que los anticuerpos, aglutinantes y protectivos contra algunas cepas (3), son eficazmente evadidos cuando el protozoo alcanza la fase intracelular.

Por otro lado, es interesante que a pesar de que el parásito es morfológicamente similar, las características del padecimiento en lo que se refiere a la intensidad y tipo de tejido afectado, varía dependiendo de la localización geográfica donde es aislado (4,5). Así se tiene que mientras en Brazil las parasitosis se presentan con problemas digestivos y cardíacos, en Venezuela predominan los cuadros clínicos con alteraciones cardíacas (5). Estas manifestaciones diferentes de la enfermedad

de Chagas pueden corresponder a diferencias en los enfermos y/o a diferencias en el parásito. Considerando la primera posibilidad, diferencias entre los pacientes, cabe mencionar que cepas diversas de ratones son diferencialmente sensibles al tripanosomatídeo Leshmania donovani, y que esta sensibilidad está determinada genéticamente (6). En lo referente a la posibilidad de diferencias entre los parásitos, mencionaré que a través de analizar el patrón electroforético de algunas isoenzimas de T. cruzi, fue posible su clasificación en grupos o zimodemas. Consideramos interesante que dichos grupos se encuentren diferencialmente distribuidos en Venezuela y en Brazil (5).

Debido a que en el programa morfogénico de desarrollo el parásito adquiere, en un estadio particular, la capacidad de infectar, y que el fenotipo diverso de patogenicidad pudiera residir en la expresión de secuencias nucleotídicas distintas, consideramos no solo interesante sino necesario el estudio de genes nucleares en T. cruzi.

A diferencia de los tripanosomas africanos, donde se han estudiado extensamente la organización y la expresión de los genes que codifican para los antígenos variables de super-

ficie (7), el Tripanosoma cruzi no ha sido estudiado molecularmente en ninguno de sus genes nucleares. Por las razones que se mencionan a continuación se escogió al sistema DNA ribosomal - RNA ribosomal como el prototipo inicial de estudio de genes nucleares en T. cruzi.

1. La abundancia del transcrito y la repetividad génica encontrada en diversas especies (8,9) lo convierten en un sistema de fácil acceso.

2. Dado que se trata de un gen esencial, con su expresión asociada a crecimiento celular (10), su estudio experimental presenta además el interés funcional de regulación. Debido a que en el ciclo de vida de T. cruzi se incluyen estadios reproductivos y no reproductivos, consideramos que la síntesis de ribosomas puede estar regulada en el programa morfogénico de desarrollo.

3. Considerando que se trata de un sistema conservado en la evolución biológica (8), similitudes y diferencias en la organización y secuencias de sus elementos podrán ser utilizados como criterios taxonómicos para la clasificación de T. cruzi.

OBJETIVO

El objetivo de esta tesis es analizar el arreglo de las secuencias de DNA que codifican para el RNA ribosomal en T. cruzi. Como el epimastigote es la forma cultivable del parásito, a este estadio se referirán los datos encontrados.

ANTECEDENTES PARTICULARES

Antes de señalar el trabajo realizado en este estudio, comentaré en los siguientes párrafos las características más sobresalientes de los genes ribosomales en varios organismos; en forma tal de presentar una visión general del conocimiento actual sobre este sistema.

Los ribosomas de eucariotes contienen especies moleculares de RNA de gran (especies mayores) y pequeña (especies menores) masa molecular: 18S y 26- 28S, y 5.8S y 5S, respectivamente. Las tres primeras especies (18, 28 y 5.8S) son codificadas dentro de una unidad de transcripción común, y la última (5S), por lo general, se sintetiza en genes repetidos independientes (69). Así pues, ha sido aceptado el denominar a los RNA tipos 18S, 28S y 5.8S como RNA ribosomal (RNAr) y al tipo 5S como RNA 5S.

El RNAr es sintetizado por la enzima RNA polimerasa I (11) como un precursor que después es procesado, en varios pasos (evento nuclear), para dar así las moléculas maduras 18S, 28S y 5.8S (12).

Como había sido comentado el gen ribosomal es un gen re-

petido en todas las células hasta ahora estudiadas (8). Así se tiene que en Echerichia coli se encuentran 7 copias (13) mientras que en eucariotes varía aproximadamente de 50 a 500 copias por genoma haploide. Al comparar la multiplicidad de los cistrones ribosomales con el tamaño del genoma en distintos organismos, es interesante que, de manera general, en la evolución filogénica estos dos parámetros hayan aumentado en forma paralela (8).

En los cromosomas de eucariotes superiores los genes ribosomales se localizan agrupados en los sitios organizadores del nucleolo (visualizados como regiones densas de núcleos en interfase o constricciones secundarias de los cromosomas en metafase). Dichas agrupaciones presentan una organización peculiar en la que las unidades repetidas de transcripción, se encuentran alternadas con secuencias espaciadoras no transcritas. Este arreglo particular fue descrito inicialmente por Miller y Beatty (14) mediante la observación al microscopio electrónico de cromatina nucleolar extendida de ovocitos de Xenopus laevis.

El tamaño de la unidad de transcripción del RNAr precursor tiene, en la mayoría de los eucariotes, un tamaño aproximado de 8 kilobases (Kb). En este grupo se incluye a levaduras

(15), insectos (16), y sapos (17). Sin embargo, se ha reportado un tamaño de 10.5 Kb en aves (18) y de 13 Kb en los mamíferos (19).

La transcripción del gen ribosomal siempre se realiza en el siguiente sentido (5' + 3'): extremo no conservado - RNA 18S - espaciador interno - RNA 28S (20- 22). Dicha polaridad es universal, e incluye tanto a bacterias (23) como a la mayoría de los genes ribosomales de mitocondrias (24).

En la gran mayoría de organismos, los genes ribosomales se encuentran integrados en los cromosomas. Sin embargo en algunos eucariotes sencillos dichos genes se encuentran como moléculas libres extracromosomales. Ejemplos de ambas situaciones se comentarán por separado.

Genes Cromosomales

La relación que guardan entre sí las unidades de transcripción en los cromosomas de eucariotes consiste, en la generalidad de los casos, en una repetición en tandem: "cabezas con colas y colas con cabezas". Acetabularia exigua presenta un arreglo cromosomal excepcional, donde las unidades se repiten

en forma palindrómica: cabezas con cabezas y colas con colas (25).

En los genes ribosomales se distinguen dos tipos de secuencias espaciadoras. Las ya mencionadas no transcritas que alternan repetidamente con las unidades de transcripción, y las transcritas que separan las regiones codificadoras del RNA 18S, 5.8S y 28S. Estas últimas están contenidas en el precursor primario de RNA, pero al ser separadas con el procesamiento del transcrito, se hacen evidentes al ubicar físicamente las moléculas de RNAr maduras sobre la unidad fundamental de transcripción.

En la Figura 1 se muestran los arreglos físicos de los genes ribosomales en X. laevis y Drosophila melanogaster, que constituyen a este respecto, los sistemas mejor estudiados. En ambos casos, la molécula ribosomal 5.8S se localiza en el espaciador transcrito entre las regiones codificadoras de las especies mayores 18S y 28S.

Unidades génicas del tipo similar a X. laevis se han reportado en varios Phyla: Leshmania donovani (26); erizos de mar (27); los insectos Chironomus tentans (28) y Bombyx mori (29); pollo (30); ratón (31, 32) ganado vacuno (33) y humano (34).

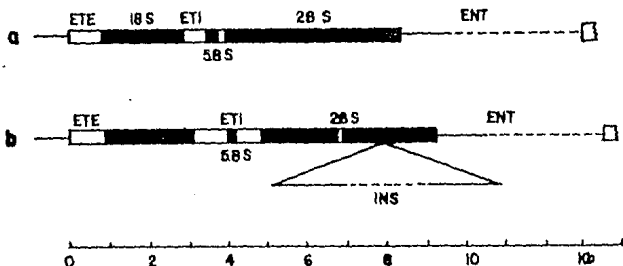


Figura 1. Mapas de las unidades génicas de repetición ribosomal de: a) *X. laevis* y b) *D. melanogaster*. Las regiones codificadoras se esquematizan como barras llenas, y los espaciadores transcritos, externos (ETE) e internos (ETI), como barras vacías. En b) se señala el punto donde algunas de las regiones codificadoras, de la especie 28S, son interrumpidas (INS). Debido a que las inserciones son de tamaño variable se representan con una porción de línea discontinua. Los espaciadores no transcritos (ENT) están representados también como líneas discontinuas. Tomado de Long, E.D. y Dawid, I.B. (68).

Como ya fue mencionado anteriormente el tamaño de las unidades de transcripción entre organismos es variable. La longitud y heterogeneidad de los espaciadores no transcritos es causa de una variabilidad aún mayor. En este sentido resalta el gran tamaño de las unidades de repetición (aprox. 40 Kb) - presentes en ratón y humano.

Por otro lado, al analizar la organización del gen ribosomal en D. melanogaster (Fig. 1 b), resalta como elemento novedoso la presencia de una secuencia intermedia en la región codificadora del RNA 28S presente en más de la mitad de las unidades de repetición (35, 36). Dichas secuencias, llamadas también intrones, constituyen un conjunto de secuencias con distinta longitud (0.5 - 6 Kb) (35); y han sido clasificadas en dos grupos:

Inserción tipo I: presenta en su mayoría una longitud de 0.5, 1, ó 5 Kb. Comparten regiones de homología y se localizan exclusivamente en el organizador del nucleolo del cromosoma X.

Inserción tipo II: difiere en secuencia a la inserción tipo I; es de tamaño variable (1-6 Kb) y se localiza tanto en el cromosoma X como en el cromosoma Y.

Esta distribución sugiere que en la evolución del DNA ribosomal (DNAr) de D. melanogaster se haya permitido el intercambio de genes entre cromosomas, con la restricción del movimiento o inestabilidad de la inserción tipo I al cromosoma Y. Por otro lado es interesante el hecho que secuencias homólogas a la inserción tipo I se encuentran a su vez representadas en múltiples copias fuera del organizador del nucleolo (37).

Entre los metazoarios, solamente en los insectos dípteros se han descrito dichas secuencias interruptoras en el DNAr. Así, se tiene que probablemente en todas las especies de Drosophila (38), Calliphora (39) y Sciara (40) tengan una parte de sus genes ribosomales interrumpidos y otra continuos. Sin embargo, y en contraste, en el díptero Chironomus tentans (28) no se encontraron secuencias interruptoras.

En levaduras las unidades repetidas en el cromosoma contienen además del RNA 18S, 5.8S y 28S, la región codificadora para el RNA 5S (41). Sin embargo, en este caso la transcripción del RNA 5S se lleva a cabo en la otra cadena de DNA. En este sentido representa una unidad separada de transcripción (42).

Genes Extracromosomales

El ejemplo de genes ribosomales extracromosomales, quizá mas antiguo, está dado por los huevos de anfibios. Estas células multiplican selectivamente su DNA ribosomal (43). El mecanismo mas aceptado para generar las nuevas copias extracromosomales involucra la utilización de un templado de DNA ribosomal del cromosoma (44), así como la participación de estructuras de replicación del tipo círculo rodante (45). Quisiera enfatizar - que este fenómeno se presenta en un estadio particular en la génesis del huevo (46), y las copias adicionales resultantes, se diluyen ó degradan despues de la fertilización en las divisiones celulares del embrión (43).

Entre los eucariotes sencillos, se han descrito varios casos de extracromosomalidad de genes ribosomales:

El micronúcleo (núcleo genético) de Tetrahymena contiene solo una copia integrada del gen ribosomal (47), mientras que el macronúcleo (núcleo metabólico) contiene varias copias de DNA extracromosomal y está organizado como moléculas palindrómicas (48) que contienen dos unidades de transcripción (Fig. 2). La transcripción de estos genes se realiza a partir de un punto cen

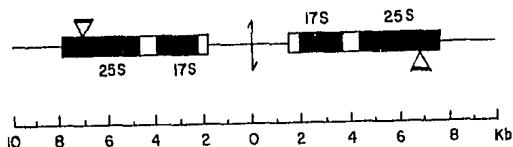


Figura 2. Mapa del DNA ribosomal extracromosomal de *Tetrahymena*. se trata de una molécula palindrómica, y su centro de simetría se esquematiza en la Figura. En las dos unidades de transcripción, el RNA precursor se sintetiza con la polaridad 5'→3' de adentro hacia afuera y en cadenas opuestas. Se señala también el sitio de inserción descrito para algunas especies. La presencia de barras vacías y llenas señala los espaciadores transcritos y las regiones codificadoras respectivamente. Tomada de Long, E.D. y Dawid, I.B. (68).

tral en el palíndrome y avanza hacia los extremos en la ya mencionada polaridad 5'→3' para cada una de las cadenas de DNA. En algunas de las cepas de Tetrahymena se han reportado la presencia de secuencias interruptoras (Fig. 2) (49-51). Estas secuencias son transcritas como parte del RNAr precursor y subsecuentemente eliminadas por corte y unión.

En Physarum policephalum las moléculas palindrómicas, de aproximadamente 60 Kb de longitud, presentan las regiones -codificadoras en posición cercana a los extremos (52-55). Este DNAr se distingue por la presencia de dos inserciones en la región codificadora de la especie ribosomal 26S (52,55).

El cuarto ejemplo de DNAr extracromosoma está dado por Dictyostelium discoideum (56). También en este caso el palíndromo es muy largo (88 Kb) y presenta las unidades de transcripción hacia los extremos. Otra situación particular es el hecho de que en este palíndrome se encuentre un gen 5S por cada gen ribosomal.

Las unidades de repetición ribosomal en Paramecium tetraurelia son moléculas lineales y circulares extracromosomales, y difieren de lo escrito en los ejemplos anteriores en que

no se encuentran organizados en forma palindrómica. En este caso se trata de unidades repetidas en tandem (57).

Como un caso particular de DNAr extracromosomal mencionaré el caso del ciliado Stylonichia. Este organismo constituye una situación especial puesto que todo el DNA de su macronúcleo se encuentra fragmentado en tamaños relativamente pequeños (~ 10 Kb).

Procesamiento del Precursor

La estructura típica del precursor ribosomal eucariótico contiene un espaciador transcrito localizado en el extremo -5', la secuencia de la especie 18S, un espaciador interno que contiene al RNA 5.8S y por último la secuencia de la especie 28S. Dicho precursor es cortado en sitios específicos durante el procesamiento. De esta forma se generan intermediarios nucleares que finalmente producen las moléculas maduras ensambladas en los ribosomas. El tipo de moléculas de RNA nuclear que hibridan en experimentos tipo Northern con diferentes secuencias ribosomales clonadas sugiere que en mamíferos existen más de un patrón posible de procesamiento (58). Los datos de ratón y de HeLa indican que por lo menos existen 3 (Fig. 3 A, B, C) y 2 (Fig. 3 A, B) vías, respectivamente.

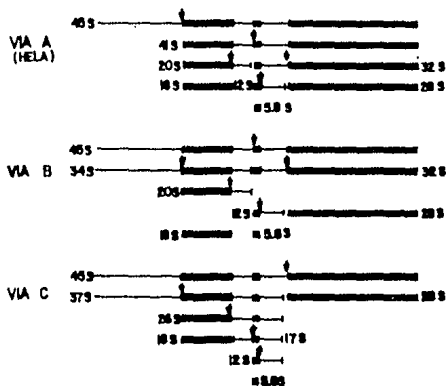


Figura 3. Patrones posibles de procesamiento del RNA ribosomal precursor. Tomado de Bowman, L.H. y col. (58).

ANTECEDENTES EN Trypanosoma cruzi

Clementina Castro y Col. (59), han reportado las características generales de aislamiento de las especies mayores ribosomales en T. cruzi, así como la caracterización parcial de los mismos. Se encontró que la especie molecular mayor, con coeficiente de sedimentación de 24S, contiene una ruptura interna; y que dependiendo de las condiciones desnaturizantes utilizadas en su purificación puede obtenerse intacta o como dos fragmentos, alfa y beta, con tamaños de 3.999, 1.666 y 2.08 Kb, respectivamente. La evidencia experimental indica que dicha ruptura se lleva a cabo in vivo probablemente como un evento tardío en el procesamiento. La especie ribosomal 18S, conservada en la mayoría de eucariotes, tiene un tamaño de 0.8×10^6 daltones, que es similar al de otros protozoarios pero a su vez mayor al resto de eucariotes.

Por otro lado, experimentos más de hibridación cuantitativa a saturación del DNA nuclear total con las moléculas 18S y alfa y beta, indican que el genoma nuclear, cuantificado químicamente, contiene alrededor de 114 copias del gen ribosomal (59).

T R A B A J O R E A L I Z A D O

En esta tesis se describen los siguientes datos obtenidos de epimastigotes de T. cruzi:

1. Los procedimientos de purificación y caracterización parcial de las especies ribosomales de bajo tamaño molecular.

2. Un análisis restrictivo de las regiones codificadoras de las especies mayores 18S, α , β y de las especies menores m_1 , m_2 , m_3 , m_4 y m_5 .

3. El comportamiento en densidad de flotación en CsCl neutro y CsCl actinomicina del DNAr.

M A T E R I A L E S Y M E T O D O S

La cepa utilizada fue aislada en la Cruz, Jalisco por el grupo del Dr. Jorge Tay, Departamento de Ecología Humana, Facultad de Medicina, UNAM. Los cultivos se realizaron en medio de In fusión de Hígado y Triptosa suplementado con suero bovino fetal al 10%; y se mantuvieron en agitación a 28°C (60).

EXTRACCION DEL RNA RIBOSOMAL

Como se describe en (59), los cultivos celulares fueron cosechados en la fase media del crecimiento logarítmico, por cen trifugación a 10 000 g durante 10 min a 4°C (temperatura manteni da a lo largo de toda la purificación). Posteriormente las célu las fueron lavadas en: Tris-HCl 30mM (pH 7.0), KCl 100mM, CaCl₂ 3mM, acetato de magnesio 5mM y heparina 1 mg/ml y guardadas co mo precipitado durante 12 h a -70°C. El paquete celular fue re- suspendido en relación 1g:1ml (peso húmedo) en la misma solución del lavado, pero con heparina 4 mg/ml.

La lisis se llevó a cabo mediante la adición de NP40 al 0.3%. Este material se centrifugó primero a 10 000 g 10 min, - después a 20 000 g 10 min y por último 2 h a 120 000 g . El mate

rial ribosomal recogido del último precipitado, fue desproteínizado con 2 ml de LiCl 2M, urea 4M, Tris-HCl 20mM (pH 7.0) y heparina 4 mg/ml. Después de centrifugar a 20 000 g 20 min, el precipitado se resuspendió en aproximadamente 1 ml de agua tratada con dietil pirocarbonato y fue leído en el espectrofotómetro a 280, 260 y 230 nm.

PURIFICACION DE LAS ESPECIES RIBOSOMALES

Tanto la purificación de las especies mayores (18S, α y β) como la de las menores (m_1 - m_5), se llevó a cabo mediante electroforesis del material ribosomal. El sistema utilizado para las especies mayores fue el de agarosa 1.5% en Tris 10.8 g/l, ácido bórico 5.49 g/l y EDTA 0.93 g/l (TBE). La muestra (aprox. 200 μ g por gel de un solo frente) fue disuelta en TBE/glicerol 20% y calentada a 60°C durante 3 min antes de su aplicación. La corrida en geles de 4 mm de espesor se llevó a cabo durante 20 h a 60 V y 4°C. El segundo sistema, para electroforesis de RNA de bajo peso molecular, fue en geles de acrilamida al 3.5% y bis acrilamida al 0.15% en TBE/urea 7 M. La muestra disuelta en TBE/7 M urea/glicerol 20% fue igualmente calentada antes de su aplicación. Los geles de 1.5 mm de espesor fueron precorridos durante la noche a 20 V. La electroforesis se llevó a cabo a 40 V durante 8 h a temperatura ambiente. El material de ambas electroforesis se visua-

lizó mediante la transiluminación con luz ultravioleta de onda corta de los geles previamente teñidos en bromuro de etidio - 3 µg/ml. Las bandas de interés fueron recortadas y el RNA electroeluido en TBE durante la noche a 4°C.

FOSFORILACION DEL RNA

El RNA fue fosforilado in vitro, de acuerdo al método de Maizels (61), mediante la enzima cinasa del fago T4 que transfiere el fosfato gamma del ATP (en este caso ^{32}P) a los extremos 5' hidroxilos del RNA. Con el objeto de generar extremos - 5'OH, las especies mayores ribosomales fueron parcialmente hidrolizadas en Tris 25 mM (pH 9.5) a 90°C durante 30 min. Las moléculas pequeñas fueron a su vez desfosfatadas mediante la enzima fosfatasa alcalina en Tris-HCl 10 mM (pH 8.0) durante una hora a 37°C y posteriormente extraídas con fenol/cloroformo (1:1). La reacción de fosforilación se llevó a cabo con 0.5 - 1.0 µg de RNA, 10 U de cinasa y 200 µCi $^{32}\text{P}_\gamma\text{ATP}$ (>7 000 Ci/mmol) en 50 µl de Tris-HCl 10 mM (pH 9.5), DTT 10 mM, MgCl_2 10 mM y espermina 10 mM. La reacción fue detenida en acetato de amonio 1 M y el RNA fue recogido en el volumen de exclusión de una columna de Sephadex G-25 (1 x 20 cm) equilibrada y eluida con Tris-HCl 10 mM (pH 7.0), NaCl 100 mM y EDTA 10 mM. La radioactividad específica obtenida por este procedimiento y contada en tolueno en un contador de centelleo líquido fue de 10^6 -

10^7 cpm/ μ g de RNA.

PURIFICACION DEL DNA

Los cultivos fueron cosechados igual que para la purificación de RNA, lavados dos veces con Tris-HCl 20 mM (pH 7.8), KCl 100 mM, CaCl_2 2 mM y MgCl_2 5 mM (solución N) y guardados como precipitado a -70°C . De acuerdo a reportes previos (59, 62), este material fue descongelado a 4°C , para resuspenderlo en solución N a una densidad de 10^9 células/ml. Las células fueron lisadas con NP40 al 1% e inmediatamente centrifugadas a 15 000 g durante 20 min a 4°C . El precipitado fue resuspendido en un mismo volumen de NaCl 150 mM, citrato de sodio 15 mM SSC y EDTA 10 mM. Posteriormente, se adicionó Sarkosyl para obtener una concentración final de 1% y se incubó a 37°C por 15 min. La incubación fue continuada por 2 h más con pronasa de Sigma Chem. (preincubada 1 h a 37°C) a una concentración de 1 mg/ml. Después de adicionar perclorato de sodio a 1 M final, los ácidos nucleicos se extrajeron dos veces con una mezcla de cloroformo/alcohol isoamílico (24:1) y se dializaron contra 100 volúmenes y 3 cambios de SSC. La purificación continuó mediante un tratamiento con ribonucleasa I de Sigma Chem. (precalentada 10 min a 85°C) 100 μ g/ml durante 30 min a 37°C . Finalmente, se extrajo con cloroformo/isoamílico y se dializó exhaustivamente contra SSC 0.1 X.

La preparación de DNA, así obtenida, se leyó en el espectrofotómetro a 230, 280 y 260 nm y fue guardada hasta su uso sobre unas gotas de cloroformo a 4°C.

DIGESTIONES CON ENDONUCLEASAS DE RESTRICCIÓN

Las endonucleasas de restricción Bam HI, Eco RI, Hae II, Hha I, Hind III, Kpa I, Pst I, Sal I, Sma I, Sst I, Xba I y Xho I, de Bethesda Research Laboratories fueron tituladas en las condiciones recomendadas por la casa comercial de origen (63), considerando que una unidad de actividad es aquella cantidad de enzima que digiere totalmente 1 µg de DNA control (en este caso fago λ o Ad₂) a 37°C (en la mayoría de los casos) en una hora. Las digestiones de DNA de T. cruzi se realizaron en un exceso de 5 a 10 veces y la digestión total fue corroborada mediante la inclusión de un sustrato control (λ o Ad₂) a la mezcla de reacción. Las reacciones de digestión, en 20 µl, fueron detenidas con 5 µl de urea 0.6 g/ml y azul de bromofenol al 0.05%.

ELECTROFORESIS DE DNA RESTRINGIDO

El DNA fue fraccionado por electroforesis en placa de agarosa 0.8% en TBE. Los geles de 5 mm de espesor fueron corridos a 450 (Volts horas). Las bandas de DNA fueron visualizadas en bromu

ro de etidio 1 $\mu\text{g/ml}$ 10 min y transiluminadas con una fuente de luz ultravioleta de onda corta. El tamaño de los fragmentos de DNA fue calculado a través de calibrar los geles con los fragmentos restrictivos del DNA de fago λ digerido con las endonucleasas Hind III o Eco RI (63).

TRANSFERENCIA E HIBRIDACION DEL DNA DIGERIDO Y FRACCIONADO

El DNA digerido con endonucleasas restrictivas y fraccionadas con base en las diferencias de tamaño, fue transferido de acuerdo al método descrito por Southern (64) a filtros de nitrocelulosa. Los filtros, secados a temperatura ambiente y horneados con vacío a 65°C por 4 h, fueron hibridados con $1 - 5 \times 10^6$ cpm de RNA [^{32}P] en 10 ml de formamida 50%, EDTA 10 mM, SDS 0.2%, fosfatos de sodio 120 mM (pH 7.0) y SSC 1 X durante 24 h a 37°C . El lavado de los filtros se llevó a cabo en 3-4 ciclos que incluyen: enjuague con SSC 2X e incubación en 50 ml de solución de hibridación a 37°C durante 4 h. La autorradiografía se llevó a cabo sobre una placa de rayos X (X Omatt RP Kodak) en presencia de una pantalla intensificadora durante 5-10 días a -70°C .

GRADIENTES DE DENSIDAD

El DNA total (125 μg por gradiente de 3 ml) fue centrifu

gado en CsCl 3.75 g y SSC 0.1 X, con un índice de refracción - inicial de 1.3998. Y en CsCl 3.40 g, Tris-HCl 10 mM (pH 8.4), EDTA 1 mM y actinomicina 50 µg; con un índice de refracción ini cial de 1.3890. Las soluciones se centrifugaron en el rotor - SW-50.1 Beckman a 150 000 g durante 40 h a 20°C. A continuación inmediata de la centrifugación los gradientes fueron fracciona- dos manualmente en volúmenes de tres gotas. En las fracciones intermedias se determinó índice de refracción por medio de un refractómetro Bauch and Lomb, y la transformación a densidad - por medio $p_{25^{\circ}\text{C}} = (10.8601 \times \text{I.R.}) - 13.4974$ (65). El resto de - las fracciones fueron llevadas a 0.5 ml con SSC 0.1 X y leídas en un espectrofotómetro Zeiss a 260 nm. La identificación del DNA de las fracciones correspondientes con ^3H RNAr, marcado in vivo con 10 µCi/ml de cultivo de uridina ^3H siguiendo meto- dologías comunes ya reportadas (59, 62).

R E S U L T A D O S

Aislamiento y caracterización de RNAR de T. cruzi

Las especies mayores ribosomales, ya caracterizadas por Castro y Col. (59), fueron purificadas en un sistema de electroforesis preparativa en geles de agarosa al 1.5% (Material y Métodos). En la Fig. 4 se muestra uno de los geles preparativos que fueron utilizados para recortar, electroeluir y fosforilar por separado las especies 18S, β y α .

Las especies menores fueron, a su vez, analizadas por electroforesis en geles de poliacrilamida bajo condiciones desnaturizantes (Material y Métodos). Como se muestra en la Fig. 5, de los ribosomas de T. cruzi se obtienen 6 moléculas de bajo peso molecular. Debido a que la molécula menor comigra con el RNA de transferencia de levadura y de ratón, pensamos que también lo sea en T. cruzi. Esta suposición necesita, sin embargo, de trabajo experimental futuro para su comprobación. La existencia de por lo menos 5 moléculas de bajo peso molecular en T. cruzi contrasta con la presencia de solamente dos (5.8S y 5S) en la generalidad de eucariotes. Con el objeto de distinguirlas de las especies mayores (18S, β y α) y de identificarlas entre sí, decidimos llamarlas en orden decreciente de tamaño m_1 , m_2 , m_3 , m_4 y m_5 .

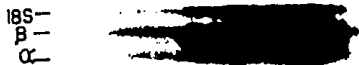


Figura 4. Gel preparativo de agarosa al 1.5%. Perfil en bromuro de etidio de las especies 18S, β y α .

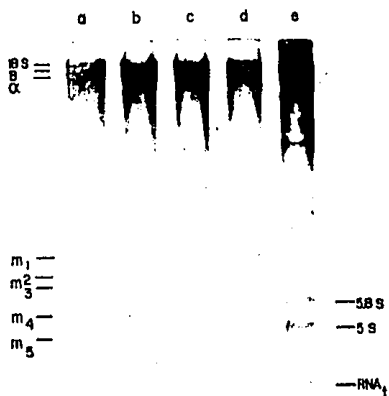


Figura 5. Gel de poliacrilamida desnaturalizante. Patrón en bromuro de etidio del RNAr de *T. cruzi* (a) 30 µg, (b) 20 µg, (c) 10µg, (d) 5 µg, (e) 10 µg de RNAr de ratón.

Tabla I

Especies de RNAr	Longitud de la Cadena (nucleótidos)		
	<u>T. cruzi</u> ^a	<u>T. brucei</u> ^b	<u>C. fasciculata</u> ^c
m ₁	261.4 ± 3.5	215	238
m ₂	217.2 ± 3.0	190	193
m ₃	197.4 ± 2.6	180	176
m ₄	140.6 ± 2.2	125	135
m ₅	109.9 ± 2.4	115	120

^a Los valores representan la media aritmética ± la desviación standard de 5 geles independientes. Las moléculas de RNA tomadas como marcadores fueron; el fragmento α del RNAr de T. cruzi de 1661 nucleótidos (59), y los RNAs de ratón 5.8S de 159 nucleótidos (66) y 5S de 121 nucleótidos (67). La línea que representa el ajuste de mínimos cuadrados fue $L = 2276.7 \cdot 1.386^X$ (coeficiente de correlación $r = 0.9999$).

^b Tomado de Cordingley y Turner (70)

^c Tomado de Gray (72)

El tamaño de estas 5 moléculas pequeñas (Tabla I) fue calculado por medio de la calibración de los geles con las especies 5S y 5.8S de ratón, así como la especie α de T. cruzi (59). Las especies 18S y β no se utilizaron como marcadores debido a que se pierde la linealidad \log tamaño = f(distancia migrada) en esa zona del sistema de electroforesis utilizado. En la Tabla I se muestra también el tamaño de las moléculas equivalentes recientemente reportados para T. brucei (70) y Crithidia fasciculata (72).

La molécula 5.8S de eucariotes se encuentra asociada por puentes de hidrógeno a la especie mayor tipo 28S. Con el objeto de investigar asociaciones análogas en las moléculas ribosomales de T. cruzi, las diferentes especies ribosomales contenidas en la preparación de RNAR total fueron separadas en condiciones no desnaturizantes a través de un gradiente isocinético de sacarosa 5- 20%. El material recogido de las fracciones correspondientes a la región soluble, a la especie 18S y a la 24S, fue analizado en el sistema de acrilamida desnaturizante. Como se muestra en la Fig. 6 las especies m_1 , m_2 , m_4 y m_5 se encuentran en la región soluble del gradiente; lo que indica que su asociación al ribosoma es por lo menos dependiente de la existencia del complejo ribonucleoproteico. La especie m_3 copurifica con la molécula 24S, y se independiza al desnaturizar el material. Es por este comportamiento bioquímico particular, que pensamos que la molécula m_3 constituye la especie análoga o equivalente a la molécula 5.8S de eucariotes.

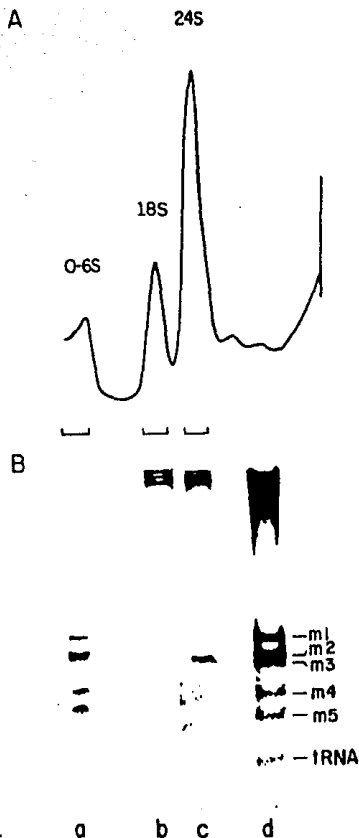


Figura 6. Fraccionamiento del RNAr de *T. cruzi* en gradientes de sacarosa no desnaturalizantes (A) y en geles de poli-acrilamida desnaturalizantes (B). Los corchetes horizontales indican las fracciones del gradiente aplicadas a los geles. (a) RNA 0-6S, (b) RNA 18S, (c) RNA 24S y (d) RNAr total aplicado al gradiente.

Debido a que en algunos gradientes se identificó en proporción pequeña y variable la presencia de m_3 en la región de 18S y recordando que por lo general ésta se encuentra contaminada con los fragmentos α y β (que conforman 24S), pensamos que de preparaciones parcialmente desnaturalizadas que hicieran evidentes α y β podría recuperarse m_3 . Por experimentos de electroforesis en agarosa al 1.5%, donde se resuelven las tres especies mayores, hemos identificado en una segunda dimensión en geles de poliacrilamida desnaturalizante, que la molécula m_3 se asocia al fragmento β (Fig.7)

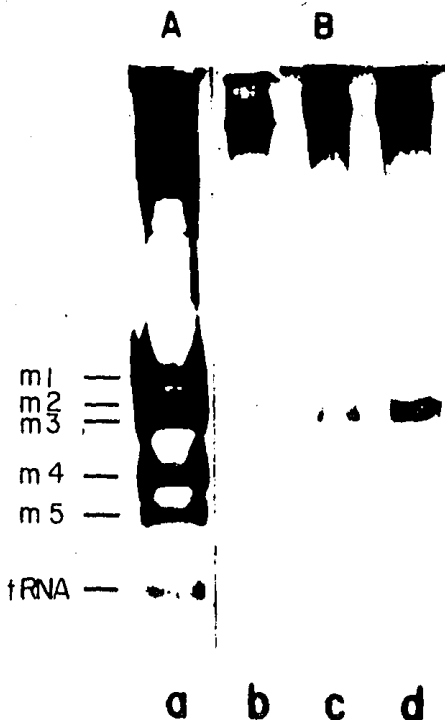


Figura 7. Gel de poliacrilamida desnaturalizante. (A) RNAr total, (B) RNAr previamente fraccionado en geles de agarosa no desnaturalizantes. El RNA presente en las bandas del gel de agarosa fue analizado en el sistema de acrilamida desnaturalizante. (a) RNAr total, (b) RNA de la especie α , (c) RNA de la especie β , (d) RNA de la especie 24S.

DNA Satélites de Densidad

En varios eucariotes el DNAr tiene una densidad, en gradientes de CsCl a equilibrio, mayor a la de la masa principal de DNA (8). Debido a ello ha sido posible su enriquecimiento en una forma sencilla. Con el propósito fundamental de purificar o enriquecer el DNAr de T. cruzi, se fraccionó DNA total en gradientes de CsCl.

La hibridación con RNAr a lo largo del gradiente indica que en estas condiciones de fraccionamiento el DNAr no se separa del pico principal de DNA (Fig. 8).

En un segundo intento por aumentar la diferencia en densidad de regiones de DNA ricas en pares AT vs GC, se adicionó actinomicina-D como intercalante preferencial de GC. El gradiente de CsCl/actinomicina-D, mostrado en la Fig. 9 revela la presencia de satélites crípticos de baja densidad (supuestamente ricos en GC en estas condiciones) no resueltos en gradientes de CsCl neutro. Sin embargo el perfil de hibridación con RNAr indica que el DNAr, si bien asimétricamente distribuido no se separa como un pico independiente de la masa principal de DNA.

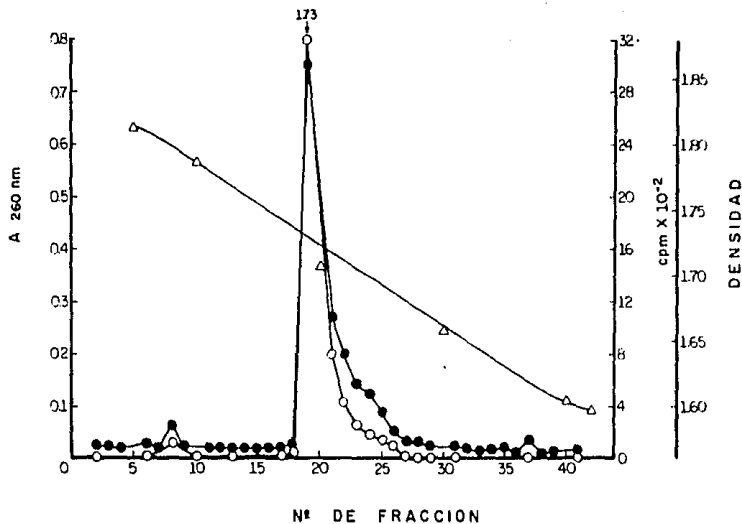


Figura 8. Gradiente de CsCl con DNA total de *T. cruzi*. Las fracciones fueron leídas a 260nm y algunas hibridadas con RNAr ³H.
 Gradiente de densidad \triangle
 Perfil de Absorbencia a 260 nm \bullet
 Perfil de hibridación ribosomal \circ

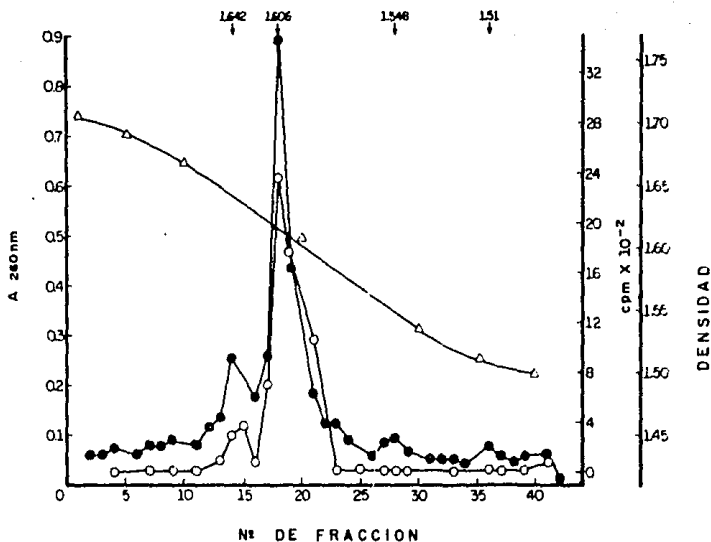
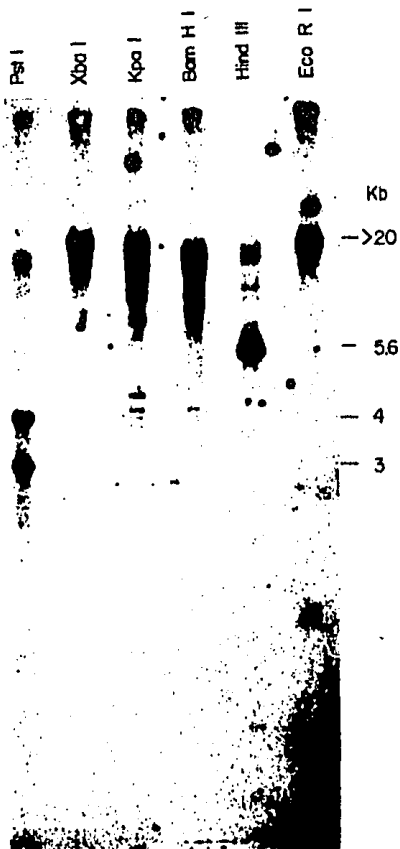


Figura 9. Gradiente de CsCl/actinomicina-D con DNA total de *T. cruzi*. Lectura a 260 nm e hibridación con RNAr tal y como se describe en Material y Métodos y en la Fig. 8.

Análisis por endonucleasas de restricción

Con intenciones de analizar el arreglo de las secuencias codificadoras del RNAr, el DNA total fue digerido con varias endonucleasas de restricción. Los fragmentos resultantes fueron sometidos a electroforesis en agarosa y transferidos a nitrocelulosa. En una búsqueda inicial de fragmentos de DNAr, se hibridó el DNA así fraccionado con una mezcla de las especies mayores ribosomales marcadas in vitro con ^{32}P (Material y Métodos). El autorradiograma post-hibridación de algunas de estas digestiones se muestra en la Fig. 10.

En la Tabla II se presenta el resumen de una clasificación de las endonucleasas probadas basada en el número y tamaño de los fragmentos de hibridación ribosomal por ellas generados. Debido a que el tamaño de las especies 18S, α y β suma alrededor de 6.4Kb, consideré que los fragmentos generados por las endonucleasas Hind III y Sst I resultaban adecuados para iniciar un análisis de la región codificadora. En la Fig. 11 se muestra el autorradiograma resultante de la hibridación del RNA 18S + 24S con el DNA digerido con Hind III y con Sst I.



18S+24S

Figura 10. Autorradiograma de la hibridación ribosomal 18S + 24S de DNA de *T. cruzi*. Experimento tipo Southern de DNA digerido con endonucleasas de restricción.

TABLA II

Grupo	Enzima	Resultados
I	<u>Eco</u> RI <u>Xba</u> I <u>Sal</u> I	Banda única que comigra con DNA sin digerir (~ 30 Kb).
II	<u>Kpa</u> I <u>Bam</u> HI <u>Sma</u> I <u>Xho</u> I	Una banda que comigra con DNA sin digerir y presencia de bandas tenues adicionales (10-20 Kb).
III	<u>Sst</u> I <u>Hind</u> III <u>Pst</u> I	Dos bandas intensas entre 1 y 20 Kb.
IV	<u>Hae</u> II <u>Hha</u> I	No se encontró material de hibridación.

Clasificación por grupos de las endonucleasas probadas. El sistema de electroforesis fue agarosa 0.8% y el RNAr utilizado en la hibridación fue una mezcla de 18S y 24S.

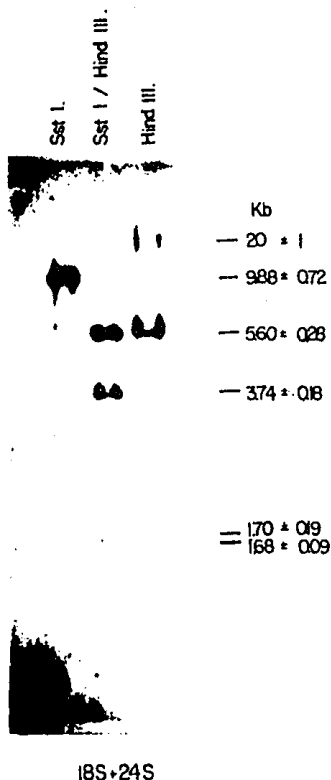


Figura 11. Autorradiograma de la hibridación ribosomal de DNA digerido con Hind III y con Sst I. El tamaño de los fragmentos fue calculado con base a su posición relativa a los de DNA del fago lambda digerido con Hind III (marcador interno no mostrado) y corresponde al promedio aritmético de por lo menos 7 determinaciones independientes.

La relación y homología que guardan entre sí dichos fragmentos fue investigada a través de realizar digestiones dobles y de hibridar por separado las 8 diferentes moléculas de RNA ribosomal (tres especies mayores y cinco menores). Los resultados de estos experimentos se muestran en las Figs. 12 y 13. Y de manera condensada se presentan en la Tabla III. En la Discusión se desglosan las alternativas y consideraciones por las que se infiere el arreglo físico de las regiones codificadoras. Este arreglo se esquematiza en la parte inferior de la Tabla III. Además de las bandas consideradas en la Tabla III, he encontrado bandas tenues adicionales generadas por lind III y hechas evidentes con RNA 18S (6-10Kb) y con la especie m_2 (10Kb). Estas bandas adicionales pudieran ser la consecuencia de heterogeneidad en la región, que por analogía a otros sistemas, corresponde al espaciador no transcrito. Dichos cortes se han representados en el mapa con una "H" de menor tamaño.

Los fragmentos de hibridación obtenidos con las especies m_4 y m_5 difieren de aquellos presentes en el resto de las sondas y son mostrados en las Figs. 14 y 15.

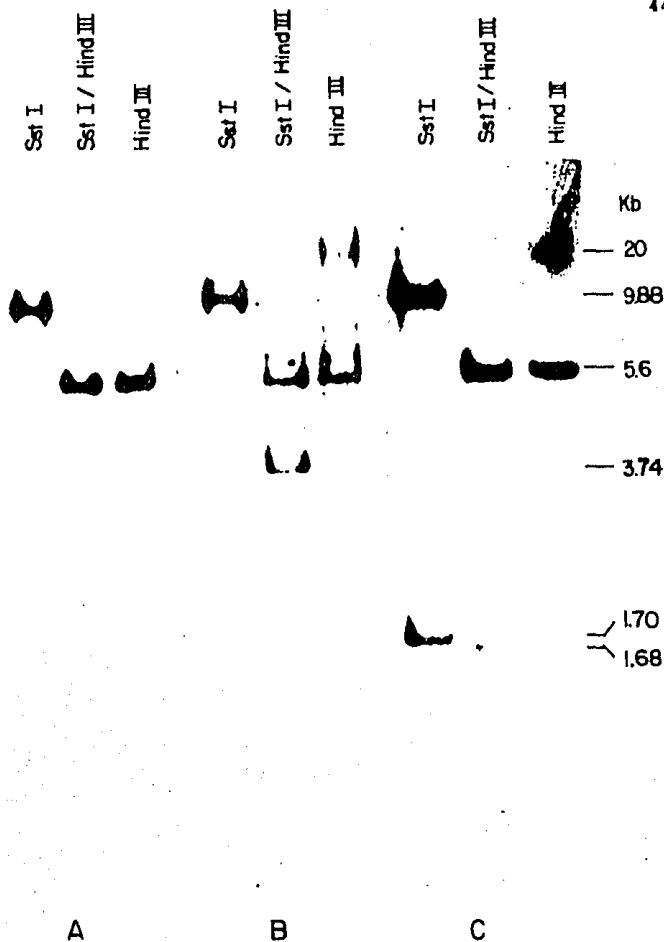


Figura 12. Autorradiograma de la hibridación tipo Southern con las especies: β (A), 18S (B) y α (C).

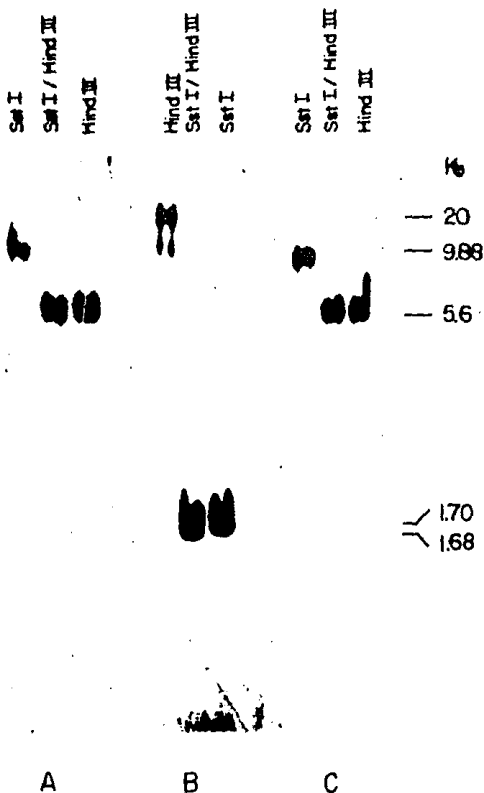
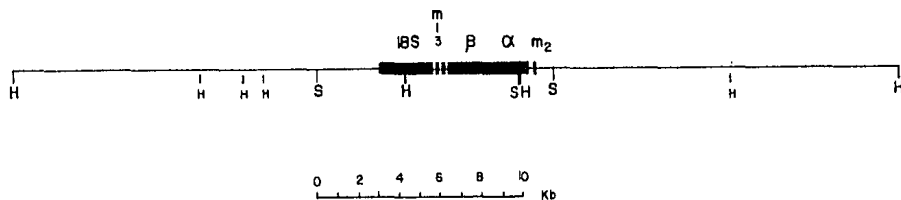


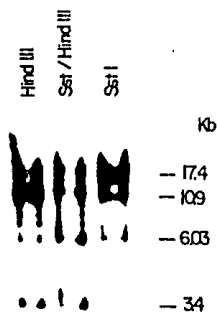
Figura 13. Autorradiograma de la hibridación tipo Southern con las especies m_1 (A), m_2 (B), m_3 (C).

TABLA III

ESPECIES RIBOSOMALES	Hind III	Sst I	Hind III	Sst I/Hind III	Sst I	Sst I/Hind III
	20 Kb	9.88 Kb	Sst I/Hind III	5.60 Kb	3.74 Kb	1.70 Kb
18S	+	+	+	+	-	-
β	-	+	+	-	-	-
α	+	+	+	-	+	+
m_1	-	+	+	-	-	-
m_2	+	-	-	-	+	+
m_3	-	+	+	-	-	-
m_4	-	-	-	-	-	-
m_5	-	-	-	-	-	-

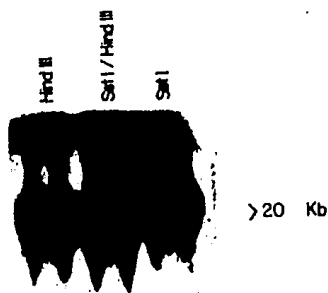
Mapa construido con la Hibridación independiente con las especies ribosomales de T. cruzi del DNA digerido con Sst (S) y/o con Hind III (H).





m₄

Figura 14. Autorradiograma de la hibridación tipo Southern con la especie ribosomal m₄.

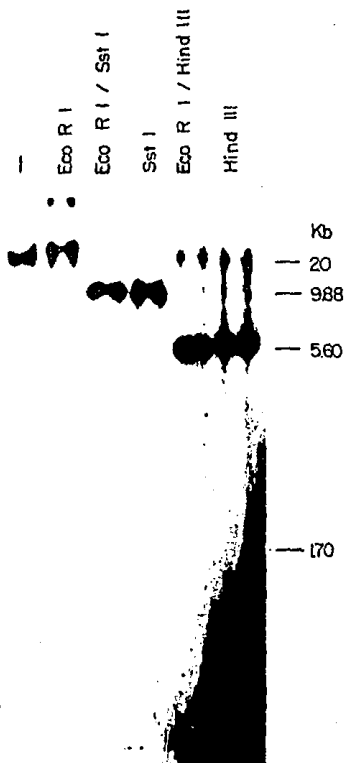


m5

Figura 15. Autorradiograma de la hibridación tipo Southern con la especie ribosomal m_5 .

Sitio para Eco RI

La hibridación obtenida con Eco RI (banda que comigra con DNA sin digerir) al igual que la obtenida con el resto de las endonucleasas de su grupo (Tabla II), sugiere que la enzima no corta dentro de la unidad fundamental de transcripción. Debido a la existencia en varios Phyla (ver Discusión) de un sitio para Eco RI localizado en el extremo 3' de la región que codifica para la especie 18S , que es una región especialmente conservada y que se aparea con una secuencia en el extremo 5' del RNA mensajero (69), pensamos que su ausencia en T. cruzi resulte interesante. Con intensiones de acumular evidencias en este sentido, se realizó un experimento de hibridación donde el DNA fue digerido con Eco RI en digestión sencilla y doble con Sst I y con Hind III, enzimas que demostraron cortar dentro de la región codificadora. El hecho de que Eco RI muestre hibridación que comigra con DNA sin digerir y que esta enzima no modifique el patrón de corte obtenido con Sst I y con Hind III (Fig 16) sugiere fuertemente que Eco RI no corta dentro de la región codificadora de estas especies ribosomales.



18 S + 24 S

Figura 16. Autorradiograma de la hibridación ribosomal (18S + 24S) del DNA digerido con la endonucleasa Eco RI independiente y combinada con Hind III y con Sst I.

D I S C U S I O N

ESPECIES RIBOSOMALES MENORES.

Los datos que se presentan en este trabajo indican que en los ribosomas de T. cruzi se encuentran 5 moléculas de bajo peso molecular (100- 300 bases). Esta situación difiere con la generalidad de eucariotes, los cuales contienen sólo dos moléculas pequeñas (5S y 5.8S). Esta discrepancia sugiere, como primera posibilidad que la presencia de 5 moléculas en T. cruzi pudiera deberse a un problema de degradación. Los argumentos que se mencionan a continuación reducen de manera importante esta posibilidad y en consecuencia sustentan el concepto de que se trata de moléculas nativas en el ribosoma de este protozoario:

1. Se tuvo gran precaución de no contaminar el material de laboratorio ni el área de trabajo con ribonucleasa comercial, así como de inactivar (150°C) cualquier actividad enzimática presente en dicho material.
2. Todas las soluciones para la purificación y manejo del RNA fueron previamente esterilizadas en presencia de inhibidores de ribonucleasa.
3. La electroforesis del RNAr aislado, da bandas nítidas y reproducibles. Si fueran producto de degradación se esperaría

encontrar un barrido.

4. Las moléculas se encuentran en cantidades equimolares con un patrón electroforético constante en purificaciones independientes.
5. En el complejo polisomal el RNA mas susceptible a degradación es el mensajero. En las preparaciones ribosomales utilizadas se encuentran polisomas con la existencia de 5 o 6 monosomas (59). Aún mas, el RNA polisomal purificado dirige, en un sistema libre de células, la síntesis de proteínas de elevado peso molecular (0.2×10^6 daltones), lo que significa la existencia de mensajeros de gran tamaño molecular (59).
6. La existencia de 5 moléculas pequeñas de RNA de tipo ribosomal ha sido reportada recientemente en otros tripanosomatídeos (70-72) y sus tamaños tienen gran similitud a los determinados en este trabajo (Tabla I).

En lo que se refiere a la localización y tipo de asociación de estas moléculas a los ribosomas de T. cruzi, quedó demostrado que m_3 es recuperable al desnaturalizar la especie ribosomal 24S (Figs.6, 7) y por lo tanto se localiza en la unidad ribosomal mayor. Además m_3 hibrida en el fragmento que, por analogía a otros sistemas, pudiera contener al espaciador transcrito del cistrón ribosomal. Dado que estos comportamientos son clásicos de la mo-

lícula 5.8S de eucariotes, consideramos que m_3 constituye el componente análogo en los ribosomas de T. cruzi. Debido a que las especies m_1 , m_2 , m_4 y m_5 se encontraron en la región soluble del gradiente, su asociación depende por lo menos del complejo ribonucleoproteico. En estos experimentos no hemos determinado la asociación de estos RNAs al ribosoma. Sin embargo se ha descrito en T. brucei que las moléculas equivalentes a m_1 , m_4 y m_5 se liberan de ribosomas tratados con EDTA (70), lo que constituye el comportamiento bioquímico de la especie 5S. Por otro lado, aquellas equivalentes a m_2 y m_3 fueron recuperables de la unidad ribosomal mayor 50S (70). Por último, la asociación exclusiva de la molécula que corresponde a m_3 a la especie 24S desproteinizada coincide con lo descrito en este trabajo. Dadas estas razones se antoja muy probable que la asociación de m_1 , m_2 , m_4 y m_5 a los ribosomas de T. cruzi sea similar.

El perfil de las especies pequeñas ribosomales pequeñas encontrado en T. cruzi es similar al reportado para T. brucei (70), Chritidia fasciculata (72) y Leshmania tarclentolae (71). Debido a que no existen hasta nuestro conocimiento, reportes en otros Phyla con estas características, puede considerarse a esta particularidad como un criterio que reúne a los tripanosomatídeos en un grupo distinto al resto de eucariotes.

Dadas estas características resulta plausible pensar que la función de los ribosomas de tripanosomatídeos patógenos sea diferente a la de los hospederos mamíferos. De resultar cierta esta hipótesis, la maquinaria de traducción en T. cruzi pudiera ser un objetivo para el diseño de fármacos específicos o preferenciales al metabolismo del parásito.

DENSIDAD RELATIVA DEL DNA RIBOSOMAL

La posición del pico de hibridación del DNA ribosomal observado en los gradientes de CsCl neutro indica que el contenido promedio de G C en el contexto de secuencias que incluye al DNAr es similar o ligeramente mayor al de la masa genómica. Desgraciadamente, con fines de purificación, la diferencia no es suficiente para conseguir un satélite ribosomal, ni aún en presencia de actinomicina-D que apenas acentúa la pequeña diferencia. He de mencionar que debido al interés de estudiar fragmentos grandes de DNA, que incluyeran por lo menos toda la unidad de repetición ribosomal, este no fue roto previamente a tamaños menores. Es posible que las pequeñas diferencias de densidad insinuadas en estos experimentos, sean aumentadas utilizando fragmentos de DNA de menor tamaño.

Como se muestra en el perfil de A_{260} (Fig 9), el antibiótico intercalante separa por lo menos 3 satélites crípticos

ligeros. Estos serán motivo de futuros estudios para determinar la repetitividad de secuencias y homología con transcritos celulares.

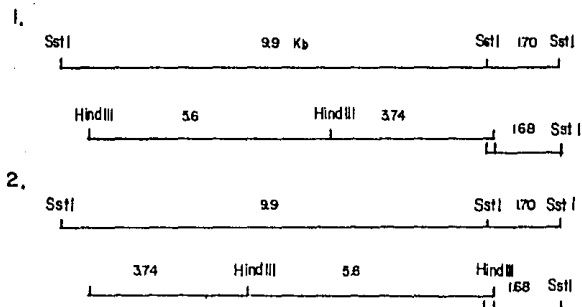
ANALISIS POR ENDONUCLEASAS DE RESTRICION

Antes de discutir el mapa construido, quisiera comentar que la existencia de pocas bandas de hibridación con RNAr (Fig. 10, Tabla II) nos sugirió desde un principio, que los cistrones ribosomales en T. cruzi se encuentran en un contexto fundamentalmente homogéneo de secuencias. El hecho de que en las digestiones con Hae II y con Hha I no se haya encontrado material de hibridación, puede explicarse si recordamos que estas enzimas reconocen solo 4 pares de bases a diferencia de 6 pares de bases que reconocen el resto de las endonucleasas probadas. El pequeño número de bases reconocido por estas endonucleasas pudo haberse traducido como la digestión del cistrón ribosomal en tamaños pequeños (< 500 bases) no analizados en las condiciones de electroforesis utilizadas.

A continuación se discuten las hibridaciones independientes de las diferentes especies ribosomales con los fragmentos generados por Hind III y Sst I (Figs. 11- 15) cuyos resultados se encuentran condensados en la Tabla III.

Utilizando las especies 18S y 24S como sondas, el fragmento de 9.9 Kb generado por Sst I desaparece en la digestión doble con Hind III (Fig 11) y concomitantemente se encuentra uno menor que comigra con el de 5.6 Kb de Hind III. Esto indica que el fragmento de 5.6 Kb producido con Hind III esta contenido en el de 9.9 Kb de Sst I. La aparición de un fragmento en la digestión doble con tamaño de 1.68 Kb, ligeramente menor al fragmento de 1.70 Kb generado por Sst I, aunado al hecho de que estos dos fragmentos presentan el mismo perfil de hibridación con las especies ribosomales α y m_2 (Tabla III), sugiere que el fragmento de 1.68 Kb proviene del de 1.70 Kb por efecto de un corte con Hind III. Un tercer fragmento de 3.74 Kb proveniente de la digestión doble, es de tamaño similar al esperado para la diferencia de 9.9 Kb y 5.6 Kb, que es de unas 4.3 Kb. Es factible que exista un fragmento extra de unas 600 bases pero este tendría que ser silencioso a la hibridación (sin secuencias representadas en las especies ribosomales), pues no se encontró material de hibridación mayor a 200 b en geles de agarosa al 1.2% y además sobreexpuestos en la radiografía.

Con estos datos existen 2 posibilidades para el posible arreglo de estos cinco fragmentos de DNA:



El hecho de que la especie α hibride con los fragmentos de 5.6, 1.68, y 1.70 Kb indica que el arreglo número 2 es el correcto.

La hibridación observada con el resto de las sondas ribosomales sitúa a las diferentes regiones codificadoras en la siguiente manera:

- 18S: En los fragmentos 3.74 (Hind III/Sst I) y 5.6 (Hind III o Hind III/Sst I) (Fig 12B Tabla III).
- β : En el fragmento central 5.6 Kb (Fig 12A y Tabla III).
- α : En el fragmento central 5.6 Kb abarcando los fragmentos 1.68 (Hind III/Sst I, 1.70 (Sst I) y 20 Kb (Hind III) (Fig 12 C y Tabla III). La banda tenue intermedia a las

de 5.6 y 1.68 de la digestión doble en la Fig. 12C disminuye específica y considerablemente cuando la hibridación de α es competida con 20 veces de 18S que hibrida fuertemente con ese fragmento (Fig. 12B). Por lo tanto, dicha banda tenue representa contaminación de 18S en mi preparación de α .

m_1 y

m_3 : En el fragmento central de 5.6 Kb (Figs. 13A, C y Tabla III). Este fragmento contiene además: aproximadamente el 50% (2 Kb) de la región 18S (Fig. 12B), la totalidad (2 Kb) de la β (Fig. 12A) y la mayor parte (< 1.6 Kb) de la α (Fig. 12C). La especie m_3 bioquímicamente se comporta como la 5.8S de eucariotes y podría ubicarse por analogía a otros sistemas entre las secuencias de 18S y 24S (β en este caso). La demostración de esta suposición y la localización de m_1 requieren de un mapeo mas fino en esta región. El hecho que 18S, β , α , m_1 y m_3 hibriden con el fragmento de 9.9 Kb generado por Sst I (Figs. 12, 13 y Tabla III) apoya el arreglo hasta ahora construido.

m_2 : En los fragmentos 1.70 (Sst I), 1.68 (Hind III/Sst I) y 20 Kb (Hind III) (Fig. 13B). Esto lo sitúa vecino a la región que codifica para α .

Las especies 18S y m_2 , ubicadas en las regiones extremas de la unidad de transcripción, hibridan con un fragmento de 20 Kb, y en menor intensidad con otros de 6- 10 Kb y 10 Kb respectivamente, generados por Hind III (Figs. 12B y 13B). Estos pudieran indicar la existencia de espaciadores no transcritos heterogéneos en secuencia y/o en longitud.

m_4 y

m_5 : Las especies m_4 y m_5 son codificadas en un contexto de secuencias diferentes al de las especies mayores. Para m_4 los datos sugieren la existencia de varios locci; mientras que para m_5 , los datos son acordes con una agrupación de las regiones codificadoras (Figs. 14 y 15). Ambas situaciones se han descrito para los genes de RNA 5S de varios eucariotes (68). Por esta y por otras similitudes como lo son su asociación al ribosoma dependiente de proteína y su tamaño molecular, consideramos a las molécula m_4 y/o m_5 como entidades análogas al RNA 5S de eucariotes.

Con intensiones de situar la información obtenida, referente a la organización de secuencias codificadoras de las especies ribosomales de T. cruzi, en el contexto de otros sistemas, considero conveniente enlistar primero aquellas caracte-

rísticas comunes y aquellas no comunes de los genes ribosomales en la generalidad de eucariotes.

Datos comunes a todos los eucariotes

1. Se trata de genes repetidos (50- 500 copias por genoma haploide).
2. Se encuentran agrupados.
3. Las unidades de transcripción se encuentran separadas por regiones de DNA no transcritas.
4. Las unidades de transcripción contienen espaciadores transcritos en el RNA precursor y al ser eliminados en el procesamiento del mismo separan las regiones codificadoras.

Datos que difieren entre eucariotes

1. Existen cistrones extracromosomales en algunos protistas de vida libre (48- 56).
2. Todos los cistrones ribosomales cromosomales, a excepción de Acetabularia exigua (25), presentan un arreglo en tandem "cabezas con colas y colas con cabezas". Protistas de vida libre (48- 56) presentan sus genes ribosomales como moléculas libres extracromosomales organizados en forma palindrómica.

3. La unidad primaria de transcripción es de tamaño variable (8- 13 Kb) (15- 19).
4. Los espaciadores no transcritos pueden ser homogéneos (29) o heterogéneos en longitud (73) y/o en secuencia (31).
5. En la gran mayoría de eucariotes, la región codificadora de la especie 5S no se encuentra ligada a la unidad fundamental de transcripción 18S y 24-28S. D. discoideum (56), Sacharomyces cerevisiae (41) y Euglena gracilis (74) constituyen casos excepcionales.
6. En varios Phyla se ha conservado la secuencia en el extremo 3' de la especie 18S, que incluye un sitio de corte para la enzima Eco RI. Tal es el caso de S. cerevisiae (41), D. discoideum (56), Oxytricha fallax (75), Lytechinus variegatus (76), D. melanogaster (35), Sciara coprophila (40), Calliphora erythrocephala (39), Bombyx mori (29), ratón (31), hamster chino (77), ternera (78) y hombre (32).

Entre los organismos que no contienen esta secuencia se encuentran tanto protistas de vida libre: Physarum polycephalum (54), Tetrahymena pyriformis (79), E. gracilis (74), como metazoarios: Neurospora crassa (80), el nemátodo Caenorhabditis elegans (81), Artemia (82) y cereales (83).

Datos en T. cruzi

El mapa construido se encuentra representado en la parte inferior de la Tabla III. La localización de los sitios de restricción dentro de las regiones codificadoras es aproximada, pues está basada en la intensidad relativa de hibridación obtenida con las especies ribosomales independientes. La información obtenida como producto de este análisis puede resumirse en los siguientes puntos:

1. Las unidades de repetición contienen las regiones codificadoras para las especies : 18S, β , α , m_1 , m_2 y m_3 .
2. Presencia de espaciadores no transcritos de gran longitud (por lo menos 20 Kb) muy probablemente heterogéneos en secuencia y/o en longitud.
3. Consideramos un tamaño de aproximadamente 8Kb para la región codificadora.
4. Tomando en cuenta los dos puntos anteriores, estimamos que el tamaño mínimo de la unidad de repetición es de aproximadamente 28 Kb. Desconocemos, por el momento, si está o no integrada al cromosoma; así como también la situación de polaridad (tandem o palíndrome) de las unidades adyacentes. De ser similar a la encontrada en L. donovani (26) se trataría de un tandem.

5. No sabemos si m_1 , m_2 y m_3 forman parte del RNA precursor, o bien se codifican en la otra cadena de DNA.
6. La ausencia de la secuencia reconocida por la endonucleasa Eco RI en la región codificadora de las especies 18S y 24S puede resultar de relevancia filogenética y funcional.

Consideramos que nuestro conocimiento y manejo actual del sistema DNAr- RNAr, nos permitirá en un futuro próximo investigar sobre la organización fina, la transcripción y el procesamiento de las diferentes especies de RNA ribosomal en T. cruzi.

R E F E R E N C I A S

1. American Trypanosomiasis Research, Scientific Publication N° 318, Pan American Health Organization. Brazil, Marzo 1975.
2. Enfermedad de Chagas en México, Centro de Investigaciones Ecológicas del Sureste, N°1 serie de documentos. San Cristóbal Las Casas, Chis., México, 1978.
3. Ursine, A.K. y Brener, Z.
Protective effects of specific antibodies in Trypanosoma cruzi infections.
J. Immunol. 116: 755- 760, 1976.
4. Trypanosomiasis and Leshmaniasis, Ciba Foundation Symposium 20, Associated Scientific Public Publishers, P.O. Box 211, Amsterdam, 1974.
5. Miles, M.A., Povoas, M.M., Prata, A., Cedillos, R.A., De Souza, A.A. y Macedo, V.
Do radically dissimilar Trypanosoma cruzi strains (zymodemes) cause venezuelan and brazilian forms of Chagas disease?
The Lancet 2 : 1338- 1340, 1981.
6. Bradley, D.J.
Genetic control of natural resistance to Leishmania donovani.
Nature 250: 353, 1974.
7. Borst, P. y Cross, G.A.M.
Molecular Basis for Trypanosome antigenic variation.
Cell 29: 291- 303, 1982.
8. Birnsteil, M.L., Chipchase, M. y Speirs, J.
The ribosomal RNA cistrons. en Progress in Nucleic Acid Acid Research and Molecular Biology. 11:351- 389,1971.
Editors JN Davidson, Waldo E Cohn.
Academic Press, New York and London.

9. Fedoroff. On spacers.
Cell 10: 697- 710, 1979.
10. Pederson, T. y Kumar, A.
Relationship between protein synthesis and ribosome assembly
in HeLa cells.
J. Mol. Biol. 61: 655- 668, 1971.
11. Chambon, P.
Eukaryotic nuclear RNA polymerases.
Ann. Rev. Biochem. 44: 613- 638, 1975.
12. Perry, R.P.
Processing of RNA.
Ann. Rev. Biochem. 45: 605- 629, 1976.
13. Kenerly 1977; Kiss 1977 en
Brosius J, Dull T.J., Sleeter D.D. y Noller H.J.
Gene Organization and primary structure of a ribosomal
RNA operon from Escherichia coli.
J. Mol. Biol. 148: 107- 127, 1981.
14. Miller, O.L. Jr. y Beatty, B.
Visualization of nucleolar genes.
Science 164: 955- 957, 1976.
15. Klootwijk, J., de Jorge, P. y Planta, R.J.
The primary transcript of the ribosomal unit in yeast.
Nucl. Acid. Res. 6: 27- 39, 1979.
16. Dawid, I.B., Wellauer, P.K. y Long, E.O.
Ribosomal DNA in Drosophila melanogaster. I. Isolation and
characterization of cloned fragments.
J. Mol. Biol. 126: 749- 769, 1978.
17. Wellauer, P.K., Dawid, I.B.
Secondary structure maps of ribosomal RNA and DNA .
I. Processing of Xenopus laevis ribosomal RNA and structure
of single stranded ribosomal DNA.
J. Mol. Biol. 89: 379- 395, 1974.

18. Schibler, J., Wyler, T. y Hagenbischle, O. 1975.
Citado en: Long, E.O. y Dawid, I.B.
Repeated genes in eukaryotes.
Ann. Rev. Biochem. 49: 727- 764, 1980.
19. Wellauer, P.K., y Dawid, I.B.
Secondary structure maps of RNA: Processing of HeLa ribosomal RNA.
Proc, Natl. Acad. Sci. 70:2827- 2831, 1973.
20. Reeder, R.H., y Brown, D.D.
Transcription of the ribosomal RNA genes of an amphibian by the RNA polymerase of a bacterium.
J. Mol. Biol. 51: 361- 377, 1970.
21. Dawid, I.B., Wellauer, P.K., 1976.
Citado en : Long, E.O. y Dawid, I.B.
Repeated genes in eukaryotes.
Ann. Rev. Biochem. 49: 727- 764, 1980.
22. Hockett, P.B. y Sauerbier, W., 1975.
Citado en: Long, E.O. y Dawid, I.B.
Repeated genes in eukaryotes.
Ann. Rev. Biochem. 49: 727- 764, 1980.
23. Lewin, B. 1976.
Citado en: Long, E.O., y Dawid, I.B.
Repeated genes in eukaryotes.
Ann. Rev. Biochem. 49: 726- 764, 1980.
24. Dawid, I.B., Klokas, C.K., Ohi, S., Ramirez, J.L., y Upholt, W.B. 1976.
En: The Genetic Function of Mitochondrial DNA, Eds C. Saccone y A.M. Kuoom, pp 3- 13. Amsterdam: Elsevier/North Holland.

25. Berger, S., Zellmer, D.M., Klopstech, K., Ritcher, G. Dillard, W.L. y Schweiger, H.G.
Alternating polarity in rRNA genes.
Cell. Biol. Int. Rep. 2: 41- 50, 1978.
26. Lion, W., Fouts, D.L. y Manning, J.
Sequence arrangement of the 16S and 23S rRNA genes in the pathogenic haemoflagellate Leishmania donovani.
Nucl. Acid. Res. 5: 491- 504, 1978.
27. Blin, N., Sperraza, J.M., Wilson, F.E., Bieber, D.G., Mickel, F.S., y Stafford, D.W., 1979.
citado en: Long, E.O. y Dawid, I.B.
Repeated genes in eukaryotes.
Ann. Rev. Biochem. 49: 727- 764, 1980.
28. Degelmann, A., Royer, H.D., y Hollenberg, C.P.
The organization of the ribosomal RNA genes of Chironomus tentans and some related species.
Chromosoma 71: 263- 281, 1979.
29. Manning, R.F., Samols, D.R. y Gage, L.D.
The genes for 18S, 5.8S and 28S ribosomal RNA of Bombyx mori are organized into tandem repeats of uniform length.
Gene 4: 153- 166, 1978.
30. McClements, W., Tilghman, S., Crouch, R., Skalka, A.
En Genetic Engineering, Eds. HB Boyer y S. Nicosia, pp 117- 122. Amsterdam.
31. Cory, S. y Adams, J.M.
A very large repeating unit of mouse DNA containing the 18S, 28S and 5.8S rRNA genes.
Cell 11: 795- 805, 1977.
32. Arnheim, M. y Southern, E.M.
Heterogeneity of the ribosomal genes in mice and men.
Cell 11: 363- 370, 1977.

33. Glin, N., Stephenson, E.C. y Stafford, D.W.
Isolation and some properties of a mammalian ribosomal DNA.
Chromosoma 58: 41- 50, 1976.
34. Wellauer, P.K. y Dawid, I.B.
Isolation and sequence organization of human ribosomal DNA.
J. Mol. Biol. 128: 289- 303, 1979.
35. David, M.G. y Hogness, D.S.
A novel arrangement of the 18S and 28S sequences in a
repeating unit of Drosophila melanogaster rDNA.
Cell 10: 167- 176, 1977.
36. Wellauer, P.K. y Dawid, I.B.
The structural organization of ribosomal DNA in
Drosophila melanogaster.
Cell 10: 193- 212, 1977.
37. Dawid, I.B., Long, E.O., DiNocera, P.P., Parolve, M.L.
Ribosomal Insertion like elements are interspersed
with mobile sequences.
Cell 25: 399- 408, 1981.
38. Barnett, T. y Rae, P.M.
A 9.6 Kb intervening sequence in D. virilis rDNA, and
sequence homology in r DNA interruptions of diverse
species of Drosophila and other diptera.
Cell 16: 763- 775, 1979.
39. Beckingham, K.
The ribosomal DNA of Calliphora erythrocephala.
The cistron classes of total genomic DNA.
J. Mol. Biol. 149: 141- 169, 1981.
40. Renkawitz, R., Gerbi, S.A., Glatzer, K.H.
Ribosomal DNA of the fly Sciara coprophila has a very
small and homogeneous repeat unit.
Mol. Gen. Genet. 173: 1- 13, 1979.

41. Graeme, I.B., De Gennaro, L.J., Gelfand, D.H., Bishop, R.J. Valenzuela, P. y Rutter, W.J.
Ribosomal RNA genes of Sacharomyces cerevisiae.
J. Biol. Chem. 252: 8118- 8125, 1977.
42. Kramer, R.A., Philippsen, P. y Davis. R.W.
Divergent transcription in the yeast ribosomal RNA coding region as shown by hybridization to separated strands and sequence analysis of cloned DNA.
J. Mol. Biol. 123: 405- 416, 1978.
43. Brown, D.D. y Dawid, I.B.
Specific gene amplification in Oocytes.
Science 160: 272- 280, 1968.
44. Brown, D.D. y Blackler, A.W.
Gene amplification proceeds by a chromosome copy mechanism.
J. Mol. Biol. 63: 75- 84, 1972.
45. Rochaix, J.P., Bird, A. y Bakken, A.
Ribosomal RNA gene amplification by Rolling Circles.
J. Mol. Biol. 87: 473- 487, 1974.
46. Coggins, L.W. y Gall, J.G.
The timing of meiosis and DNA synthesis during early oogenesis in the toad, Xenopus laevis.
J. Cell. Biol, 52: 569- 576, 1972.
47. Yao, M.C. y Gall, J.G.
A single integrated gene for ribosomal RNA in a cukaryote Tetrahymena pyriformis.
Cell 12: 121- 132, 1977.
48. Karrer, K.M. y Gall, G.J.
The macronuclear ribosomal DNA of Tetrahymena pyriformis is a palindrome.
J. Mol. Biol. 104: 421- 453, 1976.

49. Wild, M.A. y Gall, J.G.
An intervening sequence of the gene coding for 24S Ribosomal RNA of Tetrahymena pigmentosa.
Cell 16: 565- 573, 1979.
50. Din, N., Engiberg, J., Kaffenberge, W., Eckert, W.
The intervening sequence in the 26S rRNA coding region of T. termophila is transcribed within the largest stable precursor of rRNA.
Cell 18: 525- 532, 1979.
51. Cech, T.R. y Rio, D.C.
Localization of transcribed regions on extrachromosomal ribosomal RNA genes of Tetrahymena termophila by R loop mapping.
Proc. Natl. Acad. Sci. 76: 5051- 5055, 1979.
52. Campbell, G.R., Littau, V.V., Melera, P.W., Allfrey, V.G. y Johnson, E.M.
Unique sequence arrangement of ribosomal genes in the palindromic rDNA molecules of Physarum policephalum.
Nucl. Acid. Res. 6: 1433- 1447, 1979.
53. Vogt, V.M. y Brawn, R.
Structure of ribosomal DNA in Physarum policephalum.
J. Mol. Biol. 106: 567- 587, 1976.
54. Molgaard, H.V., Mattheus, H.R., Bradbury, E.M.
Organization of genes for ribosomal RNA in Physarum policephalum.
Eur. J. Biochem. 68: 541- 549, 1976.
55. Gubler, V., Wyler, T., y Baun, R.
The gene for 26S rRNA in Physarum contains two insertions.
FEBS Lett. 100: 347-50, 1979.
56. Cockburn, A.F., Taylor, W.C. y Firtel, R.A.
Dictyostelium rDNA consists of non chromosomal palindromic

- dimers containing 5S and 36S coding regions.
 Chromosoma 70: 19- 29, 1978.
57. Findly, R.G. y Gall, J.G.
 Free ribosomal genes in Paramecium are tandemly repeated.
 Proc. Natl. Acad. Sci. 75: 3312- 3316, 1978.
58. Bowman, L.H., Rabin, B. y Schlessinger, D.
 Multiple ribosomal RNA cleavage pathways in mammalian cells.
 Nucl. Acid. Res. 9: 4951- 4966, 1981.
59. Castro, C., Hernández, R. y Castañeda, M.
Trypanosoma cruzi ribosomal RNA: Internal break in the large molecular mass species and number of genes.
 Mol. Biol. Parasitol. 2: 219- 233, 1981.
60. Camargo, E.P.
 Grow and differentiation of Trypanosoma cruzi. Origin of metacyclic trypanosomes in liquid medium.
 Revta. Inst. Met. Trot. S. Pulo; 6: 220- 244, 1964.
61. Maizels, N.
Dictyostelium 17S, 25S and 5S rDNAs lie within a 38,000 base pair repeated unit.
 Cell 9: 431- 438, 1976.
62. Hernández, R.
 Cuantificación génica de las especies mayores de RNA ribosomal en epimastigotes de Trypanosoma cruzi.
 Tesis profesional 1980.
 Instituto de Investigaciones Biomédicas, U.N.A.M.
 U.A.C.P. y P. del C.C.H.
63. Bethesda Research Laboratories, Inc.
 Catálogo de 1979.
64. Southern, E.M.
 Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis.
 J. Mol. Biol. 98: 503- 517, 1975.

65. Voet y Vinograd.
J. Phys. Chem. 65: 1138, 1961.
66. Erdman, V.A.
Collection of published 5S and 5.8S ribosomal RNA sequences.
Nucl. Acid. Res. 5: r1- r13, 1978.
67. Erdman, V.A.
Collection of published 5S and 5.8S RNA sequences and their precursors.
Nucl. Acid. Res. 9: r25- r42, 1981.
68. Long, E.O., y Dawid, I.B.
Repeated genes in eukaryotes.
Ann. Rev. Biochem. 49: 727- 764, 1980.
69. Hagenbuchle, O., Santer, M., Steitz, J.A., Mans, R.J.
Conservation of the primary structure at the 3' end of 18S rRNA from eucaryotic cells.
Cell 13: 551- 563, 1978.
70. Cordingley, J.S. y Turner, M.J.
6.5S RNA; preliminary characterization of unusual small RNAs in Trypanosoma brucei
Molec. and Biochem. Parasitol. 1: 91- 96, 1980.
71. Simpson, L. y Simpson, A.M.
Kinctoplast RNA of Leishmania tarentolae.
Cell 14: 169-178, 1978.
72. Gray, M.W.
Unusual pattern of ribonucleic acid components in the ribosome of Crithidia fasciculata, a Trypanosomatid protozoan.
Mol. and Cell Biol. 1: 347- 357, 1981.
73. Wellauer, P.K., Reeder, R.H., Carrol, D., Brown, D.D.

Deutch, A., Higashinakawa, T. y Dawid, I.B.
Amplified ribosomal DNA from Xenopus laevis has
heterogeneous spacer lengths.

Proc. Natl. Acad. Sci. 71: 2823- 2827, 1974.

74. Curtis, S.E. y Tawson, J.R.
Characterization of the nuclear ribosomal DNA of Euglena gracilis.
Gene 15: 237- 247, 1981.
75. Spear, B.B.
Isolation and mapping of the rRNA genes in the
macronucleus of Oxytricha fallax.
Chromosoma 77: 193- 202, 1980.
76. Edgal, M.H., Perler, F., Blin, N., Hutchynson, C.A.
y Stafford, D.W.
The ribosomal RNA region in the sea urchin Lytechinus variegatus.
Natl. Cancer Inst. Monogr. 48: 11- 18, 1978.
77. Stambrook, P.J.
Heterogeneity in Chinese hamster ribosomal DNA.
Chromosoma 65: 153- 159, 1978.
78. Rotival, M.M., Cortadas, J., Macaya, G., y Bernard, G.
Isolation and organization of calf ribosomal DNA.
Nucl. Acid Res. 6: 2109- 2123, 1979.
79. Gall, J.G., comunicación personal citada en
Manning, R.F., Samols, D.R., Gage, L.D.
The genes for 18S, 5.8S, and 28S ribosomal RNA of
Bombyx mori are organized into tandem repeats of
uniform length.
Gene 4: 153- 166, 1978.
80. Free, S.J., Rice, P.W., Metzenberg, R.L.
Arrangement of the genes coding for ribosomal ribonucleic
acids in Neurospora crassa.
J. Bac. 137: 1219- 1226, 1979.

81. Fies, J.G. y Hirsh, D.
Ribosomal DNA of Caenorhabditis elegans.
J. Mol. Biol, 149: 223- 240, 1981.
82. Cruces, J., Sebastián, J. y Rnart, J.
Restriction mapping of the rRNA genes of Artemia.
BBRC 98: 404- 409, 1981.
83. Appels, R., Gerlach, W.L., Dennis, E.S., Swift, H.
y Peacock, W.J.
Molecular and chromosomal localization of the DNA
sequences coding for the ribosomal RNAs in cereals.
Chromosoma 78: 293- 311, 1980.