

03062
10
2ej-

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

**UNIDAD ACADÉMICA DE LOS CICLOS PROFESIONALES Y
DE POSGRADO DEL COLEGIO DE CIENCIAS Y HUMANIDADES**

**CARACTERIZACION DEL EXTREMO 5' DE LOS GENES DE
RNA RIBOSOMAL DE *Entamoeba histolytica***

T E S I S

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

**QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
MAESTRIA EN INVESTIGACION
BIOMEDICA BASICA**

P R E S E N T A

Bertha Paula Michel González

CUERNAVACA, MOR.

1992



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Abreviaturas

RFLP- Restriction fragment length polymorphism

DNAr- DNA ribosomal

RNAr- RNA ribosomal

RNA pol I- RNA polimerasa I

SL1- factor de selectividad especie-especifico

UBF- Upstream Binding Factor

HMG- High Mobility Group

TBP- TATA-Binding Protein

TAF- TBP-Associated Factor

SSE- Specie- Specific Element

ITS-Internal Transcribed Spacer

ETS- External Transcribed Spacer

Resumen

Los genes de RNA ribosomal de *Entamoeba histolytica* se encuentran localizados en una molécula extracromosomal circular de 24.4 kb (episoma ribosomal). Cada célula cuenta con un promedio de 200 copias de esta molécula. El episoma ribosomal constituye un modelo sencillo para iniciar el estudio sobre la organización génica, la replicación y la transcripción del DNA en este parásito, sobre el cual se conoce poco a nivel de genética molecular. Con el fin de iniciar la caracterización de la región promotora de los genes de RNA ribosomal de *Entamoeba histolytica*, se aisló una clona genómica con el extremo 5' del cistron ribosomal. Usamos diferentes criterios para limitar la unidad transcripcional, como por ejemplo, ensayos tipo "northern" y análisis de RNA naciente. Con la primera técnica, se detectó un precursor pequeño, contenido dentro de los 600 nucleótidos hacia arriba del gen ribosomal 17S. Sin embargo, al hibridar fragmentos de la clona genómica con RNA naciente se detectó una señal que sugirió un precursor más largo. Para averiguar si la unidad transcripcional estaba contenida dentro de la clona genómica, se subclonó aquel fragmento de la clona genómica que generó una fuerte señal con el RNA naciente y se sometió a una digestión controlada con Bal 31. Los resultados obtenidos indicaron que el extremo 5' de la unidad transcripcional está contenida dentro de la clona genómica que se aisló inicialmente, y lograron limitar de forma aproximada el tamaño del líder ribosomal dentro de esta clona. Se presenta, en esta tesis, parte de la secuencia nucleotídica del líder ribosomal. Estos experimentos, en conjunto, sugieren fuertemente la existencia de una molécula precursora ribosomal que se procesa rápidamente con un tamaño máximo de 2.7 kb y un tamaño mínimo de 2.1 kb en *Entamoeba histolytica*.

I - Introducción	
A. Generalidades sobre la amibiasis	1
a.1- Perspectiva histórica	1
a.2- <i>Entamoeba histolytica</i> - agente etiológico de la amibiasis	2
a.3- Patogenicidad de las infecciones por <i>E. histolytica</i>	2
B. Biología celular de <i>Entamoeba histolytica</i>	3
b.1- Ciclo de vida de <i>Entamoeba histolytica</i>	3
b.2- Morfología y ultraestructura	4
b.3- Metabolismo	7
C- Organización del genoma	7
c.1- Cromosomas	7
c.2- DNA extracromosomal: el episoma ribosomal	8
c.3- Análisis del DNA- Contenido de DNA y porcentaje de GCs	8
c.4- Características de la organización génica	9
c.5- RNA ribosomal	9
c.6- DNA repetido	9
D- Diferenciación molecular entre cepas patógenas y no patógenas	10
d.1- Secuencias ribosomales	10
d.2- Divergencias genotípicas	10
II - Antecedentes	11
A. Generalidades sobre la transcripción de los genes de DNAr	11
B. Genes de RNAr en protozoarios y en <i>Entamoeba histolytica</i>	17
C. El episoma ribosomal como modelo de organización y regulación de la expresión genética amibiana	20
III - Objetivo	21
IV - Estrategia Experimental	22
V - Materiales y Métodos	24
VI - Resultados	27
VII - Discusión	39
VIII - Conclusiones	46
IX - Bibliografía	48

I- Introducción

A- Generalidades sobre la amibiasis

a1 - Perspectiva histórica

Se han preguntado alguna vez por qué los ingleses no sufren una amibiasis invasiva, mientras que nosotros los mexicanos la sufrimos con frecuencia ?

Este hecho ha generado una confusión tal, que durante décadas se cuestionó el significado y la importancia del diagnóstico de una infección por *Entamoeba histolytica*. Aún cuando las primeras descripciones del parásito se hicieron a finales del siglo pasado, esta confusión provocó un retraso considerable en el conocimiento de esta enfermedad. Lesh identificó por vez primera el parásito en 1875, en un paciente que sufría diarrea crónica y que presentaba amibas en heces. El papel patógeno de las amibas lo demostró Kartulis unos años después, en Egipto, describiendo además lesiones en el hígado asociadas a la infección por el parásito. A principios de siglo, Walker y Sellards demostraron la existencia de amibas patógenas (*E. histolytica*) y de amibas no patógenas (*Entamoeba coli*). Posteriormente aumentaron los reportes de otros géneros y especies amibianas capaces de habitar en calidad de comensales en el tracto gastrointestinal y se identificaron individuos infectados con la misma *E. histolytica* que no presentaban síntomas de enfermedad. Así mismo, estudios epidemiológicos gruesos sugirieron que en climas cálidos los trofozoitos de *E. histolytica* originaban amibiasis invasiva en uno de cada 5 individuos infectados, mientras que en climas templados sólo uno de cada millón de individuos infectados desarrollaban la enfermedad.

La amibiasis sigue siendo un problema social y de salud importante, sobre todo en países en vías de desarrollo, donde las condiciones de salubridad inadecuadas junto con la pobreza e ignorancia, se combinan para sostener una alta incidencia de amibiasis invasiva en niños, y de abscesos hepáticos en adultos. Ambas formas de amibiasis pueden ser fatales si no existe un diagnóstico rápido y un tratamiento adecuado.

En las últimas dos décadas han resurgido el número de investigaciones sobre la amibiasis. Esto se debe, en parte, a un reconocimiento mundial de la necesidad de estudiar los aspectos básicos de la biología del parásito y también al desarrollo de un método para cultivar la forma adulta de *E. histolytica* en condiciones axénicas (Diamond, 1968). Por otro lado los avances en la biología molecular ocurridos en la

última década ofrecen una alternativa valiosa para estudiar diversos aspectos que no se han resuelto por técnicas convencionales. *E. histolytica* ha sido considerada tradicionalmente como un organismo primitivo y anaerobio, ya que carece de mitocondrias y de otros organelos asociados con células eucariotes superiores (Martínez- Palomo, 1982). La falta de conocimiento sobre ploidía y recombinación, al igual que la ausencia de sexo en *E. histolytica* han impedido que se realicen estudios de genética convencionales.

a2- *E. histolytica*- agente etiológico de la amibiasis

Entamoeba histolytica es la causa de altos niveles de morbilidad y mortalidad por amibiasis en países en vías de desarrollo, y está clasificada como el tercer agente patológico parasitario más importante, después de la malaria y la esquistosomiasis; se estimó en el año de 1981 que cerca de 500 millones de individuos se infectan anualmente por *E. histolytica* (Walsh, 1986). La mayoría de las infecciones son asintomáticas y aparentemente no patogénicas. Se piensa que en estos casos, ocurre una erradicación espontánea del parásito en un lapso de meses (Nanda y col., 1984). Sin embargo, un 10% de los casos desarrollan amibiasis invasiva en donde los síntomas van desde una diarrea media y transitoria hasta una colitis ulcerativa crónica (Reed y Braude, 1988). En algunos casos, ocurre una diseminación por el torrente sanguíneo que resulta en la producción de abscesos amibianos extraintestinales, principalmente en el hígado. Alrededor de 75000 muertes al año se deben a una amibiasis invasiva (Guerrant, 1986). El ser humano es el único reservorio y fuente de la infección.

a3- Patogenicidad de las infecciones por *E. histolytica*

Dos de los aspectos más desconcertantes de *E. histolytica* son la variabilidad considerable de su potencial patogénico y la restricción de la amibiasis invasiva a ciertas áreas geográficas, pese a la distribución mundial del parásito. *E. histolytica* comprende tanto cepas no patógenas como cepas patógenas, éstas últimas con diferentes grados de virulencia. Las cepas más virulentas son prevalentes en regiones en donde la amibiasis invasiva es común, mientras que las de baja virulencia presentan una distribución más cosmopolita. La pregunta obvia que surgió entonces fue si las amibas aisladas de infecciones sintomáticas o asintomáticas representaban grupos genéticamente distintos o

dos fenotipos potencialmente interconvertibles del mismo organismo (Sargeant, 1987; Mirelman, 1987a). Aunque trabajos recientes sugieren fuertemente que estos dos grupos representan identidades separables genéticamente (Tannich y col., 1989), existen reportes de ciertos aislados no patogénicos que son capaces de convertirse en formas patógenas *in vitro* (Mirelman y col. 1986b; Mirelman y col., 1986a), que deberán revisarse con detenimiento.

B-Biología celular de *E. histolytica*

b1- Ciclo de vida

E. histolytica tienen un ciclo de vida que consiste fundamentalmente en cuatro estadios consecutivos que son, el trofozoito, el prequiste, el quiste y el metaquiste. El **trofozoito** es el estado adulto móvil de la ameba. Mide de 15 - 30 μm de diámetro y habita en el intestino grueso la mayor parte del tiempo como comensal. El trofozoito se multiplica por división binaria (Schaffer y col, 1961) y se enquistan cuando las condiciones del medio se vuelven adversas. El **prequiste** es un estado intermedio entre el trofozoito y el quiste y se caracteriza porque presenta una actividad retardada, sin refringencia. Su forma es oval y es más pequeño que el trofozoito. Durante la maduración a quiste secreta progresivamente una cápsula de quitina (Cleveland y Sanders, 1930). El **quiste** es la forma infectiva del parásito. El quiste es inmóvil y mide de 10 a 20 μm de diámetro. Contiene cuatro núcleos y tiene una pared de quitina que lo protege del medio ambiente (Cleveland y Sanders, 1930). El **metaquiste** es un estado intermedio entre el quiste y el trofozoito y aparece una vez que el quiste llega al intestino grueso y se va deshaciendo de la pared de quitina para terminar dividiéndose en cuatro u ocho trofozoitos (Arroyo- Begovich y col. 1980). Los quistes se ingieren oralmente a partir de agua o alimentos contaminados y se desenquistan en el intestino grueso. La colonización de la superficie de la mucosa por el trofozoito puede conllevar a la invasión de tejidos y a la enfermedad; el ciclo se completa por el enquistamiento del trofozoito y la excreción de los quistes. El trofozoito, o la forma móvil del parásito, no es infectivo; su vida media es corta fuera del hospedero, y no resiste el ácido clorhídrico y las enzimas digestivas del tracto gastrointestinal. Los quistes, por el contrario, sobreviven en las heces por varios días.

b2- Morfología y ultraestructura

El trofozoito es una célula dinámica y pleiomórfica, cuya forma y movilidad son sumamente sensibles a cambios físicos y químicos del ambiente. Su forma es elongada y presenta lobopodios, bocas endocíticas y a veces un uroide posterior, que se ve como una cola formada por pliegues irregulares de membrana y de filopodios (González-Robles y Martínez-Palomo, 1983). En la superficie basal hay proyecciones filamentosas (filopodios) de varios micrómetros de longitud. Se sugiere que estos filopodios puedan estar involucrados en la fijación al epitelio intestinal.

La membrana plasmática tiene un espesor de 10 nm y está cubierta en la superficie externa por una capa delgada compuesta de glicoproteínas (Martínez-Palomo, 1982); se piensa que la capa de superficie contiene residuos de manosa y glucosa expuestos, ya que la lectina concanavalina A se une a la superficie ambiana (Martínez-Palomo y col., 1973). Como resultado de una interacción con ligandos específicos, los componentes de la capa de superficie se redistribuyen y acumulan en la parte posterior de la célula, en el uroide, para posteriormente ser eliminados al medio. La propiedad de redistribuir los componentes membranales en un polo específico de la célula se conoce como fenómeno de "capping". Aún en ausencia de ligandos específicos, ocurre una muda continua de los componentes de superficie en los trofozoitos activos. Se sugiere que ambos fenómenos, la muda y el "capping", estén involucrados en la evasión de la respuesta inmune (Calderon y col., 1980; Kettis y Sundquist, 1978).

Los trofozoitos adecuadamente fijados y observados en el microscopio electrónico muestran dos tipos de especializaciones transitorias en la superficie: evaginaciones (pseudopodios que consisten de lobopodios, filopodios y del uroide posterior) e invaginaciones (vacuolas fagocíticas y pinocíticas). Estas diferenciaciones pueden ocurrir en cualquier momento en la superficie ambiana. Las evaginaciones están relacionadas con la movilidad y unión de la célula, mientras que las invaginaciones están relacionadas con diversos procesos endocíticos que le permiten a la ameba incorporar material líquido y particulado a su citoplasma (Martínez-Palomo, 1982).

El endoplasma presenta abundantes vacuolas embebidas en una matriz citoplásmica. Por microscopía electrónica se han identificado diferentes tipos de vacuolas citoplásmicas: vacuolas fagocíticas, macropinocíticas, lisosomas primarios y secundarios, cuerpos residuales y vacuolas autofágicas (Martínez-Palomo, 1982; Aley y col., 1984; Ravdin y col., 1986). Muchas de ellas contienen enzimas lisosomales,

algunas unidas a la cara interna de la membrana vacuolar. La organización submicroscópica del citoplasma se caracteriza por la ausencia de organelos diferenciados presentes en las células eucariotes típicas- mitocondrias, aparato de Golgi, retículo endoplásmico y centriolos. Los ribosomas están organizados en arreglos helicoidales, que se agregan en inclusiones cristalinas grandes y constituyen los 'cuerpos cromatoides' que se ven en el microscopio de luz (Dobell, 1919). Bajo el microscopio electrónico los cuerpos cromatoides muestran un claro patrón hexagonal. En los trofozoitos de *E. histolytica* las helices se encuentran frecuentemente asociadas a vacuolas digestivas (Rosenbaum y Wittner, 1970). Se han identificado estructuras filamentosas parecidas a filamentos de actina, aunque esta proteína tiene características propias (Meza y col., 1983).

El núcleo del trofozoito tiene un diámetro de 4-7 μm , y se caracteriza por la ausencia de nucleólo y la presencia de cromatina periférica bien definida. La membrana nuclear interna está cubierta de aglomerados de cromatina uniformemente distribuidos que le dan al núcleo la apariencia de un anillo en secciones ópticas (Fig.1; Dobell, 1919). El cariosoma o endosoma es una masa pequeña y esférica, de 0.5 μm de diámetro, y está localizado en la parte central del núcleo. Se especula que el endosoma pueda ser el sitio de condensación de DNA, previo a la segregación. El mecanismo de división nuclear de *Entamoeba histolytica* sigue siendo uno de los aspectos más oscuros de la biología del parásito. Es un hecho que la división nuclear sigue su curso sin disolución de la membrana nuclear (Martínez- Palomo, 1982; Cervantes y Martínez- Palomo, 1980), y sin la formación de cuerpos nucleares distintivos, los cuales estarían unidos a los cromosomas eucariotes típicos.

No se han descrito organizadores nucleolares como sitios de síntesis de RNAr característicos de los núcleos de los eucariotes; sin embargo en la periferia interna de la pared membranal del núcleo de *E. histolytica* existen aglomerados de cromatina periférica. Al marcar los núcleos con dos diferentes nucleótidos (UTP-U y TTP-T), se demostró que el T se distribuyó aleatoriamente en el núcleo y principalmente en el endosoma, en tanto que el U se acumuló fundamentalmente en la llamada cromatina periférica (Albach y col., 1980). Por otro lado, por hibridizaciones *in situ* con una sonda específica contenida dentro del episoma ribosomal (ver más adelante), se demostró que los genes de RNA ribosomal se localizan en la cromatina periférica

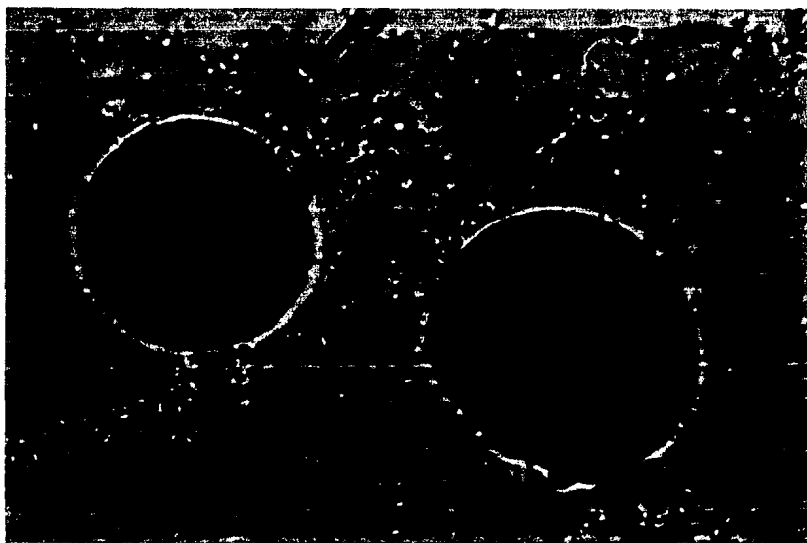
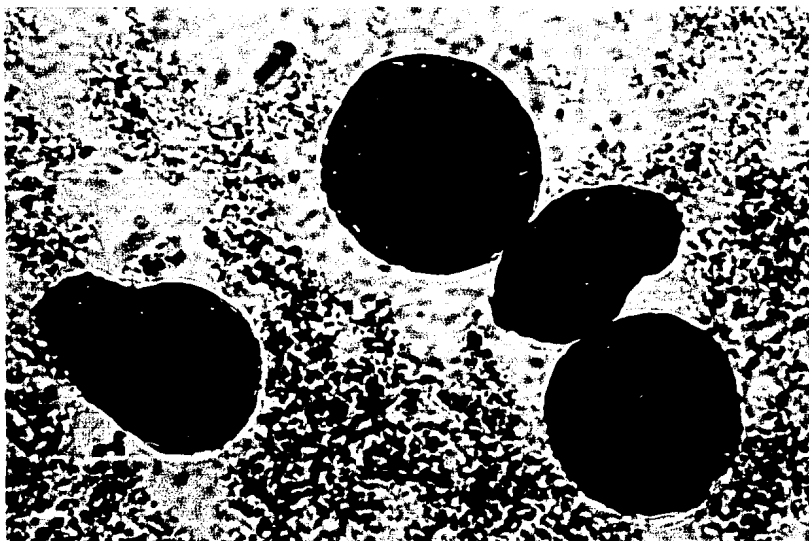


Fig. 1. Trofozoitos de *E. histolytica* en cultivo axénico (cepa HK9).
Microscopía óptica (40X) con tinción de Iodo. (Cortesía de Estefan Miranda)

(Zurita y col. 1991). Estos estudios sugieren fuertemente que esta estructura es la contrapartida del nucleólo eucariote, mientras que el endosoma es el sitio de condensación del DNA (heterocromatina).

b3-Metabolismo

Los trofozoitos de *E. histolytica* no son anaeróbios absolutos, como se pensaba tradicionalmente. Las amibas son capaces de consumir oxígeno, pese a que no tienen mitocondrias, y pueden crecer en atmósferas con 5% de oxígeno. Por debajo de esta concentración de oxígeno, las amibas son capaces de detoxificar los productos de reducción del oxígeno (McLaughlin y Aley, 1985). El metabolismo del trofozoito es peculiar, ya que es un aerobio facultativo. Este metabolismo resulta ventajoso para el parásito, ya que le permite alternar entre un medio ambiente con una baja tensión de oxígeno propia del lumen intestinal, y un ambiente sumamente oxigenado característico de tejidos sólidos y altamente irrigados como el hígado. Los carbohidratos son la fuente principal de energía del parásito. La captación de glucosa involucra un sistema de transporte específico, que le permite incorporar 100 veces más glucosa que por vía endocítica. El catabolismo amibiano de la glucosa difiere del de otros organismos eucariotes, dado que carece de mitocondrias, citocromos y ciclo de Krebs, y contiene enzimas glicolíticas poco comunes. La amiba utiliza el pirofosfato inorgánico como fuente de energía, en tanto que a éste se le considera generalmente como un producto final del metabolismo (Martínez- Palomo, 1982; McLaughlin y Aley, 1985).

C-Organización del genoma

c1-Cromosomas

Debido a la ausencia de un estado de condensación nuclear durante la división, no conocemos el cariotipo de la amiba. Existen estudios de microscopía electrónica en cultivos sincronizados con colchicina que reportan de 4 a 5 cuerpos electrón-densos que podrían corresponder a cromosomas (Solis y col, 1986), aunque un estudio más reciente, usando el mismo sistema, reporta de 12 a 16 estructuras parecidas a cromosomas asociadas a arreglos de microtúbulos (Orozco y col, 1988). La técnica de electroforesis en pulso (PFGE) parecía muy prometedora, ya que ofrece la resolución de moléculas de DNA gigantes (100-2000kb) en geles de agarosa; con este sistema se

ha documentado el tamaño de los cromosomas de varios protozoarios. Empero, los cromosomas de *E. histolytica* no han podido resolverse del todo (Meza y col, 1990).

c2- DNA extracromosomal: el episoma ribosomal

Dentro de la organización genómica de *E. histolytica* destaca una molécula de DNA circular, con características de replicación autónoma, que contiene los genes que codifican para el RNAr. Cada célula cuenta con 200 copias de esta molécula, cuyo tamaño es de 24.6 kb (Huber y col., 1989; Bhattacharya y col., 1989). Los genes ribosomales mapean en dos regiones inversamente repetidas de por lo menos 5.2 kb, cada una de las cuales representa un solo cistrón ribosomal. Hay evidencias, a partir de ensayos tipo southern de geles de bajo porcentaje de agarosa (Bhattacharya y col 1989) y de geles de PFGE (Valdez y col, 1990), de que existe por lo menos una copia cromosomal de los genes ribosomales.

c3- Análisis del DNA- Contenido de DNA y porcentaje de GCs

La caracterización del DNA de *E. histolytica* se facilitó con la introducción de un método que permite cultivar los trofozoitos en condiciones axénicas (Diamond, 1968). Esto permitió estudiar el DNA amibiano en ausencia de DNA bacteriano. Sin embargo, es importante señalar que se requiere de cierto cuidado para extrapolar los datos de la expresión génica obtenidos con amibas cultivadas bajo condiciones axénicas con los de las amibas que habitan en un ambiente xénico en el lumen de intestino, especialmente por la influencia que ciertas bacterias tienen en la modificación de la virulencia amibiana (Mirelman, 1987; Mirelman y col, 1990; Phillips y Gorstein, 1966).

Se han reportado valores de contenido de DNA que son bastante variables; por ejemplo, el contenido de DNA de la cepa HK9 fluctúa de 0.45 a 1.5 pg/célula (Lopez- Revilla y Gomez, 1978; Gelderman y col., 1971), el de la cepa NIH:200 fue de 0.4 pg por célula (Reeves y col., 1971); en contraste, el contenido de DNA de la cepa HM2 fluctuó entre 3 y 8.9 pg por célula (Lopez- Revilla y Gomez, 1978). Aunque este reporte merece confirmarse, se ha sugerido que cambios en ploidia, posiblemente a través de trofozoitos multinucleados, estén involucrados en esto (López-Revilla y Gómez, 1978). El DNA amibiano contiene un alto porcentaje AT; los valores del porcentaje GC del DNA para HK9 van de 22.4% a 24% (Lopez- Revilla y Gomez, 1978), comparado con

Revilla y Gómez, 1978).

c4- Características de la organización génica

Edman y col. y Huber y col., en 1987, reportaron independientemente la clonación de un gen de actina amibiano y describieron su secuencia. El gen de actina es uno de los genes que se transcriben abundantemente, y representa el 1% de las clonas de un banco de cDNA. El análisis del cDNA de *E. histolytica* mostró una fuerte preferencia para los residuos A o T en la tercera posición de un codon. Esto ocurre en una frecuencia de 83%, en contraste con un 30% para la actina humana. El análisis de la clona genómica de actina mostró que la secuencia codificadora es idéntica a la secuencia del cDNA y que no tiene intrones. La longitud de la region 3' no transcrita varió en un número de clonas, y se encontraron señales de poli-adenilación tanto típicas como atípicas. La región 5' no transcrita fue constante y relativamente pequeña (11 nucleótidos). Estas observaciones, junto con la aparición de bandas múltiples en ensayos tipo southern, sugirieron que existe una familia multigénica compuesta de 4 a 7 miembros. Se han observado estas mismas características en las secuencias que codifican para otros dos genes, la apoferrredoxina y el antígeno de superficie de 125 Kd (Huber y col., 1988; Edman y col., 1990).

c5- RNA ribosomal

Albach y col., en 1984 describieron para la cepa HK9 especies de RNAr con coeficientes de sedimentación de 4S, 17S y 25S con una relación 1:2:3. El RNAr 25S se disocia a 55°C a los productos 5.8S, 16S y 17S, lo cual indica que las moléculas no están unidas covalentemente *in vivo* (Boonlayangoor y col., 1978; Barker y Swales, 1972). También se ha detectado una especie de RNAr 5S (Albach y col., 1984).

c6- DNA repetido

de la Cruz-Hernández y col. en 1986 fueron los primeros que observaron la presencia de más de una banda en DNA total digerido con *Eco* RI y *Hind* III en geles de agarosa. Bhattachayra en 1988 realizó un estudio más extensivo, y analizó el DNA repetido de 5 cepas de *E. histolytica* y otras especies de *Entamoeba*. En ensayos tipo southern las bandas principales observadas en los geles de agarosa hibridaron con sondas ribosomales de *Plasmodium berghei*; con estos datos concluyeron que el DNA ribosomal comprendía una proporción mayoritaria del DNA repetido, y por lo menos el

ribosomal comprendía una proporción mayoritaria del DNA repetido, y por lo menos el 10% del DNA total de *E. histolytica*.

D- Diferenciación molecular de cepas patógenas y cepas no patógenas

d1- Secuencias ribosomales

Existen regiones dentro del episoma ribosomal que contienen secuencias de DNA altamente repetido; destaca un elemento de 145 pb (p145), el cual hibridizó exclusivamente con DNA de aislados patogénicos bajo condiciones estrictas. Este fue el primer ejemplo de una secuencia de DNA específica de cepas patógenas de *E. histolytica*, y conjuntamente se reportó una sonda análoga, B133, aislada de un banco genómico de una cepa no patógena, con especificidad exclusiva para esta forma. Existe un 43.6 % de homología entre p145 y B133 (Garfinkel y col., 1989).

d2- Divergencias genotípicas

Existen varios reportes que documentan diferencias en la organización genómica y en la secuencia nucleotídica de varios genes estructurales en cepas de *E. histolytica* patógenas y no patógenas. Tannich y col. en 1989 identificaron una clona de cDNA específica de amibas patógenas buscando en un banco con suero de pacientes con amibiasis previamente absorbido con amibas no patógenas. Al comparar la secuencia nucleotídica de esta clona con su homóloga proveniente de amibas no patógenas, encontraron una divergencia de 12% entre las dos clonas. La hibridización en ensayos tipo southern con aislados patogénicos y no patogénicos de *E. histolytica* produjo un patrón de bandeado característico específico de cada forma.

De igual forma, Cruz-Reyes y col. demostraron la existencia de RFLP específicos de cepas patógenas dentro del cistrón de los genes ribosomales. Estos reportes, junto con los de Tannich y col., 1991 y los de Edman y col. en 1990, apoyan la propuesta inicial de Sargeant en 1987 de que las dos formas de *E. histolytica* representan dos especies genéticamente distintas.

II-Antecedentes

A. Generalidades sobre la transcripción de los genes de DNA ribosomal

En la mayoría de los eucariotes, los genes de RNA ribosomal son las secuencias de DNA que dirigen la formación de la molécula precursora 35-47S, la cual se procesa para dar los componentes 17-18S, 5.8S y 28S del ribosoma maduro. El RNA ribosomal precursor se sintetiza en un compartimiento especial dentro del núcleo, el nucleolo, y es el producto de síntesis único de la RNA polimerasa I (RNA pol I; Palmer, y col., 1990). Otra característica importante de estos genes es que existen en copias múltiples, con el fin de satisfacer los diversos requerimientos de desarrollo y fisiológicos de la célula. La transcripción de los genes ribosomales controla la velocidad de ensamblaje del ribosoma, y se regula en respuesta a señales relacionadas con el control del crecimiento celular (Sollner-Webb, 1991). En la mayoría de los metazoarios, las unidades transcripcionales de los DNAr están localizadas en DNA cromosómico. La organización típica consiste en arreglos en tandem, en donde las regiones que codifican para el transcrito primario de 7-14 kb están separadas por regiones espaciadoras que no se transcriben de 2-30 kb (Fig. 2; Amaldi y col., 1989; Long y col., 1980). En varias especies de protozoarios, sin embargo, el DNAr presenta una organización y localización diferente que consiste en moléculas lineares o circulares extracromosomales (Long y col., 1980; Clark y col., 1987; Ravel-Chapuis y col., 1985).

Se ha estudiado la transcripción de los genes ribosomales por la RNA pol I en muchas especies, que van desde *Acantamoeba* hasta el humano (Iida y col, 1985; Reeder y col., 1983; Culotta y col, 1985; Culotta y Sollner-Webb, 1985; Miesfield y Arnheim, 1984), y se han descrito los elementos mínimos de secuencia involucrados en promover la síntesis de RNAr (Sollner-Webb y Tower, 1986). Pese a que no se encontró homología en la secuencia que constituye la región promotora de diferentes organismos, existe una organización estructural común; esta organización consiste de un dominio central alrededor del sitio de inicio de la transcripción, el cual es esencial para una iniciación precisa, y de elementos de control hacia arriba del dominio central, los cuales se requieren para una iniciación de la transcripción eficiente (Sollner-Webb, 1991; Sollner-Webb y Tower, 1986; Fig. 3).

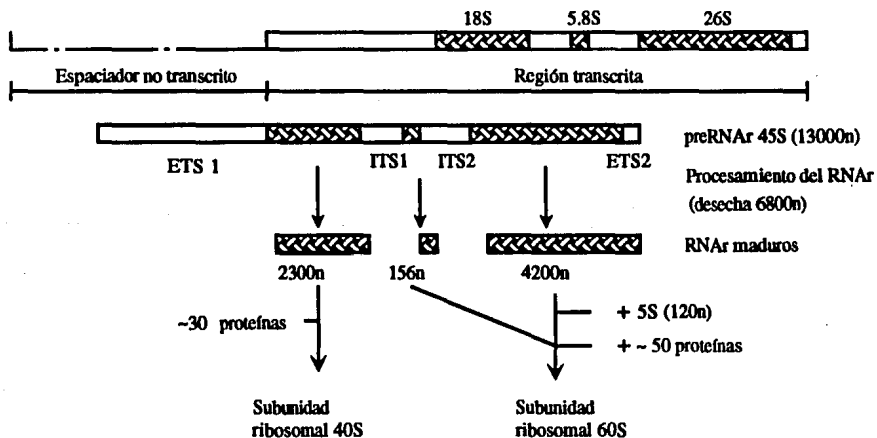
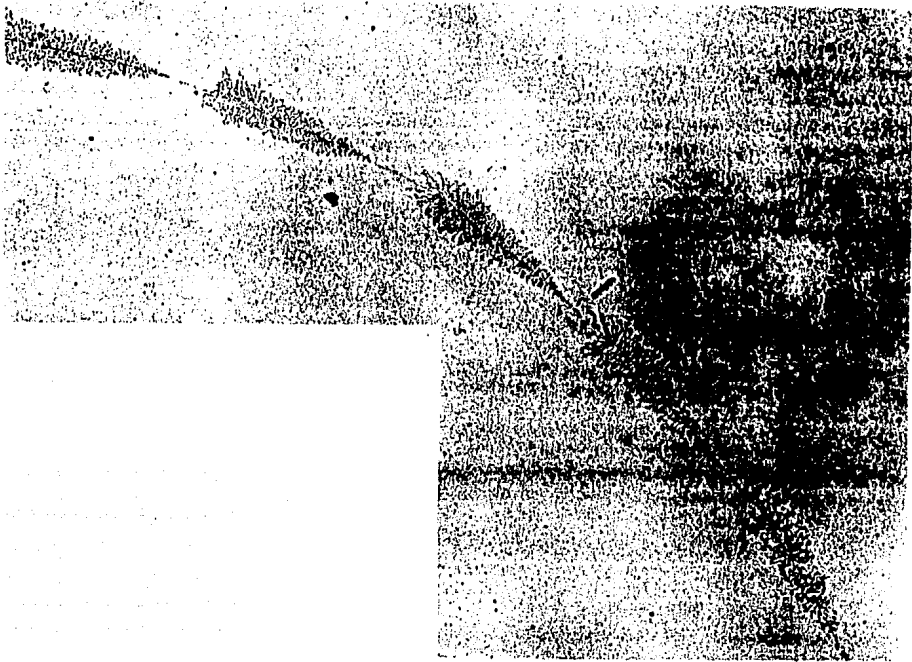


Fig. 2. Organización de la unidad transcripcional de los RNAr. La micrografía electrónica muestra la cromatina ribosomal transcribiéndose. Se ven estructuras parecidas a árboles de navidad, que corresponden a unidades transcripcionales individuales. En el esquema se ilustra la región espaciadora no transcrita y la región transcrita, dentro de la cual se muestra la organización de los genes 18S, 5.8S y 26S. El esquema también muestra los pasos involucrados en la transformación de la molécula precursora 45S a la molécula madura. ETS, espaciadores externos transcritos, ITS, espaciadores internos transcritos (Watson y col., 1987).

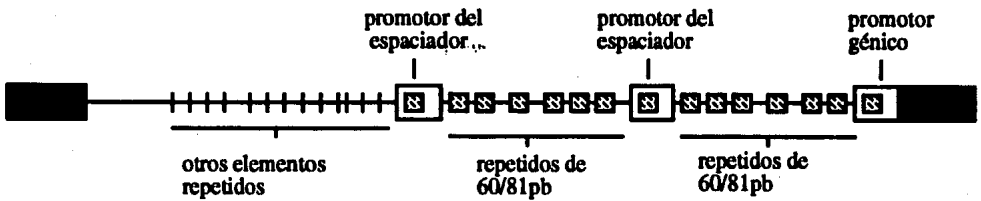


Fig. 3. Región espaciadora no transcrita de los RNAs de *Xenopus laevis*.

La figura muestra que la mayor parte del espaciador está compuesta de secuencias relacionadas con el promotor verdadero. Los cuadros pequeños representan repeticiones imperfectas de una secuencia de 42 pb localizada entre la posición -72 y -114 del sitio de inicio de la transcripción. Los cuadros grandes son duplicaciones imperfectas de la región promotora. También están señalados otros elementos repetidos que no están relacionados con la secuencia del promotor. La secuencia que compone al promotor se refiere al dominio central, y los elementos repetidos que se ilustran se refieren a los elementos de control hacia arriba del promotor.

En células animales, se han descrito por lo menos dos factores transcripcionales necesarios para dirigir la transcripción precisa y específica del promotor de los genes de DNAr, que son el factor de selectividad del promotor, SL1, y un factor que se une hacia arriba de la región promotor, el UBF (Upstream Binding Factor, Bell y col., 1988; Learned y col., 1985, 1986). El UBF de humano es un polipéptido de 94/97 kd que es capaz de reconocer y unirse específicamente a elementos de control hacia arriba del promotor, ricos en GC, y a la región central del promotor de los RNAr. La reciente clonación del cDNA que codifica para el UBF mostró dominios funcionales múltiples, incluyendo un motivo de unión a DNA con homología a la región que une DNA presente en las proteínas nucleares pertenecientes al grupo de alta movilidad (HMG; Bell y col., 1988). UBF es el único factor transcripcional de la RNA pol I necesario para la unión inicial al promotor, y la especificidad de este factor de reconocimiento por el promotor está conservada a través de especies tan diversas como el hombre y *Xenopus* (Bell y col., 1989; Pikaard y col., 1989). El segundo factor necesario para la transcripción precisa por la RNA pol I, SL1, no se une directamente al promotor (Learned y col., 1985). Sin embargo, cuando ambos factores UBF y SL1 están presentes, se forma un fuerte complejo que une DNA, con una extensión concomitante de la región de DNA reconocida por el complejo, el cual es crítico para la iniciación de la transcripción (Bell y col., 1990; Learned y col., 1986). La transcripción del RNAr es especie -específica (Grummt y col., 1982), y se ha demostrado que SL1 es el factor especie -específico responsable de dirigir la transcripción del promotor homólogo (Bell y col., 1990, 1989). Parece, entonces, que la clave de la especificidad transcripcional de la RNA pol I radica en las propiedades de SL1 y su interacción con UBF y el templado de DNA.

Recientemente, Comal y col. (1992) reportaron la caracterización del factor de selectividad SL1, que consiste de un complejo compuesto de varias subunidades que contiene el TBP (TATA-binding protein) de 38 kd asociado a tres diferentes polipéptidos (TAFs, TBP-associated factors), esenciales para reconstituir la transcripción *in vitro*. Este hallazgo tiene importantes implicaciones ya que indica la existencia de un mecanismo común involucrado en el reconocimiento de los promotores en las células animales. El factor de transcripción esencial de la RNA polimerasa II, TFIID, aislado de células animales contiene una actividad TBP responsable de reconocer y unirse al elemento TATA box, una secuencia de control presente en casi

todos los promotores de los genes que codifican para proteínas (Stringent y col., 1990; para revisión, ver a Greenblatt, 1991). El TBP sólo representa una subunidad de un complejo de factores asociados (TAFs- TBP associated factors; Dynnlach y col., 1991); de hecho, estos TAFs son esenciales en ensayos de transcripción *in vitro*, y son capaces de restaurar la activación promotor-específica dirigida por una variedad de factores que se unen a 'enhancers'. El hecho que TBP también se requiriera para la iniciación transcripcional por la RNA polimerasa III del gen U6, dió la primera clave para pensar que estos factores, TBP y los TAFs estuvieran involucrados en la iniciación transcripcional por la RNA polimerasa I (Lobo y col., 1991; Simmen y col., 1991). Los resultados obtenidos con SL1 validan, pues, la noción de que diferentes complejos TBP-TAF son responsables de mediar la activación por diferentes proteínas que se unen a DNA, desempeñando así un papel de moléculas adaptadoras o intermediarias. Este hallazgo sugiere fuertemente que TBP sea un factor de transcripción universal y que la organización TBP-TAFs represente un mecanismo unificado para el reconocimiento de los promotores de las células animales. En la Fig. 4 se presenta un modelo que ilustra la participación potencial de diferentes complejos TBP-TAFs en la iniciación de la transcripción mediada por las RNA polimerasas I, II y III (tomado de Comal y col.) Se muestra que para la RNA polimerasa I hay un solo factor que une DNA, UBF, y que interactúa específicamente con el promotor de los RNAr. SL1 consiste de TBP, más tres TAFs distintos. En presencia de UBF, el complejo SL1 se une al templado extendiendo así el 'footprint' de la DNAasa hacia la región de DNA que abarca el elemento especie-específico (SSE, specie-specific element; Bell y col, 1990). Es interesante remarcar que los TAFs asociados a SL1 son diferentes de los TAFs presentes en el complejo TFIID utilizados por la RNA polimerasa II. Estos datos sugieren que la presencia de juegos diferentes de TAFs junto con TBP como un componente central común, represente un mecanismo generalizado de ensamble de diferentes complejos de iniciación.

Es importante recordar que los genes de DNAr existen y son esenciales para todo tipo de células, eucariotes y procariotes. Estos genes han sido extensamente estudiados a lo largo de los años; de hecho, y no por casualidad el primer gen que se aisló, antes de la tecnología de DNA recombinante, fue un gen de RNAr. También fue el primer gen cuyo patrón transcripcional fue analizado, uno de los primeros genes en donde se

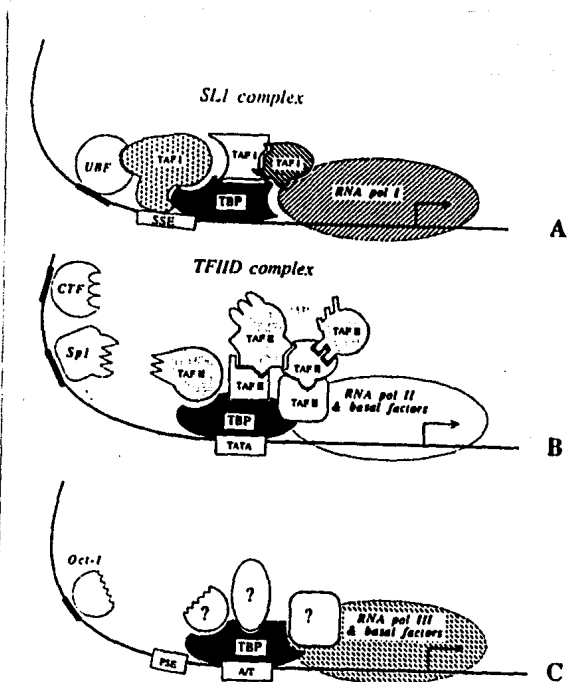


Fig. 4. Modelo esquemático que presenta el complejo TBP-TAFs involucrado en la transcripción por las RNA polimerasas I, II y III.

Se propone que TBP funciona como un factor de transcripción central que participa en la iniciación de la transcripción por los tres diferentes tipos de polimerasas y que un complejo TBP-TAF específico para cada tipo es responsable del reconocimiento específico del promotor.

A) Para la RNA polimerasa I, la formación de un complejo de preiniciación requiere, además de la RNA pol I, que el factor transcripcional UBF se encuentre unido específicamente a las secuencias promotoras en el DNA templado y SL1, el cual interactúa fuertemente con UBF. SL1 está representado como un complejo compuesto de TBP y de tres diferentes TAFs. Puesto que SL1 es el factor responsable de conferir la especie-especificidad sobre la transcripción por la RNA pol I, uno o más de uno de sus componentes debe de interactuar con el elemento especie-específico del promotor.

B) La iniciación transcripcional por la RNA polimerasa II requiere por lo menos 6 factores basales diferentes (TFIIA, TFIIB, TFIID, TFIIE, TFIIIF y TFIIH). TFIID esta compuesto de varias subunidades, de TBP, el cual se une a la caja TATA y de por lo menos 6 factores fuertemente asociados (TAFs). Algunos de estos TAFs funcionan como coactivadores que median la activación transcripcional por reguladores unidos a DNA hacia arriba, como el Sp1 y CTF.

C) El complejo de iniciación ensamblado en el promotor de la RNA polimerasa III (como el de U6) aparentemente consiste de la RNA polimerasa III, factores transcripcionales basales y de la proteína Oct-1 que se une a secuencias hacia arriba. Se ha demostrado la participación de TBP para transcribir el gen U6. Por lo tanto es posible que un complejo TBP-TAFs que interactúa con elementos esenciales del promotor sea un componente esencial del complejo de iniciación de la RNA polimerasa III. (Modelo tomado de Cymal y col, 1992)

determinó el sitio de inicio de la transcripción, y el primer gen en donde se estableció una ruta de procesamiento (revisado por Sollner-Webb y col., 1986). Recientemente, y gracias al desarrollo de sistemas de transcripción *in vitro* para la RNA polimerasa I, se han identificado las secuencias promotoras y terminadoras de varios genes de RNAr de varias especies, y ha ocurrido un avance considerable en el conocimiento de los factores que median y regulan la expresión y la maduración del transcrito primario de los RNAr.

La transcripción por la RNA polimerasa I ofrece ciertas ventajas únicas para estudiar los mecanismos de reconocimiento y activación de un promotor. En particular, la RNA polimerasa I reconoce un solo tipo de promotor en cada especie, y se ha demostrado que la presencia de SLI y UBF son suficientes para llevar a cabo la transcripción exacta y específica de los genes de RNAr. En contraste, la RNA polimerasa II y la III reconocen una enorme variedad de promotores, y en el caso de la RNA polimerasa II la formación de un complejo de activación requiere por lo menos 6 factores independientes, y los mecanismos de reconocimiento de los promotores parecen ser mucho más complejos (Sawadogo and Sentenac, 1990).

B. Genes de RNAr en protozoarios y en *E. histolytica*

Se conoce poco acerca de la organización, expresión y procesamiento de los genes de RNAr en eucariotes inferiores y en particular en protozoarios; sin embargo se han encontrado ciertas particularidades interesantes. En varias especies de protozoarios los genes de DNAr frecuentemente tienen una localización extracromosomal, y se encuentran en moléculas lineales palindrómicas o bien en forma circular (Clark, 1987; Ravel-Chapuis, 1985). Los genes de DNAr extracromosomales se replican de forma autónoma durante el crecimiento vegetativo y tienen la capacidad de proveer a la célula con enormes cantidades de RNAr. En *Tetrahymena*, por ejemplo, los genes de DNAr tienen una localización extracromosomal y provienen de una sola copia integrada al cromosoma, los cuales se amplifican durante la formación del macronúcleo después de la conjugación (Engberg y col., 1985).

Por otra parte, *Critidia fasciculata*, posee un ribosoma atípico, cuya subunidad

grande (LSU) está compuesta de 2 especies de alto peso molecular (c y d) y de 4 especies de bajo peso molecular (e,f,g y j), además del 5S y del 5.8S, y es estructuralmente equivalente al complejo binario entre el 5.8S y el 28S de los eucariotes superiores (Spencer, 1987). Un patrón similar en la organización de las especies que componen la LSU ha sido encontrado en *Leishmania tarentolae* (Simpson y Simpson, 1978), *Trypanosoma brucei* (Cordingley y Turner, 1980), y *T. cruzi* (Hernández y col., 1983). Estos datos sugieren que se trata de una característica común de los tripanomastidios. A su vez, el gen que codifica para la LSU también es discontinuo, ya que las regiones codificadoras de las 7 diferentes especies de rRNA están separadas por espaciadores transcritos internos (ITS).

Un caso sumamente interesante es el de los parásitos de la malaria, *Plasmodium berghei* y *P. falciparum*. Existen 2 unidades transcripcionales de los genes de rDNA esparcidas por el genoma, cada una con dos copias, las cuales producen moléculas de rRNA similares, pero los espaciadores intergénicos y las regiones flanqueadoras son diferentes. La transcripción de estos genes está regulada durante el desarrollo: cuando el parásito se encuentra en el estadio asexual, infectando mamíferos, se transcribe una unidad transcripcional (A) mientras que el otro transcrito (B) se encuentra sólo cuando el parásito infecta mosquitos (Gundersen y col., 1987). Esto sugiere fuertemente la existencia de un control diferencial de la transcripción de estos genes.

En cuanto a *Entamoeba histolytica*, se ha reportado que los genes de rDNA se localizan en un episoma circular, de alrededor 24.6 kb y que cada episoma contiene 2 copias de los genes de rDNA en posición repetida inversa (Fig. 5; Huber y col., 1989; Bhattacharya y col., 1989). Las regiones que separan los cistrones de rRNA contienen DNA altamente repetido, dentro del cual destaca una unidad de 145 pb, que parece ser característico de las cepas patógenas (Huber y col., 1989). Utilizando como sonda D1, la cual contiene el fragmento repetido de 145pb, en hibridizaciones *in situ* nuestro grupo mostró fuertes evidencias de que el episoma ribosomal de *E. histolytica* se mantiene durante todo el ciclo celular del trofozoito en la membrana nuclear (Zurita y col., 1991), como un componente importante de la llamada cromatina periférica. Esta observación sugiere que el episoma ribosomal pueda considerarse como un organizador nucleolar, ya que estudios previos han mostrado que la cromatina periférica es muy rica en RNA (Albach y col., 1980), como ocurre en el nucleólo de otros organismos. En este mismo trabajo, se demostró que las regiones del episoma ribosomal que mostraron

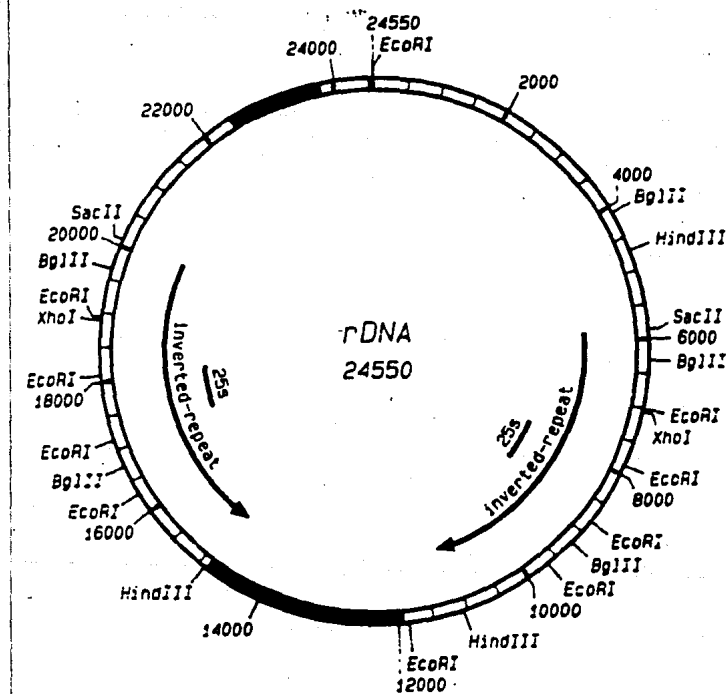


Fig. 5. Mapa circular del episoma ribosomal de *E. histolytica*. La línea negra alrededor de 14000 representa un fragmento de ~ 4 kb, que contiene sitios de restricción Dra I altamente reiterados. Los repetidos invertidos y la dirección de la transcripción de los dos cistrones de rRNA están representados por flechas. (Huber y col., 1990).

mayor sensibilidad a DNAasa I fueron los extremos 5' y 3' del cistrón ribosomal, al igual que las regiones de DNA que contenían al elemento repetido de 145 pb. Se ha descrito que las regiones involucradas en la regulación de la expresión de los genes ribosomales muestran una mayor sensibilidad a DNAasa I. Las regiones del episoma que contienen el fragmento de 145 pb podrían estar involucradas en la unión de algún factor nuclear que intervenga, ya sea en cierta función episomal o regulatoria de los genes de DNAr ('enhancer'), o bien representar puntos de recombinación. De hecho, una secuencia de 40 pb comprendida dentro del fragmento de 145 pb es reconocida específicamente por un factor protéico nuclear, de 28 Kd (Zurita y col., 1991).

C. El episoma ribosomal de *E. histolytica* como un modelo de estudio de la organización y regulación de la expresión génica amibiana.

Hemos decidido utilizar al episoma ribosomal como punto de partida para estudiar la organización y regulación de la expresión génica amibiana. Los genes de DNA ribosomal son indispensables para cualquier tipo de célula. Por ello, han sido extensamente estudiados, desde diversos puntos de vista. Por otra parte, la descripción reciente de TBP como un componente integral de SL1 indica la existencia de elementos comunes en el reconocimiento de promotores en células animales y, por ende, en la formación de complejos de iniciación de la transcripción. Dado que existen alrededor de 200 copias del episoma ribosomal por célula, esta molécula constituye un modelo interesante para iniciar el estudio de la organización y regulación de la expresión génica amibiana. El episoma ribosomal está parcialmente caracterizado, y un mapa de restricción preliminar de esta molécula ha sido reportado (Fig. 5; Huber y col., 1989). Finalmente, puesto que el episoma ribosomal presenta características de replicación autónoma (Huber y col., 1989; Bhattacharya y col., 1989), consideramos que una mejor comprensión de la organización génica y funcional de esta molécula puede ser de gran utilidad para el diseño de un vector de transformación estable para *E. histolytica*.

III-Objetivo

Estamos interesados en estudiar el mecanismo y la regulación de la transcripción de los RNAr de *E. histolytica*. Nos interesa caracterizar los elementos en cis que estén involucrados en la regulación de la transcripción de estos genes. El objetivo particular de este trabajo fue la caracterización del extremo 5' del cistrón ribosomal. Con ello, queremos iniciar la identificación y el análisis de las señales de control involucradas en el inicio de la transcripción de los DNAr de *E. histolytica*.

IV-Estrategia experimental

Para estudiar el mecanismo y la regulación de los RNAr de *E. histolytica*, es necesario aislar y caracterizar a nivel de estructura primaria una clona que contenga al extremo 5' de la unidad transcripcional. Para limitar el extremo 5' de la unidad transcripcional se realizaron ensayos tipo northern utilizando diferentes fragmentos de restricción localizados en la región 5' del cistrón ribosomal y un análisis de las cadenas de RNA naciente. Este análisis contempla la incorporación de un ribonucleótido marcado a la cadena de RNA naciente. Posteriormente, esta cadena de RNA naciente marcada se usa como sonda en un southern que contiene el DNA con los fragmentos contenidos dentro de la unidad transcripcional. El esquema I ilustra el análisis de las cadenas de RNA naciente. La localización del sitio de inicio de la transcripción (el +1) se determinará eventualmente por medio de un ensayo de extensión de primero y con un ensayo de 'capping' *in vitro*.

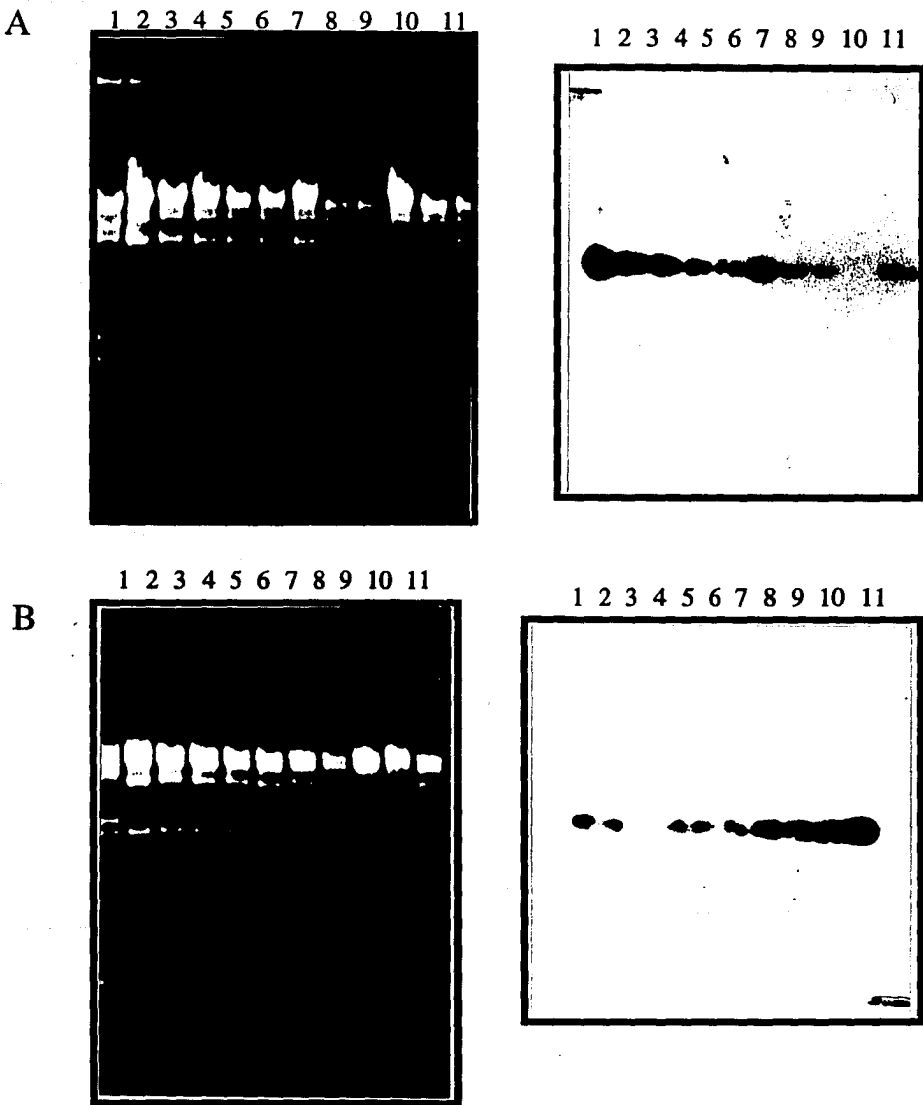


Fig. 7. Digestión de la clona 1 con *Eco* RI y con *Bgl* II.

En A, se liberó el inserto del DNA de 10 fagos recombinantes (carriles 2-11) mediante una digestión con *Eco* RI, se separó en un gel de agarosa al 1%, se transfirió a un filtro de nitrocelulosa y se hibridó con el oligo 17S. El carril 1 contiene lambda cortado con *Hind* III como marcador de peso molecular.

En B, el DNA de los fagos recombinantes se digirió con *Bgl* II, se separó en un gel de agarosa al 1%, se transfirió y se hibridó con el oligo 17S. El carril 1 contiene lambda cortado con *Hind* III como marcador de peso molecular.

V-Materiales y Métodos

Materiales

Para realizar este proyecto trabajamos con la cepa *E. histolytica* HK9¹, caracterizada por presentar un zimodemo patógeno (Said- Fernández y col., 1988). El crecimiento y el cultivo de los trofozoitos se llevó a cabo en condiciones axénicas en el medio de cultivo TYI-S-33 descrito por Diamond y col. en 1968.

Las enzimas de restricción, la DNAasa I y la nucleasa Bal 31 las obtuvimos de Boehringer Mannheim. Los nucleótidos radioactivos los obtuvimos de New England Nuclear. Las reacciones de secuencia se hicieron con un kit de Sequenasa 2 (United States Biochemical Corporation). Las manipulaciones estándar de DNA se hicieron de acuerdo a los protocolos que reportan Sambrook y col., 1989.

Obtención de ácidos nucleicos de E. histolytica

Purificación de DNA

El DNA de los trofozoitos se obtuvo cosechando los trofozoitos en fase de crecimiento logarítmica. Lavamos 2 veces con PBS. Resuspendimos el precipitado en 0.5 ml de solución de lisis con 0.5M EDTA, 20mM Tris-HCl pH 8, 0.5 % SDS y una pizca de proteinasa K. Homogenizamos vigorosamente. Posteriormente extrajimos 2 veces con un volumen equivalente de fenol/cloroformo y una vez con cloroformo y finalmente precipitamos la fracción acuosa con etanol absoluto. Lavamos el precipitado dos veces con etanol al 70% y resuspendimos el DNA en 10 mM Tris /HCl, 1mM EDTA o en H₂O desionizada estéril.

Purificación de RNA

El RNA se preparó siguiendo el protocolo descrito por Zurita y col., 1987. Brevemente, después de cosechar las amibas en fase logarítmica de crecimiento y de lavarlas dos veces en PBS, las transferimos a una solución 6 M de isotiocianato de guanidina. Homogenizamos vigorosamente y centrifugamos el homogenado con el fin de eliminar los restos celulares. Transferimos el sobrenadante a un tubo nuevo y lo precipitamos dos veces con 0.3 volúmenes de etanol. Resuspendimos el precipitado en TE (10 mM Tris/HCl pH8, 1mM EDTA) y lo extrajimos 2 veces con un volumen de fenol /cloroformo. Precipitamos el RNA con 0.1 volúmenes de acetato de sodio 3M pH4.7 y 2.5 volúmenes de etanol absoluto.

Análisis del DNA y del RNA

- ensayo tipo southern

El DNA se fraccionó por tamaño en geles de agarosa al 0.8% y se trató para transferirlo a membranas de nitrocelulosa de acuerdo al protocolo reportado por Sambrook y col., 1989.

- ensayo tipo northern

Para estos ensayos, el RNA se fraccionó en geles desnaturalizantes de agarosa con formaldehído y se transfirió a membranas de nitrocelulosa de acuerdo a Sambrook y col., 1989.

Cuando utilizamos fragmentos de DNA como sondas, hibridamos 18 hrs a 42°C en 50% formamida, 5X SSC, 1X Denhart y 100 mg de DNA de esperma de salmón . Lavamos los filtros a 55°C en 0.1X SSC y 0.1% SDS. En los experimentos que involucraron el oligo 17S como sonda, hibridamos de acuerdo al protocolo reportado por Ausubel y col., 1987.

Identificación de la clona genómica que contiene el extremo 5' del cistrón ribosomal de E. histolytica.

Se construyó un banco genómico clonando en el fago λ gt10 a partir de digestiones parciales y totales del DNA de HK9 con la enzima *EcoRI*. Este banco contiene alrededor de 5×10^5 clonas recombinantes independientes y el tamaño promedio de los insertos es de 3 kb. Diseñamos un oligonucleótido específico para la secuencia del gen 17S ribosomal de *E. histolytica*, la cual nos fue proporcionada gentilmente por el Dr. M. Sogin, tomando como condición que no hibridara con el gen 16S ribosomal de *E. coli* (Brosius y col., 1981). El oligonucleótido 17S es complementario a los nucleótidos 251-273 de la secuencia del gen 17S de *E. histolytica*. Utilizamos el oligo 17S como sonda en el banco genómico para así identificar y aislar la clona que contiene el extremo 5' del cistrón ribosomal. El protocolo de hibridación en placa que utilizamos fue el de Sambrook y col., 1991.

Análisis de la secuencia de DNA

La estrategia de secuenciación está ilustrada en la Fig. 5. El fragmento a (*Hind* III-*Xba* I) y el fragmento b (*Bam* HI- *Hind*III) se insertaron en los sitios *Hind* III y *Xba* I y en *Bam* HI y *Hind* III del M13 mp19 y del M13mp18 y se generaron así cuatro subclonas independientes. Se utilizó el oligo 17S como primer para las

reacciones de secuencia del fragmento a. Para secuenciar el fragmento c, este fragmento (*Eco*RI-*Bgl*II) se insertó entre los sitios *Eco*RI-*Bam*HI del vector pBluescript KS (clona p-3.4) y utilizó como fásmido para producir templado de cadena sencilla. Utilizamos las enzimas *Hae* III y *Alu* I para generar fragmentos de la clona p-3.4. Por hibridaciones en southern usando RNA marcado como sonda, identificamos un fragmento *Hae* III de 1.7kb y un fragmento *Alu* I de 1.4 kb que forman parte de la unidad transcripcional. Para secuenciar cada uno de estos fragmentos se insertaron en los sitios *Sma*I del m13mp18. Las reacciones de secuencia se realizaron siguiendo el método de Sanger y col., 1977.

Ensayo de RNA naciente

Se prepararon núcleos de un cultivo de trofozoitos en fase logarítmica de crecimiento rompiendo las células en una solución de lisis (15 mM Tris/HCl, pH 8, 15 mM NaCl, 0.25 mM Cl_2Mg y 0.5% NP40) con un homogenizador manual. El lisado se colocó en 9 ml de un colchón de sacarosa 1M (10mM Tris/HCl, pH 8, 1mM EDTA) y se centrifugó a 5000g X 10 min a 4°C. Los núcleos se congelaron en una solución apropiada (50 mM Tris/HCl pH 8.0, 75mM NaCl, 0.5 mM EDTA pH 8.0, 200 μ M de PMSF, 5 mM DTT y 50% glicerol) y se guardaron en nitrógeno líquido. El RNA naciente se marcó siguiendo el protocolo de Kooter y col., 1987. Los núcleos se descongelaron en hielo, se centrifugaron para eliminar la solución de congelación y se resuspendieron en Tris/HCl 100mM pH8, NaCl 0.5 mM, KCl 50mM, $MgCl_2$ 2mM, $MnCl_2$ 4mM, Espermidina 0.15mM, DTT 2 mM y glicerol al 25%. La reacción de elongación se inició con la adición de ATP 2mM, GTP 2mM, CTP 2mM, 10mM UTP y 0.2-0.5 mCi de [^{32}P]-UTP (3000Ci/mmol) en un volumen final de 100 μ l. La reacción se incubó 20 min a 37°C al cabo de los cuales se añadieron 27U de DNAsa I y se prosiguió la incubación a 37°C por 5 min más. Se paró la reacción con la adición de un volumen equivalente de Tris/HCl pH8 10mM con EDTA 1mM, SDS1% y 0.5mg/ml de proteinasa K e incubando 15 min a 37°C. Finalmente se extrajo con fenol /cloroformo y el RNA se separó de los radionucleótidos libres pasándolo a través de una columna de Biogel P-10. El RNA naciente marcado se utilizó como sonda en southern de acuerdo a Kooter y col., 1987.

VI- Resultados

Diseño de un oligonucleótido específico del gen 17S

Para aislar una clona del banco genómico de HK9 en λ gt10 que contuviera el extremo 5' del cistrón ribosomal, diseñamos un oligonucleótido que reconociera específicamente la secuencia del gen 17S ribosomal de *E. histolytica* (Sogin, comunicación personal). Puesto que la secuencias de los genes ribosomales están conservadas en diferentes especies, un requisito importante del oligonucleótido era que no hibridara con el gen 16S de *E. coli*. Realizamos un alineamiento de la secuencia del 16S de *E. coli* y del 17S de *E. histolytica* y escogimos la región comprendida entre los nucleótidos 251 y 273 del gen 17S ribosomal de *E. histolytica* como blanco del oligonucleótido 5'-GTGTTCTACAATTGTCGTGG-3'.

Southern de DNA total de *E. histolytica* utilizando el oligonucleótido 17S como sonda

Al digerir el DNA total de *E. histolytica* con ciertas enzimas de restricción, se obtiene un patrón de bandas característico, que corresponde a los sitios de restricción presentes en el DNA altamente repetido. Se ha demostrado que este DNA presente en un alto número de copias corresponde a DNA ribosomal (Bhattachayra y col., 1989). Con el fin de probar la especificidad del oligonucleotido 17S, se hizo un experimento tipo southern, en donde el DNA de la cepa HK9 se digirió con *Eco* RI, *Bgl* II y *Hind* III. En los carriles 2, 3 y 4 de la Fig. 6, podemos observar las bandas que se generan al digerir el DNA con estas enzimas de restricción y someterlo a una electroforesis en gel de agarosa al 1%. En los carriles 5, 6 y 7 de la Fig. 6, se presenta la hibridización del oligo 17S con el southern que contenía los fragmentos de restricción del DNA de *E. histolytica*. El oligo 17S hibridó fuertemente con un fragmento de 2 kb generado con *Bgl* II, con un fragmento de 6.4 kb generado con *Eco* RI y con un fragmento de 6.0 kb generado con *Hind* III. A partir del mapa de restricción reportado por Huber y col., y asumiendo que el episoma de HK9 fuera idéntico al de la cepa HM1, se esperaba que el oligo 17S hibridara con más de una banda en las diferentes digestiones del DNA de HK9. Sin embargo, sólo hibridó una banda en cada una de las digestiones examinadas.

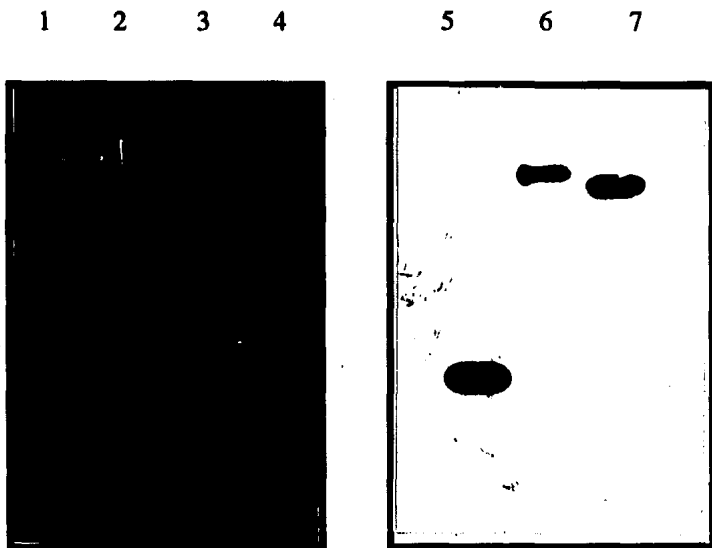


Fig. 6. Southern del DNA total de *E. histolytica* (HK9) cortado con *Eco* RI, *Bgl* II y *Hind* III, hibridizado con el oligonucleótico 17S. Los carriles 2, 3 y 4 muestran el DNA digerido con *Eco* RI, *Bgl* II y *Hind* III, respectivamente, en un gel de agarosa teñido con bromuro de etidio, y los carriles 5, 6 y 7 la hibridación del southern de este gel con el oligo 17S. El carril 1 contiene DNA del fago lambda cortado con *Hind* III/ *Eco* RI como marcador de peso molecular.

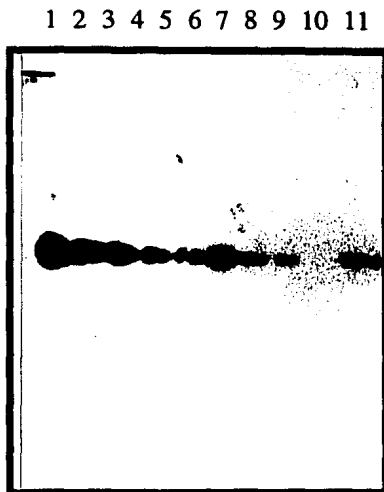
Búsqueda en el banco genómico del fragmento de DNA que contiene el extremo 5' del cistrón ribosomal

Posteriormente se decidió utilizar el oligo 17S como sonda en un banco genómico de HK9 en λ gt10 para aislar la clona que contiene al extremo 5' del cistrón ribosomal. Para ello, se infectó la cepa Hfl-C600 con el banco genómico en λ gt10, se transfirieron las placas a nitrocelulosa por duplicado y se hibridó con el oligo 17S. Se aisló una placa positiva y se volvió a infectar la cepa Hfl-C600. Se aislaron varias placas positivas y se purificó el DNA recombinante de los fagos. Se cortó el DNA con *EcoRI* para liberar los insertos y caracterizarlos. Las clonas positivas contienen un inserto de aproximadamente 6.5 kb (Fig. 7A). Paralelamente, el DNA recombinante se digirió con *Bgl* II (Fig. 7B). Estos geles fueron transferidos a nitrocelulosa e hibridados con el oligo 17S, el cual hibridó específicamente con el fragmento de 6.5 kb generado con *Eco* RI y con el fragmento de 2 kb generado con *Bgl* II (Fig. 7). A partir de estos datos concluimos que aislamos una clona que contiene alrededor de 5 000 pb hacia arriba del cistrón ribosomal de *E. histolytica*. A partir de los datos obtenidos en la Fig. 7, presentamos en la Fig. 8 la orientación del inserto y un mapa de restricción parcial de esta clona. El mapa en esta región es idéntico al mapa de restricción que reportaron Huber y col, en las coordenadas 0 a 7000 del episoma.

Estrategia de secuenciación de la región 5' del cistrón de DNAr.

Con el fin de conocer la estructura primaria de esta clona, se empezó a secuenciar la región 5' del cistrón ribosomal, puesto que en esta región se encuentran el promotor y sus regiones de control. La secuencia se presenta en la Fig 9, junto con un diagrama de la estrategia de secuenciación que seguimos. La secuencia no está terminada, y sólo presentamos la secuencia comprendida entre los sitios *Bgl* II y *Xba* I. Con base en datos de secuencia, la clona 1 contiene 1742 pb de la región codificadora del gen 17S ribosomal y contiene un alto contenido de AT, representando estos nucleótidos el 74% de los nucleótidos totales.

A



B

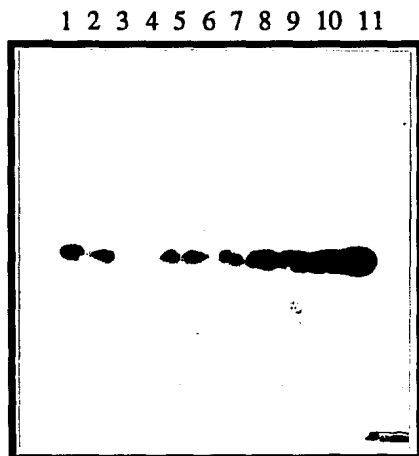
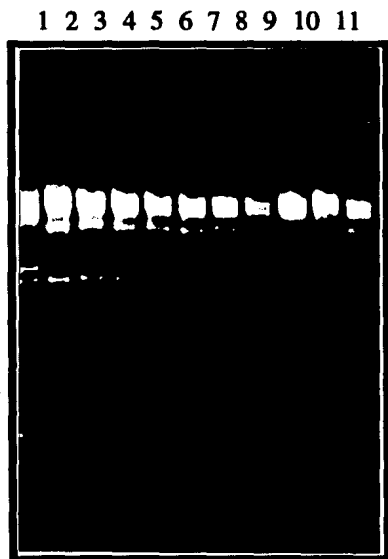


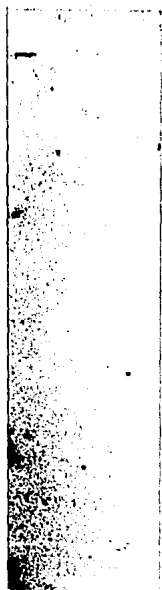
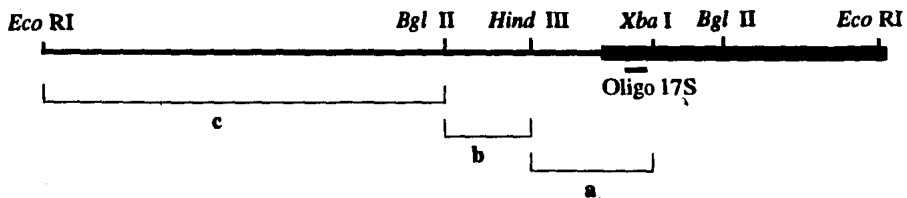
Fig. 7. Digestión de la clona 1 con *Eco* RI y con *Bgl* II.

En A, se liberó el inserto del DNA de 10 fagos recombinantes (carriles 2-11) mediante una digestión con *Eco* RI, se separó en un gel de agarosa al 1%, se transfirió a un filtro de nitrocelulosa y se hibridó con el oligo 17S. El carril 1 contiene lambda cortado con *Hind* III como marcador de peso molecular.

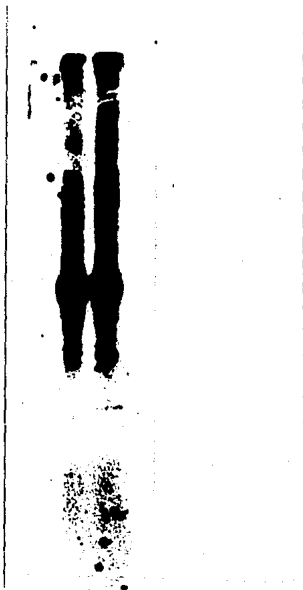
En B, el DNA de los fagos recombinantes se digirió con *Bgl* II, se separó en un gel de agarosa al 1%, se transfirió y se hibridó con el oligo 17S. El carril 1 contiene lambda cortado con *Hind* III como marcador de peso molecular.

NO HAY PAGES

31 32 33



Fragmento b



Fragmento a



Oligo 17S

Fig. 10. Northern del RNA total de *E. histolytica*. En la parte superior, se presenta un mapa de restricción parcial de la clona 1 y están señalados el oligo 17S así como los fragmentos a, b y c que se usaron como sondas en las diferentes hibridaciones.

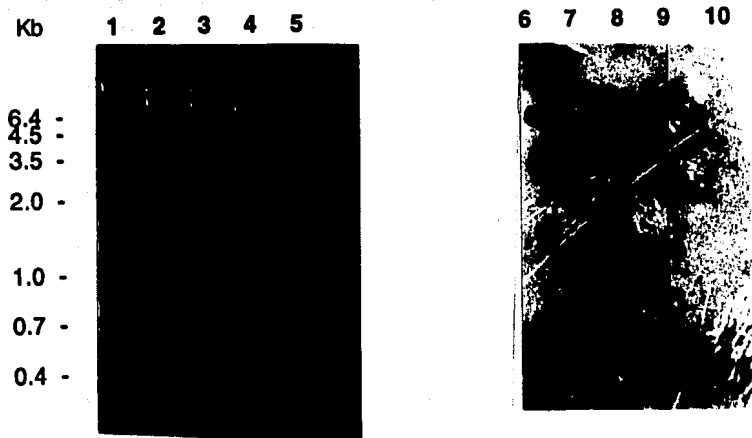
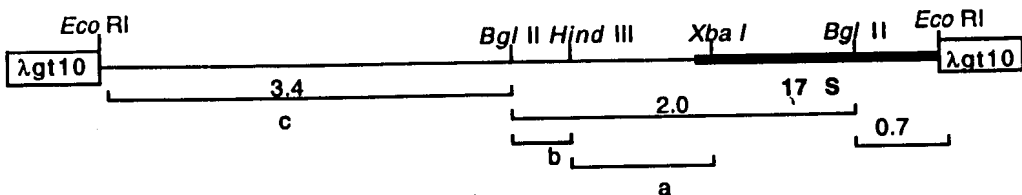
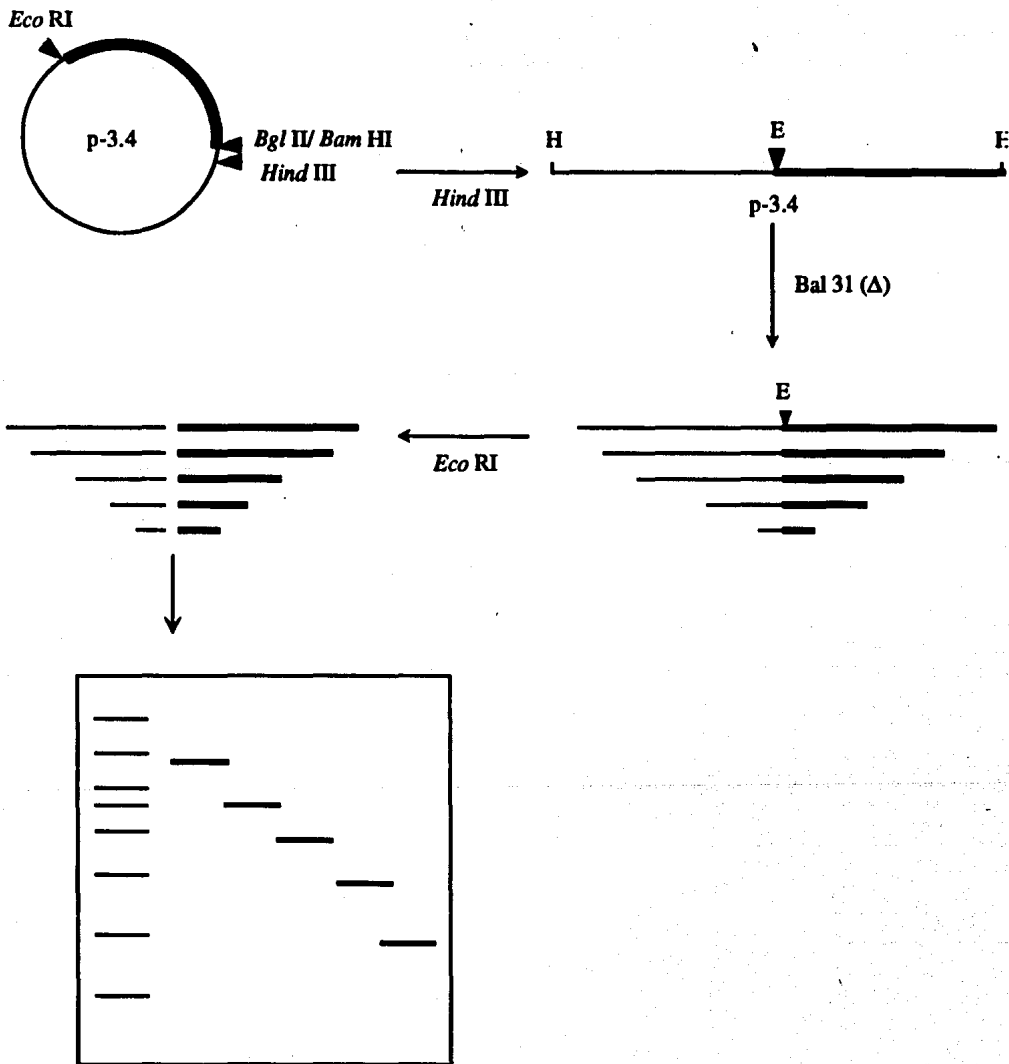


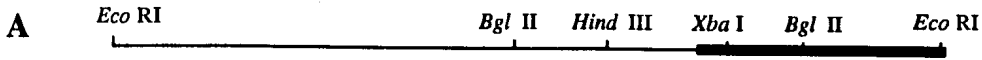
Fig. 11. Hibridación de los transcritos nacientes marcados a los fragmentos de restricción de la clona 1 y a los fragmentos a y b. Los carriles 1-5 muestran un gel teñido con bromuro de etidio y los carriles 6-10 muestran la hibridación tipo southern del mismo gel utilizando los transcritos nacientes marcados. Carriles 1 y 6, la clona 1 cortada con *Eco*RI; carriles 2 y 7, la clona 1 cortada con *Bgl*III; carriles 3 y 8, la clona 1 cortada con *Eco*RI y *Bgl*III; carriles 4 y 9, la subclona M13a, que contiene el fragmento a, cortada con *Hind*III/*Xba*I; carriles 5 y 10, la subclona M13b, que contiene al fragmento b, cortada con *Eco*RI/*Hind*III. En la parte superior de la figura se muestra un mapa de restricción parcial de la clona 1. Los números a la izquierda de la figura se refieren a los tamaños relativos de los fragmentos de restricción. Las flechas negras indican la localización de los fragmentos a, b y c. El fragmento c' contiene al fragmento c más 1.1 kb del vector de clonación λ gt10, y se obtuvo digiriendo la clona 1 con *Bgl*II.

tanto, este experimento sugiere fuertemente que el sitio de inicio de la transcripción está contenido por lo menos dentro del fragmento c (Fig. 11). Este experimento, sin embargo, no descarta la posibilidad de que exista una segunda unidad transcripcional dentro del fragmento c.

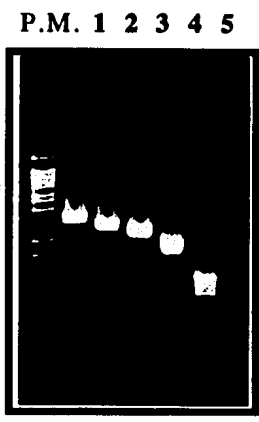
Con el fin de delimitar la unidad transcripcional en la región río arriba del gen 17S, y en particular dentro del fragmento c, se hicieron digestiones parciales del fragmento c con la nucleasa Bal 31 y se probaron con el RNA naciente. Se cortó la clona p-3.4 con *Hind* III y se expuso a la nucleasa Bal 31. Se tomaron alcuotas a diferentes tiempos después de añadir la nucleasa, se cortó con *Eco*RI, se separaron los fragmentos generados en un gel de agarosa al 1.5% , se transfirió el gel a un filtro de nitrocelulosa y se probó con el RNA naciente (ver esquema II). Se obtuvieron fragmentos de la clona p-3.4 que fluctuaron en tamaño de 3.4 kb en ausencia de enzima hasta 1.6 kb después de una exposición de 8 min a la nucleasa Bal 31 (Fig. 12A, carriles 1-5). El RNA naciente marcado hibridizó fuertemente con la clona no expuesta a la nucleasa (carril 6), y con los fragmentos de 3.1 kb (carril 7), de 2.7 kb (carril 8) y de 2.3 kb (carril 9). Sin embargo el fragmento de 1.6 kb no generó una señal de hibridización con el RNA naciente (carril 10). Estos datos limitan el dominio transcrito a la región comprendida entre los fragmentos de 1.6 kb y 2.3 kb generados por la nucleasa Bal 31. Finalmente, se generaron fragmentos de digestión de la clona p-3.4 con las enzimas de restricción *Alu* I y *Hae* III (Fig. 12B). Se separaron los fragmentos generados en un gel de agarosa al 2%, se transfirieron e hibridizaron con el RNA naciente. Sólo un fragmento de 1.7 kb generado con *Hae* III y un fragmento de 1.4 kb generado con *Alu* I hibridizaron con el RNA naciente (carriles 8 y 10). Este resultado permitió identificar los fragmentos dentro de la clona p-3.4 que contienen parte del dominio transcrito, facilitando su clonación y posterior análisis de secuencia.



Esquema II: Digestión de la clona p-3.4 con *Hind* III y tratamiento con Bal 31



P. M.	Bal 31	Transcritos nascentes	
3.42	-	+	1
3.1	+	+	2
2.7	+	+	3
2.3	+	+	4
1.7	+	-	5



B

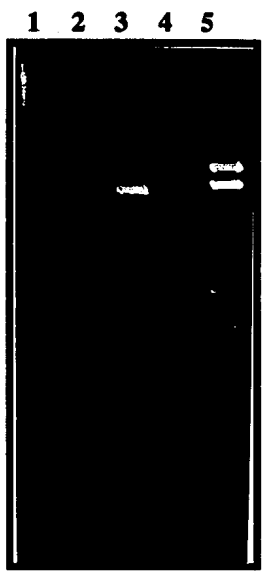


Fig. 12. Hibridación de los transcritos nacientes marcados a la clona p-3.4 tratada con Bal 31 y a fragmentos de restricción de la clona p-3.4. En el panel A, la clona p-3.4 se linearizó en el sitio *Hind* III del polylinker y se trató con 2U de Bal 31 por diferentes periodos de tiempo (0, 1, 2, 4 y 8 minutos). Los carriles 1-5 muestran el gel teñido con bromuro de etidio y los carriles 6-10 las hibridaciones tipo southern del mismo gel con los transcritos nacientes marcados. Carriles 1 y 6 , tiempo 0; carriles 2 y 7, 1 min; carriles 3 y 8, 2 min; carriles 4 y 9, 4 min y los carriles 5 y 10, 8 min de exposición a la enzima. En el panel B, se muestra la clona p-3.4 cortada con *Alu* I (carril 3 y 8) y con *Hae* III (carril 5 y 10); los carriles 2 y 7, y los carriles 4 y 9 contienen al vector PKS cortado con *Alu* I y *Hae* III, respectivamente. El carril 1 contiene marcadores de peso molecular. En los carriles 6-10 se muestra el southern del gel teñido con bromuro de etidio e hibridizado con el RNA naciente.

VII- DISCUSION

Hemos aislado una clona genómica que contiene el extremo 5' del cistrón ribosomal de un banco genómico de la cepa HK9. Utilizamos para ello un oligonucleótido específico del gen 17S ribosomal. En ensayos tipo southern con DNA total de HK9 cortado con tres diferentes enzimas de restricción (*Eco* RI, *Bgl* II y *Hind* III), el oligonucleótido hibridó con una sola banda en cada una de las digestiones. Los fragmentos de restricción que dieron una señal positiva con el oligo 17S coinciden con el mapa de restricción reportado por Huber y col., en las coordenadas 0 a 7000. Dado que ellos documentan 2 cistrones ribosomales por episoma, y la presencia de elementos repetidos que le confieren al episoma cierto grado de asimetría, la predicción era, para la cepa HM1 por lo menos, que por lo menos dos fragmentos generados por las digestiones enzimáticas hibridaran con el oligonucleótido 17S (ver Fig. 5). Nuestros resultados muestran, sin embargo, que el oligo 17S hibridó con un solo fragmento en cada una de las digestiones examinadas del DNA de la cepa HK9. Paralelamente, una búsqueda extensiva en el banco genómico logró identificar clonas idénticas a la clona que reportamos (datos no mostrados). Se han obtenido resultados similares para la cepa HM1; fragmentos de los genes 17S y 25S hibridizan con una sola banda en southern de DNA total de *E. histolytica* cortado con *Eco* RI y con *Eco* RI/ *Hind* III (Meza, comunicación personal). Una de las explicaciones posibles de este resultado, y de las observaciones de Meza y col., podría ser que en estos aislados sólo existiera una copia del cistrón ribosomal por episoma. Por otro lado, existen evidencias que demuestran polimorfismo en algunas secuencias repetidas del episoma ribosomal, entre diferentes aislados de *E. histolytica*, y aún entre los mismos aislados cultivados en diferentes medios axénicos (Estevez, 1991). Las bandas que muestran mayor polimorfismo corresponden a los espaciadores del episoma ribosomal, adyacentes a las secuencias que codifican para los genes de RNAr. Estos datos sugieren fuertemente que los espaciadores ribosomales contienen secuencias que se reorganizan frecuentemente en el episoma ribosomal de *E. histolytica*; por lo tanto, el mapa que reportaron Huber y col. en 1989 para el aislado HM1, cultivado bajo sus condiciones, no es extrapolable para predecir la organización del episoma ribosomal de otros aislados de *E. histolytica*. En este trabajo, sin embargo, utilizamos el mapa reportado por Huber y col. como marco de referencia para situar nuestra clona de DNA con el extremo 5' del cistrón ribosomal.

En este trabajo presentamos evidencias que documentan, de forma aproximada, el tamaño del precursor del RNAr de *E. histolytica*. Inicialmente, intentamos limitar el tamaño del precursor mediante ensayos tipo northern con RNA celular total. Sin embargo, el resultado que obtuvimos con este tipo de ensayo no excluyó la existencia de un precursor más largo. Por esta razón, decidimos realizar un mapeo del extremo 5' del cistrón ribosomal mediante un análisis de cadena de RNA nascente en núcleos intactos. Si los núcleos intactos se exponen a un ribonucleótido marcado por un breve periodo de tiempo, se marcan sólo las cadenas de RNA nascente. Las cadenas nascentes incompletas que emergen de una unidad transcripcional son heterogéneas en longitud. El análisis de las cadenas nascentes permite mapear diferentes regiones codificadoras dentro de una misma unidad transcripcional. Esta técnica fue fundamental para el mapeo inicial de unidades transcripcionales de RNAm en células animales. Con este ensayo, logramos detectar una señal de hibridización con el RNA nascente 2700-2100 pares de bases río arriba de la región codificadora del gen 17S ribosomal. Este resultado sugiere fuertemente que el líder tiene una longitud máxima de 2700 y una longitud mínima de 2100 bases, y que se procesa muy rápido; por esta razón, el espaciador externo transcrito no fue detectado en ensayos tipo northern usando RNA celular total. Es importante señalar, sin embargo, que bajo las condiciones que utilizamos, la técnica del análisis del RNA nascente no permite diferenciar entre la existencia de un líder con un tamaño de 2.7 -2.1 bases y la presencia de otra unidad transcripcional comprendida en esta región. No se han reportado unidades transcripcionales dentro de los espaciadores de los genes ribosomales en eucariotes, lo cual hace poco plausible la existencia de una unidad transcripcional en esta región. Se requieren, sin embargo, evidencias adicionales que demuestren contundentemente que esta región contiene el líder de los genes ribosomales. Pensamos que los datos de secuencia de esta región, al igual que la realización de un ensayo de RNA nascente en presencia de inhibidores de las RNA polimerasas II y III apoyarán nuestros resultados.

Como hemos mencionado en la introducción, en las células de mamíferos, el RNAr se transcribe en una molécula precursora 45S, la cual se procesa subsecuentemente para formar las especies 28S, 5.8S y 28S que conforman el RNAr maduro. Las secuencias espaciadoras transcritas, que representan alrededor de la mitad del transcrito primario, se desechan y degradan rápidamente. Mientras que las moléculas de RNAr maduras

muestran un alto grado de homología entre eucariotes inferiores (levadura) y eucariotes superiores (mamíferos), y aún entre procariotes y eucariotes, tanto los tamaños como las secuencias de los segmentos espaciadores transcritos son sumamente diferentes. El número de nucleótidos que se descartan durante el procesamiento del pre-RNAr aumenta de 1400 en *E. coli* a 6800 nucleótidos en humanos, aunque no parece haber relación alguna entre el tamaño del precursor y la filogenia del organismo en cuestión. No se conoce función alguna para el RNA de los espaciadores transcritos que no se incorpora a los ribosomas. Ahora bien, los sitios de procesamiento del espaciador externo transcrito no se localizan exclusivamente en la frontera del RNAr 18S maduro. El primer evento de procesamiento que sufre el preRNAr de ratón ocurre en el residuo 650 (3.5 kb hacia arriba del 18S), con una degradación concomitante del fragmento escindido (Miller y Sollner-Webb, 1981). Este primer evento de procesamiento ocurre muy rápido, de forma tal, que el extremo 5' del preRNAr mayoritario (el 90%) mapea en este sitio. Se ha descrito un procesamiento similar para el preRNAr de humano, en el nucleótido 414 del transcrito primario (Kass y col., 1987), y la misma señal de procesamiento en el preRNAr de la rata, en el nucleótido 790 (Rothblum y col., 1982), lo cual sugiere que el procesamiento en el 5' pueda ser un paso común en la maduración del RNAr de mamíferos. De hecho, se ha reportado que una secuencia de 200 nucleótidos hacia el 3' del sitio de procesamiento es suficiente para que el procesamiento ocurra (Craig y col., 1987) y que esta región está muy conservada entre los mamíferos (Kass y col., 1987), aún cuando el resto de la secuencia haya divergido enormemente. El primer evento de procesamiento involucra la snRNP U3 (Kass y col. 1990).

En contraste con la RNA polimerasa II y la III, cada una de las cuales es responsable de transcribir cientos de genes diferentes con secuencias diferentes, la RNA polimerasa I sintetiza generalmente un solo producto, el transcrito de los pre-RNAr. Por lo tanto, reconoce una sola señal promotora y una terminadora. Por esta razón, inicialmente se asumió que la identificación de las secuencias requeridas para la iniciación y la terminación de la síntesis por la RNA polimerasa I se lograría simplemente comparando las secuencias de DNAr de varias especies de eucariotes. Sin embargo, esta estrategia fracasó rápidamente cuando aparecieron secuencias completamente diferentes alrededor de los sitios de inicio de la transcripción en el DNA de diferentes organismos (Tabla I, Sommerville, 1984). Existe una fuerte homología sólo en las

Tabla I. Región central de los promotores de los genes de DNAr de diferentes organismos

	-16	+1	ref.
		→	
<u>T. brucei</u>	G	T	White y col (1986)
<u>A. castellani</u>	G	T	Kownin y col (1985)
<u>S. cerevisiae</u>	A	T	Kulkens y col (1991)
<u>S. rosei</u>	G	T	Verbeet y col (1983)
<u>X. laevis</u>	G	T	Boseley y col (1979)
<u>D. discoideum</u>	T	T	Hishikawa, Y (1983)
<u>T. pyriformis</u>	G	T	Saiga y col (1982)
<u>P. polycephalum</u>	A	T	Blum y col (1983)
<u>D. melanogaster</u>	G	T	Kohorn y col (1983)
Ratón	G	T	Mishima y col (1982)
Rata	T	T	Financsek y col (1982)
Humano	G	T	Financsek y col (1982)

Las cajas indican secuencias consenso. El GA subrayado representan un patrón conservado cuya posición varía por un nucleótido. En todas las especies presentadas, una purina se encuentra en la posición +5.

secuencias de especies muy cercanas. La Tabla I muestra la limitada homología que existe alrededor de los sitios de inicio de la transcripción en el DNAr de varios organismos eucariotes. Podemos observar que el +1 en casi todos los casos es una Timidina, que en la posición -16 casi siempre se encuentra una Guanidina, y sorprende también la ocurrencia frecuente del dinucleótido GA en la posición +4 o +5. El papel esencial de las secuencias localizadas entre los nucleótidos -45 y +10 se demostró mediante el análisis de los efectos de mutaciones y/o deleciones cada vez más cercanas al sitio de inicio de la transcripción. Por ejemplo, parece que una secuencia TTT localizada en la posición -30, la G en la posición -16 y los primeros nucleótidos transcritos actúan en conjunto para llevar a cabo una iniciación eficiente y exacta por la RNA polimerasa I (Yamamoto y col., 1984). Así entonces, mediante este tipo de análisis, se demostró que las secuencias que rodean el sitio de inicio de la transcripción son suficientes para la iniciación de la transcripción por la RNA polimerasa I, y que por lo tanto constituyen un promotor para la RNA polimerasa I (Yamamoto y col., 1984; Grummt, 1982; Moss, 1982).

Para identificar el promotor de los DNAr de *E. histolytica*, pretendemos inicialmente determinar el sitio de inicio de la transcripción. Contamos ya con una idea aproximada del tamaño del espaciador externo transcrito, que tiene un tamaño máximo de 2.7 y un tamaño mínimo de 2.1 bases, y sabemos que inicia dentro del fragmento c. Los datos de secuencia van a ser útiles tanto para diseñar un primer y utilizarlo en un ensayo de extensión de primer, como para realizar un mapeo del transcrito con la nucleasa S1. Estos ensayos permiten determinar el sitio de inicio de la transcripción. Es recomendable realizar paralelamente un ensayo de 'capping' *in vitro*. Este ensayo incorpora un GTP-[³²P] a la molécula precursora en una reacción catalizada por la guanililtransferasa. Esta enzima cataliza la incorporación del GMP a una estructura tipo 'cap' en una reacción que es específica para transcritos di o trifosfatados; por lo tanto, únicamente los transcritos primarios, no procesados, se marcan por esta reacción (Moss, 1981). Este tipo de experimentos han sido utilizados para diferenciar sitios de inicio de la transcripción de eventuales sitios de procesamiento en el genoma mitocondrial de plantas (Mulligan y col., 1988) Con este tipo de experimentos pensamos obtener una caracterización parcial de la región promotora de los DNAr de *E. histolytica*. Existen varias alternativas para demostrar que una secuencia en

particular está involucrada en la regulación de la transcripción; una de ellas consiste en determinar el efecto regulatorio de una secuencia en un ensayo de transcripción *in vitro*, o bien, en ensayos de expresión transitoria. Con cualquiera de estos ensayos es posible limitar con cierto grado de exactitud la, o las, regiones esenciales para la transcripción. Otra alternativa se fundamenta en que aquellas secuencias involucradas en la regulación de la transcripción son reconocidas específicamente por factores protéicos ('trans-acting factors'). Por medio de geles nativos, o de retardamiento, es posible determinar si una secuencia en particular es reconocida específicamente por una proteína. Las proteínas unidas a ciertas secuencias dejan una huella, o 'footprint', la cual podrá ser evaluada de acuerdo a la susceptibilidad de estas secuencias protegidas por las proteínas a diferentes tratamientos químicos o enzimáticos (Galas y Schmitz, 1978). De hecho, en la actualidad es posible realizar este ensayo (footprint) *in vivo*, lo cual reduce considerablemente el ruido que aparece frecuentemente en este tipo de ensayos *in vitro*, y además, permite evaluar lo que está ocurriendo dentro de la célula (Mirkovitch y Darnell, 1991; Huibregtse y Engelke, 1991; Morret y Duck, 1989).

Con este trabajo, estamos empezando a estudiar los mecanismos transcripcionales de *E. histolytica*. Inicialmente nos interesa identificar los elementos que regulan en *cis* la transcripción de los genes ribosomales (promotor, 'enhancers'), y compararlos con sus equivalentes en otros organismos. Consideramos de igual forma, la posibilidad de caracterizar los factores protéicos que mediante su unión a estas secuencias modulan la transcripción de los RNAr.

La caracterización del promotor de los DNAr de este parásito puede tener varias aplicaciones interesantes. Pese a que los transcritos producidos por la RNA polimerasa I carecen de una estructura 5' cap y de señales de poliadenilación, lo cual puede conducir a un transcrito inestable, se trata de un promotor fuerte, y su integración dentro de un vector de transformación ofrece la posibilidad de generar transcritos antisentido, o bien, un transcrito que contenga una ribozima diseñada específicamente contra un mensajero en particular. Estos enfoques van a ser sumamente atractivos en cuanto se consiga transformar *E. histolytica*, sobre todo porque la complejidad del parásito ha impedido que se realicen experimentos de genética convencionales, y que por lo tanto, han limitado mucho el conocimiento que tenemos sobre la ameba.

Finalmente, hemos considerado el usar oligonucleótidos específicos para interferir con la función del promotor de los genes de RNAr de este parásito; existen varios

reportes en la literatura que documentan la inhibición de la expresión genética de un gen en particular con oligonucleótidos específicos, de cadena doble y sencilla, y su posible utilización como agentes terapéuticos o anti-virales. Bielinska y col. en 1990, reportaron la inhibición de la unión de proteínas que se unen a una secuencia de DNA específica utilizando oligonucleótidos modificados (fosforotioatos) de doble cadena que contenían la secuencia consenso κB. Estos oligonucleótidos, *in vitro*, se unieron específicamente al factor nuclear (NF)-κB e, *in vivo*, al añadir el oligonucleótido apropiado a una línea de células B transfectadas transitoriamente, se inhibió la activación dependiente de (NF)-κB del enhancer del VIH. Los autores sugieren que los oligonucleótidos modificados de doble cadena compiten *in vivo* por la unión de factores de transcripción específicos y proponen que este tipo de oligonucleótidos modificados puedan ser útiles en la inhibición de la transcripción de genes que provocan enfermedad. Gee y col., en 1992, observaron la formación de una triple helice con un oligonucleótido de cadena sencilla dirigido al sitio de unión de la proteína regulatoria SL1 del promotor de la dihidrofolato reductasa. La formación del triplex intermolecular inhibe la unión de la proteína regulatoria SL1 de forma secuencia específica. Con la eventual caracterización de la secuencias involucradas en la regulación de la transcripción de los genes de RNA ribosomal en *E. histolytica* (la secuencia que constituye el promotor y eventuales secuencias 'enhancer') pensamos explorar el efecto de oligonucleótidos específicos de doble o de cadena sencilla sobre este proceso celular.

VIII- CONCLUSION

En conclusión, hemos aislado la clona que contiene la región 5' de la unidad transcripcional del cistrón de los DNAr de *E. histolytica*. Los datos bioquímicos que obtuvimos con ensayos tipo northern sugieren que la molécula precursora es inestable y que se degrada muy rápido. Logramos caracterizar de manera aproximada el tamaño del espaciador externo transcrito mediante un mapeo con RNA naciente. Estos datos sugieren fuertemente que el sitio de inicio de la transcripción está localizado 2.1-2.7 kb hacia arriba del gen estructural del 17S ribosomal (Fig. 13).

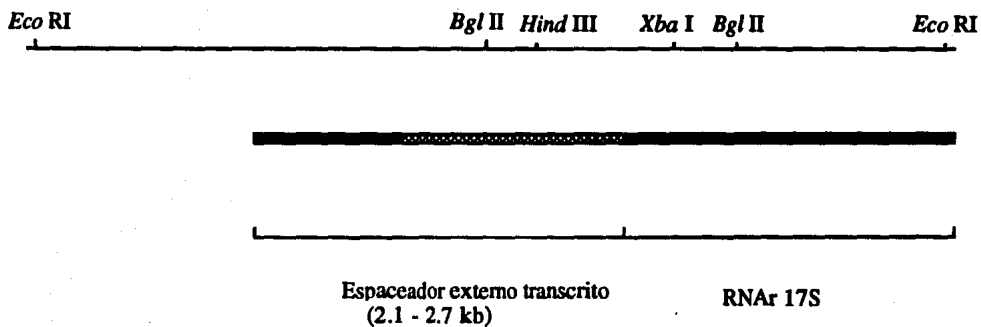


Fig. 13. El espaciador externo transcrito (o el lider) del cistrón ribosomal de *E. histolytica* tiene un tamaño máximo de 2.7 y un tamaño mínimo de 2.1 kb.

X-BIBLIOGRAFIA

- Albach, R. A., Booden, T., Bonlayangoor, P. and Downing, S.(1980) Concepts of junction of peripheral non-chromatin and endosome in *E. histolytica*. *Arch. Invest. Méd. (México)*, **11**, Suppl 1, 63-74
- Albach, R. A., Prachayasittikul, V. and Heebner, G.M. (1984) Isolation and characterization of RNA of *Entamoeba histolytica*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **12**: 261-272
- Aley, S. B., Lohn, Z. A. and Scott, W. A.(1984) Endocytosis in *Entamoeba histolytica*. *J. Exp. Med.*, **152**: 391
- Amaldi, F., Bozzoni, I., Beccari, E., and Pierandrei-Amaldi, P. (1989) Expression of ribosomal protein genes and regulation of ribosomal biosynthesis in *Xenopus* dedvelopment. *Trends Biochem. Sci.* **14**, 175-178
- Arroyo- Begovich, A. Cárabez-trejo, A. and Ruiz-Herrera, L. (1980) Identification of the structural components in the cyst wall of *Entamoeba invadens*. *J. Parasitol.* **66**: 735
- Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Smith, J. A., Seidman, J. G., and Struhl, K., (1987), *Current Protocols in Molecular Biology*. John Willey & Sons, New York.
- Barker, D.C. and Swales, L.S. (1972) Characteristics of ribosomes during differentiation from trophozoites to cyst in axenic *Entamoeba sp.* *Cell differ.* **1**:297-306
- Bell, S. P., Pikaard, C. S., Reeder, R. H., and Tjian, R. (1989) Molecular mechanisms governing species-specific transcription of ribosomal RNA. *Cell* **59**, 489-497
- Bell, S. P., Learned, R. M., Jantzen, H. M. and Tjian, R. (1988) Functional cooperativity between transcription factors UBF1 and SL1 mediates human ribosomal RNA synthesis. *Science* **241**, 1192-1197
- Bell, S. P., Jantzen, H. M. and Tjian, R. (1990) Assembly of alternative multiprotein complexes directs rRNA promoter specificity. *Genes. Dev.* **4**, 943-954
- Bhattacharya, S., Bhattacharya, A. and Diamond, L.S. (1988) Comparison of repeated DNA from strains of *Entamoeba histolytica* and other *Entamoeba*. *Mol.*

Biochem. Parasitol. 27: 257-262

- Bhattacharya, S., Bhattacharya, A., Diamond, L.S. and Soldo, A. T. (1989) Circular DNA of *Entamoeba histolytica* encodes ribosomal RNA. *J. Protozool.*, 36: 455-458
- Bielinska, A., Shivdasani, R. A., Zhang, L. and Nabel, G. J. (1990) Regulation of gene expression with double stranded phosphorothioate oligonucleotides. *Science*, 250: 997-1000
- Blum, B., Seebeck, T., Braun, R., Ferris, P., and Vogt, V. (1983) Localization and DNA sequence around the initiation site of ribosomal RNA transcription in *Physarum polycephalum*. *Nucleic Acids Res.* 11, 8519
- Boonlayangoor, P., Otten, M., Booden, T. and Albach, R.A. (1978) Isolation and sedimentation analysis of RNA from *Entamoeba histolytica*. *Arch. Invest. Med. (Mex.)* 9: 121-128
- Boseley, P., Moss, T., Machler, M., Portman, R., and Birnsteil, M. (1979) Sequence organization of the spacer DNA in a ribosomal gene unit of *Xenopus laevis*. *Cell* 17, 19
- Brosius, J., Dull, J. T., Sleeter, D. D., and Noller, H.F. (1981) Gene organization and primary structure of a ribosomal RNA operon of *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* 148, 107-127
- Calderón, J., Muñoz, M.L. and Acosta, H.M. (1980) Surface redistribution and release of antibody-induced caps in *Entamoeba*. *J. Exp. Med.* 151: 184-
- Cervantes, A. and Martínez-Palomo, A. (1980) Estudio del ciclo vital de *E. invadens* mediante cinematografía espaciada. *Arch. Invest. Méd. (México)*, 11, Suppl 1, 63-74
- Clark, C. G., and Cross, A. M. (1987) rRNA genes of *Naegleria gruberi* are carried exclusively on a 14 kilobases-pair plasmid. *Mol. Cell. Biol.* 7, 3027-303
- Cleveland, L. R. and Sanders, E. P. (1930) The virulence of pure line and several strains of *Entamoeba histolytica* for the liver of cats and the relation of bacterial cultivation and liver passage to virulence. *Am. J. Hyg.* 1-
- Comal, L., Tanese, N. and Tjian, R. (1992) The TATA-binding protein and associated factors are integral components of the RNA polymerase I transcription factor, SL1. *Cell*, 68, 965-976
- Cordingley, J.S., and Turner, M.J. (1980) 6.5S RNA: preliminary characterization of unusual small RNAs in *Trypanosoma brucei*. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 1, 91-96

- Craig, N., Kass, S, and Sollner-Webb, B. (1989) Nucleotide sequence determining the first cleavage site in the processing of mouse precursor rRNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **84**, 629-633
- de la Cruz-Hernández, F., Ocadiz, J. R. and Orozco, E. (1986) [Analysis of the organization of the DNA of various stains and clones of *Entamoeba histolytica*.] *Arch. Invest. Med. Mex.* **17**, 1:107-112
- Cruz-Reyes, J.A., Spice, W. M., Rehman, T., Gisborne, E. and Ackers, J. P. (1992) Ribosomal DNA sequences in the differentiation of pathogenic and non-pathogenic isolates of *Entamoeba histolytica*. *Parasitology*, **104**, en prensa.
- Culotta, V. H., and Sollner-Webb, B. (1985) *J. Cell. Biochem.* **9**,156
- Culotta, V. C., Wides, R. J., and Sollner-Webb, B. (1985) Eucaryotic transcription complexes are specifically associated in large sedimentable structures: rapid isolation of polymerase I, II and III transcription factors. *Mol. Cell. Biol.* **5**, 1582-1590
- Diamond, L. S. (1968) Techniques of axenic cultivation of *Entamoeba histolytica* and *E. histolytica*-like amebae. *J. Parasitol.* **54**, 1047-1056
- Diamond, L. S., Harlow, D. R., and Cunnick, C.C. (1978) A new method for the axenic cultivation of *Entamoeba histolytica* and other *Entamoeba*. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* **72**, 431-432
- Dobell, C. (1919) The amoebae living in man. A zoological monograph. John Ball, Sons & Danielson, London
- Dynlacht, B.D., Hoey, T., and Tjian, R. (1991) Isolation of coactivators associated with the TATA-binding protein that mediate transcriptional activation. *Cell*, **66**, 563-576
- Edmann, U., Meza, I., and Agabian, N. (1987) Genomic and cDNA actin sequences from a virulent strain of *Entamoeba histolytica*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **84**:3024-3028
- Edman, U., Meraz, M.A., Rausser, S., Agabian, N. and Meza, I. (1990) Characterization of an immuno- dominant variable surface antigen from pathogenic and nonpathogenic *Entamoeba histolytica*. *J. Exp. Med.*, **172**: 879-888
- Engberg, J. (1985) The Ribosomal RNA Genes of *Tetrahymena*: Structure and Function. *Eur. J. Cell. Biol.* **36**, 133-151
- Estevez, M. L. (1991) Clonación y caracterización de genes ribosomales de

Entamoeba histolytica. Tesis de maestría.

- Financsek, I., Mizumoto, K., and Muramatsu, M. (1982) Nucleotide sequence of the transcription initiation region of a rat ribosomal RNA gene. *Gene* **18**, 115-122
- Financsek, I., Mizumoto, K., Mishima, Y., and Muramatsu, M. (1982) Human ribosomal RNA gene: nucleotide sequence of the transcription initiation region and comparison of three mamalian genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **79**, 3092-3096
- Galas, D. and Smmitz, A. (1978) DNasa footprinting: a simple method for the detection of protein-DNA binding specificity. *Nucleic Acid Res.* **5**: 3157-3170
- Garfinkel, L. I., Giladi, M. Huber, M., Gitler, C., Mirelman, D., and Rozenblatt, S. (1989) DNA probes specific for *Entamoeba histolytica* possessing pathogenic and non-pathogenic zymodemes. *Infect. Immun.*, **57**, 926-931
- Gee, J. E., Blume, S., Snyder, R. C. Ratna, R. Miller, D. M. (1992) Triplex formation prevents Sp1 binding to the dihydrofolate reductase promoter. *J. Biol. Chem.*, **267**: 11163- 11167
- Gelderman, A. H., Keister, D.B., Bartgis, I.L. and Diamond, L.S. (1971) A comparison of genomes sizes and thermal denaturation- derived base composition of DNAs from several members of *Entamoeba* (*histolytica* group). *J. Parasitol.* **57**: 912-916
- González-Robles, A. and Martínez-Palomo, A. (1983) Scanning electron microscopy of attached trophozoites of *Entamoeba histolytica*. *J. Protozool.*, **30**: 692
- Grummt, I. (1982) Nucleotide sequence requirements for specific initiation of transcription by RNA polymerase I. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **79**, 6908- 6811
- Grummt, I., Roth, E., and Paule, M. (1982) Ribosomal RNA transcription in vitro is species specific. *Nature* **296**, 173-174
- Guerrant, R. L. (1986) Amebiasis: introduction, current status and research questions. *Rev. Infect. Dis.*, **8**: 218-227
- Greenblatt, J. (1991) Roles of TFIID in transcriptional initiation by RNA polymerase II. *Cell*, **66**, 1067-1070
- Gunderson, J.H., Sogin, M.L., Wollet, G., Hollingdale, M., de la Cruz V.F., Waters, A.P. and McCutchan, T.F. (1987) Structurally distinct, stage specific ribosomes occur in *Plasmodium*. *Science*, **238**, 933

- Hernández, R., Nava, G., and Castañeda, M. (1983) Small size ribosomal RNA species in *Trypanosoma cruzi*. *Mol. Biochem. Parasitol.*, **8**, 297-303
- Hishikawa, Y., Iida, Y., and Iwabuchi, M. (1983) Nucleotide sequence of the transcriptional initiation region of *Dictyostelium discoideum* rRNA gene and comparison of the initiation regions of three lower eukaryotes genes. *Nucleic Acids Res.* **11**, 1725
- Huber, M., Garfinkel, L., Gitler, C., Mirelman, D., Revel, M. and Rosenbatt, S. (1987) *Entamoeba histolytica*: cloning and characterization of actin cDNA. *Mol. Biochem. Parasitol.* **24**:227-235
- Huber, M., Garfinkel, L., Gitler, C., Mirelman, D., Revel, M. and Rozenblatt, S. (1988) Nucleotide sequence analysis of an *Entamoeba histolytica* ferredoxin gene . *Mol. Biochem. Parasitol.* **31**:27-33
- Huber, M., Koller, B. Gitler, C., Mirelman, D., Revel, M., Rozenblatt, S. and Garfinkel, L. (1989) *Entamoeba histolytica* ribosomal RNA genes are carried on palindromic circular DNA molecules. *Mol. Biochem. Parasitol.* **32**: 285-296
- Huijbrege, J. M. and Engelke, D. R. (1991) Direct sequence and footprint analysis of yeast DNA by primer extension. *Methods Enzymol.*, **39**: 550-561
- Iida, C. T., Kowling, P., and Paule, M. R. (1985) Ribosomal RNA transcription: proteins and DNA sequences involved in preinitiation complex formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**, 1668-1672
- Jantzen, H. M., Admon, A., Bell, S. P. and Tjian, R. (1990) Nucleolar transcription factor hUBF contains a DNA binding motif with homology to HMG proteins. *Nature* **344**, 830-836
- Kartulis, S (1887) Zur Aetiologie der leberabscesses lebende dysenterie- amöben im Eiter der dysenterischen leberabscesse. *Centralblatt für Bakteriologie und parasitenkunde*, **25**, 745-748
- Kass, S., and Sollner-Webb, B. (1990) The first Pre-rRNA- processing event occurs in a large complex: Analysis by gel retardation, sedimentation and UV crosslinking. *Mol. Cell. Biol.* **10**, 4920-4931
- Kettis, A. A. and Sundquist, M. (1978) Capping in *Entamoeba histolytica*: acceleration and inhibition by experimental procedures. pp324
- Kohorn, B. D., and Rae, P. M. M. (1983) Localization of DNA sequences promoting RNA polymerase I activity in *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*.

80, 3265

- Kooter, J. M., van der Spek, H. J., Wagter, R., d' Oliveira, C. E., van der Hoeven, F., Johnson, P. J., and Borst, P. (1987) The anatomy and transcription of a telomeric expression site for variant-specific surface antigen in *T. brucei*. *Cell* **11**, 261-272
- Kownin, P., Iida, C. T., Brown-Shimer, S., and Paule, M. R. (1985) The ribosomal RNA promoter of *Acanthamoeba castellanii* determined by transcription in a cell free system. *Nucleic Acids Res.* **13**, 6237-6248
- Kulkens, T., Riggs, D. L., Denis Heck, J., Planta, R. J., and Nomura, M. (1991) The yeast RNA polymerase I promoter: ribosomal DNA sequences involved in transcription initiation and complex formation in vitro. *Nucleic Acids Res.* **19**, 5363-5370
- Learned, R. M., Cordes, S. and Tjian, R. (1985) Purification and characterization of a transcription factor that confers promoter specificity to human RNA polymerase I. *Mol. Cell. Biol.* **5**, 1358-1369
- Learned, R. M., Learned, T.K., Haltiner, M. M. and Tjian, R. T. (1986) Human rRNA transcription is modulated by the coordinate binding of two factors to an upstream control element. *Cell*, **45**, 847-857
- Lesh (Lösh), F.D. (1875) Massive development of amebas in large intestine. Translated and reprinted in American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, **24**, 383-392 (1975)
- Lobo, S. M., Lister, J., Sullivan, M.L. and Hernández, N. (1991) The cloned RNA polymerase II transcription factor IID selects RNA polymerase III to transcribe the human U6 gene in vitro. *Genes Dev.* **5**, 1477- 1489
- Long, E. O., and David, I. B. (1980) Repeated genes in eukaryotes *Annu. Rev. Biochem.* **49**, 727-764
- Lopez-Revilla, R. y Gomez, R. (1978) *Entamoeba histolytica*, *E. invadens*, and *E. moshkovskii*: Fluctuations of the DNA content of axenic trophozoites. *Exp. Parasitol.* **44**:243-248
- Martínez-Palomo, A. (1982) Cell Biology. En: The Biology of *Entamoeba histolytica*. Research Studies Press. Chichister,
- Martínez-Palomo, A., González-Robles, A. and de la Torre, M (1973) Selective

agglutination of pathogenic strains of *E. histolytica* induced Con A. *Nature*, NB, 245 : 186

- Mc Laughlin, J. y Aley, S. (1985) The biochemistry and functional morphology of *Entamoeba*. *J. Protozool.*32: 221-240
- Meza, I., Torres-Guerrero, H. K. and Meraz, M. A. (1990) Molecular organizations of *Entamoeba histolytica*. In: Amebiasis: infection and disease by *Entamoeba histolytica*, edited by Kretschmer, R. R. Boca Raton: CRC Press, pp19-42
- Meza, I., Sabanero, M., Cazares, I., and Brian, J. (1983) Isolation and characterization of actin from *Entamoeba histolytica*. *J. Biol. Chem.*, 258: 3936-41
- Miesfield, R., and Arnheim, N. (1984) Specie- specific rDNA transcription is due to promoter -specific binding factors. *Mol. Cell. Biol.* 4, 221-227
- Miller, K. G. and Sollner-Webb, B. (1981) Transcription of mouse ribosomal RNA by RNA polymerase I: In vitro and in vivo initiation and processing sites. *Cell*, 27: 165-174
- Mirelman, D. (1987) Effect of cultural conditions and bacterial associates on the zymodemes of *Entamoeba histolytica*. *Parasitology today* 3: 37-40
- Mirelman, D., Bracha, R., Chayen, A., Austketis, A. and Diamond, L. S. (1986) *Entamoeba histolytica*: effect of growth conditions and bacterial associates on isoenzyme patterns and virulence. *Exp. Parasitol.* 62: 142-148
- Mirelman, D., Bracha, R., Nexler, A. and Chayen, A. (1986) Changes in isoenzyme patterns of cloned culture of non-pathogenic *Entamoeba histolytica* during axenization. *Infect. Immun.* 54: 827-832
- Mirelman, D. (1987) Ameba-bacterium relationship in amebiasis. *Microbiol. Rev.* 51: 272-284
- Mirelman, D., Bracha, R., Rozenblatt, S. and Garfinkel, L. I. (1990) *Entamoeba histolytica*: virulence enhancement of isoenzyme-stable parasites. *Exp. Parasitol.* 57:172-177
- Mishima, Y., Yamamoto, O., Kominami, R., and Maramatsu, M. (1981) In vitro transcription of a cloned mouse ribosomal RNA gene. *Nucleic Acids Res.* 9, 6773-6785
- Mirkovitch, J. and Darnell, J. E. (1991) Rapid in vivo footprinting technique identifies proteins bound to the TTR gene in the mouse liver. *Genes Dev.* 5: 83-93

- Moss, B. (1981) en Gene Amplification and Analysis. Eds Chirikjian, J. G. & Papas, T. S. (Elsevier, N. Y.) pp. 253-266
- Moss, T.(1982) Transcription of cloned *Xenopus laevis* ribosomal DNA microinjected into *Xenopus* oocytes, and the identification of a RNA polymerase I promoter. *Cell*, **30**, 835- 842
- Morret, E. and Buck, M. (1989) In vivo studies on the interaction of RNA-polymerase- σ^{54} with the *Klebsiella pneumoniae* and *rhizobium meliloti* nif H promoters. The role of nif A in the formation of an open promoter complex. *J. Mol. Biol.*, **210**: 65-77
- Mulligan, R. M., Lau, G. T. and Walbot, V. (1988) Numerous transcription initiation sites exist for the maize mitochondrial genes for subunit 9 of the ATP synthase and subunit 3 of cytochrome oxidase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **85**: 7998-8002
- Nanda, R., Bareja, U. and Anand B. S. (1984) *Entamoeba histolytica* cyst passers: clinical features and outcome in untreated subjects. *Lancet* **2**: 301-303
- Orozco, E., Solis, F. J., Domínguez, J., Chávez, B. and Hernández, F. (1988) *Entamoeba histolytica*: cell cycle and nuclear division. *Exp. Parasitol.* **67**: 85-95
- Palmer, J. M. and Folk, N.R. (1990) Unraveling the complexities of transcription by RNA polymerase III. *Trends Biochem. Sci.*, **15**, 300-304
- Phillips, B. P. and Gorstein, F. (1966) Effects of different species of bacteria on the ethology of enteric amebiasis in monocontaminated guines pigs. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **15**: 863-868
- Pikaard, C. S., McStay, B., Schultz, M. C., Bell, S. P., and Reeder, R. H. (1989) The *Xenopus* ribosomal gene enhancer bind an essential polymerase I transcription factor, xUBF. *Genes Dev.* **3**: 1779-1788
- Ravdin, J. I., Schlesinger, P. H., Murphy, C. F., Gluzman, I. A., and Krogstad, D. J. (1986) Acid intracellular vesicles and the cytolysis of mammalian target cells by *Entamoeba histolytica* trofozoites. *J. protozool.* **33**: 478
- Ravel-Chapuis, P., Nicolas, P., Nigon, V., Neyret, O., and Freyssinet, G. (1985) Extrachromozomal circular nuclear rDNA in *Euglena gracilis*. *Nucleic Acids Res.* **13**, 7529-7537
- Reed, S. L. and Braude, A. L. Extraintestinal disease: clinical syndromes, diagnostic profile and therapy. In: *Amebiasis: human infection by E. histolytica*, edited by

- Ravdin, J. I., New York, John Wiley, (1988) pp511-532
- Reeder, R. H., Roan, J., and Dunaway, M. (1983) Spacer regulation of *Xenopus* ribosomal gene transcription and competition in oocytes. *Cell* **35**, 449-456
 - Reeves, R. E., Lushbaugh, T.S. and Montalvo F.E. (1971) Characterization of deoxyribonucleic acid of *Entamoeba histolytica* by cesium chloride density centrifugation. *J. Parasitol.* **57**: 939-944
 - Rosebaum, R. M. and Wittner, M. (1970) Ultrastructure of bacterized and axenic trophozoites of *Entamoeba histolytica* with particular reference to helical bodies. *J. Cell Biol* **45**, 367-382
 - Rothblum, L.I., Reddy, R., and Cassidy, B. (1982) Transcription initiation site of rat ribosomal RNA. *Nucleic Acids Res.* **10**, 7345-7362
 - Saiga, H., Mizumoto, K., Takashi, M., and Higashinakagawa, T. (1982) Determination of the transcription initiation site of *Tetrahymena pyriformis* rDNA using in vitro capping of 35S pre-rRNA. *Nucleic Acids Res.* **10**, 4223
 - Said-Fernández, S., Vargas-Villarreal, J., Castro-Garza, J., Mata-Cardenas, B., Navarro-Montejo, L., Garza-Lozano, G., and Martinez-Rodriguez, H. (1988) PEHPS medium: an alternative for axenic cultivation of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba invadens*. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* **82**: 249-253
 - Sambrook, J., Fritsch, E. E., and Maniatis, T. (1989) Molecular cloning: A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
 - Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A. R. (1977) DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**, 5463-5467
 - Sargeant, P. G., Williams, J. E., and Neal, R. E. (1980) A comparative study of *Entamoeba histolytica* (NIH200, HK9, etc). *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* **74**, 469-474
 - Sargeant, P.G. (1987) The reliability of *Entamoeba histolytica* zymodemes in clinical diagnosis. *Parasitology Today* **3**: 40-43
 - Sawadogo, M. and Sentenac, A. (1990) RNA polymerase B (II) and general transcription factors. *Annu. Rev. Biochem.* **59**, 711-754
 - Schaffer, J. G., Scantlan, T. M. and Iralu, B. (1961) Observations on cell divisions of *Entamoeba histolytica* in culture. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **10**: 167

- Sepúlveda, B. and Martínez-Palomo, A. (1984) Amebiasis. En: Tropical and Geographical Medicine, K.S. Warren & A.A. Mahamoud (Eds) Mc Graw- Hill
- Simmen, K. A., Bernues, J., Parry, H. D., Stunnenberg, H. G., Berkenstam, A., Cavalini, B., Egly, J. -M., and Mattaj, I. W. (1991) TFIID is required for in vitro transcription of the human U6 gene by RNA polymerase III. *EMBO J.* 10, 1853-1862
- Simpson, L. and Simpson, A.M. (1978) Kinetoplast RNA of *Leshmania terantolae*. *Cell*, 14, 169-178
- Solis, F., Chavez, B. and Orozco, E. (1986) Fases de la división nuclear en *Entamoeba histolytica*. *Arch. Invest.Med. Mex.*, 17, suppl.1:95-99
- Sollner-Webb, B. and Monge, E. B. (1991) News from the nucleolus: rRNA gene expression. *Trends Biochem Sci*, 16, 58-62
- Sollner-Webb, B., and Tower, J. (1986) Transcription of eucaryotic ribosomal RNA genes. *Ann. Rev. Biochem.* 55, 801-830
- Sommerville, J. (1984) RNA polymerase I promoters and transcription factors. *Nature* 310, 189-190
- Spencer, D.F., Collings, J.C. Schnare, M.N., and Gray, M.W. (1987) Multiple Spacer Sequences in the nuclear Large subunit Ribosomal RNA Gene of *Crithidia fasciculata*. *The EMBO J.*, 6,1063-1071
- Stringent, K. F., Ingles, C. J., and Greenblat, J. (1990) Direct and selective binding of an acidic transcriptional activation domain to the TATA- box factor TFIID. *Nature* 345, 783-786
- Tannich, E., Horstmann, R. D., Knobloch, J. and Arnold, H. H. (1989) Genomic DNA differences between pathogenic and non pathogenic *Entamoeba histolytica*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* , 86: 5118-5122
- Tannich, E. and Burchard, G. D. (1991) Differentiation of pathogenic from non-pathogenic *Entamoeba histolytica* by restriction fragment analysis of a single gene amplified in vitro. *J. Clin. Microbiol.* 29: 250-255
- Valdez, J., de la Cruz-Hernández, F., Ocadiz, R. and Orozco, E. (1990) Molecular Karyotype of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba invadens*. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 84:537-541
- Verbeet, M. Ph., Klootwijk, J., van Heerikhuizen, H., Fontijn, R., Vreugdenhil, E., and Planta, J.R. (1983) Molecular cloning of the rDNA of *Saccharomyces rosei* and

comparison of its transcription initiation region with that of *Saccharomyces carlsbergensis*. *Gene* **23**, 53-63

- Walker, E. L. and Sellards, A.W. (1913) Experimental entamoebic dysentery. *Philippine Journal of Science. B, Tropical Medicine*, **8**, 253-330

- Walsh, J. A. (1986) Problems in recognition and diagnosis of amebiasis: estimation of the global magnitude of morbidity and mortality. *Rev. Infect. Dis.* **8**: 228-238

- Watson, J. D., Hopkins, N. H., Roberts, J. W., Steitz, J. A., Weiner, A. M. (1987) *The molecular Biology of the Gene*. The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc. pp-699.

- White, T. C., Rudenko, G., and Borst, P. (1986) Three small RNAs within the 10 Kb trypanosome rRNA transcription unit are analogous to Domain VII of other eukaryotic 28 S rRNAs *Nucleic Acids Res.***18**, 1333-1338

- Yamamoto, O., Takakusa, N., Mishima, Y., Komonami, R. and Maramatsu, M.(1984) Determination of the promoter region of the mouse ribosomal RNA gene by an *in vitro* transcription system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* , **81**, 299-303

- Zurita, M., Bieder, D., Ringold, G., and Mansour, T. (1987) Cloning and characterization of a female genital complex cDNA from the liver fluke *Fasciola hepatica*.*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**, 2340-2344

- Zurita, M., Alagón, A., Vargas- Villarreal, J. and Lizardi, P. M. (1991) The *Entamoeba histolytica* rDNA episome: nuclear localization, DNAase I sensitive map, and apecific DNA-protein interactions. *Molec. Microbiol.* **5** (8), 1843-1851