

03081

4  
2ej

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO**

**UNIDAD ACADÉMICA DE LOS CICLOS PROFESIONALES  
Y DE POSGRADO DEL CCH**

**GENES PARA EL RNAr 5S DE trypanosoma cruzi:  
ANÁLISIS ESTRUCTURAL Y DE INTERACCIÓN  
CON PROTEÍNAS NUCLEARES**

**T E S I S**  
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
DOCTOR EN INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA  
BÁSICA

P R E S E N T A  
**ROSAURA HERNÁNDEZ RIVAS**



TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

1992

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**



## **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.

## INDICE.

ABREVIATURAS.	V
LISTA DE FIGURAS	VII
RESUMEN	VIII
INTRODUCCION.	1
Definición	1
Generalidades del parásito.	1
Ciclo de vida de <i>T. cruzi</i> .	2
Consideraciones generales sobre el RNA ribosomal de <i>T. cruzi</i> .	4
Transcripción del RNAr 5S por la polimerasa III	10
OBJETIVOS.	12
MATERIALES Y METODOS.	13
I. CARACTERIZACION GENOMICA Y CROMOSOMAL DE <i>T. cruzi</i>	13
1. Cultivo y extracción de ácidos nucleicos de <i>T. cruzi</i>	
1.1 Cultivo de <i>T. cruzi</i>	13
1.2 Extracción de DNA.	13
1.3 Purificación de RNA ribosomal.	13
1.4 Purificación de las especies ribosomales.	14
2. Aislamiento, marcaje e identificación de moléculas recombinantes	15
2.1 Fosforilación del RNAr 5S.	15
2.2 Preparación y transformación de células. competentes de la cepa MC1061.	16
2.3 Construcción de una biblioteca genómica de <i>T. cruzi</i> .	17
2.4 Hibridación in situ de la biblioteca genómica	

de <i>T. cruzi</i> con el RNAr 5S.	17
2.5 Recuperación del DNA de geles de agarosa de bajo punto de fusión.	18
<b>3. Reiteración y caracterización génica del RNAr 5S.</b>	<b>19</b>
3.1 Ensayos tipo "Southern".	19
3.2 Hibridación cuantitativa DNA:RNA (DOT).	20
3.3 Secuenciación de DNA.	21
3.3.1 Preparación y transformación de células competentes de la cepa JM101 de <i>E. coli</i> .	22
3.3.2 Preparación de DNA de cadena sencilla.	23
3.3.3 Reacciones de secuenciación.	24
3.3.4 Preparación del gel de secuencia.	25
3.4 Secuenciación de RNA.	27
3.5 Preparación de bloques de agarosa para geles de gradiente en pulso.	29
3.6 Separación del DNA por campos alternos transversos (TAFE).	30
<b>II. CARACTERIZACION DE PROTEINAS NUCLEARES QUE SE UNEN AL RNAr 5S DE <i>T. cruzi</i>.</b>	<b>31</b>
<b>1. Construcción y marcaje de plásmidos empleados en los ensayos de retardamiento y "footprinting".</b>	<b>31</b>
1.1 Plásmidos empleados.	31
1.2 Preparación de fragmentos radioactivos de DNA para ensayos de "footprinting".	33
<b>2. Obtención y caracterización de proteínas nucleares y citoplásmicas.</b>	
2.1 Obtención de núcleos y proteínas	

citoplásmicas (fracción S100).	35
2.2 Extractos nucleares.	36
2.3 Ensayos de retardamiento en gel	38
2.4 Footprinting	40
2.4.1 Interacción DNA-proteína.	40
2.4.2 Digestión con DNAasaI.	40
2.4.3 Secuenciación por Maxam y Gilbert.	41
2.5 Southwestern.	46
2.5.1 Preparación de las muestras.	46
2.5.2 Preparación de los geles.	46
2.5.3 Tinción con azul de coomasie.	47
2.5.4 Electroinmunotransferencia.	48
<b>RESULTADOS</b>	50
Artículo 1.	51
Manuscrito.	57
Datos no mostrados.	76
1. La organización genica del RNAr 5S se ha conservado entre cepas diversas de <i>T. cruzi</i> .	76
2. Ubicación cromosómica de los genes para el RNAr.	76
3. Potencialidad del gene RNAr 5S como sonda de diagnóstico en la enfermedad de Chagas	77
4. Análisis de transcritos del RNAr 5S.	77
5. Estructura secundaria.	78
6. Análisis "Southwestern".	78
<b>DISCUSION</b>	86

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS	95
BIBLIOGRAFIA.	98
APENDICE	104

## ABREVIATURAS.

RNAr	Acido ribonucleico ribosomal
BSA	Albumina sérica bovina.
Ci	Curies.
c.p.m.	cuentas por minuto
DEP	Dietil pirocarbonato.
DNA	Acido desoxirribonucleico.
DTT	Ditiotreitol.
EDTA	Acido etilendiaminotetraácetico.
EGTA	Acido etilenglicol-bis(b-aminoetiléter) -N,N,N,N-tetrácetico.
HEPES	Acido N-2-hidroetilpiperazin-2-etanol sulfónico.
kDa	Kilodaltones.
MOPS	Acido 3-(N-morfolinopranosulfónico).
NP-40	Nonidet P-40.
TF	Factor de transcripción.
PBS	Solución salina amortiguadora de fosfatos.
rpm	revoluciones por minuto.
S	unidades Svedberg.
SDS	Lauril sulfato de sodio.
TEMED	N,N,N,N-tetrametiletildiamina.
PMSF	Phenyl-metyl-sulphonyl-fluoride.
RNAt	Acido ribonucleico de transferencia.
TBE	Tris-Borato-EDTA.
PEG	Polietilenglicol.

TE	Tris-EDTA.
dATP	desoxiadenosin trifosfato.
ATP	Adenosin trifosfato.
mA	miliamperios
VPC	volumen del paquete celular.
IPTG	Isopropil-B-D-tiogalactósido.
SSC	Sal y Citrato de Sodio.
pol I	RNA polimerasa I
pol II	RNA polimerasa II.
pol III	RNA polimerasa III
TAFE	electroforesis de campos alternos transversos. (Transverse alternating field electrophoresis).
Kpb	Kilo pares de bases.
nt	nucleótido.
TFIIIA	Factor de transcripción para la polimerasa III A.
TFIIB	Factor de transcripción para la polimerasa III B.
TFIIC	Factor de transcripción para la polimerasa III C.

## LISTA DE FIGURAS.

- Fig. 1      Ciclo de vida de T. cruzi.
- Fig. 2      Representación esquemática del procesamiento del RNAr en eucariontes.
- Fig. 3      Representación esquemática de la unidad fundamental de transcripción en los tripanosomátidos.
- Fig. 4      Mapa del gene que codifica para el RNAr 5S de T. cruzi y subclonas usadas en esta tesis.
- Fig. 5      Organización genómica del RNAr 5S en 10 cepas de T. cruzi.
- Fig. 6      Localización cromosomal del gene RNAr 5S y de la unidad fundamental de transcripción.
- Fig. 7      El gene para el RNAr 5S de T. cruzi no hibrida con el DNA de humano.
- Fig. 8      Patrón de hibridación de la molécula 5S al RNA total de T. cruzi.
- Fig .9      Estructura secundaria probable para el RNAr 5S de T. cruzi.
- Fig 10      Caracterización de las proteínas que se unen al gene del RNAr 5S de T. cruzi.

## RESUMEN.

En esta tesis se caracterizó molecularmente el sistema génico RNAr 5S de Trypanosoma cruzi. Se realizaron hibridaciones genómicas tipo Southern, encontrándose que los genes para el RNAr 5S de este parásito están organizados en tandem con repeticiones de aproximadamente 500 pb, y que esta organización se encuentra muy conservada en diferentes cepas mexicanas y sudamericanas. Ensayos de renaturalización cuantitativa RNA:DNA revelaron que existen aproximadamente 1600 copias génicas del RNAr 5S por núcleo, lo que representa un valor 16 veces mayor al encontrado previamente para la unidad de transcripción de las moléculas mayores de RNAr (18S-24S). Cromosomas de T. cruzi fueron separados por geles de campos alternos transversos, y mediante ensayos tipo "Southern" se encontró que tanto los genes para el RNAr 5S como para el RNAr 18S se encuentran en dos cromosomas uno de los cuales es común (~1385 Kpb) para ambas moléculas. El aislamiento de una clona genómica (pRTC14-2) permitió conocer la estructura primaria del gene RNAr 5S. La estructura secundaria probable fue deducida usando como guía el modelo universal propuesto por Delihias (44). Las regiones probables de control interno de la transcripción (i.e., caja A y caja C) fueron localizadas al comparar nuestra secuencia con otras reportadas para otros organismos, ya que se trata de regiones altamente conservadas en eucariotes. Además, en la región espaciadora del DNA 5S de este parásito se

identificaron 6 cajas G+C, elementos que forman parte del promotor de genes transcritos por la polimerasa II. Con la finalidad de identificar la existencia de proteínas nucleares que interaccionen in vitro con los diferentes elementos de control identificados (regiones de control interno A y C y las cajas G+C), se realizaron ensayos de huellas moleculares de protección a DNAasaI ("footprinting") así como ensayos de retardamiento. Se encontró que el patrón de protección de la región codificadora comprende no solamente la región de control interno, sino que se extiende al resto de la región codificadora. Por otro lado, en la región espaciadora la protección incluye 6 cajas G+C y otras secuencias ricas en adeninas. Ensayos de retardamiento con el promotor temprano del virus SV-40 que contiene seis cajas G+C, así como con el espaciador del DNA 5S de T. cruzi (como competidor homólogo) y con el enlazador múltiple de pUC18 (como competidor heterólogo), sugieren que la unión de algún factor(es) a estas cajas es específica. Ensayos Southwestern mostraron la presencia de una proteína de ~35 kDa que reconoce la región codificadora y una proteína de ~52 kDa que se une a la región espaciadora.

## SUMMARY.

To further study the rRNA genetic system in Trypanosoma cruzi, the 5S rRNA gene family was characterized. It was found that this gene family is composed of about 1600 copies per diploid nuclei. Southern blot analysis showed that it is tandemly organized as 500 bp repeats. This same pattern was found in seven Mexican and three South American T. cruzi strains. Southern blot analysis of chromosome-sized DNA showed that the 5S gene probe hybridized with two chromosomes of about 1400 and 1500 Kbp; the rRNA cistron (18S-24S) hybridized to the former and to a third one of about 1300 Kbp.

The 5S rRNA gene primary structure was obtained by sequencing a genomic clone (pRTC14.2). The 5S rRNA secondary structure was obtained based on the universal model proposed by Delibas. The coding region is comprised of 120 nucleotides and contains the well known internal control regions for the eukaryotic RNA polymerase III (i.e., box A and box C). The spacer regions have a putative termination signal and six sites homologous to the consensus sequences recognized by the transcription factor Sp1.

The occurrence of T. cruzi nuclear factors that bind to cloned 5S rRNA gene fragment was demonstrated by electrophoretic mobility shift and DNase I footprinting assays. It was found that the protection pattern of the

coding region 120 bp) comprises not only the internal control region (box A and box C), but also spans the rest of the coding region. Ont the spacer sequences, the protected region comprises six G+C boxes and other As rich regions. In other experiments, Southwestern assays evidenced a 35 kDa protein that recognizes the coding sequence and a 52 kDa protein that binds to spacer region.

## INTRODUCCION.

### DEFINICION.

La enfermedad de Chagas o tripanosomiasis americana es una enfermedad causada por el protozooario Trypanosoma cruzi, parásito intracelular de las células del sistema retículo endotelial que ataca particularmente el miocardio, esófago y colon. Es transmitida generalmente en las materias fecales de un artrópodo, pero también puede ser adquirida in utero (via transplacentaria), por conducto de la leche materna, por transfusión sanguínea, al desollar animales silvestres o ingerirlos semicrudos, por falta de cuidado en el laboratorio y por el transplante de órganos.

### GENERALIDADES DEL PARASITO.

La tripanosomiasis americana es una enfermedad oriunda y exclusiva de este continente. Su distribución geográfica comprende desde el Sur de los Estados Unidos de América, donde se han registrado casos autóctonos, hasta la provincia del Río Negro en el sur de Argentina ( 1 ). Esta enfermedad ataca por lo menos a 24'000,000 de personas en Latinoamérica y existen otros 65'000.000 individuos propensos a la infección ( 2 ). En cuanto a México, se encontró que existen aproximadamente 3'000,000 personas infectadas ( 3 ) con este parásito,

T. cruzi pasa por tres formas morfológicas en su ciclo

biológico: tripomastigote, amastigote y epimastigote. La identificación de las diferentes formas morfológicas en T. cruzi está basada en criterios como la forma general de la célula, la posición relativa del cinetoplasto con respecto al núcleo y la región de donde emerge el flagelo de la bolsa flagelar. Las diferentes formas morfológicas muestran propiedades biológicas únicas. De acuerdo a lo anterior tenemos que: (1) Los tripomastigotes tienen el cinetoplasto posterior al núcleo. En el hospedero mamífero son encontrados intracelularmente en tejidos y extracelularmente en circulación. En el hospedero invertebrado se localizan extracelularmente en el intestino posterior. (2) Los amastigotes son la forma replicativa intracelular de T. cruzi en células de mamífero. Son formas redondas que poseen un flagelo corto y se multiplican por fisión binaria, con un tiempo de duplicación de 7 a 14 hrs. (3) Los epimastigotes tiene el cinetoplasto anterior al núcleo, se encuentran en el intestino medio del hospedero invertebrado, donde se multiplican y mantienen la infección durante todo el tiempo que el insecto vive.

#### CICLO DE VIDA DE T. cruzi.

En el ciclo biológico de T. cruzi, están involucrados vertebrados que fungen como hospederos y reservorios ( i. e., armadillo, tlacuache, roedores, perro, gato, mono y hombre) e

insectos pertenecientes al menos a 120 especies de nueve géneros de triatómidos, entre los más importantes se encuentran: Triatoma infestans, Rhodnius prolixus y Panstrongilus megistus, los cuales participan como vectores para la transmisión de la enfermedad de Chagas. ( 5 ).

La infección inicia cuando un insecto infectado con T. cruzi pica a un hospedero mamífero y como consecuencia de la ingesta sanguínea el hematófago libera tripomastigotes en las heces y orina. Estas formas pueden entrar al nuevo hospedero por contaminación de una herida generada por el piquete del vector o a través de la contaminación de membranas mucosas.

Una vez en el hospedero vertebrado, T. cruzi es capaz de penetrar a las células en donde se replica como amastigote, forma prácticamente aflagelar. Los amastigotes replicantes se diferencian intracelularmente en tripomastigotes, lisan a las células y se liberan al torrente sanguíneo a través del cual pueden propagar la infección a todo el cuerpo. Estos pueden entrar al insecto cuando éste ingiere sangre contaminada e iniciar la infección en el hospedero invertebrado. En el hematófago los tripomastigotes se transforman en epimastigotes los cuales migran al intestino medio donde se multiplican, más tarde viajan al intestino posterior donde se unen a la glándula rectal y ahí se diferencian en tripomastigotes metacíclicos, los cuales son

liberados y eliminados con las heces del hematófago cuando ingiere la sangre del hospedero mamífero (Fig 1).

El cuadro clínico que presenta esta enfermedad es comúnmente dividido en tres fases:

1) Fase aguda, la fiebre es el signo más importante en esta etapa observándose en el 95% de los casos y generalmente va acompañada de otros síntomas tales como: linfadenopatias, malestar y anormalidades electrocardiográficas. En este período los parásitos son fácilmente detectados en sangre.

2) Fase indeterminada, la mayoría de los casos de fase aguda de la enfermedad de Chagas se resuelve en un periodo de 2 a 3 meses y pasan de una fase subaguda a una etapa crónica asintomática, comúnmente denominada fase indeterminada, la cual suele durar de 10 a 20 años.

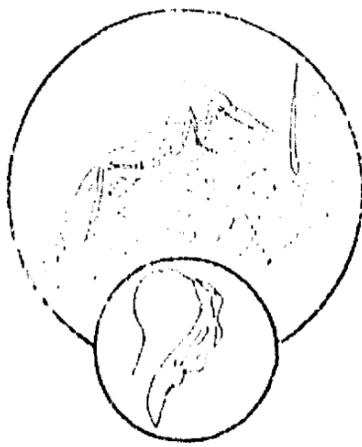
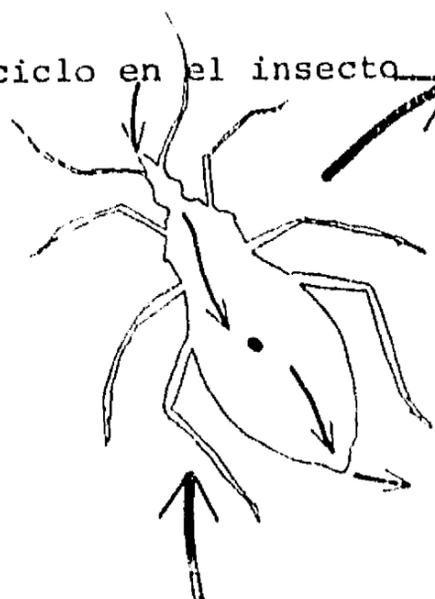
3) Fase crónica, es la etapa en la cual se presentan las manifestaciones clínicas tales como: alargamiento del corazón, anormalidades electrocardiográficas, aperistalsis y dilataciones del esófago y colon (megaesófago y megacolon), hasta la muerte súbita ( 6 ).

**CONSIDERACIONES GENERALES SOBRE EL RNA RIBOSOMAL (RNAr) de T. cruzi.**

Nuestro interés en este parásito es básico y esta encaminado

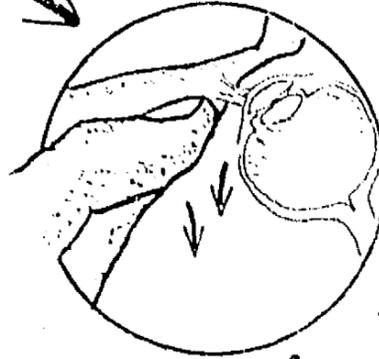
FIG. 1 Ciclo de vida de I. cruzi.

ciclo en el insecto



Tripomastigote

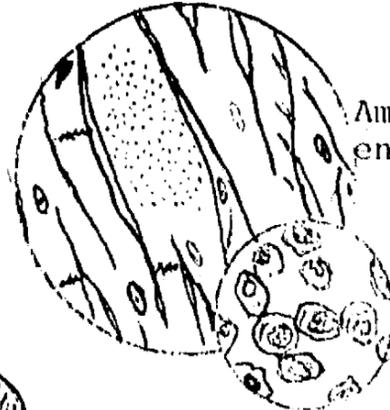
Tripomastigote entra a través de la picadura o membrana mucosa.



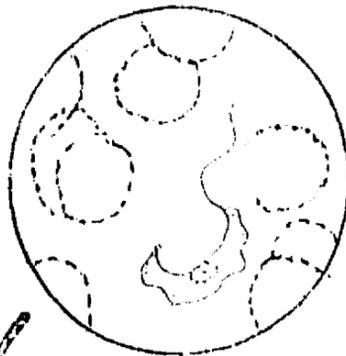
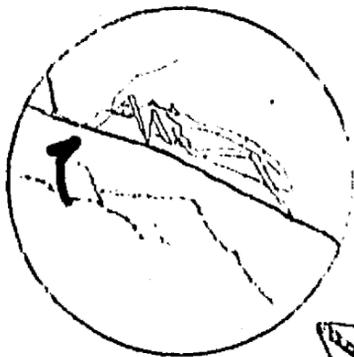
Signo de Romaña



Amastigotes viven en las células.



Insecto adquiere la infección por picar a un mamífero infectado.



Tripomastigote

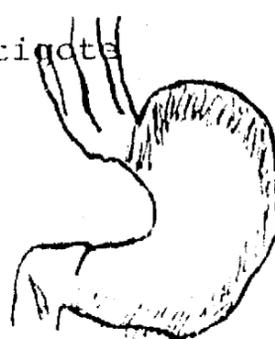
Patología



Cardiomegalía



Megacolón



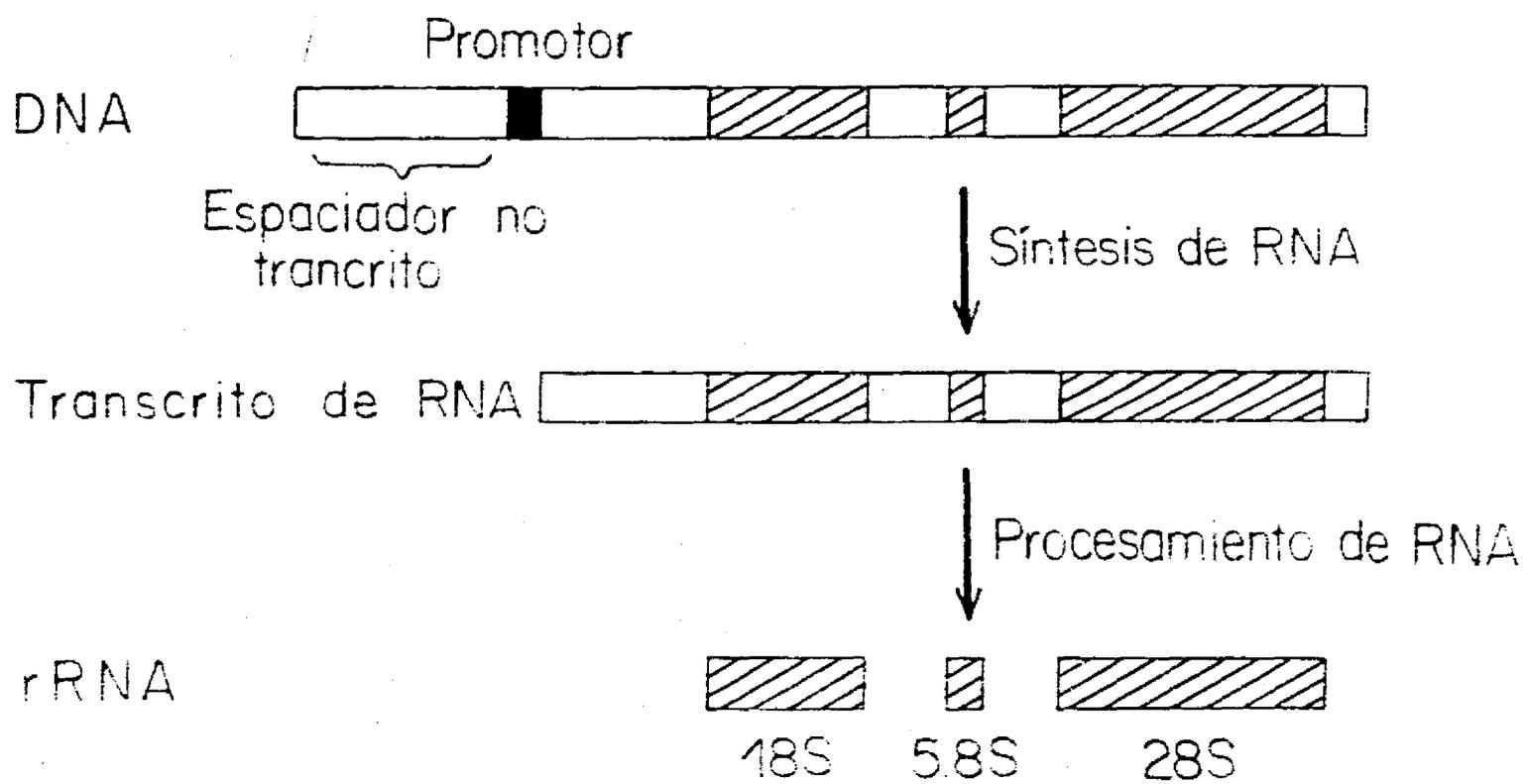
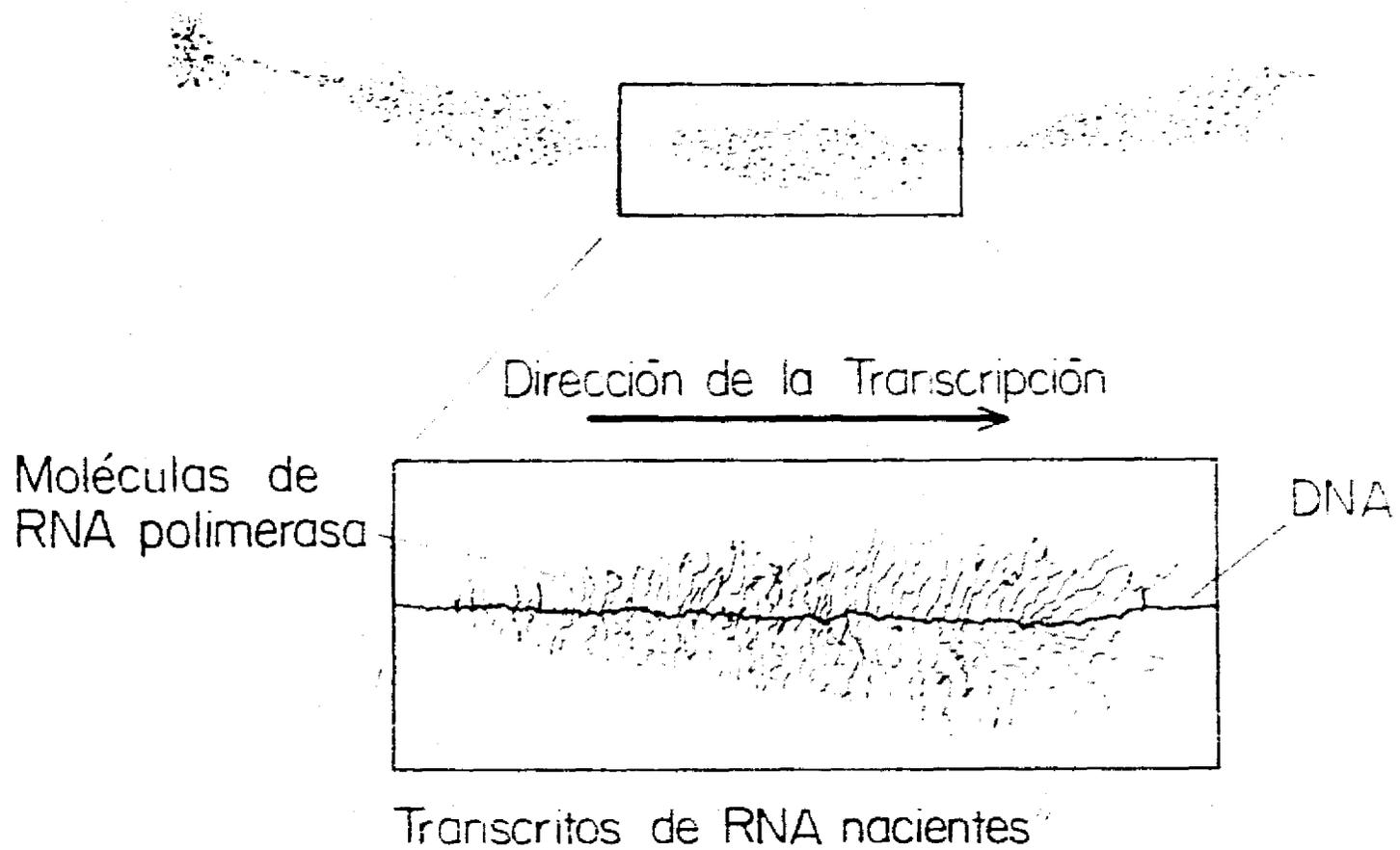
Megaesófago

principalmente a tratar de dilucidar la organización y estructura de las moléculas que se ensamblan para constituir al ribosoma.

Los genes de RNA ribosomal (RNAr) han sido de los más estudiados en eucariontes. En la mayoría de ellos se encuentran organizados en tandem constituyendo una familia de genes medianamente repetidos con 50 a 250 elementos. En estos organismos, los genes de RNAr que codifican para las moléculas de RNAr 18S, 5.8S y 28S son transcritos por la polimerasa I (pol I), generándose un transcrito primario grande (40-45S) que es procesado en el nucleólo. Este procesamiento resulta en la eliminación de espaciadores transcritos internos (ETIs) y externos (ETEs) que son rápidamente degradados (Fig 2). Sin embargo, variaciones a esta situación se han descrito en diversos phyla. En algunos protozoarios, dípteros y vertebrados el RNAr tipo 28S es cortado postranscripcionalmente en dos fragmentos que permanecen unidos por puentes de hidrógeno en el ribosoma maduro ( 7 ).

En cuanto a los tripanosomátidos, (i. e., Crithidia fasciculata y T. brucei) presentan una situación más compleja pues en el procesamiento del RNAr 28S se generan dos moléculas grandes de RNAr (24S $\alpha$  y 24S $\beta$ ) y cuatro moléculas pequeñas de RNAr (S1, S2, S4 y S6). En estos organismos tanto

FIG. 2 Representación esquemática del procesamiento del  
RNAr en eucariotes.

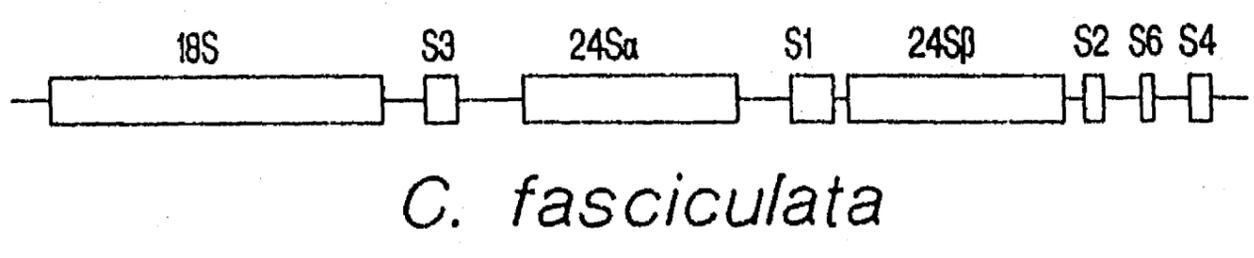
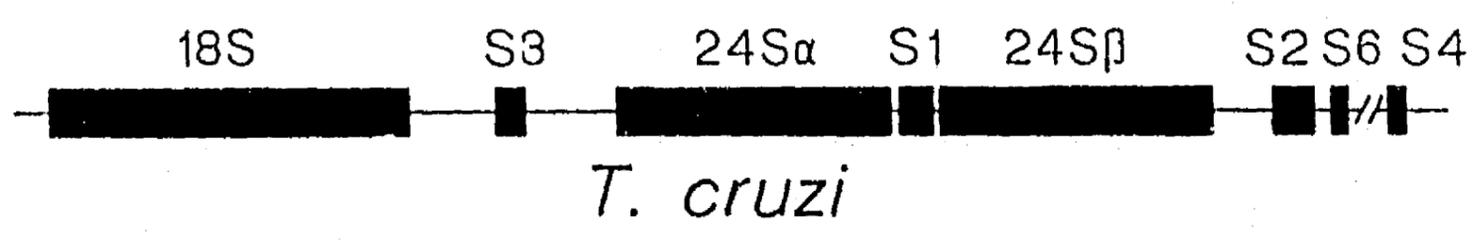
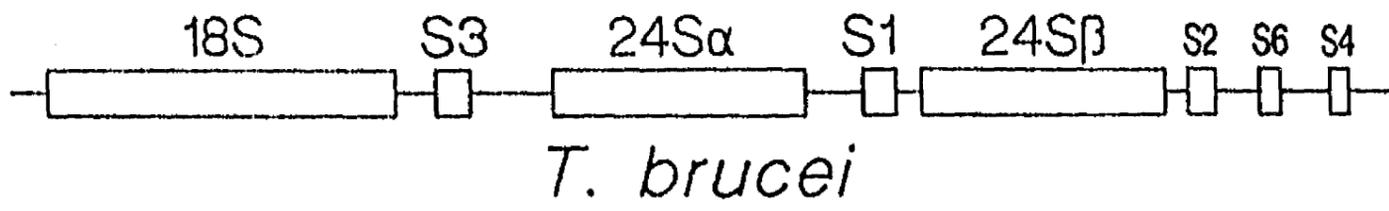


las moléculas mayores como las menores se ensamblan equimolarmente en los ribosomas. La función de las moléculas pequeñas es aún desconocida pero se ha reportado en el caso de T. brucei y C. fasciculata que su secuencia nucleotídica es análoga a la de dominios del RNAr 28S de otros eucariotes ( 8 y 9 ).

En T. cruzi, se encontró que las secuencias codificadoras de los RNA ribosomales de este parásito muestra una organización similar a la reportada para T. brucei y C. fasciculata (10).

Dentro de la unidad de transcripción las moléculas ribosomales pequeñas se encuentran separadas por DNA espaciador que se elimina durante el procesamiento del transcrito primario. La molécula S3 de los tripanosomátidos es equivalente al 5.8S de eucariotes. S1 mapea entre 24S $\alpha$  y 24S $\beta$  y el resto de los RNAs ribosomales pequeños ( S2, S4 y S6) se localizan hacia el extremo 3' de la unidad de transcripción (Fig. 3). En el caso del RNAr 5S que forma parte de la subunidad grande de los ribosomas en eucariotes, se encuentra organizado como un locus independiente y es transcrito por la pol III ( 7 ). El transcrito primario de los genes de DNAr 5S en eucariotes es idéntico al RNAr 5S que se aísla de las subunidades grandes citoplásmica, por lo tanto el RNAr en eucariotes ni madura ni se procesa, a

FIG. 3 Representación esquemática de la unidad fundamental de transcripción en los tripanosomatidios.



diferencian de lo que sucede en algunos procariontes ( 11 ). En el caso de los tripanosomátidos, (T. brucei y C. fasciculata) los genes que codifican para la molécula 5S (semejante al RNAr 5S) se encuentran en un locus independiente de la unidad fundamental de transcripción, organizados en tandem con repeticiones de aproximadamente 750 y 227 pares de bases respectivamente. La región codificadora está constituida por 120 nucleótidos y muestra los elementos de control típicos de los genes transcritos por la polimerasa III (i.e., caja A y caja C). La región espaciadora del RNAr 5S de C. fasciculata es mucho más corta (107 nt) que la de T. brucei (630 nt) y no muestran elementos en común (12 y 13). Mapeo previo de los genes de RNAr de T. cruzi indican que el RNAr 5S no está unido a la unidad fundamental de transcripción sino que probablemente se encuentra como un locus independiente ( 10 ).

#### TRANSCRIPCIÓN DEL RNAr 5S POR LA RNA POLIMERASA III.

La transcripción del RNAr 5S por la polimerasa III ha sido ampliamente estudiada en Xenopus laevis, Saccharomyces cerevisiae y Drosophila melanogaster ( 14 ) . ) Estos estudios han mostrado que la transcripción de esta molécula requiere de la participación de diferentes factores de transcripción (TFs): TFIIIA, el cual es específico para el RNAr 5S, TFIIIB y TFIIIC constituido por las dos

subunidades TFIIIC1 y TFIIIC2 ( 14 ) . Estos factores reconocen la región de control interno del RNAr 5S la cual está constituida por los siguientes elementos: la caja A, el elemento intermedio y la caja C. El orden y el sitio que reconocen estos factores durante su ensamblaje se describe brevemente: inicialmente TFIIIA interacciona con la caja C del RNAr 5S, posteriormente TFIIIC1 se une a la caja A y TFIIIC2 se une a los nucleótidos -10 a +18. Por último TFIIIB reconoce este complejo (TFIIIA + TFIIIC1 + TFIIIC2) para constituir el complejo de transcripción al cual se le une la polimerasa III ( 15, 16 ).

Si bien durante muchos años se pensó que la caja A y la caja C de el RNAr 5S eran los únicos elementos necesarios para la transcripción de este gene, ahora es evidente que por lo menos para el caso del RNAr 5S de Bombyx mori, Neurospora crassa y Drosophila melanogaster una secuencia ubicada río arriba del inicio de la transcripción (posición -30) es requerida para su transcripción ( 17, 18 y 19 ), por lo que el concepto clásico de que el RNAr 5S tiene sus regiones de control en la región codificadora debe ser reconsiderado.

## OBJETIVOS

Debido a que uno de los intereses en el grupo consiste en establecer una posible regulación global de la síntesis del RNAr en los dos locus (unidad fundamental de transcripción y gene 5S) en T. cruzi en el presente trabajo nos propusimos analizar las características de organización y estructura de los genes RNAr 5S de T. cruzi. Para ello se plantearon los siguientes objetivos:

1. Estimar la reiteración génica del locus RNAr 5S.
2. Determinar la organización genómica del RNAr 5S de T. cruzi.
3. Localizar el ó los cromosomas en los que se encuentra codificado el RNAr 5S y comparar la ubicación del RNAr 5S con el de la unidad fundamental de transcripción (18S-24S $\beta$ ).
4. Determinar la estructura primaria del gene RNAr 5S y predecir su estructura secundaria.
5. Buscar la existencia de secuencias consenso para el promotor de la RNA polimerasa III y establecer posibles interacciones de la región promotora con proteínas nucleares de T. cruzi mediante ensayos de retardamiento y "footprinting".

## MATERIALES Y METODOS.

### I. CARACTERIZACION GENOMICA Y CROMOSOMAL DEL RNAr 5S DE T. cruzi.

#### 1. Cultivo y extracción de ácidos nucleicos de T. cruzi.

##### 1.1 Cultivo de T. cruzi.

La cepa utilizada en este trabajo (C4) fue aislada en La Cruz, Jalisco por el Dr. Jorge Tay, Departamento de Ecología Humana, Facultad de Medicina U.N.A.M.

Los cultivos se realizaron en medio de infusión de hígado y triptosa (20) ) suplementado con suero bovino fetal al 10%, y se mantuvieron en agitación a 28°C

##### 1.2 Extracción de DNA.

Los cultivos celulares de la cepa C4 fueron cosechados en fase semilogarítmica, por centrifugación a 10,000 g. durante 10 min a 4°C (temperatura que se mantuvo a lo largo de toda la purificación). Posteriormente las células fueron lavadas dos veces en solución N ( Tris-HCl 20 mM pH 7.8, KCl 100 mM, CaCl<sub>2</sub> 2 mM y MgCl<sub>2</sub> 5 mM) y almacenadas a -70°C. La extracción del ácido nucleico (ADN) se realizó de acuerdo al protocolo descrito por Hernández ( 10 ).

##### 1.3 Purificación de RNA ribosomal

Como se describe en ( 21 ), los cultivos celulares

fueron cosechados en la fase semilogarítmica de crecimiento, por centrifugación a 10,000 g durante 10 min a 4°C. Posteriormente las células fueron lavadas en: Tris-HCl 30 mM pH 7.0, KCl 100 mM, CaCl<sub>2</sub>, 3 mM, acetato de magnesio 5 mM y heparina 1 mg/ml y guardadas como precipitado durante 12 h a -70°C. El paquete celular fue resuspendido en una relación 1 g/ml (peso húmedo) en la misma solución del lavado, pero con heparina 4 mg/ml. La lisis se llevó a cabo mediante la adición de NP-40 al 0.3%. Este material se centrifugó primero a 10,000 g 10 min, después a 20,000 g 10 min y por último dos horas a 120,000 g. El material ribosomal recogido del último precipitado, fue desproteínizado con 2 ml de LiCl 2 M, Urea 4 M, Tris-HCl 20 mM (pH 7.0) y heparina 4 mg/ml. Después de centrifugar a 20,000 g 20 min, el precipitado se resuspendió en aproximadamente 1 ml de agua tratada con dietil pirocarbonato (DPC) y fue leído en el espectrofotómetro a 260, 280 y 230 nm.

#### 1.4 Purificación de las especies ribosomales.

La purificación de la molécula S5 de T. cruzi se llevó a cabo mediante electroforesis del material ribosomal. El sistema empleado para el aislamiento de esta molécula pequeña (aprox. 120 b), fue en geles de poli-acrilamida al 3.5% y bis acrilamida al 0.15% en TBE/Urea 7 M.

La muestra disuelta en TBE/ 7 M Urea/ glicerol 20% fue calentada a 65°C, 3 min antes de su aplicación . Los geles de 1.5 mm de espesor fueron precorridos 3 hrs a 200 V. La electroforesis se llevó a cabo a 45 V durante 8 h a temperatura ambiente. El material se visualizó mediante la transiluminación con luz ultravioleta de onda corta de los geles previamente teñidos con bromuro de etidio . La banda de interés fue recortada y el RNA electroeluido en 500 µl de buffer de elución ( SDS 0.3%, NaCl 0.14 M y acetato de sodio 0.05 M pH 5.1), durante toda la noche a 37°C con agitación ocasional. Al día siguiente se recuperó el sobrenadante ( que contenía el RNA marcado) y se dejó 30 min en hielo-sal, posteriormente se centrifugó y el sobrenadante se precipitó dos veces con etanol. El precipitado final fue resuspendido en agua DPC.

## 2. Aislamiento, marcaje e identificación de moléculas recombinantes.

### 2.1 Fosforilación del RNAr 5S.

El RNA fue fosforilado in vitro, de acuerdo al método de Maizels ( 22 ). mediante la enzima cinasa del fago T4 que transfiere el fosfato gama del ATP (en este caso <sup>32</sup>P) a los extremos 5' hidroxilos del RNAr. Con el objeto de generar extremos 5' OH, el RNAr 5S fue desfosfatado mediante la enzima fosfatasa alcalina en

Tris-HCl pH 8.0 durante una hora a 37°C y posteriormente extraídas con fenol-cloroformo (1:1). La reacción de fosforilación se llevó a cabo con 0.5 a 1.0 µg de RNA, 10 U de cinasa y 200 µCi ( $\delta$  32<sup>P</sup>) ATP (> 7000 Ci/ mmol) en 50 µl de Tris-HCl 10 mM pH 9.5, DTT 10 mM, MgCl<sub>2</sub> 10 mM y espermina 10 mM. La reacción fué detenida con acetato de amonio 1 M y el RNA fue recogido en el volumen de exclusión de una columna de Sephadex G-50 (1 X 20 cm) equilibrada y eluída con Tris-HCl 10 mM (pH 7.0), NaCl 100 mM. La radioactividad específica obtenida por este procedimiento fue de 10<sup>7</sup> cpm/µg de RNA.

## 2.2 Preparación y transformación de células competentes de la cepa MC1061 de Escherichia coli K-12.

El precipitado de un cultivo de bacterias de la cepa MC1061 crecidas en 50 ml de medio LB (10 g de peptona, 5 g de extracto de levadura y 10 g de cloruro de sodio) fue resuspendido en 12.5 ml de 0.1 M de cloruro de calcio a 4°C. Esta suspensión se mantuvo a 4°C 30 min, posteriormente fue centrifugada y nuevamente resuspendida en 2.5 ml de 0.1 M de cloruro de calcio a 4°. Las células se mantuvieron a 4°C por lo menos 2 h antes de utilizarlas. La transformación fue realizada tomando 200 µl de la suspensión celular y se le agregaron de 10 a 20 ng de DNA (plásmidos híbridos generados en la reacción de ligación). Se dejó en hielo por 30 min, una

vez transcurrido este tiempo se incubó 90 segundos a 42°C. Después se agregaron 1.5 ml de medio Luria con ampicilina (50 µg/ml de medio). Se dejó crecer el cultivo durante 50 min a 37°C con agitación. De ahí se tomaron alícuotas y se sembraron en placas de Luria-ampicilina (50 µg/ml) usando un asa triangular. La eficiencia de la transformación fue calculada utilizando pUC18 superenrollado como control.

### 2.3 Construcción de una biblioteca genómica de T. cruzi

DNA genómico de la cepa C4 de T. cruzi fue digerido parcialmente con la endonucleasa de restricción Sau3A y fraccionado electroforéticamente en un gel preparativo de agarosa de bajo punto de fusión al 0.8%. El DNA que migró entre 4.3 Kpb a 6.6 Kpb fue electroeluido del gel y ligado en el sitio BamH1 del plásmido pUC18. Células competentes de la cepa MC1061 de E. coli fueron transformadas con la mezcla de ligación (23).

### 2.4 Hibridación in situ de la biblioteca genómica de T. cruzi con el RNAr 5S

La hibridación in situ de colonias transformadas se efectuó de acuerdo al método descrito por Rowecamp y Firtel (24). A continuación se describe brevemente:  $1 \times 10^3$  plásmidos recombinantes se crecieron en cajas de Petri de 6.0 cm de diámetro con medio luria-ampicilina y

se dejaron a 37°C toda la noche. Al día siguiente las colonias fueron transferidas a filtros de papel Whatman 540, luego se colocaron durante 8 min en la solución desnaturalizadora (NaOH 0.5 M y NaCl 1.5 M). Las replicas se neutralizaron con NaCl 1.5 M y Tris-HCl 0.5 M (pH 8.0) 10 min y durante 15 min en una mezcla de etanol absoluto y LiCl 8 M (9:1). Después los filtros se dejaron secar a temperatura ambiente y se prehibridaron por 3 hrs en un volumen de 15 ml a 37°C, y se hibridaron por 18-24 hrs en 8 ml de solución a 37°C. Las soluciones empleadas para prehibridar se prepararon de igual manera que las soluciones utilizadas en los experimentos tipo "Southern" sólo que en este caso no contiene SDS. Se hibridó con  $0.5 \times 10^6$  cpm del RNA marcado con  $^{32}\text{P}$  por cada filtro. El lavado de los filtros, así como la obtención de la autorradiografía, se realizó bajo las mismas condiciones que las que se describieron para el "Southern". De este tamizaje se obtuvo la clona pRTC14-2 que contiene un inserto de 6 kpb que hibrida con el RNAr 5S de *T. cruzi*.

#### 2.5 Recuperación del DNA de geles de agarosa de bajo punto de fusión.

El DNA digerido fue fraccionado por electroforesis en geles de agarosa de bajo punto de fusión al 1% en TBE, con bromuro de etidio 0.5  $\mu\text{g/ml}$ . Con una espátula

se cortó el fragmento del gel que contenía la banda de DNA de interés y se colocó en un tubo eppendorf. Posteriormente se agregó un volumen de TNE 2X (Tris-HCl 0.01 M pH 8.0, NaCl 0.1 M, EDTA 0.001 M pH 8.0) y se calentó a 65° C por 5 min. El DNA se extrajo dos veces con fenol y dos veces con éter para eliminar trazas de fenol y se precipitó con 2.5 volúmenes de etanol absoluto y 1/10 volumen de acetato de sodio 3 M (pH 5.2).

### 3.0 Reiteración y caracterización génica del RNAr 5S.

#### 3.1 Ensayos tipo "Southern".

3 µg de DNA total de la cepa C4 se digirieron con las endonucleasas de restricción Sau 3A, HinfI, y HincII. Los fragmentos de DNA resultantes, se separaron en geles de agarosa al 1% y se corrieron a 80. Volts durante 6 h. Después de la electroforesis el gel se tiñó en una solución de bromuro de etidio al 0.01%. El tamaño de los fragmentos de DNA fue calculado por calibración de los geles con los fragmentos restrictivos del DNA del fago lambda digerido con la endonucleasa HindIII. El DNA digerido fue transferido de acuerdo al método descrito por Southern ( 25 ) a filtros de nitrocelulosa. Los filtros se secaron a temperatura ambiente y se hornearon al vacío a 65°C durante 2 hrs. Fueron prehibridados en 15 ml de la solución de hibridación

(formamida al 50%, EDTA 2 mM, SDS 0.2%, fosfato de sodio 120 mM, SSC 1X y solución de Denhardtts 4X [Ficoll 400 0.002%, PVP-40 0.002% y albumina sérica bovina 0.02%]) por 2 hrs a 37°C. Posteriormente los filtros se hibridaron con  $1 - 5 \times 10^4$  cpm de RNA  $^{32}P$  en 10 ml de una solución de prehibridación durante 18 h a 37°C. El lavado de los filtros se llevo a cabo en 3-4 ciclos que incluyen: enjuague con SSC 2X e incubación en SSC 0.2X y SDS 0.1% a 37°C, con agitación constante una hora. La autorradiografía se llevó a cabo sobre una placa de rayos X (X-Omatt RP Kodak) en presencia de una pantalla intensificadora durante 1 a 3 días a -70°C. En los casos en los que se usó DNA marcado radioactivamente como sonda, se siguió prácticamente el mismo protocolo; la única diferencia fué que en la solución de prehibridación la concentración final de SSC fue 2X.

### 3.2 Hibridación cuantitativa DNA:RNA ("DOT")

Un exceso de RNA marcado es hibridado a DNA que ha sido inmovilizado en un soporte sólido (papel de nitrocelulosa). El análisis densitométrico de la cantidad de marca retenida permite estimar la cantidad de secuencias que existen para ese gene en el DNA genómico.

Antes de gotear el DNA en las tiras de papel de nitrocelulosa éstas fueron hidratadas con agua y posteriormente se transfieron en buffer SSC 20X y se

dejaron en este amortiguador por lo menos cinco minutos. Para eliminar el exceso de buffer las tiras de papel nitrocelulosa se colocaron entre dos hojas de papel Whatman 3MM. Por otro lado 125 ng, 250 ng y 500 ng de DNA genómico de la cepa C4 se llevaron a un volumen de 10  $\mu$ l con agua. Los tubos que contenían las muestras fueron perfectamente cerrados y se colocaron 7 minutos en agua hirviendo. Una vez concluido este tiempo se enfriaron rápidamente en una mezcla de hielo-agua por aproximadamente 4 min y se centrifugaron brevemente para recuperar el volumen inicial. Se colocaron nuevamente en el hielo y se gotearon sobre la nitrocelulosa húmeda en SSC 20X. Se dejaron secar los papeles a temperatura ambiente y se hornearon durante 2 hrs a 80°C. Se prehibridaron e hibridaron como un Southern regular.

La cantidad de RNA hibridada fue estimada a través de la radioactividad que mostraron los filtros al contarse en centelleo líquido en Tolueno, PPO y POPOP, normalizada a cantidad ( $\mu$ g) de RNA por la actividad específica del RNA radioactivo.

### 3.3 Secuenciación de DNA.

La secuenciación nucleotídica se realizó por el método de polimerización sobre moldes de cadena sencilla descrito por Sanger ( 26 ). En este método se lleva a cabo

la síntesis de una cadena de DNA por la DNA polimerasa (secuenasa) in vitro , usando un molde de cadena sencilla. La síntesis se inicia sólo en el sitio en el que un oligonucleótido (cebador) se une al molde. La reacción de síntesis finaliza por la incorporación de un nucleótido análogo, el cual bloquea la elongación de DNA. Estos nucleótidos análogos son los 2',3'-didesoxinucleósidos 5'-trifosfatados (ddNTPs), los cuales carecen del grupo 3'-OH necesario para la elongación de la cadena de DNA.

El DNA de cadena sencilla, requerido para secuenciar por este método, puede ser preparado a partir de los vehículos de clonación M13mp18 y M13mp19, los cuales son derivados del DNA del fago M13, que presenta un enlazador múltiple (polilinker) que contiene sitios de corte para 13 endonucleasas diferentes. M13mp18 y M13mp19 difieren únicamente en la dirección del enlazador múltiple.

El DNA a secuenciar fue ligado en M13mp18, bajo condiciones iguales a las señaladas en las ligaciones con pUC18.

### 3.3.1 Preparación y transformación de células competentes de la cepa JM101 de E. coli.

El DNA clonado en los vectores derivados de M13 fue

introducido en E. coli K-12 JM101 ( 27 ) por transformación, para lo cual:

Una asada de células de E. coli de la cepa JM101 fué inoculada en 50 ml de medio líquido YT (peptona 0.8%, extracto de levadura 0.8% y NaCl 0.5%) y se dejó crecer a 37°C. por 4 h. Posteriormente el cultivo se transfirió a dos tubos, se mantuvo en hielo por 30 min y se centrifugó por 10 min a 6 Krpm. El botón de cada tubo se resuspendió en 12.5 ml de CaCl<sub>2</sub> 100 mM. Se dejó en hielo por una hora y se volvió a centrifugar bajo las mismas condiciones anteriores. Ahora el botón fué resuspendido en 2.5 ml de CaCl<sub>2</sub> 100 mM. Las células se guardaron a 4°C durante 2 hrs mínimo antes de usarlas para transformar. Posteriormente fueron tomados 0.3 ml de éstas células competentes y se les añadieron 4µl de la mezcla de ligación. Se mantuvieron a 4°C por 40 min. y se les dió un choque térmico a 42°C por 2 min. Después fueron agregados 0.01 ml de IPTG 100 mM, 0.1 ml de X-gal al 2%, 0.2 ml de células JM101 frescas (crecidas por 4 h) y 3 ml de agar suave que se prepara igual que el medio YT pero con agar al 6%). Toda esta mezcla se agregó sobre cajas con medio YT (con agar al 1.5%) y se distribuyó homogéneamente. Las cajas se dejaron a 37°C durante toda la noche.

### 3.3.2 Preparación de DNA de cadena sencilla

Fue inoculada una colonia de la cepa JM101 en medio YT,

y se dejó creciendo toda la noche a 37°C. Al día siguiente se tomaron 0.5 ml del cultivo celular y se le agregaron 50 ml de medio YT. Se distribuyó en alícuotas de 3 ml en tubos de ensayo y en cada uno se inoculó una placa incolora. Se incubó por 5 h a 37°C, con agitación fuerte y se transfirió a tubos eppendorf. El cultivo se centrifugó 5 min se tomó 1 ml del sobrenadante y se agregaron 0.2 ml de PEG 6000 al 20% y NaCl 2.5 M. Se conservó a 4°C por 15 min y se centrifugó 10 min. El sobrenadante fue desechado y el botón fue resuspendido en 100  $\mu$ l de TE (Tris 10 mM pH 8.0, EDTA 1 mM). Posteriormente se agregaron 50  $\mu$ l de fenol saturado (2 volúmenes de fenol, un volumen de TE, 1/10 de volumen de Tris 1M pH 9.5) y se mezcló con vortex por 5 min. Se recuperó el sobrenadante acuoso. De manera similar se llevó a cabo una extracción con cloroformo y otra más con éter. Finalmente, a la fase acuosa se le agregaron 10  $\mu$ l de acetato de sodio 3 M y 250  $\mu$ l de etanol, y se dejó a -20°C por una hora. Se centrifugó por 10 min y el botón se resuspendió en 20  $\mu$ l de TE. Se conservó a -20°C hasta su uso.

### 3.3.3 Reacciones de secuenciación.

La secuenciación se llevó a cabo utilizando el equipo de secuenasa (United State Corporation). Se tomaron 7  $\mu$ l de DNA de cadena sencilla (aprox. 1.0  $\mu$ g) en un tubo eppendorf y se le agregó 1  $\mu$ l de cebador (0.5 pmoles) y 2  $\mu$ l de amortiguador

de secuencia (Tris-HCl 40 mM pH 7.5, MgCl<sub>2</sub> 20 mM, NaCl 50 mM). Se calentó a 65°C por 2 min y se dejó enfriar lentamente a temperatura ambiente. Una vez que la temperatura fué menor a 35°C la unión entre el molde y el cebador se completó.

Posteriormente se preparó la mezcla de marcaje: a los 10 µl de la reacción de unión entre el molde y el cebador se le agregaron 2 µl de la mezcla de dNTPs (dGTP, dCTP y dTTP, 1.5 mM), 1 µl de DTT 0.1 M, 0.6 µl de <sup>32</sup>P dATP (5 µCi) y 2 µl de secuenasa (diluída 1:10 en TE). Esta mezcla se incubó a temperatura ambiente 10 min. Después fue preparada la reacción de término, para lo cual se tomaron 2.5 µl de cada uno de los 4 ddNTP 8 µM, y se colocaron en 4 tubos eppendorf (en cada uno un ddNTP diferente). Se precalentaron a 37°C por 3 min. y a cada tubo se le agregaron 3.5 µl de la reacción de marcaje y se dejaron a 37°C por 5 min más. Las reacciones se detuvieron con 4 µl de formamida al 95%, EDTA 20 mM, azul de bromofenol 0.05% y xileno-cianol 0.05%.

#### 3.3.4 Preparación del gel de secuencia.

Inicialmente se procedió a tratar los vidrios que iban a ser utilizados para hacer el gel de secuencia con el silicón y el pegamento. Los vidrios previamente lavados y secos fueron colocados en la campana de extracción, al vidrio grande se le añadieron varias gotas de "sigmacote"

para siliconizarlo y se extendió a todo el vidrio con la ayuda de un pedazo de papel sanitario rápidamente antes de que se secara. Una vez que se extendió se dejó reposar durante 1 min y se volvieron a añadir otras gotas de el siliconizador y nuevamente se extendió. Se dejó secar este vidrio y se lavó exhaustivamente con agua corriente y luego con agua destilada. Una vez hecho lo anterior el vidrio se dejó secar a temperatura ambiente. Por otro lado al vidrio chico se le adicionaron una gotas de pegamento (3-methacrylaylaxy propyl trimethoxysilan de fluka) gelgoo. y se lavó de la misma forma que se hizo para el vidrio grande. El gel que se empleó para secuenciar fue de poliacrilamida al 6%. Para preparar un gel de 70 ml se agregaron: 10.5 ml de la mezcla de acrilamida 38% bisacrilamida 2%, 35 gr de Urea, 14 ml de TBE 5X y 18.9 ml de agua. Esta mezcla se filtró a través de papel de nitrocelulosa (poro de 45  $\mu$ m) y se le adicionó 0.5 ml de persulfato de amonio al 10% y 18.5  $\mu$ l de TEMED. El buffer de corrida fue TBE 1X. El gel se precorrió 1 h a 1500-2000 volts, mientras se realizaban las reacciones de secuenciación. Finalizada la precorrida se cargaron 3  $\mu$ l de cada muestra. Justo antes de ser cargadas en el gel, las muestras se calentaron por 2 min a 80°C. Una vez que el azul de bromofenol llegó al límite del gel se cargaron 3  $\mu$ l más de cada muestra, en los pozos contiguos. Finalizada la corrida

el gel se colocó en una solución de ácido acético al 10% y metanol al 12% por 1 h para remover la urea, y posteriormente se dejó toda la noche a 80°C. La autorradiografía se llevó a cabo sobre una placa de rayos X durante 1-2 días.

### 3.4 Secuenciación de RNA

La secuenciación del RNA se realizó por el método de las digestiones parciales con ribonucleasas ( 28, 29 ). usando el equipo de secuenciación de Bethesda Research Laboratories. Las ribonucleasas utilizadas fueron T1, U2, Phy M, B. cereus y CL3, que cortan en G. A, A+U, C+U, respectivamente.

Inicialmente, la molécula de RNA ribosomal S5 fue desfosforilada y marcada en su extremo 5' con  $^{32}\text{P}$ -ATP (como se describió anteriormente). Los nucleótidos no incorporados fueron eliminados por medio de precipitaciones con etanol y acetato de sodio y mediante electroforesis del material marcado en un gel de acrilamida al 3.5%, bisacrilamida 0.15% y Urea 7 M. La banda correspondiente al RNA S5 fue eluida en SDS 0.3%, NaCl 0.14M y acetato de sodio 0.05M (pH 5.1), durante una noche a 37°C. El material eluido fué precipitado con etanol y acetato de sodio, y finalmente resuspendido en agua tratada con DPC, de manera que en cada 3  $\mu\text{l}$  se tuvieran  $3 \times 10^5$  dpm (desintegraciones por minuto).

Posteriormente se prepararon las muestras agregando en tubos eppendorf lo que a continuación se señala para cada ribonucleasa

Enzima	RNA marcado	Agua	Sol. A	Sol. B	Sol. C	Sol. D	tRNA
Phy M	3 ul	-	2 ul	-	-	14 ul	1 ul
y T1							
U2	3ul	-	-	2 ul	-	14 ul	1 ul
CL 3	6 ul	11 ul	-	-	2 ul	-	1 ul
B.cereus "		11 ul	2 ul	-	-	-	1 ul

Realizadas las mezclas anteriores, se tomaron 4  $\mu$ l de cada una y se colocaron en otros tubos eppendorf, adicionándose en éstos 1  $\mu$ l (2 unidades) de su RNasa correspondiente. Los tubos en los que se adicionó T1, Phy M, U2 y B. cereus se incubaron a 55°C por 15 min. y el tubo con CL3 se incubó a 37°C por 15 min. Para detener la reacciones, todas las digestiones se enfriaron en hielo seco. A las digestiones con CL3 y B. cereus se les adicionaron 5  $\mu$ l de solución D justo antes de ser colocadas en el hielo seco. De esta forma, las muestras quedaron listas para correrse en un gel de secuencia.

El gel de secuencia fue de acrilamida al 20%. Para preparar un gel de 70 ml se agregaron 14 ml de TBE 5X, 13.3 gr de acrilamida, 0.71 gr de bisacrilamida, 35 gr de urea, 100 mg de persulfato de amonio y 25  $\mu$ l de TEMED. El gel se precorrió a 25 watts por aproximadamente 2 hr. Finalizada la precorrida, se cargaron 5  $\mu$ l de cada muestra. Antes de ser cargadas en el gel, las muestras se calentaron 30 seg a 90°C.

La corrida se realizó a 50 watts, hasta que el azul de bromofenol migró 15 cm. La autorradiografía se llevó a cabo sobre una placa de rayos X, en presencia de una pantalla amplificadora, durante la noche.

### 3.5 Preparación de bloques de agarosa para geles de gradiente en pulso ( 30 ).

Cultivos de epimastigotes de la cepa C4 de *T. cruzi* (aprox.  $5 \times 10^8$  células) fueron centrifugados a 5000 rpm durante 10 min a 4°C, en el rotor HB4. El botón fue lavado con 5 ml de SSC 1X (NaCl 50 mM, Citrato de sodio 15 mM y EDTA 10 mM) y centrifugado nuevamente 10 min a 5000 rpm a 4°C. El botón fue resuspendido en 0.5 ml de la solución PBS-EDTA 0.35 M y mezclado con un volumen igual de agarosa de bajo punto de fusión al 1% fundida en: EDTA 0.2 M pH 8.0, Tris-base 0.1 M y NaCl 0.02 M. Las células con la agarosa se mezclaron muy bien con la ayuda de una pipeta pasteur precalentada procurando no hacer burbujas y se vaciaron en el molde donde se hacen los bloques lo mas rápidamente posible. Los bloques se dejaron solidificar 15 min a 4°C y posteriormente se sacaron del molde con la ayuda de un bulbo y se colocaron en la solución de lisis (Sarcosil al 1%, EDTA 0.5M pH 9.5 y 2mg/ml de proteinasa K), se incubaron con esta solución durante 48 hrs a 50°C. Una vez transcurrido este tiempo los bloques de agarosa se guardaron en 0.5 M de EDTA pH 8.0 a 4°C hasta su uso.

### 3.6 Separación del DNA por campos alternos transversos.

Bloques de agarosa que contienen aproximadamente  $1 \times 10^7$  parásitos fueron colocados en los pozos de un gel de agarosa al 0.7%. Una vez que se colocaron los bloques en los pozos del gel éstos fueron sellados con agarosa al 1% (disuelta en TBE 1X), procurando que en los pozos no quedara atrapada ninguna burbuja de aire ya que esto interfiere con el corrimiento de los cromosomas. La separación de los cromosomas fue realizada por utilizando el aparato de electroforesis de campos alternos transversos (TAFE) de Beckman y TBE 1X como buffer de corrida. Las condiciones de electroforesis fueron:

Pulsos de 3 min a 280 mA por 48 hrs y  
pulsos de 8 min a 400 mA por 24 hrs a 14°C.

Cromosomas de Saccharomyces cerevisiae de la cepa 334 fueron usados como marcadores de tamaño (31). Una vez concluida la corrida los cromosomas se visualizaron mediante la transiluminación de los geles (previamente teñidos con Bromuro de etidio (50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )) con luz ultravioleta de onda corta. El gel fue transferido a nitrocelulosa despues de ser despurinizados los ácidos nucleicos con HCl 0.2 N por 5 min, desnaturalizado con NaOH 0.4 M durante 1 h. y neutralizado con NaCl 1.5 M y Tris 1 M pH 7.0 durante 30 min con al menos dos cambios. El papel de nitrocelulosa fue horneado durante 2 h a 65°C para fijar a la membrana los ácido nucleicos. La

prehibridación e hibridación de la nitrocelulosa se efectuó en las mismas condiciones que las descritas para el "Southern".

## II. CARACTERIZACION DE PROTEINAS NUCLEARES QUE SE UNEN AL RNAr 5S DE T. cruzi

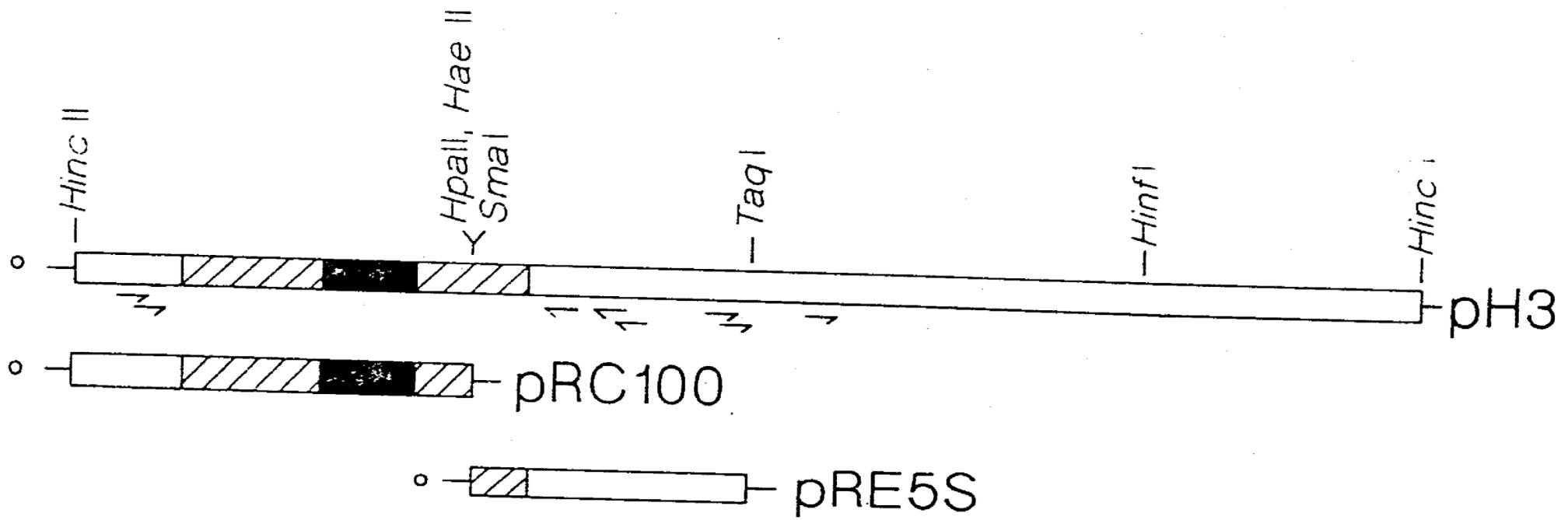
1. Construcción y marcaje de plásmidos empleados en los ensayos de retardamiento y "footprinting".

### 1.1 Plásmidos empleados.

Los plásmidos construídos durante esta tesis para realizar los ensayos de retardamiento y "footprinting" se describen a continuación. El fragmento HincII del plásmido pRTC14-2 que contiene una copia del RNAr 5S fue subclonado en el sitio SmaI de M13mp18 y reclonado en el sitio EcoRI\HindIII de pUC18 generando la clona pH3 (Fig. 4). El plásmido pRE5S fue construído al digerir el inserto del plásmido pH3 con las enzimas SmaI\TaqI; este fragmento de 100 pb que contiene 80 pb de la región espaciadora y 6 cajas G+C fue clonado en los sitios AccI\SmaI de pUC18. El plásmido pRC100 ( que contiene 100 pb de la región codificadora y 2 cajas G+C que se encuentran 40 pb río arriba del inicio de la transcripción) se contruyó al clonar el fragmento SmaI\SmaI del plásmido pH3 en el sitio SmaI\SmaI de pUC18 (Fig. 4). El plásmido pGC9 proporcionado por el Dr. Alejandro García Carranca fué digerido con las enzimas

FIG. 4 Mapa del gene que codifica para el RNAr 5S de T. cruzi y subclonas usadas en esta tesis.

Solamente las enzimas utilizadas para la construcción de los plásmidos son representados aquí. La caja sombreada y negra corresponden a la región codificadora y a la región de control interno (i.e., caja A y caja C) respectivamente. Las flechas indican la posición y orientación de las cajas G+C. El extremo HindIII de los plásmidos es indicado por un círculo.



40 bp

o pUC18 *Hind III*

SalI/BamHI para liberar un fragmento de 70 pb que contiene 6 cajas G+C en el promotor temprano del genoma del virus de mono SV-40 ( 32 ).

### 1.2 Preparación de fragmentos radioactivos de DNA para ensayos de "footprinting" (33).

El marcaje radioactivo de DNA con  $P^{32}$ -dNTP (Amersham), se realizó empleando el fragmento Klenow de la enzima DNA polimerasa I, la cual incorpora nucleotidos marcados en los extremos 3' del DNA lineal de doble cadena, con extremos 5' salientes. Para el marcaje de los fragmentos se digirieron 3  $\mu$ g de DNA plasmídico con la enzima de restricción adecuada que deje extremos 5' salientes y que corte una sola vez en el polilinker en el cual se encuentra clonado el fragmento de DNA que nos interesa marcar. El marcaje se efectuó durante 20 min a temperatura ambiente en un volumen final de 15  $\mu$ l. Las reacciones contenían normalmente 3.0  $\mu$ g del plásmido digerido (resuspendido en 10  $\mu$ l de agua, 1.5  $\mu$ l de Buffer Hind III, 1  $\mu$ l de cada dNTP;s frío (2.5 mM), 20 uCi de dNTPs marcados en la posición alfa y 7.5 U de enzima (fragmento Klenow). Para separar el DNA marcado del dNTP $\alpha$ - $P^{32}$  no incorporado, se agregaron a la mezcla 85  $\mu$ l de TE (Vf 100 $\mu$ l) mas 50  $\mu$ l de fenol saturado y 50  $\mu$ l de cloroformo y se centrifugó durante 5 min a 14 Krpm a temperatura ambiente, se recuperó la fase acuosa y se agregó

un volumen de acetato de amonio 4 M más 2.5 volúmenes de etanol para precipitar el DNA marcado. La mezcla se colocó en un baño de hielo seco-etanol 15 min, se centrifugó 30 min a 14 Krpm . Se eliminó el sobrenadante y la pastilla se lavó con etanol al 80% y posteriormente el botón se dejó secar de 5 a 10 min a temperatura ambiente y finalmente se resuspendió en 20  $\mu$ l de agua. El fragmento apropiado del DNA marcado se obtuvo al digerir los ácidos nucleicos marcados, con una segunda enzima de restricción. Los productos de las digestiones se fraccionaron en geles nativos de poliacrilamida del 4 al 6% ( 25 ). Los productos de la segunda digestión se colocaron directamente sobre el gel nativo de poliacrilamida, después de agregar 5  $\mu$ l de solución con colorantes (50% de glicerol, 0.1% de xilen-cianol\ 0.1% de azul de bromofenol). Los geles de poliacrilamida se corrieron a 150 volts, hasta la separación deseada de los fragmentos, en base a la migración de los colorantes. Los fragmentos marcados se localizaron al exponer el gel húmedo cubierto con Ega-pack, sobre una placa de autorradiografía, durante 10 min. Las bandas de interés se cortaron del gel con bisturí y se colocaron en tubos eppendorf. Se agregaron 400  $\mu$ l de buffer de elución (10 mM de Tris-HCl pH 7.5, 1 mM de EDTA, 0.3 M de NaCl y 0.1% de SDS). a cada banda, y éstas se incubaron a 37°C durante 14 a 16 hrs. Los 400  $\mu$ l se filtraron (Millex-HA, 0.45  $\mu$ m; Millipore),

y los ácidos nucleicos se precipitaron con un volumen de isopropanol. Las pastillas se resuspendieron en agua a 10,000 cpm/ $\mu$ l.

2. Obtención y caracterización de proteínas nucleares y citoplásmicas.

2.1 Obtención de núcleos y proteínas citoplásmicas (fracción S100),\*

La obtención de los núcleos se realizó de acuerdo al protocolo descrito por Weil ( 34 ) con las siguientes modificaciones: Un cultivo de 250 ml. con aproximadamente  $1 \times 10^8$  epimastigotes/ml, fueron cosechados y lavados con buffer salino de fosfatos (PBS, pH 7.2), centrifugados en el rotor GSA 10 min a 6000 rpm a 4°C. El volumen del paquete celular (VPC) fue medido y se resuspendió en 5 volúmenes con buffer A (Hepes 10 mM pH 7.9, 1.5 mM de  $MgCl_2$ , 10 mM de DTT y 0.5 mM de PMSF). se transfirió a tubos nalgene (de aproximadamente 30 ml) donde se dejaron reposar 20 min en hielo. El material se centrifugó a 6000 rpm en el rotor HB4 a 4°C y el botón celular se resuspendió en 2 volúmenes del VPC inicial con buffer A conteniendo cocktail de inhibidores de proteasas (0.5 mM de PMSF, 2 mM de Benzamidina, 5  $\mu$ g/ml de aprotinina, 5  $\mu$ g/ml de pepstatina y 5  $\mu$ g/ml de leupeptina) concentración final. Las células fueron lisadas por 30 golpes manuales en el homogenizador de maso de teflón y vaso de vidrio (en hielo

y en la campana de flujo laminar). La lisis celular fue monitoreada en el microscopio. Esta suspensión se centrifugó nuevamente a 6000 rpm en el rotor HB4, durante 10 min a 4°C. Se recuperó el sobrenadante (el botón constituido principalmente por núcleos\* fue usado para la obtención de extractos nucleares ver sección 2.2 ) y se le añadió un décimo del volumen de Buffer B ( 0.3 M de Hepes pH 7.9, KCl 1.4 M y 0.03 M de MgCl<sub>2</sub>) se mezcló suavemente y se centrifugó 1 h a 35 Krpm en el rotor SW 65 Ti. El sobrenadante se dializó a 4°C en bolsas de dialisis (previamente tratadas con 2% de bicarbonato de sodio y 1 mM de EDTA pH 8.0). durante 3 h contra 200 Vol de buffer D (Hepes 20 mM pH 7.9, KCl 60 mM, 20% de glicerol, 0.25 mM de EDTA, 0.125 mM de EGTA, 1 mM de DTT) y cocktail de inhibidores de proteasas (2 mM de Benzamidina 5 µg/ml aprotinina, 5 µg/ml de pepstatina A y 5 µg/ml de leupeptina). Después de la diálisis, los extractos que contienen principalmente proteínas citoplásmicas (denominada fracción S-100) fueron alicuotadas en volúmenes de 10-20 µl y rápidamente congeladas en nitrógeno líquido.

## 2.2 Extractos nucleares\*.

Los extractos proteicos se obtuvieron básicamente según lo descrito por Dignam y cols (35) y Wildman y cols (36). La extracción de las proteínas se efectuó en el cuarto frío. Los núcleos previamente obtenidos (como se

describió en la sección 2.2) fueron resuspendidos suavemente con la ayuda de puntas azules (de micropipeta p1000 a las cuales se les cortó la punta para hacerlas más anchas) procurando no hacer burbujas en buffer C (Hepes 20 mM pH 7.9, glicerol al 25%, NaCl 0.42 M, MgCl 1.5 mM, EDTA 0.2 mM, DTT 0.5 mM, PMSF 0.5 mM) más cocktail de inhibidores de proteasas. Una vez que se resuspendieron los núcleos, se dejaron incubando con este buffer durante 45 min a 4°C con agitación rotatoria. Para separar restos nucleares y cromatina liberada, la suspensión nuclear se centrifugó durante 33 min a 19 Krpm a 4°C en el rotor SW 50.1. Los sobrenadantes que contenían las proteínas nucleares se colocaron, con cuidado en otro tubo limpio y se les adicionó 1.6 ml de sulfato de amonio 3.8 M (disuelto en 20 mM de Hepes pH 7.9), por ml de sobrenadante con la finalidad de precipitar las proteínas contenidas en el sobrenadante. Las mezclas se agitaron nuevamente de manera rotatoria durante 30-45 min a 4°C y el precipitado de las proteínas se obtuvo por centrifugación durante 18 min a 35 Krpm a 4°C en el rotor SW50 Ti. La pastilla de proteínas se resuspendió inmediatamente en 100 - 500  $\mu$ l de amortiguador D (Hepes 20 mM pH 7.9, Glicerol al 20%, EDTA 0.2 mM, KCl 50 mM, BmeOH 2 mM, PMSF 1 mM) y cocktail de inhibidores de proteasas procurando nuevamente no hacer burbujas para no desnaturalizar las proteínas. Las proteínas fueron dializadas por colocarlas en

un tubo eppendorff el cual fue previamente decapitado y al cual se le colocó en lugar de la tapa la membrana de diálisis, esta se sujetó al tubo por medio de una liga y parafilm. Finalmente se colocó el eppendorf invertido en un tubo cónico de 50 ml y se centrifugó a 1000 rpm 5 min (en la centrífuga clínica) con la finalidad de checar que no se saliera la muestra. El eppendorf invertido con la muestra en contacto con la membrana de diálisis se colocó en 200 volúmenes de Buffer D que contiene solamente Benzamidina y PMSF como inhibidores de proteasa a una concentración de 0.5 mM y 2 mM respectivamente. El buffer de diálisis se cambió cada dos hrs 3 veces. Una vez que finalizó la diálisis el eppendorf que contiene la proteína dialisada se centrifugó durante 8 min a 14 Krpm, se recuperó el sobrenadante (el botón contiene proteína desnaturalizada), se alicuotó en tubos eppendorf en volúmenes de 10 a 20  $\mu$ l, se colocaron rápidamente en nitrógeno líquido y se guardaron en el REVCO. La concentración de proteínas fue determinada de acuerdo al método de Bradford ( 37 ).

### 2.3 Ensayos de retardamiento en gel.

Antes de realizar los ensayos de interacción DNA proteína se procedió a hacer el gel nativo de poliacrilamida de baja fuerza iónica. Para lo cual se preparó un gel de poliacrilamida al 4% de 10 X 11.5 y 1.5 mm de espesor de

acuerdo al protocolo descrito por Cereghini ( 38 ). Se añadieron 6.6 ml del stock de acrilamida:bisacrilamida 29:1, 5 ml de TBE 5X (Cf 0.5X) y 38.4 ml de agua. El gel fue polimerizado con la adición de 250  $\mu$ l de persulfato de amonio al 10% y 80  $\mu$ l de TEMED. La acrilamida se dejó polimerizar durante 1 h. Antes de cargarse las muestras (complejos DNA-proteína) el gel fue precorrido a 150 volts 30 min.

Los ensayos de interacción DNA proteína se realizaron en un volumen de 20  $\mu$ l en presencia de Hepes 10 mM pH 7.9, KCl 30 mM, glicerol al 10%, DTT 1 mM, PMSF 0.05 mM; 1  $\mu$ g/ $\mu$ l de poli (dI-dC):(dI-dC) como competidor no específico. MgCl<sub>2</sub> 4 mM, y Espermidina 4 mM. Esta mezcla se incubó con diferentes concentraciones de extractos nucleares (1-24  $\mu$ g) durante 10 min en hielo. Posteriormente se añadieron 2 ng del fragmento de DNA marcado radioactivamente con <sup>32</sup>P y se incubaron nuevamente durante 10 minutos en hielo. Terminada la incubación se añadieron 3  $\mu$ l de Buffer de muestra (0.25% de azul de bromofenol, 0.25% de xilen cianol y 20% de glicerol) solamente a la muestra que contiene sonda libre sin extracto. Las muestras se cargaron inmediatamente en el gel de poliacrilamida de baja fuerza iónica, y se corrieron a 150 volts durante 2 hrs. Una vez que concluyó la corrida, los geles se fijaron 15 min en 10% de Metanol y 10% de ácido acético y posteriormente fueron secados sobre papel Whatman 3 MM (45 min a 80°C) y expuestos en película Kodak X-Omat.

## 2.4 Footprinting.

### 2.4.1 Interacción DNA-proteína ( 39 ).

Los ensayos de interacción DNA-proteína para el footprinting se realizaron normalmente en un volumen final de 10  $\mu$ l, en reacciones que contenían: 10 mM de Hepes pH 7-5, KCl 50 mM, 0.1 mM de EDTA, 0.5 mM PMSF, 4mM MgCl<sub>2</sub>, 4 mM espermidina, 10% de glicerol, 1  $\mu$ g/ $\mu$ l de poly (dI-dC):(dI-dC), 1-2 ng de fragmento de DNA marcado en un extremo y en una sola cadena y 30  $\mu$ g de extracto nuclear. Normalmente se mezclaron 3  $\mu$ l de solución 3.3X (13.3 mM de MgCl<sub>2</sub> y 13.3 mM de espermidina) con 1  $\mu$ g/ $\mu$ l de competidor poly (dI-dC):(dI-dC) y se ajustó el volumen con amortiguador D (ver sección 2.2) antes de adicionar el extracto. Generalmente componentes descritos se preincubaron durante 10 min en hielo, antes de adicionar los fragmentos marcados e incubar las reacciones por otros 10 a 15 min en hielo.

### 2.4.2 Digestión con DNAasaI.

La DNAasaI (Amersham) se disolvió a una concentración de 2 mg/ml en solución HNB (Tris-HCl 15 mM pH7.5, KCl 60 mM, NaCl 15 mM, 0.5 M de sacarosa, espermidina 0.5 mM, espermina 0.15 mM, EDTA 0.2 mM, DTT 0.5 mM, PMSF 0.2 mM) y se almacenó a -20°C. Las digestiones con DNAasaI se realizaron normalmente a 20°C durante 60 seg, con DNAasa recién diluida en solución HNB enriquecida con MgCl<sub>2</sub> 5 mM y CaCl<sub>2</sub> 2.5 mM).

Generalmente se usaron 1-3  $\mu$ l de DNAasaI diluida entre 1:50 y 1:100 para las digestiones en presencias de extracto. Para digerir el DNA en ausencia de extractos se usaron diluciones entre 1:400 y 1:1000. Las reacciones se detuvieron mediante la adición de 30  $\mu$ l del amortiguador de paro de DNAasa (EDTA 50 mM, SDS 0.2%, RNA de transferencia 100  $\mu$ g/ml y 100  $\mu$ g/ml de proteinasa K). Los tubos se incubaron durante 45 min a 42°C. A cada tubo se le añadió TE (10 mM Tris pH 7.5 y 1 mM EDTA) a un volumen final de 100  $\mu$ l. Los ácidos nucleicos fueron extraídos con fenol:cloroformo (1:1). Se recuperó la fase acuosa de cada una de las muestras y se les adicionó un volumen de acetato de amonio 4 M y 2.5 volúmenes de etanol frío (-20°C), y se dejó precipitar el DNA toda la noche a -20°C. Al día siguiente las muestras se centrifugaron a 14 Krpm a 4°C. El sobrenadante fue eliminado y el botón fue lavado con etanol al 80% y se dejó secar a temperatura ambiente. Finalmente la pastilla se disolvió en 3  $\mu$ l de buffer de carga (95% de formamida, 10 mM de EDTA, 0.25% de azul de bromofenol y 0.25% de xilen cianol).

#### 2.4.3 Secuenciación por Maxam y Gilbert ( 40 ).

Este procedimiento requiere que el DNA sea marcado en un extremo y una cadena. El DNA es sujeto a 4 diferentes reacciones de secuencia, cada una de las cuales va a modificar químicamente el DNA en una base específica. De tal

manera que en la reacción A+G, las condiciones ácidas depurinizan el DNA. Las guaninas son metiladas por Dimetilsulfato. La hidrazina reacciona con citosina y timidina pero una alta concentración de cloruro de sodio modifica preferencialmente las citosinas e inhibe la reacción con timidina. Estas reacciones se extienden a lo largo de la molécula de DNA en donde se encuentran cada una de las bases que modifican. Posteriormente el DNA modificado es tratado con piperidina que rompe la hebra de DNA en la base modificada. Dado que las bases son modificadas parcial y azarosamente, lo que resulta es una mezcla de fragmentos de DNA marcados de diferente tamaños en cada reacción de secuencia. Cada una de las reacciones son cargadas separadamente en un gel de secuencia el cual separa los fragmentos de DNA de acuerdo a su tamaño. Por observar la posición relativa de las bandas radioactivas en estos cuatro carriles, la secuencia de DNA puede ser determinada

#### **Reacciones de modificación.**

Reacción de modificación de purinas (G+A). Se efectuó de acuerdo al protocolo descrito por Maxam y Gilbert (40) y que a continuación se describe:

A 10  $\mu$ l de DNA marcado (10,000 cpm/ $\mu$ l) en un solo extremo y en una sola cadena se le añadió 2  $\mu$ l de esperma de salmón (5  $\mu$ g/  $\mu$ l) sonificado como "carrier" y 25  $\mu$ l de ácido fórmico

(98%). Esta mezcla se incubó durante 6 min a 20°C, se agitó con vórtex y se añadió 200  $\mu$ l de buffer de paro de hidrazina (0.3 M de acetato de sodio, 0.1 mM EDTA, 25  $\mu$ g/ml de tRNA) y se colocó en hielo. Una vez que se paró la reacción el DNA se precipitó al añadir 3 volúmenes de etanol a -20°C y se centrifugó a 14 Krpm durante 30 min. El botón se resuspendió en 250  $\mu$ l de acetato de sodio 0.3 M y se volvió a precipitar el DNA con 3 volúmenes de etanol. Nuevamente se colocó en un baño de hielo seco - etanol 15 min y se centrifugó a 14 Krpm a 4°C. El botón se lavó con etanol al 80% y se procedió a la reacción de ruptura con piperidina.

Para la reacción de modificación de guaninas (G) se mezclaron 190  $\mu$ l de buffer de dimetil-sulfóxido (50 mM de cacodilato de sodio, y 1 mM de EDTA disódico pH 8.0) con 4  $\mu$ l de DNA de esperma de salmón sonicado y 5  $\mu$ l de DNA marcado. Esta mezcla se colocó a 4°C y se le adicionó 5  $\mu$ l de dimetil sulfóxido al 10%. La reacción de modificación se efectuó durante 5 min a 20°C y fue parada por añadir 50  $\mu$ l de solución de paro de dimetil sulfato (1.5 M de acetato de sodio, 0.5 M de ditiotreitól, 100  $\mu$ g/ml de t-RNA de levadura). EL DNA se precipitó al adicionar 3 volúmenes de etanol y se dejó durante 15 min en un baño de hielo seco-etanol. Se centrifugó, se reprecipito y se lavó el botón igual que para la reacción de modificación de las purinas.

Para la secuenciación de las adeninas (A) se mezclaron 100  $\mu$ l de NaOH 1.2 N, 1mM de EDTA pH 8.0, 4  $\mu$ l de DNA sonificado y 5  $\mu$ l de DNA marcado (aprox. 10.000 cpm / $\mu$ l). La reacción se efectúa durante 7 min a 90°C y se enfría rápidamente en agua-hielo. A esta mezcla se le añadió 150  $\mu$ l de ácido acético 1 M y 5  $\mu$ l de tRNA (aprox 1 mg/ml) más 3 volúmenes de etanol para precipitar ácidos nucleicos y se mantuvo en hielo seco/ etanol durante 15 min. transcurrido este tiempo se centrifugó durante 30 min a 14 Krpm. El botón fue resuspendido en 300  $\mu$ l de acetato de sodio 0.3 M pH 5.2 se volvió a precipitar y lavó como se indicó anteriormente.

#### Reacción de ruptura

Después que las reacciones de modificación han sido hechas, el DNA modificado es tratado con piperidina, la cual rompe la hebra de DNA en las bases modificadas. Esta reacción se realizó de la siguiente manera:

EL DNA de cada una de las reacciones se disolvió en 100  $\mu$ l de piperidina diluida recientemente (1:10). Cada uno de los tubos eppendorf que contenían las reacciones de secuencia fueron sellado muy bien con parafilm y posteriormente incubados a 90°C durante 30 min. Una vez que la reacción de ruptura fue efectuada los tubos fueron rápidamente colocados en una baño de hielo seco / etanol durante 5 min y posteriormente se colocaron en el evaporador rotatorio

(Savant) hasta que se evaporó la piperidina (aproximadamente 1 h). Una vez que se evaporó la piperidina el botón fue redisoluto en 10  $\mu$ l de agua se colocó nuevamente 5 min en el baño de hielo seco-etanol y se volvió a colocar en el savant esto se efectuó dos veces más con la finalidad de eliminar lo más que se pueda la piperidina, debido a que la calidad de las reacciones de secuencia depende en parte, de la completa eliminación de ésta.

Una vez que las reacciones de secuencia así como las del footprinting fueron realizadas las muestras se corrieron en un gel de poliacrilamida-Urea al 6%. Para un gel de 70 ml se agregaron: 18 ml de la mezcla acrilamida-bisacrilamida (29:1), 35 gr de Urea, 14 ml de TBE 5X y 18 ml de agua. Además se le adicionaron 520  $\mu$ l de persulfato de amonio al 10% y 18.6  $\mu$ l de TEMED. El gel se precurrió durante 30 min a 30 watts. Por otro lado las muestras fueron calentadas justo antes de cargarse 3 min a 90°C. y se colocaron 3  $\mu$ l de cada reacción por pozo. Las muestras fueron corridas a 25 watts hasta que el azul de bromofenol migró tres cuartas partes del gel. Una vez que finalizó la corrida el gel ( que se encontraba pegado al vidrio chico) se colocó en una solución que contenía 10% de ácido acético y 12% de metanol durante 1 hr para fijarlo. El gel se dejó toda la noche a 37°C para secarlo y al día siguientes se colocó una película de rayos X

y se dejó exponiendo durante 2 a 3 días a  $-70^{\circ}\text{C}$  con pantalla amplificadora.

## 2.5 Southwestern ( 41 ).

Esta técnica, es un método efectivo para identificar de manera directa las proteínas que se unen al DNA sin purificación parcial. A través de la transferencia de las proteínas a papel de nitrocelulosa y su incubación con DNA blanco se puede lograr identificar las proteínas que reconocen la secuencia del promotor a estudiar. Nosotros empleamos este protocolo para identificar un grupo de proteínas que parecen unirse con especificidad al promotor del RNAr 5S y a su región espaciadora.

### 2.5.1 Preparación de las muestras.

30  $\mu\text{g}$  de proteínas nucleares y de la fracción S-100 (aproximadamente 15  $\mu\text{l}$ ) fueron diluidas con un volumen de buffer de muestra (5% SDS, 5 mM de Tris-HCl pH 6.8, 200 mM de DTT, 20% de glicerol y 0.05% de pironina). Las muestras se colocaron directamente en el gel sin hervir. El volumen depositado en los pozos del gel dependió en cada caso de que tan concentrada estuviera la muestra.

### 2.5.2 Preparación de los geles.

La electroforesis de las proteínas se hizo en geles de poliacrilamida de 10 X 11.5 cm y de 1.5 mm de espesor.

preparados de acuerdo al procedimiento descrito por Laemmli ( 42 ). El gel resolutivo fue preparado con las siguientes concentraciones finales: Acrilamida 10%, bisacrilamida 0.9%, Tris-base 0.375 M pH 8.8, SDS 0.1%. El gel fue polimerizado mediante la adición de 0.05% de persulfato de amonio y 0.003% de TEMED. Las concentraciones finales del gel concentrador fueron las siguientes: Acrilamida 4%, bisacrilamida 0.10%, Tris-HCl 0.0125 M pH 6.8 y SDS al 0.1%, persulfato de amonio 0.05% y TEMED 0.05%. El buffer de electroforesis contenía: Tris-base 0.025 M pH 8.3, glicina 0.192 M y SDS 0.1%. La electroforesis se hizo manteniendo el voltaje constante (100 volts) hasta que la pironina alcanzó el fondo del gel en aproximadamente 5 hrs.

### 2.5.3 Tinción con azul de Coomasie.

Terminada la corrida del gel; éste se desmontó de la cámara de electroforesis, la mitad de éste se colocó en un recipiente que contenía aproximadamente 25 ml de solución de tinción la cual consistía de azul de Coomasie (Bio-Rad) 0.25% disuelto en metanol 45% y ácido acético 10%. Después de permanecer el gel 1 h en el colorante se lavó el exceso del mismo con agua bidestilada. Para desteñir el gel se empleó una solución de metanol al 10% y ácido acético al 10%, cambiándola cuando se saturaba de colorante, hasta que el fondo del gel estuviera transparente o azul tenue.

#### 2.5.4 Electroinmunotransferencia ( 43 ).

Terminada la electroforesis del gel de poliacrilamida, la otra mitad del gel se equilibró en la solución amortiguadora de transferencia Trizma-base 25 mM, glicina 192 mM y metanol al 20%. Así mismo el papel de nitrocelulosa cortado al tamaño del gel se equilibró en la misma solución amortiguadora por 30 min. Una vez equilibrados el gel y el papel de nitrocelulosa, la unidad de transferencia se armó en una bandeja con solución amortiguadora de la siguiente manera: se colocó primero un cojinete de fibra y en seguida dos capas de papel filtro (Whatman 2MM), ambos previamente humedecidos en amortiguador. Sobre el papel filtro se colocó el gel y sobre éste el papel de nitrocelulosa, presionando con un objeto cilíndrico con el fin de eliminar burbujas de aire. Después del papel de nitrocelulosa se adicionaron otras dos capas de papel filtro y un cojinete de fibra. La unidad se cerró y se pasó a la cámara de transferencia, que contenía 2.5 l del amortiguador ya mencionado. La transferencia se realizó durante 3 h a 300 mA. Una vez terminada la transferencia el papel se secó a temperatura ambiente y se guardó hasta su uso a 4°C. Antes de ponerse a interactuar con el DNA, el papel de nitrocelulosa fue cubierto con 5% de leche descremada (Sveltes) disuelta en 10 mM de HEPES pH 7.9 e incubadas durante 1 h a temperatura ambiente.

Posteriormente y ya con el papel bloqueado para disminuir de esta manera uniones inespecíficas el filtro fue incubado con amortiguador de unión (10 mM Hepes pH 7.9, 50 mM NaCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1 mM EDTA, 1 mM DTT, 0.25% de leche descremada) que contiene 5 X 10<sup>5</sup> cpm (Cerenkov) de DNA marcado por ml durante 3 hrs a temperatura ambiente. Los filtros fueron lavados con 3 cambios de buffer de unión que contiene 0.1 M de NaCl durante 2 hrs. El papel de nitrocelulosa se dejó secar y se expuso en películas Kodak X-Omat.

## RESULTADOS

FEMSLE 04825

## *Trypanosoma cruzi* 5S rRNA genes: molecular cloning, structure and chromosomal organization

Rosaura Hernández-Rivas, Santiago Martínez-Calvillo, Mireya Romero  
and Roberto Hernández

*Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, México City, México*

Key words: *Trypanosoma cruzi*; 5S Ribosomal RNA; Chromosomal organization; Gene sequence

Received 6 August 1991

Revision received 21 January 1992

Accepted 22 January 1992

### 1. SUMMARY

To further study the ribosomal RNA genetic system in *Trypanosoma cruzi*, the 5S rRNA gene family was characterized. We found that this gene family is reiterated about 1600 times per diploid nuclei and is mostly organized as a tandem repeat of 481 base pairs. These gene clusters were assigned to two chromosomes of about 1500 and 1400 kilobase pairs. We found that the 5S rRNA-coding region is comprised of 120 nucleotides, and contains the well-known internal control regions of eukaryotic RNA polymerase III. The two gene-spacer regions analysed exhibit a putative signal for transcription termination and six sites homologous to the consensus sequence for the binding of transcription factor Sp1.

*Correspondence to:* R. Hernández, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Apartado Postal 70-228, 04510 México D.F. México.

### 2. INTRODUCTION

*Trypanosoma cruzi*, a parasitic protozoa, is the etiologic agent for Chagas' disease. *T. cruzi*, like other trypanosomatids, possesses atypical cytosolic ribosomes whose large subunits contains two large ( $\alpha$  and  $\beta$ ) and six small (S1-S6) rRNA molecules [1-3]. All these RNA molecules, except S5, are encoded within the main transcription unit [4-6]. RNA sequencing of 5S rRNA from *Crithidia fasciculata* [7] and from *Trypanosoma brucei* [8], have demonstrated that this small rRNA molecule corresponds to the 5S rRNA of other species.

Our group is interested in the physiology of expression of the two kinds of *T. cruzi* rRNA genes (i.e., main transcription unit and 5S locus). We have previously cloned and partially characterized genomic DNA fragments from the main transcription unit [6,9]. Here we report the genomic organization, chromosome location, and structure of the 5S rRNA gene family from *T. cruzi*. Our findings are compared with the analo-

gous data published for the African species *T. brucei* [10,11] and the insect parasitic trypanosomatid *C. fasciculata* [12].

### 3. MATERIAL AND METHODS

#### 3.1. Cell culture and nucleic acids preparation

Culture of *T. cruzi* epimastigotes, nucleic acids purification and the use of small rRNAs as probes have been previously described [6,13].

#### 3.2. Genome characterization and cloning procedures

Southern-blot experiments were performed by standard techniques [14]. Dot blots of genomic DNA were carried out by applying 125–500 ng of heat-denatured DNA to nitrocellulose wet in 3 M NaCl and 300 mM trisodium citrate. Thereafter, the membrane was treated as a regular Southern. Hybridization signals were first visualized by x-ray autoradiography, and then the individual dots were counted in a Packard Tri-Carb liquid scintillation analyser.

A *T. cruzi* genomic library was constructed as follows: nuclear DNA was partially digested with *Sau3AI* endonuclease and size fractionated through a 0.8% agarose gel. The DNA migrating in between 4.3 to 6.6 kbp was electroeluted from the gel and ligated into the *Bam*HI site of plasmid pUC18. *Escherichia coli* MC1061 cells were transformed and screened with kinased 5S rRNA as described elsewhere [6]. The clone pRTC14.2 was isolated as a recombinant plasmid bearing a 6-kbp genomic DNA insert that hybridizes to 5S rRNA.

#### 3.3. Preparation of DNA plugs and chromosome electrophoresis

Epimastigotes from cultures were embedded and lysed in agarose blocks as described [15]. The embedded material of approximate  $1 \times 10^7$  parasites were loaded on 0.8% agarose gels in 0.1 M Tris base, 0.1 M boric acid and 2 mM EDTA pH 8 (1 × TBE). The separation of the chromosomes was performed using the Transverse Alternating Field Electrophoresis (TAFE) apparatus from Beckman. The electrophoretic conditions were:

3-min pulses of 280 mA constant current for 48 h, 8-min pulses of 400 mA for an additional 24 h at 14°C in 1 × TBE. *Sacharomyces cerevisiae* chromosomes from strain 334 were used as size standards. The gel was blotted to nitrocellulose after depurination with 0.2 N HCl for 5 min, and treated as a regular Southern blot.

#### 3.4. Nucleotide sequence analysis

Two different *Sau3AI* fragments of the tandem repeat cloned in pRTC14.2 were subcloned into the M13mp18 *Bam*HI site. Sequences from these and other constructions were obtained as described elsewhere [9]. Both DNA strands were sequenced and all restriction sites were crossed.

The 5' end of *T. cruzi* 5S rRNA was determined by partial sequence analysis of 5' [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]-ATP-kinased RNA molecules (New England Nuclear), using the Bethesda Research Laboratories RNA sequencing kit and protocol. The 3' end was assigned by comparison with *T. brucei* and *C. fasciculata* species.

## 4. RESULTS AND DISCUSSION

#### 4.1. Gene reiteration

The 5S rRNA-gene copy number was estimated by comparison with the S1 small-rRNA coding region as reference. S1 is part of the main transcription unit [6], which is present in about 100 copies per nuclei [13]. The radioactivity retained in dot blots, corrected for the specific radioactivity of the S1 or 5S rRNAs (Fig. 1A), indicates that, in *T. cruzi*, the 5S rRNA genes occur some sixteen times for each S1 coding region (i.e., approximately 1600 copies per nuclei). This figure is similar for the three DNA quantities used (125, 250 and 500 ng). An equivalent reiteration value (1500 copies) has been reported for *T. brucei* 5S rRNA genes [8]. *C. fasciculata* 5S rRNA genes exhibit a lower multiplicity (i.e., 250–300 gene copies per nuclei [12]). Since all the rRNA molecular species are equimolar in the ribosomes, the 5S gene overdosage raises interesting questions regarding its level of expression and the stoichiometry of transcripts potentially produced.

gous data published for the African species *T. brucei* [10,11] and the insect parasitic trypanosomatid *C. fasciculata* [12].

### 3. MATERIAL AND METHODS

#### 3.1. Cell culture and nucleic acids preparation

Culture of *T. cruzi* epimastigotes, nucleic acids purification and the use of small rRNAs as probes have been previously described [6,13].

#### 3.2. Genome characterization and cloning procedures

Southern-blot experiments were performed by standard techniques [14]. Dot blots of genomic DNA were carried out by applying 125–500 ng of heat-denatured DNA to nitrocellulose wet in 3 M NaCl and 300 mM trisodium citrate. Thereafter, the membrane was treated as a regular Southern. Hybridization signals were first visualized by x-ray autoradiography, and then the individual dots were counted in a Packard Tri-Carb liquid scintillation analyser.

A *T. cruzi* genomic library was constructed as follows: nuclear DNA was partially digested with *Sau3A*I endonuclease and size fractionated through a 0.8% agarose gel. The DNA migrating in between 4.3 to 6.6 kbp was electroeluted from the gel and ligated into the *Bam*HI site of plasmid pUC18. *Escherichia coli* MC1061 cells were transformed and screened with kinased 5S rRNA as described elsewhere [6]. The clone pRTC14.2 was isolated as a recombinant plasmid bearing a 6-kbp genomic DNA insert that hybridizes to 5S rRNA.

#### 3.3. Preparation of DNA plugs and chromosome electrophoresis

Epimastigotes from cultures were embedded and lysed in agarose blocks as described [15]. The embedded material of approximate  $1 \times 10^7$  parasites were loaded on 0.8% agarose gels in 0.1 M Tris base, 0.1 M boric acid and 2 mM EDTA pH 8 (1 × TBE). The separation of the chromosomes was performed using the Transverse Alternating Field Electrophoresis (TAFE) apparatus from Beckman. The electrophoretic conditions were:

3-min pulses of 280 mA constant current for 48 h, 8-min pulses of 400 mA for an additional 24 h at 14°C in 1 × TBE. *Sacharomyces cerevisiae* chromosomes from strain 334 were used as size standards. The gel was blotted to nitrocellulose after depurination with 0.2 N HCl for 5 min, and treated as a regular Southern blot.

#### 3.4. Nucleotide sequence analysis

Two different *Sau3A*I fragments of the tandem repeat cloned in pRTC14.2 were subcloned into the M13mp18 *Bam*HI site. Sequences from these and other constructions were obtained as described elsewhere [9]. Both DNA strands were sequenced and all restriction sites were crossed.

The 5' end of *T. cruzi* 5S rRNA was determined by partial sequence analysis of 5' [ $\gamma$ - $^{32}$ P]-ATP-kinased RNA molecules (New England Nuclear), using the Bethesda Research Laboratories RNA sequencing kit and protocol. The 3' end was assigned by comparison with *T. brucei* and *C. fasciculata* species.

### 4. RESULTS AND DISCUSSION

#### 4.1. Gene reiteration

The 5S rRNA-gene copy number was estimated by comparison with the S1 small-rRNA coding region as reference. S1 is part of the main transcription unit [6], which is present in about 100 copies per nuclei [13]. The radioactivity retained in dot blots, corrected for the specific radioactivity of the S1 or 5S rRNAs (Fig. 1A), indicates that, in *T. cruzi*, the 5S rRNA genes occur some sixteen times for each S1 coding region (i.e., approximately 1600 copies per nuclei). This figure is similar for the three DNA quantities used (125, 250 and 500 ng). An equivalent reiteration value (1500 copies) has been reported for *T. brucei* 5S rRNA genes [8]. *C. fasciculata* 5S rRNA genes exhibit a lower multiplicity (i.e., 250–300 gene copies per nuclei [12]). Since all the rRNA molecular species are equimolar in the ribosomes, the 5S gene overdosage raises interesting questions regarding its level of expression and the stoichiometry of transcripts potentially produced.

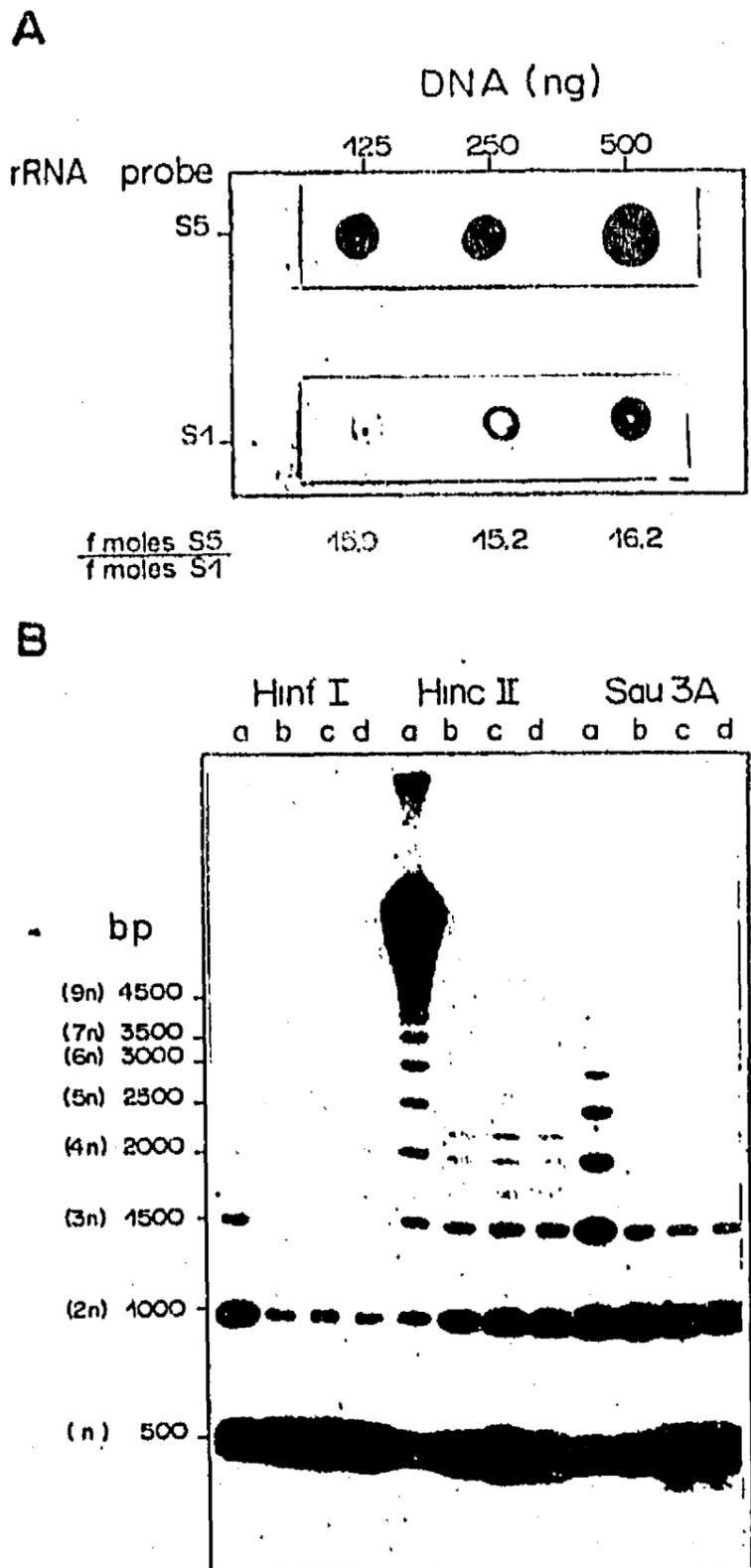


Fig. 1. Hybridization of *T. cruzi* 5S rRNA to genomic DNA. A. Denatured DNA was spotted onto nitrocellulose and independent membranes were hybridized with the kinased small rRNAs S5 (or S5) and S1. The retained molar ratio S5/S1 indicated below the autoradiographs was calculated by liquid scintillation analysis of the membranes. B. Genomic DNA was digested with the indicated enzymes during 5 min (a), 15 min (b), 30 min (c) and 5 h (d). The blotted gel (1.2% agarose) was hybridized to a 481-bp cloned DNA fragment containing a complete 5S rRNA gene repeat. Fragment sizes were estimated using  $\lambda$  HindIII and pBR322 HincII independent digests.

#### 4.2. Genomic organization and chromosomal location

Our previous genomic map of *T. cruzi* rRNA genes indicated that the 5S rRNA gene family was not linked to the main transcription unit [6]. Partial HincII, HincII or Sau3AI digestions of *T. cruzi* genomic DNA were Southern hybridized to a 5S rRNA gene probe. In all cases, the radioactive signal shows the accumulation of an approximately 500-bp fragment and fainter bands (Fig. 1B). Most of these bands move in the gel with sizes expected for multiples of a putative 500-bp monomeric unit. There are also a few other bands (> 500 bp) that hybridize with the 5S rRNA gene probe. These results are consistent with the 5S rRNA gene family being organized as a tandem of an approximately 500-bp unit. The fragments that don't fit this model may represent DNA elements with heterogeneity in size and/or sequence, the end of the repeats in a cluster of genes, or homologous sequences that moved elsewhere in the genome. This model has also been proposed for the 5S rRNA gene family from *T. brucei* (745-bp monomer [10]) and from *C. fasciculata* (227-bp monomer, [12]). Our sequence data from two independent 5S rRNA gene repeats indicate *T. cruzi* monomeric sizes of 479 and 481 bp.

The localization of the 5S gene clusters in *T. cruzi* chromosomes was carried out by Southern blots of chromosome-sized DNA molecules. Fig. 2 shows the occurrence of two discrete hybridizing bands of approximately 1500 and 1400 kbp.

#### 4.3. Gene sequence

Two different 5S rRNA gene repeats were completely sequenced. The coding and spacer regions were assigned as mentioned in MATERIALS AND METHODS. Fig. 3 depicts the nucleotide sequence of the two repeated elements analyzed: the coding region (120 bp) was identical in both repeats. Two substitutions and two deletions (or insertions) were found among the two spacer regions (361 bp, the largest). These changes could be due to natural polymorphisms among the repeats.

The non-coding spacers of *T. brucei* and *C. fasciculata* differ in size: 625 and 107 bp, respec-

tively [10,12], and show no similarity to that of *T. cruzi*. If there is any DNA element within the spacer region that interacts with the transcription apparatus, it is likely to be a small sequence motif. With respect to this point, we found six putative G + C boxes which are at least 83% homologous to the consensus sequence GGGCGG [16,17] identified as a binding site for the transcription factor Sp1. Three of them occur in the same polarity as the RNA-like strand, and the rest are found in the opposite DNA strand (Fig. 3). When we searched for this motif in the

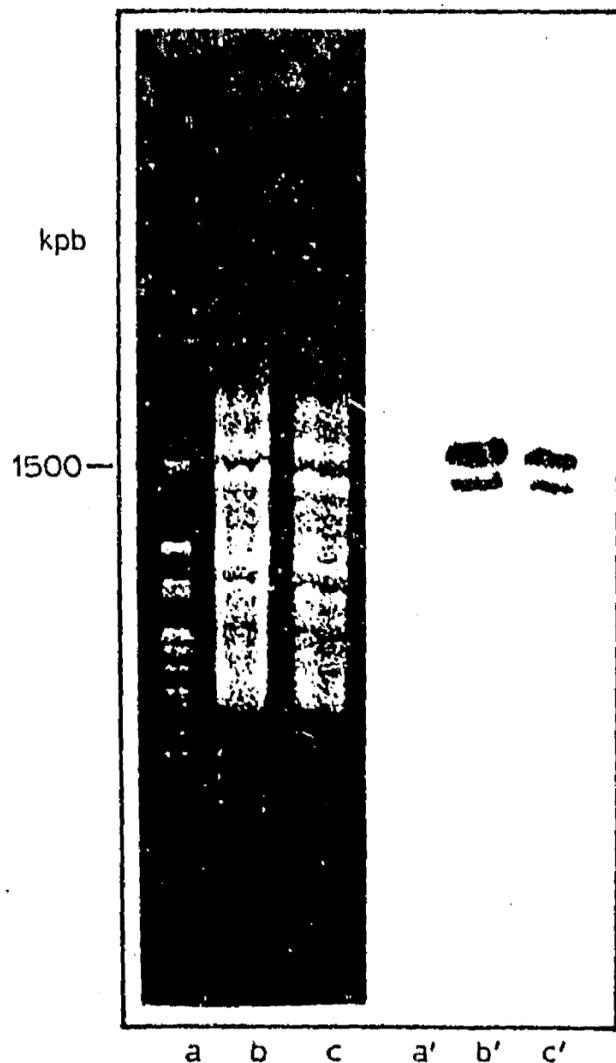


Fig. 2. Chromosomal location of *T. cruzi* 5S rRNA genes. Ethidium bromide-stained gel of chromosomes from *T. cruzi* cells (b, c) separated under transverse alternating field electrophoresis, *S. cerevisiae* chromosomes (a) were used as size markers. The lanes a', b', and c' correspond to the Southern hybridization of the blotted gel using a cloned 5S rRNA gene repeat (481 bp) as a radioactive probe.

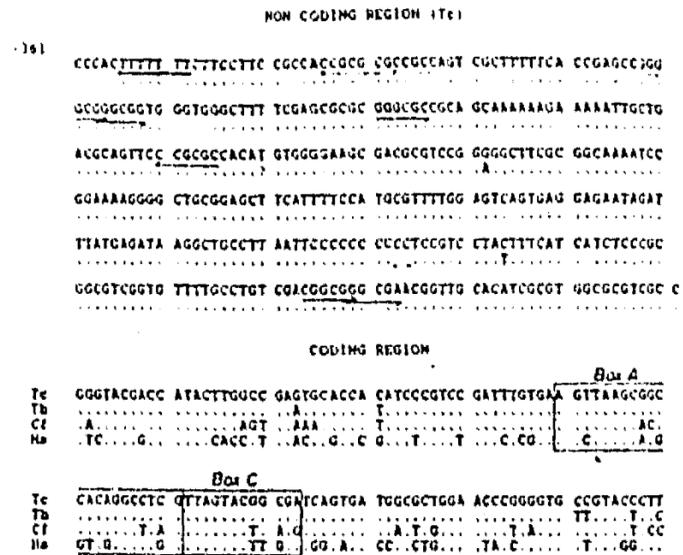


Fig. 3. Nucleotide sequence of the 5S rRNA gene repeat of *T. cruzi*. The non-coding region (upper block) is compared for two independent *Sau3AI* clones. Dots and dashed represent identity or absence of nucleotide, respectively. The arrows indicate the position and orientation of the putative Sp1-binding sites (GGGCGG, consensus sequence in the same polarity as the sense strand). In two cases these sequence elements are repeated with an overlap of two nucleotides, as indicated. The lower block of sequences presents the alignment of the coding regions (sense strand). This coding sequence was identical in both *T. cruzi* clones (Tc). The published sequences for *T. brucei* (Tb) [10], *C. fasciculata* (Cf) [12] and *Homo sapiens* (Hs) [19] are shown. The internal control regions (i.e., Box A and Box C) are boxed. The bold line under a run of 7 Ts (upper block of non-coding region) indicates the putative element of transcription termination [21].

published data for other trypanosomatids, we found that both *T. brucei* [10] and *C. fasciculata* [12] analogous spacers exhibit two G + C boxes of this sort. Their significance in a polymerase III-type transcription unit is not known. DNA sequence elements of polymerase II promoters have been documented to functionally occur upstream from the transcription-start site of some genes transcribed by RNA polymerase III, e.g., a CACCC-box and a TATA-box localized upstream from the human 7S K RNA gene (see ref. 18 for review). Whether the G + C boxes here found have an analogous function in the transcription of the 5S rRNA genes is an open question. A probable interaction of these boxes with *T. cruzi* nuclei-derived proteins is currently being analysed.

The 5S rRNA coding region shows high similarity to that published for *T. brucei* (95%, [10])

and *C. fasciculata* (80%, [12]). Noteworthy is the absolute conservation of the internal polymerase III control regions (i.e., A-box and C-box) among the *T. cruzi* and *T. brucei* homologues [12,19].

As a separate feature, we found that the *T. cruzi* 5S rRNA coding region is only 65% homologous to the analogous molecule from humans [20] (Fig. 3). Therefore, it may be worth considering the application of this sequence (or part of it) as a probe for diagnosis of Trypanosomiasis. The coding region may not discriminate between different trypanosomatids, but this identification could be achieved using gene-spacer derived sequences.

The isolation and characterization of 5S rRNA genes from the pathogenic trypanosomatid *T. cruzi* provides us with an opportunity to explore the molecular mechanisms that are involved in the expression of this gene family.

#### ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Antonio Quiróz-Gutiérrez for finding the putative SpI-binding sites here described. We also thank Imelda López and Jaime Lagúnez for critical reading of the manuscript. This work was partially supported by grants from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, México to R. Hernández (P228CCOX891666) and from Dirección General de Asuntos del Personal Académico UNAM to F. Bastarrachea and R. Hernández (IN 200689).

#### REFERENCES

- [1] Cordingley, J.S., and Turner, M.J. (1980) *Mol. Biochem. Parasitol.* 1, 91-96.
- [2] Gray, M.W. (1981) *Mol. Cell. Biol.* 1, 347-357.
- [3] Hernández, R., Nava, G., and Castañeda, M. (1983) *Mol. Biochem. Parasitol.* 8, 297-304.
- [4] White, T.C., Rudenko, G., and Borst, P. (1986) *Nucleic Acids Res.* 14, 9471-9489.
- [5] Spencer, D.F., Collings, J.C., Selnare, M.N., and Gray, M.W. (1987) *EMBO J.* 6, 1063-1071.
- [6] Hernández, R., Díaz de León, F., and Castañeda, M. (1988) *Mol. Biochem. Parasitol.* 27, 275-280.
- [7] Mackay, R.M., Gray, M.W., and Dolittle, W.F. (1980) *Nucleic Acids Res.* 8, 4911-4917.
- [8] Hasan, G., Turner, M.J., and Cordingley, J.S. (1984) *Gene* 27, 75-86.
- [9] Hernández, R., Ríos, P., Valdés, A.M., and Piñero, D. (1990) *Mol. Biochem. Parasitol.* 41, 207-212.
- [10] Cordingley, J.S. (1985) *Mol. Biochem. Parasitol.* 17, 321-330.
- [11] Lenardo, M.J., Dorfman, D.M., Reddy, L.V., and Donelson, J.E. (1985) *Gene* 35, 131-141.
- [12] Köck, J., and Cornelissen, A.W.C.A. (1990) *Mol. Biochem. Parasitol.* 38, 295-298.
- [13] Castro, C., Hernández, R., and Castañeda, M. (1981) *Mol. Biochem. Parasitol.* 2, 219-233.
- [14] Southern, E.M. (1975) *J. Mol. Biol.* 98, 503-517.
- [15] Wagner, W., and So, M. (1990) *Infect. Immun.* 58, 3217-3224.
- [16] Dynan, W.S., and Tjian, R. (1983) *Cell.* 32, 669-680.
- [17] Dynan, W.S., and Tjian, R. (1983) *Cell* 35, 79-87.
- [18] Kleinert, H., Bredow, S., and Benecke, B.J. (1990) *EMBO J.* 9, 711-718.
- [19] Ciliberto, G., Castagnoli, L., and Cortese, R. (1983) *Curr. Topics Dev. Biol.* 18, 59-88.
- [20] Wingender, E., Frank, R., Blöcker, H., Wang, L., Jahn, D., and Seifart, K.H. (1988) *Gene* 64, 77-85.
- [21] Geiduschek, P.E., and Tocchini-Valentini, G.P. (1988) *Annu. Rev. Biochem.* 57, 873-914.

Title: DNA-protein interaction analysis on the 5S rRNA gene  
from *Trypanosoma cruzi*.

Authors: Rosaura Hernández-Rivas, Alejandro García-Carrancá  
and Roberto Hernández\*.

Address: Instituto de Investigaciones Biomédicas,  
Universidad Nacional Autónoma de México.  
Apartado Postal 70228, 04510 México D. F.

FAX (525) 5-50-00-48. TEL (525) 5-50-38-93.

\*Corresponding author.

## ABBREVIATIONS

5S DNA, 5S ribosomal RNA gene

bp, base pairs

EGTA, ethyleneglycol-bis- (B-aminoethylether)-N, N, N', N'-  
tetraacetic acid

BSA, bovine serum albumin

TFIIIA, transcription factor III A

**SUMMARY**

The entire coding region (120 bp) plus 122 nucleotides from the *Trypanosoma cruzi* 5S rRNA gene spacer region were analyzed by footprinting assays of homologous crude nuclear extracts, and by gel retardation experiments. The region protected to DNAaseI digestion comprises practically the entire coding region and most of the gene spacer sequences analyzed. Evidence is presented that supports the specific recognition of G+C boxes from the gene spacer by a putative Sp1 related factor present in nuclei from *T.cruzi* epimastigotes.

**KEY WORDS:** *Trypanosoma cruzi*, 5S rRNA gene, G+C boxes, Sp1

## INTRODUCTION

The cytosolic ribosomes of trypanosomatids are atypical in that they contain three large and six small ribosomal RNA (rRNA) molecules [1-3]. Our work group has been interested in the analysis of the rRNA gene system from *Trypanosoma cruzi*: It has been reported that all of the small rRNA molecules from this parasite are codified in a major rRNA transcription unit with the single exception of the 5S rRNA species [4]. These RNA molecules were found to be codified in a gene family of approximately 1600 members, as tandem repeats of 480 bp [5]. The 5S DNA repeated elements are comprised of both coding and non-coding spacer sequences [5]. The former (120 bp), exhibit the well known internal control elements (i.e., box A and box C) recognized by the eukaryotic RNA polymerase III (pol III) [6]. The latter (360bp), possess the putative signal for transcription termination, and six sites at least 83% homologous to the consensus sequences for the binding of the transcription factor Sp1 [7, 8]. Since Sp1 is a factor associated with pol II transcription units, and the 5S rRNA genes are typically transcribed by pol III, we considered appropriate to further characterize these regions in terms of their interactions with *T. cruzi* nuclear proteins.

The findings here presented support the occurrence of *T. cruzi* nuclear proteins that interact with most of the sequences of the 5S rRNA gene repeat. In addition, it is shown that the potential Sp1 binding sites from the 5S DNA

spacer sequences are able to compete with the analogous motifs from SV40 early promoter region in their ability to interact with proteins from crude nuclear extracts derived from *T. cruzi* epimastigotes.

## MATERIALS AND METHODS

### Cell cultures

The Mexican stock of *T.cruzi*, C4 [9] was axenically cultured in liver infusion-tryptose liquid medium [10] supplemented with 10% heat inactivated fetal serum agitated in roller bottles at 28°C.

### Plasmid clones

The genomic fragment cloned in pH3 is a complete *T.cruzi* 5S gene repeat, and its sequence has been previously reported (Genbank accession number M59502) [5]. Figure 1 shows the sequence elements of this clone, as well as the restriction sites used to construct the subclones pRC100 and pRESS.

### Nuclear extracts

Nuclei were prepared as reported by Weil et al. [11] with the following modifications: *T.cruzi* cells were collected by centrifugation, washed once with isotonic phosphate buffer saline (pH 7.2) and resuspended in two volumes (referred to the packed cells) with Buffer A (10 mM Hepes pH 7.9, 10 mM KCl, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.5 mM dithiotreitol, 0.5 mM PMSF). The cells were allowed to swell for 20 min on ice, and then manually disrupted with a teflon homogenizer - about 30 strokes. The cell lysis was monitored with phase-contrast microscopy. The lysate was centrifuged at 6000 rpm (Sorvall HB4 rotor) for ten min at 4°C. Nuclear extracts

were prepared from this pellet as described by Dignam et al. [12] under the following conditions: nuclei were resuspended at  $2 \times 10^9$  nuclei/ml in buffer C (20 mM Hepes pH 7.9, 25 % glycerol, 0.42 M NaCl, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.25 mM EDTA, 0.5 mM DTT, 0.5 mM PMSF). The suspension was stirred for 45 min by gentle rocking at 4°C, and the chromatin was sedimented at 19,000 rpm for 30 min (Beckman SW 50.1 rotor). The protein from the supernatant was precipitated by the slow addition of 3.8 M ammonium sulfate in 20 mM Hepes (pH 7.9), at a ratio: 1.6 ml of sulfate solution per ml of protein suspension. The mixture was rocked over-night at 4°C and centrifuged at 35,000 rpm for 20 min (Beckman SW 50.1 rotor). The proteins from the pellet were resuspended in the minimal volume of buffer D (20 mM Hepes pH 7.9, 60 mM KCl, 20 % glycerol, 1 mM DTT, 0.5 mM PMSF, 0.25 mM EDTA, 0.125 mM EGTA, 2 mM Benzamidine, 5 µg/ml Aprotinin, 5 µg/ml Pepstatin A, 5 µg/ml Leupeptin). Typically 100-200 µl of buffer D were used to resuspend proteins from  $10^8$  cells. The suspension was dialysed for 4 hr at 4°C against 500 volumes of buffer D. The nuclear extracts were kept frozen in liquid nitrogen until used and the protein concentration was determined by the method of Bradford [13].

#### **Electrophoretic mobility shift assays.**

Protein-DNA complexes were formed and analyzed as described [14, 15] under the following conditions: 10,000 cpm (ca 1.0 ng) of an end-labeled double-stranded DNA probe

was incubated at 4°C in binding buffer (20mM Hepes pH 7.9, 60 mM KCl, 20% glycerol, 0.25mM EDTA, 0.125 mM EGTA, 1 mM DTT, 0.5 mM PMSF, 2 mM Benzamidine, 5 µg/ml Aprotinin, 5 µg/ml Pepstatin A, 5 µg/ml Leupeptin) with 1-24 µg of protein from *T. cruzi* nuclei (20 µl as final volume). To reduce the non-specific binding, 1 µg/µl of poly (dI-dC):(dI-dC) (Pharmacia) was used in the binding reaction. This reaction mix was incubated for 10 min at 4°C, and the DNA-protein complexes were resolved on 6% polyacrylamide gel (acrylamide to bisacrylamide 29:1) in 55.5 mM Tris, 44.5 mM boric acid, 1 mM EDTA (0.5X TBE). The electrophoresis was carried out in 0.5X TBE for 2 hr at 150 V. The gel was fixed in 10% acetic acid and 10% methanol, dried, and autoradiographed.

#### **Footprinting reactions**

DNA-binding reactions for DNAase I footprinting were carried out exactly as described above for the gel retardation assays except that 30 µg of the appropriate nuclear extract and 1.5µg of poly (dI-dC):(dI-dC) were used for the binding reactions. Cleavage with DNAase I was performed essentially as described previously [16], with only minor modifications: following incubation of the binding reaction at 4°C for 10 min, 2 µl of a freshly prepared solution containing 0.3 u of DNAase I in 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM CaCl<sub>2</sub> was added. The digestion was carried out at 20°C for 60 sec, and terminated by the addition of 30 µl

of DNAase I stop buffer (50 mM EDTA, 0.1 % SDS, 150  $\mu$ g/ml tRNA, Proteinase K). After phenol extraction, the DNAase I cleavage products were analyzed on a 6 % polyacrylamide, 8 M urea sequencing gel. Chemical cleavages were performed as described by Maxam and Gilbert [17].

## RESULTS

### Protein interactions along the *T.cruzi* 5S rRNA genes

Our previous sequence analysis on *T.cruzi* 5S rRNA genes identified the putative internal control region (i.e., box A and box C), and some G+C boxes homologous to the consensus sequence for the binding of the transcription factor Sp1 [18]. These boxes are located in both polarities within the spacer region (Fig. 1). The occurrence of *T.cruzi* nuclear proteins that could interact with these DNA elements was investigated by footprinting analysis: the DNA probes pRC100 and pRE5S which bear different regions of the 5S rRNA gene repeat (Fig. 1) were end-labelled and incubated with crude nuclear extracts from *T.cruzi* cells. Their DNAase I protection pattern indicate several zones of protection (relative to the pattern observed with the free probe) that span most of the analyzed region (Figs. 2 and 3). In addition, a slightly stronger protection was observed in some regions, like the internal control region (Fig. 2), or the G+C boxes number 2 and 3 (Fig. 3). Figure 4 depicts the nucleotide sequence analyzed (242 bp), with the DNAase I protected zones indicated.

All the G+C boxes contained within the analyzed fragments from the 5S rRNA gene and spacer are located inside protected regions. Therefore, it is difficult to interpret whether they are specifically recognized by nuclear proteins from *T.cruzi* or are protected by factors

interacting in a broader sequence context (see below).

**Sp1 related factor present in *T. cruzi* nuclei**

To support the possibility that the G+C boxes could be specifically recognized by a factor from *T. cruzi* nuclei that could be related to Sp1, a gel retardation experiment was carried out. If these G+C boxes were indeed recognized by an Sp1 related factor, then they should be able to form a complex with a well defined target sequence for Sp1. A 72 bp insert from plasmid pGC9 [19] was used as the G+C related radioactive probe, since it possesses six prototypic G+C boxes within the three 21 bp repeats from the simian virus SV40 early promoter region (Fig 5D). Nuclear extracts from *T. cruzi* were able to form at least two complexes with this probe (Fig 5A). Figure 5B shows that the 5S rRNA gene spacer region from *T. cruzi* (i.e., insert from plasmid pRE5S) displaces these complexes at a 50 fold excess. The polylinker region of plasmid pUC18 was used as negative control (Fig. 5C).

## DISCUSSION

### Footprinting analysis.

In spite of extensive studies on the structure of 5S rRNA genes carried out in several phyla, footprinting analysis of protein-5S DNA interactions is still limited to few organisms. On the one hand, the footprints of *Xenopus* crude nuclear extracts or purified TFIIIA on their 5S RNA genes indicate that only the internal control region is protected by DNAase I, and only some enhancements distinguish the two protected regions [20]. On the other hand, detailed analyses performed on *Saccharomyces* homologous show that the assembly of transcription complexes take place in multiples steps involving protein-DNA interactions, and that the complete molecular complex extend over the entire transcription unit together with some 50 bp of the 5' flanking sequence [21]. The footprints here presented on the *T.cruzi* 5S rRNA gene support an expanded type of protein-DNA interactions similar to that observed in yeast cells [21]. Whether this kind of expanded protein-5S DNA interactions is a feature particular to simple eukaryotes is an interesting possibility, but it needs further examples to be supported.

### G+C boxes.

*T.cruzi* nuclear proteins were able to form stable complexes with a probe from the early promoter region of SV40 that possesses 6 G+C boxes, recognized by the

transcription factor Sp1. The displacement of these complexes by the *T.cruzi* 5S rRNA gene spacer region was evidenced in the gel retardation analysis of figure 5B. Since the similarity between these two sequences is restricted to the G+C boxes that conform the Sp1 binding site, it is likely that these motifs are responsible for the observed complex displacement.

The occurrence of control regions located upstream from the transcription initiation site is now well documented in the 5S rRNA genes from arthropoda, and fungi species (see Ref. 22 for review). Moreover, an upstream Sp1 binding site has been found to stimulate (among other elements, including internal control regions) the transcription levels of the Epstein-Barr encoded small RNAs (EBER) genes transcribed by RNA polymerase III [23]. Whether *T.cruzi* possesses an Sp1 related protein capable to functionally bind the G+C boxes of the 5S DNA spacer region is an interesting possibility and future work will be directed to test it.

#### ACKNOWLEDGMENTS

We would like to thank Imelda López for critical reading of the manuscript. This work was partially supported by a Grant DGAPA IN200689-UNAM.

## REFERENCES.

- 1 Cordingley, J. S. and Turner, M, J. (1980) 6.5 S RNA; preliminary characterization of unusual small RNAs in *Trypanosoma brucei*. Mol. Biochem. Parasitol. 1. 91-96.
- 2 Gray, M. W. (1981) Unusual pattern of ribonucleic acid components in the ribosome of *Crithidia fasciculata*, a trypanosomatid protozoan. Mol. Cell. Biol. 1. 347-357.
- 3 Hernández, R., Nava, G. and Castañeda, M. (1983) Small size ribosomal RNA species in *Trypanosoma cruzi*. Mol. Biochem. Parasitol. 8. 297-304.
- 4 Hernández, R., Díaz de León, F. and Castañeda, M. (1988) Molecular cloning and partial characterization of ribosomal RNA genes from *Trypanosoma cruzi*. Mol. Biochem. Parasitol. 27. 275-280.
- 5 Hernández-Rivas, R., Martínez-Calvillo, S., Romero, M. and Hernández, R. (1992) *Trypanosoma cruzi* 5S rRNA genes: molecular cloning, structure and chromosomal organization. FEMS Microbiol. Lett. 92. 63-68.
- 6 Ciliberto, G., Castagnoli, L. and Cortese, R. (1983) Transcription by RNA pol III. Curr. Topics Dev. Biol. 18. 59-88.

7 Dynan, W. S. and Tjian, R. (1983) Isolation of transcription factors that discriminate between different promoters recognized by RNA polymerase II. *Cell* 32. 669-680.

8 Dynan, W. S. and Tjian, R. (1983) The promoter-specific transcription factor Sp1 binds to upstream sequences in the SV40 early promoter. *Cell* 35. 79-87

9 Zavala-Castro, J. E., Velasco-Castrejón, O. and Hernández, R. (1992) Molecular characterization of Mexican stocks of *Trypanosoma cruzi* using total DNA. *Am. J. of Trop. Med. and Hyg.* 47. 201-209.

10 Camargo, E. P. (1964) Growth and differentiation of *Trypanosoma cruzi*. Origin of metacyclic trypanosomas in liquid medium. *Rev Inst. Med. Trop. Sao Paulo.* 6. 220-224.

11 Weil, P. A., Segall, J., Harris, B., Ng, S. and Roeder, R. G. (1979) Faithful transcription of eukaryotic genes by RNA polymerase III in system reconstituted with purified DNA templates. *The J. of Biol. Chem.* 254. 6163-6173.

12 Dignam, J. D., Lebovitz, R. M. and Roeder, R. G. (1983) Accurate transcription initiation by RNA polymerase II in a soluble extract from isolated mammalian nuclei. *Nucleic Acids Res.* 11. 1475-1489.

- 13 Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72. 248-254.
- 14 Fried, M. and Crothers, D. M. (1981) Equilibria and kinetics of lac repressor-operator interactions by polyacrylamide gel electrophoresis. *Nucleic Acids Res.* 9. 6505-6525.
- 15 Strauss, F. and Varshausky, A. (1984) A protein binds to a satellite DNA repeat at three specific sites that would be brought into mutual proximity by DNA folding in the nucleosome. *Cell* 37. 889-901.
- 16 Galas, D. J. and Schmitz, A. (1978) DNAase footprinting: a simple method for the detection of protein-DNA binding specificity. *Nucleic Acids Res.* 5. 3157-3170.
- 17 Maxam, A. M. and Gilbert, W. (1977) A new method for sequencing DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74. 560-564.
- 18 Gidoni, D. J., Kadonaga, T. J., Barrera-Saldaña, H., Takahashi, K., Chambon, P. and Tjian, R. (1985) Bidirectional SV40 transcription mediated by tandem Sp1 binding interactions. *Science* 230, 511-517.

19 Guido, M. C., Zamorano, R., Garrido-Guerrero, E., Gariglio, P. and García-Carrancá, A. (1992) Early promoters of genital and cutaneous human papillomaviruses are differentially regulated by the bovine papillomavirus type 1 E2 gene product. *J. Gen. Virol.* 73. 3996-4000.

20 Wolffe, A. P., Jordan, E. and Brown, D. D. (1986) A bacteriophage RNA polymerase transcribes through a *Xenopus* 5S RNA gene transcription complex without disrupting it. *Cell* 44. 381-389.

21 Braun, B. R., Riggs, D. L., Kassavetis, G. A. and Geiduschek, E. P. (1989) Multiple states of protein-DNA interaction in the assembly of transcription complexes on *Saccharomyces cerevisiae* 5S ribosomal RNA genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86. 2530-2534.

22 García, A. D., O'Connell, A. M. and Sharp, S. J. (1987) Formation of an active transcription complex in the *Drosophila melanogaster* 5S RNA gene is dependent on an upstream region. *Mol. Cell. Biol.* 7. 2046-2051.

23 Howe, J. G. and Shu, M. (1989) Epstein-Barr virus small RNA (EBER) genes: unique transcription units that combine RNA polymerase II and III promoter elements. *Cell* 57. 825-834.

## FIGURE LEGENDS.

**Fig. 1.** Restriction map of *T.cruzi* 5S rRNA gene clones. Only key restriction sites are presented. The hatched boxes represent the coding region which contains the internal control regions (solid area). The small arrows indicate the position and orientation of the G+C boxes [5].

**Fig. 2.** DNAase I footprinting of *T.cruzi* nuclear extract on the 5S rRNA coding region. The labelled probe is the RNA-like DNA strand (\*) from the insert cloned in pRC100 (Fig.1). Lanes: a, no protein digestion control; b-e, samples contained 30  $\mu$ g of nuclear protein; f, chemical cleavage at As of the same DNA as marker. Sequences protected from DNAase I digestion are lengthwise indicated ([ ]). The fragment used as probe is presented alongside of the autorradiograph. The coding region (hatched box), the internal control region (solid box), and two G+C boxes (7 and 8) are indicated.

**Fig. 3.** DNAase I footprinting of *T.cruzi* nuclear extract on the 5S DNA spacer region. The non-sense strand of pRE5S insert (Fig. 1) was end-labelled (\*) and incubated with (lanes b-e), or without (lane a) nuclear proteins. Chemical cleavage at purines G+A (lane f) or at Gs (lane g) were included as markers. For further details see legend to figure 2.

**Fig. 4.** Summary of the 5S DNA sequence analyzed: The coding region (bold) is presented in between spacer sequences. Continuous and discontinuous underlining represent strong and mild protection of nuclear extracts to DNAase I digestion, respectively. The internal control regions (box A and box C), the G+C boxes (numbered arrows of 5'-3' polarity), and the run Ts (transcription termination signal) are presented.

**Fig. 5.** Gel retardation analysis of *T.cruzi* nuclear extracts. The DNA probe (D) corresponds to the *Bam*HI *Sal*I fragment from SV40 early promoter region [19], that contains six prototypic G+C boxes (underlined with arrows in D). Panel A depicts the complexes C1 and C2 formed after the incubation of the probe with growing amounts of *T.cruzi* extracts: a, 0  $\mu$ g; b, 2  $\mu$ g; c, 4  $\mu$ g; d, 8  $\mu$ g; e, 16  $\mu$ g; f, 24  $\mu$ g. The position of the free probe is indicated (FP). The displacement of these complexes (formed with 20  $\mu$ g of nuclear extract) by the 5S rRNA gene spacer region (insert from plasmid pRE5S, Fig. 1) is indicated in panel B, as follows: a, no extract; b and c, no competitor DNA; d-f, 10, 50 and 100-fold molar excess of unlabeled competitor DNA respectively. The polylinker region from plasmid pUC18 was used as heterologous competitor (panel C). For molar ratio of this unrelated competitor refer to those conditions of panel B.

o PUC18 Hind III

40 bp

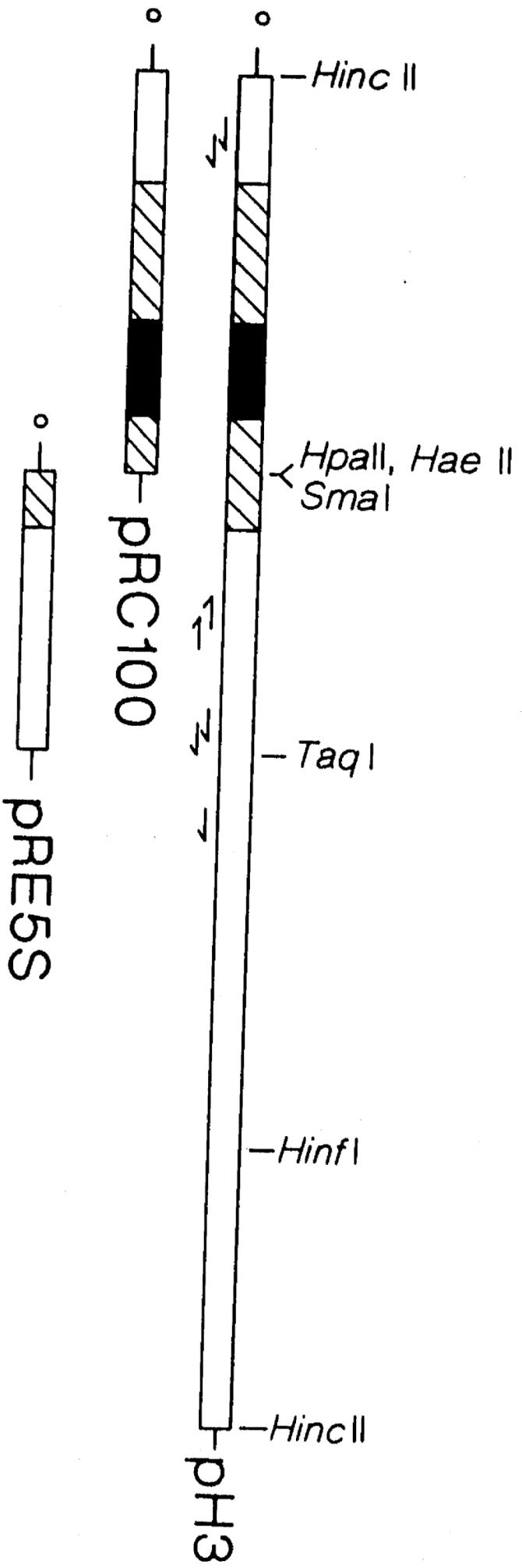


FIGURE 1

abcdef

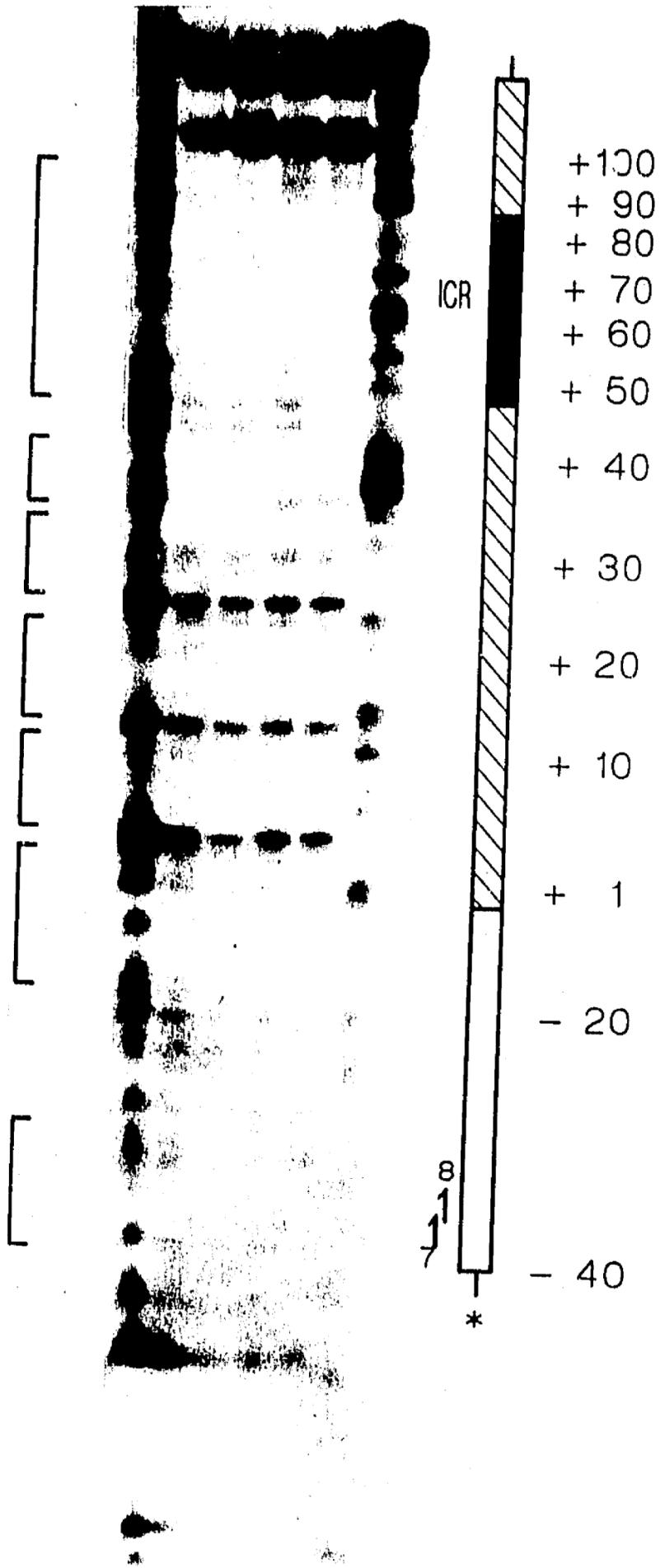


FIGURE 2

<sup>7</sup> → <sup>8</sup> →  
 5' CGACGGCGGG CGAACGGTTG CACATCGCGT GCGCGTCCG C  
 3' GCTGCCGCC GCTTGCCAAC GTGTAGCGCA CCGGCAGCG G

-1

GGGTACGACC ATACTTGGCC GAGTGCACCA CATCCCGTCC  
 CCCATGCTGG TATGAACCGG CTCACGTGGT GTAGGGCAGG

40

	Box A	Box C
GATTTGTGAA	GTTAAGCGGC CACAGGCCTC	GTTAGTACGG
CTAAACACTT	CAATTCGCCG GTGTCCGGAG	CAATCATGCC

80

CGATCAGTGA TGGCGCTGGA ACCCGGGGTG CCGTACCCTT  
 GCTAGTCACT ACCGCGACCT TGGGCCCCAC GGCATGGGAA

120

<sup>1</sup> ← <sup>2</sup> ← <sup>3</sup> ←  
 CCCACTTTTT TTCTTCCTTC CGCCACCGCG CGCCGCCAGT  
 GGGTGAAAAA AAGAAGGAAG GCGGTGGCGC GCGGCGGTCA

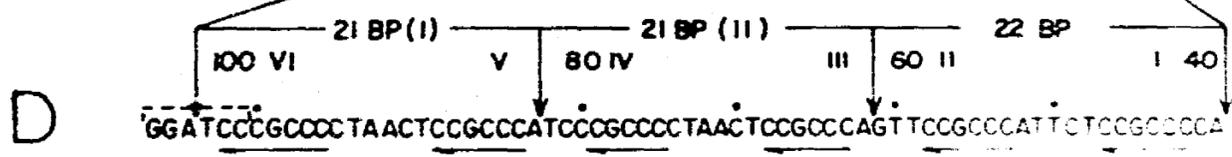
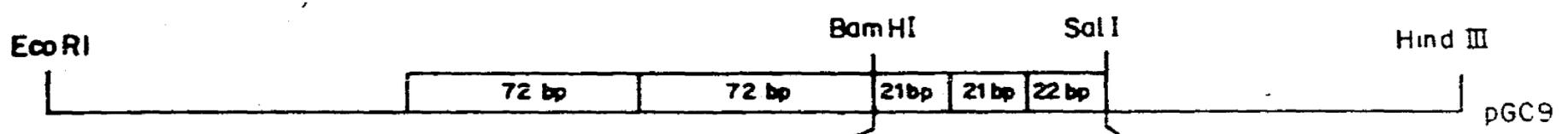
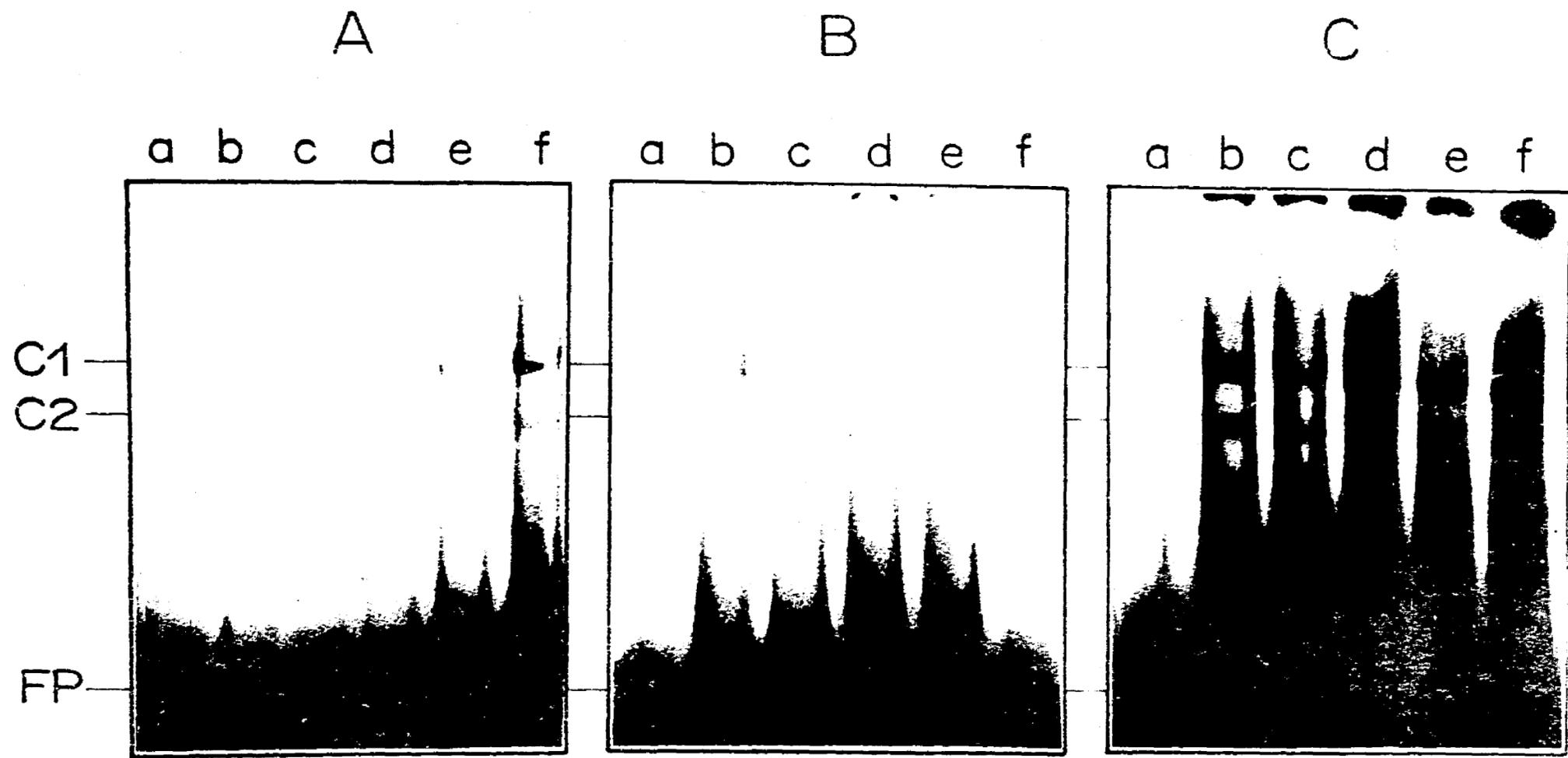
-320

<sup>4</sup> → <sup>5</sup> → <sup>6</sup> →  
 CGCTTTTTCA CCGAGCCGGG GCGGGCGGTG GGTGGGCTTT  
 GCGAAAAAGT GGCTCGGCC CGCCCGCCAC CCACCCGAAA

-280

TC  
 AG

FIGURE 4



DATOS NO MOSTRADOS EN EL MANUSCRITO.

1. La organización génica del RNAr 5S se ha conservado entre cepas diversas de T. cruzi.

Una vez que encontramos que el RNAr 5S en la cepa C4 de T. cruzi estaba organizado en "tandem" con repeticiones de aproximadamente 500 pb (artículo 1). Quisimos averiguar si en otras cepas de T. cruzi se presentaba una organización génica similar. La figura 5 muestra el patrón comparativo de hibridación genómica del gene del RNAr 5S entre cepas mexicanas y sudamericanas de T. cruzi. En todos los casos la sonda hibridó con un fragmento de aproximadamente 500 pb, y en la cepa Ninoa además hibridó con otros fragmentos que son múltiplos de esta. Estos resultados nos sugieren que el arreglo de la molécula 5S ( en tandem con repeticiones de aproximadamente 500 pb) está muy conservado entre las diferentes cepas de este parásito.

2. Ubicación cromosómica de los genes para el RNAr.

Con la finalidad de localizar el ó los cromosomas en los que se encuentra codificado el RNAr 5S y comparar su ubicación con la del cistrón del RNAr (18S-24S). Cromosomas de T. cruzi, Entamoeba histolytica y Plasmodium chabudii fueron separados por electroforesis de campos alternos transversos (TAFE) e hibridados con el RNAr 5S y el gene del RNAr 18S. Como se observa en la figura 6. la secuencia de DNA

que codifica para el RNAr 18S y el RNAr 5S se encuentran en dos cromosomas uno de los cuales (aproximadamente 1385 Kpb) es común en ambas moléculas. Además se observa que el gene para el RNAr 5S de este parásito solamente hibrida con los cromosomas de T. cruzi y no con los cromosomas de E. histolytica, Plasmodium chabudii y Saccharomyces cerevisiae lo que nos sugiere que el gene del RNAr 5S de T. cruzi podría ser usado como sonda para diferenciar entre diferentes parásitos.

### 3. Potencialidad del gene RNAr 5S como sonda de diagnóstico de la enfermedad de Chagas.

Con el propósito de averiguar si el gene del RNAr 5S de T. cruzi es capaz de hibridar con la molécula 5S de humano. DNA genómico de T. cruzi y DNA de humano fueron digeridos con la enzima HinfI, transferidos a papel de nitrocelulosa e hibridados con el gene del RNAr 5S de este parásito. En la figura 7 se aprecia que la sonda solamente hibrida con el DNA de T. cruzi pero no con el de humano, lo que nos sugiere que la molécula 5S de T. cruzi podría ser usado como una probable sonda de diagnóstico de la enfermedad de Chagas.

### 4. Análisis de transcritos del RNAr 5S.

Con el objeto de analizar el perfil celular de la transcripción del locus: RNA total de T. cruzi se corrió en un gel de agarosa-formaldehído, se transfirió a membrana de

nylon y se hibridó con el fragmento de DNA que contiene la región codificadora del RNAr 5S. La autorradiografía presentada (Fig. 8) muestra la hibridación con fragmentos de alto peso molecular (7.5 kb) hasta la molécula madura de 120 b. Esto indica que probablemente el RNAr 5S de T. cruzi sea transcrito como una molécula policistrónica.

#### 5. Estructura Secundaria

Finalmente se procedió a obtener una probable estructura secundaria para el RNAr 5S de T. cruzi utilizando como guía el modelo universal propuesto por Delihias (44). La secuencia homóloga publicada para T. brucei (13) y C. fasciculata (12) fueron alineadas. Cambios compensatorios en las moléculas homólogas de T. brucei y C. fasciculata refuerzan la validez del modelo (Fig. 9).

#### 6. Análisis "Southwestern".

Con la finalidad de caracterizar las proteínas que se unen a la región codificadora de este gene se realizaron ensayos "southwestern". Como se aprecia en el panel A (Figura 10) a la región codificadora (plásmido pRC100) se le unen dos proteínas una de aproximadamente 35 Kda y otra de 52 Kda. Mientras que la región espaciadora del gene 5S (plásmido pRE5S) es reconocida por una proteína de 52 Kda (panel B fig. 10). Tal vez la proteína (~52 Kda) que se une a la región espaciadora sea el mismo factor que reconoce las dos cajas

G+C 7 y 8 ( ver figura 4) que se encuentran rio arriba de la región codificadora (plásmido pRC5S). Probablemente la proteína de 52 kDa que reconoce al espaciador de la molécula 5S de *T. cruzi* corresponda a la fosfoproteína de 56 kDa que ha sido reportada que se une a las cajas G+C de SV-40 (45). La proteína de 35 kDa podría corresponder a la proteína TFIIA que tiene un peso molecular de 38 kDa y es una proteína gene específica del RNAr 5S (46).

FIG. 5 Organización genómica del RNAr 5S en 10 cepas de T. cruzi. DNA genómico de 7 cepas mexicanas (Z17, YUCH4, H10, ZAC, NINOA, FRV y C4) y tres cepas Sudamericanas (PERU, Y y Silvio) fueron digeridas con la enzima HinfI durante 4 hrs. Las muestras se corrieron en un gel de agarosa (1.2%) y se hibridaron con la region codificadora del gene RNAr 5S. El tamaño de los fragmentos fue estimado por usar como marcadores standard DNA de lambda digerido con HindIII y DNA de pBR322 digerido con HinfI.

ESTA TESTE NO DEBE  
SALIR DE LA RECUERDA

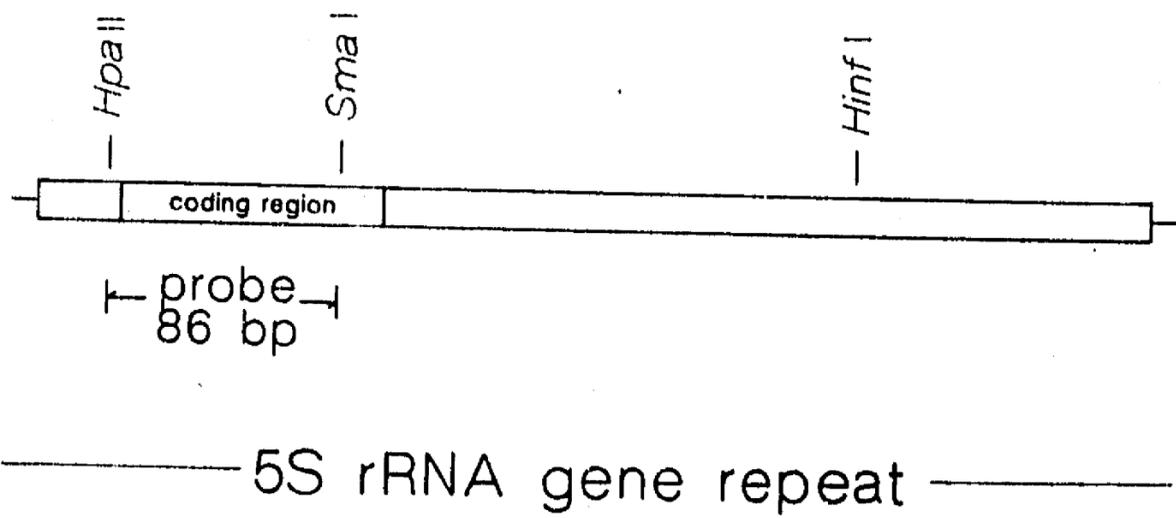
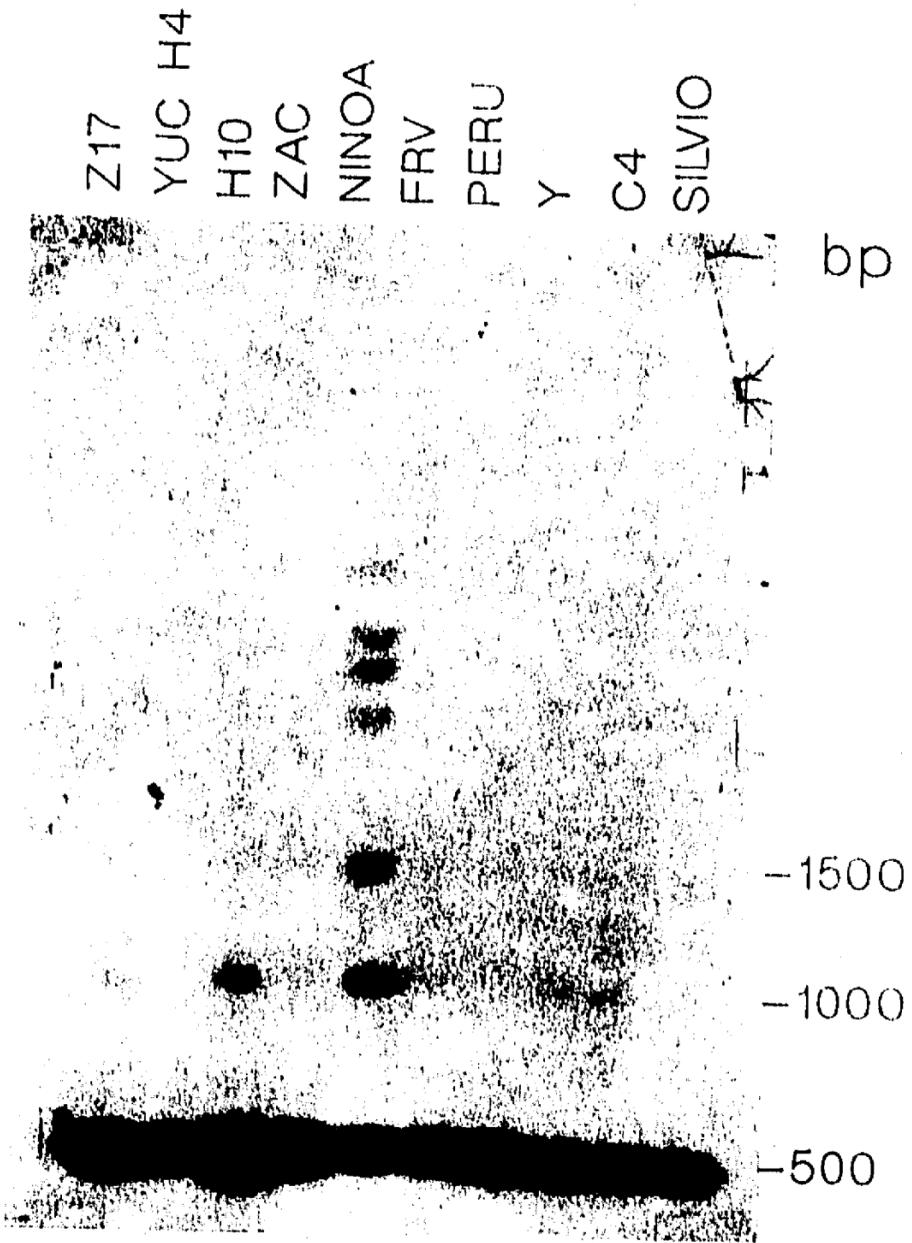
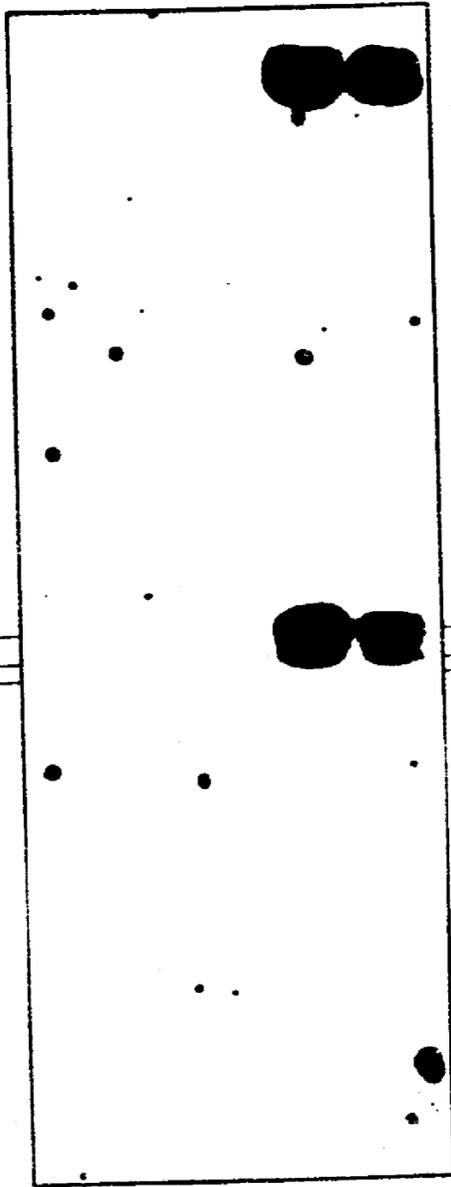


FIG. 6 Localización cromosomal del gene RNAr 5S y de la unidad fundamental de transcripción

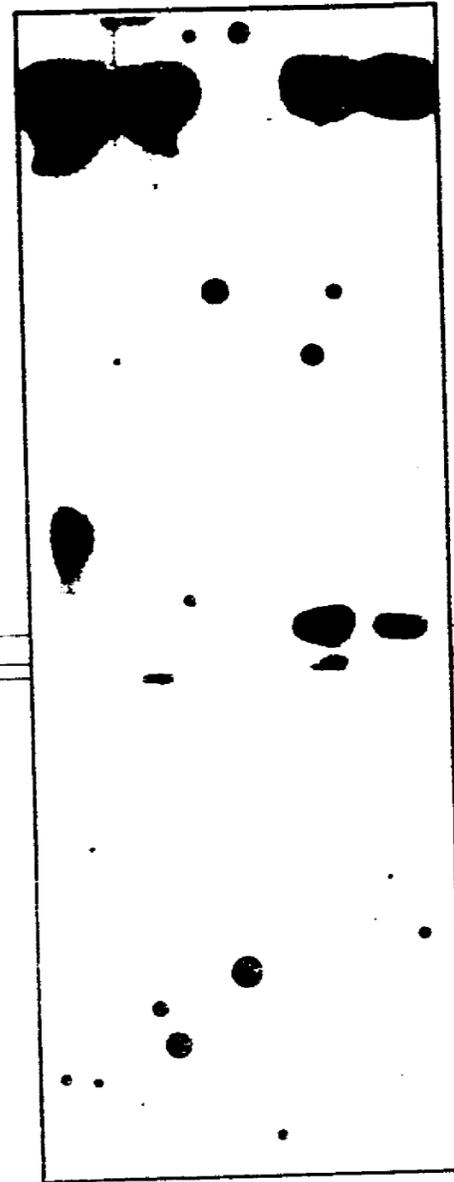
A. Cromosomas de Entamoeba histolytica

Plasmodium chabudii y T. cruzi fueron separados por electroforesis de campos alternos transversos (TAFE). El gel fue transferido a papel de nitrocelulosa e hibridado con el gene para el RNAr 5S (B) ó el gene del RNAr 18S (C). El tamaño de los cromosomas fue estimado por usar como referencia los cromosomas de Saccharomyces cerevisiae.

*S. cerevisiae*  
*E. histolytica*  
*P. chabaudi*  
*T. cruzi*  
*T. cruzi*



5S-rRNA gene



18S-rRNA gene

Kbp

1385  
1300  
1185

FIG. 7 El gene para el RNAr 5S de T. cruzi no hibrida con el DNA humano. DNA de la capa C4 de T. cruzi y DNA de humano fueron digeridos con la ennzima HinfI. Los productos de la digestión se corrieron en un gel de agarosa al 1.2% y se hibridaron en condiciones tipo "Southern" con el gene del RNAr 5S de T. cruzi. El tamaño de los fragmentos fue estimado con el DNA de lambda HindIII y pBR322 HinfI.

λ Hind III

*T. cruzi*

*H. sapiens*

bp

-500

FIG. 8 Patrón de hibridación de la molécula 5S al RNA total de T. cruzi. 30 ug de RNA total de T. cruzi se corrieron en un gel desnaturalizante de formaldehído, se transfirió a papel de nylon (GeneScreen) y se hibrido con la región codificadora del gene 5S de T. cruzi (Carril 1 y 2). El tamaño de los fragmentos fue estimado con el RNA "ladder" de BRL.

1 2

7.5-  
6.2-

2.4-  
2.0-

1.6-  
1.3-  
1.1-

0.8-

0.5-

0.26-

0.12-



FIG. 9 Estructura secundaria para el RNAr 5S de T. cruzi. La estructura secundaria fue obtenida por usar como guía el modelo universal propuesto por Delihias (44). La secuencia homologa publicada para el RNAr 5S de T. brucei (13) y C. fasciculata (12) fueron alineadas. Diferencias observadas con respecto a T. cruzi son mostradas en círculo para T. brucei o paréntesis para C. fasciculata.

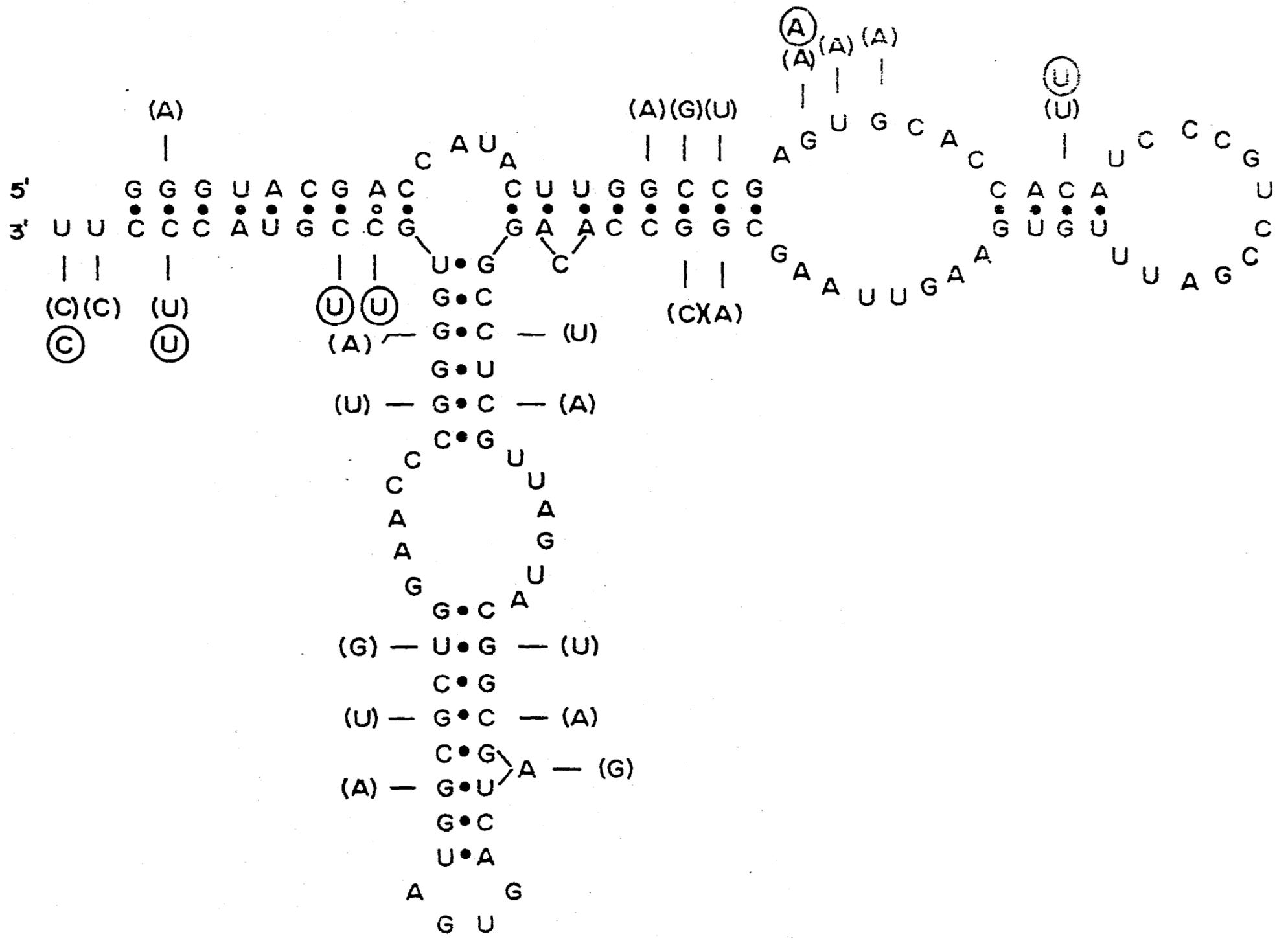
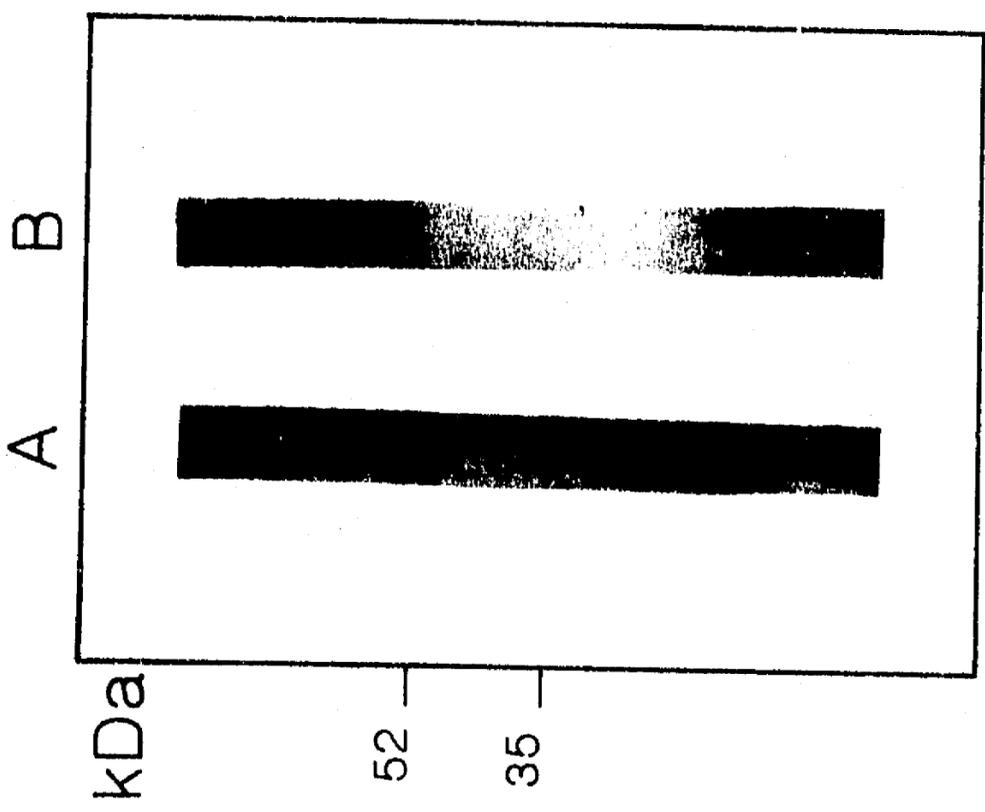


FIG. 10      Caracterización de las proteínas que se unen al  
gene del RNAr 5S de T. cruzi. Proteínas nucleares  
de T. cruzi fueron transferidas a papel de  
nitrocelulosa e incubadas con  $5 \times 10^5$ cpm/ml de la  
región codificadora (carril A) y con la region  
espaciadora (carril B). Después de la incubación  
los filtros fueron lavados con 100 mM de NaCl.



## DISCUSION

Nuestro grupo está interesado en el estudio de la regulación de la transcripción de T. cruzi. El estudio de los componentes moleculares de los ribosomas ofrece el atractivo de involucrar la participación de los tres tipos de polimerasas: pol I transcribe la unidad fundamental del RNAr, pol II transcribe las proteínas ribosomales y pol III la molécula de RNAr 5S.

En esta tesis se estudió la organización genómica y cromosomal de la molécula de RNAr 5S de T. cruzi, así como la interacción de proteínas nucleares con el gene RNAr 5S de este parásito.

### A) Organización genómica del RNAr 5S en diferentes cepas de T. cruzi.

Mediante ensayos tipo "Southern" se encontró que el gene que codifica para el RNAr 5S está organizado en "Tandem" con repeticiones de aproximadamente 500 pb. Una organización similar fue encontrada en las 10 cepas analizadas (Z17, YUC H4, H10, ZAC, NINOA, FRV, PERU, Y, C4 y SILVIO). Una explicación para la conservación de esta organización no tenemos ya que si bien se ha reportado que la región codificadora para el RNAr 5S es bastante conservada, no es así para la región espaciadora. Es por eso que cuando nosotros digerimos el DNA de las cepas de T. cruzi con la

enzima HinfI (cuyo sitio de restricción se encuentra dentro de la región espaciadora) esperabamos que el fragmento de DNA que codifica para el RNAr 5S, hibridará con fragmentos de diferentes tamaños resultado de la heterogeneidad dada por las secuencia que constituyen el espaciador. Sin embargo, encontramos que este arreglo es muy conservado lo que nos sugiere que probablemente exista una restricción funcional, en donde hayan tanto en la región espaciadora y codificadora de este gene elementos que fueran importantes para la transcripcion de está molécula.

B) El gene del RNAr 5S está 16 veces mas reiterado que la unidad fundamental de transcripcion.

Mediante ensayos de renaturalización cuantitativa RNA:DNA se encontró que la familia del RNAr 5S esta reiterada aproximadamente 1600 veces por núcleo. Esto representa un exceso de 16 veces la dosis génica estimada previamente para la unidad fundamental de transcripción, cuya reiteración es de aproximadamente 100 copias por núcleo (20). Si consideramos que los ribosomas estan constituidos por cantidades equimolares de RNA. Podría sugerirse que la célula regula la disponibilidad de las diferentes unidades de transcripción. En mamíferos existe una fosfoproteína de 50 kDa ("La") cuya ausencia provoca una dramática disminución de la transcripción del locus RNAr 5S. El mecanismo propuesto

supone que el complejo de transcripción permanece unido al DNA que esta transcribiendo y no permite que el complejo de transcripción sea liberado y pueda ser usado en varias rondas de transcripción (47). De tal manera que los niveles de "La" regulan la transcripción del gene 5S. Tal vez exista en T. cruzi una proteína semejante a "La". 2) Otra posibilidad es que la vida media de los transcritos para la molécula 5S fuera mas corta que la de los transcritos para la unidad fundamental de transcripción de T. cruzi. Una situación alternativa de regulación pudiera pensarse si el RNAr 5S fuera extranucleolar como en otros sistemas, y su incorporación al nucleolo fuera ineficiente. Esto explicaría la necesidad de una dosis adicional de RNAr 5S para su ensamblaje equimolar con los componentes de la unidad fundamental de transcripción.

C) Ubicación cromosómica del gene para el RNAr 5S y de la unidad fundamental de transcripción.

Durante mucho tiempo la caracterización de T. cruzi a nivel citogenético ha sido difícil, porque sus cromosomas no condensan durante la división nuclear (48). Con el advenimiento de la electroforesis de campos pulsados se ha logrado la separación de grandes moléculas de DNA. Nosotros empleamos la técnica de electroforesis de campos alternos transversos (TAFE) y fuimos capaces de evidenciar 16

cromosomas cuyo peso molecular van desde 580 Kpb a más de 1500 Kpb. Mediante ensayos tipo Southern de los cromosomas de T. cruzi se ubico al gene para el RNAr 5S en dos cromosomas de aproximadamente 1400 y 1300 Kpb y al comparar la ubicación de este gene con la del cistrón ribosomal se encontró que este también se encuentra ubicado en dos cromosomas (1400 y 1200 kpb). Aparentemente uno de los cromosomas (el de 1400 kpb) es común para ambos loci. Sin embargo, no podemos asegurar que la banda de 1400 Kpb realmente corresponda a un solo cromosoma ó más cromosomas no separados. Si resultará el caso de que en verdad es un cromosoma común, esto se antoja como una ventaja para poder regular un dominio grande de cromatina para la transcripción de estos loci (RNAr 5S y la unidad fundamental de transcripción).

D) El RNAr 5S de T. cruzi probablemente se transcriba como un policistrón.

El transcrito primario de los genes de RNAr 5S en eucariotes es idéntico al RNAr 5S que se aísla de las subunidades grandes citoplasmicas, por lo tanto el RNAr en eucariotes ni madura ni se procesa. Resultados preliminares obtenidos en esta tesis sugieren que el RNAr 5S de T. cruzi es transcrito como un policistrón (transcrito primario arriba de 7.5Kb) el cual debe de sufrir una serie de pasos de procesamiento que generen moléculas individuales y maduras (120 b). Mensajeros policistrónicos ya han sido descritos en

el caso de T. brucei (i. e., genes de calmodulina, genes de tubulina y genes VSG) (49-51). En todos los casos la situación a comprobar es que la maquinaria transcripcional de T. cruzi, transcribe sus unidades en tandem como RNA policistronicos. Con respecto al mecanismo de terminación este seria funcional dependiendo de las condiciones metabólicas o de algun factor que permitiera que bajo ciertas condiciones la transcripción parara o reiniciara.

E) Análisis de las proteínas que se unen al gene del RNAr 5S de T. cruzi.

Uno de los intereses del grupo consiste en tratar de establecer un posible sistema de transcripción in vitro. El gene 5S ha sido uno de los más estudiados y de los que se conoce mejor su secuencias de control asi como los factores que interaccionan con el. Con el objeto de identificar los factores que interaccionan con las regiones de control previamente identificadas en el RNAr 5S de T. cruzi (i.e., caja A y caja C, asi como las cajas G+C encontradas en el espaciador) y comparar nuestros hallazgos con los ya reportados, se realizaron ensayos de huellas moleculares con el plásmido pRC100 que contiene la región codificadora y 40 pb río arriba del sitio de inicio de la transcripción (que contiene las cajas G+C 7 y 8 Figura 1 manuscrito enviado). Los resultados mostraron que la protección no solamente

comprende la region de control interno constituida por la caja A y caja C (+50 - +90) sino que se extiende practicamente a todo lo largo de la molécula incluyendo la región en donde se ubican las cajas G+C 7 y 8. Estudios previos realizados con el gene para el RNAr 5S de S. cerevisiae mostraron que las proteínas que se unen a esta molécula protegen de la digestión por DNAasaI grandes regiones de este gene y 40 a 45 pb ubicadas río arriba del inicio de la transcripción (52). Resultados similares encontramos para la molécula 5S de T. cruzi. Sin embargo, para el caso del RNAr 5S de Xenopus y células Hella (53) se ha encontrado que la protección se limita a la región de control interno. Estas diferencias en el patrón de protección observado entre dos organismos eucariotes inferiores y dos organismos superiores no sabemos a que se deban. Creemos que es necesaria la caracterización y purificación de los factores que interaccionan con la region codificadora del gene 5S de T. cruzi para poder establecer si las interacciones que estamos observando se deben a la unión de proteínas que ya han sido reportadas o bien si se tratan de proteínas nucleares diferentes.

F) En los extractos nucleares de T. cruzi existe algun factor que se une a la región espaciadora del gene 5S.

Ensayos de huellas moleculares y de retardamiento con la

región espaciadora (pRE5S) mostraron que existe un factor(es) que se une a las cajas G+C. Durante mucho tiempo se pensó que la caja A y la caja C eran los únicos elementos necesarios para la transcripción de estos genes. Sin embargo, se sabe que los genes del RNAr 5S de Neurospora crassa, Bombyx mori y Drosophila melanogaster contienen secuencias ubicadas río arriba de la región codificadora que son necesarias para su transcripción (54). Además para el caso de los dos RNAs pequeños EBER1 y EBER2 (transcritos por la pol III) del virus de Epstein Barr se ha encontrado que estos genes requieren para su transcripción tanto de la región de control interno (constituida por la caja A y caja B) así como de dos elementos ubicados río arriba del inicio de la transcripción, uno de ellos está constituido por una caja G+C (55). Por esto, consideramos probable que las cajas G+C encontradas en el RNAr 5S de T. cruzi pudieran estar jugando un papel importante en la transcripción del gene 5S y que la transcripción de esta molécula requiera de la participación de ambos tipos de elementos.

La TBP (proteína que se une a la caja TATA) es una proteína que inicialmente se encontró formando parte del factor multimérico TFIID, que se requiere para la transcripción de genes del tipo II. Recientemente se ha encontrado que TBP también forma parte del complejo de transcripción de los genes del tipo I y III (56-59). Esto

sugiere que probablemente TBP actúe interaccionando inicialmente con la caja TATA y después se le unan a esta otra serie de proteínas que le confieren la especificidad. Sería interesante que las cajas G+C que encontramos en el espaciador del gene RNAr 5S de T. cruzi estuvieran en los genes de proteínas ribosomales así como en los genes que codifican para la unidad fundamental de transcripción, de tal manera que el factor que se uniera a estas cajas pudiera participar en una probable regulación coordinada de los tipos de genes que se requieren para constituir un ribosoma.

G) A la región espaciadora de T. cruzi se le une una proteína de aproximadamente 52 kDa.

La secuencia G+C es uno de los elementos regulatorios más comunes de los genes eucariotes que son transcritos por la polimerasa II. Esta secuencia es generalmente reconocida por el factor de transcripción Sp1. Este factor activa la transcripción de genes de la clase II al unirse al DNA a través de sus tres dedos de zinc. Aunque muchos genes que contienen las cajas G+C (i. e., H-ras, c-myb, receptor de insulina) son activados por Sp1 (60). Algunas secuencias G+C pueden ser activadas por otros factores diferentes de Sp1 tales como Krox-20, BTEB, LSF y p53 (encontrados en Drosophila, ratón, células Hella y mamíferos respectivamente) (45, 60, 61 y 62). Dada la diversidad de

proteínas que se unen a las cajas G+C, es muy probable que la proteína de 52 kDa que encontramos en este trabajo se trate de otro factor diferente de Sp1 cuyo peso molecular es de 95 a 105 kDa. Probablemente la proteína de 52 kDa de T. cruzi al igual que las proteínas que se unen a las cajas G+C (Krox-20, BTEB, LSF y p53) tenga en su dominio de unión al DNA tres dedos de Zinc y se trate de un factor específico de este parásito capaz de activar la transcripción. Por lo que consideramos que es importante la caracterización y purificación de esta proteína para poder dilucidar el papel que juega en la transcripción del gene RNAr 5S y averiguar su posible papel en la regulación de la transcripción de las proteínas ribosomales así como el de la unidad fundamental de transcripción.

## CONCLUSIONES.

1. Se estimó la existencia de aproximadamente 1600 copias por núcleo del RNAr 5S, lo que representa un valor 16 veces mayor al encontrado previamente para la unidad de transcripción 18S-24S.
2. El análisis de restricción e hibridación sugiere que la familia génica del RNAr 5S se encuentra organizado en "tandem" con repeticiones de aproximadamente 500 pb y este mismo arreglo está muy conservado en varias cepas mexicanas y sudamericanas.
3. Cromosomas de T. cruzi, fueron separados por electroforesis de campos alternos transversos (TAFE) y mediante ensayos tipo "Southern" se encontró que tanto el RNAr 5S como la unidad fundamental de transcripción (18S-24S) se encuentran en dos cromosomas uno de los cuales (~1385 Kbp) es común en ambas moléculas de RNAr.
4. Ensayos preliminares tipo "Northern" sugieren que la molécula 5S es transcrita como un policistrón.
5. La secuencia deducida para el RNAr 5S mostró los elementos de control de la transcripción descritos en otros phyla (i.e., caja A y caja C). Además se identificaron en la región espaciadora ocho cajas G+C, elementos que forman parte del promotor de genes transcritos por la pol II.

6. Una probable estructura secundaria para el RNAr 5S fue obtenida por usar como guía el modelo universal propuesto por Delinas.

7. Mediante ensayos de huellas moleculares de protección a DNAasa I ("footprinting") se demostró que existen proteínas en el núcleo de T. cruzi, capaz de proteger de manera muy evidente la región de control interno así como las cajas G+C 2 y 3 de la región codificadora y espaciadora de la molécula 5S respectivamente.

8. Ensayos de retardamiento con el promotor temprano del virus SV-40 que contiene seis cajas G+C, así como con el espaciador del DNA 5S de T. cruzi (como competidor homólogo y con el polilinker de pUC18 (como competidor heterólogo) , sugieren que la unión de algún factor(es) a estas cajas es específica.

9. Ensayos tipo "Southwestern" hicieron evidente una proteína de ~35 kDa que reconoce la región codificadora y una proteína de ~52 kDa que se une a la región espaciadora.

## PERSPECTIVAS.

En el presente trabajo, se demostró la existencia de proteínas nucleares de T. cruzi capaces de interaccionar con la molécula 5S de este parásito. Sin embargo creemos que es necesaria la purificación de los factores que están interaccionando con la región codificadora y espaciadora del gene 5S. Esto nos permitiría la caracterización de estos factores y averiguar si las proteínas que se están uniendo a esta molécula son iguales o similares a las que han sido reportadas que se unen a la región de control interno, así como a las cajas G+C (i.e., TFIIA y factor Sp1 ó p53).

Estudios de transcripción in vitro son necesarios para averiguar si algunos de los factores purificados son indispensables para la formación de un complejo de transcripción activo para el RNAr 5S de T. cruzi.

Finalmente el estudio de la cromatina del 5S con nucleasa micrococcal nos permitiría conocer si los nucleosomas para este gene se encuentran en fase y si las regiones involucradas en la transcripción se encuentran desprotegidas, lo que haría que estas regiones de DNA fueran accesibles a los factores de transcripción.

BIBLIOGRAFIA.

1. Velasco, C. O., Gúzman, B. C., Cruz, R. J., López, G.G. y González, D. H. (1991) La enfermedad de Chagas. Publicación Técnica del INDRE N°8, México, D. F.
2. Guerra, F. (1954) J. Trop. Med. Hyg. 73: 105-111.
3. Velasco CO (1986) Rev. Latinoamer. Microbiol. 28: 275-338.
4. Miercio, E. A. (1990) Cell Biology of *Trypanosoma cruzi*. En Modern parasite biology, cellular, immunological and molecular aspects. David, J. W. Eds. W. H. Freeman and Company. New York.
5. García, E. S. y Azambuja, P. (1991) Development and interactions of *Trypanosoma cruzi* within the insect vector. Parasitology Today 7: 240-249.
6. Nogueira, N. (1986) American Trypanosomiasis. En Parasite antigens, toward new strategies for vaccines: T. W. Pearson, editor, Marcel Detcker INC., New York.
7. Long, E. O., Dawid, I. B. (1980) Repeated genes in eukaryotes. Ann. Rev. Biochem. 49:727-764.
8. White, T. C., Rudenko, G. y Borst, P. (1986) Three small RNAs within the 10 Kb Trypanosome rRNA transcription unit are analogous to domain VII of other eukaryotic 28S rRNAs. Nucleic Acids. Res. 14: 9471-89.
9. Spencer, D. F., Collings, J. C, Schnare, M. N. y Gray, M. W. (1987) Multiple spacer sequence in the large subunit ribosomal RNA gene of *Crithidia fasciculata*. EMBO J. 6: 1063-1071.
10. Hernández, R., Díaz de León, F. y Castañeda, M. (1988) Molecular cloning and partial characterization of ribosomal RNA genes from *Trypanosoma cruzi*. Mol. Biochem. Parasitol. 27: 275-280.
11. Zinker, S., Corona, M. y Depardón, F. (1986) Estructura y biosíntesis de los ribosomas. Boletín de Educación Bioquímica 4: 100-113.
12. Köck, J., y Cornelisson, A. W. C. A. (1990) The ribosomal RNA genes of *Crithidia fasciculata*. Mol. Biochem. Parasitol. 38: 295-298.

13. Lenardo, M. J., Dorfman, D. M., Reddy, L. V. y Donelson, J. E. (1985) Characterization of *Trypanosoma brucei* 5S ribosomal RNA gene and transcript; the 5S rRNA is a spliced-leader-independent species. *Gene* 35: 131-141.
14. Geiduscheck, P. E. y Tocchini-Valentini, G. P. (1988) Transcription by RNA polymerase III. *Ann. Rev. Biochem.* 57: 873-914.
15. Kassavetis, A. G., Braun, R. B., Ngoyen, H. L. y Geiduscheck, P. E. (1990) *S. cerevisiae* TFIIIB is the transcription initiation factor proper of RNA polymerase III, while TFIIIA and TFIIIC are assembly factors. *Cell* 60: 235-245.
16. Palmer, M. J. y Folk, R. W. (1990) Unraveling the complexities of transcription by RNA polymerase III. *Trend in Biochemistry* 15: 300-304.
17. Morton, D. G. y Sprague, K. U. (1984) In vitro transcription of a silkworm 5S RNA gene requires an upstream signal. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 81: 5519-5522.
18. Selker, U. E., Wroblewska-Morzycka, E., Stevens, N. J. y Metzenberg, L. R. (1986) An upstream signal is required for in vitro transcription of *Neurospora* 5S RNA genes. *Mol. Gen. Genet.* 205: 189-192.
19. García, D. A., O'Connell, M. A. y Sharp, J. S. (1987) Formation of an active transcription complex in the *Drosophila melanogaster* 5S RNA gene is dependent on an upstream region. *Mol. and Cell. Biol.* 7: 2046-2051.
20. Camargo, E. P. (1964) Growth and differentiation of *Trypanosoma cruzi*. Origin of metacyclic trypanosomes in liquid medium. *Revta. Inst. Med. Trop. Sao Paulo* 6: 220-224.
21. Castro, C., Hernández R. y Castañeda, M. (1981) *Trypanosoma cruzi* ribosomal RNA: internal break in the large molecular-mass species and number of gene. *Mol. Biochem. Parasitol.* 2: 219-233.
22. Maizels, N. (1976). *Dictyostelium* 17S, 25S and 5S rDNA lie within a 3800 base pair repeat unit. *Cell* 9: 431-438.
23. Mireya, R. H. (1992) Elaboración de un banco genómico de

Trypanosoma cruzi y aislamiento de secuencias repetidas.  
[Tesis]. Facultad de Química. UNAM.

24. Rowecamp, W. y Firtel, R. A. (1980) Isolation of developmentally regulated genes from Dictyostelium. Dev. Biol. 79: 409-418.
25. Southern, E. M. (1975) Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. J. Mol. Biol. 98: 503-517.
26. Sanger, F., Nicklen, S. y Coulson, A. R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74: 5463-5467.
27. Yanisch-Perron, C., Vieira, J. y Messing, J. (1985) Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequence of the M13mp18 and pUC19 vectors. Gene, 3: 103-119.
28. Donis-Keller, H., Maxam, A. M. y Gilbert, W. (1977) Mapping adenines, guanines and pyrimidines in RNA. Nucleic Acids. Res. 4: 2527-2538.
29. Peattie, D. A. (1979). Direct Chemical method for sequencing RNA: Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 76: 1760-1764.
30. Wagner, W., y So. M. (1990) genomic variation of Trypanosoma cruzi: Involvement of multicopy genes. Infec. Inmun. 58: 3217-3224.
31. Carle y Olson (1985) An electrophoretic karyotype for yeast. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 3756-3760.
32. Guido, C. M., Zamorano, R., Garrido-Guerrero, E., Gariglio, P. y García-Carranca, A. (1992) Early promoters of genital and cutaneous human papillomaviruses are differentially regulated by the bovine papillomavirus type 1 E2 gene products. Journal of General Virology. 73: 3996-4000.
33. Maniatis, T., Fritsch, E. F. y Sambrook, J. (1982) Molecular cloning, a laboratory manual. Cold Spring Harbor. New York.
34. Weil, A. P., Segall, J., Harris, B., Sun-Yu, Ng. y Roeder, G. R. (1979). Faithful transcription of

eukaryotic genes by RNA polymerase III in system reconstituted with purified DNA templates. The Journal of Biol. Chem. 254: 1395-1400.

35. Dignam, J. D., Lebovitz, M. R. y Roeder, G. R. (1983) Accurate transcription initiation by RNA pol II in a soluble extract from isolated mammalian. Nucleic Acids Res. 11: 1475-1489.
36. Wildeman, A. G., Sassone-Corsi, P., Gondstrom, T., Zenke, M. y Chambon, P. (1984) Stimulation of in vitro transcription from the SV40 early promoter by the enhancer involves a specific trans-acting factor. EMBO J. 3, 3129-3133.
37. Bradford, M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein dye binding. Anal. Biochem. 72: 248-254.
38. Cereghini, S. (1988) Detection and characterization of DNA-binding protein by in vitro approaches: practical course. Institute Pasteur Biologie Moleculaire. Francia.
39. Galas, D. J. y Schmitz, A. (1978) DNAase footprinting: a single method for the detection of protein DNA-binding specificity. Nucleic Acids Res. 5: 3157-3170.
40. Maxam, A. M. y Gilbert, W. (1977) A new method for sequencing DNA. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74: 560-564.
41. Miskiminis, W. K., Roberts, M. P., McClelland A. y Rudle, F. H. (1985) Use of a protein blotting procedure and a specific DNA probe to identify nuclear that recognize the promoter region of the transferrin receptor gene. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 6741-6744.
42. Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227: 680-685.
43. Towbin, H., Staehelin, T. y Gordon, J. (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrilamide gels to nitrocellulose sheets: procedures and some applications. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76: 4350-4354.
44. Delihias, N. y Andersen, J. (1982) Generalized structures of the 5S ribosomal RNAs. Nucleic Acids Res. 10: 7323-7344.

45. Bargonetti, J., Friedman, N. P., Kern, E. S., Vogelstein, B. y Prives, C. (1991) Wild type but not mutant p53 immunopurified proteins bind to sequences adjacent to the SV40 origin of replication. *Cell* 65: 1083-1091.
46. Engelke, D. R., Ng, S. Y. Shasttry, B. S. y Roeder, R. G. (1980) Specific interaction of a purified transcription factor with an internal control region of 5S RNA genes. *Cell* 19: 717-718.
47. Gottlieb, E. y Steitz, J. A. (1989) Function of the mammalian La protein: evidence for its action in transcription termination by RNA polymerase III. *EMBO J.* 8: 851-861.
48. Rubio, J., Rosado, Y. y Castañeda, M. (1980) SUBunit structure of Trypanosoma cruzi chromatin. *Can. J. Biochem.* 58: 1247-1251.
49. Tschudi, C. y Ullu, E. (1988) Polygene transcripts are precursors to calmodulin mRNAs in trypanosomes. *EMBO J.* 7: 455-463.
50. Imboden, M. A., Laird, P. W., Affolter, M. y Seebeck, T. (1987) Transcription of the intergenic regions of the tubulin gene cluster of Trypanosoma brucei: evidence for a polycistronic transcription unit in a eukaryote. *Nucleic Acids Res.* 15: 7357-7368.
51. Boothroyds, J. C., y Cross, G. A. M. (1982) Transcripts coding for different variant surface glycoproteins in Trypanosoma brucei have a short identical exon at their 5'-end. *Gene* 20: 279-287.
52. Braun, R. B., Riggs, L. D., Kassavetis, A. G. y Geiduschek, P. E. (1989) Multiples states transcription complexes on Saccharomyces cerevisiae 5S ribosomal RNA genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*. 86: 2530-2534.
53. Seifar, K. H., Wang, L., Waldschmidt, R., John, D. y Wingenderf, E. (1989) purification of human transcription factor TFIIIA and this interaction with a chemically synthesized gene encoding human 5S rRNA. *The Journal of Biological Chemistry.* 264: 1702-1709.
54. García, D. A., O'Connell, M. A. y Sharp, J. S. (1987) Formation of an active transcription complex in the *Drosophila melanogaster* 5S RNA gene is dependent on an

upstream region. *Mol. and Cell Biol.* 7: 2046-2051.

55. Howe, G. J. y Shu M. (1989) Epstein-Barr virus small RNA (EBER) genes: unique transcription units that combine RNA polymerase II and III promoter elements. *Cell* 57: 825-834.
56. Sharp, A. P. (1992) TATA-binding protein is a clasless factor. *Cell* 68: 819-821.
57. Comai, L., Tanese, N. y 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.
58. Cormack, P. B. y Struhl, K. (1992). Variants of the TATA-binding protein is required for transcription by all three nuclear RNA polymerase I in yeast cell. *Cell* 69: 685-696.
59. Schuttz, C. M. y Reeder, H. R. (1992) Variants of the TATA-binding protein can distinguish subsets of RNA polymerase I, II and III promoters. *Cell* 69: 685-696.
60. Imataka, H., Sogawa, K., Yasomoto, K., Kikuchi, Y., Sasano, K., Kobayashi, A., Hayain, M. y Foji-Kuriyama, Y. (1992). Two regulatory proteins taht bind to the basic transcription element (BTE), a GC box sequence in the promoter region of the rat P-4501A gene. *EMBO J.* 11: 3663-3671.
61. Chavrier, P., Vesque, C., Galliot, B., Vigneron, M., Dolle, P., Duboule, D. y Charnay, P. (1992) The segment-specific gene Krox-20 encodes a transcription factor with binding sites in the promoter region of the Hox-1.4 gene. *EMBO J.* 9: 1209-1218.
62. Kim, C. H., Heath, C., Bartuch, A. y Hansen, U. (1987) Specific stimulation of simian virus 40 late transcription *in vitro* by a cellular factor binding the simian virus 40 21-base-pair repeat promoter element. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*. 84: 6025-6029.

APENDICE.

PREPARACION DE MEDIO LURIA

NaCl.....10 gr  
peptona.....10 gr  
Extracto de levadura...5 gr  
Tris pH 7.5 - 8.0 1 M..10 ml  
c.p.b 1 litro

LIT

NaCl.....4.0 gr  
KCl.....0.4 gr  
Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.....8.0 gr  
Glucosa.....2.0 gr  
Infusión de hígado.....5.0 gr  
Hemina.....0.25 gr  
Suero fetal bovino inactivado 100 ml  
c.b.p. 1 litro.

6,6,0.2

Tris pH 7.4.....6 mM  
NaCl.....6 mM  
EDTA pH 7.2.....0.2 mM

TBE 5X

Tris-base.....54.0 gr  
Acido bórico.....27.5 gr

EDTA.....4.65 gr

c.b.p 1 litro.

SOLUCION DESNATURALIZANTE

NaCl.....87.75 gr

NaOH.....20.0 gr

c.b.p 1 litro

SOLUCION NEUTRALIZANTE.

NaCl.....87.75 gr.

Tris-base.....66.6 gr.

c.b.p 1 litro.

20X SSC

NaCl.....175.32 gr

Citrato de Sodio.....88.23 gr

c.b.p 1 litro.

SOLUCION DE DENHARDTS 100X

Ficoll 400.....1.0 gr

polivinil pyrrolidona..1.0 gr

Albumina sérica bovina.1.0 gr

c.b.p 50 ml

SOLUCION DE HIBRIDACION.

CONCENTRACION FINAL                      STOCK

Formamida 50%.....50 ml

50 ml

SDS 0.2%.....1 ml de SDS 20%  
EDTA (7.4) 2mM.....1 ml de EDTA 0.2M pH 7.4  
Buffer de fosfatos 120 mM.....10 ml de buffer de fosfatos  
1.2M

\*SSC 1X.....5 ml de 20X SSC

c.b.p 100 ml

\*en el caso de DNA el SSC es 2X.

#### OBTENCION DE NUCLEOS.

##### SOLUCION A.

Hepes pH 7.9 10mM.....0.5 ml de Hepes 1 M pH 7.9.

MgCl<sub>2</sub> 1.5 mM.....75 µl de MgCl<sub>2</sub> 1 M

KCl 10 mM.....0.5 ml de KCL 1 M

DTT 0.5 mM.....25 µl de DTT 1 M.

PMSF 0.5 mM.....250 µl de 0.1 M .

c.b.p 50 ml

##### SOLUCION B.

Hepes pH 7.9 0.3 M.....15 ml de Hepes 1 M pH 7.9

KCl 1.4 M.....5.21 gr de KCl

MgCl<sub>2</sub> 0.03 M.....1.5 ml de 1 M

\*cocktel de inhibidores de proteasas

c.b.p 50 ml

##### SOLUCION D

CONCENTRACION FINAL

STOCK

Hepes 20mM pH 7.9.....10 ml de Hepes 1 M  
KCl 60 mM.....30 ml de KCl 1M  
Glicerol al 20 %.....100 ml de glicerol  
EDTA 0.25 mM.....250  $\mu$ l de EDTA 0.5 M pH 8.0  
EGTA 0.125 mM.....125  $\mu$ l de EGTA 0.5 M pH 8.0  
DTT 1mM.....500  $\mu$ l de 1 M de DTT\*

más inhibidores de proteasas

\*se añade justo antes de usarse.

#### PREPARACION DE INHIBIDORES DE PROTEASAS.

PMSF 100 mM.....0.871gr en 50ml de isopropanol

Pepstatin A 1 mg.....1mg por ml en etanol.

Leupeptina 10 mg.....10mg por ml en agua.

Aprotinina 10 mg.....10mg por ml en 0.01 M HEPES  
(pH 8.0).

Benzamidina 100 mM.....0.8 gr en 50 ml de etanol,

#### COCKTEL DE INHIBIDORES DE PROTEASAS

CONCENTRACION FINAL

STOCK

PMSF 0.5 mM.....5  $\mu$ l de PMSF 100 mM

Benzamidina 2mM.....20  $\mu$ l de benzamidina 100 mM

aprotinina 5 ug/ml.....0.5  $\mu$ l de aprotinina 10mg/ml

Pepstatin A 5 ug/ml.....5  $\mu$ l de pepstatina 1mg/ml

Leupeptina 5 ug/ml .....0.5  $\mu$ l de leupeptina 10 mg/ml

c.b.p 1 ml.

SOLUCIONES PARA LA OBTENCION DE EXTRACTOS NUCLEARES.

BUFFER DE EXTRACCION NUCLEAR (NEB 0.42 M)

CONCENTRACION FINAL	STOCK
HEPES 20 mM.....	10 ml de HEPES 1M
Glicerol 25%.....	12.5 ml de glicerol
MgCl <sub>2</sub> 1.5 mM.....	75.0 $\mu$ l de MgCl <sub>2</sub> 1 M
EDTA 2.5 mM.....	25 $\mu$ l de EDTA 0.5M pH 8.0
NaCl 0.42 M .....	4.2 ml de NaCl 5M.

antes de usarse añada:

DTT 0.5  $\mu$ M.....25.0  $\mu$ l de DTT 1M

cocktel de inhibidores de proteasas.

c.b.p 50 ml

BUFFER DE DIALISIS.

CONCENTRACION FINAL	STOCK
HEPES 20 mM.....	10 ml de HEPES 1M pH 7.9
KCl 60 mM.....	30 ml de KCl 1M
Glicerol 20%.....	100 ml de glicerol.
EDTA 250 $\mu$ M.....	250 $\mu$ l de EDTA 0.5 M pH 8.0
EGTA 125 $\mu$ M.....	125 $\mu$ l de EGTA 0.5 M pH 8.0

antes de usarse añada:

DTT 1.0 mM.....500  $\mu$ l de DTT 1M

e inhibidores de proteasas.

BUFFER HNB  $MgCl_2/CaCl_2$

CONCENTRACION FINAL

STOCK

Sucrosa 0.5 M.....25.0 ml de sucrosa 1M  
Tris pH 7.5 15mM.....750  $\mu$ l de Tris 1M pH 7.5  
KCl 60 mM.....3.0 ml de KCl 1M  
EDTA pH 8.0 250  $\mu$ M.....25  $\mu$ l de EDTA 0.5 M pH 8.0  
EGTA pH 8.0 125  $\mu$ M.....12.5  $\mu$ l de EGTA 0.5 M pH 8.0  
 $MgCl_2$  5mM.....250  $\mu$ l de  $MgCl_2$  1M  
 $CaCl_2$  2.5 mM.....125  $\mu$ l de  $CaCl_2$  1M

Justo antes de usarse añada:

Espermidina 500  $\mu$ M.....125  $\mu$ l de espermidina 0.2M  
Espermina 150  $\mu$ M.....37.5  $\mu$ l de espermina 0.2M  
DTT 1 mM.....5.0  $\mu$ l de DTT 1 M  
PMSF 1mM.....500  $\mu$ l de PMSF 100 mM  
c.b.p 50 ml.

SOLUCIONES SOUTHWESTERN

SOLUCION DE BLOQUEO.

5 gr de Leche Sveltes en 10 mM de Hapes pH 8.0

BUFFER DE UNION.

CONCENTRACION FINAL

STOCK

Hepes pH 8.0 10 mM.....500  $\mu$ l de Hepes 1 M pH 8.0.  
NaCl 50 mM.....500  $\mu$ l de NaCl 5 M.  
 $MgCl_2$  10 mM.....500  $\mu$ l de  $MgCl_2$  1 M.  
EDTA 0.1 mM.....6.25  $\mu$ l de EDTA 0.8 M.

Justo antes de usarse añada:

DTT 1mM.....50  $\mu$ l de DTT 1M  
leche semidescremada 0.25%....0.125 gr de leche.  
0.5 X10<sup>6</sup> cpm/ml del fragmento de DNA  
c.b.p 50 ml.

BUFFER DE LAVADO.

Se prepara igual que el buffer de Unión solamente que ahora tiene 0.1 M de NaCl.

BUFFER DE CORRIDA PARA GELES DE POLIACRILAMIDA.

Glicina 192 mM.....14.4 gr  
Tris-base 0.025 M.....3.0 gr  
SDS 10%.....100. gr de SDS  
c.b.p litro

BUFFER DE TRANSFERENCIA.

Glicina 192 mM.....59.2 gr  
Tris 0.025 M.....12.12 gr  
Metanol 20%.....800 ml.  
c.b.p 4 litros.