



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

CAMPUS IZTACALA

CLONACION, SECUENCIACION Y
CARACTERIZACION DEL GENE U6 SNRNA DE
Entamoeba histolytica

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

B I O L O G O

P R E S E N T A I

RAUL MIRANDA CASO LUENGO

1995



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

A mis padres Guadalupe y Raúl

A mis hermanos Araceli y Alfonso

A mi novia Ma. Teresa

A mi amigo Alfredo

Agradecimientos.

La culminación de este trabajo de investigación es una muestra del inquebrantable espíritu de trabajo en equipo. En mayor o menor medida, los integrantes de los laboratorios del Dr. Paul M. Lizardi y del Dr. Alejandro Alagón han sido partícipes del avance y discusión de los resultados que aquí se presentan. En particular quiero agradecer a los doctores Paul M. Lizardi López, Luis Miguel Salgado Rodríguez y Alejandro Alagón Cano por su excelente trabajo de dirección y enseñanza.

La experiencia que proporciona el trabajo cotidiano es un factor de incuestionable importancia. En un sinnúmero de ocasiones he contado con el apoyo de Isabel Tussie, Helena Porta, Laurence Colin, Rosana Sánchez, Gabriel Mercado, Miguel Angel Cevallos, Gabriel Moreno, Bertha Michel, Ernesto Ortiz y Ernesto Cota, quienes con sus valiosas observaciones, comentarios y críticas han enriquecido y acelerado la culminación de este trabajo.

No puedo dejar de agradecer el excelente apoyo técnico que me brindaron Alejandro Olvera Rodríguez, Rene Hernández Vargas, Georgina Estrada de Krötzsch, Felipe Olvera Rodríguez, Paul Gaytan Colin, Filiberto Sánchez López y Eugenio López Bustos.

Agradezco la revisión crítica de este trabajo a Paul M. Lizardi López, Luis Miguel Salgado Rodríguez, Alejandro Alagón Cano, Sergio Vaca Pacheco, Irma Elena Dueñas García, Diego J. Arenas Aranda y Elías Piedra Ibarra. Además tengo en especial atención la revisión ortográfica que hicieron Guadalupe Caso Luengo Méndez y María Teresa Sandoval Minero.

También agradezco a todos los profesores que algún día tuvieron que lidiar con un estudiante inquieto. En particular a José Luis Gama, Sergio Vaca, Luis Miguel Salgado y Paul M. Lizardi.

Alejandra Jasso siempre me brindó un gran apoyo en los asuntos administrativos haciendo más agradable mi estancia en el laboratorio.

Para la realización de este proyecto se contó con el apoyo económico de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico de la UNAM y de la Comunidad Económica Europea.

Índice temático

	Página
Agradecimientos.....	1
Índice temático.....	2
Índice de figuras.....	4
Abreviaturas y tecnicismos.....	6
Resumen.....	7
Introducción.....	8
U6 snRNA.....	12
Objetivos.....	19
General.....	19
Particulares.....	19
Material y Métodos.....	21
Soluciones y amortiguadores.....	21
Medios y cepas.....	24
Técnicas de electroforesis en gel.....	26
Geles de agarosa.....	26
Geles de poliacrilamida.....	27
Nativos.....	27
Desnaturalizantes.....	27
Purificación de DNA de <i>Entamoeba histolytica</i>	28
Purificación de RNA de <i>Entamoeba histolytica</i>	29
Amplificación de fragmento de 50 pb.....	30
Clonación del gene U6 snRNA.....	31
Genoteca.....	31
Cultivo.....	32
Obtención de placas de lisis.....	32
Transferencia.....	32

Hibridación.....	32
Recuperación.....	33
Escisión.....	33
Purificación de plásmido.....	34
Digestión de DNA.....	35
Subclonación.....	35
Sondeo directo por PCR.....	36
Secuenciación.....	36
Southern blot.....	39
Northern blot.....	40
Análisis computacional de las secuencias U6 snRNA.....	41
Alineamientos.....	41
Modelos de estructura secundaria.....	42
Resultados.....	43
Construcción de una sonda específica para el gene U6...	43
Aislamiento y caracterización de clonas U6 positivas...	43
Número de copias y transcripción del gene U6.....	49
Subclonación del gene U6 snRNA.....	51
Secuencia del gene U6 snRNA.....	53
Alineamiento de secuencias U6 snRNA.....	53
Estructura secundaria de U6 snRNA.....	63
Discusión.....	65
U6 snRNA de <i>Entamoeba histolytica</i>	65
Implicaciones filogenéticas de la presencia de U6	
en <i>Entamoeba histolytica</i>	66
Estructura secundaria de U6 snRNA.....	68
Conclusiones.....	70
Referencias.....	72

Índice de figuras

Introducción.

Tabla 1. Características de <i>Entamoeba histolytica</i>	8
Figura 1. Procesamiento de intrones GII y pre-mRNA....	9
Figura 2. Representación esquemática de las snRNPs....	11
Figura 3. Primeras interacciones en la formación del spliceosoma.....	13
Tabla 2. Diferencias entre U6 snRNA y demás U snRNAs..	14
Figura 4. Modelos de estructura e interacción de U6 snRNA.....	16
Figura 5. Similitud estructural en el procesamiento de intrones GII y pre-mRNA.....	18
Estrategia experimental.....	20

Resultados.

Figura 6. Fragmento de amplificación de 50 pb.....	44
Figura 7. Caracterización de clonas por PCR.....	45
Figura 8. Análisis de restricción de clonas.....	47
Figura 9. Clonas genómicas que contienen el gene U6...	48
Figura 10. Southern blot y Northern blot.....	50
Figura 11. Subclonación.....	52
Figura 12. Estrategias de secuenciación.....	54
Figura 13. Resultados de secuencia.....	55
Figura 14. Alineamiento de Needleman-Wunsch de las secuencias U6 snRNA.....	57
Figura 15. Alineamiento de GeneWorks de las secuencias U6 snRNA.....	59
Figura 16. Dendograma del alineamiento de GeneWorks...	60

Figura 17 Alineamiento y dendograma de U6 snRNA de eucariontes unicelulares.....	62
Figura 18. Modelos de estructuración secundaria para U6 snRNA de <i>Entamoeba histolytica</i> y <i>Saccharomices cerevisiae</i>	64

Abreviaturas y Tecnicismos

G, A, C, T o U: Residuo de guanina, adenina, citosina, timina o uracilo.

dNTP: Trifosfato de deoxinucleótido. (N puede ser G, A, T o C)

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa (Polymerase Chain Reaction).

RNA: Acido ribonucleico.

pre-mRNA: Precursor de RNA mensajero.

DNA: Acido desoxirribonucleico.

snRNA: Acido ribonucleoproteico pequeño nuclear.

snRNP: Partícula ribonucleoproteica pequeña nuclear.

Splicing: Maduración de pre-mRNA por escisión de intrones y empalmado de exones.

Spliceosoma: Complejo de maduración de pre-mRNA formado por 4 snRNPs, formados a su vez por 5 snRNAs. Las interacciones RNA-RNA son particularmente importantes.

Resumen

Se ha mostrado que U6 snRNA juega un papel determinante en el splicing de intrones tipo pre-mRNA. De los cinco snRNA's spliceosomales es el más conservado en tamaño y secuencia a través de la escala filogenética. Existe 77 % de homología entre las secuencias de *Saccharomices cerevisiae* y *Homo sapiens*. Hasta hoy no se han descrito snRNAs spliceosomales en *Entamoeba histolytica*.

Por PCR amplificamos un fragmento de 50 pb que corresponde a la región interna del gene U6 de *Entamoeba histolytica*. Este fragmento se utilizó como sonda. A partir de una genoteca genómica de *Entamoeba histolytica* HM1-IMSS se obtuvieron nueve clonas positivas (U6⁺) idénticas. El gene se secuenció y se realizaron alineamientos con otras 20 secuencias disponibles en el Gene Bank.

Existe una polémica con respecto a la evolución de los grupos de intrones. Se ha indicado que un punto clave en el entendimiento del origen de intrones tipo pre-mRNA es si se encuentran o no en eucariontes mitocondriales (v.g. *Entamoeba histolytica*). Recientemente se reportó la existencia de un intrón en *Entamoeba histolytica*, aún cuando no se han discutido las implicaciones filogenéticas. Debido a la presencia del gene U6 snRNA podemos pensar que la maquinaria de pre-mRNA splicing de *Entamoeba* es similar a la de los eucariontes con mitocondria. Con esto se plantean dos posibilidades excluyentes. La primera es que esta maquinaria pudo tener su origen antes del evento que llevó a la aparición del primer organismo con mitocondria, y la segunda es que *Entamoeba histolytica* puede ser un organismo moderno que ha perdido su mitocondria en su adaptación parasítica. En el presente continúa la discusión al ubicar el género *Entamoeba* en la escala filogenética:

Por último, mediante un análisis computarizado de estructura secundaria se refuerza la idea de que el U6 snRNA adopta su conformación funcional solamente cuando se encuentra en interacción con los restantes elementos que forman el spliceosoma.

Introducción

Durante más de una década se consideró que los eucariontes que no tienen mitocondria (Archezoa; Cavalier-Smith, 1991), carecían de genes interrumpidos por intrones tipo pre-mRNA. Sin embargo, Samuelson y cols. (1993) reportaron la presencia de un intrón en el gene *cdc2* de *Entamoeba histolytica* (Ver características de este organismo en la Tabla 1). Este descubrimiento llevó a considerar que la amiba contiene la maquinaria de

Tabla 1. Características de *Entamoeba histolytica*

Morfología y compartimentalización.

- Ausencia de mitocondria y peroxisomas.
- Aparato de Golgi no desarrollado.
- No existe diferenciación entre vacuolas digestivas y vesículas secretorias.
- Enzimas digestivas asociadas a membrana.

Metabolismo y proteínas.

- Ausencia de proteínas heme, de ciclo de ácidos tricarboxílicos y de vía de las pentosas.
- Ferredoxinas citoplásmicas.
- Cinasas dependientes de pirofosfato.
- Carencia de regulación alostérica en glucólisis
- Ausencia de ruta biosintética de glutation

Organización de DNA y RNA.

- Ausencia de nucleolo típico.
- Cromatina inusualmente estructurada.
- Ausencia de histonas.
- Presencia de rDNA en episomas.
- Regiones 5' no traducibles de mRNAs relativamente cortas.

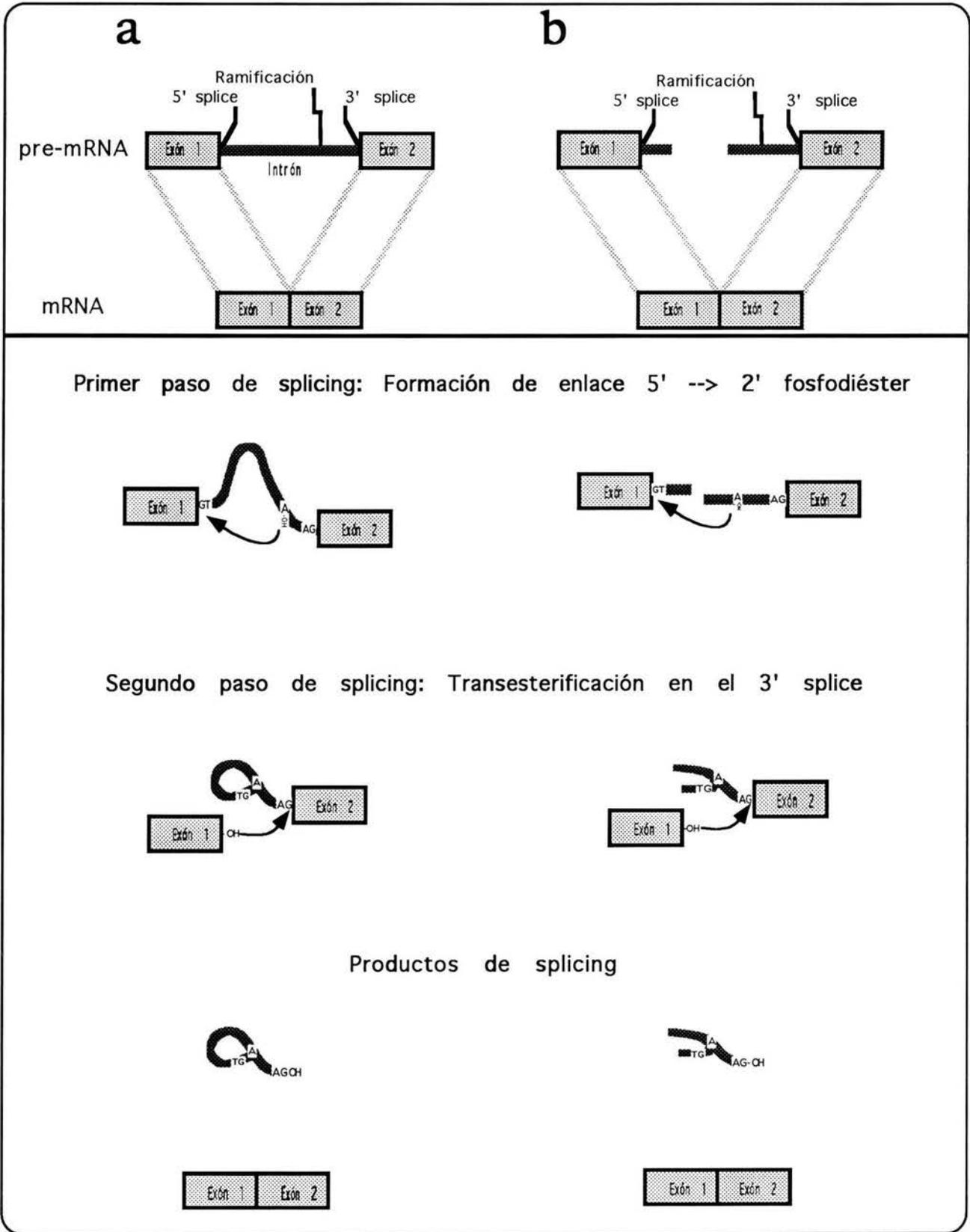


Figura 1. Procesamiento de intrones GII y pre-mRNA. (a) *cis*-splicing y (b) *trans*-splicing. (Arriba) Resumen del procesamiento. (Abajo) Esquema de cada uno de los dos ataques nucleofílicos que llevan a la liberación del intrón y al empalme de exones. La diferencia entre los intrones GII y pre-mRNA está en que mientras los primeros son autocatalíticos, los segundos requieren de todo un complejo multi-ribonucleoproteico.

procesamiento requerida para el splicing, quedando la interrogante de si ésta era similar a la de metacariontes (eucariontes con mitocondria; Cavalier-Smith, 1991).

En el genoma de metacariontes es habitual encontrar secuencias codificables interrumpidas por intrones (Lewin, 1990). La escisión de intrones (splicing) de las moléculas precursoras de mRNA (pre-mRNA) es un proceso esencial, frecuentemente regulado, en la expresión genética de estos organismos (Madhani *et. al.*, 1990). Este evento sucede en dos etapas (Figura 1): 1) formación de una estructura secundaria (en forma de "lazo" o de "y" dependiendo de si se trata de *cis*- o *trans*- splicing, respectivamente) en donde la guanosina en el extremo 5' del intrón se liga al sitio de ramificación con una adenosina en enlace 5'-->2' fosfodiéster. Esto tiene como resultado la liberación del exón 5' y la exposición de un extremo 3'-OH; 2) el extremo 3' del intrón se corta, se unen los exones en un segundo evento de transesterificación y se libera el intrón conservando su estructura secundaria (Fabrizio & Abelson, 1990). Para este evento se requiere la interacción del pre-mRNA con factores en *trans* ensamblados a lo largo de una ruta ordenada que formará el complejo de procesamiento llamado spliceosoma (Benjamin *et. al.*, 1989). Estos factores son cuatro partículas ribonucleoproteicas nucleares pequeñas (snRNP's U1, U2, U4/U6 y U5), formadas a su vez por cinco RNA's nucleares pequeños (snRNA's U1, U2, U4, U5 y U6) y un número indeterminado de proteínas, las cuales pueden ser comunes o específicas a cada snRNA (Fabrizio & Abelson, 1990 y Figura 2).

En un primer estado en el ensamblaje del spliceosoma, U1 snRNP y U2 snRNP interactúan con el sitio 5' y con la región de ramificación del

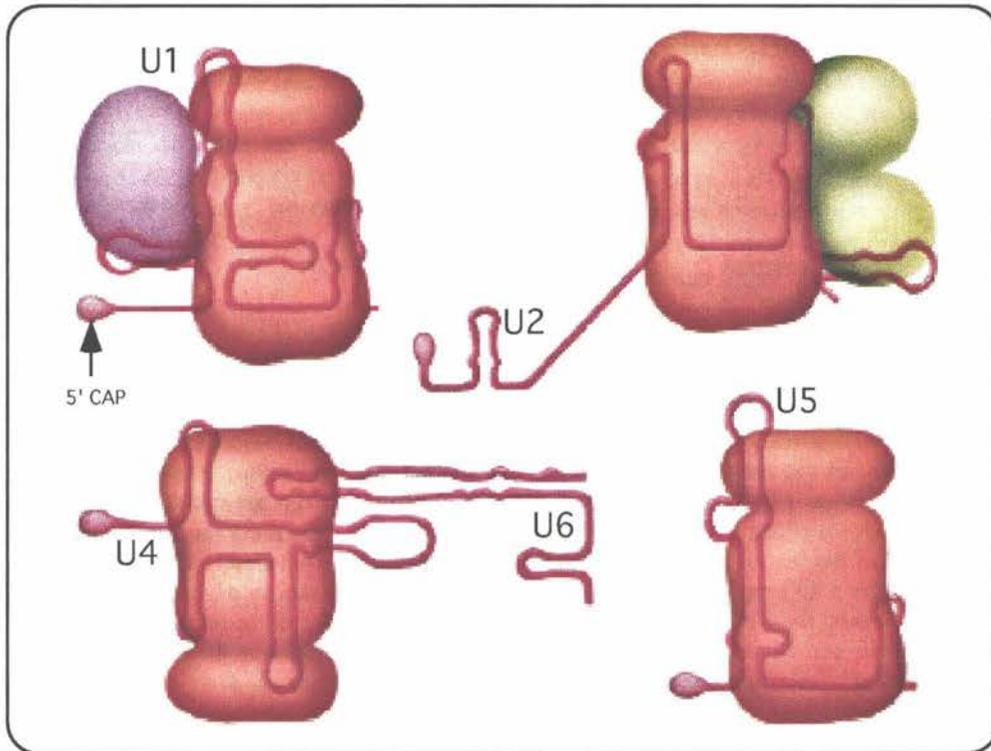


Figura 2. Representación esquemática de las pequeñas partículas ribonucleoproteicas nucleares (snRNP). Cada snRNP es nombrado de acuerdo al ácido ribonucleico con que forman complejos. Se representan proteínas comunes y específicas.

intrón, respectivamente (Sharp, 1994 y Reich, 1992). En ambos casos, la interacción se lleva a cabo por apareamiento de bases complementarias entre el intrón y los snRNAs (Sawa & Shimura, 1992 y Figura 3). Es relevante mencionar que en todos los intrones existen secuencias similares en su extremo 5' (GUAUGU) y en su región de ramificación (UACUAACA), para *Saccharomyces cerevisiae* y otras levaduras (Woollford & Peebles, 1992 y Wise *et. al.* 1983). En los demás organismos esta secuencia es menos conservada, pero la A en el punto de ramificación está conservada totalmente. En el extremo 3' sólo existen dos bases conservadas (AG). Realmente, la primera interacción ocurre entre U1 snRNA y el 5' del intrón (Reich & Wise, 1990). En experimentos *in vitro* fue posible establecer que todas las interacciones son dependientes de ATP a excepción de la primera (Nilsen, 1994). Por otra parte se ha encontrado que U5 snRNA interacciona con ambos exones (Sontheimer, 1993), lo que sugiere que después de la primera reacción de transesterificación, este snRNA es el encargado de mantener cercanos a los exones para que la segunda reacción se realice (Wise, 1993 y Figura 5).

U6 snRNA.

Se han mostrado un buen número de evidencias que apuntan a que U6 snRNA juega un papel determinante en el splicing (Lesser & Guthrie, 1993 y Yu *et. al.* 1993). En la Tabla 2 se presentan las características que diferencian a U6 snRNA de los demás RNAs implicados en el splicing. U6 snRNA tiene una longitud promedio de 105 nucleótidos (Tani & Ohshima, 1989). De los cinco snRNAs spliceosomales es el más conservado en tamaño y secuencia a través de la escala filogenética (77 % de homología entre las secuencias de *S. cerevisiae* y *H. sapiens*; Brow & Guthrie, 1988).

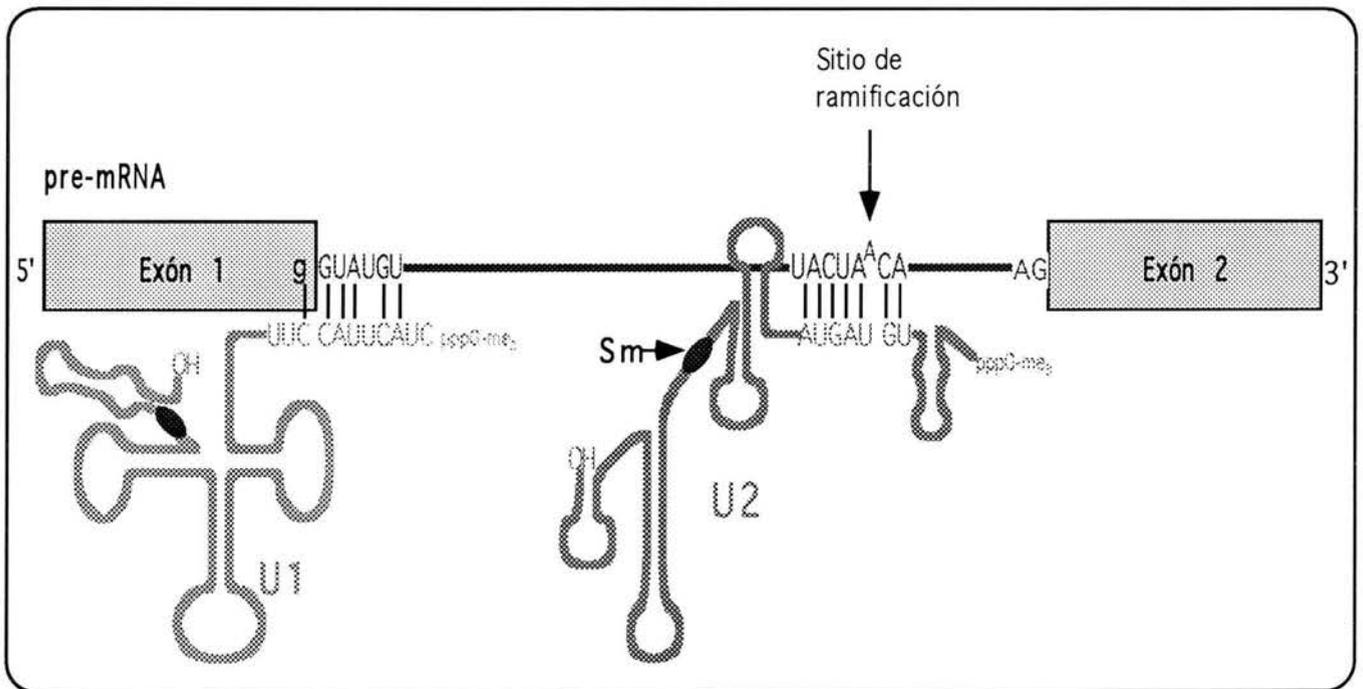


Figura 3. Representación esquemática de las primeras interacciones durante el ensamblaje del spliceosoma. Debe considerarse que los U snRNAs se encuentran asociados con proteínas en partículas ribonucleoproteicas (ver figura anterior). Sm: Sitio de unión a las proteínas spliceosomales comunes. Los detalles se explican en el texto.

Madhani y cols. (1990) identificaron 13 posiciones en el U6 de *Saccharomices. cerevisiae* que son sensibles a mutación puntual dando fenotipos letales o condicionalmente letales. Nueve de éstas están localizadas en dos secuencias altamente conservadas. Sin embargo, otras mutaciones en el resto de la secuencia no tuvieron ningún efecto en la viabilidad de las mutantes ni tampoco en el splicing, aún en bases invariantes.

Tabla 2. Diferencias entre U6 snRNA y demás snRNAs que participan en el procesamiento de intrones tipo pre-mRNA (U1, U2, U4 y U5 snRNA).

Característica	U6 snRNA	Otros snRNAs spliceosomales
Transcripción	RNA Polimerasa III	RNA Polimerasa II
cap	γ monometil fosfato	2,2,7 trimetil Guanosina
Sitio de unión a proteínas (Sm)	Carece	Presente
Conservación en tamaño	Rango de 98 a 112 nucleótidos	Variable
Conservación en secuencia	Muy conservado en su región intermedia	Conservación sólo en pequeñas regiones

U4 snRNA y U6 snRNA se encuentran en el mismo snRNP y apareadas en dos hélices por 22 pares de bases, de las cuales 6 pertenecen al grupo de bases sensibles a mutación (Benjamin *et. al.*, 1989; Fabrizio & Abelson, 1990 y Madhani *et. al.*, 1990). Sin embargo, al restaurar la complementaridad, cambiando las bases correspondientes en U4, no se suprime el fenotipo mutante. Por sí mismas estas mutaciones en U4 son completamente viables. Además, se ha encontrado excelente correlación entre la desnaturalización U4/U6 snRNA y el evento de corte en el sitio 5' del intrón (Madhani &

Guthrie, 1992). De aquí se ha sugerido que U4 funciona como un RNA antisentido que regula el estado de actividad de U6 snRNA. En experimentos de entrecruzamiento (cross-linking) se pudo observar que las interacciones que se llevan a cabo durante el ensamblaje del spliceosoma y durante el splicing son cambiantes (Wassarman & Steitz, 1992). U6 no solamente se aparea con U4, sino que U6 snRNA se mantiene apareado por 7 residuos nucleotídicos al sitio 5' del intrón y por un número variable de nucleótidos a U2 snRNA, antes y después del corte del exón 5' (Wise, 1993 y Wolff & Bindereif, 1993). Además, la primera de estas dos interacciones substituye el apareamiento del intrón con U1 snRNA (comparar Figuras 3 y 5). Es interesante notar que la secuencia ACAGAG, altamente conservada en U6 y muy sensible a mutaciones puntuales, participa de este apareamiento (Sawa & Shimura, 1992). Esto puede implicar que mientras que U1 snRNA establece la localización de la región 5' del intrón, U6 snRNA está involucrado en la selección específica del sitio de corte (Kandels-Lewis & Séraphin, 1993). Además debe notarse que las estructuras secundarias formadas por las interacciones de U6 snRNA con U4 y U2 snRNA son excluyentes entre sí (Wolff & Bindereif, 1993; Fortner *et. al.*, 1994 y Figura 4). Todos estos aspectos sugieren que es el cambio en la interacción de U6 lo que desencadena el procesamiento de los intrones tipo pre-mRNA en el spliceosoma.

Otro hecho que sugirió la importancia de U6 snRNA en el splicing es la presencia de un intrón de tipo pre-mRNA en el gene que codifica para U6 snRNA del género *Squizosaccharomices* (Tani & Ohshima, 1989 y Reich & Wise, 1990) y *Rhodospordium dacryoidum*, así como cuatro intrones en el de *Rhodotorula hasegawae* (Tani & Ohshima, 1991). Estos intrones se encuentran localizados en las regiones altamente conservadas y sensibles a mutaciones (Fabrizio & Abelson, 1990). Existe la hipótesis de que estos

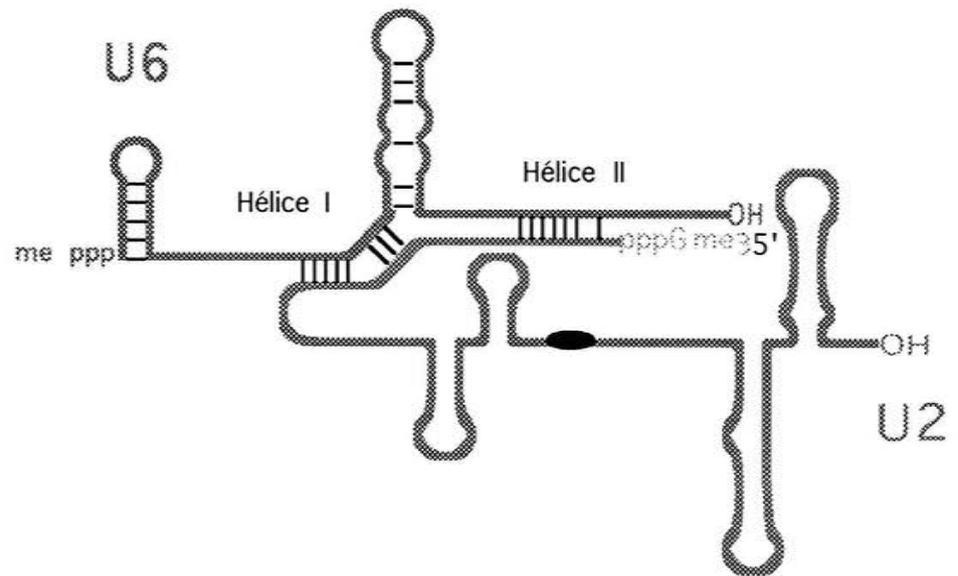
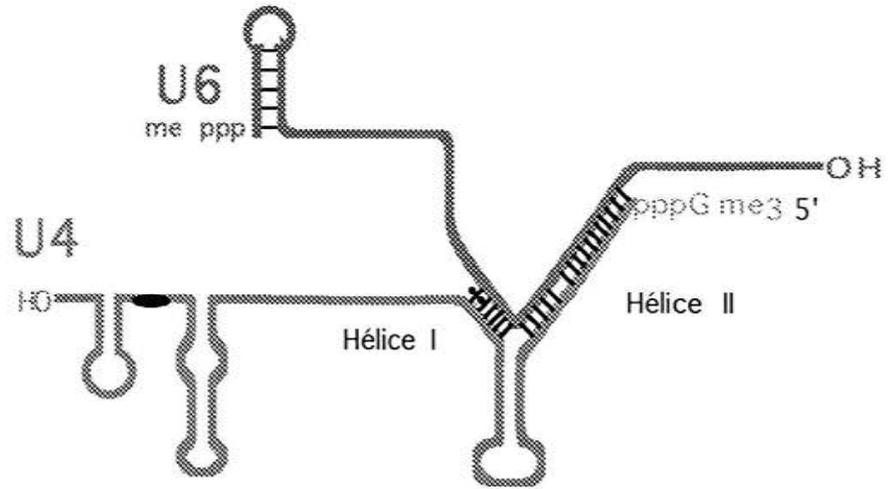
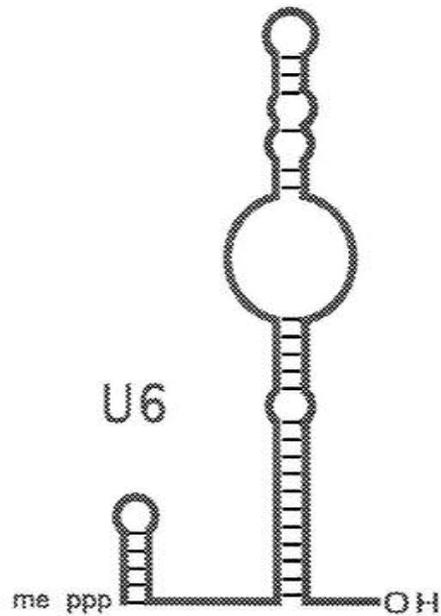


Figura 4. Modelos de estructuración e interacciones alternativas de U6 snRNA con U4 y U2 snRNA. El tallo grande de U6 es desnaturizado totalmente cuando U6 snRNA interacciona con U4 snRNA y sólo parcialmente cuando interacciona con U2 snRNA. Los detalles de estas interacciones son explicados en el texto.

intrones son resultado de una aberración en el procesamiento, ocurriendo finalmente una reacción inversa que llevó a la integración del intrón en U6. Esto podría implicar que U6 es importante para la actividad catalítica del complejo de procesamiento de pre-mRNA y que, probablemente, los sitios de inserción de estos intrones se encuentran muy cercanos al sitio catalítico del spliceosoma (Brow & Guthrie, 1989). Posteriormente, mediante un sistema de mutación en una región inmediatamente anterior al 5' de la secuencia de interacción con el intrón y reconstitución funcional en nemátodos, Yu y cols. (1993) descubrieron que U6 puede funcionar como substrato en reacciones de *cis*- y *trans*-splicing, lo que sugiere que U6 puede ser utilizado como aceptor y aún como exón 5' cuando estas mutaciones interfieren con la correcta localización del 5' del intrón dentro del spliceosoma. Además, este es el primer resultado de interacción covalente entre un U snRNA spliceosomal y un substrato de splicing y provee evidencia de un grado sorprendente de flexibilidad catalítica dentro del spliceosoma.

Así, tomando en cuenta la conservación de U6 snRNA a través de la escala filogenética y convencidos de su importancia funcional en el procesamiento de intrones tipo pre-mRNA, creemos que este gene es un excelente candidato para cuestionarnos si en *Entamoeba histolytica* existe un sistema molecular parecido al spliceosoma que en la actualidad está ampliamente distribuido entre metacariontes.

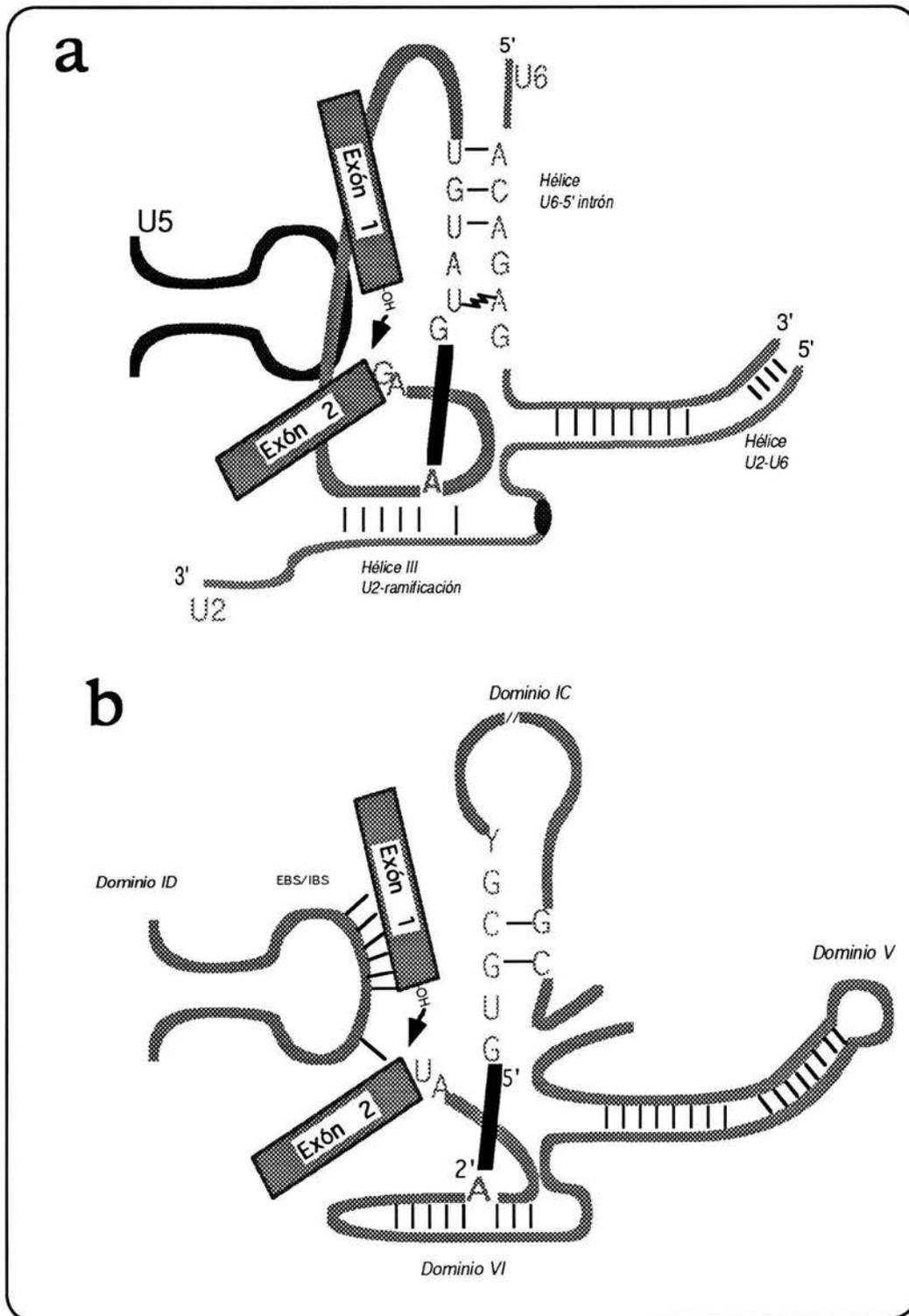


Figura 5. Similitud estructural entre el procesamiento de intrones (a) spliceosomales tipo pre-mRNA y (b) autocatalíticos grupo II. Nótese homología entre las hélices (a) y los dominios (b).

Objetivos

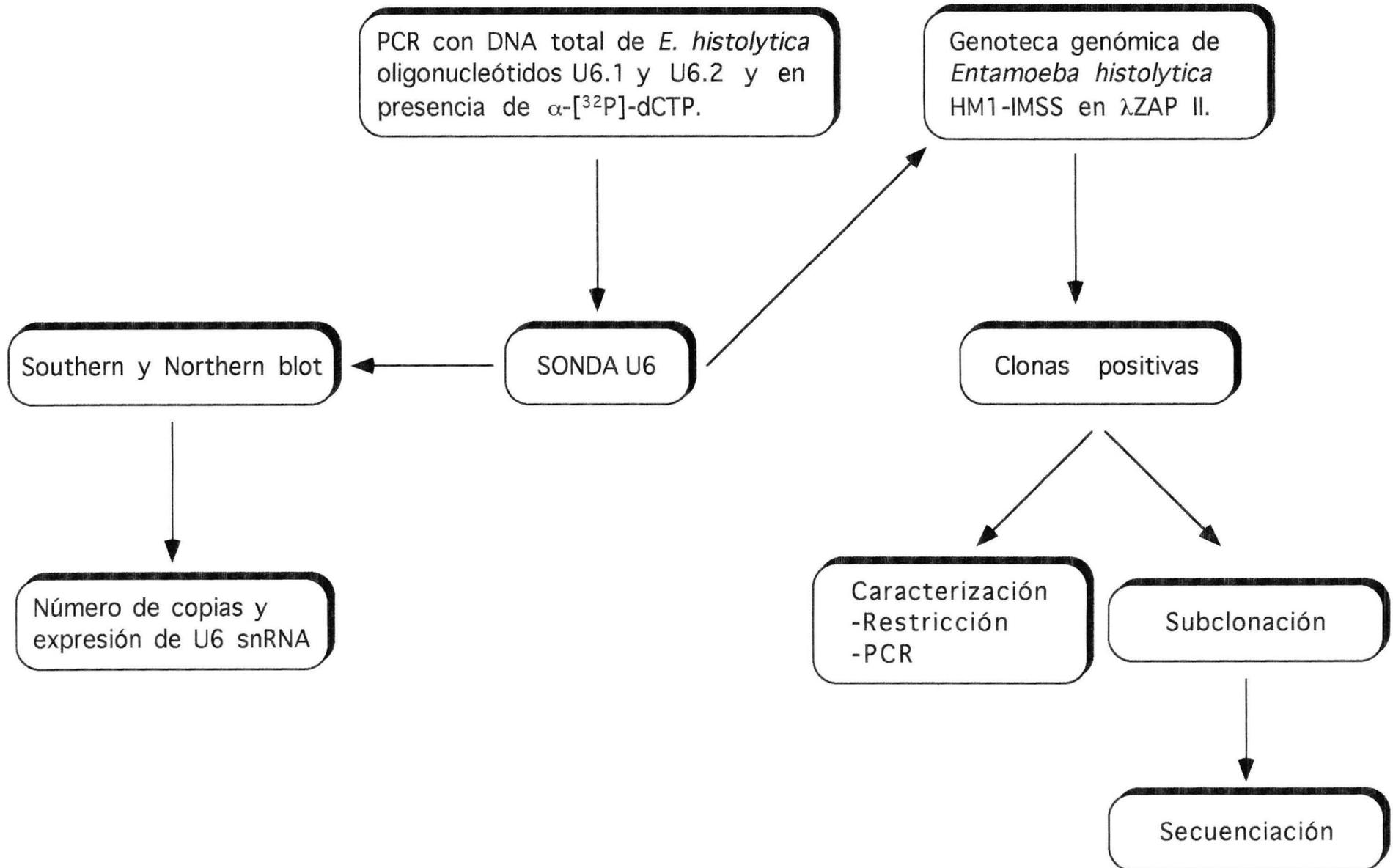
General:

Aislar y caracterizar el gene que codifica para el U6 snRNA de *Entamoeba histolytica*.

Particulares:

- a) Obtención de una sonda para realizar la búsqueda.
- b) Clonar el gene que codifica para el snRNA U6 de *Entamoeba histolytica* a partir de un banco genómico.
- c) Obtener la secuencia nucleotídica de este gene y realizar alineamientos y dendogramas con las secuencias de los genes U6 snRNA reportados para otros organismos.
- d) Determinar el número de copias del gene U6 snRNA en el genoma de *Entamoeba histolytica*.
- e) Determinar si el gene se expresa.
- f) Realizar un análisis de la estructura secundaria del gene U6 snRNA.

Estrategia Experimental



Material y Métodos.

Soluciones y amortiguadores.

El amortiguador TE usado para disolver DNA, consistió de Tris hidroximetilaminometano (Tris base) 10 mM pH 7.6, y 3 posibles concentraciones de trabajo para el quelante; ácido etilendiaminatetracetato disódico (EDTA), 1 mM, 0.1 mM o 0.01 mM.

El amortiguador TBE usado para las corridas de geles de acrilamida se preparó en soluciones 10X mezclando 108 g de Tris base, 55 g de ácido bórico y 40 ml de EDTA 0.5 M pH 8.0 en un litro de agua bidestilada. La concentración final de trabajo fue Tris-borato 0.09 M, EDTA 0.002 M.

El amortiguador TAE usado para las corridas de geles de agarosa para Southern blot se preparó en soluciones 50X mezclando: 242 g de Tris base, 57.1 ml de ácido acético glacial, 100 ml de EDTA 0.5 M pH 8.0 en un litro de agua bidestilada. La concentración final de trabajo fue Tris-acetato 0.04 M, EDTA 0.001 M.

La solución estándar de acrilamida al 40 % se preparó de la siguiente manera: a 100 ml de agua bidestilada se le agregaron 194.5 g de acrilamida y 5.2 g de bis-acrilamida, se agitó hasta disolver, y se aforó a 500 ml con agua bidestilada; la solución se filtró a través de una membrana Milipore de 0.45 μm , y se guardó en un frasco ámbar a 4.0 °C

La solución de carga para geles de agarosa, consistió de azul de

bromofenol 0.25 %, xilencianol 0.25 % y glicerol al 30 % en agua bidestilada.

La solución de carga para geles desnaturalizantes de poliacrilamida se preparó con formamida 90 %, EDTA 20 mM pH 8.2, azul de bromofenol 0.05 % y xilencianol 0.05 %, en agua bidestilada.

La tinción de geles de poliacrilamida con nitrato de plata se realizó de la siguiente manera: El gel fue lavado 20 minutos en solución de etanol al 50 % y ácido acético 7 %. Después se lavó dos veces (10 minutos cada una) en solución de etanol 10 % y ácido acético 1 %. Posteriormente se lavó durante 25 minutos en solución de nitrato de plata 12 mM y se enjuagó en agua 15 segundos. Se enjuagó 30 segundos con solución de formaldehído 0.2 % y KOH 0.75 %. El revelado se realizó durante 2 minutos en la misma solución (nueva).

El amortiguador de fosfatos (PBS) 0.5 M fue preparado disolviendo 34.5 g de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ y 67 g de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ en 900 ml de agua bidestilada, se ajustó el pH a 7 y se aforó a 1000 ml con agua bidestilada.

La solución 1000X de carbamicilina (un análogo más estable de la ampicilina) se preparó disolviendo un gramo en 5 ml de agua desionizada y tetradestilada (concentración inicial de 200 mg/ml), y se pasó por un filtro Millipore de 0.45 μm . La concentración para seleccionar cepas transformadas en cajas Petri con LB-agarosa fue de 100 $\mu\text{g/ml}$.

El amortiguador PEG 5X usado para la ligación intracatenaria durante la subclonación constó de Tris HCl 250 mM, pH 7.6, MgCl_2 50 mM, DTT 5

mM, ATP 5 mM y PEG 8000 25 % (w/v).

La solución amortiguadora SET 20X usada para los lavados posteriores a la hibridación se preparó mezclando 25 ml de NaCl 5 M, 7.5 ml de Tris-HCl 1 M, pH 7.8 y 1 ml de EDTA 0.5 M en un volumen final de 250 ml.

La solución amortiguadora SETS 2X usada para los lavados posteriores a la hibridación se preparó con SDS 0.2 % en SET 2X.

El amortiguador STE se preparó con NaCl 100 mM, Tris HCl 10 mM pH 8.0 y EDTA 1 mM pH 8.0.

La solución amortiguadora SM utilizada para diluir bacteriófagos fue preparada con Tris HCl 50 mM pH 7.5, NaCl 100 mM, MgSO₄ 8 mM y gelatina 0.01 %. Esterilizado al autoclave y alicuotado en volúmenes de 50 ml.

La solución de deoxinucleótidos (dNTPs) usada para las reacciones de amplificación de DNA consistió de 2.5 mM de cada dNTP en TE pH 7.5.

La solución de lavado para la determinación de cuentas incorporadas y totales en ácidos nucleicos fue preparada con H₃PO₄ 300 mM, Na₄P₂O₇ 200 mM y EDTA 1 mM.

La solución desnaturalizante para la transferencia de placas de bacteriófago λ consistió de NaCl 1.5 M y NaOH 0.5 M.

La solución neutralizante para la transferencia de placas de

bacteriófago λ consistió de NaCl 1.5 M y Tris HCl 0.5 M pH 8.0.

La solución de lavado para la transferencia de placas de bacteriófago λ consistió de Tris HCl 0.2 M pH 7.5 y SSC 2X.

El amortiguador SSC 20X fue preparado con NaCl 3 M y citrato de sodio dihidratado 0.3 M. Se ajustó el pH a 7.0 con HCl 1 M.

La solución Denhardt 100X utilizada para hibridación se preparó disolviendo 10 g de Ficoll 400, 10 g de Polivinilpirrolidona y 10 g de albúmina de suero bovino en un volumen final de 1000 ml. Fue filtrada y almacenada en alícuotas de 25 ml a -20°C .

La solución de prehibridación consistió de 30 ml de formamida, 2 ml de solución Denhart 50X, 25 ml de SSC 20X, 2.5 ml de Na_3PO_4 1 M pH 7.0 y 10 ml de SDS 10 %. El volumen final fue de 100 ml.

La solución de hibridación consistió de sonda a concentración final de 10^6 cpm/ml en solución de prehibridación.

Medios y Cepas.

Las cepas de *Entamoeba histolytica* HK9 y HM1-IMSS se caracterizan por presentar un zimodemo patógeno tipo II (Said-Fernández y col. 1988).

El cultivo para los trofozoítos de *Entamoeba histolytica* se llevó a cabo en el medio de cultivo BYI-S-33 bajo condiciones axénicas, similar a

las descritas por Diamond L. y col. (1968).

La cepa *Escherichia coli* XL1-Blue fue utilizada para la infección por bacteriófago λ ZAP II. El genotipo de esta cepa es *sup E44 hsdR17 recA1 endA1 gyrA46 thi relA1 lac* F' [*proAB⁺ lac^P lacZ Δ M15 Tn10(tet^r)*].

La cepa *Escherichia coli* DH5 α fue utilizada para la transformación con el plásmido pBluescript II SK durante la subclonación. El genotipo de esta cepa es *sup E44 Δ lacJ169(ϕ 80 lacZ Δ M15) hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi relA1*.

El cultivo de *E. coli* se realizó en el medio LB (Luria-Bertani). Preparado como se describe a continuación: a 950 ml de agua desionizada se agregaron 10 g de bacto-triptona, 5 g de extracto de levadura y 10 g de NaCl. Se agitó hasta que los solutos se disolvieron. Se ajustó el pH a 7.0 con NaOH y se llevó a un volumen final de 1000 ml con agua desionizada, después se alicuotó a volúmenes de 100 ml en matraces Erlenmeyer y se taparon con tapones de algodón y gasa. Se esterilizó en autoclave durante 20 minutos a 15 libras/pulgada². Para preparar medio LB sólido se agregaron previamente 15 g de bacto-agar.

El medio NZY para titular el bacteriófago λ fue preparado disolviendo 5 g de NaCl, 2 g de MgSO₄·7H₂O, 5 g de extracto de levadura y 10 g de peptona de caseína. Se ajustó el pH a 7.0 con NaOH y se llevó a un volumen final de 1000 ml con agua desionizada, se alicuotó a volúmenes de 100 ml en matraces Erlenmeyer y se taparon con tapones de algodón y gasa. Se esterilizó en autoclave durante 20 minutos a 15 libras/pulgada². Para

preparar medio NZY sólido se agregaron previamente 15 g de bacto-agar.

El medio YT 2X para la escisión del plásmido pBluescript II SK fue preparado disolviendo 16 g de peptona de caseína, 10 g de extracto de levadura y 5 g de NaCl. Se ajustó el pH a 7.0 con NaOH y se llevó a un volumen final de 1000 ml con agua desionizada, se alicuotó a volúmenes de 100 ml en matraces Erlenmeyer, y se taparon con tapones de algodón y gasa. Se esterilizó en autoclave durante 20 minutos a 15 libras/pulgada².

Cuando se usó antibiótico, se dejó que el medio se enfriara hasta una temperatura de aproximadamente 45 °C antes de agregarlo (debido a que el antibiótico es termolábil).

El almacenamiento de cultivos de bacterias importantes se hizo creciendo una colonia en LB líquido por 12 h y llevándola a una concentración final de 25 % de glicerol estéril. Alícuotas en tubos de 1.5 ml se guardaron a -70.0 °C

Técnicas de electroforesis en gel:

Se utilizaron dos tipos de geles para electroforesis de DNA.

1) **Geles de agarosa.** Fueron preparados siguiendo el método descrito por Sambrook J., *et. al.* (1989). Estos geles al 1 % o 1.5 % fueron utilizados para la resolución y cuantificación de moléculas de DNA mayores de 100 pares de bases tales como: DNA cromosómico purificado de *E. histolytica*, plásmidos purificados de *E. coli* y productos de amplificación obtenidos

por PCR. A cada muestra se agregó 1 μ l de solución de carga por cada 10 μ l de volumen final. De manera regular se incluyeron marcadores de peso molecular tales como 300 ng/carril de escalera de 100 pares de bases (Ladder 100, Gibco BRL) y/o 300 ng/carril de DNA del bacteriófago λ (Boehringer) digerido con la endonucleasa de restricción Hind III (Boehringer). Los geles se corrieron a 100 volts (voltaje constante) en una cámara de electroforesis horizontal (BioRad, INC) sumergidos en amortiguador TBE 1X con bromuro de etidio a concentración final de 0.5 μ g/ml. Al término de la electroforesis los geles fueron observados sobre un transiluminador de luz ultravioleta de onda corta y fotografiados.

2) Geles de Poliacrilamida. Dependiendo del tipo de DNA, se utilizaron dos tipos de geles de poliacrilamida, preparados como se describe en Sambrook J., *et. al.* (1989).

a) Nativos. Se utilizaron al 10 % para la resolución del fragmento de amplificación de 50 pares de bases obtenido mediante PCR con los oligonucleótidos U6.1 y U6.2, y para los productos de digestión de las clonas U6⁺ con las endonucleasas de restricción Mnl I y Hind III. A la muestra se le adicionó 1 μ l de solución de carga y se corrió a 350 volts (voltaje constante) en una cámara vertical (Mighty small) con amortiguador TBE 1X. Al término de la electroforesis el gel fue removido de los vidrios y teñido con nitrato de plata o procesado para radioautografía, dependiendo de si el DNA fue marcado previamente con α -[³²P]-dCTP durante la polimerización.

b) Desnaturalizantes Estos geles se utilizaron al 20 % Urea 8 M

para la resolución de oligonucleótidos y RNA. Para geles de secuencia se utilizaron en un rango del 4 al 6 %. En ambos casos, las muestras fueron previamente desnaturalizadas a 95 °C durante 5 minutos e inmediatamente pasadas a un baño de agua-hielo durante 5 minutos más.

Purificación de DNA de *Entamoeba histolytica*

Un inóculo de aproximadamente 10^6 células de *Entamoeba histolytica* HM1-IMSS fue crecido hasta fase logarítmica en 200 ml de medio BYI-S-33. El cultivo se cosechó por centrifugación a 500 x g durante 10 minutos a 4 °C y las células se lavaron en amortiguador de fosfatos 0.5 M (PBS). Al paquete celular se adicionaron 2.2 ml de sacarosa (100 mg/ml en EDTA 0.5 M), 400 µl de sarcosil al 20 % y 500 µl de proteinasa K (2 mg/ml en solución sacarosa-EDTA; preparada justo antes de usarla) y se incubó toda la noche a 55 °C. Para realizar el gradiente de cesio, se ajustó el volumen a 7.7 ml con TE y se adicionaron 8 gramos de CsCl. Después de disolver suavemente por inversión se agregaron 300 µl de bromuro de etidio a 5 mg/ml y usando micropipeta de 1 ml con punta cortada, se pasó la suspensión de DNA a dos tubos para rotor SW50.1 y se equilibraron con tolerancia de 0.02 g. El gradiente se formó por centrifugación a 40,000 rpm durante 22 horas, a 22 °C y desaceleración 0.

El tubo fue expuesto a luz ultravioleta y se identificó y marcó la banda de DNA. Esta banda fue colectada con una jeringa estéril de aguja gruesa. El bromuro de etidio se removió con volúmenes iguales de isopropanol y se separaron las fases por centrifugación a 1000 rpm en un rotor JS-13 durante 15 minutos. Se agregaron 3 volúmenes de etanol al 70 % (a

temperatura ambiente) y se centrifugó por 30 minutos a 10000 rpm en rotor JS-13 a temperatura ambiente. El precipitado se recuperó y se disolvió en 2 ml de TE a 4 °C durante toda la noche. Se analizó 1 µl de DNA en gel de agarosa 1 %.

Purificación de RNA de *Entamoeba histolytica*

Un inóculo de aproximadamente 10^6 células de *Entamoeba histolytica* HM1-IMSS fueron crecidas hasta fase logarítmica en 200 ml de medio BYI-S-33. El cultivo se cosechó por centrifugación a 500 x g durante 10 minutos a 4 °C y las células se lavaron 2 veces por centrifugación con medio sin suero. Las células se lisaron con 1 ml de solución de isotiocianato de guanidina 5 M (en agua DEPC) homogenizando vigorosamente con vórtex durante 5 segundos. El lisado se centrifugó a 16000 x g durante 5 minutos y a temperatura ambiente. El sobrenadante se recuperó y precipitó dos veces a -20 °C por 45 minutos con 0.3 volúmenes de etanol. La segunda precipitación se realizó en 0.3 volúmenes de etanol conteniendo 1 ml de isotiocianato de guanidina 5 M. El precipitado se resuspendió en TE a 55 °C por 30 minutos agitando ocasionalmente (vórtex). Posteriormente se realizaron dos extracciones con un volumen de fenol/cloroformo [1:1] y centrifugando 5 minutos a 16000 x g. La fase superior se precipitó con 0.1 volúmenes de acetato de sodio 3 M pH 4.7 y 2.5 volúmenes de etanol absoluto. El RNA resultante se resuspendió en TE/DEPC y se almacenó a -20 °C. La cuantificación de RNA se hizo con una dilución 1:100 a $D.O_{260}$ y por electroforesis en gel de agarosa 1.5 % a 100 V. Por último, la solución de RNA se pasó por una columna de oligo (dT)₂₀-celulosa para separar las fracciones de RNA poli A⁺ y RNA poli A⁻.

Amplificación del fragmento de 50 pb.

Para amplificar un fragmento de 50 pares de bases, correspondiente a la región media del gene U6 snRNA, se realizó una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a partir de DNA total de *Entamoeba histolytica* HK9. El volumen de reacción fue de 100 μ l. La reacción consistió de 10 ng/ μ l de DNA templado, 20 μ M de cada oligonucleótido (U6.1: 5'-CAA ATT GAA ACG ATA CAG AG-3' Tm = 54.8 °C y U6.2: 5'-TGG CCC CTG CAC AAG GAT GA-3' Tm = 73.0 °C, Tani y Oshima, 1989), 25 μ M de cada deoxinucleótido (Boehringer), 10 μ l de amortiguador para Taq DNA polimerasa 10X (Boehringer) y 0.025 U/ μ l de Taq DNA polimerasa (Boehringer). La reacción se hizo en un aparato de PCR Perkin Elmer Cetus 9600 durante 30 ciclos bajo las condiciones siguientes: Desnaturalización a 92 °C durante 30 segundos, apareamiento a 42 °C durante 30 segundos y polimerización a 72 °C durante 45 segundos. Al finalizar los ciclos se permitió la extensión de los productos que pudieran quedar incompletos a 72 °C durante 10 minutos. En este experimento se incluyeron dos reacciones bajo las mismas condiciones. Una de ellas se utilizó como control positivo y consistió de la amplificación del fragmento de 50 pb a partir de 10 ng/ μ l de DNA total de humano. La otra reacción se utilizó como control negativo (sin DNA). Por último, 1 μ l de los productos de amplificación de cada una de las reacciones fueron analizados por migración en gel de poliacrilamida al 10 % a 350 V (voltaje constante) y el gel fue teñido con la técnica de nitrato de plata.

Este fragmento se utilizó como sonda en la clonación del gene U6 snRNA y en los experimentos de Northern y Southern blot. Para ello, se modificó el protocolo en tres aspectos: 1) el DNA templado fue 1 μ l del

producto de amplificación previo a partir de DNA total de *E. histolytica*, 2) la mezcla de deoxinucleótidos fue utilizada a concentración final de 12 μM y careció de dCTP y 3) se añadió 0.33 μM (concentración final) de α - [^3P]-dCTP.

Utilizando una dilución 1:25 de esta sonda se determinó la actividad específica como sigue: Por duplicado se agregaron 20 μl de la dilución a un filtro 3MM circular de 24 mm y se dejaron secar al aire. Uno de estos filtros se colocó en viales plásticos de 5 ml y se agregaron 5 ml de agua tridestilada. El otro se lavó tres veces con 50 ml de (H_3PO_4 300 mM, $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ 200 mM y EDTA 1 mM) y una vez con 10 ml de etanol absoluto (ambos a -20°C). Después de que se secaron, los filtros se colocaron en viales de plástico de 5 ml y se agregaron 5 ml de agua tridestilada. En un contador de centelleo Beckmann se determinaron las cuentas por minuto (cpm) en cada filtro, mediante el método de Cerenkov. El primer filtro proporcionó las cuentas totales y el segundo las cuentas incorporadas. Los resultados de actividad específica se reportaron como cpm/ μg de sonda.

Clonación del gene U6 snRNA.

Genoteca: La búsqueda del gene U6 snRNA se realizó en una genoteca genómica construída por el grupo del Dr. Ruy Pérez-Montfort (IFC, UNAM) con fragmentos Eco RI obtenidos por digestión parcial del DNA de *Entamoeba histolytica* HM1-IMSS y clonados en el bacteriófago $\lambda\text{ZAP II}$. El título de esta genoteca es de aproximadamente 2.6×10^{11} recombinantes/ml y el tamaño promedio del inserto es de 3000 pares de bases.

Cultivo: Una colonia de *E. coli* XL1-blue se creció hasta la fase estacionaria en 5 ml de medio LB suplementado con maltosa 0.02 % y MgSO_4 1 mM. Se lavó con MgSO_4 10 mM por centrifugación a 1000 x g durante 7 minutos y se ajustó a $\text{D.O.}_{600} = 0.6$.

Obtención de placas de lisis 300 μl de *E. coli* XL1-blue ajustado a $\text{D.O.}_{600}=0.6$ fueron infectados con aproximadamente 26000 bacteriófagos de la genoteca. Después de incubar durante 15 minutos a 37 °C y 250 rpm se adicionaron 7 ml de medio NZY-agarosa 0.7 % y se vaciaron a una placa de NZY. Estas últimas se incubaron a 37 °C hasta que las placas de lisis resultaron visibles (6-8 horas aproximadamente).

Transferencia: Las placas de lisis se refrigeraron al menos dos horas y posteriormente se transfirieron por duplicado a filtros de nitrocelulosa. El primer filtro se mantuvo en la placa durante dos minutos y se marcó con tinta china de tal forma que la marca quedara también en el agar de la placa. El segundo filtro se mantuvo cuatro minutos sobre la placa y fue marcado exactamente como el primero. Ambos filtros se sumergieron en solución desnaturalizante durante dos minutos, en solución neutralizante durante 5 minutos y en SSC 2X durante 30 segundos, en el orden descrito. Posteriormente se secaron al aire y el DNA fue fijado a la membrana en un horno de vacío a 80 °C durante dos horas.

Hibridación: Previo a la hibridación los filtros se humedecieron en solución SSC 2X y se incubaron a 37 °C en solución de prehibridación con formamida al 30 % durante dos horas. Antes de adicionar, la sonda se desnaturalizó a 95 °C durante 5 minutos y se colocó en baño de agua-hielo

otros 5 minutos. El volumen de hibridación fue de 50 ml. La hibridación se realizó a 37 °C durante doce horas. Tanto en la prehibridación como en la hibridación la incubación se realizó en agitación constante a 100 rpm. Posteriormente, los filtros se lavaron en solución SET 2X a temperatura ambiente durante 10 minutos, dos veces en solución SETS 2X a 30 °C y 100 rpm durante 20 minutos y por último 10 minutos en SETS 1X a 30 °C y 100 rpm, después de lo cual se secaron al aire.

Recuperación: Estos filtros fueron utilizados para realizar una autorradiografía con pantalla de intensificación durante tres días a -70 °C. Después de revelar se marcaron las posiciones de los filtros y se compararon los duplicados. Solamente aquellas placas que resultaron positivas por duplicado fueron recuperadas. Para ello se realizó un corte del pedazo de agar en donde se encontraba la placa de lisis positiva y se sumergió en un tubo eppendorf de 1.5 ml conteniendo 1 ml de solución amortiguadora SM y 20 µl de cloroformo. El tubo se agitó suavemente por inversión para liberar los bacteriófagos del agar. Estos fueron sometidos a una segunda y tercera purificación repitiendo todo el protocolo. Después de la tercera purificación se recuperaron nueve clonas positivas (U6⁺).

Escisión: λZAP II contiene a su vez al plásmido pBluescript II SK (-). Es precisamente en el sitio Eco RI de la región de policlonación de este plásmido donde se encuentra el fragmento Eco RI del DNA de *Entamoeba histolytica* HM1-IMSS.

Un cultivo de *E. coli* crecida en LB suplementado con maltosa y magnesio se lavó y ajustó a D.O.₆₀₀ = 1.0 como se describió anteriormente.

200 μ l de este cultivo se infectaron con aproximadamente 2×10^4 bacteriófagos λ ZAP II positivos y 1×10^3 bacteriófagos de ayuda (VCSM13, derivado del bacteriófago filamentoso f1) e incubados durante 15 minutos a 37 °C. Después se adicionaron 5 ml de medio YT 2X y se incubó la mezcla a 37 °C por tres horas con agitación a 150 rpm. Posteriormente se sometió el cultivo a 70 °C durante 20 minutos y se centrifugó a 4000 X g durante 5 minutos para recuperar el sobrenadante que contiene el fagémido pBluescript II SK empacado como bacteriófago filamentoso. Por último 10 μ l de este sobrenadante y 20 μ l de una dilución 10^{-2} fueron incubados a 37 °C con 200 μ l de XL1-blue (D.O.₆₀₀ = 1.0) durante 15 minutos y plaqueados en medio LB/carbamicilina (100 μ g/ml). Las colonias resultantes contienen el plásmido pBluescript II SK. Las colonias fueron caracterizadas por PCR y los plásmidos por digestión con endonucleasas de restricción.

Purificación de plásmido.

Para purificar los plásmidos de las nueve clonas seleccionadas con la sonda de 50 pares de bases, se crecieron bacterias de *E. coli* XL1-blue transformadas con el plásmido pBluescript II SK (-) en 50 ml de LB/carbamicilina hasta saturación. Los cultivos se lavaron en STE y se centrifugaron a 1000 x g durante 7 minutos. La pastilla fue procesada con el método de *Plasmid* SELECT-250 SPIN COLUMN (5 Prime -> 3 Prime, Inc.) siguiendo las instrucciones del fabricante. El plásmido resultante se linearizó con diferentes enzimas de restricción (Boheringer) y se cuantificó en gel de agarosa 1 %.

Digestión de DNA.

Mediante digestión con endonucleasas de restricción fue posible agrupar las clonas en dos grupos de acuerdo a la orientación del inserto. La restricción se realizó de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Las enzimas con que fueron cortados los plásmidos fueron: BamHI, DraI, EcoRI, EcoRV, MnlI, NotI, PstI, SacI, SmaI y XbaI (todas de Boehringer).

Subclonación.

Mediante el análisis de fragmentos obtenidos con enzimas de restricción se observó la posibilidad de remover un fragmento de aproximadamente 2000 pares de bases, obtenido con Bam HI, sin afectar la región codificante del gene U6 snRNA de *Entamoeba histolytica*. Para ello se diluyeron (1:80) los productos de restricción y se ligaron con T4 DNA ligasa durante 12 horas a 15 °C en amortiguador PEG 1X (Ken'ichiro *et. al.*, 1986). Las moléculas resultantes se precipitaron a 4 °C con etanol absoluto utilizando 1 µg de tRNA como acarreador, después de lo cual se lavaron con etanol al 70 % y se resuspendieron en 10 µl de amortiguador TE.

La transformación se realizó en células competentes de *E. coli* DH5 α (preparadas por el método de permeabilización con cloruro de calcio). Para ello se incubaron los 10 µl del producto de ligación con 200 µl de las células competentes durante 2 horas en baño agua-hielo. Inmediatamente después las células fueron incubadas a 42 °C durante 90 segundos y finalmente se incubaron una hora en LB a 37 °C. 100 µl fueron plateados en placas de LB/carbamicilina (100 µg/ml) y se incubaron a 37 °C durante 12 horas. La selección de subclonas se realizó mediante la amplificación de un fragmento

de amplificación con el par de oligonucleótidos U6.2-T3, como se describe en el siguiente punto.

Sondeo directo por PCR.

Se procedió modificando el método descrito en McPherson y cols. (1992). Las colonias se picaron y cada una se resuspendió en 100 μ l de agua tetradestilada estéril y se calentó a 95 °C por 15 minutos, al terminar el tubo se agitó y centrifugó para separar los residuos. Se añadieron 10 μ l de cada sobrenadante a tubos conteniendo 90 μ l de una solución previamente preparada, de manera que las concentraciones finales de los solutos fueron: amortiguador de reacción para PCR 1X, dNTP's 200 μ M, oligonucleótidos 0.25 μ M, Taq DNA polimerasa 0.025 U/ μ l (Boehringer). Se realizaron 30 ciclos en donde la desnaturalización fue a 94 °C por 30 segundos, el apareamiento fue a 42 °C por 30 segundos y la polimerización fue a 72 °C por 45 segundos. Los productos de reacción se analizaron en geles de poliacrilamida al 10 %. En todos los casos se incluyó como control negativo una colonia de *E. coli* XL1-blue transformada con plásmido pBluescript II SK (sin inserto). Este protocolo se utilizó para confirmar clonas U6⁺ y seleccionar subclonas.

Secuenciación.

Los experimentos de secuenciación fueron realizados mediante el método de terminación de la polimerización enzimática utilizando el *fmol Sequencing Kit* de Promega Corporation.

En cuatro tubos Perkin Elmer de 150 μ l se adicionaron por separado 2 μ l de la mezcla de deoxinucleótidos conteniendo el dideoxinucleótido apropiado.

En un tubo eppendorff de 0.5 ml se adicionó 1 μ l conteniendo 100 ng del plásmido purificado correspondiente, 5 μ l de la solución amortiguadora para Taq DNA polimerasa 5X, 2 μ l conteniendo 4 fmoles del oligonucleótido correspondiente marcado en su extremo 5' con fluoresceína y se ajustó el volumen a 16 μ l con agua tridestilada estéril. Por último se agregó 1 μ l de Taq DNA polimerasa grado de secuenciación (5 UI) y la mezcla se agitó con la punta de la pipeta.

Se adicionaron 4 μ l de esta mezcla a cada uno de los tubos conteniendo la mezcla de nucleótidos. La reacción se realizó durante 25 ciclos en un aparato Perkin Elmer Cetus 9600 bajo las siguientes condiciones: desnaturalización a 95 °C durante 30 segundos, apareamiento a 42 °C durante 30 segundos y polimerización a 72 °C durante 45 segundos. Al finalizar los ciclos se permitió la polimerización a 72 °C durante 15 minutos.

Al terminar la reacción, las muestras se transfirieron a tubos eppendorff de 0.5 ml y se les adicionaron 6 μ l de solución de terminación. Los tubos se agitaron suavemente y se centrifugaron en una microfuga Eppendorff para detener la reacción. Posteriormente fueron incubados en baño maría a 95 °C durante 5 minutos e inmediatamente transferidos a baño de agua-hielo.

Las muestras fueron cargadas en un gel de poliacrilamida de 0.2 μ m al 4 o 6 % urea 8 M y sometidas a electroforesis en la estación de secuenciación Millipore Base Station bajo condiciones estándar. La primera fotografía fue tomada después de 60 minutos de migración y posteriormente cada 10 minutos hasta completar 15 fotografías.

Cada fotografía fue analizada manualmente y los resultados fueron integrados con la utilidad Contig del programa GeneWorks. Además, la estación Millipore analizó automáticamente los resultados.

Los experimentos de secuenciación se realizaron con los siguientes oligonucleótidos fluoresceinados:

U6.1	5'-CAA ATT GAA ACG ATA CAG AG-3'
U6.2	5'-TGG CCC CTG CAC AAG GAT GA-3'
T3	5'-GCC TTA ACC CTC ACT AAA GG-3'
T7	5'-GTA ATA CGA CTC ACT ATA GG-3'
SK	5'-GCT CTA GAA CTA GTG GAT C-3'
M13 Reverso	5'-AGC GGA TAA CAA TTT CAC ACA GGA-3'

A partir de los resultados de los oligonucleótidos U6.2 y T7 se obtuvieron las secuencias complementarias con la utilidad "Make Complement" del programa GeneWorks. Estos resultados y los obtenidos con los restantes oligonucleótidos fueron analizados con las utilidades Contig y Align de GeneWorks.

Southern Blot.

10 μ g de DNA total de *Entamoeba histolytica* fueron digeridos con la endonucleasa de restricción Eco RI. Los productos de digestión se sometieron a electroforesis, junto con 300 ng del bacteriófago λ digerido con Hind III como marcadores de tamaño, en un gel de agarosa al 1 %. El gel se corrió en una cámara horizontal con solución amortiguadora TAE 1X y bromuro de etidio 0.5 μ g/ml. Al término de la electroforesis, el gel se expuso a luz UV y la posición de los marcadores de tamaño fue registrada en el mismo gel con tinta china. El DNA fue despurinado en presencia de 250 ml de HCl 0.25 M durante 20 minutos, seguido de una desnaturalización con 250 ml de NaOH 0.4 M durante 30 minutos en agitación.

Se recortaron cuatro pedazos de papel filtro 3MM al mismo tamaño del gel. Dos de ellos se colocaron sobre la cámara de electroforesis conteniendo 300 ml de NaOH 0.4 M de tal manera que sus extremos estuvieran en contacto con la solución. El gel, previamente tratado, fue colocado sobre el papel 3MM. Para impedir el flujo de líquido por las orillas se rodeó el gel con parafilm. Sobre el gel se colocó una membrana de nylon (Hybond N+, Amersham). Posteriormente se colocaron las otras dos piezas de papel filtro 3MM sobre la membrana de Nylon. Se tuvo cuidado que en ningún caso hubiera burbujas. Sobre estos filtros se colocó un paquete de toallas de papel recortadas un poco más pequeñas que el papel 3MM, una placa de vidrio y un peso de 500 g.

La transferencia de DNA se realizó durante 12 hrs. El paquete de toallas de papel se reemplazó cuando se encontró húmedo. Al término de la

transferencia se separó el gel del filtro, se hidrató con agua, fue teñido con bromuro de etidio y se observó a la luz UV para comprobar la transferencia. La membrana de nylon se sumergió en NaOH 0.4 M durante 10 minutos en agitación constante a temperatura ambiente. Posteriormente, se colocó en 200 ml de solución de Tris HCl 0.2 M pH 7.5, SSC 0.1X y SDS 0.5 % durante 10 minutos y agitación constante. Enseguida se secó sobre papel filtro 3MM a temperatura ambiente. El DNA se fijó en un horno de vacío a 80 °C por 2 horas. La prehibridación, hibridación y lavados fueron realizadas como se describe en la sección de la clonación del gene U6 snRNA. Posteriormente el filtro fue expuesto en una pantalla de PhosphorImager (Molecular Dynamics) durante 12 horas y la imagen se comparó con el gel en que se habían registrado previamente los marcadores de tamaño.

Northern Blot.

1, 10 y 30 µg de RNA poli A⁻ y 700 ng de RNA poli A⁺ se migraron en un gel de poliacrilamida 20 % y urea 8 M. Como marcadores de migración se incluyeron 3000 cpm de un transcrito de 84 nucleótidos previamente marcado con α-[³²P]-CTP. Para asegurar una buena transferencia se incluyeron 3 µg de tRNA en los carriles que se cargaron con el transcrito de 84 nucleótidos, el RNA poli A⁺ y 1 µg de RNA poli A⁻. A cada muestra se le adicionaron 10 µl de solución de carga con formamida al 90 %. El volumen final de carga fue de 20 µl, las muestras se desnaturalizaron a 95 °C durante 5 minutos y la electroforesis se realizó a 350 V (voltaje constante) hasta que el azul de bromofenol se encontrara a 2 cm arriba del límite inferior del gel. Posteriormente, el RNA se transfirió a una membrana de nylon (hybond N⁺, Amersham) utilizando una cámara semiseca de electrotransferencia

(Hoefer), a 0.8 V/cm^2 (corriente constante) durante 20 minutos. Después el RNA se fijó a la membrana mediante 2 pulsos de luz UV de 12 segundos cada uno en un aparato Stratalinker (Stratagene) y posteriormente la membrana se horneó a $80 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 60 minutos. Simultáneamente, para comprobar la eficiencia de transferencia, el gel fue recuperado y teñido con nitrato de plata. Posteriormente fue expuesto a una pantalla de PhosphorImager durante 12 horas.

La prehibridación, hibridación y lavados fueron realizadas como se describe en la sección de la clonación del gene U6 snRNA. Posteriormente el filtro fue expuesto en una pantalla de PhosphorImager durante 12 horas.

Análisis computacional de las secuencias U6 snRNA.

Alineamientos: A partir de las bases de datos del Gene Bank y de la recopilación hecha por Shumyatsky (1992), se obtuvieron las secuencias U6 snRNA de los siguientes organismos:

Protozoarios: *T. thermophila* y *T. brucei*.

Levaduras: *R. dracoydium*, *R. hasegawae*, *S. cerevisiae* y *S. pombe*.

Plantas: *V. faba*, *T. aestivum*, *Z. mays*, *S. tuberosum*, *L. esculentum* y *A. thaliana*.

Animales: *T. tridentans*, *A. lumbricoides*, *C. elegans*, *R. noruegus*, *M. musculus*, *X. laevis*, *H. sapiens* y *D. melanogaster*.

Para la construcción de alineamientos de similitud, las secuencias nucleotídicas de estos organismos fueron analizadas con los programas

Genalign y GeneWorks. El orden de las secuencias en los archivos de entrada fue completamente aleatorio en ambos casos y los archivos de salida se muestran en las figuras 14, 15 y 17. El alineamiento, construido con el algoritmo de Needleman-Wunsch del programa Genalign, fue analizado manualmente y coloreado con el programa Canvas. Los dendogramas presentados en las figuras 16 y 17 fueron construidos automáticamente a partir de los alineamientos del programa GeneWorks.

Modelos de estructura secundaria: Las secuencias U6 snRNA de *Entamoeba histolytica*, *Saccharomices cerevisiae* y *Rhodospiridium dracoydium* fueron analizadas con el programa Mulfold (Zucker, 1989) y los resultados visualizados con el programa RNA Loop Viewer (Gilbert, 1990). A partir de los alineamientos construidos anteriormente, se extrapolaron los datos de las bases que en *Saccharomices cerevisiae* interaccionan con el extremo 5' del intrón y con U2 snRNA. En un posterior análisis con el programa Mulfold se impidió la interacción de estos residuos nucleotídicos con el propósito de simular la interacción RNA-RNA.

Resultados

Construcción de una sonda específica para U6.

Hasta la fecha no se ha reportado ningún snRNA que pudiera estar involucrado en el procesamiento de intrones tipo pre-mRNA en *Entamoeba histolytica*. La base experimental de este trabajo radica en la amplificación de un fragmento de la región media del gene U6 snRNA de este organismo (Figura 6) con los oligonucleótidos U6.1 y U6.2 (Tani y Oshima, 1989). Se puede considerar que estos oligonucleótidos son universales debido a la excelente conservación de la región media del gene U6 snRNA (ver adelante) y la amplificación de fragmentos específicos en 32 de 35 organismos (incluyendo *H. sapiens*, Figura 6a y Tani & Oshima, 1991), todos ellos eucariontes con mitocondria. En los casos de *S. pombe*, *R. hasegawae* y *R. dracoydium*, los fragmentos de amplificación no son de 50 pb debido a la presencia de intrones en sus genes U6 snRNA (Tani & Oshima, 1991). El fragmento de 50 pb amplificado a partir de DNA de *Entamoeba histolytica* fue utilizado como sonda para la clonación y caracterización del gene U6 snRNA. En la Figura 6b se muestra la secuencia nucleotídica del fragmento.

Aislamiento y caracterización de clonas positivas para U6⁺

Después de 3 tamizados con la sonda de 50 pb se aislaron 9 clonas con insertos de aproximadamente 2.5 Kb, a partir de una genoteca genómica de *Entamoeba histolytica* HM1-IMSS donada por el Dr. Ruy Pérez-Montfort. Para corroborar que se aislaron clonas positivas (U6⁺), se realizó un análisis de PCR con los oligonucleótidos U6.1 y U6.2, con los cuales se obtuvo el

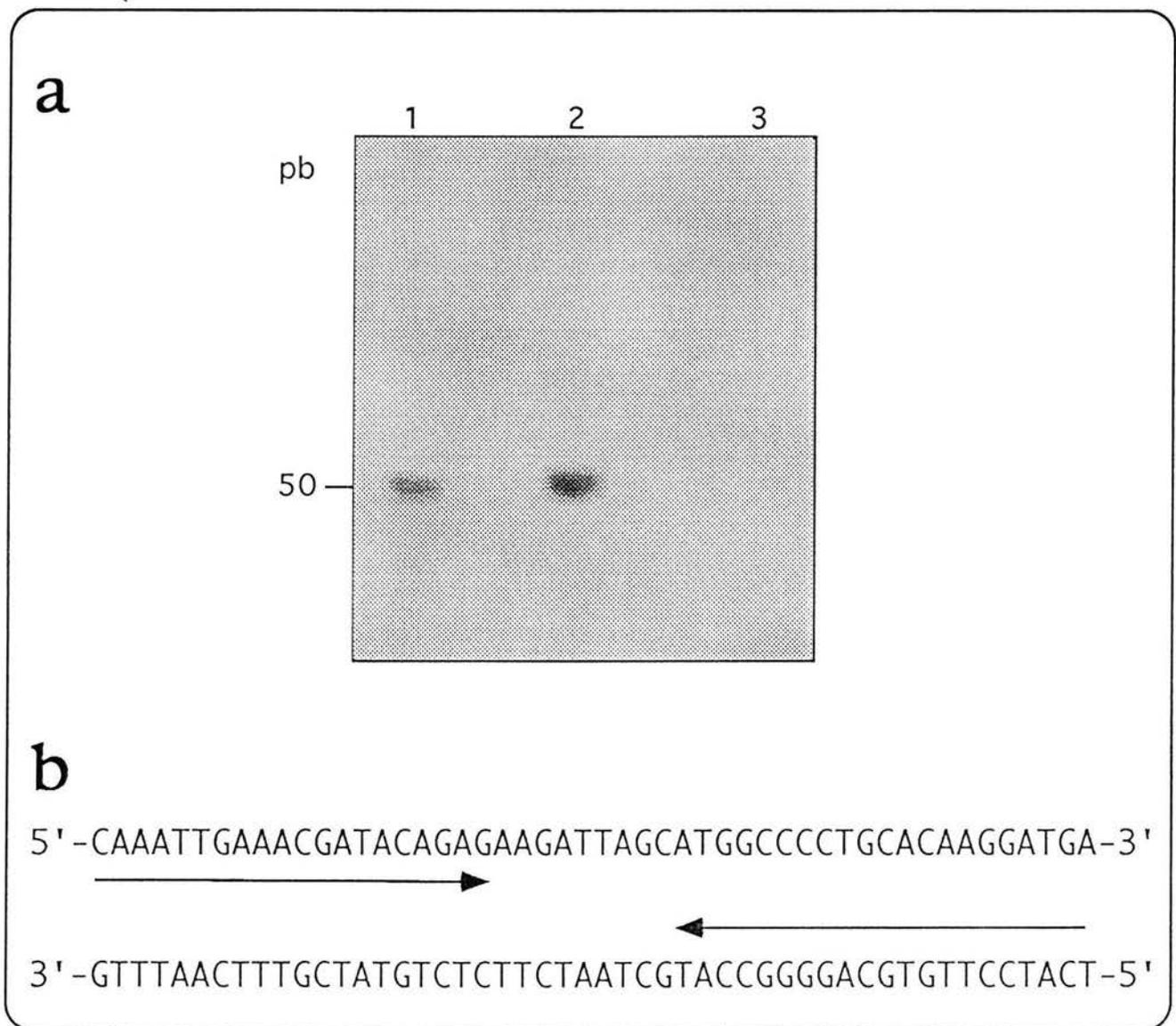


Figura 6. Fragmento de 50 pb del gen U6 snRNA amplificado por PCR. (a) Gel nativo de poliacrilamida al 10% teñido con la técnica de nitrato de plata. Carriles: 1) DNA total de *H. sapiens* (control positivo), 2) DNA total de *E. histolytica* HM1-IMSS y 3) control negativo de amplificación. (b) Secuencia del fragmento amplificado. Las flechas señalan la secuencia de los primers y la dirección de la extensión.

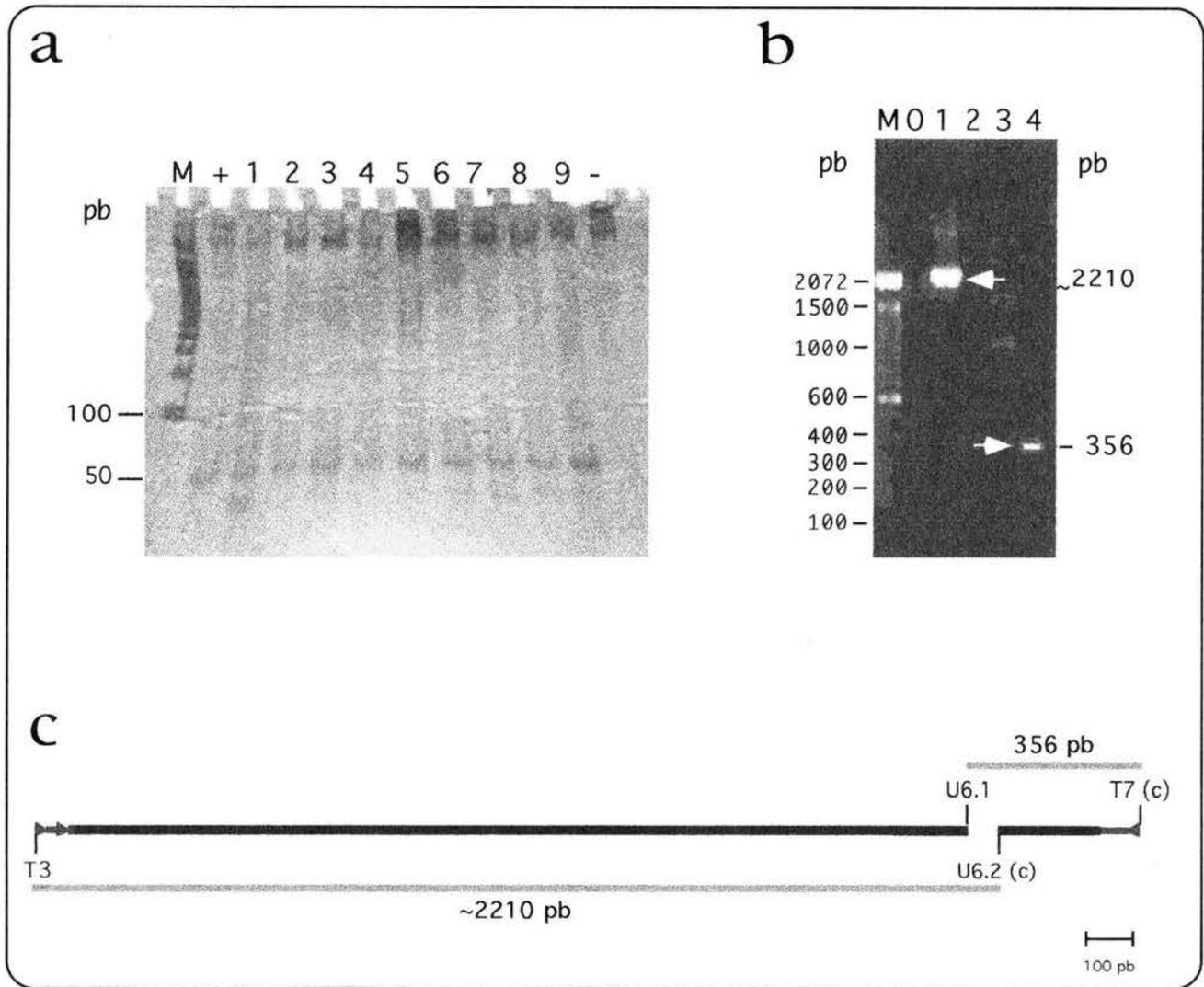


Figura 7. Caracterización de las clonas por amplificación en cadena de la polimerasa (PCR). (a) Amplificación del fragmento de 50 pb con los oligonucleótidos U6.1 y U6.2 (azul claro en c) a partir de extractos celulares de *E. coli* XL1-Blue transformada con cada una de las 9 clonas U6⁺ (gel de poliacrilamida 10%, teñido con nitrato de plata). +) Control positivo (similar al de la figura 6), -) control negativo correspondiente a la reacción en presencia de extracto de *E. coli* XL1-Blue transformada con el plásmido pBluescript II SK (sin inserto). (b) Amplificación con cuatro pares de oligonucleótidos para definir tamaño y orientación del inserto de *E. histolytica* así como la posición del gen U6 snRNA de las clonas 1 y 2 (gel de agarosa 1%, teñido con bromuro de etidio). Carriles: M) Marcadores de tamaño (escalera de 100 pb) 0) Control de fondo (Extracto de la clona 1 sin amplificar), 1) amplificación con oligonucleótidos T3 y U6.2, 2) amplificación con oligonucleótidos T3 y U6.1 3) amplificación con oligonucleótidos T7 y U6.2 y 4) amplificación con oligonucleótidos T7 y U6.1. (c) Modelo lineal de las clonas 1 y 2 construido con la información obtenida en (b). Las líneas grises corresponden a cada uno de los fragmentos indicados con flechas blancas.

fragmento del tamaño esperado (Figura 7a). La caracterización de las clonas incluyó un análisis de PCR con cuatro pares de oligonucleótidos (T3-U6.2, T3-U6.1, T7-U6.2 y T7-U6.1) con el cual se determinó el tamaño y la orientación del inserto, así como la posición del gene U6 snRNA. En la Figura 7b se muestran los fragmentos que son característicos en cinco de las nueve clonas. En la Figura 7c se muestra un modelo lineal que resume estos resultados. Mediante análisis de digestión con enzimas de restricción que tienen múltiples sitios de corte al interior del inserto de *E. histolytica* se encontró que las 9 clonas son iguales y que solamente varían en la orientación del inserto con respecto al vector (plásmido pBluescript II SK, Stratagene). Esta idea es apoyada por el hecho de que se encontró un patrón único cuando las clonas fueron digeridas con la endonucleasa de restricción Mnl I (Figura 8a). Sin embargo, al digerir con la endonucleasa Dra I, se encontraron dos patrones alternativos de digestión (Figura 8b). Estos resultados fueron corroborados mediante digestión con Bam HI. Esta enzima tiene sitios de corte únicos en el inserto y en el vector. Así, cuando un grupo de clonas fue digerido con Bam HI se liberó un fragmento de aproximadamente 2 Kb (Figura 9, derecha), mientras que en el otro grupo se liberó uno de 332 pb (Figura 9, izquierda). Además se realizaron digestiones con enzimas que no contienen sitios de corte dentro del inserto pero que sí tienen sitios únicos dentro del vector y que por tal motivo linearizan el plásmido (Figura 9b izquierda: carril 1; derecha: carriles 4-7). Por último las clonas fueron digeridas con Eco RI, liberando el inserto (Figura 9b carriles 3). En la Figura 9a se muestran los mapas de los tipos de plásmidos con el mismo inserto orientado en ambas direcciones y construidos a partir de los resultados anteriores. A las clonas en las que el gene U6 snRNA se encuentra cercano al promotor T7 y liberan el fragmento de

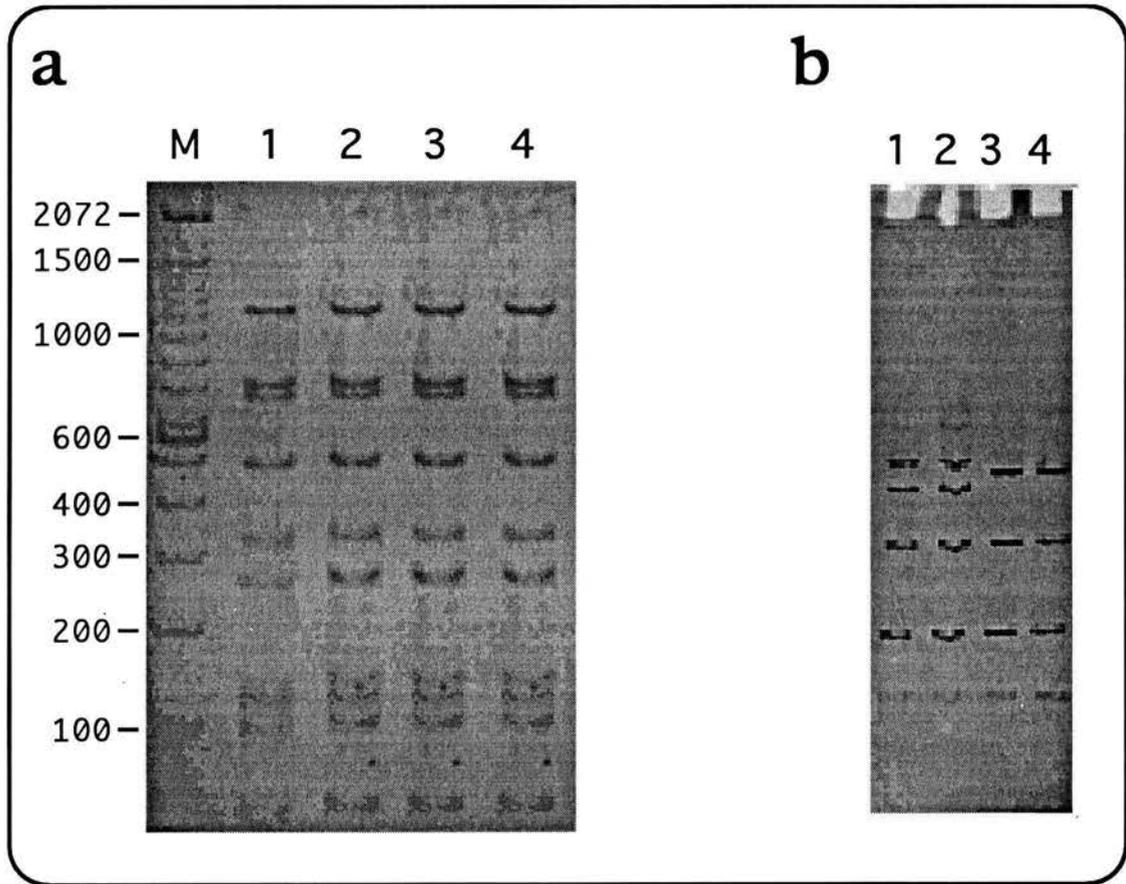


Figura 8. Análisis de restricción de las clonas 1, 2, 3 y 4 (carriles correspondientes en los gels de poliacrilamida al 10% teñidos con nitrato de plata). (a) Digestión con la endonucleasa de restricción con Mnl I y (b) Digestión con la endonucleasa de restricción con Dra I.

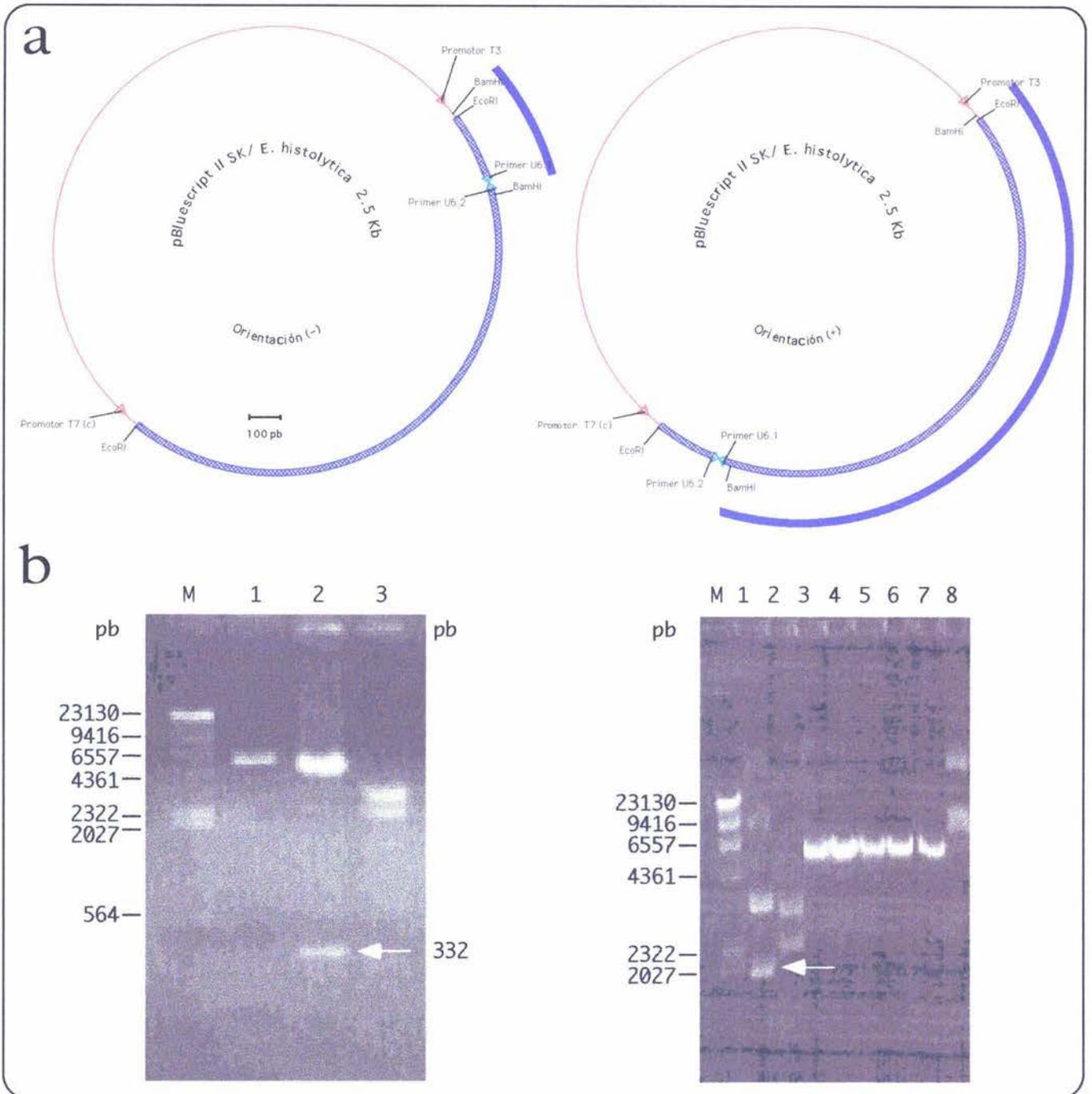


Figura 9. (a) Clonas genómicas U6⁺ de *E. histolytica* HM1-IMSS. Estos modelos fueron contruidos a partir de los datos de restricción. (b) Análisis electroforético de fragmentos de restricción. Carriles: M) Marcadores de tamaño. Bacteriofago λ digerido con Hind III. Izquierda (gel de agarosa 1.5%): 1) Digestión del plásmido con Sma I; 2) digestión con Bam HI y 3) digestión con Eco RI. Derecha (gel de agarosa 1%): 1) Digestión del plásmido con Bam HI; 2) digestión con Eco RI; 3-7) digestión con Not I, Pst I, Sac I, Sma I y Xba I, respectivamente y 8) plásmido superenrollado. Las flechas blancas indican el fragmento subrayado al exterior de los plásmidos.

aproximadamente 2 Kb mediante digestión con Bam HI, se les denomina arbitrariamente positivas (+). Aquellas clonas con orientación contraria, en las que el gene U6 snRNA se encuentra cercano al promotor T3 y liberan el fragmento de 332 pb mediante digestión con la endonucleasa Bam HI, se les denomina negativas (-).

Número de copias y transcripción.

Los resultados anteriores sugieren que *Entamoeba histolytica* contiene una copia del gene U6 snRNA. Sin embargo, considerando las posibilidades de sub-representación de genes en la genoteca, se realizó un análisis de tipo Southern (Figura 10a). En éste se utilizó también la sonda de 50 pb para hibridar los fragmentos de digestión con la endonucleasa de restricción Eco RI migrados a través de un gel de agarosa al 1 % y transferidos por capilaridad a una membrana de nylon (Hybond). Con este experimento encontramos una banda única que migra arriba de 2322 pb y que coincide perfectamente con el tamaño del inserto en las clonas positivas (U6⁺) (comparar Figuras 9b y 10a), lo que sugiere que efectivamente se encuentra un sola copia del gene U6 snRNA en el genoma de *Entamoeba histolytica* HM1-IMSS.

Aún cuando en el presente trabajo no se realizan experimentos funcionales, es posible afirmar que el gene U6 snRNA se expresa en *Entamoeba histolytica*. Mediante experimentos de tipo Northern se detectó, a medida que se aumentó la cantidad de material por carril (1, 10 y 30 µg, respectivamente), un transcrito en la fracción de RNA poli A⁺ que tiene un tamaño aproximado de 100 nucleótidos (Figura 10b). La astringencia de la

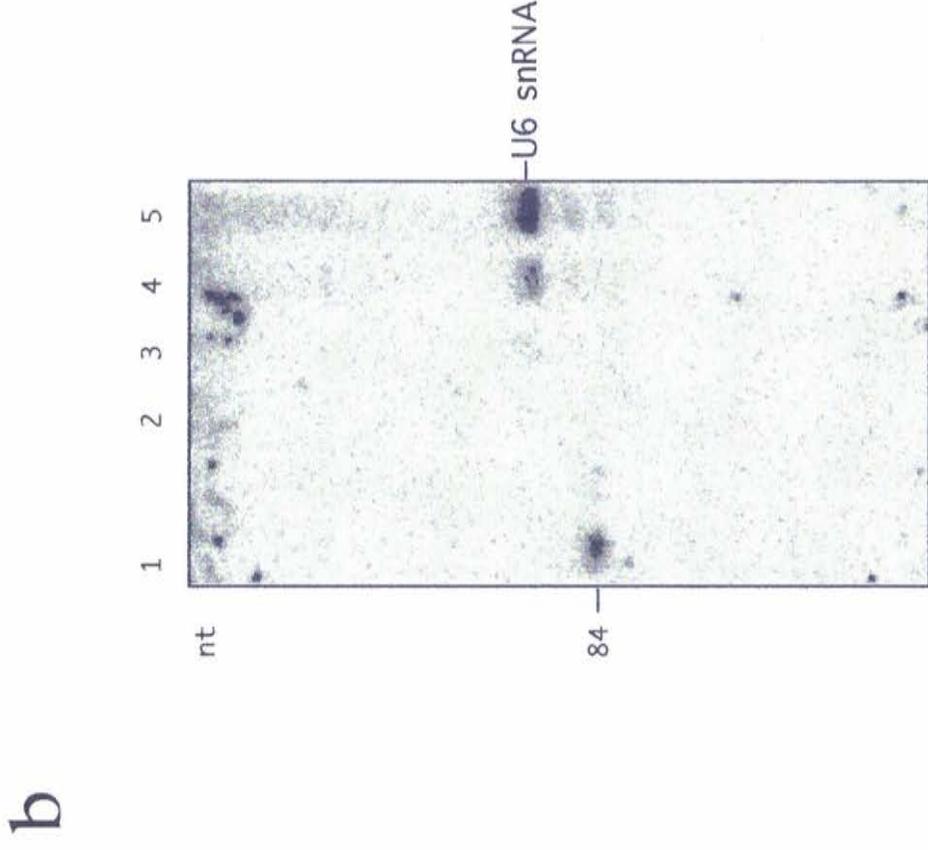
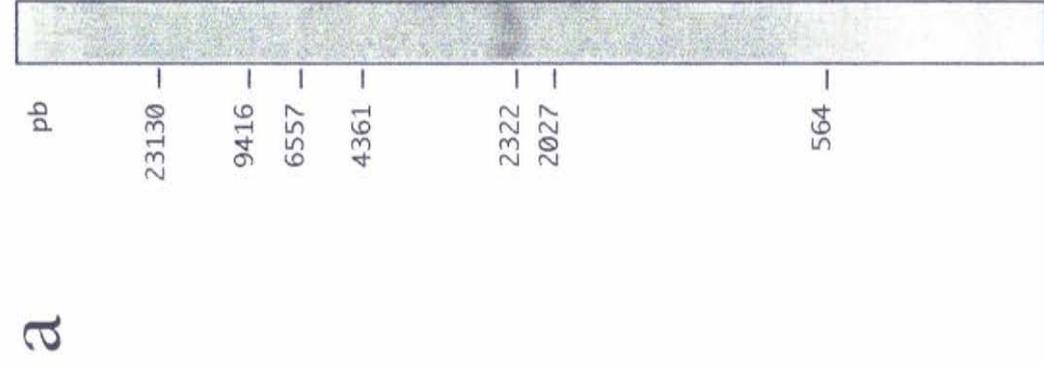


Figura 10. (a) Southern blot. DNA total de *Entamoeba histolytica* Hk-9 (10 μ g) digerido con Eco RI, migrado en gel de agarosa al 1%, transferido a membrana de nylon e hibridado con la sonda U6 de 50 pb. A la izquierda se indica el tamaño de los marcadores no radioactivos, los cuales no aparecen en la radioautografía. (b) Northern blot. RNA de *E. histolytica* HM1-IMSS migrado en gel de poliacrilamida al 8% con urea 8 M, transferido a nylon e hibridado con la sonda U6 de 50 pb. Carriles: 1) RNA marcador de 84 nt; 2) RNA poli A⁺ (700 ng); 3-5) RNA poli A⁻ (1, 10 y 30 μ g, respectivamente).

hibridación y los lavados fueron lo suficientemente elevados para asegurar que se detectó hibridación específica con la sonda de U6. Además, debe notarse que la hibridación fue altamente específica pues el transcrito no se encontró en la fracción de RNA poli A⁺, lo cual concuerda con los resultados encontrados en la expresión de U6 snRNA para otros organismos (Brow & Guthrie, 1990). Estos resultados sugieren que el gene U6 snRNA de este organismo es transcrito por la RNA polimerasa III. Así, la transcripción del gene U6 snRNA no se aparta del esquema encontrado en los metacariontes (eucariontes con mitocondria) (Eschenlauer *et. al.*, 1993).

Subclonación del gene U6 snRNA.

El sitio de digestión de BamHI que se encuentra inmediatamente anterior al gene U6 snRNA en las clonas de orientación (+) (Figura 11a) fue utilizado para realizar una deleción de aproximadamente 2 Kb sin afectar la secuencia del gene y con ésto acercarlo a los sitios que posteriormente fueron utilizados para realizar los experimentos de secuenciación (Figura 11). En la Figura 11b se señala con flecha blanca el fragmento de digestión que fue ligado con la enzima T4 DNA ligasa y que resultó en la subclona referida (Figura 11c). Debido a que la subclonación se realizó sin aislar previamente el fragmento (ver materiales y métodos), se requirió realizar un análisis de PCR con los oligonucleótidos T3 y U6.2 para corroborar la subclonación. En la Figura 11d se muestran los resultados de tal análisis y se observa que de 10 subclonas candidatas 9 amplificaron un fragmento del tamaño esperado.

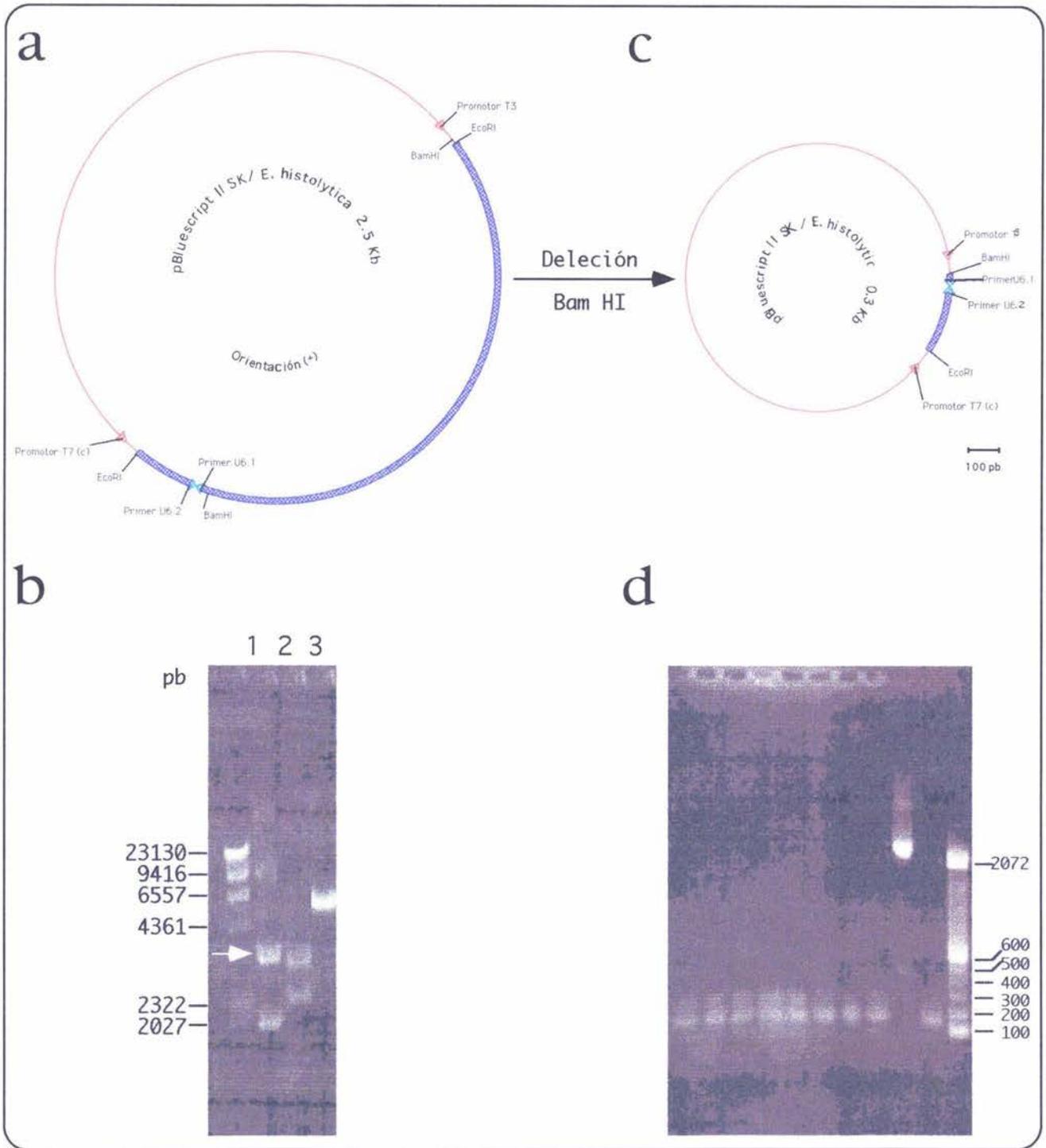


Figura 11. Subclonación. (a) pBluescript II SK/*E. histolytica* 2.5 kb (+). (b) Patrón de restricción con 1) Bam HI; 2) Eco RI y 3) Sma I. La flecha blanca indica el fragmento que fue utilizado para subclonar (ver materiales y métodos). (c) Producto de subclonación. pBluescript II SK / *E. histolytica* 0.3 kb (+). (d) Amplificación por PCR con oligonucleótidos T3 y U6.2 para corroborar resultados de subclonación. Cada uno de los carriles corresponde a un candidato de subclonación (ver materiales y métodos).

Secuencia del gene U6 snRNA.

A partir de dos clonas de 2.5 Kb con orientación (+) y de la subclona de 0.3 Kb se realizaron varios experimentos de secuenciación con los oligonucleótidos M13 Reverso, T3, SK, U6.1, U6.2 y T7. En la Figura 12 se muestra la estrategia para tales experimentos y se puede observar que se puso especial atención a la región que contiene el gene U6 snRNA. En la Figura 13a se muestra un ejemplo de uno de los geles de secuenciación a partir de una reacción con el oligonucleótido T7 marcado en el extremo 5' con fluoresceína y analizado por electroforesis digitalizada en la estación de secuenciación Millipore Base Station. La secuencia que se encuentra a la izquierda de este gel corresponde a la complementaria de una parte de la secuencia de la Figura 13b. De forma similar se secuenciaron 421 residuos nucleotídicos en los cuales se resalta la secuencia que corresponde al gene U6 snRNA de *Entamoeba histolytica* y los sitios de restricción que resultaron relevantes para el desarrollo de este trabajo. Los datos obtenidos en cada uno de los experimentos de secuenciación fueron comparados y alineados con las utilerías "Contig" y "Align" del programa GeneWorks.

Alineamiento de secuencias U6 snRNA.

Las secuencias nucleotídicas del gene U6 snRNA de *E. histolytica* y la de veinte organismos disponibles en las bases de datos, se analizaron con dos programas de alineamiento para la determinación de similitud de secuencias.

El primer alineamiento se realizó con el algoritmo de Needleman-Wunsh

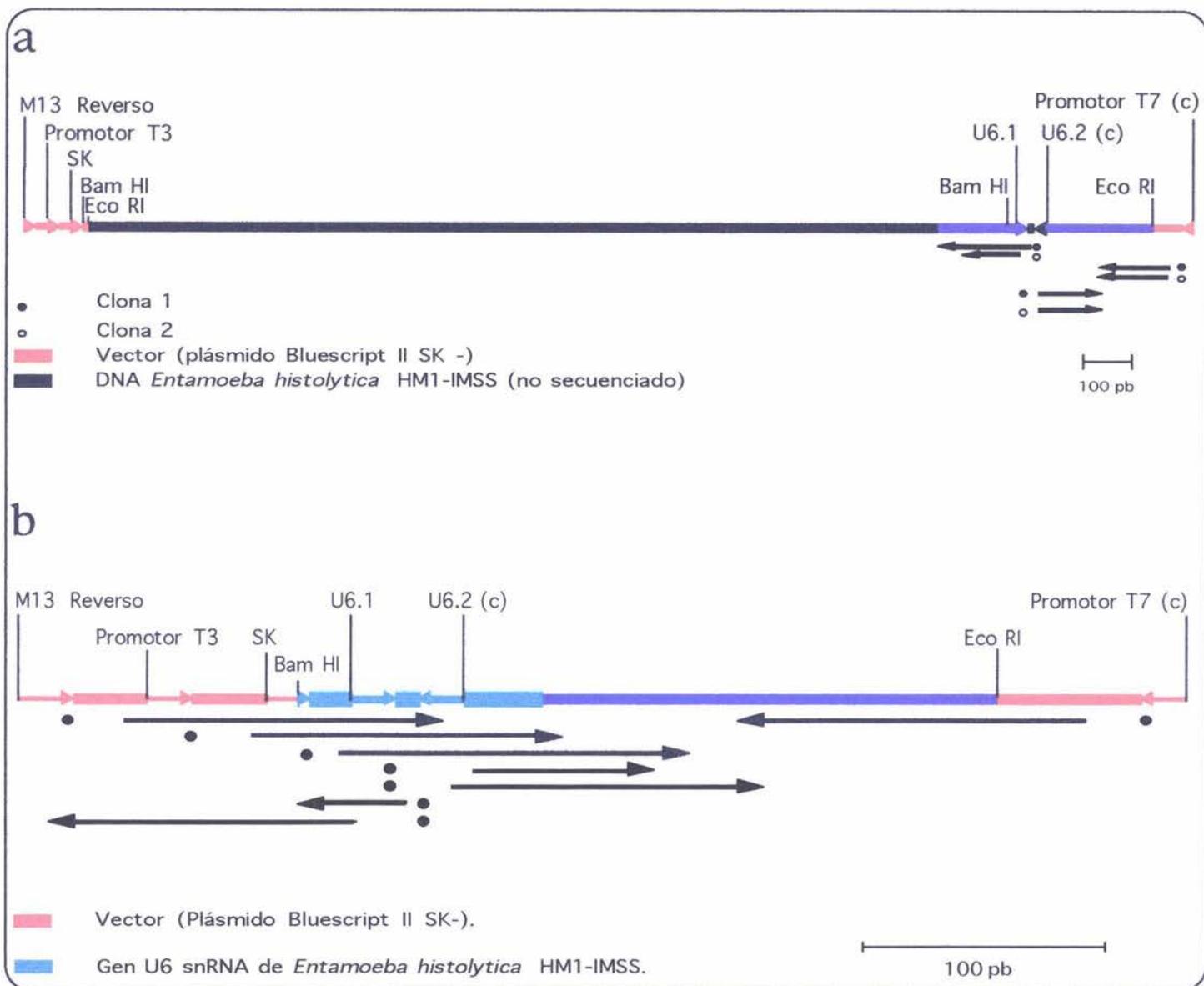
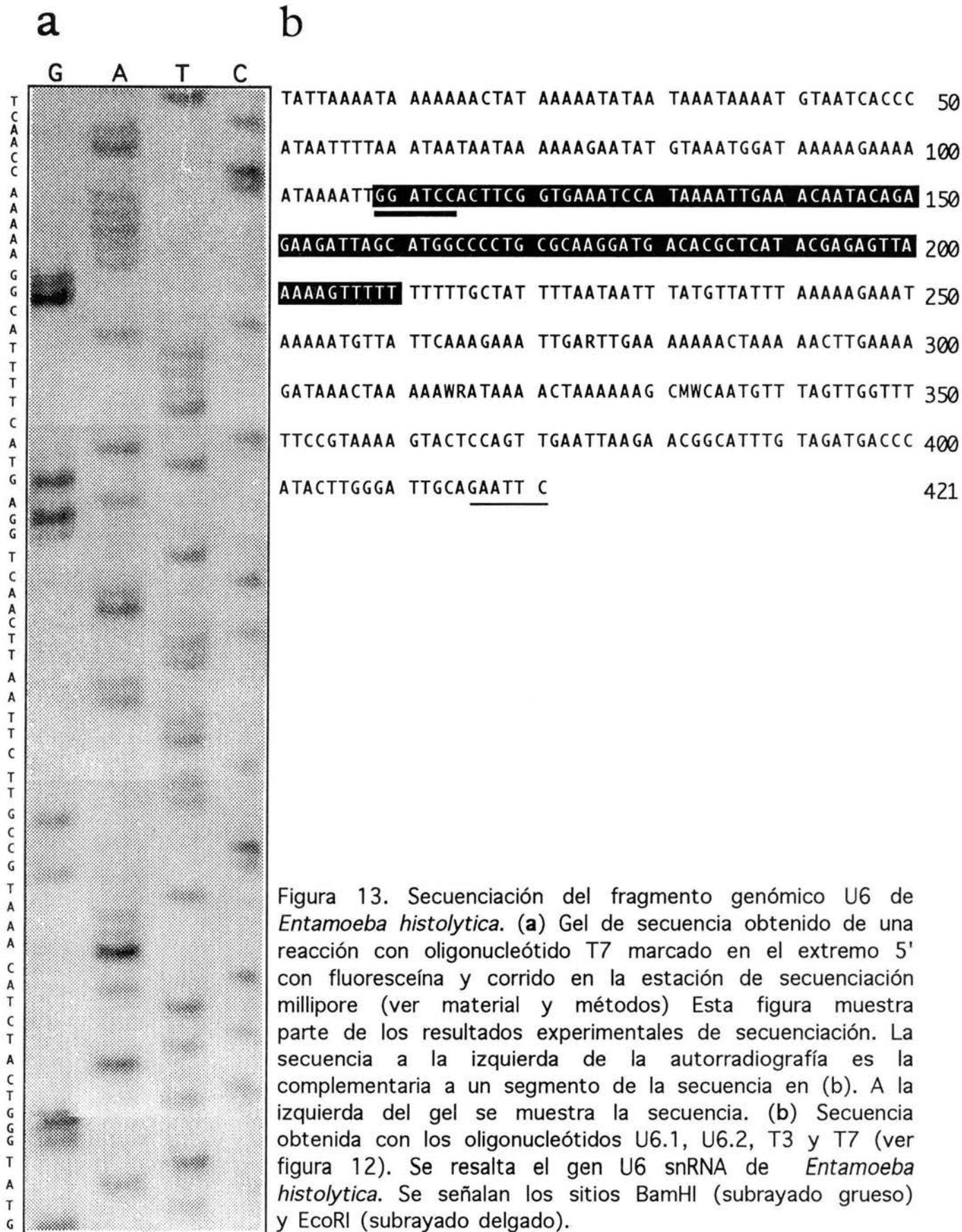


Figura 12. Estrategias de secuenciación. (a) Clonas de 2.5 Kb, (b) subclona de 0.3 Kb. Los puntos indican el oligonucleótido con el que se realizó la reacción de secuencia, y las flechas, la dirección y región de lectura.



del programa Genalign. El archivo de entrada fue completamente aleatorio, y el orden en que se presentan las secuencias en el archivo de salida está determinado por el algoritmo del programa (Figura 14). Los residuos que tienen al menos un vecino idéntico son presentados en mayúsculas. El alineamiento fue revisado manualmente para resaltar las características más interesantes. Las líneas debajo del consenso representan las regiones de interacción con el intrón (negra), con U4 snRNA (naranja) y con U2 snRNA (verde). Además, en color se muestran las regiones conservadas (el azul fuerte indica cambios en las secuencias conservadas) y las cajas encierran organismos que se encuentran más relacionados entre sí que con los demás. En negro se resalta la secuencia ACAGAGA, totalmente conservada. En rosa se muestra la región media del gene U6 snRNA. Esta región es muy conservada a lo largo de la escala filogenética y a diferencia de los eucariontes unicelulares, entre plantas y animales se presentan sólo cambios esporádicos. Por otra parte debe notarse que diferencias sutiles en las secuencias U6 snRNA fueron suficientes para discriminar entre organismos filogenéticamente más cercanos. Tal es el caso de las secuencias U6 snRNA de plantas y animales que aún cuando tienen una extensa región de homología (rosa y amarillo) fueron agrupadas por separado. Las secuencias que diferencian a las plantas están sombreadas con rojo y las que diferencian a los animales en azul claro. Los eucariontes unicelulares están divididos en dos grupos. En uno de ellos se encuentran las levaduras y en el otro los protozoarios entre los cuales fue segregada *Entamoeba histolytica*.

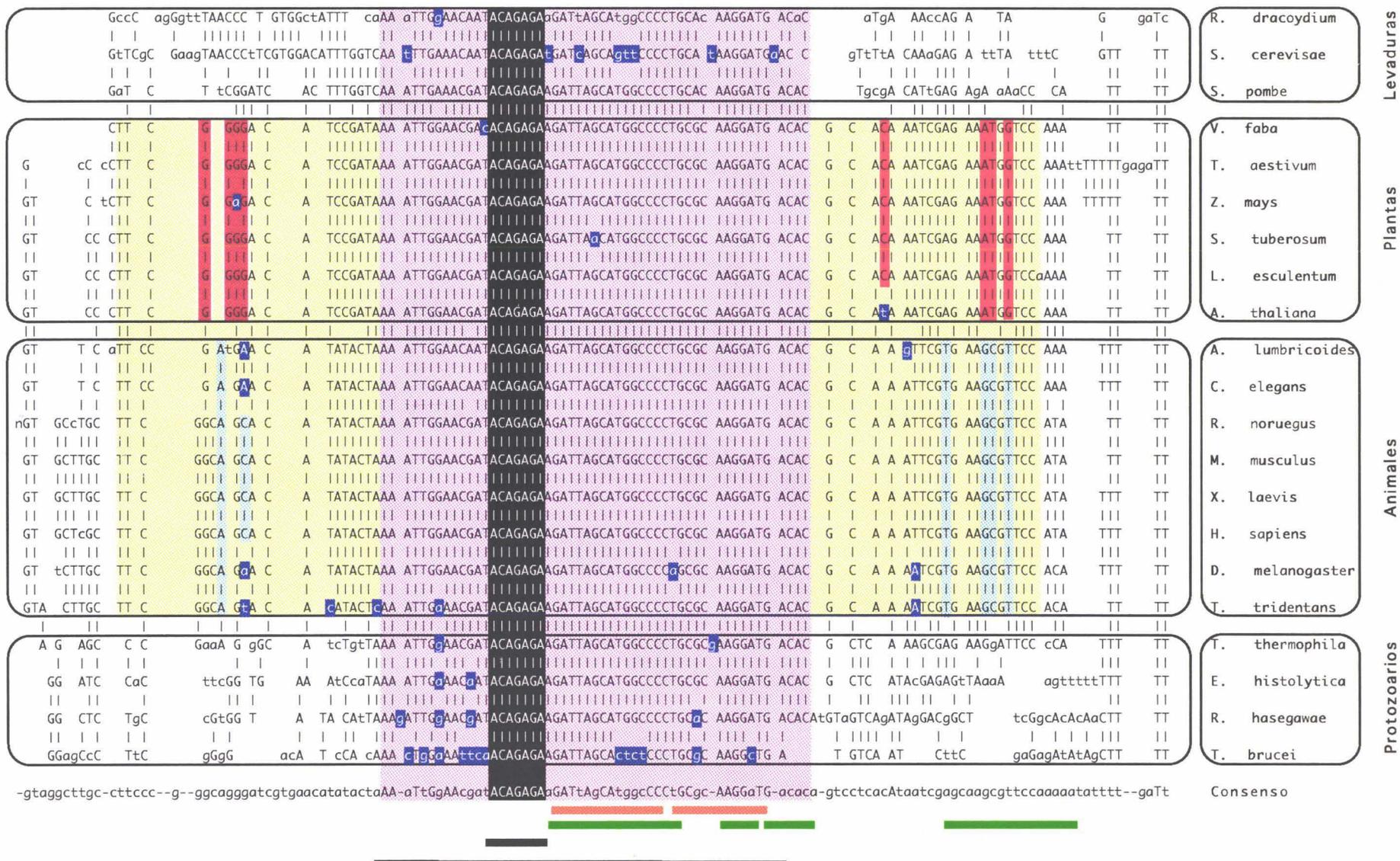


Figura 14. Alineamiento realizado con el algoritmo de Needleman-Wunsch del programa Genalign. Se consideraron las secuencias de U6 snRNA de 21 organismos (incluyendo *Entamoeba histolytica* HM1-IMSS). Se muestran en colores las regiones más conservadas. En la parte inferior de la figura, se subrayan las secuencias que interactúan con U4 snRNA (naranja), con U2 snRNA (verde) y con el extremo 5' del intrón (negro grueso). Además, también se subraya la región que corresponde al fragmento de 50 pb (negro delgado).

La secuencia de *Entamoeba histolytica* se diferencía ampliamente de la de animales (ver regiones no sombreadas). Este hecho puede excluir la posibilidad de que el gene U6 snRNA y posiblemente los restantes elementos del spliceosoma, hayan sido adquiridos por transferencia horizontal en algún momento de la interacción hospedero-parásito. Es más probable que la amiba contara con su sistema de procesamiento de intrones aún antes de que iniciara su vida como parásito de animales.

De acuerdo con el mismo alineamiento, *Entamoeba histolytica* es más parecida a los protozoarios que a cualquiera de los otros grupos. Sin embargo, hay que considerar que tradicionalmente todos aquellos organismos que no entran en los reinos bien definidos (Animalia, Plantae, Fungi o Monera) se han clasificado entre protozoarios. *Rhodotorula hasegawae*, una levadura, fue el único organismo que se sale del esquema filogenético ya que inexplicablemente la secuencia de su gene U6 hace que sea agrupado junto con protozoarios.

El segundo alineamiento fue realizado con la utilidad "Align" del programa GeneWorks. Al igual que en el programa anterior, el orden de las secuencias en el alineamiento (Figura 15) está determinado por el algoritmo. En este caso, el programa resalta las regiones conservadas. Además, manualmente fueron encerradas las secuencias de las plantas y animales, los cuales se encuentran más relacionados entre sí que con los demás (ver adelante). En este alineamiento no es posible detectar, a primera vista, las diferencias existentes entre las secuencias U6 snRNA. Sin embargo, este programa tiene el potencial de construir automáticamente un dendograma a partir de los resultados del alineamiento (Figura 16) (posibilidad que no

Organismo	Secuencia	Posición
<i>S. cerevisiae</i>	GTTCGGGAG TAACC-CTTC G--TGGACAT TTGGTCATTTT AC CGFTTTACAA AGNEATTTAT TTGCTTTT--	112
<i>X. laevis</i>	-----G TGCTTGCTTC GGCAGCACAT ATACTAAAT TGPALDGAAT- AGGATGALAC -G-CA-AAAT- CGTEAAGCGT TCCATATTTT T-----	107
<i>M. musculus</i>	-----G TGCTTGCTTC GGCAGCACAT ATACTAAAT TGPALDGAAT- AGGATGALAC -G-CA-AAAT- CGTEAAGCGT TCCATATTTT T-----	106
<i>H. sapiens</i>	-----G TGCTTGCTTC GGCAGCACAT ATACTAAAT TGPALDGAAT- AGGATGALAC -G-CA-AAAT- CGTEAAGCGT TCCATATTTT T-----	107
<i>R. noruegus</i>	-----NG TGCTTGCTTC GGCAGCACAT ATACTAAAT TGPALDGAAT- AGGATGALAC -G-CA-AAAT- CGTEAAGCGT TCCATATTTT T-----	107
<i>D. melanogaster</i>	-----G TTCTTGCTTC GGCAGCACAT ATACTAAAT TGPALDGAAT- AGGATGALAC -G-CA-AAAT- CGTEAAGCGT TCCATATTTT T-----	107
<i>T. tridentans</i>	-----G TACTTGCTTC GGCAGCACAT ATACTAAAT TGPALDGAAT- AGGATGALAC -G-CA-AAAT- CGTEAAGCGT TCCATATTTT T-----	106
<i>C. elegans</i>	-----GTTTC-TTC CGA-GAAGCAT ATACTAAAT TGPALDGAAT- AGGATGALAC -G-CA-AAAT- CGTEAAGCGT TCCATATTTT T-----	102
<i>A. lumbricoides</i>	-----GTTTCATTC CGATGAACAT ATACTAAAT TGPALDGAAT- AGGATGALAC -G-CA-AGTT- CGTEAAGCGT TCCATATTTT T-----	104
<i>S. tuberosum</i>	-----GTTCCCTTC GGG-G-ACAT CCGATAAAT TGPALDGAAT- AGGATGALAC -G-CACAAAT- CGNEAATGG TCCAAATTTT T-----	102
<i>A. thaliana</i>	-----GTTCCCTTC GGG-G-ACAT CCGATAAAT TGPALDGAAT- AGGATGALAC -G-CATAAAT- CGNEAATGG TCCAAATTTT T-----	102
<i>T. aestivum</i>	-----GCCCTTC GGG-G-ACAT CCGATAAAT TGPALDGAAT- AGGATGALAC -G-CACAAAT- CGNEAATGG TCCAAATTTT TTTGAGATTT- T-----	111
<i>V. faba</i>	-----CTTC GGG-G-ACAT CCGATAAAT TGPALDGAAT- AGGATGALAC -G-CACAAAT- CGNEAATGG TCCAAATTTT T-----	98
<i>L. esculentum</i>	-----GTTCCCTTC GGG-G-ACAT CCGATAAAT TGPALDGAAT- AGGATGALAC -G-CACAAAT- CGNEAATGG TCCAAATTTT T-----	103
<i>Z. mays</i>	-----GTTCTTC GGA-G-ACAT CCGATAAAT TGPALDGAAT- AGGATGALAC -G-CACAAAT- CGNEAATGG TCCAAATTTT TTT-----	105
<i>S. pombe</i>	-----GATCTTC GGATC-ACCTT -TGGTCAAT TGPALDGAAT- AGGATGALAC TG-CGACAT- TGAEAF--AA AACCCATTTT T-----	99
<i>E. histolytica</i>	-----GG ATCCA-CTTC GG-TG-AAAT -CCATAAAT TGPALDGAAT- AGGATGALAC -G-C-TCATA- CGNEAATTTAA AAAGTTTTTT TTTT-----	107
<i>T. brucei</i>	-----GGAGCCCTTC GG--GGACAT CCAC--AAAC TGPALDGAAT- AGGATGALAC -G-T--CAATCTT- CGNEAATAT AGCTTTT-----	99
<i>R. hasegawae</i>	-----GGCTCTG-CC GTG-GTADAC ATTA-ALGAT TGPALDGAAT- AGGATGALAC --ATGTAAGT- C-NEAATGGA- CGGCTTCGGC ACACAACTTT T-----	112
<i>R. dracoydium</i>	-----GCCAG GGTAA-CC CTGTGGCTAT TTCA-ALAT TGPALDGAAT- AGGATGALAC --ATGAAAC- C-NEAATGGA- TC-----	99
<i>T. termophila</i>	-----AG AGCCGA-- AAGGCATCT GTTA-ALAT TGPALDGAAT- AGGATGALAC -G-CTCAAG- CGNEA-AGGA TTCCCAATTT TT-----	105
Consenso	GTTCGGSMAG DDNBNHTYC VDVDSNMHHY NYNTVTRHWY TGPEALDWTYA ACAGAGAGA TTPCEALPKBY TCCGCTCYCA AGGATGALAS YGTHDNHVDN HGHEALDDBRD HNVNHHHKY WTWBARMTT T-----	131

Figura 15. Alineamiento de secuencias U6 snRNA de 21 organismos realizado con el programa GeneWorks. Los asteriscos (*) señalan las nueve posiciones altamente sensibles a mutación en levadura (Madhani H D, et. al. 1990).

Animales

Plantas

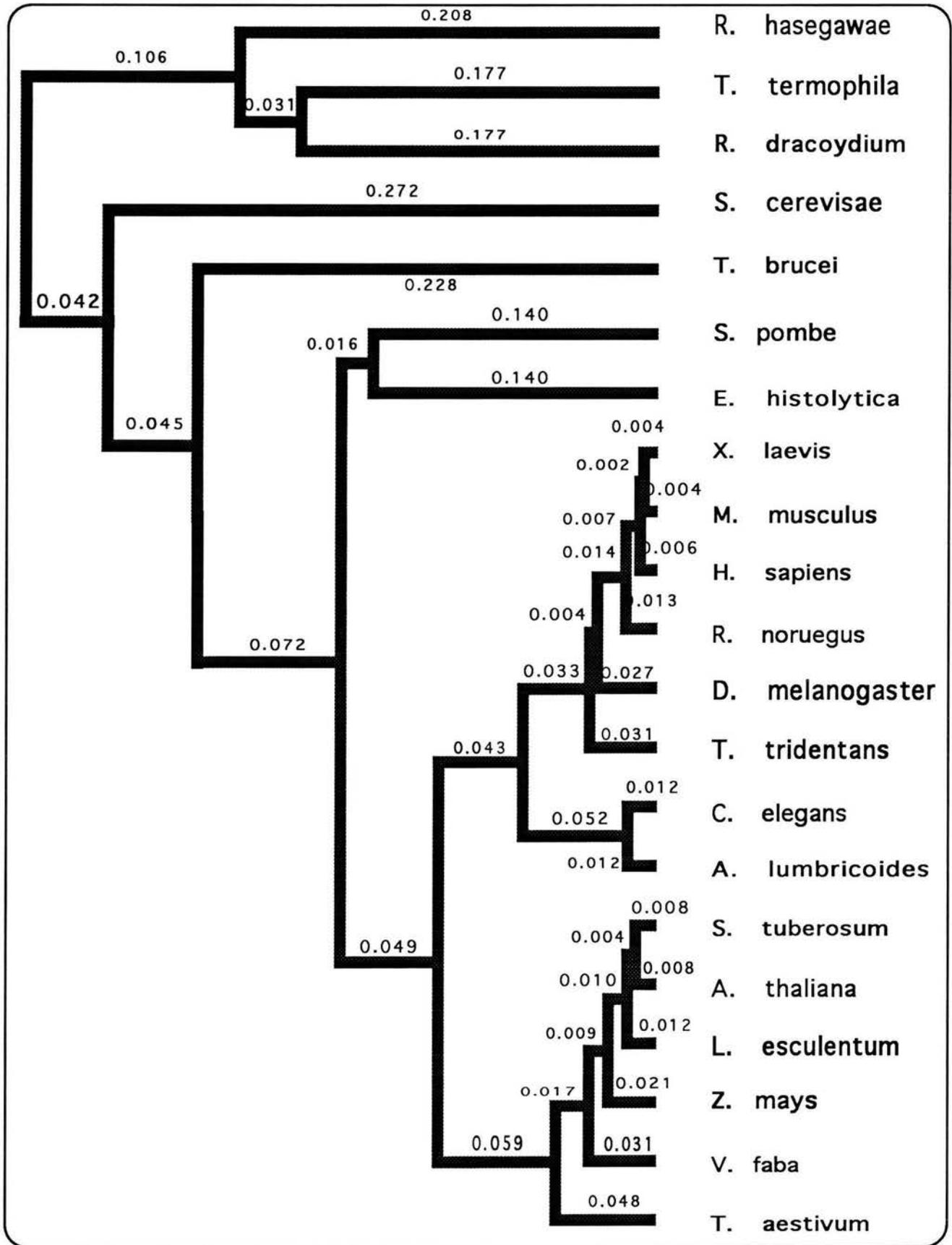


Figura 16. Dendrograma construido a partir del alineamiento de GenWorks (figura 15). La distancia que separa dos organismos entre sí es medida en el plano horizontal, siendo irrelevante la separación vertical.

tiene el programa Genalign). En el dendograma se puede apreciar la formación de una rama bien definida de animales, otra de plantas y por último un grupo heterogéneo de eucariontes unicelulares. Además, las ramas de animales y plantas salen de una rama común y las secuencias de los organismos que las forman son más parecidas entre sí que con las de eucariontes unicelulares. Así, los resultados obtenidos con los dos programas son esencialmente iguales en lo que respecta a la agrupación de plantas y animales. Sin embargo, este último no pudo discriminar entre levaduras y protozoarios. Para intentar obtener un dendograma (Figura 17b) en el que se formen estos grupos, sin la posible interferencia de las secuencias de plantas y animales, se realizó un alineamiento en el que se consideraron únicamente las secuencias de los eucariontes unicelulares (Figura 17a) . Sin embargo, este dendograma tampoco pudo hacer tal discriminación. Por último se señalan con asteriscos las nueve posiciones que en levadura son altamente sensibles a mutación (ver Figura 15 e introducción). Debe notarse que éstas son altamente conservadas con la única excepción de un cambio de la secuencia AGC por AAC en *S. tuberosum*.

Estos alineamientos, así como los dendogramas, son los primeros que se realizan en donde se incluyen todas las secuencias U6 snRNA reportadas.

a

U6S.cerevisae	G TTCGCGAAG TAACCCCTCG TGGACAFITG GTCAAITPGA AACAATACAG AGA GATTAG CABITCCCTT GCAT-AAGGA TGA-ACGTT TTACA-AAGA GATTATTTC GTTTT-----	112
U6R.hasegawae	-----GGCT CTGCCGTG-G TATACATFAA --AGAITPGA A-CGATACAG AGA GATTAG CATGGCCCTT GCAC-AAGGA TGACAC-ATG TAGT-C-AGA --TAGGACGG CTTCGGCACA CAACTTTT	112
U6R.dracoydium	GCCCAGGGTT TAACCCGTG GCTATTTCAA --A-AITPGA A-CAATACAG AGA GATTAG CATGGCCCTT GCAC-AAGGA TGACAC-ATG AAAC-C-AGA --TAGGATC-----	99
U6T.termophila	----AGAGCC CGA--AAGG CATCTGTFAA --A-AITPGA A-CGATACAG AGA GATTAG CATGGCCCTT GCAC-AAGGA TGACAC-GCTC AAAG-CGAGA --AGGATTC CCCATTTTT-----	105
U6S.pombe	-----GATCTCCG ATCACTTGG TCAAAITGAA A-CGATACAG AGA GATTAG CATGGCCCTT GCAC-AAGGA TGACACTGCG ACAT-TGAGA G--AAAACCC ATTTT-----	99
U6E.histolytica	-----GGAT CCA-CTTCG -TGAAATCA TAAAAITGAA A-CAATACAG AGA GATTAG CATGGCCCTT GCAC-AAGGA TGACAC-GC- TCATACGAGA GTTAAAAAGT TTTTTTTTT-----	107
U6T.brucei	-----G GAGCCCTCG GGGACATCA C-AAAITGCA AATTCAACAG AGA GATTAG CACTCTCCCT GCAC-AAGGC TG--ATGTCA ATCTTCGAGA GATATAGCTT TT-----	99
Consensus	GYCRSRRHB BNRYCNWBE NNBMHDTYNR BHMRETKRE AAYDMWACAG AGA GATTAG CABKBYCCCT GCRC-AAGG TGACACBNNY WHVBWYRGA GWTWDRDHB NYHKKYWYA CAACTTTT	128

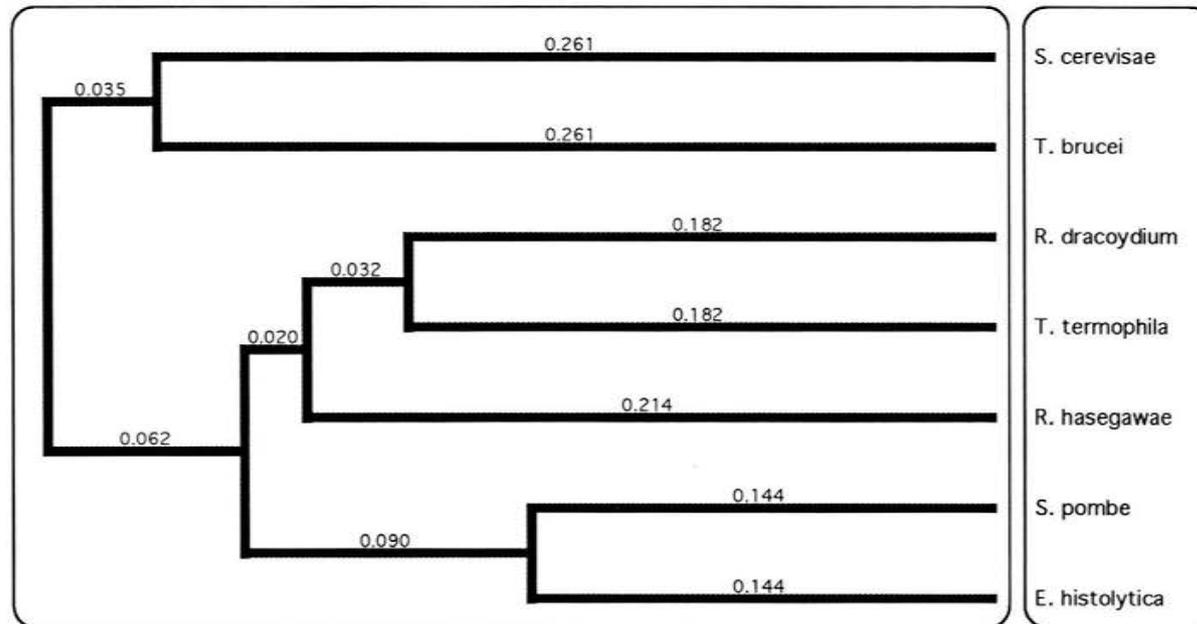
b

Figura 17. (a) Alineamiento de secuencias U6 snRNA de eucariontes unicelulares. (b) Dendrograma correspondiente al alineamiento de (a). Ambos fueron construidos como se indica en las figuras 15 y 16.

Estructura secundaria de U6 snRNA.

Utilizando los programas Mulfold y RNA Loop Viewer se construyeron un total de 45 modelos de estructura secundaria de U6 snRNA de *Entamoeba histolytica* y 37 de *Saccharomices cerevisiae* . En la figura 18 se muestran tres modelos para cada organismo. Los modelos **a** corresponden a las estructuras óptimas en solución. Los modelos **b** corresponden al que previamente ha sido reportado para el U6 snRNA de *H. sapiens* (Wolff, T. & Bindereif, A., 1993). Por último, a partir de las bases de U6 snRNA que interaccionan con el extremo 5' del intrón y con U2 snRNA en *Saccharomices cerevisiae* se realizó un análisis de estructuración en el que se impidió el apareamiento de estos nucleótidos para simular las condiciones en las que se encuentra U6 al interior del spliceosoma (Figura 18, modelos c). En estos modelos, los tallos en azul posiblemente reflejan parte de la estructura funcional de U6, mientras que las bases en verde interaccionan con el intrón y con U2 snRNA. Las implicaciones de estos modelos se describen en la discusión.

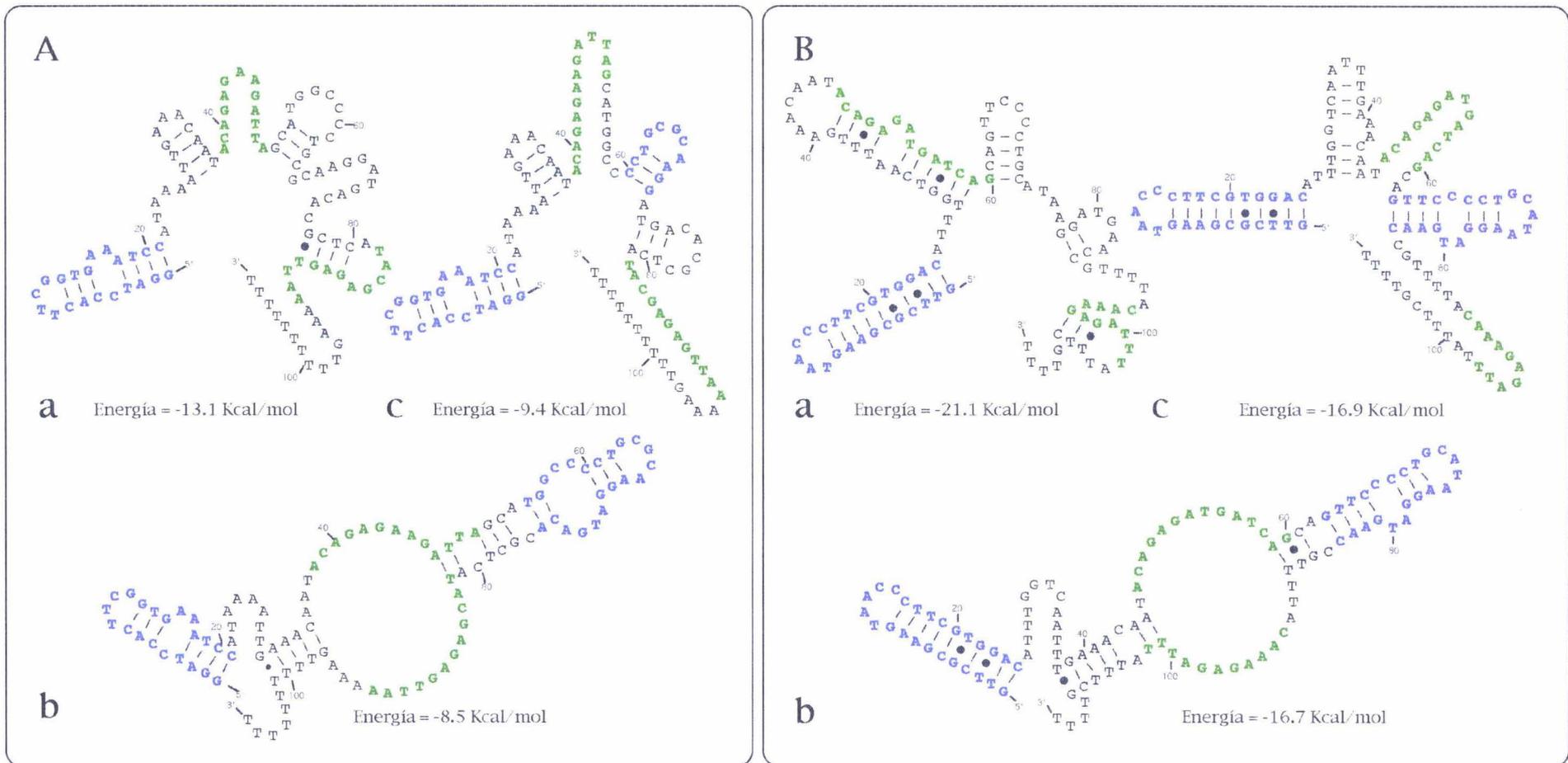


Figura 18. Modelos de estructuración secundaria para U6 snRNA de (A) *Entamoeba histolytica* y (B) *Saccharomyces cerevisiae* realizados con los programas MulFold y RNA Loop Viewer (ver materiales y métodos). (a) Modelos óptimos, (b) modelos subóptimos y (c) modelos óptimos en el caso de que se impida la estructuración de los nucleótidos comprometidos con el apareamiento U2/U6 snRNA y 5' del intrón/U6 snRNA en el spliceosoma (verde). En azul se resaltan los tallos que probablemente son formados en el spliceosoma. Los detalles de la figura se explican en el texto.

Discusión

U6 snRNA en *Entamoeba histolytica*

La formación del spliceosoma y el procesamiento de intrones tipo pre-mRNA requiere de la participación de los cinco U snRNA spliceosomales y de un número todavía no definido de proteínas. En este sentido, para determinar si la maquinaria de procesamiento de intrones de *Entamoeba histolytica* es igual al spliceosoma de los metacariontes (eucariontes con mitocondria), es necesario determinar si cada uno de sus constituyentes están representados en la amiba. Sin embargo, teniendo en cuenta la cada vez más robusta idea de que U6 snRNA es la molécula más íntimamente relacionada con la actividad catalítica en el spliceosoma junto con su conservación a lo largo de la evolución eucarionte, sugerimos que esta molécula resulta ser un excelente indicador de la presencia de toda la maquinaria de splicing en *Entamoeba histolytica*. Los resultados de amplificación del fragmento de 50 pb a partir de DNA total, la obtención de clonas positivas, los análisis de Southern y Northern, la secuenciación y el análisis de alineamiento son concluyentes en el sentido de que el gene U6 snRNA está presente y se expresa en la amiba. Es importante puntualizar que la evidencia disponible indica sin lugar a dudas que existe un gene U6 snRNA funcional en este organismo aún cuando no estamos en posición de afirmar que la maquinaria sea estrictamente idéntica a la de los eucariontes con mitocondria.

Por otra parte, a la fecha no se cuenta con ningún vector de transformación estable para *Entamoeba histolytica*, y aunque se ha logrado

transformación transitoria (Petri, 1994) y se está trabajando sobre la construcción de un vector de clonación (Alagón, 1994) y la metodología de transformación, todavía nos tenemos que conformar con sistemas de expresión heteróloga. Además, éstos se han restringido a vectores y sistemas procariontes (v.g. lambda- *E. coli*). En este contexto, en el grupo del doctor Alejandro Alagón se está trabajando, paralelo al desarrollo de la tecnología de transformación, en la construcción de una genoteca genómica de expresión en levadura con DNA de amiba digerido con la enzima Mung Bean. Con los resultados presentados en este trabajo pensamos que existen grandes posibilidades de que los genes que tienen intrones tipo pre-mRNA sean expresados correctamente en esta genoteca, cuando ésta sea expresada en levadura.

Implicaciones filogenéticas de la presencia de U6 en *Entamoeba histolytica*.

Existe una polémica con respecto a la evolución de los grupos de intrones. Cavalier-Smith (1991) ha indicado que un punto clave en el entendimiento del origen de intrones tipo pre-mRNA es si se encuentran o no en eucariontes sin mitocondria (Archezoa). El ha argumentado que la ausencia de intrones tipo pre-mRNA en genes que sistemáticamente se presentan entre eucariontes con mitocondria (Metacariota) y el parecido estructural de éstos con los intrones autocatalíticos grupo II (presentes sólo en genes mitocondriales) (figura 5) son indicios determinantes de que los primeros aparecen en la evolución después del evento endosimbiótico que terminó en la formación de la mitocondria. Sin embargo, poco tiempo después Lohia y Samuelson (1993) y el grupo de la Dra. Esther Orozco

(comunicación personal) descubrieron la existencia de intrones en *Entamoeba histolytica*. Estos resultados junto con la presencia de U6 snRNA sugieren que la aparición de intrones tipo pre-mRNA es un evento anterior a la formación de la mitocondria.

Por otra parte, el hecho de que *Entamoeba histolytica* sea un organismo parasitario, despliega una complicación adicional: pudo separarse de la rama principal eucariota antes de la obtención de la protomitocondria, o bien perder su mitocondria, sus peroxisomas y adquirir las características presentadas en la tabla 1, en el curso de su adaptación al estilo de vida parasítico (Bakker-Grunwald T. and Wöstmann C., 1993). Así, se ha especulado que sus características pueden interpretarse alternativamente como arcaicas o como regresivas. En apoyo de la hipótesis regresiva, se ha publicado un árbol de distancias filogenéticas utilizando como molécula marcadora a la subunidad pequeña de RNA ribosomal (Sogin M.L. et. al., 1986), en el que *Entamoeba histolytica* está entre *Euglena* y *Dictyostelium* (eucariontes con mitocondria). Sin embargo, existe la posibilidad de una sobrevaloración de estos resultados debido al elevado contenido de A + T en el genoma de *Entamoeba*. En contraparte, utilizando las secuencias de aminoácidos de la ubiquitina (Bakker-Grunwald T. and Wöstmann C., 1993) y del factor de elongación 1α (Hasegawa M. et. al., 1993) como marcadores en la elaboración de árboles filogenéticos se ha sugerido que *Entamoeba histolytica* se separa antes de la integración de la protomitocondria (primera hipótesis). Bakker-Grunwald y Wöstmann (1993) han señalado que es necesario contar con un mayor número de estudios que permitan localizar más certeramente la posición filogenética de *Entamoeba*.

En este contexto, si la hipótesis de Cavalier-Smith sobre la evolución de los intrones tipo pre-mRNA es acertada, la presencia de intrones y del complejo de procesamiento en el que participa U6 snRNA, así como la posición de la secuencia de U6 de *Entamoeba histolytica* en los alineamientos y dendogramas presentados en este trabajo, pueden ser tomados como un argumento a favor de que *Entamoeba histolytica* es un organismo moderno que ha perdido su mitocondria y sus peroxisomas (hipótesis regresiva).

Estructura secundaria de U6 snRNA.

Durante la formación del spliceosoma y el procesamiento de moléculas precursoras de mRNA, U6 snRNA adopta diferentes estados conformacionales que involucran la formación y ruptura de interacciones por apareamiento de bases con el extremo 5' del intrón, U4 snRNA y U2 snRNA, así como interacciones intramoleculares. Mediante modelado de estructuras a partir de secuencias U6 snRNA con los programas Mulfold y RNA Loop Viewer, encontramos que la información contenida en la secuencia de esta molécula en *Entamoeba histolytica* y *Saccharomices cerevisiae* es suficiente para que adopten, al menos parcialmente, conformaciones que posiblemente sean requeridas para realizar su actividad en el spliceosoma (Figura 18, tallos en azul de los modelos b). Sin embargo, estas estructuras no son las termodinámicamente favorecidas. Entre 45 posibilidades estructurales para la secuencia de *Entamoeba histolytica* y 37 para la secuencia de *Saccharomices cerevisiae* los modelos b corresponden a las estructuras subóptimas número 25 y 20, respectivamente, en orden de estabilidad. Realizando ensayos de modificación química/interferencia y análisis mutacionales Wolff, T y Bindereif, A (1993) propusieron un modelo

similar para el U6 snRNA de *H. sapiens* y propusieron que el tallo al extremo 3' es esencial para iniciar la interacción de apareamiento entre U4 y U6 snRNA. Sin embargo, es interesante notar que la estructura óptima obtenida con nuestro análisis es diametralmente distinta si consideramos la conformación de la región 3' (Figura 18, modelos a). Esto es congruente con la idea de que se requiere la interacción con otros factores para que U6 snRNA adopte las conformaciones funcionales. En este sentido, a partir de los alineamientos de las figuras 14, 15 y 17, se extrapolaron las bases que en el spliceosoma de *Saccharomyces cerevisiae* se encuentran comprometidos en la interacción con U2 snRNA y con el extremo 5' del intrón (Fortner, D. *et. al.*, 1994) y se forzó el análisis impidiendo la estructuración de estos residuos nucleotídicos (Figura 18, nucleótidos en verde de los modelos c). Ante esta condición encontramos modelos óptimos que contienen los dos tallos propuestos anteriormente (azul). Por otra parte, a pesar de la conservación de secuencias, el análisis no condicionado para la secuencia U6 snRNA de *R. dracoydium* (Datos no presentados) resultó en modelos en que el tallo 3' no fue formado; pero cuando se condicionó el análisis, los tallos 5' y 3' fueron perfectamente formados. Todos estos resultados juntos refuerzan la idea de que estos tallos están presentes en las formas funcionales de U6 snRNA, es decir cuando se encuentra en interacción con los restantes componentes del spliceosoma.

Conclusiones

Con los resultados presentados en este trabajo se puede concluir que

1. El fragmento de 50 pares de bases amplificado mediante PCR con los oligonucleótidos U6.1 y U6.2 a partir de DNA total de *Entamoeba histolytica* es específico de la región media del gene U6 snRNA, teniendo potencial utilidad en la búsqueda de genes U6 snRNA de otros organismos debido a la alta conservación de secuencia en esta región del gene.

2. La presencia de una sola banda en el experimento tipo Southern blot y la clonación de un sólo tipo de inserto durante la búsqueda del gene son indicativos de que existe una sola copia del gene U6 snRNA en el genoma de *Entamoeba histolytica*.

3. La presencia de un intrón en el gene *cdc2* y el hecho de que el gene U6 snRNA se expresa en *Entamoeba histolytica* por transcripción con la RNA polimerasa III, sugieren que su sistema de procesamiento de intrones tipo pre-mRNA es similar al de metacariontes (eucarionte con mitocondria).

4. Si la hipótesis de que *Entamoeba histolytica* es un organismo arcaico es acertada, la presencia del gene U6 snRNA que se diferencia de la de animales en cuanto a secuencia es un indicador de que el sistema de procesamiento de intrones tipo pre-mRNA es anterior al evento endosimbiótico que terminó en la aparición de la mitocondria.

5. Si, alternativamente, la hipótesis de Cavalier-Smith sobre la

evolución de los intrones pre-mRNA es acertada, la presencia de intrones y del gene U6 snRNA en *Entamoeba histolytica* puede ser tomada como un argumento a favor de que este organismo ha perdido su mitocondria en el curso de su adaptación al estilo de vida parasítico.

6. El análisis de estructuración secundaria de U6 snRNA sugiere que esta molécula adopta su conformación funcional solamente cuando se encuentra formando parte del spliceosoma.

Referencias

- Bakker-Grunwald T. & Wöstmann C. 1993. *Entamoeba histolytica* as a model for the primitive eukariotic cell. *Parasitology Today*, 9(1):27-31.
- Benjamin J., Blencowe B.J., Sproat B.S., Ryder U., Barabino S., & Lamond A.I. 1989. Antisense probing of the human U4/U6 snRNP with biotinylated 2'-OMe RNA oligonucleotides. *Cell*, 59(3):531-539 .
- Brow D.A. & Guthrie C. 1988. Spliceosomal RNA U6 is remarkably conserved from yeast to mammals. *Nature*, 334:213-218.
- Brow D.A. & Guthrie C. 1990. Transcription of a yeast U6 snRNA gene requires a polymerase III promoter in a novel position. *Genes & Development*, 4(8):1345-1356.
- Cavalier-Smith T. 1991. Intron phylogeny: a new hypothesis. *Trends in Genetics*, 7(5):145-148.
- Diamond L.S. 1968. Techniques of axenic cultivation of *Entamoeba histolytica*. and *E. histolytica*. -like amebae. *J. Parasitol.* Vol. 54, 1047-1056.
- Eschenlauer J.B., Kaiser M.W., Gerlach V.L. & Brow D.A. Architecture of a yeast U6 RNA gene promoter. *Mol Cell Biol*, 13(5):3015-3026.
- Fabrizio P. & Abelson J. 1990. Two domains of yeast U6 small nuclear RNA required for both steps of nuclear precursor messenger RNA

splicing. *Science*, 250(4979):404-409 .

Fortner D.M., Troy R.G. & Brow D.A. 1994. A stem/loop in U6 RNA defines a conformational switch required for pre-mRNA splicing. *Genes & development*, 8:221-233.

Gilbert D.G. 1990. LoopViewer, a Macintosh program for visualizing RNA secondary structure. Publicado electrónicamente en Internet, disponible via ftp anónimo a iubio.bio.indiana.edu

Hasegawa M., Hashimoto T., Adachi J., Iwabe N. & Miyata T. 1993. Early branchings in the evolution of eukaryotes: Ancient divergence of *Entamoeba* that lacks mitochondria revealed by protein sequence data. *J Mol Evol*, 36: 380-388.

Jacquier A. 1990. Self-splicing group II and nuclear pre-mRNA introns: how similar are they?. *TIBS*, Sept:351-354.

Kandels-Lewis S. & Séraphin B. 1993. Role of U6 snRNA in 5' splice site selection. *Science*, 262:2035-2039.

Ken'ichiro Hayashi, Masako Nakazawa, Yukuo Ishizaki, Nobutsugu Hiraoka and Akira Obayashi. 1986. Regulation of inter- and intramolecular ligation with T4 DNA ligase in the presence of polyethylene glycol. *Nucleic Acid Research*. Vol. 14, No. 19, 7617- 7631.

Lesser C.F. & Guthrie C. 1993. Mutations in U6 snRNA that alter splice site specificity: Implications for the active site. *Science*, 262:1982-1988

- Lewin, B. 1990. Genes IV. Cell Press, Cambridge, Mass. Capítulo 30:578-609.
- Lohia A. & Samuelson J. 1993. Cloning of the *Eh cdc2* gene from *Entamoeba histolytica* encoding a protein kinase p34^{cdc2} homologue. *Gene*, 127:203-207.
- Madhani H.D., Bordonne R., & Guthrie C. 1990. Multiple roles for U6 snRNA in the splicing pathway. *Genes Dev*, 4(12B):2264-2277.
- Madhani H.D. & Guthrie C. 1992. A novel base-pairing interaction between U2 and U6 snRNAs suggests a mechanism for the catalytic activation of the spliceosome. *Cell*, 71(5):803-817.
- McPherson M. J., Quirke P., Taylor G. R. 1992. PCR a practical approach. The practical Approach series, IRL press.
- Nilsen T.W. 1994. RNA-RNA interactions in the spliceosome: Unraveling the ties that bind. *Cell*, 78:1-4.
- Reich C. & Wise J.A. 1990. Evolutionary origin of the U6 small nuclear RNA intron. *Mol Cell Biol*, 10(10):5548-5552.
- Reich C., VanHoy R.W., Porter G.L. & Wise J.A. 1992. Mutatioisn at the 3' splice site can be suppressed by compensatory base changes in U1 snRNA in fission yeast. *Cell*, 69:1159-1169.
- Sawa H. & Shimura Y. 1992. Association of U6 snRNA with the 5'-splice site region of pre-mRNA in the spliceosome. *Gens Dev*, 6(2):244-254.

- Sambrook J., Fritsch E., and Maniatis T. 1989. Molecular cloning. A laboratory manual. 2nd Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Sharp P.A. 1994. Split genes and RNA splicing. *Cell*, 77:805-815.
- Shumyatsky, G. & Reddy, R. 1992. Compilation of small RNA sequences. *Nucleic Acids Research*, 20(suplemento):2159-2165.
- Sogin M.L., Elwood H.J. & Gunderson J.H. 1986. Evolutionary diversity of eukaryotic small-subunit rRNA genes. *Proc Natl Acad Sci USA* 83:1383-1387.
- Sontheimer E.J. & Steitz J.A. 1993. The U5 and U6 small nuclear RNAs as active site components of the spliceosome. *Science*, 264:1989-1996.
- Tani T. & Ohshima Y. 1989. The gene for the U6 small nuclear RNA in fission yeast has an intron. *Nature*, 337(6202):87-90 .
- Tani T. & Ohshima Y. 1991. mRNA-type introns in U6 small nuclear RNA genes: implications for the catalysis in pre-mRNA splicing. *Genes Dev*, 5(6):1022-1031.
- Tarczynski, M.C., Min, J.J., Wood, K.A. & Hellwing, R.J. 1994. Two-minute miniprep method for plasmid DNA isolation. *Bio/Techniques*, 16(3):514-519.
- Wassarman D.A. & Steitz J.A. 1992. Interactions of small nuclear RNA's

with precursor messenger RNA during in vitro splicing. *Science*, 257(5078):1918-1925.

Wise J.A., Tollervey D., Maloney D., Swerdlow H., Dunn E.J. & Guthrie C. 1983. Yeast contains small nuclear RNAs encoded by single copy genes. *Cell*, 35:743-751.

Wise J. A. 1993. Guides to the heart of the spliceosome. *Science*, 262:1978-1979.

Wolff T. & Bindereif A. 1993. Conformational changes of U6 RNA during the spliceosome cycle: an intramolecular helix is essential both for initiating the U4-U6 interaction and for the first step of splicing. *Genes & Development*, 7:1377-1389.

Woollford J.L. & Peebles C.L. 1992. RNA splicing in lower eukaryotes. *Cur Opin Gen Dev*, 2:712-719.

Yu Y.T., Maroney P.A. & Nilsen T.W. 1993. Functional reconstitution of U6 snRNA in nematode cis- and trans-splicing: U6 can serve as both a branch acceptor and a 5' exon. *Cell*, 75(6):1049-1059.

Zucker M. 1989. On finding all suboptimal foldings of an RNA molecule. *Science* Vol. 244(7):48-52.