

169



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

ORGANIZACIÓN DE GENES CODIFICADORES DE LA PROTEINA RIBOSOMAL S4 DE *Trypanosoma cruzi*

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE BIÓLOGA

PRESENTA: MARIANA PÉREZ ESCOBAR

DIRECTOR DE TESIS: DR. ROBERTO HERNÁNDEZ FERNÁNDEZ.



FACULTAD DE CIENCIAS SECCION ESCOLAR



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

M. EN C. ELENA DE OTEYZA DE OTEYZA

Jefa de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo escrito: "Organización de genes codificadores de la proteína ribosomal S4 de Trypanosoma cruzi".

realizado por Mariana Pérez Escobar

con número de cuenta 9557674-5 , quién cubrió los créditos de la carrera de Biología

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis
Propietario

Dr. Roberto José Rafael Hernández Fernández

Propietario

Dra. Ana María Cevallos Gao

Propietario

Dra. Inelda López Villaseñor

Suplente

Dr. Luis Felipe Jiménez García

Suplente

Biol. Jeny Solange Sotuyo Vázquez

FACULTAD DE CIENCIAS
U N A M.

Consejo Departamental de Biología

DRA. PATRICIA RAMOS MORALES



DEPARTAMENTO
DE BIOLOGIA

A mis padres

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la Universidad Nacional Autónoma de México y al Instituto de Investigaciones Biomédicas por la oportunidad que me dieron de obtener mi formación profesional en sus instalaciones.

Al Dr. Roberto Hernández le doy gracias por confiar en mí y permitirme realizar este trabajo con su guía.

A la Dra. Ana María Cevallos Gaos por haber sido una continua guía y ayuda en la preparación de este trabajo.

A la Dra. Imelda López Villaseñor por la realización de la biblioteca genómica de *Trypanosoma cruzi* así como por su ayuda y comentarios acertados para el mejoramiento de este trabajo.

A mis sinodales revisores Dr. Luis Felipe Jiménez García y la Biol. Jeny Solange Sotuyo Vázquez por el tiempo y comentarios dedicados al presente para su mejoramiento.

Agradezco a la QFB Juliana Herrera López por la obtención de las clonas genómicas empleadas y por todas las técnicas que pacientemente me enseñó, así como a la Biol. Lorena López Griego por la continua asistencia técnica.

Finalmente a mis compañeros y amigos: Yetzi Robles Bucio, Elisa Figueroa Angulo, Julio Carrasco Vallejo y Abril Navarrete Mena les agradezco los consejos y ayuda que en algún momento me brindaron así como todos los buenos momentos que hemos pasado y que han hecho el trabajo aún más agradable de lo que es.

INDICE

Lista de Figuras	IV
Lista de cuadros	IV
Lista de abreviaturas empleadas	V
Resumen	VI
1 INTRODUCCIÓN	1
1.1 Ciclo de vida de <i>Trypanosoma cruzi</i> .	2
1.2 LA TRIPANOSOMIASIS AMERICANA	4
1.2a Consideraciones sobre el vector	4
1.2b La enfermedad de Chagas.	4
1.2c Epidemiología	6
1.2d Diagnóstico y tratamiento.	7
1.3 PARTICULARIDADES DE LA BIOLOGIA DE <i>T. cruzi</i>	7
1.3a Biología celular.	7
1.3b Biología molecular y genética.	9
1.3c Transcripción.	11
1.4 EL RIBOSOMA	13
1.4a El cistrón de RNAr en <i>T. cruzi</i> .	13
1.4b Proteínas ribosomales.	15
1.4c La proteína ribosomal S4.	15
1.4d Consideraciones particulares sobre el tema de estudio.	17
2.0 OBJETIVOS	20
2.1 Objetivo general	20
2.2 Objetivos particulares	20
3. MATERIALES Y MÉTODOS.	21
3.1 DEFINICIÓN DE CLONAS GENÓMICAS.	21
3.2 CARACTERIZACIÓN DE LAS CLONAS P811 Y P812.	21
3.2a Preparaciones de DNA a mediana escala (midipreparaciones).	21
3.2b Patrones de restricción.	22
3.3 POSICIÓN DE <i>prS4</i> EN LAS CLONAS GENÓMICAS P811 Y P812.	23
3.3a Preparación del inserto para ser empleado como sonda.	23
3.3b Marcaje del inserto por el método de iniciador al azar.	23

3.3c Southern blot.	24
3.4 SUBCLONACIÓN DE DNA.	25
3.4a Preparación de células competentes.	25
3.4b Purificación del material para subclonar.	26
3.4c Ligación y transformación.	27
3.4d Preparación de DNA a pequeña escala por el método de lisis alcalina.	28
3.5 SECUENCIA DE DNA.	29
3.5a Análisis de las secuencias.	29
3.6 DIGESTIÓN DE FRAGMENTOS NO SECUENCIADOS CON <i>Hinf</i> I.	30
3.7 AMPLIFICACIÓN DE DNA.	30
3.8 NORTHERN BLOT.	30
4 RESULTADOS	32
4.1 Mapas de restricción.	32
4.2 Identificación y subclonación del gen <i>prS4</i> en las clonas genómicas p811 y p812.	35
4.3 Estrategia de subclonación y secuenciación.	38
4.4 Análisis de la secuencia.	40
4.4a Identificación de la copia expresada de <i>prS4</i> .	46
4.4b Análisis indirecto de homología entre las regiones no-secuenciadas de los plásmidos p811 y p812.	47
4.5 Identificación de una región alelo específica.	48
4.5 Niveles de equilibrio de RNAm de <i>prS4</i> .	49
5 DISCUSIÓN	
5.1 Organización genómica de <i>prS4</i> en <i>Trypanosoma cruzi</i> .	51
5.2 Regiones río arriba y río debajo de <i>prs4</i> .	53
6 CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS.	54
7 LITERATURA CONSULTADA.	56

LISTA DE FIGURAS

- 1 Ciclo de vida de *Trypanosoma cruzi*.
- 2 Posición filogenética de *T. cruzi*.
- 3 Trans-splicing.
- 4 Organización del cistrón de RNA de *T. cruzi*.
- 5 Organización esquemática de la proteína ribosomal S4.
- 6 Localización cromosomal de *prS4* en *T. cruzi*.
- 7 Patrones de restricción enzimática de los plásmidos p811 y p812.
- 8 Mapas de restricción de los plásmidos p811 y p812.
- 9 Región de hibridación mínima para S4 en las clonas p811 y p812.
- 10 Mapas de los plásmidos p811 y p812 con la localización de la región de hibridación para S4.
- 11 Estrategia de subclonación y secuencia de los plásmidos p811 y p812.
- 12 Alineamiento de las secuencias obtenidas de los plásmidos p811 y p812.
- 13 Mapas de las regiones secuencias en los plásmidos p811 y p812.
- 14 Patrón de restricción con *Hinf* I de las regiones no-secuenciadas de los plásmidos p811 y p812.
- 15 Southern genómico de *T. cruzi* hibridado con la región intergénica entre copia 1 y copia 2.
- 16 Niveles de equilibrio de RNAm de S4 en *T. cruzi*.

LISTA DE CUADROS:

- 1 Estructura genómica de cinetoplástidos.
- 2 cDNA's aislados de *prS4* en *T. cruzi*.
- 3 Fragmentos generados por endonucleasas de restricción en los plásmidos p811 y p812.
- 4 Identificación de la copia expresada de *prS4* en *T. cruzi*.

LISTA DE ABREVIATURAS EMPLEADAS

°C	grados Celsius
μCi	micro-Curies
μg	micro gramos
μl	micro litros
cpm	cuentas por minuto
dATP	trifosfato de dideoxiadenina
dGTP	trifosfato de dideoxiguanina
dTTP	trifosfato de dideoxitimina
dCTP	trifosfato de dideoxicitosina
DNAc	ácido desoxiribonucleico complementario
EDTA	etilendinitrotetra acético sódico
kDa	kilo Daltones
Kb	kilo bases
LB	medio de cultivo de Luria
Mb	mega pares de bases
ml	mililitros
nm	nanometros
nt	nucleótido
pb	pares de bases
<i>prS4</i>	secuencia codificadora para la proteína ribosomal S4
RNA _m	ácido ribonucleico mensajero
RNA _r	ácido ribonucleico ribosomal
RNA _t	ácido ribonucleico de transferencia
rpm	revoluciones por minuto
S	svedberg
s	segundos
SDS	dodecil sulfato de sodio
SL	spliced-leader
SSC	solución de sales de sodio y citrato
TBE	amortiguador tris-hidroximetilaminometano-boratos-EDTA
TE	amortiguador tris-hidroximetilaminometano-EDTA
UV	radiación ultra violeta
V	volts

RESUMEN

Trypanosoma cruzi es un parásito causante de la enfermedad de Chagas, mal que constituye un problema de salud pública en México y en América Latina. *T. cruzi* presenta mecanismos atípicos en su Biología molecular que sumados al natural interés que este organismo despierta, hacen de él un interesante modelo de estudio. Para determinar con precisión la organización genómica de la proteína ribosomal S4 (*prS4*) en este organismo se obtuvieron clonas genómicas con las regiones codificadoras de la misma, a partir de una biblioteca genómica de *Trypanosoma cruzi*, cepa CL Brenner. Estas clonas fueron caracterizadas por los patrones mostrados al emplear endonucleasas de restricción. Posteriormente a través de ensayos tipo Southern se localizó en estas clonas la posición de las copias del gen que codifica para la proteína ribosomal S4. Las regiones en que se encontró una señal de hibridación a *prS4* fueron secuenciadas. Se encontró que en *T. cruzi* hay 3 copias de este gen éstas son idénticas en sus regiones codificadoras. Dos de las copias se encuentran organizadas de "cabeza a cola" en forma consecutiva separadas por una pequeña región intergénica, la tercera copia se halla en un alelo diferente. Resultó notable encontrar que las clonas son idénticas salvo por la presencia de dos copias de *prS4* en una de ellas así como por la región que separa a las dos copias consecutivas. Debido al atípico procesamiento por el cual maduran los RNAm en estos organismos se observó que por lo menos en teoría se generarían tres RNAm diferentes, el significado de esto no se conoce. También se encontró que los niveles de equilibrio del RNAm de *prS4* varían a lo largo de un cultivo de epimastigotes lo que representa una modulación de la expresión génica el punto de control de este fenómeno lo desconocemos.

**ORGANIZACIÓN DE GENES
CODIFICADORES DE LA PROTEÍNA
RIBOSOMAL S4 EN *Trypanosoma cruzi***

1 INTRODUCCION

La enfermedad de Chagas constituye un problema de salud pública ampliamente distribuido en América Latina (13). Su agente etiológico es el hemoflagelado parásito *Trypanosoma cruzi*, protozooario perteneciente a la familia Tripanosomatidae, del orden Kinetoplastida (10, 14, 31, 49). La enfermedad de Chagas constituye la mayor parasitosis del continente y la tercera a nivel mundial, antecedida sólo por la malaria y la schistosomiasis (56). En 1940 Mazzotti hizo el primer reporte de este mal en México (34). Es un padecimiento endémico, en los estados del sur de México, como Oaxaca y Chiapas (13).

1.1 Ciclo de vida

El *Trypanosoma cruzi* exhibe un ciclo de vida digenético (Fig. 1) compartido entre un hospedero invertebrado que hace las veces de vector (himenópteros de la subfamilia Triatominae, "chinches besuconas") y un hospedero vertebrado: el humano, ganado o perros (10, 14). El ciclo inicia cuando una chinche se alimenta de sangre de un individuo infectado con tripomastigotes circulantes, los cuales se transforman en epimastigotes en el tubo digestivo del triatómido, quienes constituyen la forma replicativa en el vector. De una a dos semanas después de la infección, dependiendo de la temperatura, los epimastigotes se diferencian a tripomastigotes metacíclicos, que son la forma infectiva (33, 50). Los tripomastigotes son expulsados del vector en sus heces y se introducen en el hospedero vertebrado a través de las mucosas o por abrasiones en la piel. Una vez dentro del mamífero los tripomastigotes invaden rápidamente células del sistema reticulo-endotelial, musculares esqueléticas y cardíacas, entre otros tejidos (6, 33). Intracelularmente, los tripomastigotes se diferencian a amastigotes, los cuales se multiplican por fisión binaria y forman un pseudoquistes. Posteriormente se rediferencian a tripomastigotes

circulantes o procíclicos. Estos tripomastigotes se liberan por la lisis de células infectadas aunque en algunas ocasiones también se pueden liberar amastigotes. Los amastigotes poseen la capacidad de infectar células fagocíticas, mientras que los tripomastigotes pueden reinfectar otras células o bien, continuar el ciclo con la intervención de otra chinche (6, 33, 50).

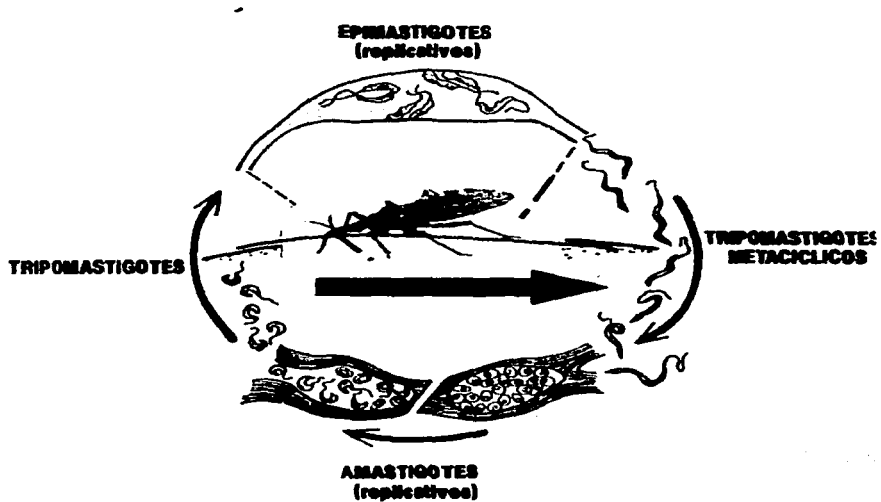


Figura 1: Ciclo de vida de *Trypanosoma cruzi*

1.2 LA TRIPANOSOMIASIS AMERICANA

1.2a Consideraciones sobre el vector

El mecanismo más frecuente de transmisión del *T. cruzi* al hombre es el vectorial. El vector responsable de la transmisión de este parásito es un insecto hemíptero hematófago de la subfamilia Triatominae (13, 33).

El primer registro de triatómidos en América, data de 1590, cuando Lizárraga los describió en su viaje a Argentina (15). Éstos hemípteros, también conocidos como vinchucas o chinches voladoras son insectos alados o ápteros, dependiendo de su estadio de vida, poseen un aparato bucal suctopizador, son ovíparos y de metamorfosis gradual. En principio son organismos de ambiente selvático, pero cuando el hombre invadió su ecosistema algunas especies se adaptaron al ambiente peridoméstico y entraron en convivencia con los humanos (2, 13, 15). Se han descrito aproximadamente cien especies en la familia y todas ellas son vectores potenciales del *T. cruzi* pero sólo doce son vectores comprobados (15). En México, las especies con mayor responsabilidad epidemiológica son *Triatoma dimidiata* y *Rhodnius prolixus*. Los factores que determinan que una chinche sea un vector eficiente son los siguientes: Ser antropofílica, alcanzar alta densidad en la vivienda, poseer un intervalo corto entre la ingesta de sangre y la defecación, estar adecuada para vivir en el ambiente peridoméstico, y tener alta capacidad metacíclica (14, 27, 33).

1.2b La enfermedad de Chagas

La enfermedad de Chagas tiene una fase aguda inicial con duración de varias semanas, y una fase crónica que persiste por la vida del huésped. Durante la fase inicial de la infección el parásito invade células y se multiplica rápidamente ya que no hay reacción inflamatoria alrededor de las células parasitadas, ni una respuesta inmune específica. Los parásitos se diseminan a través de la circulación pudiendo infectar todo tipo de células nucleadas, sin embargo tienen marcada preferencia por células

musculares cardiacas, macrófagos neuronas y tejido glial (células de soporte del sistema nervioso). La ruptura de las células parasitadas provoca una intensa respuesta inflamatoria que en casos severos, causan miocarditis aguda, destrucción de ganglios autonómicos del tracto gastrointestinal y meningoencefalitis.

Con el desarrollo de inmunidad humoral y celular, el número de parásitos en sangre y en los tejidos disminuye dramáticamente hasta llegar a no ser detectables con los métodos usuales de diagnóstico así queda instalada la fase crónica. El empleo de métodos de diagnóstico más sensibles parece indicar que las personas pueden permanecer infectadas de por vida con parásitos tanto en sangre como en los tejidos. La mayoría de los individuos infectados crónicamente permanecen asintomáticos y el daño tisular se limita a pequeños focos de inflamación y de fibrosis con pérdida limitada de los ganglios autonómicos. En los casos de cardiopatía chagásica severa, hay destrucción importante de las células musculares cardiacas y del tejido de conducción con fibrosis difusa. En los pacientes con afección gastrointestinal hay destrucción severa de los ganglios autonómicos (10, 27, 39, 51).

Una de las mayores dificultades para estudiar la patogenia de la enfermedad de Chagas es su lenta evolución. La enfermedad generalmente se expresa de 15 a 30 años después de la entrada del parásito al organismo. Los estudios hechos hasta el momento sugieren que el desarrollo de la enfermedad podría estar asociado a seis posibles mecanismos patogénicos:

- a) lesión directa de tipo mecánico, por parasitismo de las células por el *T. cruzi*
- b) lesión producida por toxinas liberadas por el parásito
- c) alteraciones del sistema nervioso autónomo
- d) lesión producida por respuesta autoinmune
- e) lesión microvascular

Sin embargo en vista de que ninguna de estas teorías explica por sí misma lo que ocurre en la enfermedad, no es aventurado sugerir que podrían ser varios los mecanismos involucrados. De aquí se desprende la teoría combinada o mixta, que involucra la participación de todos los mecanismos arriba mencionados (27, 39, 48).

1.2c Epidemiología

Aún cuando la enfermedad de Chagas es exclusiva del continente americano, cerca de 90 millones de personas están en riesgo de infección. La OMS estima que hay 18 millones de infectados (56). Se han registrado casos desde el sur de EE.UU. donde tal vez hay 50,000 infectados, hasta Argentina, donde junto con Bolivia se encuentra la mayor prevalencia, ya que el 63% de los donadores de sangre son seropositivos para *T. cruzi* (43).

En México, Schofield estimó en 1985, que pueden existir cuatro millones de personas infectadas. La encuesta nacional de epidemiología de 1987, demostró que la enfermedad tiene una distribución heterogénea, y que la prevalencia va del 0.1% para estados como Jalisco hasta 5% para Chiapas y Oaxaca, lo que se relaciona con el ambiente ecológico y social asociado a esta zoonosis (presencia de triatómidos y condiciones para su anidación en el ambiente peridoméstico) (13, 39, 51). Los individuos infectados constituyen un riesgo de transmisión pues la enfermedad puede contagiarse también por transfusiones sanguíneas y/o transplante de órganos. Se ha reportado en los bancos de sangre de los estados de Morelos y Puebla, una seroprevalencia del 17% (39, 51).

1.2d Diagnóstico y tratamiento

La OMS, recomienda el uso de por lo menos dos métodos para un diagnóstico acertado. El más común y confiable es el xenodiagnóstico, sin embargo en la fase crónica de la enfermedad resulta muy difícil detectar la presencia del parásito por métodos convencionales por lo que se precisa de otros de mayor sensibilidad como la inmunohistoquímica, PCR o hibridación *in situ* (13, 14, 48, 51).

Cuando en 1969 salió al mercado el nitrofurfuriliden-amino (nifurtimox), el tratamiento de la enfermedad de Chagas pareció entrar en una etapa optimista. En ese mismo año se inició el ensayo de otra droga, una nitroimidazolacetamida (benzinidazol). El uso de estas drogas disminuye la parasitosis y los títulos serológicos hasta en un 80%; en un seguimiento prolongado sin embargo los efectos colaterales y la magnitud de los mismos provocaron que estos fármacos entraran en desuso desde 1991. El allopurinol permanece como una buena opción en casos de Chagas crónico; se administra en altas dosis y sólo cuando el paciente no tiene comprometida la función renal (44). Estudios más profundos en la biología del *T. cruzi* y sus peculiaridades bioquímicas y moleculares harán posible el desarrollo de nuevos fármacos contra este organismo. En este momento parecen ser prometedores el uso de derivados púricos e inhibidores de la trypanotión reductasa (48). Finalmente aunque con reservas, hay autores que proponen una cura espontánea, aún cuando admiten que posiblemente ocurra en un bajo porcentaje de los enfermos (57).

1.2 PARTICULARIDADES DE LA BIOLOGIA DE *Trypanosoma cruzi*

1.3a Biología Celular

Además de la importancia médica que representa este grupo de organismos, los cinetopláستidos han llamado la atención por lo atípico de su biología. Es pertinente tomar en cuenta su muy temprana divergencia

del linaje evolutivo eucarionte para poder entender estas peculiaridades (31, 37) (Figura 2). De manera general *T. cruzi* posee las características y organelos de un eucarionte típico: es una célula con una membrana plasmática, un núcleo, retículo endoplásmico y aparato de Golgi, estos últimos poco desarrollados. Posee tres estadios o formas: Epimastigote, tripomastigote y amastigote. Los dos primeros son formas alargadas que poseen un flagelo aunque en diferente posición, el tercer estadio es redondeado, carece de flagelo y a diferencia de los primeros que se localizan extracelularmente; el amastigote es una forma intracelular (10, 31, 37).

En estas células existe sólo una mitocondria que ocupa gran parte del volumen celular. Un rasgo prominente en estos organismos y que le da nombre al orden es el cinetoplasto, estructura formada por el DNA mitocondrial. Este es excepcional en su contenido y organización: constituye (dependiendo de la especie) del 15 al 30% del DNA celular total y se halla organizado formando una red de moléculas circulares concatenadas de dos tamaños diferentes, los minicírculos y los maxicírculos. Los primeros forman la mayor parte de esta estructura, ya que son entre 5,000 y 10,000 moléculas por célula con un tamaño de 2500 pares de bases. Su función es codificar para RNAs pequeños que participan como guías en el procesamiento de RNAm mitocondriales. En cuanto a los maxicírculos, hay entre 25 y 50 copias por célula y su tamaño se encuentra entre 30,000 y 50,000pb; codifican para RNAr, RNAt y para enzimas mitocondriales (10, 37). Lo más inusual de estas moléculas es que se hallan "incompletas", pero son modificados por un proceso llamado edición en el que se añaden o remueven uridinas de forma postranscripcional, generando así codones de inicio y término para dar así sentido a la traducción (1, 3).

Los glicosomas son organelos que sólo se han descrito en tripanosomatídeos. En ellos se concentran parte de las enzimas e intermediarios de la glicólisis. Aparentemente se trata de peroxisomas

prototípicos o primitivos (35). Otro aspecto notable de estos organismos es un conjunto de microtúbulos subpeliculares organizados a manera de red, localizados por debajo de toda la membrana plasmática, excepto en el área por donde emerge el flagelo, el saco flagelar, que es donde ocurren todos los fenómenos de exo y endocitosis. Los microtúbulos de este "corset" se conectan entre sí y le dan rigidez al parásito (33, 37).

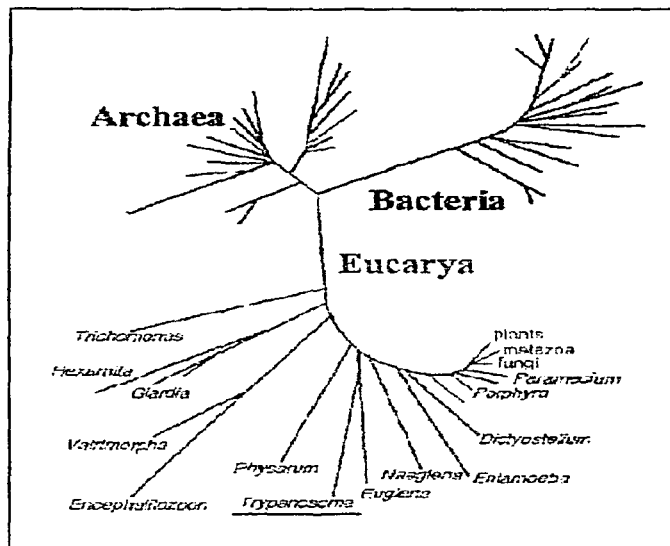


Figura 2: Posición del género *Trypanosoma* en un árbol filogenético construido en base al 18 SRNAr. Como puede notarse se localiza en las primeras ramas de evolución Eucariote. Tomado de <http://phylogeny.arizona.edu/tree/>

1.3b Biología molecular y genética

De manera general se considera que los tripanosomatídeos poseen genomas pequeños, 4 a 6 veces el genoma de *Escherichia coli* (4.2×10^6 pb) (28, 45). Poseen además copias múltiples de genes, ya sea arregladas en tandem (es decir varias copias de un mismo gen una detrás de otra con separaciones de 100 a 500 pb), o localizadas en diferentes cromosomas;

Resultan raros los genes presentes en una o dos copias, más aún si se hallan en diferentes loci (cuadro 1) (45).

CLASE	EJEMPLOS		
	<i>Trypanosoma a brucei</i>	<i>T. cruzi</i>	<i>Leishmania</i>
1 a 3 copias en un locus	PG1, ALD, gGAPDH	ALD, gGAPDH	DHFR, gGAPDH
1 a 4 copias en dos loci, en cromosomas homólogos	RNA polIII, PARP	Actina ?	?
Multicopia en una locus	UBI; SL, THT β -TUB	SL, UBI	Gp63, RNAr
Multicopia en más de un locus, en cromosomas homólogos o no homólogos.	RNAr	SL, RNAr	β Tub
Familia génica, muchos loci, diferentes cromosomas.	VSG	Gp85	?

Cuadro 1: Organización de genes en Cinetopástitos : Se muestran diferentes organizaciones génicas reportadas. Abreviaturas: PG1, fosfoglucoasa isomerasa; ALD, aldolasa; gGAPDH, gliceraldehido fosfato deshidrogenasa glicosomal; DHFR, dihidrofolato reductasa; PARP, proteína repetitiva ácida procíclica; UBI, ubiquitina; SL, gen del RNA spliced leader; THT, transportador de hexosa de *Trypanosoma*; β -TUB, β tubulina; gp63, glicoproteína de superficie de 63 kDa; VSG, glicoproteína variable de superficie; gp85, glicoproteína de superficie de 85 kDa. (Modificado de Swindle et al 1996 (45).

El núcleo de estos organismos no se comporta de manera típica ya que durante la división celular la membrana nuclear no se desintegra y tampoco hay condensación de cromosomas (37). A pesar de esto es posible realizar un "cariotipo molecular parcial", por uso de electroforesis en gel de pulsos alternos (PFGE). Las bandas así separadas se consideran cromosomas y se nombran con números romanos iniciando por el más pequeño. El cariotipo así realizado reveló que en *T. cruzi* existen 12 bandas cromosomales principales que miden de 1 a 3.5Mb; el que co-migren más de una banda no es un evento raro por lo que la resolución que brinda este método para observar separación de genes no es muy alta. Además de las bandas principales existen 8 bandas intermedias que van de 0.45 a 1Mb (7, 20). *T. cruzi* es un organismo ampliamente reconocido como diploide en vista de que pruebas de hibridación con diferentes genes muestran dos bandas. El tamaño del genoma de *T. cruzi* se ha calculado en 87 Mb. (7, 45).

1.3c Transcripción

Aún cuando en la mayoría de los eucariontes la transcripción de genes da como resultado pre-RNAm monocistrónicos que contienen exones (secuencias codificadoras) e intrones (secuencias no codificadoras), éstos luego son procesados por cis-splicing para producir RNAm maduros a los que se les han removido los intrones. El RNAm maduro posee dos modificaciones: una metil-guanosina en posición 5' (5'cap) y un segmento de adeninas en posición 3' (28), sin embargo el proceso de maduración de RNAm en tripanosomatídeos presenta particularidades que lo distinguen: la transcripción es policistrónica, no hay intrones y por lo tanto no hay cis-splicing. En lugar de esto hay un proceso llamado trans-splicing (figura 3) el cual fué descrito primero en cinetoplástidos y ahora se sabe que ocurre también en euglénidos, tremátodos y nemátodos (4). En el trans-splicing participan 2 moléculas precursoras independientes: por un lado el

transcrito primario policistrónico (secuencias codificadoras separadas entre sí por 100 a 500 pb) y por otro lado una secuencia no codificadora de 39 nucleótidos que contiene el "cap" en su extremo 5' (splice leader SL). Aún cuando en una misma posición cromosomal existen varias copias génicas del SL cada una es transcrita de manera independiente.

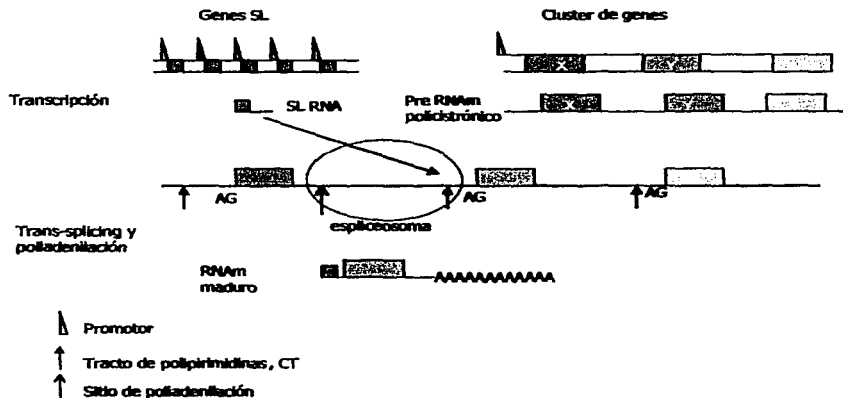


Figura 3: Trans-splicing: Intervienen dos moléculas de diferente procedencia. El pre-RNAm policistrónico y el splice-leader (SL). La maquinaria que lleva a cabo el splicing (spliceosoma) reconoce una secuencia de polipirimidinas junto con un AG adyacente a éste presentes río arriba del ATG iniciador de cada gen, como señal de corte y aceptación del SL y simultáneamente localiza el sitio de poliadenilación del gen ubicado río arriba. Cada RNAm que madura queda constituido por el SL con su 5' Cap, la región codificadora de cada gen, una fracción de la región no traducida hacia el extremo 3' de cada gen y la cola de adeninas

Para la maduración del transcrito primario se requiere de señales presentes en sus regiones intergénicas. En la región río arriba de cada gen existe una secuencia de pirimidinas (citosinas y timinas), delante del cual se encuentra un dinucleótido AG, éste es la señal de corte y aceptación del SL. Cuando el SL es añadido al extremo 5' de RNAm contribuye con el 5' CAP que será reconocido por la maquinaria de traducción. El extremo 3'

del RNAm de cada gen particular se forma cuando al gen que se localiza río abajo se le adiciona el SL. Hasta el momento no se ha descrito en estos organismos una señal consenso de poliadenilación, más bien se cree que la adición de adeninas es dirigida por la localización del sitio aceptor de splicing, el AG que se encuentra río abajo. Todos estos eventos son catalizados por un mismo complejo molecular, el spliceosoma y se llevan a cabo de forma simultánea (10, 11, 45, 49). Una vez que los mensajeros han madurado, éstos son exportados del núcleo para su traducción la que resulta ser típica como en cualquier otro eucarionte (5, 45).

En nuestro laboratorio tenemos el interés de estudiar los procesos moleculares de la biosíntesis de ribosomas y su regulación en *Trypanosoma cruzi*.

1.4 EL RIBOSOMA

El ribosoma es la maquinaria responsable del proceso de traducción. Está constituido por dos subunidades las cuales se designan por su coeficiente de sedimentación: la pequeña (40S) y la mayor (60S) en organismos eucariontes. La subunidad pequeña está formada por la molécula de RNAr tipo 18S y 33 proteínas, mientras que la subunidad mayor está constituida por las moléculas de RNAr 5 S, 5.8 S, y 28 S así como por 50 proteínas. La biogénesis del ribosoma requiere del ensamblaje equimolar de sus componentes moleculares (28, 30).

1.4a Cistron de RNA en *Trypanosoma cruzi*.

De manera general en los organismos eucariontes los genes de las moléculas 18S, 5.8S y 28S forman una unidad de transcripción fundamental o cistrón de RNAr y se transcriben en un RNA precursor común. Este precursor ribosomal incluye espaciadores transcritos internos y externos, los cuales son eliminados para generar las moléculas

de RNAr independientes (41). Las regiones codificadoras para el RNA 5S generalmente no forman parte de la unidad de RNAr sino que constituyen un locus independiente (17). En tripanosomatídeos se ha encontrado que su RNAr tipo 28S presenta un procesamiento atípico (19, 22), ya que se originan dos moléculas grandes (34S α y 24S β) y cuatro moléculas pequeñas (S1, S2, S4 y S6). El análisis de las secuencias y las estructuras secundarias de estas seis moléculas de RNAr ha permitido establecer su analogía con los distintos dominios del RNA 28S típico encontrándose que las moléculas S2, S4 y S6 son análogas del dominio VII de la molécula 28S (54). Por otra parte la molécula S3 es equivalente al RNA 5.8S (18) y la molécula S5 es análoga al RNA 5S de otros organismos (24). En los tripanosomatídeos como en la mayoría de los eucariontes el RNA S5 no forma parte de la unidad fundamental de transcripción (24). Una organización similar para el cistron de RNAr ha sido descrita para *T. brucei* (54) y *Chritidia fasciculata*, esto parece indicar que se trata de un arreglo génico característico del orden Kinetoplastida (21).

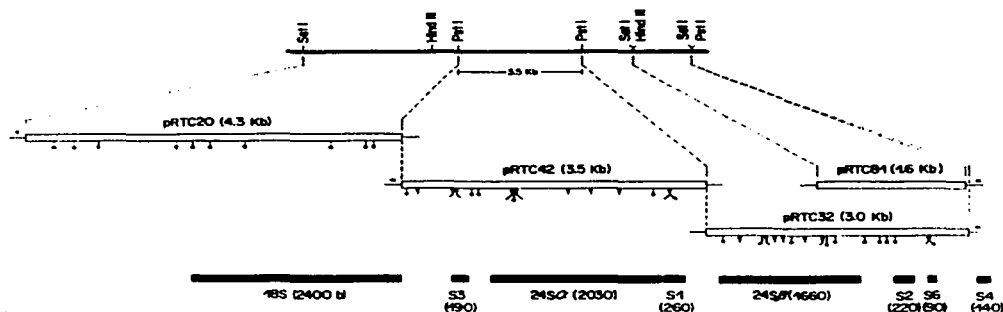


Figura 4: Unidad de transcripción mayor de RNAr en *Trypanosoma cruzi*. Se muestra la organización. Tomado de Hernández, R. et al 1988 (23)

Las células eucariontes presentan de 100 a 5000 copias de la unidad fundamental de transcripción de RNAr, organizadas en sucesiones lineales (arreglo en "tandem"), en uno o varios cromosomas o en elementos extracromosomales (38). En el caso particular de *T. cruzi* existen cerca de 100 copias génicas para la unidad de transcripción mayor (8) (figura 4). Se ha demostrado que ésta en *T. cruzi* mide alrededor de 10Kb y cada una de ellas está separada de la siguiente por aproximadamente 20Kb (21, 24).

1.4b Proteínas ribosomales

Actualmente se acepta que las proteínas ribosomales contribuyen al plegamiento correcto de las diferentes especies de RNAr que forman parte del ribosoma así también mantienen la estructura tridimensional del mismo. El componente catalítico lo constituyen las moléculas de RNAr incorporadas (28) (9).

Las proteínas ribosomales son clasificadas empleando dos criterios, el primero se basa en la subunidad a la cual pertenecen L (large), si se encuentran en la subunidad mayor y S (small), si participan en la subunidad menor. El segundo criterio es de acuerdo a su patrón electroforético en un gel de dos dimensiones (25, 55). En su mayoría las proteínas ribosomales son básicas, pero existe un grupo menor de proteínas ácidas que son llamadas P, por ser fosforiladas (55). Las proteínas ribosomales de *T. cruzi* que más se han estudiado son de tipo ácido, pero también existen reportes de proteínas de tipo básico (23) (25).

1.4c Proteína ribosomal S4

Con una masa molecular de 23 kDa, S4 es una de las proteínas ribosomales más grandes e importantes (30). Esta proteína ha sido estudiada desde un punto de vista estructural principalmente en sistemas bacterianos, por lo que la descripción de su estructura corresponde a como

está organizada en estos organismos. En el ribosoma procarionte S4 pertenece a la subunidad 30S y junto con las proteínas S7, S8, S15 y S17 controla los estadios iniciales del plegamiento de la molécula de RNAr 16S y es crucial para determinar la arquitectura de la subunidad pequeña (30, 40) (53). S4 se localiza en la interfase entre las subunidades ribosomales, formando parte del llamado "dominio de fidelidad" (23, 30). S4 está involucrada en el reconocimiento de los 3 tipos de RNA: mensajero, ribosomal y de transferencia. Aparentemente las regiones de reconocimiento para el RNAr 16S están distribuidas en dos dominios: El primero incluye los residuos no continuos 42 al 91 y 180 al 200 separados por el dominio 2 que abarca los residuos 92 al 179. En particular parece ser el dominio 1 (residuos 48-104) el que interactúa más directamente con el RNAr 16S. La región de reconocimiento del RNAm se localiza entre los residuos 48 al 177 y en la interacción con el RNAt participan los residuos 1 al 32 (figura 5) (26, 30, 32, 40, 42).

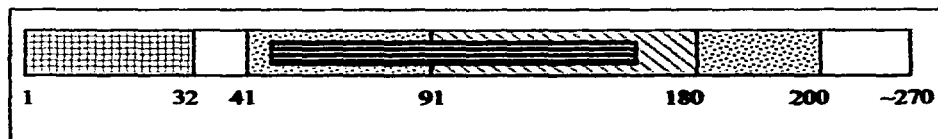


Fig. 5: Organización esquemática de la proteína ribosomal S4. Demarcación de sus regiones funcionales. Las áreas punteadas en verde corresponden al dominio 1 de reconocimiento al 16 S ribosomal, el área rayada en azul es el dominio 2 que reconoce RNAr 16 S, la zona cuadriculada naranja es la involucrada en interacción con el RNAt y región de líneas negras participa en reconocimiento al RNAm.

En cuanto a la organización genómica de esta proteína se ha descrito en algunos organismos eucariotes como *Dictyostelium discoideum* (47), *Saccharomyces cerevisiae* (46), *Leishmania major*, rata (12, 36) y humano (16), por mencionar algunos. En *S. cerevisiae* se localizan dos copias de este gen, entre ellas existen 14 cambios a nivel de nucleótidos, pero estas diferencias no generan cambios a nivel de aminoácidos. Se ha probado que el producto de estos genes es esencial para este

organismo. Aún cuando la viabilidad ocular se puede mantener con una sola copia, la carencia de una de ellas disminuye la tasa de crecimiento (46). Por lo que respecta a los cinetoplastidos se sabe que en *Leishmania major* existen dos copias de *prS4* organizadas en tandem con una separación entre ellas de una kilobase (www.sanger.ac.uk/Projects/L_major/orinaps/LMFL2464orfs.shtml).

1.4d Consideraciones particulares sobre el tema de estudio

Como se mencionó anteriormente en nuestro laboratorio se tiene como interés general la identificación y análisis molecular de genes esenciales cuyos productos se integren al ribosoma de *T. cruzi*. Con este fin se determinó la secuencia de dos cDNA para la proteína S4 provenientes de una biblioteca de cDNA de *T. cruzi*, cepa Tulahuén. Por medio de una sonda heteróloga de *T. brucei* específica para *prS4* se encontraron dos mensajeros correspondientes en *T. cruzi*, uno de 924 pb y otro de 903 pb. Resultaron ser idénticos en secuencia salvo por 21 nucleótidos adicionales presentes en la región 3' no traducida del más largo (cuadro 2) (23). Esto condujo a la pregunta de si se trata de dos genes diferentes o de dos sitios de poliadenilación de un mismo gen.

```

ps4-1  aactaacgct attattgat acagtttctg tactatattg tgagttgcag
ps4-2  aactaacgct attattgat acagtttctg tactatattg tgagttgcag

ps4-1  ctcttttgta ttatgaccaa ..... aggcacgaaa ataggtgcag
ps4-2  ctcttttgta ttatgaccaa ..... aggcacgaaa ataggtgcag

ps4-1  agcaactttg tttttaattt tattttgatt attttttttt ttttgcattc
ps4-2  agcaactttg tttttaattt tattttgatt attttttttt ttttgcattc

ps4-1  gtgaactttt ctgttcattg ttuc
ps4-2  gtg

```

Cuadro 2 cDNA identificados correspondientes a *prS4* en *Trypanosoma cruzi*.

En color azul se observa la secuencia del miniexón o "splice-leader", en rojo parte de la región no traducida 5' (5' UTR) que se conserva en el RNAm maduro y en verde está la región no traducida 3' (3'UTR). En negro subrayado se observa la secuencia codificadora de S4 en forma abreviada.

Por lo anterior y con la intención de conocer el número de veces que se halla representado *prS4* en el genoma de este organismo se realizó un análisis tipo Southern de DNA genómico de *T. cruzi* digerido con algunas endonucleasas de restricción que no reconocen sitios en el interior de la región codificadora de *prS4* (*EcoR* I, *EcoR* I.*Sst* I, *Sst* I-*Cla* I), se obtuvieron dos bandas de hibridación lo que apoyó la idea de que se trataba de dos copias de un mismo gen (25). Para determinar la posición cromosomal de estas señales se realizó una separación de bandas cromosomales de *T. cruzi* por medio de una electroforesis en gel de campos alternos transversos (PFGE) y ésta se hibridó con la misma sonda anteriormente empleada. Se encontraron dos señales de hibridación en dos cromosomas de diferente tamaño (figura 6) esto apoyó la hipótesis de que *prS4* se hallaba en dos alelos (25).

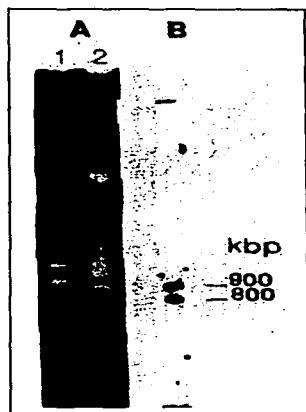


Figura 6: Localización cromosomal de *prS4* en *T. cruzi*. Panel A: Electroforesis cromosomal de *T. cruzi* teñido con bromuro de etidio. 1) Marcador de peso molecular: Cromosomas de *Sacharomyces cerevisiae*. 2) DNA cromosomal de *T. cruzi*, separado por electroforesis en gel de campos alternos transversos (PGFE). En el panel B se observa la hibridación de S4 con 2 bandas cromosomales (25).

La intención de realizar reemplazos génicos de *prS4* para determinar su carácter de esencial en *T. cruzi*, creó la necesidad de conocer con exactitud la estructura, el número de copias y la posición de este gen en el genoma de este organismo. Para esto se decidió emplear clonas genómicas. El presente trabajo describe a detalle la organización genómica de las

secuencias codificadoras de S4 en *T. cruzi*, a partir de dos clonas genómicas obtenidas de una biblioteca de DNA de *T. cruzi* cepa CL Brenner.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo general

Caracterizar la organización de secuencias codificadoras de la proteína ribosomal S4 en *Trypanosoma cruzi* y caracterizar su expresión durante el crecimiento.

2.2 Objetivos particulares

2.2a Determinar el número de copias del gen *prS4* en *Trypanosoma cruzi* mediante el empleo de clonas genómicas.

2.2b Señalar la organización de las copias de *prS4* así como las diferencias y/o semejanzas entre ellas.

2.2c Determinar si las copias de *prS4* se encuentran en regiones genómicas homólogas.

2.2d Localizar los sitios de procesamiento de la(s) copia(s) de *prS4* expresadas.

3 MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 DEFINICIÓN DE CLONAS GENÓMICAS

A lo largo de este trabajo se hará mención continua de los plásmidos p811 y p812, obtenidos por la QFB Juliana Herrera López. Son clonas genómicas con extremos *EcoR* I, y contienen las regiones codificadoras para la proteína ribosomal S4 (*prS4*). Estas clonas se obtuvieron a partir de la búsqueda en una biblioteca genómica de *Trypanosoma cruzi* cepa CL Brenner, construida en el vector λ -ZAP II (Lambda ZAP II predigested vector kit, Stratagene) elaborada por la Dra. Imelda López Villaseñor y corresponden a los dos sitios identificados para *prS4* encontrados en el genoma de *T. cruzi*. El tamizaje se hizo empleando como sonda uno de los cDNA de la proteína ribosomal S4 de *T. cruzi* (pS4-2, copia corta) obtenidos por Sergio Palacios. El tamaño del inserto del plásmido p811, es de 8.5 Kb y de p812 es de 7.5 Kb.

3.2 CARACTERIZACIÓN DE LAS CLONAS p811 y p812.

3.2a Preparaciones de DNA a mediana escala (midipreparaciones).

Para realizar digestiones con endonucleasas de restricción o para subclonar fragmentos de los plásmidos originales es decir p811 y p812, fué necesaria la purificación de DNA de los mismos, ésta se realizó a través del método de purificación de plásmidos de QIAGEN (QIAGEN plasmid purification kit), protocolo basado en una modificación del procedimiento de lisis alcalina seguido de la unión del DNA plasmídico a la resina de intercambio aniónico QIAGEN, bajo las condiciones apropiadas de pH y baja salinidad. Las impurezas de bajo peso molecular, RNA y proteínas, son eliminadas con un lavado de mediano contenido de sales, mientras que el DNA plasmídico es eluido de la columna de resina en un amortiguador de alto contenido en sales y finalmente concentrado y desalado en una precipitación con isopropanol.

De una preparación de bacterias transformadas con el plásmido deseado y conservadas en glicerol al 50 % a -70°C se tomó una asada para inocular 25 ml de medio de cultivo LB pH 8 (triptona 1%, extracto de levadura 0.5%, NaCl 0.5%, TRIS 10mM), se dejó crecer a 37°C por toda la noche (12 a 16 horas en agitación vigorosa); las bacterias se cosecharon por centrifugación a 6 krpm durante 15 minutos a 4°C en un rotor Sorvall SS34. El sobrenadante fue eliminado, mientras que el botón celular fue ligeramente disgregado. A partir de este punto se procedió de acuerdo con el instructivo de la casa comercial y con los reactivos y soluciones incluidas en el kit. El DNA obtenido así, finalmente fue resuspendido en un volumen apropiado de agua desionizada estéril ($\sim 100 \mu\text{l}$). El rendimiento de cada preparación y su pureza se determinó por espectrofotometría UV (a 260 nm) y por su inspección en geles de agarosa 0.8%.

3.2b Patrones de restricción

Para ubicar sitios de corte reconocidos por endonucleasas de restricción en los plásmidos p811 y p812, éstos fueron digeridos con las siguientes enzimas: *Cla*I, *Eco*R V, *Xba*I, *Spe*I, *Sma*I, *Hind* III, *Sst*I, *Xho*I, *Not*I, *Kpn*I y *Pst*I. Las digestiones de DNA se realizaron de acuerdo a las recomendaciones de la casa comercial (GibcoBRL Life-technologies). Las reacciones se realizaron como a continuación se describe: 5 μg de DNA plasmídico (p811 y p812), 1.5 μl de enzima (10u/ μl) y 2 μl de buffer de reacción 10x, específico para cada enzima, agua estéril suficiente para un volumen final de 20 μl . Las reacciones se incubaron a 37°C durante 5 horas. Para fijar algunos sitios en un mapa se recurrió a reacciones empleando dos enzimas (digestiones simultáneas o subsecuentes). Las reacciones se analizaron en geles de agarosa 0.8% y se sometieron a una diferencia de potencial de 75 Volts en una cámara de electroforesis horizontal (11x14, Gibco Life-technologies), durante 4 horas. Los geles

fueron teñidos en una solución de bromuro de etidio 0.5 µg/ml y después fueron fotografiados expuestos a luz UV.

3.3 POSICIÓN DE *prS4* EN LAS CLONAS GENÓMICAS p811 Y p812

Con la intención de localizar los genes *prS4* en las clonas genómicas se realizaron ensayos tipo Southern buscando una señal específica.

3.3a Preparación de inserto para ser empleado como sonda.

El plásmido pS4-2 contiene el cDNA con la secuencia codificadora completa para la proteína ribosomal S4 de *T. cruzi* (copia corta). El tamaño del inserto es de 945 pb. De este plásmido se digirieron 6 µg para separar el inserto del vector pBluescript KS-, esto para emplearlo como sonda de hibridación. Los productos de digestión se separaron en un gel de agarosa 0.8% en TBE (amortiguador de Tris hidroximetil aminometano boratos EDTA.). Posteriormente se cortó la banda de interés y se purificó separándola de la agarosa. El DNA se limpió de impurezas realizando tres extracciones orgánicas secuenciales con fenol, fenol-cloroformo en una mezcla 1:1 y cloroformo, para finalmente precipitar el DNA en etanol 100%. La concentración se calculó por espectrofotometría y por análisis en un gel de agarosa.

3.3b Marcaje radiactivo del inserto mediante el método del iniciador al azar

El DNA fué marcado con ³²[P] dCTP, por uso del método de "iniciador al azar" (Random primer DNA labeling system, Gibco BRL Life-technologies). Esta técnica está basada en la incorporación de deoxicitosina trifosfato [α]³²P (dCTP) a partir de hexanucleótidos iniciadores no específicos y con la ayuda del fragmento Klenow de la DNA polimerasa I. La reacción "random primer" se llevó a cabo, partiendo de 15 nanogramos de inserto en un volumen de 12 µl de TE y se desnaturalizó a 96°C durante 10 minutos. Se

agregaron 3 μ l de una mezcla de dATP, dGTP, dTTP, 2 μ l de amortiguador de reacción, 5 μ l de dCTP[α]-³²P (50 μ Ci totales) y 2 μ l de polimerasa Klenow (1u/ μ l)(Gibco BRL Life-technologies). Esta reacción se incubó a 37°C durante una hora. La reacción se detuvo agregando 2 μ l de EDTA 0.2 M, pH 8.0 y se aforó hasta un volumen final de 125 μ l con TE. La sonda se purificó a través de una columna de Sephadex G-50 hidratada y empaquetada en TE. Debajo de ésta se colocó un tubo Eppendorf de 500 μ l para coleccionar la sonda. La columna con la sonda fué centrifugada por 5 minutos a 2 krpm. La radioactividad incorporada se determinó con la ayuda de un contador de centelleo. Esta sonda fue etiquetada como S4. Justo antes de emplear la sonda en diferentes ensayos, se desnaturalizó calentando a 96°C durante 12 minutos. Después de emplearla se guardó a -20 °C.

3.3c Southern blot

El DNA de cada plásmido fue digerido con diversas endonucleasas de restricción para realizar ensayos tipo Southern. Estas reacciones se corrieron en una cámara de electroforesis horizontal (Gibco BRL 11x14) en un gel de agarosa 0.8%, a 75 V. Las bandas se visualizaron por tinción con 0.5 μ g/ml de bromuro de etidio y se observaron en un transiluminador de onda corta (Mighty bright, Hoefer Scientific instruments). El gel tipo Southern se enjuagó con agua desionizada y se fotografió con una regla de referencia fluorescente. Después se colocó en solución desnaturalizante (NaCl 1.5 M, NaOH 0.5 M), en agitación suave durante 50 minutos. Pasado este tiempo se aplicaron dos enjuagues de 3 minutos cada uno en agua bidestilada, para pasarlo a una solución neutralizante (NaCl 1.5 M, Tris-HCL 0.5 M pH 7.2, EDTA 0.1 mM), durante 30 minutos también en agitación suave. El gel se enjuagó por 2 minutos en agua bidestilada. Después de este tratamiento el gel se colocó en un aparato de transferencia (Blot transfer system 11 x 14, GibcoBRL) con SSC 20x (NaCl 3M, citrato de sodio 0.3 M), para permitir que el DNA fragmentado se transfiriera por

capilaridad hacia una membrana Hybond-N (Amersham Pharmacia Biotech) durante toda la noche. Posteriormente se lavó la membrana en SSC 2x durante 2 minutos, se dejó secar al aire y finalmente el DNA se fijó permanentemente a la membrana mediante un pulso de luz UV (UV crosslinker, Hoefer scientific instruments). La membrana se prehibridó durante 2 horas en 10 ml de solución de pre-hibridación (formamida 50%, Denhardt's 4x (albúmina bovina sérica 0.02%, ficoll 400 0.002%, PVP-40 0.002%), SDS 0.2%, EDTA 2 mM, amortiguador de fosfatos 120 mM, SSC 2x), a 42°C en un horno de hibridación (hybridizer HB-1000 UVP laboratory products). Posteriormente se eliminó la solución de prehibridación y se cambió por solución de hibridación conteniendo la sonda ésta se dejó durante toda la noche también a 42°C. Después las membranas se lavaron dos veces por 1 hora con una solución de SSC 0.2% y SDS 0.2% a 42° C. Posteriormente la membrana se expuso en una placa fotográfica (Kodak X OMAT AR 5 film), con pantalla intensificadora en un cassette a -70°C por el tiempo necesario (de 4 horas a 3 días dependiendo de la radioactividad incorporada en la membrana), para finalmente ser revelada.

3.4 SUBCLONACIÓN DE DNA

Una vez identificada la localización de *prS4* en las clonas p811 y p812, se consideró subclonar estas regiones para facilitar el manejo de las mismas en experimentos posteriores.

3.4a Preparación de células competentes

De un stock guardado a -70°C de células de *Escherichia coli* cepa JM109, se tomó una asada que fue estriada en medio LB aguar sin antibiótico, se dejó incubando a 37 °C durante toda la noche (14-16 hrs.). Al día siguiente en un matraz con capacidad de un litro se colocaron 200 ml de medio SOB (peptona 140 al 2%, extracto de levadura 0.5%, NaCL 10 mM,

KCl 2.5 mM, MgCl₂ 10 mM, MgSO₄ 10 mM) y se inoculó con ~15 colonias. Los cultivos se mantuvieron a 18°C en agitación (200 a 250 rpm) hasta que uno de ellos alcanzó una densidad óptica de 0.6 al leerlo en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 600 nm. El cultivo se colocó en hielo con agua durante 10 minutos. Se transfirió a dos frascos para centrifuga y se centrifugó a 4 krpm por 10 minutos a 4°C (rotor Sorvall GSA). El sobrenadante se eliminó por decantación y el botón celular se resuspendió con suaves movimientos circulares en 50 ml de TB (transformation buffer) frío (PIPES 10 mM, CaCl₂ 15 mM, KCl 250 mM, el pH se ajusta a 6.7 con KOH y se agrega MnCl₂ 55 mM.), esto se dejó en agua con hielo por 10 minutos. Nuevamente se centrifugó bajo las mismas condiciones mencionadas arriba. Esta vez el botón se resuspendió suavemente en 9.3 ml de TB y 0.7 ml de DMSO (dimetil sulfóxido) para obtener una concentración final del 7%. Se incubó en agua-hielo por 10 minutos. La suspensión de células se guardó en alícuotas de 200 µl en tubos Eppendorf y se congelaron inmediatamente a -70°C.

3.4b Purificación de material para subclonar

Los fragmentos a subclonar se obtuvieron por digestión de 6 a 10 µg del plásmido p811. Simultáneamente se prepararon los vectores de clonación en que se habrían de insertar los fragmentos a subclonar. Por cada subclona se digieron 7 µg de vector pBluescript II KS- con las mismas endonucleasas con que se liberaron los fragmentos de subclonación, de forma que los extremos de inserto y vector coincidieran. Los vectores digeridos sólo con una endonucleasa fueron tratados con CIAP (Fosfatasa alcalina de ternera, GIBCO BRL life-technologies) para ser defosforilados y así evitar su recircularización. Las reacciones se llevaron a cabo en un volumen de 40 µl y los fragmentos se separaron en un gel de agarosa 0.8% en una cámara de electroforesis a 20 volts durante 12 horas. Las bandas de DNA se visualizaron por tinción del gel en bromuro de etidio y su exposición a luz UV. El tamaño de las bandas se estimó por comparación

con el marcador de peso molecular (1 Kb DNA ladder, Gibco BRL Technologies). Se identificó la posición de las bandas de interés en el gel y se cortaron de la agarosa. El fragmento cortado se colocó en un tubo Eppendorf de 500 μ l a los que previamente se les había hecho un orificio en el fondo y se los había colocado una pequeña cantidad de fibra de vidrio siliconizada a manera de filtro. Este tubo a su vez se colocó dentro de otro mayor, de 1.5 ml de capacidad. El conjunto así formado se centrifugó a 6 krpm durante 5 minutos. El líquido recuperado en el tubo inferior se aforó hasta 450 μ l con agua destilada estéril y se le practicaron 3 extracciones químicas de la siguiente forma: Se agregó un volumen igual de fenol, se agitó vigorosamente y se centrifugó a 6 krpm por 3 minutos. Se recuperó la fase acuosa en un nuevo tubo y se le agregó un volumen igual de una mezcla 1:1 de fenol-cloroformo, se agitó y se centrifugó en las mismas condiciones mencionadas antes, se recuperó la fase acuosa y se le agregó un volumen igual de cloroformo, se agitó y centrifugó. La última fase acuosa se recuperó y se le añadieron 2.5 volúmenes de etanol 10% y 1/10 del volumen de acetato de sodio 3 M. El contenido del tubo se agitó con suavidad y se dejó a -20 °C durante 2 horas. Cuando el tubo adquirió temperatura ambiente, se centrifugó a 13 krpm durante 15 minutos. El sobrenadante se desechó y el botón de DNA se lavó con 400 μ l de etanol 70 % y se centrifugó nuevamente a 13 krpm durante 5 minutos. El etanol fue desechado, el botón se dejó secar al aire durante 5 minutos y se resuspendió en un volumen apropiado de agua estéril bidestilada.

3.4c Ligación del inserto con el vector y transformación

Se emplearon 150 ng del inserto purificado por \sim 75 ng del vector pBluescript II KS- predigerido para realizar una reacción de ligación. Se agregaron 1 μ l de ligasa (1u/ μ l) (T4 DNA ligasa, Gibco BRL Life-technologies), 4 μ l de amortiguador de reacción 5 x, y se aforó la reacción hasta 20 μ l con agua bidestilada. La reacción se incubó por dos horas a temperatura ambiente.

Para transformar se descongeló una alícuota de 200 μ l de células competentes preparadas con DMSO, se les agregó 10 μ l de la reacción de ligación y se dejaron transcurrir 30 minutos en hielo. Se le aplicó un choque térmico de 42 °C por 45 segundos al tubo en un baño térmico y después de 5 minutos en hielo se les agregó 800 μ l de medio SOC (medio SOB⁻ enriquecido con glucosa) para incubar las células durante 50 minutos a 37 °C. A continuación se tomaron 100 μ l de la suspensión de células y se espatularon sobre medio LB agar con ampicilina (100 μ g /ml), en cajas de Petri. El resto de las células se centrifugaron 15 segundos en microfuga, el sobrenadante se decantó y el botón celular se resuspendió y se plaqueó. Las cajas se incubaron a 37°C toda la noche. Al aparecer colonias algunas de estas se seleccionaron para comprobar el éxito de la transformación y su posterior crecimiento para purificar DNA.

3.4d Preparaciones de DNA a pequeña escala por el método de lisis alcalina.

De las colonias resultantes de la transformación se escogieron algunas al azar. Cada colonia se creció en 3 ml de medio LB con ampicilina a 37°C en agitación toda la noche. El cultivo se centrifugó a 14 krpm durante 30 segundos, el sobrenadante se desechó y al botón celular se le agregaron 100 μ l de solución para resuspender fría (glucosa 500 mM, TRIS-HCl 25 mM pH 8, EDTA 10 mM pH 8). Se dejó en hielo durante cinco minutos después de los cuales se agregaron 200 μ l de solución de lisis (NaOH 0.2 N, SDS 1%), de preparación fresca. Los tubos se mezclaron por inversión y se incubaron en hielo durante tres minutos. Se añadieron 150 μ l de solución neutralizante fría (acetato de potasio 5 M, ácido acético glacial , agua destilada). Se mezcló por inversión y se dejó en hielo durante cinco minutos. Se centrifugó a 14 krpm por cinco minutos. El sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo. Se realizaron tres extracciones orgánicas secuenciales, con fenol, fenol-cloroformo en una mezcla 1:1 y con

cloroformo, siempre empleando un volumen igual al del sobrenadante recuperado. Cada extracción fue seguida de una centrifugación a 14 krpm durante 5 minutos. El DNA plasmídico se recuperó agregando a la última fase acuosa recuperada 2 volúmenes de etanol 100 % y un décimo de acetato de sodio 3 M. Se precipitó a -20°C durante dos horas. Pasado este tiempo se centrifugó a 14 krpm durante 15 minutos. El sobrenadante se desechó por decantación y se lavó el pellet con etanol 70%, para dejar secar al aire por cinco minutos. Se resuspendió en 75 μl de TE con RNAsa (Tris 10 mM pH 7.4, EDTA 0.2 mM pH 7.2, RNAsa 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Se incubó durante una hora a 37°C . Las minipreparaciones así obtenidas se corrieron en un gel analítico para observar si correspondían a los tamaños esperados y se determinó su concentración por lectura en espectrofotómetro.

3.5 SECUENCIA DE DNA

El trabajo de secuenciación de los plásmidos p811 y p812 así como de las subclonas obtenidas fue realizado en la unidad de Biología Molecular del Instituto de Fisiología Celular, UNAM, empleando un secuenciador automático (ABI Prism Mod. 310, versión 3.4) por la Dra. Laura Ongay Larios quien dirige la unidad de servicio de secuencia.

3.5a Análisis de las secuencias

Las secuencias obtenidas, fueron analizadas mediante el programa BLAST contenido en la página www.ncbi.nlm.nih.gov. Este programa compara la secuencia problema con todas aquellas en su base de datos y reporta si se encontró o no alguna homología. Las secuencias obtenidas también se analizaron con la asistencia de los programas DNAMAN (DNAMAN for Windows, versión 2.7, Lynnon Biosoft) y DNASIS (DNASIS for Windows, Ver. 2.5, Hitachi software engineering Co. Ltd) para construir una secuencia continua de las clonas.

3.6 DIGESTION CON *Hinf* III DE SEGMENTOS NO SECUENCIADOS

Los plásmidos p811 y p812 fueron digeridos simultáneamente con las enzimas *Eco*RI y *Not* I. La reacción fue separada en un gel de agarosa 0.8%. De los fragmentos obtenidos se recuperó en ambos plásmidos el fragmento de 6 Kb, cortándolo y purificándolo de la agarosa. Después estos fragmentos fueron digeridos con *Hinf* I. En un gel de agarosa 1% se separaron las bandas de esta digestión. Se tiñó y fotografió el gel y se compararon los resultados.

3.7 AMPLIFICACION DE DNA

Se decidió amplificar una secuencia de 250 pb mediante una reacción de PCR (reacción de amplificación en cadena de polimerasa). Los oligonucleótidos empleados fueron IVS1 (ggt ctt tgc tgg cga tg) e IVS2 (caa aga gct gca ac cac tat) (ambos sintetizados por Gibco BRL). En tubos para PCR de 200 µl se colocaron 10 µl de amortiguador libre de Mg 10x, 2 µl de dNTP's (100 mM 25 umol cada uno), 3 µl MgCl₂ (50 mM), 2 µl de los oligonucleótido IVS1 e IVS2 (100 picomolas de cada uno), 2 µl de Taq polimerasa (5u/µl) (Gibco BRL Life-technologies), 50 ng del DNA empleado como templado para amplificar y agua estéril suficiente para un volumen final de 100 µl. La reacción transcurrió durante 29 ciclos en un termociclador automático (mastercycler personal, Eppendorf scientific Inc.). Las condiciones usadas fueron: 2 min a 94°C, 30 s a 94°C, 30 s a 55°C, 30 s a 72°C, extensión final 5 s 72°C.

El DNA obtenido por amplificación se cargó en un gel de agarosa 0.8% para purificarlo y posteriormente marcarlo radioactivamente (método random primer, Gibco BRL) y emplearlo como sonda para hibridar un Southern blot de DNA genómico de *T. cruzi* digerido con *Hind* III.

3.8 NORTHERN BLOT

Con la intención de cuantificar los niveles de equilibrio del RNAm de *prS4* a lo largo de un cultivo de epimastigotes de *T. cruzi*, se utilizaron ensayos tipo northern de RNA total de *T. cruzi* en membranas preparadas por la Dra. Ana María Cevallos. Estas fueron hibridadas con la sonda S4 a 42°C por 15 horas. Posteriormente las membranas fueron lavadas y expuestas a una placa Kodak X-OMAT AR 5 Film durante 10 días y posteriormente fueron reveladas. Las membranas también se expusieron en una placa sensible a actividad de radioisótopos (imaging screen-K 35x43cm, Bio-Rad laboratories) para cuantificar la cantidad de RNA específico de S4 con asistencia de un analizador de imágenes (Quantity One Molecular Imager FX, Bio-Rad laboratories).

8 RESULTADOS.

8.1 MAPAS DE RESTRICCIÓN

Para iniciar los estudios estructurales de los plásmidos p811 y p812 se digirió DNA de éstos con diferentes endonucleasas. Se emplearon *EcoR* I, *Hind* III, *Sac* I, *Pst* I y *Not* I, para ubicar algunos sitios se realizaron las siguientes dobles digestiones: *EcoR* I-*Sac* I, *EcoR* I-*Hind* III, *Hind* III-*Sac* I (Figura 7). El tamaño de las bandas obtenidas fue calculado a través del marcador de peso molecular (1Kb DNA ladder, Gibco BRL) (cuadro 3).

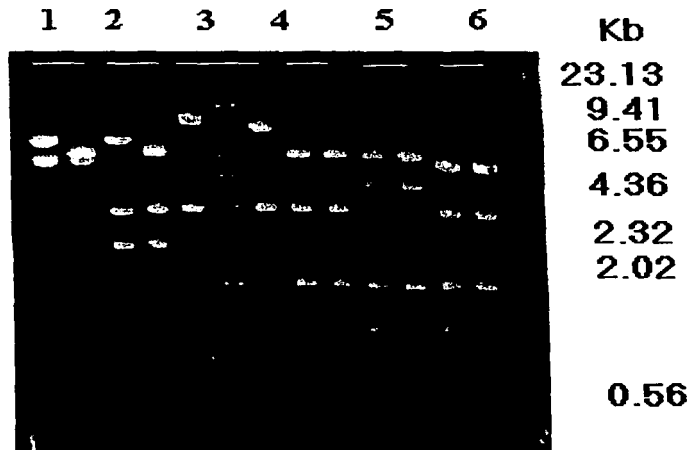


Figura 7: Patrones de restricción de los plásmidos p811 y p812. Las digestiones se muestran ordenadas en pares: par 1 *Sst* I; par 2 *Sst* I-*EcoR* I, par 3 *EcoR* I, par 4 *Hind* III-*EcoR* I, par 5 *Hind* III, par 6 *Hind* III-*Sst* I. En todos los pares el carril izquierdo corresponde a p811 y el derecho a p812. El tamaño de las bandas obtenidas se estimó por comparación con el marcador de peso molecular (*) de 1 Kb y con el fago λ digerido con *Hind* III y cuyos valores se muestran en el extremo derecho. Los tamaños de las bandas se pueden comparar en el cuadro 3.

Cuadro 3: Comparación de los fragmentos de restricción entre clonas p811 y p812. Se muestran en negro el tamaño de fragmentos comunes a ambas clonas y en rojo el tamaño de fragmentos que aparecieron de diferente tamaño en las dos clonas.

ENZIMAS	CLONA	FRAGMENTOS GENERADOS (Kb)							TOTAL (Kb)
<i>Eco</i> R1	p811	8.6	3.0						11.6
	p812	7.5	3.0						10.5
<i>Hind</i> III	p811	5.0	3.8	1.6	1.1				11.5
	p812	5.0	3.8	1.6					10.4
<i>Eco</i> R1/ <i>Hind</i> III	p811	5.0	3.0	1.6	1.1	0.8			11.5
	p812	5.0	3.0	1.6		0.8			10.4
<i>Sac</i> I	p811	6.3	5.2						11.5
	p812	5.3	5.2						10.5
<i>Eco</i> R1/ <i>Sac</i> I	p811	6.3	3.0	2.2					11.5
	p812	5.3	3.0	2.3					10.6
<i>Pst</i> I	p811	5.0	3.3	2.8	0.3				11.4
	p812	4.0	3.3	2.8	0.3				10.4
<i>Eco</i> R1/ <i>Pst</i> I	p811	5.1	2.9	2.8	0.3	0.2			11.3
	p812	4.0	2.9	2.8	0.3	0.2			10.2
<i>Hind</i> III/ <i>Sac</i> I	p811	4.4	3.0	1.6	1.1	0.8	0.6		11.4
	p812	4.4	3.0	1.6		0.8	0.6		10.4
<i>Hind</i> III/ <i>Pst</i> I	p811	3.1	2.9	2.0	1.1	1.0	0.8	0.4	11.3
	p812	3.1	2.9	2.0		1.0	0.8	0.4	10.2
Not	p811	8.0	3.5						11.5
	p812	8.0	2.5						10.5

Como puede verse los fragmentos obtenidos son prácticamente los mismos en ambas clonas, salvo por una diferencia constante entre ellas de alrededor de 1.1 Kb (cuadro 3). Los fragmentos fueron ordenados partiendo de los siguientes hechos: el vector pBluescrip KS- en el que están construidas las clonas genómicas tienen un tamaño de 2.960 Kb y el inserto clonado es totalmente liberado con *EcoR* I (esta enzima no corta al interior del inserto). Con esto en mente el orden de los fragmentos fue elucidado (figura 8).

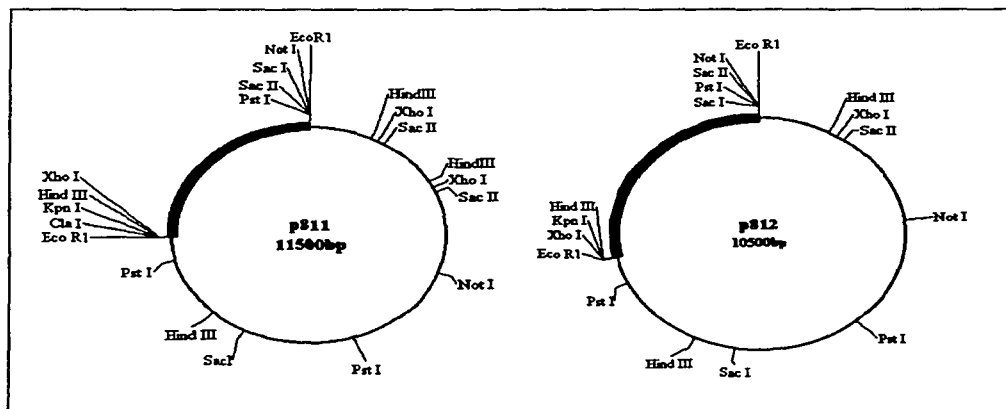


Figura 8: Mapas de restricción de los plásmidos p811 y p812: Al ordenar los fragmentos se observa una marcada similitud entre las clonas. La banda negra corresponde a la secuencia del vector pBluescript KS-. Los sitios enzimáticos que lo flanquean pertenecen al sitio de clonación múltiple del vector.

Una vez ordenados los fragmentos y obtenidos los mapas de restricción se hizo evidente que la diferencia entre ambos plásmidos radica en un fragmento que es escindido con *Hind* III y que se localiza únicamente en la clona p811 (figura 8)

8.2 IDENTIFICACIÓN Y SUBCLONACIÓN DEL GEN *prS4* EN LAS CLONAS GENÓMICAS p811 y p812.

Con el mapa de restricción resuelto (figura 8), se localizaron en los plásmidos regiones con secuencias relacionadas a la proteína ribosomal S4. Esto se hizo por medio de ensayos tipo Southern de las clonas hibridadas con la sonda S4. En la digestión con *Hind* III en p812 se observa una señal correspondiente a S4, mientras que en p811 se observan dos (figura 9 pánel B, par de carriles 3). Es notable que la señal presente en ambas clonas corresponde a fragmentos de igual tamaño y posición, mientras que la segunda señal en p811 pertenece al fragmento "ausente" en p812. Esto solamente nos permite decir que probablemente hay un gen "extra" para S4 en p811 con respecto a p812. En vista de que la señal presente en ambas clonas se localiza en una banda de 5.0 Kb y tomando en cuenta que el gen *prS4* mide sólo 820 pb no es posible asegurar la presencia de sólo una copia génica dentro de esta banda. Como puede verse en los mapas de restricción para la enzima *Not* I sólo existe un sitio de corte en el interior de cada plásmido, además del sitio en la región de clonación múltiple del vector, esto genera dos fragmentos en cada clona al ser digerida con esta enzima. Cuando esta digestión es hibridada con S4 se encuentra que por arriba del sitio de corte de esta enzima no hay señal alguna. El empleo de la digestión doble *Hind* III-*Not* I permite acotar la señal de S4 hasta un fragmento de 1.5 Kb en ambas clonas y para p811 una señal (gen?) extra en una banda de 1.1Kb.

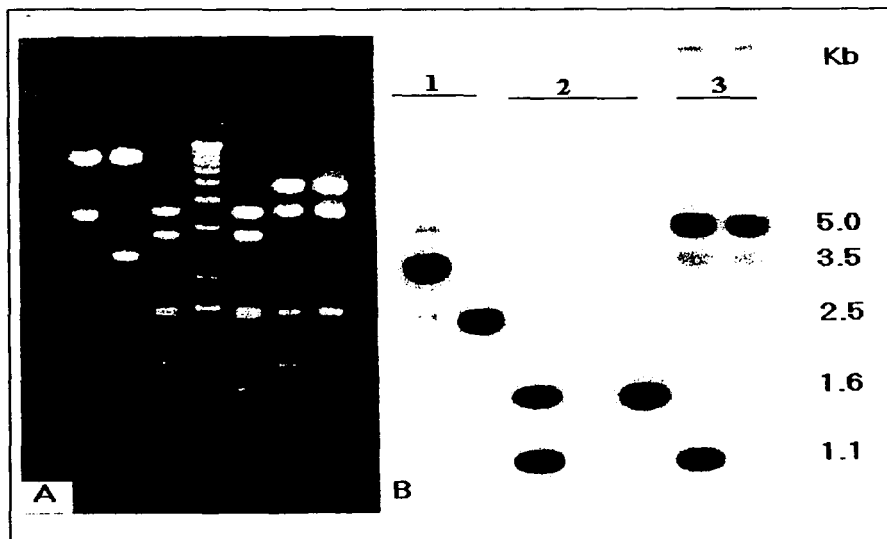


Figura 9: Fragmentos de hibridación mínima para S4 en los plásmidos p811 y p812. La digestión con *Not* I permite ver que en cada clona más allá de este sitio no hay hibridación para S4 (par de carriles # 1) (ver también figura 9) es decir que la sonda empleada solamente hibrida con la fracción que no contiene al vector. Al hibridar la digestión con *Hind* III (par de carriles # 3) se distinguen dos señales en p811 y sólo una en p812. Finalmente la digestión *Hind* III-*Not* I (par de carriles # 2) proporciona la mínima región de hibridación mostrando una señal para S4 en p812 de 1.6 Kb y dos señales en p811 una de 1.6 Kb y otra de 1.1 Kb. En cada par de carriles que se presenta el carril de la izquierda corresponde a p811 y el de la derecha a p812.. Panel A: gel teñido con bromuro de etidio; panel B: Southern blot hibridado con la sonda S4.)

Lo anterior nos permitió fijar en los mapas de restricción la posición relativa de *prS4* en los plásmidos p811 y p812 (figura 10). Conociendo esto se decidió secuenciar precisamente la región comprendida entre las enzimas *EcoR* I y *Not* I iniciando en el sitio de clonación múltiple del vector.

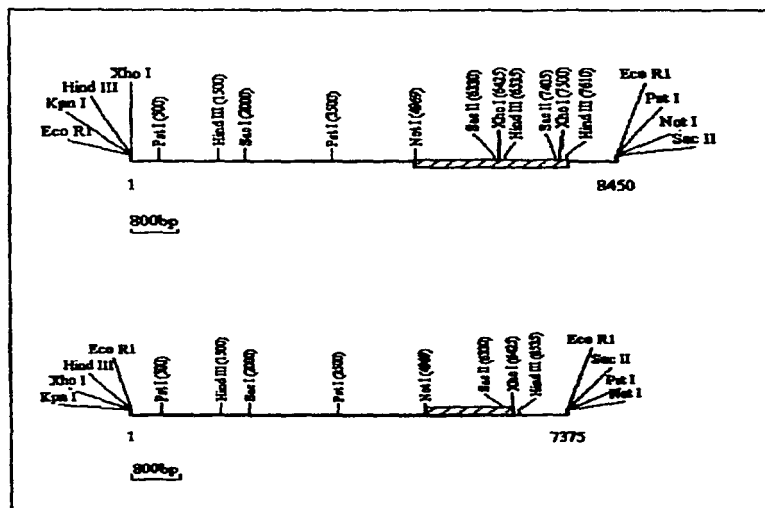


Figura 10: Posición relativa de *prS4* en los plásmidos p811 y p812. La región de hibridación para S4 (línea rayada roja) es acotada por los sitios *Not* I y *Hind* III. Es evidente la similitud entre los dos plásmidos. La diferencia entre ellos parece radicar en un fragmento generado por *Hind* III presente sólo en p811 (*Hind* III 6535-*Hind* III 7610).

8.3 ESTRATEGIA DE SECUENCIACIÓN.

Para caracterizar la región genómica de *prS4* a nivel de secuencia se decidió secuenciar las regiones de ambas clonas en donde se presentó hibridación. Se obtuvieron 3410 pb del plásmido p811 y 2380 de p812. La secuencia de las clonas se inició a partir del sitio de clonación múltiple del vector p-Bluescript KS-, para continuar la secuencia se emplearon oligonucleótidos diseñados en base a la secuencia ya obtenida y fueron empleados como "primers" para continuar la secuencia. Para facilitar el trabajo de secuencia se realizaron subclonaciones de fragmentos de la clona p811 esto en vista de que esta clona contiene un elemento duplicado por lo que el primer podría haberse anclado en 2 sitios al mismo tiempo. Se obtuvieron 2 subclonas a partir de la región en donde se presentó hibridación con la sonda S4, una de ellas mide 1.2 Kb y la segunda 5.1 Kb, ambas se construyeron con extremos *Hind* III en el vector pBluescript II KS- (Figura 11). Una vez obtenidas las secuencias éstas fueron ordenadas con la asistencia de los programas DNAsis y DNAMAN para formar una sólo secuencia continua (Figura 12).

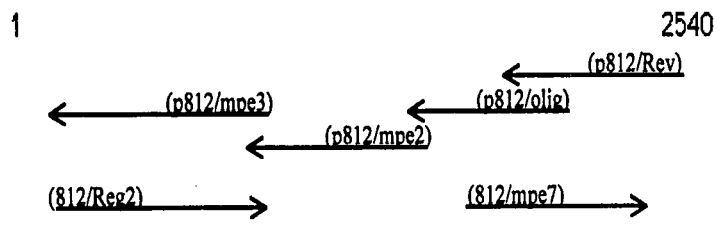
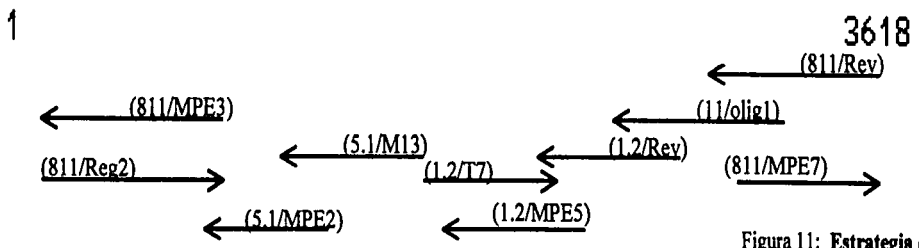
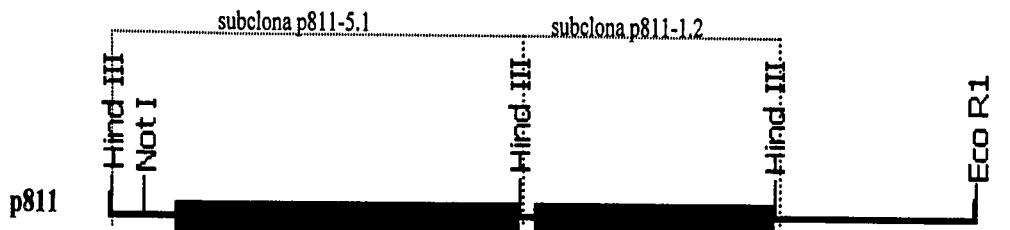


Figura 11: Estrategia de secuenciación de los plásmidos p811 y p812. Se observa únicamente las regiones secuenciadas de cada plásmido. Las barras muestran las regiones en donde se encontró hibridación para S4. El proceso inició en el sitio *Eco R1* de cada clona. Para continuar se usaron oligonucleótidos diseñados a partir de la secuencia previamente obtenida. La dirección de las flechas indica la dirección de la secuencia. Entre paréntesis se muestra el plásmido y el oligonucleótido empleados en cada reacción.

8.3 ANÁLISIS DE SECUENCIA

El análisis de las secuencias mostró que en la clona p811 existen dos copias del gen *prS4*, y una sola en la clona p812. Las dos copias de p811 están organizadas en tandem (flechas negras copias 1 y 2 de figura 13) es decir una detrás de la otra, se encuentran arregladas de cabeza a cola, separadas por 251pb. Las regiones codificadoras, es decir desde el codón de inicio hasta el codón de término de las tres copias son idénticas (figura 12 y 13).

Por medio del programa BLAST se identificó en el extremo 3' de las dos clonas un marco de lectura abierto de 350pb que corresponde a la secuencia codificadora de un transportador de nucleósidos. La similitud es mayor con uno presente en el cromosoma 2 de *Leishmania major* (valor E=6e-40). Resulta interesante que en este organismo, que se encuentra cercano filogenéticamente a *T. cruzi*, este transportador de nucleósidos se localice también adyacente al gen para la proteína ribosomal S4 del cual posee dos copias en tandem arregladas de cabeza a cola (figura 12 y 13).

En *T. cruzi* encontramos que la región río arriba de la copia 3 y de la copia 1 son idénticas (banda azul de los mapas en la figura 13), la identidad se presenta también entre las regiones río abajo de la copia 3 y de la copia 2 (bandas verdes en figura 13). En contraste la región río debajo de la copia 1 es diferente a la de las copias 2 y 3, no se encontraron elementos de homología significativa entre estas secuencias. Del mismo modo la región río arriba de la copia 2 no se parece a las correspondientes de copia 1 y 3. Esto parece indicar la pérdida de una de las copias junto con los 251 nucleótidos que la separan de la copia 1 en el alelo 1.

A pesar del parecido que ostenta la organización de los genes *prS4* en *T. cruzi* y *L. major*, al comparar las regiones intergénicas (entre S4-1 y S4 -2

así como entre S4-2 y el transportador de nucleósidos) no se encontró un valor significativo de similitud.

Figura 12 Alineamiento de las secuencias del fragmento *Not I- EcoR I* de las clonas p811 y p812. En azul se observa la región río arriba de las copias 1 y 3 de *prS4*; En negro se distinguen las regiones codificadoras de *prS4* (copias 1, 2 y 3). El texto en turquesa corresponde a la región río abajo de copia 2. En rojo se observa el 5' UTR de copia 2, en verde las regiones río debajo de copias 2 y 3. Finalmente en marrón está la secuencia del transportador de nucleósidos. Las áreas subrayadas son las secuencias de polipirimidinas que putativamente podrían ser empleadas para el reconocimiento de sitio aceptor de splicing. En letras más intensas se observan los sitios aceptores de splicing (dinucleótido ag), así como los codones de inicio y término de las áreas codificadoras.

P811	GCGGCCGCTT	CGGCTGGGTA	GCTGTAGATT	GGGGCACACG	GGAAGCGTGT
P812	GCGGCCGCTT	CGGCTGGGTA	GCTGTAGATT	GGGGCACACG	GGAAGCGTGT
P811	ATGCGTTTAT	GGAGGACAAA	AGCAGCTAAC	CCCAAACAAG	GTTTCCGCAA
P812	ATGCGTTTAT	GGAGGACAAA	AGCAGCTAAC	CCCAAACAAG	GTTTCCGCAA
P811	AACAGTTTCA	CAGACACAAG	TCCAACGTCA	GTCAAATGTT	GGCAAAAAGTT
P812	AACAGTTTCA	CAGACACAAG	TCCAACGTCA	GTCAAATGTT	GGCAAAAAGTT
P811	ACTGCTTG TG	TTTGCGCGAG	GCTCACTGGA	AATGGAAAAAT	TTCGTTGAAA
P812	ACTGCTTG TG	TTTGCGCGAG	GCTCACTGGA	AATGGAAAAAT	TTCGTTGAAA
P811	ATTTTAGCGA	CTGAAAAGGA	CAGACAATGC	CGTGTGGGCT	GTGGGGCGGC
P812	ATTTTAGCGA	CTGAAAAGGA	CAGACAATGC	CGTGTGGGCT	GTGGGGCGGC
P811	TGTATTGCAG	CATAAAGGCT	TTTTTTTTCT	TTCTTTCTTT	TAGACGCTTT
P812	TGTATTGCAG	CATAAAGGCT	TTTTTTTTCT	TTCTTTCTTT	TAGACGCTTT
P811	TGGCGAGGGA	GTGCCACGGG	TGAAATCTCA	CGAGGTGAAC	TGATGGCGTC
P812	TGGCGAGGGA	GTGCCACGGG	TGAAATCTCA	CGAGGTGAAC	TGATGGCGTC
P811	TCAGGGTCTT	GACGAAAAAG	GCGGCGCTTG	CGAATGTGTT	TTTGATACCC
P812	TCAGGGTCTT	GACGAAAAAG	GCGGCGCTTG	CGAATGTGTT	TTTGATACCC
P811	CAGGCGACAT	TACGAATCCT	TTGTTTTTCC	TACTTTTGAT	TGTGCATTAC
P812	CAGGCGACAT	TACGAATCCT	TTGTTTTTCC	TACTTTTGAT	TGTGCATTAC
P811	TATTTTTTTC	TTTTTTTTCCA	AGCTGATGAA	TAAAAAAAAA	TGAGGTGACG
P812	TATTTTTTTC	TTTTTTTTCCA	AGCTGATGAA	TAAAAAAAAA	TGAGGTGACG
P811	GGTGGGTTTA	<u>CGGTTCTTTT</u>	<u>CCTTCCTTTT</u>	<u>TTTCTTGCCG</u>	GGTAACATTT
P812	GGTGGGTTTA	<u>GCGTTCTTTT</u>	<u>CCTTCCTTTT</u>	<u>TTTCTTGCCG</u>	GGTAACATTT

P811	TATGCGATGG	CCACTGGCAC	TCGTGGGATT	CGGTGGTCAA	ACGTGCTTTC	
P812	TATGCGATGG	CCACTGGCAC	TCGTGGGATT	CGGTGGTCAA	ACGTGCTTTC	
P811	TGGAAAAAAT	GATTTATTGT	CAGATTTTAT	TTGCTGAATT	TCTTGTGACC	
P812	TGGAAAAAAT	GATTTATTGT	CAGATTTTAT	TTGCTGAATT	TCTTGTGACC	
P811	CCGTGCGAAG	TGGGAAGAAT	AACGAGGCAA	TATTCTTTTT	TATTATACAT	
P812	CCGTGCGAAG	TGGGAAGAAT	AACGAGGCAA	TATTCTTTTT	TATTATACAT	
P811	TTAGTTTCTA	TCGCCTTTTT	TTTCCCATTG	CACCCTTTGC	ATCTACCCGT	
P812	TTAGTTTCTA	TCGCCTTTTT	TTTCCCATTG	CACCCTTTGC	ATCTACCCGT	
P811	ACTCTTGTAC	ATACGTGTAA	AAGGAACCTA	AAAC ATGACC	AAGAAGCACC	1
P812	ACTCTTGTAC	ATACGTGTAA	AAGGAACCTA	AAAC ATGACC	AAGAAGCACC	2
P811	TGAAGCGCCT	TTATGCCCCC	AAGGACTGGA	TGCTGAGCAA	GCTCACGGGC	1
P812	TGAAGCGCCT	TTATGCCCCC	AAGGACTGGA	TGCTGAGCAA	GCTCACGGGC	3
P811	GTGTTGCGTC	CACGTCCCCG	TGCTGGACCC	CACAAGCTGC	GTGAGTGCAT	1
P812	GTGTTGCGTC	CACGTCCCCG	TGCTGGACCC	CACAAGCTGC	GTGAGTGCAT	3
P811	GACTCTTATG	ATCATCATCC	GCAATCGTCT	GAAGTATGCG	CTGAACGCCG	1
P812	GACTCTTATG	ATCATCATCC	GCAATCGTCT	GAAGTATGCG	CTGAACGCCG	3
P811	CCGAGGCTCA	GATGATTCTT	CGCCAGGGCC	TTGTGTGCGT	GGACGGTAAG	1
P812	CCGAGGCTCA	GATGATTCTT	CGCCAGGGCC	TTGTGTGCGT	GGACGGTAAG	3
P811	CCCCGCAAGG	ACACCAAGTA	TCCGGTTGGC	TTCATGGACG	TTGTGGAGAT	1
P812	CCCCGCAAGG	ACACCAAGTA	TCCGGTTGGC	TTCATGGACG	TTGTGGAGAT	3
P811	CCCACGGACC	GGGGATCGTT	TCCGCATTCT	GTACGACGTG	AAGGGCCGCT	1
P812	CCCACGGACC	GGGGATCGTT	TCCGCATTCT	GTACGACGTG	AAGGGCCGCT	3
P811	ACAGGGTCTC	CGCATCAACG	TGATTCAAGG	GCGTGAGGAG	AAGCTTAAGC	1
P812	ACAGGGTCTC	CGCATCAACG	TGATTCAAGG	GCGTGAGGAG	AAGCTTAAGC	3
P811	TTATCGCTGC	TGAGGCACGC	AAGAACATGC	AGACTCGCGG	CGTACGCAAG	1
P812	TTATCGCTGC	TGAGGCACGC	AAGAACATGC	AGACTCGCGG	CGTACGCAAG	3
P811	GCACGAAAA	TAG	TTTTTTTTTT	TTTTTTTTTT	TTTTTTTTTT	1
P812	GCACGAAAA	TAG	TTTTTTTTTT	TTTTTTTTTT	TTTTTTTTTT	3
P811	TTTTTTTTTT	TTTTTTTTTT	TTTTTTTTTT	TTTTTTTTTT	TTTTTTTTTT	
P812	TTTTTTTTTT	TTTTTTTTTT	TTTTTTTTTT	TTTTTTTTTT	TTTTTTTTTT	
P811	TTTTTTTTTT	TTTTTTTTTT	TTTTTTTTTT	TTTTTTTTTT	TTTTTTTTTT	
P812	TTTTTTTTTT	TTTTTTTTTT	TTTTTTTTTT	TTTTTTTTTT	TTTTTTTTTT	
P811	TTTTTTTTTT	TTTTTTTTTT	TTTTTTTTTT	TTTTTTTTTT	TTTTTTTTTT	
P812	TTTTTTTTTT	TTTTTTTTTT	TTTTTTTTTT	TTTTTTTTTT	TTTTTTTTTT	
P811	TTTTTTTTTT	TTTTTTTTTT	TTTTTTTTTT	TTTTTTTTTT	TTTTTTTTTT	
P812	TTTTTTTTTT	TTTTTTTTTT	TTTTTTTTTT	TTTTTTTTTT	TTTTTTTTTT	

P811 TTTTGGGCTT GTTTACGTT TACTTTTCTT TATCTGATAG TGAGTTGCAG
 P812

P811 CTCTTTGTCA TTATGACCAA GAAGCACCTG AAGCGCCTTT ATGCCCCCAA 2
 P812

P811 GGACTGGATG CTGAGCAAGC TCACGGGCGT GTTCGCTCCA CGTCCCCGTG 2
 P812

p811 CTGGACCCCA CAAGCTGCGT GAGTGCATGA CTCTTATGAT CATCATCCGC 2
 P812

P811 AATCGTCTGA AGTATGCGCT GAACGCCCGC CGAGGCTCAG ATGATTCTTC 2
 P812

P811 GCCAGGGCCT TGTGTGCGTG ACGGTAAGCC CGCAAGGACA CCAAGTATCC 2
 P812

P811 GGTTGGCTTC ATGGACGTTG TGGAGATCCC ACGGACCGGG GATCGTTTCC 2
 P811 GCATTCTGTA CGACGTGAAG GCCGCTTTGC CCTCGTGAAG GTTGCCGAGG 2
 P812

P811 CTGAGGGGAA CATCAAGCTC CTGAAGGTGG AGAACGTCTA CACGAGCACT 2
 P812

P811 GGCCGCATTC CTGTTGCCAT GACACACGAC GGTCAACCGCA TTCGTTACCC 2
 P812

P811 CGACCCCGG CACCCACCGT GGCACACCC TGGTATACAA CCTGAAGGAG 2
 P812

P811 AAGAAGGTGG TGGACCTCAT CAAGTCCAGC AACGGCAAGG TGGTGATGGT 2
 P812

P811 CACCGGCGGC GCGAACCGCG GCCGTATTGG CGAGATCATG TCGATTGAGC 2
 P812

P811 GCCACCCTGG TGCCTTCGAC ATTGCACGTC TGAAGGATGC GCGGGACAC 2
 P812

P811 GAGTTTGCTA CTCGAGCGTC CAACATTTTT GTGATTGGCA AGGACATGCA 2
 P812

P811 GAGCGTTCCT GTGACGCTGC CGAAGCAACA GGGTCTCCGC ATCAACGTGA 2
 P812

P811	CAGACTCGCG	CGGTACGCAA	GGCACGAAAA	TAGGTGCAGA	GCAACTTTGT	2
P812				GTGCAGA	GCAACTTTGT	
P811	TTTTAATTTT	ATTTTGATTA	TTTTTCTTTT	TTTGCATTCC	TGAACTTTTC	
P812	TTTTAATTTT	ATTTTGATTA	TTTTTCTTTT	TTTGCATTCC	TGAACTTTTC	
P811	TGTGCATGTT	TTCAAGATGC	TCCTCTTCTT	GACGGTTTGT	ACGTCCGTGT	
P812	TGTGCATGTT	TTCAAGATGC	TCCTCTTCTT	GACGGTTTGT	ACGTCCGTGT	
P811	CGCCGCGCAC	ACAAATGAAGT	TGCAGTATTT	GTGTTTTTAA	TTTTTGCAAT	
P812	CGCCGCGCAC	ACAAATGAAGT	TGCAGTATTT	GTGTTTTTAA	TTTTTGCAAT	
P811	CACCTTTTTT	TTTTGTTTTT	GTTTCCCCTT	TTGTTTTGTA	ATCAACTACA	
P812	CACCTTTTTT	TTTTGTTTTT	GTTTCCCCTT	TTGTTTTGTA	ATCAACTACA	
P811	CTACACTGAA	ATATATATAT	ATATATATAC	GCACACACAC	ACACGAGGGA	
P812	CTACACTGAA	ATATATATAT	ATATATATAC	GCACACACAC	ACACGAGGGA	
P811	ATATACTTTA	CGGGAGTGAA	CAGTAAGGCT	TCCTTTGTTA	CTGTACCAGC	
P812	ATATACTTTA	CGGGAGTGAA	CAGTAAGGCT	TCCTTTGTTA	CTGTACCAGC	
P811	TAGAGGCCAA	GAAGCGCATA	AATACCTCTT	GTTTTTTGTT	TTTTTTTTTT	
P812	TAGAGGCCAA	GAAGCGCATA	AATACCTCTT	GTTTTTTGTT	TTTTTTTTTT	
P811	TCCTTCTGTA	ATCCTTATTT	GATTGCCCTG	TTTGTGACCG	ACTTCACGGA	
P812	TCCTTCTGTA	ATCCTTATTT	GATTGCCCTG	TTTGTGACCG	ACTTCACGGA	
P811	TGGCACTTGG	ATTTTCTTCT	TGGGCGGAGT	TCTACGTTTA	TACGACATGC	
P812	TGGCACTTGG	ATTTTCTTCT	TGGGCGGAGT	TCTACGTTTA	TACGACATGC	
P811	ATTACTTTGG	GCGTCTCCAT	GTTGATGCCA	ATGAACGCCC	TGACATCTGC	
P812	ATTACTTTGG	GCGTCTCCAT	GTTGATGCCA	ATGAACGCCC	TGACATCTGC	
P811	ACCTCGATAC	ATGGTGGATT	ACTACCGCTA	CGTCTCAGGA	GACCCCATG	
P812	ACCTCGATAC	ATGGTGGATT	ACTACCGCTA	CGTCTCAGGA	GACCCCATG	
P811	CGAAGGCAA	CGTGCCAATA	TTTTGGGCCA	ACATTTTCAC	CTTCTACAAC	
P812	CGAAGGCAA	CGTGCCAATA	TTTTGGGCCA	ACATTTTCAC	CTTCTACAAC	
P811	GTTGTGTGCT	TGGTGACGCA	AATTATATTT	GGACCCACCG	TGTTGACGCA	
P812	GTTGTGTGCT	TGGTGACGCA	AATTATATTT	GGACCCACCG	TGTTGACGCA	
P811	TTTGGCGAGA	AAATTTTCCC	TTAGCAATCG	CTTTATTTTT	GCGCTCACAT	
P812	TTTGGCGAGA	AAATTTTCCC	TTAGCAATCG	CTTTATTTTT	GCGCTCACAT	
P811	GTATGATGCT	GGAGGTTATT	GTGGTTCTTT	TGCTGCCAC	GGGAAAGGTC	
P812	GTATGATGCT	GGAGGTTATT	GTGGTTCTTT	TGCTGCCAC	GGGAAAGGTC	
P811	TCACAGAATT	C				
P812	TCACAGAATT	C				

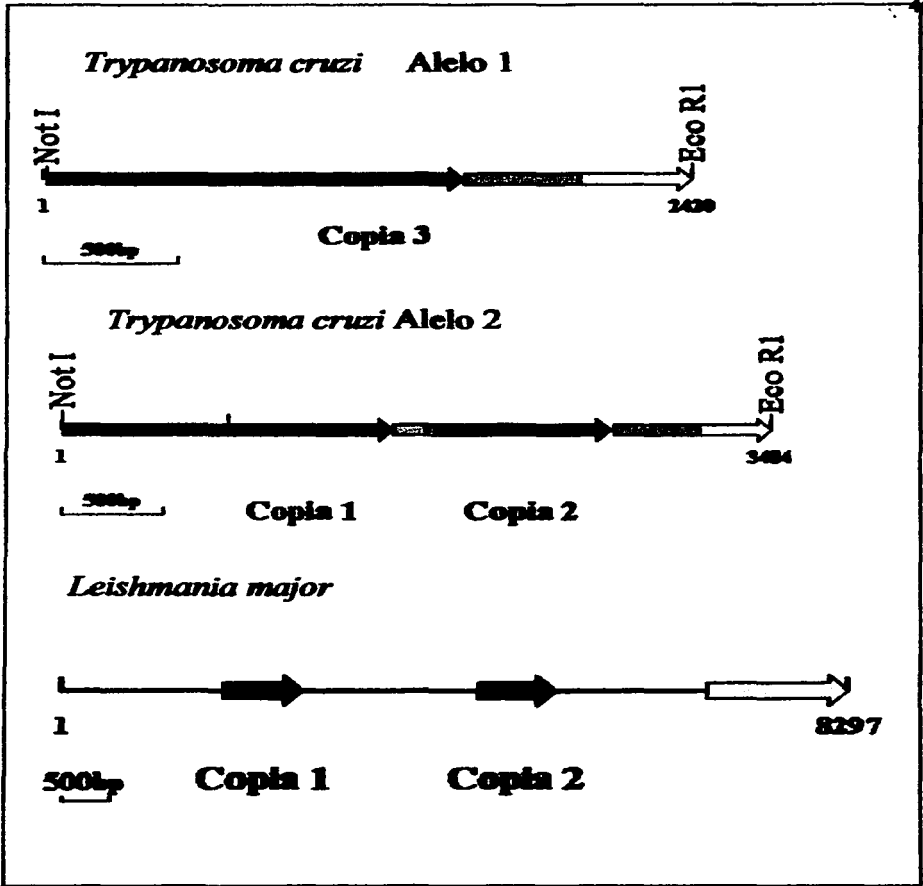


Figura 13: Mapas de las regiones identificadas a partir de la secuencia en los plásmidos p811 y p812. Las flechas negras indican las regiones codificadoras para la proteína ribosomal S4 y su orientación en dirección 5'-3'. En azul oscuro se observan las regiones río arriba de las copias 1y 3, en verde las regiones río debajo de las copias 2 y 3. En amarillo se observa la secuencia del transportador de nucleósidos. NOTA: Aún cuando las escalas de los mapas son diferentes se puede ver la marcada semejanza entre la organización presente en *L. major* y el alelo 2 de *T. cruzi*. Los tamaños de *prS4* entre estas especies difiere únicamente en 7 nt pero nuevamente por efecto de la escala es difícil apreciar esto. El área roja señala la región de procesamiento de la copia 2 de *prS4* en *T. cruzi* (ver figura 12).

8.3a Identificación de la copia expresada

En el RNAm maduro existen regiones no traducidas o UTRs, uno en la región 5' y otro en posición 3'. El primero abarca desde el sitio aceptor del miniexón hasta el codón de inicio. El segundo va desde el codón de término del gen hasta el sitio de poliadenilación. No hay un claro consenso con respecto a la longitud de estas regiones. La comparación de la secuencia de los mensajeros identificados previamente con la secuencia genómica nos permitió encontrar los sitios donde ocurre el procesamiento de los mismos (Cuadro 4). Con esto sabemos que estos mensajeros corresponden ambos a la segunda copia del tandem (copia 2). Hacia 3' los mensajeros difieren en 20 nt, esto es por que son poliadenilados a diferente nivel (Cuadro 4). Hacia 5' de la región codificadora se identificó el dinucleótido (AG) donde ocurre la adición del miniexón (SL), el cual se localiza a 22 nt del codón de inicio. También se identificó una secuencia de poli-pirimidinas que como se ha reportado es la señal putativa que dirige el reconocimiento del sitio de splicing (10, 49).

1	GTTTGTTCTT	TGCTGGCGAT	GGTGATGCT	AATGGTTCG	TTTCTTTTTT
51	GATCCTCTTT	GTTCAATTCC	ATTTAAAAAT	AGAATTTTTT	TCTTGCTTCT
101	CTATCTTGCC	GTTAGCGTGG	TAGCGGGAAC	CCTTATTATC	ATTGTGTGAG
151	GTAGCCGNTC	GTTTTTCATT	AGCACTTCTT	<u>TTTTTTTTTT</u>	<u>TTTGGCTTGT</u>
201	TTTACGTTTA	CTTTTCTTTA	TCTGATAGTG	AGTTGCAGCT	CTTTGTCATT
251	ATGACCARGA	ACGAAAATAG	GTGCAGAGCA	ACTTTGTTTT
301	TAATTTTATT	TTGATTATTT	TTCTTTTTTT	GCATT [▽] GTGA	ACTTTTCTGT
351	GCATGTTTTTC [▽]	AAGATGCTCC	TCTTCTTGAC	GGTTTGTAGC	TCCGTGTCGC

Cuadro 4 Los cDNA identificados corresponden ambos a la copia 2 de *prS4* en *Trypanosoma cruzi*. Se aprecia la secuencia espaciadora entre la copia 1 y la copia 2 de *prS4* (1-250); en rojo se observa el 5' UTR que se conserva en el RNAm maduro. El dinucleótido AG en el que ocurre el procesamiento es marcado en letras rojo intenso. En negritas se observa abreviada la secuencia codificadora de la proteína ribosomal S4. En verde se localizan los 3' UTR, las cabezas de flecha indican los dos sitios de poliadenilación encontrados. NOTA: Los colores coinciden con los empleados en los mapas de la figura 13 y en la figura 12.

8.3c Observación indirecta de homología entre los plásmidos p811 y p812

Para identificar diferencias entre las áreas no secuenciadas de los plásmidos p811 y p812, la región río arriba del sitio *NotI* fue digerida en ambas clonas con la enzima *Hinf I* que sólo reconoce 5 nt por lo que su frecuencia de corte es mayor que la de endonucleasas que reconocen 6 nt. El patrón de restricción del segmento *EcoRI-NotI* no secuenciado en ambas clonas realizado con *Hinf I* es idéntico (figura 14) para los dos plásmidos lo que puede interpretarse como un alto grado de conservación entre ellos, a su vez esto nos permite decir que *prS4* se localiza en regiones homólogas, presumiblemente cromosomas homólogos. En el futuro se tiene contemplada la secuenciación de estas clonas en su totalidad.

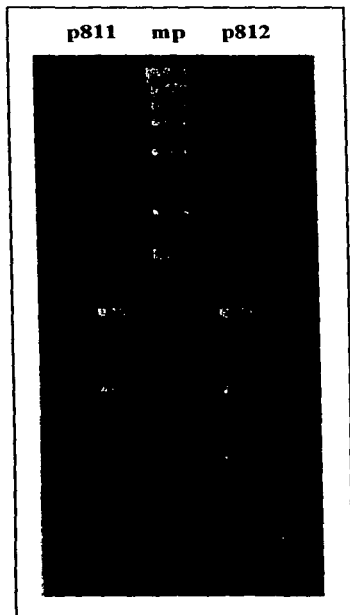


Figura 14: Patrón de digestión de regiones no secuenciadas con *Hinf I*. Las bandas obtenidas son las mismas para ambas clonas. La diferencia observada en la intensidad de las bandas se debe a diferencias en la carga de cada muestra. Mp: marcador de peso molecular

8.4 AMPLIFICACION DE DNA

La región de 251 pb que se localiza entre las copias 1 y 2 del gen *prS4* en el plásmido p811 fue amplificada por PCR. El producto obtenido fue de 243 pb ya que los primers empleados se localizan a 5 nt del codón de término de copia 1 y a 4 nt del codón de inicio de copia 2. Este producto se empleó como sonda en un Southern de DNA genómico de *T. cruzi* digerido con *Hind* III para observar si esta secuencia se encuentra representada en alguna otra región del genoma de este organismo. La sonda sólo hibridó en la zonas correspondiente a p811, lo que nos demuestra que esta secuencia es alelo específica (Figura 15).

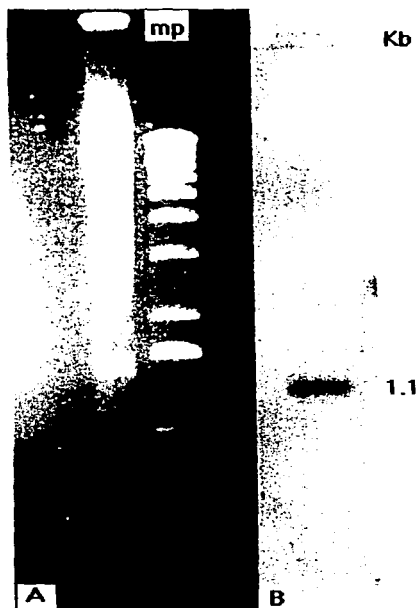


Figura 15: Identificación de una región alelo-específica. La sonda realizada con la región intergénica (entre copia 1 y 2 de *prS4*), hibrida únicamente en un sitio que corresponde al alelo 2 (clona p811).

8.5 NIVELES DE EQUILIBRIO DE RNAm DE *prS4*

Los niveles de equilibrio del RNAm de *S4* se cuantificaron a partir de un northern blot de RNA total de *T. cruzi* realizado por la Dra. Ana María Cevallos Gaos. Las muestras tomadas corresponden a los días 4,5, 6, 7, 9, 13, 17, 21 y 27 de un cultivo de epimastigotes (figura 16). Las cantidades de RNAm de *prS4* fueron obtenidas extrapolando la cantidad de radioactividad incorporada en las membranas y estos valores fueron ajustados al medir también los niveles de RNAr para demostrar que las diferencias observadas no se debieran a un efecto de carga de la muestra.

Se observa que en principio mientras el cultivo de epimastigotes se encuentra en fase logarítmica los niveles de equilibrio del RNAm de *prS4* aumentan a la par, sin embargo en cuanto se instala la fase estacionaria estos niveles caen de forma dramática (figura 16). Datos similares se han obtenido en nuestro laboratorio por la Dra Ana María Cevallos para el gen de actina.

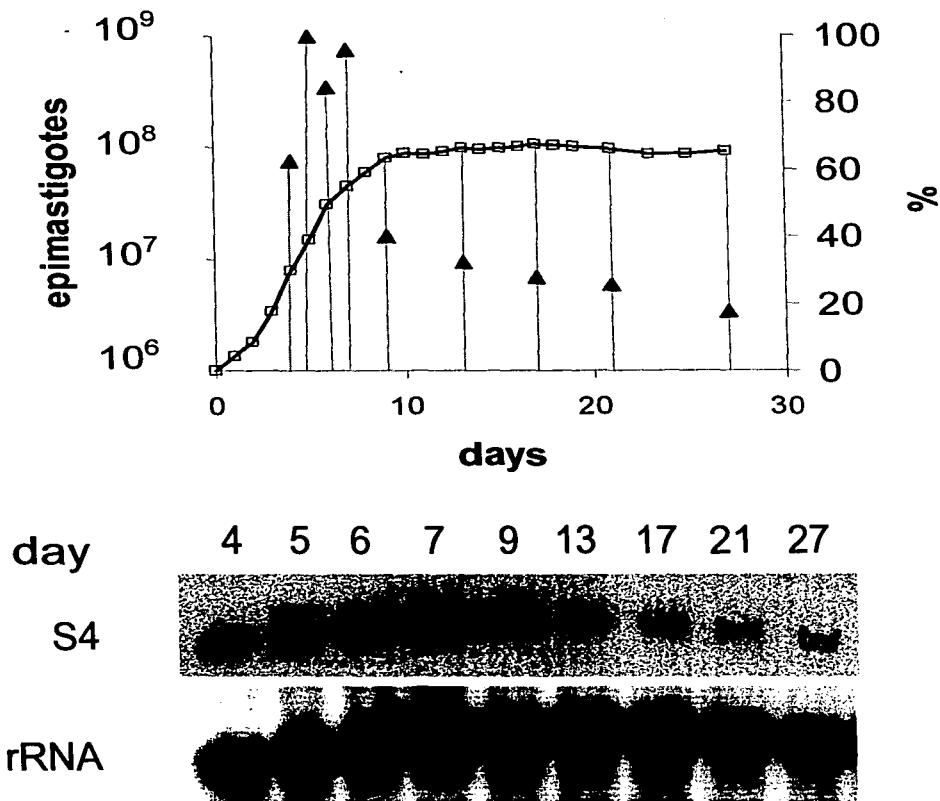


Figura 16. Variación de los niveles de equilibrio del RNAm de *prS4*. En la gráfica los cuadros muestran el crecimiento del cultivo de epimastigotes. Los triángulos señalan los niveles de RNAm de *prS4* en algunos puntos de la curva de crecimiento. Se puede observar como estos niveles caen en el punto en que se instala la fase estacionaria del cultivo. En los páneces inferiores se observan las señales obtenidas en un ensayo tipo northern hibridado con la sonda S4 y con una sonda hecha a partir de RNAr.

9 DISCUSION

9.1 Número de copias del gen *prS4*

Estudios previos realizados en nuestro laboratorio sugirieron la existencia de dos copias génicas codificadoras de la proteína ribosomal S4 en *T. cruzi* (23, 25). Sin embargo, hemos encontrado que en realidad existen 3 copias de este gen (Figs.12 y 13). Dos de las copias se encuentran en tandem, separadas por 251 nucleótidos arregladas de cabeza a cola. Esta organización recuerda en gran medida a la reportada para el mismo gen en *Leishmania major* debido a que este organismo posee dos copias organizadas en tandem de cabeza a cola. Esta semejanza se acentúa cuando observamos que en ambos organismos hacia 3' de *prS4* se localiza un transportador de nucleósidos. Se ha propuesto que la organización génica se mantiene en tripanosomatídeos, es decir que la posición relativa de algunos genes con respecto de otros se conserva entre tripanosomas africanos, *T. cruzi* y las diferentes especies de *Leishmania*, mientras que simultáneamente es factible encontrar diferencias entre las regiones espaciadoras (5). Las regiones codificadoras de la proteína ribosomal S4 entre las dos especies poseen 73% de similitud a nivel de nucleótidos y 77% de identidad en cuanto a aminoácidos. Sin embargo las regiones espaciadoras son muy diferentes ya que mientras que en *L. major* existen alrededor de 2 Kb de separación entre las copias de *prS4* en *T. cruzi* sólo hay 259 nt de separación. En cuanto a la secuencia del transportador de nucleósidos no sabemos en este momento de cuánto es la identidad pues no tenemos la secuencia completa de éste.

La tercera copia de *prS4* se encuentra en una región presumiblemente homóloga a la localización de la copia 1 y de la copia 2, esto a juzgar por las secuencias adyacentes y a los patrones de restricción de las clonas (Figs. 12 y 14). En vista de los resultados obtenidos por Herrera en 1998 (25) (Fig. 6) podemos decir que se trata de cromosomas homólogos de diferente tamaño. *L. major* es un organismo de evolución independiente y

posterior a *T. cruzi* por lo que podemos pensar que la organización que presenta para *prS4* es la condición ancestral de este gen. Por esto podemos pensar que en algún momento una de las copias junto con la región intergénica se perdieron, sin embargo para saber esto se requieren de más estudios.

9.2 Organización genómica

De acuerdo a lo señalado por Swindle (45)(cuadro 1) en *T. cruzi* son poco comunes los genes organizados en 1 a 2 copias presentes en 2 loci, sin embargo esto es precisamente lo que ocurre con *prS4* es decir hay 2 + 1 copias. Una organización muy similar a esta se ha encontrado en nuestro laboratorio para el gen de actina, lo que implica algo relativamente novedoso o que tal vez ha sido poco reportado por falta de investigación en el genoma de este organismo.

Aún cuando muchos de los productos génicos no son requeridos continuamente en un organismo, existen otros que son esenciales y además solicitados en grandes cantidades. Un ejemplo de esto es el RNAr. Mientras más metabólicamente activa es una célula es mayor su demanda de esta molécula. En teoría una copia del gen que codifica para RNAr sería inadecuada tal vez por esto es que existen muchas copias. Este fenómeno es llamado redundancia génica y no se restringe a genes de RNAr(28, 52). De hecho en tripanosomatídeos es más la regla que la excepción ya que los genes esenciales frecuentemente se presentan en multicopia (5 a 9) organizadas en tandem. Es por esto que llama la atención que un producto que debe ser requerido tanto como el RNAr este presente en pocas copias sin embargo se ha visto que los genes presentes en menor número de copias son transcritos preferencialmente sobre aquellos que son abundantes en copias (29).

9.3 Regiones 3' y 5' no traducidas (3' y 5' utr)

Hasta este momento se acepta que la regulación en trypanosomatídeos es mayormente post-transcripcional en vista de la naturaleza policistrónica de sus RNAm y la escasa identificación de promotores (10, 49). Si asumimos que las tres copias de *prS4* son transcritas una vez que estos transcritos primarios maduren a través de trans-splicing, es evidente que se generarían 3 mensajeros maduros diferentes, no por sus regiones codificadoras las cuales son idénticas, sino por sus regiones no traducidas 3' y 5', las implicaciones de esto no las conocemos al momento. Sin embargo existen autores ,que consideran que estas regiones UTR, pueden tener valor regulador, interviniendo en la vida media del mensajero y hasta en el estadio en el cual se expresan. Esto cobra particular importancia si tomamos en cuenta que *T. cruzi* es un organismo que atraviesa diferentes ambientes y sufre cambios morfológicos y metabólicos a los cuales se debe adaptarse rápidamente.

Cuando se aislaron los dos cDNA de *prS4* en *T. cruzi*, se escogieron 2 de entre 12 clonas positivas, sin embargo resulta curioso que las dos correspondieran a la copia 2 de este gen; si las copias 1 y 3 se expresan no lo sabemos en este momento. Tal vez alguna(s) de las 10 clonas de cDNA que se tienen aisladas correspondan a alguna de las copias 1 y/o 3 de *prS4* pero esto solo lo sabremos al secuenciarlas..

9.4 NIVELES DE EQUILIBRIO DE RNAm DE S4.

Se observó que los niveles de equilibrio de RNAm de S4 disminuyen con la instalación de la fase estacionaria del cultivo, esto implica que en determinado punto del crecimiento del cultivo se activa un mecanismo que modula estos niveles. Estas cuantificaciones se llevaron a cabo en northern de RNA total por lo que no podemos deducir a qué nivel se lleva a cabo la modulación. El significado de este fenómeno es desconocido.

10 CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

- El análisis de las clonas genómicas por patrones de restricción y por secuencia, indica que existen tres copias del gen *prS4* en el genoma de *Trypanosoma cruzi*. A cada copia corresponde un juego de regiones no traducidas 5' y 3' diferente.
- Resulta claro que el evento de duplicación génica por el cual surgió el tandem de S4 (copias 1 y 2), es anterior a la separación de *Leishmania* del linaje de los tripanosomas, pues está presente en el género, pero qué tan anterior no lo podemos saber en este momento.
- Hasta el momento no sabemos si el transportador de nucleósidos es funcional, pero la señal que le corresponde como sitio aceptor de transplicing, es empleado por la copia 2 de S4 que le antecede, para que ésta sea debidamente poliadenilada, pues se sabe que estos son eventos acoplados.

- Actualmente se conoce la localización cromosomal de este gen, y por el arreglo genómico de las áreas adyacentes a él, podemos decir que se trata de cromosomas homólogos de diferente tamaño.

- Las regiones reguladoras de las tres copias de *prS4*, (regiones no traducidas 5' y 3'), son diferentes. Esto nos puede servir en el futuro como una herramienta para conocer el papel que juegan dichas regiones en la regulación de la expresión génica de *T. cruzi* por lo menos de este gen en particular.

- En el futuro podremos determinar si S4 es o no una proteína esencial para esta célula. No podemos descartar su empleo como blanco para el diseño de fármacos y por ello el conocimiento de su regulación y fisiología es obviamente necesario.

- El conocimiento de la organización de los genes *prS4* nos proporcionará las bases para poder desarrollar reemplazos génicos específicos de los mismos.
- La modulación presentada en los niveles de RNAm de *prS4* será explorada para determinar en qué punto ocurre.

11 LITERATURA CONSULTADA

- 1. **Adler, B. K., and S. L. Hajduk.** 1994. Mechanisms and origins of RNA editing. *Curr Opin Genet Dev.* **4**:316-22.
- 2. **Araujo-Jorge, T. C.** 1999. Biology and ultra-structure of *Trypanosoma cruzi*: a 90-year old challenge for scientists. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* **94**:131-4.
- 3. **Benne, R., J. Van den Burg, J. P. Brakenhoff, P. Sloof, J. H. Van Boom, and M. C. Tromp.** 1986. Major transcript of the frameshifted *coxII* gene from trypanosome mitochondria contains four nucleotides that are not encoded in the DNA. *Cell.* **46**:819-26.
- 4. **Blumenthal, T.** 1998. Gene clusters and polycistronic transcription in eukaryotes. *Bioessays.* **20**:480-7.
- 5. **Bringaud, F., C. Vedrenne, A. Cuvillier, D. Parzy, D. Baltz, E. Tetaud, E. Pays, J. Venegas, G. Merlin, and T. Baltz.** 1998. Conserved organization of genes in trypanosomatids. *Mol Biochem Parasitol.* **94**:249-64.
- 6. **Burleigh, B. A., and N. W. Andrews.** 1995. The mechanisms of *Trypanosoma cruzi* invasion of mammalian cells. *Annu Rev Microbiol.* **49**:175-200.
- 7. **Cano, M. I., A. Gruber, M. Vazquez, A. Cortes, M. J. Levin, A. Gonzalez, W. Degrave, E. Rondinelli, B. Zingales, J. L. Ramirez, and et al.** 1995. Molecular karyotype of clone CL Brener chosen for the *Trypanosoma cruzi* genome project. *Mol Biochem Parasitol.* **71**:273-8.
- 8. **Castro, C., R. Hernandez, and M. Castaneda.** 1981. *Trypanosoma cruzi* ribosomal RNA: internal break in the large-molecular-mass species and number of genes. *Mol Biochem Parasitol.* **2**:219-33.
- 9. **Cech, T. R.** 2000. Structural biology. The ribosome is a ribozyme. *Science.* **289**:878-9.

- 10. **Cevallos, A. M., and R. Hernández.** 2001. . *Trypanosoma cruzi* y la enfermedad de Chagas (Tripanosomiasis americana). In D. E. M. R. y. J. C. M. Romero (ed.), Microbios en línea. UNAM, Mexico.
- 11. **Clayton, C. E.** 1999. Genetic manipulation of kinetoplastida. *Parasitol Today*. **15**:372-8.
- 12. **Devi, K. R., Y. L. Chan, and I. G. Wool.** 1989. The primary structure of rat ribosomal protein S4. *Biochim Biophys Acta*. **1008**:258-62.
- 13. **Dumontell, E.** 1999. Update on Chagas' disease in Mexico. *Salud Publica Mex*. **41**:322-7.
- 14. **Durante, E. C. S.** 1994. Agente etiológico: *Trypanosoma cruzi*. In R. S. y. J. Milei (ed.), *Enfermedad de Chagas*, 1a. ed. Mosby Doyma Argentina, Argentina.
- 15. **E. Durante de Isolda, S. G.** 1994. Vectores transmisores: Triatóminos, "vinchucas", p. 652. In R. S. y. J. Milei. (ed.), *Enfermedad de Chagas*, 1st. ed, vol. 1. Mosby/ Doyma Argentina, Buenos Aires.
- 16. **Fisher, E. M., P. Beer-Romero, L. G. Brown, A. Ridley, J. A. McNeil, J. B. Lawrence, H. F. Willard, F. R. Bieber, and D. C. Page.** 1990. Homologous ribosomal protein genes on the human X and Y chromosomes: escape from X inactivation and possible implications for Turner syndrome. *Cell*. **63**:1205-18.
- 17. **Gelduschek, E. P., and G. P. Tocchini-Valentini.** 1988. Transcription by RNA polymerase III. *Annu Rev Biochem*. **57**:873-914.
- 18. **Gomez, E., A. M. Valdes, D. Pintero, and R. Hernandez.** 1991. What is a genus in the Trypanosomatidae family? Phylogenetic analysis of two small rRNA sequences. *Mol Biol Evol*. **8**:254-9.
- 19. **Gray, M. W.** 1981. Unusual pattern of ribonucleic acid components in the ribosome of *Crithidia fasciculata*, a trypanosomatid protozoan. *Mol Cell Biol*. **1**:347-57.

- 20. **Henriksson, J., U. Pettersson, and L. Aslund.** 1996. Karyotype variability in *Trypanosoma cruzi*. *Parasitology today*. **12**:108-124.
- 21. **Hernandez, R., S. Martinez-Calvillo, R. Hernandez-Rivas, and E. Gomez.** 1993. *Trypanosoma cruzi* ribosomal RNA genes: a review. *Biol Res*. **26**:109-14.
- 22. **Hernandez, R., G. Nava, and M. Castaneda.** 1983. Small-size ribosomal RNA species in *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol*. **8**:297-304.
- 23. **Hernandez, R., S. Palacios, J. Herrera, S. Martinez-Calvillo, and I. Lopez.** 1998. The deduced primary structure of a ribosomal protein S4 from *Trypanosoma cruzi*. *Biochim Biophys Acta*. **1395**:321-5.
- 24. **Hernandez-Rivas, R., S. Martinez-Calvillo, M. Romero, and R. Hernandez.** 1992. *Trypanosoma cruzi* 5S rRNA genes: molecular cloning, structure and chromosomal organization. *FEMS Microbiol Lett*. **71**:63-7.
- 25. **Herrera, J.** 1998. Licenciatura, Experimental. UNAM.
- 26. **Inazu, Y., S. C. Chae, and Y. Maeda.** 1999. Transient expression of a mitochondrial gene cluster including *rps4* is essential for the phase-shift of *Dictyostelium* cells from growth to differentiation. *Dev Genet*. **25**:339-52.
- 27. **Laranja, F. C., Dias E, Nobrega G, Miranda A.,** 1956. Chagas' disease: A clinical, epidemiologic and pathologic study. *Circulation* 1035.
- 28. **Lewin, B.** 1995. *Genes V*, 1st ed. Oxford university press, Oxford.
- 29. **Lopez-Estrano, C., C. Tschudi, and E. Ullu.** 1998. Exonic sequences in the 5' untranslated region of alpha-tubulin mRNA modulate trans splicing in *Trypanosoma brucei*. *Mol Cell Biol*. **18**:4620-8.
- 30. **M.I. Oakes, A. S., T. Atha, A. Shankweiler, J. A. LAke.** 1990. Ribosome structure: Three-dimensional locations of rRNA and proteins,

- p. 677. In A. D. W. E. Hill, R. A. Garret, P. B. Moore, D. Schlessinger and J. R. Warner (ed.), The ribosome, structure, function and evolution., 1st ed, vol. 1. American Society for Microbiology, Washington, D. C.
- 31. **Margulis, L. J. O. C., M. Melkonian and D.J. Chapman.** 1990. Handbook of protoctista. Jones and Bartlett Publishers, Boston.
 - 32. **Markus, M. A., R. B. Gerstner, D. E. Draper, and D. A. Torchia.** 1999. Refining the overall structure and subdomain orientation of ribosomal protein S4 delta41 with dipolar couplings measured by NMR in uniaxial liquid crystalline phases. J Mol Biol. **292**:375-87.
 - 33. **Marquardt, W. C., R. S. Demaree, R. B. Grieve.** 1999. Parasite and vector biology, 2nd ed. Harcourt Academic Press, San Diego, California.
 - 34. **Mazzoti, L.** 1940. Dos casos de Enfermedad de Chagas en el estado de Oaxaca. Gaceta Médica Mexicana **4**:17-20.
 - 35. **Parsons, M., T. Furuya, S. Pal, and P. Kessler.** 2001. Biogenesis and function of peroxisomes and glycosomes. Mol Biochem Parasitol. **115**:19-28.
 - 36. **Paz, V., Y. L. Chan, A. Gluck, and I. G. Wool.** 1989. The primary structure of rat ribosomal protein S14. Nucleic Acids Res. **17**:9484.
 - 37. **Pereira, M. E. A.** 1990. Cell biology of *Trypanosoma cruzi*, p. 426. In D. J. Wyler (ed.), Modern parasite biology, vol. 1. Freeman, New York.
 - 38. **Reeder, R. H.** 1984. Enhancers and ribosomal gene spacers. Cell. **38**:349-51.
 - 39. **Reyes, P.** 1984. Enfermedad de Chagas en México. Archivos del Instituto de Cardiología de Mexico **1**-2.
 - 40. **Sayers, E. W., R. B. Gerstner, D. E. Draper, and D. A. Torchia.** 2000. Structural preordering in the N-terminal region of

ribosomal protein S4 revealed by heteronuclear NMR spectroscopy. *Biochemistry*. **39**:13602-13.

- 41. **Sollner-Webb, B., and J. Tower.** 1986. Transcription of cloned eukaryotic ribosomal RNA genes. *Annu Rev Biochem.* **55**:801-30.
- 42. **Staker, B. L., P. Korber, J. C. Bardwell, and M. A. Saper.** 2000. Structure of Hsp15 reveals a novel RNA-binding motif. *Embo J.* **19**:749-57.
- 43. **Storino, R., Barragán, H.** 1994. Epidemiología, p. 652. *In R. y. J. M. Storino (ed.), Enfermedad de Chagas, 1a ed, vol. 1. Mosby/ Doyma Argentina, Buenos Aires.*
- 44. **Storino, R., Gallerano, R., Sosa, R.** 1994. Tratamiento antiparasitario específico, p. 652. *In R. S. y. J. Milei (ed.), Enfermedad de Chagas, vol. 1. Mosby/Doyma Argentina, Buenos Aires.*
- 45. **Swindle, J., Tait, A.** 1996. Trypanosomatid genetics. *In D. F. S. a. M. Parsons (ed.), Molecular biology of parasitic protozoa, 1a ed, vol. 13. IRL Press, Oxford.*
- 46. **Synetos, D., M. D. Dabeva, and J. R. Warner.** 1992. The yeast ribosomal protein S7 and its genes. *J Biol Chem.* **267**:3008-13.
- 47. **Tapparo, A., M. Satre, and G. Klein.** 1998. Cloning, sequencing and developmental expression of the genes encoding S4 and S10 ribosomal proteins in the cellular slime mould *Dictyostelium discoideum*. *Curr Genet.* **34**:410-8.
- 48. **Tarleton, R. L., and L. Zhang.** 1999. Chagas disease etiology: autoimmunity or parasite persistence? *Parasitol Today.* **15**:94-9.
- 49. **Teixeira, S. M.** 1998. Control of gene expression in Trypanosomatidae. *Braz J Med Biol Res.* **31**:1503-16.
- 50. **Tyler, K. M., and D. M. Engman.** 2001. The life cycle of *Trypanosoma cruzi* revisited. *Int J Parasitol.* **31**:472-81.
- 51. **Velasco, O.** 1992. La enfermedad de Chagas en México. *Infectologia* 783-791.

- 52. **Weaver, R. F., and P. W. Hedrick.** 1997. Genetics, 3a ed. WCB publishers, Dubuque, IA.
- 53. **White, S., W. Clemons, C. Davies, V. Ramakrishnan, and B. Wimberly.** 2000. Structures of bacterial ribosomal proteins: high - resolution probes of the architecture and mechanism of the ribosome. *In* R. A. Garret, R. Douthwaite, A. Lilja, A. T. Matheson, P. B. Moore, and H. Noller (ed.), The ribosome: structure, function, antibiotics and cellular interactions., nd ed. ASM Press, Washington.
- 54. **White, T. C., G. Rudenko, and P. Borst.** 1986. Three small RNAs within the 10 kb trypanosome rRNA transcription unit are analogous to domain VII of other eukaryotic 28S rRNAs. *Nucleic Acids Res.* **14**:9471-89.
- 55. **Wool, I., Y. L. Chang, and A. Gluck.** 1995. Structure and evolution of mammalian ribosomal proteins. *Biochem. Cell Biol.* **73**:933-947.
- 56. **WorldBank.** 1993. World development report 1993-1994 Investigating in health. World bank / Oxford university press.
- 57. **Zeledon, R., J. C. Dias, A. Brilla-Salazar, J. M. de Rezende, L. G. Vargas, and A. Urbina.** 1988. Does a spontaneous cure for Chagas' disease exist? *Rev Soc Bras Med Trop.* **21**:15-20.