



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

“ANÁLISIS FUNCIONAL DE LAS SEÑALES DE
POLIADENILACIÓN EN *Trichomonas vaginalis*”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE
MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
(BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)

P R E S E N T A:

Q.F.B. MA. GUADALUPE BARRERA ANDRADE

DIRECTORA DE TESIS: DRA. MA. IMELDA LÓPEZ VILLASEÑOR



MÉXICO, D.F.

ABRIL, 2006



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

Ing. Leopoldo Silva Gutiérrez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Por medio de la presente me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 13 de marzo del 2006, se acordó poner a su consideración el siguiente jurado para el examen de grado de Maestría en Ciencias Biológicas (Biología Experimental) de la alumna **Barrera Andrade María Guadalupe** con número de cuenta **94177600** con la tesis titulada: "**Análisis funcional de las señales de poliadenilación en Trichomonas vaginalis**", bajo la dirección de la **Dra. María Imelda López Villaseñor**.

Presidente:	Dra. Ingeborg Dorothea Becker Fauser
Vocal:	Dra. Rosa Laura Camarena Mejía
Secretario:	Dra. María Imelda López Villaseñor
Suplente:	Dra. Ana María Cevallos Gaos
Suplente:	Dr. Luis Felipe Jiménez García

Sin otro particular, quedo de usted.

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, D.F. a. 04 de abril del 2006



Dr. Juan Núñez Farfán
Coordinador del Programa

c.c.p. Expediente del interesado

AGRADECIMIENTOS.

A la Universidad Nacional Autónoma de México por permitirme continuar con mi preparación profesional, esta vez a nivel maestría en otra de sus excelentes escuelas, la Facultad de Ciencias y en uno de sus mejores institutos dedicados a investigación de primer nivel como lo es el Instituto de Investigaciones Biomédicas.

A la Dirección de Estudios de Posgrado (DGEP) por la beca otorgada durante un año.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada durante 11 meses.

Al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) de la UNAM, por el apoyo otorgado al proyecto IN 209302.

A SEP-CONACYT por el apoyo otorgado al proyecto de Investigación Científica Básica 45037-Q.

A mi tutora Dra. María Imelda López Villaseñor

A los miembros de mi comité tutorial: Dra. Rosa Laura Camarena Mejía y Dr. Luis Felipe Jiménez García

A los honorables miembros del jurado: Dra. Ingeborg Becker Fauser, Dra. Laura Camarena Mejía, Dra. Imelda López Villaseñor, Dra. Ana María Cevallos Gaos, y Dr. Luis Felipe Jiménez García.

A la Dra. María Imelda López Villaseñor por ser una excelente tutora y mejor persona, por sus enseñanzas, y paciencia. Por compartir conmigo su experiencia, y conocimientos pero sobre todo por permitirme formar parte de la gran familia que es su grupo de trabajo, por su apoyo en todo momento, y por algo más valioso aún, su amistad y cariño que me hicieron sentir como en casa.

¡Mil Gracias!

A los miembros de mi comité tutorial: Dra. Rosa Laura Camarena Mejía y Dr. Luis Felipe Jiménez García por su valioso tiempo, y acertados comentarios para el mejoramiento del proyecto y el desarrollo de la tesis durante estos casi tres años.

A los honorables miembros del jurado: Dra. Ingeborg Becker Fauser, Dra. Laura Camarena Mejía, Dra. Imelda López Villaseñor, Dra. Ana María Cevallos Gaos, y al Dr. Luis Felipe Jiménez García por el tiempo invertido en la revisión de la tesis, porque sin duda enriquecieron este trabajo con sus sugerencias y comentarios.

Al Dr. Roberto Hernández Fernández por sus valiosos consejos y sugerencias en el desarrollo del proyecto pero sobre todo por su invaluable apoyo durante este tiempo.

A la Bióloga Lorena López Griego, técnico académico de nuestro laboratorio, porque además de apoyarme en todo momento en la realización de este proyecto, me brindó su amistad que es el regalo más valioso que puede darse.

A la Dra. Norma Espinosa por su apoyo constante en el desarrollo de esta tesis, por sus valiosos consejos, pero sobre todo por su amistad.

A la LIBB Ana Lilia Torres, QFB Vanesa Fuentes y al QFB Pablo Hernández por su confianza, entusiasmo, y apoyo constante en la realización de este trabajo, pero sobre todo por el valioso regalo de su amistad que ha hecho tan agradable la estancia en el laboratorio.

A la Bióloga Mariana Pérez por su apoyo constante y consejos para seguir adelante, por escucharme cuando mas lo necesitaba.

A mis amigas del laboratorio: Ericka, Juliana, Elisa, y Yayoi por su alegría, tiempo, y apoyo, mil gracias ☺.

Dedicatorias y Agradecimientos Especiales.

A Dios por el valioso regalo de la vida, por la familia que me dio, por mis amigos y todas la personas que ha puesto en mi camino, pero sobre todo por permitirme cumplir uno mas de mis sueños.

A mis Padres Guadalupe Andrade A. y Manuel Barrera A. por todo su amor, esfuerzos, preocupación y apoyo incondicional, a pesar de lo difícil que ha sido, por su paciencia pero sobre todo por creer en mi.

Gracias, los amo muchísimo.

A mis hermanos Manuel, José, Lucí, y Antonio por su cariño, apoyo, consejos, y regaños, pero sobre todo por lo feliz que han hecho mi vida. No se que haría sin ustedes.

Los quiero 😘😊.

A mis amig@s Gabita, Marce, Gaby, Lety, Javier, Miguel, Artur, y los que no recuerdo en este momento, gracias por su apoyo incondicional, su preocupación pero sobre todo por estar ahí siempre.

A las chicas del club, Nancy, Angie, Ale, Alita, Lauris, y Zully por su cariño, consejos, alegría, y apoyo constante.

¡Gracias chicas 🌸!

"Detrás de cada logro hay otro desafío."

Madre Teresa de Calcuta.

Indice	Página
I. Resumen	1
II. Abstract	3
1. Introducción	4
1.1 Biología de <i>Trichomonas vaginalis</i>	5
1.1.1 Características generales	5
1.1.1.1 Ciclo de vida	5
1.1.1.2 Clasificación taxónomica	5
1.1.1.3 Forma y tamaño	5
1.1.1.4 Citoplasma	6
1.1.1.5 Núcleo	7
1.1.1.6 Número Cromosómico	8
1.1.1.7 Metabolismo	8
1.1.1.8 Tipo de reproducción y mitosis	9
1.2 Patogenicidad de <i>T. vaginalis</i>	9
1.3 Importancia médica de <i>T. vaginalis</i>	9
1.4 Descripción de la enfermedad	10
1.5 Importancia biológica de <i>T. vaginalis</i>	11
1.6 Aspectos moleculares de <i>T. vaginalis</i>	12
2. Antecedentes	14
2.1 Poliadenilación de los mRNAs en eucariontes superiores	15
2.1.1 Importancia de la cola de poli (A) en el mRNA de organismos eucariontes	16
2.1.2 Señales de poliadenilación en mamíferos	17
2.1.2.1 Factores involucrados en el proceso de poliadenilación en mamíferos	18
2.1.2.2 Modelo para el procesamiento y poliadenilación de mRNAs en mamíferos	19
2.2 Proceso de poliadenilación en protistas	21
2.3 Señales de poliadenilación en <i>T. vaginalis</i>	22
2.4 Genes reporteros	25
2.5 El vector de expresión pAC22 <i>cat</i> -1	28
2.5.1 Funcionalidad del vector pAC22 <i>cat</i> -1 en <i>T. vaginalis</i>	30
3. Hipótesis y Objetivos	31
3.1 Hipótesis	32
3.2 Objetivo general	32
3.3 Objetivos particulares	32

4. Metodología	33
4.1 Cultivo de <i>T. vaginalis</i>	34
4.2 Transformación de <i>Escherichia coli</i>	34
4.3 Obtención de DNA plasmídico (mini-preparación)	35
4.4 Preparación de DNA de plásmidos (midi-preparación)	36
4.5 Mutagénesis-	37
4.6 Cinética de crecimiento del aislado CNCD147 de <i>T. vaginalis</i>	38
4.7 Transfección de <i>Trichomonas vaginalis</i>	39
4.8 Preparación del extracto proteico	40
4.9 Extracción de RNA total a partir de parásitos transfectados	40
4.10 Ensayo para medir la actividad enzimática de la cloranfenicol acetil transferasa (CAT)	41
4.11 Cuantificación de proteína	43
4.12 Purificación de RNA poli (A) +	43
4.13 Amplificación rápida de los extremos 3' de cDNA (3'RACE)	45
4.14 Southern blot	48
4.15 Selección de las clonas positivas mediante hibridación	49
4.16 Northern blot	51
5. Resultados y discusión	52
5.1 Curva de crecimiento de <i>Trichomonas vaginalis</i>	53
5.2 Mutagénesis del codón de término de la traducción del gen reportero <i>cat</i>	53
5.2.1 Actividad enzimática de la proteína CAT-ámbar	56
5.2.2 Determinación del sitio de poliadenilación de los transcritos <i>cat</i> -ámbar	57
5.2.3 Clonación de los productos amplificados por 3' RACE y análisis de las clonas	59
5.3 Mutagénesis de la señal propuesta para la poliadenilación en <i>T. vaginalis</i>	60
5.3.1 Actividad enzimática CAT en parásitos transfectados con los diferentes plásmidos mutantes en la señal propuesta de poliadenilación	61
5.3.2 Detección del transcrito <i>cat</i> en el RNA de células transfectadas con los plásmidos mutantes	63
5.3.2.1 Detección del transcrito <i>cat</i> mediante RT-PCR	64
5.3.3 Amplificación de la región 3' de los transcritos <i>cat</i> mutantes en la señal propuesta de poliadenilación UAAA	66
5.3.4 Clonación de los productos amplificados por 3' RACE	68
5.3.5 Secuenciación y análisis de las clonas 3' RACE-mutantes de la señal propuesta de poliadenilación	69
5.3.5.1 Alineación de las clonas provenientes de la misma mutante	71
5.3.5.2 Análisis de las clonas no poliadeniladas	85
5.3.5.3 Análisis de las clonas poliadeniladas	88
5.4 Discusión	94
6. Conclusiones y perspectivas	96
7. Bibliografía	98

8.Apéndices	103
8.1 Apéndice A	104
8.2 Apéndice B	105
8.3 Apéndice C	107
8.4 Apéndice D	111
8.5 Apéndice E	112

Abreviaturas

°C	Grados centígrados
<i>cat</i>	Gen que codifica para la cloranfenicol acetil transferasa
CAT	Cloranfenicol Acetil Transferasa
cDNA	DNA complementario al mRNA
CFI	Factor de corte I (cleavage factor I)
CFII	Factor de corte II (cleavage factor II)
CPSF	Factor específico de corte y poliadenilación (cleavage and polyadenylation specificity factor)
CstF	Factor estimulador de corte (cleavage stimulation factor)
DEPC	Dietilpirocarbonato
dNTP	Deoxinucleótido trifosfato
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DSE	Elemento río abajo (downstream element).
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
ETS	Enfermedades de transmisión sexual.
Fig	Figura
hnRNPs	Proteínas heterogeneas nucleares ribonucleares (heterogeneous nuclear ribonuclear proteins)
Inr	Elemento iniciador de la transcripción
kb	Kilobases
min	Minuto
µg	Microgramo
µl	Microlitro
ml	Mililitro
nm	Nanómetro
nt	Nucleótido
PABP	Proteína de unión a poli A
PAP	Enzima poly A polimerasa
pb	Pares de bases
PBS	Amortiguador salino de fosfatos
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
Poli (A)	Cola de poliadeninas
rpm	Revoluciones por minuto
RNA	Ácido ribonucleico (ribonucleic acid)
mRNA	RNA mensajero (messenger ribonucleic acid)
TAE	Amortiguador de Tris-acetato-EDTA
T.E.	Amortiguador de Tris-EDTA
u	Unidades

RESUMEN.

Trichomonas vaginalis es un protozooario parásito de evolución temprana y agente etiológico de la tricomonosis, una de las enfermedades sexuales más comúnmente transmitidas en humanos. Los mecanismos de expresión génica en este parásito de evolución temprana aún no han sido analizados a fondo. La mayoría de estos estudios se han enfocado en promotores y secuencias regulatorias de la región 5'. Nuestro laboratorio se ha interesado en estudiar los procesos que involucran la región 3' particularmente el proceso de poliadenilación.

En células eucariontes, los transcritos primarios sufren varios procesamientos postranscripcionales entre ellos la adición de una cola de poli (A) en su extremo 3' (poliadenilación) que confiere estabilidad al transcrito, participa en el transporte del mismo al citoplasma y en el proceso de traducción.

El proceso de poliadenilación es un área que no había sido estudiada en *T. vaginalis*. Recientemente nuestro grupo de investigación realizó un estudio detallado de las regiones 3' de varios cDNAs de diversos genes de *T. vaginalis* y se ha propuesto al motivo UAAA como señal de poliadenilación.

Esta señal está ubicada a una distancia entre 11 y 30 nucleótidos río arriba del sitio de procesamiento, y se destaca que el codón de término de la traducción UAA casi siempre forma parte de este motivo. Además, se propone que la secuencia Y↓(A)AAUU señala el sitio de procesamiento. Otra región rica en Us río abajo al sitio de procesamiento podría estar implicada en este proceso.

En el presente trabajo se realizó el análisis funcional de la señal propuesta para la poliadenilación en *T. vaginalis*: el tetranucleótido UAAA. Se mutagenizaron todos y cada uno de los nucleótidos que forman esta señal, además del nucleótido río abajo y adyacente a la misma. Para monitorear el efecto de las mutaciones se utilizó un vector de expresión transitoria en *T. vaginalis* que contiene al gen reportero *cat* (que codifica para la enzima cloranfenicol acetil transferasa), flanqueado por las regiones reguladoras 5' y 3' de un gen de actina. El efecto de cada mutación se reflejó en la disminución de la actividad enzimática de la proteína reportera. Por otra parte, se caracterizaron los extremos 3' de los transcritos provenientes de parásitos transfectados con cada uno de los plásmidos mutantes

en la señal propuesta de poliadenilación; encontramos que el proceso de poliadenilación se ve alterado al cambiar cualquier nucleótido de la señal UAAA. Los resultados obtenidos confirmaron que la señal de poliadenilación en *T. vaginalis* es el tetranucleótido UAAA.

ABSTRACT

The protozoan parasite *Trichomonas vaginalis* is the aetiologic agent for trichomonosis, one of the most common sexually transmitted diseases in humans. Nevertheless, the detailed mechanism of gene expression has not been thoroughly analyzed. Most studies have been focused on promoters and upstream regulatory sequences. Our group has been interested in the mechanisms involved in the processing of mRNA transcripts on the 3' end.

The precursor mRNA transcripts in eukaryotic cells are posttranscriptionally processed. Among these is the addition of a poly(A) tail at the 3' end, a process known as polyadenylation. This has been involved in the stability of the mRNA, the exportation of mRNAs to cytoplasm and the initiation of translation of mRNA into protein.

The polyadenylation process in *T. vaginalis* has been recently approached by our laboratory. Recently our research group proposed the motif UAAA as the polyadenylation signal in *T. vaginalis*, by in silico analysis of the 3' regions of various genes. This putative polyadenylation signal was found 11-30 nucleotides upstream from the cleavage site. It is worth to note that the stop codon UAA is usually found as part of this signal. Moreover the sequence Y↓(A)AAUU is proposed to be the cleavage site. One or several U-rich regions are also proposed to be located downstream from the cleavage site.

In this work we performed a functional analysis of the putative polyadenylation signal in *T. vaginalis* (UAAA). For this purpose we used a *T. vaginalis* transient expression vector which contains the chloramphenicol acetyl-transferase (*cat*) reporter gene flanked by 5' and 3' regulatory regions from a *T. vaginalis* actin gene. By directed-mutagenesis we introduced mutations in the polyadenylation signal. The effect of these mutations was evaluated by the biochemical activity of the reporter protein and by determining the polyadenylation site of the mutant mRNAs by 3'RACE.

Our data confirm that the polyadenylation signal in *T. vaginalis* is the tetranucleotide UAAA.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Biología de *Trichomonas vaginalis*.

1.1.1 Características Generales.

1.1.1.1 Ciclo de vida:

Trichomonas vaginalis es un parásito protozoario anaerobio que solo presenta un estadio en su ciclo de vida, el trofozoito uninucleado (Fig 1A), parasita el tracto urogenital en humanos no tiene huéspedes intermediarios ni vectores. La transmisión de la tricomonosis humana es de persona a persona mediante el contacto sexual con personas infectadas.

1.1.1.2 Clasificación Taxonómica.

Reino:	Protista.
Phylum:	Protozoa.
Subphylum:	Sarcamastigophora.
Clase:	Zoomastigia.
Orden:	Trichomonadida.
Familia:	Trichomonadidae.
Género:	Trichomonas.
Especie:	<i>Trichomonas vaginalis</i>

1.1.1.3 Forma y Tamaño.

Este protozoario presenta cuatro flagelos anteriores, un flagelo recurrente adosado a la membrana ondulante y un axostilo que es una estructura especializada del citoesqueleto formada por microtúbulos (Fig 2).

Los parásitos en cultivo presentan formas y tamaños variables, miden en promedio de 10 a 20 μm de largo por 7 μm de diámetro. Las formas ovoides y redondas son las que predominan en cultivo líquido y en las secreciones vaginales. Las formas ameboides aplanadas se encuentran en biopsias de pacientes, aunque algunas veces se les encuentra

también en cultivos, adheridos a las paredes de los tubos; estos parásitos ameboides se desplazan lentamente sobre el sustrato al que se adhieren. En su interacción con células del epitelio vaginal *in vitro*, los microorganismos de forma ovoide se transforman morfológicamente en formas ameboides en menos de tres minutos: forman lamelipodios y son capaces de emitir pseudópodos que se interdigitan en diferentes sitios con la membrana plasmática de las células blanco, reduciendo el espacio intercelular en las áreas de contacto (Arroyo y col., 1993; Arroyo, R. 2000) (Fig 1B)

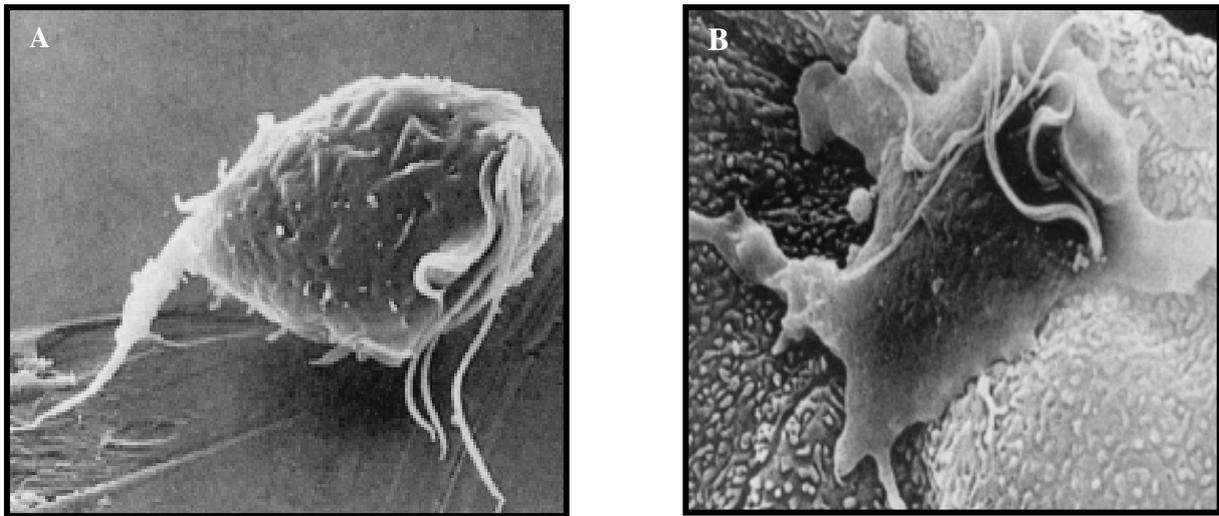


Figura 1. Trofozoito de *Trichomonas vaginalis*, A) Forma ovoide, B) Forma ameboides del parásito en contacto con una célula del epitelio vaginal (Tomado de Arroyo R. y col., 1993).

1.1.1.4 Citoplasma.

En el citoplasma de *T. vaginalis* se han identificado las siguientes estructuras: 1) aparato de Golgi muy bien definido, 2) retículo endoplásmico, 3) sistema vacuolar rico en fagosomas y fagolisosomas, 4) gránulos paraxostilares y paracostales (hidrogenosomas), 5) gránulos de glucógeno, 6) ribosomas libres y asociados al retículo endoplásmico y 7) un citoesqueleto muy complejo. Este organismo no posee mitocondrias ni peroxisomas, en su lugar posee un hidrogenosoma en el cuál se lleva a cabo la generación de ATP (Petrin y col., 1998). En algunos parásitos se pueden encontrar partículas virales que poseen un genoma de RNA de doble cadena.

1.1.1.5 Núcleo.

El núcleo de *T. vaginalis* en interfase es piriforme, mide aproximadamente 4 x 5 μm , se encuentra limitado por una envoltura nuclear con poros típicos y contiene gránulos dispersos de cromatina. Se localiza en la porción anterior y ventral izquierda de la expansión capitular del axostilo. El núcleo contiene un nucleolo esférico pequeño, rodeado de un área libre de cromatina.

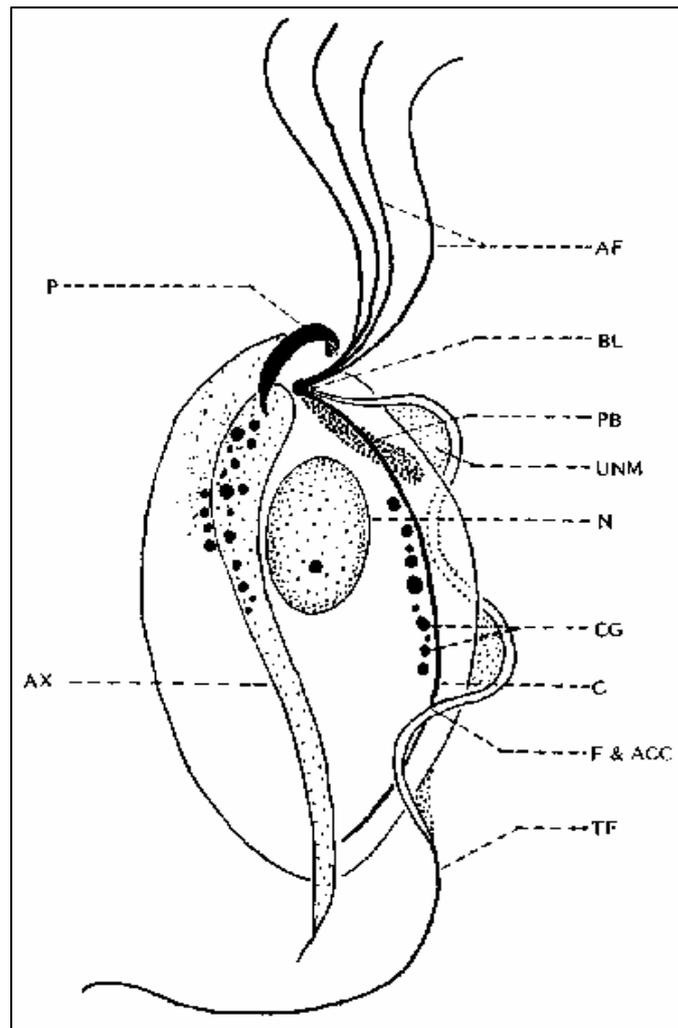


Figura 2 Esquema generalizado del trofozoito del género *Trichomonas* donde se muestran varias estructuras del parásito. Pelta (P), axostilo (AX), flagelos anteriores (AF), costa (C), flagelo y filamento accesorio (F y ACC), flagelo recurrente (TF), membrana ondulante (UNM), cuerpo basal (BL), cuerpo parabasal o golgi (PB) núcleo (N), granulos costales (hidrogenosomas, CG). Tomado de: Marquardt, W.C. y col. 2000.

1.1.1.6 Número Cromosómico.

T. vaginalis es un organismo diploide y posee seis pares de cromosomas (Yeong-Seng y col. 1997; Yeong-Seng y col. 1998). El tamaño del genoma de *T. vaginalis* se estima en 2.5×10^7 pb (Wang, A. Y Wang, C., 1985).

1.1.1.7 Metabolismo.

Trichomonas vaginalis es un organismo anaerobio facultativo, que carece de mitocondria pero contiene un organelo rodeado por doble membrana denominado hidrogenosoma, en donde se lleva a cabo el metabolismo de los carbohidratos. Los hidrogenosomas se dividen de manera autónoma por fisión binaria, importan proteínas postraduccionalmente y producen ATP. Estos organelos difieren de las mitocondrias ya que carecen de genoma, de citocromos, del ciclo de los ácidos tricarbóxicos y de la reacción de fosforilación oxidativa; en su lugar utilizan enzimas (piruvato-ferredoxina oxidorreductasa e hidrogenasa) típicamente restringidas a organismos anaerobios (Müller, 1993).

En el hidrogenosoma se identificó y analizó la β -SCS, una proteína típicamente localizada en la mitocondria de eucariontes superiores. Otros estudios realizados en este parásito han mostrado que en este organelo se encuentran proteínas relacionadas con la mitocondria, lo cual sugiere que este podría ser antecesor de la mitocondria de eucariontes (Lahtí y col., 1992; Roger y col., 1996; Germot y col., 1996).

T. vaginalis es un parásito obligado que no es capaz de sintetizar muchas macromoléculas *de novo*, principalmente purinas, pirimidinas y lípidos. Por lo que debe adquirirlos de las secreciones vaginales o mediante fagocitosis de células del huésped y células bacterianas. El suero es primordial para el crecimiento de tricomonátidos *in vitro* ya que provee de lípidos, ácidos grasos, aminoácidos y trazas de metales (Petrin y col., 1998).

1.1.1.8 Tipo de reproducción y mitosis.

T. vaginalis presenta una reproducción asexual por medio de fisión binaria longitudinal. El tiempo de duración aproximado de la mitosis en este organismo es de 45 minutos y puede ser dividido en cinco fases: profase, metafase, anafase temprana y tardía, telofase temprana y tardía y citocinesis (Gómez-Conde, E. y col. 2000). Ribeiro y colaboradores han propuesto recientemente que el axostilo y los flagelos de *T. vaginalis* contribuyen de manera importante en la mitosis cerrada que presentan estos organismos: sugieren que estas estructuras participan en los cambios de forma del parásito durante este proceso, en la contorsión de la región anterior, en la citocinesis. (Ribeiro, K.C. y col. 2000).

1.2 Patogenicidad.

En el mecanismo de patogenicidad de *T. vaginalis* se han distinguido tres etapas principales: 1) adhesión (citoadherencia) de los parásitos a las células blanco (células epiteliales y eritrocitos), 2) efecto citopático dependiente del contacto y mediado por la secreción de sustancias citoactivas y 3) fagocitosis de las células blanco.

La adhesión del parásito a las células del epitelio vaginal es un paso crítico en la patogénesis, ya que este contacto inicia la transformación a una forma amebode seguida con la producción de adhesinas. Este parásito tiene la capacidad de obtener nutrientes vía lisis de eritrocitos y puede evadir al sistema inmune ya que degrada inmunoglobulinas G y A. También puede tener efectos citopáticos por su capacidad para secretar citotoxinas (Petrin y col., 1998).

1.3 Importancia médica de *Trichomonas. vaginalis*.

Trichomonas. vaginalis es el agente infeccioso responsable de la tricomonosis, una de las enfermedades más comúnmente transmitida por contacto sexual, afecta a 170 millones de personas en el mundo anualmente de las cuales un 92% son mujeres (WHO, 2001).

Esta enfermedad produce daño en los tejidos del tracto urogenital provocando embarazos de alto riesgo (Cotch, M.F. y col. 1997), una mayor susceptibilidad a la infección por el virus de la inmunodeficiencia adquirida (Sorvillo, F. Y Kerndt, P.1998), y

predisposición de algunas pacientes con tricomonosis al cáncer cérvico-uterino (Vikki, M. y col. 2000).

En México la tricomonosis se encuentra entre las veinte principales causas de morbilidad. Los estados de mayor incidencia son: Veracruz, Oaxaca, Chiapas y Puebla, el grupo mas afectado son las personas en edad reproductiva .entre 25 y 44 años. Esta enfermedad representa un serio problema de salud ya que ha mantenido un número de casos similares durante el periodo de 2000-2003 (Vigilancia Epidemiológica, SSA).

1.4 Descripción de la enfermedad.

La tricomonosis humana es una enfermedad crónica no mortal, causada por el protozooario *Trichomonas vaginalis*. En la mujer, el parásito coloniza principalmente el epitelio de la vagina y del exocervix. Los síntomas principales de la enfermedad son: flujo vaginal purulento verde amarillento y de olor fétido e irritación vulvo-vaginal, en algunos casos se presenta dolor en el vientre, en la espalda y al contacto sexual. También se puede presentar eritema vaginal y enrojecimiento cervical causado por dilatación capilar y puntos hemorrágicos, conocidos como “cérvix de fresa”. Los síntomas varían durante el ciclo menstrual y se exacerban durante la menstruación y el embarazo. Sin embargo, del 25 al 50% de las mujeres infectadas son asintomáticas. La tricomonosis se ha identificado como un factor de riesgo en el embarazo, ya que puede provocar parto prematuro, bajo peso neonatal e incremento en la incidencia de endometritis postparto. En el hombre el parásito se aloja principalmente en la uretra, aunque en algunas ocasiones también en la próstata y vesículas seminales, originando una tricomonosis asintomática. Ocasionalmente la enfermedad presenta inflamación de la uretra y puede llegar a ser causa de esterilidad (Arroyo, R., 2000; Meysich, K.1995).

Para el tratamiento de la tricomonosis se utiliza el 5-nitroimidazol (metronidazol) que se activa en los hidrogenosomas del parásito: donde se lleva a cabo la reducción del grupo nitro del metronidazol catalizada por la enzima piruvato ferredoxina oxidoreductasa, formándose un intermediario citotóxico para el parásito que reacciona con el DNA provocando que cese la división celular y ocurra la muerte de la célula (Meysick y col., 1995; Leherker y col., 2000).

1.5 Importancia biológica de *Trichomonas vaginalis*.

Trichomonas vaginalis es un protozoo flagelado de evolución temprana. Este parásito representa uno de los primeros organismos que divergieron de linajes eucarióticos según estudios comparativos tanto de secuencias de la subunidad grande de RNA ribosomal (Baroin, A., y col. 1988) como de secuencias de la subunidad pequeña de RNA ribosomal (16s-like rRNA) (Sogin, M.L., 1991) (Fig 3). El conocimiento de la biología de *T. vaginalis* podría proporcionarnos información acerca de la evolución molecular y celular en organismos de evolución temprana.

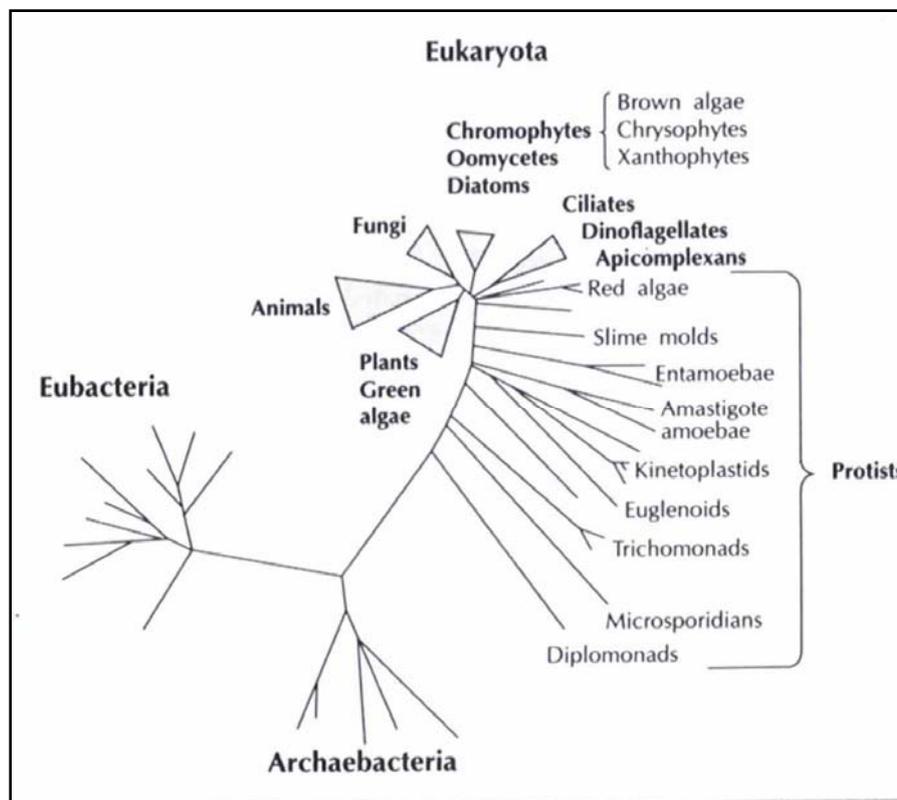


Figura 3 Árbol filogenético construido con base en la similitud de las secuencias de la subunidad pequeña de RNA ribosomal (16s like). Se muestran tres ramas principales: eubacterias, arqueobacterias y eucariontes. *Trichomonas vaginalis* se ubica entre los organismos amitocondriados de las primeras ramificaciones de los eucariontes. Tomado de: Sogin, M.L., 1991.

1.6 Aspectos moleculares de *T. vaginalis*.

Organización génica.

Estudios realizados acerca de la estructura y expresión de algunos genes de *T. vaginalis* han mostrado que los genes de este organismo se encuentran arreglados en unidades de transcripción sencillas. Recientemente se demostró la presencia de intrones en algunos genes y la maquinaria de corte y empalme (splicing) en este parásito. La posición de los intrones encontrados está conservada en genes ortólogos (Vanacova y col., 2005).

Regulación de la expresión génica.

El estudio de la expresión génica en *T. vaginalis* es aún incipiente y se ha enfocado principalmente a la región 5' en donde se localizan los elementos promotores de la transcripción. Hasta el momento solo una secuencia con actividad promotora de la transcripción ha sido caracterizada en *T. vaginalis*. Este elemento rico en pirimidinas, conocido como elemento iniciador (Inr), rodea al sitio de inicio de la transcripción de todos los genes de *T. vaginalis* examinados y se localiza de 6 a 20 nucleótidos río arriba del codón de inicio de la traducción (ATG). El Inr de *T. vaginalis* posee una secuencia altamente conservada: TCA₊₁Y(T/A) que comparte un fuerte parecido con el Inr de metazoarios (T/CT/CA₊₁NT/AT/CT/C). El análisis del elemento Inr de *T. vaginalis* ha mostrado que es esencial para la transcripción. No se han encontrado cajas TATA típicas de eucariontes a 25-30 nucleótidos río arriba a los sitios de inicio de la transcripción (Quon, D.V.K. y col., 1994; Liston, D.R. y Johnson, P.J. 1999).

En este microorganismo, la transcripción de los genes que codifican para proteínas parece estar dirigida por la RNA polimerasa II, que presenta características diferentes a las RNA polimerasas de eucariontes superiores. Estudios de transcripción *in vitro* han mostrado que la RNA polimerasa II de *T. vaginalis* es resistente a altas concentraciones de α -amanitina (50% inhibición con 250 μ g/ml), a diferencia de lo observado con otras RNA pol II que son inhibidas 2-20 μ g/ml. Esta resistencia parece deberse a cambios en el sitio probable de unión a α -amanitina encontrados en la subunidad grande de la RNA

polimerasa II de *T. vaginalis*. Uno de los hallazgos que apoyan la idea de que la RNA polimerasa II de *T. vaginalis* lleva a cabo la transcripción de los genes que codifican para proteínas, es la presencia de un cap en los extremos 5' de los mRNAs, lo cual no sucede típicamente en el proceso de transcripción dirigido por las RNA polimerasas I y III (Liston, D.R. y Johnson, P.J.1998).

Con respecto al procesamiento de los transcritos de *T. vaginalis*, el proceso de poliadenilación ha sido poco estudiado en este parásito. Algunos reportes han sugerido que los motivos AAUAAA y AAUAA (utilizados en eucariontes superiores) podrían funcionar como señales de poliadenilación en este organismo, debido a que estas secuencias se encontraron en las regiones 3' no traducidas de los genes de ferredoxina y β -succinil coenzima A sintetasa (Lahtí, C.J. y col. 1992). Sin embargo, estas propuestas no presentan datos experimentales que las apoyen.

Recientemente, el grupo de investigación de la Dra. López-Villaseñor ha propuesto que la secuencia UAAA es la señal de poliadenilación para los mRNAs de *T. vaginalis* (Espinosa y col, 2002) (ver sección de antecedentes).

2. ANTECEDENTES

2.1 Poliadenilación de los mRNAs en eucariontes superiores.

La síntesis de los RNA mensajeros (mRNAs) en organismos eucariontes es un proceso que requiere de varias etapas de procesamiento. Un paso crítico común para virtualmente todos los transcritos primarios es la generación de los extremos 3' maduros y su subsecuente poliadenilación. Las señales de poliadenilación son requeridas para la terminación de la transcripción por la RNA polimerasa II y para la adición de residuos de adenilato en el extremo 3'OH (Whitelaw, E. y Proudfoot. N., 1986; Proudfoot, N. 1989; McCracken, S. y col., 1997). Esta cola de poli (A) es importante en el transporte del mRNA del núcleo al citoplasma (Eckner, R. y col., 1991), en el control de la estabilidad del mRNA (Beelman, C.A. y Parker, R. 1995). La elección del sitio de poliadenilación puede influenciar la expresión génica, como en el caso de las células B, en donde la diferenciación de la cadena pesada de las inmunoglobulinas en su forma membranal o en su forma secretada, es gobernado en parte a través del uso de sitios alternativos de poliadenilación (Wahle, E. y Kühn, U. 1997).

El proceso de poliadenilación se lleva a cabo en dos reacciones: en la primera el transcrito es cortado endonucleolíticamente, generándose dos moléculas; en la segunda reacción el sitio 3'OH generado en el corte es poliadenilado, es decir se agregan de 150 a 200 residuos de adenilato de manera independiente de templado .

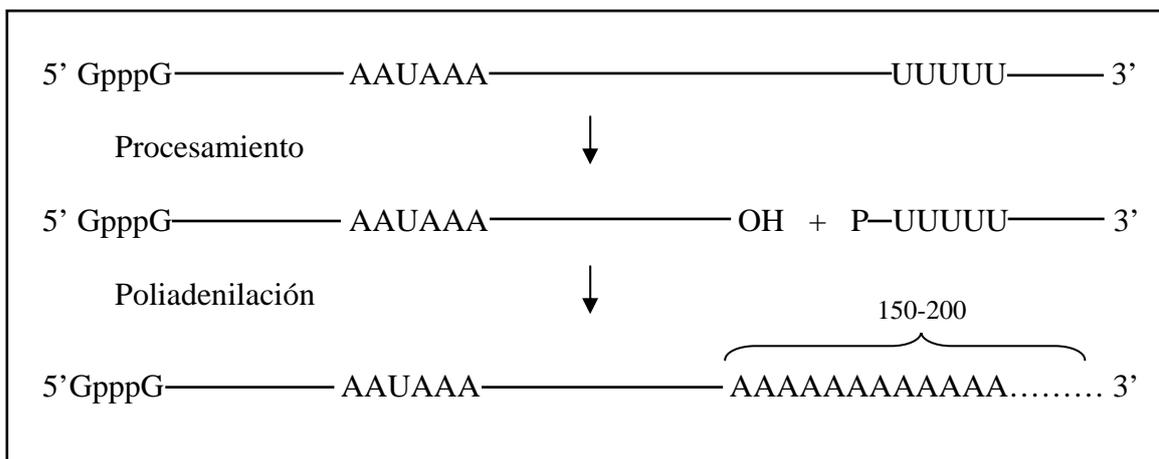


Figura 4. Esquema del proceso de poliadenilación en eucariontes superiores (Wahle; y Walter, 1996)

2.1.1 Importancia de la cola de poli (A) en el mRNA de organismos eucariontes.

El procesamiento en el extremo 3' de los transcritos primarios de RNA requiere la formación de una cola de poli (A) para dar lugar a RNAs mensajeros maduros que puedan ser traducidos. La cola de poli (A) controla el transporte nuclear, la estabilidad y la traducción del mRNA.

Estabilidad: El proceso de degradación puede iniciarse por tres eventos: corte endonucleolítico, remoción del cap del extremo 5' y el acortamiento de la cola de poli (A), en levadura se ha observado el acortamiento de la cola de poli (A) como primer evento posteriormente se remueve el cap y estos mRNAs son digeridos exonucleolíticamente en dirección 5'-3' por una exoribonucleasa o bien en dirección 3'-5' por el exosoma. La cola de poli (A) confiere estabilidad al transcrito ya que es el sitio de unión de varias proteínas (PABP) que lo protegen de la degradación (Mangus y col., 2003).

Exporte nuclear: La cola de poli (A) juega un papel importante en el transporte del mensajero maduro del núcleo al citoplasma ya que los factores de transporte (proteínas de unión a RNA llamadas hnRNP) se unen a ésta para llevar a cabo el transporte. Se ha observado que en ausencia de la señal de poliadenilación los transcritos son retenidos en el núcleo debido a la falta de cola de poli (A) (Zhao y col., 1999).

Traducibilidad: Participa en el proceso de traducción del RNA mensajero a la proteína correspondiente, ya que la proteína PABP se une a la cola de poli(A) del RNA mensajero y al factor de inicio de la traducción eIF4G que forma un complejo ternario con los factores de inicio de la traducción eIF4A y eIF4E (Sachs, y col., 2000), este complejo se une al cap del extremo 5' del mRNA mediante el factor eIF4E. La interacción de la PABP con el factor eIF4G permite la circularización del RNA mensajero estimulando el inicio de la traducción (Wells y col., 2000) ya que facilita el reclutamiento de los ribosomas en el extremo 5' del mRNA (Fig 5). La unión del factor de terminación de la traducción eRF3 con la PABP es importante ya que forma una estructura circular (loop) con el 3'UTR, lo que permite que en mRNAs con 3'UTRs largos el ribosoma se libere eficientemente y sea reclutado en el extremo 5' del mRNA para el siguiente ciclo de traducción. (Sonenberg y col., 2003)

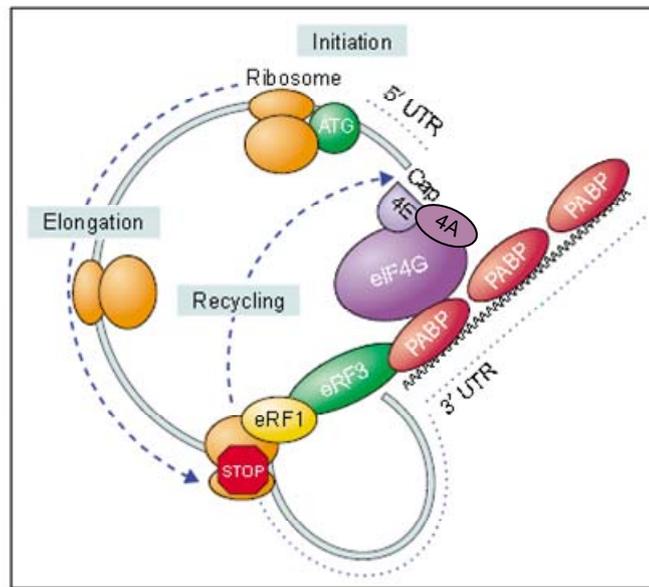


Figura 5. Modelo de circularización del RNA mensajero. Modificado de: Sonenberg y col., 2003

2.1.2 Señales de poliadenilación en mamíferos.

En mamíferos son necesarios principalmente tres elementos para llevar a cabo el proceso de poliadenilación. El hexanucleótido AAUAAA, localizado en la mayoría de los transcritos a una distancia de 10 a 30 nucleótidos río arriba al sitio de procesamiento, es una señal altamente conservada para la poliadenilación en mamíferos y es esencial para el procesamiento de los extremos 3' de los mRNAs. Se ha reportado que la delección del elemento AAUAAA suprime el procesamiento y la poliadenilación de los transcritos, mientras que las mutaciones puntuales en dicha secuencia consenso reducen en gran medida la eficiencia del procesamiento en el extremo 3', la variante más frecuente es AUUAAA (Sheets, M. D., 1990).

Sin embargo, la señal AAUAAA por sí sola no es suficiente para inducir el procesamiento y la poliadenilación de transcritos. Un segundo elemento que juega un papel importante en este proceso ha sido denominado elemento "downstream" (DSE) y está situado río abajo del sitio de corte de los transcritos, a una distancia no mayor de 30 nucleótidos; su secuencia es pobremente conservada, pero han sido descritos dos tipos de

elementos: uno que consiste en una secuencia de por lo menos cuatro o cinco uridinas y otro que es una secuencia rica en GU y tiene el consenso YGUGUUY (Y= pirimidina). Se ha visto que en algunos casos solo uno de estos elementos es suficiente para la poliadenilación; sin embargo, también se ha observado que si están presentes los dos tipos de elementos se presenta un efecto de sinergismo (Gil, A. y Proudfoot, N.J. 1987). Mutaciones en este elemento disminuyen la eficiencia del procesamiento en el extremo 3' y la disminución de la distancia entre el DSE y el sitio de corte puede afectar el procesamiento del transcrito.

La distancia que existe entre la señal AAUAAA y el elemento "downstream" en el transcrito determina una región dentro de la cual puede tener lugar el corte. Dentro de esta región, existe preferencia para cortar en el extremo 3' después de un residuo de A, se ha demostrado que el orden de preferencia para el sitio de corte es $A > U > C \gg G$ frecuentemente después del dinucleótido CA, sugiriendo que este podría jugar un papel en la selección del sitio de procesamiento (Chen, F. y col. 1995).

Por otra parte, secuencias denominadas elementos "upstream" (USE) localizadas río arriba de la señal AAUAAA pueden incrementar la eficiencia del procesamiento; estas secuencias son ricas en Us y su mecanismo de acción es todavía controversial (Wahle, E. y Kühn, U. 1997).

2.1.2.1 Factores involucrados en el proceso de poliadenilación en mamíferos.

El factor específico de corte y poliadenilación (CPSF, cleavage and polyadenylation specificity factor), se requiere como su nombre lo indica para el corte y la poliadenilación; está formado por 4 subunidades de 160, 100, 70 y 30 kDa; la subunidad de 160 kDa reconoce el motivo AAUAAA independientemente de cualquier estructura secundaria (Zhao y col. 1999), la función de las subunidades de 100 y 70 kDa no se conoce y la subunidad de 30 kDa contiene 5 motivos de dedos de zinc, lo que sugiere participa en la unión al RNA (Colgan y col. 1997).

El factor de estimulación de corte (CstF, cleavage stimulation factor) está formado por tres subunidades de 64, 77 y 50 kDa. Es requerido para procesar de manera eficiente los pre-mRNAs y para que se lleve a cabo la poliadenilación. La subunidad de 64 kDa se une a

regiones ricas en Us (DSE), localizadas en las regiones río abajo del sitio de corte (MacDonald, y col. 1994).

Los factores de corte CFI, CFII y la enzima poli (A) polimerasa son requeridos para el corte endonucleolítico de los transcritos primarios, recientemente se reportó que CFI regula la selección del sitio de poliadenilación (Brown y col., 2003). La enzima poli (A) polimerasa es la encargada de sintetizar la cola de poli (A); su función en la reacción de corte es desconocida pero se sugiere que estabiliza al complejo CPSF-RNA (Wahle, y col. 1996).

La proteína de unión a poli (A) (PABII, Poly (A) binding protein II) es una proteína nuclear con alta afinidad por poli (A). Una vez que se ha sintetizado una cola corta de poli (A) esta proteína se une para formar un complejo cuaternario con CPSF, PAP y el RNA. Este complejo momentáneo estabiliza la unión de PAP al extremo 3' formado favoreciendo la síntesis de la cola de poli (A), (Bienhroth, y col., 1993).

2.1.2.2 Modelo para el procesamiento y poliadenilación de mRNAs en mamíferos.

El paso inicial en el ensamblaje del complejo funcional de corte y poliadenilación es probablemente el reconocimiento de las señales de poliadenilación y DSE en el transcrito primario por CPSF y CstF respectivamente, en un proceso asistido por CFI. CPSF se une a la señal AAUAAA mediante la subunidad CPSF-160 auxiliado por CPSF-30 y posiblemente CPSF-100; CstF se une a DSE mediante la subunidad CstF-64. Las interacciones individuales de CPSF y CstF con sus secuencias blanco son débiles pero se estabilizan por la interacción de los factores CPSF-160 y CstF-77. Un último componente en el complejo de iniciación es la enzima RNA polimerasa II (pol II) (Hirose y col., 1998). La formación estable del complejo de corte requiere el reclutamiento de CFII_m y PAP, se desconoce la interacción de CFI_m y CFII_m con los otros factores; la PAP probablemente interactúa con CPSF-160. Cambios significativos tienen lugar después del corte, se libera y degrada el producto de corte 3' y se disocian los factores CstF, pol II, y los factores de corte CFI_m y CFII_m. La interacción de CPSF con la señal AAUAAA recluta la PAP, para llevar a cabo el proceso de poliadenilación sin embargo es necesaria la

unión de PABII al complejo CPSF-PAP para que se lleve a cabo de forma rápida y eficiente la adición de ~250 residuos de adenilato (Fig 6).

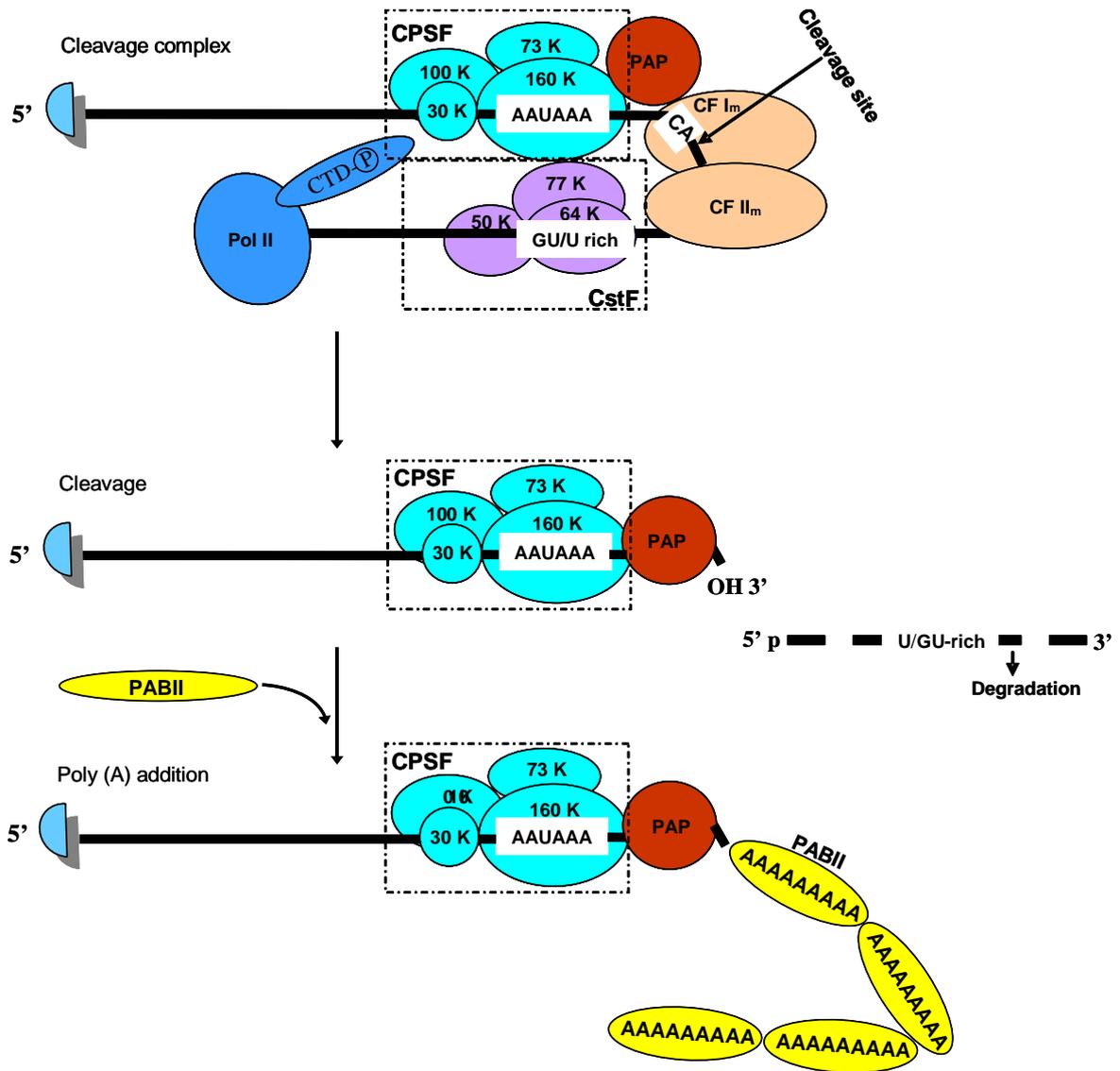


Figura 6. Representación del complejo de procesamiento y poliadenilación en mamíferos. El complejo de corte se forma al unirse CPSF a la señal AAUAAA y CstF a la región rica en U o GU. CPSF-160 interactúa directamente con CpsF-77 y PAP. La posición de CFI y CFII es hipotético. Después del corte el complejo queda unido al RNA y comienza a sintetizarse la cola de poli (A) en presencia de PABII. (Modificado de Zhao, J., 1999).

2.2 Proceso de poliadenilación en protistas.

Los estudios sobre el proceso de poliadenilación en protistas son aun incipientes y esta reacción sólo se ha estudiado en algunas especies. Los datos que se tienen hasta el momento sugieren que los protistas no utilizan necesariamente la señal de poliadenilación descrita en eucariontes superiores (AAUAAA) y se han reportado distintas secuencias que podrían funcionar como señales de poliadenilación en estos organismos.

Especie	Motivo	Referencia
<i>Giardia lamblia</i>	AGTPuAA	Que, X., 1996
<i>Entamoeba histolytica</i>	UA(A/U)UU	Bruchhausy col., 1993
<i>Trypanosoma cruzi</i>	Ausente, proceso acoplado a trans-splicing	Texeira, S.M.R., 1998.

Figura 7. Señales de poliadenilación en algunos protistas.

En *Giardia spp* se ha propuesto como señal de poliadenilación la secuencia AGTPuAA y esta presente entre 6 y 19 nucleótidos río abajo del codón de término de la traducción y entre 7 y 10 bases río arriba del sitio de corte (Adam, R.D. 1991). Que y colaboradores reportaron que los 3' UTRs de dos transcritos de ENC6 son inusualmente largos y utilizan dos señales de poliadenilación: el motivo AGTAAA localizado a 87 y 107 nucleótidos río abajo del codón de término de la traducción; en este caso se utiliza con mayor frecuencia la segunda señal de poliadenilación.

En *Entamoeba histolytica* se propone que el contenido de AT es mayor en las regiones 3' UTR's (alrededor del 80%) que en las regiones codificadoras (~ 68%). Mediante análisis de diversos cDNAs y secuencias genómicas se identificaron dos regiones ricas en Us, una localizada entre 1 y 30 nucleótidos río arriba del sitio de corte (Bruchhaus y col., 1993), y la otra entre 3 y 30 nucleótidos río abajo del sitio de poliadenilación (López-Camarillo y col., 2005), no se encontró una secuencia consenso para el sitio de procesamiento de transcritos. La señal consenso de poliadenilación UA(A/U)UU se encontró en 65% de los genes analizados y el 8% de ellos incluía el codón de término de la traducción.

En *E. histolytica* mediante análisis *in silico* y expresión de mRNA se identificaron 16 genes probables que codifican a los factores de corte y poliadenilación (López-Camarillo y col., 2005). Se sugiere que la maquinaria de procesamiento del extremo 3' del pre-mRNA de *E. histolytica* está en una posición evolutiva intermedia entre mamíferos y levaduras, ya que el modelo propuesto para el procesamiento de transcritos contiene proteínas homólogas a los factores involucrados en el procesamiento y poliadenilación en mamíferos. Se identificaron 4 factores que no presentan homología con los factores descritos en mamíferos y levaduras que pudieran contribuir a una eficiente reacción de corte y poliadenilación.

En los tripanosomátidos (*Trypanosoma cruzi*, *T. brucei* y *Leishmania*) el proceso de poliadenilación no se modula por medio de secuencias consenso como en otros eucariontes, sino por la localización del sitio aceptor de splicing (AG) que se encuentra río abajo del sitio de poliadenilación. Es decir en los tripanosomátidos los procesos de trans-splicing y poliadenilación están acoplados (Texeira, S.M.R., 1998., Ullu E., y col., 1996). En *T. brucei* experimentos con mutantes en donde se deletaron fragmentos de las regiones intergénicas apoyan la importancia de estas regiones en la regulación del trans-splicing y la poliadenilación. La presencia de una secuencia rica en polipirimidinas es crucial, ya que el dinucleótido AG es usado como sitio aceptor de splicing solo si se sitúa río abajo de la secuencia rica en polipirimidinas (Schurch, N. y col., 1994). Por lo tanto la secuencia rica en polipirimidinas dirige la poliadenilación río arriba y el trans-splicing río abajo, llevándose a cabo en primera instancia la reacción de trans-splicing.

2.3 Señales de poliadenilación en *T. vaginalis*.

En el trabajo de tesis de la Dra. Norma Espinosa, realizado en el laboratorio de la Dra. Imelda López Villaseñor, se analizaron de manera detallada las regiones adyacentes al sitio de poliadenilación en algunos transcritos de *T. vaginalis*. Se estudiaron las regiones 3' no traducidas de 10 cDNAs de actina y de otros siete cDNAs de diversos genes de *T. vaginalis* y se compararon con su secuencia genómica. Con base en este trabajo se ha propuesto que el motivo UAAA es la secuencia que actúa como señal de poliadenilación y se ubica a una distancia entre 11 y 30 nucleótidos río arriba del sitio de procesamiento del

transcrito. Se destaca que el codón de terminación de la traducción UAA casi siempre forma parte de este motivo. Se propone también que el motivo UAAA no es suficiente para dirigir el proceso de poliadenilación en este organismo y es necesaria la secuencia $Y^{\downarrow}(A)_{0-3}AAUU$ para señalar el sitio de procesamiento del transcrito; en esta secuencia la flecha indica el sitio de corte del transcrito por lo que el elemento AAUU se localiza río abajo y adyacente al sitio de corte y poliadenilación. Otra región rica en Us, localizada río abajo del sitio de procesamiento del transcrito, podría estar implicada en este proceso (Fig 8). Se propone también que en *T. vaginalis* el motivo UAAA se seleccionó evolutivamente para señalar tanto el fin de la traducción como el procesamiento de transcritos en el extremo 3', acoplando así los dos procesos; se sugiere también que esta secuencia pudo haber originado la señal AAUAAA utilizada como señal de poliadenilación en eucariontes superiores (Espinosa N. y col. 2002).

Si bien en el trabajo de la Dra. Espinosa se propusieron las secuencias que pudieran actuar como señales para el procesamiento y poliadenilación de los mRNAs de *T. vaginalis*, hacía falta probar la funcionalidad de las mismas para demostrar su papel en el proceso de poliadenilación.

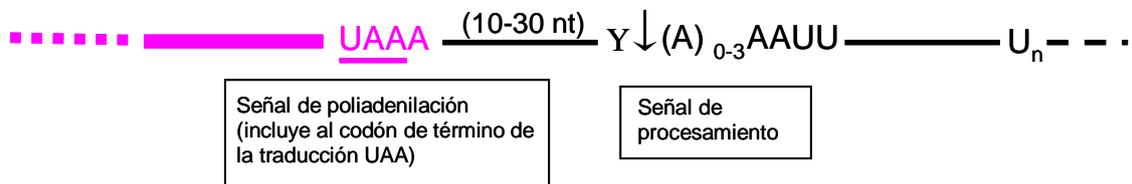


Figura 8. Señales propuestas para la poliadenilación en *T. vaginalis* (Espinosa y col., 2002).

Existen dos reportes que apoyan las propuestas realizadas para las señales de poliadenilación en *T. vaginalis*:

1) En el gen *tvcp12* que codifica para una proteasa de cisteína del tipo papaína, se encontró la señal propuesta para la poliadenilación UAAA que incluye el codón de término de la traducción, situada 18 nucleótidos río arriba del sitio de corte representado por el motivo AAAUU. Se describe también la región rica en Us río abajo al sitio de corte (León-Sicarios y col., 2004).

2) En los genes *tvlegu-1* y *tvlegu-2* que codifican para asparaginil endopeptidasas del tipo de las cisteín proteinasas, se observó la señal propuesta para la poliadenilación UAAA (que no incluye el codón de término de la traducción) situada a 16 nucleótidos río arriba del sitio de corte. En el gen *tvlegu-1* el último nucleótido antes de la cola de poli (A) no es una pirimidina, sino una purina (G) (León-Félix y col., 2004).

Si comparamos las señales propuestas de poliadenilación en *T. vaginalis*, con las descritas para eucariontes superiores, encontramos que ambas señales de poliadenilación están situadas a la misma distancia del sitio de corte, es importante destacar que en eucariontes superiores, el codón de término de la traducción es independiente de la señal de poliadenilación, mientras que en *T. vaginalis* el codón de término de la traducción casi siempre esta incluido en la señal propuesta de poliadenilación, es interesante observar que la señal propuesta para *T. vaginalis* se encuentra contenida en la señal de eucariontes superiores. En cuanto al motivo propuesto como sitio de corte ambos contienen una pirimidina seguida de una adenina, sin embargo en *T. vaginalis* se propone el motivo novedoso AAUU río abajo y adyacente al sitio de corte, en ambos organismos esta presente una región rica en U's o GU río abajo al sitio de corte

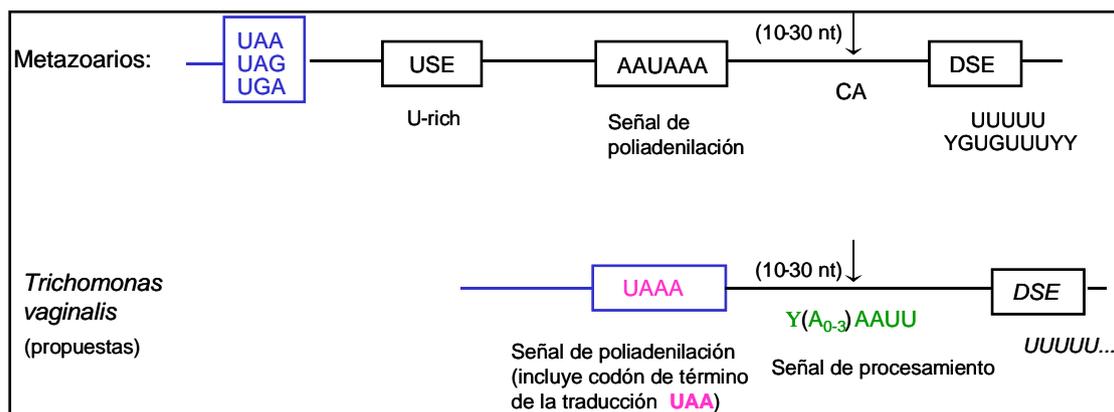


Figura 9. Comparación de las señales de poliadenilación en eucariontes superiores y las señales propuestas para *T. vaginalis*. USE (Upstream Element), DSE (Downstream Element), la flecha señala el sitio de corte del transcrito.

2.4 Genes Reporteros.

Los genes reporteros son una excelente herramienta utilizada para identificar y analizar elementos regulatorios de los genes en un organismo de interés.

La metodología de DNA recombinante permite unir la secuencia regulatoria de interés a un gen reportero o marcador, para ser acoplado en un vector de expresión. Dicho vector se introduce en las células apropiadas, donde la expresión del gen reportero es detectada por la identificación de mRNA, o bien por la actividad catalítica de la proteína reportera. Una característica de los genes reporteros es que la actividad de la proteína reportera debe diferenciarse de la actividad de las proteínas propias del hospedero. La mayoría de los métodos de detección son sensibles, específicos, cuantitativos, reproducibles y rápidos.

La estructura de una región regulatoria puede ser analizada utilizando promotores en los cuales se introducen mutaciones particulares dentro de la secuencia en estudio; la capacidad de las mutantes para expresar al reportero es medida y comparada contra la actividad nativa (es decir, la secuencia original no mutada).

Uno de los genes reporteros mas usados en el análisis de elementos regulatorios es el gen *cat*, que codifica por la enzima Cloranfenicol acetil transferasa (CAT) (Fig 10). Esta enzima modifica de manera covalente al cloranfenicol transfiriéndole un grupo acetilo del acetil CoA en la posición C3 donde se encuentra el grupo hidroxilo primario del cloranfenicol. El producto de esta reacción, 3-acetil cloranfenicol, sufre un rearrreglo en el cual el grupo acetilo se transfiere al C1 formando el 1-acetil cloranfenicol; este rearrreglo permite que se lleve a cabo un segundo ciclo de acetilación al C3, dando como resultado el 1,3-diacetil cloranfenicol. El cloranfenicol modificado de esta manera carece de actividad bactericida ya que es incapaz de unirse a la peptidil transferasa en el centro de los ribosomas procarióticos e inhibir el proceso de traducción. Se puede medir la actividad de CAT mediante varios ensayos usando procedimientos y equipo de uso común en los laboratorios (ver material y métodos). La actividad de CAT es muy estable; su vida media es de 50 horas y se mantiene su actividad después de que la transcripción se ha reducido. CAT es una enzima procariótica, por lo tanto no tiene actividad competitiva endógena en células de mamíferos; además esta enzima es muy estable lo que representa una gran ventaja para ser utilizada como molécula

reportero. En este trabajo de tesis se utilizó a *cat* como reportero molecular. Además de *cat*, otros reporteros se han desarrollado para incrementar la sensibilidad de detección y expandir el rango de líneas celulares que pueden ser usados como hospederos. Cada uno de los reporteros utiliza un método diferente de detección y tiene diferente tiempo de vida media. Dentro de estos genes reporteros podemos encontrar los siguientes:

El gen *luc* codifica para la proteína luciferasa, que produce luciferina en presencia de ATP. Para medir la actividad de este gen se requiere un luminómetro o un contador líquido de centelleo con un contador simple de fotones. La vida media de la luciferasa en células transfectadas es corta, de aproximadamente 3 horas.

La proteína fluorescente verde (GFP, green fluorescent protein) y sus variantes obtenidas por ingeniería genética, son un buen sistema reportero no enzimático. GFP es única entre varias proteínas emisoras de luz, autofluorescentes, que no requieren cofactores exógenos o sustratos independientes para su actividad. Su presencia es detectada mediante la medición de la absorbancia en la longitud de onda apropiada; el sistema utiliza un método de medición no invasivo para monitorear la expresión del gen reportero en las células transformadas. Sin embargo la señal fluorescente no es amplificada por lo tanto la detección requiere que la expresión de GFP sea dirigida por promotores o elementos regulatorios muy fuertes. GFP es muy utilizado en el seguimiento del transporte, localización y destino de las proteínas blanco.

Secuencia del gen *cat*

```

1   ATGGAGAAAAAATCACTGGATATACCACCGTTGATATATCCCAATCGCATCGTAAAGAA
1   M E K K I T G Y T T V D I S Q S H R K E

61  CATTTTGAGGCATTTTCAGTCAGTTGCTCAATGTACCTATAACCAGACCGTTCAGCTGGAT
21  H F E A F Q S V A Q C T Y N Q T V Q L D

121 ATTACGGCCTTTTTAAAGACCGTAAAGAAAAATAAGCACAAGTTTTATCCGGCCTTTATT
41  I T A F L K T V K K N K H K F Y P A F I

181 CACATTCTTGCCCGCCTGATGAATGCTCATCCGGAATTCGGTATGGCAATGAAAGACGGT
61  H I L A R L M N A H P E F R M A M K D G

241 GAGCTGGTGATATGGGATAGTGTTACCCCTTGTTCACCCGTTTTCCATGAGCAAAC TGAA
81  E L V I W D S V H P C Y T V F H E Q T E

301 ACGTTTTTCATCGCTCTGGAGTGAATACCACGACGATTTCCGGCAGTTTCTACACATATAT
101 T F S S L W S E Y H D D F R Q F L H I Y

361 TCGCAAGATGTGGCGTGTACGGTGAAAACCTGGCCTATTTCCCTAAAGGGTTTATTGAG
121 S Q D V A C Y G E N L A Y F P K G F I E

421 AATATGTTTTTCGTCTCAGCCAATCCCTGGGTGAGTTTCACCAGTTTTGATTTAAACGTG
141 N M F F V S A N P W V S F T S F D L N V

481 GCCAATATGGACAACCTTCTCGCCCCGTTTTACCCATGGGCAAATATTATACGCAAGGC
161 A N M D N F F A P V F T M G K Y Y T Q G

541 GACAAGGTGCTGATGCCGCTGGCGATTTCAGGTTTCATCATGCCGTCTGTGATGGCTTCAT
181 D K V L M P L A I Q V H H A V C D G F H

601 GTCGGCAGAAATGCTTAATGAATTACAAAGTACTGCGATGAGTGGCAGGGCGGGGCGTAA
201 V G R M L N E L Q Q Y C D E W Q G G A *

```

Oligo CAT 10 5' 3'

Oligo CAT 11 5' 3'

Oligo CAT 20 3' 5'

Oligo CAT 21 3' 5'

Figura 10. Secuencia del gen *cat* donde se muestra la ubicación de los oligos específicos CAT10, CAT11, CAT 20 y CAT 21 utilizados en la parte experimental.

Secuencia parcial del vector pAC22*cat*-1.

```

5'GGTGGCGGCC GCTCTAGAAC TAGTGTTTTT ATATATAATT ATTTTCGACGG AGCTTAGCAA
ATGAAGACCG TAGCGAAATC AATCTATCAG AATATGTCAG GCACCTGGCTA TTCTCATTAT
TTTTGTGATG TGTGCGCATA TGCTAAAAAA GTTAAATAAT TGTGATTGGA CACTTTTTAGA
TGTTCAATAT TGATCTAAAC ATAAAAACAA TATATAACAG TAACAATCAA ATAGTGTTTA
TGAAAAGATA GACGAACTAT CTTTTGCGTT ACTATAATTC GAATGATATC ATATTTTTTA
ACTTTTTTAG CGAAGACGTA GTTTTTCGAC ATAATATTTT TGAATAACGA TATAGTTTCT
CCAAAAATTT ATGTTTTGGG GAACTTAAAC GAATGTCAGA ATATTGGAAA AAAAATTATG
AGGACATTTT CGTAATCAA TAACAGATTT GTAACCTATA TGTACGTTTA ATTCTGAAAT
CAAGCGTAAT TTCGAAATGG GTAAGATAAT ATCGTGATGT CTGATGTGAA ATTAGTAAAA
AGAATAAAAA TTTTATGAAT GGTTCTTTGA TATGAATACC ATTCATGATA ATCGTTATAA
TTTATAAAAC ATTTTGTAGT TCAGTGCAAT CAATATTTGT GAATTGTCAA ATTTATTCTC
AAAAATTTGA GAGCAATTGA TTGGAATAAA GATATAGAAA ATATATTTAT TGATAGAAAT
AGCAAAATTG GCCAGATATA ATATCGGAAA TAAAATGACA TCACCTCACA TTGTCCCTTT
GAAAATTTGA TCTTTGAGGA AAATATTCGG GAAACCACAT ATATATGTAT AATATCGAAA
GATTAAAAAA ATTAAGAAGG GACTTAGATG TCCTGGTTAT AAATTTTGAG GACTCTAACC
GTTGTCTAAA GAAGTGAAAT GATTGGAATG TTAACCTCAT TTCATTTTCT GCCATGAACA
AAAAATTCAC TGGATATACC ACCGTTGATA TATCCCAATC GCATCGTAAA GAACATTTTG
AGGCATTTCA GTCAGTTGCT CAATGTACCT ATAACCAGAC CGTTCAGCTG GATATTACGG
CCTTTTTTAAA GACCGTAAAG AAAAATAAGC ACAAGTTTTA TCCGCGCTTT ATTCACATTC
TTGCCCGCCT GATGAATGCT CATCCGGAAT TCCGTATGGC AATGAAAGAC GGTGAGCTGG
TGATATGGGA TAGTGTTCAC CCTTGTTACA CCGTTTTCCA TGAGCAAAC TAAACGTTTT
CATCGCTCTG GAGTGAATAC CACGACGATT TCCGGCAGTT TCTACACATA TATTCGCAAG
ATGTGGCGTG TTACGGTGAA AACCTGGCCT ATTTCCCTAA AGGGTTTATT GAGAATATGT
TTTTCGTCTC AGCCAATCCC TGGGTGAGTT TCACCAGTTT TGATTTAAAC GTGGCCAATA
TGGACAACCT CTTGCCCCC GTTTTCACCA TGGGCAAATA TTATACGCAA GCGGACAAGG
TGCTGATGCC GCTGGCGATT CAGGTTTCAT ATGCCGTCTG TGATGGCTTC CATGTGCGCA
GAATGCTTAA TGAATTACAA CAGTACTGCG ATGAGTGGCA GGGCGGGCG TAAGAGCTCA
CTTAAACAAT TTCGGTATAA TATATTTCAA AATTAACTAA CTTTTTTTCT TTAGTGAACC
TATTTTGGAA ATCACTTCAT TAATATTGTG TTTTAATGGT TTATATGTGA CCAATACGAT
GTACCCTGAA CATTTCTTTT CCAATATGAT TTTTACCTTT CACCAAATAC AAGTATCATG
CTAATTAAG TGCTGATTT GCATTGTATT CTTTAACTAT ACATAATTGA ATCAATCAAT
AACACTTGAT AATTGTGTAT TATTCCTTGT TGATTTAAAA GAATATCTTT TGATATTTTG
AAGTAAATTA AATTATTCTT CATCAAATCA TAGAGATAAA CTAAAACAAG ACATTTATAG
TAAGTTAATC AATTATTAA TAAAAATACA AATTTAAATA ATACAAAATA CTAATTTGAAT
TACTCGTTGA CCATTCCAAT CTTCTTTAGA ACATTGAGAA GTTGAGGATC AATTCCTTCA
TCCAAGTCTT CGTAGTGAGC AATCTGTGAG TATGAGCTAG AGTCGTCAGA TCTATTGTCA
TCTCTATCCA AAGGACTTGA AATTGGTCTA GGAATTGCAG AAACATCAAT AGGAACGATG
TTTGCATTTT CGCATTCTTT CATCATATAA TCATTTTCGT GGCTCAATCT ATCATCGGTT
ATCTCAACGA ATGACAGCAA TCTCTTGAC TCCTCGTACG ATCTCTTGTA GCTCAACCTG
TTGTGCTGGT CCTTGACTTT GTCGCTGTTT TCGTTTGAGC TGAATTCGAT ATCAAGCTTA3'

```

Figura 12. Secuencia parcial del vector pAC22*cat*-1. En color rosa se muestra la región 5' intergénica de actina, en azul la región codificadora del gen *cat*, en negro la secuencia que une este gen con la región 3' intergénica de actina representada en rosa (inicia con el codón de paro de actina TAA (subrayado) que forma parte de la señal propuesta para la poliadenilación), en rojo la señal propuesta para la poliadenilación (TAAA), con doble subrayado la señal propuesta para dirigir el procesamiento ($\Psi \downarrow (A)_{0-3}AAUU$) de los transcritos, en cursivas la región rica en U's río abajo del sitio de procesamiento, subrayado en negro el sitio de corte para la enzima Sst I y en los extremos 5' y 3' representadas en negro algunas bases del vector p-bluescript II.

2.5.1 Funcionalidad del vector pAC22*cat*-1 en *T. vaginalis*.

Durante el desarrollo de mi tesis de licenciatura corroboré la funcionalidad del vector pAC22CAT-1 ya que al introducirlo en *T. vaginalis* mediante electroporación el gen *cat* se transcribe y se traduce en el parásito y el producto proteico (CAT) posee actividad enzimática. Determiné las condiciones óptimas de transfección de *T. vaginalis* que son: 50 µg de DNA plasmídico (pAC22*cat*-1), 1500 µF, 360 V y 13 Ω en un electroporador BTX; y un tiempo post-transfección de 22 horas para detectar la mayor expresión de CAT.

Se determinó el sitio de poliadenilación de los transcritos del gen reportero *cat* mediante amplificación rápida de los extremos 3' de cDNA de *cat*, la clonación y secuenciación de los mismos. Encontramos que la poliadenilación de los transcritos *cat* se lleva a cabo en el mismo sitio donde se procesan los RNAs mensajeros de actina (Fig 13), lo que sugiere que la región 3'UTR de actina contiene las señales que dirigen el procesamiento y la poliadenilación de los transcritos, mientras la región codificadora no parece estar involucrada en el procesamiento de los mismos.

Por lo tanto el vector pAC22*cat*-1 es un modelo conveniente para estudiar la funcionalidad de las señales propuestas para la poliadenilación de transcritos en *T. vaginalis*.



Figura 13. Comparación de las señales de poliadenilación de los cDNAs de *cat* y actina.

Se muestra en rojo la señal de poliadenilación propuesta para *T. vaginalis*, rojo y subrayado el codón de término de la traducción de actina, en azul y subrayado el codón de término de la traducción del gen *cat*, en verde la última base antes de la cola de poliadeninas, en amarillo la cola de poliadeninas, en rosa actina y en azul *cat*.

3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

3.1 Hipótesis.

El tetranucleótido UAAA es la señal de poliadenilación de los RNA mensajeros en *Trichomonas vaginalis*. Por lo tanto mutaciones en esta señal alterarán el proceso de poliadenilación.

3.2 Objetivo general.

- Determinar la funcionalidad de la señal propuesta para la poliadenilación de los RNAs mensajeros de *T. vaginalis* utilizando el vector pAC22*cat*-1.

3.3 Particulares.

- Mutagenizar el codón de término de la traducción del gen reportero *cat* (UAA → UAG).
- Realizar mutaciones puntuales en la señal propuesta para la poliadenilación (UAAA) en *T. vaginalis*.
- Determinar el estado de poliadenilación de los transcritos provenientes de párasitos transformados con los plásmidos mutantes en la señal propuesta de poliadenilación y, si es el caso, el sitio donde se lleva a cabo dicho proceso.

4. METODOLOGÍA

4.1 Cultivo de *Trichomonas vaginalis*.

Los parásitos del aislado CNC147 (donado por la Dra. Rossana Arroyo del CINVESTAV, IPN), se cultivaron en tubos de vidrio de 10 ml con tapa de rosca a 37°C, en medio TYM (trypticase-yeast extract-maltose) (apéndice A), suplementado con 10% de suero de caballo (GIBCO) previamente inactivado a 56°C por 30 min. Para el mantenimiento del cultivo se realizaron subcultivos cada 2 días, tomando como inóculo inicial 0.5×10^6 parásitos por ml.

4.2 Transformación de *Escherichia coli*.

Se creció un cultivo de la cepa *E. coli* JM109 en 30 ml de medio LB a 37°C durante toda la noche con agitación (5,000 rpm). Al día siguiente se inocularon 30 ml de medio LB con 1/100 del cultivo anterior, se incubaron a 37°C con agitación (5000 rpm) hasta que alcanzó una densidad óptica de 0.5 a $\lambda = 550$ nm; en este punto las células se mantuvieron en hielo durante 10 minutos, para después centrifugarse a 5,000 rpm en un rotor Sorvall SS34 durante 5 minutos. Las células se resuspendieron en la mitad del volumen original (15 ml) de una solución fría de CaCl₂ 100 mM y se incubaron en hielo por 15 minutos. Terminada la incubación se centrifugaron las células a 5,000 rpm (Sorvall SS34) por 5 minutos. Las células se resuspendieron en 1/15 del volumen original (2 ml) de una solución fría de CaCl₂ 100 mM y se incubaron en hielo por lo menos 30 minutos o más; terminada esta incubación se tomaron 200 μ l de células en un microtubo de 1.5 ml y se agregaron aproximadamente 50 ng del DNA que se desea transformar en un volumen no mayor a 10 μ l, se incubaron en hielo durante 30 minutos. Terminada la incubación se les dio a las células un choque térmico a 42°C por 45 segundos y se regresaron a hielo, para agregarles 800 μ l de medio LB e incubarlos a 37°C por 45 minutos.

En cajas de LB + ampicilina (100 μ g/ml) se siembran 1/10 (100 μ l) y 9/10 de las bacterias transformadas, para sembrar 9/10 se centrifugaron los 900 μ l de bacterias durante 20 segundos a 14,000 rpm en una microfuga y el botón celular se resuspendió en la gota residual de medio después de desechar el sobrenadante. Las cajas se incubaron a 37°C durante toda la noche.

4.3 Obtención de DNA plasmídico (mini- preparación).

Se tomó con un palillo estéril una colonia de las bacterias transformantes, se colocó en tubos de vidrio estériles con tapa, que contenían 3 ml de medio LB con el antibiótico apropiado y se incubaron a 37°C durante toda la noche con agitación (5,000 rpm). Se transfirió 1.5 ml del cultivo bacteriano a microtubos de 1.5 ml, se centrifugó a 12,000 rpm durante 30 seg., se retiró el sobrenadante y se colocó el cultivo restante en el mismo tubo y se volvió a centrifugar en la misma forma. Se retiró el sobrenadante, el botón celular se suavizó mediante agitación en vortex, se agregaron 100 µl de solución I fría (50 mM glucosa, 25 mM Tris-HCl pH 8, 10 mM EDTA pH 8) y se mezcló en vortex nuevamente. Se agregaron 200 µl de solución II recién preparada (0.2 N NaOH, 1% SDS), se mezcló el contenido invirtiendo el tubo en 5 ocasiones y se incubó en hielo durante 5 min. Se agregaron 150 µl de solución III fría (6 ml de acetato de potasio 5M, 1.1 ml de ácido acético glacial y 2.85 ml de agua bidestilada estéril), se mezcló en vortex suavemente y se incubó en hielo durante 5 min. Después se centrifugó a 12,000 rpm durante 5 min., se transfirió el sobrenadante a un microtubo limpio y se agregaron 250 µl de fenol y 250 µl de cloroformo, se mezcló en vortex, y se centrifugó a 12,000 rpm durante 2 min. Se transfirió la fase superior, sin tomar la interfase, a un tubo limpio y se agregaron 500 µl de cloroformo, se mezcló en vortex y se centrifugó igual que en el paso anterior. Se transfirió nuevamente la fase superior a un tubo limpio y el DNA se precipitó con 1 ml de etanol absoluto, se mezcló en vortex y se incubó a temperatura ambiente durante 10 minutos. Por último se centrifugó a 12,000 rpm durante 5 min., se retiró el sobrenadante y se lavó el botón de DNA con etanol al 70% frío, se volvió a centrifugar, se retiró la solución de lavado y el botón de DNA se secó al aire durante 5 min. El DNA plasmídico se resuspendió en 50 µl de amortiguador TE [Tris 10 mM, EDTA 0.2 mM] con RNasa (20 µg/ml), se incubó a 37°C durante 30 min. y se guardó a -20°C.

4.4 Preparación de DNA de plásmidos (midi-prep).

Se realizó el cultivo del plásmido de interés con 75 ml de medio LB + el antibiótico apropiado y se incubó a 37°C toda la noche. Al siguiente día el cultivo se centrifugó a 6000 rpm (Sorvall GSA) por 15 minutos a 4°C, se desechó el sobrenadante y el botón celular se resuspendió en 4 ml del amortiguador P1 plasmid midi kit QIAGEN (50 mM Tris-Cl pH 8, 10mM EDTA, 100 mg/ml RNAsa A), posteriormente se le agregaron 4 ml del amortiguador P2 plasmid midi kit QIAGEN (200mM NaOH, 1% SDS), mezclando por inversión 4 ó 5 veces y se incubó a temperatura ambiente durante 5 minutos. Terminada la incubación se adicionaron 4 ml del amortiguador P3 plasmid midi kit QIAGEN (3 M KCOOH pH 5.5) frío, se mezcló inmediatamente por inversión 4 ó 5 veces y se incubó en hielo por 15 minutos. Se centrifugó a 13,000 rpm (Sorvall SS-34) durante 30 minutos a 4°C. El sobrenadante se colocó en otro tubo y se centrifugó nuevamente por 15 minutos en las condiciones anteriores, terminada la centrifugación se tomó una muestra de 240 µl del sobrenadante que se guardó para analizar posteriormente una alícuota de este en un gel de agarosa al 1%.

Cinco minutos antes de que terminara la centrifugación se equilibró la columna (QIAGEN-tip 100) agregándole 4 ml del buffer QBT plasmid midi kit QIAGEN (750 mM NaCl, 50 mM MOPS pH 7, 15% isopropanol, 0.15% x-100), vaciándose la columna por gravedad. El sobrenadante ya centrifugado por segunda vez se pasó a través de la columna; se recibió el eluido en un tubo cónico de 50 ml, de este eluido se tomó una muestra de 240 µl que se guardó para su análisis posterior en un gel de agarosa al 1%.

Se lavó la columna con 10 ml del amortiguador QC plasmid midi kit QIAGEN (1 M NaCl, 50mM MOPS pH 7, 15% isopropanol) dos veces, cada eluido se recibió en un tubo cónico de 50 ml y se tomó una muestra de 400 µl que se analizó en un gel de agarosa al 1%. El DNA se eluyó de la columna con 5 ml del amortiguador QF plasmid midi kit QIAGEN (1.25 M NaCl, 50 mM Tris-Cl pH 8.5, 15% isopropanol), y se recibió el eluido en un tubo para rotor SS-34, se guardó también una muestra de 100 µl de este eluido para analizar. El DNA eluido de la columna se precipitó con 3.5 ml de isopropanol a temperatura ambiente, se mezcló vigorosamente y se centrifugó a 11,000 rpm (Sorvall SS-34) a 4°C por 30 minutos. Terminada la centrifugación se eliminó el sobrenadante que se

guardó en un tubo cónico de 50 ml; el botón se lavó con 2 ml de etanol al 70% a temperatura ambiente y se centrifugó inmediatamente a 11,000 rpm (Sorvall SS-34) por 10 minutos a 4°C, el sobrenadante se decantó con mucho cuidado para no perder el botón de DNA, este se secó al aire por 5 ó 10 minutos y se resuspendió en 250 µl de H₂O bidestilada estéril. El DNA se guardó en un microtubo de 1.5 ml a -20°C.

4.5 Mutagénesis.

Se utilizó el Quikchange site-directed mutagénesis Kit (Stratagene). Esta metodología consta de 4 pasos: 1) Diseño de oligonucleótidos para la mutación deseada, 2) Replicación del DNA plasmídico utilizando los oligonucleótidos del paso 1 y la DNA polimerasa *PfuTurbo*, 3) Digestión del DNA parental con la enzima *Dpn I* que corta específicamente DNA metilado y hemimetilado, 4) Transformación de células XL1-Blue supercompetentes con el DNA mutante.

1) Diseño de oligonucleótidos: Se diseñaron dos oligonucleótidos complementarios que contuvieran la mutación que se deseaba realizar a la mitad del mismo; con una longitud de 25 a 45 bases , un contenido mínimo de G+C ~ 40%, y una T_m (melting temperature) ≥ a 78°C .

2) Reacción de mutagénesis: En un microtubo se colocaron

Solución	[] final en la reacción
-Amortiguador de reacción 10X	1X
-DNA templado 20 ng/µl	50 ng
-Oligonucleótido #1 (100ng/µl)	2.5 ng/ µl
-Oligonucleótido #2 (100ng/µl)	2.5 ng/ µl
-dNTPs mix (10mM)	0.2mM

38 µl H₂O bidestilada estéril. Se añadió 1 µl DNA polimerasa *PfuTurbo* (2.5 U/µl) .La reacción se llevó a cabo en un volumen total de 50 µl y consistió de 30 segundos 95°C, 12 ciclos de 30 segundos a 95°C, 1 minuto a 55°C, 10 minutos 40 segundos a 68°C y finalmente dos minutos a 4 °C.

3) Transcurrido el tiempo del programa de PCR se agregó 1 µl de la enzima *Dpn I* (10U/µl). Se incubó la reacción a 37°C durante 1 hora. Terminada la incubación se llevó a cabo la transformación de las células XL1-Blue.

4) Se tomó un tubo con 50 µl de células XL1-Blue competentes y se agregaron 2 µl de la reacción de mutagénesis. Se mezcló e incubó en hielo durante 30 min. La reacción se incubó a 42°C durante 45 segundos y se colocó en hielo durante 2 minutos.

Se añadieron 500 µl de medio NZY⁺ precalentado a 42°C para la recuperación. Se pasaron las células transformantes a un tubo cónico de 15 ml y se incubó la reacción a 37°C durante 1 hora con agitación ~200-250 rpm. Transcurrido el tiempo se platearon las células en dos cajas de LB+ Ampicilina (100µg/ml), y se incubaron a 37°C durante por lo menos 16 horas.

4.6 Cinética de crecimiento del aislado CNCD147 de *T. vaginalis*.

Para realizar esta curva partimos de un pool de medio TYM pH=6.2 (apéndice A) + 6% de suero de caballo (GIBCO) y un inóculo de 100,000 células/ml, los cultivos se realizaron en tubos de vidrio con tapa de rosca estériles. Se preparo el pool de acuerdo a los tubos necesarios para realizar lecturas cada cuatro horas, hasta cubrir un periodo de 72 horas de manera que se utilizará un tubo para cada lectura.

Las células se despegaron de las paredes del tubo, se homogenizó perfectamente y se tomó una alícuota de 100 µl que se añadió a un microtubo que contenía formaldehído para una concentración final de 3.5% en PBS (amortiguador salino de fosfatos), se mezcló muy bien y se mantuvo 15 minutos a temperatura ambiente, posteriormente se cargaron 10 µl de la mezcla anterior en las dos ventanas del hemocitómetro y se contó en el microscopio de luz, de esta forma se obtuvo el número de parásitos/ml, este procedimiento se realizó para cada una de las muestras por duplicado.

4.7 Transfección de *Trichomonas vaginalis*.

Para el cultivo inicial de *T. vaginalis*, se preparó un tubo de cultivo que contenía 6 ml de medio TYM pH=6.2, 0.6 ml de suero de caballo inactivado por calentamiento (GIBCO BRL), y un inóculo de ~500,000 células; se incubó a 37°C durante 24 horas. A partir de este cultivo se inocularon 3.7×10^6 parásitos en una botella (Nunc) con capacidad de 260 ml; en cada botella se colocaron 50 ml de medio TYM pH=6.2, 5ml de suero de caballo (GIBCO BRL); se incubaron a 37°C durante 24 horas.

Con este cultivo se inocularon las botellas (Nunc) necesarias para las transfecciones a realizar, ya que para cada transfección se necesitan 2.4×10^8 parásitos.

Pasado el tiempo de incubación, los cultivos se juntaron en un frasco estéril de 1000 ml, se mezclaron perfectamente y se tomaron 100 μ l del cultivo para contar el número de parásitos. El resto del cultivo se centrifugó a 3000 rpm por 10 minutos a 4°C en un rotor GSA (SORVALL). Se desechó el sobrenadante y el paquete celular se resuspendió suavemente en 20 ml de solución Zimmerman fría. Las células se transfirieron a un tubo para rotor SS-34 y se centrifugaron a 3,000 rpm durante 10 minutos a 4°C. El paquete celular se resuspendió en solución de Zimmerman suficiente para llevar a una concentración final de 600,000 células/ μ l y se colocaron en hielo. Las células de *T. vaginalis* se transfectaron mediante electroporación. Para la electroporación se utilizaron celdas (electroporation cuvette plus, 2 mm Gap, BTX) con 400 μ l de células preparadas como ya se describió, 50 μ g del plásmido a transfectar en un volumen no mayor a 50 μ ls. Como control negativo se realizó otra electroporación en iguales condiciones, pero utilizando una solución de T.E. [Tris-EDTA] 10/02 mM. Las celdas se incubaron en hielo por 5 minutos.

La electroporación se llevó a cabo con el BTX electroporation system, electro cell manipulator 600. Las condiciones iniciales fueron un pulso a 1,500 μ F, 360 V y 13 Ω . Después de electroporadas las células se dejaron a temperatura ambiente por 5 minutos; a continuación cada electroporación se transfirió a una botella de cultivo de 260 ml de capacidad con 30 ml de medio TYM pH=6.2 y 3 ml de suero de caballo, preincubada a 37°C. Las botellas se incubaron a 37°C durante 22 horas.

4.8 Preparación del extracto proteico.

Los extractos proteicos se obtuvieron de los cultivos de *T. vaginalis* transfectados por electroporación (secc.4.6) el cultivo se dividió en dos para preparar RNA total y el extracto proteico de la siguiente manera: Del volumen total del cultivo de *T. vaginalis* se transfirieron 15 ml del cultivo electroporado a un tubo cónico de 15 ml. Este se centrifugó a 3,000 rpm durante 5 minutos a 4°C. Se eliminó el sobrenadante y la pastilla se resuspendió en 1 ml de solución TEN (Tris 40 mM pH=8, EDTA 1 mM pH=8 y NaCl 15 mM, estéril), subiendo y bajando con una micropipeta. La pastilla resuspendida de cada muestra se transfirió a un microtubo nuevo de 1.5 ml y se centrifugó en una microcentrifuga a 3,000 rpm durante 15 segundos a 4°C. Se retiró el sobrenadante con una micropipeta y se resuspendió cada pastilla en 500 µl de solución TEN. Se centrifugó en una microcentrifuga a 3,000 rpm durante 15 segundos a 4°C y se desechó el sobrenadante.

Finalmente el paquete celular se resuspendió suavemente en 75 µl de Tris 25 mM pH=8, subiendo y bajando con la pipeta. Las células se lisaron con 3 ciclos de congelación-descongelación en nitrógeno líquido. Inmediatamente después del último ciclo, los tubos se incubaron a 37°C durante 5 minutos, y se repitieron dos ciclos más de congelación-descongelación. A continuación los tubos se incubaron a 65°C por 10 minutos, se mezcló el lisado con la punta de una pipeta y se centrifugó en una microcentrifuga a 14,000 rpm por 10 minutos a 4°C. Los tubos se mantuvieron en hielo, los extractos proteicos se alicuotaron en microtubos con 25 µl de extracto cada uno y se guardaron a -70°C hasta ser utilizados.

4.9 Extracción de RNA total a partir de parásitos transfectados.

Para la extracción del RNA total se tomaron los 15 ml del cultivo electroporado restantes y se colocaron en un tubo cónico (Nalgene) de 15 ml, se centrifugó a 3,000 rpm durante 10 min. a 4°C en una centrifuga clínica. Se desechó el sobrenadante y la pastilla se resuspendió en 1 ml de PBS (amortiguador salino de fosfatos) preparado con H₂O DEPC estéril, se transfirió a un microtubo de 1.5 ml y se trataron de la siguiente forma: se centrifugaron 1 min. a 14,000 rpm a 4°C, se desechó el sobrenadante y la pastilla se resuspendió en 1 ml de TRIZOL (Invitrogen). Las células se lisaron mediante pipeteo y el lisado se incubó 5 minutos a temperatura ambiente para disociar complejos

nucleoprotéicos. Se agregó a cada tubo 0.2 ml de cloroformo, se mezcló por inversión 15 segundos, se incubó 3 minutos a temperatura ambiente y se centrifugó a 14,000 rpm durante 15 minutos a 4°C. El RNA se precipitó de la fase acuosa con 0.5 ml de alcohol isopropílico, durante 10 minutos a temperatura ambiente. Se centrifugó a 14,000 rpm durante 10 minutos a 4°C, el sobrenadante se eliminó y se lavó el botón de RNA con 1 ml de etanol al 75% (H₂O DEPC). El botón de RNA se secó y se resuspendió en 30 µl de H₂O/DEPC.

Para valorar la integridad del RNA se tomó 1 µl de la muestra de RNA+ 4 µl de H₂O DEPC + 2 µl de amortiguador de carga 6X para RNA, se calentó a 60°C durante 10 minutos, se incubó en hielo 5-10 min para después cargarse en un gel de agarosa al 0.8% en TBE 1X preparado con H₂O tratada con DEPC, el gel se corrió a 80 volts durante 1 hora. El resto del RNA se guarda a -70°C hasta ser utilizado.

4.10 Ensayo para medir la actividad enzimática de la cloranfenicol acetil transferasa (CAT).

En este ensayo deben tomarse en cuenta todos los lineamientos para el manejo de material radioactivo.

Se prepara el stock de [³H]-cloranfenicol 0.2µCi/µl (apéndice C) y se diluye a una concentración de 0.01µCi/µl. También se prepara N-Butiril-CoA 2.5mM en acetato de sodio 10 mM pH=5.

Para el ensayo CAT se utilizaron los extractos proteícos de *T. vaginalis* (secc.4.8) y se incluyeron los siguientes controles negativos y positivos

Controles negativos:

- 1.-Tris 25 mM
- 2.-Extracto proteíco de células transfectadas con T.E 10/02 mM.

Controles positivos:

- 1.-Enzima CAT 0.016 U/ml
- 2.-Enzima CAT 0.008 U/ml

Todos los reactivos y las muestras se colocaron en hielo antes de comenzar el ensayo.

La mezcla maestra para 8 reacciones se preparó de la siguiente forma:

Solución.	[] final en la reacción
-160 µl [³ H] Cloranfenicol (0.01 µCi/µl)	0.2 µCi
- 80 µl N-Butiril-CoA 2.5 mM	0.25 mM
- 80 µl Tris 1M, pH=8	100 mM
- 80 µl Agua bidestilada estéril.	

- 400 µl Volumen final.

Se prepararon las siguientes reacciones:

1. 50 µl de Tris 25 mM pH=8 (control negativo de la reacción).
2. 48.9 µl de Tris 25 mM pH=8 + 1.12 µl de la enzima CAT dilución 1:1000 en Tris 25mM (0.008U) [control positivo de la reacción].
3. 47.8 µl de Tris 25 mM pH=8 + 2.24 µl de la enzima CAT dilución 1:1000 en Tris 25 mM (0.016U) [control positivo de la reacción].
4. 45 µl de Tris 25 mM pH=8 + 5 µl del extracto proteico de T.E(control negativo de transfección)
5. 45 µl de Tris 25 mM pH=8 + 5 µl del extracto proteico preparado en la sección 4.6 para cada electroporación realizada.

A cada tubo se le agregaron 50 µl de la mezcla maestra para tener un volumen final de 100 µl. Se incubaron los tubos a 37°C durante 2.5 horas. Terminado el tiempo de incubación se extrajo el cloranfenicol diacetilado mediante una extracción con xileno; para esto se agregaron a los tubos 240 µl de xileno, se mezclaron en vortex muy bien y se centrifugan a 14,000 rpm durante 2 minutos, se tomaron 180 µl de la fase orgánica (superior) y se colocaron en un nuevo tubo marcado con un asterisco. Se realizó otra extracción, agregándole 210 µl de xileno a los tubos con la reacción original y se realizó el mismo procedimiento anterior, ahora se tomaron 200 µls de la fase orgánica y se colocaron en los tubos marcados con un asterisco para un volumen final

de 380 μ l. A los tubos con 380 μ l de xileno se les agregaron 250 μ l de Tris 25 mM pH=8, se mezclaron en vortex por 30 segundos y se centrifugaron 2 minutos a 14,000 rpm; se tomaron 330 μ l de la fase orgánica y se colocaron en nuevos microtubos, a estos tubos se les agregaron 300 μ l de Tris 25 mM pH=8 se mezclaron en vortex muy bien y se centrifugaron a 14,000 rpm por dos minutos, se tomaron 300 μ l de la fase orgánica y se colocaron en viales que contenían líquido de centelleo. Las muestras se leyeron en un contador de centelleo previamente normalizado en el canal de tritio (ver resultados).

4.11 Cuantificación de Proteína.

Para reportar la actividad de CAT / μ g de proteína se cuantificó la cantidad de proteína en los extractos mediante el método de Bradford (Bradford, M.M. 1976). Se utilizó una curva patrón de albúmina sérica bovina a diferentes concentraciones (0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3 hasta 10 μ g /ml).

En un microtubo de 1.5 ml se colocaron 5 μ l de la muestra a cuantificar + 795 μ l de agua bidestilada estéril. A estos tubos se les agregó 200 μ l del reactivo Azul de Coomasie (Biorad), se mezclaron en vortex vigorosamente por 30 segundos, y se incubaron a temperatura ambiente por 10 minutos. Las muestras se leyeron en el espectrofotómetro a 595 nm, antes de que transcurriera una hora de realizada la reacción. Los datos de la curva patrón se graficaron para interpolar las lecturas de las muestras.

4.12 Purificación del RNA poli (A)+.

A partir del RNA total de *T. vaginalis* se purificó el RNA poli (A)+ utilizando el Quick Prep Micro mRNA purification kit (Amersham Pharmacia Biotech). En este procedimiento se utilizó una resina [oligo(dT) celulosa] para separar el RNA poli (A)+. Se partió de 2.2 μ g de RNA total de *T. vaginalis* resuspendidos en 30 μ l de H₂O DEPC; se adicionó 0.4 ml de amortiguador de extracción [Quick Prep Micro mRNA purification kit (Amersham Pharmacia Biotech)], 0.8 ml del amortiguador de elución [Quick Prep Micro mRNA purification kit (Amersham Pharmacia Biotech)] 1 μ l de oligo (dT) celulosa, se mezcló suavemente por inversión durante 3 minutos, se centrifugó a 14,000 rpm por 10 segundos y se eliminó el sobrenadante. La resina se lavó

cinco veces de la siguiente manera: se resuspendió en 1 ml del amortiguador de alta sal [10Mm Tris-HCl (pH 7.5), 1 mM EDTA, 0.5 mM NaCl] se centrifugó a 14,000 rpm por 10 segundos y se eliminó el sobrenadante. Posteriormente la resina se resuspendió en 1 ml del amortiguador de baja sal [10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 1 mM EDTA, 0.1 M NaCl] por inversión, se centrifugó a velocidad máxima por 10 segundos y se eliminó el sobrenadante; este procedimiento se repitió 2 veces.

La resina se resuspendió en 0.3 ml del amortiguador de baja sal, se transfirió a la columna (microspin column) que se coloca dentro de un microtubo y se centrifugó a velocidad máxima (14,000 rpm) durante 5 segundos. Este proceso se realizó dos veces mas, utilizando 0.5 ml del amortiguador de baja sal y tubos nuevos.

El RNA poli (A)+ se eluyó de la resina de la siguiente manera: La columna se colocó en un microtubo de rosca, y se le agregó 0.2 ml del amortiguador de elusión a 65°C, la columna se centrifugó a velocidad máxima durante 5 segundos, y se guardó el eluato que contiene el RNA poli (A)+. La columna se lavó con 0.2 ml de amortiguador de elusión a 65°C y se repitió el procedimiento anterior.

El RNA se cuantificó por espectrofotometría de la siguiente manera: el RNA se diluyó 1:1000 en amortiguador de elusión, en un volumen total de 1000 μ ls. En una celda de cuarzo se leyó la absorbancia a $\lambda=260$ nm y $\lambda=280$ nm. La concentración de RNA se calculó utilizando la fórmula:

$$1 \text{ D.O.}_{260} = 40 \mu\text{g RNA/ml}$$

4.13 Amplificación rápida de los extremos 3' de cDNA (3' RACE)

La técnica de 3' RACE incluye los procesos de: a) síntesis de cDNA a partir de RNA poli (A)+, b) amplificación del extremo 3' del cDNA del gen mediante PCR y c) clonación del producto de PCR purificado.

a) Síntesis de cDNA de *T. vaginalis*.

Se colocaron en un microtubo:

Solución	[] final en la reacción.
-RNA poli (A) +	1.5-71 ng/ μ l
-oligonucleótido AP	28.5 ng/ μ l
-dNTPs mix	0.7 mM
-H ₂ O DEPC	cbp 7 μ l

Esta reacción se incubó a 65°C durante 5 min. y se colocó en hielo 1 min, el tubo se centrifugó en una microcentrifuga y se agregaron:

Solución	[] final en la reacción
-Amortiguador First Strand (Invitrogen)	0.5 X
- DTT (Invitrogen)	0.005 M
-SuperScript TM III RT (Invitrogen)	100 U

Se mezcló con pipeta subiendo y bajando, se incubó durante 15 min a 42°C. y 30 min a 50°C. La enzima se inactivo durante 15 minutos a 70°C. Posteriormente el RNA se degradó con 1 U de RNAsa H (Invitrogen) a 37°C durante 35 minutos, se centrifugó en una microcentrifuga y se guardó a -20°C.

b) Amplificación de los extremos 3' de cDNAs de CAT por medio de PCR.

En un microtubo de 0.5 ml para PCR estéril se colocaron

Solución	[] final en la reacción
-cDNA de <i>T. vaginalis</i>	1.5 µl
-Amortiguador PCR (SIGMA)	1X
-dNTPs (Invitrogen)	0.6mM
-MgCl ₂ (SIGMA)	3mM
-Oligonucleótido AUAP-B	80 pmol
-Oligonucleótido CAT 10	80 pmol
-H ₂ O bde	cbp 49.5 µl

Se agregaron 0.5 µl de la enzima *Taq* polimerasa (donada por el Dr. Jaime Ortega, CINVESTAV). La reacción se llevó a cabo en un volumen total de 50 µl y consistió de 30 ciclos de 1 minuto de desnaturalización a 94°C, 2 min. de acoplamiento a 42°C y 3 min. de extensión a 72°C, seguidos por 5 min. de extensión a 72°C.

Para realizar una segunda amplificación del cDNA de CAT (PCR anidado, o “nested”), se colocaron:

Solución	[] final en la reacción
-Producto de la primera amplificación	0.5 µl
-Amortiguador PCR (SIGMA)	1X
-dNTPs (Invitrogen)	0.6mM
-MgCl ₂ (SIGMA)	3mM
-Oligonucleótido AUAP-B	80 pmol
-Oligonucleótido CAT 11	80 pmol
-H ₂ O bde	cbp 49.5 µl

Se agregaron 0.5 µl de la enzima *Taq* polimerasa (CINVESTAV). La reacción se llevó a cabo en un volumen total de 50 µl y consistió de 35 ciclos de 1 minuto de

desnaturalización a 94°C, 1 min. de acoplamiento a 55°C y 1 min. de extensión a 72°C, seguidos por 5 min. de extensión a 72°C. Los productos de PCR se verificaron en un gel de agarosa al 1.5 % en TAE 1X

c) Ligación del producto de PCR en el vector TOPO (Invitrogen).

La clonación en el vector TOPO se basa en la reacción que se lleva a cabo entre la enzima topoisomerasa I del virus de la *Vaccinia* y el DNA del vector plasmídico, la enzima corta después de la secuencia 5'- CCCTT de cada una de las cadenas del DNA (en este sitio se ligará el producto de PCR) y se forma un enlace covalente entre el grupo 3' fosfato del sitio de corte y el residuo de tirosina (Tyr 274) de la topoisomerasa. Este enlace es atacado por el grupo 5' hidroxilo de la cadena de DNA liberando a la enzima, haciendo eficiente la clonación del producto de PCR con el vector. Se puede transformar en células químicamente competentes o bien en células electrocompetentes. El vector TOPO tiene en su genoma al gen *ccdB* que es un gen letal de *E. coli*, este gen está unido al C terminal del fragmento *LacZα* y al ligarse el producto de PCR se inhibe la expresión de dicho gen, permitiendo crecer únicamente a las colonias recombinantes representando de esta forma una gran alternativa para la clonación de productos.

Se clonaron los productos del PCR anidado, de la siguiente manera: En un microtubo de 0.5 ml se colocaron 2 µl del producto de PCR anidado, 0.5 µl de la solución diluida de sal (1:4) (Invitrogen), y 0.5 µl del vector TOPO. La mezcla se incubó por 15 minutos a temperatura ambiente para que se llevara a cabo la ligación. Posteriormente se agregaron 2 µl de la reacción anterior a un vial de células competentes (*E.coli* ya incluidas en el kit) mezclándose ligeramente. Las células se transfirieron a una celda para electroporación de 0.1 cm de diámetro, se electroporaron a 2.46 Kvolts, y se recuperaron inmediatamente en 250 µl de medio SOC. La mezcla se transfirió a un tubo cónico (Falcon) de 15 ml y se incubó a 37 °C por una hora con agitación a 500 rpm.

Después de la incubación se plateó 1/10 (30 µl) y 9/10 (270 µl) de cada electroporación en cajas de medio LB sólido + kanamicina (50 µg/ml) y las cajas se incubaron a 37°C toda la noche.

4.14 Southern blot

En esta técnica se hibrida el DNA (los productos de PCR de la primera amplificación y el PCR anidado) con una sonda radiactiva de un fragmento de la región codificadora de el gen *cat*..

Se preparó un gel de agarosa al 0.8% en TAE 1X, con un grosor aproximado de 6 mm, se utilizó como marcador de peso molecular λ HindIII, se cargaron los productos de PCR obtenidos para la primera y segunda amplificación, el gel se corrió a 80 volts durante una hora, se tiñó con bromuro de etidio durante 10 minutos y se destiñó 20 minutos en agua bidestilada. Se colocó una regla fluorescente junto al gel de forma que coincidiera el 0 de la regla con la parte inferior del pozo, se tomó una fotografía para posteriormente inferir el tamaño de las bandas que den señal. Se hizo una muesca en la parte superior derecha del gel. Posteriormente se transfirió el gel a un recipiente para realizar los pasos de:

- a. Depurinización: se incubó el gel en 250 ml de HCl 0.25 N durante 7 minutos. Se descartó la solución y se repitió este paso una vez más.
- b. Desnaturalización: se incubó el gel en 250 ml de solución desnaturalizante durante 15 min. Se descartó la solución y se repitió este paso una vez más.
- c. Neutralización: se incubó el gel en 250 ml de solución de neutralización durante 30 minutos. Se descartó la solución y se repitió este paso.

Para transferir el DNA a una membrana de nylon Zeta probe GT (BIORAD), se cortó la membrana del tamaño del gel, se colocó sobre el gel y para permitir la transferencia se colocó sobre esta un papel whatman del mismo tamaño y una cama de toallas de papel, con un peso encima. Se utilizó la solución de transferencia (apéndice c) y se dejó transfiriendo durante 16 horas.

Después de la transferencia, se marcaron los pozos del gel en la membrana, y se cortó la esquina correspondiente que se cortó en el gel. La membrana se lavó con agitación suave en SSC 2X (apéndice c) durante 10 minutos, y se dejó secar durante 1 hora. El DNA se fijó a la membrana con luz UV utilizando una energía de 120,000 $\mu\text{J}/\text{cm}^2$ en un equipo UV crosslinker (Stratagene); la membrana se prehibridó durante por lo menos 2 horas en solución de prehibridación (apéndice c) a 40°C. Se desechó la solución de prehibridación y se le agregó la sonda radiactiva.

La sonda para hibridar la membrana, se preparó de la siguiente forma: utilizando el kit comercial Rediprime™ II (random prime labelling system) [Amersham pharmacia biotech], 50-100 ng de DNA se llevan a un volumen de 45 µl con H₂O bidestilada estéril, se desnaturalizan por calentamiento a 95°C durante 5 minutos en un baño de agua hirviendo, se pasan a hielo durante 3' y se centrifugan a velocidad máxima en microcentrifuga por 30 segundos.

El DNA desnaturalizado se agregó al tubo de labelling mix mezclándolo suavemente hasta que el color fue uniforme, se centrifugó nuevamente a la misma velocidad y se agregaron 15µCi de α[³²P] dCTP homogeneizando perfectamente la reacción, se incubó por 10 minutos a 37°C. Se paró la reacción agregando 5 µl de EDTA 0.2M, posteriormente se le agregaron 50 µl de solución T.E 10/02 mM.; se pasó esta mezcla por una columna de sephadex G50 para quitar la marca radiactiva libre, no incorporada a la reacción.

La sonda se desnaturalizó con 10 µl de NaOH 3N durante 5 minutos a temperatura ambiente, se transfirió a hielo con agua y se neutralizó con 10 µl de HCl 3N y 5µl de Tris 1M pH=7.4. La sonda desnaturalizada se mezcló con 5 ml de solución de prehibridación.

La solución de prehibridación de la membrana se desechó y se le agregaron los 5 ml de la sonda radiactiva. Los filtros se hibridaron durante un tiempo equivalente a 2 Cot 1/2, donde $Cot\ 1/2 = 2(1/X) (Y/5) (Z/10)$; X= Peso en µg de la sonda, Y= tamaño en kb de la sonda, y Z= volumen de hibridación en ml (Cot ½ es el tiempo en el que la mitad de las moléculas de la sonda se unen a las moléculas del DNA blanco).

Pasado el tiempo de hibridación, la membrana se lavó durante 15 minutos a temperatura ambiente con una solución 2X SSC y 0.5% SDS; la membrana se monitoreo con un contador geiger y se lavó dependiendo del fondo radiactivo. La membrana se expuso en película Hiperfilm (Amersham Biosciences) durante 24 horas.

4.15 Selección de clonas positivas mediante hibridación.

Las colonias que se obtuvieron en las cajas de medio LB + kanamicina se parcharon por duplicado en cajas de medio LB + kanamicina (50 µg/ml) de la siguiente manera: se colocó una plantilla cuadrículada y numerada bajo la caja petri y en cada uno

de los cuadros se sembró una colonia distinta, mediante el uso de palillos estériles. Las cajas se incubaron a 37°C por 24 horas. El duplicado de cada caja se guardó a 4°C para recuperar las clonas positivas. La transferencia de colonias a filtros para hibridación se hizo de la siguiente manera:

Se cortaron filtros de nitrocelulosa del tamaño de la base de la caja petri; se colocó un filtro sobre una caja petri, evitando que quedaran burbujas de aire, durante un minuto sobre las colonias parchadas; se marcaron los filtros con tinta para saber su orientación. Los filtros se transfirieron sucesivamente en las siguientes soluciones: SDS al 10% (5 min), NaOH 0.5 M (5min), NaCl 1.5 M (5 min). Los filtros se dejaron secar a temperatura ambiente por 1 hora. Posteriormente se fijó el DNA utilizando una energía de 120,000 $\mu\text{J}/\text{cm}^2$ en un equipo UV crosslinker (Stratagene). A continuación los filtros se lavaron con una solución 5XSSC, 0.5% SDS y 1mM EDTA, para eliminar completamente los restos celulares. Se dejaron secar los filtros por aproximadamente 1 hora a temperatura ambiente.

Los filtros se prehibridaron durante dos horas en 10 ml de la solución de prehibridación (apéndice c), en un horno de hibridación (Amersham Life Science).

La sonda para hibridar los filtros, se preparó de la misma forma que la utilizada en el Southern blot (sección 4.14).

La solución de prehibridación de los filtros se desechó y a los filtros se les agregó la sonda radiactiva. Los filtros se hibridaron durante un tiempo equivalente a 2 Cot 1/2. Pasado el tiempo de hibridación, los filtros se lavaron 2 veces durante 15 minutos a temperatura ambiente con una solución 2XSSC y 0.5 % SDS; los filtros se monitorearon con un contador geiger y se lavaron las veces necesarias para reducir el fondo radiactivo. Los filtros se expusieron durante toda la noche en película Hiperfilm (Amersham Biosciences).

4.16 Northern blot.

El RNA extraído de los parásitos transformados con el plásmido de interés se separó de acuerdo a su peso molecular en un gel desnaturalizante de agarosa con formaldehído al 1.75%, (peso/volumen), (apéndice e). Las muestras de RNA se prepararon de la siguiente forma: Se colocaron en un microtubo estéril 500 ng de RNA total, 2.5 µl de agua bidestilada tratada con DEPC, 1.55 µl de MOPS 5X, 2.72 µl de formaldehído y 6.8 µl de formamida.

Las muestras de RNA y los marcadores de bajo y alto peso molecular (0.16-1.77 kb RNA Ladder. GIBCO) se incubaron durante 15 minutos a 65°C y se pasaron a hielo. Posteriormente se les agregó 4.5 µl de amortiguador de carga 6X para RNA (0.25% azul de bromofenol, 0.25% xilencianol, 30% glicerol, 1.2% SDS y 60 mM de fosfato de sodio pH= 6.8) y se cargó en el gel. El gel se corrió 3 horas a 80 volts posteriormente se cortó la parte donde se cargaron los marcadores de peso molecular y una muestra del RNA, se tiñó con bromuro de etidio en agua DEPC. El resto del gel se transfirió a una membrana de nylon (nitran, Schleider & Schuell) durante 17 horas con una solución 10X SSC. Después de la transferencia la membrana se dejó secar a temperatura ambiente durante 1 hora y el RNA se fijó a la membrana con luz UV utilizando una energía de 120,000 µJ/cm² en un equipo UV crosslinker (Stratagene).

Posteriormente la membrana se prehibridó durante dos horas a 42°C con 5 ml de solución de prehibridación [50% (v/v) formamida, 5X SSC, 50 mM tris-HCL pH= 7.4, 5X solución Denhart's, 1% (peso/volumen) SDS], pasadas las dos horas se desechó la solución de prehibridación y se agregó la sonda homóloga de *cat*. La hibridación se realizó durante 15 horas a 42°C. Posteriormente la membrana se lavó con una solución 2XSSC, 0.5% SDS a temperatura ambiente, y se expuso toda la noche en película Hiperfilm (Amersham Biosciences).

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Curva de crecimiento de *Trichomonas vaginalis*.

Con el fin de optimizar las condiciones experimentales y tener la certeza de trabajar con parásitos en fase logarítmica se realizó una curva de crecimiento de *T. vaginalis* (sección 4.6), ya que no existen reportes sobre la cinética de crecimiento en función del tiempo de este parásito. Los resultados se muestran en la figura 14.

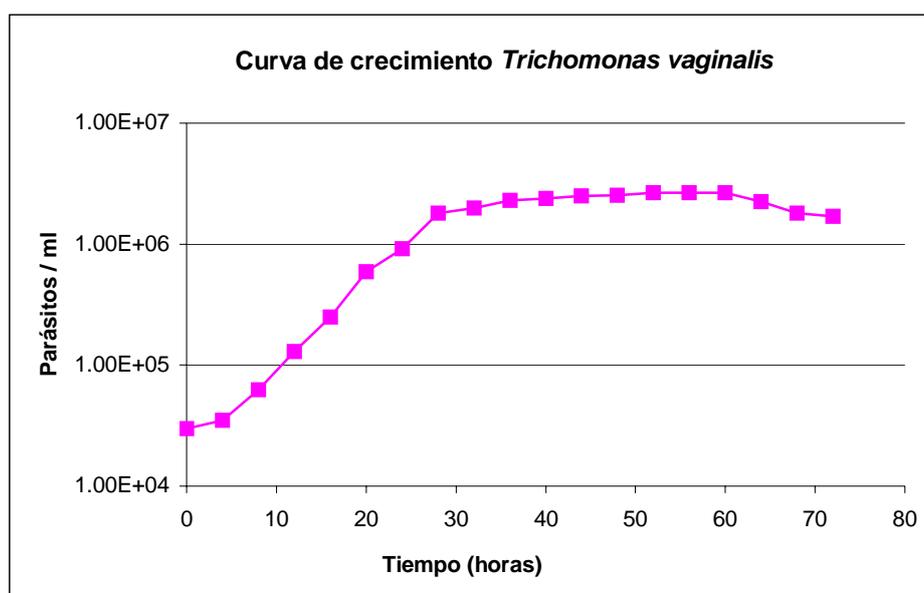


Figura 14. Cinética de crecimiento de *T. vaginalis* en función del tiempo.

Como se observa en la gráfica la fase logarítmica se sitúa entre 1×10^5 y 1×10^6 parásitos/ml, por lo que decidimos utilizar cultivos que tuvieran una densidad de aproximadamente 1×10^6 parásitos/ml para realizar el ensayo de transfección (sección 4.7).

5.2 Mutagénesis del codón de término de la traducción del gen reportero *cat*.

Es importante destacar que en el vector que utilizamos pAC22*cat*-1 el codón de término de la traducción del gen reportero *cat* se localiza de manera independiente de la señal propuesta para la poliadenilación, y estos dos elementos se encuentran separados entre sí por 10 nucleótidos (ver figura 15).

En el trabajo desarrollado durante mi tesis de licenciatura en el laboratorio de la Dra. Imelda López determiné el sitio de poliadenilación de los transcritos del gen reportero *cat*, expresados a partir del vector pAC22*cat*-1 que contiene las regiones río arriba y río abajo a la región codificadora de un gen de actina (Fig 10). Nuestros resultados muestran que los mRNA de *cat* se poliadenilan en el mismo sitio que los mRNAs de el gen de actina (Fig 13), lo que sugiere que la región 3' UTR de este gen es capaz de dirigir el procesamiento (poliadenilación) del transcrito de un gen reportero de manera análoga al procesamiento de los transcritos del parásito.

El primer objetivo de este proyecto fue mutagenizar el codón de término de la traducción original del gen reportero *cat* (TAA) dada su cercanía y similitud con la señal propuesta de poliadenilación TAAA.

Se decidió cambiar el codón de término de la traducción de *cat* TAA (Fig 15) presente en un 99% de los mRNAs de *T. vaginalis*, por el codón de término TAG (también llamado ámbar) presente en un 1% de los mRNAs del parásito. Dicho cambio se realizó mediante mutagénesis dirigida (sección 4.5) utilizando como templado el vector pAC22*cat*-1. Los oligonucleótidos utilizados fueron los siguientes:

Oligo CATSTOP3: 5'GGCAGGGCGGGGCGTAGGAGCTCACTTAAA3'

Oligo CATSTOP4: 5'TTTAAGTGAGCTCCTACGCCCCGCCCTGCC3'.

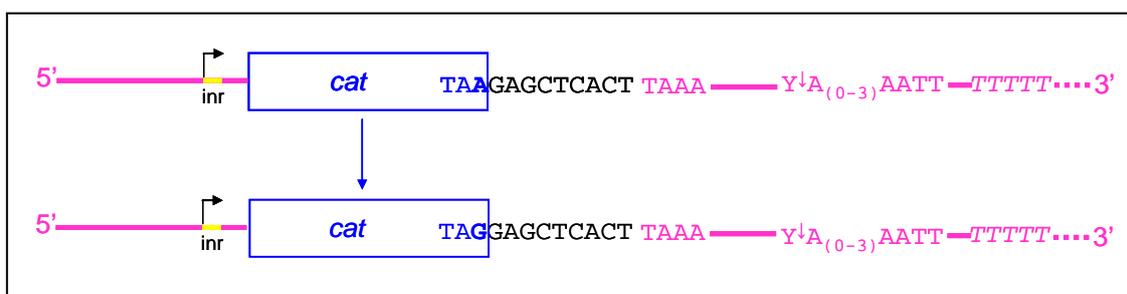


Figura 15. Esquema del cambio realizado por mutagénesis dirigida. En rosa se muestran las regiones intergénicas 5' y 3' de actina (esta última contiene las señales propuestas para la poliadenilación y el procesamiento de transcritos en *T. vaginalis*), en azul se muestra el gen *cat* con el cambio de codón de término de la traducción en negritas, en amarillo el promotor de *T. vaginalis*, y en negro la secuencia que une el gen *cat* con la región 3' de actina.

Se obtuvieron 120 clones de la construcción mutante y se eligieron 10 clones al azar para extraer plásmido (minipreps) de cada una, de estas seleccionamos 2 clones: la clona 5 *cat*-ámbar y la clona 10 *cat*-ámbar, las cuales se mandaron secuenciar con los

oligos CAT10 y CAT 20 (ver figura 10) al Instituto de Fisiología Celular, UNAM en un secuenciador automático. Las secuencias obtenidas son las siguientes:

pAC22 <i>cat</i>	ATGAACAAAAAATCACTGGATATACCACCGTTGATATATCCCAATCGCATCGTAAAGAA	60
ámbar 5	ATGAACAAAAAATCACTGGATATACCACCGTTGATATATCCCAATGGCATCGTAAAGAA	60
ámbar 10	ATGAACAAAAAATCACTGGATATACCACCGTTGATATATCCCAATGGCATCGTAAAGAA	60
pAC22 <i>cat</i>	CATTTTGAGGCATTTTCAGTCAGTTGCTCAATGTACCTATAACCAGACCGTTCAGCTGGAT	120
ámbar 5	CATTTTGAGGCATTTTCAGTCAGTTGCTCAATGTACCTATAACCAGACCGTTCAGCTGGAT	120
ámbar 10	CATTTTGAGGCATTTTCAGTCAGTTGCTCAATGTACCTATAACCAGACCGTTCAGCTGGAT	120
pAC22 <i>cat</i>	ATTATTACGGCCTTTTTAAAGACCGTAAAGAAAAATAAGCACAAGTTTTATCCGGCCTTT	180
ámbar 5	ATTACGGCCTTTTTAAAGACCGTAAAGAAAAATAAGCACAAGTTTTATCCGGCCTTTATT	180
ámbar 10	ATTACGGCCTTTTTAAAGACCGTAAAGAAAAATAAGCACAAGTTTTATCCGGCCTTTATT	180
pAC22 <i>cat</i>	CACATTCTTGCCCGCCTGATGAATGCTCATCCGGAATTCGGTATGGCAATGAAAGACGGT	240
ámbar 5	CACATTCTTGCCCGCCTGATGAATGCTCATCCGGAATTCGGTATGGCAATGAAAGACGGT	240
ámbar 10	CACATTCTTGCCCGCCTGATGAATGCTCATCCGGAATTCGGTATGGCAATGAAAGACGGT	240
pAC22 <i>cat</i>	GAGCTGGTGATATGGGATAGTGTTCACCCCTGTTACACCGTTTTCCATGAGCAAAGTAA	300
ámbar 5	GAGCTGGTGATATGGGATAGTGTTCACCCCTGTTACACCGTTTTCCATGAGCAAAGTAA	300
ámbar 10	GAGCTGGTGATATGGGATAGTGTTCACCCCTGTTACACCGTTTTCCATGAGCAAAGTAA	300
pAC22 <i>cat</i>	ACGTTTTTCATCGCTCTGGAGTGAATACCACGACGATTTCCGGCAGTTTCTACACATATAT	360
ámbar 5	ACGTTTTTCATCGCTCTGGAGTGAATACCACGACGATTTCCGGCAGTTTCTACACATATAT	360
ámbar 10	ACGTTTTTCATCGCTCTGGAGTGAATACCACGACGATTTCCGGCAGTTTCTACACATATAT	360
pAC22 <i>cat</i>	TCGCAAGATGTGGCGTGTACGGTGAAAACCTGGCCTATTTCCCTAAAGGGTTTATTGAG	420
ámbar 5	TCGCAAGATGTGGCGTGTACGGTGAAAACCTGGCCTATTTCCCTAAAGGGTTTATTGAG	420
ámbar 10	TCGCAAGATGTGGCGTGTACGGTGAAAACCTGGCCTATTTCCCTAAAGGGTTTATTGAG	420
pAC22 <i>cat</i>	AATATGTTTTTCGCTCTCAGCCAATCCCTGGGTGAGTTTCACCAGTTTTGATTTAAACGTG	480
ámbar 5	AATATGTTTTTCGCTCTCAGCCAATCCCTGGGTGAGTTTCACCAGTTTTGATTTAAACGTG	480
ámbar 10	AATATGTTTTTCGCTCTCAGCCAATCCCTGGGTGAGTTTCACCAGTTTTGATTTAAACGTG	480
pAC22 <i>cat</i>	GCCAATATGGACAACCTCTTCGCCCGTTTTTCACCATGGGCAAATATTATACGCAAGGC	540
ámbar 5	GCCAATATGGACAACCTCTTCGCCCGTTTTTCACCATGGGCAAATATTATACGCAAGGC	540
ámbar 10	GCCAATATGGACAACCTCTTCGCCCGTTTTTCACCATGGGCAAATATTATACGCAAGGC	540
pAC22 <i>cat</i>	GACAAGGTGCTGATGCCGCTGGCGATTTCAGTTTCATCATGCCGTTTGTGATGGCTTCCAT	600
ámbar 5	GACAAGGTGCTGATGCCGCTGGCGATTTCAGTTTCATCATGCCGTTTGTGATGGCTTCCAT	600
ámbar 10	GACAAGGTGCTGATGCCGCTGGCGATTTCAGTTTCATCATGCCGTTTGTGATGGCTTCCAT	600
pAC22 <i>cat</i>	GTCGGCAGAATGCTTAATGAATTACAACAGTACTGCGATGAGTGGCAGGGCGGGGCGTAA	660
ámbar 5	GTCGGCAGAATGCTTAATGAATTACAACAGTACTGCGATGAGTGGCAGGGCGGGGCGTAG	660
ámbar 10	GTCGGCAGAATGCTTAATGAATTACAACAGTACTGCGATGAGTGGCAGGGCGGGGCGTAG	660
pAC22 <i>cat</i>	GAGCTCACTTAAACAATTTTCGGTATAATATATTTCAAATTAACCTTTTTCTTTA	720
ámbar 5	GAGCTCACTTAAACAATTTTCGGTATAATATATTTCAAATTAACCTTTTTCTTTA	720
ámbar 10	GAGCTCACTTAAACAATTTTCGGTATAATATATTTCAAATTAACCTTTTTCTTTA	720

Figura. 16. Alineamiento de las secuencias de los plásmidos mutantes ámbar con la secuencia de pAC22*cat*-1. Se muestran encerradas en un rectángulo las bases diferentes: en azul el cambio deseado en el codón de termino de la traducción y en amarillo los cambios encontrados en la región codificadora. En negro la secuencia que une el gen *cat* con la región 3' de actina (en color rosa), con doble subrayado la señal propuesta para la poliadenilación, subrayada la señal propuesta para el procesamiento de los transcritos y en cursivas la región rica en Us río abajo del sitio de corte.

En la secuencia se observan dos cambios en la región codificadora del gen *cat* además del cambio deseado en el codón de término; ocurre un cambio de base de C→G que se traduce en un cambio de aminoácido de serina (TCG) a triptofano (TGG) en la posición 47 y un segundo cambio de base C→T por un codón sinónimo para valina en la posición 585.

Se ha reportado que en el sitio activo de la enzima CAT están involucrados los residuos His-195, Arg-18 y Tyr-25 los cuáles son altamente conservados (Leslie y col.,1988). En este caso el cambio de aminoácido que se observa (Ser16 → Trp) no participa en el sitio activo por lo que pudiera no afectar la actividad de la proteína reportera. Es necesario determinar la actividad bioquímica de CAT expresada a partir del vector *pcat-ámbar* (CAT ámbar) y compararla con la actividad CAT expresada a partir del vector *pAC22cat-1*, para determinar si el cambio de aminoácido modificó la actividad de la enzima.

5.2.1. Actividad enzimática de la proteína CAT ámbar.

Para saber si los cambios de codón (TCG→TGG; TCT→TTT; y UAA→UAG) afectaron la actividad enzimática de la proteína reportera CAT se realizó la transfección de células de *T. vaginalis* en fase logarítmica, con los vectores *pcat-ámbar 5*, *pcat-ámbar 10* y como control positivo de la transfección y de la actividad CAT se utilizó el vector parental *pAC22cat-1* conforme al ensayo descrito en la sección 4.7.

Se realizó la extracción de proteína de los cultivos transfectados (sección 4.8), y se determinó la actividad bioquímica de la proteína CAT como se describe en la sección 4.10.

Los resultados de las actividades enzimáticas se muestran en la figura 17. Como se observa en la gráfica, la actividad CAT obtenida con los dos plásmidos *pcat-ámbar* es muy semejante a la actividad CAT obtenida con el plásmido parental *pAC22cat-1*, lo que indica que el cambio en el codón de término de la traducción de *cat* y los cambios observados en la región codificadora no modificaron la actividad de la proteína reportera (Fig 17).

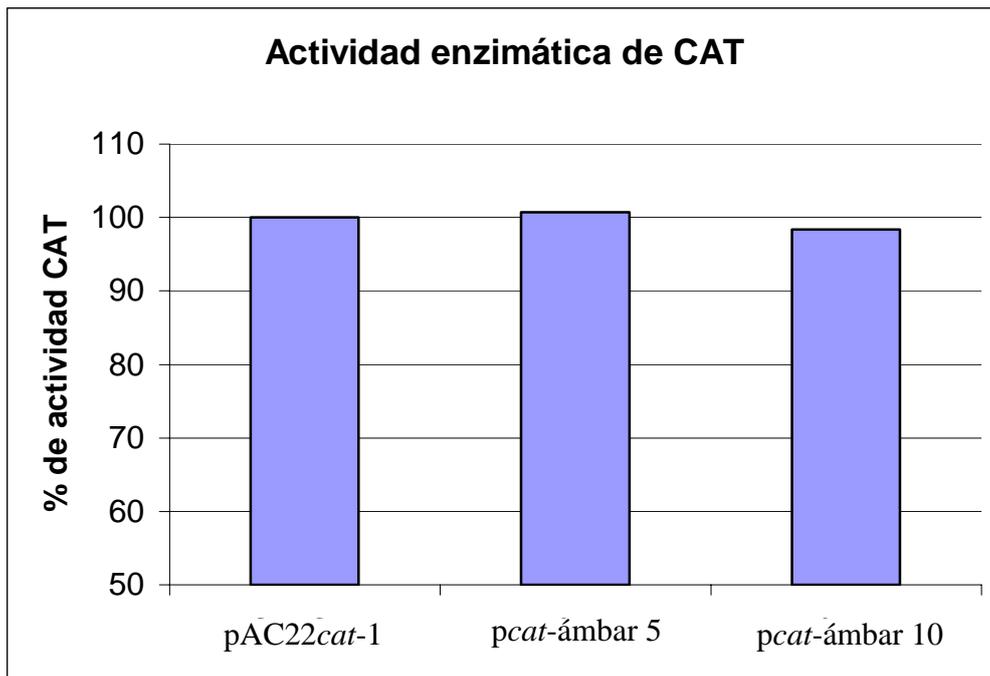


Figura 17. Actividad CAT promedio de ensayos independientes (n=2), de parásitos transfectados con los plásmidos *pcat-ámbar 5* y *pcat-ámbar 10* comparada con la actividad de parásitos transfectados con el vector *pAC22cat-1*.

5.2.2 Determinación del sitio de poliadenilación de los transcritos *cat-ámbar*.

Para determinar el sitio donde se lleva a cabo la poliadenilación de los transcritos *cat* expresados en parásitos transfectados con los plásmidos *pcat-ámbar 5* y *pcat-ámbar 10*, se realizó la amplificación rápida de los extremos 3' de cDNA (3' RACE). Se utilizó RNA poly (A)+ extraído de las transfecciones realizadas. El esquema de esta técnica se muestra en la figura 18. Se espera un producto de ~560 pb para la primera amplificación y de ~ 500 pb para el producto anidado.

1. Síntesis de cDNA

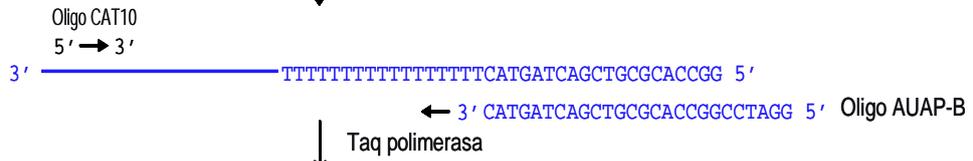


2. Degradación del RNA

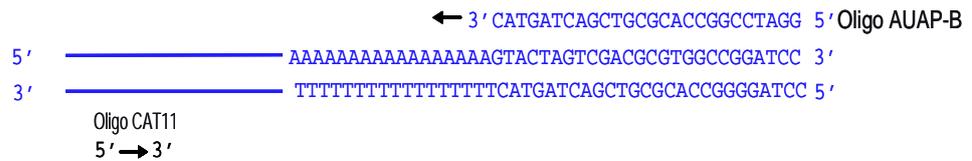
↓ RNAsa H



3. PCR inicial para amplificar *cat*



4. PCR anidado (Nested PCR) para *cat*



5. Clonación



Figura 18. Esquema del proceso de amplificación rápida de los extremos 3' de cDNA (3'RACE).

5.2.3 Clonación de los productos amplificados por 3' RACE y análisis de las clonas.

Los productos del ensayo 3' RACE para *pcat*-ámbar 5 y *pcat*-ámbar 10 se clonaron en el vector TOPO; se obtuvieron 125 y 113 colonias respectivamente. Se eligieron 8 colonias al azar de cada ligación y se extrajo plásmido.

Los plásmidos se checaron en un gel de agarosa al 1% en TAE 1X y se eligieron 2 clonas, una de cada ligación para secuenciarlas con el oligo CAT11 (10 pmol/μl) en el Instituto de Fisiología Celular UNAM.

Las secuencias 3' UTR de los mRNAs de *cat* expresados a partir de *pcat* ámbar 5 y *pcat*-ámbar 10 se alinearon en la región 3' UTR del mRNA de *cat* expresado a partir del vector parental pAC22*cat*-1 (Fig 19).

```

pAC22cat-1    5' ... GCGTAA GAGCTCACT TAAACAATTT CCGGTATAATATATTT CAAAAAAAAAAAAAAAAA ... 3'
pcat-ámbar 5  5' ... GCGTAG GAGCTCACT TAAACAATTT CCGGTATAATATATTT CAAAAAAAAAAAAAAAAA ... 3'
pcat-ámbar 10 5' ... GCGTAG GAGCTCACT TAAACAATTT CCGGTATAATATATTT CAAAAAAAAAAAAAAAAA ... 3'
    
```

Figura 19. Alineación y comparación de las secuencias del extremo 3' UTR de los cDNAs de *cat* expresado a partir de el plásmido parental (pAC22*cat*-1) y de los plásmidos *pcat*-ámbar 5 y *pcat*-ámbar 10. Se muestra en negritas el cambio de codón de término de la traducción de *cat*, en rosa la región 3' UTR de actina, subrayada la señal propuesta para la poliadenilación (TAAA), en verde la última base diferente de A presente antes de la cola de poliadeninas (amarillo).

Como se ve en la figura 19 los mRNAs *cat*-ámbar se poliadenilan en el mismo sitio que los transcritos de pAC22*cat*-1. Por lo tanto el cambio en el codón de término de la traducción de *cat* no alteró el sitio de poliadenilación de los mRNAs. Para realizar los ensayos de mutagénesis dirigida de la señal propuesta para la poliadenilación (UAAA) en *Trichomonas vaginalis* podrán utilizarse cualquiera de los dos plásmidos anteriores. Elegimos el plásmido *pcat*-ámbar 5 para utilizarlo como herramienta experimental en la demostración funcional de la señal de poliadenilación, y en lo sucesivo nos referiremos a él como plásmido parental.

5.3 Mutagénesis de la señal propuesta para la poliadenilación en *T. vaginalis*

Se ha propuesto que la señal utilizada por *Trichomonas vaginalis* para llevar a cabo el proceso de poliadenilación de los RNAs mensajeros es el tetranucleótido UAAA que en la mayoría de los casos incluye al codón de término de la traducción UAA (Espinosa y col., 2002). El objetivo principal de este trabajo es demostrar la funcionalidad de esta señal mediante ensayos de mutagénesis dirigida, utilizando el vector *pcat*-ámbar 5 (sección 5.2) como plásmido parental.

Se realizó mutagénesis dirigida (sección 4.5, ver apéndice D para los oligonucleótidos utilizados), del tetranucleótido UAAA y se generaron 6 plásmidos mutantes. Para facilidad en la nomenclatura los plásmidos mutantes se nombraron de acuerdo a la(s) mutaciones generadas. En la primera construcción se sustituyeron los cuatro nucleótidos de la señal de poliadenilación por la secuencia GCCC; a continuación se cambió cada una de las posiciones de la señal propuesta para la poliadenilación dando lugar a los plásmidos GAAA, TCAA, TACA y TAAC. Para corroborar que la señal propuesta se compone de 4 bases, se sustituyó la base (C) río abajo y adyacente a la señal de poliadenilación para obtener el plásmido TAAAG. Células competentes de *E. coli*, se transformaron con los plásmidos mutantes y se obtuvieron varias colonias. Se eligió al azar una colonia de cada transformación, se obtuvo plásmido y se secuenció para verificar la presencia de la mutación deseada. Se utilizaron los oligos CAT11 y CAT20 (ver figura 10), que permitieron secuenciar el gen *cat* completo y sus regiones 5' y 3' adyacentes.

Como se puede observar en la figura 20 se obtuvieron todos los plásmidos con las mutaciones deseadas en la señal propuesta de poliadenilación. No se encontró ningún otro cambio en la región codificadora de *cat*.

Parental	TAAA	<u>TGGCGATT</u> <u>CAGGTT</u> <u>CATCAT</u> <u>GCCGTCT</u> <u>GTGATGGCTT</u> <u>CCATGT</u> <u>CGGCAGAAT</u> <u>GCTTAATG</u>	620
	GCCC	<u>TGGCGATT</u> <u>CAGGTT</u> <u>CATCAT</u> <u>GCCGTCT</u> <u>GTGATGGCTT</u> <u>CCATGT</u> <u>CGGCAGAAT</u> <u>GCTTAATG</u>	620
	GAAA	<u>TGGCGATT</u> <u>CAGGTT</u> <u>CATCAT</u> <u>GCCGTCT</u> <u>GTGATGGCTT</u> <u>CCATGT</u> <u>CGGCAGAAT</u> <u>GCTTAATG</u>	620
	TCAA	<u>TGGCGATT</u> <u>CAGGTT</u> <u>CATCAT</u> <u>GCCGTCT</u> <u>GTGATGGCTT</u> <u>CCATGT</u> <u>CGGCAGAAT</u> <u>GCTTAATG</u>	620
	TACA	<u>TGGCGATT</u> <u>CAGGTT</u> <u>CATCAT</u> <u>GCCGTCT</u> <u>GTGATGGCTT</u> <u>CCATGT</u> <u>CGGCAGAAT</u> <u>GCTTAATG</u>	620
	TAAC	<u>TGGCGATT</u> <u>CAGGTT</u> <u>CATCAT</u> <u>GCCGTCT</u> <u>GTGATGGCTT</u> <u>CCATGT</u> <u>CGGCAGAAT</u> <u>GCTTAATG</u>	620
	TAAAG	<u>TGGCGATT</u> <u>CAGGTT</u> <u>CATCAT</u> <u>GCCGTCT</u> <u>GTGATGGCTT</u> <u>CCATGT</u> <u>CGGCAGAAT</u> <u>GCTTAATG</u>	620
Parental	TAAA	<u>AATTACAACAGTACTGCGATGAGTGGCAGGGCGGGGCGTAG</u> <u>GAGCTCACT</u> <u>TAAACAATTT</u>	680
	GCCC	<u>AATTACAACAGTACTGCGATGAGTGGCAGGGCGGGGCGTAG</u> <u>GAGCTCACT</u> <u>GCCCAATTT</u>	680
	GAAA	<u>AATTACAACAGTACTGCGATGAGTGGCAGGGCGGGGCGTAG</u> <u>GAGCTCACT</u> <u>GAAACAATTT</u>	680
	TCAA	<u>AATTACAACAGTACTGCGATGAGTGGCAGGGCGGGGCGTAG</u> <u>GAGCTCACT</u> <u>TCAACAATTT</u>	680
	TACA	<u>AATTACAACAGTACTGCGATGAGTGGCAGGGCGGGGCGTAG</u> <u>GAGCTCACT</u> <u>TACACAATTT</u>	680
	TAAC	<u>AATTACAACAGTACTGCGATGAGTGGCAGGGCGGGGCGTAG</u> <u>GAGCTCACT</u> <u>TAACCAATTT</u>	680
	TAAAG	<u>AATTACAACAGTACTGCGATGAGTGGCAGGGCGGGGCGTAG</u> <u>GAGCTCACT</u> <u>TAAAGAATTT</u>	680
Parental	TAAA	<u>CGGTATAATATATTTCAA</u> <u>AATTA</u> <u>ACTAACCTTTTTCTTTAGTGAACCTATTTTGAAAT</u>	740
	GCCC	<u>CGGTATAATATATTTCAA</u> <u>AATTA</u> <u>ACTAACCTTTTTCTTTAGTGAACCTATTTTGAAAT</u>	740
	GAAA	<u>CGGTATAATATATTTCAA</u> <u>AATTA</u> <u>ACTAACCTTTTTCTTTAGTGAACCTATTTTGAAAT</u>	740
	TCAA	<u>CGGTATAATATATTTCAA</u> <u>AATTA</u> <u>ACTAACCTTTTTCTTTAGTGAACCTATTTTGAAAT</u>	740
	TACA	<u>CGGTATAATATATTTCAA</u> <u>AATTA</u> <u>ACTAACCTTTTTCTTTAGTGAACCTATTTTGAAAT</u>	740
	TAAC	<u>CGGTATAATATATTTCAA</u> <u>AATTA</u> <u>ACTAACCTTTTTCTTTAGTGAACCTATTTTGAAAT</u>	740
	TAAAG	<u>CGGTATAATATATTTCAA</u> <u>AATTA</u> <u>ACTAACCTTTTTCTTTAGTGAACCTATTTTGAAAT</u>	740

Figura 20. Alineamiento de la secuencia de los plásmidos mutantes en la señal propuesta de poliadenilación con el plásmido parental. En azul se muestra la región codificadora del gen *cat*, (incompleta), subrayado en azul el codón de término de la traducción de *cat*, en rosa la región 3' del gen de actina, encerrada en un rectángulo rojo la señal propuesta de poliadenilación y las mutaciones de la misma; en rosa subrayado se muestra la señal propuesta de procesamiento y en cursivas la región rica en Us localizada río abajo del sitio de corte.

5.3.1 Actividad enzimática de CAT en parásitos transfectados con los diferentes plásmidos mutantes en la señal propuesta de poliadenilación.

Para determinar el efecto funcional de cada una de las mutaciones en la señal propuesta de poliadenilación se transfectaron parásitos en fase logarítmica con cada uno de los 6 plásmidos mutantes (sección 4.7). Como control positivo de la transfección se utilizó el plásmido parental, y como control negativo se transfectaron parásitos con solución amortiguadora T.E. sin DNA. Las transfecciones se realizaron en cuatro ensayos independientes y en las mismas condiciones experimentales.

Se realizó la extracción de proteínas de los parásitos transfectados con cada uno de los plásmidos mutantes (sección 4.8) y se determinó la actividad enzimática de CAT (sección 4.10).

En la figura 21 se muestra el promedio de la actividad enzimática de CAT con la respectiva desviación estándar.

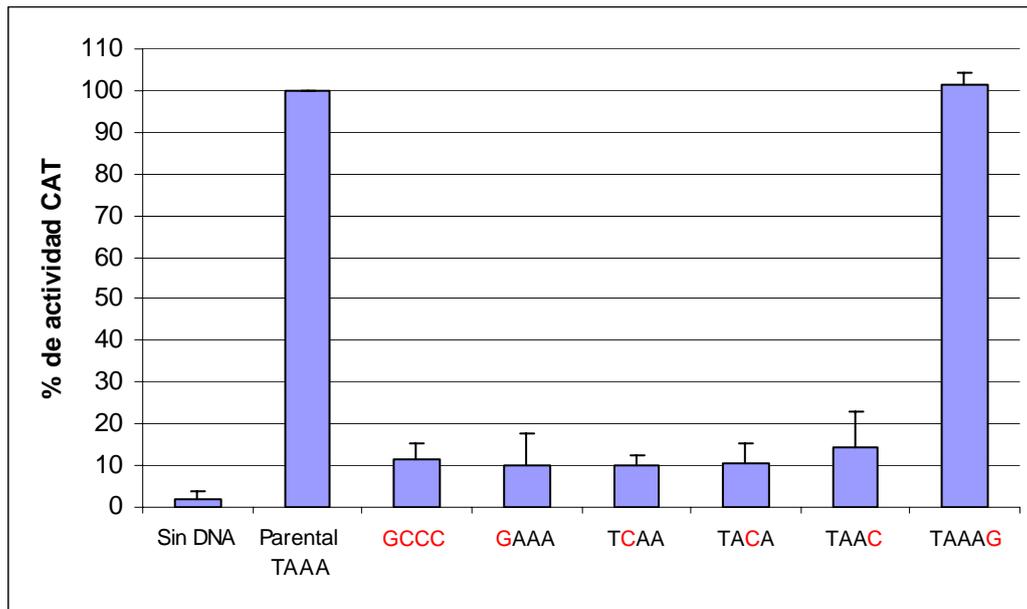


Figura 21. Actividad bioquímica de cloranfenicol-acetil-transferasa (CAT) en cultivos de *T. vaginalis* transfectados con los plásmidos mutantes en la señal propuesta de poliadenilación comparada con la actividad de parásitos transfectados con el plásmido parental (TAAA).

Al comparar las actividades de CAT obtenidas de parásitos transfectados con el plásmido parental (TAAA) y los plásmidos mutantes en la señal propuesta de poliadenilación, observamos que la actividad para los plásmidos mutantes GCCC, GAAA, TCAA, TACA y TAAC cae a valores de entre el 10 y el 15% con respecto a la actividad dada por el plásmido parental y estos valores son semejantes a los obtenidos en las transformaciones sin DNA. En contraste, para el plásmido TAAAG en donde se cambió el nucleótido río abajo adyacente a la señal propuesta de poliadenilación, la actividad detectada equivale al 100% de la parental. Estos datos muestran que cualquier cambio en el tetranucleótido TAAA se refleja en una disminución del 90% de la actividad de la proteína reportera.

Nuestra hipótesis de trabajo es que el tetranucleótido UAAA es la señal de poliadenilación y que las mutaciones en esta secuencia alteran el proceso de poliadenilación en *T. vaginalis*. Para confirmar nuestra propuesta analizamos los transcritos de *cat* y su estado de poliadenilación en células transfectadas con los plásmidos anteriores. Los resultados se muestran a continuación.

5.3.2 Detección del transcrito *cat* en el RNA de células transfectadas con los plásmidos mutantes.

Para determinar la presencia e integridad del RNA mensajero de *cat* en parásitos transfectados con el plásmido parental y con los plásmidos mutantes en la señal propuesta de poliadenilación, se realizó un ensayo tipo Northern blot con RNA total, y se utilizó una sonda homóloga de *cat* (fragmento de 420 pb *EcoRI/SstI* del plásmido pAC22*cat*-1) (Fig 22 A). No se logró observar una banda de ~700 pb (tamaño esperado para el mensajero de *cat*) sino solo un barrido en cada una de las muestras lo cual podría significar que el RNA estaba degradado. Como control lavamos el filtro y lo hibridamos con una sonda homóloga de actina (Fig 22 B). En esta ocasión se observó claramente la banda de ~1.3 kb que corresponde al mensajero de actina. Por lo tanto el RNA del filtro estaba íntegro y la ausencia de una señal definida con la sonda de *cat* probablemente se deba a que la cantidad de mensajeros del reportero es muy baja y no es posible detectarlos con este método.

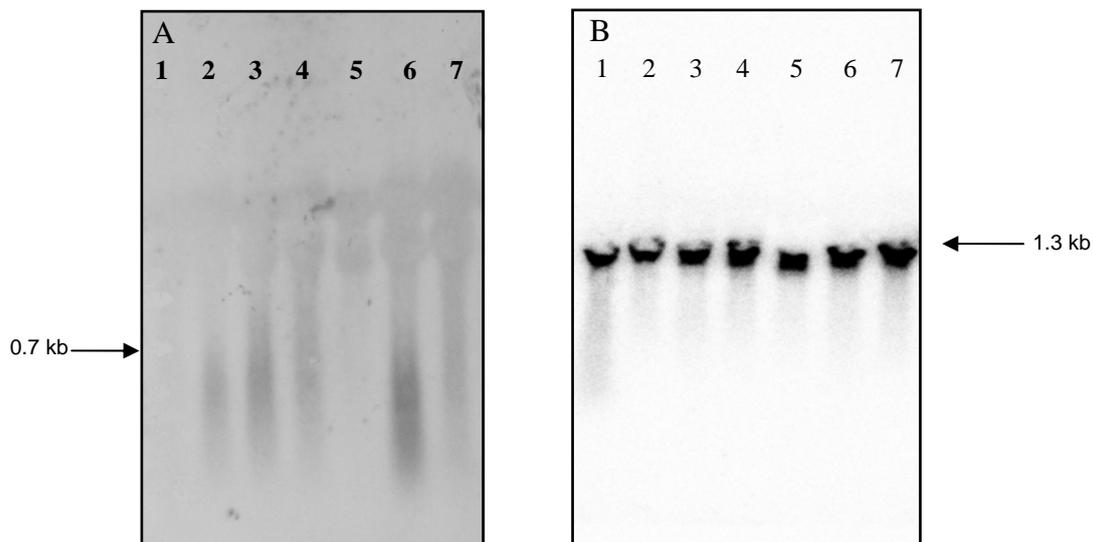


Figura 22. Análisis por Northern blot del RNA total extraído de parásitos transfectados con diferentes plásmidos. Se cargaron 5 μ g por carril del RNA extraído de parásitos transfectados con los siguientes plásmidos: 1: plásmido GFP(control negativo de hibridación); 2: parental (TAAA); 3: GCCC; 4: GAAA; 5: TCAA; 6: TACA y 7: TAAC. Panel A: Sonda: fragmento de 420 pb *EcoRI-SstI* del gen *cat*. B) membrana presentada en la figura A lavada y rehibridada con una sonda de actina de *T. vaginalis*.

5.3.2.1 Detección del transcrito *cat* mediante RT-PCR.

Ya que no fue posible detectar la presencia del RNA mensajero de *cat* mediante el ensayo de Northern blot, decidimos amplificar por RT-PCR la región codificadora del mRNA de *cat*, ya que con esta técnica es posible detectar cantidades muy pequeñas de RNA. Se utilizó RNA total de parásitos transfectados con el plásmido parental y con los plásmidos mutantes. Para el ensayo se utilizaron oligonucleótidos específicos del gen *cat* que se anclan en la región codificadora, como se muestra en la figura 23. El cDNA se sintetizó con el oligonucleótido CAT21.

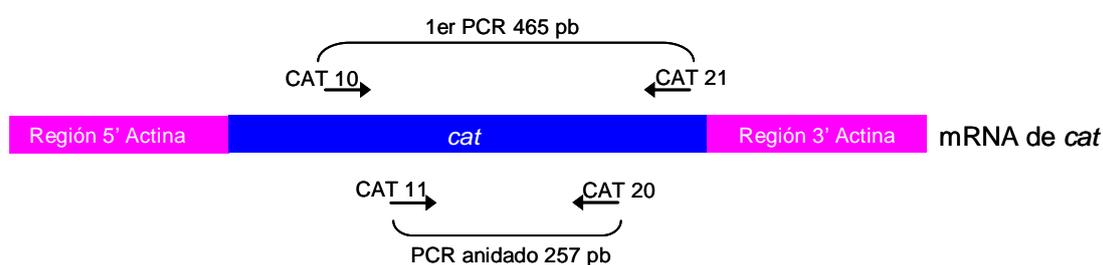


Figura 23. Productos de amplificación esperados para el RT-PCR del mRNA de *cat*, utilizando los oligos específicos CAT10, CAT11, CAT20 y CAT21.

Los productos obtenidos para el PCR inicial y para el PCR anidado se separaron electroforéticamente en un gel de agarosa al 1% en TAE 1X. Para corroborar que los productos amplificados correspondían a *cat* se hibridaron con una sonda homóloga para este gen (Fig 24). En el primer PCR no se observan bandas de amplificación por tinción con bromuro de etidio (Fig 24 A, gel superior) sin embargo se observa una señal tenue de hibridación para el RT-PCR de células transfectadas con el plásmido parental (Fig 24 B, carril 2).

En el PCR anidado se logró detectar la presencia del transcrito *cat* en el RNA total de parásitos transfectados con el plásmido parental y con los plásmidos mutantes en la señal propuesta de poliadenilación (Fig 24). Estos datos muestran que la baja actividad de CAT no se debe a la ausencia del transcrito, probablemente sea el resultado de un proceso de poliadenilación deficiente y por lo tanto en una baja producción de proteína.

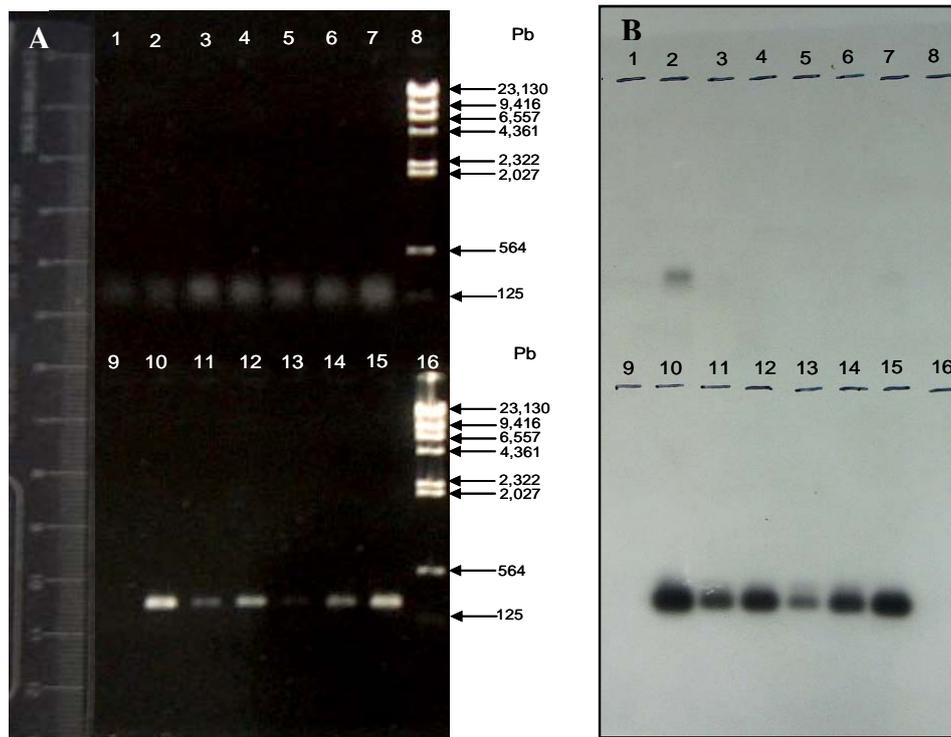


Figura 24. Análisis de los transcritos de *cat* mediante RT-PCR. A) Gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio. Se cargaron 5 μ l de los productos del RT-PCR (gel superior) y del PCR anidado (gel inferior). Se analizó el RNA obtenido de parásitos transfectados con los siguientes plásmidos: T.E. carril 1 y 9; parental carril 2 y 10; GCCC carril 3 y 11; GAAA carril 4 y 12; TCAA carril 5 y 13; TACA carril 6 y 14; TAAC carril 7 y 15. Marcador de peso molecular (λ *Hind*III) carril 8 y 16. B) Southern blot del gel presentado en el panel A. Sonda: fragmento de 420 pb *Eco*RI-*Sst*I del gen *cat*.

En los experimentos mostrados hasta aquí hemos analizado el efecto que tienen las mutaciones en la señal propuesta de poliadenilación sobre la actividad de la proteína reportera. Para relacionar la disminución de la actividad enzimática con las mutaciones introducidas es necesario conocer el estado de poliadenilación de los transcritos *cat* mutantes en la señal propuesta de poliadenilación y, si es el caso, el sitio donde se agrega la cola poli (A).

5.3.3 Amplificación de la región 3' de los transcritos *cat* mutantes en la señal propuesta de poliadenilación UAAA.

Para determinar si se poliadenila el mRNA de *cat* expresado en los parásitos transfectados con los plásmidos mutantes: GCCC, GAAA, TCAA, TACA, TAAC y TAAAG, se realizó el ensayo de amplificación rápida de los extremos 3' del cDNA (3' RACE). Para este ensayo se utilizó RNA poli (A)+ extraído de las transfecciones realizadas con cada uno de los plásmidos mutantes. El esquema de esta técnica se muestra en la Fig 18. Para la primera amplificación se espera un producto de ~570 pb y para el PCR anidado se espera un producto de ~510 pb.

En la primera ronda de amplificación del ensayo 3' RACE de *cat* se obtuvieron varias bandas de amplificación, de las que se distinguen tres bandas mayoritarias de 500, 800 y 1800 pb aproximadamente; la banda que nosotros esperábamos es de aproximadamente 570 pb (Fig 25 A gel superior). En la segunda ronda de amplificación (PCR anidado) se obtuvieron también productos de amplificación de varios tamaños; aunque se ven enriquecidas las bandas de ~500 y 800 pb. Para saber si algunos de estos productos de amplificación corresponden a *cat*, se realizó un análisis por Southern blot.

El gel del panel A se transfirió a una membrana de nylon y se hibridó con una sonda específica para *cat* (Fig 25 B). En la primera ronda de amplificación (panel superior) sólo se observó señal de hibridación en los productos de RT-PCR de RNA aislado de células transfectadas con el plásmido parental TAAA y con TAAAG (Fig 25 B membrana superior). En la segunda ronda de amplificación se observó hibridación para todos los casos, sin embargo las bandas mejor definidas son las obtenidas para los plásmidos parental y TAAAG. El barrido que se observa en el resto de las amplificaciones pudiera ser el resultado de una población de mRNAs de tamaño heterogéneo (Fig 25 B gel inferior).

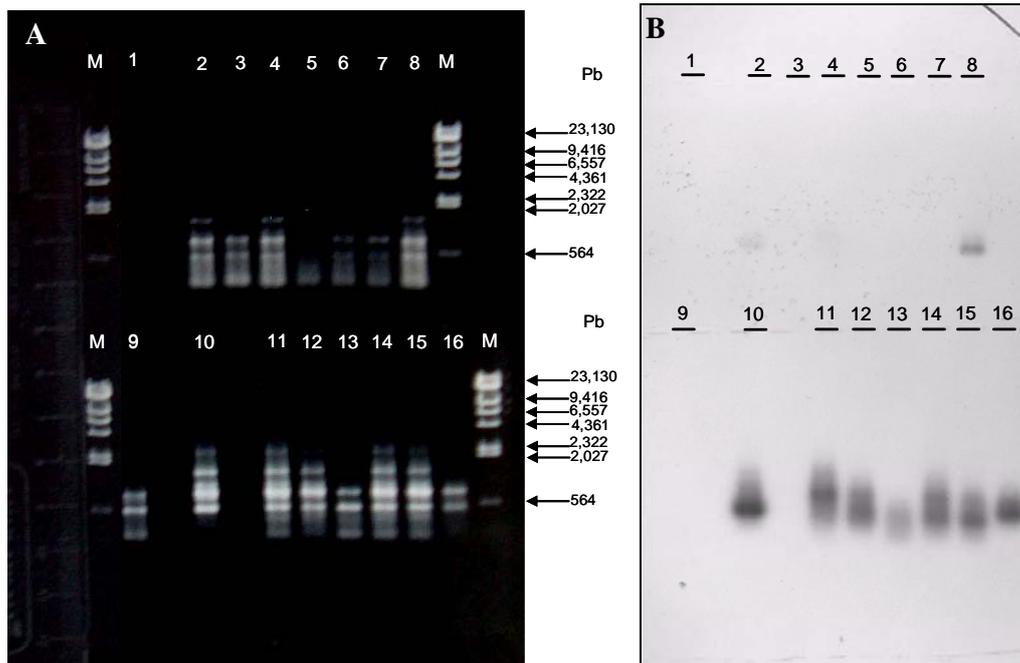


Figura 25. Análisis de los transcritos de *cat* mediante 3' RACE. A) Gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio. Se cargaron 5 μ l de los productos de la primera amplificación (gel superior) y del PCR anidado (gel inferior). Se analizó el RNA obtenido de parásitos transfectados con los siguientes plásmidos: T.E. carril 1 y 9; parental carril 2 y 10; GCCC carril 3 y 11; GAAA carril 4 y 12; TCAA carril 5 y 13; TACA carril 6 y 14; TAAC carril 7 y 15; TAAAG carril 8 y 16. Marcador de peso molecular (λ *Hind*III) carril M. B) Southern blot del gel presentado en el panel A. Sonda: fragmento de 420 pb *Eco*RI-*Sst*I del gen *cat*.

Se obtuvieron productos de amplificación para los RNAs-*cat* mutantes en la señal propuesta de poliadenilación, lo cual sugiere que podrían estar poliadenilados, quizá en menor proporción que los RNAs *cat* parental y TAAAG. Probablemente por ser menos abundantes no se logró detectarlos en la primer ronda de amplificación. Sería necesario realizar PCR's cuantitativos o semi-cuantitativos para conocer la cantidad de transcrito *cat* en los RNAs mutantes y compararla con la cantidad de transcrito *cat* parental.

5.3.4 Clonación de los productos amplificados por 3' RACE.

Para determinar el sitio de poliadenilación de los transcritos *cat* mutantes, se ligaron los productos completos del PCR anidado (obtenidos para cada una de las mutantes) con el vector TOPO (sección 5.3.3). Se obtuvo un gran número de colonias transformantes que se hibridaron con una sonda homóloga de *cat*, para identificar aquellas que contenían secuencias relacionadas con el gen reportero. Se obtuvieron las siguientes clonas:

Ligación	No. de colonias positivas a la hibridación.
TOPO-GCCC	6
TOPO-GAAA	4
TOPO-TCAA	1
TOPO-TACA	5
TOPO-TAAC	5
TOPO-TAAAG	4

Un ejemplo de la señal de hibridación que se obtuvo se muestra en la figura 26.

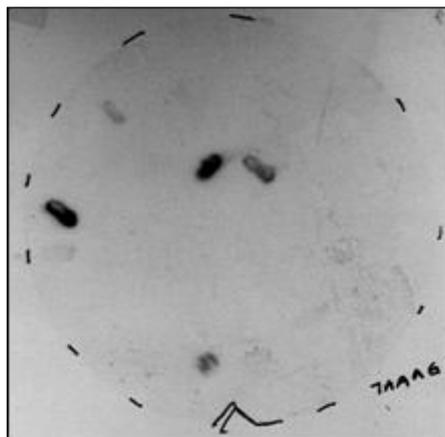


Figura 26. Señales positivas obtenidas para las clonas TOPO-TAAAG.

Para descartar algún falso positivo de la hibridación en colonia, los plásmidos extraídos de las clonas positivas se analizaron mediante Southern blot, para lo cual se digirieron con la enzima *EcoRI* que libera el inserto del vector TOPO y se hibridaron con la sonda específica de *cat* (datos no mostrados).

5.3.5 Secuenciación y análisis de las clonas 3' RACE-mutantes de la señal propuesta de poliadenilación .

Las clonas positivas identificadas en la sección anterior se secuenciaron en el Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM en un secuenciador automático con el oligo CAT11. Los resultados se muestran de dos maneras: 1 esquemática y después en alineamiento. Para su comparación las secuencias de cada una de las clonas se alinearon con la secuencia del plásmido parental, primero entre clonas provenientes de la misma mutante (GCCC, GAAA, TCAA, TACA, TAAC, y TAAAG), posteriormente se alinearon entre sí las secuencias que no están poliadeniladas, y por último las secuencias que tienen cola de poli (A). En la figura 27 se muestra un esquema de los transcritos *cat*-mutantes comparados contra la secuencia parental para dar una perspectiva global del análisis posterior de las secuencias.

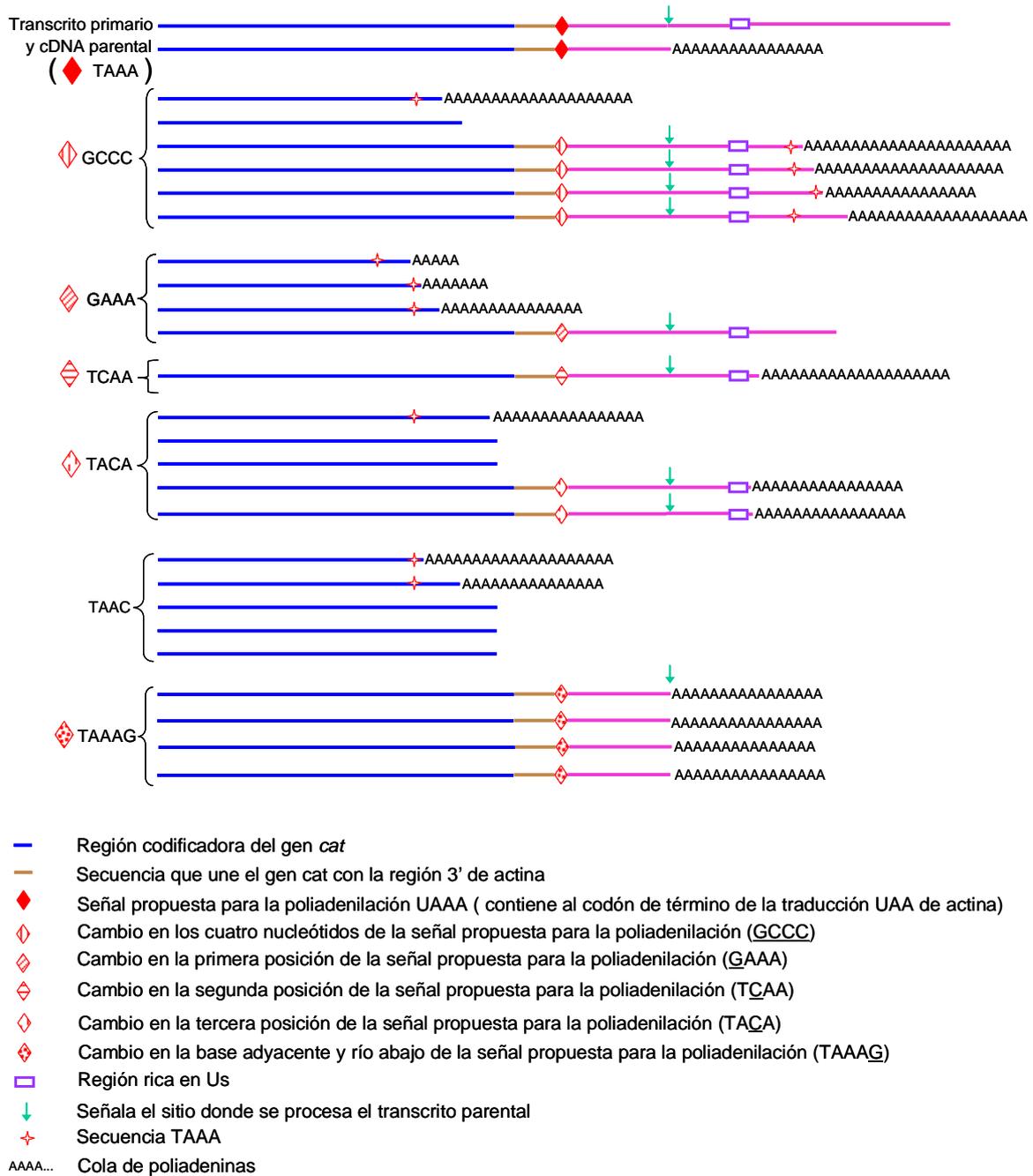


Figura 27. Esquema de los transcritos *cat*- mutantes en la señal propuesta de poliadenilación comparados con el cDNA del plásmido parental.

Como se observa en el esquema, existen diferentes sitios de procesamiento para los transcritos incluso provenientes de la misma mutante, solo los transcritos provenientes de la mutante TAAAG se poliadenilan en el mismo sitio que es el sitio donde se procesa el plásmido parental, además en algunos se observan residuos de

Adenilato y en otros no; este comportamiento pudiera ser consecuencia de un proceso deficiente de poliadenilación.

5.3.5.1 Alineación de clonas provenientes de las misma mutante.

En el análisis de secuencias que se presenta en las secciones siguientes se muestra en azul la región codificadora del gen reportero *cat* a partir del codón ATG de inicio de la traducción, en negritas el codón de término de la traducción de *cat* (TAG), en café la secuencia que une la región codificadora de *cat* con la región 3' intergénica de actina, en rosa la región intergénica de actina, encerrada en cuadro rojo se muestra la señal propuesta de poliadenilación y las variantes obtenidas de ésta mediante mutagénesis dirigida, la flecha verde indica el sitio donde se procesa el transcrito TAAA parental, en color amarillo se muestra la cola de poliadeninas, subrayada la secuencia del oligonucleótido AUAP-B utilizado para la amplificación por 3' RACE, con doble subrayado el sitio *EcoRI*, y el guión indica la falta de un nucleótido.

Alineamiento clonas 3'- GCCC

parental	ATGAACAAAAAATCACTGGATATACCACCGTTGATATATCCCAATCGCATCGTAAAGAA
49GCCC	-----
36GCCC	-----
14GCCC	-----
1GCCC	-----
48GCCC	-----
16GCCC	-----
parental	CATTTTGAGGCATTTTCAGTCAGTTGCTCAATGTACCTATAACCAGACCGTTCAGCTGGAT
49GCCC	-----
36GCCC	-----
14GCCC	-----
1GCCC	-----
48GCCC	-----
16GCCC	-----
parental	ATTACGGCCTTTTTAAAGACCGTAAAGAAAAATAAGCACAAAGTTTTATCCGGCCTTTATT
49GCCC	-----
36GCCC	-----
14GCCC	-----
1GCCC	-----
48GCCC	-----
16GCCC	-----
parental	CACATTCTTGCCCGCCTGATGAATGCTCATCCGGAATTCGGTATGGCAATGAAAGACGGT
49GCCC	-----
36GCCC	-----
14GCCC	-----
1GCCC	-----
48GCCC	-----
16GCCC	-----

```

parental  GAGCTGGTGATATGGGATAGTGTTCACCCCTTGTTACACCGTTTTCCATGAGCAAACCTGAA
49GCCC   -----
36GCCC   -----
14GCCC   -----
1GCCC    -----
48GCCC   -----
16GCCC   -----

parental  ACGTTTTTCATCGCTCTGGAGTGAATACCACGACGATTTCCGGCAGTTTCTACACATATAT
49GCCC   -----TACCACGACGATTTCCGGCAGTTTCTACACATATAT
36GCCC   -----TACCACGACGATTTCCGGCAGTTTCTACACATATAT
14GCCC   -----TACCACGACGATTTCCGGCAGTTTCTACACATATAT
1GCCC    -----TACCACGACGATTTCCGGCAGTTTCTACACATATAT
48GCCC   -----TACCACGACGATTTCCGGCAGTTTCTACACATATAT
16GCCC   -----CACCACGACGATTTCCGGCAGTTTCTACACATATAT

parental  TCGCAAGATGTGGCGTGTACGGTGAAAACCTGGCCTATTTCCCTAAAGGGTTTATTGAG
49GCCC   TCGCAAGATGTGGCGTGTACGGTGAAAACCTGGCCTATTTCCCTAAAGGGTTTATTGAG
36GCCC   TCGCAAGATGTGGCGTGTACGGTGAAAACCTGGCCTATTTCCCTAAAGGGTTTATTGAG
14GCCC   TCGCAAGATGTGGCGTGTACGGTGAAAACCTGGCCTATTTCCCTAAAGGGTTTATTGAG
1GCCC    TCGCAAGATGTGGCGTGTACGGTGAAAACCTGGCCTATTTCCCTAAAGGGTTTATTGAG
48GCCC   TCGCAAGATGTGGCGTGTACGGTGAAAACCTGGCCTATTTCCCTAAAGGGTTTATTGAG
16GCCC   TCGCAAGATGTGGCGTGTACGGTGAAAACCTGGCCTATTTCCCTAAAGGGTTTATTGAG

parental  AATATGTTTTTCGTCTCAGCCAATCCCTGGGTGAGTTTCACCAGTTTTGATTTAAACGTG
49GCCC   AATATGTTTTTCGTCTCAGCCAATCCCTGGGTGAGTTTCACCAGTTTTGATTTAAACGTG
36GCCC   AATATGTTTTTCGTCTCAGCCAATCCCTGGGTGAGTTTCACCAGTTTTGATTTAAACGTG
14GCCC   AATATGTTTTTCGTCTCAGCCAATCCCTGGGTGAGTTTCACCAGTTTTGATTTAAACGTG
1GCCC    AATATGTTTTTCGTCTCAGCCAATCCCTGGGTGAGTTTCACCAGTTCTGATTTAAACGTG
48GCCC   AATATGTTTTTCGTCTCAGCCAATCCCTGGGTGAGTTTCACCAGTTTTGATTTAAACGTG
16GCCC   AATATGTTTTTCGTCTCAGCCAATCCCTGGGTGAGTTTCACCAGTTTTGATTTAAACGTG

parental  GCCAATATGGACAACCTCTTCGCCCCGTTTTCCACCATGGGCAAATATTATACGCAAGGC
49GCCC   GCCAATATGGACAACCTCTTCGCCCCGTTTTCCACCATGGGCAAATAGAAAGAGAGAGG
36GCCC   GCCAATATGGACAACCTCTTCGCCCCGTTTTCCACCATGGGCAAATATTATACGTAAGGC
14GCCC   GCCAATATGGACAACCTCTTCGCCCCGTTTTCCACCATGGGCAAATATTATACGCAAGGC
1GCCC    GCCAATATGGACAACCTCTTCGCCCCGTTTTCCACCATGGGCAAATATTATACGCAAGGC
48GCCC   GCCAATATGGACAACCTCTTCGCCCCGTTTTCCACCATGGGCAAATATTATACGCAAGGC
16GCCC   GCCAATATGGACAACCTCTTCGCCCCGTTTTCCACCATGGGCAAATATTATACGCAAGGC

parental  GACAAGGTGCTGATGCCGCTGGCGATTACAGTTTCATCATGCCGTTGTGATGGCTTCCAT
49GCCC   GAAAAAAAAAAGAAAAGGAAAAAAAAAAAAAAAAAAGTACTAGTCGACCGTGGCCGGAT
36GCCC   CACAAGGTGCTGATGCCGCTGGCTCGTATTCAGGTCTCCATCCATGTCCGTATTG
14GCCC   GACAAGGTGCTGATGCCGCTGGCGATTACAGTTTCATCATGCCGTTTGTGATGGCTTCCAT
1GCCC    GACAAGGTGCTGATGCCGCTGGCGATTACAGTTTCATCATGCCGTTTGTGATGGCTTCCAT
48GCCC   GACAAGGTGCTGATGCCGCTGGCGATTACAGTTTCATCATGCCGTTTGTGATGGCTTCCAT
16GCCC   GACAAGGTGCTGATGCCGCTGGCGATTACAGTTTCATCATGCCGTTTGTGATGGCTTCCAT

parental  GTCGGCAGAATGCTTAATGAATTACAACAGTACTGCGATGAGTGGCAGGGCGGGGCGTAG
49GCCC   CCAAGGGCGAATTC-----
36GCCC   -----
14GCCC   GTCGGCAGAATGCTTAATGAATTACAACAGTACTGCGATGAGTGGCAGGGCGGGGCGTAG
1GCCC    GTCGGCAGAATGCTTAATGAATTACAACAGTACTGCGATGAGTGGCAGGGCGGGGCGTAG
48GCCC   GTCGGCAGAATGCTTAATGAATTACAACAGTACTGCGATGAGTGGCAGGGCGGGGCGTAG
16GCCC   GTCGGCAGAATGCTTAATGAATTACAACAGTACTGCGATGAGTGGCAGGGCGGGGCGTAG

parental  GAGCTCACTTAAACAATTTCCGGTATAATATATTTCAAATTAACCTTTTTTCTTTA
49GCCC   -----
36GCCC   -----
14GCCC   GAGCTCACTGCCCCAATTTCCGGTATAATATATTTCAAATTAACCTTTTTTCTTTA
1GCCC    GAGCTCACTGCCCCAATTTCCGGTATAATATATTTCAAATTAACCTTTTTTCTTTA
48GCCC   GAGCTCACTGCCCCAATTTCCGGTATAATATATTTCAAATTAACCTTTTTTCTTTA
16GCCC   GAGCTCACTGCCCCAATTTCCGGTATAATATATTTCAAATTAACCTTTTTTCTTTA
    
```



```

parental      GTGAACCTATTTTGGAAATCACTTCATTAATATTGTGTTTTAATGGTTTATATGTGACCA
49GCCC      -----
36GCCC      -----
14GCCC      GTGAACCTATTTTGGAAATCACTTCATTAATATTGTGTTTTAATGGTTTATATGTGACCA
1GCCC      GTGAACCTATTTTGGAAATCACTTCATTAATATTGTGTTTTAATGGTTTATATGTGACCA
48GCCC      GTGAACCTATTTTGGAAATCACTTCATTAATATTGTGTTTTAATGGTTTATATGTGACCA
16GCCC      GTGAACCTATTTTGGAAATCACTTCATTAATATTGTGTTTTAATGGTTTATATGTGACCA

parental      ATACGATGTACCCTGAACATTTCTTTTCCAATATGATTTTTACCTTTCACCAAATACAAG
49GCCC      -----
36GCCC      -----
14GCCC      ATACGATGTACCCTGAACATTTCTTTTCCAATATGATTTTTACCTTTCACCAAATACAAG
1GCCC      ATACGATGTACCCTGAACATTTCTTTTCCAATATGATTTTTACCTTTCACCAAATACAAG
48GCCC      ATACGATGTACCCTGAACATTTCTTTTCCAATATGATTTTTACCTTTCACCAAATACAAG
16GCCC      ATACGATGTACCCTGAACATTTCTTTTCCAATATGATTTTTACCTTTCACCAAATACAAG

parental      TATCATGCTAATTAAGTGCCTGATTGCATTGTATTCTTTAACTATACATAATTGAATC
49GCCC      -----
36GCCC      -----
14GCCC      TATCATGCTAATTAAGTGCCTGATTGCATTGTATTCTTTAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
1GCCC      TATCATGCTAATTAAGTGCCTGATTGCATTGTATTCTTTAACTAAAAAAAAAAAAAAAA
48GCCC      TATCATGCTAATTAAGTGCCTGATTGCATTGTATTCTTTAACTATACATAATTGAATC
16GCCC      TATCATGCTAATTAAGTGCCTGATTGCATTGTATTCTTTAACTATCCATAATTGAATC

parental      AATCAATAACACTTGATAATTGTGTATTATTCCTTGTTGATTAAAAGAATATCTTTTGA
49GCCC      -----
36GCCC      -----
14GCCC      AAAGTACTAGTCGACCCG-GGCCGGATCCAAGGGCGAATTC-----
1GCCC      AAAAAGTACTAATCCACGCCG-----
48GCCC      AATCAATAACACTTGATAATTGTGTATTATTCCTTGTTGATTAAAAGAATATCTTTTGA
16GCCC      AATCAAAAACCTTGGAAAAATGGGGGAATTATTCCCTGGTGAAATTAATAAAAAAATCTT

parental      TATTTTGAAGTAAATTAATTATTCTTCATCAAATCATAGAGATAAACTAAAACAAGACA
49GCCC      -----
36GCCC      -----
14GCCC      -----
1GCCC      -----
48GCCC      TAAAAAAAAAAAAAAAAAGTACTAGTTCGACGCGTGGCCGGATCCAAGGGCGAATTC
16GCCC      TTTGATTTTGGAAAGTAAAAAAAAAAAAAAAAAGTTCCTTGTTCCAACCGGGCCGGAT

```

Como se observa en el alineamiento anterior cinco de las seis clonas analizadas tienen regiones ricas en A, la clona 36 no tiene cola de poli A y termina en la base 563 de la región codificadora del gen *cat*. En las clonas 14, 1, 48 y 16 que presentan cola de poli A, no se observa un patrón de poliadenilación definido ya que se poliadenilan entre 180 y 260 bases río abajo del sitio donde se procesa el parental. La clona 49 se poliadenila en la base 527 de la región codificadora de *cat*. La última base diferente de A que se observa antes de la cola de poli A es la base pirimidica timina en todas las clonas poliadeniladas. Ninguno de los transcritos analizados se procesa en el mismo sitio que los transcritos provenientes del plásmido parental.

En las clonas 16 y 49 se observan secuencias cortas de varias adeninas (A) situadas solo bases antes de la cola de poli A. En dos de la clonas analizadas (14 y 1 GCCC) podría funcionar como señal de poliadenilación el motivo TAAA (subrayado),

situado a 29 y 33 nucleótidos respectivamente río arriba del sitio donde se procesaron dichas clonas, sin embargo a pesar de que es el mismo motivo no se poliadenilan en el mismo sitio, y no se observa la región rica en U's propuesta para que se lleve a cabo el proceso de poliadenilación.

El cambiar todos los nucleótidos de la señal propuesta de poliadenilación (GCCC) afecta el procesamiento y poliadenilación de transcritos en el reportero *cat*. Este proceso se vuelve deficiente y errático, por lo que los transcritos *cat* de esta mutante pudieran no ser exportados al citoplasma o bien degradados rápidamente lo que se refleja en la cantidad de proteína CAT-GCCC producida ya que la actividad observada de la proteína CAT disminuye a valores del 10% respecto al parental.

Alineamiento clonas 3'- GAAA

parental	ATGAACAAAAAATCACTGGATATACCACCGTTGATATATCCAATCGCATCGTAAAGAA
14GAAA	-----
10GAAA	-----
16GAAA	-----
24GAAA	-----
parental	CATTTTGAGGCATTTTCAGTCAGTTGCTCAATGTACCTATAACCAGACCGTTCAGCTGGAT
14GAAA	-----
10GAAA	-----
16GAAA	-----
24GAAA	-----
parental	ATTACGGCCTTTTTAAAGACCGTAAAGAAAAATAAGCACAAGTTTTATCCGGCCTTTATT
14GAAA	-----
10GAAA	-----
16GAAA	-----
24GAAA	-----
parental	CACATTCTTGCCCGCCTGATGAATGCTCATCCGGAATTCGTATGGCAATGAAAGACGGT
14GAAA	-----
10GAAA	-----
16GAAA	-----
24GAAA	-----
parental	GAGCTGGTGATATGGGATAGTGTTCACCCTTGTTACACCGTTTTCCATGAGCAAAGTAA
14GAAA	-----
10GAAA	-----
16GAAA	-----
24GAAA	-----
parental	ACGTTTTTCATCGCTCTGGAGTGAATACCACGACGATTTCCGGCAGTTTCTACACATATAT
14GAAA	-CGTTTTTCATCGCTCTGGAGTGAATACCACGACGATTTCCGGCAGTTTCTACACATATAT
10GAAA	-CGTTTTTCATCGCTCTGGAGTGAATACCACGACGATTTCCGGCAGTTTCTACACATATAT
16GAAA	-CGTTTTTCATCGCTCTGGAGTGAATACCACGACGATTTCCGGCAGTTTCTACACATATAT
24GAAA	-CGTTTTTCATCGCTCTGGAGTGAATACCACGACGATTTCCGGCAGTTTCTACACATATAT

```

parental   TCGCAAGATGTGGCGTGTACGGTGAAAACCTGGCCTATTTCCCTAAAGGGTTTATTGAG
14GAAA    TCGCAAGATGTGGCGTGTACGGTGAAAACCTGGCCTATTTCCCTAAAGGGTTTATTGAG
10GAAA    TCGCAAGATGTGGCGTGTACGGTGAAAACCTGGCCTATTTCCCTAAAGGGTTTATTGAG
16GAAA    TCGCAAGATGTGGCGTGTACGGTGAAAACCTGGCCTATTTCCCTAAAGGGTTTATTGAG
24GAAA    TCGCAAGATGTGGCGTGTACGGTGAAAACCTGGCCTATTTCCCTAAAGGGTTTATTGAG

parental   AATATGTTTTTCGTCTCAGCCAATCCCTGGGTGAGTTTCACCAGTTTTGATTTAAACGTG
14GAAA    AATATGTTTTTCGTCTCAGCCAATCCCTGGGTGAGTTTCACCAGTTTTAAGAAAAAAAAA
10GAAA    AATATGTTTTTCGTCTCAGCCAATCCCTGGGTGAGTTTCACCAGTTTTGATTTAAACGTG
16GAAA    AATATGTTTTTCGTCTCAGCCAATCCCTGGGTGAGTTTCACCAGTTTTGATTTAAACGTG
24GAAA    AATATGTTTTTCGTCTCAGCCAATCCCTGGGTGAGTTTCACCAGTTTTGATTTAAACGTG

parental   GCCAATATGGACAACCTCTTCGCCCCCGTTTTCCACCATGGGCAAATATTATACGCAAGGC
14GAAA    AGAAAAA GTACTAGTCGACGCGTGGCCGGATCCAAGGGCGAATT-----
10GAAA    GCCAATATGGGAAAAAGAGAGAAAAA GTACTAGTCGTACCTCGGTGCGCTTACTAGTG
16GAAA    GCCAATATGGACAACCTCTTCGCCCCCGTTTTCCACCATGGGCAAAAAAAAAAAAAGTA
24GAAA    GCCAATATGGACAACCTCTTCGCCCCCGTTTTCCACCATGGGCAAATATTATACGCAAGGC

parental   GACAAGGTGCTGATGCCGCTGGCGATT CAGGTT CATCATGCCGCTGTGATGGCTTCCAT
14GAAA    -----
10GAAA    -----
16GAAA    CTAGTCGACGCGTGGCCGGATCAAGGGCGAATT-----
24GAAA    GACAAGGTGCTGATGCCGCTGGCGATT CAGGTT CATCATGCCGCTTGTGATGGCTTCCAT

parental   GTCGGCAGAATGCTTAATGAATTACAACAGTACTGCGATGAGTGGCAGGGCGGGGCGTAG
14GAAA    -----
10GAAA    -----
16GAAA    -----
24GAAA    GTCGGCAGAATGCTTAATGAATTACAACAGTACTGCGATGAGTGGCAGGGCGGGGCGTAG

parental   GAGCTCACTTAAACAATTTCCGGTATAATATATTTCAA AATTA ACTAACCTTTTTTCTTTA
14GAAA    -----
10GAAA    -----
16GAAA    -----
24GAAA    GAGCTCACTGAAACAATTTCCGGTATAATATATTTCAA AATTA ACTAACCTTTTTTCTTTA

parental   GTGAACCTATTTTGAAATCACTTCATTAATATTGTGTTTAAATGG-TTTATATGTGACC
14GAAA    -----
10GAAA    -----
16GAAA    -----
24GAAA    GTGAACCTATTTTGAAATCACTTCATTAATATTGTGTTTAAATGGTTTATATGTGACC

parental   AATACGATGTACCCTGAACATTTCTTTTCCAATATGATTTTACCTTTCACCAAATACAA
14GAAA    -----
10GAAA    -----
16GAAA    -----
24GAAA    AATACGATGTACCCTGAACATTTCTTTTCCAATATGATTTTACCTTTC-CCAAATACAA

parental   GTATCATGCTAATTAAGTGCCTGATTTGCATTGTATTCTTTAACTATACATAATTGAAT
14GAAA    -----
10GAAA    -----
16GAAA    -----
24GAAA    GTATCATGCTAATTAAGTGCCTGATTTGCATTGTATTCTTTA-CTATCCATAATTGAAT

parental   CAATCAATAACACTTGATAATTGTGTATTATTCCTTGTT...
14GAAA    -----
10GAAA    -----
16GAAA    -----
24GAAA    CAATCAATA-C
    
```

En el alineamiento anterior observamos que las clonas 14, 10 y 16 tienen regiones ricas en A en la región codificadora del gen *cat* entre las bases 450 y 520, en caso de traducirse estos mRNAs darían lugar a una proteína truncada no funcional. De la misma forma que en dos de las clonas GCCC, en las clonas 10 y 14 GAAA se observan secuencias cortas adicionales con residuos de A antes de la cola de poli A que en ambos casos es de solo 5 residuos de adenilato. La última base diferente de A que se observa en el cDNA en la clona 14 es timina, en la clona 10 guanina y en la clona 16 citosina. Ninguno de los transcritos analizados provenientes de esta mutación se procesa en el mismo sitio que el transcrito parental.

En la clona 10 existe un motivo TAAA (subrayado) situado a 23 nt río arriba del sitio de corte del transcrito que pudiera funcionar como señal de poliadenilación, sin embargo no está presente la región rica en U's propuesta para que se lleve a cabo el proceso de poliadenilación.

En la clona 24 la última base leída pertenece a la región 3' intergénica de actina por lo tanto es necesario continuar secuenciándola para conocer su estado de poliadenilación.

Como observamos el cambio en la primera posición de la señal propuesta para la poliadenilación (GAAA) afecta el proceso de poliadenilación, se vuelve deficiente y no se lleva a cabo en todos los transcritos. Este hecho se ve reflejado en la producción de una menor cantidad de enzima CAT ya que los transcritos CAT- GAAA pudieran no ser exportados al citoplasma o bien ser degradados rápidamente y por lo tanto la actividad enzimática de la proteína CAT-GAAA cae a valores del ~10% respecto al parental.

Alineamiento clonas 3'- TCAA

parental 14TCAA	ATGAACAAAAAATCACTGGATATACCACCGTTGATATATCCAATCGCATCGTAAAGAA -----
parental 14TCAA	CATTTTGAGGCATTTTCAGTCAGTTGCTCAATGTACCTATAACCAGACCGTTCAGCTGGAT -----
parental 14TCAA	ATTACGGCCTTTTTAAAGACCGTAAAGAAAAATAAGCACAGTTTTATCCGGCCTTTATT -----
parental 14TCAA	CACATTCTTGCCCGCCTGATGAATGCTCATCCGGAATTCGGTATGGCAATGAAAGACGGT -----
parental 14TCAA	GAGCTGGTGATATGGGATAGTGTTCACCCTTGTTACACCGTTTTCCATGAGCAAAGTAA -----GAGCCTTGTC---CCGTTTTC-ATGAC---ACTGAA
parental 14TCAA	ACGTTTTTCATCGCTCTGGAGTGAATACCACGACGATTTCCGGCAGTTTCTACACATATAT -CGTTTTTCATCGCTCTGGAGTGAATACCACGACGATTTCCGGCAGTTTCTACACATATAT
parental 14TCAA	TCGCAAGATGTGGCGTGTACGGTGAAAACCTGGCCTATTTCCCTAAAGGGTTTATTGAG TCGCAAGATGTGGCGTGTACGGTGAAAACCTGGCCTATTTCCCTAAAGGGTTTATTGAG
parental 14TCAA	AATATGTTTTTCGTCTCAGCCAATCCCTGGGTGAGTTTCACCAGTTTTGATTTAAACGTG AATATGTTTTTCGTCTCAGCCAATCCCTGGGTGAGTTTCACCAGTTTTGATTTAAACGTG
parental 14TCAA	GCCAATATGGACAACCTCTTCGCCCCGTTTTCCACCATGGGCAAATATTATACGCAAGGC GCCAATATGGACAACCTCTTCGCCCCGTTTTCCACCATGGGCAAATATTATACGCAAGGC
parental 14TCAA	GACAAGGTGCTGATGCCGCTGGCGATTGAGTTTCATCATGCCGTCTGTGATGGCTTCCAT GACAAGGTGCTGATGCCGCTGGCGATTGAGTTTCATCATGCCGTTTGTGATGGCTTCCAT
parental 14TCAA	GTCGGCAGAATGCTTAATGAATTACAACAGTACTGCGATGAGTGGCAGGGCGGGGCGTAG GTCGGCAGAATGCTTAATGAATTACAACAGTACTGCGATGAGTGGCAGGGCGGGGCGTAG
parental 14TCAA	GAGCTCACTTAAACAATTTCCGGTATAATATATTTCAAATAACTAACCTTTTTTCTTTA GAGCTCACTTCAACAATTTCCGGTATAATATATTTCAAATAACTAACCTTTTTTCTTTA
parental 14TCAA	GTGAACCTATTTTGAAATCACTTCATTAATATTGTGTTTTAATGGTTTATATGTGACCA GTGAACCTATTTTGAAATCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAGTACTAGTCGACGCGTGGC
parental 14TCAA	ATACGATGTACCCTGAACATTTCTTTTCCAATATGATTTTTACCTTTCACCAAATACAAG CGGATCCAAGGGCGAAATT-----



En el caso de esta mutante fue muy difícil obtener clonas para el producto del 3' RACE de *cat* y solo se tiene una secuencia. En este alineamiento observamos que la clona 14 TCAA se poliadenila 45 bases río abajo del sitio donde se procesa el parental, la última base diferente de A que observamos antes de la cola de poli A es una citosina. No se observa algún motivo que pudiera utilizar como señal alternativa de poliadenilación.

Alineamiento clonas 3'- TACA

```

parental  ATGAACAAAAAATCACTGGATATACCACCGTTGATATATCCAATCGCATCGTAAAGAA
10TACA    -----
12TACA    -----
16TACA    -----
28TACA    -----
20TACA    -----

parental  CATTTTGAGGCATTTTCAGTCAGTTGCTCAATGTACCTATAACCAGACCGTTCAGCTGGAT
10TACA    -----
12TACA    -----
16TACA    -----
28TACA    -----
20TACA    -----

parental  ATTACGGCCTTTTTAAAGACCGTAAAGAAAAATAAGCACAAGTTTTATCCGGCCTTTATT
10TACA    -----
12TACA    -----
16TACA    -----
28TACA    -----
20TACA    -----

parental  CACATTCTTGCCCGCCTGATGAATGCTCATCCGAATTCGTATGGCAATGAAAGACGGT
10TACA    -----
12TACA    -----
16TACA    -----
28TACA    -----
20TACA    -----

parental  GAGCTGGTGATATGGGATAGTGTTCACCCTTGTTACACCGTTTTCCATGAGCAAACCTGAA
10TACA    -----
12TACA    -----
16TACA    -----
28TACA    -----
20TACA    -----

parental  ACGTTTTTCATCGCTCTGGAGTGAATACCACGACGATTTCCGGCAGTTTCTACACATATAT
10TACA    -CGTTTTTCATCGCTCTGGAGTGAATACCACGACGATTTCCGGCAGTTTCTACACATATAT
12TACA    -CGTTTTTCATCGCTCTGGAGTGAATACCACGACGATTTCCGGCAGTTTCTACACATATAT
16TACA    -CGTTTTTCATCGCTCTGGAGTGGATAACCACGACGATTTCCGGCAGTTTCTACACATATAT
28TACA    -CGTTTTTCATCGCTCTGGAGTGAATACCACGACGATTTCCGGCAGTTTCTACACATATAT
20TACA    -CGTTTTTCATCGCTCTGGAGTGAATACCACGACGATTTCCGGCAGTTTCTACACATATAT

parental  TCGCAAGATGTGGCGTGTACGGTGAAAACCTGGCCTATTTCCCTAAAGGGTTTATTGAG
10TACA    TCGCAAGATGTGGCGTGTACGGTGAAAACCTGGCCTATTTCCCTAAAGGGTTTATTGAG
12TACA    TCGCAAGATGTGGCGTGTACGGTGAAAACCTGGCCTATTTCCCTAAAGGGTTTATTGAG
16TACA    TCGCAAGATGTGGCGTGTACGGTGAAAACCTGGCCTATTTCCCTAAAGGGTTTATTGAG
28TACA    TCGCAAGATGTGGCGTGTACGGTGAAAACCTGGCCTATTTCCCTAAAGGGTTTATTGAG
20TACA    TCGCAAGATGTGGCGTGTACGGTGAAAACCTGGCCTATTTCCCTAAAGGGTTTATTGAG

parental  AATATGTTTTTCGTCTCAGCCAATCCCTGGGTGAGTTTCACCAGTTTTGATTTAAACGTG
10TACA    AATATGTTTTTCGTCTCAGCCAATCCCTGGGTGAGTTTCACCAGTTTTGATTTAAACGTG
12TACA    AATATGTTTTTCGTCTCAGCCAATCCCTGGGTGAGTTTCACCAGTTTTGATTTAAACGTG
16TACA    AATATGTTTTTCGTCTCAGCCTATCCCTGGGTGAGTTTCACCAGTTTTGATTTAAACGTG
28TACA    AATATGTTTTTCGTCTCAGCCAATCCCTGGGTGAGTTTCACCAGTTTTGATTTAAACGTG
20TACA    AATATGTTTTTCGTCTCAGCCAATCCCTGGGTGAGTTTCACCAGTTTTGATTTAAACGTG
  
```

```

parental   GCCAATATGGACAACCTCTTCGCCCCCGTTTTCCACATGGGCAAATATTATACGCAAGGC
10TACA    GCCAATATGGACAACCTCTTCGCCCCCGTTTTCCACATGGGCAAATATTATACGCAAGGC
12TACA    GCCAATATGGACAACCTCTTCGCCCCCGTTTTCCACATGGGCAAATATTATACGCAAGGC
16TACA    GCCAATATGGACAACCTCTTCGCCCCCGTTTTCCACATGGGCAAATATTATACGCAAGGC
28TACA    GCCAATATGGACAACCTCTTCGCCCCCGTTTTCCACATGGGCAAATATTATACGCAAGGC
20TACA    GCCAATATGGACAACCTCTTCGCCCCCGTTTTCCACATGGGCAAATATTATACGCAAGGC

parental   GACAAGGTGCTGATGCCGCTGGCGATTACAGTTCATCATGCCGTTGTGATGGCTTCCAT
10TACA    GACAAGGTGCTGATGCCGCTGGCGATTACAGTTCATCATGCCGTTGTGATGGCTTCCAT
12TACA    GACAAGGTGCTGATGCCGCTGGCGATTACAGTTCATCATGCCGTTGTGATGGCTTCCAT
16TACA    GACAAGGTGCTGATGCCGCTGGCGATTACAGTTCATCATGCCGTTGTGATGGCTTCCAT
28TACA    GACAAGGTGCTGATGCCGCTGGCGATTACAGTTCATCATGCCGTTGTGATGGCTTCCAT
20TACA    GACAAGGTGCTGATGCCGCTGGCGATTACAGTTCATCATGCCGTTGTGATGGCTTCCAT

parental   GTCGGCAGAATGCTTAATGAATTACAACAGTACTGCGATGAGTGGCAGGGCGGGGCGTAG
10TACA    GTCGGCAGAATGCTTAATGAATTACAACAGTACTAGTCGACGC-TGGCCGGAAAGGGCGA
12TACA    GTCGGCAGAATGCTTAATGAATTACAACAGTACTAGTCGACGCGTGGCCGGATCCAAGGG
16TACA    GTCGGCAGAATGCTTAAAAAAAAAAAAAAAAAGTACTAGTCGACGCGTGGCCGGATCCAAG
28TACA    GTCGGCAGAATGCTTAATGAATTACAACAGTACTGCGATGAGTGGCAGGGCGGGGCGTAG
20TACA    GACGGCAGAATGCTTAATGAATTACAACAGTACTGCGATGAGTGGCAGGGCGGGGCGTAG

parental   GAGCTCACTTAAACAATTTCGGTATAATATATTTCAAATTAACCTTTTTTCTTTA
10TACA    ATTC-----
12TACA    CGAATTC-----
16TACA    GGCGAATTC-----
28TACA    GAGCTCACTTACACAATTTCGGTATAATATATTTCAAATTAACCTTTTTGAGAAAA
20TACA    GAGCTCACTTACACAATTTCGGTATAATATATTTCAAATTAACCTTTTTTCTTTA

parental   GTGAACCTATTTGGAAATCACTTCATTAATATTGTGTTTTAATGGTTTATATGTGACCA
10TACA    -----
12TACA    -----
16TACA    -----
28TACA    AAAAAAAAAAAGTACTAGTCGACGCGTGGCCGGATCCAAGGGCGAATTC-----
20TACA    GTGAACCTATTTGGGAATCACTTCAAAAAAAAAAAAAAAAGTACTAGTCGACGCGTGGCC

parental   ATACGATGTACCCTGAACATTTCTTTTCCAATATGATTTTACCTTTCACCAAATACAAG
10TACA    -----
12TACA    -----
16TACA    -----
28TACA    -----
20TACA    CGGATCCAAGGGCGAATTC-----

```

En el alineamiento de las clonas provenientes de la mutante en la tercera posición de la señal propuesta para la poliadenilación observamos que 3 clonas tienen cola de poli A sin embargo no se poliadenilan en el mismo sitio; la clona 16 se poliadenila dentro de la región codificadora del gen *cat* (base 614), las clonas 28 y 20 se poliadenilan a 21 y 49 nucleótidos respectivamente río abajo del sitio donde se procesa el parental. No se observa algún motivo que pudieran utilizar como señal alternativa de poliadenilación. Ninguno de los transcritos analizados para esta mutante se procesa en el mismo sitio en el que se procesa el parental.

El último nucleótido diferente de A que se observó en el cDNA en la clona 20 es citosina, y en las clonas 16 y 28 timina.

En la clona 28 se observa la inserción de guaninas que interrumpen la cola de poli (A) de igual forma que sucede en las clonas 14 y 10 GAAA y 49 GCCC.

Las clonas 10 y 12 no están poliadeniladas y se lee hasta el nucleótido 534 de la región codificadora del gen *cat*. En estas clonas el oligonucleótido AP (5'-GGCCACGCGTCGACTAGTACTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT-3') con el cuál se sintetizó el cDNA pudo haberse pegado de manera inespecífica a la región codificadora del gen *cat* ya que se tienen 5 bases continuas (subrayadas en el oligonucleótido AP) que son complementarias a las bases 535- 539 de la región codificadora del gen *cat*. Estas clonas probablemente no estén poliadeniladas y quizá durante el ensayo 3' RACE el oligonucleótido pudo haberse unido en el lugar donde existía complementariedad y generar así un producto inespecífico en la amplificación.

Observamos que al cambiar la tercera posición de la señal propuesta de poliadenilación (TACA), el proceso de poliadenilación se vuelve deficiente, probablemente por esta razón la actividad enzimática de la proteína reportera CAT-TACA disminuye a valores de ~10% respecto al parental.

Alineamiento clonas 3'- TAAC

```

parental  ATGAACAAAAAATCACTGGATATACCACCGTTGATATATCCCAATCGCATCGTAAAGAA
48TAAC   -----
11TAAC   -----
1TAAC    -----
5TAAC    -----
44TAAC   -----

parental  CATTTTGAGGCATTTTCAGTCAGTTGCTCAATGTACCTATAACCAGACCGTTCAGCTGGAT
48TAAC   -----
11TAAC   -----
1TAAC    -----
5TAAC    -----
44TAAC   -----

parental  ATTACGGCCTTTTTAAAGACCGTAAAGAAAAATAAGCACAAAGTTTTATCCGGCCTTTATT
48TAAC   -----
11TAAC   -----
1TAAC    -----
5TAAC    -----
44TAAC   -----

parental  CACATTCCTGCCCCCTGATGAATGCTCATCCGGAATCCGTATGGCAATGAAAGACGGT
48TAAC   -----
11TAAC   -----
1TAAC    -----
5TAAC    -----
44TAAC   -----

parental  GAGCTGGTGATATGGGATAGTGTTACCCCTTGTTACACCGTTTTCCATGAGCAAACCTGAA
48TAAC   -----
11TAAC   -----
1TAAC    -----
5TAAC    -----
44TAAC   -----

parental  ACGTTTTTCATCGCTCTGGAGTGAATACCACGACGATTTCCGGCAGTTTCTACACATATAT
48TAAC   ACGTTTTTCATCGCTCTGGAGTGAATACCACGACGATTTCCGGCAGTTTCTACACATATAT
11TAAC   ACGTTTTTCATCGCTCTGGAGTGAATACCACGACGATTTCCGGCAGTTTCTACACATATAT
1TAAC    ACGTTTTTCATCGCTCTGGAGTGCCTACCACGACGATTTCCGGCAGTTTCTACACATATAT
5TAAC    ACGTTTTTCATCGCTCTGGAGTGAATACCACGACGATTTCCGGCAGTTTCTACACATATAT
44TAAC   ACGTTTTTCATCGCTCTGGAGTGAATACCACGACGATTTCCGGCAGTTTCTACACATATAT

parental  TCGCAAGATGTGGCGTGTACGGTGAAAACCTGGCCTATTTCCCTAAAGGGTTTATTGAG
48TAAC   TCGCAAGATGTGGCGTGTACGGTGAAAACCTGGCCTATTTCCCTAAAGGGTTTATTGAG
11TAAC   TCGCAAGATGTGGCGTGTACGGTGAAAACCTGGCCTATTTCCCTAAAGGGTTTATTGAG
1TAAC    TCGCAAGATGTGGCGTGTACGGTGAAAACCTGGCCTATTTCCCTAAAGGGTTTATTGAG
5TAAC    TCGCAAGATGTGGCGTGTACGGTGAAAACCTGGCCTATTTCCCTAAAGGGTTTATTGAG
44TAAC   TCGCAAGATGTGGCGTGTACGGTGAAAACCTGGCCTATTTCCCTAAAGGGTTTATTGAG

parental  AATATGTTTTTCGTCTCAGCCAATCCCTGGGTGAGTTTCACCAGTTTTGATTTAAACGTG
48TAAC   AATATGTTTTTCGTCTCAGCCAATCCCTGGGTGAGTTTCACCAGTTTTGATTTAAACGTG
11TAAC   AATATGTTTTTCGTCTCAGCCAATCCCTGGGTGAGTTTCACCAGTTTTGATTTAAACGTG
1TAAC    AATATGTTTTTCGTCTCAGCCAATCCCTGGGTGAGTTTCACCAGTTTTGATTTAAACGTG
5TAAC    AATATGTTTTTTGTCTCAGCCAATCCCTGGGTGAGTTTCACCAGTTTTGATTTAAACGTG
44TAAC   AATATGTTTTTCGTCTCAGCCAATCCCTGGGTGAGTTTCACCAGTTTTGATTTAAACGTG

```

parental	GCCAATATGGACAACCTTCTTCGCCCCCGTTTTCCACATGGGCAAATATTATACGCAAGGC
48TAAC	GCCAATATGGACAAAAAAGT-CTAGTCGACGCGTGGCCGGATCCAC
11TAAC	GCCAATATGGACAACCTTCTTCGCCCCCGTTTTCCACATGGGCAAATATTATACGCAAGGC
1TAAC	GCCAATATGGACAACCTTCTTCGCCCCCGTTTTCCACATGGGCAAATATTATACGCAAGGC
5TAAC	GCCAATATGGACAACCTTCTTCGCCCCCGTTTTCCACATGGGCAAATATTATACGCAAGGC
44TAAC	GCCAATATGGACAACCTTCTTCGCCCCCGTTTTCCACATGGGCAAATATTATACGCAAGGC
parental	GACAAGGTGCTGATGCCGCTGGCGATT CAGGTT CATCATGCCGTTCTGTGATGGCTTCCAT
48TAAC	ATTCTTGCCCGCTG-----
11TAAC	GACAAGGTGCTGATGCCGCTAAAAGGTAAGTACTAGTCGACGCGTGGCC
1TAAC	GACAAGGTGCTGATGCCGCTGGCGATT CAGGTT CATCATGCCGTTTGTGATGGCTTCCAT
5TAAC	GACAAGGTGCTGATGCCGCTGGCGATT CAGGTT CATCATGCCGTTTGTGATGGCTTCCAT
44TAAC	GACAAGGTGCTGATGCCGCTGGCGATT CAGGTT CATCATGCCGTTTGTGATGGCTTCCAT
parental	GTCGGCAGAATGCTTAATGAATTACAACAGTACTGCGATGAGTGGCAGGGCGGGCGTAG
48TAAC	-----
11TAAC	GGATCCAAGGGCGAATTC-----
1TAAC	GTCGGCAGAATGCTTAATGAATTACAACGTAAGTACTGCGACGCGTGGCCGGATCCAAGGG
5TAAC	GTCGGCAGAATGCTTAATGAATTACAACGTAAGTACTGCGACGCGTGGCCGGATCCAAGGG
44TAAC	GTCGGCAGAATGCTTAATGAATTACAACGTAAGTACTGCGACGCGTGGCCAGATCCAAGGG
parental	GAGCTCACTTAAACAATTTCGGTATAATATTTCAAATTAACCTTTTTTCTTTA
48TAAC	-----
11TAAC	-----
1TAAC	CGAATTC-----
5TAAC	CGAATTC-----
44TAAC	CGAATTC-----



En los transcritos correspondientes al cambio en la cuarta posición de la señal propuesta de poliadenilación (TAAC), observamos que solo dos de las clonas tienen cola de poli A, ambas dentro de la región codificadora del gen *cat*. La última base diferente de A que se observa antes de la cola de poli A es una citosina en la clona 48 y timina en la clona 11. En la clona 11 TAAC se observa la inserción de una guanina dentro de la cola de poli A de forma similar a lo que se observó en las clonas 49 GCCC, 10 y 14 GAAA. Ninguno de los transcritos analizados para esta mutación se procesa en el mismo sitio que el parental.

En la clona 48 se observa una secuencia TAAA a una distancia de 20 nucleótidos del sitio donde se procesa esta clona, pero no se observa la región rica en U's propuesta para que se lleve a cabo el proceso de poliadenilación.

Las clonas 1, 5 y 44 no están poliadeniladas y terminan 26 bases antes del codón de término del gen *cat*, de igual forma que las clonas 10 y 12 TACA. En este caso también el oligonucleótido AP pudo haberse pegado de forma inespecífica a la región codificadora del gen *cat*.

Al cambiar la cuarta posición de la señal propuesta de poliadenilación (TAAC) y de igual forma que sucedió al cambiar las otras posiciones de la señal, el proceso de

poliadenilación se vuelve deficiente y se refleja en la disminución de la actividad enzimática de la proteína CAT-TAAC a valores de ~15% respecto al parental.

Alineamiento clonas 3'- TAAAG

```
parental ATGAACAAAAAATCACTGGATATACCACCGTTGATATATCCCAATCGCATCGTAAAGAA
13TAAAG -----
23TAAAG -----
2TAAAG -----
19TAAAG -----
```

```
parental CATTTTGAGGCATTTTCAGTCAGTTGCTCAATGTACCTATAACCAGACCGTTCAGCTGGAT
13TAAAG -----
23TAAAG -----
2TAAAG -----
19TAAAG -----
```

```
parental ATTACGGCCTTTTTAAAGACCGTAAAGAAAAATAAGCACAAGTTTTATCCGGCCTTTATT
13TAAAG -----
23TAAAG -----
2TAAAG -----
19TAAAG -----
```

```
parental CACATTCCTGCCCGCCTGATGAATGCTCATCCGGAATTCGTATGGCAATGAAAGACGGT
13TAAAG -----
23TAAAG -----
2TAAAG -----
19TAAAG -----
```

```
parental GAGCTGGTGATATGGGATAGTGTTCACCCTTGTTACACCGTTTTCCATGAGCAAACCTGAA
13TAAAG -----
23TAAAG -----TTTCCATGAGCAAACCTGAA
2TAAAG -----
19TAAAG -----TTTCCATGAGCAA-CTGAA
```

```
parental ACGTTTTTCATCGCTCTGGAGTGAATACCACGACGATTTCCGGCAGTTTCTACACATATAT
13TAAAG ACGTTTTTCATCGCTCTGGAGTGAATACCACGACGATTTCCGGCAGTTTCTACACATATAT
23TAAAG ACGTTTTTCATCGCTCTGGAGTGAATACCACGACGATTTCCGGCAGTTTCTACACATATAT
2TAAAG ACGTTTTTCATCGCTCTGGAGTGAATACCACGACGATTTCCGGCAGTTTCTACACATATAT
19TAAAG ACGTTTTTCATCGCTCTGGAGTGAATACCACGACGATTTCCGGCAGTTTCTACACATATAT
```

```
parental TCGCAAGATGTGGCGTGTACGGTGAAAACCTGGCCTATTTCCCTAAAGGGTTTATTGAG
13TAAAG TCGCAAGATGTGGCGTGTACGGTGAAAACCTGGCCTATTTCCCTAAAGGGTTTATTGAG
23TAAAG TCGCAAGATGTGGCGTGTACGGTGAAAACCTGGCCTATTTCCCTAAAGGGTTTATTGAG
2TAAAG TCGCAAGATGTGGCGTGTACGGTGAAAACCTGGCCTATTTCCCTAAAGGGTTTATTGAG
19TAAAG TCGCAAGATGTGGCGTGTACGGTGAAAACCTGGCCTATTTCCCTAAAGGGTTTATTGAG
```

```
parental AATATGTTTTTCGTCTCAGCCAATCCCTGGGTGAGTTTCACCAGTTTTGATTTAAACGTG
13TAAAG AATATGTTTTTCGTCTCAGCCAATCCCTGGGTGAGTTTCACCAGTTTTGATTTAAACGTG
23TAAAG AATATGTTTTTCGTCTCAGCCAATCCCTGGGTGAGTTTCACCAGTTTTGATTTAAACGTG
2TAAAG AATATGTTTTTCGTCTCAGCCAATCCCTGGGTGAGTTTCACCAGTTTTGATTTAAACGTG
19TAAAG AATATGTTTTTCGTCTCAGCCAATCCCTGGGTGAGTTTCACCAGTTTTGATTTAAACGTG
```

```
parental GCCAATATGGACAACCTCTTCGCCCGTTTTCCACCATGGGCAAATATTATACGCAAGGC
13TAAAG GCCAATATGGACAACCTCTTCGCCCGTTTTCCACCATGGGCAAATATTATACGCAAGGC
23TAAAG GCCAATATGGACAACCTCTTCGCCCGTTTTCCACCATGGGCAAATATTATACGCAAGGC
2TAAAG GCCAATATGGACAACCTCTTCGCCCGTTTTCCACCATGGGCAAATATTATACGCAAGGC
19TAAAG GCCAATATGGACAACCTCTTCGCCCGTTTTCCACCATGGGCAAATATTATACGCAAGGC
```

```

parental  GACAAGGTGCTGATGCCGCTGGCGATT CAGGTT CATCATGCCGTTCTGTGATGGCTTCCAT
13TAAAG  GACAAGGTGCTGATGCCGCTGGCGATT CAGGTT CATCATGCCGTTTGTGATGGCTTCCAT
23TAAAG  GACAAGATGCTGATGCCGCTGGCGATT CAGGTT CATCATGCCGTTTGTGATGGCTTCCAT
2TAAAG   GACAAGGTGCTGATGCCGCTGGCGATT CAGGTT CATCATGCCGTTTGTGATGGCTTCCAT
19TAAAG  GACAAGGTGCTGATGCCGCTGGCGATT CAGGTT CATCATGCCGTTTGTGATGGCTTCCAT

parental  GTCGGCAGAATGCTTAATGAATTACAACAGTACTGCGATGAGTGGCAGGGCGGGGCGTAG
13TAAAG  GTCGGCAGAATGCTTAATGAATTACAACAGTACTGCGATGAGTGGCAGGGCGGGGCGTAG
23TAAAG  GTCGGCAGAATGCTTAATGAATTACAACAGTACTGCGATGAGTGGCAGGGCGGGGCGTAG
2TAAAG   GTCGGCAGAATGCTTAATGAATTACAACAGTACTGCGATGAGTGGCAGGGCGGGGCGTAG
19TAAAG  GTCGGCAGAATGCTTAATGAATTACAACAGTACTGCGATGAGTGGCAGGGCGGGGCGTAG

parental  GAGCTCACTTAAACAATTTCCGGTATAATATATTTCAAATAACTAACCTTTTTTCTTTA
13TAAAG  GAGCTCACTTAAACAATTTCCGGTATAATATATTTCAAAAAAAAAAAAAAAAAA-GTACTAGT
23TAAAG  GAGCTCACTTAAACAATTTCCGGTATAATATATTTCAAAAAAAAAAAAAAAAAA-GTACTAGT
2TAAAG   GAGCTCACTTAAACAATTTCCGGTATAATATATTTCAAAAAAAAAAAAAAAAAA-GTACTAGT
19TAAAG  GAGCTCACTTAAACAATTTCCGGTATAATATATTTCAAAAAAAAAAAAAAAAAA-GTACTAGT

parental  GTGAACCTATTTGGAAATCACTTCATTAATATTGTGTTTTAATGTTTTATATGTGACCA
13TAAAG  CGACGCGTGGCCGGATCCAAGGGCGAATTC-----
23TAAAG  CGACGCGTGGCCGGATCCAAGGGCGAATTC-----
2TAAAG   CGACGCGTGGCCGGATCCAAGGGCGAATTC-----
19TAAAG  CGACGCGTGGCCGGATCCAAGGGCGAATTC-----
  
```

Todos los transcritos provenientes de la mutante *cat*-TAAAG (en la que se mutó la base río abajo y adyacente a la señal propuesta de poliadenilación), se poliadenilan en el mismo sitio que los transcritos del parental (indicado por la flecha), es importante recordar que la actividad obtenida para esta mutación es del 100% respecto al parental, lo que sugiere que la señal propuesta de poliadenilación se delimita al tetranucleótido UAAA y esta secuencia es la señal de poliadenilación utilizada en *Trichomonas vaginalis*.

5.3.5.2 Análisis de las clonas no poliadeniladas.

parental ATGAACAAAAAATCACTGGATATACCACCGTTGATATATCCCAATCGCATCGTAAAGAA
 36GCCC -----
 10TACA -----
 12TACA -----
 1TAAC -----
 5TAAC -----
 44TAAC -----
 24GAAA -----

parental CATTTTGAGGCATTTTCAGTCAGTTGCTCAATGTACCTATAACCAGACCGTTCAGCTGGAT
 36GCCC -----
 10TACA -----
 12TACA -----
 1TAAC -----
 5TAAC -----
 44TAAC -----
 24GAAA -----

parental ATTACGGCCTTTTTAAAGACCGTAAAGAAAAATAAGCACAGTTTTATCCGGCCTTTATT
 36GCCC -----
 10TACA -----
 12TACA -----
 1TAAC -----
 5TAAC -----
 44TAAC -----
 24GAAA -----

parental CACATTCCTGCCCGCCTGATGAATGCTCATCCGGAATCCGTATGGCAATGAAAGACGGT
 36GCCC -----
 10TACA -----
 12TACA -----
 1TAAC -----
 5TAAC -----
 44TAAC -----
 24GAAA -----

parental GAGCTGGTGATATGGGATAGTGTTCACCCCTGTTACACCGTTTTCCATGAGCAAACCTGAA
 36GCCC -----
 10TACA -----
 12TACA -----
 1TAAC -----
 5TAAC -----
 44TAAC -----
 24GAAA -----

parental ACGTTTTTCATCGCTCTGGAGTGAATACCACGACGATTTCCGGCAGTTTCTACACATATAT
 36GCC ACGTTTTTCATCGCTCTGGAGTGAATACCACGACGATTTCCGGCAGTTTCTACACATATAT
 10TACA ACGTTTTTCATCGCTCTGGAGTGAATACCACGACGATTTCCGGCAGTTTCTACACATATAT
 12TACA ACGTTTTTCATCGCTCTGGAGTGAATACCACGACGATTTCCGGCAGTTTCTACACATATAT
 1TAAC ACGTTTTTCATCGCTCTGGAGTGAATACCACGACGATTTCCGGCAGTTTCTACACATATAT
 5TAAC ACGTTTTTCATCGCTCTGGAGTGAATACCACGACGATTTCCGGCAGTTTCTACACATATAT
 44TAAC ACGTTTTTCATCGCTCTGGAGTGAATACCACGACGATTTCCGGCAGTTTCTACACATATAT
 24GAAA ACGTTTTTCATCGCTCTGGAGTGAATACCACGACGATTTCCGGCAGTTTCTACACATATAT

parental TCGCAAGATGTGGCGTGTACGGTGAAAACCTGGCCTATTTCCCTAAAGGGTTTATTGAG
 36GCCC TCGCAAGATGTGGCGTGTACGGTGAAAACCTGGCCTATTTCCCTAAAGGGTTTATTGAG
 10TACA TCGCAAGATGTGGCGTGTACGGTGAAAACCTGGCCTATTTCCCTAAAGGGTTTATTGAG
 12TACA TCGCAAGATGTGGCGTGTACGGTGAAAACCTGGCCTATTTCCCTAAAGGGTTTATTGAG
 1TAAC TCGCAAGATGTGGCGTGTACGGTGAAAACCTGGCCTATTTCCCTAAAGGGTTTATTGAG
 5TAAC TCGCAAGATGTGGCGTGTACGGTGAAAACCTGGCCTATTTCCCTAAAGGGTTTATTGAG
 44TAAC TCGCAAGATGTGGCGTGTACGGTGAAAACCTGGCCTATTTCCCTAAAGGGTTTATTGAG
 24GAAA TCGCAAGATGTGGCGTGTACGGTGAAAACCTGGCCTATTTCCCTAAAGGGTTTATTGAG

parental AATATGTTTTTCGTCTCAGCCAATCCCTGGGTGAGTTTCACCAGTTTTGATTTAAACGTG
 36GCCC AATATGTTTTTCGTCTCAGCCAATCCCTGGGTGAGTTTCACCAGTTTTGATTTAAACGTG
 10TACA AATATGTTTTTCGTCTCAGCCAATCCCTGGGTGAGTTTCACCAGTTTTGATTTAAACGTG
 12TACA AATATGTTTTTCGTCTCAGCCAATCCCTGGGTGAGTTTCACCAGTTTTGATTTAAACGTG
 1TAAC AATATGTTTTTCGTCTCAGCCAATCCCTGGGTGAGTTTCACCAGTTTTGATTTAAACGTG
 5TAAC AATATGTTTTTCGTCTCAGCCAATCCCTGGGTGAGTTTCACCAGTTTTGATTTAAACGTG
 44TAAC AATATGTTTTTCGTCTCAGCCAATCCCTGGGTGAGTTTCACCAGTTTTGATTTAAACGTG
 24GAAA AATATGTTTTTCGTCTCAGCCAATCCCTGGGTGAGTTTCACCAGTTTTGATTTAAACGTG

parental GCCAATATGGACAACCTTCTTCGCCCCCGTTTTACCATGGGCAAATATTATACGCAAGGC
 36GCCC GCCAATATGGACAACCTTCTTCGCCCCCGTTTTACCATGGGCAAATATTATACGTAAGGC
 10TACA GCCAATATGGACAACCTTCTTCGCCCCCGTTTTACCATGGGCAAATATTATACGCAAGGC
 12TACA GCCAATATGGACAACCTTCTTCGCCCCCGTTTTACCATGGGCAAATATTATACGCAAGGC
 1TAAC GCCAATATGGACAACCTTCTTCGCCCCCGTTTTACCATGGGCAAATATTATACGCAAGGC
 5TAAC GCCAATATGGACAACCTTCTTCGCCCCCGTTTTACCATGGGCAAATATTATACGCAAGGC
 44TAAC GCCAATATGGACAACCTTCTTCGCCCCCGTTTTACCATGGGCAAATATTATACGCAAGGC
 24GAAA GCCAATATGGACAACCTTCTTCGCCCCCGTTTTACCATGGGCAAATATTATACGCAAGGC

parental GACAAGGTGCTGATGCCGCTGGCGATTACAGTTTCATCATGCCGTCTGTGATGGCTTCCAT
 36GCCC CACAAGGTGCTGATGCCGCTGGCTCGTATTCAGGTCTCCATCCATGTCCGTATTG-----
 10TACA GACAAGGTGCTGATGCCGCTGGCGATTACAGTTTCATCATGCCGTCTGTGATGGCTTCCAT
 12TACA GACAAGGTGCTGATGCCGCTGGCGATTACAGTTTCATCATGCCGTCTGTGATGGCTTCCAT
 1TAAC GACAAGGTGCTGATGCCGCTGGCGATTACAGTTTCATCATGCCGTCTGTGATGGCTTCCAT
 5TAAC GACAAGGTGCTGATGCCGCTGGCGATTACAGTTTCATCATGCCGTCTGTGATGGCTTCCAT
 44TAAC GACAAGGTGCTGATGCCGCTGGCGATTACAGTTTCATCATGCCGTCTGTGATGGCTTCCAT
 24GAAA GACAAGGTGCTGATGCCGCTGGCGATTACAGTTTCATCATGCCGTCTGTGATGGCTTCCAT

parental GTCGGCAGAATGCTTAATGAATTACAACAGTACTGCGATGAGTGGCAGGGCGGGCGTAG
 36GCCC -----
 10TACA GTCGGCAGAATGCTTAATGAATTACAACAGTACTAGTCGACGC-TGGCCGGAAAGGGCGA
 12TACA GTCGGCAGAATGCTTAATGAATTACAACAGTACTAGTCGACGCGTGGCCGGATCCAAGGG
 1TAAC GTCGGCAGAATGCTTAATGAATTACAACAGTACTAGTCGACGCGTGGCCGGATCCAAGGG
 5TAAC GTCGGCAGAATGCTTAATGAATTACAACAGTACTAGTCGACGCGTGGCCGGATCCAAGGG
 44TAAC GTCGGCAGAATGCTTAATGAATTACAACAGTACTAGTCGACGCGTGGCCAGATCCAAGGG
 24GAAA GTCGGCAGAATGCTTAATGAATTACAACAGTACTGCGATGAGTGGCAGGGCGGGCGTAG

parental GAGCTCACTTAAACAATTTCCGGTATAATATATTTCAAATTAACCTTTTTCTTTA
 36GCCC -----
 10TACA ATTC-----
 12TACA CGAATTC-----
 1TAAC CGAATTC-----
 5TAAC CGAATTC-----
 44TAAC CGAATTC-----
 24GAAA GAGCTCACTGAAACAATTTCCGGTATAATATATTTCAAATTAACCTTTTTCTTTA



parental GTGAACCTATTTGGAAATCACTTCATTAATATTGTGTTTAATGGTTTATATGTGACCA
 36GCCC -----
 10TACA -----
 12TACA -----
 1TAAC -----
 5TAAC -----
 44TAAC -----
 24GAAA GTGAACCTATTTGGAAATCACTTCATTAATATTGTGTTTAATGGTTTATATGTGACCA

parental AATACGATGTACCCTGAACATTTCTTTTCCAATATGATTTTTACCTTTCACCAAATACAA
 36GCCC -----
 10TACA -----
 12TACA -----
 1TAAC -----
 5TAAC -----
 44TAAC -----
 24GAAA AATACGATGTACCCTGAACATTTCTTTTCCAATATGATTTTTACCTTTCACCAAATACAA

```

parental  -GTATCATGCTAATTAAAGTGCCTGATTTGCATTGTATTCTTTAACTATACATAATT-GA
36GCCC   -----
10TACA   -----
12TACA   -----
1TAAC    -----
5TAAC    -----
44TAAC   -----
24GAAA   AGTATCATGCTAATTAAAGTGCCTGATTTGCATTGTATTCTTTA-CTATCCATAATTGA

parental  ATCAATCAATAACACTTGATAATTGTGTATTATTCCTTGTT...
36GCCC   -----
10TACA   -----
12TACA   -----
1TAAC    -----
5TAAC    -----
44TAAC   -----
24GAAA   ATCAATCAATA-C-----

```

Como se puede observar en el alineamiento anterior de las clonas que no presentan cola de poli (A), los transcritos tienen diferentes longitudes y pareciera existir un sitio de termino preferencial del transcrito dentro de la región codificadora ya que 5 de los 7 transcritos analizados terminan en la misma base. Sin embargo esto podría deberse a una complementariedad parcial del oligonucleótido AP con la región codificadora del gen *cat*. En la clona 24 no logramos observar la secuencia del oligo AUAP-B.

5.3.5.3 Análisis de las clonas poliadeniladas.

Parental [ATGAACAAAAAATCACTGGATATACCACCGTTGATATATCCCAATCGCATCGTAAAGAA](#)
 14GAAA -----
 10GAAA -----
 48TAAC -----
 16GAAA -----
 49GCCC -----
 11TAAC -----
 16TACA -----
 13TAAAG -----
 23TAAAG -----
 2TAAAG -----
 19TAAAG -----
 28TACA -----
 14TCAA -----
 20TACA -----
 14GCCC -----
 1GCCC -----
 48GCCC -----
 16GCCC -----

Parental [CATTTTGAGGCATTTTCAGTCAGTTGCTCAATGTACCTATAACCAGACCGTTCAGCTGGAT](#)
 14GAAA -----
 10GAAA -----
 48TAAC -----
 16GAAA -----
 49GCCC -----
 11TAAC -----
 16TACA -----
 13TAAAG -----
 23TAAAG -----
 2TAAAG -----
 19TAAAG -----
 28TACA -----
 14TCAA -----
 20TACA -----
 14GCCC -----
 1GCCC -----
 48GCCC -----
 16GCCC -----

Parental [ATTACGGCCTTTTTAAAGACCGTAAAGAAAAATAAGCACAGTTTTATCCGGCCTTTAT](#)
 14GAAA -----
 10GAAA -----
 48TAAC -----
 16GAAA -----
 49GCCC -----
 11TAAC -----
 16TACA -----
 13TAAAG -----
 23TAAAG -----
 2TAAAG -----
 19TAAAG -----
 28TACA -----
 14TCAA -----
 20TACA -----
 14GCCC -----
 1GCCC -----
 48GCCC -----
 16GCCC -----

Parental	CACATTCTTGCCCGCCTGATGAATGCTCATCCGGAATTCGTATGGCAATGAAAAGACGGT
14GAAA	-----
10GAAA	-----
48TAAC	-----
16GAAA	-----
49GCCC	-----
11TAAC	-----
16TACA	-----
13TAAAG	-----
23TAAAG	-----
2TAAAG	-----
19TAAAG	-----
28TACA	-----
14TCAA	-----
20TACA	-----
14GCCC	-----
1GCCC	-----
48GCCC	-----
16GCCC	-----
Parental	GAGCTGGTGATATGGGATAGTGTTACCCTTGTTACACCGTTTTCCATGAGCAAACCTGAA
14GAAA	-----
10GAAA	-----
48TAAC	-----
16GAAA	-----
49GCCC	-----
11TAAC	-----
16TACA	-----
13TAAAG	-----
23TAAAG	-----
2TAAAG	-----
19TAAAG	-----
28TACA	-----
14TCAA	-----
20TACA	-----
14GCCC	-----
1GCCC	-----
48GCCC	-----
16GCCC	-----
Parental	ACGTTTTTCATCGCTCTGGAGTGAATACCACGACGATTTCCGGCAGTTTCTACACATATAT
14GAAA	---TTTTTCATCGCTCTGGAGTGAATACCACGACGATTTCCGGCAGTTTCTACACATATAT
10GAAA	---TTTTTCATCGCTCTGGAGTGAATACCACGACGATTTCCGGCAGTTTCTACACATATAT
48TAAC	---TTTTTCATCGCTCTGGAGTGAATACCACGACGATTTCCGGCAGTTTCTACACATATAT
16GAAA	---TTTTTCATCGCTCTGGAGTGAATACCACGACGATTTCCGGCAGTTTCTACACATATAT
49GCCC	---TTTTTCATCGCTCTGGAGTTCCTACCACGACGATTTCCGGCAGTTTCTACACATATAT
11TAAC	---TTTTTCATCGCTCTGGAGTGAATACCACGACGATTTCCGGCAGTTTCTACACATATAT
16TACA	---TTTTTCATCGCTCTGGAGTGGATAACCACGACGATTTCCGGCAGTTTCTACACATATAT
13TAAAG	---TTTTTCATCGCTCTGGAGTGAATACCACGACGATTTCCGGCAGTTTCTACACATATAT
23TAAAG	---TTTTTCATCGCTCTGGAGTGAATACCACGACGATTTCCGGCAGTTTCTACACATATAT
2TAAAG	---TTTTTCATCGCTCTGGAGTGAATACCACGACGATTTCCGGCAGTTTCTACACATATAT
19TAAAG	---TTTTTCATCGCTCTGGAGTGAATACCACGACGATTTCCGGCAGTTTCTACACATATAT
28TACA	---TTTTTCATCGCTCTGGAGTGAATACCACGACGATTTCCGGCAGTTTCTACACATATAT
14TCAA	---TTTTTCATCGCTCTGGAGTGAATACCACGACGATTTCCGGCAGTTTCTACACATATAT
20TACA	---TTTTTCATCGCTCTGGAGTGAATACCACGACGATTTCCGGCAGTTTCTACACATATAT
14GCCC	---TTTTTCATCGCTCTGGAGTGCCTACCACGACGATTTCCGGCAGTTTCTACACATATAT
1GCCC	---TTTTTCATCGCTCTGGAGTGAATACCACGACGATTTCCGGCAGTTTCTACACATATAT
48GCCC	---TTTTTCATCGCTCTGGAGTGACTACCACGACGATTTCCGGCAGTTTCTACACATATAT
16GCCC	---TTTTTCATCGCTCTGGAGTGTCCACCACGACGATTTCCGGCAGTTTCTACACATATAT

Parental TCGCAAGATGTGGCGTGTACGGTGAAAACCTGGCCTATTTCCCTAAAGGGTTTATTGAG
 14GAAA TCGCAAGATGTGGCGTGTACGGTGAAAACCTGGCCTATTTCCCTAAAGGGTTTATTGAG
 10GAAA TCGCAAGATGTGGCGTGTACGGTGAAAACCTGGCCTATTTCCCTAAAGGGTTTATTGAG
 48TAAC TCGCAAGATGTGGCGTGTACGGTGAAAACCTGGCCTATTTCCCTAAAGGGTTTATTGAG
 16GAAA TCGCAAGATGTGGCGTGTACGGTGAAAACCTGGCCTATTTCCCTAAAGGGTTTATTGAG
 49GCCC TCGCAAGATGTGGCGTGTACGGTGAAAACCTGGCCTATTTCCCTAAAGGGTTTATTGAG
 11TAAC TCGCAAGATGTGGCGTGTACGGTGAAAACCTGGCCTATTTCCCTAAAGGGTTTATTGAG
 16TACA TCGCAAGATGTGGCGTGTACGGTGAAAACCTGGCCTATTTCCCTAAAGGGTTTATTGAG
 13TAAAG TCGCAAGATGTGGCGTGTACGGTGAAAACCTGGCCTATTTCCCTAAAGGGTTTATTGAG
 23TAAAG TCGCAAGATGTGGCGTGTACGGTGAAAACCTGGCCTATTTCCCTAAAGGGTTTATTGAG
 2TAAAG TCGCAAGATGTGGCGTGTACGGTGAAAACCTGGCCTATTTCCCTAAAGGGTTTATTGAG
 19TAAAG TCGCAAGATGTGGCGTGTACGGTGAAAACCTGGCCTATTTCCCTAAAGGGTTTATTGAG
 28TACA TCGCAAGATGTGGCGTGTACGGTGAAAACCTGGCCTATTTCCCTAAAGGGTTTATTGAG
 14TCAA TCGCAAGATGTGGCGTGTACGGTGAAAACCTGGCCTATTTCCCTAAAGGGTTTATTGAG
 20TACA TCGCAAGATGTGGCGTGTACGGTGAAAACCTGGCCTATTTCCCTAAAGGGTTTATTGAG
 14GCCC TCGCAAGATGTGGCGTGTACGGTGAAAACCTGGCCTATTTCCCTAAAGGGTTTATTGAG
 1GCCC TCGCAAGATGTGGCGTGTACGGTGAAAACCTGGCCTATTTCCCTAAAGGGTTTATTGAG
 48GCCC TCGCAAGATGTGGCGTGTACGGTGAAAACCTGGCCTATTTCCCTAAAGGGTTTATTGAG
 16GCCC TCGCAAGATGTGGCGTGTACGGTGAAAACCTGGCCTATTTCCCTAAAGGGTTTATTGAG

Parental AATATGTTTTTCGTCTCAGCCAATCCCTGGGTGAGTTTCACCAGTTTTGATTTAAACGTG
 14GAAA AATATGTTTTTCGTCTCAGCCAATCCCTGGGTGAGTTTCACCAGTTTTAGAAAAA
 10GAAA AATATGTTTTTCGTCTCAGCCAATCCCTGGGTGAGTTTCACCAGTTTTGATTTAAACGTG
 48TAAC AATATGTTTTTCGTCTCAGCCAATCCCTGGGTGAGTTTCACCAGTTTTGATTTAAACGTG
 16GAAA AATATGTTTTTCGTCTCAGCCAATCCCTGGGTGAGTTTCACCAGTTTTGATTTAAACGTG
 49GCCC AATATGTTTTTCGTCTCAGCCAATCCCTGGGTGAGTTTCACCAGTTTTGATTTAAACGTG
 11TAAC AATATGTTTTTCGTCTCAGCCAATCCCTGGGTGAGTTTCACCAGTTTTGATTTAAACGTG
 16TACA AATATGTTTTTCGTCTCAGCCTATCCCTGGGTGAGTTTCACCAGTTTTGATTTAAACGTG
 13TAAAG AATATGTTTTTCGTCTCAGCCAATCCCTGGGTGAGTTTCACCAGTTTTGATTTAAACGTG
 23TAAAG AATATGTTTTTCGTCTCAGCCAATCCCTGGGTGAGTTTCACCAGTTTTGATTTAAACGTG
 2TAAAG AATATGTTTTTCGTCTCAGCCAATCCCTGGGTGAGTTTCACCAGTTTTGATTTAAACGTG
 19TAAAG AATATGTTTTTCGTCTCAGCCAATCCCTGGGTGAGTTTCACCAGTTTTGATTTAAACGTG
 28TACA AATATGTTTTTCGTCTCAGCCAATCCCTGGGTGAGTTTCACCAGTTTTGATTTAAACGTG
 14TCAA AATATGTTTTTCGTCTCAGCCAATCCCTGGGTGAGTTTCACCAGTTTTGATTTAAACGTG
 20TACA AATATGTTTTTCGTCTCAGCCAATCCCTGGGTGAGTTTCACCAGTTTTGATTTAAACGTG
 14GCCC AATATGTTTTTCGTCTCAGCCAATCCCTGGGTGAGTTTCACCAGTTTTGATTTAAACGTG
 1GCCC AATATGTTTTTCGTCTCAGCCAATCCCTGGGTGAGTTTCACCAGTTCTGATTTAAACGTG
 48GCCC AATATGTTTTTCGTCTCAGCCAATCCCTGGGTGAGTTTCACCAGTTTTGATTTAAACGTG
 16GCCC AATATGTTTTTCGTCTCAGCCAATCCCTGGGTGAGTTTCACCAGTTTTGATTTAAACGTG

Parental GCCAATATGGACAACCTCTTCGCCCCCGTTTTACCATGGGCAAATATTATACGCAAGGC
 14GAAA AGAAAAA GTACTAGTCGACGCGTGGCCGGATCCAAGGGCGAATT-----
 10GAAA GCCAATATGGGAAAAAG AAGAGAAAAA GTACTAGTCGTACCTCGGTGCGCGTTACTAGT
 48TAAC GCCAATATGGACAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA GT-CTAGTCGACGCGTGGCCGGATCCAC
 16GAAA GCCAATATGGACAACCTCTTCGCCCCCGTTTTACCATGGGC AAAAAAAAAAAAAAAGTA
 49GCCC GCCAATATGGACAACCTCTTCGCCCCCGTTTTACCATGGGCAAATAGAAAGAGAGAAGG
 11TAAC GCCAATATGGACAACCTCTTCGCCCCCGTTTTACCATGGGCAAATATTATACGCAAGGC
 16TACA GCCAATATGGACAACCTCTTCGCCCCCGTTTTACCATGGGCAAATATTATACGCAAGGC
 13TAAAG GCCAATATGGACAACCTCTTCGCCCCCGTTTTACCATGGGCAAATATTATACGCAAGGC
 23TAAAG GCCAATATGGACAACCTCTTCGCCCCCGTTTTACCATGGGCAAATATTATACGCAAGGC
 2TAAAG GCCAATATGGACAACCTCTTCGCCCCCGTTTTACCATGGGCAAATATTATACGCAAGGC
 19TAAAG GCCAATATGGACAACCTCTTCGCCCCCGTTTTACCATGGGCAAATATTATACGCAAGGC
 28TACA GCCAATATGGACAACCTCTTCGCCCCCGTTTTACCATGGGCAAATATTATACGCAAGGC
 14TCAA GCCAATATGGACAACCTCTTCGCCCCCGTTTTACCATGGGCAAATATTATACGCAAGGC
 20TACA GCCAATATGGACAACCTCTTCGCCCCCGTTTTACCATGGGCAAATATTATACGCAAGGC
 14GCCC GCCAATATGGACAACCTCTTCGCCCCCGTTTTACCATGGGCAAATATTATACGCAAGGC
 1GCCC GCCAATATGGACAACCTCTTCGCCCCCGTTTTACCATGGGCAAATATTATACGCAAGGC
 48GCCC GCCAATATGGACAACCTCTTCGCCCCCGTTTTACCATGGGCAAATATTATACGCAAGGC
 16GCCC GCCAATATGGACAACCTCTTCGCCCCCGTTTTACCATGGGCAAATATTATACGCAAGGC

Parental GACAAGGTGCTGATGCCGCTGGCGATTCAAGGGCGAATT
 14GAAA -----
 10GAAA -----
 48TAAC ATTCTTGCCCGCCTG-----
 16GAAA CTAGTCGACGCGTGGCCGGATCAAGGGCGAATT-----
 49GCCC GAAAAAAAAAGAAAAGGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAGTACTAGTCGACGCGTGGCCGGAT
 11TAAC GACAAGGTGCTGATGCCGCTAAAAGAAAAAAAAAAAAAAAAAGTACTAGTCGACGCGTGGCC
 16TACA GACAAGGTGCTGATGCCGCTGGCGATTCAAGTTTCATCATGCCGTTTGTGATGGCTTCCAT
 13TAAAG GACAAGGTGCTGATGCCGCTGGCGATTCAAGTTTCATCATGCCGTTTGTGATGGCTTCCAT
 23TAAAG GACAAGTCTGATGCCGCTGGCGATTCAAGTTTCATCATGCCGTTTGTGATGGCTTCCAT
 2TAAAG GACAAGGTGCTGATGCCGCTGGCGATTCAAGTTTCATCATGCCGTTTGTGATGGCTTCCAT
 19TAAAG GACAAGGTGCTGATGCCGCTGGCGATTCAAGTTTCATCATGCCGTTTGTGATGGCTTCCAT
 28TACA GACAAGGTGCTGATGCCGCTGGCGATTCAAGTTTCATCATGCCGTTTGTGATGGCTTCCAT
 14TCAA GACAAGGTGCTGATGCCGCTGGCGATTCAAGTTTCATCATGCCGTTTGTGATGGCTTCCAT
 20TACA GACAAGGTGCTGATGCCGCTGGCGATTCAAGTTTCATCATGCCGTTTGTGATGGCTTCCAT
 14GCCC GACAAGGTGCTGATGCCGCTGGCGATTCAAGTTTCATCATGCCGTTTGTGATGGCTTCCAT
 1GCCC GACAAGGTGCTGATGCCGCTGGCGATTCAAGTTTCATCATGCCGTTTGTGATGGCTTCCAT
 48GCCC GACAAGGTGCTGATGCCGCTGGCGATTCAAGTTTCATCATGCCGTTTGTGATGGCTTCCAT
 16GCCC GACAAGGTGCTGATGCCGCTGGCGATTCAAGTTTCATCATGCCGTTTGTGATGGCTTCCAT

Parental GTCGGCAGAATGCTTAATGAATTACAACAGTACTGCGATGAGTGGCAGGGCGGGGCGTAG
 14GAAA -----
 10GAAA -----
 48TAAC -----
 16GAAA -----
 49GCCC CCAAGGGCGAATTC-----
 11TAAC GGATCCAAGGGCGAATTC-----
 16TACA GTCGGCAGAATGCTTAAAAAAAAAAAAAAAAAGTACTAGTCGACGCGTGGCCGGATCCAAG
 13TAAAG GTCGGCAGAATGCTTAATGAATTACAACAGTACTGCGATGAGTGGCAGGGCGGGGCGTAG
 23TAAAG GTCGGCAGAATGCTTAATGAATTACAACAGTACTGCGATGAGTGGCAGGGCGGGGCGTAG
 2TAAAG GTCGGCAGAATGCTTAATGAATTACAACAGTACTGCGATGAGTGGCAGGGCGGGGCGTAG
 19TAAAG GTCGGCAGAATGCTTAATGAATTACAACAGTACTGCGATGAGTGGCAGGGCGGGGCGTAG
 28TACA GTCGGCAGAATGCTTAATGAATTACAACAGTACTGCGATGAGTGGCAGGGCGGGGCGTAG
 14TCAA GTCGGCAGAATGCTTAATGAATTACAACAGTACTGCGATGAGTGGCAGGGCGGGGCGTAG
 20TACA GACGGCAGAATGCTTAATGAATTACAACAGTACTGCGATGAGTGGCAGGGCGGGGCGTAG
 14GCCC GTCGGCAGAATGCTTAATGAATTACAACAGTACTGCGATGAGTGGCAGGGCGGGGCGTAG
 1GCCC GTCGGCAGAATGCTTAATGAATTACAACAGTACTGCGATGAGTGGCAGGGCGGGGCGTAG
 48GCCC GTCGGCAGAATGCTTAATGAATTACAACAGTACTGCGATGAGTGGCAGGGCGGGGCGTAG
 16GCCC GTCGGCAGAATGCTTAATGAATTACAACAGTACTGCGATGAGTGGCAGGGCGGGGCGTAG



Parental GAGCTCACTTAAACAATTCGGTATAATATATTTCAAATTAACCTTTTTCTTTA
 14GAAA -----
 10GAAA -----
 48TAAC -----
 16GAAA -----
 49GCCC -----
 11TAAC -----
 16TACA GGCGAATTC-----
 13TAAAG GAGCTCACTTAAAGAATTCGGTATAATATATTTCAAATTAACCTTTTTCTTTA-GTACTAGT
 23TAAAG GAGCTCACTTAAAGAATTCGGTATAATATATTTCAAATTAACCTTTTTCTTTA-GTACTAGT
 2TAAAG GAGCTCACTTAAAGAATTCGGTATAATATATTTCAAATTAACCTTTTTCTTTA-GTACTAGT
 19TAAAG GAGCTCACTTAAAGAATTCGGTATAATATATTTCAAATTAACCTTTTTCTTTAAGTACTAGT
 28TACA GAGCTCACTTACACAATTCGGTATAATATATTTCAAATTAACCTTTTTCTTTAAGAAAA
 14TCAA GAGCTCACTTCAACAATTCGGTATAATATATTTCAAATTAACCTTTTTCTTTA
 20TACA GAGCTCACTTACACAATTCGGTATAATATATTTCAAATTAACCTTTTTCTTTA
 14GCCC GAGCTCACTGCCCAATTCGGTATAATATATTTCAAATTAACCTTTTTCTTTA
 1GCCC GAGCTCACTGCCCAATTCGGTATAATATATTTCAAATTAACCTTTTTCTTTA
 48GCCC GAGCTCACTGCCCAATTCGGTATAATATATTTCAAATTAACCTTTTTCTTTA
 16GCCC GAGCTCACTGCCCAATTCGGTATAATATATTTCAAATTAACCTTTTTCTTTA

Parental GTGAACCTATTTTGGAAATCACTTCATTAATATTGTGTTTTAATGGTTTATATGTGACCA
 14GAAA -----
 10GAAA -----
 48TAAC -----
 16GAAA -----
 49GCCC -----
 11TAAC -----
 16TACA -----
 13TAAAG CGACGCGTGGCCGGATCCAAGGGCGAATTC-----
 23TAAAG CGACGCGTGGCCGGATCCAAGGGCGAATTC-----
 2TAAAG CGACGCGTGGCCGGATCCAAGGGCGAATTC-----
 19TAAAG CGACGCGTGGCCGGATCCAAGGGCGAATTC-----
 28TACA AAAAAAAAAAAAGTACTAGTCGACGCGTGGCCGGATCCAAGGGCGAATTC-----
 14TCAA GTGAACCTATTTTGGAAATCACTTCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAGTACTAGTCGACGCGTGGC
 20TACA GTGAACCTATTTTGGAAATCACTTCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAGTACTAGTCGACGCGTGGC
 14GCCC GTGAACCTATTTTGGAAATCACTTCATTAATATTGTGTTTTAATGGTTTATATGTGACCA
 1GCCC GTGAACCTATTTTGGAAATCACTTCATTAATATTGTGTTTTAATGGTTTATATGTGACCA
 48GCCC GTGAACCTATTTTGGAAATCACTTCATTAATATTGTGTTTTAATGGTTTATATGTGACCA
 16GCCC GTGAACCTATTTTGGAAATCACTTCATTAATATTGTGTTTTAATGGTTTATATGTGACCA

Parental AATACGATGTACCCTGAACATTTCTTTTCCAATATGATTTTTACCTTTCACCAAATACAA
 14GAAA -----
 10GAAA -----
 48TAAC -----
 16GAAA -----
 49GCCC -----
 11TAAC -----
 16TACA -----
 13TAAAG -----
 23TAAAG -----
 2TAAAG -----
 19TAAAG -----
 28TACA -----
 14TCAA CGGATCCAAGGGCGAATTC-----
 20TACA CGGATCCAAGGGCGAATTC-----
 14GCCC ATACGATGTACCCTGAACATTTCTTTTCCAATATGATTTTTACCTTTCACCAAATACAAG
 1GCCC ATACGATGTACCCTGAACATTTCTTTTCCAATATGATTTTTACCTTTCACCAAATACAAG
 48GCCC ATACGATGTACCCTGAACATTTCTTTTCCAATATGATTTTTACCTTTCACCAAATACAAG
 16GCCC ATACGATGTACCCTGAACATTTCTTTTCCAATATGATTTTTACCTTTCACCAAATACAAG

Parental -GTATCATGCTAATTAAAGTGCCTGATTTGCATTGTATTCTTTAACTATACATAATT-GA
 14GAAA -----
 10GAAA -----
 48TAAC -----
 16GAAA -----
 49GCCC -----
 11TAAC -----
 16TACA -----
 13TAAAG -----
 23TAAAG -----
 2TAAAG -----
 19TAAAG -----
 28TACA -----
 14TCAA -----
 20TACA -----
 14GCCC TATCATGCTAATTAAAGTGCCTGATTTGCATTGTATTCTTTAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
 1GCCC TATCATGCTAATTAAAGTGCCTGATTTGCATTGTATTCTTTAACTAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
 48GCCC TATCATGCTAATTAAAGTGCCTGATTTGCATTGTATTCTTTAACTATACATAATTGAATC
 16GCCC TATCATGCTAATTAAAGTGCCTGATTTGCATTGGAATTCCTTTAACTATCCATAATTGA-TC

```

parental  AATCAATAACACTTGATAATTGTGTATTATTCCTTGTTGATTTAAAAGAATATCTTTTGA
14GAAA   -----
10GAAA   -----
48TAAC   -----
16GAAA   -----
49GCCC   -----
11TAAC   -----
16TACA   -----
13TAAAG  -----
23TAAAG  -----
2TAAAG   -----
19TAAAG  -----
28TACA   -----
14TCAA   -----
20TACA   -----
14GCCC   AAAGTACTAGTCGACCCG--GGCCGGATCCAAGGGCGAATTC-----
1GCCC    AAAAAGTACTAATCCACGCCG-----
48GCCC   AATCAATAACACTTGATAATTGTGTATTATTCCTTGTTGATTTAAAAGAATATCTTTTGA
16GCCC   AATCAAAAACCCCTTGGAAAAATGGGGGAATTATTCCTGGTGAAATTAATAAAAAAATCTT

parental  TATTTTGAAGTAAATTAAATTATTCTTCATCAAATCATAGAGATAAACTAAACAAGACA
14GAAA   -----
10GAAA   -----
48TAAC   -----
16GAAA   -----
49GCCC   -----
11TAAC   -----
16TACA   -----
13TAAAG  -----
23TAAAG  -----
2TAAAG   -----
19TAAAG  -----
28TACA   -----
14TCAA   -----
20TACA   -----
14GCCC   -----
1GCCC    -----
48GCCC   TAAAAAAAAAAAAAAAAAATACTAGTTCGACGCGTGGCCGGATCCAAGGGCGAATTC----
16GCCC   TTTGATTTTGGAAAGTAAAAAAAAAAAAAAAAAAGTTCTTGTTCCAACCGGGCCGGAT

```

Al analizar las clonas que presentan cola de poli A, observamos que únicamente las clonas provenientes del plásmido TAAAG se procesan en el mismo sitio donde se procesa el plásmido parental.

En algunas clonas se identificó la secuencia TAAA (subrayada), que pudiera ser utilizada como la señal de poliadenilación. Sin embargo se observa que estos transcritos se poliadenilan en distinta posición relativa a esta señal TAAA.

Es importante recordar que en nuestro grupo de trabajo se ha propuesto que río abajo a la señal de poliadenilación existen dos señales consenso: la secuencia Y↓ AAUU(10-30 nt río abajo) que señala el sitio de corte, y una secuencia rica en U's río abajo del sitio de corte. En los sitios de poliadenilación de los transcritos anteriores no se observan estas otras señales propuestas para el procesamiento de transcritos.

5.4 Discusión

Los resultados obtenidos de la mutagénesis dirigida en la señal propuesta de poliadenilación (UAAA) de *Trichomonas vaginalis* muestran claramente que el proceso de poliadenilación se afecta al cambiar cualquiera de las posiciones del motivo UAAA. No se observa un efecto menor para alguna posición en particular, en todos los casos se observan transcritos con diferentes sitios de poliadenilación e incluso transcritos no poliadenilados. Algunos se poliadenilan dentro de la región codificadora del gen *cat* que en caso de traducirse producirían proteínas truncas, se observan también transcritos poliadenilados en distintas posiciones de la región 3' intergénica de actina que en ningún caso corresponde al sitio de procesamiento del parental. En ambos casos los transcritos pudieran no ser exportados al citoplasma o bien ser degradados rápidamente. Es importante recordar que se tiene una población heterogénea de transcritos poliadenilados y no poliadenilados, de cualquier forma el resultado es la producción de una cantidad menor de proteína CAT, por esta razón se observa la disminución de la actividad enzimática de la proteína CAT de cada mutante a valores de ~ 15% respecto al parental.

Si asumimos que la maquinaria de corte y poliadenilación en *Trichomonas vaginalis*, consta de los mismos factores (CPSF, CstF, CF I y II, PAP, PABP) y se comporta de manera similar al descrito para eucariontes superiores, se puede explicar el comportamiento al azar del proceso de poliadenilación, ya que al cambiar el motivo de unión del factor CPSF (la señal de poliadenilación), no se forma un complejo de corte y poliadenilación estable, ya que el primer paso en dicho proceso es el reconocimiento de la señal de poliadenilación por el factor CPSF, para posteriormente reclutar el resto de los factores involucrados; como consecuencia de que el factor CPSF no se una de forma estable a su secuencia blanco los transcritos primarios pudieran ser procesados en distintos sitios al propuesto en *T. vaginalis* ya que el sitio de procesamiento esta dado por el posicionamiento de los factores CPSF y CstF mas que por reconocer una secuencia específica, y dar lugar a diversos sitios de poliadenilación.

Para el plásmido TAAAG en el que se cambió la base río abajo y adyacente a la señal propuesta de poliadenilación observamos que los transcritos se poliadenilan en el mismo sitio que el plásmido parental, es decir el proceso de poliadenilación es eficiente y se refleja en la actividad enzimática de la proteína del 100% respecto al parental, lo

cuál nos indica que la señal de poliadenilación en *Trichomonas vaginalis* es UAAA y se delimita a estas cuatro bases. No realizamos ningún cambio río arriba de la señal de poliadenilación UAAA ya que el codón de término de la traducción está contenido en dicha señal por lo tanto antes de la misma puede encontrarse cualquier nucleótido formando parte de un codón para cualquier aminoácido.

Con los datos anteriores hemos confirmado que la señal de poliadenilación utilizada en *T. vaginalis* es UAAA que puede o no incluir el codón de término de la traducción y esta situada a una distancia de 11 a 30 nucleótidos río arriba del sitio de corte de los transcritos de forma similar a lo descrito para eucariontes superiores.

La propuesta de nuestro grupo es que el codón de término de la traducción UAA haya sido seleccionado evolutivamente como semilla de la señal de poliadenilación en un ancestro del linaje eucariótico. Esto podría reflejar una estrategia de evolución temprana para señalar el fin de una región codificadora y el sitio de procesamiento de transcritos en el extremo 3'.

6. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

Conclusiones.

1.- El vector de expresión utilizado en este trabajo (*p_{cat}-ámbar*) es una herramienta útil para analizar la funcionalidad de las señales propuestas para el proceso de poliadenilación en *Trichomonas vaginalis*.

2.- Se demostró que la señal de poliadenilación en *Trichomonas vaginalis* es el tetranucleótido UAAA. En la mayoría de los casos esta secuencia puede incluir al codón de termino de la traducción UAA.

3.- El cambio en cualquiera de los cuatro nucleótidos de la señal de poliadenilación altera el proceso de poliadenilación de los RNA mensajeros de *T. vaginalis*.

Perspectivas.

Ahora que se demostró que el tetranucleótido UAAA es la señal de poliadenilación utilizada en *Trichomonas vaginalis*, es necesario caracterizar el complejo de corte y poliadenilación a nivel de los factores proteicos involucrados en este proceso vital para el parásito y de gran importancia a nivel evolutivo del que sólo se tiene conocimiento a nivel de eucariontes superiores.

7. BIBLIOGRAFÍA

Arroyo, R. 2000. Biología molecular de la trichomonosis. Genética y Biomedicina Molecular. Edit. Limusa, Noriega. Cap. 19. P.p. 287-304.

Arroyo, R., González-Robles, A., Martínez-Palomo, A. and Alderete, J.F. 1993. Signalling of *Trichomonas vaginalis* for ameboid transformation and adhesin synthesis follows cytoadherence. Mol. Microbiol. 7(2):299-309.

Baroin, A., Perasso, R., Qu, L.H., Brugerolle, G., Bachellerie, J.P. and Adoutte, A. 1988. Partial phylogeny of the unicellular eukaryotes based on rapid sequencing of a portion of 28S ribosomal RNA. Proc. Natl. Acad. Sci. 85: 3474-3478.

Beelman, C.A. and Parker, R. 1995. Degradation of mRNA in eukaryotes. Cell. 81:179-183

Chen, F., MacDonald, C.C. and Wilusz, J. 1995. Cleavage site determinants in the mammalian polyadenylation signal. Nucleic Acids Research. 23(14):2614-2620.

Colgan, D., and Manley J. 1997. Mechanism and regulation of mRNA polyadenylation. Genes & Development 11: 2755-2766.

Cotch, M.F., Patorek, J.G., Nugent R.P., Hillier, S.L., Gibbs, R.S., Martin, D.H., Eschenbach, D.A., Edelman, R., Carey, J.C., Regan, J.A., Krohn, M.A., Klebanoff, M.A., Rao, A.V. and Rhoads, G.G. 1997. *Trichomonas vaginalis* associated with low birth weight and preterm delivery. The vaginal infections and prematurity study group. Sex. Trans. Dis. 24(6):353-360.

Delgadillo María G., Liston D., Niazi K., Johnson P. 1997. Transient and selectable transformation of the parasitic protist *Trichomonas vaginalis*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA Vol. 94, pp. 4716-4720, April 1997 Microbiology

Eckner, R., Ellmeier, W. And Birnstiel, M.L. 1991. Mature mRNA 3' end formation stimulates RNA export from de nucleus. The EMBO Journal. 10(11):3513-3522.

Espinosa Norma, Hernández R., López-Griego L., Arroyo R., López-Villaseñor I. 2001. Differences between coding and non-coding regions in the *Trichomonas vaginalis* genome: an actin gene as a locus model. Acta Tropica (2001) 147-154.

Espinosa Norma, Hernández R., López-Griego L., López-Villaseñor I. 2002 Separable putative polyadenylation and cleavage motifs in *Trichomonas vaginalis* mRNAs. Gene 289 (2002) 81-86.

- Gil, A. and Proudfoot, N.J. 1987. Position-dependent sequence elements downstream of AAUAAA are required for efficient rabbit b-globin mRNA 3' end formation. *Cell*. 49:399-406.
- Gómez-Conde, E., Mena-López, R., Hernández-Jauregui, P., Gozález-Camacho, M. and Arroyo, R. 2000. *Trichomonas vaginalis*: Chromatin and mitotic spindle during mitosis. *Experimental Parasitology*. 96:130-138.
- Guo, Z. And Sherman, F. 1995. 3' end-forming signals of yeast mRNA. *Mol. Cell. Biol.* 15(11):5983-5990.
- Lahtí, C.J., D'Oliveira, C.E. and Johnson, P.J. 1992. β -Succinyl-coenzyme A synthetase from *Trichomonas vaginalis* is a soluble Hydrogenosomal protein with an amino-terminal sequence that resembles mitochondrial presequences. *Journal of Bacteriology*. 174(21):6822-6830.
- León-Félix, J., Ortega-López J., Orozco-Solís R., and Arroyo R., 2004. Two novel asparaginyl endopeptidase-like cysteine proteinases from the protist *Trichomonas vaginalis*: their evolutionary relationship within the clan CD cysteine proteinases. *Gene* 335 (2004) 25-35.
- León-Sicarios, C.R., León-Félix J., and Arroyo R. 2004. *tvcp12*: a novel *Trichomonas vaginalis* cathepsin L-like cysteine proteinase-encoding gene. *Microbiology*. (2004), 150, 1131-1138.
- Leslie, W.G.A., Moody E.C.P., and Shaw V.W. 1988. Structure of chloramphenicol acetyltransferase at 1.75- \AA resolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* Vol. 85, pp. 4133-4137, June 1988 *Biochemistry*.
- Liston, D.R. and Johnson, P.J. 1998. Gene transcription in *Trichomonas vaginalis*. *Parasitology Today*. 14 (7):261-265.
- Liston, D.R. and Johnson, P.J. 1999. Analysis of a ubiquitous promoter element in a primitive eukaryote: early evolution of the initiator element. *Molecular and cellular Biology*. 19(3):2380-2388.
- López-Camarillo, C., Orozco E., and Marchat L.A. 2005. *Entamoeba histolytica*: Comparative genomics of the pre-mRNA 3' processing machinery. *Experimental parasitology* 110 (2005) 184-190.
- Mangus, D.A., Evans, M.C. and Jacobson A. 2003. Poly (A)-binding proteins: multifunctional scaffolds for the post-transcriptional control of gene expression. *Genome Biology* 2003, 4:223.
- McCracken, S., Fong, N., Yankulov, K., Ballentyne, S., Pan, G., Greenblatt, J., Patterson, S.D., Wickens, M. and Bentley, D.L. 1997. The C-terminal domain of RNA processing to transcription. *Nature*. 385:357-361.

- Meade, J.C., Shah, P.H. and Lushbaugh, W.B. 1997. *Trichomonas vaginalis* : Analysis of Codon Usage. *Experimental Parasitology*. 87:73-74.
- Meysich, K. and Garber, G. E. 1995. *Trichomonas vaginalis*. *Current Opinion in Infectious Diseases*. 8:22-25
- Molecular Cloning a Laboratory Manual. Third Edition, Sambrook and Russell. Sambrook Joseph, Russell David W. Cold Spring Harbor Laboratory Press. United States of America.
- Müller, M. 1993. The hydrogenosome. *Journal of General Microbiology*. 139:2879-2889.
- Proudfoot, N.J. 1989. How RNA polymerase II terminates transcription in higher eukaryotes. *Trends in Biochemical Sciences*. 14:105-110.
- Proudfoot, N. 2004. New perspectives on connecting messenger RNA 3' end formation to transcription. *Current Opinion in Cell Biology* 2004, 16:272-278.
- Quon, V.K.D., Delgadillo, M.G., Khachi, A., Smale, S.T. and Jonson, P.J. 1994. Similarity between a ubiquitous promoter element in an ancient eukaryote and mammalian initiator elements. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 91:4579-4583.
- Ribeiro, K.C., Monteiro-Leal, L.H. and Benchimol, M. 2000. Contributions of the axostyle and flagella to closed mitosis in the protists *Tritrichomonas foetus* and *Trichomonas vaginalis*. *J. Eukaryot. Microbiol.* 47(5):481-492.
- Roger, A.J., Clarck, C.G., and Doolittle, W.F. 1996. A possible mitochondrial gene in the early-branching amitochondriate protist *Trichomonas vaginalis*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 93:14618-14622.
- Sarkar, N. 1997. Polyadenylation of mRNA in prokaryotes. *Annu. Rev. Biochem.* 66:173-197.
- Sheets, M.D., Ogg, S. C., and Wickens, M. P. 1990. Point mutations in AAUAAA and the poly (A) addition site: effects on the accuracy and efficiency of cleavage and polyadenylation in vitro. *Nucleic Acids Reserch*. 18 (19):5799-5805.
- Sogin, M. L. 1991. Early evolution and the origin of eukaryotes. *Current Opinion in Genetics and Development*. 1:457-463.
- Sonenberg, N., and Dever T.E. 2003. Eukaryotic translation initiation factors and regulators. *Current Opinion in Structural Biology* 2003, 13:56-63.
- Sorvillo, F. and Kerndt, P. 1998. *Trichomonas vaginalis* and amplification of HIV-1 transmission. *The Lancet*. 351:213-214.

- Vanacova S., Yan W., Carlton J., Jonson P. Spliceosomal introns in the deep-branching eukaryote *Trichomonas vaginalis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2005, 102(12):4430-4435
- Viikki, M. Pukkala, E., Nieminen, P. and Hakama M. 2000. Gynaecological infections as risk determinants of subsequent cervical neoplasia. *Acta Oncol.* 39(1):71-75.
- Wahle, E. and Keller, W. 1996. The biochemistry of polyadenylation. *TIBS.* 21:247-250.
- Wahle, E. And U. Kühn. 1997. The mechanism of 3' cleavage and polyadenylation of eukaryotic pre-mRNA. *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology.* 57: 41-71.
- Wang, A. and Wang C. 1985. Isolation and characterization of DNA from *Tritrichomonas foetus* and *Trichomonas vaginalis*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 14:323-335.
- Weiss, E.A. , Gilmartin, G.M. and Nevins, J.R. 1991. Poly(A) site efficiency reflects the stability of complex formation involving the downstream element. 10(1):215-219.
- Whitelaw, E. and Proudfoot. N. 1986. α -thalassaemia caused by a poly(A) site mutation reveals that transcriptional termination is linked to 3' end processing in the human $\alpha 2$ globin gene. *The EMBO Journal.* 5(11):2915-2922.
- Yeong-Seng, Y., Jah-Yao, L., d Men-Fang, S. 1997. Chromosome number of *Trichomonas vaginalis*. *Journal of Parasitology* 83:551-553.
- Yeong-Seng, Y., Jah-Yao, L., d Men-Fang, S. 1998. Chromosome number of *Trichomonas vaginalis*. *Journal of Parasitology* 84:28.
- Zhao, J., Hyman L., and Moore C. 1999. Formation of mRNA 3' Ends in Eukaryotes: Mechanism, Regulation, and Interrelationships with other Steps in mRNA Synthesis. *Microbiology and Molecular Biology reviews*, June 1999, p. 405-445.

8. APÉNDICES

8.1 Apéndice A

MEDIO DE CULTIVO PARA *Trichomonas vaginalis*.

MEDIO TYM (Trypticase-yeast extract-maltose).

Composición:

-Tryptona	10.0 g
-Extracto de levadura.....	5.0 g
-Maltosa.....	2.5 g
-L-cisteina.....	0.5 g
-Ácido ascórbico.....	0.1 g
-Fosfato de potasio dibásico (KH ₂ PO ₄).....	0.4 g
-Fosfato de potasio monobásico (K ₂ HPO ₄).....	0.4 g

Se disuelven los componentes en agua bidestilada, se ajusta el pH a 6.2, se afora a 500 ml y se esteriliza a 15 psi durante 15 minutos. Antes de usarse se suplementa con 10% de suero de caballo inactivado.

8.2 Apéndice B**Medio LB-agar.**

-Tryptona.....	10.0 g
-Extracto de levadura.....	5.0 g
-Cloruro de sodio.....	5.0 g
-NaOH 10M.....	0.3 ml
-Tris 1M pH 8.....	10.0 ml
-Select agar.....	15.0 g

Disolver en 800 ml de agua bidestilada, ajustar el volumen a 1 litro y esterilizar.

Medio LB líquido

-Tryptona	10 g
-Extracto de Levadura.....	5 g
-NaCl.....	5 g
-NaOH 10M.....	0.3 ml
-Tris 1M pH = 8.....	10 ml

Disolver en 800 ml de agua bidestilada, ajustar el volumen a 1 litro y esterilizar.

Medio SOB

-Tryptona.....	.2 %
-Extracto de Levadura.....	0.5 %
-Cloruro de Sodio.....	.10 mM
-Cloruro de Potasio.....	2.5 mM
-Cloruro de Magnesio.....	.10 mM
-Sulfato de Magnesio.....	10 mM

Medio SOC

- Medio SOB.....10 ml
- Glucosa 1M.....200 µl

Medio NZY +

- NaCl5 g
- MgSO₄.....2 g
- Extracto de levadura.....5 g
- Peptona de caseína.....10 g

Disolver en 700 ml de agua bidestilada, ajustar el volumen a 1 litro y esterilizar.

8.3 Apéndice C

T.E [10/0.2 mM] (Tris- EDTA)

Se debe tener una concentración final en la solución de 10 mM de Tris pH= 7.4 y 0.2 mM de EDTA.

Solución I: (100ml).

-Glucosa.....50mM

-Tris/HCl pH=8.....25mM

-EDTA pH=8.....10mM

Nota: Preparar a partir de los stocks ya estériles y ponerlo en un frasco estéril.

Solución II: (5ml)

-NaOH 0.2N

-SDS 1%

Nota: Preparar a partir de los stocks ya estériles y ponerlos en un matraz estéril.

Solución III: (100ml)

-Acetato de potasio 5M.....60ml

-Ácido acético glacial concentrado.....11.5ml

-Agua bidestilada estéril.....28.5ml

Nota: Preparar a partir de los stocks ya estériles y ponerlos en un frasco estéril.

TAE 50X

-Tris base.....121.0 g

-Ácido acético glacial28.55 ml

-EDTA 0.5 M pH=850 ml

Se ajusta el volumen a 500 ml.

TBE 5X

- Tris-HCl.....54.0 g
- Ácido bórico.....27.5 g
- EDTA 0.5 M.....20.0 ml

Disolver en 750 ml de agua bidestilada y ajustar el volumen a 1 litro, esterilizar por autoclave

PBS (Amortiguador Salino de Fosfatos). pH= 7.4

- NaCl4g
- KCl.....0.1 g
- Na₂HPO₄.....7.2 g
- KH₂PO₄.....12 g

Se afora con agua destilada a 500 ml y se ajusta el pH a 7.4

Solución Zimmerman

Para preparar 1 litro

- KH₂PO₄.....0.2040 g
- NaCl7.7100 g
- KCl0.5900 g
- Na₂HPO₄.....1.1300 g
- (CH₃COO)₂Mg0.1070 g
- (CH₃COO)₂Ca0.0142 g

Se ajusta el volumen a 1 litro y el pH= 7.4 y se esteriliza.

Solución TEN

Tris 40 mM, EDTA 1 mM, NaCl 15 mM se puede preparar a partir de los stocks con los que se cuente en el laboratorio de manera que las concentraciones citadas sean las que prevalescan en la solución final.

Stock de cloranfenicol ^3H .

Se deben seguir los lineamientos para el manejo de sustancias radiactivas.

Cloranfenicol tritiado (^3H) 0.2 $\mu\text{Ci}/\mu\text{l}$

Se toman con mucho cuidado 125 μl del vial original de cloranfenicol ^3H (250 $\mu\text{Ci}/\mu\text{l}$) y se agregan a 480 μl de etanol absoluto, además de 40 μl de cloranfenicol sin marcar (50 mg/ μl) se mezclan muy bien y se guarda a -20°C ..

Cloranfenicol 50 mg/ μl sin marcar.

Pesar 100mg de cloranfenicol y se disuelven en 2 ml de etanol al 50%, se mezclan y se guarda a -20°C .

Solución desnaturalizante (500 ml)

-NaCl.....43.83 g

-NaOH 10N.....25 ml

Solución de neutralización (500 ml)

-Tris/HCl 2M pH=7.5.....125 ml

-NaCl.....87.66 g

Solución de transferencia:

- NH_4Ac 1M

- NH_4OH1M

-NaOH.....0.02 N

Solución Denhart's

-Ficoll 400.....1%

-Polivinilpirrolidona1%

-Álbumina sérica bovina1%.

20X SSC (Sodium Chloridal Sodium Citrate)

NaCl, Citrato de sodio, pH 7.0

Disolver:

-NaCl175.3 g

-Citrato de sodio88.2 g

-H₂O800 ml

Se ajusta el pH con HCl

Solución de hibridación

-Formamida.....50% v/v

-SSC.....5X

-Tris.....50 mM pH=7.4

-Denhardt's5X

-SDS.....1%

8.4 Apéndice D

Mutación	Oligos utilizados
UAA → UAG	CATSTOP 3 [5'GGCAGGGCGGGGCGTAGGAGCTCACTTAAA3'] CATSTOP 4 [5' TTTAAGTGAGCTCCTACGCCCCGCCCTGCC3']
TAAA → GCCC	CATSTOP 13 [5'TAGGAGCTCACTGCCCAATTTTCGGTATAA3'] CATSTOP 14 [5'TTATACCGAAATTGGGGCAGTGAGCTCCTA3']
TAAA → GAAA	CATSTOP 5 [5'GCGTAGGAGCTCACTGAAACAATTTTCGGTA3'] CATSTOP 6 [5'TACCGAAATTGTTTCAGTGAGCTCCTACGC3']
TAAA → TCAA	CATSTOP 7 [5'CGTAGGAGCTCACTTCAACAATTTTCGGTAT3'] CATSTOP 8 [5'ATACCGAAATTGTTGAAGTGAGCTCCTACG3']
TAAA → TACA	CATSTOP 9 [5'GTAGGAGCTCACTTACACAATTTTCGGTATA3'] CATSTOP10 [5'TATACCGAAATTGTGTAAGTGAGCTCCTAC3']
TAAA → TAAC	CATSTOP11 [5'TAGGAGCTCACTTAACCAATTTTCGGTATAA3'] CATSTOP12 [5'TTATACCGAAATTGGTTAAGTGAGCTCCTA3']
TAAAC → TAAAG	CATSTOP15 [5'AGGAGCTCACTTAAAGAATTTTCGGTATAAT3'] CATSTOP16 [5'ATTATACCGAAATTCTTTAAGTGAGCTCCT3']

Las bases subrayadas corresponden a los cambios que se desean realizar en el DNA parental.

8.5 Apéndice E

Preparación del gel desnaturalizante para el Northern blot

Se disuelve 1 gramo de agarosa en 73 ml de agua bidestilada tratada con DEPC, se disuelve calentando a 60°C aproximadamente, se agregan 10 ml del amortiguador 10X 0.5 M MOPS y 0.01 M EDTA pH=7, 16.2 ml de formaldehído al 37%, se mezcla perfectamente y se vierte a la cámara de electroforesis para RNA, se deja solidificar durante 2 horas a temperatura ambiente.