

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

**DISECCIÓN FUNCIONAL DEL PROMOTOR DE
DNA RIBOSOMAL DE *Trypanosoma cruzi***

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTORA EN CIENCIAS PRESENTA:**

Mic. M en C. Elisa Elvira Figueroa Angulo

México, D.F. 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.

Este proyecto de investigación fue desarrollado bajo la asesoría del Dr. Roberto Hernández Fernández, en el Departamento de Biología Molecular y Biotecnología del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM. Para la realización de este trabajo se contó con la asesoría de la Dra. Imelda López Villaseñor y del Dr. Alejandro Zentella Dehesa.

AGRADECIMIENTOS

Con un profundo agradecimiento a México y a la Universidad Nacional Autónoma de México.

Al Dr. Roberto Hernández por permitirme realizar este proyecto de investigación y forjarme como investigadora.

A los miembros de mi comité tutoralk: Dra. Imelda López Villaseñor y Dr. Alejandro Zentella por sus acertados comentarios y consejos para la realización de este proyecto.

A la Dra. Ana María Cevallos por su apoyo y asesoría para la realización de este trabajo.

A los miembros del jurado de obtención de grado: Dra. María del Carmen Gómez, Dra. Laura Camarena, Dr. Roberto Coria, Dra. Susana Brom y Dr. Diego Gonzalez H.

A la Dirección General de Estudios de Posgrado de la UNAM por permitirme llevar a cabo mis estudios doctorales gracias al programa de becas para extranjeros.

A Juliana Herrera y Lorena López-Griego por el apoyo técnico para la realización de este trabajo.

A mis compañeros del laboratorio y amigos: Diana Pacheco, Julieta Peña, Rosalía Lira, Mariana Pérez, Julio Carrasco, Yayoi Segura, Pablo Hernández, Ana Lilia Torres, Guadalupe Barrera, Vanesa Fuentes.

DEDICATORIA

A mi madre y mi hermana por todo su amor y apoyo incondicional durante toda mi formación como persona y profesional. Desde la distancia siempre los he llevado en mi corazón y sus palabras me dieron la fuerza que necesité para seguir adelante.

A Oswaldo, el amor de mi vida, por apoyarme para conseguir mis metas, acompañarme en esta etapa de mi desarrollo profesional y construir conmigo un futuro.

INDICE

RESUMEN	15
ABSTRACT	16
1. INTRODUCCION	19
1.1. <i>Trypanosoma cruzi</i>	19
1.1.1. Generalidades de los Cinetoplástidos	19
1.1.2. Distribución de la enfermedad de Chagas	21
1.1.3. Vectores	22
1.1.4. Ciclo de Vida de <i>T.cruzi</i>	23
1.1.5. Linajes genéticos de <i>T.cruzi</i>	26
1.1.6. Biología de los Tripanosomátidos	27
1.1.6.1. Aspectos Celulares	27
1.1.6.2. Aspectos Moleculares	28
1.1.6.2.1. Organización genómica	28
1.1.6.2.2. DNA del cinetoplasto: Edición de RNAm mitocondrial	31
1.1.6.2.3. Transcripción policistrónica de genes nucleares, Transplicing y poliadenilación	32
1.1.6.2.4. RNAs polimerasas	35
1.1.6.2.5. Transcripción de los genes codificadores de las Proteínas por la RNA polimerasa I	37
1.1.6.2.6. Organización genómica del DNAr	38
1.2. Promotores Ribosomales en Eucariontes Superiores	41
2. ANTECEDENTES	48
3. OBJETIVOS	53
4. MATERIALES Y MÉTODOS	55
4.1 Parásitos	55
4.1.1 Cultivos de parásitos	55
4.1.2 Curvas de Crecimiento	55
4.2. Construcciones plasmídicas con diferentes versiones Moleculares del promotor y del vector de co-transfección	56
4.2.1. Digestiones	56
4.2.2. Amplificación por PCR de fragmentos de interés	56
4.2.3. Purificación de fragmentos de interés	57

4.2.4.	Clonación de productos de PCR en el vector pCR-Blunt II-TOPO	58
4.2.5.	Ligaciones	58
4.2.6.	Preparación de células competentes por Cloruro de Calcio	60
4.2.7.	Preparación de células electrocompetentes	60
4.2.8.	Transformaciones en <i>E.coli</i> JM109 por choque Térmico	61
4.2.9.	Electrotransformación de <i>E.coli</i> JM109	62
4.2.10.	Preparación de DNA a pequeña escala (minipreparaciones)	62
4.2.11.	Preparación de DNA a mediana escala (midipreparaciones)	63
4.2.12.	Construcciones plasmídicas	64
4.2.13.	Construcción del plásmido de co-transfección pRIBO16- <i>luc</i>	67
4.2.14.	Caracterización de insertos (Ensayos de restricción y secuenciación)	68
4.3	Construcción de los plásmidos mutantes en la región del <i>tsp</i> distal	68
4.4	Transfecciones de <i>T.cruzi</i> por electroporación	71
4.5	Ensayos CAT	72
4.5.1	Mediciones de la actividad enzimática y estandarización de las condiciones	72
4.6	Ensayos de luciferasa	74
5.	RESULTADOS	76
5.1	Establecimiento del sistema de estudio	76
5.2	Establecimiento de las condiciones de linealidad en el ensayo enzimático	76
5.3.	Construcción y análisis de los plásmidos recombinantes con las diferentes versiones del promotor de DNAr	81
5.3.1.	Dependencia de la polaridad y funcionalidad del sitio de inicio de la transcripción proximal	81
5.3.2.	Funcionalidad del sitio de inicio de la transcripción distal	83

5.3.3.	Análisis del elemento repetido de 172 pb	87
5.3.4.	Identificación del dominio corriente arriba	87
5.3.5.	Búsqueda de la región mínima con actividad promotora	89
5.4.	Plásmido de co-transfección pRIBO16- <i>luc</i>	92
5.5.	Análisis de los diferentes dominios del promotor en diferentes cepas de <i>T.cruzi</i>	94
5.6.	Análisis del sitio de inicio de la transcripción	101
5.7.	Análisis del promotor de DNAr en clonas genómicas	104
6.	DISCUSION DE RESULTADOS	113
6.1	Establecimiento de las condiciones de estudio	113
6.2	El promotor de DNAr de <i>T.cruzi</i> presenta elementos reguladores de la transcripción	114
6.3	Dominios reguladores del promotor de DNAr están conservados en las diferentes cepas de <i>T.cruzi</i>	123
6.4	Análisis fino de la región del sitio de inicio de la transcripción	124
6.5	Polimorfismo del promotor de DNAr de <i>T.cruzi</i>	124
7.	CONCLUSIONES	128
8.	BIBLIOGRAFIA	131
9.	ANEXOS	143

FIGURAS

- Figura 1 Mapa de distribución geográfica de la enfermedad de Chagas.
- Figura 2 Distribución geográfica de las especies más frecuentes de triatómicos, vectores de *T.cruzi*.
- Figura 3 Estadios y ciclo de vida de *T.cruzi*.
- Figura 4 Expresión de RNAm en tripanosomátidos.
- Figura 5 Organización genómica de la unidad principal de transcripción de los genes de DNAr.
- Figura 6 Comparación de la región intergénica del DNAr de diferentes especies eucarióticas.
- Figura 7 Formación del complejo de iniciación de la transcripción por la RNA polimerasa I.
- Figura 8 Secuencia nucleotídica de DNAr clonada en los vectores de expresión pRIBOTEX y pRIBOTEX-*cat*.
- Figura 9 Mapa de restricción y elementos génicos de los plásmidos pTEX, pRIBOTEX y pRIBOTEX-*cat*.
- Figura 10 Plásmido de expresión pRIBO4-*cat*.
- Figura 11 Curva de actividad enzimática de los datos presentados en la Tabla 4
- Figura 12 Determinación de la actividad enzimática de CAT a diferentes tiempos y concentraciones proteicas de extractos de parásitos *T.cruzi* transfectados con pRIBO4-*cat*.
- Figura 13 Dependencia de la polaridad y funcionalidad del sitio de inicio de la Transcripción proximal.
- Figura 14 Funcionalidad del sitio de inicio de transcripción distal.
- Figura 15 Alineamiento de las secuencias del promotor de DNAr con sitios de inicio de transcripción ubicados experimentalmente.
- Figura 16 Análisis del elemento repetido de 172 pb.

- Figura 17 Identificación del dominio de activación corriente arriba.
- Figura 18 Búsqueda de la región mínima con actividad promotora e identificación de la secuencia capaz de disminuir la actividad promotora.
- Figura 19 Plásmido pRIBO16-*luc*.
- Figura 20 Comparación de las secuencias del promotor de DNAr en las diferentes cepas de *T.cruzi*.
- Figura 21 Análisis del cambio de 6 pb en el sitio de inicio de la transcripción del promotor de DNAr de *T.cruzi*.
- Figura 22 Análisis por mutagénesis de la región alrededor del sitio de inicio de la transcripción.
- Figura 23 Organización genómica de los “contigs” con el promotor de genes de DNAr de *T.cruzi*.
- Figura 24 Comparación de las copias del elemento repetido de 172 pb del contig 6453.
- Figura 25 Comparación de las secuencias promotoras de DNAr en los diferentes “contigs”.
- Figura 26 Comparación de la organización estructural de los promotores de DNAr en los diferentes Cinetoplástidos.

TABLAS

- Tabla 1 Anotaciones del genoma de *T.cruzi*.
- Tabla 2 Secuencias de oligonucleótidos usados para amplificar diferentes fragmentos de la región promotora.
- Tabla 3 Secuencia de oligonucleótidos usados para realizar la mutagénesis dirigida de la región del sitio de inicio de transcripción.
- Tabla 4 Actividad enzimática de CAT en 10 µg de extracto celular de parásitos *T.cruzi* transfectados con pRIBO4-*cat*.
- Tabla 5 Cuentas por minutos promedio de dos réplicas de ensayo CAT para diferentes concentraciones de extracto proteico de parásitos transfectados con pRIBO4-*cat* a diferentes tiempos.
- Tabla 6 Porcentaje de similitud de los diferentes dominios reguladores en cepas pertenecientes a los dos grupos de *T.cruzi*, con respecto a la cepa La Cruz Jalisco.
- Tabla 7 “Contigs” con el promotor de genes de DNAr de *T.cruzi*.
- Tabla 8 Resumen de la información sobre los promotores de RNAr, sus elementos y dominios reguladores de la transcripción.

ABREVIATURAS

Amp	Gen de resistencia a ampicilina
BSA	Albúmina Sérica Bovina
CAT	Cloranfenicol acetil transferasa
cpm	Cuentas por minuto
CORE	Dominio central del promotor
CTD	Dominio C-terminal
DO	Densidad óptica
DNA	Acido Desoxiribonucleico
DNAk	DNA del cinetoplasto
DNAr	DNA ribosomal
dNTPs	Deoxinucleótidos
DRE	Dominio de activación corriente abajo
EDTA	Dietiletanolamina
ER	Elemento repetido
GAPDH	Gliceraldehido fosfato deshidrogenasa
kb	kilobases
kDa	kilodaltones
LIT	Liver Infusión triptose
LB	Luria-Broth
LUC	Luciferasa
Mb	Megabases
<i>neo</i>	Gen de resistencia a geneticina
PARP	Proteínas repetitivas de ácido procíclico
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PFGE	Geles de electroforesis de campo pulsado
R	Secuencia capaz de disminuir la actividad promotora
RAPD	Amplificación al azar de DNA polimórfico
RNA	Acido Ribonucleico
RNAr	RNA ribosomal
RNAg	RNA guía
RNAm	RNA mensajero
RNAmed	RNA derivado del miniexón

RNA pol I	RNA polimerasa tipo I
RNA pol II	RNA polimerasa tipo II
RNA pol III	RNA polimerasa tipo III
RNAr	RNA ribosomal
RNAt	RNA de transferencia
rpm	Revoluciones por minuto
SDS	Dodecil sulfato de sodio
SL	“spliced leader” o miniexón
SL1	Factor de selectividad 1
snRNA	RNA nuclear pequeño
snoRNA	RNA nucleolar pequeño
TAF	Factor asociado a la TBP
TBP	Proteína de unión a caja TATA
TE	Tris EDTA
TEN	Tris EDTA NaCl
TM	Temperatura de anillaje
tsp	Sitio de inicio de la transcripción
TTFI	Factor de terminación de la transcripción I
TUTasa	Uridil transferasa Terminal
U	Unidad
UBF	Factor de unión corriente arriba
UCE	Dominio de activación corriente arriba
VSG	Glicoproteínas variables de superficie

RESUMEN

Trypanosoma cruzi es el agente causal de la enfermedad de Chagas en el continente americano. Este trabajo se enfocó al análisis del promotor génico que codifica para la unidad fundamental de transcripción RNA ribosomal de *T.cruzi*. Describimos las condiciones experimentales que generaron un sistema cuantitativo para medir la actividad promotora usando el promotor ribosomal fusionado al gen reportero cloranfenicol acetil transferasa. Se analizó por medio de delecciones, de un fragmento de 806 pb con actividad promotora que contiene una copia de un elemento repetido de 172 pb y dos posibles sitios de inicio de la transcripción (distal y proximal). Los datos sugieren que el elemento repetido es capaz de activar la transcripción en un 20% y que el sitio de inicio de la transcripción distal es el principal contribuyente de la actividad promotora. Se estableció la presencia de varios elementos reguladores: un dominio central del promotor y un dominio corriente arriba que activan la transcripción, una secuencia con capacidad de disminuir la actividad promotora y un elemento regulador corriente abajo. También se analizó la contribución individual de siete nucleótidos alrededor del sitio de inicio de la transcripción y encontramos que cada uno de estos contribuye entre un 10 y un 40% a la actividad promotora. Estos resultados indican que la organización del promotor es similar a la encontrada en eucariontes superiores, sugiriendo que este tipo de organización surgió temprano durante la evolución de los eucariontes. El análisis genómico in silico de diferentes copias de la unidad fundamental de la transcripción de los genes de RNA ribosomal reportadas en el proyecto genoma de *T. cruzi* mostró que existe conservación en secuencia y distancias de los potenciales elementos reguladores descritos en este trabajo.

ABSTRACT

Trypanosoma cruzi is the causal agent of Chagas disease in America. This research work focused on the analysis of the gene promoter that mediates the transcription of the *T. cruzi* ribosomal RNA precursor transcript. We describe the experimental conditions that result in a quantitative system to measure promoter activity using the ribosomal promoter fused to the cloramphenicol acetyl transferase gene as a reporter. Deletions of a fragment of 806 pb with promoter activity containing one copy of the 172 pb repeated element and two putative transcription start points (distal and proximal) were analyzed. The data suggest that the repeated element is capable of activating the transcription by 20% and that the distal transcription start point is the main contributor to the observed promoter activity. The presence of the following regulatory elements was demonstrated: a promoter central domain and an upstream domain as upregulating elements, a downregulating promoter activity sequence and a downstream regulating element. The individual contribution of seven nucleotides around the distal transcription start point to the overall promoter activity was found to be between 10% to 40%. These results indicate the promoter organization is similar to the organization found in superior eukaryotes, suggesting that this kind of organization emerged early during eukaryotic evolution. The in silico genomic analysis of different copies of the main transcription unit of ribosomal RNA genes reported in the *T. cruzi* genome project showed that there is sequence and distance conservation among the putative regulatory elements described in this work.

1. INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

1.1. *Trypanosoma cruzi*

1.1.1 Generalidades de los Cinetoplastidos

Los Cinetoplástidos son parásitos protozoarios flagelados que se caracterizan por la presencia de un organelo único característico de este orden, el cinetoplasto. Este organelo se localiza en la base del flagelo y contiene una intrincada red de moléculas circulares de DNA mitocondrial. Honingberg en 1963 subdividió este orden en tres familias: Trypanosomatidae, Bodonidae y Cryptobiidae (Stevens J.R. et al., 2001). Estos organismos pueden ser de vida libre, encontrarse en medios ambientes acuáticos (ej. *Bodo spp.*), como endo y ectoparásitos (ej. *Trypanoplasma spp.* y *Ichtyobodo spp.*), parásitos de invertebrados (ej. *Cryptobia spp.*, *Crithidia spp.*), nemátodos (*Leptomonas spp.*), plantas (*Phytomonas spp.*) o vertebrados (*Trypanosoma spp.*, *Leishmania spp.*). Pueden tener ciclos de vida mono o digenéticos (que incluye invertebrados hematófagos). Estos se caracterizan por una sucesión de diferentes formas adaptadas a medios ambientes diversos, alternando estadios de crecimiento y no crecimiento, infectivos y no infectivos. A pesar de estas diferencias se ha sugerido que estos organismos provienen de un ancestro de vida libre común (Wright A.D.G. et al., 1999). Los análisis basados en la comparación de secuencias de los genes de la subunidad pequeña del RNA ribosomal (RNAr) (Sogin M.L. et al., 1986) y de los genes codificadores para enzimas glicolíticas (Michels P.A. et al., 1994), indican que los cinetoplastidos, divergieron temprano del linaje eucarióntico después de la adquisición de la mitocondria.

Organismos de la familia Trypanosomatidae, que incluyen los géneros *Trypanosoma*, *Leishmania*, y *Crithidia* entre otros, pueden causar enfermedades en sus hospederos vertebrados por lo cual son de importancia médica y

económica. Los tripanosomas de la especie *T. brucei*, están restringidos al continente Africano y son el agente causal de la enfermedad del sueño en humanos y la enfermedad de Nagana en el ganado. En el continente Americano, los tripanosomas de la especie *T. cruzi* causan la enfermedad de Chagas. Las especies del género *Leishmania* producen la enfermedad conocida como leishmaniasis que afecta a regiones tropicales y subtropicales del mundo.

El estudio de estos organismos ha permitido la descripción de fenómenos atípicos en cuanto a su biología como son: 1) los rearrreglos génicos asociados a la variación de antígenos de superficie descrita para las especies africanas de tripanosomas (Texeira S.M.R. et al., 1998), 2) la existencia de organelos peculiares como son los glicosomas en los cuales se concentran enzimas e intermediarios de la glicólisis (Texeira S.M.R. et al., 1998), 3) La transcripción policistrónica de genes codificadores de proteínas (Texeira S.M.R. et al., 1998), 4) el procesamiento atípico de los transcritos policistrónicos por un proceso llamado “trans-splicing”. Por este mecanismo un transcrito primario policistrónico se corta con la adición a cada uno de los genes de una secuencia líder de 39 nucleótidos con el “cap” en el extremo 5´ (Agabian N. 1990). Evidencia actual sugiere que el proceso de adición de la secuencia líder o miniexón se encuentra acoplada a la poliadenilación del mensajero del gen que lo antecede (LeBowitz J.H. et al., 1993). 5) Finalmente, se menciona la edición post-transcripcional del RNA mensajero (RNAm) mitocondrial. Este evento molecular es un procesamiento que adiciona o remueve residuos de uridina internos a un precursor de RNAm mitocondrial (Benne R. et al., 1994; Stuart K. et al., 1995). La adición o remoción de uridinas genera codones de inicio o término de la traducción así como cambios en el marco de lectura (Frasch A.C. et al., 1997). El origen de este mecanismo no se conoce pero dado que ocurre en la mitocondria y tomando en cuenta la divergencia evolutiva temprana de los tripanosomátidos, podría suponerse que tienen un origen evolutivo temprano (Stuart K. et al., 1995).

1.1.2. Distribución de la enfermedad de Chagas

La enfermedad de Chagas o Tripanosomiasis americana, llamada así en honor al médico brasileño Carlos Chagas quien la describió en 1909, existe solamente en el continente americano. Ésta es causada por *Trypanosoma cruzi*, un protozoo transmitido a humanos por insectos de la familia *Reduviidae*. La distribución geográfica de la infección por este parásito se extiende desde México hasta el sur de la Argentina. Según datos de la Organización Mundial de la Salud, la enfermedad afecta entre 16 y 18 millones de personas y cerca de 100 millones, aproximadamente el 25 % de la población latinoamericana, están en riesgo de contraer la enfermedad (Fig. 1).

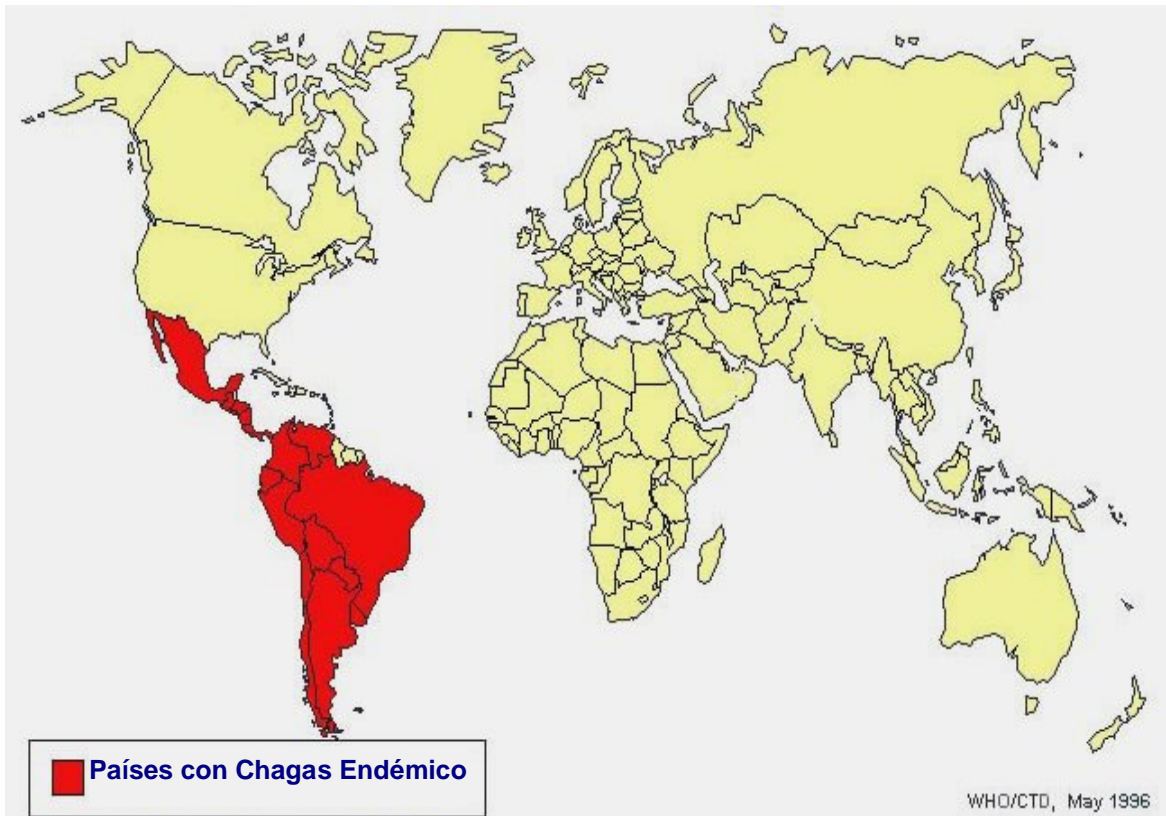


Figura 1. Mapa de distribución de la enfermedad de Chagas. Tomado de www.who.int/ctd/chagas.

1.1.3. Vectores

La tripanosomiasis americana es transmitida por insectos hematófagos de la familia Reduviidae, subfamilia Triatominae. Más de 110 especies de insectos hemípteros de esta familia fungen como vectores transmisores de esta enfermedad. Entre ellos se citan a: *Triatoma infestans*, *Triatoma dimidiata*, *Rhodnius prolixus* y *Parastrongilus megistus* (Fig. 2).

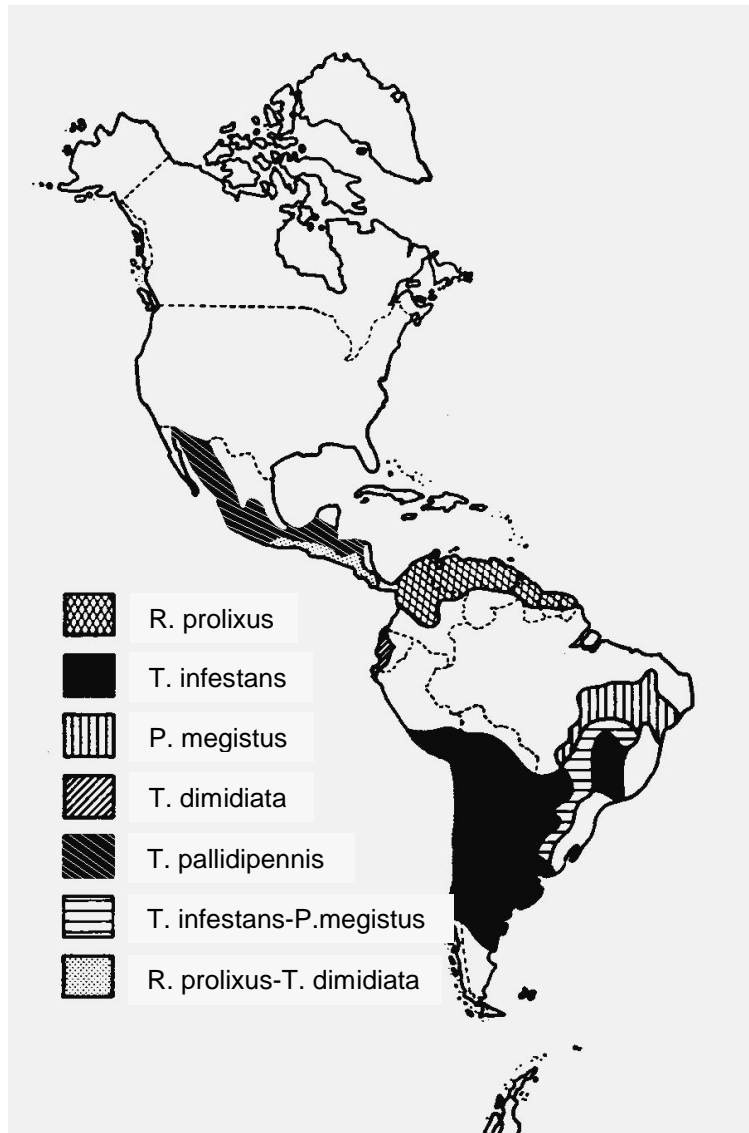


Figura 2. Distribución de las especies más frecuentes de triatóminos, vectores de *T. cruzi*, en América latina. Tomado de Durante E. y González S. 1994.

Estos hemípteros también son conocidos popularmente con diferentes nombres como vinchucas, chinches voladoras o pitos. Son insectos alados o ápteros, dependiendo de su estadio de vida. Tienen un aparato bucal suctopírador, con patas caminadoras, son ovíparos y su metamorfosis es incompleta y gradual. La mayoría de los hemípteros son fitófagos, sin embargo, esta familia agrupa dos tipos de insectos: uno predador que se alimenta de insectos y un segundo grupo estrictamente hematófago. La toma de sangre de huéspedes móviles está asociada con la evolución fisiológica y morfológica que permite la ubicación precisa del huésped y la rápida alimentación nocturna y ocasional; para lo que poseen termorreceptores eficientes (Durante E. et al., 1994). Son de hábitat selvático pero, debido a la invasión del hombre a los ecosistemas, estos se han adaptado a los ambientes peridomésticos, es decir en convivencia con los humanos, facilitando así la transmisión.

1.1.4. Ciclo de Vida de *T.cruzi*

Durante su ciclo biológico, *T.cruzi* presenta tres estadios de desarrollo que son identificables por microscopía de luz en preparaciones teñidas con Giemsa: epimastigotes, amastigotes y tripomastigotes (Figura 3A). La definición de estos estadios se basa en la forma general de la célula, la posición del cinetoplasto en relación al núcleo y la posición de la que emerge el flagelo de la bolsa flagelar (Pereira M.E.A.1990).

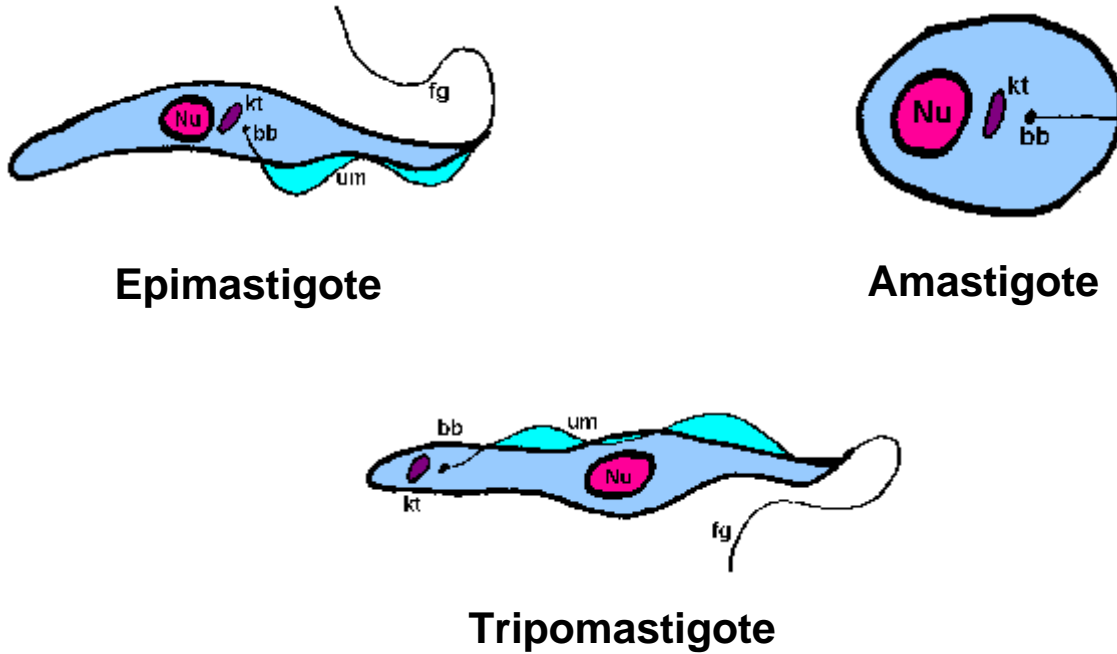
Los epimastigotes son formas flageladas alargadas entre 20 y 40 μm de largo, se establecen y replican extracelularmente en el intestino del vector. En este estadio el cinetoplasto se localiza anterior al núcleo. Los amastigotes, son células redondeadas con un flagelo corto y constituyen el estadio replicativo intracelular en el hospedero vertebrado. El tripomastigote es un estadio celular capaz de infectar a los mamíferos. Es una forma flagelada, delgada y alargada, con una longitud aproximada de 30 μm y 2 μm de diámetro. Se puede encontrar

en el intestino distal y el recto del insecto (tripomastigote metacíclico) y en la sangre del mamífero infectado (tripomastigote sanguíneo).

El vector se infecta con la ingesta de sangre de personas o mamíferos infectados con tripomastigotes sanguíneos circulantes. Estas formas sufren transformaciones a lo largo del tubo digestivo del vector, pasando de epimastigotes (replicativos) a tripomastigotes metacíclicos (no replicativos) que son las formas infectantes. Los parásitos salen de las deyecciones del vector y se introducen al organismo a través del orificio de la picadura, heridas o escoriaciones de la piel o atravesando la mucosa ocular, nasal o bucal (Botero D. et al., 1992). Al entrar estos últimos al organismo, son fagocitados por los macrófagos, iniciando así su ciclo intracelular que dura entre 4 y 5 días. Son englobados en el fagosoma, de donde se escapan para dirigirse al citoplasma y allí convertirse en amastigotes, multiplicándose por fisión binaria. De este proceso se generan aproximadamente 500 parásitos (Vickerman K. 1985; Burleigh B.A. et al., 1995). Los amastigotes se diferencian luego a tripomastigotes, las células se lisan y se liberan a la circulación sanguínea y linfática. Los tripomastigotes infectan nuevas células del huésped (tejido muscular y nervioso principalmente) transformándose de nuevo en amastigotes, continuando así el ciclo celular (Botero D. et al., 1992; Burleigh B.A. et al., 1995) (Fig. 3B).

En etapas crónicas del padecimiento (10 a 20 años después de la infección), éste parásito puede producir lesiones en el corazón y tubo digestivo, liberación de antígenos y sustancias tóxicas y producción de auto-anticuerpos. Estas manifestaciones clínicas pueden causar la muerte de la persona infectada (Botero D. et al., 1992).

A



B

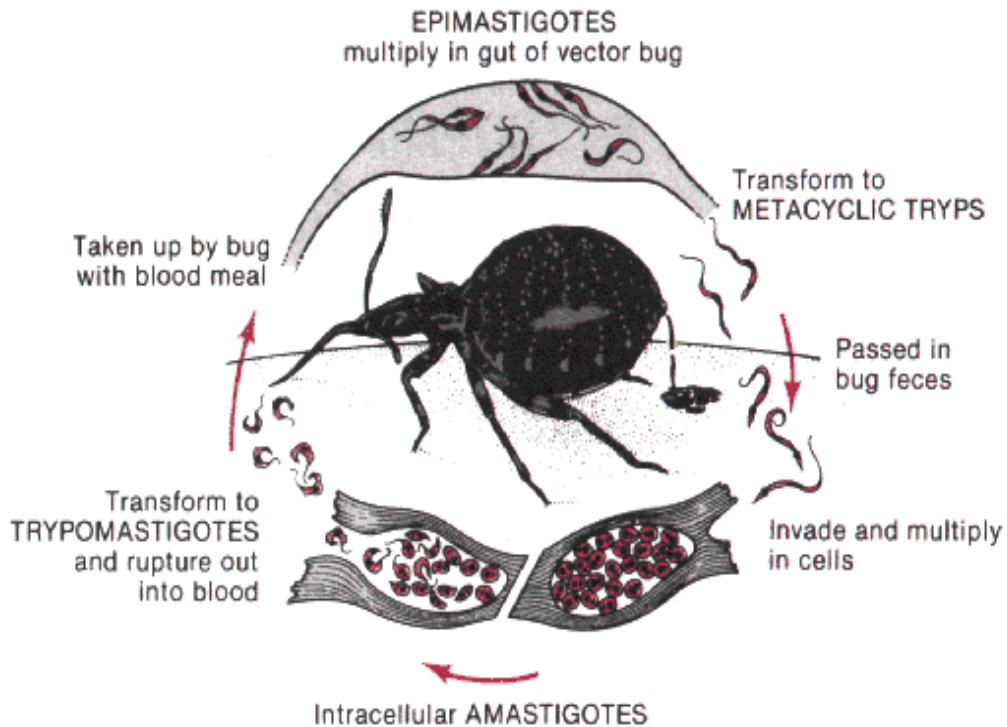


Figura 3. Estadios y Ciclo de vida de *T. cruzi*. A. Formas identificadas para *T. cruzi*: epimastigotes, amastigotes y tripomastigotes. bb: Bolsillo flagelar ,fg: flagelo, kt: cinetoplasto, Nu: núcleo, B. Ciclo de vida de *T. cruzi* Tomado de <http://www.digitus.com.br/~plinio/chagas.html>

1.1.5. Linajes en *T.cruzi*

La enfermedad de Chagas es compleja ya que se presenta con diferentes manifestaciones clínicas. Éstas van desde una carencia de síntomas reconocibles hasta cardiomiopatías severas (o letales), megaesófago o megacolon. No se ha entendido bien la etiología de esta variabilidad clínica, pero es posible en ella participen parcialmente características particulares del aislado infectante. De hecho, distintas cepas de *T.cruzi* presentan diferencias en cuanto a su virulencia y patogenicidad en modelos animales.

Estudios iniciales en las poblaciones genéticas de *T.cruzi*, han revelado variabilidad entre los diferentes aislados. Inicialmente, los aislados se agruparon en tres zimodemas, Z1, Z2, Z3, basados en patrones de isoenzimas (Miles M.A. et al., 1978, 1980). Análisis posteriores de 15 loci genéticos revelaron una mayor heterogeneidad estableciendo 121 aislados de *T.cruzi* en 43 zimodemas, lo cual no permitía agrupar los aislados en pocos grupos naturales (Tibayrenc M. et al., 1988). Análisis independientes basados en los perfiles de restricción del DNA del cinetoplasto (DNA_k) generaron agrupamientos llamados schizodemas (Morel C. et al., 1980), peptidemas basados a su vez en patrones electroforéticos de sus proteínas (Ebert F. et al., 1978) o rapidemas basados en RAPD-PCR (Tibayrenc M. 1995). Este último permitió la agrupación de las cepas de *T.cruzi* en dos linajes mayores (linajes 1 y 2). La amplificación por PCR de las secuencias del gen de RNAr 24S α y del miniexón indicaron de igual manera un claro dimorfismo en los aislados de *T.cruzi*. Este dimorfismo permitió la definición de dos linajes principales que correlacionan con los zimodemas I y II (Souto R.P. et al.; 1996; Nunes L.R. et al.; 1997). Para armonizar el agrupamiento de las cepas de *T.cruzi* se definieron dos grupos : T.cruzi I que correspondía al linaje 2 y zimodema 1 y el grupo T.cruzi II que correspondía al linaje 1 e incluía a los zimodemas Z2 y Z3 (Anónimo, 1999). Posteriormente el análisis de 22 loci de isoenzimas y una caracterización por RAPDs de un conjunto de 434 aislados de *T.cruzi* de diferentes zonas geográficas y orígenes

ecológicos representativos de los dos grupos, permitió la identificación de 5 subdivisiones dentro del grupo *T.cruzi* II (IIa-IIe) (Brisse S. et al., 2000). La comunidad científica que analiza la clasificación de este parásito considera que *T.cruzi* debe agruparse en una sola especie.

1.1.6. Biología de los Tripanosomátidos

Además del interés médico que representan estos organismos, presentan características diferentes a las encontradas en eucariontes superiores, lo que ha motivado estudios sobre su biología. A continuación se describirán brevemente algunos aspectos sobresalientes.

1.1.6.1. Aspectos celulares

Existen varios aspectos básicos interesantes en la biología de los tripanosomátidos como son : a) un citoesqueleto constituido principalmente por microtúbulos sub-peliculares, b) Un flagelo unido al cuerpo del protozoo a través de uniones especializadas; c) una mitocondría-cinetoplasto compleja; y d) la presencia de glicosomas y acidocalcisomas importantes para el metabolismo celular .

La superficie celular de los tripanosomátidos está compuesta por dos componentes principales: la membrana plasmática y una red sub pelicular de microtúbulos. Esta última se localiza debajo de la membrana plasmática y esta conectada a esta y entre ellos por filamentos cortos de naturaleza desconocida. Esta asociación parece ser la responsable de la rigidez de la célula (De Souza W. 2002).

Todos los miembros de la familia Trypanosomatidae presentan un flagelo que emerge de una invaginación conocida como bolsillo flagelar. La longitud de este varía de acuerdo al estadio de desarrollo. Presenta una estructura similar a la encontrada en otros flagelos, mostrando un patrón de microtúbulos 9+2.

Los glicosomas por su parte son estructuras citoplasmáticas unidas a membrana que se encuentran distribuidas a través de la célula. En estos se encuentran enzimas glicolíticas e intermediarios de la glicólisis los cuales están involucrados en la conversión de la glucosa a 3-fosfoglicerato. Estos organelos no presentan genoma y todas las enzimas encontradas en ellos están codificadas en genes nucleares, traducidas en los ribosomas e importadas post-traduccionalmente a este organelo (De Souza W. 2002).

1.1.6.2. Aspectos moleculares

1.1.6.2.1. Organización genómica

Como todos los organismos mitocondriados, los tripanosomátidos tienen dos genomas, el nuclear y el mitocondrial. Este último llamado cinetoplasto destaca por su abundancia ya que dependiendo de la especie, contiene del 10 al 20 % del DNA total celular. En cuanto al genoma nuclear, los cromosomas no se condensan durante la mitosis y pueden ser separados en geles de electroforesis de campo pulsado (PFGE) (Van der Ploeg L.H.T. et al., 1984). Los cromosomas se dividen en tres subclases de acuerdo a la movilidad en PFGE: mini, intermedios y megacromosomas (Van der Ploeg L.H.T. et al., 1984; Ersfeld K. et al., 1999).

El genoma de *T.brucei* contiene aproximadamente 100 minicromosomas y su tamaño varía entre 50 y 150 kilobases (kb). Son lineales y presentan repeticiones teloméricas típicas eucarióticas que son también encontradas en

las otras subclases de cromosomas. En el caso de *T.brucei*, muchos de estos minicromosomas contienen copias silenciosas de las glicoproteínas variables de superficie (VSG) y son regiones altamente susceptibles a la recombinación. Los cromosomas intermedios, con movilidades electroforéticas entre las otras dos subclases de cromosomas y también parecen ser reservorios de VSGs. Los megacromosomas presentan tamaños entre 1 y 6 Megabases (Mb) y se encuentran genes activos como por ejemplo el locus de tubulina (Van der Ploeg L.H.T. et al., 1984; Ersfeld K. et al., 1999).

La reciente secuenciación y ensamblaje del genoma de *T.cruzi* se realizó en la cepa CL Brener un miembro del subgrupo IIe. Datos de varios laboratorios son consistentes con la naturaleza híbrida de esta cepa; con haplotipos de los subgrupos IIb y IIC (el cual aparentemente es un derivado del grupo *T.cruzi* I) (Brisse S. et al., 2000 y 2003; Machado C.A. et al., 2001). Se pudo determinar que el tamaño del genoma diploide de este organismo entre 106.4 y 110.7 Mb y el porcentaje de G+C es del 51% (El-Sabed N.M. et al., 2005) (Tabla 1). Anteriormente el tamaño se había estimado en 87 Mb, basado en análisis densitométrico de cromosomas separados en geles de campo pulsado (Cano M.I. et al., 1995; Swindle J. et al., 1996).

El estudio de esta secuencia genómica permitió determinar que el genoma de *T.cruzi* cepa CL Brener posee aproximadamente 12,000 genes. El análisis automatizado de 4,008 “contigs” predijo inicialmente 25,013 genes codificadores de proteínas en el genoma diploide. Un refinamiento manual de estos resultados permitió obtener un valor de 22,570 genes, de los cuales 6159 representan alelos presentes en el haplotipo IIb, 6043 a otros haplotipos y 10,368 representan secuencias que no pueden ser asignadas a un haplotipo en particular. En cuanto a los genes de RNA se han encontrado muchas unidades repetidas de RNAr, RNA del ““spliced leader”” y RNA nucleolares pequeños (Tabla 1).

Parámetro	Número
El genoma	
Tamaño (pb)	60,372,297
Contenido de G+C (%)	51
Secuencias "Contig"	4,008
Porcentaje codificado	58.9
Genes codificadores de proteínas	
Número de genes	22,570
Estimado del número de genes por genoma haploide	~12,000
Pseudogenes	3,590
Porcentaje de G+C (%)	53.4
Densidad de genes (genes por Mb)	385
Regiones Intergénicas	
Media de longitud (pb)	1,024
Contenido de G+C (%)	47
Genes de RNA	
RNA _t	115
RNA _r	219
"spliced leader" RNA	192
SnRNA	19
SnoRNA	1447
SrpRNA	2

Tabla 1. Anotaciones del genoma nuclear de *T.cruzi*. Tomado parcialmente de El-Sayed N.M. y col. (2005).

1.1.6.2.2. DNA del cinetoplasto : Edición de RNA mensajero mitocondrial

El DNA presente en el cinetoplasto, es una porción de material genético extracelular que puede constituir hasta el 20% del DNA total celular. Se encuentra formando una red de moléculas circulares concatenadas de dos diferentes tamaños, llamadas minicírculos y maxicírculos. Los primeros, forman la mayor parte de la estructura y se encuentran entre 5,000 y 10,000 moléculas por célula con un tamaño aproximado entre 0.5 y 2.5 kb. Codifican para RNAs pequeños que participan como guías en el procesamiento y edición de los RNA mensajeros (RNAm) mitocondriales. En cuanto a los maxicírculos, hay entre 25 y 50 copias por célula, su tamaño oscila entre 20 y 40 kb y codifican para RNAs ribosomales (RNAr), RNAs de transferencia (RNAt) y para enzimas mitocondriales (Pereira M.E.A.1990).

La edición de RNAm mitocondriales representa uno de los procesos moleculares atípicos presentes en los miembros de la familia Trypanosomatidae (Benne R. et al., 1986). Mediante este mecanismo, los precursores de los RNAm de la mitocondria sufren la adición y en menor medida, la remoción de residuos de uridina, lo cual conduce a la formación o extensión de marcos de lectura abiertos. Por medio de este tipo de edición se generan más del 50% de las secuencias codificadoras de una proteína (Feagin J.E. et al., 1988).

El mecanismo por medio del cual se lleva a cabo la edición no ha sido totalmente elucidado. Sin embargo, se sabe que la secuencia complementaria en este proceso se encuentra en moléculas de RNA pequeñas, de 55 a 70 nucleótidos de largo, llamadas RNA guías (RNAg) (Blue B. et al., 1990). Los RNAg, codificados tanto en los minicírculos como en los maxicírculos, poseen una secuencia de 4-18 nucleótidos (secuencia de anclaje) que presenta complementariedad con el transcrito precursor. Dicha secuencia está involucrada en el reconocimiento inicial entre el pre-RNAm y el RNAg. Además, los RNAg tienen una secuencia complementaria a una parte del RNAm editado y

se ha demostrado que esta parte del RNAg sirve como molde para la edición del pre-RNA_m (Benne R. 1994).

La maquinaria proteica involucrada en la edición del RNA_m mitocondrial está siendo elucidada gracias al desarrollo de reacciones de edición *in vitro*. El proceso de edición se inicia por la formación de un duplex corto de 10 a 15 pares de bases (pb) entre el RNAg y su RNA_m. Posteriormente endonucleasas de edición sitio específicas reconocen el duplex de anclaje RNA_m/RNAg y corta en el extremo 3' del RNA_m, en el primer nucleótido no apareado. En este momento se lleva a cabo la adición o remoción de residuos de uridina que involucra la actividad enzimática de las enzimas TUTasa (uridil-transferasa terminal) o una 3' U exonucleasa específica respectivamente. El último paso involucra la enzima RNA ligasa capaz de unir las partes de los RNA_m (Schnauffer A. et al., 2003). El resultado de este proceso es la transferencia de información del RNAg al RNA_m generando una maduración de este último (Madison-Antenucci S. et al., 2002).

1.1.6.2.3. Transcripción policistrónica de genes nucleares, transplicing y poliadenilación.

Los genes que codifican para proteínas en tripanosomátidos, carecen de intrones y están mayoritariamente organizados con la misma polaridad, en grupos densos que contienen repeticiones en “tandem” del mismo gen (o similares), o de genes no relacionados (Imboden M.A. et al., 1987; Johnson P. et al., 1987; Tschudi C. et al., 1988; Bãñame L. et al., 1995; Stiles J.K. et al., 1999). Proteínas altamente expresadas como son la α y β tubulinas, proteínas de choque térmico, proteasas, transportadores, proteínas flagelares y antígenos de superficie están presentes en copias múltiples, usualmente organizadas en repeticiones directas. Se ha sugerido que este tipo de organización puede funcionar como un mecanismo que permite incrementar la abundancia de los transcritos de aquellas proteínas que son altamente expresadas (Stiles J.K. et

al., 1999). Hay sin embargo genes de copia única (o duplicados) que también expresan su propio RNAm de una manera robusta (ej. proteína ribosomal S4).

Las regiones codificadoras en las unidades de transcripción policistrónica están separadas por secuencias intergénicas de aproximadamente 1024 pb (Tabla 1). Éstas son eliminadas en el procesamiento de los RNAm individuales. Los genes son transcritos como unidades policistrónicas (Vanhamme L. et al., 1995) a partir de promotores localizados corriente arriba de los genes dispuestos en “tandem” o desde promotores localizados frente a cada gen individual como en el caso del “spliced leader” (Zomerdijk J.C.B.M. et al., 1991; Campbell D.A. et al., 2000; Lee M.G.S. et al., 1997).

RNAm de genes que se encuentran en la misma unidad transcripcional, pueden tener diferentes niveles de expresión. Esto se debe a la existencia de mecanismos de control post-transcripcional (Revelard P. et al., 1993).

Los RNAm de estos organismos son procesados por los mecanismos de “trans-splicing” y poliadenilación (Figura 4). A través del “trans-splicing” todos los RNAm reciben en su extremo 5' una secuencia común de 39 nucleótidos llamada miniexón o ““spliced leader”” (Boothroy J.C. et al., 1982). El miniexón aporta al pre-RNAm el “cap”, un residuo m⁷Gppp. Los genes del “spliced leader” se encuentran codificados en una región diferente del genoma como una familia génica de aproximadamente 200 miembros organizados en “tandem” (Agabian N. 1990). A diferencia de los genes codificadores de proteínas, su transcripción ocurre en forma individual o monocistrónica debido a la presencia de espaciadores no transcritos. La transcripción es llevada a cabo por la RNA polimerasa tipo II (RNA pol II) y cada gen contiene su propio promotor localizado justo corriente arriba (Gilinger G. et al., 2001; Campbell D.A. et al, 2000).

El miniexón se adiciona al RNAm en sitios aceptores localizados a 30-70 pb corriente arriba del codón de inicio de la traducción (Liang X.H. et al., 2003).

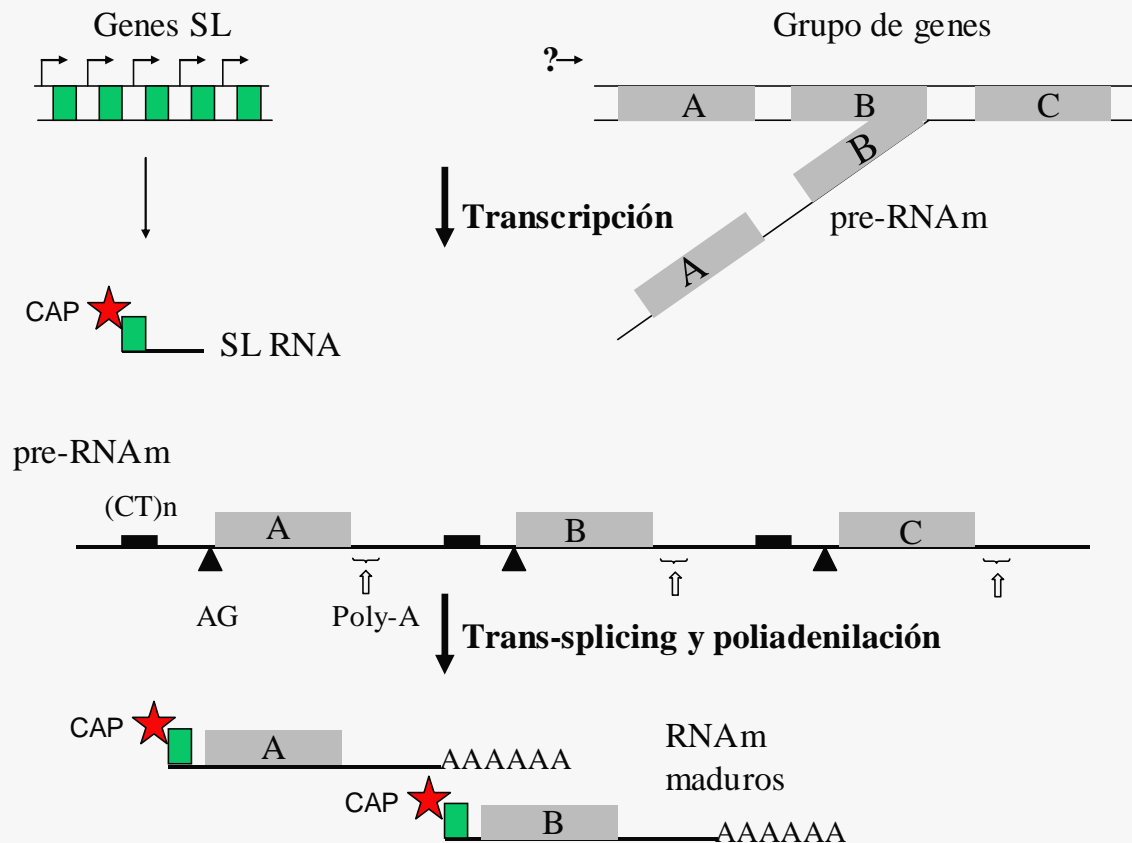


Figura 4. Expresión de RNA_m en tripanosomátidos. Los RNA_m maduros se producen por la unión de transcritos generados en dos unidades de transcripción. Los genes del spliced leader con su promotor individual y la región codificadora de los mensajeros que generalmente se producen policistricamente a partir de un promotor localizado corriente arriba en el cromosoma. Se destaca la presencia de un CAP agregado al extremo 5' del SL RNA. El trans-splicing y la poliadenilación de proponen como procesos acoplados en la región intergénica transcrita en el pre-RNA_m policistrónico. Genes del spliced leader: Genes SL- cajas verdes; Promotores: flechas; CAP: estrella roja; Sitios inicio de la transcripción frecuentemente desconocidos: ?; Tracto de polipirimidinas: CT_n; Sitio aceptor de spliced: AG.

Los sitios aceptores del pre-RNAm están caracterizados por poseer el dinucleótido AG precedido por una región rica en pirimidinas (Huang J. et al., 1991). Este mecanismo de procesamiento secundario permite generar pre-RNAm transcritos inicialmente por la RNA polimerasa I (RNA pol I). Ejemplo de ello son los genes codificadores de las proteínas más abundantes de *T.brucei*, las proteínas repetitivas de ácido procíclico (PARP) y las VSG, que son transcritos por una RNA pol I (resistente a α -amanitina).

La poliadenilación es otro proceso importante en la maduración de los RNAm en células eucariontes. Hasta el momento no se sabe si existe una secuencia consenso en los Tripanosomátidos necesaria para llevar a cabo este proceso, sin embargo se han reportado secuencias ricas en pirimidinas localizadas en las regiones intergénicas que pudieran estar involucradas (Schurch N. et al., 1994). Además se sabe que el mecanismo de trans-splicing y poliadenilación están acoplados ya que el sitio aceptor de spliced del gen localizado justo corriente abajo determina el sitio de poliadenilación del gen localizado corriente arriba (LeBowitz J.H. et al., 1993). La distancia entre las regiones de poliadenilación y el sitio aceptor de spliced del gen localizado corriente abajo es de 100 a 150 nucleótidos dependiendo de la especie de Tripanosomátido. Se ha reportado un uso diferencial de sitios de procesamiento dentro de esta secuencia intergénica, es decir que el procesamiento no ocurre en una posición específica sino que pueden existir varios sitios de procesamiento en una región determinada (Báñame L. et al., 1995).

1.1.6.2.4. RNAs polimerasas

En eucariontes superiores existen tres polimerasas. La RNA polimerasa I encargada de transcribir los RNAs ribosomales, la RNA polimerasa II los genes codificadores de proteínas y la RNA polimerasa III los RNAs de transferencia, los RNAs nucleolares pequeños y el RNAr 5S. Las RNAs polimerasa eucarionticas

consisten de varias proteínas de las cuales solo un grupo son consideradas como parte fundamental de los componentes de transcripción. En los tripanosomátidos se han descrito los tres tipos de RNA polimerasa típicos de células eucarióticas y se han clonado los genes que codifican para la subunidad grande de estas enzimas (Evers R. et al., 1989; Jess W. et al., 1989). Estos genes también se han identificado por secuencia en el genoma de *T.cruzi*, *T.brucei* y *L.major*. En cuanto a la RNA pol II se han encontrado pequeñas diferencias. La subunidad grande de esta enzima carece de una repetición de heptapéptidos en el dominio C-terminal (CTD, Tyr-Ser-Pro-Thr-Pro-Ser) característica común en otros eucariontes y esencial para la viabilidad celular (Chapman A. et al.; 1994). En todos los tripanosomátidos esta enzima transcribe los RNAm y el gen del “spliced leader” o miniexón. En cuanto a la RNA polimerasa tipo III (RNA pol III) esta es capaz de transcribir los RNA de transferencia (RNAt), RNAr 5S y snRNAs ricos en uridinas de manera similar a su homólogo en eucariontes superiores.

En muchos eucariontes, la RNA polimerasa I solo lleva a cabo la transcripción de los genes del RNAr. En los tripanosomátidos, como en el caso de *T.brucei* esta enzima también transcribe dos RNAm estadio específicos que codifican para la glicoproteína variable de superficie (VSG) y para las proteínas repetitivas de ácido procíclico (PARP) (Rudenko G.H. et al, 1991; Zomerdijk J.C.B.M. et al., 1991). Un estudio bioquímico del complejo de la RNA pol I en *T.brucei* y análisis de las secuencias genómicas de varias especies de tripanosomátidos, ha demostrado que las subunidades típicas presentes en los tres tipos de RNA polimerasa se expresan en este organismo; sin embargo no se han podido identificar aquellas subunidades específicas para la RNA pol I; sugiriendo la existencia de subunidades especie-específica que cumplan éstas funciones (Walgraffe D. et al., 2005; Nelly S. et al., 2005).

1.1.6.2.5. Transcripción de los genes codificadores de las proteínas por la RNA polimerasa I

En células eucarióticas, la RNA polimerasa tipo I es la enzima que transcribe los genes de RNAr. La transcripción de los genes codificadores para proteínas se realiza con la participación de la RNA pol II, complejo que dirige la adición del 5' CAP a todos los RNAm citoplasmáticos. En los organismos de la familia Trypanosomatidae, se ha observado que la RNA polimerasa tipo I tiene la capacidad de transcribir genes codificadores de proteínas: en 1984, Kooter y Borst reportaron que la transcripción de los genes que codifican para las proteínas VSG, es prácticamente resistente a α -amanitina. Esta es una característica específica para la transcripción dependiente de la RNA polimerasa tipo I. Posteriormente se determinó un efecto similar de esta toxina sobre la transcripción de los genes que codifican para las proteínas PARP, proteínas que recubren las formas procíclicas de *T.brucei* (Lee M.G.S. et al.; 1997; Texeira S.M.R. 1998). Estos resultados sugirieron que estos genes fueran transcritos por la RNA polimerasa I o por una polimerasa con características similares a ésta. El hallazgo de dos loci para la subunidad grande de la RNA polimerasa tipo II en los tripanosomas que presentan variación antigénica, generó una hipótesis alternativa que propone la existencia de una RNA pol II con resistencia a α -amanitina (Lee M.G.S 1997). Evidencia indirecta sin embargo, sugiere que estos genes son transcritos por la misma RNA pol I que transcribe el cistrón ribosomal (Chung H.M. et al., 1993).

En los tripanosomátidos, la adición del 5' CAP a cada RNAm ocurre como consecuencia del trans-splicing que liga el miniexón al extremo 5' del RNAm. Por esta razón es posible generar un RNAm utilizando la maquinaria de transcripción de la RNA polimerasa tipo I. En estos organismos se han diseñado vectores de expresión utilizando promotores tipo pol I (ej, promotor de genes ribosomales) para expresar genes reporteros (Rudenko G.H. et al., 1991; Zomerdijk J.C.B.M. et al., 1991; Martinez-Calvillo S. et al., 1997).

1.1.6.2.6. Organización genómica del DNAr

Las moléculas de RNAr son componentes estructurales y funcionales de los ribosomas. La organización cromosomal de estos genes ha sido bien estudiada en organismos eucariontes y procariontes (Reeder R.H. 1992; Grousse R.L. et al., 1996). Generalmente, los genes que codifican para las moléculas de RNAr forman parte de una misma unidad transcripcional. En eucariontes, estas unidades se encuentran repetidas en “tandem” y separadas entre ellas por regiones intergénicas en las cuales se localizan los elementos de control de la transcripción (Reeder R.H.1992). En la mayoría de los eucariontes en la hebra codificadora se encuentran las secuencias codificadoras para el RNAr 18S, 5.8S y 28S dentro de la misma unidad transcripcional, separadas entre sí por espaciadores transcritos internos y son sintetizados por la RNA polimerasa I (Figura 5). El RNAr 5S se encuentra generalmente localizado fuera de esta unidad y es transcrito por la RNA polimerasa tipo III.

En el caso de los tripanosomátidos, se observa un patrón más complejo de moléculas de RNAr citosólicas. Estudios bioquímicos realizados en *T.cruzi* por Castro C. y col. en 1981, determinaron que la molécula de RNAr 28S, presenta una discontinuidad interna. El rompimiento interno fue evidente bajo fuertes condiciones desnaturizantes, las cuales permitieron observar la liberación de las moléculas α y β (24S α y 24S β), las cuales sedimentan a través de gradientes de sacarosa en la misma fracción que la subunidad 18S (Castro C. et al.; 1981). Por otro lado, el análisis de las especies pequeñas de RNAr, reveló la presencia de 6 moléculas a las que se les llamó S3 que corresponde al RNAr 5.8S, S1, S2, S4, S5 que corresponde al RNAr 5S y S6 (Hernández R. et al., 1983; Hernández R. et al., 1993). Ésta situación de complejidad atípica en el número de moléculas de RNAr ha sido ampliamente documentada en otros miembros de la familia Trypanosomatidae (Cordingley S.J. et al., 1980; Gray M.W. 1981).

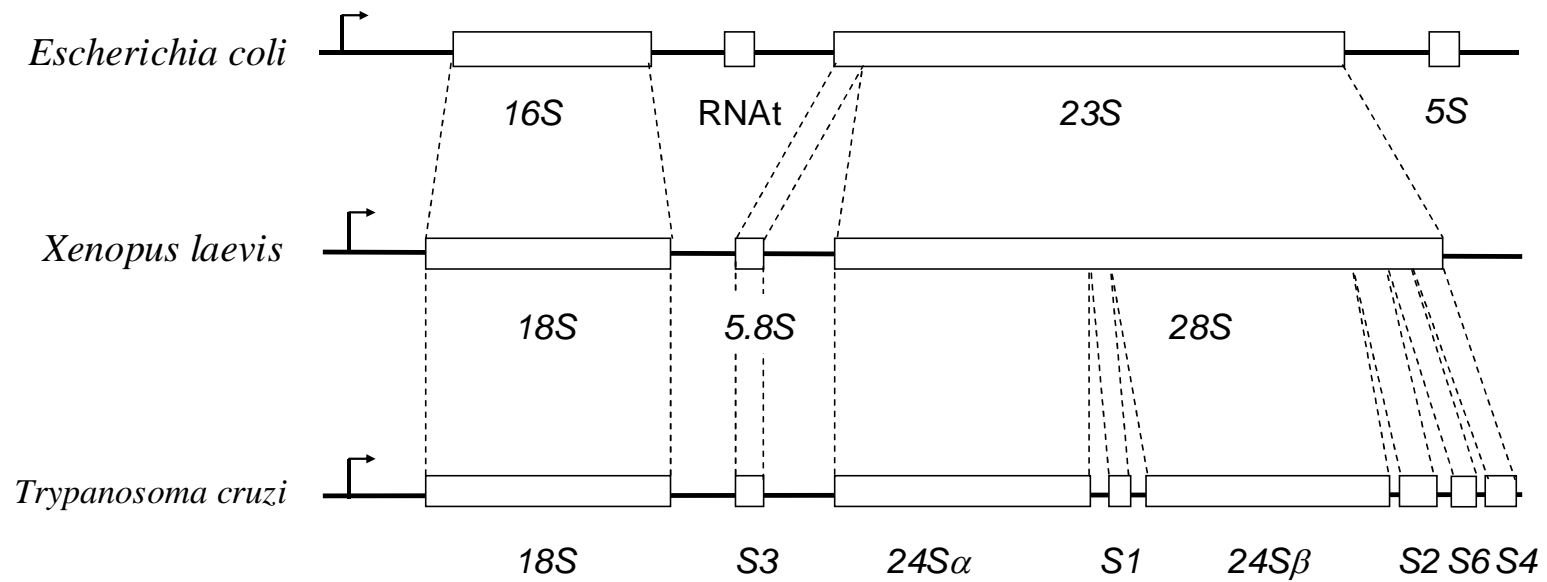


Figura 5. Organización genómica de la unidad principal de transcripción de los genes de DNAr en procariontes (*Escherichia coli*) y eucariontes (*Xenopus laevis*) y se compara con la de *Trypanosoma cruzi*. La flecha indica el sitio de inicio de la transcripción.

Por medio del análisis de clonas genómicas de DNA se determinó el arreglo de las regiones codificadoras de la llamada unidad fundamental de transcripción del RNAr: 18S, S3, 24S α , S1, 24S β , S2, S6 y S4 (Hernández R. et al., 1988) (Figura 5). Éstas se encuentran separadas por espaciadores transcritos internos, los cuales son transcritos y escindidos post-transcripcionalmente durante el procesamiento del RNAr precursor. Organizaciones génicas similares de la unidad principal de transcripción ha sido establecida para otros miembros de esta familia. Tal es el caso de *T. brucei* (White T.C. et al., 1986), *C. fasciculata* (Spencer D.F. et al., 1987; Grondal E.M.J. et al., 1990) y varias especies de *Leishmania* (Martínez-Calvillo S. et al., 2001). Recientemente, Martínez-Calvillo S. y col. (2001) describieron la organización de los genes de RNAr en *L. major* Friedlin. Encontraron que el cistrón principal de DNAr contenía un fragmento de 526 pb duplicado en el extremo 3' del cistrón ribosomal, presentando dos copias de la región codificadora para el RNAr S4 (ahí llamada RNAr LSU ϵ). La organización modular particular de los genes de RNAr se ha considerado como un sello genético en la evolución de la familia Trypanosomatidae.

En *T. cruzi*, las regiones codificadoras para el RNAr están organizadas en clusters de aproximadamente 10 kb separados entre ellos por secuencias intergénicas de 20 kb (Hernández R. et al.; 1983). En *T. cruzi* por ejemplo, esta unidad se encuentra repetida un poco más de 100 veces en el genoma haploide (Castro C. et al.; 1981; El-Sayed N.M. et al.; 2005).

Por otro lado, en un análisis génico de la molécula de RNAr 5S de *T. cruzi* se determinó que sus genes codificadores se encuentran en al menos dos cromosomas, uno de 1400 y otro de 1500 kb y se encuentra organizado en repeticiones contiguas de 480 pb (Hernández-Rivas R. et al.; 1992). De igual manera que en otros eucariontes esta molécula es transcrita por la RNA polimerasa tipo III.

La unidad fundamental de transcripción es transcrita por la RNA polimerasa I a partir de un promotor bien localizado. Ha sido nuestro interés el disectar funcionalmente este promotor en la especie *T.cruzi*.

1.2. PROMOTORES RIBOSOMALES EN EUCARIONTES SUPERIORES

1.2.1. Promotor ribosomal eucariótico

Los RNAr son los transcritos más abundantes en las células procariontes y eucariontes, llegando a constituir más del 90% del RNA total celular. La transcripción de los cistrones del RNAr no solo es eficiente, sino que también está regulada. La producción del RNAr se incrementa o disminuye dependiendo de las condiciones fisiológicas celulares, particularmente de proliferación celular. La regulación en la síntesis del RNA ribosomal es un mecanismo importante que controla a su vez la síntesis de ribosomas (Reeder R. 1992; Grouse R.L. et al., 1996).

Las células de eucariontes superiores contienen de 100 a 500 copias de la unidad de transcripción de RNAr, organizadas en “tandem” en uno o varios cromosomas o en elementos extracromosomales (Reeder R 1990). Los cistrones ribosomales están separados entre sí por espaciadores intergénicos de aproximadamente 2 a 30 kb (Sollner-Webb B. et al., 1986), en los cuales se encuentran los elementos reguladores de la transcripción: los promotores ribosomales, reconocidos por la maquinaria de la transcripción de la RNA polimerasa tipo I.

Las regiones codificadoras para el RNAr 18S, 5.8S y 28S, se han mantenido conservadas durante la evolución. Por el contrario, las secuencias intergénicas han evolucionado rápidamente y solo entre especies muy relacionadas entre sí, es posible encontrar similitud de secuencia. A pesar de esto es posible

encontrar una conservación significativa en el tipo y arreglo de los elementos regulatorios encontrados en estos espaciadores, aunque la secuencia haya cambiado.

El estudio de las secuencias intergénicas de diversos organismos eucariontes ha llevado a establecer la existencia de elementos reguladores como son: el promotor génico, promotores espaciadores, elementos repetidos y terminadores de la transcripción (Figura 6).

El promotor génico de varias especies de vertebrados como humano (Haltiner M.M. et al., 1986), ratón (Miller K.G. et al., 1985); rata (Cassidy B. et al., 1987) y sapo (Reeder R.H. 1992), ha sido bien caracterizado y ha permitido concluir que poseen la misma arquitectura básica. A pesar de las diferencias en la secuencia nucleotídica, casi todos los promotores del RNAr analizados están formados por un dominio central o “core” y un dominio corriente arriba o “UCE” por sus siglas en inglés (Sollner-Webb B. et al., 1986). En consenso se tiene que el dominio central se extiende del nucleótido -45 al +20, incluyendo el sitio de inicio de la transcripción (+1), y contiene secuencias esenciales para el inicio correcto de la transcripción. El dominio “corriente arriba” abarca del nucleótido -186 al -107, e incluye secuencias que activan la transcripción (Haltiner M.M. et al., 1986). La función del dominio corriente arriba se afecta al modificar su distancia u orientación con respecto al dominio central, lo que sugiere que estas dos secuencias de control operan en conjunto para promover una eficiente transcripción por la RNA polimerasa I (Bell S.P. et al., 1988) (Figura 7).

Promotores espaciadores han sido identificados en algunos metazoarios como sapo (Moss T. et al., 1979) y ratón (Kuhn A. et al., 1987) y son reconocidos por la RNA polimerasa I al igual que el promotor génico. En *Xenopus laevis*, el promotor espaciador difiere del promotor génico solamente en un 10% de su secuencia (Morgan G.T. et al., 1984). En el caso del ratón, este promotor espaciador comparte solamente 12 pb con el dominio central (Kuhn A. et al.,

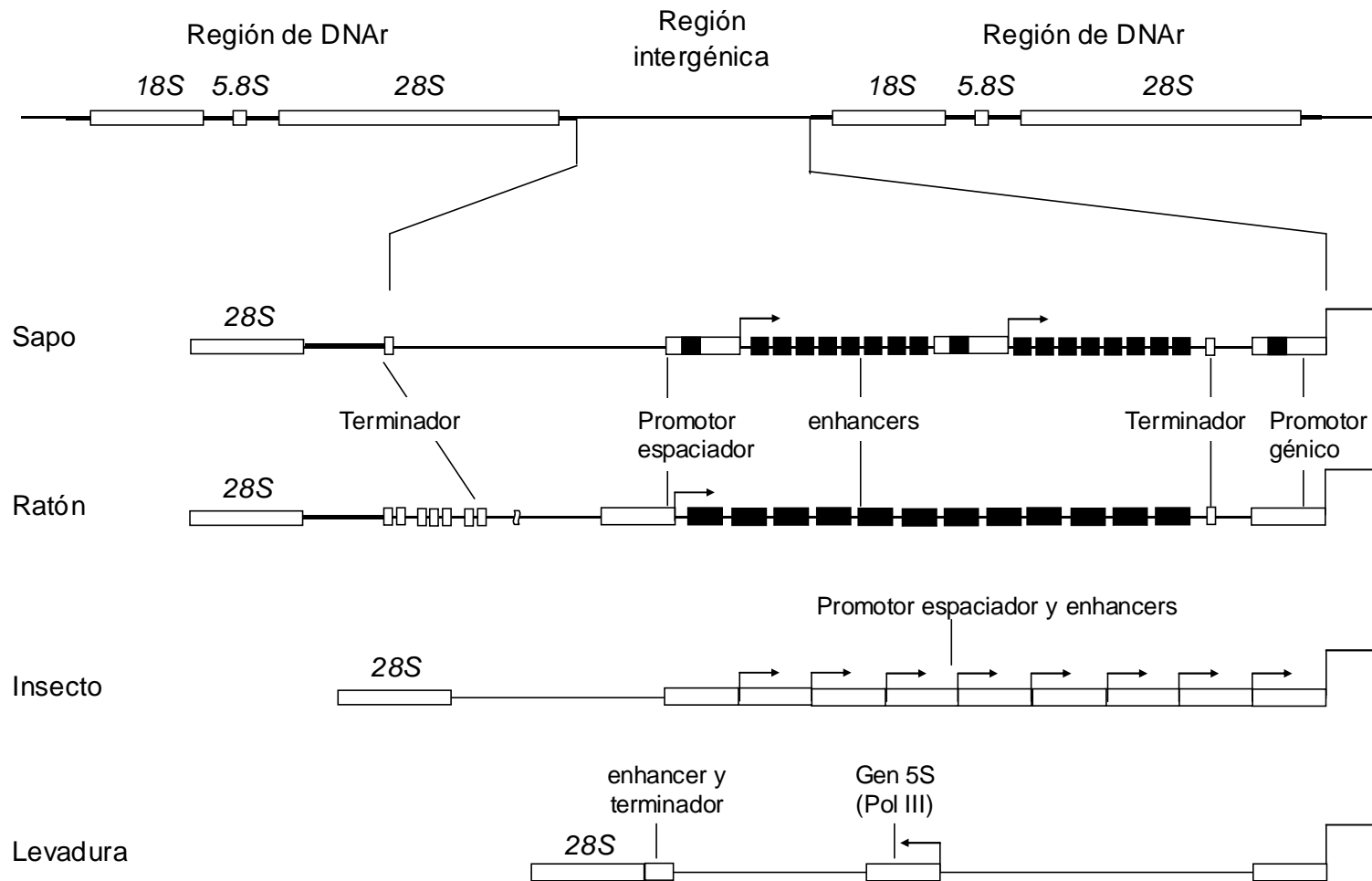


Figura 6. Comparación de la región intergénica del DNAr de diferentes especies eucarióticas. En la parte de arriba se muestra la organización en tandem de la unidad fundamental de transcripción del DNAr. Abajo se muestran las regiones intergénicas ampliadas con los diferentes elementos de control presentes en diferentes organismos: Sapo: *Xenopus laevis*, Ratón, Insecto: *Drosophila melanogaster* y levadura: *Sacharomyces cerevisiae*. La flecha indica el sitio de inicio de la transcripción. Modificado de Reeder R 1992.

1987). Hasta el momento este tipo de promotores se han encontrado corriente arriba de los elementos repetidos y generalmente están seguidos de secuencias terminadoras de la transcripción. Estos elementos son capaces de iniciar la transcripción pero ésta se detiene rápidamente por la presencia de un terminador localizado justo corriente abajo de éste (Figura 6). Se ha propuesto que la función de este tipo de elemento en el DNA espaciador es la de concentrar la maquinaria modular de transcripción a las cercanías del promotor, haciéndolo de esta forma más eficiente (Reeder R et al., 1992).

En los espaciadores intergénicos de las unidades de RNAr suelen presentarse secuencias repetidas, cuyo tamaño y reiteración varían de una especie a otra (Reeder R.H. 1984 y 1990). En algunos casos, la secuencia nucleotídica del elemento repetido puede presentar cierta similitud con la región promotora de la unidad de transcripción (Labhart P. et al., 1984). En la mayoría de los organismos analizados ha sido demostrado que los elementos repetidos tienen la capacidad de unir factores de transcripción de la RNA pol I, y funcionan como activadores de la transcripción (Reeder R.H. 1984).

Hay terminadores de la transcripción localizados al 3' de las unidades de transcripción. En el ratón, por ejemplo, estas secuencias tienen un tamaño de 18 pb y son conocidas como "Cajas Sal" (Grummt I. et al., 1986). En este organismo se han encontrado al menos 8 "Cajas Sal" corriente abajo del cistron ribosomal, las cuales unen la proteína TTFI, necesaria para la terminación de la transcripción (Grummt I. et al., 1986).

Iniciación de la transcripción.

Para que la RNA pol I inicie la transcripción del RNAr se requiere la presencia de un complejo de iniciación, que en vertebrados está formado por los factores UBF (upstream binding factor) y SL1 (selectivity factor). UBF es una proteína dimérica de 90-100 kDa que contiene entre 4 y 6 cajas HMG (dominios de unión a ácidos nucleicos) (Jantzen H. et al., 1990; Paule M.R. et al.; 2000). Por su parte, SL1 es un complejo formado por la proteína de unión a caja TATA (TATA-binding protein" (TBP)) y tres factores asociados a la proteína TBP

(“TBP associated factors” (TAFs)) (Comai L. et al., 1992). La proteína UBF tiene la capacidad de unirse a los dos dominios del promotor: al dominio corriente arriba y al dominio central. Posteriormente, SL1 interactúa con UBF, y el complejo resultante es reconocido por la RNA polimerasa I, iniciándose entonces la transcripción (Moss T. et al., 2002) (Figura 7).

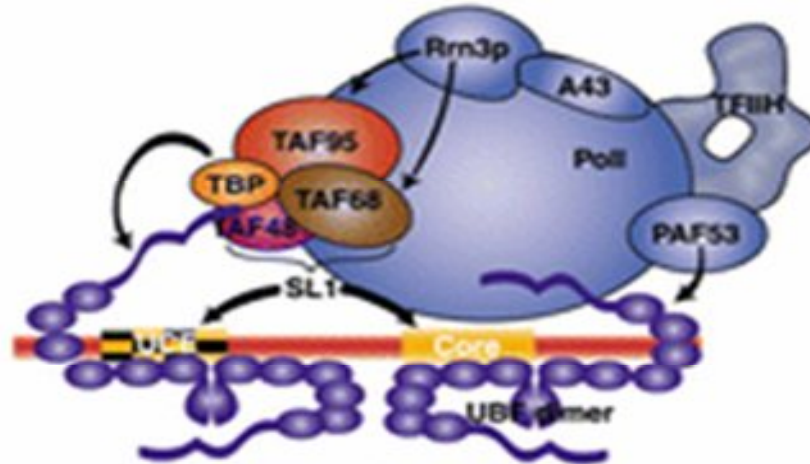
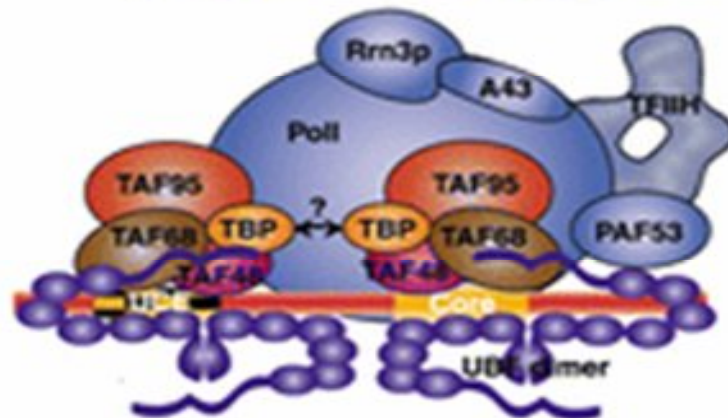
A**B**

Figura 7. Formación del complejo de iniciación de la transcripción por la RNA polimerasa I. **A.** El promotor eucariótico presenta dos dominios importantes el dominio central del promotor o CORE y el dominio corriente arriba o UCE. Inicialmente se une a estos dos dominios la proteína UBF (upstream binding factor). Esta proteína reconoce el complejo de selectividad (SL) al promotor. El complejo SL1 está formado por cuatro proteínas, la proteína de unión a caja TATA (TBP) y tres factores asociados a la TBP (TAF). **B.** No se sabe bien si se unen dos complejos SL1 (uno al CORE y otro al dominio UCE) o es un solo complejo capaz de interactuar con las dos regiones. Después de que están unidos estos dos complejos es reclutada la RNA pol I y se inicia la transcripción. Tomado de Moss y col. 2002.

2. ANTECEDENTES EN *Trypanosoma cruzi*

2. ANTECEDENTES EN *T.cruzi*

El análisis molecular de la síntesis de RNAr en *T.cruzi* ha sido del interés del grupo de investigación del Dr. Roberto Hernández. Se secuenciaron 2.1 kb del espaciador transcrito externo del cistrón ribosomal y por extensión con cebador (“primer extensión”) se determinó un sitio de inicio de la transcripción (tsp) del DNAr de *T.cruzi*, localizado a 1768 pb corriente arriba del inicio del gen codificador para el RNA 18S (Martínez-Calvillo S. et al., 1994. GenBank: N° L13926). Este sitio se encuentra 270 pb corriente arriba de otro elemento promotor descrito por Dietrich y col. en 1993, quien también determinó la existencia de un elemento repetido de 172 pb dentro de esta secuencia (GenBank N° M88712). En referencia al extremo 5' del RNAr 18S estos sitios se nombraron tsp distal y tsp proximal respectivamente; pudiendo ser ambos tsp funcionales (Figuras 8 y 9).

Para determinar si la secuencia que contiene estos dos sitios de inicio de transcripción tiene actividad promotora, esta se clonó en vectores de expresión y se llevaron a cabo transfecciones transitorias en epimastigotes de *T.cruzi*. Tyler-Cross y col. (1995) realizaron experimentos de transfección transitoria utilizando el plásmido pGCAT que contiene el gen *cat* (Cloranfenicol acetil transferasa) como gen reportero. Clonaron esta secuencia reguladora y establecieron que esta era capaz de inducir la expresión del gen reportero. De forma independiente Martínez-Calvillo y col. (1997) determinaron la capacidad de esta secuencia para inducir la actividad del gen reportero *cat* en el plásmido de expresión pTEX-*cat*.

El plásmido pTEX es un vector para *T.cruzi* que contiene el gen *neo* que confiere resistencia a la geneticina (G418) y las secuencias corriente arriba, intergénica y corriente debajo de los genes que codifican para las enzimas gliceraldehido fosfato deshidrogenasa I y II (*gapdh*), como regiones reguladoras (Kelly J.M. et al.; 1992). pTEX-*cat* por su parte es un plásmido derivado de este último, que

incluye secuencias del gen *cat* y que se utiliza como gen reportero (Figura 9). Para analizar funcionalmente esta región, en el laboratorio del Dr. Roberto Hernández, se clonó en pTEX y en pTEX-*cat* una secuencia de 806 pb que contiene los sitios de inicio de la transcripción del DNAr y un elemento repetido de 172 pb, substituyéndose así la región promotora original del vector. Los plásmidos resultantes, pRIBOTEX y pRIBOTEX-*cat*, fueron transfectados por electroporación en *T.cruzi*. Al realizar los ensayos de actividad CAT con células de *T.cruzi* transfectadas transitoriamente con estos dos plásmidos, se encontró que el promotor del RNAr es más activo que el encontrado en pTEX (Martínez-Calvillo S. et al., 1997).

Teniendo en cuenta que los promotores ribosomales son especie-específico y que en *T.cruzi* el promotor de DNAr es uno de los pocos promotores descritos, se decidió continuar con el análisis funcional de esta secuencia promotora. Se presenta el resultado de la expresión de CAT en diversas construcciones plasmídicas que contienen distintas versiones del promotor y que permitieron establecer la contribución del elemento repetido y de los sitios de inicio de la transcripción localizados dentro de esta secuencia, en la actividad promotora. De igual manera, se identificaron varios elementos potencialmente reguladores presentes en esta secuencia. Encontramos que la organización de este promotor recuerda a la establecida para eucariontes superiores y teniendo en cuenta la divergencia evolutiva temprana de *T.cruzi*, podemos pensar en una aparición evolutiva temprana de los mecanismos de regulación del promotor de DNAr. La identificación del dominio central del promotor permitió realizar estudios de mutagénesis dirigida y establecimos una región de 7 nucleótidos funcionalmente importantes.


```

1      GAGCTCGGTG CACCCTGGGA TATTTGCGCA CCCACCTTTC CCGTCGCAAT CGGCGCCGTC
61     CGAACGCGGA AATGTTCCGA GAATAATACG GCTGGGCTGC GCCGCGCGTT CCCCGCGTGA
121    ACCAACTATT GTGCGATGTG CAGCATCCTA TTGTGGTGCT TTACCGCACA CCAGTTTCCT
181    TGCGGGCCTT ATTTGGTGTG TTGGATTTTT AATTTTTTGA TGATTCCGAG GAATTTTTTG
241    CAATTTTTGG GTACCCCTAA AAAAATTTTG GAGTTTCCGG GGTTTCGATCC AACTTGTGCT
301    TTTTAAACCG TCCATTTGTG TCTAGTACAT CATGGAGCGG TATTCTCTCC GGTGGCCCAG
361    GTGGCGTCGG AAGGAATCGG TGTCCCTCAG GATGTTTGGT TTTTCGTTTT TTTTTTTGCG
421    GTCTTTTGTT TCGCATCGCC GTATCGTGTG CGGCGCGACC TTCTTTTTGG CTCATTGGTC
481    AGTGAGGTTT ATAATAAAGT GGATCATTTG GGTTTTTGGC CCTTTGCGGC GCACCCGCGG
541    AATGGGGGAG GGATTTTCAT ATAATTGTAG TGTACACATT GTGTGTGGGT CGCAAATGT
601    CATGCCGTGT GCAATGTTTA TTTGCGTGCT GTGCGTGTCC TTTTGTGATT CCACCACTTG
661    TGTGTATTTT ACCTTATCGT CTCTCCCTCG CGTTGGCTGT GCGTGAATTG TCTGTGCGAT
721    TCGTGGGAAA TCAAAGGGG AATCAACGTG TTCTTTTTTTT TTCAGAAGGG GAGTCAAAGC
781    GCCGTGTGGA TGCCAAGTCT GTGCAA

```

Figura 8. Secuencia nucleotídica DNAr que contiene la región promotora clonada en los vectores de expresión pRIBOTEX y pRIBOTEX-cat. Se muestra una copia del elemento repetido de 172 pb (caja verde) y los dos posibles sitios de inicio de la transcripción (nucleótidos en rojo y subrayado) distal (posición 334) y proximal (posición 607).

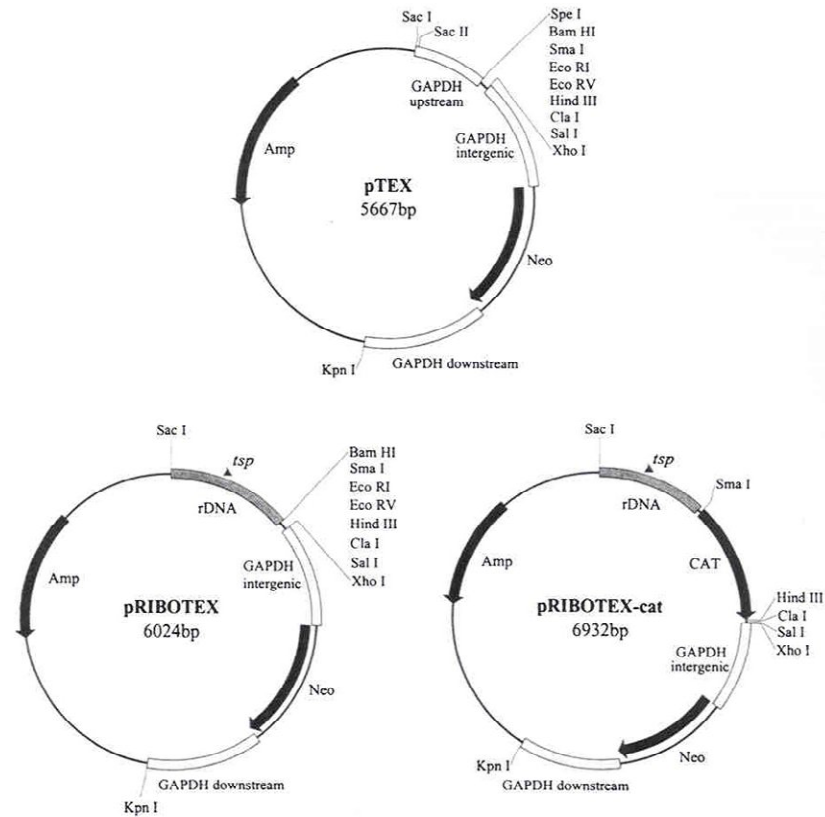


Figura 9. Mapa de restricción y elementos génicos de los plásmidos pTEX, pRIBOTEX y pRIBOTEX-cat. pRIBOTEX es un plásmido derivado del vector pTEX (Kelly et al., 1992). La diferencia con pTEX es un reemplazo de la secuencia corriente arriba ("upstream") *gapdh* (gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa) presente en el plásmido parental con un fragmento de DNA que incluye el sitio de inicio de la transcripción (*tsp*) de los genes de RNAr de *T.cruzi*. El plásmido pRIBOTEX-cat se generó a partir del plásmido pTEX-cat (Kelly et al., 1992). rDNA: secuencia de 806 pb que contiene los sitios de inicio de la transcripción para los genes de RNAr y un elemento repetido de 172 pb. CAT: gen que codifica para la enzima cloranfenicol acetil transferasa. Neo: gen que confiere resistencia a geneticina. Amp: gen que confiere resistencia a ampicilina. GAPDH intergenic y downstream: Secuencias intergénicas y corriente abajo del gen *gapdh*. Tomado de Martínez-Calvillo et al., 1997

3. OBJETIVOS

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GENERAL

- Caracterización funcional de una región génica con actividad promotora de los genes ribosomales de *T.cruzi*.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Delimitar la región mínima con actividad promotora.
- Identificar nucleótidos funcionalmente importantes dentro de la región promotora.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Parásitos

4.1.1. Cultivo de parásitos

El procedimiento estándar para cultivar epimastigotes de *Trypanosoma cruzi* en suspensión, se realiza en medio LIT (por sus siglas en inglés, Liver Infusion Tryptose) a 28°C. El tiempo de duplicación del parásito es de aproximadamente 20 horas, aunque hay heterogeneidad dependiendo del aislado. Los parásitos se cultivan a partir de una densidad de $1-5 \times 10^6$ células por mililitro, donde se mantienen hasta alcanzar una densidad de 5×10^7 epimastigotes por mililitro de cultivo. Se trabajó con la cepa de *T.cruzi*, CL Brener (cepa de referencia para el proyecto genoma).

Para un litro de medio LIT se deben adicionar 4 gramos de NaCl, 0.4 gr de KCl, 8.0 gr de Na_2HPO_4 , 2 gr de glucosa, 5 gr de Tryptosa, 5 gr Liver Infusión Broth, 25 mg de hemina, y dejar a un 10% de suero fetal bovino. Se debe ajustar el pH a 7.2 con HCl. Además se le adiciona 10 μl de penicilina y estreptomina de un stock al 100X que contiene 100.000 U y 100 mg respectivamente disuelto en 10 ml de agua estéril.

4.1.2. Curvas de Crecimiento

Los cultivos fueron analizados diariamente para medir la concentración de células. Para esto se toman 10 μl del cultivo en 90 μl de paraformaldehído al 4% (disuelto en PBS) y se cuentan los parásitos en una cámara de conteo de Neubauer.

4.2. Construcciones plasmídicas con diferentes versiones moleculares del promotor y del vector de co-transfección

Las diversas construcciones plasmídicas utilizadas en este trabajo, contienen diferentes versiones moleculares de una secuencia con actividad promotora de los genes de RNA ribosomal de *T.cruzi* cepa La Cruz Jalisco. Las diferentes regiones promotoras se obtuvieron por medio de digestiones con enzimas de restricción que presentan sitios de corte en la secuencia promotora o por medio de amplificaciones de DNA utilizando oligonucleótidos específicos.

4.2.1. Digestiones

Para algunas construcciones plasmídicas utilizadas en este proyecto, fue necesario hacer digestiones con endonucleasas, con el fin de obtener los fragmentos de inserto y vector necesarios para las diversas clonaciones. Típicamente se cortaron 10 µg de DNA del vector (pTEX-*cat* o sus derivados) y del plásmido que contenían la secuencia promotora con 2 µl de enzima de restricción (5000 a 10000 U/µl dependiendo de la enzima), en el buffer de reacción recomendado. Esta mezcla de digestión se llevó a 20 µl de volumen final con agua bidestilada estéril y se incubó a 37°C por 3 horas. Adelante se muestra la construcción de los diversos plásmidos.

4.2.2. Amplificación por PCR de fragmentos de interés

Otras versiones moleculares del promotor se obtuvieron por la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Se diseñaron oligonucleótidos específicos que se anclaran en la región promotora de los genes de DNAr, en los sitios deseados y se les adicionaron secuencias de corte para enzimas de

restricción. El protocolo estándar utilizado para las reacciones de PCR es el siguiente:

Mezcla de reacción: DNA plasmídico que contiene la secuencia a amplificar a una concentración final de 100 ng, buffer de amplificación 1X (Invitrogen), 0.2mM de una mezcla de dNTPs, 1.5mM de Sulfato de Magnesio (Invitrogen), los oligonucleótidos a 1 μ M (Sigma o Invitrogen) y la polimerasa Platinum Pfx (Invitrogen). El volumen final se ajustó a 50 μ l con agua bidestilada estéril.

El protocolo seguido por el termociclador (Mastercycler Personal-Eppendorf) para la reacción de PCR consistió de siete pasos: una desnaturalización inicial de 2 minutos a 94°C (Paso 1), seguida por otra desnaturalización corta de 30 segundos a 94°C (Paso 2), renaturalización por 30 segundos a 55°C (Paso 3), una extensión a 68°C por un tiempo entre 15 segundos y 1 minuto dependiendo del tamaño del amplificado (Paso 4), repetir los pasos del 2 al 4, 29 veces (Paso 5), una extensión final a 68°C por 10 minutos (Paso 6) y un enfriamiento a 4°C.

La secuencia y las TM de los oligonucleótidos utilizados se muestran en la Tabla 2.

4.2.3. Purificación de fragmentos de interés

Los insertos a clonar y los vectores de clonación fueron purificados en un gel preparativo de agarosa entre el 0.8 y el 2.5% a 60 voltios por aproximadamente 4 o 5 horas, tiempo después del cual el gel fue teñido con bromuro de etidio. Las bandas de interés fueron identificadas por comparación de éstas con los patrones de peso molecular (1 kb DNA ladder, Gibco BRL Technologies) y posteriormente cortadas y pesadas. Los fragmentos fueron purificados de la agarosa siguiendo las instrucciones del kit de purificación CONCERTTM Rapid Gel Extraction System (GIBCO BRL, Life Technologies). La integridad de las

bandas y su concentración se determinó geles analíticos de agarosa a concentraciones entre 0.8 y el 2.5% dependiendo del tamaño del fragmento de interés.

4.2.4. Clonación de los productos de PCR en el vector pCR-Blunt II-TOPO

Los fragmentos de la región promotora obtenidos por PCR y purificados fueron subclonados en el vector, pCR-Blunt II-TOPO (Invitrogen). Para esto se tomaron 2 μ l del producto de PCR, 0.5 μ l de solución salina y 0.5 μ l del vector TOPO. Se incubó por 30 minutos a temperatura ambiente y posteriormente se transformó por choque térmico en células de *Escherichia coli* químicamente competentes (todos los reactivos y células son proveídos por el kit: TOPO cloning and transformation). Las células transformadas se espatularon en cajas de LB (Luria-Broth) con kanamicina (50 μ g/ml).

4.2.5. Ligaciones

Se emplearon aproximadamente 50 ng de vector purificado y 150 ng de inserto (una relación 1:3 vector:inserto) para llevar a cabo la reacción de ligación. Se agregaron estos fragmentos de DNA con 1 μ l de enzima T4 ligasa (1 U/ μ l) (T4 DNA ligasa, Gibco BRL Life-Technologies), 4 μ l de Buffer de reacción y se completó a 20 μ l con agua bidestilada estéril. Esta mezcla de reacción se incubó toda la noche a 14°C y posteriormente fue transformada en células *E.coli* JM109 (ver adelante).

NOMBRE	SECUENCIA	N° BASES	TM °C
o-prox-1	CGGAGCTCAGGTGGCGTCGGAAGGA	25	78
o-prox-2	CGGAGCTCTTAACTCTTGCACAGACTTGGC	30	72.7
o-pr12f	GGAGCTCGATCCAACCTTGTGCTTTTTTAA	29	69.5
o-pr12r	CAATTATATGAAAATCCCTCCCCATTCC	29	68.9
o-pr13f	GAGCTCGGTACCCCTAAAAAATTTTG	27	65.7
o-pr13r	CCGCGGGCGAAACAAAAGACC	21	71.7
o-pr14r	CCGCGGACACCGATTCTTCC	21	72
o-pr15r	CCGCGGTGGGCCACCGGAGAGA	22	79.7
o-pr16r	CCGCGGATACCGCTCCATGATG	22	72.5
o-pr17r	CCGCGGCATGATGTACTAGACACAAATG	28	71.4
o-pr20f	GAGCTCTTTTTGCAATTTTTGGGTACCCC	30	70.9
o-pr21f	GAGCTCTTTTTGATGATTCGGGAGGATTT	30	70.9
o-pr22f	GAGCTCATTTTTGGAGTTTCCGGGGTTC	27	71.7
o-pr23f	GAGCTCTCCGGGGTTCGATCCAACCTTG	27	74.5
M13-20 MOD	GTAAAACGACGGCCAGTGAATTGTAATCA	29	69.1
Luc-sense	CGCATGGATCCACCATGGAAGACGCCA	28	59
Luc-reverse	CGCATGGATCCACTCTAGAATTACACGGCG	30	59

Tabla 2. Secuencias de oligonucleótidos usados para amplificar diferentes fragmentos de la región promotora. Se indican el nombre y el número de pares de bases de cada uno de los oligonucleótidos y la temperatura de anillaje (TM) se estimó utilizando el programa DNAMAN.

4.2.6. Preparación de células competentes por cloruro de calcio.

Cinco mililitros de medio LB fueron inoculados con una asada de un cultivo criopreservado de *E.coli* JM109 y se dejó toda la noche a 37°C. A partir de este cultivo, se realizó una dilución 1:80 en un volumen final de 100 ml de LB. Este cultivo se incubó a 37°C por 2 horas y media. Este cultivo se dividió en 4 tubos de 30 ml que fueron centrifugados a 5000 rpm por 5 minutos a 4°C (Rotor SS34). Posteriormente se eliminó el sobrenadante y las células se resuspendieron en la mitad del volumen inicial con cloruro de calcio 0.1M frío. Las células se colocaron en hielo durante 1 hora y se centrifugaron a 5000 rpm por 10 minutos a 4°C. El sobrenadante fue eliminado y las células fueron resuspendidas en 1/10 del volumen inicial del medio de cultivo con cloruro de calcio 0.1 M frío. La transformación se llevó a cabo 2 horas después de su incubación a 4°C.

4.2.7. Preparación de células electrocompetentes

La preparación de estas células toma tres días. **Día 1:** Se siembra una caja de LB agar por aislamiento con la cepa de *E.coli* JM109 criopreservada y se incuba toda la noche a 37°C. **Día 2:** Se inoculan 50 ml de medio SOB sin magnesio (24 g de Bactotripton, 6 g de extracto de levadura y 0.7 g de cloruro de sodio para 1200 ml de medio a pH 7.0) con 6 colonias grandes de la caja crecida el día anterior y se incuba toda la noche a 37°C en agitación continua. **Día 3:** Se toman 0.5 ml del cultivo de *E.coli* JM109 crecido toda la noche y se inoculan en un frasco de 2.8 litros con 500 ml de medio SOB sin magnesio. Se incuba a 37°C en agitación vigorosa hasta obtener una DO de 0.8 al leer en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 550 nm, lo que equivale a 2 o 3 horas de incubación. Posteriormente se colocan los 500 ml del cultivo en dos botellas cada una con capacidad para 250 ml. Se cosechan las células por centrifugación a 5000 rpm en un rotor GSA por 10 minutos a 4°C (Centrifuga Sorvall). Se desecha el sobrenadante por decantación y se lava el pellet

resuspendiéndolo en 500 ml de WB (glicerol al 2% en agua bidestilada estéril) frío. Se centrifuga de nuevo a 5000 rpm por 20 minutos a 4°C. El pellet se vuelve a lavar con 500 ml de solución WB y finalmente se resuspende el pellet en 1 ml de solución WB y se alicuota en tubos Eppendorf cada uno con 200 µl de células. Se guarda a -70°C hasta su uso.

4.2.8. Transformaciones en *E.coli* JM109 por choque térmico.

Los productos de las ligaciones que generaron nuevas construcciones plasmídicas se transformaron en las células de *E.coli* JM109 competentes con cloruro de calcio de la siguiente manera:

En un tubo Eppendorf de 1.5 ml se adicionaron 200 µl de células competentes JM109 y DNA dependiendo de las siguientes condiciones:

- a) Control positivo (50 ng de pBluescript)
- b) Control negativo (sin DNA)
- c) DNA plasmídico de interés

Los tubos se incubaron a 4°C por 30 minutos después de los cuales se procedió a hacer el choque térmico colocando las células a 42°C por 45 segundos para posteriormente llevarlos a hielo por 2 o 3 minutos. Inmediatamente se agregaron 0.8 ml de medio SOC (5ml de SOB + 100µl de dextrosa 1M) y las células transformadas se incubaron a 37°C por 50 minutos. Después del tiempo de incubación las células fueron espatuladas a diferentes diluciones en cajas de agar de LB con ampicilina (100 µg/ml) para ser incubadas toda la noche a 37°C.

4.2.9. Electrotransformación de *E.coli* JM109.

Se adicionó la mezcla de ligación a un tubo de células electrocompetentes recién descongeladas. Se mezclaron y se pasaron a una celda para electroporación previamente enfriada. Se electroporó con un voltaje de 2.46 kilovoltios y una longitud de pulso de 10 milisegundo (Cell Porator *E.coli* Pulser). Se recuperaron las células de la celda añadiendo 800 μ l de medio SOC (SOB suplementado con glucosa) y pasándolas a un tubo Eppendorff de 1.5 ml estéril. Se incubó por 1 hora a 37°C en agitación y posteriormente se espatuló en cajas de LB con ampicilina (100 μ g/ml) para ser incubadas toda la noche.

Se utilizaron los mismos controles que en el protocolo de transformación por choque térmico.

4.2.10. Preparación de DNA a pequeña escala (minipreparaciones)

Después de transformar es importante caracterizar cual de las colonias resultantes contienen el plásmido de interés. Para este fin se hicieron extracciones de DNA plasmídico por el método de lisis alcalina. De las colonias resultantes de la transformación, se escogieron al azar algunas y se crecieron en 3 ml de medio LB con una concentración final de 100 μ g/ ml de ampicilina (o 50 μ g/ml para el caso de células con el vector pCR-Blunt II-TOPO) a 37°C toda la noche. Al otro día el cultivo se centrifugó a 14000 rpm durante 30 segundos (Centrifuge 5415D- Eppendorf), el sobrenadante se desechó y el pellet celular se resuspendió en 100 μ l de solución de resuspensión fría (glucosa 500 mM, Tris-HCl 25 mM pH 8.0 y EDTA 10 mM pH 8.0). Se dejó en hielo por cinco minutos al final de los cuales se agregaron 200 μ l de solución de lisis (NaOH 0.2 N, SDS 1%) a temperatura ambiente y se mezclaron los tubos por inversión. Después de una incubación en hielo durante tres minutos, se añadió a los tubos 150 μ l de solución neutralizante fría (acetato de potasio 5 M, ácido acético glacial en agua

destilada). Se mezclaron de nuevo por inversión, se dejaron cinco minutos en hielo y finalmente se centrifugaron a 14000 rpm por 5 minutos. El sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo y se realizaron dos extracciones orgánicas, la primera fenol-cloroformo en una relación 1:1 y la segunda únicamente con un volumen de cloroformo. Cada extracción fue seguida de una centrifugación por 5 minutos a 14000 rpm, después de la cual se recuperó la fase acuosa. El DNA plasmídico se recuperó, de la última fase acuosa por precipitación de ésta con 2.5 volúmenes de etanol a -20°C por 2 horas. Pasado este tiempo, las muestras se centrifugaron por 10 minutos a 14000 rpm (Centrifuge 5415D- Eppendorf), se eliminó el sobrenadante y el pellet se lavó con etanol al 70%, después de lo cual se dejó secar el DNA plasmídico por 2 minutos a temperatura ambiente. Finalmente el DNA se resuspendió en 50 μl de TE con RNasa (Tris 10mM pH 7.4, EDTA 0.2 mM pH 7.2, RNasa 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$) y se incubó a 37°C por una hora. Las minipreparaciones así obtenidas se corrieron en un gel de agarosa al 0.8% con el fin de ver la integridad de la muestra y estimar su concentración aparente. Los diferentes plásmidos fueron digeridos con enzimas de restricción con el fin de caracterizar e identificar las clonas que poseen el plásmido recombinante de interés.

4.2.11. Preparación de DNA a mediana escala (midipreparaciones)

Para preparar DNA plasmídico de mayor pureza, se utilizó el protocolo recomendado por QIAGEN (QIAGEN plasmid purification kit), que se basa en una modificación del método de extracción de DNA plasmídico por lisis alcalina.

De un cultivo de 100 ml de bacterias transformadas con el plásmido de interés en LB con ampicilina a una concentración de 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ y mantenidas toda la noche a 37°C , se obtuvo un pellet de células por centrifugación a 6000 rpm por 15 minutos a 4°C en un rotor Sorvall SS34. El sobrenadante fue eliminado y el pellet de células se trató de acuerdo a las instrucciones dadas por la casa

comercial. El DNA obtenido fue resuspendido en 200 μ l de agua desionizada estéril y su integridad fue evaluada en un gel de agarosa al 0.8%. Además se determinó la pureza y la concentración de DNA por espectrofotometría a 260 y 280 nm.

4.2.12. Construcciones plasmídicas.

Se construyeron plásmidos que poseen diversos tamaños de la región promotora del DNAr. Estas fueron clonadas en el vector pTEX-*cat* que posee el gen *neo* (que confiere resistencia a geneticina), el gen *cat* (que codifica para la enzima cloranfenicol acetil transferasa) al igual que las regiones corriente arriba, corriente abajo e intergénica del gen que codifica para la gliceraldehido fosfato deshidrogenasa (*gapdh*) (Ver figura 9).

Dado que se cuenta con la secuencia completa de la región promotora para hacer los acotamientos de ésta, se hicieron cortes con enzimas de restricción en diferentes sitios presentes en la región promotora o se amplificaron regiones de interés por PCR. Los fragmentos así generados se ligaron en el plásmido pTEX-*cat*, utilizando para ello la enzima T4 ligasa. Un segundo recurso utilizado fue rellenar extremos sobresalientes con el fragmento Klenow de la DNA polimerasa para generar extremos romos de DNA, y ligar productos de enzimas no compatibles.

Los plásmidos se construyeron de la siguiente manera:

pRIBO4-*cat*: el inserto de 806 pb, de *SacI* a *Hin*clI, fue purificado de la clona pRTC19 (Martínez-Calvillo et al., 1994) y clonado en pTEX-*cat* (Kelly J.M. et al., 1992) digerido con *SacI* y *SacII* (tratado con la enzima Klenow para convertirlo en extremo romo).

pRIBO5-cat: el inserto de 806 pb fue purificado del vector pTRAP-8 (Hernández R. y col. no publicado) cortando con las enzimas *SacI* y *HindIII* (rellenado con Klenow) y ligado en pTEX-cat digerido con *SacII* y *SacI* (tratado con Klenow).

pRIBO6-cat: El fragmento de 629 pb se obtuvo de p Δ ER172 (Hernández R. y col. , no publicado) digiriéndolo con las enzimas *SmaI* y *SacI*, y se ligó en pTEX-cat digerido con *SacI* y *SacII* (tratado con Klenow).

pRIBO8-cat: El inserto de 540 pb se purificó de pRTC19 digiriendo este plásmido con *SacI* y *SacII* y fue ligado en pTEX-cat digerido con las mismas enzimas.

pRIBO9-cat: El plásmido pRIBO6-cat se digirió con las enzimas *SacII* (tratado con Klenow) y *HincII* y religado con la enzima T4 ligasa.

pRIBO10-cat: se cortó pRIBO4-cat con las enzimas de restricción *KpnI* y *HindIII* las cuales liberaron un inserto de 1536 pb. Como un paso intermedio se ligó en el plásmido pUC18 en los sitios *KpnI* y *HindIII* (plásmido p6). El plásmido p6 se digirió con las enzimas *SacI* y *HindIII* y se ligó en pRIBO4-cat digerido con las mismas enzimas, previa liberación del inserto *SacI* – *HindIII* que incluye la región de DNAr, *gapdh* y *cat*.

pPROX1-cat: Se ligó el fragmento de 1514 pb producto de la digestión de pRIBO4-cat con *SacII* y *HindIII* en pTEX-cat digerido con las mismas endonucleasas.

Los siguientes plásmidos se construyeron amplificando por PCR las regiones de interés, subclonando en el plásmido pCR-Blunt II-TOPO (Stratagene) y sacando el inserto de interés con las enzimas *SacI* y *SacII*. En fragmento obtenido se clonó posteriormente en el plásmido pRIBO4-cat digerido con las mismas enzimas.

pRIBO12-cat: Contiene un fragmento de 254 pb que se amplificó por PCR utilizando los oligonucleótidos o-pr12f y o-pr12r. Contiene las secuencias entre los nucleótidos -47 a +207 con respecto al tsp distal.

pRIBO13-cat: Un fragmento de 179 pb se amplificó con los oligonucleótidos o-pr13f y o-pr13r. Contiene las secuencias entre los nucleótidos -79 a +100 con respecto al tsp distal.

pRIBO14-cat: Contiene un fragmento de 129 pb que se amplificó por PCR utilizando los oligonucleótidos o-pr13f y o-pr14r. Contiene las secuencias entre los nucleótidos -79 a +207 con respecto al tsp distal.

pRIBO15-cat, Un fragmento de 104 pb se amplificó con los oligonucleótidos o-pr13f y o-pr15r. Contiene las secuencias entre los nucleótidos -79 a +25 con respecto al tsp distal.

pRIBO16-cat: Contiene un fragmento de 89 pb se amplificó por PCR utilizando los oligonucleótidos o-pr13f y o-pr16r. Contiene las secuencias entre los nucleótidos -79 a +10 con respecto al tsp distal.

pRIBO17-cat: Un fragmento de 89 pb se amplificó con los oligonucleótidos o-pr13f y o-pr17r. Contiene las secuencias entre los nucleótidos -79 a +1 con respecto al tsp distal.

pRIBO19-cat: Contiene un fragmento de 198 pb se amplificó por PCR utilizando los oligonucleótidos M13-20mod y o-pr12r. Contiene las secuencias entre los nucleótidos -47 a +207 con respecto al tsp distal.

pRIBO20-cat: Un fragmento de 307 pb se amplificó con los oligonucleótidos o-pr20f y o-pr12r. Contiene las secuencias entre los nucleótidos -100 a +207 con respecto al tsp distal.

pRIBO21-cat: Un fragmento de 327 pb se amplificó con los oligonucleótidos o-pr21f y o-pr12r. Contiene las secuencias entre los nucleótidos -120 a +207 con respecto al tsp distal.

pRIBO22-cat: El fragmento de 79 pb con la secuencia entre los nucleótidos -69 y +10 con respecto al tsp distal, se obtuvo de la amplificación del DNA plasmídico de pRIBO4-cat con los oligonucleótidos o-pr22f y o-pr16r.

pRIBO23-cat: Contiene las secuencias entre los nucleótidos -59 a +10 con respecto al tsp distal y es el producto de una amplificación de DNA por PCR utilizando los oligonucleótidos o-pr23f y o-pr16r.

pRIBO24-cat: Contiene un fragmento de 57 pb se amplificó por PCR utilizando los oligonucleótidos o-pr12f y o-pr16r. Contiene las secuencias entre los nucleótidos -47 a +10 con respecto al tsp distal.

pPROX2-cat: El fragmento contiene la secuencia entre los nucleótidos +250 y +200 con respecto al tsp proximal en polaridad directa. Se obtuvo de la amplificación del DNA plasmídico de pRIBO4-cat con los oligonucleótidos o-prox2 y o-prox3 que contienen el sitio de restricción para la enzima *SacI* (GibcoBRL) y se clonó en el plásmido pTEX-cat cortado con la misma enzima.

pPROX3-cat: El fragmento contiene la misma secuencia del plásmido pPROX2-cat en polaridad indirecta.

4.2.13. Construcción del plásmido de co-transfección pRIBO16-luc

El gen reportero *luc* se amplificó por PCR utilizando los oligonucleótidos Luc-sense y Luc-reverse (Tabla 2) y el plásmido pGL3-basic (Promega), que contiene la secuencia codificadora para este gen. El fragmento amplificado de

1650 pb se subclonó en el plásmido pCR-Blunt II-TOPO (Stratagene) y el plásmido resultante se digirió con las enzimas *SpeI* y *XhoI*. El fragmento liberado se clonó en un plásmido derivado de pTEX-*cat* que contiene la secuencia de -79 a +10 con respecto al *tsp* distal, de la región promotora de los genes de DNAr de *T.cruzi* La Cruz Jalisco digerido con las mismas enzimas.

4.2.14. Caracterización de insertos (Ensayos de restricción y secuenciación).

En todos los casos se corroboró que los plásmidos recombinantes contuvieran los insertos apropiados.

pRIBO4-*cat* se digirió con las enzimas *SacI* y *BamHI*, pRIBO5-*cat* con *SacII* y *KpnI*, pRIBO6-*cat* con *SacI* y *BamHI*, pRIBO8-*cat* y pRIBO10-*cat* con *SacI* y *SacII*, pPROX1-*cat* con *SacII* y *HindIII* y los plásmidos pPROX2-*cat* y pPROX3-*cat* con la enzima *SacI*. Todas las demás construcciones se digirieron con las enzimas *SacI* y *SacII* ya que los oligonucleótidos utilizados en las amplificaciones contienen sitios de corte para estas enzimas. Después de confirmar por restricción las construcciones plasmídicas, estas fueron secuenciadas (servicio comercial) para así corroborar que las clonas poseían la secuencia del promotor correcta. Esto se hizo por comparación de la secuencia clonada con la secuencia de nucleótidos del espaciador transcrito externo del DNA ribosomal de *T.cruzi* (Martínez-Calvillo S. et al., 1994. GenBank bajo el número de acceso L13926).

4.3. Construcción de los plásmidos mutantes en la región del *tsp* distal

El plásmido pRIBO4-*cat* que contiene un fragmento de DNAr de 806 pb de la cepa La Cruz Jalisco (grupo *T.cruzi* I) con actividad promotora, considerado en

este trabajo como el plásmido de referencia fue utilizado para generar diferentes plásmidos mutantes en la región del sitio de inicio de la transcripción distal. Estos plásmidos mutantes se construyeron utilizando el kit QuickChange Site-Directed Mutagenesis (Stratagene) y los oligonucleótidos descrito en la Tabla 3. Todos los plásmidos se confirmados por secuenciación. El protocolo de mutagénesis contiene los siguientes pasos:

Paso 1: Sintetizar dos oligos complementarios que contengan la mutación deseada, flanqueada por secuencias de nucleótidos no modificada (Tabla 3).

Paso 2: Realizar la mezcla de reacción para la amplificación del plásmido. Esta mezcla contiene 2.5 μ l del buffer de reacción (10X), 1 μ l de plásmido pRIBO4-*cat* (50 ng/ μ l), 125 ng de cada uno de los oligonucleótidos, 0.5 μ l de la mezcla de dNTPs, 0.5 μ l de la DNA polimerasa *Pfu Turbo* y se lleva a 25 μ l con agua bidestilada estéril. El PCR se realiza de manera similar a la señalada anteriormente en la metodología (Amplificación por PCR de fragmentos de interés). La diferencia radica en que se realizan 12 rondas de amplificación cada una con un tiempo de extensión de 14.4 minutos (2 minutos por kilobase del plásmido).

Paso 3: Adicionar 0.5 μ l de la enzima de restricción *DpnI* a la reacción de amplificación e incubar por 1 hora a 37°C para digerir el DNA parental el cual se encuentra metilado.

Paso 4: Transformar el producto de amplificación en células de *E.coli* XL1-blue supercompetentes (incluidas en el kit de mutagenesis), espatular en cajas de LB con ampicilina (100 μ g/ml) e incubar toda la noche a 37°C.

Paso 5: Extraer DNA plasmídico y corroborar la presencia de la mutación por secuenciación.

NOMBRE	SECUENCIA	TM °C
of-tsp-6	GTCCATTTGTGTCTAGTAAATCATGGAGCGGTATTCTCTCCGGTG	79.4
or-tsp-6	CACCGGAGAGAATACCGCTCCATGATTTACTAGACACAAATGGAC	79.4
of-tsp-5	GTCCATTTGTGTCTAGTACCTCATGGAGCGGTATTCTCTCCGGTG	80.7
or-tsp-5	CACCGGAGAGAATACCGCTCCATGAGGTACTAGACACAAATGGAC	80.7
of-tsp-4	GTCCATTTGTGTCTAGTACAGCATGGAGGCGGTATTCTCTCCGGTG	82.3
or-tsp-4	CACCGGAGAGAATACCGCTCCATGCTGTACTAGACACAAATGGAC	82.3
of-tsp-3	GTCCATTTGTGTCTAGTACATTTATGGAGGCGGTATTCTCTCCGGTG	79.5
or-tsp-3	CACCGGAGAGAATACCGCTCCATTTATGTACTAGACACAAATGGAC	79.5
of-tsp-2	GTCCATTTGTGTCTAGTACATCCTGGAGCGGTATTCTCTCCGGTG	80.7
or-tsp-2	CACCGGAGAGAATACCGCTCCAGGATGTACTAGACACAAATGGAC	80.7
of-tsp-1	GTCCATTTGTGTCTAGTACATCAGGGAGCGGTATTCTCTCCGGTG	80.7
or-tsp-1	CACCGGAGAGAATACCGCTCCCTGATGTACTAGACACAAATGGAC	80.7
of-tsp+1	GTCCATTTGTGTCTAGTACATCATTTGAGCGGTATTCTCTCCGGTG	79.2
or-tsp+1	CACCGGAGAGAATACCGCTCAATGATGTACTAGACACAAATGGAC	79.2
of-tsp+2	GTCCATTTGTGTCTAGTACATCATGTAGCGGTATTCTCTCCGGTG	78.1
or-tsp+2	CACCGGAGAGAATACCGCTCATGATGTACTAGACACAAATGGAC	78.1
of-tsp+3	GTCCATTTGTGTCTAGTACATCATGGCGCGGTATTCTCTCCGGTG	82.5
or-tsp+3	CACCGGAGAGAATACCGCGCCATGATGTACTAGACACAAATGGAC	82.5
of-tsp+4	GTCCATTTGTGTCTAGTACATCATGGAICGGTATTCTCTCCGGTG	79.2
or-tsp+4	CACCGGAGAGAATACCGATCCATGATGTACTAGACACAAATGGAC	79.2
of-tspΔ6	GTCCATTTGTGTCTAGTACAGACGTTAGCGGTATTCTCTCCGGTG	78.6
or-tspΔ6	CACCGGAGAGAATACCGCTAACGCTGTACTAGACAACAAATGGAC	78.6

Tabla 3. Secuencias de los oligonucleótidos usados para realizar la mutagénesis dirigida de la región del sitio de inicio de transcripción. Se indican el nombre y la temperatura de anillaje (TM) se estimó utilizando el programa DNAMAN. El nucleótido que ha sido cambiado se muestra subrayado. El sitio de inicio de la transcripción distal (Martínez-Calvillo et al., 1994) se señala con la letra en negrilla.

4.4. Transfección de *T.cruzi* por electroporación

Se cultivaron epimastigotes de *T.cruzi* CL Brener hasta una concentración de $35\text{-}50 \times 10^6$ células por mililitro. El volumen requerido fue calculado considerando que se necesitan 400 μl de células a una concentración de 6×10^8 células por mililitro, es decir 240 millones de células por cada electroporación. El cultivo se transfirió a un tubo de 50 ml y se centrifugó a 5000 rpm durante 8 minutos a 4°C . El sobrenadante se retiró y el precipitado se resuspendió en 10 ml de solución de Zimmerman estéril fría. Para un litro de solución de Zimmerman se adicionan 7.7 gr de NaCl, 0.59 gr de KCl, 1.13 gr de Na_2HPO_4 , 0.204 gr de KH_2PO_4 , 0.107 gr de acetato de magnesio 0.0142 gr de ácido de calcio a un pH de 7.0.

La suspensión celular se centrifugó de nuevo a 5000 rpm por 8 minutos y las células se resuspendieron en solución de Zimmerman de tal forma que la concentración de células quedara a 6×10^8 células por mililitro. Las células deben ser mantenidas en hielo. 400 μl de células fueron depositadas en una celdilla de electroporación y se colocaron en hielo. Se agregó posteriormente 10 μg del plásmido de interés disuelto en TE (Tris 10 mM, EDTA 0.2 mM) y se colocaron en hielo por otros 5 minutos. En algunos casos se adicionó además 5 μg del plásmido de co-transfección pRIBO16-*luc*. La electroporación se realizó a 360 voltios, 1500 microfaradios y 13 ohms (Electro Cell Manipulator 600, BTX Electroporation System). Las células se mantuvieron a temperatura ambiente por 5 minutos para ser transferidas a 10 ml de medio LIT complementado con suero y hemina.

Después de ser incubadas a 28°C durante 3 días, los parásitos fueron procesados para realizar el ensayo CAT y el ensayo de luciferasa.

Los controles incluidos corresponden a parásitos transfectados con pTEX-*cat*, pRIBO4-*cat*, pRIBO16-*luc* y parásitos transfectados sólo con buffer (sin DNA).

Esta técnica se encuentra estandarizada en el laboratorio del Doctor Roberto Hernández.

4.5 Ensayos CAT

4.5.1. Mediciones de la actividad enzimática y estandarización de las condiciones

El gen reportero *cat* presente en las construcciones plasmídicas codifica para la enzima cloranfenicol acetil transferasa (CAT) que cataliza la transferencia de un grupo acil de cualquier cofactor acil CoA al cloranfenicol (Current protocols in Molecular Biology, 1990). El ensayo CAT consistió en la medición de la actividad de esta enzima. Cuando la enzima CAT transfiere un grupo acil o butiril al cloranfenicol, éste se vuelve más hidrofóbico y es recuperable por medio de una extracción orgánica (Seed B. et al., 1988).

Para realizar los ensayos CAT, se transfirieron 5 ml del cultivo electroporado a tubos nalgene para ser centrifugados a 5000 rpm por 5 minutos (4 °C). El sobrenadante fue eliminado y el pellet resuspendido en 1 ml de TEN (Tris 40 mM a pH 8.0, EDTA 1mM pH 8.0 y NaCl 15 mM estéril y a temperatura ambiente). Esta suspensión fue transferida a tubos Eppendorf y centrifugada durante 7 segundos a 13000 rpm. El sobrenadante fue retirado y el precipitado resuspendido de nuevo en 1 ml de TEN. Se centrifugó por 7 segundos, el sobrenadante retirado y resuspendido el pellet en 150 µl de Tris 25 mM pH 8.0.

Las células fueron lisadas con tres ciclos de congelación-descongelación en nitrógeno líquido (después descongelar a 37 °C). Después de una incubación luego a 65 °C durante 10 minutos se centrifugo el material a 13000 rpm por 10 minutos a 4 °C. Se transfirieron 100 µl del extracto y se almacenaron a -70 °C.

La concentración de proteínas del extracto de parásitos transfectados, fue realizada utilizando el método de Bradford (BioRad), se realizó una curva patrón con albúmina sérica bovina (BSA) como referencia. Se partió de un stock de BSA de 1 mg/ml y se realizaron diluciones seriadas para obtener 5, 10, 15, 20 y 25 μg de BSA en 1 ml de buffer fosfato pH 7.4. Los extractos fueron diluidos 1:200 en buffer fosfato pH 7.4. De estas muestras se tomaron 160 μl , se colocaron en placas de 96 pozos y se incubaron por 5 minutos con 40 μl de reactivo de Bradford. Posteriormente se leyó absorbancia a 595 nm y se determinó la concentración de proteínas, como referencia a la curva patrón.

Los ensayos CAT se realizaron siguiendo el protocolo que se describe a continuación.

Se mezclaron 5 μg (o diferencias indicadas en el texto) de extracto celular en un volumen final de 50 μl de Tris 25mM pH 8.0 con 50 μl de mezcla maestra. La mezcla maestra contiene 20 μl cloranfenicol- H^3 0.01 $\mu\text{Ci}/\mu\text{l}$, 10 μl de Butiril-CoA 2.5 mM, 10 μl de Tris 1 M pH8.0 y 10 μl de agua desionizada. Ésta mezcla se incubó a 37 °C por 30 minutos (o diferencias indicadas en el texto). Pasado este tiempo se añadieron 210 μl de xileno, se mezcló con el vortex por 15 segundos y se centrifugó por 2 minutos a 14000 rpm. Se tomaron 180 μl de xileno (fase superior o fase orgánica) y se colocaron en un tubo nuevo. La fase acuosa se extrajo de nuevo añadiendo 210 μl de xileno, haciendo vortex y centrifugando por 2 minutos a las mismas rpm. Se tomaron 200 μl de xileno y se colocaron en el tubo donde estaban los 180 μl de xileno. Éstos 380 μl de xileno se extrajeron con 250 μl de Tris 25 mM, se tomaron 330 μl de xileno y se colocaron en otro tubo. Se extrajo nuevamente con 250 μl de xileno y se agregaron a un vial con 1.5 ml de líquido de centelleo. Finalmente se leyó en el contador de centelleo. Todas las muestras fueron realizadas por duplicado, graficadas y el error estándar de la media se estableció en el programa EXCEL.

4.6. Ensayos de Luciferasa

El plasmido de co-transfección pRIBO16-*luc* utilizado en este trabajo contiene como reportero el gen que codifica para la enzima Luciferasa.

Para este ensayo fue necesario preparar solución KTME. Para 500 ml de ésta solución se requieren 8.96 g de Tricina, 0.602g de $MgSO_4$ y 2 ml de EDTA. Se llevó a un volumen a 500 ml con agua bidestilada estéril y se ajustó el pH a 7.8 con KOH.

5 ml del cultivo de parásitos transfectados se transfirieron a un tubo Falcon de 15 ml para ser centrifugados a 3000 rpm por 10 minutos (Beckman coulter allegra 2IR centrifuge). El pellet se lavó dos veces con 10 ml de PBS pH 7.0. El precipitado se resuspendió en 1 ml de PBS pH 7.0, se transfirió a un tubo Eppendorf de 1.5 ml y se centrifugó por 2 minutos a 13.000 rpm (Centrifuge 5415D- Eppendorf). Se retiró el sobrenadante, el pellet se resuspendió en 200 μ l de buffer de lisis (NaEDTA 2mM, fosfato de potasio 0.1M pH 7.8, Triton X-100 1% y DTT 1mM) y se incubó a 4°C por 20 minutos. Se centrifugó nuevamente a 13000 rpm por 5 minutos y 30 μ l del sobrenadante se transfirieron a un tubo Eppendorf de 1.5 ml. La muestra se llevó a 100 μ l con buffer de lisis. En tubos de lectura para luminómetro se adicionaron 25 μ l de la solución de reacción que contiene KTME y DTT 1M. Se adicionaron en este momento los 100 μ l de la muestra y 100 μ l de una mezcla de reacción que contiene KTME, DTT 1M, luciferina y ATP. Inmediatamente se evaluó la actividad del sobrenadante en el luminómetro (Monoligth™ 3010, Pharmigen-Becton Dickinson Company). Todas las mediciones se realizaron por duplicado.

5. RESULTADOS

5. RESULTADOS

5.1. Establecimiento del sistema de estudio

En la primera etapa del estudio se preparó el vector base, sobre el cual se habrían de hacer las modificaciones de la secuencia promotora DNAr para acotar su función. El plásmido pTEX-*cat* presenta una actividad de CAT apenas superior al fondo. Este contiene las secuencias necesarias para el procesamiento del gen reportero por “trans-splicing” (región 5’ del gen *gapdh*) y para la poliadenilación en la región intergénica del gen *gapdh*. Dada la naturaleza policistrónica de la transcripción en tripanosomas, no es un requisito que el promotor se encuentre adyacente al gen transcrito bajo su influencia. Así pues, se decidió insertar la secuencia promotora ribosomal, en el extremo 5’ de la región corriente arriba del gen *gapdh* presente en pTEX-*cat* (Kelly J.M. et al., 1992), y dejar ésta como una secuencia natural para recibir el exón del “spliced leader”. La Figura 10 muestra el mapa del plásmido pRIBO4-*cat* el cual se construyó insertando una región de 806 pb con actividad promotora de los genes de DNAr en el plásmido pTEX-*cat*, en los sitios de restricción para las enzimas *SacI* y *SacII*. Este plásmido contiene la región promotora de mayor tamaño utilizada en este trabajo y su actividad de CAT en tripanosomas transfectados con éste plásmido, representa una referencia del 100% en los ensayos realizados con versiones deletadas de ésta región de 806 pb.

5.2. Establecimiento de condiciones de linealidad en el ensayo enzimático.

El gen reportero *cat* fue empleado para identificar cambios en la actividad del promotor DNAr, expresada en diferentes versiones moleculares de éste.

Para establecer condiciones de sensibilidad en nuestros ensayos CAT y detectar así pequeños cambios en los nivel de expresión del gen que codifica para esta enzima se decidió analizar diferentes condiciones de tiempo de reacción y de concentración de extracto proteico que permitieran analizar linealmente cambios en el producto de la actividad de CAT.

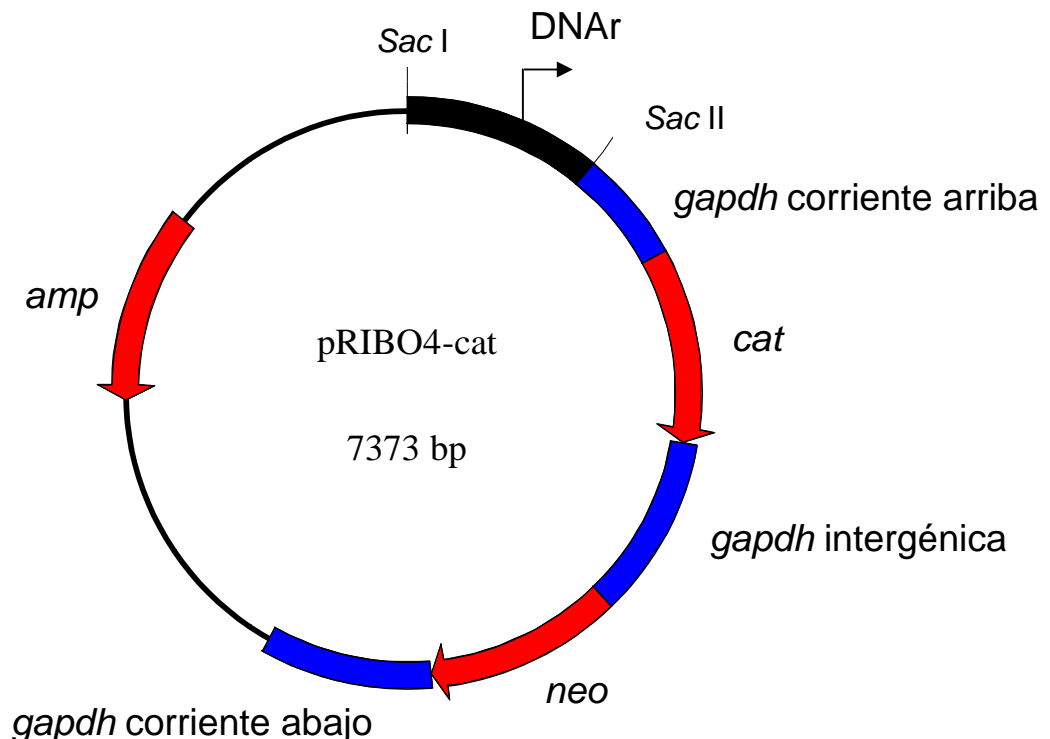


Figura 10. Plásmido de expresión pRIBO4-cat. Se muestra la secuencia de 806 pb con actividad promotora de DNAr clonada en los sitios *Sac I* y *Sac II* y las secuencias corriente arriba, corriente abajo e intergénicas de la *gapdh* (gliceraldehido fosfato deshidrogenasa), *cat* (gen que codifica para la cloranfenicol acetil transferasa), *neo* (gen que confiere resistencia a la geneticina) y *amp* (gen que codifica para la resistencia a ampicilina en *E.coli*). La flecha indica el sitio de inicio de la transcripción reportado por Martínez-Calvillo S. y col. 1994.

Como un primer acercamiento se decidió ver el comportamiento enzimático de CAT en el extracto celular de parásitos transfectados con el plásmido de referencia pRIBO4-*cat*, construcción que contiene la longitud mayor de la

secuencia con actividad promotora, utilizando 10 μg de extracto proteico a diferentes tiempos de reacción (Tabla 4, Fig. 11).

Tiempo en minutos	Cuentas por minuto	Error estándar de la media
0	0	0
10	40333	14256.3
15	44645	15779.1
20	57444	20302.4
30	63822	22553.9
40	75568	26703.2
60	72170	25494.7
90	73549	25971.7
120	80270	28337.3
150	76037	26830.1

Tabla 4. Actividad enzimática de CAT en 10 μg de extracto celular de parásitos transfectados con pRIBO4-cat. Las cuentas por minuto (cpm) equivalen al promedio de dos réplicas.

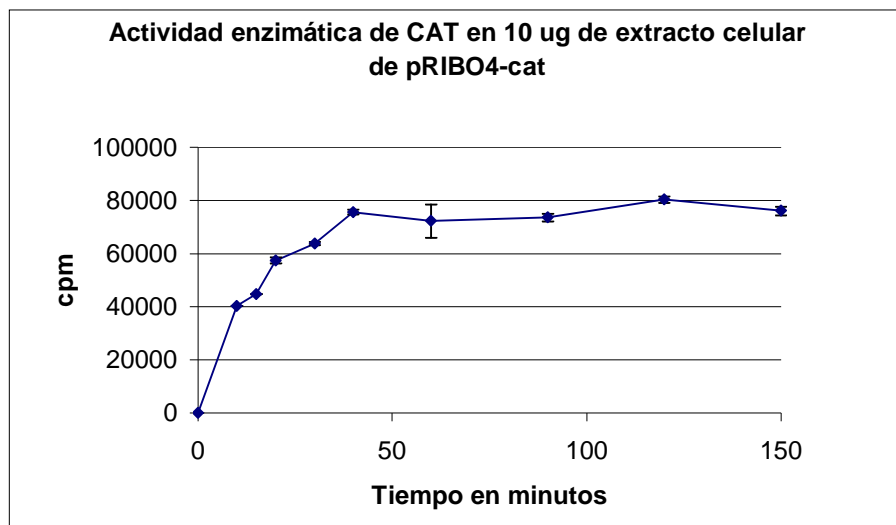


Figura 11. Curva de actividad enzimática de los datos presentados en la Tabla 4. cpm: cuentas por minuto.

Los datos de la Tabla 4, Fig. 11 nos muestran que entre 10 y 40 minutos la producción del producto (inferido por las cpm) se encuentra en condiciones de linealidad. Esta observación se amplió con el análisis del comportamiento de esta enzima a distintas concentraciones de extracto proteico de parásitos trasfectados con pRIBO4-*cat* (0.625 a 10 μ g) y a diferentes tiempos de reacción (0 a 60 minutos) (Tabla 5, Fig. 12).

Concentración (μ g)	Tiempo en minutos				
	7.5	15	30	45	60
0.625	1445	1991	3112.5	4147.5	5466
1.25	3109.5	4317.5	7156.5	9276	11922.5
2.5	6607.5	8920	14851.5	19323.5	22489
5	12230	16010	27493	34257	41418.5
10	24347.5	30126.5	45801	57121	60070

Tabla 5. Cuentas por minuto promedio de dos réplicas de ensayo CAT para diferentes concentraciones de extracto proteico de parásitos trasfectados con pRIBO4-*cat* a diferentes tiempos.

Como observamos en las gráficas entre 7.5 y 10 minutos hay una velocidad de reacción enzimática ligeramente diferente a la que se muestra en el resto de la curva. Probablemente la enzima se adapta a una velocidad de reacción menor, pero estable, por las nuevas condiciones donde se práctica el ensayo enzimático. De la observación de las curvas de actividad enzimática que se muestran en la Figura 12 se escogió realizar las mediciones enzimáticas con las diferentes versiones de la región promotora DNAr empleando 5 μ g del extracto proteico de parásitos trasfectados y 30 minutos de reacción.

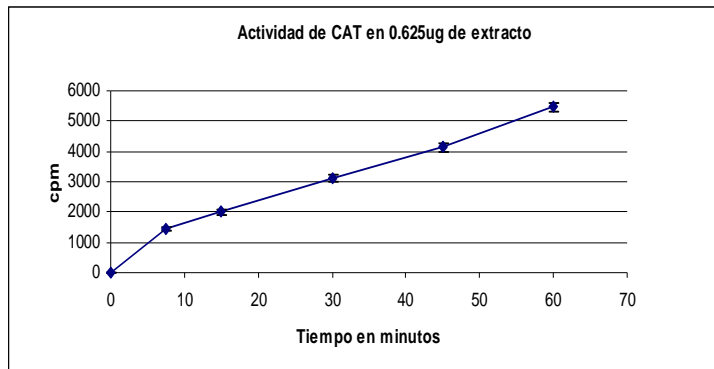
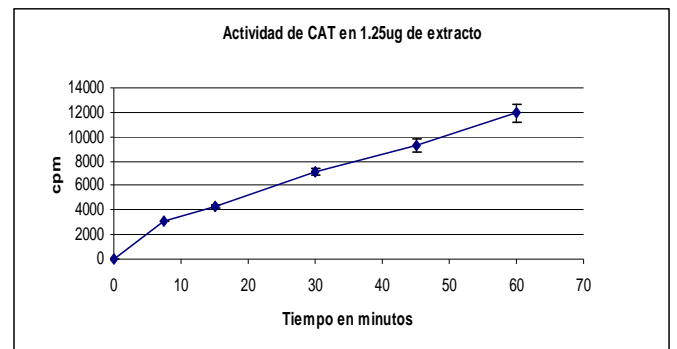
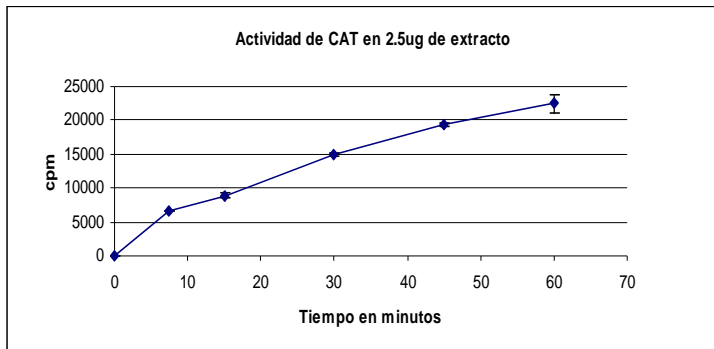
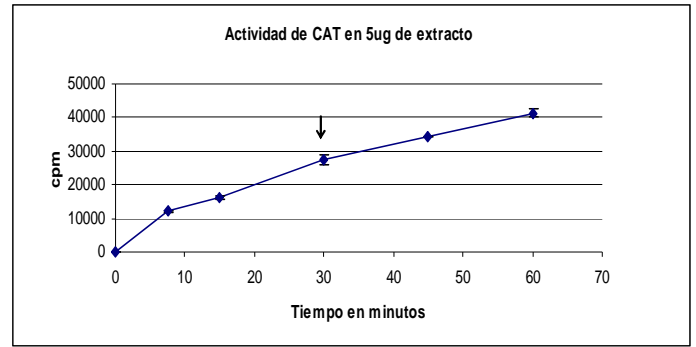
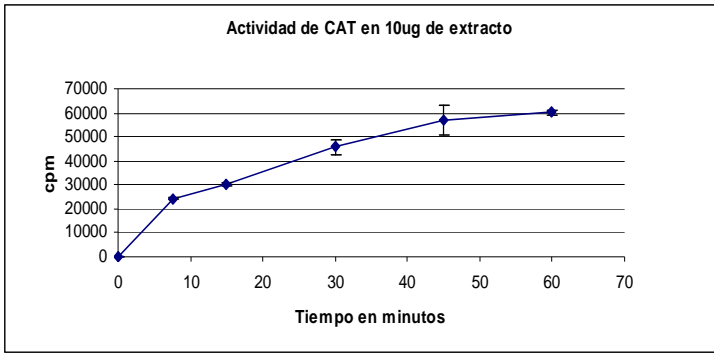


Figura 12. Determinación de la actividad enzimática de CAT a diferentes tiempos y concentraciones proteicas de extracto de parásitos *T.cruzi* transfectados con pRIBO4-cat. Las gráficas muestran las cpm (cuentas por minuto) a los diferentes tiempos (minutos). Los datos representan el promedio de dos réplicas y se muestran los errores estándares de la media como barras de error en cada una de las diferentes mediciones. La flecha (en la gráfica de 5µg de extracto proteico) indica la condición escogida para todos los experimentos posteriores.

5.3. Construcción y análisis de los plásmidos recombinantes con las diferentes versiones del promotor DNAr.

En la secuencia con actividad promotora de los genes de DNAr clonada en el plásmido pRIBO4-*cat*, se presentan varios elementos a estudiar: 1.) la dependencia de polaridad en la funcionalidad del promotor, 2.) una copia del elemento repetido de 172 pb y 3.) la funcionalidad de dos posibles sitios de inicio de la transcripción: distal (Martínez-Calvillo S. et al., 1994) y proximal (Dietrich P. et al., 1993) (Figura 13).

5.3.1. Dependencia de la polaridad y funcionalidad del sitio de inicio de la transcripción proximal.

El plásmido pRIBO4-*cat* fue utilizado en este estudio, como el plásmido de referencia con el 100% de actividad de la enzima CAT. La actividad presentada en los plásmidos derivados se comparó siempre con el plasmido de referencia. Por otro lado, el plásmido pTEX-*cat* no contiene secuencia promotora (Sin DNAr) y fue utilizado para determinar los niveles de fondo en los ensayos de transfección.

La primera modificación realizada en el plásmido pRIBO4-*cat* fue la clonación del fragmento de 806 pb en polaridad invertida (3'-5'), generando así el plásmido pRIBO5-*cat*. Esta construcción se hizo con el fin de determinar si la capacidad de dirigir la expresión del gen reportero por parte de esta región con actividad promotora, era dependiente de polaridad. De esta manera, se transfectaron epimastigotes de *T.cruzi* con los plásmidos control y el plásmido de interés y se determinó la actividad enzimática de CAT. Como se observa en la figura 13, la actividad CAT baja a niveles de fondo (Anexo 1). Esto muestra que la actividad del promotor de DNAr es dependiente de polaridad.

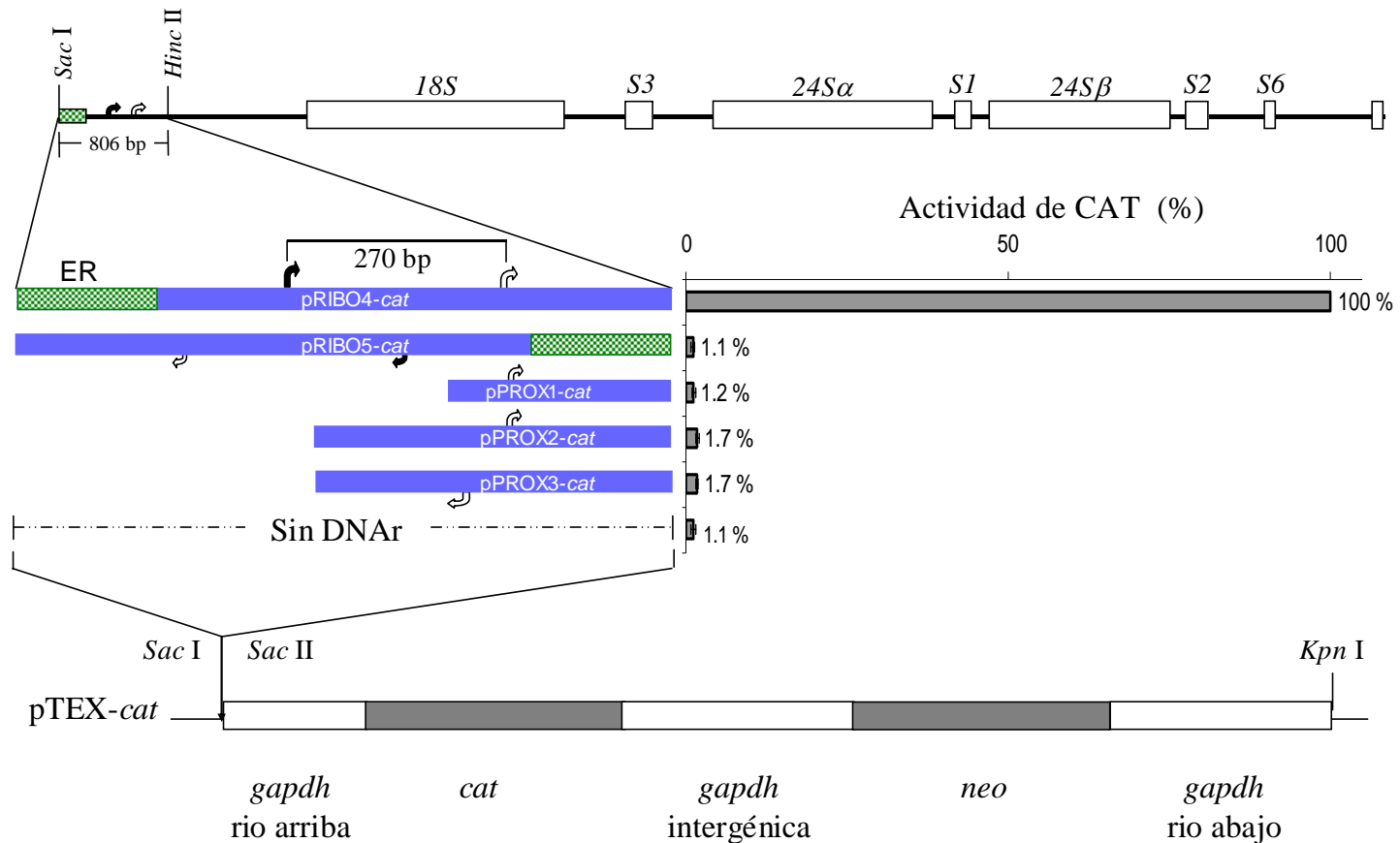


Figura 13. Dependencia de la polaridad y funcionalidad del sitio de inicio de la transcripción proximal. En la parte de arriba se muestra la organización del cistron ribosomal de *T.cruzi* y la secuencia de 806 pb contenida entre los sitios *Sac*I y *Hinc*II a partir de la cual se han hecho las deleciones. Se observan las diferentes construcciones plasmídicas en las cuales se ejemplifican los dos posibles sitios de inicio de la transcripción y una copia del elemento repetido de 172 pb. Se muestran también las actividades de CAT de al menos tres ensayos de transfección independientes. En la parte de debajo de la gráfica se observa el vector de clonación pTEX-*cat*. Flecha negra: *tsp* distal, flecha blanca: *tsp* proximal, ER:Elemento repetido, *gapdh*:gen de la gliceraldehido fosfato deshidrogenasa, *cat*: cloranfenicol acetil transferasa; *neo*: gen de resistencia a geneticina.

De igual manera analizamos el sitio de inicio de la transcripción proximal descrito por Dietrich y col. en 1993 con el fin de establecer la funcionalidad de éste. Se realizaron tres construcciones plasmídicas que contenían únicamente el tsp proximal. La construcción pPROX1-*cat* contenía las secuencias entre los sitios *SacII* y *HincIII* y presenta una actividad promotora similar al plásmido pTEX-*cat* (Figura 13, anexo1). Este plásmido contiene 65 pb corriente arriba del tsp, por lo tanto para asegurarnos que esta actividad de CAT a niveles de fondo no se debía a una eliminación de secuencias importantes del promotor, decidimos clonar una secuencia de 450 pb en el plásmido pTEX-*cat*. Este fragmento se clonó en las dos polaridades y presenta 250 pb corriente arriba del sitio de inicio de la transcripción proximal. De esta manera generamos los plásmidos pPROX2-*cat* y pPROX3-*cat* los cuales presentan una actividad enzimática de CAT a niveles de fondo (Figura 13, anexo 1). Por lo tanto, bajo éstas condiciones de estudio, el sitio de inicio de la transcripción proximal no parece contribuir a la actividad promotora.

5.3.2. Funcionalidad del sitio de inicio de la transcripción distal.

En nuestro laboratorio se había descrito un sitio de inicio de la transcripción ubicado corriente arriba del tsp descrito por Dietrich y col. (1993). A este sitio se le denominó tsp distal por su localización con respecto al extremo 5' del gen 18S (Martínez-Calvillo S. et al., 1994). El tsp distal se encuentra localizado a 270 pb corriente arriba del tsp proximal. Para determinar su funcionalidad se diseñó el plásmido pRIBO8-*cat* que contiene un fragmento 540 pb de la secuencia con actividad promotora (producto de la digestión de la secuencia promotora original con las enzimas *SacI* y *SacII*). Esta construcción contiene una copia del elemento repetido de 172 pb y el sitio de inicio de la transcripción distal.

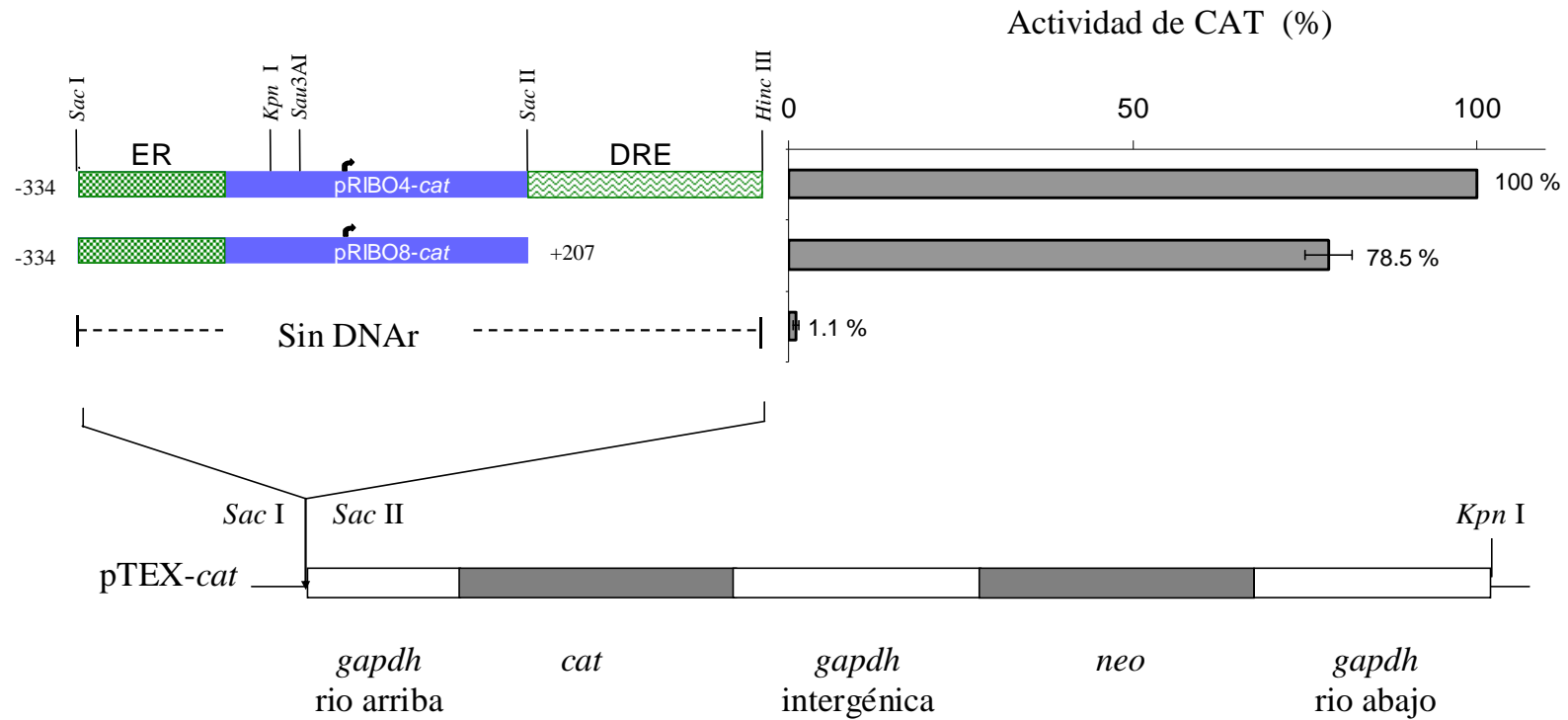


Figura 14. Funcionalidad del sitio de inicio de la transcripción distal. Se observan las construcciones plasmídicas realizadas para evaluar la funcionalidad del tsp distal. Se coloca como referencia el plásmido control pRIBO4-*cat* que presenta todos los elementos del promotor (dos posibles sitios de inicio de la transcripción y una copia del elemento repetido de 172 pb) y el plásmido pTEX-*cat*, el cual no tiene región promotora (Sin DNAr). Se muestran también las actividades de CAT de al menos tres ensayos de transfección independientes. En la parte de debajo de la gráfica se observa el vector de clonación pTEX-*cat*. Flecha negra: tsp distal, flecha blanca: tsp proximal, ER:Elemento repetido, DRE: Elemento regulador corriente abajo, *gapdh*: gen de la gliceraldehido fosfato deshidrogenasa, *cat*: cloranfenicol acetil transferasa; *neo*: gen de resistencia a la geneticina.

Cuando se transfectaron transitoriamente los epimastigotes de *T.cruzi* con esta construcción, encontramos una actividad de CAT del 80 % (Figura 14, anexo 1). Por lo tanto este tsp es funcional y el principal contribuyente de la actividad promotora de la clona original (pRIBO4-*cat*). La eliminación de las secuencias corriente abajo del sitio *SacII* (no del tsp proximal) generan sin embargo, una disminución en la actividad promotora de aproximadamente un 20 %. Esto nos sugiere la presencia de un elemento regulador localizado corriente abajo del tsp distal capaz de estimular la transcripción. A este elemento se le ha denominado elemento regulador corriente abajo o DRE por sus siglas en inglés (downstream regulating element) (Figura 14).

Los sitios de inicio de la transcripción, distal y proximal se reportaron de dos cepas distintas de *T.cruzi*. El tsp proximal fue descrito en la cepa CL la cual genéticamente pertenece al grupo *T.cruzi* II (Dietrich P. et al., 1993). El sitio de inicio de la transcripción distal se describió en la cepa La Cruz Jalisco que pertenece al grupo *T.cruzi* I (Martínez-Calvillo S. et al. 1994). Por esta razón se pensó inicialmente que la funcionalidad de los tsp podría ser cepa específico.

En 1997, Nunes y col. clonaron la secuencia promotora de DNAr de cepas representativas de cada grupo en plásmidos de expresión para tripanosomátidos. Transfecciones transitorias cruzadas con estos plásmidos indicaron que los promotores de DNAr de cepas del grupo *T.cruzi* I son funcionales en aislados de ambos grupos; sin embargo, el promotor del grupo *T.cruzi* II solo es funcional en cepas de su propio grupo.

Nuestros ensayos utilizan el promotor de la cepa La Cruz Jalisco en transfecciones transitorias realizadas en la cepa CL Brener perteneciente al grupo *T.cruzi* II. Para esta cepa, recientemente se publicó la ubicación del sitio de inicio de transcripción para los genes de DNAr y llama la atención que éste se localiza tres nucleótidos corriente arriba del tsp distal (Wen L.M. et al., 2001). Para analizar esta situación en el contexto de nuestros resultados se alinearon

I	{	LA CRUZ	CACCAGTTTCCTTGCGGGGCTTATTTGGTGTGTTGGATTTTAAATTTTTTGATGATTTCGGAGGAATTTTTGCAATTTTTGGGTACCCCTAAAA
II	{	CL	TG-G-----G-----A---T-----T-A-. .-----G-----T-----C-----A-----
		CL BRENER	TG-G-----C--G-----A---T-----T---C-----G-----T-----C-----A-----
I	{	LA CRUZ	AAATTT. .TGGAGTTTCCGGGGTTCGATCCAACCTGTGCTTTTTTAACCGTCCATTGTGTCTAGTACATCAIGGAGCGGTATTCTCTCCGGTG
II	{	CL	-----AT-----C-----T--A---AG--G-----G. ---T-G---TG--T---A-----GG-----T
		CL BRENER	-----AT-----C-----T--A---AG--G-----G---T-G---TG--T---A--C-----GG-----
I	{	LA CRUZ	GCCCAGGTGGCGTCGGAAGGAATCGGTGTCCCTCAGGATGTTTGGTTTTTCGTTTTTTTTTTGGCGTCTTTTGTTCGCATCGCCGTATCGTG
II	{	CL	-G-A-A-----T--C-G-TT-. ---CT--AAT---CTCG-----C-----GCAT-----C-
		CL BRENER	---. -A-----T--C-G-TT-AG-ATCT--AAT---CTCG-----C-----G-----C-
I	{	LA CRUZ	TGCGGCGCG. .ACCTTCTTTTTGGCTCATTGGTCAGTGAGGTTTATAATAAAGTGGATCATTGGGTTTTTGGCCCTTTGCGGCGCACCCGCGG
II	{	CL	--T-CG---C. -AT-----C-----T-----C--T-----T-----T---A-----CA
		CL BRENER	--T-CG---CA--T-----C-----T-----T-----T-----T---A-----A-
I	{	LACRUZ	AATGGGGGAGGGATTTTCATATAATTGTAGTGTACACAT. TGTGTGTGGGTCGCAAAAT.GTCATGCCGTGTGCAATGTTATTT. GCG
II	{	CL	G- .AT-----C.-G-. .-----TG-G---GT---T---C---TTGTGT---G-T-----C-----T---
		CL BRENER	--. .T-----C.-G-. .-----TG-. .-----C---TTGTGT---T-----C-----T---
I	{	LA CRUZ	TGCTGTGCGTGTCTTTTGTGATTCCACCACCTGTGTGATTTTACCTTATCGTCTCTCCCTCGCGTTGGCTGTGCGTGAATTGTCTGTGCAT
II	{	CL	---. . . .-----G---AT-.-G-----G-ACCT--A-CGTC---C-TGC---G-----A-----GT-----
		CL BRENER	-----G-----G-----G-ACT--A-CGTC---C-TGC---G-----A-----GCT-----
I	{	LA CRUZ	TCGTGGGAAATCAAAGGGGAATCAACGTGTTCTTTTTTTTT. .CAGAAGGGGAGTCAAAG. CGCCGTGTGGAT
II	{	CL	-A-C-.-A-----TT---G-----T-----C
		CL BRENER	-A-C--A-.-A-----T. -----

Figura 15. Alineamiento de la secuencias del promotor de DNAr con sitios de inicio de la transcripción ubicados experimentalmente. Se muestran las secuencias de los promotores de DNAr de cepas pertenecientes a los dos grupos de *T. cruzi*: T.cruzi I (cepa La Cruz Jalisco) y T.cruzi II (cepas Cl y CL Brener) alineados en el programa DNAMAN. cajas rojas: tsp descritos experimentalmente. Los números de acceso en Genbank para las secuencias son: La Cruz Jalisco: L13926; CL:M88712; CL Brener: U88712.

las secuencias de los promotores de DNAr con tsp descritos experimentalmente. Como se observa en la figura 15, las secuencias son claramente alineables. El sitio de inicio de la transcripción descrito en la cepa CL Brener del grupo *T.cruzi* II, se ubica en la misma región del sitio de inicio de la transcripción distal.

5.3.3. Análisis del elemento repetido de 172 pb

En los promotores ribosomales eucarióticos se han descrito copias de elementos repetidos (ER) localizadas corriente arriba de los sitios de inicio de la transcripción los cuales funcionan como “enhancers” o activadores de la transcripción (Reeder R. 1992). En los Cinetoplástidos se han descrito elementos repetidos cercanos a la región promotora. La secuencia de 806 pb con actividad promotora de los genes de DNAr de *T.cruzi* clonada en el plásmido pRIBO4-*cat*, contiene una copia de un elemento repetido de 172 pb. Para determinar si este elemento presenta una función semejante a la reportada para otros eucariontes, se transfectó transitoriamente la construcción pRIBO6-*cat* que no contiene la copia del elemento repetido y se comparó su actividad de CAT con el plásmido de referencia pRIBO4-*cat*. La delección del elemento repetido genera una disminución en la actividad promotora del 20%; lo que sugiere que este elemento podría activar la transcripción (Figura 16, anexo 1).

5.3.4. Identificación de un dominio corriente arriba.

El promotor de los genes de DNAr típico eucariótico presenta en su estructura dos dominios reguladores de la transcripción: el dominio corriente arriba o “UCE” capaz de activar la transcripción y el dominio central del promotor o “CORE” el cual presenta niveles de transcripción basal.

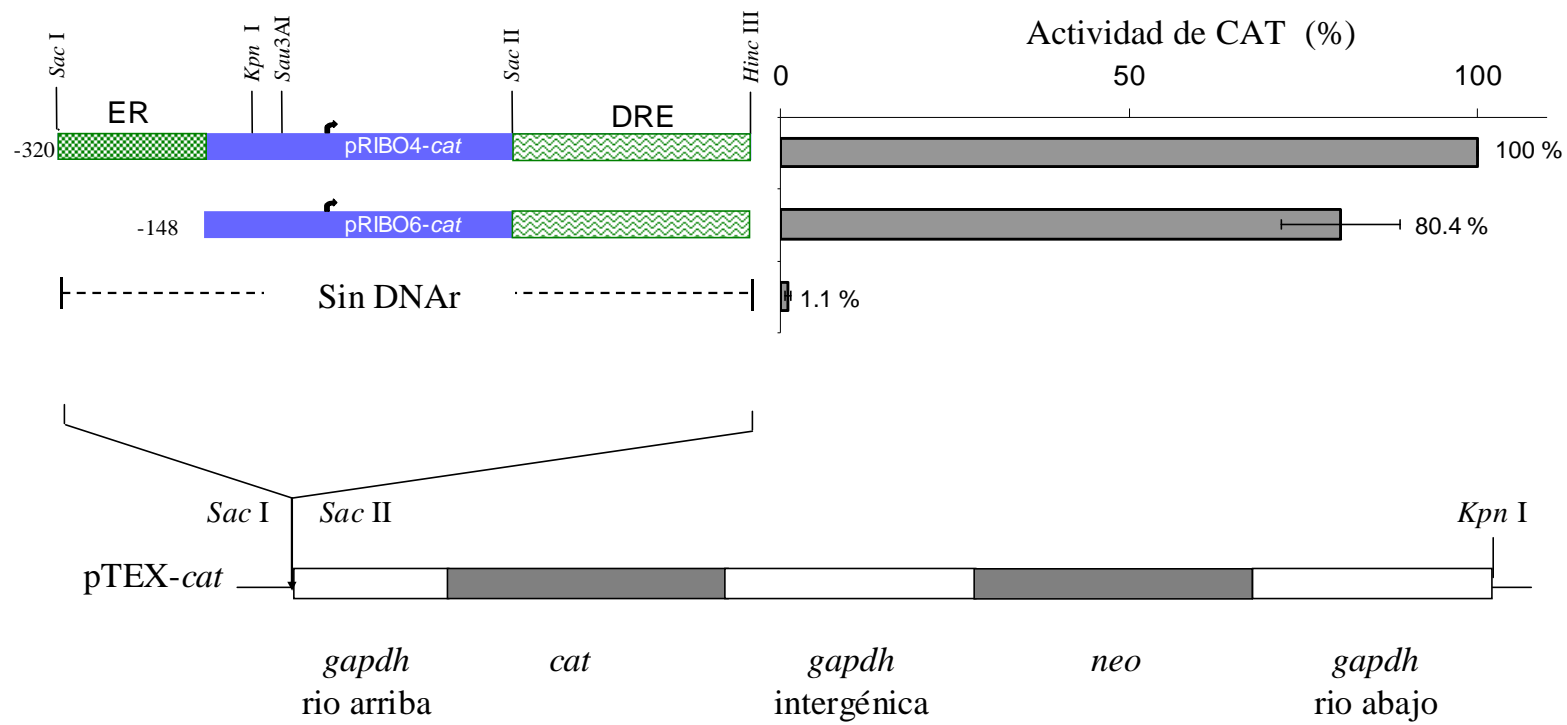


Figura 16. Análisis del elemento repetido de 172 pb. Se observan las construcciones plasmídicas realizadas para evaluar la funcionalidad del elemento repetido. Se coloca como referencia el plásmido control pRIBO4-*cat* y el plásmido pTEX-*cat*, el cual no tiene región promotora (Sin DNAr). Se muestran también las actividades de CAT de al menos tres ensayos de transfección independientes. En la parte de debajo de la gráfica se observa el vector de clonación pTEX-*cat*. Flecha negra: tsp distal, ER: Elemento repetido, DRE: Elemento regulador corriente abajo, *gapdh*: gen de la gliceraldehido fosfato deshidrogenasa, *cat*: cloranfenicol acetil transferasa; *neo*: gen de resistencia a geneticina.

Para la identificación de dominios potencialmente reguladores del promotor de DNAr de *T.cruzi*, se realizaron varias deleciones como indica a continuación.

Una doble deleción donde se eliminaron las secuencias correspondientes al elemento repetido y las secuencias corriente abajo del sitio SacII, que corresponde al dominio DRE permitió generar el plásmido pRIBO9-*cat*. Esta construcción contiene las secuencias entre los sitios -148 a +207 y en los ensayo de tranfección este plásmido presenta una actividad de CAT del 121% (Figura 17, anexo 1). La siguiente construcción, pRIBO10-*cat*, contenía secuencias localizadas entre los nucleótidos -79 a +207 y presentaba una actividad de CAT de 63.6% comparada con el plásmido de referencia pRIBO4-*cat* (Figura 17, anexo 1). La comparación de las actividades enzimáticas de estas construcciones nos llevó a pensar en la existencia de un dominio que pudiera activar la transcripción localizado entre los nucleótidos -148 y -79. Para delimitar esta secuencia se generaron las construcciones pRIBO20-*cat* y pRIBO21-*cat* que contienen las secuencias corriente arriba hasta los nucleótidos -100 y -120 respectivamente. Estos plásmidos presentan actividades de CAT de 133.4 y 132.3 % comparadas con el plásmido control por lo tanto, el elemento activador corriente arriba está ubicado entre los nucleótidos -100 y -79 con respecto al *tsp* (Figura 17, anexo 1). Por la ubicación similar de éste al elemento corriente arriba descrito en varios promotores ribosomales de eucariontes, la región localizada entre los nucleótidos -100 a -79 fue denominada dominio corriente arriba o "UCE" (por sus siglas en inglés, upstream control element).

5.3.5. Búsqueda de la región mínima con actividad promotora

Para identificar un probable dominio central del promotor o "CORE" se realizaron una serie de deleciones corriente abajo y corriente arriba del *tsp*.

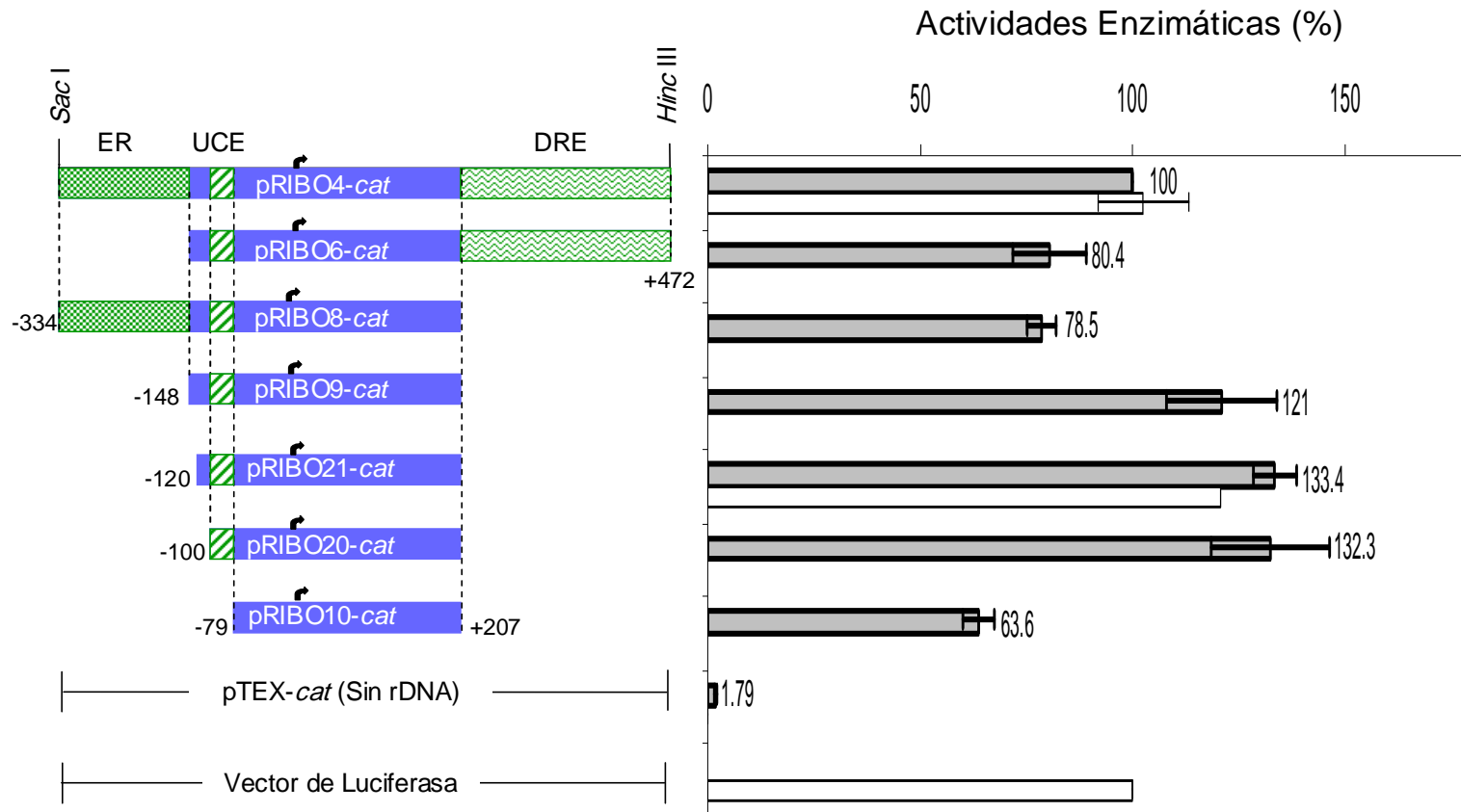


Figura 17. Identificación del dominio de activación corriente arriba. Se observan las construcciones plasmídicas realizadas para identificar el dominio corriente arriba o UCE. Se coloca como referencia el plásmido control pRIBO4-*cat* que presenta todos los elementos del promotor (dos posibles sitios de inicio de la transcripción y una copia del elemento repetido de 172 pb) y el plásmido pTEX-*cat*, el cual no tiene región promotora (Sin DNAr). Se muestran también las actividades de CAT de al menos tres ensayos de transfección independientes (barras grises). Algunas de las construcciones fueron co-transfectadas con el plásmido pRIBO16-*luc* (Vector luciferasa) y su actividad corresponde al 100% de actividad para LUC (barras blancas). Flecha negra: tsp distal, ER: Elemento repetido, DRE: Elemento regulador corriente abajo, UCE: dominio activador corriente arriba.

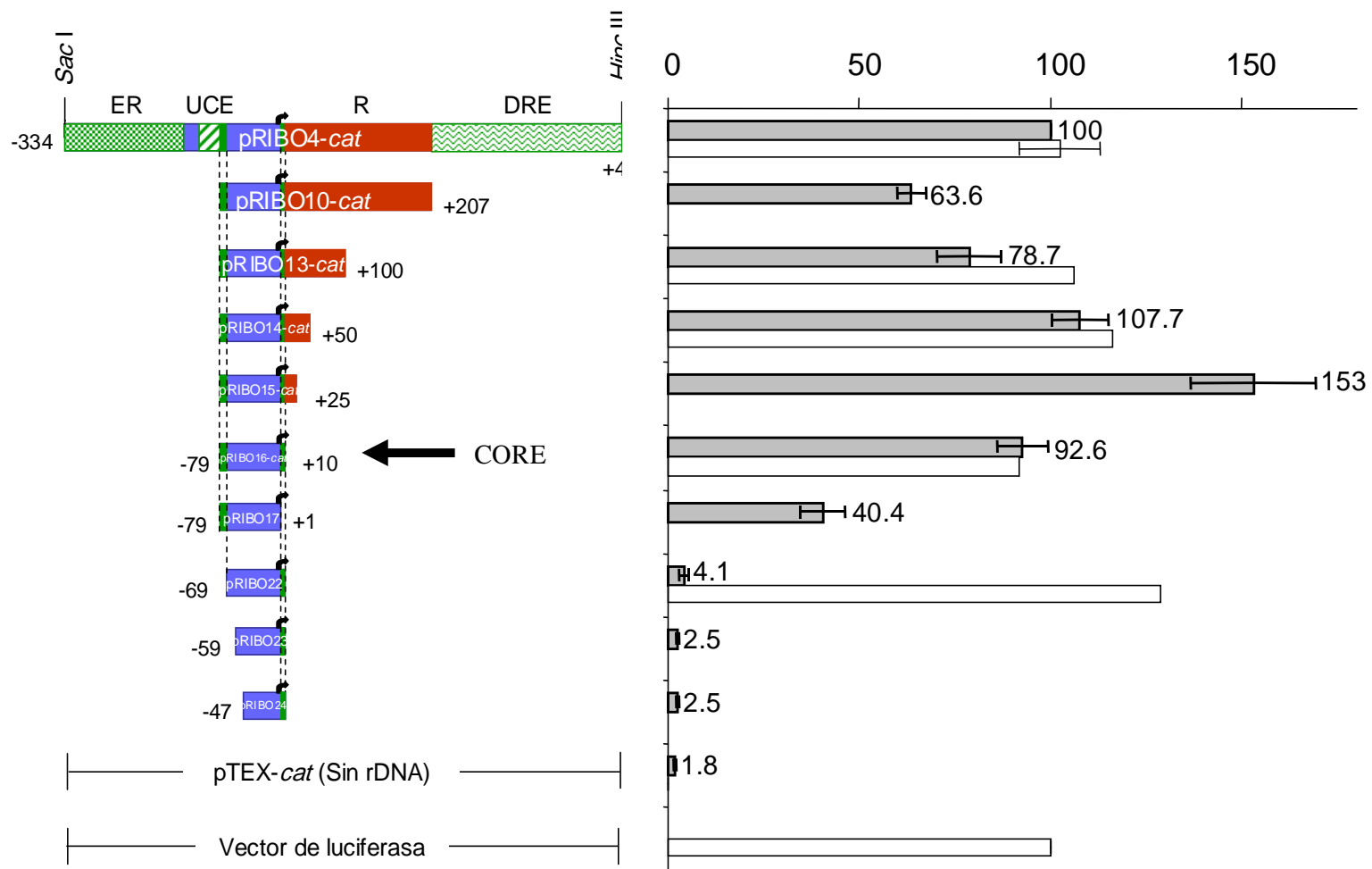


Figura 18. Búsqueda de la región mínima con actividad promotora e identificación de la secuencia capaz de disminuir la actividad promotora. Se muestran las diferentes construcciones plasmídicas teniendo como referencia el plásmido control pRIBO4-cat que presenta todos los elementos del promotor y el plásmido pTEX-cat, el cual no tiene región promotora (Sin DNAr). Se muestran también las actividades de CAT de al menos tres ensayos de transfección independientes (barras grises). Algunas de las construcciones fueron co-transfectadas con el plásmido pRIBO16-luc (Vector luciferasa) y su actividad corresponde al 100% de actividad para LUC (barras blancas). Flecha negra: tsp distal, ER: Elemento repetido, DRE: Elemento regulador corriente abajo, UCE: dominio activador corriente arriba; R: secuencia capaz de disminuir la actividad promotora; CORE: dominio central del promotor

Primero se hicieron deleciones corriente abajo del sitio de inicio de la transcripción hasta los nucleótidos +100, +50, +25 y +10. Estas deleciones corresponden a las construcciones pRIBO13-*cat*, pRIBO14-*cat*, pRIBO15-*cat* y pRIBO16-*cat* respectivamente y en su orden presentan actividades de CAT de 78.7%, 107.7%, 153% y 92.6 % (Figura 18, anexo 1). La comparación de las actividades de estos plásmidos con la construcción pRIBO10-*cat* sugiere la existencia de un dominio capaz de disminuir la transcripción localizado entre los nucleótidos +207 y +10 al que denominamos R (Figura 18). El plásmido pRIBO16-*cat* muestra una actividad de CAT similar al plásmido de referencia pRIBO4-*cat*. Un fragmento del promotor que contiene a secuencia corriente abajo hasta el nucleótido +1 muestra una caída en la actividad promotora hasta el 40.4%. Las secuencias contenidas entre los nucleótidos +10 y +1 son importantes para la actividad del promotor.

Con el fin de establecer la localización del dominio central del promotor, se analizaron las secuencias hacia el extremo 5' del *tsp*. Para este fin se realizaron las construcciones pRIBO22-*cat*, pRIBO23-*cat* y pRIBO24-*cat*, que contienen las secuencias corriente arriba del sitio de inicio de la transcripción hasta los nucleótidos -69, -59 y -47 respectivamente. Estas construcciones muestran niveles de actividad de CAT a niveles de fondo (Figura 18, anexo 1).

La comparación de las actividades de estos plásmidos nos indica que el dominio central del promotor o "CORE", que conserva una actividad vigorosa, se encuentra localizado entre los nucleótidos -79 a +10 que corresponde a la construcción pRIBO16-*cat*.

5.4. Plásmido de co-transfección pRIBO16-*luc*.

Para establecer que las diferencias obtenidas en estas construcciones no se debían a diferencias en la eficiencia del proceso de transfección, se decidió crear

el vector de co-transfección pRIBO16-*luc*. Este plásmido tiene las secuencias del dominio central del promotor de DNAr (-79 a +10) y el gen que codifica para la enzima luciferasa como reportero (Figura 19).

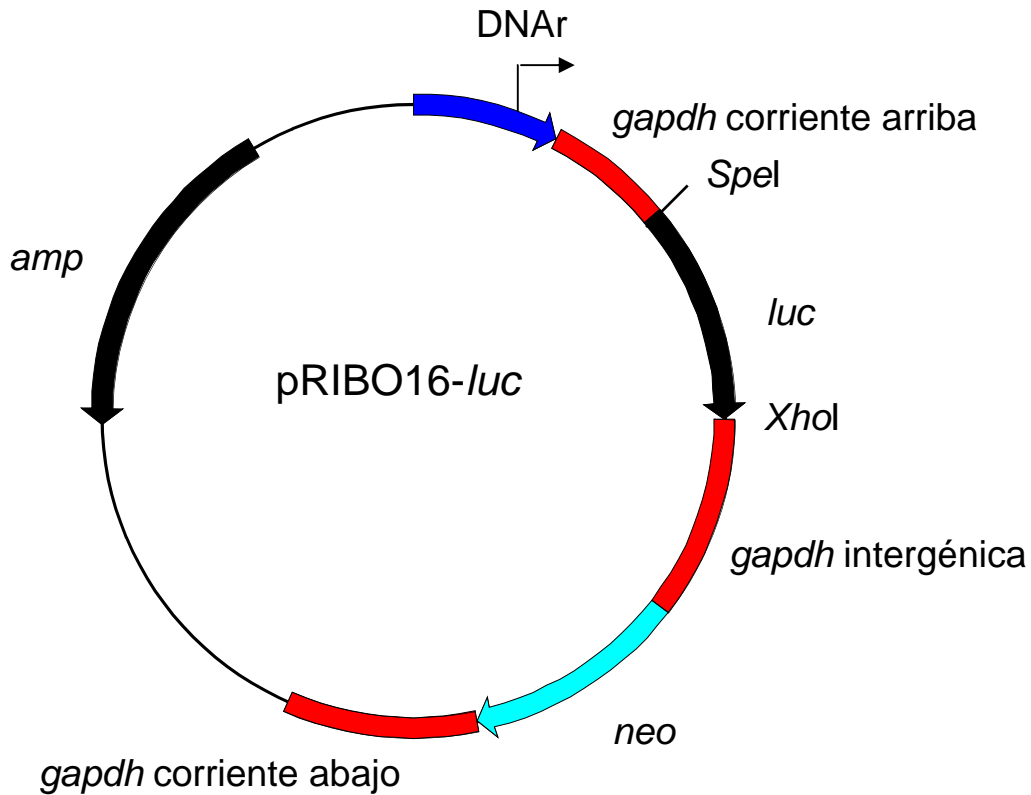


Figura 19. Plásmido pRIBO16-*luc*. Se muestra la secuencia del dominio central del promotor (DNAr) y las secuencias corriente arriba, corriente abajo e intergénicas de la *gapdh* (gliceraldehido fosfato deshidrogenasa), *luc* (gen que codifica para la luciferasa), *neo* (gen que confiere resistencia a la geneticina) y *amp* (gen que codifica para la resistencia a ampicilina en *E.coli*). La flecha indica el sitio de inicio de la transcripción.

La actividad de luciferasa de éste plásmido indica el 100% de actividad para LUC.

Este plásmido se co-transfectó con varias construcciones que contenían diferentes versiones moleculares del promotor aquí reportadas. Se indican en las figuras anteriores como barras blancas acompañando las actividades de

CAT. En todos los casos se pudo establecer que las diferencias en los niveles de expresión de las actividades CAT no son explicables por pequeñas variaciones observadas en las actividades de LUC.

5.5. Análisis de los diferentes dominios del promotor en diferentes cepas de *T.cruzi*

Se compararon las secuencias promotoras de DNAr reportadas en la literatura y en los bancos de datos con el fin de establecer las similitudes existentes para cada uno de los dominios identificados en diferentes cepas de *T.cruzi*.

Por medio del programa DNAMAN se alinearon los promotores ribosomales de 14 cepas de *T.cruzi*, pertenecientes a los dos grupos mayores: *T.cruzi* I y *T.cruzi* II (Figura 20). Se determinaron las diferencias existentes en las secuencias promotoras de DNAr en varios aislados de *T.cruzi* para cada uno de los potenciales elementos reguladores descritos en este trabajo. Se compararon éstas secuencias con la reportada para la cepa La Cruz Jalisco y el porcentaje de similitud que se muestra en la tabla 6, se estableció sacando un promedio de similitud de las cepas de cada grupo.








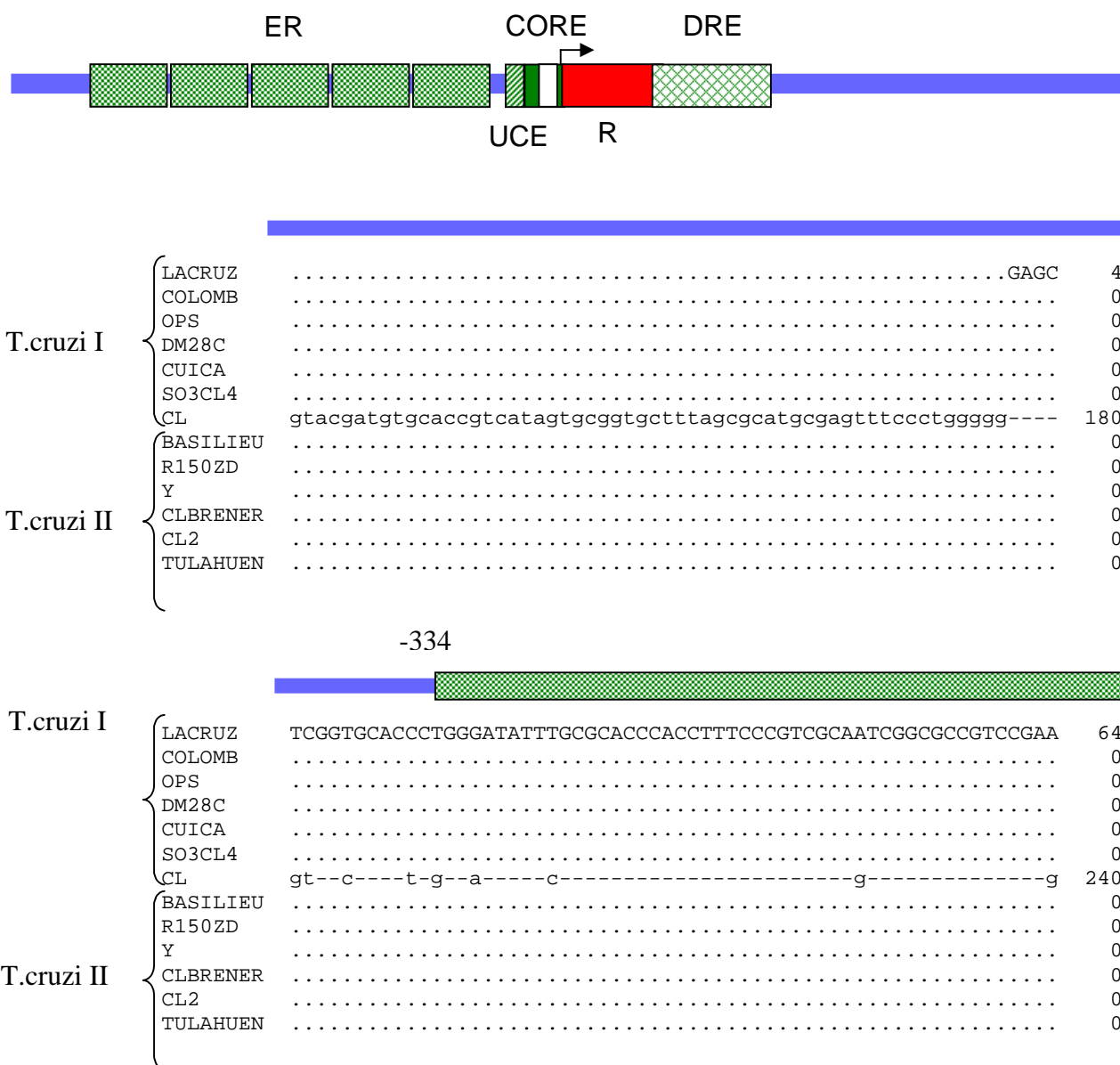
Elemento		T.cruzi I	T.cruzi II
ER de 172 pb		100	83.2
UCE		99	86.9
Secuencia de -79 a -69		92.5	71.9
Secuencia de -69 a +1		97	75.9
Secuencia de +1 a +10		98	80
Secuencia de +10 a +207		92.4	62.3
Secuencia de +207 a +454		91.4	64.4


Tabla 6. Porcentajes de similitud de los diferentes dominios reguladores en cepas pertenecientes a los dos grupos de *T.cruzi*, con respecto a la cepa La Cruz Jalisco.

Figura 20. Comparación de las secuencias del promotor de DNAr en las diferentes cepas de *T.cruzi*. Se muestran las secuencias de cepas pertenecientes a los dos grupos: *T.cruzi* I y *T.cruzi* II. Se coloca como referencia los elementos del promotor establecidos en este trabajo: ER: Elemento repetido, UCE: dominio corriente arriba, CORE: dominio central del promotor, R: secuencia capaz de disminuir la actividad promotora, DRE: dominio activador corriente abajo. Los números de acceso en GenBank para las secuencias son: La Cruz Jalisco: L13926, Colombiana: U89780, OPS: U89785, DM28c: U89182, Cuica: U89779, SO3CL4: U89786, CL: M88712, Basillieu: U89777, R150ZD: U89776, Y: U89788, CL Brener: U89779, CL2: U89778, Tulahuen: U89787. (Martínez- Calvillo S. et al., 1994; Dietrich P. et al., 1993; Nunes L.R. et al., 1997). La flecha indica el sitio de inicio de la transcripción descrito por Martínez-Calvillo S. y col. (1994). Subrayados se muestran los otros dos sitios de inicio de la transcripción descritos (Wen L.M. et al., 2001; Stolf B. et al., 2003) Se presentan dos secuencias del promotor de DNAr de la cepa CL (CL y CL2).








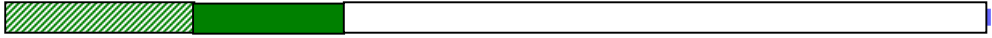
T.cruzi I	LACRUZ	CGCGGAAATGTTCCGAGAATAATACGGCTGGGCTGCGCCGCGCGTTCCCCGCGTGAACCA	124
	COLOMB	0
	OPS	0
	DM28C	0
	CUICA	0
	SO3CL4	0
	CL	----t-t-t----g-----c-c-----t-----g-t-----a--	300
T.cruzi II	BASILIEU	0
	R150ZD	0
	Y	0
	CLBRENER	0
	CL2	0
	TULAHUEN	0



T.cruzi I	LACRUZ	ACTATTTGTGCGATGTGCAGCATCCTATTGTGGTGCTTTACCGCACACCAGTTTCCTT.GC	183
	COLOMB	15
	OPS	15
	DM28C	15
	CUICA	15
	SO3CL4	14
	CL	-t-----a-----c-g-a-g-c-----g---t-g-g-----g-.	359
T.cruzi II	BASILIEU	15
	R150ZD	15
	Y	15
	CLBRENER	15
	CL2	15
	TULAHUEN	15

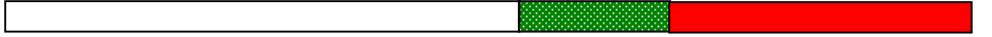
		-148		-100	
					
T.cruzi I	LACRUZ	GGGGCTTATTTGGTGTGTTGGATTTTAAATTTTTTGATGATTCGGAGGAATTTTTTGCAA	243		
	COLOMB	75		
	OPS	75		
	DM28C	75		
	CUICA	75		
	SO3CL4	74		
	CL	-----a--t-----t--c-----	417		
T.cruzi II	BASILIEU	-----a--t-----t--c-----g-----t--	75		
	R150ZD	-----a--t-----t--c-----g-----t--	75		
	Y	-----t-----t--c-----g-----t--	75		
	CLBRENER	-----a--t-----t--c-----g-----t--	75		
	CL2	-----a--t-----t--c-----g-----t--	75		
	TULAHUEN	-----a--t-----t--c-----g-----t--	75		

-79 -69



T.cruzi I	LACRUZ	TTTTTGGGTACCCCTAAAAAAA . TTTTGGAGT . TTCCGGGGTTCGATCCAACCTGTGCTT	301
	COLOMB	-----t----- . -----	134
	OPS	-----t----- . -----	134
	DM28C	-----t----- . -----	134
	CUICA	-----t----- . -----	134
	SO3CL4	-----t-----t----- . -----t--a--a-----	133
	CL	-----c---a---t---a-t-gagc-----t--a---ag--g---	477
	BASILIEU	-----c---a---t---a-t-gagc-----t--a---ag--g---	135
	R150ZD	-----c---a---t---a-t-gagc-----t--a---ag--g---	135
	Y	-----c---a---t---a-t-gagc-----t--a---ag--g---	135
T.cruzi II	CLBRENER	-----c---a---t---a-t-gagc-----t--a---ag--g---	135
	CL2	-----c---a---t---a-t-gagc-----t--a---ag--g---	135
	TULAHUEN	-----c---a---t---a-t-gagc-----t--a---ag--g---	135

+10



T.cruzi I	LACRUZ	TTTTAACCGTCCATTGTGTCTAGTACATCA <u>AG</u> GAGCGGTATTCTCTCCGGTGGCCCAGG	361
	COLOMB	----- . -----	194
	OPS	----- . -----	194
	DM28C	-----a----- . -----	194
	CUICA	----- . -----	194
	SO3CL4	c-----a-g-g-g-----g----- . -----	192
	CL	---g---t-g--tg-t---a-----gg-----t-g-a-a	536
	BASILIEU	---t---t-g--tg-t---a-----gg-----t-g--a	193
	R150ZD	---g---t-g--tg-t---a-----gg-----t-g--a	193
	Y	---g---t-g--tga-t---a-----gg-----t-g--a	193
T.cruzi II	CLBRENER	---g---t-g--tg-t---a-ca-----gg-----t-g--a	194
	CL2	---g---t-g--tg-t---a-----gg-----t-g--a	194
	TULAHUEN	---g---t-g--tg-t---a-----gg-----t-g--a	194



T.cruzi I	LACRUZ	TGGCGTCGGAAGGAATCGGTGTCCCTCAGGATGTTGGTTTTTCGTTTTTTTTT	415
	COLOMB	-----t----- . -----	248
	OPS	-----t----- . -----	248
	DM28C	-----t----- . -----	248
	CUICA	-----t----- . -----	248
	SO3CL4	-----t-t---c-tt-ag-atct--aac--a--g	240
	CL	-----tggc-g..-tt-ag-a.ct--aat---ctcgtttt.-.-.---cg	590
	BASILIEU	-----tggc-g..-tt-ag-atct--aat---ctcgtttt.-.-.---cg	248
	R150ZD	-----tggc-g..-tt-ag-atct--aat---ctcgtttt.-.-.---cg	248
	Y	-----tggc-g..-t-ag-atct--aat---ctcgtttt.-.-.---cg	248
T.cruzi II	CLBRENER	-----tggc-g..-tt-ag-atct--aat---ctcgtttt.-.-.---cg	249
	CL2	-----tggc-g..-tt-ag-atct--aat---ctcgtttt.-.-.---cg	249
	TULAHUEN	-----tggc-g..-tt-ag-atct--aat---ctcgtttt.-.-.---cg	249



T.cruzi I	{	LACRUZ	TTGCGGTCTTTTGTTCGCATCGCCGTATCGTGTGCGGCGCGACCTTC.TTTTGGCTCA	474
		COLOMB	-----t-----.	307
		OPS	-----t-----.	307
		DM28C	-----.	307
		CUICA	-----t-----	308
		SO3CL4	-----a-----.	299
		CL	cg-tct-t-g--tgcatt-gc--tatcg.-----a.t---.----c-----	647
		BASILIEU	cg-tct-t-g--tggcat-gc--tatcg.-----a-t---.----c-----	306
		R150ZD	cg-tct-t-g--tggcat-gc--tatcg.-----a-t---.----c-----	306
		Y	cg-tct-t-g--tggcat-gc--tatcg.-----a-t---.----c-----	306
T.cruzi II	{	CLBRENER	cg-tct-t-g--tggcat-gc--tatcg.-----a-t---.----c-----	307
		CL2	cg-tct-t-g--tggcat-gc--tatcg.-----a-t---.----c-----	307
		TULAHUEN	cg-tct-t-g--tggcat-gc--tatcg.-----a-t---.----c-----	307



T.cruzi I	{	LACRUZ	TTGGTCAGTGAGGTTTATAATAAAGTGGATCATTGGGTTTTTGGCCCTTTGCGGCGCAC	534
		COLOMB	-----	367
		OPS	-----	367
		DM28C	-----	367
		CUICA	-----	368
		SO3CL4	-----t---a-t-----ca....	355
		CL	-----t-----c-t-----t---t---a-----cac-cg	706
		BASILIEU	-----t-----c-g-----t---t---a-----cac-cg	366
		R150ZD	-----t-----c-g-----t---t---a-----cac-cg	366
		Y	-----t-----c-g-----t---t---a-----cac-cg	366
T.cruzi II	{	CLBRENER	-----t-----t-----t---t---a-----cac-cg	367
		CL2	-----t-----t-----t---t---a-----cac-cg	367
		TULAHUEN	-----t-----t-----t---t---a-----cac-cg	367

+207



T.cruzi I	{	LACRUZ	CCGCGGAATGGGGGAGGGATTTTCATATAATTGTAGTGTACACATTGTGTGTTGGTTCGCA	594
		COLOMB	-----g-----.	426
		OPS	-----g-----.	426
		DM28C	-----.	424
		CUICA	-----.	428
		SO3CL4	.----c-gaaaat-g---gggattc----gtagtgtagaca....	410
		CL	--agaat.....---gggattc----g--gtgtaca.t.g-----ggt-gggtg	756
		BASILIEU	.-agaat.....---gggattc----g--gtgtaca.t.g-----t-ggt-g	413
		R150ZD	.-agaat.....---gggattc----g--gtgtaca.t.g-----t-ggt-g	413
		Y	.-agaat.....---gggattc----g--gtgtaca.t.g-----t-ggt-g	413
T.cruzi II	{	CLBRENER	.-agaat.....---gggattc----g--gtgtaca.t.g-----t-ggt-g	414
		CL2	.-agaat.....---gggattc----g--gtgtaca.t.g-----t-ggtg	414
		TULAHUEN	.-agaat.....---gggattc----g--gtgtaca.t.g-----t-ggtg	414

T.cruzi I	LACRUZ	AAA.....TGTCATGCCGTGTGCAATGTTTATTTGCGTGTCTGCGTGTCTTTTGT	646
	COLOMB	-----	478
	OPS	-----	478
	DM28C	-----	476
	CUICA	-----	480
	SO3CL4	-----	462
	CL	c-caatttgtg-----t-----c-----tgcgtgc...-----g--	813
	BASILIEU	c-caatttgtg-----t-----c-----tgcgtgc.-----g--	472
	R150ZD	c-caatttgtg-----t-----c---.-tgcgtgc.-----g--	471
	Y	c-caatttgtg-----t-----c---.-tgcgtgc.-----g--	471
T.cruzi II	CLBRENER	c-caatttgtg-----t-----c-----tgcgtgc.-----g--	473
	CL2	c-caatttgtg-----t-----c-----tgcgtgc.-----g--	473
	TULAHUEN	c-caatttgtg-----t-----c-----tgcgtgc.-----g--	473

T.cruzi I	LACRUZ	GATTCCACCACCTTGTGTGTATTTTACCTTATCGTCTCTCCCTCGCGTTGGCTGTGCGTGA	706
	COLOMB	-----g-----gc-----	538
	OPS	-----g-----gc-----	538
	DM28C	-----gc-----	536
	CUICA	-----gc-----	540
	SO3CL4	--c-----ttg-----a....-----a-gc-----	518
	CL	.-----ggtg.-----...acct-catcgtctctc--tg-cgcg--gctgtgcgt-	868
T.cruzi II	BASILIEU	-----ttg.-----...-act-catcgtctctc--tg-cgcg--gctgtgcgt-	528
	R150ZD	-----ttg.-----...-act-catcgtctctc--tg-cgcg--gctgtgcgt-	527
	Y	-----ttg.-----...-act-catcgtctctc--tg-cgcg--gctgtgcgt-	528
	CLBRENER	-----ttg.-----...-act-catcgtctctc--tg-cgcg--gctgtgcgt-	529
	CL2	-----ttg.-----...-act-catcgtctctc--tg-cgcg--gctgtgcgt-	529
	TULAHUEN	-----ttg.-----...-act-catcgtctctc--tg-cgcg--gctgtgcgt-	529

T.cruzi I	LACRUZ	AT..TGTCGTGCGCATTCGTGGGAAATCAAAGGGAATCAACGTGTTT.TTTTTTTTTC	763
	COLOMB	-----	540
	OPS	---gct-----	594
	DM28C	---gct-----	592
	CUICA	---gct-----	596
	SO3CL4	--tg--gct-----a---a---...-----t.-----	574
	CL	-attgtg-tcgcat-agcg..a--taag-gaatc--cgtgttct-.t.-----	923
T.cruzi II	BASILIEU	-attgtg--tcgcat-agcg-aa--taag-gaatc--cgtgttct-.t.-----	585
	R150ZD	-attgtg--tcgcat-agcg-aa--taag-gaatc--cgtgttct-.t.-----	584
	Y	-attgtg--tcgcat-agcg-aa--taag-gaatc--cgtgttct-.t.-----	585
	CLBRENER	-attgtg--tcgcat-agcg-aa--taag-gaatc--cgtgttct-.t.-----	585
	CL2	-attgtg--tcgcat-agcg-aa--taag-gaatc--cgtgttct-.t.-----	586
	TULAHUEN	-attgtg--tcgcat-agcg-aa--taag-gaatc--cgtgttct-.t.-----	586



T.cruzi I	{	LACRUZ	AGAAGGGGAGTCAAAG . CGCCGTGTGGATGCCAAGTCTGTGCAAGAGTTAACTATTATTA	822
		COLOMB - - - - - . - - - - -	562
		OPS	- - - - - . - - - - -	622
		DM28C	- - - - - . - - - - -	620
		CUICA	- - - - - . - - - - -	624
		SO3CL4	- - - - - . - - - - -	602
		CL	--g- - - - - t- - - - - acgc-a-gtctgtgca-gagt-a-c	974
T.cruzi II	{	BASILIEU	- - - - - . - - - - -	613
		R150ZD	- - - - - . - - - - -	612
		Y	- - - - - . - - - - -	613
		CLBRENER	- - - - - . - - - - -	613
		CL2	- - - - - . - - - - -	614
		TULAHUEN	- - - - - . - - - - -	614

Los elementos reguladores están conservados en cepas del grupo *T.cruzi* I. Las cepas del grupo *T.cruzi* II muestran una considerable similitud para la mayoría de los dominios con excepción del dominio R que presenta una similitud del 62.3 %. Podemos concluir, en base a estos porcentajes de similitud, que los elementos reguladores son homólogos.

5.6. Análisis del sitio de inicio de la transcripción.

En *T.cruzi* se han mapeado tres posibles sitios de inicio de la transcripción localizados en la región del *tsp* distal (nucleótidos en negrita, que en su orden de 5´a 3´ corresponden respectivamente a los descritos por: Wen L.M. et al.; 2001, Stolf B.S. et al., 2003; Martinez-Calvillo S. et al, 1994). Estos se ubican entre sí con pocos nucleótidos de diferencia.

5´ **T**CAT**GG** 3´

Para analizar la funcionalidad de estos tres posibles sitios de inicio de la transcripción y la región circundante se cambió inicialmente por mutagénesis dirigida del plásmido pRIBO4-*cat*, una región de 6 pb que contenía los tres *tsp*. Como se observa en la figura 21, el ensayo CAT el plásmido mutante pTSP-*cat* muestra una actividad similar a los valores de fondo.

Además evaluamos la importancia de cada uno de los nucleótidos presentes en estas 6 pb cambiando por mutagénesis dirigida cada uno de ellos. Este procedimiento también nos permitió examinar la funcionalidad de cada uno de los *tsp* de manera individual. La figura 22 muestra las actividades de CAT de cada una de las construcciones mutantes y las compara con la actividad presentada por el plásmido con la secuencia de DNAr silvestre (DNAr). Observamos actividades entre un 10 y un 41%, lo que indica que cualquier cambio en estos 6 nucleótidos afecta la funcionalidad del promotor.

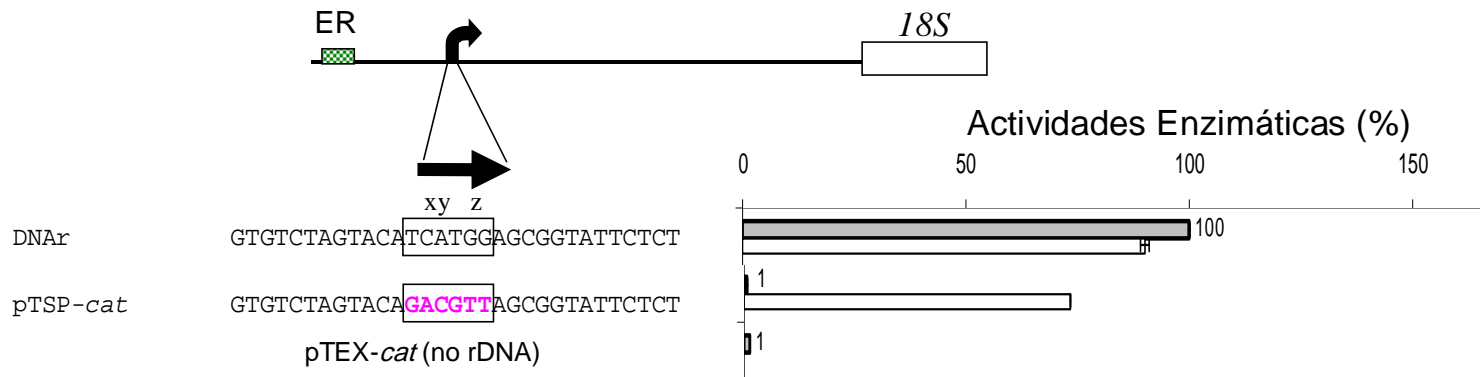


Figura 21. Análisis del cambio de 6 pb en el sitio de inicio de la transcripción del promotor de DNAr de *T.cruzi*. En la parte de arriba se muestra el sitio de inicio de la transcripción en perspectiva con el gen que codifica para el RNAr 18S y el elemento repetido de 172 pb (ER). Se cambio una región de 6 pb que contiene tres sitios de inicio de la transcripción reportados x (Wen L.M. et al., 2001), y (Stolf B.S.et al., 2003), z (Martínez-Calvillo S. et al., 1994) en el plásmido pTSP-*cat* y se comparó la actividad de CAT de este plásmido con la actividad presentada por el plásmido con la secuencia silvestre (DNAr). Se toma como control el plásmido pTEX-*cat* y del vector de co-transfección (Luciferasa). Actividad de CAT: barras grises; Actividad de LUC: Barras blancas

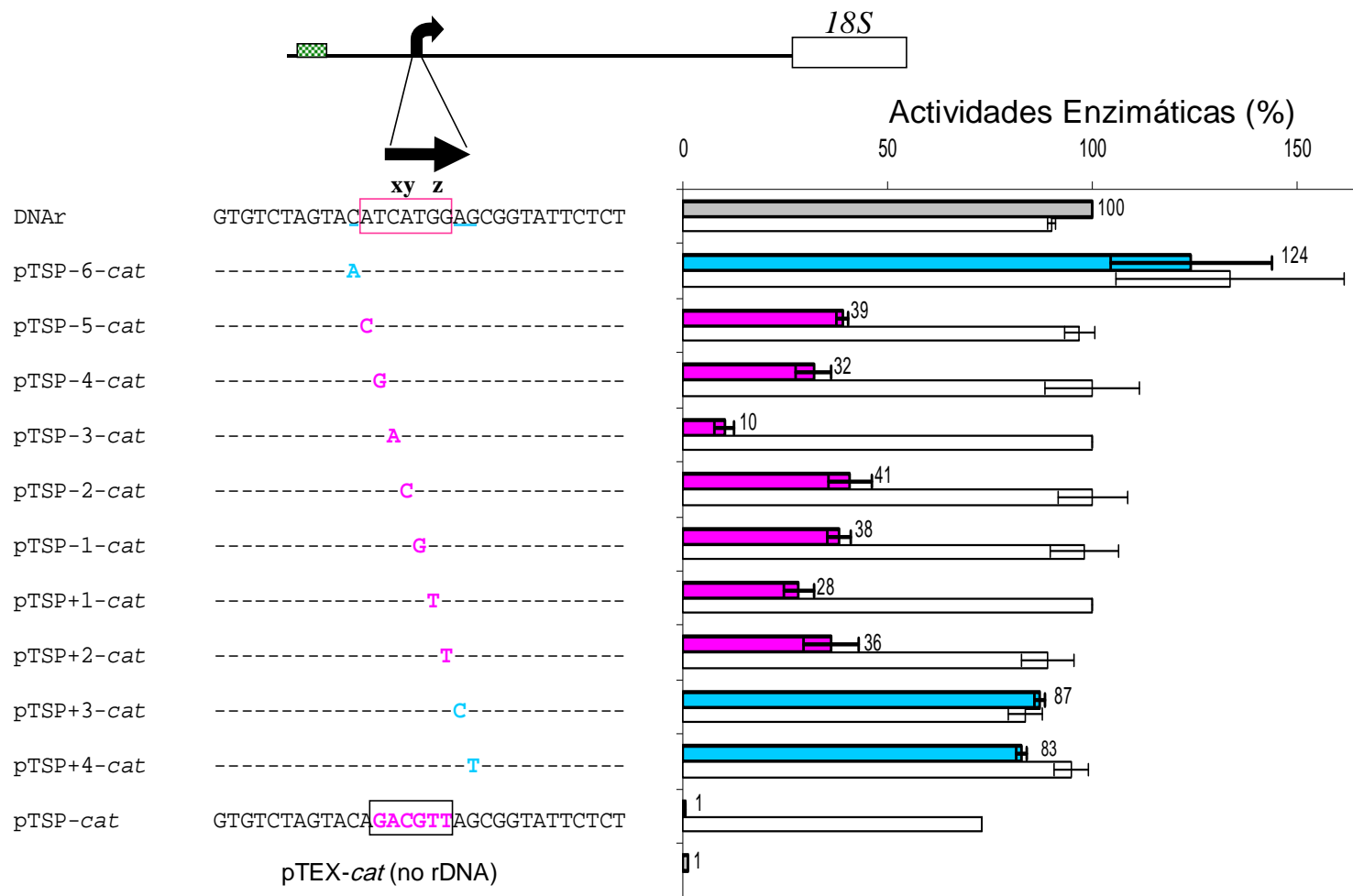


Figura 22. Análisis por mutagénesis de la región alrededor del sitio de inicio de la transcripción. Se muestran los cambios en la secuencia promotora se muestran y la localización de tres sitios de inicio de la transcripción reportados x (Wen et al.; 2001), y (Stolf et al.; 2003), z (Martínez-Calvillo et al.; 1994). Se comparó la actividad de CAT de los plásmidos mutantes con la actividad presentada por el plásmido con la secuencia silvestre (DNAr). Se toma como control el plásmido pTEX-cat y del vector de co-transfección (Luciferasa). Actividad de LUC: Barras blancas Barras rosa: Actividad de CAT de los plásmidos mutantes que presentan nucleótidos fundamentales para la actividad promotora, Barras azules: Actividad de CAT para nucleótidos que limitan la región fundamental. Barras grises : Actividad de CAT de los plásmidos control.

Además se examinaron los nucleótidos adyacentes a estas 6 pb ya analizadas (construcciones pTSP-6-*cat*, pTSP-5-*cat*, pTSP+3-*cat* y pTSP+4-*cat*). De éstos plásmidos, únicamente la mutación presente en pTSP-5-*cat* genera una disminución en la actividad promotora (Figura 22).

5.7. Análisis del promotor de DNAr en clonas genómicas.

T.cruzi cepa CL Brener presenta en su genoma 219 copias de cistrón de DNAr separadas entre sí por secuencias intergénicas de aproximadamente 20 Kb en las que se encuentran elementos de control de la transcripción (Castro C. et al., 1981; Hernández R. et al., 1983; El-Sayed N.M. et al., 2005). Con el interés de ensamblar una secuencia intergénica completa y evaluar la organización del promotor en un contexto genómico, decidimos estudiar las secuencias circundantes al promotor de genes de DNAr en clonas reportadas en el proyecto genoma de este organismo.

Con la búsqueda de las secuencias del promotor de DNAr de las cepas de *T.cruzi* CL Brener (Nunes L.R. et al., 1997. Número de Acceso en GenBank N° U89779) y La Cruz Jalisco (Martínez-Calvillo S. et al., 1994. GenBank N° L13926) se obtuvieron en el banco de datos del proyecto genoma varios “contigs” que presentaban similitud con la secuencia de interés (www.genedb.org; Tabla 7).

Las secuencias genómicas de estos “contigs” fueron analizadas utilizando como base de comparación las secuencias de los promotores de DNAr estudiadas en este trabajo y el programa de computación DNAMAN que permite el realizar análisis de secuencias. Se determinó la localización de cada uno de los potenciales elementos de control de la transcripción identificados en este trabajo y de los sitios de inicio de la transcripción ya descritos. La figura 23 muestra la

“Contig”	Tamaño (pb)	e	Cepa
1757*	1013	2.4e-132	CL Brener
13556	1274	1.9e-132	CL Brener La Cruz Jalisco
28323	884	5.5e-130	CL Brener La Cruz Jalisco
6017	6804	2.7e-130	La Cruz Jalisco
2983	1647	2.7e-81	CL Brener La Cruz Jalisco
6453*	1657	5 e-74	CL Brener La Cruz Jalisco
17148*	1089	9.6e-54	CL Brener La Cruz Jalisco
17988	1009	4.6e-31	CL Brener La Cruz Jalisco
24205	948	1.9e-24	La Cruz Jalisco
7536	30006	1.2e-20	La Cruz Jalisco

Tabla 7. “Contigs” con secuencias similares al promotor de genes de DNAr de *T.cruzi*. Se muestra el número de acceso de cada contig en www.genedb.org, el tamaño, su porcentaje de homología con respecto a la secuencia problema (e) y la secuencia promotora de DNAr con la que presenta similitud. *: secuencia reportada en polaridad 3'-5'.

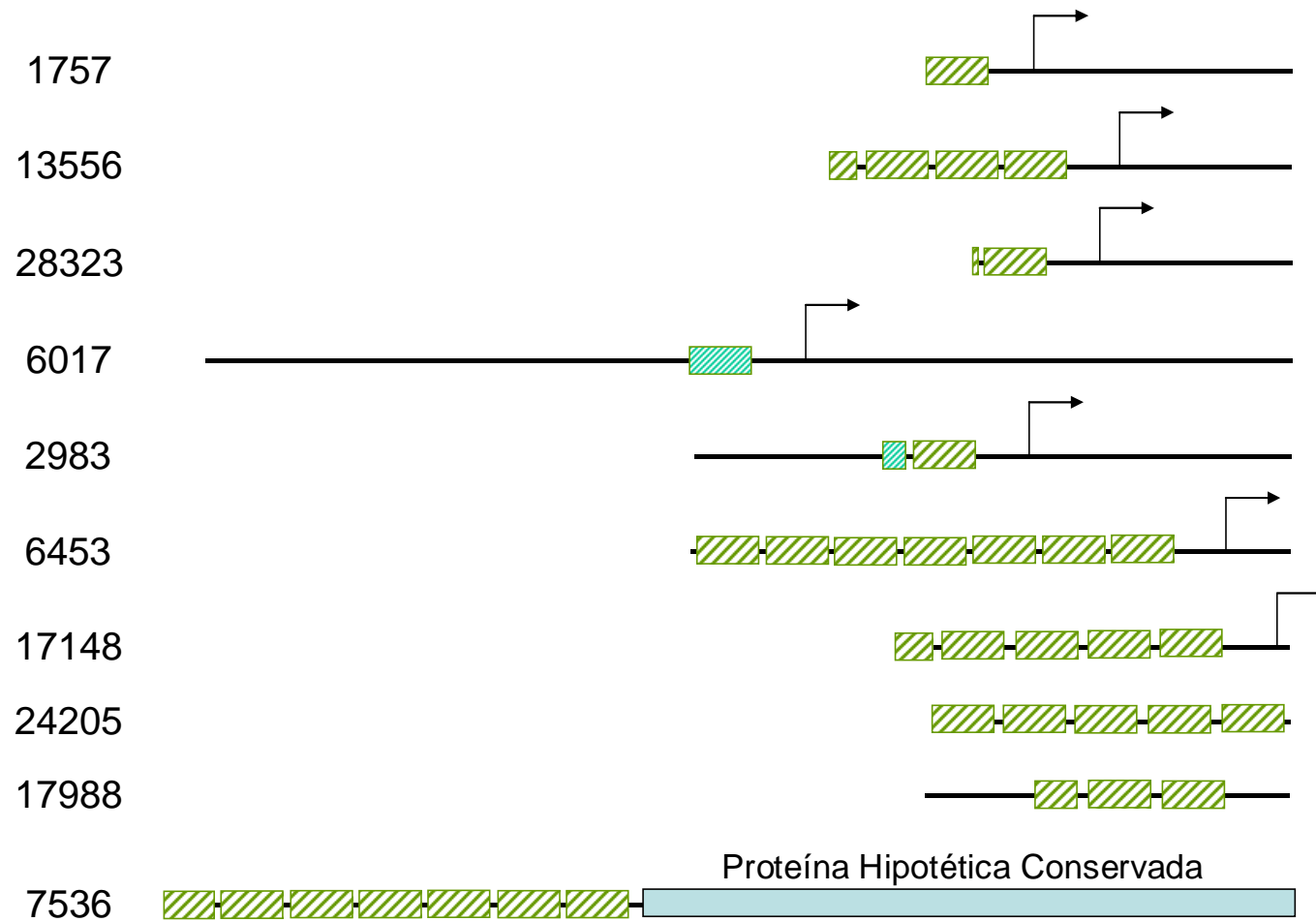


Figura 23. Organización genómica de los diferentes contigs con secuencias promotoras de DNAr. Cajas rayadas (verde oscuro) representan copias de los elementos repetidos de 172 pb, Cajas verde claro, representan copias imperfectas de los elementos repetidos. Flecha indica el sitio de inicio de la transcripción.

organización de los elementos reguladores encontrados en los diferentes “contigs”.

Los “contigs” encontrados presentan una o varias copias del elemento repetidos de 172 pb, algunas son parciales o poseen cambios a nivel de nucleótidos al hacer comparaciones con la secuencia ya reportada para estos elementos (Dietrich P. et al., 1993; Martínez-Calvillo S. et al., 1994).


Para determinar la similitud existente entre las diferentes copias de elementos repetidos en un mismo “contigs”, se compararon las copias de estos elementos entre íi y con la secuencia reportada para los estos en los promotores de DNAr de las cepas CL y La Cruz Jalisco. La Figura 24, ejemplifica el caso de uno de los “contigs” en donde se realizó este alineamiento. Como se observa en la figura, las secuencia de los elementos repetidos presentes en el contig 6453 son muy parecidas entre si y presentan similitudes del 85.5 y 85.9 % con los elementos repetidos reportados en los promotores de DNAr de las cepas La Cruz Jalisco (Martínez-Calvillo S. et al.,1994) y CL (Dietrich P. et al.,1993) respectivamente.

También se analizaron las secuencias localizadas corriente abajo del elemento repetido de 7 “contigs”. Identificamos en primer término el tsp y los elementos de regulación del inicio de la transcripción. Se compararon estos “contigs” con las secuencias del promotor de DNAr de *T.cruzi* cepas CI Brener y la Cruz Jalisco. Como se observa en la figura 25, las secuencias de DNAr encontradas en los diferentes “contigs”, son similares entre si y con las secuencias promotoras descritas en las dos cepas de *T.cruzi*. Esta similitud se mantiene al evaluar por separado cada uno de los elementos reguladores. Al analizar los porcentajes de similitud en los diferentes “contigs”, encontramos que el promotor de DNAr del contig 2983 es más parecido al promotor reportado para la cepa La Cruz Jalisco que al reportado para la cepa CI Brener. El caso contrario se

presenta con los otros “contigs”, en donde estos son muy similares al promotor de la cepa CL Brener.

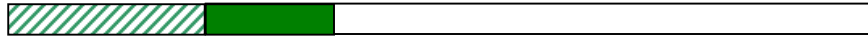
ER CLGGAAATATTCCCCGAACCCACCCTTCCCGTCGCAAGTCGGCGCCGT	48
ER 1	gagcgtggcgcaactcggg-a-att--gca--ca-----	59
ER 2	gagcgtggcgcaactcggg-a-att--gca--ca-----	59
ER 3	gagcgtggcgcaactcggg-a-att--gca--ca-----	59
ER 5	gagcgtggcgcaactcggg-a-att--gca--ca-----	59
ER 6	gagcgtggcgcaactcggg-a-att--gca--ca-----	59
ER 7	gagcgtggcgcaactcggg-a-att--gca--ca-----	59
ER 4	gagcgtggcgcaactcggg-a-att--gca--ca-----t-----	59
ER LACRUZtggga-attt--gca--ca-----a-----	44
ER CL	CCGAGCCACGGAAATCTTGCAGAGAATAACCCGGCGGGTTGTGCCGCGGTTCCCGTGCGT	108
ER 1	----g-----g-----c-----t-----c-----t-----	118
ER 2	----g-----g-----c-----t-----c-----t-----	118
ER 3	----g-----g-----c-----t-----c-----t-----	118
ER 5	----g-----g-----c-----t-----c-----t-----	118
ER 6	----g-----g-----c-----t-----c-----t-----	118
ER 7	----g-----g-----c-----t-----c-----t-----	118
ER 4	----g-----g-----c-----t-----c-----t-----	117
ER LACRUZ	---a-g-----g--c-----ta---t---c--c-----cc---	103
ER CL	GAAACAATTATTGTACGATGTGCACCGTCATAGTCCGGTGCTTTAGCGCATGCGAGTTTC	168
ER 1	-----g-----g-----	178
ER 2	-----g-----g-----	178
ER 3	-----g-----g-----	178
ER 5	-----g-----g-----	178
ER 6	-----g-----g-----	178
ER 7	-----g-----g-----	178
ER 4	-----g-----g-----	177
ER LACRUZ	---c---c-----g-----g-a--c--t--t-----c---ca-c-----	163
ER CL	CCTGGGGGG	177
ER 1	-----	186
ER 2	-----	186
ER 3	-----	186
ER 5	-----	186
ER 6	-----	186
ER 7	-t-----	186
ER 4	-----	185
ER LACRUZ	-t--c----	172

Figura 24. Comparación de las copias del elemento repetido de 172 pb del contig 6453. Se realiza una comparación de secuencia entre el cada una de las 7 copias del elemento repetido del contig y la secuencia de los elementos repetidos encontrados en las cepas CL y La Cruz Jalisco.

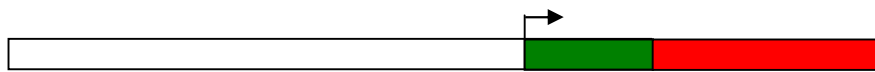


CL Brener	TGGGGGGCTTATTTGGTGTATTGTATTTTAAATTTTTTGTGACTCGGAGGAGTTTTTTG	72
C. 17148-----	53
C. 1757-----	53
C. 6017-----	53
C. 28323-----	53
C. 6453-----	54
C. 13556-----	55
C. 2983-g-g-----a-t-----a-----	53
LA CRUZ	--c-----g-g-----a-t-----a-----	240

UCE CORE



CL Brener	TAATTTTTGGGCACCCCAAAAAAATTTATTGGAGCTTCCGGGGTTTGAACCAAAGTGGG	132
C. 17148	-----	113
C. 1757	-----	113
C. 6017	-----	113
C. 28323	-----	113
C. 6453	-----	114
C. 13556	-----	115
C. 2983	c-----t-t-----t-----c-t---ct-t-	112
LA CRUZ	c-----t-t-----t-----c-t---ct-t-	298



CL Brener	CTTTTTAGCCGTTTCGTTTTGGTTTAGTAAATCATGGAGCGGTGGTCTCTCCGGTGGCC.	191
C. 17148	-----	172
C. 1757	-----	172
C. 6017	-----a-----	172
C. 28323	-----tt-----	172
C. 6453	-----tt-----	173
C. 13556	-----	174
C. 2983	-----a--c-a--gt--c--c-----at-----c	172
LA CRUZ	-----a--c-a--gt--c--c-----at-----c	358

R




CL Brener	AAGTGGCGTCGGAAGGA..TGGCGGCTTT.AGGATCTTTAATTTTTCTCGTTTTTTTTTC	248
C. 17148	-----	229
C. 1757	-----	229
C. 6017	-----g-----	228
C. 28323	-----g-----	228
C. 6453	-----g-----	229
C. 13556	-----	231
C. 2983	-g-----at--t-t-cc-c---g--gg---gt.-----t	231
LA CRUZ	-g-----atc-t-t-cc-c---g--gg---gt.-----t	417




CL Brener	GCGGTCTTTTGGTTGGCATCGCCGTATCGCGTGTGCGGCGCAACTTTCTTTTCGGCTCAT	308
C. 17148	-----	242
C. 1757	-----	289
C. 6017	-----g-----t-----	288
C. 28323	-----	288
C. 6453	-----	289
C. 13556	-----	291
C. 2983	-----c-----g-c---t-----	289
LA CRUZ	-----c-----g-c---t-----	475





CL Brener	TGGTCATTGAGGTTTTTAATAAATGGATTATTTAGGTTTTTGGCCCTTTGCG...CACC	365
C. 1757	-----	346
C. 6017	-----	345
C. 28323	-----c-g-----	345
C. 6453	-----c-g-----	343
C. 13556	-----	348
C. 2983	-----g-----a-----g---c---g-----gcga--	349
LA CRUZ	-----g-----a-----g---c---g-----gcg--	535


		
CL Brener	CGCAGAATGGGAGGGA...TTCATAA...TGGTGTGTACATGT.GTGTGTGGGTCGCAC	417
C. 1757	-----t-----	398
C. 6017	-----	397
C. 28323	-----	397
C. 13556	-----t-----	400
C. 2983	---g-----g-a-ggatt-----...-ta-----ca-t-----a	406
LA CRUZ	---g-----g-a-ggatt-----taat--ta-----ca-t-----a	595

DRE

		
CL Brener	AATTTGTGTGTCATGCTGTGTGCAATGCTTATTT.TGCGTGCTGCGTGCCTTGTGTGAT	476
C. 1757	-----	457
C. 6017	-----	456
C. 28323	-----	456
C. 13556	-----	459
C. 2983	---c-----t-----gc-t-ctg-----t-----	460
LA CRUZ	---c-----t-----gc-t-ctg-----t-----	649

		
CL Brener	TCCAC...TTGTGTGTGTTACTCCATCGTCTCTCCCTGCCGCGTGGGCTGTGCGTAAATT	533
C. 1757	-----	514
C. 6017	-----	513
C. 28323	-----	513
C. 13556	-----	516
C. 2983	---cac-----a-tta--t-atcg---t-cctgc---t-----g---	520
LA CRUZ	---cac-----a-tta--t-atcg---t-cct---t-----g---	709

		
CL Brener	GTGCTTCGCATTAGCGGAAAAT...AAGAGGAATCAACGTGTTCTTTTTTTTTT.CAGAA	589
C. 1757	-----t-----	571
C. 6017	-----t-----	570
C. 28323	-----t-----	570
C. 13556	-----t-----	573
C. 2983	---c-t-g---caa--g-----...---	577
LA CRUZ	--ctg-----c-t-g---caa--g-----...---	767

		
CL Brener	GGGGAGTCAAAGCGCGTGTGGAT	613
C. 1757	-----GCCAAGTCTGTGCAAGAGTAACTATTATTACTACT	631
C. 6017	-----	630
C. 28323	-----	630
C. 13556	-----	633
C. 2983	-----a-----	636
LA CRUZ	-----c-----	827


		
C. 1757	A.CTCTACTACTGCTGCTGCTGCTGCCACTCTACACATACGCGCAGG.....TAC	680
C. 6017	-----	679
C. 28323	-----t-----	676
C. 13556	-----	641
C. 2983	..tg-g-g-----ca-c-. .taca-a-g-g-c-agta---c.....--t	681
LA CRUZ	-cta-g-g-----ca-c-c.taca-a-g-g-c-agta---ccacatatatat--c	886

Figura 25. Comparación de las diferentes regiones promotoras encontradas en los contigs con secuencias de DNAr. Se localizan cada uno de los elementos reguladores descritos. UCE: dominio corriente arriba, CORE: dominio central del promotor, R: secuencia capaz de disminuir la actividad promotora, DRE: secuencia activadora corriente abajo. La flecha indica el sitio de inicio de la transcripción. C: contig

6. DISCUSIÓN

6. DISCUSION

En este trabajo se describen resultados encaminados a la caracterización de una región con actividad promotora de los genes de DNAr en *T.cruzi*, con el fin de determinar la presencia de elementos reguladores que controlan el inicio de la transcripción y establecer la organización del promotor.

6.1. Establecimiento de las condiciones de estudio.

Para llevar a cabo este trabajo, fue necesario instaurar un sistema de estudio que permitiera analizar modificaciones de la secuencia promotora de DNAr. En primer término, se construyó un vector de transfección que contenía una secuencia de DNAr de 806 pb con actividad promotora utilizando como base el plásmido de expresión para tripanosomátidos pTEX-*cat* (Kelly J.M. et al., 1992). El plásmido resultante pRIBO4-*cat* contenía el gen reportero *cat* que codifica para la enzima cloranfenicol acetil transferasa y las secuencias necesarias para el procesamiento por trans-splicing y poliadenilación contenidas en los fragmentos corriente arriba, intergénico y corriente abajo de la *gapdh*. Este plásmido contiene la región promotora de mayor tamaño utilizada en este trabajo y la actividad de CAT mostrada por este vector en epimastigotes transfectados representa el 100% de actividad.

El gen reportero *cat* se empleó para identificar cambios en la fuerza relativa del promotor de DNAr, expresada en diferentes versiones moleculares de éste. Por esta razón fue imperante establecer condiciones experimentales en el ensayo enzimático que permitieran analizar linealmente los cambios en la cantidad de la enzima CAT (niveles de expresión) de una manera sensible. Se probaron diferentes concentraciones de extracto proteico de epimastigotes transfectados con pRIBO4-*cat* a diferentes tiempos y se escogió realizar las mediciones

enzimáticas con las diferentes versiones del promotor con 5 µg de extracto proteico de parásitos transfectados y 30 minutos de reacción.

6.2. El promotor de DNAr de *T.cruzi* presenta elementos reguladores de la transcripción.

Los promotores ribosomales mejor caracterizados pertenecen a eucariontes superiores. En estos tenemos la presencia de cuatro elementos reguladores: terminadores de la transcripción, promotores espaciadores, elementos repetidos y el promotor génico. Este último que está constituido a su vez por dos dominios, el dominio corriente arriba y el dominio central del promotor. Teniendo en cuenta que los promotores ribosomales son especie-específicos, la caracterización de este tipo de promotores ha tenido que hacerse de manera individual.

En los organismos de la familia Tripanosomatidae se han caracterizado parcialmente algunos promotores de DNAr. En algunos casos se han identificado los sitios de inicio de la transcripción, los dominios corriente arriba y central del promotor y los elementos repetidos (Tabla 8).

En la secuencia de 806 pb con actividad promotora, clonada en el plásmido de referencia pRIBO4-*cat*, se describieron inicialmente varios elementos: una copia de un elemento repetido de 172 pb y dos posibles sitios de inicio de la transcripción. Para establecer la funcionalidad de estos elementos e identificar elementos reguladores, se realizaron modificaciones de la secuencia promotora.

La primera modificación realizada al promotor fue invertir su polaridad. Se encontró que su actividad promotora se abate totalmente con la polaridad invertida (plásmido pRIBO5-*cat*, Figura 13). La actividad promotora dependiente

Tripanosomátidos	tsp	Distancia del tsp al 5' del 18S	Dominios Funcionales Identificados	Cajas	Elementos Repetidos (ER)	Terminadores de la transcripción	Número de Acceso	Referencias
<i>C.fasciculata</i>	T T	1055 pb 1053 pb	ND	ND	Dos clases de ER: 4 copias de un ER de 55 a 57 nts (R1-R4) 28 copias de un ER de 19 nts. Función desconocida.	ND	X51407 Y00055	Grondal E.J.M. et 1990; Schnare M.N.et al., 2000
<i>L.amazonensis</i>	T	1047 pb	Dominio central: -74 a +170 Dominio corriente arriba:-74 a -196 Reprime la transcripción	ND	35 copias de 60 pb Función contradictoria	ND	U21687 U21687	Uliana S.R.B. et al., 1996; Stempliuk V.A. et al.; 2002
<i>L.chagasi</i>	T	1027 pb	Dominio central : -179 a +136 Dominio corriente arriba: ND Secuencias corriente abajo del tsp activan la transcripción	ND	9 copias de un ER de 64 pb. Contribuye en un 25 % a la actividad promotora	ND	U42465	Gay L.S. et al.; 199
<i>L.donovani</i>	T	1020 pb	Dominio central: -69 a +17 Dominio corriente arriba: ND	-69 a -57 -46 a -27 -6 a +4	39 copias del ER de 64 pb. Disminuyen la actividad promotora en un 50%.	Pueden haber terminadores arriba de los ER	L38572	Yan. S. et al., 1999
<i>L.mexicana</i>	T	1000 pb	Dominio central: -74 a +170 Dominio corriente arriba: -74 a -196 Reprime la transcripción.	ND	35 copias de un ER de 60 pb Aumentan la transcripción 20 veces	ND	AF421554	Stempliuk V.A. et al., 2002

Tripanosomátidos	tsp	Distancia del tsp al 5' del 18S	Dominios Funcionales Identificados	Cajas	Elementos Repetidos (ER)	Terminadores de la transcripción	Número de Acceso	Referencias
<i>L.major</i>	T	≈ 1000 pb	Dominio central: -74 a +170 Dominio corriente arriba: -74 a -196 Reprime la transcripción.	ND	35 copias de un ER de 64 pb Aumentan la transcripción 20 veces	ND	AF421555	Stempliuk V.A. et al. 2002
<i>L.major Friedlin</i>	T	1043 pb	Trabajan con una secuencia de -184 a +207 Dominios: ND	ND	57 copias de un ER de 63 pb.	ND	AC005806	Martínez-Calvillo S. et al., 2001
<i>T.brucei</i>	C	1200 pb	Promotor: -258 a +10 Dominio central: -75 a +10 Dominio corriente arriba: -258 a -181. Activa la transcripción.	-42 a -13 y -53 a -62 Caja entre el CORE y el UCE es importante. Al igual que la región espaciadora de -40 a -55.	ND	Terminador a 6 nucleótidos del final del cistron ribosomal.	AF416290	White T.C. et al.; 1986; Zomerdijk et al.; 1991; Janz L. et al.; 1994; Laufer G. et al.; 1999 Schimanski. et al.; 2004
<i>T.cruzi</i>	G	1768 pb	Dominio central: -79 a +10 Dominio corriente arriba: -79 a +100 Activa la transcripción	-79 a +47 +1 a +10 No completamente delimitadas	Entre 2 y 7 copias del ER de 172 pb dependiendo de la especie. Contribuye en un 20% a la actividad promotora	ND	M88712 L13926	Dietrich P. et al., 1993; Martínez-Calvillo S. et al.; 1994; Pulido M. et al.; 1996; Figueroa-Angulo E. et al.; 2003

Tabla 8. Resumen de la información sobre los promotores de RNAr y sus diferentes elementos y dominios reguladores de la transcripción. tsp: Sitio de inicio de la transcripción. ND: No determinada. ER: Elemento repetido.

de polaridad es una característica común en los promotores ribosomales (Sommerville J. 1984; Reeder R. 1992).

En este promotor, inicialmente se describieron dos posibles sitios de inicio de la transcripción, el proximal y el distal (Dietrich P. et al., 1993; Martínez-Calvillo S. et al., 1994). Con el fin de establecer si los tsp eran funcionales se realizaron construcciones que tuvieran los dos sitios por separado. El plásmido pPROX1-*cat* contiene únicamente el tsp proximal y 65 pb corriente arriba de éste y no presenta actividad aparente. Teniendo en cuenta que los dominios centrales del promotor descritos en tripanosomátidos presentan límites corriente arriba hasta el nucleótido -69 o -72, y que deleciones corriente abajo de estos nucleótidos abaten por completo la actividad promotora, se realizaron las construcciones pPROX2-*cat* y pPROX3-*cat*. Estos plásmidos contienen un fragmento con 250 pb corriente arriba del tsp proximal clonado en las dos polaridades. Los ensayos de actividad demostraron que no había actividad promotora en ninguna de las dos polaridades; es decir que este tsp no era funcional.

Para el análisis del otro sitio de inicio de la transcripción, el tsp distal (Martínez-Calvillo S. et al., 1994), se construyó el plásmido pRIBO8-*cat* (Figura 14). La actividad de CAT del 80% presentada por esta construcción, demuestra que el tsp distal es el principal contribuyente de la actividad promotora. En ésta construcción, la disminución de la fuerza promotora en un 20% no parece deberse a la influencia del otro sitio de inicio de la transcripción, sino a la existencia de un elemento regulador localizado corriente abajo del tsp funcional o DRE. Un elemento similar capaz de activar la transcripción, localizado corriente abajo del tsp se describió en *L.chagasi* (Gay L.S. et al., 1996) (Tabla 8, Figura 26).

Se ha probado experimentalmente que los promotores de DNAr de cepas del grupo T.cruzi I son funcionales en aislados pertenecientes a ambos grupos; sin embargo, los promotores pertenecientes a cepas del grupo T.cruzi II son

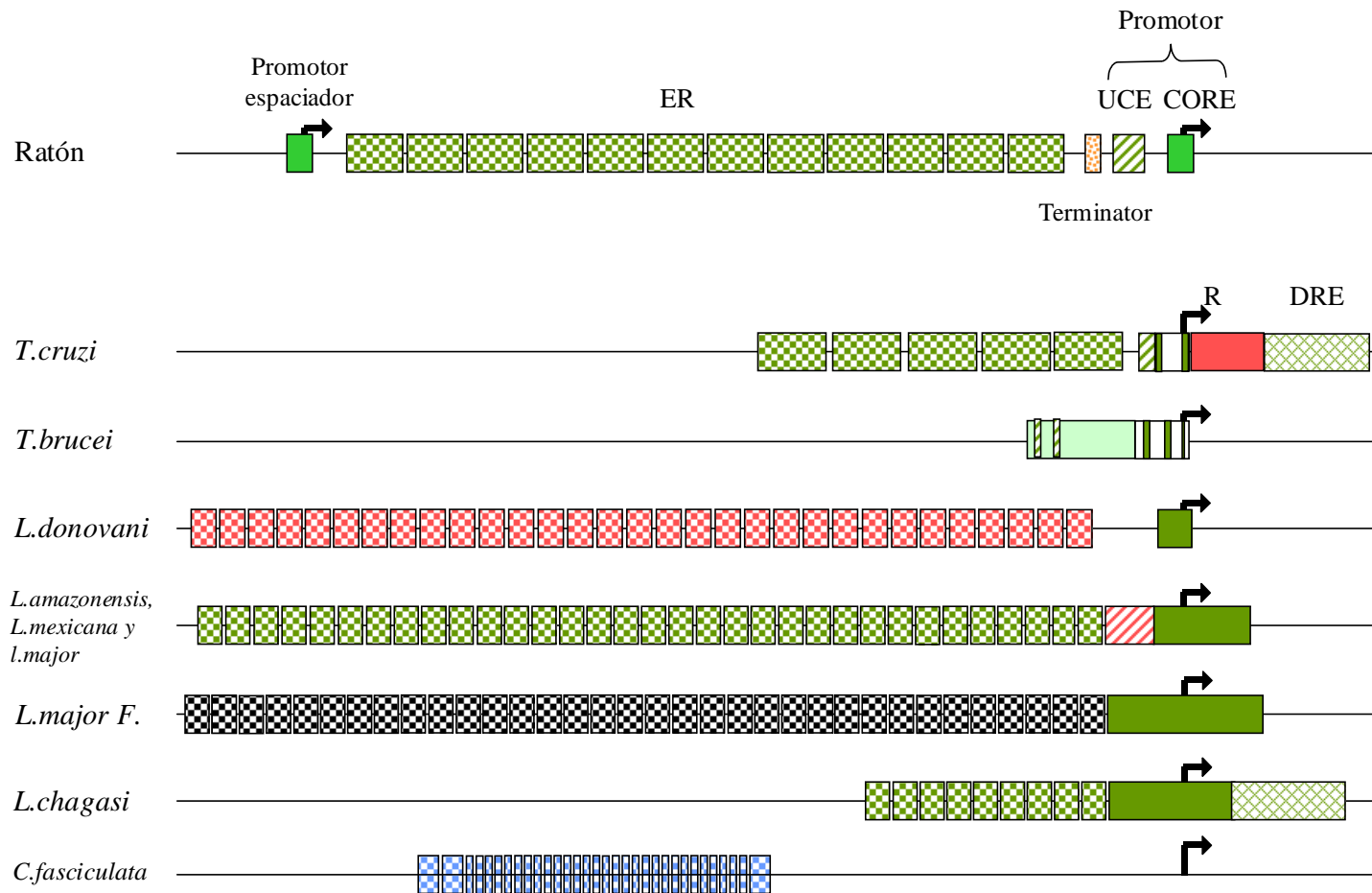


Figura 26. Comparación de la organización estructural de los promotores de DNAr en los diferentes cinetoplastideos en las secuencias localizadas 3 kb corriente arriba de la región codificadora para el RNAr 18S. Se coloca como referencia el promotor de DNAr de ratón. En verde se muestran las secuencias que activan la transcripción, en rojo aquellas que reprimen la transcripción, en negro las que no contribuyen a la actividad promotora y en azul aquellas con función no determinada. La flecha: sitio de inicio de la transcripción. Ratón (Reeder R. 1992), *T. cruzi* (Dietrich P. et al., 1993; Martínez-Calvillo S. et al., 1994; Pulido M. et al., 1996; Figueroa-Angulo E. et al., 2003); *T. brucei* (White T.C. et al. ; 1986; Zomedijk J. et al., 1991; Janz L. et al., 1994; Laüfer G. et al., 1999; Schimaski et al., 2004); *L. donovani* (Yan S. et al., 1999); *L. amazonensis*, *L. mexicana*, *L. major* (Uliana S.R.B. et al., 1996; Stempluk V.A. et al., 2002); *L. major* Friedlin (Martínez-Calvillo S. et al., 2001); *L. chagasi* (Gay L. et al., 1996); *C. fasciculata* (Grondal et al., 1990; Schnare M. et al., 2000).

funcionales únicamente en aislados pertenecientes a su propio grupo (Nunes L.R. et al., 1997). Los sitios de inicio de la transcripción proximal y distal fueron mapeados en dos cepas de *T.cruzi* y teniendo en cuenta que pertenecen a linajes distintos, se pensó que la funcionalidad de estos tsp podría ser cepa-específico. El tsp proximal fue descrito en la cepa CL perteneciente al grupo *T.cruzi* II y el sitio distal se describió en la cepa La Cruz Jalisco perteneciente al grupo *T.cruzi* I. Durante el transcurso de este trabajo Wen y col. (2001) identificaron en la cepa CL Brener (grupo *T.cruzi* II) el sitio de inicio de la transcripción para el promotor de DNAr que se localiza en la región donde se había mapeado el tsp distal. Una comparación de las secuencias de promotoras con sitios de inicio de la transcripción descritos experimentalmente demostró que las secuencias son alineables, por lo tanto la descripción del tsp proximal no se debe a diferencias en la secuencia (Figura 15). Probablemente el sitio proximal corresponda más bien a un sitio de procesamiento temprano en el pre-RNAr.

En eucariontes (incluyendo otros miembros del orden Cinetoplastidia), se han identificado elementos repetitivos en las regiones intergénicas de los genes ribosomales (Reeder R. 1992; Gay L.S. et al., 1996.; Uliana S.R.B. et al., 1996; Yan S. et al., 1999). Estos elementos son capaces de aumentar la transcripción de los genes del locus ribosomal uniendo proteínas de la maquinaria transcripcional de la RNA pol I. Para establecer si el elemento repetitivo de 172 pb hallado en la secuencia con actividad promotora de DNAr de *T.cruzi*, poseía un tipo de actividad semejante a la hallada en otros eucariontes, se construyó una versión de la región promotora que no contiene el elemento repetido de 172 pb. Encontramos que este elemento parece contribuir en un 20% a la actividad promotora (plásmido pRIBO6-*cat*, Fig. 16). Los datos sobre función de este elemento en tripanosomas son contradictorios. Elementos repetidos (64 pb) localizados corriente arriba de la región promotora han mostrado actividad estimuladora (“enhancer”) en *Leishmania (L.) chagasi* (Gay L.S. et al., 1996). En esta especie se ha observado una contribución del 25% en la expresión del gen

reportero luciferasa. De igual manera Stempliuk y col. (2002) determinaron que elementos repetidos localizados en los promotores de DNAr de *L. donovani*; *L. mexicana* y *L. major* son capaces de activar la transcripción 20 veces. En *L. amazonensis* (Uliana S.R.B. et al., 1996) y *L. donovani* (Yan S. et al., 1999) estos elementos repetidos de 60 y 64 pb respectivamente, no mostraron un efecto activador de la actividad promotora (Figura 26).

Dado que el sitio de inicio de la transcripción distal es el responsable de la actividad promotora, se decidió acotar la región con actividad promotora alrededor de este sitio e identificar los dominios del promotor: el dominio corriente arriba o "UCE" y el dominio central del promotor o "CORE". Una doble deleción que incluye el elemento regulador corriente abajo (DRE) y la copia del elemento repetido muestran un aumento en la actividad de CAT (pRIBO9-*cat*, Figura 17). No entendemos este efecto, pero suponemos que puede existir algún tipo de interacción reguladora compleja (no lineal) entre estas dos secuencias.

La siguiente construcción que realizamos fue el plásmido pRIBO10-*cat*. Este contiene las secuencias entre los nucleótidos -79 a +207 y presenta un actividad del 63 %. La comparación de este plásmido con pRIBO9-*cat*, nos llevó a pensar en la existencia de un dominio regulador corriente arriba del *tsp* o UCE. En eucariontes superiores, este elemento se localiza corriente arriba del dominio central del promotor y es capaz de activar la transcripción uniendo los factores de transcripción UBF (Factor de unión corriente arriba) y SL1 (factor de selectividad) (Moss T. et al.; 2002). Un ensayo de deleciones nos permitió localizar un probable dominio UCE de 21 pb que mapea entre los nucleótidos -100 y -79 (Figura 17). Dominios similares se han descrito en *T. brucei* y algunas de las especies de *Leishmania* pero su funcionalidad es contradictoria (Zomerdiik J.C.B.M. et al., 1991; Laüfer G. et al., 1999; Schimanski B et al., 2004; Sptempliuk V.A. et al., 2002). Únicamente para las especies de

Trypanosoma, este elemento parece funcionar de manera similar al dominio corriente arriba de otros eucariontes (Figura 26).

Con el fin de acotar la región promotora e identificar el dominio central del promotor, se realizaron deleciones corriente abajo del tsp funcional. El primer corte realizado corriente abajo del tsp, hasta el nucleótido +100 mostró un aumento en la actividad promotora al compararlo con la actividad de CAT presentada por el plásmido pRIBO10-*cat* (Figura 18). Modificaciones sucesivas en el extremo 3' de la secuencia promotora (hasta el nucleótido +10), mostraron aumentos progresivos en la actividad promotora (Figura 18, plásmidos pRIBO10-*cat*, pRIBO13-*cat*, pRIBO14-*cat*, pRIBO15-*cat* y pRIBO16-*cat*). De esta manera identificamos una secuencia de 197 pb capaz de disminuir la actividad promotora (R, Figura 26). Elementos reguladores negativos de este tipo no han sido descritos anteriormente en promotores de DNAr.

El dominio central del promotor o "CORE" se caracteriza principalmente por contener el tsp (Reeder R. 1992). Funcionalmente se han caracterizado los dominios centrales del promotor de DNAr para algunas de las especies de tripanosomátidos (Tabla 5, Figura 26).

El plásmido pRIBO16-*cat* que contiene las secuencias entre los nucleótidos -79 a +10 y muestra una actividad similar a la del plásmido de referencia pRIBO4-*cat* (Figura 18). Deleciones por debajo del nucleótido +10 muestran una disminución en la actividad promotora del 50%. De igual manera la deleción de 10 pb corriente abajo del nucleótido -69 generan caídas en la actividad de CAT a niveles de fondo. Es decir que las secuencias localizadas entre los nucleótidos -79 y -69 y +1 y +10 son importantes para la actividad promotora. Teniendo en cuenta la importancia de estos nucleótidos y que el fragmento clonado en la construcción pRIBO16-*cat* presenta una actividad de CAT del 100%, establecimos que este dominio central del promotor se localiza entre los nucleótidos +10 y -79 con respecto al tsp descrito por Martínez-Calvillo S. y col.

(1994) (Figura 18). Al comparar los dominios ya caracterizados en Tripanosomátidos, podemos observar que estos comprenden entre 80 y 90 pb alrededor del tsp. Comparaciones de la secuencia de nucleótidos de estos dominios centrales muestran poca conservación; encontrando similitud solo entre las especies de *Leishmania sp* (resultados no mostrados). Esto no es sorprendente ya que los promotores ribosomales son especie-específicos.

Establecimos la presencia y función de varios elementos reguladores: elementos repetidos, el dominio corriente arriba y el dominio central del promotor, una secuencia capaz de disminuir la actividad promotora y un dominio regulador corriente abajo. Estos elementos se determinaron infiriendo la fuerza promotora de las diversas versiones moleculares del promotor, a partir de la actividad enzimática de CAT. Para asegurarnos que los cambios en la actividad promotora no se debieran a diferencias en la transfección de cada una de las construcciones plasmídicas, incluimos el vector de co-transfección pRIBO16-*luc*. Los resultados muestran que no hay cambios significativos en la actividad de la enzima luciferasa corroborando indirectamente los resultados de los ensayos CAT.

El análisis de deleciones nos permitió establecer la organización de esta región promotora (Figura 26). En eucariontes superiores existen estos elementos organizados de una manera similar lo que haría pensar en la conservación de los mecanismos reguladores (Figura 26, ratón) (Reeder R. 1992). Teniendo en cuenta la divergencia evolutiva temprana de *T.cruzi* y la ausencia de regulación a nivel transcripcional para los genes codificadores de proteínas en este organismo, los resultados obtenidos apoyarían una hipótesis sobre la aparición evolutivamente temprana de los mecanismos de regulación transcripcional del RNAr en eucariontes.

6.3. Dominios reguladores del promotor de DNAr están conservados en las diferentes cepas de *T.cruzi*.

Nunes L.R. y col. (1997) reportaron las secuencias del promotor de DNAr de varias cepas sudamericanas de *T.cruzi* y su comparación permitió subdividir en dos grupos a estos promotores. Tranfecciones transitorias llevadas a cabo con plásmidos reporteros construidos con un promotor representativo de cada grupo indicaron que los promotores del grupo T.cruzi I son activos en cepas de ambos grupos; sin embargo, los promotores de DNAr de cepas del grupo T.cruzi II son funcionales en cepas de ese mismo grupo, pero no en aislados que tienen el promotor del grupo T.cruzi I. Proponen por un lado, que estas diferencias pueden deberse a un uso diferencial del tsp es decir, que las cepas pertenecientes al grupo T.cruzi I iniciaran la transcripción del DNAr a partir del tsp distal y que las cepas del grupo T.cruzi II lo harán a partir del tsp proximal. Descripciones posteriores de sitios de inicio de la transcripción en cepas pertenecientes a los dos grupos que mapean en la región del tsp distal y nuestros análisis funcionalidad que proponen al tsp distal como el principal contribuyente de la actividad promotora, contradicen ésta hipótesis (Wen L.M. et al.,2001; Stolf B.S. et al.,2003).

La otra hipótesis de este grupo proponía que las diferencias funcionales podían deberse a que la maquinaria transcripcional de cepas del grupo T.cruzi I fuera mas promiscua y reconociera elementos de secuencia menos estrictos, no así las cepas del grupo T.cruzi II (Nunes L.R. et al.,1997). Comparamos las secuencias de nucleótidos para cada uno de los potenciales elementos reguladores descritos en este trabajo en promotores de DNAr de varias cepas de *T.cruzi*. Como se observa en la figura 20, los elementos reguladores localizados corriente arriba del tsp parecen estar conservados en los dos grupos genéticos de *T.cruzi*. Las mayores diferencias (62.3 y 64.4% de similitud) a nivel de nucleótidos las encontramos en el dominio R y el dominio DRE pudiendo estar

estos dominios involucrados la regulación diferencial de la transcripción entre los dos grupos de aislados.

6.4. Análisis fino de la región del sitio de inicio de la transcripción.

Otra parte del trabajo se enfocó al análisis mutacional de la región que contiene el tsp. La caída en la actividad promotora a niveles de fondo al mutar de una región de 6 pb que contiene los tres tsp descritos en este organismo (Martínez-Calvillo S. et al., 1994; Wen L.M. et al., 2001; Stolf B.S. et al., 2003) indica la importancia de estos para la funcionalidad del promotor (Figura 21). Al cambiar cada uno de los 6 nucleótidos, encontramos diferentes bajas en la actividad promotora (actividades entre un 10 y un 40 %) siendo la más significativa la mutación del tsp descrito por Wen L.M: y col. (2001) (Figura 22). No pudimos obtener, como esperábamos, una disminución de la actividad a niveles de fondo, al mutar alguno de estos nucleótidos, posiblemente este promotor tenga tps alternativos donde se puede iniciar la transcripción con diferente potencia. Un análisis de los 4 nucleótidos adyacentes a estas 6 bases importantes nos permitió determinar que el nucleótido localizado en la posición -5 con respecto al tsp descrito por Martínez-Calvillo S. y col. (1994) también es importante para la actividad promotora (Figura 22). La mutación de los otros tres nucleótidos no parece tener efecto en la actividad promotora.

Estos resultados nos hablan de una secuencia de 7 nucleótidos que contiene los tsp descritos importante para la actividad promotora que constituye una huella funcional.

6.5. Polimorfismo del promotor DNAr de *T.cruzi* CL Brener

Existen 219 copias del cistrón de genes de DNAr de *T.cruzi* CL Brener organizadas en tandem y separadas entre ellas por secuencias integénicas de

aproximadamente 20 kb (Castro C. et al., 1981; Hernández R. et al., 1983; El-Sayed N.M. et al., 2005). Dentro de las secuencias reportadas para el proyecto del genoma de éste parásito, se identificaron 10 “contigs” diferentes que contenían parte de la secuencia intergénica de DNAr de *T.cruzi*. En algunos de estos “contigs” fue posible identificar copias de los elementos repetidos. Estos elementos están asociados específicamente a los cistrones ribosomales (Pulido M. et al.; 1996). Otros elementos como los sitios de inicio de la transcripción y los potenciales elementos reguladores descritos en este trabajo (Figuras 24 y 25) también pudieron ser identificados, encontrándose organizados de manera similar y conservando entre ellos las mismas distancias.

En cuanto a los elementos repetidos, en la figura 24 se observa un alto grado de similitud entre las diferentes copias de estos elementos en un mismo cistrón ribosomal. Al comparar estos elementos con los reportados para las cepas CL que pertenece al grupo *T.cruzi* II (Dietrich et al., 1993) y La Cruz Jalisco del grupo *T.cruzi* I (Martínez-Calvillo S. et al., 1994) encontramos una mayor semejanza en algunos casos (contig 6453) con los elementos repetidos encontrados en aislados del grupo *T.cruzi* I. Un evento similar se presenta cuando analizamos las secuencias del promotor. En este caso dependiendo del elemento regulador evaluado encontramos “contigs” que presentan una alta homología con los promotores de la cepa CL Brener; sin embargo, otras secuencias promotoras (contig 2983) presentan una alta similitud con el promotor de DNAr del aislado La Cruz Jalisco (grupo *T.cruzi* I). A pesar de estos resultados es posible observar cierto polimorfismo entre las diferentes copias de las secuencias intergénicas del promotor de DNAr (Figura 25).

T.cruzi está clasificado como una sola especie, aunque existe una diversidad genética y fenotípica entre los diferentes aislados. Como mencioné anteriormente, las diferentes cepas se han dividido en dos linajes principales en base a marcadores protéicos y genéticos: *T.cruzi* I y *T.cruzi* II (subdividido en cinco subgrupos). La replicación de *T.cruzi* es predominantemente clonal,

aunque hay evidencia de un intercambio genético limitado entre cepas. Un mecanismo para el intercambio genético en este organismo ha sido identificado experimentalmente e involucra una fusión de genotipos parentales, hibridización nuclear, pérdida de alelos y recombinación homóloga (Gaunt et al.; 2003). La cepa CL Brener escogida para la secuenciación del genoma es una cepa híbrida perteneciente al grupo T.cruzi II, subgrupo IIe, cuyo linaje ancestral está representado por los subgrupos IIb y IIc (Brisse S. et al., 1998; El-Sayed N.M. et al., 2005). En el 2005, Westenberger y col. propusieron un modelo de fusión entre cepas del grupo T. cruzi I y aislados del subgrupo IIb que llevó a generar híbridos heterocigos que posteriormente homogenizaron su genoma y originaron los subgrupos IIa y IIc. Un segundo evento de hibridización entre cepas de los grupos IIb y IIc crearon los subgrupos IId y IIe, resultando en una extensa heterocigosis. Por ende, la cepa de referencia para el proyecto genoma contiene secuencias pertenecientes al grupo T.cruzi I y a los subgrupos IIb y IIc. Al analizar los “contigs” que contienen el promotor de DNAr, encontramos una secuencia similar a la reportada para la cepa La Cruz Jalisco, perteneciente al grupo T.cruzi I y secuencias similares a la reportada para el promotor de DNAr de la cepa CL Brener. Esto puede deberse a la naturaleza híbrida antes mencionada de este aislado. Debido a que no contamos con secuencias del promotor de DNAr de aislados pertenecientes a los subgrupos IIb y IIc, no nos fue posible identificar si algunas de las secuencias de los “contigs” analizados pertenecían específicamente a estos subgrupos. Sin embargo, existen entre las secuencias similares al promotor de DNAr de la cepa CL Brener, dos grupos de “contigs” que muestran diferencias a nivel de nucleótidos. Un grupo contiene los “contigs”: 17148,1757, 6017 y 13556 y el otro los “contigs”: 28323 y 6453. Pudiera ser, que estos representaran secuencias del promotor de los dos subgrupos que generaron el aislado CL Brener.

7. CONCLUSIONES

6. CONCLUSIONES

- Se establecieron las condiciones para medir la expresión del reportero CAT en una zona sensible (lineal), estimulada por el promotor de DNAr de *T.cruzi*.
- Se demostró que el promotor de DNAr es dependiente de polaridad.
- Se encontró que el elemento repetido de 172 pb parece contribuir en un 20% de la actividad del promotor analizado.
- Se determinó que el sitio de inicio de la transcripción proximal no parece contribuir a la actividad promotora, bajo estas condiciones de estudio.
- El sitio de inicio de transcripción distal es el principal contribuyente de la actividad total de la secuencia con actividad promotora, muy probablemente el único.
- Se identificó un posible elemento activador de la transcripción entre los nucleótidos -100 y -79 que por similitud con los promotores ribosomales eucarionticos corresponde al dominio de activación corriente arriba o "UCE"
- Hemos acotado la región promotora entre los nucleótidos -79 pb a +10 con respecto al sitio de inicio de transcripción distal, que por comparación con los promotores homólogos en cinetoplástidos contiene el dominio "CORE" o fundamental del promotor.
- Establecimos la presencia de un elemento entre los nucleótidos +10 y +207 que disminuye la actividad promotora.

- Describimos un dominio regulador corriente abajo o DRE (por sus siglas en inglés) que es capaz de activar la transcripción en un 20%.
- Los nucleótidos entre -79 y -69 y entre +1 y +10, son importantes para la actividad promotora.
- La organización de los elementos reguladores de este promotor es similar a la encontrada en eucariontes superiores. Teniendo en cuenta la divergencia evolutiva temprana y la aparente falta de promotores para genes codificadores de proteínas en este organismo, podemos pensar en una aparición temprana de los mecanismos de regulación del promotor de DNAr.
- El cambio de 7 pb alrededor de los sitios de inicio de la transcripción descritos genera una caída en la función promotora a niveles del fondo, siendo esta una región fundamental para actividad.
- La mutación de cada uno de estos siete nucleótidos presenta una disminución en la actividad promotora (entre un 10 y 40%). Esto sugiere que cada uno de estos es importante para la función del promotor, constituyendo una huella funcional.
- El análisis de las regiones intergénicas de DNAr de *T.cruzi* cepa CL Brener descritas en el proyecto genoma, evidenció la presencia de secuencias del promotor ribosomal que pertenecen a los dos linajes genéticos en que se dividen esta especie.

8. BIBLIOGRAFIA

8. BIBLIOGRAFÍA

- Agabian, N.** Trans-splicing of nuclear pre-mRNAs. *Cell*. 1990. 61:1157-60.
- Anonimo.** Recommendations from a Satellite Meeting. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*. 1999. 94 (suplemento I):429-432.
- Bell, S.P.; Lernaed, R.M.; Jantzen, H.; Tjian, R.** Fuctional cooperativity between transcription factors UBF1 and SL1 mediates human ribosomal RNA syntesis. *Science*. 1988. 241:1192-1197.
- Benne, R.; Van Der Brurg, J.; Brakenhoff, J.P.J.; Sloof, P.; Van Bomm, J.H.; Tromp, M.C.** Major transcript of the frameshifted cox II gene from trypanosome mitochondria contains four nucleotides that are not encoded in the DNA. *Cell*. 1986. 46:819-826.
- Benne, R.** RNA editing in trypanosomes. *European Journal of Biochemistry*. 1994. 221:9-23.
- Blum B.; Bakalara N.; Simpson L.** A model for RNA editing in kinetoplastid mitochondria: "guide" RNA molecules transcribe from maxicircle DNA provide the edited information. *Cell*. 1990. 60:189-198
- Botero D.; Restrepo M.** *Parasitosis Humana*. Segunda Edición. CIB. Corporación para Investigaciones Biológicas. 1992.
- Boothroyd, J.C.; Cross, G.A.M.** Transcripts coding for different variant surface glycoproteins of *Trypanosoma brucei* have a short, identical exon at their 5'end. *Gene*. 1982. 20:281-89.
- Brisse, S.; Barnabe, C.; Banuls, A.L.; Sidibe, I.; Noel, S.; Tibayrenc, M.** A phylogenetic analysis of the *Trypanosoma cruzi* genome project CL Brener reference strain by multilocus enzyme electrophoresis and multiprimer random amplified polymorphic DNA fingerprinting. *Molecular and Biochemical Parasitology*. 1998. 92:253-263.
- Brisse, S.; Dujardin, J.C.; Tibayrenc, M.** Identification of six *Trypanosoma cruzi* lineages by sequence-characterised amplified region markers. *Molecular and Biochemical Parasitology*. 2000. 111:95-105.

Brisse, S.; Henriksson, J.; Barnabe, C.; Douzery, E.J.; Berkvens, D.; Serrano, M.; De Carvalho, M.R.; Buck, G.A.; Dujardin, J.C.; Tibayrenc, M. Evidence for genetic exchange and hybridization in *Trypanosoma cruzi* based on nucleotide sequences and molecular karyotype. *Infection, Genetics and Evolution*. 2003. 2:173-183.

Burleigh B.A.; Andrews N.W. The mechanisms of *Trypanosoma cruzi* invasion of mammalian cells. *Annual Review of Microbiology*. 1995. 49:175-200.

Cano, M.I.; Gruber, A.; Vazquez, M.; Cortes, A.; Levin, M.J.; Gonzalez, A.; Degraeve, W.; Rondinelli, E.; Zingales, B.; Ramirez, J.L.; et al. Molecular karyotype of clone CL Brener chosen for the *Trypanosoma cruzi* genome project. *Molecular and Biochemical Parasitology*. 1995. 2:273-278.

Campbell, D.A.; Sturm, N.R.; Yu, M.C. Transcription of the Kinetoplastid splice leader RNA gene. *Parasitology Today*. 2000. 16:78-82.

Campbell, D.A.; Thomas, S.; Strum; N.R. Transcription in kinetoplastid protozoa why be normal?. *Microbes and Infection*. 2003. 5:1231-1240.

Cassidy, B., Haglund, R.; Rothblum L.I. Region upstream from the core promoter of the rat ribosomal gene are required for the formation of a stable transcription initiation complex by RNA polymerase I in vitro. *Biochemical and Biophysical Acta*. 1987. 909:133-144.

Castro, C.; Hernandez, R.; Castañeda, M. *Trypanosoma cruzi* ribosomal RNA: Internal break in the large molecular mass species and number of genes. *Molecular and Biochemical Parasitology*. 1981. 2: 219-233.

Chapman A.; Agabian N. *Trypanosoma brucei* RNA polymerase II is phosphorylated in the absence of carboxyl-terminal domain heptapeptide repeats. *Journal of Biological Chemistry* .1994. 269: 4754-4760.

Chung, H.M.; Lee, M.G.S.; Van der Ploeg, L.H.T. RNA polymerase I-mediated protein-coding gene expression in *Trypanosoma brucei*. *Parasitology Today*. 1993. 8:414.

Comai, L., Tanese, N.; Tjian, R. The TATA-binding protein and associated factors are integral components of the RNA polymerase I transcription factor, SLI. *Cell*. 1992. 68: 965-976.

Cordingley, S.J.; Turner, M.J. 6.5S RNA; preliminary characterization of unusual small RNAs in *Trypanosoma brucei*. *Molecular and Biochemical Parasitology*. 1980. 1: 91-96.

Current protocols in Molecular Biology. Supplement 14. 1991 (9.0.3-6,9.3.1-4) Supplement 14. 1990 (9.6.1-9)

De Souza, W. Basic Cell Biology of *Trypanosoma cruzi*. *Current Pharmaceutical Design*. 2002. 8:269-285.

Dietrich, P.; Soares, M.B.; Affonso, M.H.T.; Floeter-Winter, L.M. The *Trypanosoma cruzi* ribosomal RNA-encoding gene: analysis of promoter and upstream intergenic spacer sequences. *Gene*. 1993. 125:103-107.

Durante E.; González S. Vectores Transmisores: Triatominos, "Vinchucas". Capítulo 4. Enfermedad de Chagas. Editorial Mosby. 1994, 41-50.

Ebert, F.; Schudnagis, R.; Muhlpfordt, H. Protein typing of some species of trypanosomes with special emphasis on *Trypanosoma cruzi*. *Tropical Medicine in Parasitology*. 1978. 29:115-118.

El-Sayed N.M.; Myler P.J.; Bartholomeu D.C.; Nilsson D.; Aggarwal G.; Tran A.N.; Ghedin E.; y otros. The genome sequence of *Trypanosoma cruzi*, etiologic agent of Chagas disease. *Science*. 2005. 309:409-415.

Ersfeld, K.; Melville, S.E.; Gull, K. Nuclear and Genome Organization of *Trypanosoma brucei*. *Parasitology Today*. 1999. 15:58-64.

Evers R.; Hammer A.; Kock J.; Jess W.; Borst P. *Trypanosoma brucei* contains two RNA polymerase II largest subunit genes with an altered C-terminal domain. *Cell*. 1989. 56: 585-597.

Feagin J.E.; Abraham J.M.; Stuart K. Extensive editing of the cytochrome C oxidase II transcript in *Trypanosoma brucei*. *Cell*. 1988. 53:413-422

Fernandes, O.; Souto, R.P.; Castro, J.A.; Pereira, J.B.; Fernández, N.C.; Junqueira, A.C.V.; Naiff, R.D.; Barret, T.V.; Degrave, W.; Zingales, B.; Campbell, D.A.; Coura, J.R. Brazilian isolates of *Trypanosoma cruzi* from humans and triatomines classified into two linajes using mini-exon and ribosomal RNA sequences. *American Journal for Tropical Medicine and Hygiene*. 1998. 58:807-811.

Figueroa-Angulo, E.; Martínez-Calvillo, S.; López-Villaseñor, I.; Hernández, R. Evidence supporting a major promoter in the *Trypanosoma cruzi* rRNA gene. *FEMS Microbiology Letters*. 2003. 225:221-225.

Frasch, A.C.; Zingales, B.; Rondinelli, E.; Degrave, W.; da Silveira, J.F.M. The *Trypanosoma cruzi* genome initiative. *Parasitology Today*. 1997. 13:16-22.

Gaunt, M.W.; Yeo, M.; Frame, I.A.; Stothard, J.R.; Carrasco, H.J.; et al. Mechanism of genetic exchange in American trypanosomes. *Nature*. 2003. 421:936-939.

Gay, L.S.; Wilson, M.E.; Donelson, J.E. The promoter for the ribosomal RNA genes of *Leishmania chagasi*. *Molecular and Biochemical Parasitology*. 1996. 77:193-200.

Gilinger, G.; Bellofatto, V. Trypanosome splice leader RNA genes contain the first identified RNA polymerase II gene promoter in these organisms. *Nucleic Acid Research*. 2001. 29: 1556-1564.

Gourse, R.L.; Gaal, T.; Bartlett, M.S.; Appleman, J.A.; Ross, W. rRNA transcription and growth rate-dependent regulation of ribosome synthesis in *Escherichia coli*. *Annual Review of Microbiology*. 1996. 50: 645-677.

Gray, M.W. Unusual pattern of ribonucleic acid components in the ribosome of *Crithidia fasciculata*, a tripanosomatid protozoan. *Molecular Cell Biology*. 1981. 1:347-357.

Grondal, E.J.M.; Evers, R.; Cornelissen, A.W.C.A. Identification and sequence analysis of the ribosomal DNA promoter region of *Crithidia fasciculata*. *Nucleic Acid Research*. 1990. 18: 1333-1338.

Grummt, I.; Kuhn, A.; Bartsch, I.; Rosenbauer, H. A transcription terminator located upstream of the mouse rDNA initiation site affects rRNA synthesis. *Cell*. 1986. 47:901-911.

Grummt, I.; Maier, U.; Ohrlein, N.; Hassouna, N.; Bachellerie, J.P. Transcription of mouse rDNA terminates downstream of the 3' end of the 28S RNA and involves interaction of the factors with repeated sequences in the 3'spacer. *Cell*. 1986. 43:801-810.

Haltiner, M.M.; Smale, S.T.; Tjian, R. Two distinct promoter elements in the human rRNA gene identified by linker scanning mutagenesis. *Molecular Cell Biology*. 1986. 227-235.

Hernández, R.; Nava, G.; Castañeda M. Small size ribosomal RNA species in *Trypanosoma cruzi*. *Molecular and Biochemical Parasitology*. 1983. 8: 297-304.

Hernández, R.; Castañeda, M. An endonuclease restriction analysis of the ribosomal RNA genes of *Trypanosoma cruzi*. *Molecular and Biochemical Parasitology*. 1983. 8:305-315

Hernández, R.; Diaz de León, F.; Castañeda M. Molecular cloning and partial characterization of ribosomal RNA genes from *Trypanosoma cruzi*. *Molecular and Biochemical Parasitology*. 1988. 27: 275-280.

Hernández, R.; Martinez-Calvillo, S.; Hernández-Rivas, R.; Gomez, E. *Trypanosoma cruzi* ribosomal RNA genes: a review. *Biological Research*. 1993. 26:109-114.

Hernández-Rivas, R.; Martinez-Calvillo, S.; Romero, M.; Hernández, R. *Trypanosoma cruzi* 5S rRNA genes: molecular cloning, structure and chromosomal organization. *FEMS Microbiology Letters*. 1992. 92:63-68.

Huang, J.; Van der Ploeg, L.H.T. Maturation of polycistronic pre-mRNA in *Trypanosoma brucei*: análisis of trans-splicing and poly(A) addition at nascent RNA transcripts from the hsp70 locus. *Molecular and Cellular Biology*. 1991. 11: 3180-3190.

Imboden, M.A.; Laird, P.W.; Affolter, M.; Seebeck T. Transcription of the intergenic regions of the tubulin gene cluster of *Trypanosoma brucei*: evidence for a polycistronic transcription unit in a eukaryote. *Nucleic Acid Research*. 1987. 15:7357-68.

Jantzen H., Admon A.; Bell S.P.; Tjian R. Nucleolar transcription factor hUBF contains a DNA-binding motif with homology to HMG proteins. *Nature*. 1990. 334:830-836.

Janz, L.; Clayton C. The PARP and rRNA promoters of *Trypanosoma brucei* are composed of dissimilar sequence elements that are functionally interchangeable. *Molecular Cell Biology*. 1994. 14:5804-5811.

Jess W.; Hammer A.; Cornelissen A.W.A.C. Complete sequence of the gene encoding the largest subunit of the RNA polymerase I of *Trypanosoma brucei*. FEBS letters. 1989. 249:123-28.

Johnson, P.; Kooter, J.; Borst, P. Inactivation of transcription by UV-irradiation of *T.brucei* provides evidence for a multicistronic transcription unit including a VSG genes. Cell. 1987. 51:273-81.

Kelly J.M.; Ward, H.M.; Miles, M.A.; Kendall, G. A shuttle vector which facilitates the expression of transfected genes in *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania*. Nucleic Acid Research. 1992. 20:3963-3969.

Kelly, S.; Wickstead, B.; Gull, K. An in silico analysis of trypanosomatid RNA polymerases: insights into their unusual transcription. Biochemical Society transactions. 2005. 33 (parte 6):1435-1437.

Kooter, J.M.; Borst, P. Alpha-amanitin-insensitive transcription of variant surface glycoprotein genes provides further evidence for discontinuous transcription in trypanosomes. Nucleic Acids Research. 1984. 24:9457-9472.

Kuhn, A.; Grummt, I. A novel promoter in the mouse rDNA spacer is active in vivo and in vitro. EMBO Journal. 1987. 6:3487-3492.

Labhart, P.; Reeder, R.H. Enhancer-like properties of the 60/81 bp elements in the ribosomal gene spacers of *Xenopus laevis*. Cell. 1984. 37:285-289.

Laüfer, G.; Schaaf, G.; Bollgönn, S.; Günzl, A. In Vitro Analysis of α -Amanitin-Resistant Transcription from the rRNA, Procyclic Acid Repetitive Protein, and Variant Surface Glycoprotein Gene Promoters in *Trypanosoma brucei*. Molecular and Cellular Biology. 1999. 19:5466-5473.

LeBowitz, J.H.; Smith, H.Q.; Rusche, L.; Beverley, S.M. Coupling of poly(A) site selection and trans-splicing in *Leishmania*. Genes and Development. 1993. 7:996-1007.

Lee, M.G.S.; Van der Ploeg, L.H.T. Transcription of protein-coding genes in Trypanosomes by RNA polymerase I. Annual Review of Microbiology. 1997. 51:463-489.

- Liang, X.H.; Haritan, A.; Uliel, S.; Michaeli, S.** *trans* and *cis* Splicing in Trypanosomatids: Mechanism, Factors and Regulation. *Eukaryotic Cell*. 2003. 2:830-840.
- Machado, C.A.; Ayala, F.J.** Nucleotide sequences provide evidence of genetic exchange among distantly related lineages of *Trypanosoma cruzi*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2001. 98:7396-7401.
- Madison-Antenucci, S.; Grams, J.; Hajduk, S.L.** Editing Machines: The Complexities of *Trypanosoma* RNA Editing. *Cell*. 2002. 108: 435-438.
- Martinez-Calvillo, S., Hernández, R.** *Trypanosoma cruzi* ribosomal DNA: mapping of a putative distal promoter. *Gene*. 1994. 142:243-247.
- Martínez-Calvillo, S.; López, I.; Hernández, R.** pRIBOTEX expresión vector: a pTEX derivative for a rapid selection of *Trypanosoma cruzi* transfectants. *Gene*. 1997. 199:71-76.
- Martínez-Calvillo, S.; Sunkin, S.M.; Yan, S.; Fox, M.; Stuart, K.; Myler P.J.** Genomic organization and functional characterization of the *Leishmania major* Friedlin ribosomal RNA gene locus. *Molecular and Biochemical Parasitology*. 2001. 116:147-157.
- Michels, P.A. Hannaert, V.** The evolution of kinetoplastid glycosomes. *Journal of bioenergetics and Biomembranes*. 1994. 26: 213-219.
- Miles, M.A.; Souza, A.; Pova, M.; Shaw J.J.; Laison, R.; Toye P.J.** Isozymic heterogeneity of *Trypanosoma cruzi* in the first autochthonous patients with Chagas disease in Amazonian Brazil. *Nature*. 1978. 272:819-821.
- Miles, M.A.; Lanham, S.M.; De Souza, A.A.; Pova, M.** Further enzymatic characters of *Trypanosoma cruzi* and their evaluation for strain identification. *Transaction of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 1980. 74:221-242.
- Miller, K.G.; Tower, J.; Sollner-Webb, B.** A complex control region of the mouse rRNA gene directs accurate initiation by RNA polymerase I. *Molecular Cell Biology*. 1985. 5:554-562.

Morel, C.; Chiari, E.; Camargo, E.P.; Mattei, D.M.; Romanha, A.J.; Simpson, L. Strains and clones of *Trypanosoma cruzi* can be characterized by pattern of restriction endonuclease products of kinetoplast DNA minicircles. Proceeding in National Academic Science USA. 1980. 77:6810-6814.

Morgan, G.T.; Roan, J.G.; Bakken, A.H.; Reeder, R.H. Variations in transcriptional activity of rDNA spacer promoters. Nucleic Acid Research. 1984. 12:6043-6052.

Moss, T.; Birnstiel, M.L. The putative promoter of a *Xenopus laevis* ribosomal gene is reduplicated. Nucleic Acid Research. 1979. 6:3733-3743.

Moss, T., Stefanovsky, V.Y. At the center of eukaryotic life. Cell. 2002. 109:545-548.

Nunes, L.R.; Carvalho, M.R.C.; Buck, G.A. *Trypanosoma cruzi* strains partition into two groups based on the structure and function of the spliced leader and rRNA gene promoters. Molecular and Biochemical Parasitology. 1997. 86:211-224.

Paule, M.R.; White, R.J. Transcription by RNA polymerases I and III. Nucleic Acid Research. 2000. 28:1283-1298.

Pereira M.E.A. Cell Biology of *Trypanosoma cruzi*. En Modern parasite biology: cellular, immunological and molecular aspects (J.W. David ed). W.H. Freeman and Company, Nueva York .1990. 64-78.

Pulido, M.; Martínez-Calvillo, S.; Hernández, R. *Trypanosoma cruzi* rRNA genes: a repeated element from the non-transcribed spacer is locus specific. Acta Tropica. 1996. 62:163-170.

Reeder, R.H. Enhancers and ribosomal gene spacers. Cell. 1984. 38:349-351.

Reeder, R.H. rRNA synthesis in the nucleus. TIG. 1990. 6:200-205.

Reeder, R.H. Regulation of transcription by RNA polymerase I. Transcriptional Regulation. Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1992. 315-346.

Revelard, P.; Lips, S.; Pays, E. Alternative splicing within and between alleles of the ATPase gene 1 locus of *Trypanosoma brucei*. Molecular and Biochemical Parasitology. 1993. 6:93-102.

Rudenko, G.H.; Chung H.M.; Pham V.P.; Van der Ploeg L.H.T. RNA polymerase I can mediate expression of CAT and *neo* protein-coding genes in the parasitic protozoan *Trypanosoma brucei*. EMBO Journal. 1991. 10:3387-3397.

Schimaski, B.; Laüfer, G.; Gontcharova, L.; Güzl, A. The *Trypanosoma brucei* spliced leader RNA and rRNA gene promoters have interchangeable TbSNAP50-binding elements. Nucleic Acid Research. 2004. 32:700-709.G

Schnare, M.N.; Collings, J.C.; Spencer, D.F.; Gray, M.W. The 28S-18S rDNA intergenic spacer from *Crithidia fasciculata*: repeated sequences, length heterogeneity, putative processing sites and potential interactions between U3 small nucleolar RNA and the ribosomal RNA precursor. Nucleic Acid Research. 2000. 28:3452-3461.

Schnauffer, A.; Ernst, N.L.; Palazzo S.S.; O'Rear, R.; Salavati, R.; Stuart, K. Separate insertion and deletion subcomplex of the *Trypanosoma brucei* RNA editing complex. Molecular Cell. 2003. 12:307-319.

Schurch, N.; Hehl, A.; Vassella. E.; Braun, R.; Roditi, I. Achúrate polyadenilation of procyclin mRNA in *Trypanosoma brucei* is determined by pyrimidine-rich element in the intergenic regions. Molecular and Cellular Biology. 1994. 14: 3668-3675.

Seed B.; Sheen Y. A simple phase-extraction assays for chloramphenicol acyltransferase activity. Gene. 1988. 67:271-277.

Sollner-Webb, B.; Tower, J. Transcription of cloned eukaryotic ribosomal RNA genes. Annual Review of Biochemistry. 1986. 55: 801-830.

Sogin, M.L.; Elwood, H.J; Gunderson, J.H. Evolutionary diversity of eukaryotic small subunit rRNA genes. Proceedings of the National Academy of science of the USA. 1986. 83:1383-1387.

Sommerville, J. RNA polymerase I promoters and transcription factors. Nature. 1984. 310:189-190.

Souto, R.P. Fernandes, O.; Macedo, A.M.; Campbell D.A.; Zingales, B. DNA markers define two major phylogenetic linages of *Trypanosoma cruzi*. Molecular and Biochemical Parasitology. 1996. 83:141-152.

- Spencer, D.F.; Collings, J.C.; Schnare, M.N.; Gray, M.W.** Multiple spacer sequences in the nuclear large subunit ribosomal RNA gene of *Crithidia fasciculata*. EMBO Journal. 1987. 6:1063-1071.
- Stempliuk, V.A.; Floeter-Winter, L.M.** Functional domains of the rDNA promoter display a differential recognition in *Leishmania*. International Journal for Parasitology. 2002. 32:437-447.
- Stevens, J.R.; Noyes, H.A.; Schofield, C.J.; Gibson, W.** The Molecular evolution of Trypanosomatidae. Advances in Parasitology. 2001. 48: 1-56.
- Stiles, J.K.; Hicock, P.I.; Shah, P.H.; Meade, J.C.** Genomic organization, transcription, splicing and gene regulation in *Leishmania*. Annals of Tropical Medicine and Parasitology. 1999. 93:781-807.
- Stolf, B.S.; Souto, R.P.; Pedroso, A.; Zingales, B.** Two types of ribosomal RNA genes in hybrid *Trypanosoma cruzi* strains. Molecular and Biochemical parasitology. 2003. 126:73-80.
- Stuart K.** RNA editing: An overview, status report, and personal perspective. Molecular Approach Parasitology. 1995. 243-254.
- Swindle J.; Tait A.** Trypanosomatid genetics. Capitulo 2. Molecular Biology of parasitic protozoa. Primera edición. Volumen 13. IRL Press. 1996, 6-34.
- Texeira, S.M.R.** Control of gene expresión in Trypanosomatidae. Brazilian Journal of Medical and Biological Research. 1998. 31:1503-1516.
- Tibayrenc, M.; Ayala, F.** Isoenzyme variability in *Trypanosoma cruzi*, the agent of Chagas disease: genetical, taxonomical and epidemiological significance. Evolution. 1988. 42:277-292.
- Tibayrenc, M.** Population genetics of parasitic protozoa and other microorganisms. Advaced in Parasitology. 1995. 36:47-115.
- Tschudi, C.; Ullu, E.** Polygene transcripts are precursors to calmodulin mRNAs in trypanosomes. EMBO Journal. 1988. 7:455.
- Tyler-Cross, R.; Short, S.L.; Floeter-Winter, L.M.; Buck, G.A.** Transient expression mediated by the *Trypanosoma cruzi* rRNA promoter. Molecular and Biochemical Parasitology. 1995. 72:23-31.

Uliana, S.R.B.; Fischer, W.; Stempliuk, V.A.; Floeter-Winter, L.M. Structural and functional characterization of the *Leishmania amazonensis* ribosomal RNA promoter. *Molecular and Biochemical Parasitology*. 1996. 76:245-255.

Van der Ploeg, L.H.T.; Cornelissen, A.W.; Barry, J.D.; Borst, P. Chromosome rearrangements in *Trypanosoma brucei*. *Cell*. 1984. 39:213-221.G

Vanhamme, L.; Pays, E. Control of gene expression in Trypanosomes. *Microbiological Reviews*. 1995. 59: 223-240.

Vanhamme, L.; Pays, A.; Tebabi, P.; Alexandre, S.; Pays, E. Specific binding of proteins to the noncoding strand of a crucial element of the variant surface glycoprotein, procyclin, and ribosomal promoters of *Trypanosoma brucei*. *Molecular and Cellular Biology*. 1995. 15:5598-5606.

Vickerman K. Developmental cycles and biology of pathogenic Trypanosomes. *British Medical Bulletin*. 1985. 41:105-114.

Walgraffe, D.; Devaux, S.; Lecordier, L.; Dierick, J.F.; Dieu, M.; Van den Abbeele, J.; Pays, E.; Vanhamme, L. Characterization of subunits of the RNA polymerase I complex in *Trypanosoma brucei*. *Molecular and Biochemical Parasitology*. 2005. 139:249-260.

Wen, L.M.; Xu, P.; Benegal, G.; Carvahho, R.C.; Butler, D.R.;Buck, G.A. *Trypanosoma cruzi*: Exogenously regulated gene expression. *Experimental Parasitology*. 2001. 97:196-204.

White, T.C.; Rudenko, G.; Borst, P. Three small RNAs within the 10kb trypanosome RNA transcription unit are analogous to domain VII of other eukaryotic 28S rRNA. *Nucleic Acid Research*. 1986. 14:9471-9489.

Wright, A.D.G.; Li, S.; Feng S.; Martin, D.S.; Lynn, D.H. Phylogenetic position of the Kinetoplastids, *Cryptobia bullocki*, *Cryptobia catostomi* y *Cryptobia salmositica* and monophyly of the genus *Trypanosoma* inferred from small subunit ribosomal RNA sequence. *Molecular and Biochemical Parasitology*. 1999.99: 69-76.

Yan, S.; Lodes, M.L.; Fox, M.; Myler, P.J.; Stuart, K. Characterization of the *Leishmania donovani* ribosomal RNA promoter. *Molecular and Biochemical Parasitology*. 1999. 103:197-210.

Zomerdijk, J.C.B.M.; Kieft, R.; Shiels, P.G.; Borst, P. Alpha-amanitin-resistant transcription units in trypanosomes: a comparison of promoter sequences for a VGS genes expression site and for the ribosomal RNA genes. *Nucleic Acid Research*. 1991. 19:5153-5158.

Zomerdijk, J.C.B.M; Kieft, R.; Borst, P. Efficient production of functional mRNA mediated by RNA polymerase I in *Trypanosoma brucei*. *Nature*. 1991. 353:772-775.

9. ANEXOS

Anexo 1. Datos de actividad de CAT y Luciferasa (LUC) en porcentajes de actividad con respecto a los plásmido de referencia pRIBO4-cat (para los ensayos CAT) y pRIBO16-luc (para los ensayos de luciferasa), de las diferentes construcciones con diferentes versiones moleculares del promotor de DNAr de *T.cruzi*. Se muestran los datos de las diferentes transfecciones transitorias, el promedio de las mismas y el error estandar de la media (SEM). T: Transfección.

Resultados para la evaluación de la dependencia de la polaridad y la funcionalidad de los dos sitios de inicio de la transcripción y el elemento repetido de 172 pb

Ensayo CAT

PLASMIDOS	T-1	T-2	T-3	T-4	Promedio	SEM
pRIBO4-cat	100	100	100	100	100,0	0,0
pRIBO5-cat	0,67	0,94	1,7		1,1	0,3
pPROX1-cat	1,15	0,79	0,98	2	1,2	0,2
pPROX2-cat	1,94	1,106	2,2		1,7	0,3
pPROX3-cat	2,02	1,508	1,6		1,7	0,1
pRIBO6-cat	69,9	101,43	69,81		80,4	8,6
pRIBO8-cat	83,73	81,65	69,98		78,5	3,5

Resultados para la identificación del dominio corriente arriba o “UCE”

Ensayo CAT

PLASMIDOS	T-1	T-2	T-3	T-4	T-5	T6	Promedio	SEM
pRIBO4-cat	100	100	100	100	100	100	100,0	0,0
pRIBO9-cat	137,28	168,34	98,32	93,2	81,22	147,87	121,0	13,0
pRIBO20-cat	147,7	130	120	135,92			133,4	5,0
pRIBO21-cat	117,28	99,33	108,3	154,6	181,9		132,3	13,9
pRIBO10-cat	77,2	55,1	50,74	60,75	67,23	70,8	63,6	3,7
pRIBO16-luc	5,020	3	3	3			3,5	0,5
pTEX-cat	0,62	1,11	2,3	0,4	0,93		1,8	0,4

Ensayo LUC

PLASMIDOS	T1	T2	T3	T4	Promedio	SEM
pRIBO4-cat	139,0	90,0	92	88,40	102,35	10,6
pRIBO20-cat	121,0				121,00	
pRIBO16-luc	100,0	100	100	100	100,00	0,0
pTEX-cat	0,0	0	0	0	0,00	0,0

Resultados para la identificación del dominio central del promotor o “CORE” y el dominio R.

Ensayo CAT

PLASMIDOS	T-1	T-2	T-3	T-4	T-5	T6	T7	Promedio	SEM
pRIBO4-cat	100	100	100	100	100	100		100,0	0,0
pRIBO6-cat	69,9	101,43	69,81					80,4	8,6
pRIBO8-cat	83,73	81,65	69,98					78,5	3,5
pRIBO9-cat	137,28	168,34	98,32	93,2	81,22	147,87		121,0	13,0
pRIBO10-cat	77,2	55,1	50,74	60,75	67,23	70,8		63,6	3,7
pRIBO13-cat	71,2	71,34	40,26	53,38				78,7	8,4
pRIBO14-cat	94,5	92,7	89,91	116,42	110,51	99,5	150,34	107,7	7,4
pRIBO15-cat	184,3	158,29	116,26					153,0	16,2
pRIBO16-cat	98,28	98,47	91,13	105,48	118,98	70,38	65,42	92,6	6,6
pRIBO17-cat	31,35	49,9	66,92	33,89	23,61	36,56		40,4	5,8
pRIBO22-cat	3	7,1	2,3					4,1	1,2
pRIBO23-cat	3	2,1	2,3					2,5	0,2
pRIBO24-cat	3,1	2,1	2,3					2,5	0,2
pTEX-cat	0,62	1,11	2,3	0,4	0,93			1,8	0,4
pRIBO16-luc	5,020	3	3	3				3,5	0,5

Ensayo LUC

PLASMIDOS	T1	T2	T3	T4	Promedio	SEM
pRIBO4-cat	139,0	90,0	92,2	88,40	102,40	10,5870204
pRIBO13-cat	106,0				106,00	
pRIBO14-cat	116,0				116,00	
pRIBO16-cat	92,0				92,00	
pRIBO22-cat	129,0				129,00	
pRIBO16-luc	100,0	100	100	100	100,00	0
pTEX-cat	0,0	0	0	0	0,00	0

Resultados para la evaluación de la actividad de los plásmidos mutantes

Ensayo CAT

Plásmido	Primera	Segunda	Tercera	Cuarta	Promedio	SEM
Mock	2,1	0,0	1,6		1,22	0,5
pRIBO16-luc	1,5	0,0	1,1		0,88	0,4
pRIBO4-cat	100,0	100,0	100	100	100,00	0,0
pTSP-4-cat	21,4	39,4	34,8		31,87	4,4
pTSP-3-cat	7,28	15,24	5,74	12,6	10,22	2,4
pTSP-2-cat	52,0	40,7	29,5		40,74	5,3
pTSP-1-cat	34,47	34,5	45,4		38,14	3,0
pTSP+1-cat	17,43	31,30	31,59	33	28,33	3,8
pTSP+2-cat	24,18	52,3	32,0		36,18	6,9
PTSPD6-cat	0,47	0,91	0,41	0,60	0,60	0,1
pTSP-5-cat	38,97	42,00	36,00		38,99	1,4
pTSP-6-cat	172,13	103,00	97,00		124,04	19,7
pTSP+3-cat	86,39	90,00	85,00		87,13	1,2
pTSP+4-cat	82,93	80,00	85,00		82,64	1,2

Ensayo LUC

Plásmido	Primera	Segunda	Tercera	Cuarta	Promedio	SEM
Mock	0	0	0		0	0
pRIBO16-luc	100	100	100		100	0
pRIBO4-cat	88,40	88,40	92,30	102,94	93,01	2,98
pTSP-4-cat	114,40	104,30	82,40		100,37	7,71
pTSP-3-cat	103,50	100,00	97,20		100,23	1,49
pTSP-2-cat	110,20	100,20	89,10		99,83	4,98
pTSP-1-cat	107,70	97,70	84,20		96,53	5,56
pTSP+1-cat	105,40	100,00	95,30		100,23	2,38
pTSP+2-cat	97,20	97,40	74,00		89,53	6,34
pTSPD6-cat	81	73,00	79,2		77,73	1,98
pTSP-5-cat	104,63	97,00	89		96,88	3,68
pTSP-6-cat	201,80	100,00	99		133,60	27,84
pTSP+3-cat	73,65	89,00	88		83,55	4,05
pTSP+4-cat	101,74	98,00	85		94,91	4,14

Evidence supporting a major promoter in the *Trypanosoma cruzi* rRNA gene

Elisa Figueroa-Angulo, Santiago Martínez-Calvillo¹, Imelda López-Villaseñor, Roberto Hernández*

Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Apartado Postal 70-228, 04510 México D.F., Mexico

Received 1 April 2003; accepted 25 June 2003

First published online 17 July 2003

Abstract

Two clearly separated transcription start points (*tsp*) have been reported within the *Trypanosoma cruzi* rDNA (DNA encoding rRNA) gene spacer region. These sites are separated by 270 bp, a distance compatible with the occurrence of two core promoters. To characterize the individual participation of these two elements, a deletion analysis was carried out. Different versions of the promoter regions were assayed in a transient transfection analysis of epimastigotes, using the chloramphenicol acetyl transferase gene (*cat*) as a reporter. The data indicate that the so-called distal *tsp*-associated region (relative to the small subunit rRNA 5' terminus coding region) comprises most (80%) if not all of the observed activity. In addition, an associated *locus* specific repeated element showed a modest upregulating activity, since its presence stimulated the *cat* reporter gene by about 20%. The data here presented should be valuable in the design of expression vectors for *T. cruzi*, where the rRNA gene promoter has been an important functional element.

© 2003 Federation of European Microbiological Societies. Published by Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: rRNA gene promoter; Transcription; RNA polymerase I; *Trypanosoma cruzi*

1. Introduction

Trypanosoma cruzi is a kinetoplastid protozoa of both medical and biological importance. It is the etiological agent of Chagas disease that affects several million people in Mexico, Central and South America. The course of this illness can vary from a mild and relatively asymptomatic condition to a highly virulent infection. The study of *T. cruzi* genome structure and expression is therefore not only interesting but also necessary. Using different genetic markers this species has been grouped into two major lineages (*T. cruzi* I and *T. cruzi* II) [1–3], although further divisions have also been proposed [4,5].

Our research work group has been interested in the analysis of *T. cruzi* genes encoding ribosomal related molecules. As in all trypanosomatids analyzed to date, the

T. cruzi cytosolic rRNA is atypical in that the large subunit component is composed of two large and five small independent rRNAs: these molecules are encoded as different modules in a so-called main transcription unit, which occurs in about 110 copies per nucleus in at least two chromosomes, separated by sequences longer than 20 kb [6–9].

The eukaryotic rRNA gene promoters (including those from trypanosomatids) contain and span around the transcription start point (*tsp*). The transcription elongation proceeds through a so-called external transcribed spacer region which precedes the actual rRNA gene coding regions. These are in turn separated by sequences transcribed as internal spacers. All transcribed spacers are removed during the ribosomal biogenesis process. In the case of *T. cruzi* two *tsp* for the rRNA genes have been mapped, separated by 270 nucleotides [10,11]. A promoter activity has been demonstrated for DNA fragments containing both the proximal and the distal *tsp* (relative to the small subunit rRNA 5' terminus coding region) [12,13]. Moreover, these fragments have been used in different plasmid expression vectors for *T. cruzi* [13,14]. For both basic and biotechnological research fields, it is important

* Corresponding author. Tel.: +52 (5) 622 3872;

Fax: +52 (5) 550 0048.

E-mail address: robher@servidor.unam.mx (R. Hernández).

¹ Present address: Seattle Biomedical Research Institute, 4 Nickerson Street, Seattle, WA 98109-1651, USA.

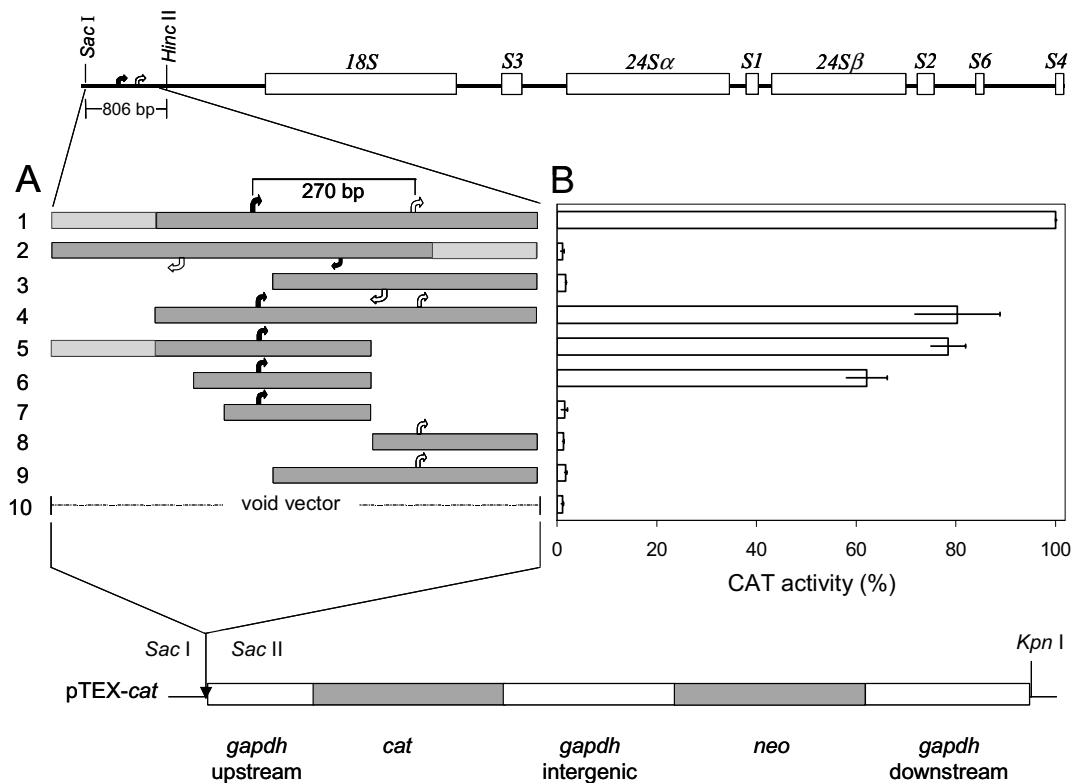


Fig. 1. Deletion analysis of the rRNA gene promoters activity. The rRNA main transcription unit is shown on top. The map on bottom represents the plasmid pTEX-*cat* used as the recipient expression vector. Panel A presents the collection of rRNA gene promoter versions here analyzed, their numerical identification is referred in the text. The bent solid arrow indicates the position and polarity of the distal *tsp*, so as the empty arrow does for the proximal *tsp*. One copy of a repeated element of 172 bp is marked as a dashed section. Panel B represents the observed CAT activity depicted by transfected epimastigotes. The reporter activity of each construct is presented as a normalized value relative to that observed with construct 1, always included in parallel transfections. The values are means of at least three independent electroporations. The standard error associated to these determinations is shown as well.

to address the individual participation of the DNA region around these two *tsp* (i.e. core promoters). In this work, experimental evidence is presented showing that the distal *tsp* region sustains most (if not all) of the promoter activity previously referred for transfected epimastigotes of *T. cruzi*.

2. Materials and methods

2.1. Plasmid constructs

An 806-bp rDNA fragment containing both published *tsp* from the Mexican strain Ia Cruz Jalisco (*T. cruzi* I) contains a promoter activity when it replaces the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene (*gapdh*) upstream promoter region in pTEX or pTEX-*cat* [15]. These vectors were therefore named pRIBOTEX and pRIBOTEX-*cat* [13]. In these earlier constructs the splice leader addition site is presumably provided by a motif or motifs present in the rDNA sequence (putative cryptic sites). In the present work, the parental rDNA 806-bp fragment was cloned in pTEX-*cat* using *Sac*I and *Sac*II (modified with Klenow); see construct 1 in Fig. 1. It is emphasized that

this construct (as well as all others here analyzed) retains the 430 bp from the *gapdh* I upstream and untranslated regions, thus providing a physiological splice leader addition site. The construct 1 represents the parental clone in this work from which the other constructs here analyzed derive (see Fig. 1). The chloramphenicol acetyltransferase (CAT) activity observed with it represents the 100% activity reference. The derivative constructs were obtained using either internal restriction sites present in the parental 806-bp fragment from construct 1, or PCR-derived amplifications (Fig. 1).

2.2. Transient transfections

The transfection conditions used for CL Brener strain (*T. cruzi* II) epimastigotes have been previously described [13]. It has been reported that promoters from *T. cruzi* I are functional in *T. cruzi* II recipient strains [16], which is the case in this study. Cultured derived epimastigotes were harvested at cellular densities of $40\text{--}50 \times 10^6$ per ml. Unless otherwise indicated the parasites were kept at 4°C. The cells were washed in and brought to Zimmerman post fusion medium [17] at 6×10^8 per ml. 400 μ l from this suspension was mixed with 20 μ g of plasmid DNA

in 10 mM Tris, 0.2 mM EDTA (pH 7.4) buffer and electroporated at 360 V, 1500 μ F 13 Ω using a BTX600 Electro Cell Manipulator (BTX). Following electroporation, the transfected cells were incubated in 10 ml of serum-enriched liver infusion tryptose medium at 28°C for 3 days. These cultures were used to prepare the cell extracts described below for CAT assays.

2.3. CAT assays

Cell extracts were prepared from 8.5 ml of transfected cells-derived cultures. These were collected by centrifugation and washed in 40 mM Tris-HCl (pH 8.0), 1 mM EDTA (pH 8.0), and 15 mM NaCl. The cellular pellet was resuspended in 150 μ l of 25 mM Tris-HCl (8.0), lysed with three freeze and thaw cycles (i.e. liquid nitrogen and 37°C), and incubated at 65°C for 10 min. The soluble material was recovered from the supernatant of a 10-min centrifugation (Eppendorf), and used for CAT assays. The protein concentration in these extracts was determined colorimetrically by the Bradford method with the aid of a Bio-Rad protein assay solution. Unless indicated the CAT reactions were carried out with 5 μ g of cellular extract protein, incubated for 30 min at 37°C in the presence of ³H-labelled chloramphenicol (New England Nuclear) and 250 μ M butyryl coenzyme A, as described by Seed and Sheen [18]. Thereafter the samples were xylene-extracted and the radioactivity determined in a liquid scintillator.

3. Results and discussion

3.1. A linear system for CAT quantitation

In order to analyze quantitative differences among the several promoter versions (i.e. to find a linear range of activity), different experimental conditions of both the reaction time and protein concentration in the extracts were tested from parasites electroporated with the reference clone (construct 1). The different protein concentrations analyzed were 0.62, 1.25, 2.5, 5 and 10 μ g, and the times tested corresponded to 7.5, 15, 30, 45 and 60 min (data not shown). From these kinetic curves 5 μ g of protein extract and 30 min of reaction time were selected as the conditions used for all the comparative analyses here described.

3.2. Activity of different versions of the rDNA promoter

Fig. 1 summarizes the results obtained in this work. The largest clone (construct 1) contains three potentially important elements: one copy of a locus specific repetitive element of 172 bp (dashed bar) [10,19], and both of the so-called distal (solid arrow) and proximal (empty arrow) *tsp* [10,11]. As a full activity control this clone (construct 1) was always transfected in parallel to all other plasmids

tested, so that their activity could be expressed as percentage values.

Regarding the polarity of the promoter two versions with reversed polarity were tested (constructs 2 and 3, Fig. 1). In both cases a close to background activity value was observed. That is, a similar value to that one observed with the rDNA-less vector (pTEX-*cat*, construct 10, Fig. 1). This result confirms an earlier observation regarding the polarity dependence of the rRNA gene promoter from *T. cruzi* [12]. A potential role for the repetitive element was addressed. Its removal in construct 4 rendered a drop in about 20% of the observed CAT activity. This reduction may be related with the function of this repetitive element as a putative enhancer, as has been observed in other eukaryotic species [20]. The genomic fragment originally cloned contains only one copy of the repeated element, although several repeats have been mapped upstream to this one in Southern experiments from total genomic DNA [19]. We do not know if additional repeats have a stronger effect upon the promoter to that one here observed with just one copy of the repeated element. In an earlier report, the *T. cruzi* rDNA repetitive element (from an independent CL strain-derived genomic clone) did not show an upregulating activity in transiently transformed trypanosomes [12]. On the other hand in the trypanosomatid *Leishmania chagasi*, a reduction of about 25% in luciferase activity (driven by a homologous rRNA gene promoter) was observed after the deletion of two repeated elements of 64 bp [21]. These different results pose a problem for further study, especially considering that the repetitive element here analyzed is locus specific in the *T. cruzi* genome [19].

Regarding the role of the two individual *tsp*, the removal of a DNA fragment bearing the proximal *tsp* (positions -65 to +201 relative to the proximal *tsp*) produced a promoter version which conserved most (80%) of the activity (construct 5, Fig. 1). In addition the lack of the repetitive element and 69 bp beyond it, but retaining 286 nucleotides with the distal *tsp* (construct 6) produced a promoter with 60% of the parental activity, which is coincident with the individual subtraction of the activity from these two potential elements. The smallest promoter version here analyzed is a fragment of 254 bp that retains 47 bp upstream from the distal *tsp* (construct 7, Fig. 1). Apparently the 32 bp deleted from its parental construct 6 are an essential part of the promoter, since the activity depicted by this shortened derivative was similar to background values (construct 7, Fig. 1). In a comparison with *T. brucei* homologous promoter, the 32 bp here mapped occur in a position of functional relevance within the core region of the promoter [22].

Both constructs devoid of the distal *tsp* (constructs 8 and 9, Fig. 1) did not show promoter activity. Construct 9 comprises the region from position +20 relative to the distal *tsp*, to position +201 downstream to the proximal *tsp*. That is, this molecule retains 250 bp upstream to the

I	{	LA CRUZ	CACCAGTTTCCTGCGGGGCTTATTGGTGTGTTGGATTTTTAAATTTTTTGGATTCGGAGGAATTTTTTGCAATTTTTGGGTACCCCTAAAA
II	{	CL	TG-G-----G-----A--T-----T-A-----G-----T-----C-----A----
		CL BRENER	TG-G-----C--G-----A--T-----T--C-----G-----T-----C-----A----
I	{	LA CRUZ	AAATTT . . TGGAGTTTCGGGGTTCGATCCAACCTTGTGCTTTTTTAACCGTCCATTGTGTCTAGTACATCAT G SAGCGGTATTCTCTCCGGTG
II	{	CL	-----AT-----C-----T--A--AG--G-----G-----T--G--TG--T--A-----GG-----T
		CL BRENER	-----AT-----C-----T--A--AG--G-----G-----T--G--TG--T--A----- C -----GG-----T
I	{	LA CRUZ	GCCCAGGTGGCGTCGGAAGGAATCGGTGCCCTCAGGATGTTTGGTTTTTCGTTTTTTTTTTGGCGTCTTTGTTTCGCATCGCCGTATCGTG
II	{	CL	-G-A-A----- . T--C-G-TT- CT--AAT--CTCG-----C-----GCAT-----C-
		CL BRENER	-. . . . A----- . . T--C-G-TT-AG-ATCT--AAT--CTCG-----C-----G-----C-
I	{	LA CRUZ	TGCGGCGCG . . ACCTTCTTTTTGGCTCATTGGTCAGTGAGGTTTATAATAAAGTGGATCATTGGGTTTTTGGCCCTTTGCGCGCACCCCGCG
II	{	CL	--T-CG--C--AT-----C-----T-----C--T-----T-----T--A----- CA
		CL BRENER	--T-CG--CA--T-----C-----T-----T-----T-----T--A----- A-
I	{	LACRUZ	AATGGGGGAGGGATTTTCATATAATTGTAGTGTACACAT . TGTGTGTGGGTCGCAAAAT GTCATGCCGTGTGCAATGTTTATTT . GCG
II	{	CL	G- . AT-----C G- TG-G-----GT-----T-----C--TTGTGT-- G -T-----C-----T--
		CL BRENER	-. . . . T-----C G- TG- C--TTGTGT--T-----C-----T--
I	{	LA CRUZ	TGCTGTGCGTCTCTTTTGTGATTCCACCCTTGTGTGTTTACCTTATCGTCTCTCCCTCGCGTTGGCTGTGCGTGAATTGTCTGTGCGAT
II	{	CL	-----G--AT G-----G-ACCT--A-CGTC--C-TGC--G-----A-----GT-----
		CL BRENER	----- G-----G--ACT--A-CGTC--C-TGC--G-----A-----GCT-----
I	{	LA CRUZ	TCGTGGGAAATCAAAGGGGAATCAACGTGTTCTTTTTTTT . . CAGAAGGGGAGTCAAAG . CGCCGTGTGGAT
II	{	CL	-A-C- A-----TT--G-----T-----C
		CL BRENER	-A-C-A- A-----T-----

Fig. 2. Promoter sequences alignment. Sequences around published *tsp* are shown in an aligned format (sequence analysis software DNAMAN, Lynnon Biosoft). I and II stand for the two *T. cruzi* genetic groups [3]. Published *tsp* sites are boxed. GenBank accession numbers and depicted sequence coordinates are as follows: la Cruz Jalisco (L13926, 169–791); CL (M88712, 345–951); CL Brener (U89779, 1–613).

proximal *tsp*, a distance large enough to contain an active core promoter. In this respect a comparison can be made with construct 6 that bearing just 79 bp upstream from the distal *tsp* sustained about 60% of the reference full activity depicted in control transfections with construct 1.

3.3. Sequence alignment of *tsp* from different strains

The aim of this work is the functional characterization of two potential rRNA gene promoters from *T. cruzi*, which were previously identified by the placement of two *tsp* in the rRNA gene spacer region [10,11]. The former report presents the here called proximal *tsp* using a gene derived from the Cl strain, which belongs to the genetic group *T. cruzi* II. Thereafter the distal *tsp* was published from a Mexican strain (la Cruz Jalisco, *T. cruzi* I). Although these sites have been considered as strain specific differences, the data here presented indicate that the major promoter activity resides in sequences surrounding the distal *tsp*, using the Cl Brener (*T. cruzi* II) as recipient cells. Moreover a recent publication states that when the rRNA *tsp* was carefully mapped in a gene from the Cl Brener strain, a third *tsp* was found as a C [23]. This new *tsp* can be clearly aligned just 3 bp upstream to the distal *tsp* mapped in the DNA from the strain la Cruz Jalisco (*T. cruzi* I) (Fig. 2). That is, the newly published *tsp* is clearly located within the region considered by us as the meaningful promoter for *T. cruzi* rRNA genes. Interestingly enough, since the position of this promoter is the same in two strains clustered in each of the two genetic groups from *T. cruzi*, it is likely that it could be an ancient genetic element present in the precursor ancestor common to both *T. cruzi* genetic types. We cannot rule out that the prox-

imal *tsp* motif could be used under different physiological conditions. In addition, its recognition as a processing site within the external transcribed rRNA spacer is another possible role.

Acknowledgements

We want to thank Dr. John M. Kelly for his kind donation of plasmid pTEX-*cat*, and Juliana Herrera and Lorena Lopez-Griego for technical assistance. Elisa Figueroa-Angulo is a recipient of a scholarship from DGEP, UNAM, Mexico. This work was supported with Grants 37620M from CONACyT, and IN209302-3 from PAPIIT, UNAM.

References

- [1] Tibayrenc, M. (1995) Population genetics of parasitic protozoa and other microorganisms. *Adv. Parasitol.* 36, 47–115.
- [2] Souto, R.P., Fernandes, O., Macedo, A.M., Campbell, D.A. and Zingales, B. (1996) DNA markers define two major phylogenetic lineages of *Trypanosoma cruzi*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 83, 141–152.
- [3] Anonymous (1999) International Symposium to commemorate the 90th anniversary of the discovery of Chagas disease. April 11–16, Rio de Janeiro, Brasil. Recommendations from a satellite meeting. *Mem. I. Oswaldo Cruz* 94, Suppl. I, pp. 429–432.
- [4] Brisse, S., Verhoef, J. and Tibayrenc, M. (2001) Characterisation of large and small subunit rRNA and mini-exon genes further supports the distinction of six *Trypanosoma cruzi* lineages. *Int. J. Parasitol.* 31, 1218–1226.
- [5] Machado, C.A. and Ayala, F.J. (2002) Sequence variation in the dihydrofolate reductase-thymidylate synthase (DHFR-TS) and trypanothione reductase (TR) genes of *Trypanosoma cruzi*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 121, 33–47.

- [6] Castro, C., Hernandez, R. and Castañeda, M. (1981) *Trypanosoma cruzi* ribosomal RNA: internal break in the large-molecular-mass species and number of genes. *Mol. Biochem. Parasitol.* 2, 219–233.
- [7] Hernandez, R. and Castaneda, M. (1983) An endonuclease restriction analysis of the ribosomal RNA genes of *Trypanosoma cruzi*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 8, 305–315.
- [8] Hernandez, R., Diaz-de Leon, F. and Castaneda, M. (1988) Molecular cloning and partial characterization of ribosomal RNA genes from *Trypanosoma cruzi*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 27, 275–280.
- [9] Wagner, W. and So, M. (1990) Genomic variation of *Trypanosoma cruzi*: involvement of multicopy genes. *Infect. Immun.* 58, 3217–3224.
- [10] Dietrich, P., Soares, M.B., Affonso, M.H. and Floeter-Winter, L.M. (1993) The *Trypanosoma cruzi* ribosomal RNA-encoding gene: analysis of promoter and upstream intergenic spacer sequences. *Gene* 125, 103–107.
- [11] Martinez-Calvillo, S. and Hernandez, R. (1994) *Trypanosoma cruzi* ribosomal DNA: mapping of a putative distal promoter. *Gene* 142, 243–247.
- [12] Tyler-Cross, R.E., Short, S.L., Floeter-Winter, L.M. and Buck, G.A. (1995) Transient expression mediated by the *Trypanosoma cruzi* rRNA promoter. *Mol. Biochem. Parasitol.* 72, 23–31.
- [13] Martinez-Calvillo, S., Lopez, I. and Hernandez, R. (1997) pRIBO-TEX expression vector: a pTEX derivative for a rapid selection of *Trypanosoma cruzi* transfectants. *Gene* 199, 71–76.
- [14] dos Santos, W.G. and Buck, G.A. (2000) Simultaneous stable expression of neomycin phosphotransferase and green fluorescence protein genes in *Trypanosoma cruzi*. *J. Parasitol.* 86, 1281–1288.
- [15] Kelly, J.M., Ward, H.M., Miles, M.A. and Kendall, G. (1992) A shuttle vector which facilitates the expression of transfected genes in *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania*. *Nucleic Acids Res.* 20, 3963–3969.
- [16] Nunes, L.R., de Carvalho, M.R.C. and Buck, G.A. (1997) *Trypanosoma cruzi* strains partition into two groups based on the structure and function of the splice leader RNA and rRNA gene promoter. *Mol. Biochem. Parasitol.* 86, 211–244.
- [17] Bellofatto, V. and Cross, G.A. (1989) Expression of a bacterial gene in a trypanosomatid protozoan. *Science* 244, 1167–1169.
- [18] Seed, B. and Sheen, J.Y. (1988) A simple phase-extraction assay for chloramphenicol acyltransferase activity. *Gene* 67, 271–277.
- [19] Pulido, M., Martinez-Calvillo, S. and Hernandez, R. (1996) *Trypanosoma cruzi* rRNA genes: a repeated element from the non-transcribed spacer is locus specific. *Acta Trop.* 62, 163–170.
- [20] Grimaldi, G. and Di Nocera, P.P. (1988) Multiple repeated units in *Drosophila melanogaster* ribosomal DNA spacer stimulate rRNA precursor transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 5502–5506.
- [21] Gay, L.S., Wilson, M.E. and Donelson, J.E. (1996) The promoter for the ribosomal RNA genes of *Leishmania chagasi*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 77, 193–200.
- [22] Janz, L. and Clayton, C. (1994) The PARP and rRNA promoters of *Trypanosoma brucei* are composed of dissimilar sequence elements that are functionally interchangeable. *Mol. Cell. Biol.* 14, 5804–5811.
- [23] Wen, L.M., Xu, P., Benegal, G., Carvahao, M.R., Butler, D.R. and Buck, G.A. (2001) *Trypanosoma cruzi*: exogenously regulated gene expression. *Exp. Parasitol.* 97, 196–204.

Elsevier Editorial System(tm) for BBA - Gene Structure and Expression

Manuscript Draft

Manuscript Number:

Title: Potential regulatory elements in the Trypanosoma cruzi rRNA gene promoter

Article Type: Promoter Paper

Section/Category:

Keywords: protozoa; kinetoplastid; transcription; RNA polymerase I; transfection

Corresponding Author: Dr. Roberto Hernandez,

Corresponding Author's Institution: UNAM

First Author: Roberto Hernandez

Order of Authors: Roberto Hernandez; Elisa Figueroa-Angulo; Ana Maria Cevallos; Alejandro Zentella; Imelda Lopez-Villaseñor

Manuscript Region of Origin:

Abstract: The Trypanosoma cruzi rRNA gene promoter was characterized by deletion and point mutation analyses. A core of 89 bp was identified as the minimal region with full promoter activity. This core region is flanked upstream by a control element that stimulates its activity, and downstream by a novel down regulating region of about 200bp. A point mutation analysis of the transcription start region evidenced 7 contiguous nucleotides where individual substitutions produced in all cases a defective promoter. It is generally accepted that the anciently speciated trypanosomatids lack strict promoters for protein coding genes transcribed by RNA polymerase II. The occurrence of a well structured rRNA gene promoter in these species suggests an early appearance of the RNA polymerase I promoters in the evolution of eukaryotic cells

To BBA Handling Editor

We would like to submit the manuscript entitled “Potential regulatory elements in the *Trypanosoma cruzi* rRNA gene promoter” by Elisa Figueroa-Angulo, Ana María Cevallos, Alejandro Zentella, Imelda López-Villaseñor and Roberto Hernández, to be considered for its publication in BBA-GENE STRUCTURE AND EXPRESSION as a PROMOTER PAPER.

The work here submitted shows our findings from a deletion and point mutation analysis on the *Trypanosoma cruzi* rRNA gene promoter. Potential up- and down-regulating elements were mapped, and comparatively analyzed with similar data published for other trypanosomatid species. The implication of well structured promoters for rRNA genes in trypanosomes is relevant from an evolutionary point of view since strict promoters for protein coding genes are apparently absent in these early divergent protozoa species. We do consider that our data will raise the interest of both molecular parasitology readers, and basic scientists interested in the molecular biology of early diverging eukaryotes.

As potential reviewers we propose the following scientists:

William Petri Jr.
Dept. of Med., Microbiol. & Pathol.
School of Medicine
University of Virginia
MR4 Building, Room 2115
Charlottesville VA 22908 USA
e-mail: wap3g@virginia.edu
Phone: 1-434-924-5621
Fax: 1-434-924-0075

David A Campbell
Office: 4825/4825A Molecular Sciences Building
University of California
Microbiology, Immunology & Molecular Genetics
609 Charles Young Drive
Los Angeles A 90095-1489, USA
Phones: (310) 206-5556 (office)
(310) 825-4195 (lab)
FAX: (310) 206-5231
e-mail: dc@ucla.edu

Peter J. Myler
Mailing address: Seattle Biomedical Research Institute
4 Nickerson St., Seattle, WA 98109-1651, USA.
Phone: (206) 284-8846.
Fax: (206) 284-0313.
E-mail: peter.myler@sbri.org.

Vivian Bellofatto
Department of Microbiology and Molecular Genetics,
UMDNJ-NJ Medical School, International Center for Public Health,
225 Warren St., Newark, NJ 07103, USA
Phone: (973) 972-4483, ext. 2-4406
Fax: (973) 972-3644.
e-mail: bellofat@umdnj.edu.

Gloria Rudenko
The Peter Medawar Building for Pathogen Research
University of Oxford
South Parks Road
Oxford OX1 3SY
United Kingdom
Phone: +44 1865 281 548
FAX: +44 1865 281 894
e-mail: gloria.rudenko@medawar.ox.ac.uk

Yours faithfully,
Roberto Hernandez PhD.
Instituto de Investigaciones Biomédicas,
Universidad Nacional Autónoma de México
Apartado Postal 70-228, 04510 México D.F., México.
Tel +52-55-56223872
Fax: +52-55-55500048
e-mail: robertohf@biomedicas.unam.mx

PROMOTER PAPER

Title: Potential regulatory elements in the *Trypanosoma cruzi* rRNA gene promoter

Authors: Elisa Figueroa-Angulo¹, Ana María Cevallos¹, Alejandro Zentella^{1,2}, Imelda López-Villaseñor¹ and Roberto Hernández^{1*}.

Affiliation: 1. Departamento de Biología Molecular y Biotecnología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México. Apartado Postal 70-228, 04510 México D.F., México.

2. Departamento de Bioquímica, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición “Salvador Zubirán”, Secretaría de Salud CP14000, México D.F., MÉXICO

*Corresponding author: Tel +52-55-56223872; Fax: +52-55-55500048. e-mail: robertohf@biomedicas.unam.mx (R. Hernández).

Key words: protozoa, kinetoplastid, transcription, RNA polymerase I, transfection.

Abstract

The *Trypanosoma cruzi* rRNA gene promoter was characterized by deletion and point mutation analyses. A core of 89 bp was identified as the minimal region with full promoter activity. This core region is flanked upstream by a control element that stimulates its activity, and downstream by a novel down regulating region of about 200bp. A point mutation analysis of the transcription start region evidenced 7 contiguous nucleotides where individual substitutions produced in all cases a defective promoter. It is generally accepted that the anciently speciated trypanosomatids lack strict promoters for protein coding genes transcribed by RNA polymerase II. The occurrence of a well structured rRNA gene promoter in these species suggests an early appearance of the RNA polymerase I promoters in the evolution of eukaryotic cells.

Trypanosoma cruzi is a protozoa of biomedical importance. It has been recognized as the infectious agent in Chagas disease, a condition that affects several million people in Mexico, Central and South America. Using different genetic markers *T. cruzi* species has been grouped into two major lineages *T. cruzi* I and *T. cruzi* II [1-3], although additional groupings have also been proposed [4, 5]. Our laboratory has been interested in the study of *T. cruzi* ribosomal RNA molecules and their genes. All trypanosomatids analyzed to date exhibit cytosolic ribosomes with their large subunit rRNA component atypically processed into two large and five small independent rRNAs. These molecules are encoded as different modules in a so called main transcription unit for which there are about one hundred copies per nucleus [6].

The eukaryotic main transcription units for rRNA (including those from trypanosomatids) are transcribed by RNA polymerase I (Pol I). Starting in the so-called transcription start point (tsp) this polymerase elongates through an external transcribed spacer upstream from the actual rRNA gene coding regions. These coding regions are in turn separated by sequences transcribed as internal spacers. All transcribed spacers are eventually removed as part of the maturation process of the primary transcript. The experimental analysis of transfected recombinant gene promoters fused to sequences encoding reporter proteins has been a successful approach. Nevertheless this strategy in eukaryotic systems has been generally limited to the study of promoters transcribed by the RNA polymerase II (Pol II) that directs the addition of a 7-methyl guanosine cap to the 5' terminus of the mRNA transcript. In trypanosomatids the addition of a 5' capped miniexon sequence to all mRNAs as part of the atypic processing pathway of polycistronic transcripts (i.e., the so called trans splicing event) [7] allows for the possibility to add a 5' cap to RNAs transcribed by Pol I, thus providing the means to study transcription of Pol I

by analysis of reporter proteins such as chloramphenicol acetyl transferase (CAT). Regarding our system, two potential promoter regions from *T. cruzi* have been comparatively analyzed through transient transfection studies [8]. We have therein shown that the distal promoter is the major if not the only functional promoter in *T. cruzi* epimastigotes. In this work an expanded study of this promoter is presented with evidence for the occurrence of both up regulating- and a novel down regulating cis-acting elements. The individual contribution of nucleotides within the transcription start region is analyzed as well.

Our previous work showed the individual contribution of a repetitive element (RE) and a here called downstream regulatory element (DE) as up regulating cis acting sequences [8], here depicted in Fig. 1A as constructs 1*, 2* and 3*. As previously reported, recombinant plasmids were transfected in *T. cruzi* cells and the strength of the promoter was evaluated as CAT activity [8]. Unexpectedly, and yet not understood, when these two DNA regions (RE and DE) are both absent, the resulting constructs give CAT activities above the reference clone 1* (constructs 4, 5 and 6 in Fig. 1A). A 21 bp region (position -100 to -79) is apparently important since its deletion correlates with an approximately 40% reduction in the CAT reporter activity (constructs 6 and 7*, Fig.1A). Based on its size, position and transcriptional effect we propose that this region corresponds to the upstream control element (UCE) present in other eukaryotic rRNA gene promoters such as the mouse type depicted in Fig. 2.

The test of further deletions on the cloned promoter provided evidence for additional cis-acting sequences. A down regulating element (R) was identified within positions +10 to +207 (see constructs 7*, and 8-11, Fig 1B). To our knowledge a potential repressor element in this position is a novel finding in rRNA gene promoters.

The core promoter was assigned to the DNA region comprised between positions -79 to +10 (construct 11, Fig. 1B). This core region is herein defined as the minimal length version of the promoter that directs a similar activity of the *cat* reporter gene as the reference clone 1*. Two important DNA sequences of 10 nucleotides each were identified at positions -79 to -69, and +1 to +10 that up regulate the promoter activity (constructs 11, 12 and 13, Fig. 1B). Deletion of the +1 to +10 sequence produces a 50% reduction in promoter activity. On the other hand, the -79 to -69 is apparently an essential region since deletion of these 10 bases results in a 90% drop of the core promoter activity to values close to background (construct 13, Fig. 1B). Additional deletions up to -47 to +10 did not modify this already inactive promoter (constructs 14 and 15, Fig. 1B).

Regarding the position where the rRNA gene transcription initiates, 3 tsp within a 4 bp region have been reported [9-11]. These data pose the sequence CATG as the transcription initiation region in this promoter. This region was further studied in the present work by point mutation analysis in the reference plasmid 1*. The simultaneous replacement of 6 bp around the tsp produced a virtually inactive promoter (construct 16, Fig. 1C). The individual contribution of these six and four adjacent bases was then analyzed. Ten plasmids were constructed, each differing in a single base as depicted in Fig. 2C. The results show that the single mutation of any of 7 bases around the tsp results in 60 to 90% decrease of the promoter activity (Fig. 2C constructs 18 to 24). In contrast, the single mutation of the bases that flank this 7-base region gave a promoter activity similar to the reference plasmid 1* (constructs 17, 25 and 26). Therefore the region atCaTGg, which contains the three proposed tsp (capital letters), seems to be the most important region for transcription initiation in this promoter.

Figure 2 summarizes the potential functional elements here mapped for the rRNA gene promoter for *T. cruzi*, and compares them with model homologous promoters from mouse cells and from other trypanosomatids. There are individual differences, some of them could arise from different experimental approaches and conditions, but a similar general structure can be inferred: A core region that includes the tsp and short blocks of essential elements. Upstream from this region and at variable distances, an upstream control element (UCE) has been described as an stimulating cis acting sequence. The case of three *Leshmania* species is exceptional in that a transcriptional repressor has been proposed to occur upstream to the core region [12]. The rRNA gene promoters are preceded by short repetitive elements of an apparent enhancer like functions. In *T. brucei*, repeats associated to the non-transcribed rRNA gene spacer region have not been reported. Short repetitive elements occur in *L. donovani* but their function was reported as down regulators [13]. On the other hand sequences from the transcribed spacer have been less analyzed. This work describes the finding of a repressor like element (R, Fig 2) which is followed downstream by a DNA region that stimulates the expression of the fused gene reporter (DE, Fig. 2). Interestingly, from published experimental data on the *L. chagasi* rRNA gene promoter [14], an analogous up regulating DNA region can be predicted in a similar position and size as that one described here for *T. cruzi* (DE, Fig. 2). Nevertheless, its presence was not pointed out in the communication [14].

As generally accepted trypanosomes are a group of early diverging unicellular eukaryotes that apparently lack strict promoters for RNA polymerase II, that is, for protein coding genes. In contrast, we here present evidence that in these early diverging organisms the RNA polymerase I promoter (rRNA gene promoter) possess some of the features we now see for pol I promoters in vertebrate cells. Is it that the eukaryotic type RNA pol I

promoter was structured earlier in evolution than RNA pol II promoters? The work here presented points that this may be the case.

Acknowledgements

Technical assistance from Juliana Herrera is acknowledged. We also thank J.M. Kelly for providing our group with the *T. cruzi* expression vector pTEXcat. This work was partially funded by grants from PAPIIT, UNAM IN214006-3, and CONACYT P45037-Q.

References

- [1] M. Tibayrenc, Population genetics of parasitic protozoa and other microorganisms, *Adv. Parasitol.* 36 (1995) 47-115.

- [2] R.P. Souto, O. Fernandes, A.M. Macedo, D.A. Campbell, B. Zingales, DNA markers define two major phylogenetic lineages of *Trypanosoma cruzi*, *Mol. Biochem. Parasitol.* 83 (1996) 141-152.

- [3] Anonymous, International Symposium to commemorate the 90th anniversary of the discovery of Chagas disease, April 11-16, Rio de Janeiro, Brasil, Recommendations from a satellite meeting, *Mem. I. Oswaldo Cruz* 94, Suppl. I (1999) 429-432.

- [4] S. Brisse, J. Verhoef, M. Tibayrenc, Characterization of large and small subunit rRNA and mini-exon genes further supports the distinction of six *Trypanosoma cruzi* lineages, *Int. J. Parasitol.* 31 (2001) 1218-1226.

- [5] C.A. Machado, F.J. Ayala, Sequence variation in the dihydrofolate reductase-tymidylate synthase (DHFR-TS) and trypanothione reductase (TR) genes of *Trypanosoma cruzi*, Mol. Biochem. Parasitol. 121 (2002) 34-37.
- [6] R. Hernandez, S. Martinez-Calvillo, R. Hernandez-Rivas, E. Gomez *Trypanosoma cruzi* ribosomal RNA genes: a review. Biol. Res. 26 (1993) 109-114.
- [7] J.B. Palenchar, V. Bellofatto, Gene transcription in trypanosomes, Mol. Biochem. Parasitol. 146 (2006)135-141.
- [8] E. Figueroa-Angulo, S. Martinez-Calvillo, I. Lopez-Villasenor, R. Hernandez, Evidence supporting a major promoter in the *Trypanosoma cruzi* rRNA gene, FEMS Microbiol. Lett. 225 (2003) 221-225.
- [9] S. Martinez-Calvillo, R. Hernandez, *Trypanosoma cruzi* ribosomal DNA: mapping of a putative distal promoter, Gene 142 (1994) 243-247.
- [10] L.M. Wen, P. Xu, G. Benegal, M.R. de Carvalho, D.R. Butler, G.A. Buck, *Trypanosoma cruzi*: exogenously regulated gene expression, Exp. Parasitol. 97 (2001) 196-204.
- [11] B.S. Stolf, R.P. Souto, A. Pedroso, B. Zingales, Two types of ribosomal RNA genes in hybrid *Trypanosoma cruzi* strains, Mol. Biochem. Parasitol. 126 (2003) 73-80.

- [12] V. de Andrade Stempliuk, L.M. Floeter-Winter, Functional domains of the rDNA promoter display a differential recognition in *Leishmania*, *Int. J. Parasitol.* 32 (2002) 437-447.
- [13] S. Yan, M.J. Lodes, M. Fox, P.J. Myler, K. Stuart, Characterization of the *Leishmania donovani* ribosomal RNA promoter, *Mol. Biochem. Parasitol.* 103 (1999) 197-210.
- [14] L.S. Gay, M.E. Wilson, J. E. Donelson, The promoter for the ribosomal RNA genes of *Leishmania chagasi*, *Molec. Biochem. Parasitol.* 77 (1996) 193-200.
- [15] J.M. Kelly, H.M. Ward, M.A. Miles, G. Kendall, A shuttle vector which facilitates the expression of transfected genes in *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania*, *Nucleic Acids Res.* 20 (1992) 3963-3969.
- [16] R.H. Reeder, Regulation of transcription by RNA polymerase I, in: S.L. McKnight, K.R. Yamamoto (Eds.), *Transcriptional Regulation*, vol. 1, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1992, pp. 315-347.
- [17] P. Dietrich, M.B. Soares, M.H. Affonso, L.M. Floeter-Winter, The *Trypanosoma cruzi* ribosomal RNA-encoding gene: analysis of promoter and upstream intergenic spacer sequences, *Gene* 125 (1993) 103-107.
- [18] J.C.B.M. Zomerdijk, R. Kieft, P.G. Shiels, P. Borst, Alpha-amanitin-resistant transcription units in trypanosomes: a comparison of promoter sequences for a VSG gene

expression site and for the ribosomal RNA genes, *Nucleic Acids Res.* 19 (1991) 5153-5158.

[19] L. Janz, C. Clayton, The PARP and rRNA promoters of *Trypanosoma brucei* are composed of dissimilar sequence elements that are functionally interchangeable, *Mol. Cell. Biol.* 14 (1994) 5804-5811.

[20] G. Laufer, G. Schaaf, S. Bollgönn, A. Günzl, In vitro analysis of α -amanitin-resistant transcription from the rRNA, procyclic acidic repetitive protein, and variant surface glycoprotein gene promoters in *Trypanosoma brucei*, *Mol. Cell. Biol.* 19 (1999) 5466-5473.

[21] B. Schimanski, G. Laufer, L. Gontcharova, A. Günzl, The *Trypanosoma brucei* spliced leader RNA and rRNA gene promoters have interchangeable TbSNAP50-binding elements, *Nucleic Acids Res.* 32 (2004) 700-709.

FIGURE LEGENDS

Fig. 1 Deletion and point mutation analyses of the *T. cruzi* rRNA gene promoter activity. The rRNA transcription unit is shown on top of panel A. As earlier reported [8] an 806 bp rDNA fragment containing the promoter region for the main transcription unit of rRNA from the Mexican strain la Cruz Jalisco (*T. cruzi* I) was cloned in the transfection vector pTEX-cat [15] using the *Sac*I and *Sac*II restriction sites (modified with Klenow). All construct coordinates shown were assigned in reference to the *tsp* described in our laboratory [9]. Constructs previously reported [8] are here marked with an asterisk next to the identification number. Parasite transfections and chloramphenicol acetyltransferase (CAT) biochemical assays were performed as previously described [8]. All plasmid derivatives tested were transfected in parallel with both the 100% reference construct 1*, and with the void vector pTEX-cat which lacks of rDNA promoter sequences. Different versions of the rRNA gene promoter were obtained from construct 1* using either internal restriction sites or PCR-derived amplifications. In all cases the 430 bp from the *gaphd* I upstream and untranslated region cloned in pTEX were retained next and upstream to the *cat* gene, thus providing a common physiological splice leader addition site. Luciferase activity was in many cases determined from an additional reporter plasmid with the luciferase encoding gene, thus providing a cotransfection control (data not shown). RE, repetitive element; UCE, upstream control element; DE, downstream regulatory element; x [10], y [11], z [9], arbitrary nomenclature for published transcription start points.

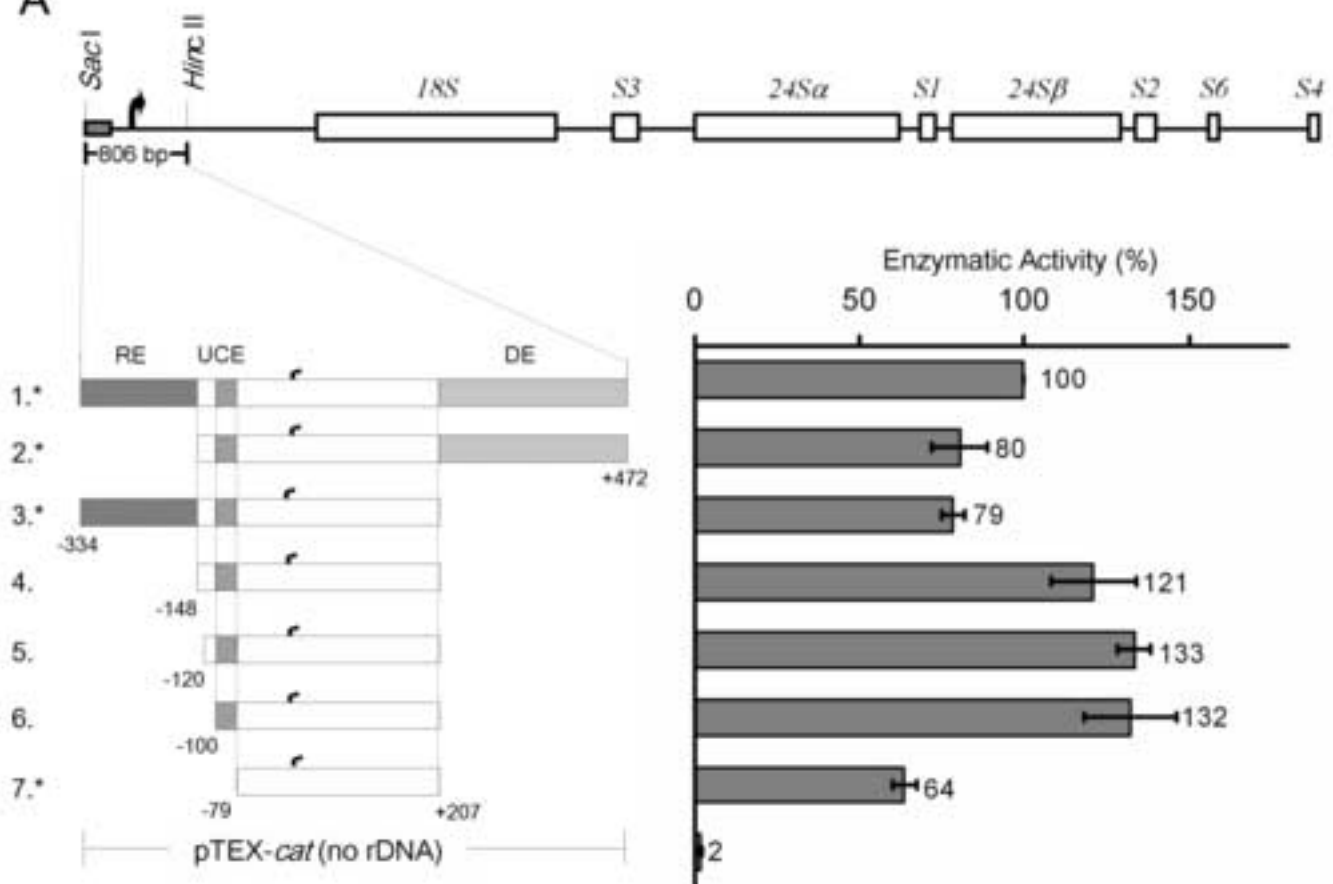
Fig 2. Comparison of rRNA gene promoters from different organisms. The schemes were adapted from published data as follows: mouse [16]; *T. cruzi* [8-9 and 17], *T. brucei* [18-

21]; *L. donovani* [13]; *L. amazonensis*, *L. mexicana* and *L. major* [12]; *L. chagasi* [14].

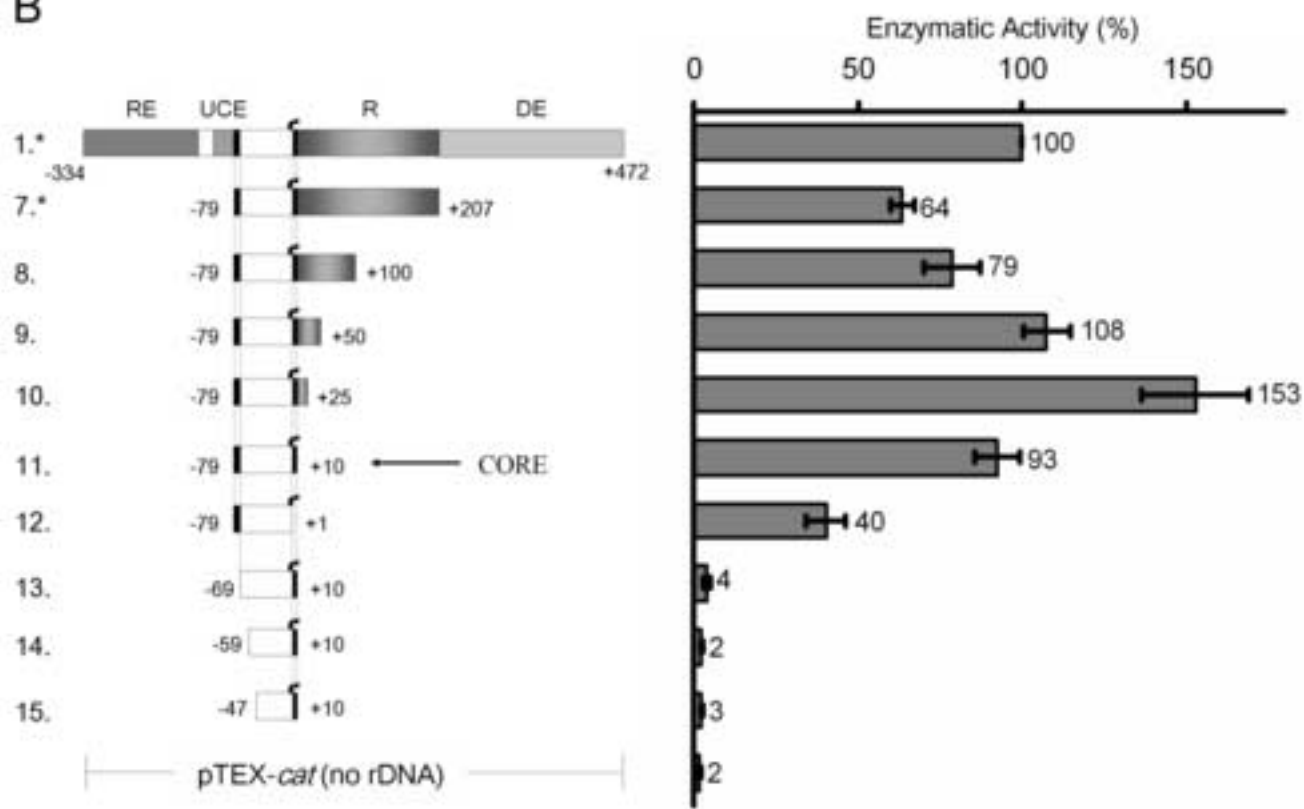
Graphic elements, abbreviations and fonts are explained in the bottom section.

Figure
[Click here to download high resolution image](#)

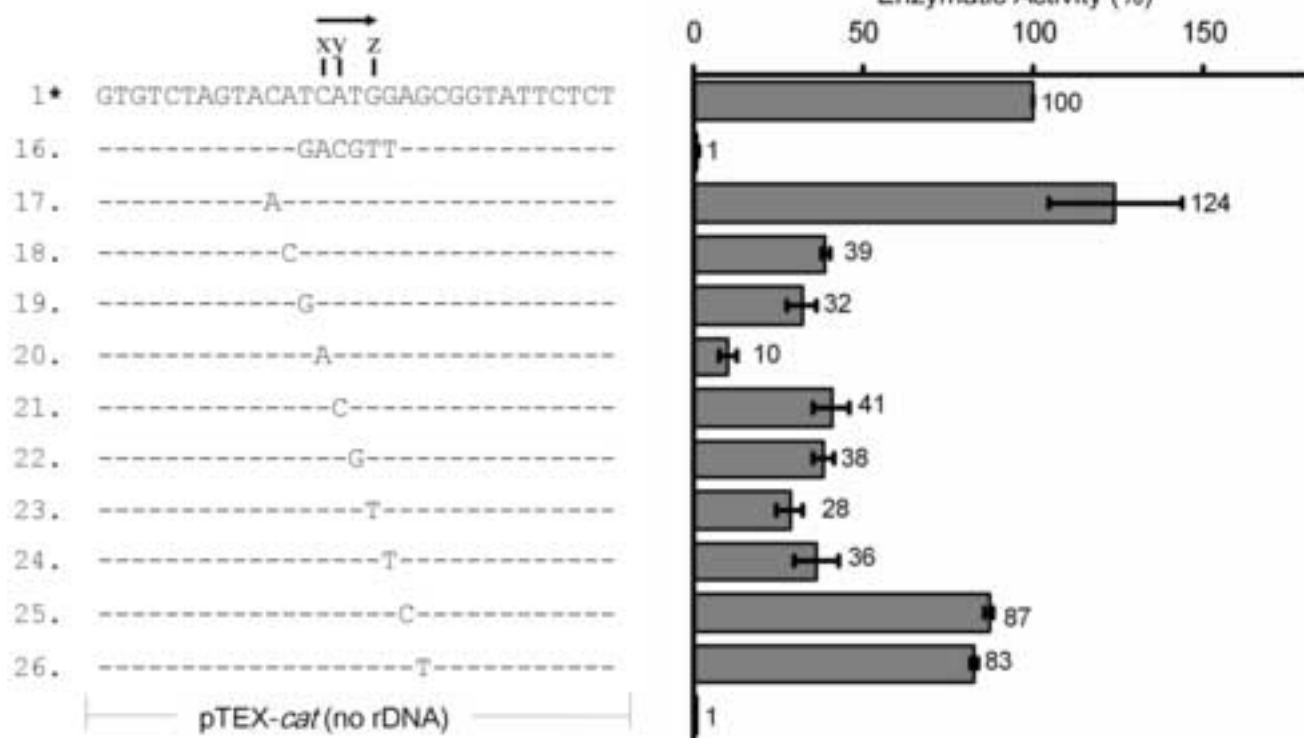
A



B



C



Figure[Click here to download high resolution image](#)