



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

Expresión de fibrilarina en *Trypanosoma cruzi*. Análisis comparativo
de un sistema de dos genes.

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA:

ERNESTO GUERRERO SÁNCHEZ

DIRECTOR DE TESIS

DR. ROBERTO HERNÁNDEZ FERNÁNDEZ
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

COMITÉ TUTOR

DRA. SOLEDAD FUNES ARGÜELLO
INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR, UNAM

DR. ROBERTO CORIA ORTEGA
INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR

CD.MX., AGOSTO DE 2019



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Agradecimientos.

Al programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México.

A CONACyT por la beca otorgada (362997).

Al apoyo del programa DGAPA (IN201014).

En especial a mi comité tutorial por su invaluable ayuda durante todo el proyecto:

Dr. Roberto Hernández Fernández

Dra. Soledad Funes Argüello

Dr. Roberto Coria Ortega

Un agradecimiento especial a la Dra. Ana Maria Cevallos y la Dra. Imelda López Villaseñor y su grupo de trabajo, por sus consejos colaboración, enseñanzas y valiosos aportes a mi trabajo.

A la M. en C. Juliana Herrera López por su apoyo técnico.

De manera especial a mis compañeros de laboratorio, Evelyn, Andrea, Tomás, Israel y Felipe.

A mis papás Esperanza y Ernesto, hermanos: Erika y Enrique.

**Dedicado a Lluvia y Bruno,
gracias por darme la dicha de formar una hermosa familia.**

Contenido

1	Introducción	6
1.1	<i>Trypanosoma cruzi</i>	6
1.1.1	Diversidad genética de <i>T. cruzi</i>	7
1.1.2	Ciclo de vida	9
1.2	Tripanosomiasis americana (Enfermedad de Chagas)	10
1.2.1	Fases de la enfermedad de Chagas	11
1.2.2	Diagnóstico y tratamiento	12
1.3	Expresión genética en tripanosomátidos	13
1.4	Biogénesis de ribosomas en tripanosomátidos	15
1.4.1	snoRNAs y snoRNPs	17
1.5	Fibrilarina	20
1.5.1	Fibrilarina en <i>T. cruzi</i>	21
2	Planteamiento del Problema	23
3	Hipótesis	24
4	Objetivos	25
4.1	Objetivo general	25
4.2	Objetivos específicos	25
5	Material y métodos	26
5.1	Cultivos de parásitos	26
5.2	Extracciones de DNA	26
5.3	Extracción de RNA total	27
5.4	Construcciones plasmídicas	27
5.5	Preparación de sondas con marca radioactiva	29
5.6	Northern blot	29
5.7	Herramientas bioinformáticas	30
5.8	Western Blot	31
5.9	Inmunodetección por microscopía de fluorescencia	31
5.10	Producción de sueros anti-TcFib1 y anti-TcFib2	32
5.11	Transfecciones	32
6	Resultados	34
6.1	Análisis de los genes que codifican para fibrilarina en <i>T. cruzi</i>	34
6.2	Expresión de ambos genes de fibrilarina en <i>T. cruzi</i>	38
6.3	Mapeo del sitio de inicio de la traducción en TcFib1	41
6.4	Expresión pGEX-TcFib1 y pGEX-TcFib2	43
6.5	Fibrilarina se expresa como proteína en epimastigotes	45
6.6	Relocalización de fibrilarina en epimastigotes de fase estacionaria	47
6.7	EGFP-TcFib se localiza en el nucléolo de <i>T. cruzi</i> .	49
7	Discusión	53

8	Conclusiones	57
9	Perspectivas	58
10	Referencias	59
11	Anexo I	63
12	Publicación	

Lista de figuras

- Fig. 1. Representación esquemática de los principales estadios de T. cruzi.*
- Fig. 2. Esquema comparativo de los modelos de Two-hybridization y Three Ancestor.*
- Fig. 3. Trans-splicing y poliadenilación.*
- Fig. 4. Diagrama del cistrón de RNA ribosomal de T. cruzi.*
- Fig. 5. Modelo de la biogénesis de los ribosomas.*
- Fig. 6 Estructura secundaria de los snoRNAs y sus reglas de orientación.*
- Fig. 7. Modificaciones post-transcripcionales más abundantes en los RNA ribosomales.*
- Fig. 8. Fibrilarina, snoRNP C/D Metiltransferasa.*
- Fig. 9. Alineamiento de las secuencias proteicas deducidas de fibrilarina en T. cruzi.*
- Fig. 10. Modelado por homología (Homology modeling) de las fibrilarinas de T. cruzi.*
- Fig. 11. Mapa de restricción teórico y ensayos de hibridación Southern blot y northern blot.*
- Fig. 12 Alineamiento de las isoformas de fibrilarina y probables inicios de traducción.*
- Fig. 13. Mapeo de sitio de inicio de traducción de TcFib1*
- Fig. 14. Mapa de las clonas de pGEX con los inserto de fibrilarina.*
- Fig 15. Ensayos de inducción de la proteína de fusión y western blot.*
- Fig.16. Reconocimiento de fibrilarina de T. cruzi por los anticuerpos policlonales.*
- Fig 17. Western blot comparativo de proteínas totales de epimastigotes de fase exponencial y estacionaria.*
- Fig. 18. Ensayo de inmunofluorescencia en epimastigotes de fase exponencial y estacionaria.*
- Fig. 19. Ensayo de inmunofluorescencia de tripomastigotes metacíclicos.*
- Fig. 20. Mapas de los plásmidos generados a partir de pTEX.*
- Fig. 21. Ensayo de western blot e inmunofluorescencia en parasitos transfectados.*
- Fig. 22. Northern blot de RNA total con sondas específicas para los genes ribosomales.*

Lista de tablas

- Tabla 1. Características generales de los alelos de fibrilarina en T. cruzi (CL Brener).*
- Tabla 2. Plásmidos generados para el estudio gélido de fibrilarina.*
- Tabla 3. Resumen de las principales características de los genes de fibrilarina de T. cruzi.*

1. Introducción

1.1. *Trypanosoma cruzi*

Es un parásito protozoario digénético que alterna, en su ciclo de vida natural, entre un huésped vertebrado y otro invertebrado. En el humano es el agente causal de la enfermedad de Chagas (Fig. 1A; de Souza, 1999).

A nivel nivel intracelular, *T. cruzi* posee los organelos característicos de las eucariontes; sin embargo, también posee estructuras particulares como lo es el cinetoplasto (característica del Orden *Kinetoplastidae*) el cual está integrado a la única mitocondria que recorre toda la célula. El cinetoplasto está conformado por DNA mitocondrial conocido como DNA-K (Stornio y Miel, 1994; Mc Geeh y Cosgrove 1980). El DNA-K es la porción más grande de material genético extranuclear hasta ahora descrito. Puede representar hasta el 20% del total del DNA celular y está estructurado como una malla de círculos concatenados.

T. cruzi tiene un flagelo que emerge del cuerpo basal o cinetosoma que está situado cerca de la envoltura mitocondrial de cinetoplasto y donde surge por el bolsillo flagelar (característica de la Familia *Trypanosomatidae*). El cinetosoma tiene una estructura cilíndrica constituida por 9 tripletes de microtúbulos que se proyectan hacia el bolsillo flagelar: una parte es citoplasmática y la otra es una zona de transición hacia el flagelo; entre ambas existe un septum. El flagelo presenta 9 pares de microtúbulos periféricos longitudinales, unidos entre sí por filamentos oblicuos, que conforman una banda estriada de aproximadamente 10.15 μm de diámetro. El flagelo presenta una vaina que es una extensión tubular de la membrana celular. El conjunto de flagelo más cinetosoma constituye el órgano de locomoción del parásito (Storino y Milei, 1994).

El aparato de Golgi está cerca del bolsillo flagelar sin conectarse con el cuerpo basal ni con el flagelo. El núcleo del parásito es fibrilar y cuando comienza a duplicarse se presenta en cúmulos de material genético próximos a la membrana nuclear. El cuerpo del parásito está

limitado por la membrana citoplasmática que tiene 8-10 nm de espesor y por debajo de ella se encuentra el sistema de microtúbulos (Storino y Milei, 1994).

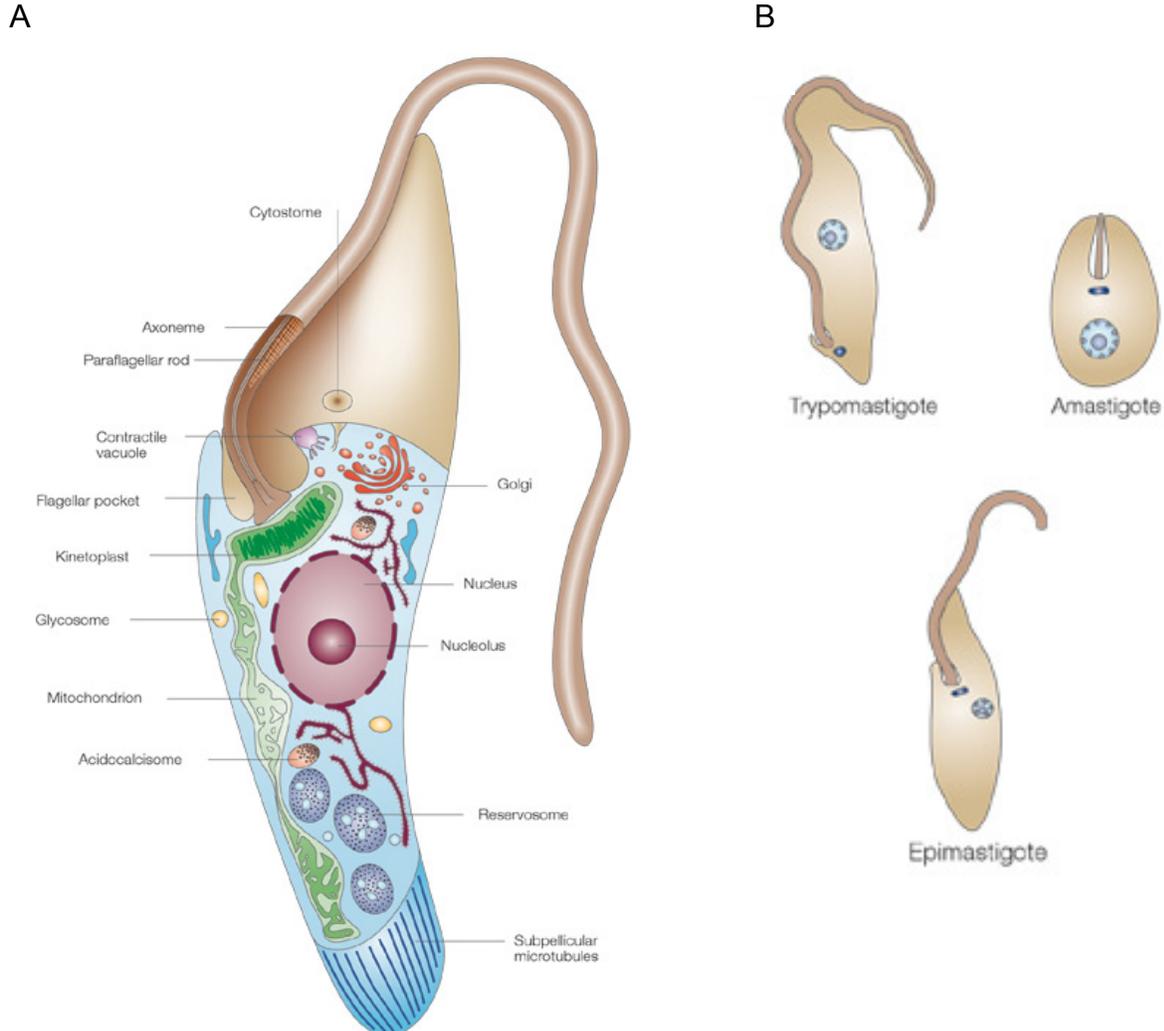


Fig. 1. Representación esquemática de los principales estadios de *T. cruzi*. (A)

Representación esquemática de la sección longitudinal de la forma epimastigote de *T. cruzi*. (B) Las principales formas celulares de los tripanosomátidos se definen por la forma de la célula, la presencia de flagelo, la posición del cuerpo basal, del cinetoplasto y del núcleo. En general, el epimastigote de *T. cruzi* se encuentra en el vector, el tripomastigote en el hospedero y el amastigote en forma intracelular. Imagen modificada de: Docampo et al., 2005.

1.1.1 Diversidad genética de *T. cruzi*

T. cruzi está clasificado como una sola especie que muestra una gran diversidad genética y fenotípica. La clasificación actual considera 6 o 7 unidades discretas de tipificación (DTUs, por sus siglas en inglés *Discrete Typing Units*) que van desde TcI a TcVI, siendo TcBat la DTU

siete, éste ordenamiento está basado en la diversidad de su genoma, multiplicidad de los genotipos y fenotipos. Aunque se ha considerado a *T. cruzi* como una especie clonal no se ha descartado la posibilidad de eventos de recombinación lo que podría explicar la heterogeneidad en algunos DTUs. Dicha heterogeneidad observada en aislados de TcV y TcVI sugieren que estos DTUs son híbridos derivados de TcII y TcIII. Existen dos modelos, "*Two-Hybridization*" y "*Three Ancestor*", en las cuales integran la teoría de dos eventos de hibridación (Fig. 2; Zignales et al., 2012).

El modelo *Three Ancestor* considera dos eventos de intercambio genético recientes entre TcII y TcIII que producen TcV y TcVI. El modelo de *Two-Hybridization* relaciona un antiguo evento de intercambio genético entre TcI y TcII, con pérdida de heterocigosidad de la progenie para producir TcIII y TcIV, seguido de un segundo evento de hibridación más reciente entre TcII y TcIII para producir TcV y TcVI (Fig. 2; Zignales et al., 2012).

La cepa usada en el proyecto del genoma (CL Brener) está clasificada como miembro del DTU TcVI . Recientemente se dio a conocer la localización cromosómica de la mayoría de los genes de *T. cruzi* (CL Brener), anotados en el proyecto genoma TriTryp (<http://tritrypdb.org/tritrypdb/>) en el que se cuentan 41 cromosomas (Aslett et al., 2010; Weatherly, 2009; Westenberger et al., 2005).

El análisis comparativo de las secuencias idénticas con las del genoma de la cepa Esmeraldo (TcII) permitió distinguir en el genoma de CL Brener dos haplotipos los cuales son llamados Esmeraldo (S) y No-esmeraldo (P). La divergencia entre los haplotipos en las regiones codificadoras es aproximadamente de 2.2% (Aslett et al., 2010; Weatherly 2009; Westenberger et al., 2005).

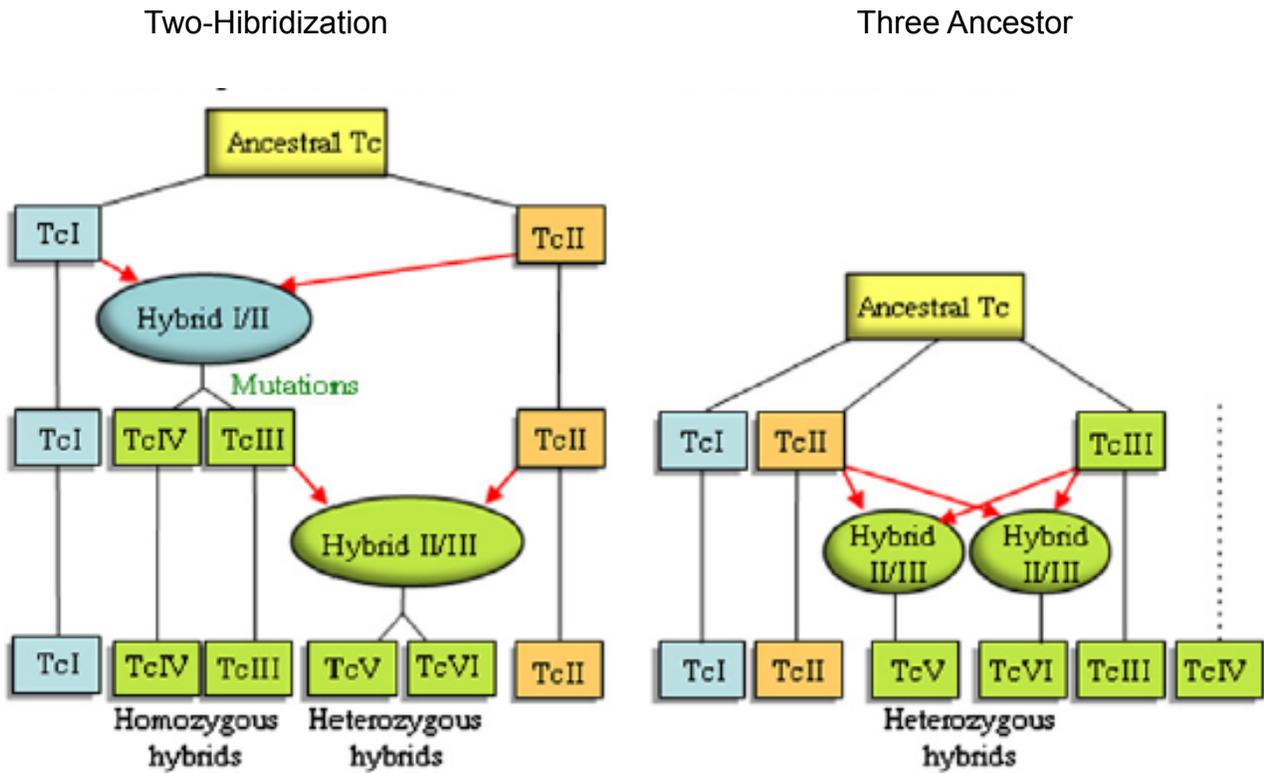


Fig. 2. Esquema comparativo de los modelos de Two-hybridization y Three Ancestor que explican la diversidad genética de *T. cruzi*. Modelos de intercambio genético durante la evolución clonal de *T. cruzi*. Los rectángulos muestran los distintos DTUs y los óvalos eventos de fusión e intercambio genético. Imagen tomada de Zingales, et al., 2012.

1.1.2 Ciclo de vida

El ciclo de vida de *T. cruzi* es complejo ya que atraviesa por 4 estadios con diferentes características reproductivas y tipos de hospederos (Mamíferos e insectos triatominos). La descripción de los estadios se menciona a continuación:

- Epimastigote: Forma elongada con dimensiones de 20-40 x 3 μm , el flagelo se origina próximo y por delante del núcleo, emerge por un costado del cuerpo del parásito, arrastra la membrana citoplasmática en un corto trayecto dando la imagen de una membrana ondulante corta que se libera por el extremo anterior de parásito; este

estadio se desarrolla en el vector y constituye una de las formas proliferativas del *T. cruzi* (Fig. 1B).

- Amastigote: Es una forma esférica u ovalada aproximadamente de 2-4 μm que carece de flagelo libre; estadio replicativo del parásito en el mamífero (Fig. 1B).
- Tripomastigote: Es una forma elongada de 20-25 μm con el cinetoplasto situado por detrás del núcleo; el flagelo nace en su proximidad y emerge por un costado del cuerpo del parásito, se libera por el extremo anterior creando la imagen de una membrana ondulante de importante extensión; estadio presente en la circulación del mamífero y en la ampolla rectal del vector (tripomastigote metacíclico) y carece de capacidad replicativa (Fig 1B).

El ciclo de vida del parásito inicia con el contacto entre el tripomastigote metacíclico y la célula hospedera de origen mamífero. El reconocimiento de la célula es mediado por proteínas receptoras que permiten a *T. cruzi* adherirse y penetrar en las células no fagocíticas (Storino y Milei, 1994). Cuando los tripomastigotes entran a las células mamíferas, se diferencian en amastigotes las cuales proliferan hasta ocupar todo el espacio intracelular disponible. Una vez ocupado todo el citoplasma de la célula infectada, los amastigotes se diferencian nuevamente a tripomastigotes, los cuales lisan a la célula infectada y se liberan al torrente sanguíneo. Los parásitos ocupan el lumen del del intestino del triatomino al ser ingeridos, en estas condiciones se diferencian a epimastigotes, cerca del final del contacto digestivo del insecto son diferenciados a tripomastigotes metacíclicos (Elias et al., 2001; Storino y Milei 1994).

1.2. Tripanosomiasis americana (Enfermedad de Chagas).

La enfermedad de Chagas es una afección parasitaria hística y hemática producida por el protozoario flagelado *Trypanosoma cruzi*. Esta infección es transmitida por insectos hemípteros hematófagos de la subfamilia *triatominae* (Storino y Milei, 1994). Se estima que cerca de 50 000 personas mueren al año debido a esta enfermedad.

1.2.1. Fases de la enfermedad de Chagas

La enfermedad de Chagas presenta generalmente tres estados en la infección humana por *T. cruzi*, primero hay un periodo de incubación de 4-10 días generalmente asintomática, posteriormente le sigue una fase aguda corta seguida de la fase crónica de larga duración, las dos fases son separadas por una fase asintomática llamada fase indeterminada (Cassab et al., 1999).

- Fase aguda: Fase que dura de 1-3 meses, con frecuencia no es detectada debido a que los síntomas pueden ser inespecíficos. Sólo el 1-2% de todos los pacientes son diagnosticados. La fase aguda puede presentarse a cualquier edad. Frecuentemente presenta una pequeña lesión llamada chagoma en el punto de entrada del parásito, cuando se encuentra a nivel del ojo, puede producirse un edema ocular unilateral llamado romaña. Los síntomas observados son fatiga acompañada de fiebre continua o recurrente, anorexia, diarrea y vómitos. Los pacientes pueden presentar hepato-esplenomegalia moderada, edemas generalizados y adenopatías difusas. Hasta el 30% de los pacientes presentan anormalidades electrocardiográficas y/o radiológicas debidas a una miocarditis aguda que presenta diferentes grados de severidad. En niños menores de 2 años pueden presentar meningo-encefalitis cuya mortalidad puede llegar hasta un 50%. En caso de evolución favorable, los síntomas disminuyen espontáneamente entre 4-8 semanas sin que se presenten secuelas clínicas a corto plazo (Cassab et al., 1999).
- Fase intermedia: Esta fase comienza unas 8-10 semanas después de la fase aguda. Se caracteriza por la ausencia de síntomas. La serología es positiva y el parásito puede ser detectado por xenodiagnóstico en 20-60% de los casos. El enfermo tiene plena capacidad para realizar actividades físicas, sus electrocardiogramas y radiografías son normales. Las personas en esta fase constituyen un reservorio importante para mantener el ciclo de vida del parásito (Cassab et al., 1999).

- Fase crónica: En esta fase los parásitos penetran y se multiplican en las células de órganos vitales a menudo causando daños irreversibles de los tejidos, particularmente del sistema nervioso autónomo y de los músculos no estriados. Hay una reducida parasitemia después de 10-20 años de la infección inicial y el 30% de los casos puede evolucionar a daños cardiacos, digestivos o neurológicos. La miocarditis crónica es la forma más común de la cardiopatía chagásica. Las manifestaciones dependen del grado de daño al miocardio, provocando arritmia e insuficiencia cardiaca. Los síntomas mas frecuentes son: palpitaciones, mareos, síncope, disnea, edema y dolor pectoral. La fibrilación es la consecuencia más frecuente que provoca la muerte súbita en los pacientes chagásicos crónicos. En la visceropatía chagásica el tejido comúnmente afectado es el esófago, con una dilatación progresiva acompañada de disfagia, regurgitación, hipersalivación y dolor. Otro tejido con gran incidencia es el colon, provocando perturbaciones peristálticas manifestando estreñimiento progresivo, meteorismo, así como fecalotas y vólvulus agudo en casos graves (megacolon). La neuropatía chagásica representa una destrucción neuronal que afecta los sistemas nerviosos central, periférico y autónomo; según la localización de las lesiones se puede observar la perturbación funcional del cerebelo, convulsiones y anomalías psiquiátricas (Cassab et al., 1999).

1.2.2. Diagnóstico y tratamiento

El diagnóstico de la infección aguda se lleva a cabo a través de la identificación por pruebas de laboratorio por medio de: 1) el análisis al microscopio de sangre no coagulada del paciente en un frote sanguíneo bajo tinción de Giemsa; 2) el xenodiagnóstico, el paciente es intencionalmente picado por el insecto trasmisor no contaminado y después de 30 y 60 días las heces e intestinos del insecto son analizados para detectar tripomastigotes o epimastigotes; 3) por medio de inoculación de la sangre del enfermo en animales de laboratorio y la verificación de si desarrollan la enfermedad aguda; el crecimiento y multiplicación de posibles parásitos en medios de cultivo, por ejemplo, medio LIT (triptosa de infusión de hígado). El diagnóstico de las etapas intermedia y crónica suele ser mas difícil por los niveles tan bajos de parásitos en sangre, se han desarrollado técnicas moleculares

como detección de DNA del parásito por PCR y pruebas inmunológicas para detectar anticuerpos específicos.

Para el tratamiento las principales drogas usadas son los nitrofuranos (nifurtimox; Bayer) y los nitroimidazoles (benznidazole; Roche), que actúan a través de la inducción de daño oxidativo o reductivo del parásito; sin embargo, ambas drogas son altamente mutagénicas y causan efectos secundarios importantes. Una gran variedad de drogas están en desarrollo por ejemplo inhibidores de síntesis de ergosterol e inhibidores de otras vías metabólicas, por otra parte, la disponibilidad de los genomas de estos parásitos ha ayudado a la rápida validación de blancos que proporcionarían mayor especificidad y potencialmente reducirían los efectos secundarios de los tratamientos principalmente en fase crónica (Croft et al., 2005).

1.3 Expresión genética en tripanosomátidos

Los tripanosomátidos, entre ellos *T. cruzi*, realizan una transcripción policistrónica de genes codificantes de proteínas y la maduración de los RNA mensajeros (RNAm) lo hacen por medio del procesamiento por *trans-splicing*.

La transcripción es el proceso por el cual el RNA es sintetizado por una célula usando como molde DNA. En eucariontes este proceso se lleva a cabo por tres tipos de RNA polimerasa. En eucariontes existen 3 tipos de RNA polimerasa (RNA pol I, II, III). En tripanosomátidos la RNA pol I transcribe los genes de RNA ribosomales (RNAr), excepto el 5S; la RNA pol II transcribe los RNAm de genes que codifican para proteínas y los genes del miniexón o *spliced leader* (SL); la RNA pol III transcribe los RNA de transferencia (tRNA), el RNAr 5S y otros tipos de RNA como los RNA nucleolares pequeños (snoRNA).

T. cruzi posee un genoma de 60.3 Mb el cual está organizado en 41 cromosomas con grandes grupos o *clusters* génicos policistrónicos (PGCs por sus siglas en inglés *Polycistronic Gene Clusters*) que pueden ser desde decenas a cientos de genes codificantes de proteínas arreglados secuencialmente en la misma hebra de DNA. Los genes codificantes para tRNAs se encuentran organizados en *clusters* de 2 a 10 genes (Martínez-Calvillo et al., 2009).

Las unidades de los transcritos policistrónicos de RNAm son procesados por mecanismos de *trans-splicing*, de lo que resulta que es la adición de un RNA pequeño SL (RNA de 39 nt) que confiere el “cap” (Guanosina del extremo 5’ metilada en el carbono 7) al transcrito procesado. El procesamiento en el extremo 3’ ocurre coordinadamente con el *trans-splicing* del transcrito génico adyacente en 3’ (Fig. 3). Los dos eventos dependen de una región rica en pirimidinas (poli(Y)), localizadas dentro de las regiones intergénicas o regiones sin traducir (UTRs por sus siglas en inglés de *Unstralated Region*). Se sabe que la mayoría de las UTRs presentan tamaños entre 50 a 500 nt donde se encuentra las regiones reguladoras de *trans-splicing* y poliadenilación (Campos, 2008). Se ha reportado que el *trans-splicing* necesita la presencia de un dinucleótido (GT o AG) río abajo de la región poli(Y) (Campos, 2008; Huang, 1991).

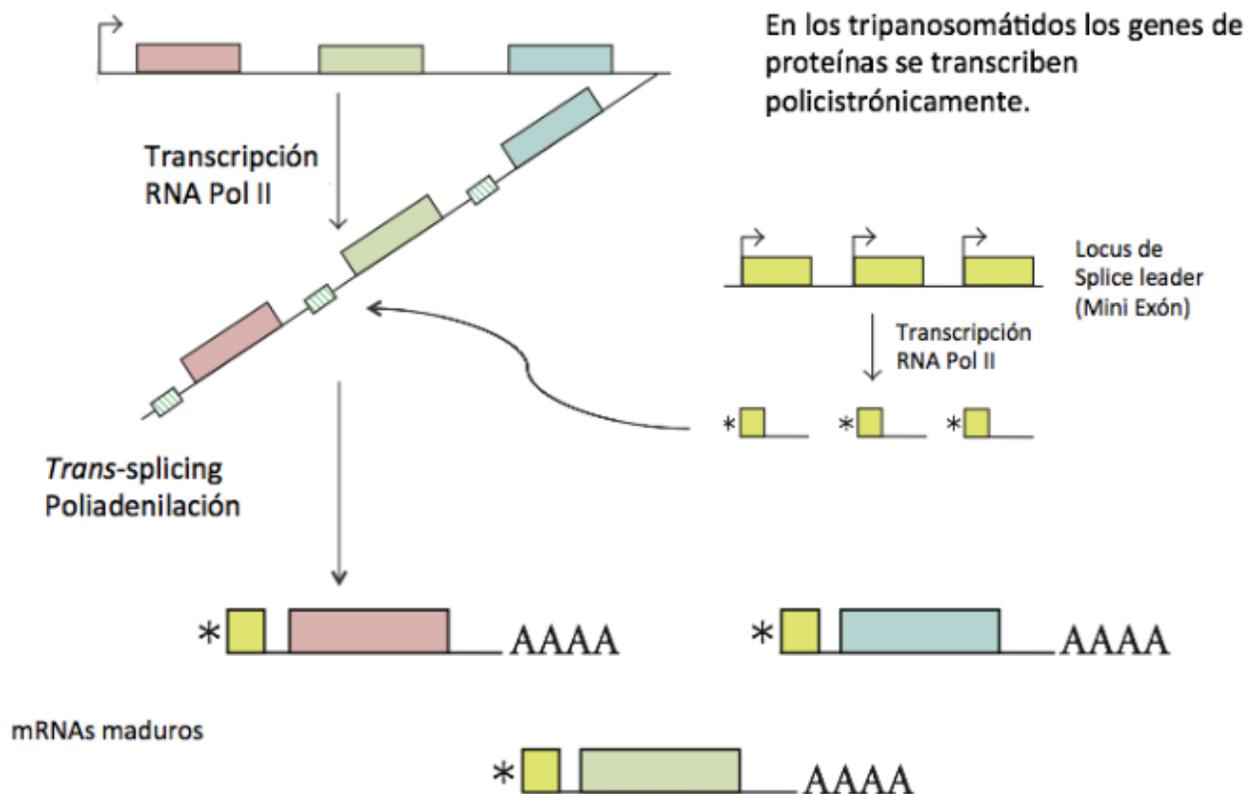


Fig. 3 Trans-splicing y poliadenilación en tripanosomátidos. La maduración del RNAm inicia con la transcripción de alguno de los genes de miniexón o “splice leader” (SL). Éste es modificado en su extremo 5’ con una guanosina metilada en el carbono 7. Por otro lado, en las regiones intergenicas de las unidades policistrónicas de RNAm (pre-RNAm), existen regiones ricas en

pirimidina (Poly (Y)), las cuales son reconocidas por la maquinaria de splicing para realizar un corte. Río abajo de este sitio de corte se localiza un dinucleótido AG donde se lleva a cabo la unión de SL con el RNAm. La misma maquinaria de splicing realiza la poliadenilación del RNAm localizado río arriba. Cada RNAm maduro queda conformado por la secuencia SL, seguida de una región no traducida en 5' (UTR 5'), el marco abierto de lectura del gen, la región no traducida en 3' (UTR 3') y la cola de poli A (Modificado de Martínez-Calvillo, et al. 2009).

1.4 Biogénesis de ribosomas en tripanosomátidos

En todos los organismos, el ribosoma forma el centro de la maquinaria de la traducción. La traducción es el proceso en el que la información codificada en los RNA mensajero es convertida en una cadena continua de aminoácidos (polipéptidos o proteínas) con propiedades estructurales y/o catalíticas. El ribosoma es un complejo ribonucleoproteico que tiene 2 funciones principales, decodificación del RNAm y formación de enlaces peptídicos. Estas actividades residen en las dos subunidades que lo integran. La subunidad pequeña se une al RNAm y a las moléculas de RNAt, mientras que la subunidad grande cataliza la formación de los enlaces peptídicos de la proteína en síntesis (Alberts et al., 2000; Lafontaine y Tollervey, 2001).

El RNAr es más de la mitad del peso del ribosoma y desempeña un papel central en las actividades catalíticas del complejo. Los ribosomas contienen un número elevado de proteínas (~49 proteínas en la subunidad mayor y ~33 proteínas la subunidad menor, número varía dependiendo la especie), pero muchas de ellas tienen una secuencia poco conservada (Alberts et al, 2000; Lafontaine y Tollervey, 2001).

Las células eucarióticas tienen 3 clases de RNA polimerasas las cuales están involucradas en la biosíntesis de los ribosomas. La RNA Pol I transcribe el cistrón ribosomal. La transcripción de los genes ribosomales origina el pre-RNAr inicial 47S, que posteriormente es cortado en las moléculas 28S, 18S y 5.8S, los cuales son modificadas de manera postranscripcional por medio de interacción con las ribonucleoproteínas nucleolares pequeñas (snoRNP) y con ayuda de enzimas específicas, finalmente es ensamblado con las proteínas de envoltura para poder ser exportados hacia el citoplasma (Fig. 5). El RNAr 5S generado en el citoplasma por la RNA pol III (Boisvert et al 2007; Reeder, 1992; Granneman,

2004). Las proteínas ribosomales, como la mayoría de las proteínas, son traducidas en el citoplasma y posteriormente son enviadas al nucléolo donde se ensamblan con los componentes de RNAr para conformar las subunidades ribosomales.

En la mayoría de los eucariontes el componente de RNA de la subunidad mayor tipo 28S es sintetizado como una sola molécula, en tripanosomátidos el cistrón ribosomal está organizado de forma particular ya que contiene un mayor número de espaciadores transcritos internos (ITSs, por sus siglas en inglés *Internal Transcribed Spacers*) que provocan la síntesis de múltiples moléculas de RNAr independientes: 24S α , 24S β , S1, S2, S3, S4, S6 codificadas en el cistrón (Fig. 4). El RNAr S5 es codificada como una unidad independiente de transcripción transcrita por la RNA pol III y corresponde al RNA 5S. La molécula pequeña de RNAr S3 corresponde al RNAr 5.8S de otros eucariontes. El RNAr 18S de *T. cruzi* es equivalente al de los demás eucariontes (Fig. 4; Cevallos et al., 2005; Hernández et al. 1993; Hernández y Cevallos, 2014; Macedo et al., 2004; Uliel et al. 2004).

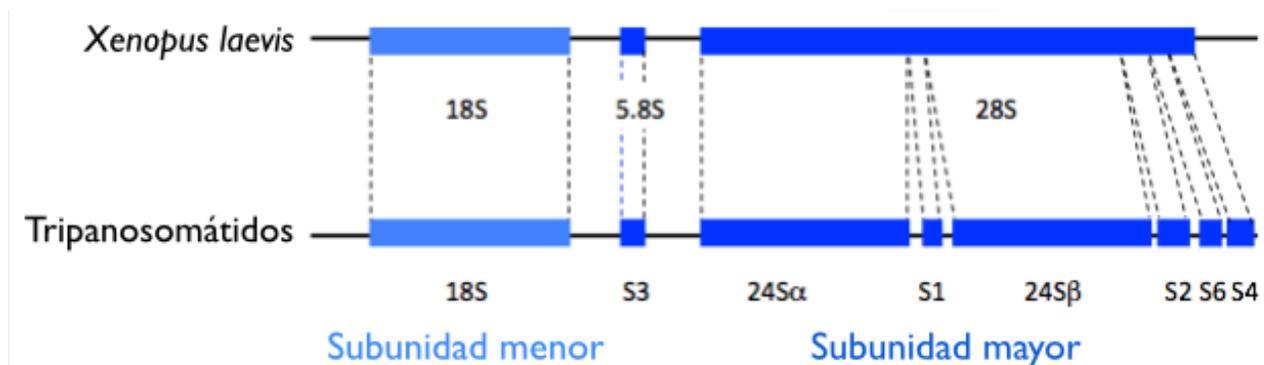


Fig. 4. Diagrama del cistrón de RNA ribosomal de *T. cruzi*. Las regiones representadas con recuadros azul representan las regiones transcritas identificadas como la subunidad pequeña de RNAr (18S), la subunidad grande de RNAr (24S α y 24S β), RNAr 5.8S (S3), y los RNAr pequeños (S1, S2, S4 y S6). Las regiones codificadoras están unidas por líneas delgadas que representan los espaciadores internos transcritos (ITS). Las barras marcadas como pRTC muestran tres fragmentos genómicos previamente clonados en el laboratorio del Dr. Roberto Hernández (Modificado de Hernández, 1988).

La biogénesis de los ribosomas inicia en los centros fibrilares (CFs) del nucléolo donde son transcritos los pre-RNAr, la formación del pre-ribosoma se lleva a cabo en el componente fibrilar denso (DFC) alrededor de los CFs, el cual se observa como una zona compacta y

densa compuesta principalmente por complejos integrados por proteínas y pequeños RNAs denominados snoRNPs (*small nucleolar ribonucleoproteins*), en los DFCs, el pre-RNAr es modificado (metilación y pseudouridilación) y procesado (cortado). El ensamblaje de las partículas pre-ribosomales ocurre en el componente granular (GC, *granular component*), los gránulos tienen un diámetro entre 15-20nm (Fig. 5; Alberts et al., 2000; Bachellerie, 1997; Jansen et al., 1991; Raška et al., 2006; Rosete et al., 2007).

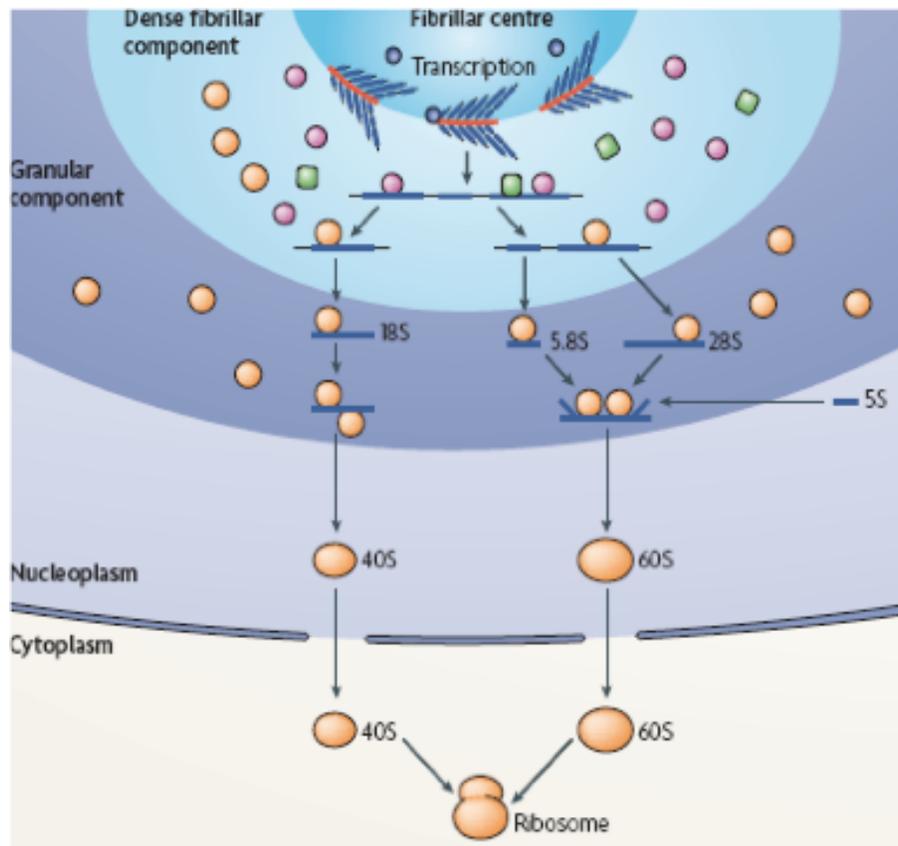


Fig. 5. Modelo de la biogénesis de los ribosomas. La transcripción del DNA ribosomal por la RNA pol I se produce en los centros fibrilares o bien al límite del componente fibrilar denso (DFC). El pre-RNA ribosomal (pre-RNAr) es modificado por las pequeñas ribonucleoproteínas nucleolares (snoRNA) en el DFC. La maduración final del pre-RNAr por las snoRNP ocurre en su mayoría en el componente granular del nucleolo (GC). En el GC, la 5,8 S y 28S del RNA ribosomal se unen para formar la subunidad 40S del ribosoma. Las subunidades 40S y 60S del ribosoma son exportados al citoplasma, donde se unen al rRNA para formar los ribosomas funcionales (Imagen tomada de Boisvert et al., 2007)

1.4.1 snoRNAs y snoRNPs

Las principales modificaciones postranscripcionales en los pre-RNAr son la 2'-O-metilación en la ribosa y la pseudouridinilación. La mayoría de las modificaciones están situadas dentro dominios conservados y lo que sugiere su importancia funcional. La ubicación de las modificaciones es guiada por dos clases de pequeños RNA nucleolares llamados snoRNA (por sus siglas en inglés de *small nuclear RNAs*).

La primera clase de snoRNAs está definida por la presencia de los motivos conservados H/ACA, donde la parte llamada caja H presenta la secuencia ANANNA (donde N es cualquier nucleótido). Estas secuencias conservadas unen dos regiones contiguas con estructuras en forma de tallo (Fig. 6). La modificación se lleva a cabo con un apareamiento previo entre la región del RNAr con secuencias en forma de burbujas intermedias a los dos tallos. En la parte central de esta interacción, en dos posiciones no apareadas se encuentra la uridina blanco de isomerización (pseudouridinilación). La región ACA se encuentra a 3 nucleótidos del extremo 3' terminal (Bachellerie et al., 1997; Reichow, 2007; Uliel, 2003). Los tripanosomátidos poseen snoRNAs H/ACA con un solo tallo (H/ACA-like RNA). Éstos presentan un motivo AGA en lugar de ACA en el extremo 3' (Fig. 6); sin embargo, se consideran dentro de esta clase estructural (Uliel, 2003).

Las metilaciones del RNAr son dirigidas por la segunda clase estructural de snoRNA, que tienen las secuencias conservadas C y D (C: 5'RUGAUGA3', R: purina; y D: 5'-CUGA3'). Las secuencias C y D se encuentran en los extremos 5' y 3' del snoRNA respectivamente, flanquean la región a la cual se aparea el RNAr que será modificado. Los nucleótidos de pre-RNAr que marcan los sitios que serán modificados se unen de forma complementaria una región en forma de burbuja que se encuentra dentro de un tallo formado por el snoRNA (Fig. 6). Los snoRNA se encuentran en complejos estables junto con 4 proteínas que sirven como envoltura: fibrilarina, Nop56, Nop58 y 15.5 K (Bachellerie, 1995; Uliel, 2003). La mayoría de los snoRNA C/D tienen un segundo set de secuencias conservadas en la región central del RNA, que son llamadas las cajas C' y D' (Raška et al., 2006; Reichow, 2007; Uliel, 2003).

Se ha observado que la complementariedad de bases entre el pre-rRNA y el snoRNA se lleva a cabo con 10-21 bases y la metilación se lleva a cabo exactamente a 5 nucleótidos de distancia de los motivos D o D' (Regla 5+) (Dunbar, et al. 2000; Reichow, 2007, Uliel, 2003).

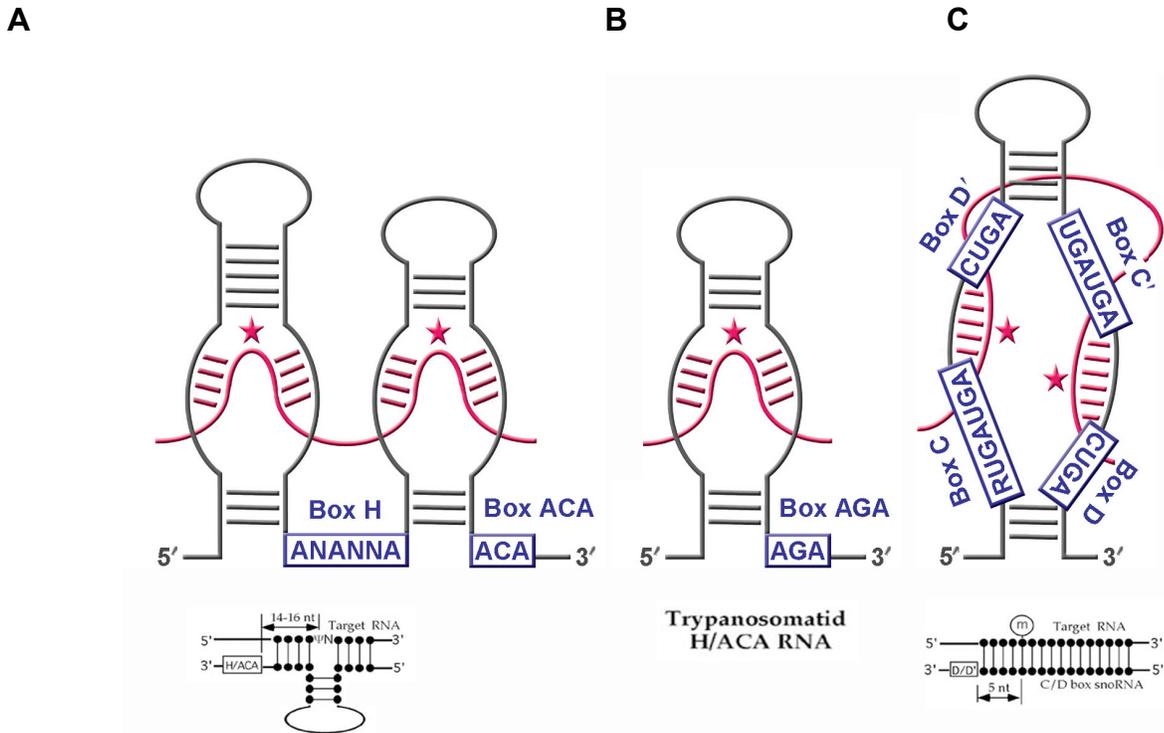


Fig. 6 Estructura secundaria de los snoRNAs y sus reglas de orientación. (A) H/ACA RNA que guía la pseudouridilación. Se indican las cajas H y ACA. Se muestran el RNA objetivo y el sitio de pseudouridilación (Ψ). La letra N designa cualquiera de los 4 nucleótidos en la bolsa de pseudouridilación. (B) La estructura secundaria de la RNA H/ACA-like en tripanosomátidos compuesta por una simple tallo y con el motivo AGA en el extremo 3'. (C) C/D snoRNA que guía la 2'-O-metilación. Se muestran las cajas C/D y C'/D' y el nucleótido metilado (m) en la cadena de RNA objetivo. La distancia entre el sitio de metilación y las cajas D/D' se da por la "regla 5+" (Imagen modificada de Uliel, 2003 y Reichow, 2007).

Sobre los snoRNAs se forman complejos enzimáticos que son los responsables de las modificaciones de los pre-rRNA, las enzimas pseudouridina sintasa (Cbf5p) que realizan la conversión de uridina a pseudouridina (Ψ) o la metiltransferasa (fibrilarina), para la 2'-O-metilación en la ribosa (Fig. 7; Reichow, 2007, Uliel, 2003).

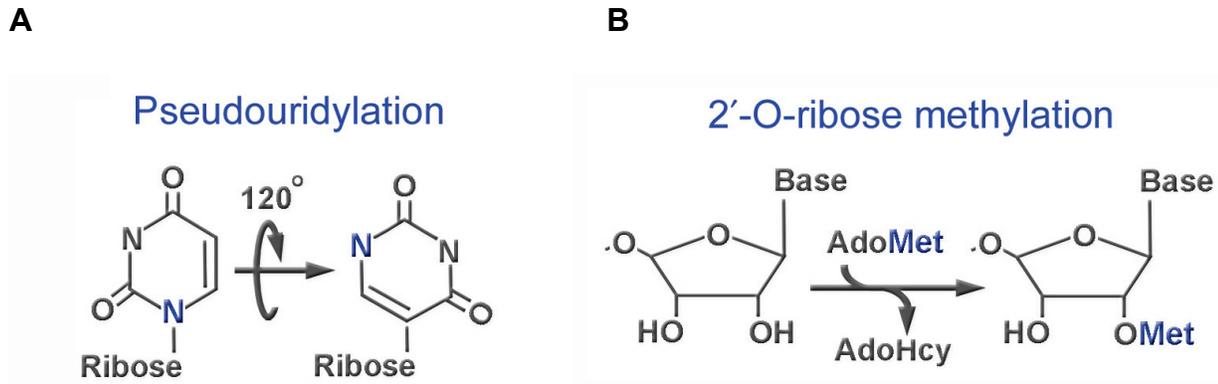


Fig. 7. Modificaciones post-transcripcionales más abundantes en los RNA ribosomales.

(A) La isomerización de la uridina en Ψ requiere un giro total de la base uracilo. (B) La proteína metiltransferasa (fibrilarina) cataliza la 2'-O-metilación en la ribosa de los RNAr, al convertir AdoMet en S-adenosilhomocisteína (AdoHcy) (Imagen: Reichow et al., 2007).

1.5 Fibrilarina

La fibrilarina es una proteína de 34 – 36 kDa que se encuentra en los snoRNPs C/D de los centros fibrilares densos nucleolares (DFC). Su actividad enzimática fue determinada por la asociación entre la proteína y los snoRNAs. Con análisis de secuencia de aminoácidos y estructurales se confirmó su similitud con enzimas con actividad de metiltransferasa (Reichow, 2007; Tollervy, 1991). Estructuralmente la fibrilarina está formada por un dominio catalítico integrado por 7 láminas beta plegadas rodeadas por 3 hélices alfa de cada lado, ésta estructura es similar a las enzimas catalizadoras de la metilación de una gran variedad de sustratos nucleofílicos (incluyendo a ácidos nucleicos y proteínas). El donador del grupo metilo es el cofactor S-adenosilmetionina (AdoMet). En células eucariontes se ha observado que en la estructura primaria de fibrilarina existe una región rica en glicina y arginina (GAR) cerca del extremo N terminal, el GAR muestra una gran variabilidad en ortólogos de otras especies, y generalmente en estudios cristalográficos la región GAR no es representado (Uziel et al. 2004).

Para catalizar la metilación del RNA, la fibrilarina forma un complejo activo (snoRNP C/D fibrilarina) al asociarse con 3 proteínas: 15.5kDa, Nop56 y Nop58 que son esenciales para estabilizar la unión entre el RNAr y fibrilarina. La estructura que resulta entre la fibrilarina y Nop56 resulta en la asociación con otro complejo de fibrilarina de tal forma que las proteínas

Nop56 y Nop58 reconocen las cajas C y C' respectivamente, mientras cada fibrilarina interactúa con los motivos D y D' (Uliel et al., 2004)

El complejo de fibrilarina reconoce las regiones que forman la RNA de doble cadena (entre pre-RNA_r y el snoRNA específico que guía el sitio de modificación). Esto es similar al reconocimiento de las metiltransferasas de DNA; sin embargo, en éste caso el mecanismo enzimático aún no se ha determinado. La mayoría de las reacciones de las metiltransferasas se llevan a cabo por la vía de sustitución tipo S_N2, donde el grupo metilo activado de AdoMet sustituye al grupo saliente del aceptor nucleofílico (en este caso el grupo hidroxilo de la ribosa 2'-OH del RNA), dentro del sitio de reconocimiento se encuentra un aspartato (que se cree lleva a cabo la desprotonación del 2'-OH nucleofilo y/o estabiliza la interacción con AdoMet) altamente conservado en las secuencias de aminoácidos de fibrilarina en varias especies (Fig. 8; Reichow et al., 2007).

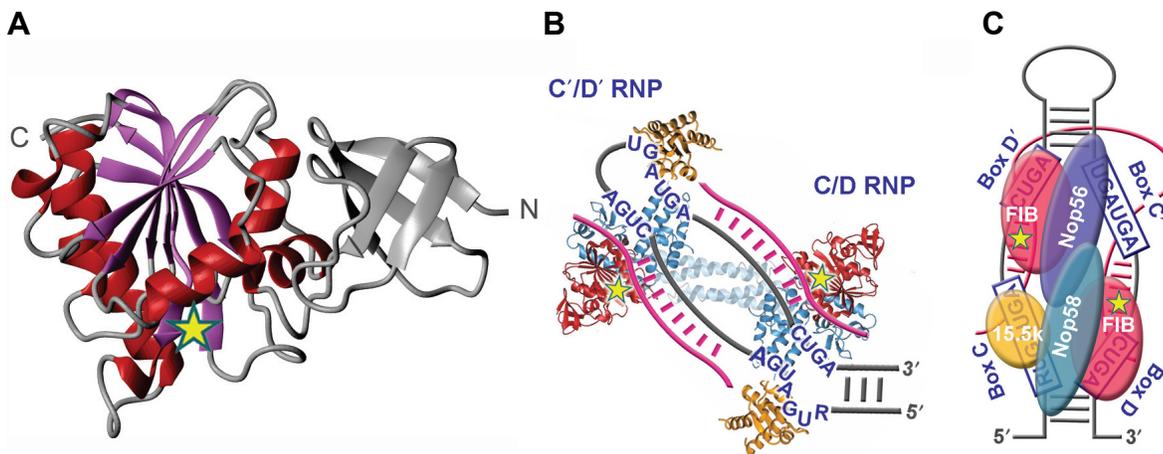


Fig. 8 Estructura de la fibrilarina y de la snoRNP C/D Metiltransferasa. (A) Estructura cristalográfica de la fibrilarina arquea (1FBN). Los principales elementos de la estructura se identifican en colores (Rojo: α -helices; violeta: β -plegadas; gris: regiones variables). La S-adenosilmetionina (AdoMet) se une al sitio conservado (estrella amarilla) de esta enzima. Los detalles de la interacción con los complejos snoRNA-RNA_r no son conocidos. (B) En la estructura cristalográfica del C/D snoRNP de fibrilarina con las proteínas de envoltura se muestran las cajas C/D y C'/D' del snoRNA (azul), que guían la metilación del nucleótido del RNA_r (rosa). La estructura cuaternaria del complejo Fibrilarina-Nop56/Nop58-Fibrilarina, posiciona 2 sitios catalíticos de fibrilarina sobre el RNA_r (estrella amarilla). (C) Estructura pseudo-simétrica propuesta en el ensamblaje de la C/D snoRNP. Aparentemente la proteína 15.5k únicamente se une al snoRNA. Los parálogos Nop56 y Nop58, reconocen los elementos de las cajas C y C' respectivamente, las copias de fibrilarina (Fib)

interactúan con cada caja D y D', consistentemente con las participaciones de los centros catalíticos (Imagen modificada: Uliel et al., 2004).

1.5.1 Fibrilarina en *T. cruzi*

Fibrilarina se encuentra anotada como dos genes en *T. cruzi*, en este caso por ser un organismo diploide estos están represados por dos pares alélicos Esmeraldo (S) y No Esmeraldo (P): TcCLB.510105·50, TcCLB.509715·40, TcCLB.506211·250 y TcCLB.511287·150 . Las características principales se encuentran resumidas en la Tabla 1.

Tabla 1. Características generales de los alelos de fibrilarina en *T. cruzi* (CL Brener).

Información general encontrada en la base de datos de <http://www.genedb.org/> de los alelos de fibrilarina en *T. cruzi* (CL Brener). En la columna "Nombre" se encuentra la nomenclatura asignada en este trabajo para el fácil manejo de los genes.

Nombre	ID	Haplotipo	Localización cromosómica	# de bases	# aa	Peso
TcFib1	TcCLB.509715·40	S	TcChr4-P; 90021 – 90972	951 pb	317 aa	34 kDa
	TcLB.510105·50	P	TcChr4-S; 90148 - 91063	915 pb	305 aa	32 kDa
TcFib2	TcCLB.506211·250	S	TcChr40-P; 467143 - 468019	876 pb	292 aa	30 kDa
	TcCLB.511287·150	P	TcChr40-S; 467414 – 468293	879 pb	293 aa	30 KDa

2. Planteamiento del problema

El estudio del nucléolo es un buen modelo de investigación de la expresión de genes, de la síntesis de RNAr y del procesamientos de los pre-ribosomas (Wei et al, 2003).

El nucléolo es la estructura subcelular más prominente de la célula eucariótica y es el sitio donde suceden algunos de los procesos esenciales, la mayor actividad transcripcional sucede en éste organelo. Del 40 al 80% de la transcripción total de la célula es de los genes ribosomales y esto sucede en los DFC y FC del nucléolo. Además, la modificación y procesamiento del rRNA sucede en los GC los cuales son necesarios para el plegamiento y correcto funcionamiento del ribosoma maduro. Las partículas pre-ribosomales son generadas en esta región (Warner, 1999). Por otra parte, el nucléolo es una estructura dinámica que cambia durante el ciclo celular, ya que en algunas ocasiones se encuentra ensamblado y en otras no, por ejemplo durante la mitosis en células mamíferas el nucléolo se desacopla hasta concluir con la división (Hernas et al., 2015; Wei et al., 2003). Diversos estudios estipulan que la estructuración del nucleólo esta ligada a una actividad transcripcional activa (Sirri et al., 2002; Okuwaki et al., 2002).

Una de las estrategias con mayor recurrencia para la comprensión de los mecanismos que conllevan a la biogénesis ribosomal, los cambios morfológicos y estructurales nucleolares, es por medio del uso de moléculas reporteras como componentes proteicos y secuencias nucleotídicas. Las herramientas utilizadas son principalmente el marcaje con anticuerpos específicos dirigidos o la transfección de células con plásmidos que codifican para las proteínas del organelo fusionadas a etiquetas fácilmente identificables que permiten la visualización de los nucléolos por microscopía (Martin et al., 2007), de ésta manera la evaluación de los efectos de las distintas condiciones o estados celulares se pueden monitorear e interpretar con mayor facilidad. Una de las proteínas con mayor uso para estos propósitos es fibrilarina en diferentes organismos, por ejemplo células de la línea celular HeLA (Barygina et al., 2010), también células de origen vegetal en particular *Arabidopsis thaliana*, *Nicotiana tabbacum* (Barneche et al. 2000; Makimoto et al. 2006), en protozoarios como *Giardia duodenalis* y *Toxoplasma gondii* (Jiménez-García et al., 2008; Milligan-Myhre et al., 2011). Por ello se considera que fibrilarina es un marcador nuclear clásico.

En trabajos previos de nuestro grupo de trabajo se ha reportado que en fase estacionaria de cultivos de epimastigotes de *T. cruzi* existe una disminución del tamaño o ausencia de nucléolo (Nepomuceno-Mejía et al. 2010). Por otro lado, a la fecha en *T. cruzi* no se ha descrito alguno de los componentes proteicos que conforman el nucléolo, por lo que es de gran interés contar con un marcador molecular dentro de la biogénesis de ribosomas y que participe en la conformación nucleolar (Olson y Dundr, 2005).

En el presente trabajo se presenta evidencia de la expresión de dos isoformas de fibrilarina y la relocalización de al menos una de ellas (TcFib2) durante la fase estacionaria de cultivo y en tripomastigotes, los cuales son formas diferenciadas que no se dividen y están desprovistos de nucléolo.

3. Hipótesis

Trypanosoma cruzi alterna entre estadios proliferativos y no proliferativos en su ciclo de vida. El nucléolo es evidente en células eucarióticas con división celular activa. La fibrilarina al ser una proteína funcional y abundante del nucleólo, se encontrará regulada en su cantidad o localización subcelular en *T. cruzi* en diferentes condiciones reproductivas.

4. Objetivos

4.1 Objetivo general

Caracterizar el sistema los dos genes de fibrilarina en *T. cruzi* y evidenciar su expresión transcripcional y proteica.

4.2 Objetivos específicos

1. Caracterizar génicamente las isoformas de fibrilarina y determinar la presencia de sus transcritos en epimastigotes.
2. Estudiar la expresión de las isoformas de fibrilarina a nivel proteico y caracterizar su localización subcelular.
3. Estudiar la expresión de las isoformas en condiciones de proliferación celular y en fase estacionaria de epimastigotes.

5. Material y métodos

5.1 Cultivos de parásitos

Epimastigotes de *T. cruzi* cepa CL Brener (TINF/BR/1963/CL-Brener) fueron cultivados en medios de cultivo LIT (por sus siglas en inglés de *Liver Infusion Tryptone medium*) a una temperatura de 28°C complementado con albúmina de suero bovino (BSA, *Bovine Serum Albumin*) inactivado al 10%, Penicilina 100U/ml, Estreptomina 100 µg/ml y hemina (Camargo, 1974). El cultivo se monitorea mediante cuenta celular en cámara de Neubauer. En las curvas de crecimiento, se inocularon medios a una densidad inicial de 1×10^6 células/mL y contadas en intervalos de 24-48 horas, las células fueron cosechadas durante el crecimiento exponencial del cultivo cuando alcanza una densidad aproximada de $8 - 12 \times 10^6$ células/mL o en fase estacionaria (cuando el crecimiento del cultivo se mantiene entre $90 - 100 \times 10^6$ células/mL durante 72 horas). En fase estacionaria algunos epimastigotes son diferenciados a tripomastigotes debido al estrés nutricional, las formas diferenciadas fueron monitoreadas por microscopía.

5.2. Extracciones de DNA

Los epimastigotes se cosecharon a partir de un cultivo en medio LIT de fase exponencial tardía (30×10^6 cel/ml) con 10^9 células aproximadamente, por centrifugación a 1000 xg durante 10 min a 4°C utilizando un rotor SS-34 Sorvall. Posteriormente las células fueron lavadas en PBS 1x (NaCl 137mM, KCl 2.7mM, Na_2HPO_4 10nM KH_2PO_4 2nM, pH 7.4) y se resuspendieron en buffer de lisis (Tris-HCl 50 mM pH 8.0, NaCl 50mM, EDTA 50mM pH 9.0, Tritón x-100 4%) con proteinasa K, se incubaron a 37°C toda la noche. La extracción de ácidos nucleicos se realizó primero con fenol (pre-equilibrado con Tris-HCl 0.1 M pH 8.0), la segunda extracción fenol:cloroformo 1:1 y finalmente con un volumen de cloroformo. El DNA genómico se precipitó con MgCl_2 y resuspendió en Tris-HCl 10mM pH 7.5, EDTA 0.2mM, finalmente el RNA presente fue digerido con RNAsa pancreática (20 µg/mL) por 1h a 37°C (Medina-Acosta y Cross, 1993).

5.3 Extracción de RNA total

Los parásitos fueron cosechados por centrifugación (1000 x g por 10 minutos). El botón celular fue lavado con PBS 1x frío y cosecho nuevamente. Se agregó 1 mL de Trizol y se homogenizó cada tubo por pipeteo. Después de incubarse a temperatura ambiente por 5 minutos se adicionó 200 μ l de cloroformo. Los tubos se agitaron vigorosamente por 15 segundos y se incubaron a temperatura ambiente por 2 a 3 min. Las muestras se centrifugaron por 15 mins a 12 000 x g en el cuarto frío. Posteriormente se recuperó la fase acuosa y el RNA se precipitó adicionando 500 μ l de isopropanol. Se incubó 10 min a temperatura ambiente y luego se centrifugó en frío a 7500 x g durante 10 min. El sobrenadante se eliminó. El RNA se resuspendió en un volumen apropiado de agua-DEPC (50 – 100 μ L). La cantidad e integridad de RNA se evaluó por espectrofotometría (Nanodrop) y electroforéticamente. Se consideró una extracción de RNA exitosa cuando al teñir el gel con bromuro de etidio (0.5 μ g/ml, en H₂O-DEPC) y colocarlo en el transiluminador UV se observan las 3 especies mayores de RNA ribosomal (18S, 24S α , 24S β) que son muy abundantes y fácilmente visibles (Cevallos AM et al., 2005).

5.4 Construcciones plasmídicas

Diferentes construcciones plasmídicas fueron generadas a partir de amplificaciones de DNA genómico por PCR o RT-PCR para cada TcFib1 y TcFib2 en los alelos S (Esmeraldo), estas regiones fueron clonadas en los vector pGEM-T Easy Vector (Promega), pGEX (GE-Healthcare) y pTEX (Kelly et al., 1992), por procedimientos estándares de ligación, clonación y propagación en bacterias competentes y selección de las mismas por resistencia a antibióticos. La caracterización de los insertos se realizó por medio de extracción de DNA plasmídico y digestión con enzimas de restricción y secuenciación (Las secuencias de estas se obtuvieron con ayuda de la M. Sc. Patricia de la Torre que pertenece al Laboratorio No.7 del Departamento de Inmunología del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM).

La información de los oligonucleótidos utilizados en la amplificación de las regiones de interés, se encuentra resumida en el Anexo I. Las características de los plásmidos generados se resumen en la siguiente Tabla:

Tabla 2. Plásmidos generados para el estudio gélido de fibrilarina.

Plásmido	Características
pGEM-T easy (Promega)	Vector prelinearizado comercial (Promega) que contiene T-3' para la inserción de productos obtenidos por PCR y ligación directa con amplicones con A-5'. Selección de clona por método Azul/Blanco en células <i>E. coli</i> competentes Dh5 α . Inserción flanqueada por sitios de restricción <i>EcoRI</i> , <i>BstZ1</i> y <i>Not1</i> .
pGEM-Sonda1	Fragmento interno del gen TcFib1 del nucleótido 496 a 851 clonado en Vector pGEM-T easy
pGEM-Sonda2	Fragmento interno del gen TcFib2 clonado en Vector pGEM-T easy del nucleótido 228 a 535
pGEX-3X (GE-Healthcare)	Vector comercial compatible con células <i>E. coli</i> competentes BL21. El vector contiene la etiqueta GST (Glutación-S-Transferasa), para la purificación de proteínas recombinantes clonadas en fase en el MCS (Sitio Múltiple de Clonación). Y selección por resistencia a ampicilina.
pGEX-TcFib1	El inserto clonado en pGEX-3X contiene el marco abierto de lectura del gen TcFib1 (890 pb) flanqueado con los sitios de restricción <i>EcoRI</i> .
pGEX-TcFib2	El inserto clonado en pGEX-3X contiene el marco abierto de lectura del gen TcFib2 (890 pb) flanqueado con los sitios de restricción <i>EcoRI</i> .
pTEX	Vector de expresión ectópica en <i>T. cruzi</i> . El vector fue construido a partir de las regiones flanqueantes del gen gGAPDH y contiene el gen neomicina fosfotranferasa como marcador de selección. Kelly et al., 1992
pTEX-EGFP	Vector de pTEX con el marco de lectura de EGFP (720 pb) flanqueado con los sitios de restricción <i>ClaI</i> en 5' y <i>XhoI</i> en 3'.
pTEX-TcFib1-EGFP	Vector de expresión ectópica en <i>T. cruzi</i> . Para expresar la proteína de fusión con EGFP en el extremo carboxilo de TcFib1. Tamaño del inserto completo: 1601 pb.
pTEX-TcFib2-EGFP	Vector de expresión ectópica en <i>T. cruzi</i> . Para expresar la proteína de fusión con EGFP en el extremo carboxilo de TcFib2. Tamaño del inserto completo: 1601 pb.

5.5 Preparación de sondas con marca radioactiva

Las sondas empleadas en estudios de Southern y northern blots de nylon se elaboraron con el kit de marcaje “Amersham. Rediprime II Random Prime Labelling System” (GE Healthcare). Se emplearon 50 ng de DNA por cada sonda, dicho DNA fue desnaturalizado por calor (baño María a temperatura de ebullición de H₂O por 5 min) en 45 µL de buffer TE (10 mM Tris HCl pH 8.0, 1mM EDTA), posteriormente se colocó en hielo por 5 min, el DNA desnaturalizado se adicionó en los respectivos tubos de reacción junto con 5 µL de marca [α -³²P] dCTP (20µCi) y se incubaron a 37°C por 1 hora, la reacción se detuvo al agregarle 5 µL de 0.2 M EDTA y se alcanzó un volumen final de 100µL con TE. La sonda se extrajo de la marca libre al hacerla pasar por una columna de Sephadex G-50. Finalmente se agregó a 10 mL de solución de hibridación (50% Formamida, 4X Denhardts, 0.2% SDS, 120 mM Buffer de fosfatos, SSC 2x, 2mM EDTA pH 8). Antes de su uso la sonda se calentó a temperatura de ebullición de agua por 10 mins y se colocó en hielo por 5 mins.

5.6 Northern blot

Se preparó un gel fundiendo 1 mg de agarosa en 73 mL de agua-DEPC, se dejó enfriar lo suficiente para poder agregar 10 mL de buffer MOPS/EDTA 10x y 16.2 mL de formaldehído 37%, se agitó suavemente para homogenizar y se vació en cámara de electroforesis. Se dejó polimerizar a temperatura ambiente por 1 h, la solución de corrida usado fue MOPS/EDTA 1x. Se cargaron 7 µg de RNA total en cada ensayo. El gel se pre-corrió a 60 V por 3 min y una vez cargadas las muestras se corrieron a 70 V / 4.5 h. Posteriormente el RNA del gel fue transferido a una membrana de nylon (Amersham Hybond-N, GE Healthcare) y fijado mediante radiación UV. A continuación se incubó con solución de hibridación sin sonda, posteriormente hibridada con la sonda radiactiva por 24h a 42°C, posteriormente se lavó 3 veces con solución de lavado (SSC 0.2x , SDS 0.1%), con 3 enjuagues (SSC 0.2x) y finalmente la membrana se expuso en una pantalla autoradiográfica radiográfica y pantalla FX para ser analizadas en el Molecular Imager FX (Bio-Rad). El control de tamaños de los fragmentos hibridados fueron estimados a partir de los marcadores de tamaño de RNA usados (0.1-2kb RNA Ladder y 0.5-10kb Ladder, Invitrogen).

5.7 Herramientas bioinformáticas

Los alineamientos de las secuencias a nivel de nucleótidos y aminoácidos de los alelos de fibrilarina fueron hechos con el software ClustalW disponible en la página: <http://www.ebi.ac.uk/clustalw/> (EBI 2010) y DNAMAN (<https://www.lynnon.com/dnaman.html>).

Los datos estructurales teóricos se analizaron el programa en línea RaproX (<http://raptorx.uchicago.edu>) y software Swiss-PdbViewer (Guex y Peitsch, 1997).

Los algoritmos Blast que se realizaron a las secuencias de todos los plásmidos fueron realizados en la página de NCBI: <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>. Este algoritmo compara la secuencia ingresada (Query) con los genes anotados del genoma de *T. cruzi*. el resultado indica el nombre del gen con el que mayor similitud existe (Sbjct), también representa el alineamiento y cambios puntuales de nucleótidos de las dos secuencias (Query y Sbjct).

Los mapas generados para representar las clonas, regiones génicas y plásmidos fueron generados en el programa SeqBuilder de DNASTAR (<https://www.dnastar.com>).

5.8 Western blot

Los extractos proteicos de *T. cruzi* se obtuvieron a partir de la cosecha de parásitos por centrifugación (1000 x g, 10 mins a temperatura ambiente), lavados por PBS (NaCl 137nM, KCl 2.7mM, Na₂HPO₄ 10nM KH₂PO₄ 2nM, pH 7.4) y cosechados nuevamente. El botón celular se resuspendió en solución de proteínas - Laemmli 2x a una concentración de 0.5 x10⁶ células/μL y se calentó por 5 minutos a 94°C. Fueron cargados 10 μL de extracto de proteína por carril, tanto con cultivos de fase exponencial y estacionaria. Los extractos fueron separados electroforéticamente por SDS-PAGE. La concentración de geles fue de 10% con geles concertadores en la parte superior de 4%. Los geles se transfirieron a membranas de PVDF en cámara húmeda por 1 hora a 350mA a 4°C en cuarto frío. Las soluciones y condiciones fueron las recomendadas por el fabricante (Bio-Rad). Todas las transferencias fueron verificadas mediante tinción de Ponceau (Sigma).

El bloqueo se realizó con leche descremada al 5% en Tritón X-100 al 0.05% en PBS (PBS-T) a 4°C por una noche o 2 horas a temperatura ambiente (ambas condiciones funcionaron de igual manera). El anticuerpo primero fue adicionado en solución PBS-T con leche descremada al 2%, la incubación se realizó por 1 h a temperatura ambiente. 3 lavados fueron realizados con PBS-T por 30 min. El segundo anticuerpo anti IgG de ratón acoplado a peroxidasa de rábano (ImmunoPure, Pierce), se incubó por 1 h a temperatura ambiente a una dilución 1:30000 v/v y fue lavado por 3 veces con PBS-T por 3 min. La señal quimioluminiscente se detectó utilizando SuperSignal West Pico utilizando las recomendaciones del fabricante (Pierce) y exponiendo en placas autoradiográficas.

5.9 Inmunodetección por microscopía de fluorescencia

Las células de *T. cruzi* se cosecharon por centrifugación (1000 x g, 10 min a temperatura ambiente) y lavados con un volumen de PBS, el botón celular fue resuspendido en paraformaldehído al 3.7% e incubado por 10 mins a 4°C para su fijado. Las células se adhirieron a portaobjetos sialinizados por 10 mins (Sigma), las células no adheridas fueron lavadas con PBS. La permeabilización de membrana se realizó con Triton X-100 al 0.5% por 5 min y las preparaciones fueron bloqueadas con BSA al 5% por 2 h a temperatura ambiente. La incubación con anticuerpo primario fue a una dilución de 1:400 en PBS, BSA al 1% a temperatura ambiente. El segundo anticuerpo utilizado fue un anti-ratón IgG (H + L) marcado con Alexa Flour 488 (dilución de 1:400) e incubados por 1 h a temperatura ambiente en oscuridad. Entre cada incubación con anticuerpo se realizaron lavados con PBS. Los controles negativos, con los sueros pre-inmunes de los ratones utilizados en la inmunización fueron examinados de la misma manera.

5.10 Producción de sueros anti-TcFib1 y anti-TcFib2

Se obtuvieron ambas proteínas recombinantes GST-TcFib1 y GST-TcFib2 por inducción de IPTG a bacterias transformadas con los plásmidos pGEX con ambas fibrilarinas. La purificación se realizó por cromatografía de afinidad con una matriz de glutatión acoplada a sefarosa (Glutathione Sepharose High Performance, GE Healthcare) siguiendo las

instrucciones del fabricante. 10µg de cada proteínas fueron emulsificados con adyuvante completo de Freund y administradas posteriormente a ratones de la cepa BALB/c (200 µL por ratón). Dos refuerzos fueron administrados, a las 9 y 7 semanas siguiendo el programa de inmunización recomendado por *Current Protocols in Molecular Biology* (Cooper y Paterson, 2008). 15 días después de la última inmunización la sangre fue colectada por medio de punción cardiaca, el suero obtenido fue alicuotado y almacenado a -70°C hasta su uso.

5.11 Transfecciones

Los epimastigotes transfectados con los plásmidos pTEX, pTEX-EGFP, pTEX-TcFib1-EGFP y pTEX-TcFib2-EGFP fueron generados de la siguiente manera: se cosecharon las células por centrifugación (1000 x g, 10 min a temperatura ambiente) y lavados con un volumen de medio LIT frío y fueron cosechadas nuevamente. El botón celular fue resuspendido en medio LIT frío y se transfirieron 20 a 50 x10⁶ células en 350 µL a celdas de electroporación de 2 mm marca BTX (01-000195-1). Se adicionaron 50 µg cada uno de los plásmidos a la suspensión celular para alcanzar un volumen final de 400 µL. A cada celda se dio un pulso de 360 V, 1500 µF, 13 ohms, 12 ms. Se mantuvieron las muestras a temperatura ambiente por 5 min y fueron transferidos a cajas de cultivo con 10 mL de medio LIT complementado para su recuperación. Después de incubarlos por 24 h a 28°C se adicionó el antibiótico de selección G418 a una concentración final de 300 µg/mL. La selección de los parásitos transfectados se realizó por 7 días y se hizo una dilución en medio LIT complementado fresco en una proporción de 1:5. Después de incubar por ~20 días los parásitos no resistentes dejan de dividirse y se observan como células redondas sin flagelo. Las células resistentes fueron evaluadas por western blot y por microscopía de fluorescencia para identificar la localización de las proteínas de fibrilarina quiméricas con EGFP.

6. Resultados

6.1 Análisis de los genes que codifican para fibrilarina en *T. cruzi*

Los dos genes de fibrilarina en *T. cruzi* se encuentran anotados en la base de datos del genoma híbrido diploide (TriTrypDB). El primer gen, el haplotipo Esmeraldo-Like tiene la clave de acceso TcCLB.510105.50, y el haplotipo Non Esmeraldo-like tiene la clave de acceso TcCLB.509715.40; estos alelos fueron designados como TcFib1s y TcFib1p. El segundo gen esta representado por los haplotipos Esmeraldo-like con la clave de acceso TcCLB.506211.250 y Non Esmeraldo-like, con la clave de acceso: TcCLB.511287.150; subsecuentemente nombrados como TcFib2s y TcFib2p, respectivamente (Aslett et al. 2010; El-Sayed et al., 2005).

En un análisis *in silico*, se examinaron las secuencias proteicas deducidas de cada alelo. El servidor utilizado fue Pfam (*Protein Families Database* por su descripción en ingles; Finn et al., 2014), el cual busca a que familia de proteínas pertenece la proteína a identificar su homología con los miembro de esa familia. El motivo reconocido por el programa para todos los alelos fue el designado como 01269 que corresponde a la familia de fibrilarina.

A partir de un alineamiento con el algoritmo de Clustal Omega de la secuencia deducida de aminoácidos de cada alelo de fibrilarina (Fig. 9), se observó una identidad casi completa entre los haplotipos del mismo gen y una conservación modesta al comparar los genes (62-63% de residuos idénticos). En la Tabla 3 se muestran las principales características de cada uno de los alelos depositados en TriTryp, la identidad y similitud entre las secuencias de proteínas:

Tabla 3: Resumen de las principales características de los genes de fibrilarina de *T. cruzi*. Los datos depositados en la tabla muestran la clave de acceso, haplotipo de cada gen, descripción conforme se encuentra depositado en la base de datos, el nombre arbitrario que se le asignó durante la realización del proyecto. El número de aminoácidos, los dominios metiltransferasa (Metase) y región rica en glicina y arginina (GAR), reconocidos por *Pfam* y su nivel de identidad / similitud.

Clave de acceso	Haplotipo	Descripción	Nombre en este trabajo	Aminoácidos	Región MeTase**	Región GAR*	Identidad / Similitud	
TcCLB. 510105.50	<i>Esmeraldo</i> (S)	fibrilarina putativa	TcFib1s	304 [291]*	231	66 [53]*	99% / 100%	62-63% / 72%
TcCLB. 509715.40	<i>No - Esmeraldo</i> (P)	fibrilarina putativa	TcFib1p	316 [291]*	231	78 [53]*		
TcCLB. 506211.250	<i>Esmeraldo</i> (S)	fibrilarina putativa	TcFib2s	292	229	59	96% / 96%	
TcCLB. 511287.150	<i>No - Esmeraldo</i> (P)	fibrilarina putativa	TcFib2p	291	229	58		

*El número inicial representa el tamaño tomando en cuenta la región completa depositada en la base de datos de *T. cruzi* CL Brener. El número que se encuentra dentro de los corchetes indica el tamaño demostrado experimentalmente y que es descrito en este trabajo.

**Región deducida a partir del programa *Pfam*.

La proteínas de fibrilarina son conservadas entre las especies; sin embargo, suelen diferir en su secuencia primaria, principalmente en la región rica en glicina y arginina como se observa en el alineamiento de las fibrilarinas de *T. cruzi* (Fig. 9). Por otra parte en las dos fibrilarinas de *T. cruzi* se logran identificar residuos y motivos funcionalmente importantes, así como motivos conservados peculiares reportados en fibrilarinas de otras especies. En el

alineamiento de la figura 9 se pueden distinguir la región amino terminal con la región GAR y el dominio metiltransferasa (MeTase) en el extremo carboxilo terminal el cual inicia a partir del residuo V61 para TcFib1 y Q62 para TcFib2. Dentro del dominio MeTase se identifican los residuos conservados: Y142, G144, E168, F169, D193, A194, V195 y Q197; estos residuos están involucrados en la estabilización del cofactor SAM en *Aeropyrum pernix* (de Silva et al., 2012). En una de las fibrilarinas de *Arabidopsis thaliana* se reconocen 2 motivos de reconocimiento de RNA (RRM) y un motivo integrado por ocho residuos los cuales interactúan con distintas especies de RNA (Rakitina et al. 2011), estos motivos se identifican en el alineamiento de las dos fibrilarinas de *T. cruzi*, en las regiones que comprende entre K120 y G161 (para el primer RRM o RRM1), también de V208 al K264 (para RRM2), los ocho residuos se localiza entre los aminoácidos G162 a F168. Por otra parte, el residuo de aspartato en la posición 214 del alineamiento, se le ha atribuido una función central en reacción catalítica de las fibrilarinas y es ampliamente conservado en las especies (Reichow et al., 2007). Existen cuatro motivos que se encuentran representadas en la fibrilarina de *S. cerevisiae* (Nop1p), en el alineamiento los identificamos en las posiciones V140 a G148; V164 a E168; (M/L)207 a F212; F231 a I240 (Fig. 9; Neiwmerzcka y Clarke, 1999).

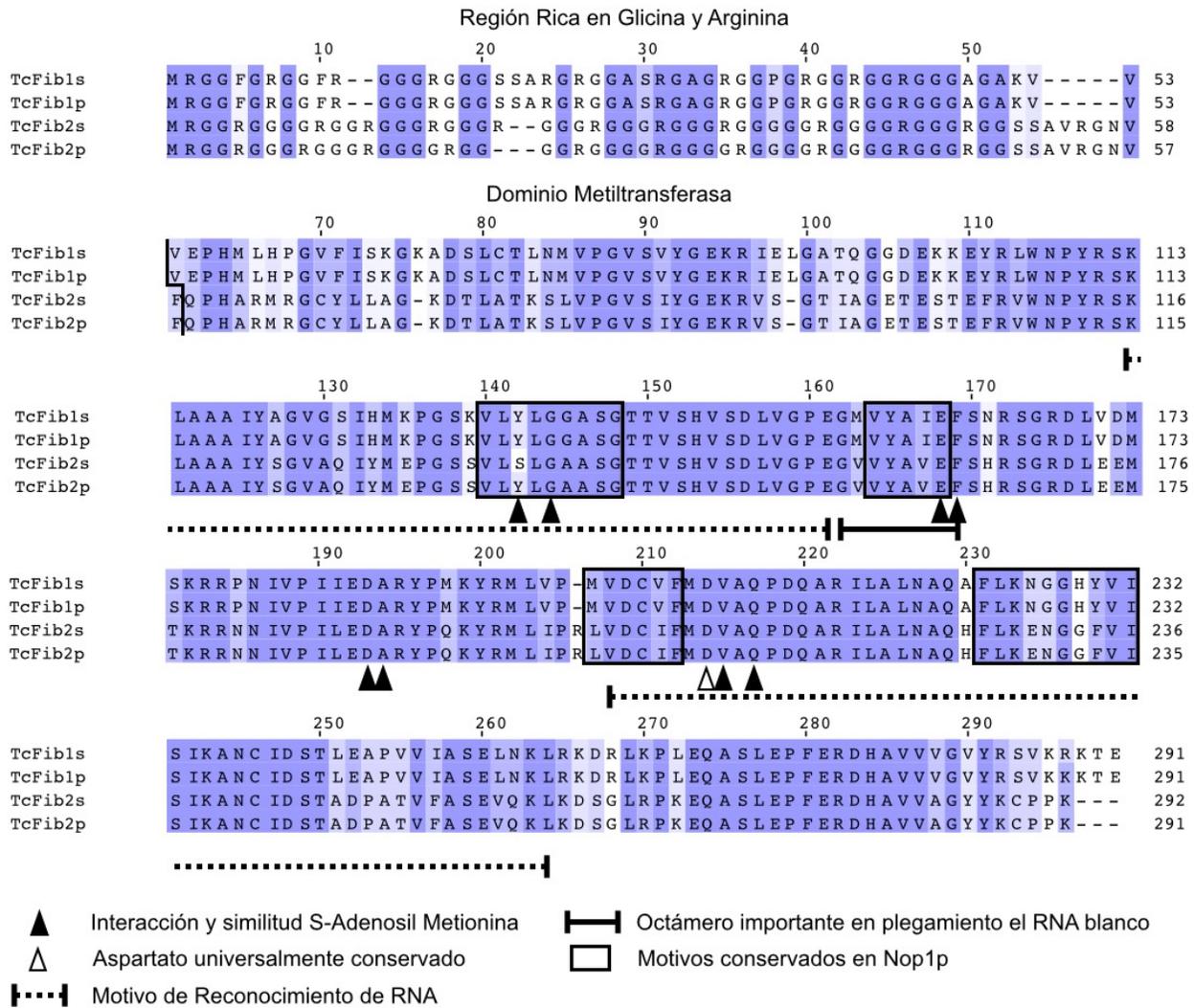


Fig. 9. Alineamiento de las secuencias proteicas deducidas de fibrilarina en *T. cruzi*. Los residuos idénticos están resaltados en azul oscuro, los residuos en azul claro corresponden a aminoácidos conservados. Con una línea continua negra en las posiciones 60 y 61 indica el inicio del dominio MeTase. Los residuos que mantienen una interacción con el cofactor S-Adenosil meteonina son indicados con un triángulo negro. El residuo de aparato universalmente conservado entre las fibrilarinas de diferentes especies se indica con un triángulo vacío. Los motivos de reconocimiento a RNA están indicados con una línea puntuada acotada. El octámero que tiene una actividad central en el plegamiento al RNA blanco se indica con una línea continua acotada. Los motivos conservados en el homólogo de fibrilarina de levadura están dentro de cuatro cuadros.

Las dos secuencias de fibrilarina se sometieron a un modelado por homología utilizado el servidor en internet RaptorX (raptorx.uchicago.edu). El plegamiento obtenido para las dos,

fibrilarinas es similar a la estructura obtenida en la fibrilarina humana (Fig. 10; HsFib, Numero de acceso en la base de datos PDB: 1IPX).

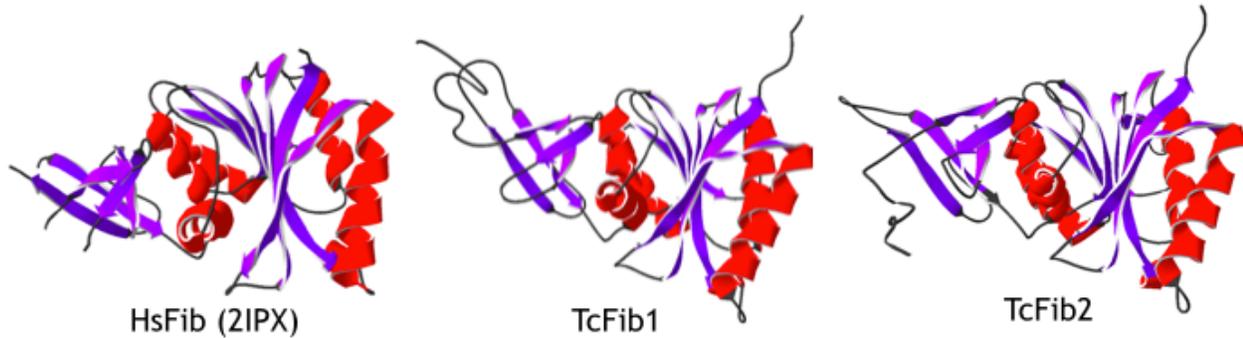


Fig. 10. Modelado por homología (Homology modeling) de las fibrilarinas de *T. cruzi*. El plegamiento teórico de TcFib1 y TcFib2 es similar al obtenido en la estructura presentada por la fibrilarina humana (HsFib, número de acceso PDB: 2IPX), el cual es característico de las proteínas de la misma familia. Las estructuras secundarias del dominio metiltransferasa se encuentran identificadas en morado (hebras β) y rojo (helices α). La edición de las estructuras se realizó en el software Swiss-PdbViewer (Guex y Peitsch, 1997).

6.2 Expresión de ambos genes de fibrilarina en *T. cruzi*

Para determinar si los genes se expresan, se diseñó un ensayo de northern blot con sondas capaces de reconocer de manera específica los transcritos de cada gen (TcFib1 y TcFib2).

Las sondas se obtuvieron a partir de la amplificación de regiones internas particulares para cada uno de los genes por medio de PCR y posteriormente clonados en el vector pGEM-T Easy (Promega). Los productos de amplificación obtenidos fueron de 356 pb (para TcFib1) y de 307 pb (para TcFib2). Para saber si estas sondas son específicas en el reconocimiento de su gen blanco, se realizó el estudio de mapas de restricción genómicos con diferentes endonucleasas, posteriormente e realizó un ensayo de Southern blot con DNA genómico y las señales de hibridación de cada gen fue comparable al mapa de restricción teórico (Fig. 11).

Las enzimas de restricción utilizadas para digerir el DNA genómico no cortan la secuencia del alelo donde la sonda hibrida, y se consideró que los fragmentos de DNA resultantes fueran de diferente tamaño para su fácil distinción. Las enzimas *Bgl*I *Eco*RI y *Hind*III cubrían los aspectos requeridos para el análisis. En el mapa de restricción en la Fig. 11A se muestran los tamaños esperados donde obtendríamos señal con las sondas. Después de realizar el ensayo de Southern blot con DNA genómico de epimastigotes digerido con las enzimas *Bgl*I *Eco*RI y *Hind*III, se observó un patrón de señales de hibridación que corresponden al mapa teórico (Fig. 11B), además de ser excluyentes entre sí, es decir la Sonda 1 dirigida al gen TcFib1 no hibridó con los genes de TcFib2, a su vez la Sonda 2 dirigida para el gen TcFib2 no hibridó con el gen TcFib1, por lo que se puede decir que el reconocimiento es específico para cada uno de los genes.

Una vez comprobada la especificidad de las Sonda1 y Sonda2 se realizó el ensayo de northern blot a partir de RNA total extraído de epimastigotes (Fig. 11C). la señal que se obtuvo en este ensayo corresponde a un transcrito de ~1.3 kb para cada uno de los genes. Este tamaño es suficiente para contener el RNAm maduro de ambos genes de fibrilarina, es decir, con el segmento de *Spliced Leader* y cola de poli(A).

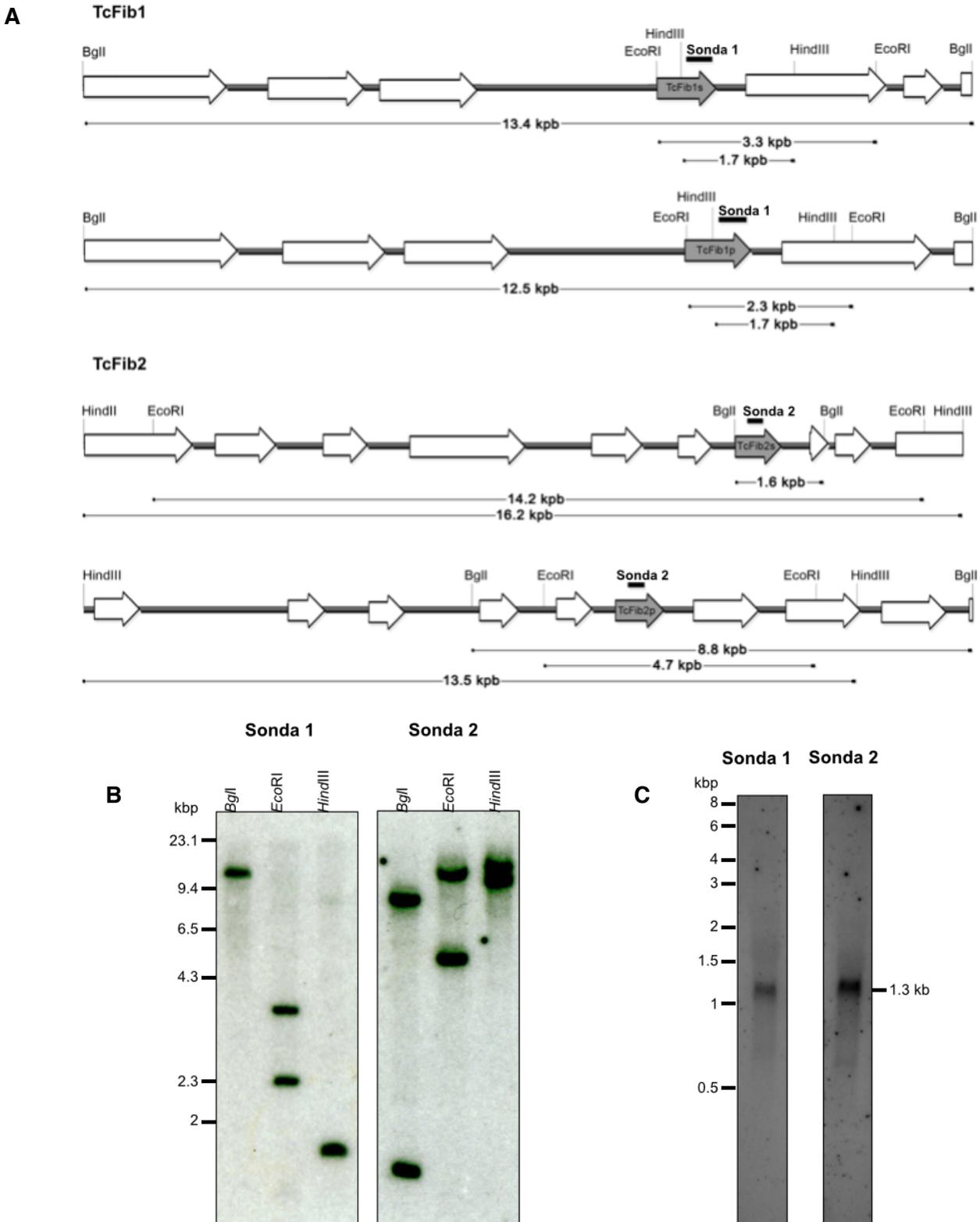


Fig. 11. Mapa de restricción teórico y ensayos de hibridación Southern blot y northern blot. (A) Mapa de restricción teórico con las endonucleasas *BglI*, *HindIII* y *EcoRI*, sobre la secuencia anotada del genoma de *T. cruzi*. Se observan los tamaños de los fragmentos resultantes de la

digestión enzimática. (B) Ensayo de Southern blot con la Sonda1 y Sonda2, el ensayo se realizó por separado en dos filtros con en los cuales fue transferido el DNA genómico digerido con cada enzima. (C) Ensayo de northern blot con las sondas en la hibridación se utilizó RNA total de epimastigotes, el tamaño de transcrito para ambos genes es de ~1.3 kb.

6.3 Mapeo del sitio de inicio de la traducción en TcFib1

Una característica interesante es el distinto tamaño entre las dos isoformas del gen TcFib1 (Fig. 12A), la extensión anotada es de 13 y 25 aminoácidos para los alelos TcFib1s y TcFib1p respectivamente. Al realizar un análisis de la secuencia encontramos que existen tres sitios posibles para que se lleve acabo el *Trans-Splicing* del RNA antes de madurar (Fig.12B).

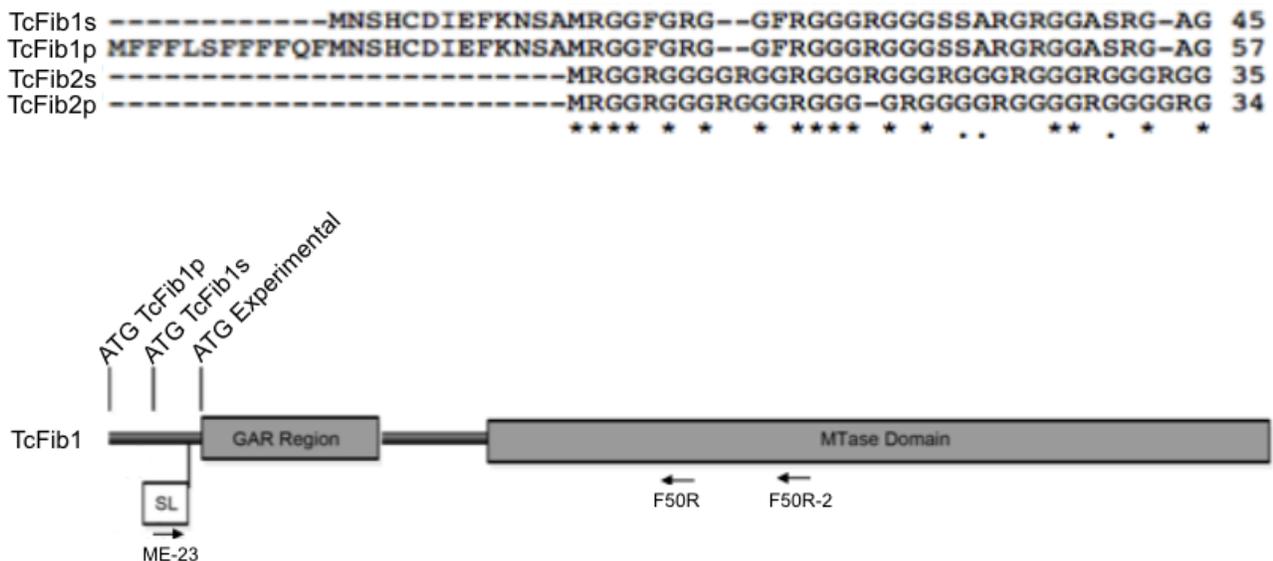


Fig. 12 Alineamiento de las isoformas de fibrilarina y probables inicios de traducción.

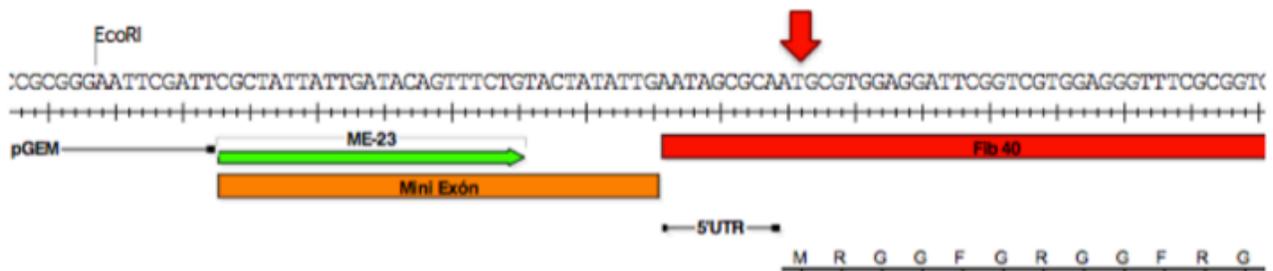
(A) Alineamiento del inicio de la secuencia peptídica de cada alelo, se observa una elongación en los alelos correspondientes a TcFib1. (B) Mapa de los sitios de inicio de traducción, en el mapa se marcan los sitios que fueron usados en el diseño de primers para RT-PCR, el oligonucleótido en sentido esta alineado al fragmento de *Spliced Leader* y el oligonucleótido reverso que se encuentra más próximo al extremo 3' del gen fue utilizado para generar la primera cadena de cDNA y el segundo oligonucleótido reverso para realizar la PCR.

La estrategia para determinar cual es el ATG inicial de traducción se basó en evaluar el sitio que es usado para el proceso de *trans-splicing* en la región 5' UTR del gen. Se realizó una

reacción de RT-PCR, en la que primero utilizamos un oligonucleótido reverso (Oligonucleótido F50R-2) que se alinea dentro de un marco abierto de lectura específico de TcFib1 aproximadamente a 300 nucleótidos del ATG inicial, este oligonucleótido se utilizó para sintetizar el cDNA. El siguiente paso fue realizar un PCR con un oligonucleótido en sentido que se ancla dentro del *Spliced Leader* o Mini Exón (Oligonucleótido ME-23) y en una reacción anidada con un oligonucleótido que se ancla aproximadamente a ~250 nucleótidos del ATG inicial (Oligonucleótido F50R). Después de realizar la reacción, los amplicones fueron purificados y clonados en el vector pGEM-T easy, posteriormente fueron secuenciados (Fig. 13A).

Las 6 clonas identificadas con un ATG en fase fueron analizadas, el codón se encontraba en fase, la metionina resultante también se coincide con el gen TcFib2 en el alineamiento de la secuencia peptídica (Fig.13B). Este resultado indica que el codón de inicio para la traducción de la región codifican del gen TcFib1 se encuentra rio abajo del anotado en el genoma y después del proceso de *trans-splicing* el 5'UTR es de 9 pb antes del ATG inicial.

A



B

Clona	-----MRGGFGRG--GFRGGGRGGGSSARGRGGASRG-AG	32
TcFib1s	-----MNSHCDIEFKNSAMRGGFGRG--GFRGGGRGGGSSARGRGGASRG-AG	45
TcFib1p	MFFFLSFFFFQFMNSHCDIEFKNSAMRGGFGRG--GFRGGGRGGGSSARGRGGASRG-AG	57
TcFib2s	-----MRGGRGGGGRRGGRRGGRRGGRRGGRRGGRRGGRRGG	35
TcFib2p	-----MRGGRGGGGRRGGRRGG--GRGGGRGGGGRRGGGGRRG	34
	***** * * * * * * * * * * * * * * * * * *	

Fig. 13. Mapeo de sitio de inicio de traducción de TcFib1. (A) En el mapa se observa un fragmento del extremo 5' del producto de RT-PCR, en el cual se observa la secuencia del Mini-Exón (bloque naranja, la flecha indica el oligo que alinea en el Mini-Exón), el gen de TcFib1 anotado (bloque rojo) y el ATG encontrado experimentalmente (flecha roja), debajo del mapa se encuentra la secuencia peptídica utilizando como inicio de marco de lectura el ATG mapeado. (B) Alineamiento de

la secuencia de aminoácidos del extremo amino de las isoterms de TcFib1, TcFib2 y la secuencia mareada experimentalmente, se observa que la metionina inicial coincide con las isoformas.

Con el fin de confirmar los resultados obtenidos como segunda estrategia se realizó una búsqueda dentro de una biblioteca de cDNA clonada en el fago λ ZAP (la biblioteca fue obtenida previo a este ensayo en el laboratorio) mediante ensayo de hibridación con la sonda de fibrilarina Sonda 1 (Fig. 11A), posteriormente de las poblaciones de fagos se realizó un PCR semianidado utilizando los mismos oligonucleótidos que se anclan dentro de la región de fibrilarina y en el Mini-Exón, los amplicones obtenidos fueron clonados en el vector pGEM-T easy, posteriormente se secuenciaron 5 clonas con insertos. Los resultados fueron idénticos a los obtenidos por la metodología anterior, de esta manera se corroboró la secuencia de la isoforma TcFib1.

6.4 Expresión pGEX-TcFib1 y pGEX-TcFib2

Una vez conocido el marco abierto de lectura del TcFib1 y TcFib2 se diseñaron oligonucleótidos para poder amplificar el marco abierto de lectura de los genes por PCR, el producto fue subclonado en un primer paso en el vector pGEM-T Easy y posteriormente en el vector de expresión pGEX-3X, los oligonucleótidos mantuvieron el marco de lectura con el sitio de restricción *EcoRI*. La secuencia resultante se mantuvo en fase y con el marco de lectura con la proteína glutatión S-transferasa (GST) al extremo 5' que se encuentra dentro del vector y es utilizada en la purificación de la proteína recombinante al ser expresada en *E. coli* JM109 competentes.

Debido a que ambos extremos del gen fueron flanqueados por el sitio *EcoRI*, fue necesario caracterizar la dirección del inserto en las clonas mediante una PCR con oligonucleótidos dirigidos a la región de GST con dirección en sentido (pGEX-F) y el reverso sobre el gen de fibrilarina en contra sentido (Rev). Las clonas que se encontraban en sentido fueron secuenciadas para observar la conservación de fase y secuencia del gen (Fig. 14).

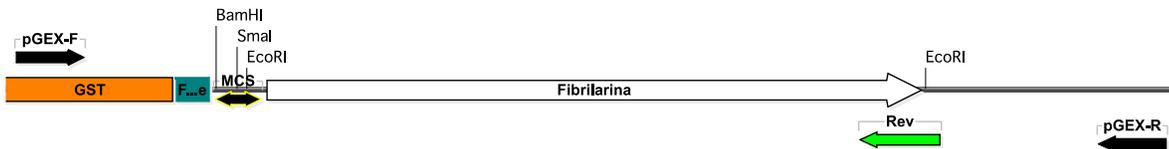


Fig. 14 Mapa de las clonas de pGEX con los insertos de fibrilarina. Se muestran los oligonucleótidos utilizados en la caracterización de los insertos dentro del plásmido obtenido. El análisis de la secuencia no reveló cambios de bases, por lo que se transformaron células BL21 competentes con cada una de las construcciones para cada isoforma TcFib1 y TcFib2. Posteriormente se realizaron los ensayos de expresión de las isoformas recombinantes con inducción con IPTG.

Las clonas con cada isoforma TcFib1 y TcFib2 en fusión con GST fueron cultivadas por una noche a 37°C, después se diluyeron 1:20 en medio fresco, cuando el crecimiento de los cultivos alcanzó una densidad óptica a 600nm (DO₆₀₀) de 0.6, se indujo la expresión con IPTG a una concentración final de 1mM y se incubaron por dos horas a 37°C, finalmente se realizó un ensayo SDS-PAGE para observar la proteína total.

Las bandas observadas en el gel que aparecieron después de la inducción correspondían en peso a las esperadas tanto para las proteínas de fusión como el control de GST (GST-Fib50: 57.8 kDa; GST-Fib250: 57.6 kDa; GST: 28.1 kDa). La detección de la proteína recombinante se realizó mediante un ensayo de inmunorreplicación tipo western blot con el uso de un anticuerpo policlonal comercial que reconoce la proteína GST fusionada como etiqueta de la proteína recombinante de ambas fibrilarinas. El resultado de los ensayos muestran que la proteína que se expresa al adicionar IPTG contiene la etiqueta GST y por su tamaño coincide con las proteínas recombinantes esperadas (Fig. 15).

Con las versiones recombinantes se inmunizaron 3 ratones con 3 dosis de 10 µg en intervalos de 7 semanas con la proteína GST-TcFib1 y 7 ratones para la GST-TcFib2 (Cooper y Paterson, 2008).

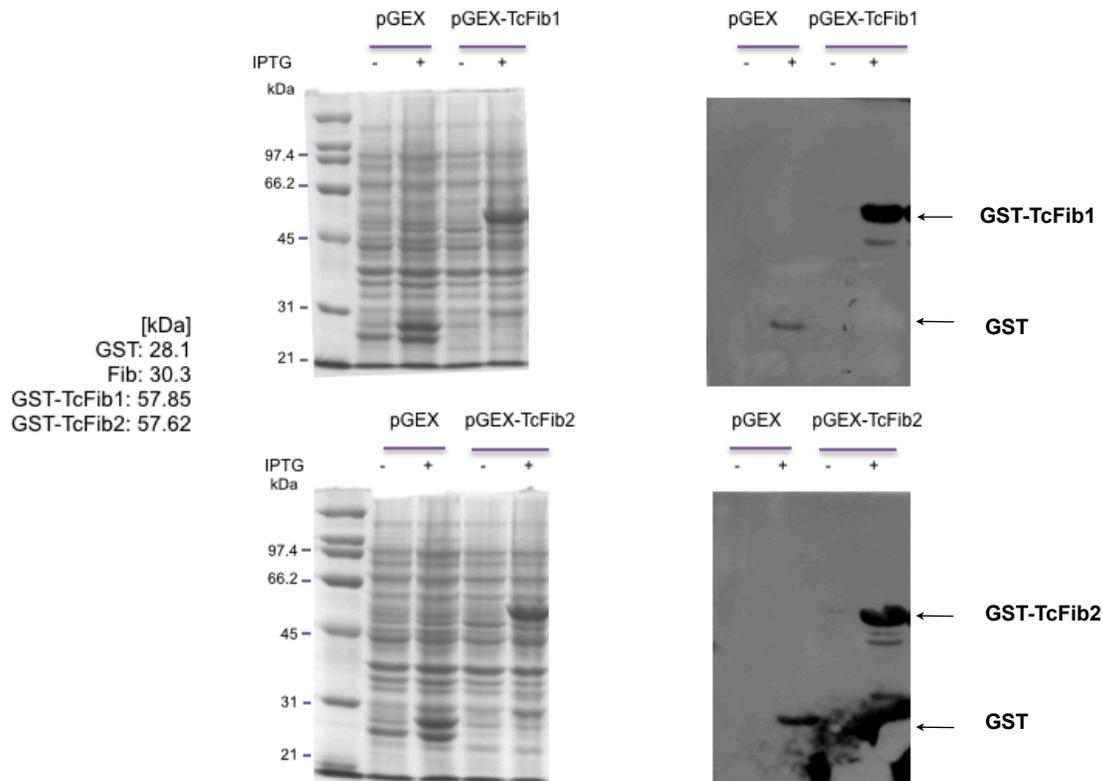


Fig 15. Ensayos de inducción de la proteína de fusión e inmunorréplica tipo western blot. Las clonas que contienen el plásmido pGEX-TcFib1 y pGEX-TcFib2 se indujeron con IPTG 1mM, se incluye una clona con el vector pGEX vacío como control. Para evidenciar la inducción por IPTG se utilizaron los vectores sin adicionar el inductor. En un ensayo separado se corrió el gel y se transfirió a membrana de nitrocelulosa para realizar ensayo de inmunorréplica tipo western blot con un anticuerpo comercial que reconoce a la etiqueta GST. Las clonas que se siguieron utilizando en los ensayos posteriores se marcan con una flecha.

6.5 Fibrilarina se expresa como proteína en epimastigotes

Las proteínas totales extraídas de epimastigotes en fase logarítmica fueron corridas electroforéticamente en geles de acrilamida y transferidas a membrana de nitrocelulosa, por medio de ensayos de inmunorreplca tipo western blot, se identificó la proteína de fibrilarina endógena. Los antisueros utilizados fueron obtenidos por medio de la inmunización de versiones recombinantes en ratones y los sueros que generaron una señal definida y con un tamaño similar al esperado para fibrilarina (~30kDa) fueron seleccionados en los

experimentos posteriores. Los sueros seleccionados fueron el 4 para la identificación de TcFib1 y los sueros 8 y 10 para identificar a TcFib2 (Fig. 16).

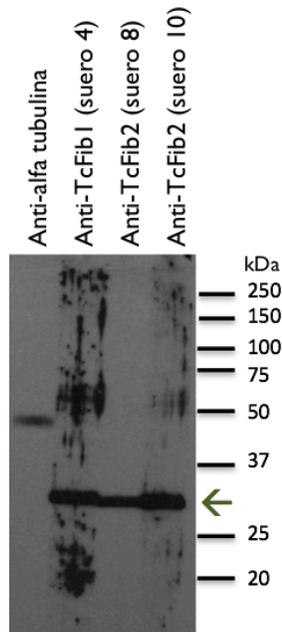


Fig. 16. Reconocimiento de fibrilarina endógena de *T. cruzi* por los anticuerpos policlonales. Lisados de epimastigotes fueron corridos electroforéticamente y transferidos a membrana de nitrocelulosa se cortó la membrana respetando cada carril de corrimiento electroforético, se probaron los diferentes sueros obtenidos por inmunización de ratones en ensayos de western blot independientemente en cada tira y finalmente expuestos en placa autoradiografica para comparar las señales y tamaños. Los sueros utilizados fueron el 4, 8 y 10. Como control positivo se utilizó un anticuerpo comercial anti-alfa tubulina (carril T).

Por ensayos cruzados se observó que el anti-TcFib1 reconoce a TcFib2 y este reconocimiento puede deberse a la alta identidad y similitud (62-63% y 72% respectivamente) que tienen las dos fibrilarinas en su secuencia de aminoácidos.

Para analizar las diferencias potenciales en la expresión de fibrilarina, se obtuvieron extractos de proteínas totales de epimastigotes de fase exponencial y de fase estacionaria. Los extractos fueron analizados por inmunoréplica tipo western blot (Fig. 17). Los resultados obtenidos presumen una abundancia similar de fibrilarina (por lo menos en TcFib2) en ambas condiciones de proliferación.

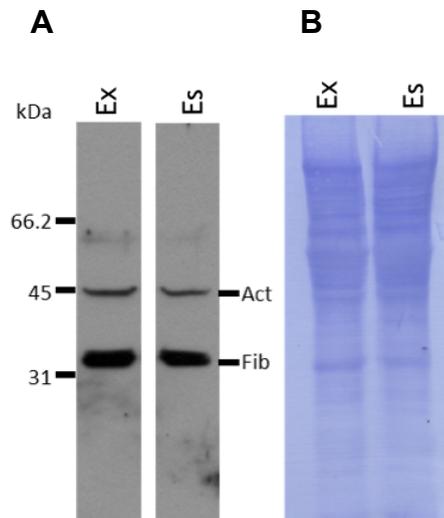


Fig 17. Western blot comparativo de proteínas totales de epimastigotes de fase exponencial y estacionaria. Ensayos con los sueros de actina, fibrilarina y actina como control de carga. **(A)** Inmunoréplica tipo western blot en donde se observa una abundancia comparable de TcFib en fase exponencial (Ex) y fase estacionaria (Es). **(B)** Membrana teñida con reactivo aminoblack para evidenciar la misma cantidad de proteína cargado en el gel y la transferencia completa de los extracots de las dos fases evaluadas.

6.6 Relocalización de fibrilarina en epimastigotes de fase estacionaria

Por ensayos previos se sabe que la morfología y tamaño del nucléolo en epimastigotes de fase estacionaria cambia a comparación de la fase exponencial de $\sim 0.45\mu\text{m}^2$ a $\sim 0.2\mu\text{m}^2$, el Componente Fibrilar Denso y el Componente Granular se reducen (Nepomuceno-Mejía *et al.* 2010), dichos resultados sugieren que los elementos involucrados en la generación de ribosomas sufre cambios. Para determinar la localización subcelular se realizaron ensayos de inmunofluorescencia en diferentes poblaciones de parásitos. En los ensayos control con los sueros pre-inmunes no se obtuvo señal, lo que descarta el reconocimiento de epítopes estructurales el parásito.

La señal de fibrilarina en fase exponencial es nucleolar (el nucléolo se caracteriza por tener poco material genético, debido a esto en tinciones con DAPI se observa ausencia de color característico), sin embargo, en fase estacionaria se observa una distribución granular citoplasmática, solo pocos parásitos en fase estacionaria aún conservan señal de fibrilarina en el nucléolo en una relación aproximada de 4:1 (Fig. 18).

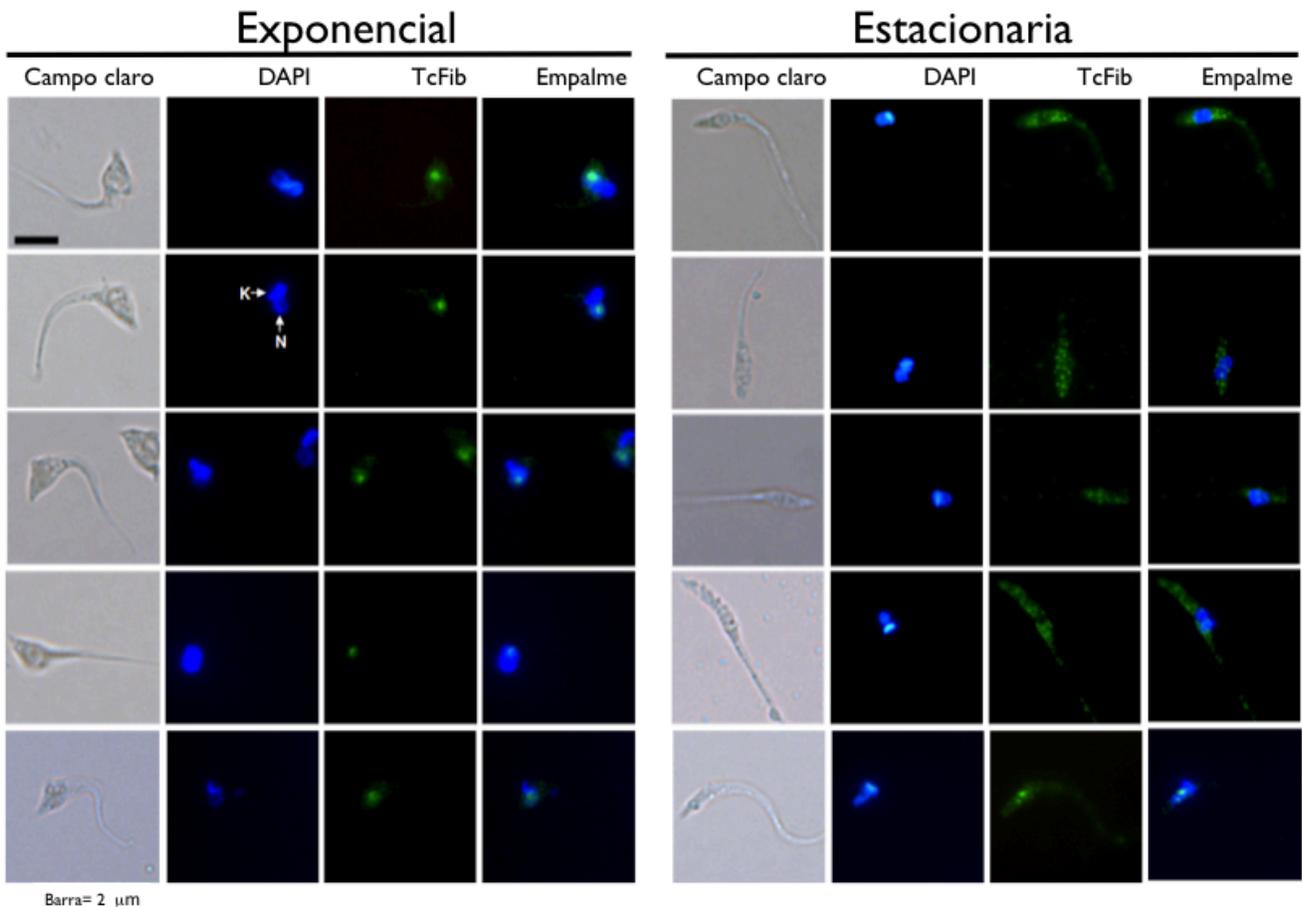


Fig. 18. Ensayo de inmunofluorescencia en epimastigotes de fase exponencial y estacionaria. La señal de fluorescencia de fibrilarina fue obtenida por medio de un ensayo de inmunofluorescencia utilizando el suero anti-TcFib y como segundo anticuerpo un anti-ratón acoplado con Alexa Fluor 488, las fases estacionarias y exponenciales de epimastigotes fueron evaluadas, en fase exponencial la fibrilarina co-localiza en el nucléolo de los parásitos, sin embargo en fase estacionaria la localización nucleolar se pierde en la mayoría de los parásitos (proporción 4:1), la distribución se observa es granular citoplasmática. Las flechas blancas indican el núcleo (N) y cinetoplasto (K) en la tinción con DAPI.

Debido al estrés nutricional que enfrentan los epimastigotes en fase estacionaria, algunos logran diferenciarse. Esto lo evidencia la localización de cinetoplasto que en tripomastigotes se encuentran en la parte posterior de la célula, además el núcleo sufre una modificación siendo este más alargado en comparación con epimastigotes. En dichos parásitos la localización de fibrilarina se observó en el citoplasma con una distribución granular (Fig.19).

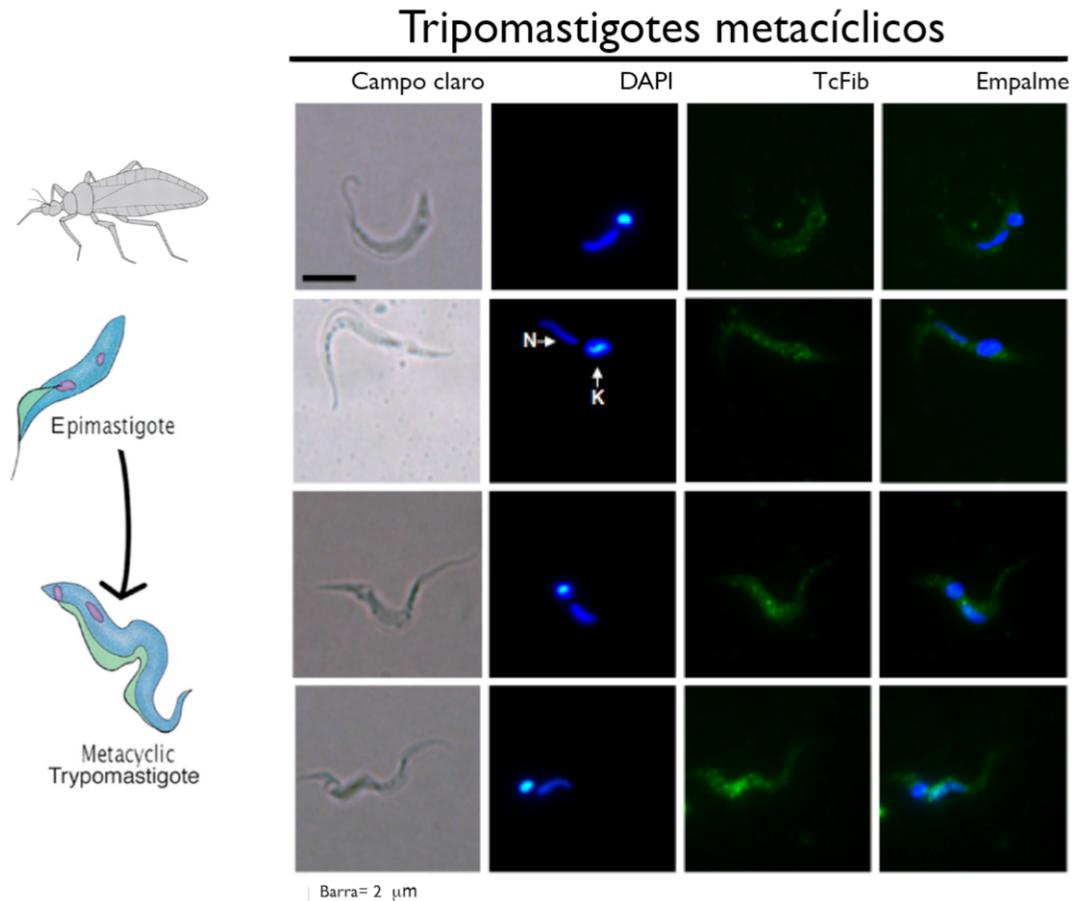


Fig. 19. Ensayo de inmunofluorescencia de tripomastigotes metacíclicos. Cuando el cultivo es mantenido en fase estacionaria algunos epimastigotes se diferencian a tripomastigotes metacíclicos debido al estrés que sufren, estas condiciones son similares al final del conducto digestivo del triatomino trasmisor del parásito. En un cultivo con estas características, tripomastigotes metacíclicos fueron localizados y la fibrilarina fue detectada en un ensayo de inmunofluorescencia, se utilizó el suero anti-TcFib y como segundo anticuerpo el anticuerpo anti-ratón acoplado con Alexa Fluor 488, en estas condiciones la fibrilarina tiene una distribución granular citoplasmática granular. Las flechas blancas indican el núcleo (N) y cinetoplasto (K) en la tinción con DAPI.

6.7 EGFP-TcFib se localiza en el nucléolo de *T. cruzi*.

Una de las estrategias comúnmente utilizadas para la caracterización y localización de proteínas es por medio de la generación de versiones quiméricas recombinantes que contengan una etiqueta fácilmente identificable, en el presente trabajo, se construyeron tres plásmidos, el primero contiene el marco de lectura de la proteína verde fluorescente (EGFP) nombrado pTEX-EGFP y dos plásmidos que expresan las formas quiméricas de ambas

isoformas de fibrilarina fusionadas en fase con EGFP, éstos plásmidos fueron nombrados pTEX-TcFib1-EGFP y pTEX-TcFib2-EGFP, y confieren resistencia al antibiótico G418 utilizado en la selección de epimastigotes recombinantes (Fig.20).

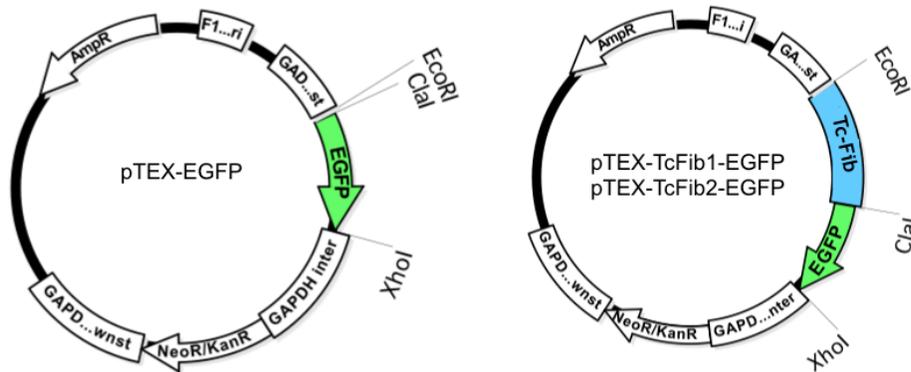
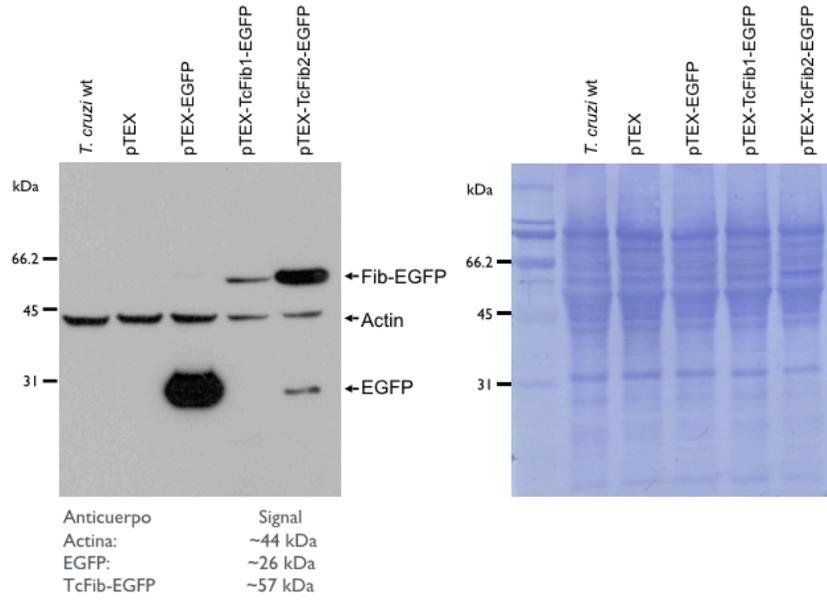


Fig. 20. Mapas de los plásmidos generados a partir de pTEX. Los plásmidos generan proteínas quiméricas con EGFP y son expresadas endógenamente en parásitos recombinantes.

Con ensayos de inmunorréplica tipo western blot con un anticuerpo anti-EGFP se evaluó la expresión proteica de las fibrilarinas quiméricas y por medio de microscopía de fluorescencia se evaluó la localización subcelular. En el ensayo de inmunorréplica tipo western blot se observa la señal correspondiente a EGFP en los extractos proteicos de cultivos transfectados con el plásmido pTEX-EGFP (Señal: ~26kDa), en los lisados correspondientes a las transfecciones con los plásmidos pTEX-TcFib1-EGFP y pTEX-TcFib2-EGFP, la señal corresponde a la proteína de fusión (~57 kDa; Fig. 21A). Por microscopía de fluorescencia la expresión de la proteína EGFP muestra un patrón disperso en toda la célula mientras que las proteínas quiméricas de TcFib-EGFP se localizan en el nucléolo de la célula (Fig. 21B).

A



B

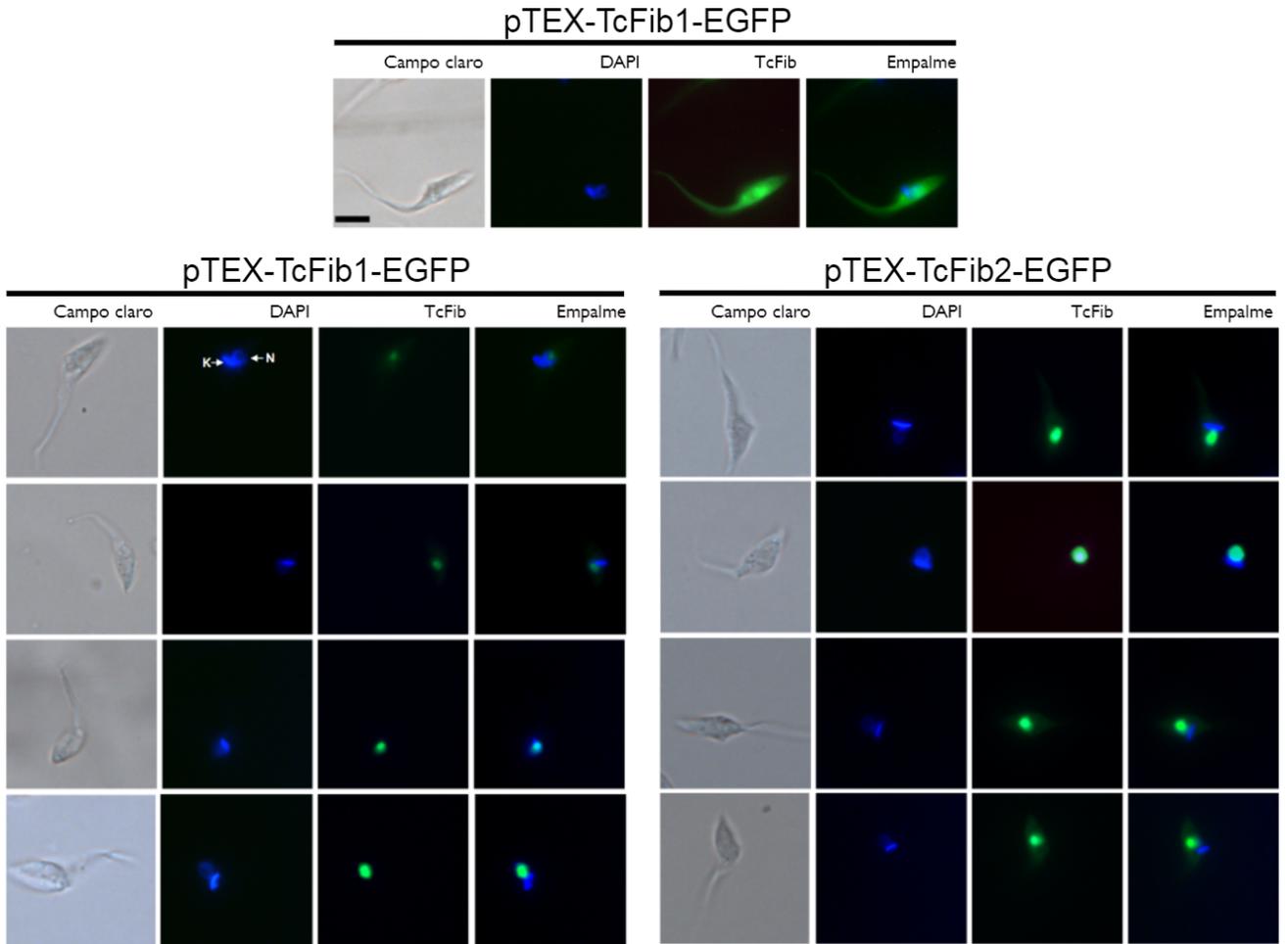


Fig. 21. Ensayo de western blot e inmunofluorescencia en parásitos transfectados.

(A) Ensayo de western blot con anticuerpo monoclonal comercial anti-EGFP. En los ensayos se utilizaron lisados de parásitos sin transfectar (*T. cruzi* wt) y transfectados con los plásmidos pTEX, pTEX-EGFP, pTEX-TcFib1-EGFP y pTEX-TcFib2-EGFP. Se observa la señal del tamaño de EGFP en las transfecciones correspondientes al plásmido pTEX-EGFP (~26 kDa); en los parásitos que expresan las proteínas de fusión (TcFib1/2-EGFP) se observa una señal cercana a la esperada (57 kDa). Como control de carga se utilizó actina (Señal ~44kDa), la membrana utilizada se tiñó con Coomassie como segundo control de carga. (B) Los parásitos transfectados se observaron bajo microscopía de fluorescencia. En las transfecciones correspondientes a los plásmidos pTEX-TcFib1-EGFP y pTEX-TcFib2-EGFP se observa una señal que co-localiza con el nucléolo; en la transfección de pTEX-EGFP hay señal de la proteína verde fluorescente en toda la célula. Las flechas blancas indican el núcleo (N) y cinetoplasto (K) en la tinción con DAPI.

7. Discusión

El estudio de fibrilarina en *T. cruzi* surge de la necesidad de contar con una herramienta molecular bien caracterizada que nos permita identificar algunos de los componentes involucrados en biogénesis ribosomal en el parásito, así como estudiar la conformación del nucléolo y sus cambios durante el ciclo de vida del parásito. Cuando se realizó la búsqueda del ortólogo de fibrilarina en la base de datos del genoma de la cepa CL Brener (TriTrypDB.org), se observó que el gen de fibrilarina se encuentra anotado como dos genes putativos, cada uno de ellos representado por sus dos alelos (debido a la naturaleza diploide del organismo).

Un ejemplo ya reportado en el que se registra la presencia de genes codificantes para fibrilarina, es el *Arabidopsis thaliana*. En éste genoma se encuentran tres genes, de los cuales se sabe que únicamente se expresan dos a nivel de mRNA y proteína. Éstas variantes tienen una identidad del 88%, la mayoría de los cambios residen en la región GAR y la localización subcelular de ambas es en la región nucleolar (Barneche et al., 2000).

En los genomas disponibles de algunos tripanosomátidos (TriTrypDB), es posible identificar por lo menos dos isoformas de fibrilarina. En tripanosomátidos el único homólogo a fibrilarina caracterizado es la de *T. brucei*, nombrado como Nop1 (que sigue la nomenclatura de la fibrilarina en levadura; ID Tritryp: Tb927.10.7500). El fenotipo asociado al silenciamiento del gen mediante RNAi de Nop1 es el escaso crecimiento de los cultivos (Barth et al. 2008). Sin embargo, los resultados reportados se enfocan únicamente a Nop1 y la segunda isoforma no fue caracterizada (ID Tritryp: Tb927.10.14630), aunque no se descarta la posibilidad que el RNAi utilizado en el ensayo también haya silenciado el segundo gen (Barth et al. 2008).

Previo al presente trabajo no se había realizado la caracterización de fibrilarina en *T. cruzi*. Ésta proteína es de gran interés por su relación a la biogénesis de ribosoma en este organismo. Los experimentos realizados aquí contemplan el estudio de la expresión de las isoformas de fibrilarina y su localización subcelular en fase exponencial y estacionaria en epimastigotes, así como, tripomastigotes metacíclicos.

Los resultados del análisis de las secuencias de ambas proteínas muestran una conservación a nivel de secuencia de aminoácidos y dominios funcionales al compararlas con otras fibrilarinas anteriormente reportadas, además de los datos obtenidos por modelado por homología (Fig 9, Fig. 10). Su conservación entre las dos isotermas que se están anotadas en el genoma es alta (62% en similitud y 73% en identidad), lo que sugiere la funcionalidad esperada para una metiltransferasa en el complejo C/D snoRNP (Tabla 3).

Para caracterizar a fibrilarina, primero demostramos su expresión a nivel de RNAm realizando ensayos de northern blot usando una sonda específica para cada una de las isoformas (Fig. 11), la banda observada es de 1.3 kb, tamaño suficiente para contener la secuencia completa de fibrilarina. Por otra parte se generó mediante inmunización de ratones antiseros policlonales para identificar la expresión proteica de fibrilarina, los antiseros fueron utilizados en ensayos de western blot con extractos proteicos y en ensayos de inmunofluorescencia. Se obtuvo una única señal que corresponde al tamaño esperado para fibrilarina (~30kDa) y la localización de la fluorescencia fue totalmente nucleolar para epimastigotes de fase exponencial; sin embargo, existe una marcada diferencia en la localización de esta proteína en epimastigotes de fase estacionaria y tripomastigotes metacíclicos, ya que su localización es mayormente granular en el citoplasma, lo que provee evidencia de una probable relocalización en condiciones de no proliferación (Fig.18 y Fig. 19). En este tipo de células, donde la división celular se encuentra comprometida, la cantidad de proteína de fibrilarina es comparable a fase estacionaria como se demuestra en la Fig. 17. Por otra parte, en estudios previos se sabe que el nucléolo de *T. cruzi* en fase estacionaria se encuentra reducido y en varias células no es posible detectarlo, algunas proteínas nucleares, como RPA31, pueden estar dispersas en el nucleoplasma en estas condiciones de crecimiento (Canela-Pérez, et al., 2018). Los tripomastigotes metacíclicos no presentan nucléolo, por lo que es interesante identificar uno de los componentes nucleolares principales, como lo es fibrilarina. En otros organismos se ha reportado una relocalización de fibrilarina al detener la actividad de polimerasa I, por ejemplo células de hígado de *Xenopus* al ser tratado con actinomicina D (Rivera-León y Gerbi, 1997), lo que correlaciona con la disminución de pre-RNA, particularmente el ribosomal 18S. Dicho estado puede compararse con el obtenido en fase estacionaria y tripomastigotes donde la abundancia de los precursores de RNA ribosomal disminuye sustancialmente (Fig. 22), por lo anterior se sugiere

que la localización de fibrilarina en el nucléolo es dependiente de procesos fisiológicos como lo es la abundancia de rRNA-precursor.

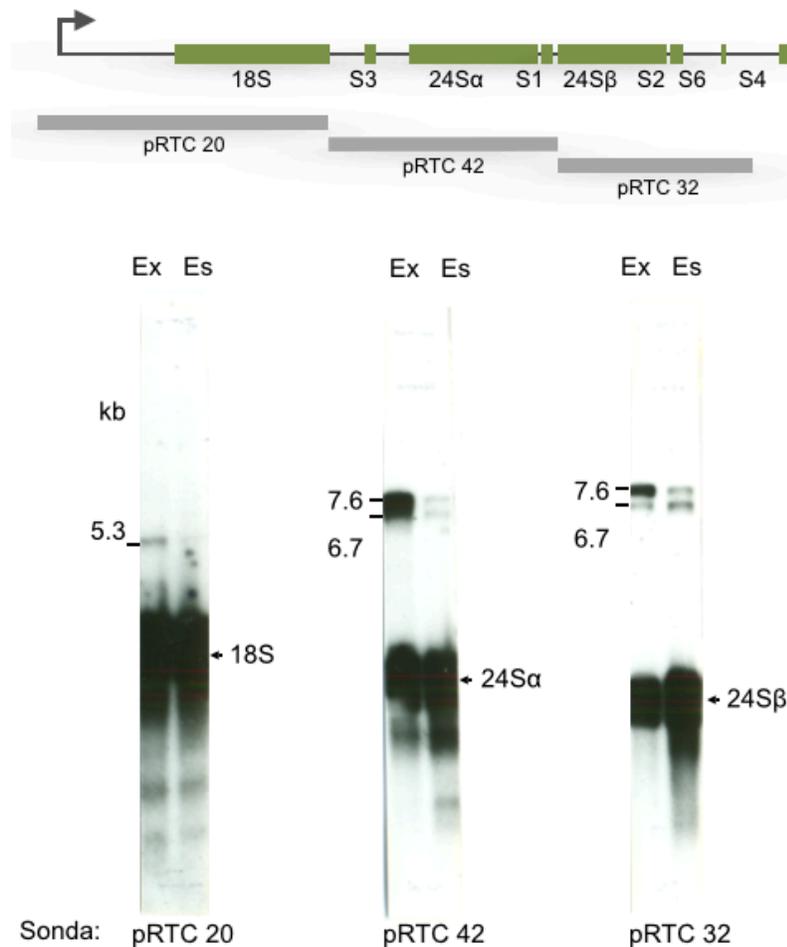


Fig. 22. Northern blot de RNA total con sondas específicas para los genes ribosomales.

Ensayos para cada una de las regiones de RNA ribosomal, en ambos estados exponencial (Ex) y estacionario (Es), se utilizó la misma cantidad de muestra (Guerrero-Sánchez et al. 2015).

Recientemente la proteína LmNop56 fue caracterizada en *Leishmania major* el cual pertenece a la familia de los tripanosomátidos (Nepomuceno-Mejía et al, 2018), en dicho artículo realizaron inmunofluorescencia de organismos en fase estacionaria, ellos reportan una localización parcial de la proteína LmNop56 fuera de la región nucleolar, aunque el nucléolo en este organismo se encuentra conservado en fase estacionaria, a diferencia de *T. cruzi* en donde se observa que en epimastigotes de fase estacionaria, el nucléolo disminuye

en tamaño y aumenta su granularidad (Nepomuceno-Mejía, 2010) y en tripomastigotes la mayoría carecen de nucléolo (Elias et al., 2001).

El resultado obtenido en *T. cruzi*, fue el esperado, en los ensayos de expresión endógena de las ambas fibrilarinas fusionadas con EGFP, tanto para TcFib1 como TcFib2, ambos se localizaron en el el nucléolo de los parásitos (Fig. 21). Un resultado equivalente fue reportado en *T. brucei* al expresar NOP1 en fusión con GFP (Marchetti et al. 2000), al tratar de cultivar los epimastigotes hasta alcanzar la fase estacionaria muchas de éstas células perdían señal de fluorescencia. Probablemente el plásmido que se mantiene de manera episomal se perdió durante las generaciones y cepas resistentes al medio con G418 fueron seleccionados. De los pocos epimastigotes que presentaban señal, la localización nuclear fue discreta lo cual indicaría que la maquinaria de maduración de RNA ribosomal aún se encuentra activa o bien la presencia de EGFP en la forma quimérica impide su exportación al citoplasma.

8. Conclusiones

- Las secuencias de aminoácidos de ambas fibrilarinas muestran los elementos necesarios para considerarse proteínas funcionales con alta similitud e identidad entre ellas.
- *T. cruzi* expresa las proteínas TcFib1 y TcFib2.
- En la forma reproductiva de epimastigotes la localización de fibrilarina intracelular es nucleolar.
- En epimastigotes de fase estacionaria y tripomastigotes metacíclicos la proteína de fibrilarina tiene una distribución granular en el citoplasma, en estos estadios no hay proliferación celular, la presencia de RNA ribosomal está comprometida y es poco abundante, lo que da indicios que estos procesos fisiológicos podrían estar involucrados en el proceso de relocalización de fibrilarina.

9. Perspectivas

En *T. cruzi* hay dos genes que codifican para fibrilarinas. Por la secuencia de aminoácidos y deducciones estructurales se perfilan como dos proteínas funcionales, sin embargo un aspecto de estudio es la redundancia de funciones o bien, la especificidad en su interacción con el RNAr y en la formación de los complejos enzimáticos. Con este fin, una de las estrategias a seguir sería la generación de clonas que sobreexpresen de manera recombinante versiones modificadas de cada una de las fibrilarinas en sitios de importancia enzimática o de ensamble con el complejo C/D snoRNP, sin embargo en este tipo de experimentos aún quedaría la duda de algún tipo de enmascaramiento del fenotipo por la expresión de los genes endógenos. Recientemente el avance de aplicaciones de edición genómica se ha expandido a varios organismos de estudio con éxito y los tripanosomátidos no son la excepción. Se ha logrado aplicar esta herramienta para generar transfecciones estables con CRISPR/Cas9 acoplado a GFP usando el plásmido pTREX con el fin de monitorear la correcta transfección de los parásitos, el sistema se ha probado para editar genes considerados esenciales y no esenciales con resultados contundentes en el fenotipo (Romagnoli et al., 2017). Al usar la tecnología CRISPR/Cas9 con cada una de las fibrilarinas eliminándolas de manera independiente, se podría estudiar la redundancia de funciones de ambas proteínas.

El marcaje de diferentes componentes del complejo C/D snoRNP (por ejemplo utilizando otros fluoróforos como EYFP o ERFP) y monitorear su distribución intracelular en diferentes condiciones de proliferación podría ayudar a dilucidar con mayor certeza el comportamiento y relocalización del complejo o las rutas que originan la exportación de los componentes nucleares en condiciones de no proliferación celular. Asimismo, la realización de co-inmunoprecipitación de los complejos C/D snoRNP en fracciones celulares nucleares y citoplasmáticas generaría datos de la abundancia de fibrilarina evaluando los diferentes condiciones reproductivas de *T. cruzi*.

10. Referencias

- Alberts B., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P. 2000. *Molecular Biology of the Cell*. Fourth Edition. Garland.
- Aslett M., Aurrecochea C., Berriman M., Brestelli J., Brunk B.P., Carrington M., Depledge D.P., Fischer S., Gajria B., Gao X., Gardner M.J., Gingle A., Grant G., Harb O.S., Heiges M., Hertz-Fowler C., Houston R., Innamorato F., Iodice J., Kissinger J.C., Kraemer E., Li W., Logan F.J., Miller J.A., Mitra S., Myler P.J., Nayak V., Pennington C., Phan I., Pinney D.F., Ramasamy G., Rogers M.B., Roos D.S., Ross C., Sivam D., Smith D.F., Srinivasamoorthy G., Stoeckert C.J. Jr, Subramanian S., Thibodeau R., Tivey A., Treatman C., Velarde G., Wang H.. 2010. TriTrypDB: a functional genomic resource for the *Trypanosomatidae*. *Nucleic Acids Res.* 38(Database issue):D457-62.
- Bachellerie J.P. Cavaillé J. 1997. Guiding ribose methylation of rRNA. *TIBS.* 22: 157-261.
- Bachellerie J.P., Michot B., Nicoloso M., Balakin A., Ni J. and Fournier M. 1995. Antisense snoRNAs : a family of nucleolar RNAs with long complementaries to rRNA. *TIBS.* 20: 261-264.
- Bachellerie J.P. Cavaillé J. 1998. SnoRNA-guided ribose methylation rRNA : structural features of the guide RNA duplex influencing the extent of the reaction. *Nucleic Acids Research.* 26(7):1576-1587.
- Barneche F., Steinmetz F and Echeverría M. 2000. Fibrillarin Genes Encode Both a Conserved Nucleolar Protein and a Small Nucleolar RNA Involved in Ribosomal RNA Methylation in *Arabidopsis thaliana*. *The journal of Biological Chemistry.* 275(35): 27212-27220.
- Barth S., Shalem B., Hurny A., Tkacz I. D. T., Liang X., Uziel S., Myslyuk I. M., Doniger T., Salmon-Divon M., Unger R. and Michaeli S. 2008. Elucidating the Role of C/D snoRNA in rRNA Processing and Modification in *Trypanosoma brucei*. *Eukaryotic cell.* 7:86-101.
- Barygina V.V., Veiko V.P., Zatssepina O.V. 2010. Analysis of nucleolar protein fibrillarin mobility and functional state in living HeLa cells. *Biochemistry (Mosc).* 2010 Aug;75(8):979-88.
- Boisvert F.M., van Koningsbruggen S., Navascués J., Lamond A.I. 2007. The multifunctional nucleolus. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 8(7):574-85.
- Camargo E. P. 1964. Growth and differentiation in *Trypanosoma cruzi*: Origin of metacyclic trypomastigotes in liquid media, *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, vol. 6, pp. 93–100.
- Campos P.C., Bartholomeu D.C., DaRocha W.D., Cerqueira GC, Teixeira S.M. 2008. Sequences involved in mRNA processing in *Trypanosoma cruzi*. *Int J Parasitol.* 38(12):1383-9.
- Canela-Pérez I., López-Villaseñor I., Cevallos A. M, and Hernández R. 2018 .Nuclear distribution of the *Trypanosoma cruzi* RNA Pol I subunit RPA31 during growth and metacyclogenesis, and characterization of its nuclear localization signal, *Parasitology Research*, vol. 117, no. 3, pp. 911–918.
- Cassab J. R. A. Noireau F. Guillén. 1999. Chagas. La enfermedad de Chagas en Bolivia. *Conocimientos científicos al inicio del Programa de Control (1998-2002)*. Edición Primera. Ediciones Gáficas "E.G.". III: 17-44, 201-247.

- Cevallos A. M., Perez-Escobar M., Espinosa N., Herrero J., López-Villaseñor I., Hernandez R. 2005. The stabilization of housekeeping transcripts in *Trypanosoma cruzi* epimastigotes evidences a global regulation of RNA decay during stationary phase. *FEMS Microbiology Letters* 246 (2005) 259–264.
- Collins, T. J. 2007. ImageJ for microscopy. *Biotechniques* 43, 25–30.
- Cooper H.M., Paterson Y. 2008. Production of polyclonal antisera. *Curr Protoc Mol Biol.* 2008 Jan;Chapter 11:Unit 11.12.
- Croft S.L., Barrett M.P., Urbina J.A. 2005. Chemotherapy of trypanosomiasis and leishmaniasis. *Trends Parasitol.* 2005 Nov;21(11):508-12.
- de Silva, U., Zhou, Z. and Brown, B. A. (2012). Structure of Aeropyrum pernix fibrillarin in complex with natively bound S-adenosyl-L-methionine at 1.7 Å resolution. *Acta Crystallographica F, Structural Biology and Crystallization Communications* 68, 854–859.
- de Souza W. 1999;94. Morphobiological characterization of *Trypanosoma cruzi* Chagas, 1909 and its distinction from other trypanosomes. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1999;94 Suppl 1:205-10.
- Docampo R., de Souza W., Miranda K., Rohloff p., Morenol S. 2005. Acidocalcisomes ? conserved from bacteria to man. *Nature Reviews Microbiology* 3, 251-261.
- Dunbar D. A., Wormsley S., Lowe M. L. and Baserga S. J. 2000. Fibrillarin-associated Box C/D Small Nucleolar RNAs in *Trypanosoma brucei*. *Journal of Biological Chemistry.* 275:14767-14776.
- El-Sayed N.M., Myler P.J., Bartholomeu D.C., Nilsson D., Aggarwal G., Tran A-N., Ghedin E., Worthey E.A., Delcher A.L., Blandin G. 2005. The Genome Sequence of *Trypanosoma cruzi*, Etiologic Agent of Chagas Disease. *Science*, 309(5733):409-415.
- Finn, R. D., Bateman, A., Clements, J., Coggill, P., Eberhardt, R. Y., Eddy, S. R., Heger, A., Hetherington, K., Holm, L., Mistry, J., Sonnhammer, E. L. L., Tate, J. and Punta, M. 2014. Pfam: the protein families database. *Nucleic Acids Research* 42 (Database issue), D222–D230.
- Granneman S. and Baserga S.J. 2004. Ribosome biogenesis: of knobs and RNA processing. *Experimental Cell Research.* 296: 43-50.
- Guex N, Peitsch MC. 1997. SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: an environment for comparative protein modeling. *Electrophoresis.* 1997 Dec;18(15):2714-23.
- Huang J., Van der Ploeg L.H. 1991. Requirement of a polypyrimidine tract for trans-splicing in trypanosomes: discriminating the PARP promoter from the immediately adjacent 3' splice acceptor site. *EMBO J.* 10(12):3877-85.
- Hernandez, R., Diaz-de León, F. and Castañeda, M. 1988. Molecular cloning and partial characterization of ribosomal RNA genes from *Trypanosoma cruzi*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 27, 275–279.
- Hernández R., Cevallos A.M. 2014. Ribosomal RNA gene transcription in trypanosomes. *Parasitol Res* 113(7):2415–2424.
- Hernandez R., Martinez-Calvillo S., Hernandez-Rivas R. and Gómez E. 1993. *Trypanosoma cruzi* ribosomal RNA genes: a review. *Biol Res.* 26: 109-114.
- Hernandez-Verdun D., Roussel P., Thiry M., Sirri V. and Lafontaine D. L. J. 2010. The nucleolus: Structure/function relationship in RNA metabolism. *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA*, vol. 1, no. 3, pp. 415–431, 2010.

- Jansen R. P., Hurt E. C., Kern H., Lehtonen H., Carmo-Fonseca M., Lapeyre B. and Tollervey D. 1991. Evolutionary Conservation of the Human Nucleolar Protein Fibrillarin and its Functional Expression in Yeast. *Journal of Cell Biology*. 113(4): 715-729.
- Jimenez-García L. F., Zavala G., Chavez-Munguía B., Ramos-Godínez M. P., López-Velázquez G., Segura-Valdez M. L., Montañez C., Hehl A. B., Argüello-García R., Ortega-Pierres G. 2008. Identification of nucleoli in the early branching protist *Giardia duodenalis*. *International Journal for Parasitology*. 38:1297-1304.
- Kelly J.M., Ward H.M., Miles M.A., Kendall G. 1992. A shuttle vector which facilitates the expression of transfected genes in *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania*. *Nucleic Acids Res* 20(15): 3963–3969.
- Lafontaine D.L., Tollervey D. 2001. The function and synthesis of ribosomes. *Nat Rev Mol Cell Biol*. Jul;2(7): 514-20.
- Romagnoli B. A. A., Picchi Gisele F. A., Hiraiwa P. M., Borges B. S., Alves R. L., Goldenberg S. 2017. Improvements in the CRISPR/Cas9 system of high efficiency gene disruption in *Trypanosoma cruzi*. *Acta Trop*. 2018 Feb; 178: 190-195.
- Macedo A.M., Machado C.R., Oliveira R.P., Pena S.D. 2004. *Trypanosoma cruzi*: genetic structure of populations and relevance of genetic variability to the pathogenesis of chagas disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 99(1):1-12.
- Makimoto Y., Yamamoto S., Takano H., Motoori K., Ueda T., Kaneoya K., Shimofusa R., Uno T., Ito H., Okamoto Y. 2006. Lymphadenopathy in the mesenteric pedicle of the free jejunal flap: reactive lymphadenopathy, not metastatic. *J Comput Assist Tomogr*. 2006 Jan-Feb;30(1):65-7.
- Marchetti M.A., Tschudi C., Kwon H., Wolin S.L., Ullu E. 2000 Import of proteins into the trypanosome nucleus and their distribution at kar- yokinesis. *J Cell Sci* 113:899–906
- Martin R.M., Tünnemann G., Leonhardt H., Cardoso M.C. 2007. Nucleolar marker for living cells. *Histochem Cell Biol*. 2007 Mar;127(3):243-51.
- Medina-Acosta E., Cross G. 1993. Rapid isolation of DNA from trypanosomatid protozoa using a simple mini-prep procedure. *Molecular and Biochemical Parasitology* 59:327-330
- McGhee, R.B. y Cosgrove, W.B. 1980. Biology and physiology of the lower *Trypanosomatidae*. *Microbiol. Rev*. 44: 140-173.
- Milligan-Myhre K.C., Rooney P.J., Knoll L.J. 2011. Examination of a virulence mutant uncovers the ribosome biogenesis regulatory protein of *Toxoplasma gondii*. *J Parasitol*. 2011 Dec;97(6):1173-7. doi: 10.1645/GE-2741.1.
- Nepomuceno-Mejía T., Lara-Martínez R., Cevallos A.M., López-Villaseñor I., Jiménez-García L.F., Hernández R. 2010. The *Trypanosoma cruzi* nucleolus: a morphometrical analysis of cultured epimastigotes in the exponential and stationary phases. *FEMS Microbiol Lett* 313(1): 41–46.
- Nepomuceno-Mejía T., Florencio-Martínez L.E., Martínez-Calvillo S. 2018. Epigenetic Regulation of Transcription in Trypanosomatid Protozoa. *Curr Genomics*. 2018 Feb;19(2):140-149.
- Niewmierzycka A., Clarke S. 1999. S-Adenosylmethionine-dependent methylation in *Saccharomyces cerevisiae*. Identification of a novel protein arginine methyltransferase. *J Biol Chem*. 1999 Jan 8;274(2):814-24.
- Raška I., Shaw P.J., Cmarko D. 2006. Structure and function of the nucleolus in the spotlight. *Current Opinion in Cell Biology*. 18:325-334.

- Reeder, R.H. 1992. Regulation of transcription by RNA polymerase I. En: transcriptional regulation (S. I. Mc Knight y K.R. Yamamoto, eds). CSHL Press, Nueva York. pp. 315-347.
- Reichow S. L., Hamma T., Ferré-D'Amare A. R., and Varani G. 2007. The structure and function of small nucleolar ribonucleoproteins. *Nucleic Acid Research*. 35(5): 1452-1464.
- Rakitina, D. V., Taliany, M., Brown, J. W. S. Kalinina, N. O. 2011. Two RNA-binding sites in plant fibrillarin provide interactions with various RNA substrates. *Nucleic Acids Research* 39, 8869–8880.
- Rivera-León, R., Gerbi, S. A. 1997. Delocalization of some small nucleolar RNPs after actinomycin D treatment to deplete early pre- rRNAs. *Chromosoma* 105, 506–514.
- Rosete M., Prados M.R., and Vindrola O. 2007. El nucléolo como un regulador del envejecimiento celular. *Medicina (Buenos Aires)*. 67: 183-194.
- Sirri V, Hernandez-Verdun D, Roussel P. 2002. Cyclin-dependent kinases govern formation and maintenance of the nucleolus. *J Cell Biol Mar* 18; 156(6): 969-981.
- Storino R., Milei J. 1994. Enfermedad de Chagas. *Doyma Argentina, Division Mosby*. 3:31-40.
- Okuwaki M., Tsujimoto M., Nagata K. 2002. The RNA Binding Activity of a Ribosome Biogenesis Factor, Nucleophosmin/B23, Is Modulated by Phosphorylation with a Cell Cycle-dependent Kinase and by Association with Its Subtype. *Mol Biol Cell*. Jun; 13(6); 2016-2030.
- Olson, M. O. J., Dundr, M. 2005. The moving parts of the nucleolus. *Histochemistry and Cell Biology* 123, 203–216.
- Tollervey D., Lehtonen H., Carmo-Fonseca M. and Hurt E. C. 1991. The small nucleolar RNP protein NOP1 (fibrillarin) is required for pre-rRNA processing in yeast. *EMBO Journal*. 10: 573-583.
- Uliel S. Liang X., Unger R., Michaeli S. 2004. Small nucleolar RNAs that guide modification in trypanosomatids: repertoire, targets, genome organization, and unique functions. *Int J for Parasitol*. 34: 445-454.
- Warner. 1999. The economics of ribosome biosynthesis in yeast. *Trend Biochem Sci*. Nov;24(11): 437-40.
- Weatherly DB, Boehlke C, Tarleton RL. 2009. Chromosome level assembly of the hybrid *Trypanosoma cruzi* genome. *BMC Genomics*. 1;10:255.
- Wei T., Baigu H., Cunxiang L., Zhonghe Z. 2003. In situ visualization of rDNA arrangement and its relationship with subnucleolar structural regions in *Allium sativum* cel nucleolus. *J cell Sci*. Mar 15;116(Pt 6): 1117-25.
- Westenber S., Bernabé C., Campbell D. Y Stum N. 2005 Two hybridization events define the population structure of *Trypanosoma cruzi*. *Genetics* 171:527-543.
- Zingales B., Miles M.A., Campbell D.A., Tibayrenc M., Macedo A.M., Teixeira M.M., Schijman A.G., Llewellyn M.S., Lages-Silva E., Machado C.R., Andrade S.G., Sturm N.R. 2012. The revised *Trypanosoma cruzi* subspecific nomenclature: rationale, epidemiological relevance and research applications. *infect Genet Evol*. 2012 Mar;12(2):240-53.

ANEXO

Oligonucleótidos utilizados en el presente trabajo para generar los diferentes plásmidos.

(F): oligonucleótido en sentido; (R): oligonucleótido reverso

Amplicón	Secuencia (5' -> 3')	Características
Sonda1	CCCGAAGGTATGGTTTATGC (F)	Amplicón de 356 pb de la región interna de TcFib1 del nucleótido 496 a 851.
	CTTGTTCCGGAGTGAAGTGG (R)	
Sonda2	CTGGCGACAAAGTCCCTAGTGCC (F)	Amplicón de 307 pb de la región interna de TcFib2 del nucleótido 228 a 535.
	GCTTCGTCATCTCCTCCAAG (R)	
pGEX-TcFib1	GAATTCATGCGTGGAGGATTCGG (F)	Amplicón de 890 pb de la región codifican de TcFib1 flanqueado con los sitios de <i>EcoRI</i> .
	GAATTCTCATTGAGTCTTCTCTTAAC (R)	
pGEX-TcFib2	GAATTCATGCGCGGAGGCCGTGG (F)	El inserto con el marco de lectura abierto flanqueado con los sitios <i>EcoRI</i> . Amplicón de 890 pb.
	GAATTCTTACTTCGGTGGACACTTGTAG (R)	
pTEX-EGFP	ATCGATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGC (F)	Marco de lectura de EGFP, el amplicón de 720 pb está flanqueado por los sitios <i>Clal</i> en 5' y <i>EcoRI</i> en 3'.
	CTCGAGTTACTTGTACAGCTCGT (R)	
pTEX-TcFib1-EGFP	GAATTCATGCGTGGAGGATTCGGTGG (F)	Amplicón de 890 pb de bases con el marco de lectura abierto de TcFib1 que se encuentra en fase con EGFP, el inserto se encuentra flanqueado con los sitios <i>EcoRI</i> y <i>Clal</i> .
	ATCGATTCAGTCTTCTCTTAACGGACC (R)	
pTEX-TcFib2-EGFP	GAATTCATGCGCGGAGGCCGTGG (F)	Amplicón de 890 pb de bases con el marco de lectura abierto de TcFib2 que se encuentra en fase con EGFP, el inserto se encuentra flanqueado con los sitios <i>EcoRI</i> y <i>Clal</i> .
	ATCGATTTCCGGTGGACACTTGTAGTACC (R)	
pGEM-TcFib1-ss	CGCTATTATTGATACAGTTTCTG (F)	Oligonucleótido en sentido complementario a Mini Exón.
	CATGTGAGGTTCCACAACAAC (R)	Oligonucleótido reverso utilizado en la reacción anidada a 153 pb del ATG iniciador de TcFib1.
	CTTGTTCCGGAGTGAAGTGG (R)	Oligonucleótido reverso utilizado en la reacción anidada a 496 pb del ATG iniciador de TcFib1.

Relocation of nucleolar fibrillarin in *Trypanosoma cruzi* during stationary phase

ERNESTO GUERRERO-SÁNCHEZ¹, ANA MARÍA CEVALLOS¹,
SANTIAGO MARTÍNEZ-CALVILLO², IMELDA LÓPEZ-VILLASEÑOR¹ and
ROBERTO HERNÁNDEZ^{1*}

¹Departamento de Biología Molecular y Biotecnología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, CP 04360, México

²Unidad de Biomedicina, Facultad de Estudios Superiores Iztacala, Universidad Nacional Autónoma de México, Av. De los Barrios 1, CP 54090, México

(Received 13 July 2015; revised 9 September 2015; accepted 15 September 2015)

SUMMARY

Trypanosoma cruzi is the aetiological agent of Chagas disease. Our group has focused on the study of ribosomal RNA and nucleolar structure in this organism. In this work, we address the cellular location of fibrillarin in epimastigotes. As a conserved and unreported feature in trypanosomatids, fibrillarin in *T. cruzi* is encoded by two genes that differ by approximately 35% in their deduced amino acid sequences (TcFib 1 and TcFib 2). Chimaeric fluorescent versions of *TcFib1* and *TcFib2* were individually expressed in *T. cruzi* cells. Both transfected cultures showed cells with a nucleolar fluorescent signal. We have not found any evident distinction between the structure or expression of Tcfibrillarins to propose a functional difference in cells. With the aid of an anti-TcFib 2 antibody, it was found that the endogenous protein relocates outside of the nucleolus in stationary epimastigotes. This was also the case in metacyclic trypomastigotes observed from aged cultures. The significance of this observation is not known, but a deficiency of fibrillarin nucleolar retention correlates with the observed reduction in the abundance of the pre-ribosomal RNAs species at stationary phase, and suggests that the nucleolar location of this protein depends on physiological processes.

Key words: fibrillarin, nucleolus, kinetoplastid stationary phase.

INTRODUCTION

Trypanosoma cruzi is a parasitic protozoan causative of Chagas disease, a neglected condition that causes an important health problem in Latin America. Our research group has been interested in ribosomal RNAs (rRNAs) and the biogenesis of ribosomes in this organism (Nepomuceno-Mejía *et al.* 2010; Hernández and Cevallos, 2014). Eukaryotic rRNA is synthesized in the nucleolus by RNA polymerase I as a precursor transcript that matures by a complex molecular pathway. Throughout this process, the pre-rRNA is cut by internal cleavages and modified at specific positions. The main modifications of this fundamental transcript are pseudouridylation and methylation of the 2' carbon of the ribose sugar ring (2'-O-methylation). Small nucleolar RNAs (snoRNAs) specifically interact (base-pairs) with sequences on the pre-rRNA and guide these modifications. Furthermore, some snoRNAs are required for the cleavage events that release transcribed rRNA spacers (Gerbi *et al.* 2001). rRNA genes in trypanosomes are atypical in that a complex processing pathway leads to a

discontinuous large subunit rRNA component composed of two large and five small rRNAs (see Hernández and Cevallos, 2014, for a recent review). The African species of trypanosomes, *Trypanosoma brucei*, is the best-studied species among kinetoplastids. It has been reported that some of their snoRNAs are conserved among eukaryotes, while some others are species-specific (Michaeli, 2012), as expected for its atypical pre-rRNA cleavage pathway. snoRNAs occur in eukaryotic cells as molecular complexes with proteins (snRNPs). In the case of snoRNAs from the C/D family (i.e. RNAs that contain the conserved sequence motifs of Box C and Box D, Gerbi *et al.* 2001), four proteins have been identified: Fibrillarin (yeast Nop1p), Nop56p, Nop58p and Snu13p (Lafontaine and Tollervey, 2000). The former contains a reported methyltransferase catalytic domain (MeTase) involved in the 2'-O-methylation modification of pre-rRNA referred to above. Eukaryotic fibrillarins contain two distinct domains, an N-terminal glycine- and arginine-rich domain (GAR domain) (Amiri, 1994) and a larger catalytic domain MeTase. The catalytic domain of all fibrillarins is highly conserved, consisting of a central seven-stranded β -sheet surrounded by three α -helices on each side. This structure is similar to that found in AdoMet-dependent MeTases (Amiri, 1994; Wang *et al.* 2000). Importantly, fibrillarin is

* Corresponding author: Departamento de Biología Molecular y Biotecnología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, CP 04360, México. E-mail: robertohf@biomedicas.unam.mx

essential for cell growth (Schimmang *et al.* 1989), and its depletion in yeast cells affects all pre-rRNA processing reactions and impairs pre-rRNA methylation (Tollervey *et al.* 1991). Similarly, fibrillarins from *T. brucei* is essential because silencing of the homologue *NOP1* by RNA interference produces rRNA-processing and modification defects that lead to cell death (Barth *et al.* 2008). It is to be noted that *fibrillarins* gene annotation in this species shows the occurrence of three genes, but this situation has not been reported in the literature (Barth *et al.* 2008). As mentioned above, we are interested in *T. cruzi* ribosome biogenesis. Consequently, construction and characterization of nucleolar markers in this species represents a rational approach to follow the process. Fibrillarins has been reported as a nucleolar marker of the dense fibrillar component (Olson and Dundr, 2005). In this work, it is shown that plasmid-encoded fluorescent fusions of two dissimilar fibrillarins in *T. cruzi* are expressed as nucleolar proteins and, in at least one case (here called TcFib2), the native endogenous protein is relocated outside the nucleus in a population of cultured epimastigotes at stationary phase. So is the case of metacyclic trypomastigotes, which are non-dividing forms devoid of nucleoli (Elias *et al.* 2001).

MATERIALS AND METHODS

Parasites and culture conditions

Trypanosoma cruzi epimastigotes from the CL Brener strain were grown at 28 °C in liver infusion tryptone medium supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum (Camargo, 1964). For growth curves, cultures were seeded at a density of 1×10^6 cells mL⁻¹ and counted at 24–48 h intervals. Cells were harvested during exponential growth (cells duplicating every 24 h; cellular density of approximately $8\text{--}12 \times 10^6$ cells mL⁻¹) or during stationary phase [when parasites stopped their growth for 72 h; cellular density of $90\text{--}100 \times 10^6$ cells mL⁻¹; 12–14 days post inoculation (dpi)].

Plasmid construction

Trypanosoma cruzi genomic DNA was prepared from exponentially growing epimastigotes by standard procedures. The experimentally determined coding regions of TcFib1 and TcFib2 of the S allele were amplified from genomic DNA and cloned into the *EcoRI* site of the vector pGEX-3X to be expressed as GST-fusion proteins (GE Healthcare). These coding regions were also amplified and cloned without the stop codon between the *EcoRI* and *Cla*I sites present in the pTEX vector (Kelly *et al.* 1992). Downstream of these genes and in frame with them, the coding region of the EGFP from the

pRH006 vector (BCCM/LMBP, Technologiepark-Zwijnaarde, Belgium) was subcloned into the *Cla*I–*Xho*I sites of the pTEX vector. All plasmid inserts were sequenced. When transfected into epimastigotes, the plasmids pTEX-TcFib1-EGFP and pTEX-TcFib2-EGFP would express fusion proteins with EGFP in the C-terminal region. *Trypanosoma cruzi* epimastigotes were transfected with the indicated plasmids as earlier described (Martínez-Calvillo *et al.* 1997).

Northern blot analysis

For Northern blot analysis, total RNA was isolated from epimastigotes using TRIZOL[®] reagent. RNA was electrophoresed in 1% agarose gels with 2 M formaldehyde, 1 mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) and 50 mM MOPS buffer, pH 7.0. Blot transfers and hybridizations were performed under standard conditions. The hybridization patterns of three rRNA gene probes, which span most of the rRNA cistron, were evaluated in both exponential and stationary phases of growth (Hernández *et al.* 1988).

Expression and purification of recombinant GST-fibrillarins fusion proteins

GST-TcFib1 and GST-TcFib2 were expressed in *Escherichia coli* strain BL21 (DE3) and the recombinant proteins were affinity purified using a glutathione Sepharose 4B column according to the manufacturer's instructions (Amersham Biosciences, London, UK). To remove contaminants, the proteins eluted from the column were separated by 10% sodium dodecyl sulphate–polyacrylamide gel electrophoresis (SDS–PAGE) and stained with Coomassie Brilliant Blue, and the band corresponding to the recombinant fusion protein was cut from the gel and electroeluted. The electroeluted protein was dialysed overnight at 4 °C in 10 mM Tris–HCl, pH 8, 100 mM NaCl and 10% glycerol. The protein was then concentrated by ultra filtration in Centricon 30 filter units (Millipore Corporation, Bedford, USA) and stored at –20 °C until use.

Production of mouse anti-T. cruzi fibrillarins polyclonal antibodies

Ten micrograms of either GST-TcFib1 or GST-TcFib2 were emulsified with Freund's complete adjuvant and administered subcutaneously to BALB/c mice (200 µL per mice). Two booster doses (10 µg of protein emulsified in incomplete Freund's adjuvant per booster dose, subcutaneous) were administered 9 and 7 weeks after the previous immunization. Pre-immune blood was collected. Fifteen days after the last antigen boost, blood was collected by terminal cardiac puncture. Serum was obtained from

all samples, aliquoted and stored at -70°C until use. The immunization protocol and housing conditions were approved by the local Bioethics Committee for Animal Research.

Immunoblotting

Total parasite lysates were separated by 10% SDS-PAGE and transferred to a $0.45\ \mu\text{M}$ polyvinylidene difluoride Immobilon-P Membrane (Merk Millipore, Darmstadt, Germany) according to the standard protocols. Nitrocellulose membranes were blocked with 0.05% Triton X-100 in phosphate buffered saline (PBS-T) with 5% skim milk overnight at 4°C . The membrane was then incubated for 1 h at room temperature (RT) with anti-TcFib serum diluted in PBS-T with 2% skim milk. At the end of the incubation period, the membrane was washed three times with PBS-T (30 min per wash) and then incubated for 1 h with horseradish peroxidase-labelled goat anti-mouse IgG (ImmunoPure, Pierce) diluted in PBS-T with 2% skim milk (1:30 000, v/v). The membrane was washed three times with PBS-T (3 min per wash), incubated in SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate (Pierce), and then exposed to film and developed. Polyclonal sera were screened by immunoblotting of *T. cruzi* protein lysates. Three anti-TcFib2 sera recognized a band of the expected size ($\sim 30\ \text{kDa}$), whereas none of the anti-TcFib1 sera recognized any *T. cruzi* antigen. One of the anti-TcFib2 sera was used in this study at a dilution of 1:6000 in immunoblots. In some studies, polyclonal antibodies against Tc actin were used at a dilution of 1:8000 (Cevallos *et al.* 2011).

Fluorescence microscopy

For immunofluorescence studies, epimastigotes from both exponential and stationary phases of growth were washed two times for 5 min each with PBS, resuspended in 4% (w/v) paraformaldehyde in PBS ($20 \times 10^6\ \text{cells mL}^{-1}$), and allowed to adhere to Saline-Prep Slides (Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, USA) for 10 min at RT. Fixed parasites were permeabilized with 0.5% (v/v) Triton X-100 for 5 min, and then blocked with 5% (w/v) bovine serum albumin in PBS for 2 h. The blocked cells were first incubated with primary antibodies (1:400 dilution in 1% BSA in PBS) for 1 h at RT, and then labelled with donkey anti-mouse IgG (H + L) tagged with Alexa Fluor 488 (1:400 dilution) for 1 h at RT in the dark. Negative control samples were incubated with pre-immune mouse serum. For the analysis of EGFP fluorescence in epimastigotes, transfectant cells were washed, fixed and allowed to bind to Saline-Prep Slides with the same protocol described above. Then, the slides were washed with PBS to remove non-adherent cells.

Both types of preparations were mounted for fluorescence in Vectashield medium containing diaminodiphenylindole (DAPI) to stain nucleic acids (Vectashield with DAPI; Vector Laboratories, Burlingame, California, USA). The samples were observed with an epifluorescent Olympus BX51 microscope, and the images were obtained with an Olympus camera and analysed using Image J (Collins, 2007).

Sequence alignment analysis

Homologous deduced *T. cruzi* fibrillarin protein sequences were obtained from the TriTrypDB database (<http://tritrypdb.org/tritryp/>) and submitted to the Clustal Omega web server (Sievers *et al.* 2011; <http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>). The Jalview applet allowed us to view, edit, colour and output the alignment for insights into amino acid conservation using the Blossum62 matrix parameters (Waterhouse *et al.* 2009).

RESULTS

Two coding genes for fibrillarin in *T. cruzi*

The TriTrypDB genomic resource (version 8.0) was searched for genes encoding fibrillarins in the *T. cruzi* hybrid strain CL Brener (El-Sayed *et al.* 2005). Esmeraldo-like (S) and non-Esmeraldo like (P) are the terms used to name both gene haplotypes. Four putative *fibrillarin* alleles were identified in this genome database at two loci (chromosome 4 and chromosome 40). Both allelic variants in each locus (S and P) are clearly annotated (Fig. 1A). Herewith, the proteins encoded at chromosome 4 have been named fibrillarin 1 (TcFib1) and those encoded at chromosome 40 as fibrillarin 2 (TcFib2). As originally annotated, the four *fibrillarin* genes (two pairs of allelic genes) differ in size: *TcFib1-S* (TcCLB.510105.50) is 915 bp long, *TcFib1-P* (TcCLB.509715.40) is 951 bp, *TcFib2-S* (TcCLB.506211.250) is 879 bp and *TcFib2-P* (TcCLB.511287.150) is 876 bp. Moreover, analysis of the aligned sequences showed a 5'-end terminal extension on both haplotypes of *TcFib1* (Fig. 1B). To determine whether this extension is actually present in the mature mRNAs, their trans-splicing site was experimentally determined. For both haplotypes, the *TcFib1* mRNA trans-splicing site was actually located downstream of the originally annotated translation starting ATG (Fig. 1B). Consequently, the gene length of both *TcFib1* haplotypes becomes the same as that of *TcFib2-P*. To further corroborate the annotated genes as fibrillarins, the deduced protein sequences were evaluated by the Conserved Domain Database at NCBI (Finn *et al.* 2014). In all cases, the pfam motif 01269 'fibrillarin' was identified.

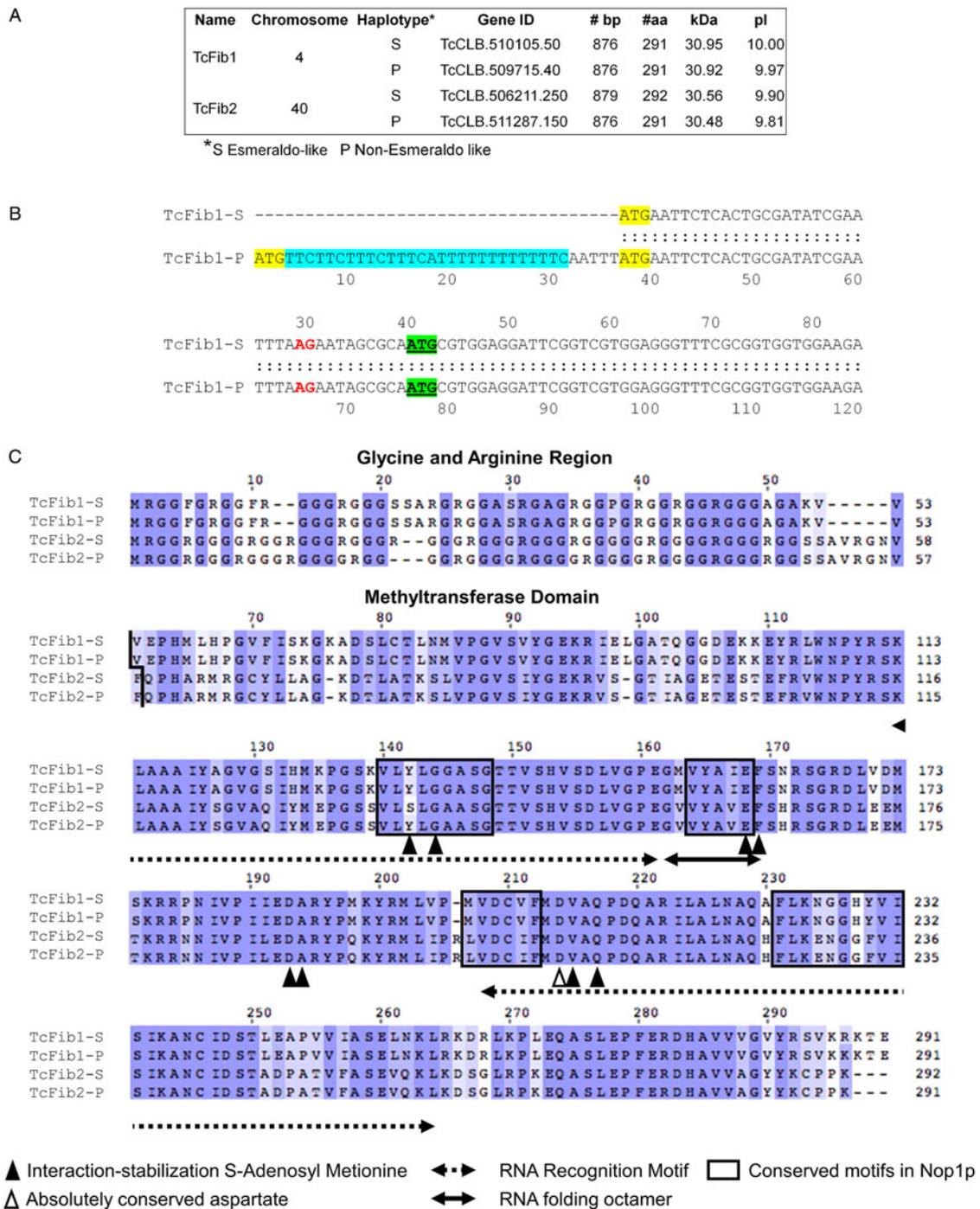


Fig. 1. (A) *Fibrillar* genes in the annotated *T. cruzi* genome, self-explained. (B) Alignment of the 5' end of the putative coding regions of fibrillarins encoded on chromosome 4 (*TcFib1*). Highlighted in yellow are the ATG codons annotated in the genome database; in blue, a polypyrimidine-rich region potentially recognized in the trans-splicing process, and in green the demonstrated ATG leading the *fibrillar* open reading frame. The trans-splicing site is in red lettering. (C) Localization of conserved motifs in deduced *T. cruzi* fibrillarins. Sequence alignment of fibrillarins from *T. cruzi* was performed using Clustal Omega (Sievers *et al.* 2011; <http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>). Gaps and mismatches are colourless. Conserved residues are highlighted with blue. Colour intensity shows the level of conservation with respect to the Blosom62 matrix. Both GAR and MeTase domains are indicated. Graphic elements that mark conserved functional motifs and residues are explained at the bottom of the figure.

Sequence alignment (Clustal Omega) and comparisons of the predicted proteins from the annotated *T. cruzi* fibrillarins encoding genes indicate almost complete identity between haplotypes of the same gene (96–99% identical residues), and modest conservation

(65–66% identical residues) when the alignment comparison was carried out between the two deduced fibrillarins-type sequences (i.e. *TcFib1* vs *TcFib2*).

Analysis of the deduced amino acid sequences of both *T. cruzi* fibrillarins allowed for the

identification of relevant residues and motifs characterized in other species. Figure 1C depicts both the N-terminal GAR region and the MeTase domain. The MeTase domain initiates at residue V61 in TcFib1 and Q62 in TcFib2. A small collection of conserved residues was identified within the MeTase domain: Y142, G144, E168, F169, D193, A194, V195 and Q197. It has been shown from the archaeobacterium species *Aeropyrum pernix* that these residues are involved in stabilizing the cofactor AdoMet (De Silva *et al.* 2012). In addition, the sequence data also permitted the identification of two potential RNA-binding sites (K120- G161 and V208- K264) and a conserved G M/V V Y A I/V E F octamer that may promote the proper folding of the central RNA-binding site (Fig. 1C). These elements were previously characterized in a recombinant version of fibrillarin 2 from *Arabidopsis thaliana* (Rakitina *et al.* 2011). An absolutely conserved aspartate (D214 in our coordinates) has been distinguished with a central role in the catalytic function of eukaryotic and archaeal fibrillarins (Reichow *et al.* 2007). Finally, four functional motifs responsible for AdoMet binding in *Saccharomyces cerevisiae* can also be identified in the sequence here characterized: V140-G148; V164-E168; (M/L)207-F212; F231-I240 (Niewmierzycka and Clarke, 1999).

Both recombinant fibrillarin genes are expressed and localized in the nucleolus

Gene type specific fibrillarin DNA probes were hybridized with total RNA in Northern blots. It was found that both *TcFib1* and *TcFib2* genes are transcribed, and in the two cases RNA species of approximately 1.3 kb were revealed (not shown). This transcript size is more than sufficient to code for proteins of 31 kDa. To explore whether both fibrillarin encoding mRNAs produce nucleolar proteins, the two types of chimaeric fibrillarin-EGFP fusions were independently transfected into culture-derived epimastigotes, and their cellular location was analysed by fluorescence microscopy. The occurrence of a fluorescent signal in the nucleolus was observed in cell lines transfected with the chimaeric gene of either type (i.e. *TcFib1* or *TcFib2*). Transfections with a non-chimaeric EGFP bearing vector were analysed as a control, and its fluorescence was observed throughout the cell body (Fig. 2).

Fibrillarin nucleolar relocation in stationary epimastigotes

Growth-arrested epimastigotes at the stationary phase provide an experimental model in *T. cruzi* cells to address differences in nucleolar size and nucleolar architecture (Nepomuceno-Mejia *et al.* 2010). To analyse potential differences in the

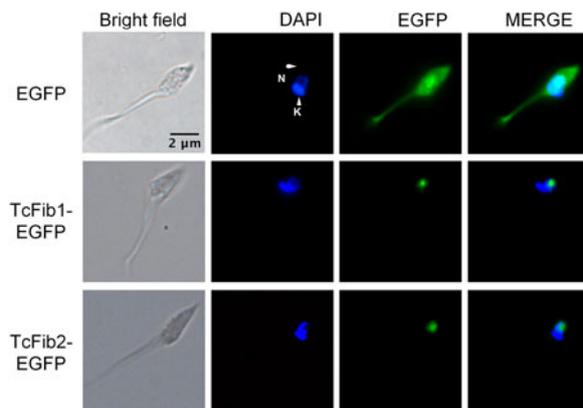


Fig. 2. Nucleolar expression of EGFP-tagged *T. cruzi* fibrillarins. Both *T. cruzi* fibrillarin genes were ectopically expressed as fusion proteins tagged with EGFP. Transfection of the individual EGFP coding region is presented in the first row as a control. Nucleus and kinetoplast organelles are indicated as N and K, respectively.

abundance of fibrillarin between growing epimastigotes and stationary cells, anti-fibrillarin antibodies were prepared. Two groups of mice were immunized with either version of bacterial recombinant fibrillarin (i.e. GST-TcFib1 or GST-TcFib2), but it is to be noted that only the group of mice exposed to TcFib2 made informative antibodies (i.e. signal producers). Figure 3A shows the recognition of the endogenous fibrillarin as well as of the fusion version of the protein by the anti-TcFib2 antibody. This antibody was used to probe Western blots with cellular extracts from exponential and stationary cells. Figure 3C illustrates a similar abundance of fibrillarin (at least TcFib2) in cells harvested at the referred different growing phases. Interestingly, changes in fibrillarin location within aged cells could be detected. A nucleolar concentration of the fluorescent signal was observed in epimastigotes from the exponential phase of growth, whereas in stationary cells the fluorescence was located throughout the cytoplasm, with a diffuse and granular pattern (Fig. 4). Conspicuously, the cytoplasmic relocation of fibrillarin in stationary cells could not be seen with the EGFP-tagged version of the protein. A structural hindrance of the chimaeric fibrillarin may be postulated to account for its defect in the nucleolar-cytoplasmic relocation event. Finally, in our culture conditions, approximately 10% of cells at the stationary phase transform into metacyclic trypomastigotes. These forms showed a granular cytoplasmic distribution of fibrillarin (Fig. 5).

An early observation of a partial fibrillarin relocation from the nucleolus to the cytoplasm was published for *Xenopus* kidney cells (Rivera-Léon and Gerbi, 1997). The experimental stimulus in this case was actinomycin D, which is known to impair

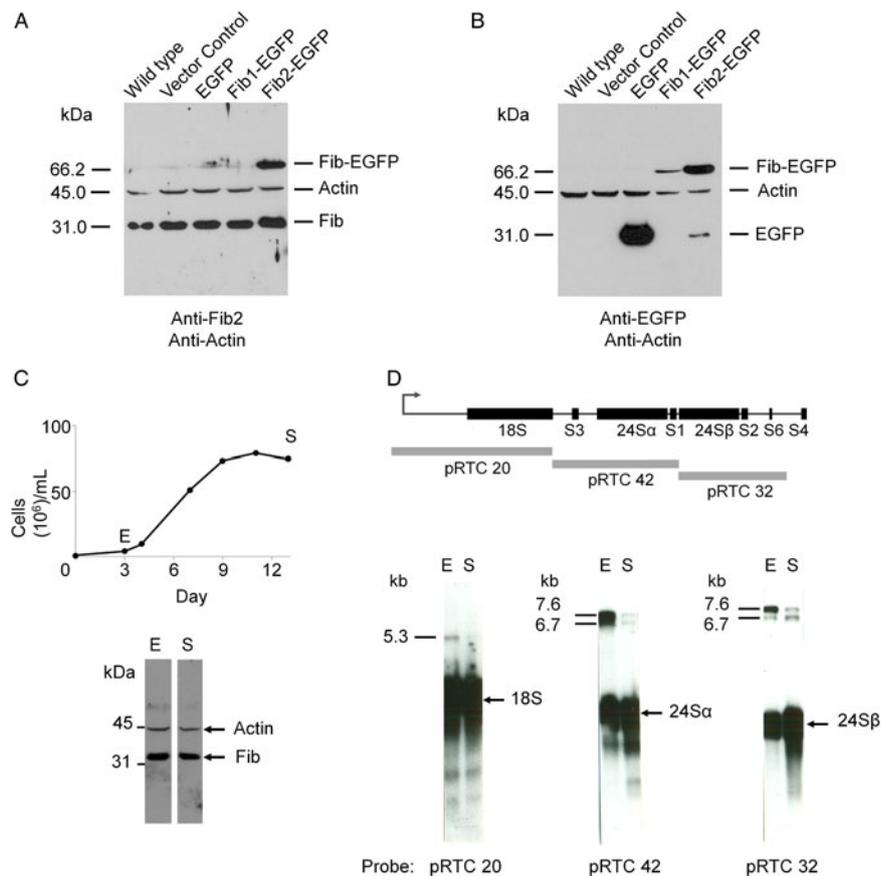


Fig. 3. Top: Expression of fibrillarins and EGFP–fibrillarins fusion proteins in epimastigotes. Protein extracts from either wild-type parasites or transfected epimastigotes (as indicated) were probed with either anti-TcFib2 antibodies (A) or anti-EGFP antibodies (B). In addition, an anti-Tcactin polyclonal antibody was used as a protein loading reference in both blots (Cevallos *et al.* 2011). Bottom: Steady-state concentration of fibrillarins and pre-rRNAs in exponential and stationary epimastigotes. (C) Representative epimastigote growth curve, and comparative Western blot of total cellular proteins with both anti-actin (loading control) and anti-Fib2 homologous polyclonal antisera. The protein size markers are broad-range SDS–PAGE standards from Bio Rad Laboratories (California). (D) Northern blots of total RNA probed with the indicated genomic clones with different regions of the rRNA gene transcription unit. Size estimation of molecular species was carried out using Gibco BRL RNA markers (0.2–9.5 kb). In both Western- and Northern blots, the same sample amount from the exponential phase or stationary cultures was loaded in the gels for their comparison.

RNA polymerase I activity. In this cited report, it was found that fibrillarins relocation correlated with a diminished abundance of pre-rRNAs, particularly those comprising the 18S mature rRNA. With such a reference, a potential difference in the steady-state concentration of pre-rRNAs between exponential and stationary *T. cruzi* epimastigotes was investigated by probing Northern blots of total RNA with genomic clones from the rDNA cistron. As expected for a ribosome-demanding physiological condition such as cellular growth, rRNA precursor molecules were more abundant in exponentially growing cells (E) than in stationary phase cells (S) (Fig. 3D).

DISCUSSION

To further study of nucleolar components in *T. cruzi*, we present our findings on the general characterization of fibrillarins expression and localization

in exponentially growing and stationary epimastigotes in culture. *Fibrillarins* is annotated in the CL Brener hybrid reference strain as two pairs of haplotype genes. Their deduced amino acid sequences differ by approximately 35% (identity comparison). In spite of these dissimilarities, potential functional domains such as the GAR region and the MeTase domain can be recognized in both of the *T. cruzi* orthologues. Studies performed on *A. pernix*, *A. thaliana* and *S. cerevisiae* provide valuable descriptions of fibrillarins functional domains (Niewmierzycka and Clarke, 1999; Reichow *et al.* 2007; Rakitina *et al.* 2011; De Silva *et al.* 2012). Given that these features are observed in the deduced proteins from both *T. cruzi* fibrillarins genes, no obvious functional discrimination can be predicted for either of them.

Arabidopsis thaliana is a species with two fibrillarins genes that encode nearly identical proteins (Barneche *et al.* 2000). Potential differences in their

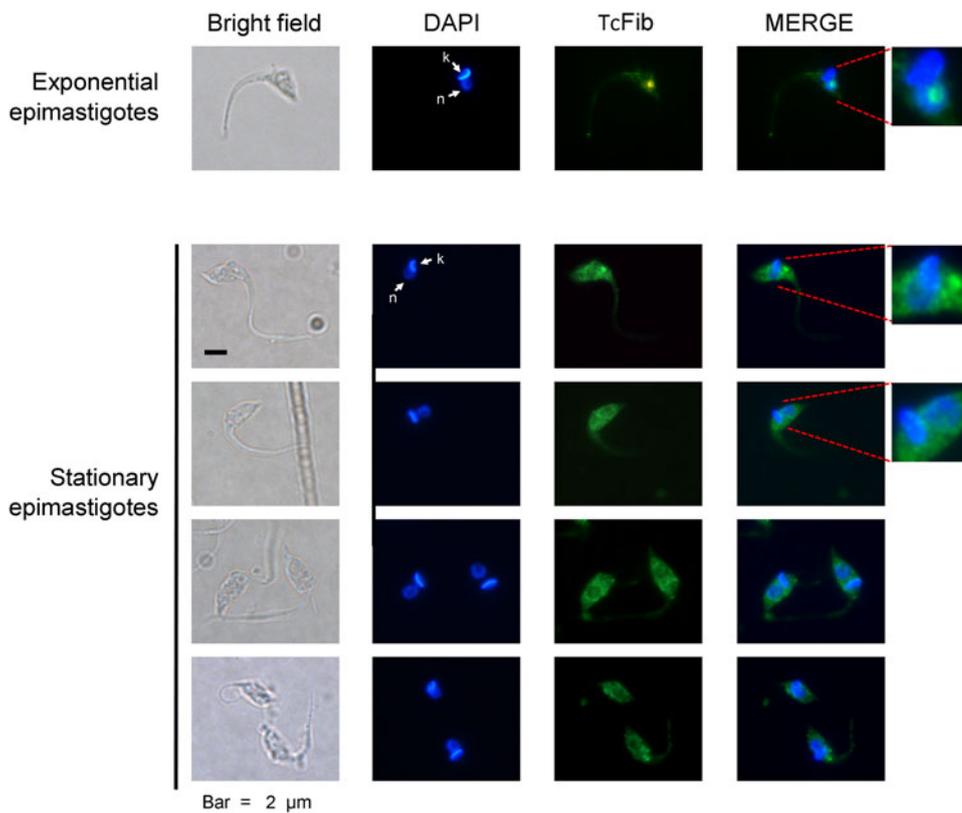


Fig. 4. Fibrillarin expression in epimastigotes. Epifluorescence images of epimastigotes after staining with anti-TcFib2 antibodies (green) and DAPI (blue). A selected image of growing epimastigotes is shown in the top panel, a collection of images of stationary cells is presented below. In some cases an amplified inset of the nuclear region (merged image) is presented to better illustrate the relation between fluorescent signals.

function have not been addressed other than that both proteins complement a *NOP-1* null yeast mutant. Accessed genomes from trypanosomatids

contain at least two annotated fibrillarin genes. The only experimental description of one gene has been done in *T. brucei* (Barth *et al.* 2008). In this study, *NOP1* (accession number TriTryp: Tb927.10.7500) was silenced by RNA interference. The associated phenotype was cellular lethality and rRNA processing and modification defects.

Data on two dissimilar *fibrillarin* genes in *T. cruzi* are presented here. Ectopic *fibrillarin* gene expression from plasmid vectors produced nucleolar location of fluorescent EGFP fusions for both *TcFib1* and *TcFib2* chimaeric genes. An equivalent finding was observed in *T. brucei* cells transfected with a *NOP1-GFP* fusion (Marchetti *et al.* 2000). In the present work, an antiserum could be raised against TcFib2 recombinant protein. This antibody recognized a nucleolar protein in exponentially growing epimastigotes. Potential linkage of its expression regulation to non-dividing conditions was addressed. It is to be noted that non-growing epimastigotes from the stationary phase harbour a nucleolus reduced in both size and granularity (Nepomuceno-Mejía *et al.* 2010). This type of cell expresses a similar amount of fibrillarin, at least TcFib2, compared with exponentially growing epimastigotes. Interestingly, most cells from aged cultures presented a granular cytoplasmic fluorescent signal, as did the metacyclic trypomastigotes that

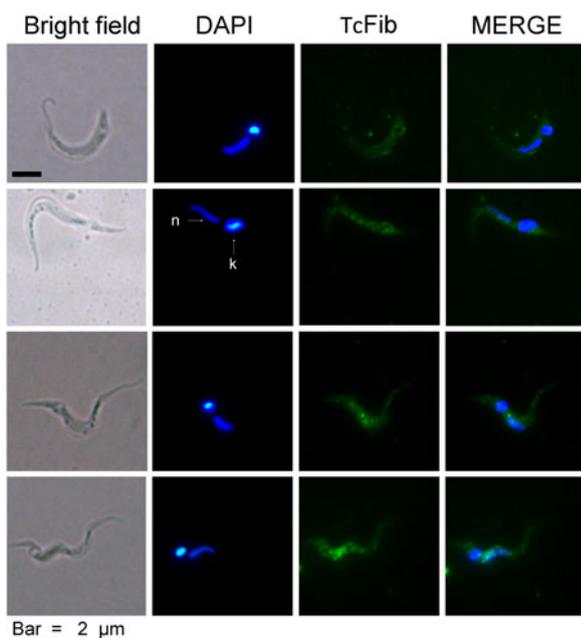


Fig. 5. Fibrillarin expression in metacyclic trypomastigotes. Epifluorescence images of trypomastigotes from cultures at the stationary phase after staining with anti-TcFib2 antibodies (green) and DAPI (blue).

appear in these stressed cultures. Trypomastigotes are nucleolar-less cells as reported by Elias *et al.* 2001. A partial relocation of nucleolar fibrillarins to the cytoplasm after a low dose of actinomycin D exposure has been described in *Xenopus* kidney cells. This observation occurred in correlation with a reduction of pre-rRNA abundance, specifically those molecular species that produce the mature small subunit rRNA component (Rivera-Léon and Gerbi, 1997). The finding presented here of reduced rRNA precursor abundance in stationary *T. cruzi* cells is consistent with this early observation (Rivera-Léon and Gerbi, 1997). It can be then suggested that the intracellular location of fibrillarins in *T. cruzi* depends on physiological processes, yet to be determined.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Juliana Herrera-López, Karla López-Pacheco and Patricia Espinosa-Cueto for technical assistance. We also acknowledge Evelyn Fein for her help in the very early stages of this work.

FINANCIAL SUPPORT

Ernesto Guerrero-Sánchez was a doctoral student from Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) and received fellowship 362997 from CONACyT. We also acknowledge financial support from Dirección General de Asuntos de Personal Académico, UNAM, through grant IN201014 (R.H.).

REFERENCES

- Amiri, K. A. (1994). Fibrillarins-like proteins occur in the domain Archaea. *Journal of Bacteriology* **176**, 2124–2127.
- Barneche, F., Steinmetz, F. and Echeverria, M. (2000). Fibrillarins genes encode both a conserved nucleolar protein and a novel small nucleolar RNA involved in ribosomal RNA methylation in *Arabidopsis thaliana*. *The Journal of Biological Chemistry* **275**, 27212–27220.
- Barth, S., Shalem, B., Hury, A., Tkacz, I. D., Liang, X.-H., Uliel, S., Myslyuk, I., Doniger, T., Salmon-Divon, M., Unger, R. and Michaeli, S. (2008). Elucidating the role of C/D snoRNA in rRNA processing and modification in *Trypanosoma brucei*. *Eukaryotic Cell* **7**, 86–101.
- Camargo, E. P. (1964). Growth and differentiation in *Trypanosoma cruzi*. I. Origin of metacyclic trypanosomes in liquid media. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* **6**, 93–100.
- Cevallos, A. M., Segura-Kato, Y. X., Merchant-Larios, H., Manning-Cela, R., Alberto Hernández-Osorio, L., Márquez-Dueñas, C., Ambrosio, J. R., Reynoso-Ducoing, O. and Hernández, R. (2011). *Trypanosoma cruzi*: multiple actin isovariants are observed along different developmental stages. *Experimental Parasitology* **127**, 249–259.
- Collins, T. J. (2007). ImageJ for microscopy. *Biotechniques* **43**, 25–30.
- De Silva, U., Zhou, Z. and Brown, B. A. (2012). Structure of *Aeropyrum pernix* fibrillarins in complex with natively bound S-adenosyl-L-methionine at 1.7 Å resolution. *Acta Crystallographica F, Structural Biology and Crystallization Communications* **68**, 854–859.
- El-Sayed, N. M., Myler, P. J., Bartholomeu, D. C., Nilsson, D., Aggarwal, G., Tran, A.-N., Ghedin, E., Worthey, E. A., Delcher, A. L., Blandin, G., Westenberger, S. J., Caler, E., Cerqueira, G. C., Branche, C., Haas, B., Anupama, A., Arner, E., Aslund, L., Attipoe, P., Bontempi, E., Bringaud, F., Burton, P., Cadag, E., Campbell, D. A., Carrington, M., Crabtree, J., Darban, H., da

- Silveira, J. F., de Jong, P., Edwards, K. *et al.* (2005). The genome sequence of *Trypanosoma cruzi*, etiologic agent of Chagas disease. *Science (New York, NY)* **309**, 409–415.
- Elias, M. C., Marques-Porto, R., Freymüller, E. and Schenkman, S. (2001). Transcription rate modulation through the *Trypanosoma cruzi* life cycle occurs in parallel with changes in nuclear organisation. *Molecular and Biochemical Parasitology* **112**, 79–90.
- Finn, R. D., Bateman, A., Clements, J., Coggill, P., Eberhardt, R. Y., Eddy, S. R., Heger, A., Hetherington, K., Holm, L., Mistry, J., Sonnhammer, E. L. L., Tate, J. and Punta, M. (2014). Pfam: the protein families database. *Nucleic Acids Research* **42** (Database issue), D222–D230.
- Gerbi, S. A., Borovjagin, A. V., Ezrokhi, M. and Lange, T. S. (2001). Ribosome biogenesis: role of small nucleolar RNA in maturation of eukaryotic rRNA. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* **66**, 575–590.
- Hernández, R. and Cevallos, A. M. (2014). Ribosomal RNA gene transcription in trypanosomes. *Parasitology Research* **113**, 2415–2424.
- Hernández, R., Díaz-de León, F. and Castañeda, M. (1988). Molecular cloning and partial characterization of ribosomal RNA genes from *Trypanosoma cruzi*. *Molecular and Biochemical Parasitology* **27**, 275–279.
- 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 Research* **20**, 3963–3969.
- Lafontaine, D. L. and Tollervey, D. (2000). Synthesis and assembly of the box C + D small nucleolar RNPs. *Molecular and Cellular Biology* **20**, 2650–2659.
- Marchetti, M. A., Tschudi, C., Kwon, H., Wolin, S. L. and Ullu, E. (2000). Import of proteins into the trypanosome nucleus and their distribution at karyokinesis. *Journal of Cell Science* **113**, 899–906.
- Martínez-Calvillo, S., López-Villaseñor, I. and Hernández, R. (1997). pRIBOTEX expression vector: a pTEX derivative for a rapid selection of *Trypanosoma cruzi* transfectants. *Gene* **199**, 71–76.
- Michaeli, S. (2012). rRNA Biogenesis in Trypanosomes. In *RNA Metabolism in Trypanosomes* (ed. Bindereif, A.), pp. 123–148. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg.
- Nepomuceno-Mejía, T., Lara-Martínez, R., Cevallos, A. M., López-Villaseñor, I., Jiménez-García, L. F. and Hernández, R. (2010). The *Trypanosoma cruzi* nucleolus: a morphometrical analysis of cultured epimastigotes in the exponential and stationary phases. *FEMS Microbiology Letters* **313**, 41–46.
- Niewmierzycka, A. and Clarke, S. (1999). S-Adenosylmethionine-dependent methylation in *Saccharomyces cerevisiae*. Identification of a novel protein arginine methyltransferase. *The Journal of Biological Chemistry* **274**, 814–824.
- Olson, M. O. J. and Dundr, M. (2005). The moving parts of the nucleolus. *Histochemistry and Cell Biology* **123**, 203–216.
- Rakitina, D. V., Taliansky, M., Brown, J. W. S. and Kalinina, N. O. (2011). Two RNA-binding sites in plant fibrillarins provide interactions with various RNA substrates. *Nucleic Acids Research* **39**, 8869–8880.
- Reichow, S. L., Hamma, T., Ferré-D'Amaré, A. R. and Varani, G. (2007). The structure and function of small nucleolar ribonucleoproteins. *Nucleic Acids Research* **35**, 1452–1464.
- Rivera-Léon, R. and Gerbi, S. A. (1997). Delocalization of some small nucleolar RNPs after actinomycin D treatment to deplete early pre-rRNAs. *Chromosoma* **105**, 506–514.
- Schimmang, T., Tollervey, D., Kern, H., Frank, R. and Hurt, E. C. (1989). A yeast nucleolar protein related to mammalian fibrillarins is associated with small nucleolar RNA and is essential for viability. *The EMBO Journal* **8**, 4015–4024.
- Sievers, F., Wilm, A., Dineen, D., Gibson, T. J., Karplus, K., Li, W., Lopez, R., McWilliam, H., Remmert, M., Söding, J., Thompson, J. D. and Higgins, D. G. (2011). Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. *Molecular Systems Biology* **7**, 539.
- Tollervey, D., Lehtonen, H., Carmo-Fonseca, M. and Hurt, E. C. (1991). The small nucleolar RNP protein NOP1 (fibrillarins) is required for pre-rRNA processing in yeast. *The EMBO Journal* **10**, 573–583.
- Wang, H., Boisvert, D., Kim, K. K., Kim, R. and Kim, S. H. (2000). Crystal structure of a fibrillarins homologue from *Methanococcus jamareschii*, a hyperthermophile, at 1.6 Å resolution. *The EMBO Journal* **19**, 317–323.
- Waterhouse, A. M., Procter, J. B., Martin, D. M. A., Clamp, M. and Barton, G. J. (2009). Jalview Version 2 -- a multiple sequence alignment editor and analysis workbench. *Bioinformatics (Oxford, England)* **25**, 1189–1191.