



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS  
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO

Identificación y caracterización de la región promotora  
de la unidad fundamental de transcripción de  
RNA ribosomal de Trypanosoma cruzi.

T E S I S

Que para obtener el Grado Académico de  
MAESTRO EN CIENCIAS  
(BIOLOGIA CELULAR)  
p r e s e n t a:

SANTIAGO MARTINEZ CALVILLO

Director de Tesis: Dr. Roberto José Rafael Hernández Fernández

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



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 está 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.

## CONTENIDO.

	página
ABREVIATURAS	IV
RESUMEN	VI
INTRODUCCION	1
OBJETIVOS	14
MATERIALES Y METODOS	15
1. Cultivo y extracción de ácidos nucleicos de <u>T. cruzi</u> .	15
1.1 Cultivos celulares.	15
1.2 Extracción de RNA total.	15
1.3 Extracción de DNA total.	17
2. Preparación de plásmidos y marcaje de frag- mentos de DNA.	18
2.1 Recuperación de DNA de geles de agarosa de bajo punto de fusión.	18
2.2 Ligaciones.	18
2.3 Preparación y transformación de células competentes de la cepa MC1061 de <u>E. coli</u> .	19
2.4 Purificación de plásmido en pequeña es- cala (minipreps).	20
2.5 Purificación de plásmido por gradiente de cloruro de cesio y bromuro de etidio.	21
2.6 Síntesis de sondas de DNA uniformemente marcadas.	22

2.7 Marcaje de fragmentos de DNA en su extremo 3'.	23
3. Caracterizaciones génicas.	23
3.1 Secuenciación de DNA.	23
3.11 Preparación y transformación de células competentes de la cepa JM101 de <u>E. coli</u> .	25
3.12 Preparación de DNA de cadena sencilla.	26
3.13 Reacciones de secuenciación.	27
3.14 Preparación del gel y electroforesis.	28
3.2 Experimento tipo Southern.	29
3.3 Experimento tipo Northern.	30
3.4 Ensayo de protección con nucleasa S1.	31
3.41 Marcaje de fragmentos de DNA.	32
3.42 Hibridación y digestión con nucleasa S1.	33
3.43 Preparación del gel y electroforesis.	34
3.5 Ensayo de "extensión del primero".	34
3.51 Marcaje del oligonucleótido.	35
3.52 Hibridación.	36
3.53 Extensión del oligonucleótido.	36
4. Alineamientos, comparación de secuencias y generación de estructuras secundarias de RNA.	37
RESULTADOS.	39
- Subclonación de fragmentos genómicos de la unidad de transcripción de RNA ribosomal.	39
- Secuenciación del fragmento pRTC19.	41

- Localización del sitio de inicio de la transcripción de la unidad de RNA ribosomal.	43
- Comparación de la región promotora de RNAr en tripanosomatidios.	51
- Análisis del grado de heterogeneidad en la región promotora de RNAr de <u>T. cruzi</u> .	53
- Generación de la estructura secundaria del espaciador transcrito externo del extremo 5' de la unidad de RNAr.	54
DISCUSION.	67
BIBLIOGRAFIA.	77
APENDICE.	87

## ABREVIATURAS

ATP	Trifosfato de adenosina
END-celulosa	Benzoilato Naftilato DEAE-celulosa
CAT	Cloranfenicol acetil transferasa
cDNA	Acido desoxirribonucleico complementario
Ci	Curie
cpm	cuentas por minuto
dATP	Trifosfato de desoxiadenosina
ddNTPs	2',3'-didesoxinucleósidos 5'-trifosfatados
DNA	Acido desoxirribonucleico
DNasa	Desoxirribonucleasa
dNTPs	2'-desoxinucleósidos 5'-trifosfatados
DPC	Dietilpirocarbonato
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Acido etilendiamino tetracético
ETE-5'	Espaciador transcrito externo del extremo 5'
IPTG	Isopropiltio- $\beta$ -D-galactósido
Kb	Kilobases
MOPS	Acido propanosulfónico 3-(N-Morfolino)
NP40	Nonidet P-40
pb	pares de bases
PBS	Solución salina amortiguadora de fosfatos
PEG	Poli-etilenglicol
PIPES	Piperazin-N,N'-bis (ácido 2-etanosulfónico)
PVP	Polivinil-pirrolidon
RNA	Acido ribonucleico

RNAr	Acido ribonucleico ribosomal
RNasa	Ribonucleasa
RNAt	Acido ribonucleico de transferencia
rpm	Revoluciones por minuto
SDS	Dodecil-sulfato de sodio
TEMED	N,N,N',N'-Tetrametiltilenodiamina
X-gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil- $\beta$ -galactósido.

## RESUMEN.

En el presente trabajo se identificó y secuenció la región promotora de la unidad fundamental de transcripción de RNA ribosomal (RNAr) de Trypanosoma cruzi. La ubicación del sitio de inicio de la transcripción se realizó mediante experimentos tipo Northern y ensayos de protección con nucleasa S1. Por medio de experimentos de "extensión del primero" se determinó que el primer nucleótido transcrito corresponde a una G ubicada a 1768 pb del extremo 5' de la región codificadora del RNAr 18S. Al alinear la secuencia del promotor de RNAr de T. cruzi (de los nucleótidos -150 a +20, considerando como +1 el primer nucleótido transcrito) con los promotores ribosomales de otros tripanosomatidios (T. brucei y C. fasciculata) no se encontraron bloques de secuencias conservadas. Además, se compararon las secuencias que flanquean el sitio de inicio de la transcripción (de las bases -20 a +10) en varios grupos de organismos eucariontes, encontrándose que entre los tripanosomatidios se presentan las mayores diferencias. Estos datos concuerdan con las observaciones llevadas a cabo con secuencias de moléculas maduras de RNAr, del gen de  $\beta$ -tubulina y de la histona H4, que sugieren que los tripanosomatidios son un grupo de organismos que durante la evolución se separó tempranamente del resto de los eucariontes. Los resultados también apoyan la conclusión de que dentro de la familia Trypanosomatidae se agrupan



organismos genética y parasitológicamente muy distintos, algunos de los cuales son, sin embargo, considerados como un mismo género. Finalmente, se secuenció todo el espaciador transcrito externo del extremo 5' de la unidad de RNAr y se obtuvo su probable estructura secundaria.

I N T R O D U C C I O N

Generalidades del parásito.

Trypanosoma cruzi es un parásito unicelular que pertenece a la familia Trypanosomatidae. En esta familia se incluyen 9 generos, algunos de los cuales, como Crithidia y Leptomonas, son parasitos de invertebrados. Phytomonas es un género parásito de plantas, mientras que Leishmania y Trypanosoma parasitan tanto a organismos vertebrados como invertebrados. Dentro de los tripanosomas se incluyen especies africanas, como T. brucei, y especies americanas como T. cruzi (McGhee y Cosgrove, 1980; Pereira, 1990).

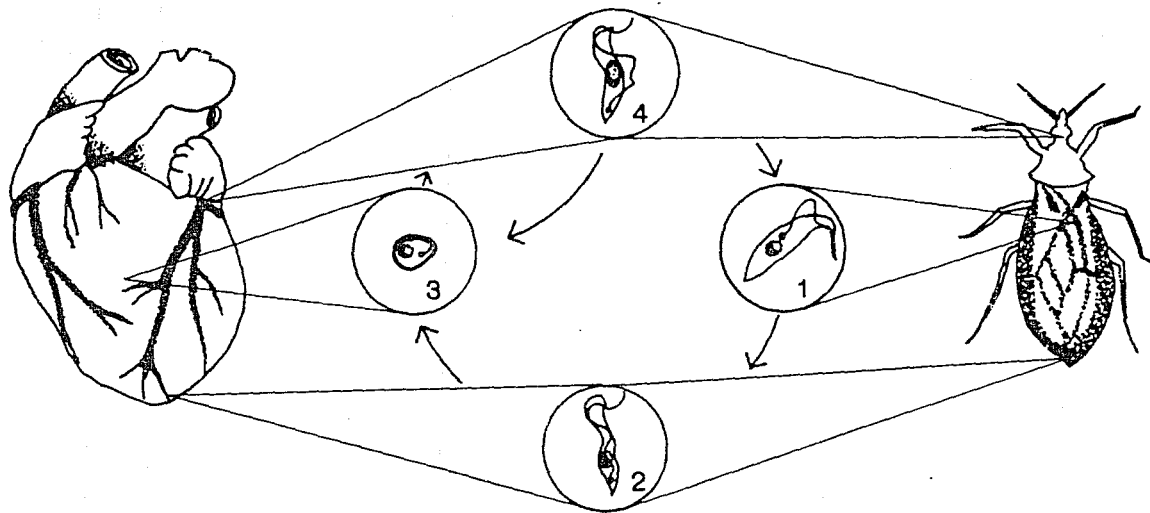
En el hombre, T. cruzi produce la enfermedad de Chagas o tripanosomiasis americana, padecimiento que afecta a más de 20 millones de personas en Latinoamérica (Kahn et al., 1991). En su fase crónica, esta enfermedad se manifiesta con alteraciones graves en el corazón, esofago y/o colon, que pueden conducir a la muerte del individuo (Dias, 1984; Kierszenbaum y Hudson, 1985).

El protozoario es transmitido al hombre por más de 110 especies de insectos hemipteros hematofagos, de la familia Reduviidae, principalmente de los géneros Triatoma, Rhodnius y Panstrongylus (García y Azambuja, 1991). Sin embargo, esta no es la única vía de transmisión, ya que hay

individuos que se infectan por transfusión sanguínea, vía digestiva o en forma congénita (Dias, 1984).

A lo largo de su ciclo de vida, T. cruzi atraviesa por tres estadios de desarrollo: amastigote, epimastigote y tripomastigote (figura 1; Nogueira, 1986; Pereira 1990). Los amastigotes son formas redondas que poseen un flagelo corto, y se replican dentro de las células del hospedero vertebrado. Los epimastigotes son organismos ovoides, de 20 a 40  $\mu\text{m}$  de largo, que se localizan en el intestino del insecto, en donde se replican extracelularmente. El tripomastigote es el estadio que transmite la infección del insecto al mamífero, aunque no es capaz de replicarse. Esta forma tiene una longitud aproximada de 25  $\mu\text{m}$ , y se observa en el recto del vector (tripomastigote metacíclico), y en la sangre del mamífero infectado (tripomastigote procíclico o de forma sanguínea).

La infección del huésped vertebrado puede iniciarse cuando un insecto infectado ingiere sangre de este, defecando al mismo tiempo y liberando tripomastigotes metacíclicos en sus heces y orina (figura 1). Los tripomastigotes entran al vertebrado por heridas de la piel, como el mismo piquete del insecto, o por membranas mucosas. Una vez en el hospedero vertebrado, los tripomastigotes penetran en sus células y se diferencian en amastigotes, los cuales se dividen repetidamente por fisión binaria, dando



- 1 Epimastigote
- 2 Tripomastigote metacíclico
- 3 Amastigote
- 4 Tripomastigote procíclico

Figura 1. Ciclo de vida de Trypanosoma cruzi.

lugar nuevamente a tripomastigotes. Esta forma de tripomastigotes se libera al torrente sanguíneo por lisis celular, pudiendo infectar a otras células. Si un insecto hematófago se alimenta con la sangre infectada, puede ingerir tripomastigotes de ésta. Ya en el insecto, los tripomastigotes se transforman en epimastigotes, los cuales migran al intestino medio, en donde se dividen repetidamente. En el recto, los epimastigotes se diferencian en tripomastigotes metacíclicos. Los tripomastigotes son liberados en las heces del insecto, en el momento en el que éste repite una ingesta sanguínea de un vertebrado (Nogueira, 1986; Pereira 1990).

Nuestro interés de investigación en este protozoario es fundamentalmente básico, dirigido a conocer la organización y estructura del RNA ribosomal (RNAr), así como a entender los mecanismos mediante los cuales se lleva a cabo su síntesis y procesamiento.

#### Organización de los genes del RNA ribosomal.

La mayoría de los organismos eucariontes contienen en sus ribosomas dos moléculas grandes de RNA ribosomal, 18S y 28S, y dos moléculas pequeñas, 5.8S y 5S. Los genes de las moléculas 18S, 5.8S y 28S forman parte de la unidad fundamental o cistrón de RNAr (figura 2), y se transcriben en un RNA precursor común (40-47S). Este precursor

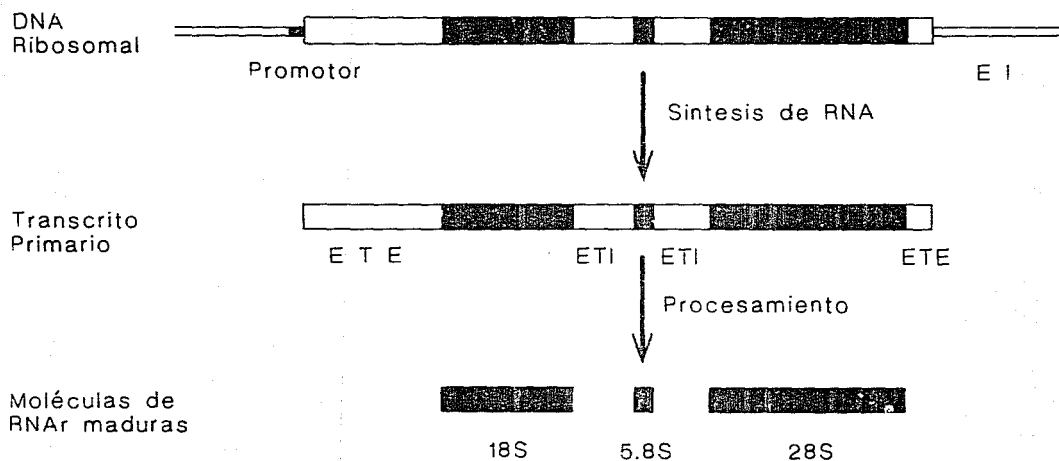


Figura 2. Síntesis y procesamiento del transcrito primario de RNAr. El: espaciador intergénico; ETE: espaciadores transcritos externos; ETI: espaciadores transcritos internos.

ribosomal incluye espaciadores transcritos internos y externos, los cuales son eliminados para generar las moléculas de RNAr maduras (Sollner-Webb y Tower, 1986).

Las células eucariontes presentan de 100 a 5000 copias de la unidad fundamental de transcripción de RNAr, organizadas en sucesiones lineales (arreglo en "tandem"), en uno o varios cromosomas, o en elementos extracromosomales (Reeder, 1990). Las copias de la unidad de transcripción se separan entre sí por espaciadores intergénicos (anteriormente denominados espaciadores no transcritos), cuyo tamaño varía de 2 a 30 Kb (Sollner-Webb y Mougey, 1991). El complejo de la RNA polimerasa I (RNA pol I) es el encargado de la transcripción del locus de RNA ribosomal. La transcripción y el procesamiento del transcrito primario se llevan a cabo en los centros fibrilares y el componente fibrilar denso del nucleolo (Thiry, 1992).

Las regiones codificadoras para el RNA 5S generalmente no forman parte de la unidad de RNAr, sino que constituyen un locus independiente, transcrito por la RNA polimerasa de tipo III (Geiduscheck y Tocchini-Valentini, 1988).

Con respecto a los tripanosomatidios (T. cruzi, T. brucei y C. fasciculata) se ha encontrado que su RNAr tipo 28S presenta un procesamiento atípico (Gray, 1981; Hernández

et al., 1983), originándose dos moléculas grandes (24S $\alpha$  y 24S $\beta$ ) y cuatro moléculas pequeñas (S1, S2, S4 y S6; figura 3). El análisis de las secuencias y las estructuras secundarias de estas seis moléculas de RNAr ha permitido establecer su analogía con los distintos dominios del RNA 28S típico, encontrándose, por ejemplo, que las moléculas S2, S6 y S4 son análogas al dominio VII de la molécula 28S (White et al., 1986). Por otra parte, la molécula S3 es equivalente al RNA 5.8S (Gómez et al., 1991) y la molécula S5 es análoga al RNA 5S de otros organismos (Hernández-Rivas et al., 1992). En los tripanosomatidios, como en la mayoría de los eucariontes, el RNA S5 no forma parte de la unidad fundamental de transcripción (Hernández-Rivas et al., 1992).

Dentro de la unidad de RNAr de los tripanosomatidios las regiones codificadoras de las 8 moléculas de RNAr presentan una organización compleja (figura 3), ya que se encuentran separadas por espaciadores transcritos, que son eliminados al procesarse el RNA precursor (Hernández et al., 1988).

Uno de los principales intereses en el laboratorio del Dr. Roberto Hernández es estudiar cómo se regula la síntesis del RNA ribosomal en T. cruzi, y como se coordina su expresión con la de los otros componentes del ribosoma (RNAr 5S y proteínas ribosomales). Como un primer paso para realizar este tipo de estudios es necesario localizar y



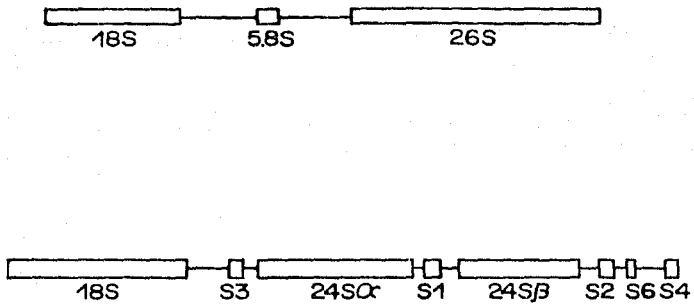


Figura 3. Representación esquemática de las unidades de transcripción de RNA ribosomal de Saccharomyces cerevisiae (parte superior) y Trypanosoma brucei (parte inferior).

caracterizar la región promotora de la unidad de transcripción de RNA ribosomal.

### **Estructura de las regiones promotoras de la unidad fundamental de RNAr.**

En varios organismos eucariontes, principalmente vertebrados, ha sido ubicado el sitio de inicio de la transcripción, y ha sido caracterizada la región promotora de la unidad de transcripción de RNAr (Sommerville, 1984). Mientras que los genes para las moléculas de RNAr presentan secuencias muy conservadas entre diversos organismos, las secuencias promotoras de su transcripción no presentan similitud, salvo en especies muy relacionadas filogenéticamente (Balzi et al., 1985). Resulta interesante que los promotores de genes para RNAr no presenten elementos conservados, como la caja TATA de los promotores de la RNA polimerasa II (White y Jackson, 1992), o las cajas A y C de las regiones promotoras de la RNA polimerasa tipo III (Geiduscheck y Tocchini-Valentini, 1988).

El análisis funcional de los promotores de RNAr en vertebrados indica que, a pesar de las diferencias en secuencia, estos promotores presentan una organización estructural común (Sollner-Webb y Mougey, 1991). Se ha encontrado que el promotor de RNAr está formado por dos regiones distintas: el dominio central ("core domain") y el

dominio "río arriba" ("upstream domain"; Ishikawa et al., 1991). En células humanas, el dominio central se extiende del nucleótido +20 al -45, incluyendo el sitio de inicio de la transcripción (+1), y contiene secuencias esenciales para el inicio correcto de la transcripción. El dominio "río arriba" se localiza del nucleótido -107 al -186, e incluye secuencias que activan la transcripción (figura 4; Bell et al., 1988). La función del dominio "río arriba" se afecta al modificarse su distancia u orientación con respecto al dominio central, lo que sugiere que estas dos secuencias de control operan en conjunto, para promover una eficiente transcripción por la RNA pol I (Bell et al., 1988).

Una configuración similar a la del promotor de RNAr de humano se ha reportado para los promotores ribosomales de otros organismos, como ratón (Schnapp et al., 1991), rata (Xie et al., 1991), Xenopus (Labhart y Reeder, 1989) y levadura (Young-Choe et al., 1992). En Acanthamoeba castellanii la región promotora del RNAr es menos compleja, componiéndose sólo de un dominio central, que se localiza del nucleótido -47 al +8 (Paule et al., 1991).

En vertebrados, se ha observado que dos factores proteicos, UBF1 ("upstream binding factor") y SL1 ("selectivity factor"), son necesarios para que se lleve a cabo la transcripción de la unidad de RNAr (Jantzen et al.,

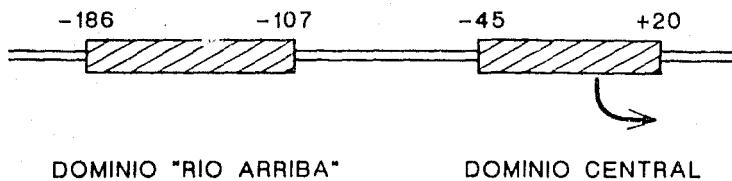


Figura 4. Estructura de la región promotora de la transcripción en la unidad de RNAr de humano. La flecha que se presenta en el dominio central indica el sitio de inicio de la transcripción.

1990; Kuhn y Grummt, 1992). UBF1 es capaz de unirse a los dos dominios del promotor. Posteriormente SL1 interactúa con UBF1, y el complejo resultante es reconocido por la RNA pol I, iniciándose entonces la transcripción (Bell et al., 1988).

Se ha demostrado que la transcripción del RNAr es especie-específica, es decir, que la maquinaria transcripcional de una especie no es capaz de reconocer al promotor de RNAr de otra especie, a menos de que sean organismos muy emparentados (Grummt et al., 1982). Así tenemos, por ejemplo, que extractos nucleares de humano no dirigen la transcripción del DNA ribosomal de ratón, y viceversa. Esta selectividad de la transcripción está mediada por el factor SL1, encontrándose que extractos nucleares de humano transcriben eficientemente la unidad de RNAr de ratón al adicionarles el factor SL1 de ratón (Schnapp et al., 1991).

Por lo que respecta a los tripanosomatídios, ya ha sido localizada la región promotora del RNAr en T. brucei (White et al., 1986) y C. fasciculata (Grondal et al., 1990), sin haberse encontrado una clara similitud en la secuencia de ambos promotores (Grondal et al., 1990). En células transfectadas se han logrado expresar plásmidos quiméricos que portan el gen reportero de cloranfenicol acetil transferasa (CAT) bajo el control de la región

promotora de RNAr de T. brucei (Rudenko et al., 1991); haciendo deleciones en esta región, se ha encontrado que el promotor abarca de los nucleótidos -258 a +10, lo que sugiere la presencia de un dominio de control "río arriba" en el promotor de RNAr de T. brucei, en analogía con otros promotores eucariontes para la RNA pol I (Rudenko et al., 1991; Zomerdijsk et al., 1991). Otro hallazgo interesante es que la región promotora de RNAr de C. fasciculata no es funcional en células de T. brucei, lo que sugiere que en la familia Trypanosomatidae la transcripción del RNAr también es especie-específica (Zomerdijsk et al., 1991)

En esta tesis se presenta la caracterización de 2106 pb del espaciador génico del cistron de RNAr de T. cruzi, y la ubicación de un probable sitio de inicio de la transcripción. Los hallazgos aquí descritos se comparan con secuencias análogas publicadas para otras especies.

## OBJETIVO GENERAL.

Dado nuestro interés en estudiar cómo se sintetiza el RNA ribosomal en T. cruzi, y cómo se regula su síntesis, el objetivo del presente trabajo es localizar y caracterizar la región promotora de la unidad fundamental de transcripción de RNA ribosomal de T. cruzi.

## OBJETIVOS PARTICULARES.

- Localizar el sitio de inicio de la transcripción de la unidad de RNA ribosomal de T. cruzi.
- Obtener la secuencia nucleotídica de la región promotora de la unidad de transcripción de RNAr, y del espaciador transcrito externo del extremo 5' de esta unidad.
- Comparar el promotor de RNAr de T. cruzi con otros promotores para la RNA polimerasa I ya caracterizados.
- Obtener la estructura secundaria probable del espaciador transcrito externo del extremo 5' de la unidad de RNAr de T. cruzi.

## MATERIALES Y METODOS

### 1. Cultivo y extracción de ácidos nucleicos de Trypanosoma cruzi

#### 1.1 Cultivos celulares.

El presente trabajo se llevó a cabo con epimastigotes de la cepa C4 de Trypanosoma cruzi, aislada en el estado de Jalisco. En el experimento tipo Southern se trabajó, además, con las cepas Yuc H4, Peru y Silvio X10, aisladas en Yucatán, Perú y Brasil, respectivamente. Los cultivos fueron mantenidos a 28°C en medio de infusión de hígado y triptosa (medio LIT), suplementado con suero bovino fetal al 10% (Camargo, 1964).

#### 1.2 Extracción de RNA total.

Los cultivos celulares fueron cosechados en la fase media del crecimiento logarítmico, centrifugando a 6000 rpm, por 10 min., en el rotor GSA (Sorvall), a 4°C (temperatura mantenida a lo largo de toda la purificación).

Posteriormente las células fueron lavadas dos veces en PBS (NaCl 0.13 M, KCl 2.68 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 10 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.7 mM, pH 7.4) y fueron congeladas en nitrógeno líquido. Después, al paquete celular se le adicionaron 10 volúmenes de una solución que contiene isotiocianato de guanidina 5 M, EDTA 25 mM, Tris 20 mM pH 7.6, sarcosil 2% y betamercaptoetanol 0.1 % (considerando que 1 g de células ocupa un volumen de 1



ml). Este homogenado se descongeló a temperatura ambiente, agitando vigorosamente con agitador eléctrico (vortex). El material fue centrifugado a 13,000 rpm, por 20 min. en el rotor HB4 (Sorvall), y el sobrenadante fue precipitado con 0.025 volúmenes de ácido acético 1 M y 0.75 volúmenes de etanol. Posteriormente se centrifugó a 9,000 rpm, durante 10 min., en el rotor SS34 (Sorvall) y el precipitado fue resuspendido en 10 ml de solución 2 (hidrocloruro de guanidina 6 M pH 7.5, EDTA 25 mM y betamerceptoetanol 11.2 mM). Esta suspensión fue precipitada adicionando 0.05 volúmenes de ácido acético 1 M y 0.5 volúmenes de etanol, enfriando a -20°C por 30 min., y fue centrifugada a 9,000 rpm, durante 10 min. en el rotor SS34. El precipitado obtenido fue resuspendido en 7 ml de solución 2, y vuelto a precipitar como en el paso anterior. El precipitado fue ahora disuelto en 5 ml de solución 2, y vuelto a precipitar como en el paso anterior. Esta vez el precipitado fue disuelto en 3 ml de Tris-HCl 10 mM (pH 7.5), EDTA 1 mM, NaCl 0.3 M y SDS 1%, y precipitado con 2 volúmenes de etanol. El botón obtenido (RNA total) fue resuspendido en 5 ml de agua tratada con dietilpirocarbonato (DPC), y fue extraído 3 veces: con fenol, fenol-cloroformo (1:1), y cloroformo. El precipitado final fue resuspendido en 500  $\mu$ l de agua tratada con DPC, y la concentración del RNA fue determinada leyendo en el espectrofotómetro a 260 y 280 nm (1 D.O. a 260 nm = 40  $\mu$ g/ml).

### 1.3 Extracción de DNA total

Los cultivos celulares fueron cosechados igual que para la purificación del RNA. Posteriormente las células fueron lavadas dos veces en SSC 1X (NaCl 0.15 M y citrato de sodio 0.015 M). El último precipitado se resuspendió en 2 ml de SE frío (NaCl 150 mM, EDTA 100 mM, pH 8.0).

Posteriormente se adicionó sarcosil para una concentración final de 0.5%, y 500 µg/ml de pronasa (preincubada a 37°C por 1 h), incubando 1 h a 50°C. Después se agregó RNasa A para obtener una concentración final 100 µg/ml, y se incubó 1 h más a 50°C. Se agregó nuevamente pronasa (misma cantidad adicionada anteriormente) y se incubó a 50°C por 30 min. más. Los ácidos nucleicos se extrajeron 3 veces: con fenol, fenol-cloroformo (1:1), y cloroformo. Se dializó 2 veces contra 1 litro de TE (Tris-HCl 10 mM pH 8.0 y EDTA 1 mM pH 8.0), por 2 horas. El DNA fue precipitado con 2.5 volúmenes de etanol y 0.1 volúmenes de LiCl 8 M. El precipitado fue disuelto en 500 µl de 6,6,0.2 (Tris-HCl 6 mM, NaCl 6 mM y EDTA 0.2 mM). La concentración del DNA fue estimada en un espectrofotómetro a 260 y 280 nm (1 D.O. a 260 nm = 50 µg/ml).

## 2. Preparación de plásmidos y marcaje de fragmentos de DNA

### 2.1 Recuperación de DNA de geles de agarosa de bajo punto de fusión.

El DNA digerido fue fraccionado por electroforesis en geles de agarosa de bajo punto de fusión al 1%, en TBE (Tris-HCl 5.4%, ácido bórico 2.74% y EDTA 0.46%), con bromuro de etidio 0.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . Con una espátula se cortó el fragmento del gel que contenía la banda de DNA de interés y se colocó en un tubo eppendorf. Posteriormente se agregó un volumen de TNE 2X (Tris-HCl 0.02 M pH 8.0, NaCl 0.2 M y EDTA 2 mM pH 8.0) y se calentó a 65°C por 5 min. El DNA se extrajo dos veces con fenol y dos veces con éter y se precipitó con 2.5 volúmenes de etanol y 0.1 volúmenes de acetato de sodio 3 M (pH 4.9).

### 2.2 Ligaciones.

Los fragmentos de DNA purificados fueron ligados en el plásmido pUC18, que es un vehículo de clonación que presenta un enlazador múltiple (polilinker) que contiene sitios de corte para 13 endonucleasas de restricción diferentes (Yanisch-Perron et al., 1985). Este plásmido porta el gen de  $\beta$ -lactamasa, que confiere resistencia a ampicilina, lo que permite la selección positiva de las células transformadas.

Las reacciones de ligación se llevaron a cabo bajo las siguientes condiciones: 0.1  $\mu\text{g}$  de inserto, 0.1  $\mu\text{g}$  de

vector, 10 unidades de ligasa (Amersham), 1  $\mu$ l de ATP 10 mM y 4  $\mu$ l de buffer de ligasa 5X (Tris-HCl 0.33 M pH 7.5,  $MgCl_2$  33 mM y DTT 50 mM), en un volumen de 20  $\mu$ l, ajustado con agua. Las reacciones se llevaron a cabo a 14°C, durante 18 horas.

### 2.3 Preparación y transformación de células competentes de la cepa MC1061 de E. coli.

Se dejó crecer toda la noche un cultivo de la cepa MC1061 de E. coli, a 37°C. Posteriormente se realizó una dilución 1:80 de este cultivo y se dejó crecer hasta su fase logarítmica ( $D.O.550=0.2$ ), a 37°C y con agitación fuerte. El cultivo fue centrifugado a 6,000 rpm por 10 min., a 4°C, y las células fueron resuspendidas, en la mitad del volumen inicial, en  $CaCl_2$  100 mM. Se dejó reposar 30 min. a 4°C, y se volvió a centrifugar, bajo las mismas condiciones anteriores. Las células fueron resuspendidas, en 1/10 del volumen inicial, en  $CaCl_2$  100 mM y se guardaron a 4°C. Posteriormente, se tomaron 200  $\mu$ l de células en un tubo eppendorf y se les agregaron 5-10  $\mu$ l de mezcla de ligación. Se dejó en hielo por 30 min., y se dió un choque térmico a 42°C durante 90 segundos. Después se agregaron 1.2 ml de medio Luria a cada tubo y se incubaron a 37°C por 50 min. Posteriormente fueron centrifugados, en la microcentrífuga, a 13,000 rpm durante 5 min., y las células fueron resuspendidas en 150  $\mu$ l de medio Luria. Se sembraron 50-100

$\mu$ l en cajas con medio Luria con ampicilina (a una concentración de 50  $\mu$ g/ml), usando asa triangular.

#### 2.4 Purificación de plásmido en pequeña escala (minipreps).

Una asada de células transformadas con el plásmido de interés fue inoculada en 3 ml de medio Luria con ampicilina (50  $\mu$ g/ml) y se dejó creciendo toda la noche a 37 $\circ$ C, con agitación fuerte. Al día siguiente se colocó 1 ml de este cultivo en un tubo eppendorf y se centrifugó 45 seg. a 13,000 rpm. El botón celular fue resuspendido en 100  $\mu$ l de Tris-HCl 0.025 M (pH 8.0), lisozima 0.2%, EDTA 0.001 M (pH 7.2) y glucosa 0.05 M. Posteriormente se mantuvo 30 min. en hielo y se le agregaron 200  $\mu$ l de SDS 1% y NaOH 0.2 N. Se mantuvo en hielo otros 5 min., se agregaron 150  $\mu$ l de acetato de sodio 3 M (pH 4.9) y se mantuvo en hielo por 25 min. más. Después se centrifugó 5 min. a 13,000 rpm y el sobrenadante fue transferido a un tubo eppendorf nuevo, agregando 1 ml de etanol y manteniendo a -20 $\circ$ C por 30 min. Posteriormente se centrifugó por 10 min. y el botón fue resuspendido en 200  $\mu$ l de 6.6.0.2, agregando después 550  $\mu$ l de etanol y 20  $\mu$ l de LiCl 8 M. Se mantuvo a -20 $\circ$ C por 30 min. y se centrifugó por 10 min. Finalmente el botón fue resuspendido en 70  $\mu$ l de 6.6.0.2. Las preparaciones de plásmido se conservaron a -20 $\circ$ C.

## 2.5 Purificación de plásmido por gradiente de cloruro de cesio y bromuro de etidio.

La primera parte de esta técnica fue realizada en forma similar a la técnica de "minipreps", pero a gran escala, partiendo de un cultivo celular de 200 ml. Después de la última precipitación, el material fue sometido a un gradiente de cloruro de cesio, para lo cual se hizo lo siguiente: el precipitado fue resuspendido en 9 ml de 6,6,0.2 y dividido en partes iguales en dos tubos. En cada tubo se agregaron 6.25 g de  $\text{CsCl}_2$  y se agitó suavemente, hasta que se disolvió totalmente el  $\text{CsCl}_2$ . Posteriormente se agregaron 1.5 ml de una mezcla de Tris 0.45 M (pH 8.0), Tris 0.41 M (pH 9.4) y EDTA 0.08 M (pH 7.2), así como 0.25 ml de bromuro de etidio (10 mg/ml) y 0.25 ml de sarcosil al 10%. Toda esta mezcla fue transferida a tubos de nitrato de celulosa. Se centrifugaron por 15 h a 55,000 rpm, en el rotor vertical Vti 65.1 (Beckman). Finalizado el tiempo de centrifugación se extrajo, con jeringa de 10 ml, la banda correspondiente al plásmido. El DNA se diluyó con un volumen de agua y se precipitó con 2.5 volúmenes de etanol. Posteriormente se centrifugó por 10 min. a 10,000 rpm (rotor SS34) y se resuspendió el botón en 5 ml de 6,6,0.2. Se realizaron dos extracciones con fenol-cloroformo (1:1). Finalmente el DNA se resuspendió en 0.5 ml de 6,6,0.2 y fue leído en el espectrofotómetro a 260 y 280 nm.

## 2.6 Síntesis de sondas de DNA uniformemente marcadas.

Los fragmentos de DNA fueron marcados por el método de "random primer", utilizando el equipo de Boehringer Mannheim. El método consiste en hibridar una mezcla de hexanucleótidos (con secuencias al azar) con el fragmento de DNA desnaturalizado. La hebra complementaria es sintetizada por el fragmento Klenow de la DNA polimerasa I de *E. coli*, utilizando como primeros a los hexanucleótidos. En la síntesis se incluye un nucleótido radioactivo, el cual es incorporado en las hebras complementarias (Ausubel et al., 1991).

Las reacciones de marcaje se realizaron con 0.1  $\mu\text{g}$  de DNA, desnaturalizado por calor, en un volumen de 10  $\mu\text{l}$  de agua. Al DNA desnaturalizado se le adicionaron 3  $\mu\text{l}$  de mezcla de nucleótidos (dGTP, dCTP y dTTP, 0.5 mM), 2  $\mu\text{l}$  de solución de reacción (que contiene la mezcla de hexanucleótidos en buffer de reacción 10X), 40  $\mu\text{Ci}$  de  $\alpha\text{-}^{32}\text{P}\text{-dATP}$  (3,000 Ci/mmol, Amersham) y 2 unidades de Klenow. La mezcla fue incubada a 37°C durante 1 h. La reacción fue detenida con 2  $\mu\text{l}$  de EDTA 0.2 M. Los nucleótidos no incorporados fueron separados en una columna de cromatografía de exclusión molecular, con sefadex G-50 (Ausubel et al., 1991). El DNA marcado fue recogido en el volumen de exclusión, en un tubo eppendorf. La radioactividad específica obtenida por este procedimiento, registrada en un contador de centelleo líquido, fue de  $10^7$  cpm/ $\mu\text{g}$  de DNA.

## 2.7 Marcaje de fragmentos de DNA en su extremo 3'.

El plásmido pBR322 fue digerido con la endonucleasa Hinf I y los fragmentos resultantes fueron marcados en su extremo 3' con  $^{32}\text{P}$ , empujando el fragmento Klenow de la DNA polimerasa I. Esta enzima incorpora nucleótidos en los extremos 3' de moléculas de DNA con extremos 5' sobresalientes (Sambrook et al., 1989).

Para el marcaje de los fragmentos, fueron digeridos 1.5  $\mu\text{g}$  de DNA con 10 unidades de Hinf I, en un volumen de 15  $\mu\text{l}$ . A esta digestión se adicionaron 1.5  $\mu\text{l}$  de mezcla 2 mM de dNTP (dGTP, dCTP y dTTP), 2.3  $\mu\text{l}$  de buffer 2 de Gibco-BRL, 20  $\mu\text{Ci}$  de  $\alpha\text{-}^{32}\text{P}\text{-dATP}$  y 10 unidades de fragmento Klenow. La reacción se incubó a temperatura ambiente por 20 min. Posteriormente se adicionaron 85  $\mu\text{l}$  de TE y se llevó a cabo una extracción con 100  $\mu\text{l}$  de fenol-cloroformo (1:1). La fase acuosa fue precipitada con un volumen de acetato de amonio 4 M y 2.5 volúmenes de etanol. El botón se lavó con etanol al 80%, se secó con vacío y se resuspendió en 35  $\mu\text{l}$  de agua. La cantidad de radioactividad incorporada se midió en un contador de centelleo.

## 3. Caracterizaciones génicas

### 3.1 Secuenciación de DNA

La secuenciación nucleotídica se realizó por el método de polimerización sobre moldes de cadena sencilla (Sanger et al., 1977). En este método se lleva a cabo la



síntesis de una cadena de DNA por una DNA polimerasa (secuenasa) in vitro, usando un molde de cadena sencilla. La síntesis se inicia sólo en el sitio en el que un oligonucleótido (el primero) se une al molde. La reacción de síntesis finaliza por la incorporación de un nucleótido análogo, el cual bloquea la elongación del DNA. Estos nucleótidos análogos son los 2',3'-didesoxinucleósidos 5'-trifosfatados (ddNTPs), los cuales carecen del grupo 3'-OH necesario para la elongación de la cadena de DNA. Cuando se hacen mezclas apropiadas de los dNTPs y uno de los 4 ddNTPs, la polimerización se detiene, en una fracción de la población de cadenas, en cada sitio donde el ddNTP pueda ser incorporado. Si se preparan 4 reacciones separadas, cada una con un ddNTP diferente, se tiene la capacidad de introducir bloqueos en toda la secuencia.

En la síntesis también se incluye un nucleótido marcado radioactivamente, de manera que las cadenas marcadas, de varios tamaños, pueden ser visualizadas en una autorradiografía, después de ser separadas, base por base, por electroforesis.

El DNA de cadena sencilla, requerido para secuenciar por este método, puede ser preparado a partir de los vehículos de clonación M13mp18 y M13mp19 (Yanisch-Perron et al., 1985), los cuales son derivados del DNA del fago M13, y presentan un polilinker igual al de pUC18. El DNA a secuenciar fue ligado en mp18 y 19 bajo condiciones iguales a las señaladas en la sección 2.2.

### 3.11 Preparación y transformación de células competentes de la cepa JM101 de E. coli

M13mp18 y 19 presentan insertado un fragmento del operón de lactosa de E. coli, que incluye la región regulatoria y parte del gen que codifica para la  $\beta$ -galactosidasa. Por otra parte, la cepa JM101 posee un gen incompleto de la misma proteína. Al transformar células JM101 con mp18 ó 19, la porción del gen de la proteína en el vector es capaz de complementar al gen incompleto presente en la célula. Esta complementación produce  $\beta$ -galactosidasa activa, que dá lugar a placas azules cuando el fago y las células crecen en presencia del inductor isopropil-tiogalactosidasa (IPTG) y del sustrato cromogénico 5-bromo-4-cloro-3-indolil- $\beta$ -galactosido (X-gal). Si el vehículo de clonación contiene un inserto, no se produce  $\beta$ -galactosidasa (el polilinker está insertado en la porción amino terminal del gen de esta proteína), originándose placas incoloras (Ausubel et al., 1991).

La técnica usada para preparar células competentes y transformar es la siguiente: una asada de células de la cepa JM101 fue inoculada en 50 ml de medio líquido YT (peptona 0.8%, extracto de levadura 0.8% y NaCl 0.5%), y se dejó crecer a 37°C por 4 h. Posteriormente el cultivo se transfirió a dos tubos y se mantuvo en hielo por 30 min. y se centrifugó por 10 min., a 6,000 rpm, en el rotor SS34. El botón de cada tubo se resuspendió en 12.5 ml de CaCl<sub>2</sub> 100 mM. Se dejó en hielo por 1 h y se volvió a centrifugar,

bajo las mismas condiciones anteriores. Ahora el botón fue resuspendido en 2.5 ml de  $\text{CaCl}_2$  100 mM. Las células se guardaron a 4°C. Posteriormente fueron tomados 0.3 ml de estas células y se les adicionaron 4  $\mu\text{l}$  de mezcla de ligación. Se mantuvieron a 4°C por 40 min. y se les dió un choque térmico a 42°C por 2 min. Después fueron agregados 0.01 ml de IPTG 100 mM, 0.1 ml de X-gal al 2% y 0.2 ml de células JM101 frescas (crecidas por 4 h). Además se agregaron 3 ml de agar suave (que se prepara igual que el medio YT, pero con agar al 0.6%). Toda esta mezcla se plaqueó sobre cajas con medio YT. Las cajas se dejaron a 37°C durante toda una noche.

### 3.12 Preparación de DNA de cadena sencilla.

Fue inoculada una colonia de la cepa JM101 en medio YT, y se dejó creciendo toda la noche a 37°C. Al día siguiente se tomaron 0.5 ml del cultivo celular y se le agregaron 50 ml de medio YT. Se distribuyó en alícuotas de 3 ml en tubos de ensayo, y en cada uno se inoculó una placa incolora. Se incubó por 5 h a 37°C y se transfirió a tubos eppendorf. El cultivo se centrifugó por 5 min., se tomó 1 ml del sobrenadante y se agregaron 0.2 ml de PEG 600 al 20% y NaCl 2.5 M. Se conservó a 4°C por 15 min. y se centrifugó por 10 min. El botón fue resuspendido en 100  $\mu\text{l}$  de TE. Posteriormente se agregaron 50  $\mu\text{l}$  de fenol saturado (2 volúmenes de fenol, 1 volumen de TE y 0.1 volúmenes de Tris 1 M pH 9.5) y se mezcló con vortex por 30 seg. Se dejaron

los tubos 20 min. a temperatura ambiente y se centrifugaron por 5 min. Se tomó el sobrenadante acuoso en un tubo nuevo. De manera similar se llevó a cabo una extracción con cloroformo, y una más con éter. Finalmente, a la fase acuosa se le agregaron 10  $\mu$ l de acetato de sodio 3 M (pH 4.8) y 250  $\mu$ l de etanol, y se dejó a  $-20^{\circ}\text{C}$  por 1 h. Se centrifugó por 10 min. y el botón se resuspendió en 20  $\mu$ l de TE.

### 3.13 Reacciones de secuenciación.

La secuenciación se llevó a cabo utilizando el equipo de secuencia (United States Biochemical Corporation). Se tomaron 7  $\mu$ l de DNA de cadena sencilla (0.1  $\mu$ g) en un tubo eppendorf, y se agregó 1  $\mu$ l de primero (0.5 pmoles) y 2  $\mu$ l de buffer de secuencia 5X (Tris-HCl 200 mM pH 7.5,  $\text{MgCl}_2$  100 mM y NaCl 250 mM). Se calentó a  $65^{\circ}\text{C}$  por 2 min. y se dejó enfriar lentamente. Una vez que la temperatura fue menor a  $30^{\circ}\text{C}$ , la unión entre el molde y el primero se completó.

Posteriormente se preparó la mezcla de marcaje: a los 10  $\mu$ l de la reacción de unión entre el molde y el primero se les agregaron 2  $\mu$ l de mezcla de dNTPs (dGTP, dCTP y dTTP, 1.5  $\mu\text{M}$ ), 1  $\mu$ l de DTT 0.1 M, 0.6  $\mu$ l de  $\alpha$ - $^{32}\text{P}$ -dATP (6  $\mu\text{Ci}$ ) y 2  $\mu$ l de secuencia (diluida 1:10 en TE). Esta mezcla se incubó a temperatura ambiente por 10 min. Después fue preparada la reacción de término, para lo cual se tomaron 2.5  $\mu$ l de cada uno de los cuatro ddNTP 8  $\mu\text{M}$ , y se colocaron en 4 tubos eppendorf (en cada uno un ddNTP diferente). Se precalentaron a  $37^{\circ}\text{C}$  por 3 min. y a cada tubo se le

agregaron 3.5  $\mu$ l de la reacción de marcaje, y se dejaron a 37°C por 5 min. más. Las reacciones se detuvieron con 4  $\mu$ l de formamida al 95%, EDTA 20 mM, azul de bromofenol 0.05% y xileno-cianol 0.05%.

### 3.14 Preparación del gel y electroforesis.

El gel para secuenciar fue de poliacrilamida al 6%. Los vidrios en los que se preparó el gel se trataron previamente de la siguiente forma: al vidrio grande (30 x 43 cm) se le colocaron aproximadamente 150  $\mu$ l de sigmacote (Sigma), y con papel se extendió esta solución uniformemente en todo el vidrio; en el vidrio chico (30 x 41 cm) se colocaron aproximadamente 50  $\mu$ l de pegamento 3-(Trimethoxylilyl)propil-metacrilato, preparado al 2% en etanol. Posteriormente los vidrios se enjuagaron muy bien con agua destilada y se dejaron secar. Para preparar un gel de 70 ml, se agregaron 10.5 ml de mezcla de acrilamida 36%-bisacrilamida 2%, 35 g de urea, 14 ml de TBE 5X y 18.9 ml de agua. Además se le adicionaron 0.5 ml de persulfato de amonio al 10% y 18.6  $\mu$ l de TEMED. El buffer de corrida fue TBE 1X. El gel se precorrió por 1 h a 1,400-2,000 volts, mientras se realizaban las reacciones. Finalizada la precorrida se cargaron 3  $\mu$ l de cada muestra. Justo antes de ser cargadas en el gel, las muestras se calentaron por 2 min. a 80°C. Una vez que el azul de bromofenol llegó al límite del gel se cargaron 3  $\mu$ l más de cada muestra, en los pozos contiguos. Finalizada la corrida, el gel se colocó en

una solución de ácido acético al 10% y metanol al 12%, por 1 h, para remover la urea, y se secó durante toda la noche a 80°C. La autorradiografía se llevó a cabo sobre una placa de rayos X durante 1 día. El gel fue separado del vidrio colocando éste en una solución de NaOH 2 N durante 30 minutos.

### 3.2 Experimento tipo Southern.

3 µg de DNA total de las cepas C4, YUC H4, Perú y Silvio X10 fueron digeridos con Hinf I. Los fragmentos resultantes fueron fraccionados por electroforesis en geles horizontales de agarosa al 0.8%, en TBE, con bromuro de etidio a una concentración de 0.5 µg/ml. Los geles, de 0.5 mm de espesor, fueron corridos a 80 volts. Las bandas de DNA fueron visualizadas en un transiluminador de luz ultravioleta de onda corta. El tamaño de los fragmentos de DNA fue calculado a través de calibrar los geles con los fragmentos de restricción del DNA del fago lambda digerido con Hind III. Posteriormente el DNA de los geles fue transferido, de acuerdo al método descrito por Southern (1975), a filtros de nitrocelulosa. Los filtros, secados a temperatura ambiente y horneados con vacío a 80°C por 2 h, fueron prehibridados en 15 ml de solución de prehibridación (ver sección 3.3). Posteriormente los filtros fueron hibridados, lavados y expuestos en placas de rayos X, como se indica en los experimentos tipo Northern (sección 3.3).

### 3.3 Experimento tipo Northern.

El RNA total de T. cruzi fue fraccionado por electroforesis en geles de agarosa al 1% en buffer MOPS 1X (MOPS 0.05 M y EDTA 1 mM, pH 7.0) y formaldehído al 6% (Lehrach et al., 1977). Fueron disueltos 15 µg de RNA total en 17 µl de una solución que contiene formamida desionizada al 50%, formaldehído al 6% y buffer MOPS 1X. Antes de ser cargadas en el gel, las muestras se incubaron a 70°C por 10 min., y les fueron adicionados 1.5 µl de buffer de muestra (400 mg de sacarosa, 5 mg de xileno-cianol y 5 mg de azul de bromofenol, en 322 µl de buffer MOPS 3X). Los geles fueron corridos a 75-100 volts en la campana de extracción. Como marcador de tamaño se usó una mezcla comercial de 6 RNAs de diferente tamaño (de 0.24 a 9.5 Kb) de Gibco-BRL. El RNA fue transferido a membranas de nylon (Gene Screen, de New England Nuclear) de acuerdo al método descrito por Southern (1975), usando como buffer de transferencia fosfatos de sodio 0.025 M (pH 7.0). Los filtros fueron secados a temperatura ambiente y horneados con vacío a 80°C por 2 h, y posteriormente fueron prehibridados por 3 h en 15 ml de formamida al 50%, EDTA 2 mM, SDS 0.2%, fosfatos de sodio 120 mM (pH 7.0), SSC 2X y solución Denhardtts 4X (Ficoll 400 0.08%, PVP-40 0.08% y albúmina sérica bovina 0.08%). Posteriormente los filtros se hibridaron con 5 X 10<sup>6</sup> cpm de DNA marcado con <sup>32</sup>P en 5 ml de una solución preparada bajo las mismas condiciones que la solución de prehibridación. Los filtros fueron lavados en tres ciclos, que incluyeron:

enjuague en SSC 0.2X e incubación en SSC 0.2X y SDS 0.1% a 37°C, con agitación constante durante 1h. La autorradiografía se llevó a cabo sobre una placa de rayos X (X-Omatt RP Kodak) en presencia de una pantalla intensificadora, durante 1 ó 2 días, a -70°C.

#### 3.4 Ensayo de protección con nucleasa S1.

El ensayo de protección con nucleasa S1 es una técnica muy empleada en el mapeo de extremos 5' y 3' de moléculas de RNA. En el procedimiento, el RNA que se analiza debe hibridarse con un fragmento radioactivo de DNA. La hibridación se realiza en altas concentraciones de formamida y a temperaturas cuidadosamente seleccionadas, para favorecer los híbridos DNA-RNA sobre los dúplex DNA-DNA. Las mezclas de hibridación son después digeridas con nucleasa S1, que degrada DNA de cadena sencilla y RNA. Los fragmentos resistentes a la nucleasa S1 son resueltos por electroforesis en geles de poliacrilamida. El tamaño de estos fragmentos sirve para definir el sitio de inicio de la transcripción (Sambrook et al., 1989).

Este experimento fue realizado con fragmentos de DNA marcados con <sup>32</sup>P en una sola cadena, sintetizados sobre templados de cadena sencilla por la enzima secuenasa (Burke, 1984; ver sección 3.1).



### 3.41 Marcaje de fragmentos de DNA.

Fueron seleccionadas las preparaciones de DNA de cadena sencilla apropiadas (en mp18 ó mp19) de manera que pudiera marcarse la hebra de DNA complementaria al RNA. La unión entre el templado y el primero se llevó a cabo como se señala en la sección 3.13. La mezcla de marcaje se preparó de la siguiente manera: a los 10  $\mu$ l de la reacción de unión entre el primero y el templado se les agregaron 2.5  $\mu$ l de mezcla de dNTP (dGTP, dCTP y dTTP, 3.75  $\mu$ M), 1  $\mu$ l de DTT 0.1 M, 1.5  $\mu$ l de  $\alpha$ -<sup>32</sup>P-dATP (15  $\mu$ Ci) y 2  $\mu$ l de secuenasa (diluída 1:10 en TE). Esta mezcla se incubó a temperatura ambiente por 7 min. Posteriormente fueron adicionados 2  $\mu$ l más de secuenasa y 2.5  $\mu$ l de mezcla de extensión (dGTP, dATP, dTTP y dCTP, 180  $\mu$ M). Posteriormente se adicionaron 130  $\mu$ l de agua y se realizó una extracción con fenol. Los ácidos nucleicos se precipitaron con 2.5 volúmenes de etanol y 0.1 volúmenes de acetato de sodio 3 M (pH 5.2). El precipitado, se lavó con etanol al 80% y se resuspendió en 20  $\mu$ l de agua. Posteriormente la preparación de DNA fue digerida con Hind III y Eco RI, para separar al inserto, del vector. Los productos de la digestión se corrieron en un gel de agarosa de bajo punto de fusión al 1%. Los insertos marcados fueron localizados exponiendo el gel húmedo, cubierto con plástico delgado, sobre una placa de rayos X, durante 10 min. Las bandas de interés se cortaron con una espátula delgada y se colocaron en tubos eppendorf. La recuperación del DNA se realizó tal como se indica en la

sección 2.1. Finalmente, los insertos marcados fueron resuspendidos en 20  $\mu$ l de agua, y la cantidad de radioactividad incorporada fue medida en un contador de centelleo.

### 3.42 Hibridación y digestión con nucleasa S1.

40  $\mu$ g de RNA total de T. cruzi y 20 ng del fragmento marcado (60,000 cpm) fueron precipitados con 0.1 volúmenes de acetato de sodio 3 M (pH 5.2) y 2.5 volúmenes de etanol, y fueron disueltos en 20  $\mu$ l de solución de hibridación (PIPES 0.04 M pH 6.4, EDTA 1 mM, NaCl 0.4 M y formamida al 80%). La mezcla de ácidos nucleicos fue calentada a 85°C por 15 min., para desnaturalizar el DNA, y fue transferida rápidamente a un baño a 46°C, temperatura de hibridación. La hibridación se llevó a cabo durante toda una noche. Posteriormente, manteniendo los tubos a 46°C, se adicionaron 300  $\mu$ l de buffer de nucleasa S1 (NaCl 280 mM, acetato de sodio 30 mM pH 4.5 y ZnSO<sub>4</sub> 4.5 mM), 400 u/ml de nucleasa S1 (Gibco BRL) y 20  $\mu$ g de DNA de esperma de salmón desnaturalizado. Los tubos se mezclaron y rápidamente se transfirieron a una estufa a 37°C, durante 30 min. La reacción fue detenida con 75  $\mu$ l de mezcla de término (EDTA 50 mM pH 8.0 y acetato de amonio 2.5 mM) Los híbridos DNA-RNA fueron recuperados precipitando con 0.1 volúmenes de acetato de sodio 3 M y 2.5 volúmenes de etanol. El precipitado final fue disuelto en 15  $\mu$ l de formamida al 95%, EDTA 20 mM, azul de bromofenol 0.5% y xileno-cianol 0.5%.

Se realizaron experimentos control, conteniendo 40  $\mu\text{g}$  de RNA de transferencia de E. coli, en lugar del RNA total de T. cruzi.

### 3.43 Preparación del gel y electroforesis.

Los productos fueron analizados en geles desnaturalizantes de poliacrilamida al 4%. Para preparar un gel de 45 ml mezcló lo siguiente: 6 ml de solución de acrilamida al 30%-bisacrilamida al 0.8%, 9 ml de TBE 5X, 18.91 g de urea, 0.15 ml de persulfato de amonio al 10% y 12.5  $\mu\text{l}$  de TEMED. La electroforesis se realizó a 100 volts, usando TBE 1X como buffer de corrida. En los geles también se corrieron, como un control, muestras de los fragmentos marcados (alrededor de 25.000 cpm), en carriles contiguos a los de las muestras tratadas con nucleasa S1. Como marcadores de tamaño se usaron los fragmentos generados al digerir pBR322 con Hinf I, marcados en su extremo 3' (ver sección 2.7). Finalizada la corrida, los geles se colocaron en una solución de ácido acético al 10% y metanol al 12% por 15 min., y posteriormente fueron secados sobre papel whatman 3MM (45 min. a 80°C), y expuestos en placas de rayos X.

### 3.5 Ensayo de "extensión del primero".

Esta técnica es empleada para mapear y cuantificar el extremo 5' de moléculas de RNA. El RNA es hibridado con un oligonucleótido sintético marcado en su extremo 5'. Después es empleada la enzima transcriptasa reversa para sintetizar

cdNA complementario al molde de RNA, usando como primero al oligonucleótido. La longitud del cdNA resultante refleja la distancia entre la base marcada del oligonucleótido y el extremo 5' de la molécula de RNA.

Para este experimento se utilizó un oligonucleótido sintético de 30 bases, complementario a los nucleótidos 431 a 460 de la clona genómica pRTC19 (figuras 5 y 6), cuya secuencia es 5'-GGTCGCGCCGCACACGATACGGCGATGCGA-3'.

### 3.51 Marcaje del oligonucleótido.

Para marcar con  $^{32}\text{P}$  el oligonucleótido, se realizó la siguiente mezcla en un tubo eppendorf: 200 ng de oligonucleótido, 200  $\mu\text{Ci}$  de gamma- $^{32}\text{P}$ -ATP (7.000 Ci/mmol, Amersham), 2.5  $\mu\text{l}$  de buffer 10X de polinucleótido cinasa (Tris-HCl 0.5 M pH 7.6,  $\text{MgCl}_2$  0.1 M, DTT 50 mM, espermidina 1 mM y EDTA 1 mM pH 8.0), 10 unidades de polinucleótido cinasa del fago T4 (Amersham), y agua estéril suficiente para alcanzar un volumen de 25  $\mu\text{l}$ . Esta mezcla fue incubada a 37°C por 30 min., y posteriormente calentada a 65°C por 5 min. para inactivar la cinasa. Después se adicionaron 25  $\mu\text{l}$  de acetato de amonio 4 M y 250  $\mu\text{l}$  de etanol, y se dejó precipitando por 30 min. en hielo seco-etanol. Posteriormente se centrifugó por 15 min. en microcentrifuga, y el botón resultante fue disuelto en 25  $\mu\text{l}$  de agua. Se realizaron dos precipitaciones más, como en el paso anterior, con el objeto de eliminar el ATP radioactivo libre. El último precipitado fue lavado con etanol al 70% y

resuspendido en 100  $\mu$ l de agua. La cantidad de radioactividad incorporada se determinó en un contador de centelleo líquido.

### 3.52 Hibridación.

Fueron mezclados 50.000 cpm del oligonucleótido marcado con 40  $\mu$ g de RNA total de T. cruzi. Esta mezcla se precipitó con 0.1 volúmenes de acetato de sodio 3 M (pH 5.2) y 2.5 volúmenes de etanol. El botón se dejó secar a temperatura ambiente y se resuspendió en 30  $\mu$ l de solución de hibridación (formamida al 80%, PIPES 40 mM pH 6.4, NaCl 0.4 M y EDTA 1 mM pH 8.0). Esta mezcla se incubó a 30°C durante una noche. Posteriormente se precipitó con 170  $\mu$ l de acetato de sodio 0.3 M y 500  $\mu$ l de etanol. El botón fue lavado con etanol al 75%-acetato de sodio 0.1 M (pH 5.2), y fue secado a temperatura ambiente.

### 3.53 Extensión del oligonucleótido.

El precipitado fue disuelto en la siguiente mezcla: 3.5  $\mu$ l de cada dNTP 4 mM (dGTP, dATP, dTTP y dCTP), 2.5  $\mu$ l de buffer 10X de transcriptasa reversa (Tris-HCl 0.5 M pH 8.0, MgCl<sub>2</sub> 50 mM, DTT 50 mM y KCl 0.5 M), 1.25  $\mu$ l de RNAsin (Promega) y 7.5  $\mu$ l de agua (volumen final de 25  $\mu$ l). Posteriormente se agregaron 40 unidades de transcriptasa reversa AMV (Boeringer Mannheim) y se incubó a 42°C por 90 min. Después se añadió 1  $\mu$ l de EDTA 0.5 M (pH 8.0) y 1  $\mu$ l de RNasa A pancreática (1 mg/ml), y se mantuvo a 37°C por 30

min. Posteriormente se adicionaron 100  $\mu$ l de acetato de amonio 2.5 M y se realizó una extracción con 125  $\mu$ l de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1). La fase acuosa se transfirió a un tubo nuevo y se agregaron 300  $\mu$ l de etanol, para precipitar los ácidos nucleicos. El precipitado se lavó con etanol al 70%, se secó con vacío y se resuspendió en 4  $\mu$ l de TE. Posteriormente se adicionaron 4  $\mu$ l de buffer de muestra (formamida al 95%, EDTA 20 mM, azul de bromofenol 0.05% y xileno-cianol 0.05%). Los tubos fueron calentados 3 min. a 80°C y transferidos a hielo. Fueron analizados 4  $\mu$ l de la muestra en un gel de poliacrilamida al 6% (ver sección 3.14). A la par que se realizaba este ensayo, fue secuenciado el fragmento genómico 8-2 (figura 5) subclonado en M13mp19, usando como primero al oligonucleótido empleado en este experimento. Las reacciones de secuencia se corrieron en el gel, junto con la muestra de este ensayo. Las condiciones de electroforesis, tratamiento del gel después de la corrida y obtención de la autorradiografía, se señalan en la sección 3.14

#### 4. Alineamientos, comparación de secuencias y generación de estructuras secundarias de RNA.

Las secuencias fueron alineadas con el programa CLUSTAL de PC/GENE, buscando los mejores alineamientos posibles. Este programa se basa en el método Higgins y Sharp (1988).

Las matrices de comparación de secuencias se llevaron a cabo con el programa NMAPUS de PC/GENE, basado en el método desarrollado por Pustell y Kafatos (1984), con porcentajes de astringencia del 75 al 100%.

Las estructuras secundarias de RNA se obtuvieron con el programa RNA-fold de PC/GENE, el cual se basa en el método de Zuker y Stiegler (1981). La presentación de las estructuras se obtuvo con el programa MOLECULE (Lapalme et al., 1982).

## R E S U L T A D O S.

**Subclonación de fragmentos genómicos de la unidad de transcripción de RNA ribosomal.**

La clona genómica pRTC20 (Hernández et al., 1988) contiene la región codificadora del RNAr 18S y un fragmento de aproximadamente 2.1 Kb hacia el extremo 5' de esta región (figura 5). En T. brucei y C. fasciculata el sitio de inicio de la transcripción fue ubicado a aproximadamente 1.2 y 1.0 Kb, respectivamente, del gen del RNAr 18S (White et al., 1986; Grondal et al., 1990). Dado que en organismos muy cercanos hay similitud en el tamaño del espaciador transcrito externo (Bourbon et al., 1988), se consideró muy probable que en el inserto pRTC20 estuviera contenido el sitio de inicio de la transcripción del RNAr de T. cruzi.

El fragmento de 2.1 Kb (inserto pRTC19, figura 5) se aisló de la clona pRTC20 digiriendo ésta con Bgl II y Eco RI, y se subclonó en pUC18, digerido con Bam HI y Eco RI. Se verificó la presencia de sitios de Sau 3A y Hinc II en el inserto pRTC19, previamente ubicados en el laboratorio del Dr. Hernández, y fueron localizados dos sitios de Sph I. Los fragmentos 8, 9, 4, 7, 8-3, 8-2, 7-3, 9-4 y 9-5 se generaron al digerir el inserto pRTC19 con las endonucleasas señaladas en el mapa de restricción (figura 5). Estos fragmentos también fueron subclonados en pUC18.

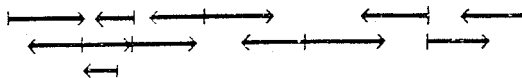
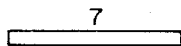
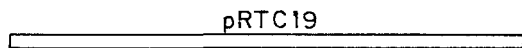
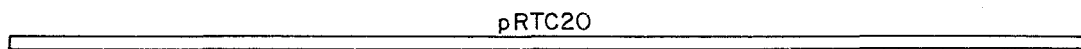
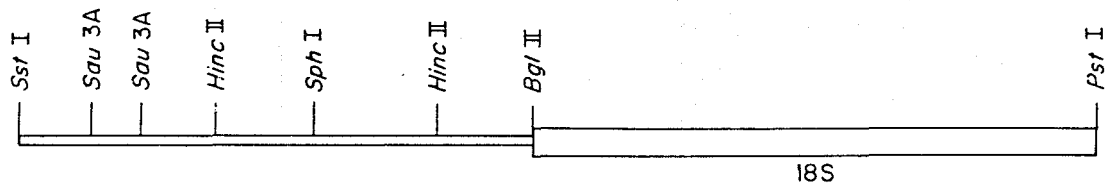


**Figura 5.** Mapa del extremo 5' de la unidad de RNAr de T. cruzi. Se señala la región codificadora del RNAr 18S y las clonas genómicas empleadas en este trabajo. También se presenta la estrategia de secuenciación. Se señalen únicamente los sitios de restricción utilizados en las subclonaciones.

### Secuenciación del fragmento pRTC19.

Los fragmentos provenientes de la clona genómica pRTC19 fueron subclonados en los derivados fágicos M13mp18 y M13mp19, y se realizó un análisis de secuencia nucleotídica sobre moldes de cadena sencilla. En la figura 5 se presenta la estrategia de secuencia, y en la figura 6 se muestra la secuencia completa del inserto pRTC19. El fragmento resultó ser de 2106 pb. conteniendo las primeras 5 bases del DNA codificador del RNAr 18S, y 2101 pb hacia su extremo 5'. La composición de bases del fragmento es la siguiente: T= 30.7%, C= 20.3%, A= 23.9% y G= 25.1%. En particular, el fragmento 8-2 presenta una secuencia rica en T (38.2%) y pobre en A (14.5%).

Algunos organismos, como Xenopus y ratón, presentan secuencias repetidas en los espaciadores intergénicos de sus unidades de RNAr, los cuales funcionan como activadores de la transcripción (Reeder, 1984). Con el objeto de buscar secuencias repetidas en el inserto pRTC19, se analizó la secuencia completa del inserto, por medio de una matriz de comparación. No se encontraron elementos repetidos en el inserto mediante este análisis.



500 pb

**Figura 6.** Secuencia nucleotídica del espaciador externo (2106 pb), en el extremo 5' de la unidad de RNAr de T. cruzi. El sitio de inicio de la transcripción aquí identificado se muestra subrayado y con letra más oscuro (G en la posición 334). La secuencia TCATGNNG, que incluye el sitio de inicio de la transcripción, también se localizó entre los nucleótidos 599 y 607 (ambas regiones se presentan subrayadas). El oligonucleótido de 30 bases empleado en el experimento de "extensión del primero" también se muestra subrayado.

1	GAGCTCGGTG	CACCCTGGGA	TATTTCGGCA	CCCACCTTTC	CCGTGCGCAAT	CGGCGCCGTC
61	CGAACCGGGA	AATGTTCGGA	GAATAATACG	GCTGGGCTGC	GCCGCGGCTT	CCCCGCGTGA
121	ACCAACTATT	GTGCGATGTG	CAGCATCCTA	TTGTGGTGTCT	TTACCGCACA	CCAGTTCCT
181	TGCGGGGCTT	ATTTGGTGTG	TTGGATTTT	AATTTTTTGA	TGATTCGGAG	GAATTTTTTG
241	CAATTTTTGG	GTACCCCTAA	AAAAATTTG	GAGTTTTCCGG	GGTTCGATCC	AACTTGTGCT
301	TTTTTAAACCG	TCCAATTGTG	TCFAGTACAT	<u>CATGGAGCGG</u>	TAITCTCTCC	GGTGGCCCAG
361	GTGGCGTCGG	AAGGAATCGG	TGTCCCTCAG	GATGTTTGGT	TTTTCGTTTT	TTTTTTTTGG
421	GTCTTTTGTT	<u>TCCGATCGCC</u>	<u>GTATCGTGTG</u>	<u>CGCCCGGACC</u>	TTCTTTTTGG	CTCATTGGTC
481	AGTGAGGTTT	ATAATAAAGT	GGATCATTG	GGTTTTTGGC	CCTTTGGCGC	GCACCCGCGG
541	AATGGGGGAG	GGATTTTCAT	ATAATTGTAG	TGTACACATT	GTGTGTGGGT	CGCAAAATGT
601	<u>CATGCCCTGT</u>	GCAATGTTTA	TTTGGGTGCT	GTGCGTGTCC	TTTTGTGATT	CCACCACCTG
661	TGTGTATTTT	ACCTTATCGT	CTCTCCCTCG	CGTTGGCTGT	GCGTGAATTG	TCGTGCGCAT
721	TCGTGGGAAA	TCAAAAGGGG	AATCAACGTG	TTCTTTTTTT	TTCAGAAGGG	GAGTCAAAGC
781	GCCGTGTGGA	TGCCAAGTCT	GTGCAAGAGT	TAACTATTAT	TACTACCACCT	ACTGCTGCTG
841	CTGCCACTCC	CTACATATGC	GCACAAGTAC	ACACACATAT	ATATATATAT	ATGCGAATAC
901	ACCTGTGTGT	ATATGTCTAT	GTGTGTGTCT	GTGTGTGTGT	AGGTGATGGG	GTAGTAGTTG
961	TATTATAGTA	TAGTATATAT	TAGTAGTATA	CGGCAAAAGG	CAAAGACACA	AGCACGGCGA
1021	GTACGACGAA	CAAACCCAIT	TCACACATGA	GTGTGCGCCA	CACACGCGCC	TGTCCTTTTT
1081	TTTTCTGCCT	TTGCCACACC	CCATATGTAT	ATTATATATA	TAAGGGTGTG	TGTGTGGTGA
1141	GAGAAAACCTG	GAAATGATTTG	CGTGTGTGTG	GCCGCCACGA	ACCTGTGAGA	TGCTTTCTTA
1201	CGGTATTTTGG	TTGCATGCAC	CGCGGTACAC	ACAATATATA	CACACACAAA	AAAAAACACC
1261	GATATGATGG	CGAGTGTGGG	ATTCFCTTFT	TATTGTCTTT	TTCTCTTTT	TCGTGTCTCT
1321	GCTGTGTGCC	AATAAAACAC	ACGAGAGTAG	AGAAAAGGGG	GAAAAAGTAT	TAAATAAANTG
1381	GAGGACTGTCT	TCGCAGCTGC	CTGCGGCAC	TGTTTTTGTCT	GCTGGGTTCG	CAACCGGATG
1441	CTGAAGAGAG	TGAAATCGCG	TCACAAAAGC	ACCCTCAGAC	TGTTGTGAAG	TGTGAAGTAT
1501	GTGTACAAT	GCGTGTGTGT	GTGTAACAC	ATTGACGATA	GCATACCAGG	GAAAAAAGGA
1561	GGACACAAAC	AAACAAAAGG	AATTGTGTGC	GTGTGTGTCC	TCFCTTFCGT	CGGTGCTGAA
1621	CTCTGTGTGT	GTGTGTGTCC	GTTTTGTTTTG	CAGCTTGAAA	TGCTTGGTTG	ATAGAAAATCG
1681	GTACTTTGATT	GTTCGCCGAT	TTGAGGGAAT	TTTATCCAAA	AAAAAAGAG	GTCACAAACA
1741	ACCAACTGAC	AAACTTTTGG	TTGGACCTGT	CTATGTGGTG	GTGTGTGGGG	GGAAGAGAAA
1801	CACACACACA	GACAAAAACA	CAAAACCCAT	GTCAATTTGG	CAITGGTGTG	CGTGCCTGTG
1861	CGTGCCTTGA	ATATCTCTCA	CACACAAATA	TATATATATA	TATATATAAT	ACCACAACAA
1921	CATTTCAAAG	GATCATCAAT	GTGTGTGAGA	CGTGTGCTGT	TGTAGCCGTGT	GTATATGTGT
1981	GTTTTTGTGTG	TTGTGTGGTG	TAATGTGTGT	GTGTGTGTG	TTCTGCGATA	TACACCTTAT
2041	ACACACACAC	ACACACGTA	TATAATACAC	ACACAGCGAA	CGCCGCGGTC	CAACAACCTG
2101	AGATCT					

## Localización del sitio de inicio de la transcripción de la unidad de RNA ribosomal.

Como paso inicial en la localización del sitio de inicio de la transcripción de la unidad de RNAr, fue necesario reproducir en el laboratorio una técnica de extracción de RNA total que nos permitiera la obtención de precursores de RNAr del tamaño de la unidad de transcripción completa (aproximadamente 10 Kb). Las mejores preparaciones de RNA se obtuvieron con la técnica que emplea tiocianato de guanidina e hidrocloreuro de guanidina (sección 1.2 de materiales y métodos; McDonald et al., 1987). Como se aprecia en la figura 7, las preparaciones de RNA así obtenidas presentaron abundante material de alto peso molecular.

La localización del sitio de inicio de la transcripción de la unidad de RNAr de T. cruzi se llevó a cabo mediante experimentos tipo Northern, ensayos de protección con nucleasa S1 y análisis de "extensión del primero". Los experimentos tipo Northern se llevaron a cabo con 15 µg de RNA total, utilizando como sondas fragmentos de DNA marcados con <sup>32</sup>P, por "random primer". Los fragmentos 4, 9, 7 y 7-3 hibridaron predominantemente con moléculas de RNA de aproximadamente 4.3 y 6.8 Kb (figura 8), aunque a mayores tiempos de exposición fue evidente la presencia de bandas de tamaño superior a 9.5 Kb. Al hibridar con el inserto pRTC20 se obtuvo señal con la molécula de RNAr 18S madura (2.4 Kb)

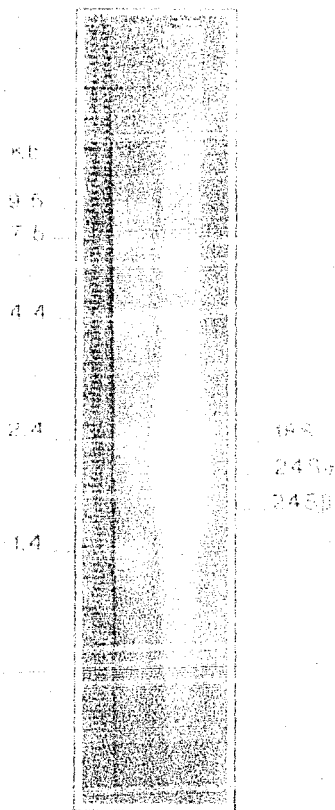


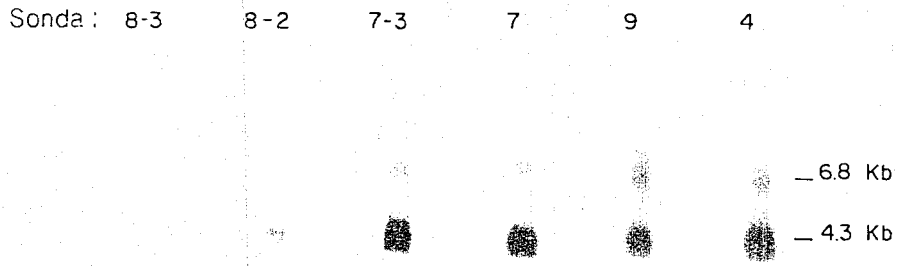
Figura 7. Perfil electroforético de RNA total de T. cruzi.

Se utilizó un gel de agarosa al 1% y formaldehído al 6%. Carril 1: RNA marcador de tamaño. Carril 2: 15 µg de RNA total de T. cruzi.

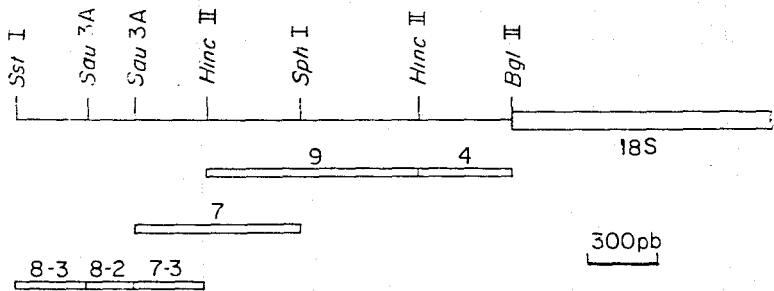
**Figura 8.** Localización del sitio de inicio de la transcripción por medio de experimentos tipo Northern. A) Autorradiografía de la hibridación tipo Northern de RNA total de T. cruzi con fragmentos de DNA marcados con  $^{32}\text{p}$ . B) Mapa físico del extremo 5' de la unidad de RNAr de T. cruzi. Se señala la posición de los fragmentos de DNA usados como sonda.



A



B



y con el fragmento de 4.3 kb (figura 9); a mayores tiempos de exposición también se presentó señal con el fragmento de 6.8 Kb. Esto nos indicó que la molécula de 4.3 Kb es un precursor del RNAr 18S que contiene el espaciador transcrito externo. Los fragmentos mayores de 9.5 Kb probablemente sean transcritos primarios integros de la unidad de RNA ribosomal. El fragmento 8-2 hibridó débilmente con la molécula de 4.3 Kb, mientras que con el fragmento 8-3 no se presentó señal alguna (figura 8). Estos datos indicaron que el sitio de inicio de la transcripción está contenido en el inserto 8-2.

Como siguiente paso en la localización del sitio de inicio de la transcripción, se realizaron ensayos de protección con nucleasa S1, con los fragmentos 9, 7 y 8-2. Como se observa en la figura 10, después del tratamiento con nucleasa S1 los fragmentos 9 y 7 fueron totalmente protegidos, mientras que el inserto 8-2 fue reducido a un fragmento de aproximadamente 170 pb. Esto nos indicó que el sitio de inicio de la transcripción se localiza a aproximadamente 170 pb "rio arriba" del extremo 3' del fragmento 8-2. Estos resultados concuerdan con los obtenidos en los experimentos tipo Northern (figura 8).

Sonda : pRTC 20

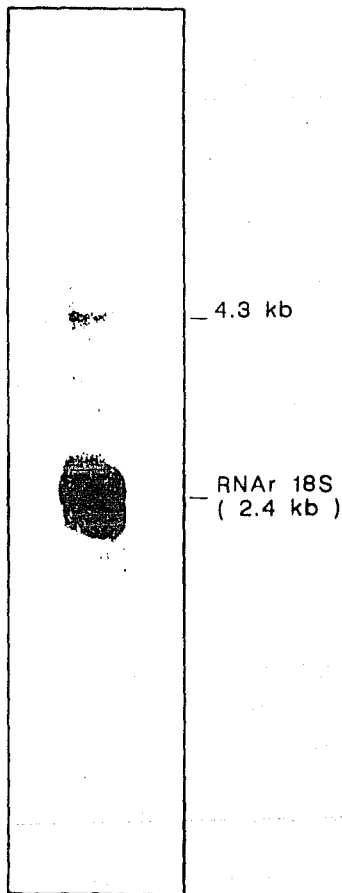
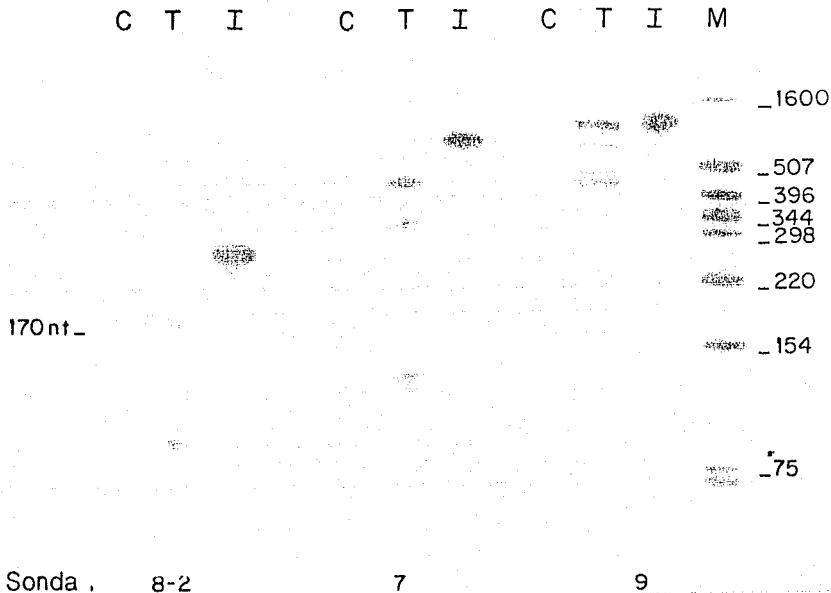


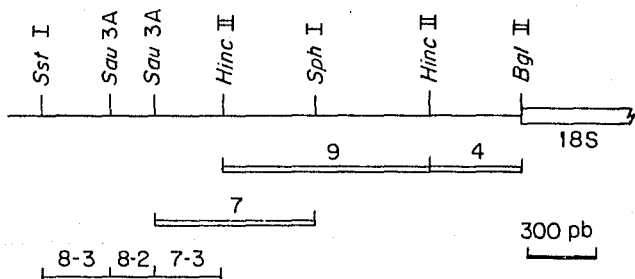
Figura 9. Autorradiografía de un experimento tipo Northern en el que RNA total de *T. cruzi* fue hibridado con el inserto pRTC20.

**Figura 10.** Ubicación del sitio de inicio de la transcripción mediante ensayos de protección con nucleasa S1. A) Autorradiografía de experimentos de protección con nucleasa S1 llevados a cabo con los insertos 8-2, 7 y 9. Carril C: experimento control con 40  $\mu$ g de RNAT de E. coli. Carril T: Ensayo realizado con 40  $\mu$ g de RNA total de T. cruzi. Carril I: inserto marcado, sin tratarse con nucleasa S1. Carril M: marcador de tamaño, pBR322 digerido con Hinf I. B) Mapa de restricción de la región espaciadora del extremo 5' de la unidad de RNAr de T. cruzi.

**A**



**B**



Cabe señalar que, además del fragmento totalmente protegido, en la autorradiografía se aprecian bandas de menor tamaño (figura 10); con el inserto 8-2 se observa una banda de alrededor de 90 pb, mientras que con el inserto 7 se presentan fragmentos de 460, 370, 340 y 130 pb. En el experimento con el inserto 9 se observan varias bandas, principalmente una de poco menos de 900 pb y otra de 700 pb. Estas bandas menores pueden ser resultado de la protección de moléculas de RNA precursoras ya procesadas, o degradadas, aunque también pueden deberse a la presencia de heterogeneidad en la localización del sitio de inicio de la transcripción entre las diversas copias de la unidad de RNAr.

Finalmente, con el objeto de determinar con exactitud el primer nucleótido transcrito de la unidad de RNAr de T. cruzi, se procedió a realizar un ensayo de "extensión del primero". Para este experimento se utilizó un oligonucleótido de 30 bases complementario a la secuencia localizada a aproximadamente 100 pb del sitio de inicio de la transcripción ubicado en el experimento con nucleasa S1 (figuras 6 y 10). El producto de este ensayo se analizó en un gel desnaturalizante de poliacrilamida, junto con una reacción de secuencia del fragmento 8-2, usando el mismo oligonucleótido como primero (figura 11). El resultado de este experimento indicó que el sitio de inicio de la transcripción de la unidad de RNAr de T. cruzi corresponde a

**Figura 11.** Identificación del primer nucleótido transcrito de la unidad de RNAr por "extensión del primero".

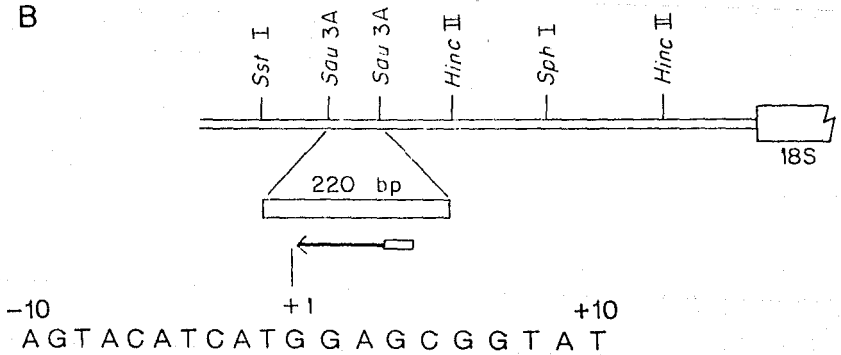
A) Análisis de "extensión del primero" llevado a cabo con un oligonucleótido de 30 bases (ver figura 6) y 40  $\mu\text{g}$  de RNA total de T. cruzi (carril 1). Carriles G, A, T y C: reacciones de secuencia. B) Secuencia nucleotídica alrededor del sitio de inicio de la transcripción. En la parte superior se presenta el mapa del extremo 5' de la unidad de RNAr, y se esquematiza el oligonucleótido empleado y el producto de extensión (rectángulo y flecha, respectivamente). En la parte inferior se presenta la secuencia que rodea al sitio de inicio de la transcripción (+1). Esta secuencia es complementaria a la que se lee en el panel A.

A

1 G A T C



B





una G (C en la secuencia complementaria) ubicada a 1768 pb del extremo 5' de la región codificadora del RNA 18S (figuras 11B y 6). El espaciador transcrito externo del extremo 5' de la unidad ribosomal de T. cruzi (1768 pb) es, por lo tanto, casi 600 pb más grande que el espaciador análogo en T. brucei, y casi 800 pb mayor que el mismo espaciador en C. fasciculata.

#### Comparación de la región promotora de RNAr en tripanosomatidios.

Con el objeto de identificar posibles elementos conservados en los promotores para la RNA pol I en tripanosomatidios, fueron alineadas las secuencias de los promotores de RNAr de T. cruzi, T. brucei y C. fasciculata, de los nucleótidos -150 a +20, considerando como +1 el primer nucleótido transcrito (figura 12). No se encontraron bloques de secuencias conservadas, usualmente presentes en los promotores de RNAr de organismos emparentados (Balzi et al., 1985). Del total de 170 bases comparadas, hubo identidad entre las tres especies en 30 nucleótidos, distribuidos a lo largo de toda la secuencia, sin agruparse en alguna región en particular. Resultados similares se obtuvieron al comparar, por separado, la secuencia de T. cruzi con la de T. brucei, y T. cruzi con C. fasciculata (datos no mostrados).

**Figura 12.** Alineamiento de las secuencias de las regiones promotoras de la transcripción de la unidad de RNAr de T. cruzi (TC), C. fasciculata (CF) y T. brucei (TB). La región analizada abarca de los nucleótidos -150 a +20. Con asterisco se señala la identidad de una base entre las tres secuencias, y con punto se indica que hay identidad entre dos secuencias. La primera base transcrita, en cada promotor, se señala con letra más oscura.

CF CCAAC-----GGCATGCCCGCGAGCCCAGTGGGCCGTG----GCCTAGG  
 TC GGGGCTTATTTGGTGTGTGGATTTTTAATTTTTTGATGATTCGGAGGAA  
 TB G---CTT--TTGACATGTTAGATATAATATGTTTTATTGTAAGTCAATA  
 . \* \* . . . . . \* . . . . . \* . . . . . \* . . . . .

CF CCCAGCCCTAGGGAAAGGGCAGTGGCCGAGCACACATACGGGAATTCTA  
 TC TTTTTGCAATT-----TTGGGTACCCCTAAAAAAATTTTGGAGTTTC  
 TB CAACACACAATAGGATAATAATGATAAAGTTAAAAAAGTATATATAGTAA  
 . . . \* . . . . . \* . . . . . \* . . . . . \* . . . . .

CF TGGA-----CGATTGTGGCCATATTTTA-CGCACATCGCCCGCGCAGG  
 TC CGGGGTTTCGATCCA ACTTGTGCTTTTTTAACCGTCCATTTGTGCTAGTA  
 TB TAGAAATATATCTTATATAGGAAAAGATTAAAGCAGT-AAAAGTAGCGCTTA  
 . \* \* . \* . . . \* . . . . . \* \* \* \* \* \* \* . . \* \* \* . . .

CF CGCTGTTTTGCTAAAACTCGGTGTCTG-AGACAAGCAGCC  
 TC CA-----TCAT-----GGAGCGGTATTCTCTCCGGT  
 TB CG-----GCGTA-----CGGAGCAGGAGA-GCAACTG- +20  
 \* . \* . \* . . . . . \* . . . . .

En cuanto a su composición de bases, los promotores de RNAr de los tripanosomatidios también presentaron diferencias. El promotor de T. cruzi es rico en T y pobre en C (T= 41.8%, C= 15.9%, G= 23.5% y A= 18.8%), mientras que el promotor de T. brucei es rico en A y pobre en C (A= 42.4%, C= 10%, G= 19.4% y T= 28.2%). En C. fasciculata esta región es rica en G y C (G= 30.6%, C= 30%, A= 21.8% y T= 17.6%).

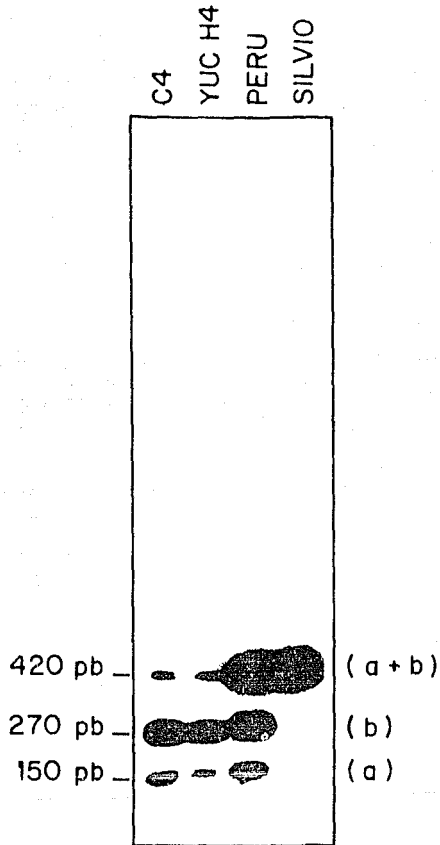
#### Análisis del grado de heterogeneidad en la región promotora de RNAr de T. cruzi.

Se ha reportado que regiones de DNA funcionalmente importantes son muy conservadas, mientras que regiones que aparentemente no llevan a cabo alguna función son altamente polimórficas (Clark, 1987). En el caso de la unidad ribosomal, las regiones codificadoras de las moléculas de RNAr son muy conservadas, mientras que las secuencias de los espaciadores son muy variables; mediante el análisis de sitios de restricción en espaciadores intergénicos, en el extremo 3' de la unidad ribosomal de T. cruzi, se encontró que hay heterogeneidad entre las diferentes copias del cistrón ribosomal (Martínez-Calvillo, 1990), y que también existe variabilidad entre diferentes cepas de T. cruzi (Zavala-Castro et al., 1992).

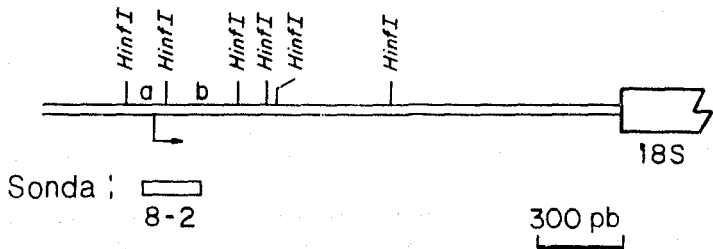
Con el objeto de determinar el grado de heterogeneidad en la región que rodea al promotor de RNAr de T. cruzi, se procedió a realizar un análisis de sitios de restricción de Hinf I en esta región, tanto en la cepa C4, como con las cepas Yuc H4, Perú y Silvio. El análisis se realizó mediante un experimento tipo Southern, utilizando como sonda una región de DNA que contiene secuencias de la región promotora (inserto 8-2). Como se observa en la figura 13A, con las cepas C4, Yuc H4 y Perú se presentaron 3 bandas, de 150, 270 y 420 pb, mientras que con la cepa Silvio se presentó únicamente la banda de 420 pb. De acuerdo al mapa de restricción de Hinf I de la clona genómica pRTC19 (figura 13B) se esperaban las bandas de 150 y 270 pb. El fragmento de 420 pb resulta de la ausencia de un sitio de Hinf I en algunas copias de la unidad de RNAr. En el caso de la cepa Silvio, este sitio de Hinf I no se presenta en ninguna de las copias del cistrón ribosomal, lo que da como resultado la presencia de sólo una banda. Estos resultados nos indican que existe poca variabilidad en la región identificada como probable promotor de la unidad de RNAr de T. cruzi, lo que sugiere que esta región del genoma es funcionalmente importante.

**Figura 13.** Análisis de sitios de restricción de Hinf I en la región que rodea al promotor de RNAr. A) Experimento tipo Southern en el que DNA total de cuatro cepas de T. cruzi fue digerido con Hinf I, e hibridado con el fragmento 8-2. B) Mapa de restricción de Hinf I de la región espaciadora del extremo 5' de la unidad de RNAr de T. cruzi. La flecha indica el sitio de inicio de la transcripción

A



B



## Generación de la estructura secundaria del espaciador transcrito externo del extremo 5' de la unidad de RNAr.

Con el programa "RNA-fold" de Zuker (1981), se obtuvo la estructura secundaria del espaciador transcrito externo del extremo 5' (ETE-5') de la unidad de RNAr de T. cruzi (1768 bases). Una limitación de este programa es que sólo analiza moléculas de RNA pequeñas (no mayores de 400 bases). Por ello, el espaciador fue dividido en varias partes: los primeros 200 nucleótidos transcritos (posición 334 a 534, de acuerdo a la numeración de la figura 6), fragmento 7-3 (nucleótidos 502 a 814), fragmento 9-4a (nucleótidos 809 a 1012), fragmento 9-4b (bases 1013 a 1218), fragmento 9-5a (nucleótidos 1213 a 1473), fragmento 9-5b (bases 1474-1736) y fragmento 4 (bases 1731 a 2106). Como puede apreciarse en las figuras 14A y 15, todo el espaciador forma regiones altamente estructuradas. Los valores de energía libre negativos obtenidos indican que las estructuras secundarias son muy estables. Cabe señalar que si se pudiera obtener la estructura secundaria del ETE-5' completo (en lugar de en 7 partes) tal vez se presentarían modificaciones en algunas regiones de la estructura secundaria que aquí se presenta.

En ningún otro tripanosomatidido se ha secuenciado totalmente el ETE-5' de la unidad ribosomal y, por lo tanto, no hay reportes de estructuras secundarias en esta región. Con ayuda del programa "RNA-fold" obtuvimos la estructura



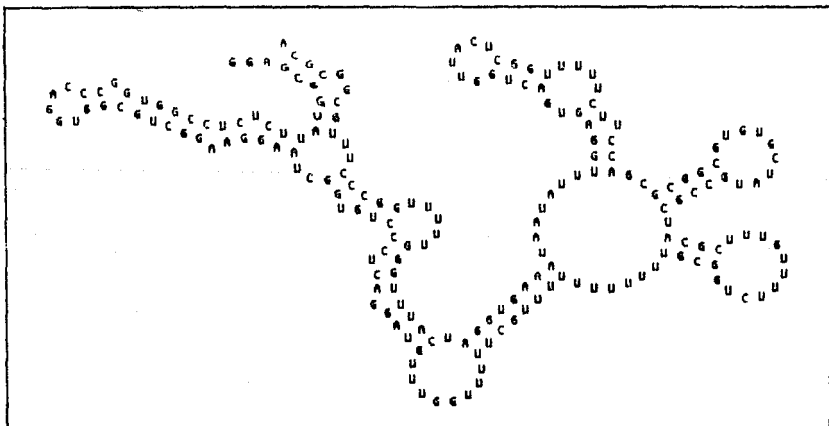
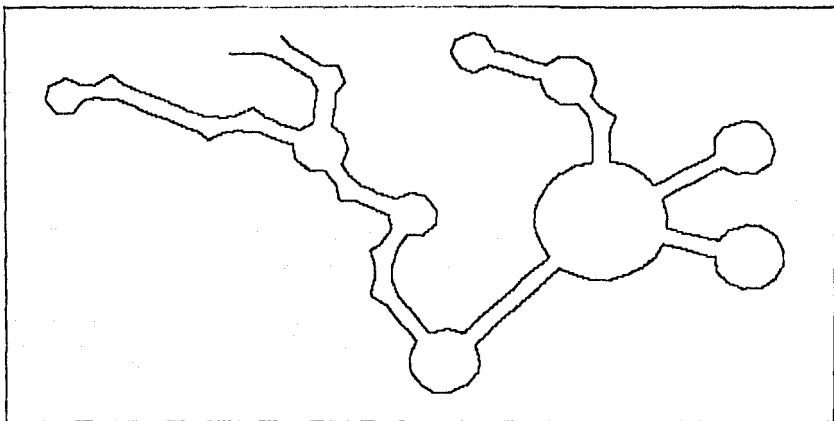
**Figura 14.** Estructura secundaria de los primeros 200 nucleótidos del espaciador transcrito externo del extremo 5' de la unidad de RNAr de: A) T. cruzi, B) T. brucei y C) C. fasciculata. En la figura de T. cruzi se presenta un mapa de restricción en el que se señala la región analizada.

A

Trypanosoma cruzi

Nucleótidos +1 a +200 del transcrito primario de RNAr

Energía: -63.6 Kcal

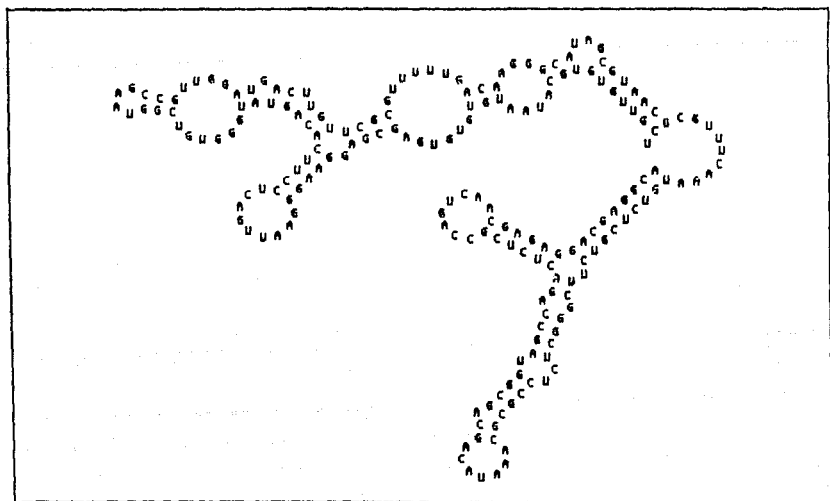
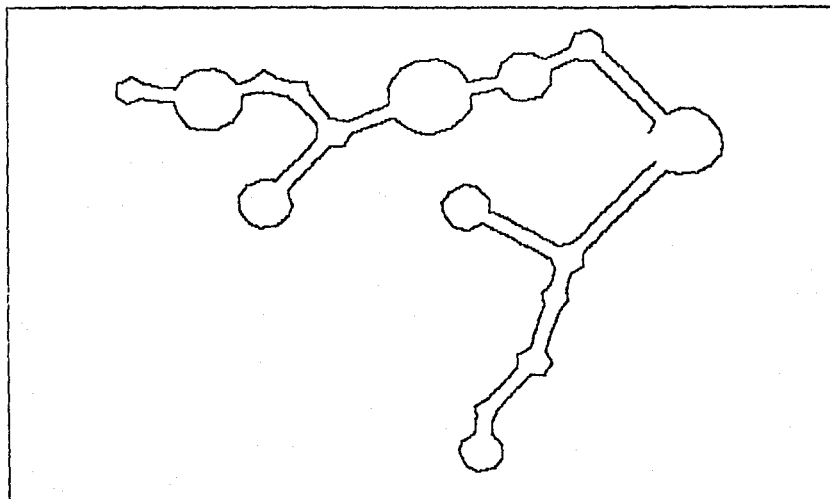


B

*Trypanosoma brucei*

Nucleótidos +1 a +200 del transcrito primario del RNAR

Energía: -76.6 Kcal



C

Crithidia fasciculata

Nucleótidos +1 a +200 del transcrito primario de RNAR

Energía: -85.4 Kcal

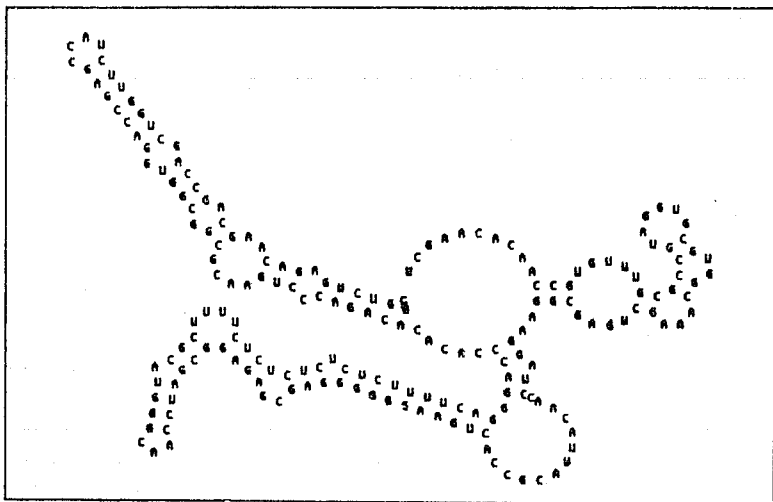
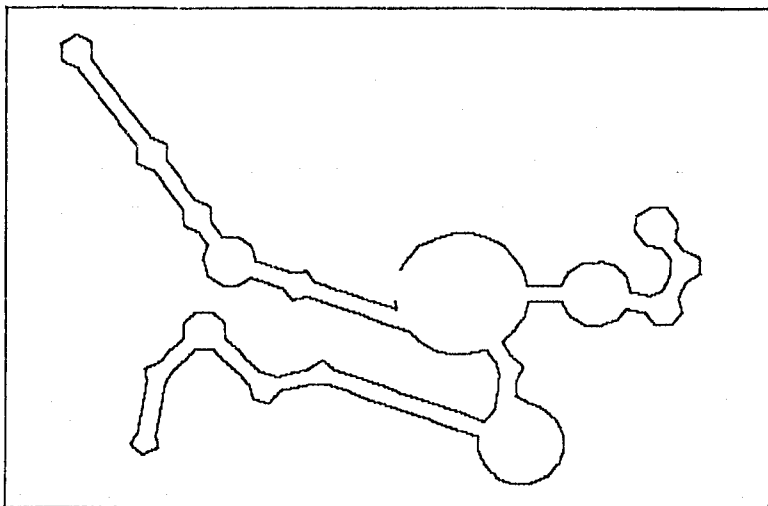
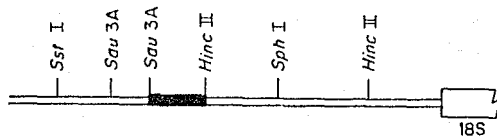
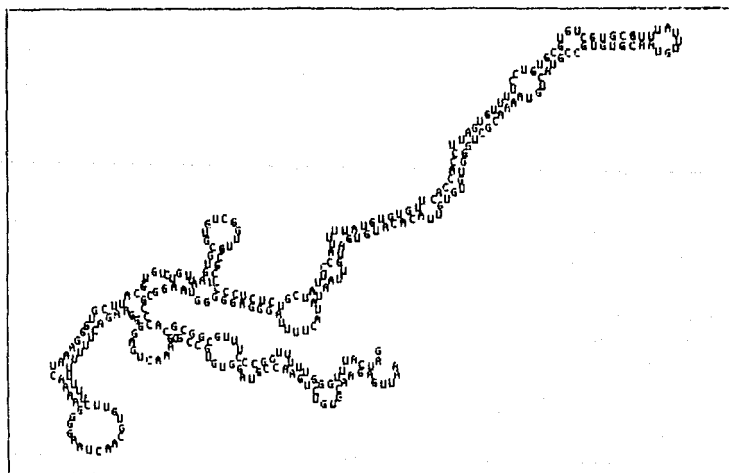
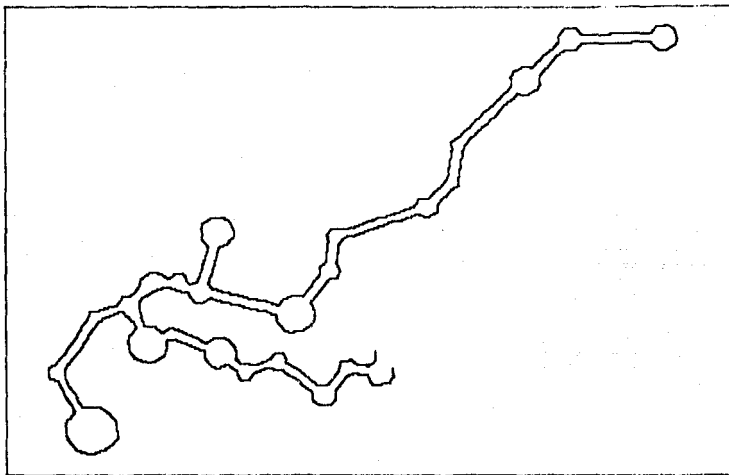


Figura 15. Estructura secundaria del espaciador transcrito externo del extremo 5' de la unidad de RNAr de T. cruzi: A) fragmento 7-3, B) fragmento 9-4a, C) fragmento 9-4b, D) fragmento 9-5a. E) fragmento 9-5b y F) fragmento 4. En cada caso se señala en el mapa de restricción la región analizada.

A

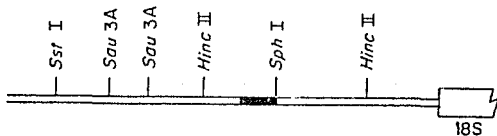
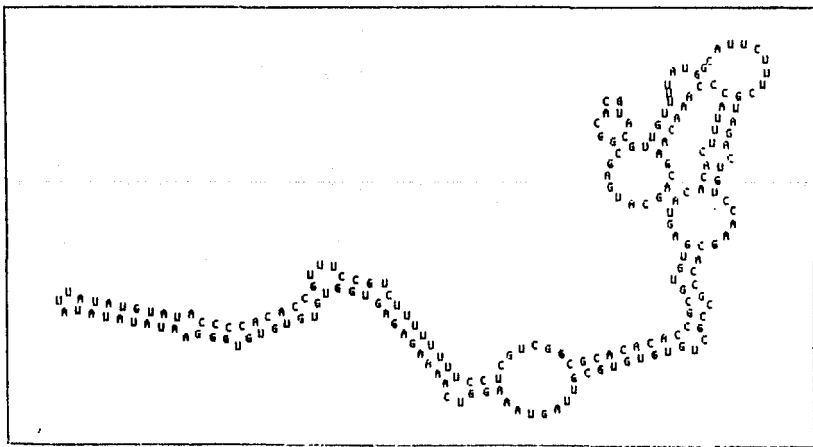
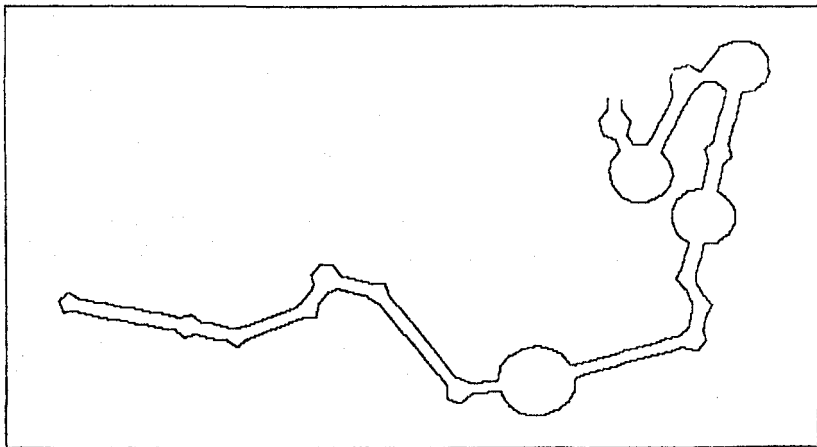
FRAGMENTO: 7-3  
ENERGIA: -113 Kcal





FRAGMENTO: 9-4b

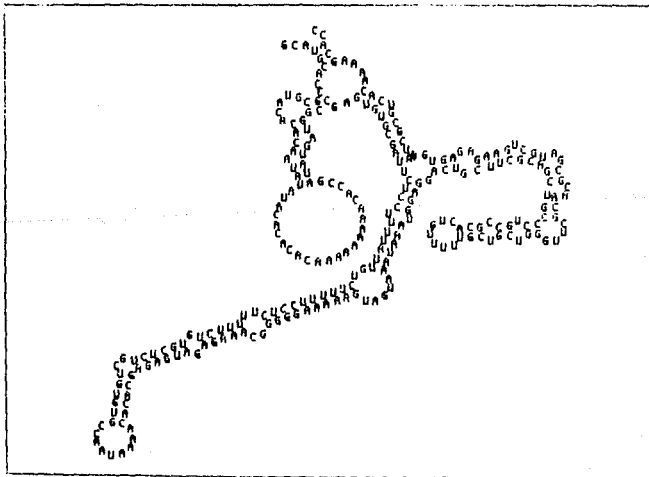
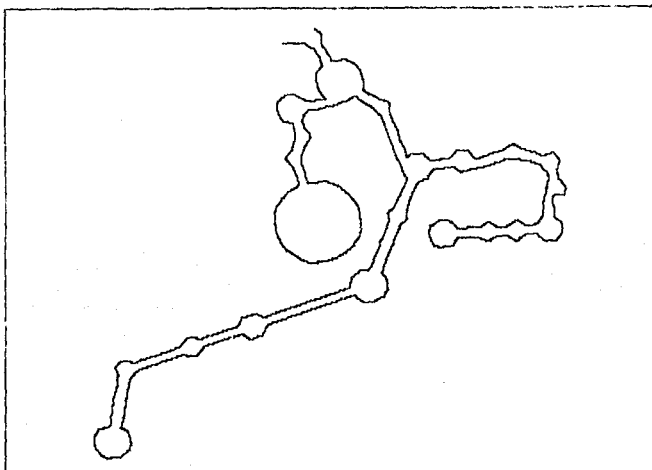
ENERGIA: -82.4 Kcal





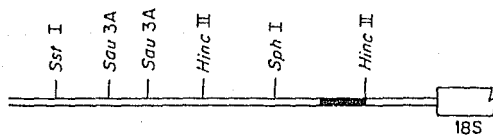
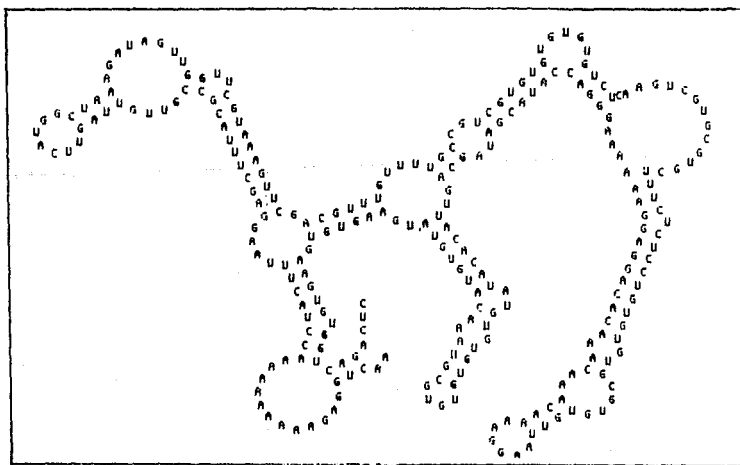
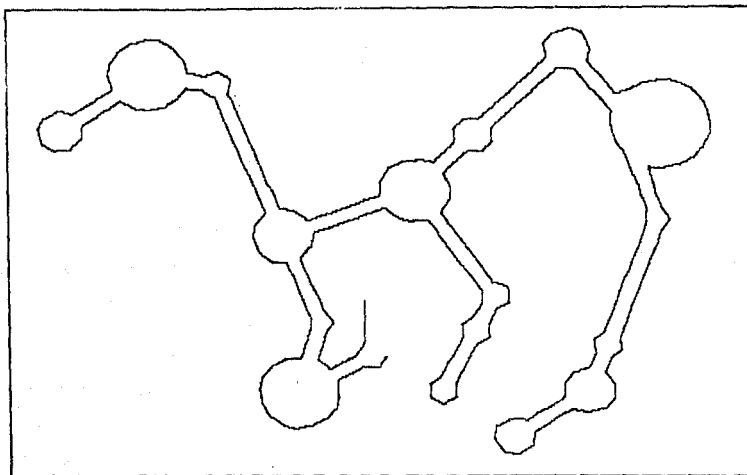
FRAGMENTO: 9-5a

ENERGIA: -91.8 Kcal



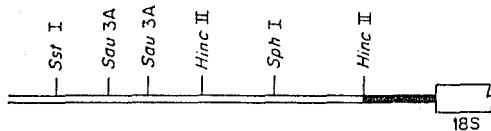
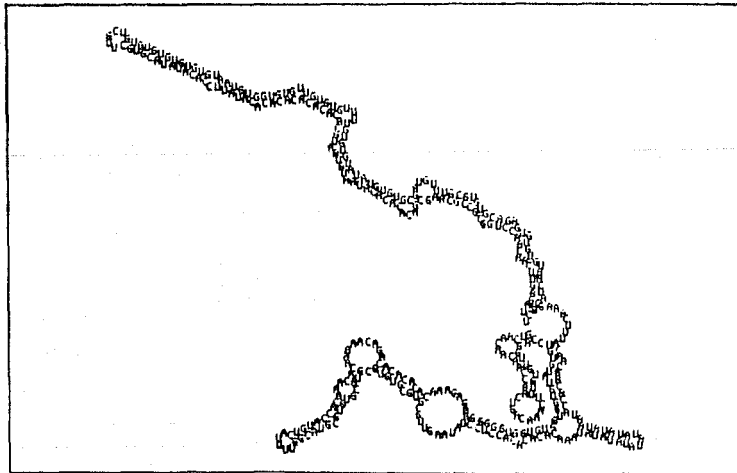
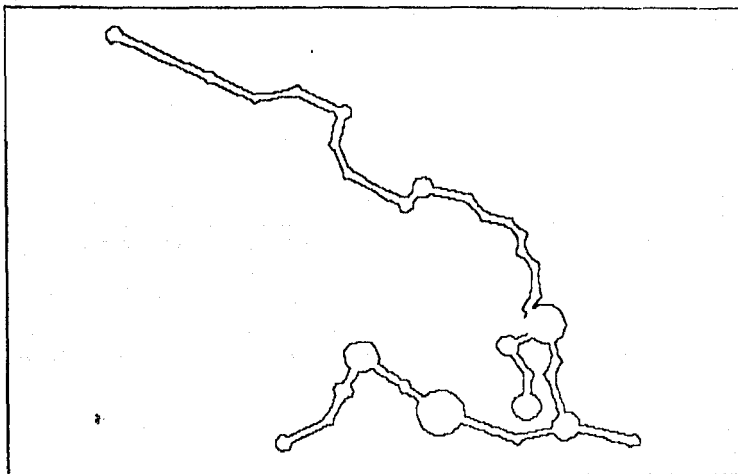
FRAGMENTO: 9-5b

ENERGIA: -70.0 Kcal



FRAGMENTO: 4

ENERGIA: -156.6 Kcal



secundaria probable de los primeros 200 nucleótidos transcritos de la unidad de RNAr de T. brucei (figura 14B) y C. fasciculata (figura 14C), encontrándose que al igual que en T. cruzi (figura 14A) esta zona es altamente estructurada. Sin embargo, resulta necesario comparar estructuras secundarias de regiones más grandes, para tratar de encontrar regiones comunes entre los tripanosomatidios, que pudieran ser importantes en el procesamiento del transcrito primario.

## D I S C U S I O N .

**Estructura primaria y secundaria del espaciador transcrito externo del extremo 5' de la unidad de RNAr.**

En esta tesis se localizó el sitio de inicio de la transcripción de la unidad de RNAr de T. cruzi, y se identificó una probable región promotora de la transcripción. El primer nucleótido transcrito fue ubicado a 1768 pb del extremo 5' de la región codificadora del RNAr 18S, lo que indica que de la región espaciadora secuenciada (2101 pb), 333 pb corresponden al espaciador intergénico, y 1768 pb corresponden al espaciador transcrito externo del extremo 5' (ETE-5') de la unidad de RNAr. En T. brucei y C. fasciculata el ETE-5' tiene un tamaño aproximado de 1.2 y 1.0 Kb, respectivamente (White et al., 1986; Grondal et al., 1990). En algunos anfibios, como Xenopus laevis y X. borealis ha sido secuenciado totalmente el ETE-5' (Furlong et al., 1983), encontrándose que su tamaño es menor que el de los tripanosomatidios (712 y 612 pb, respectivamente). En mamíferos, el ETE-5' de la unidad de RNAr es más grande, teniendo un tamaño de 3658 pb en humano (González et al., 1990), y 4006 pb en ratón (Bourbon et al., 1988).

Comparaciones de la secuencia del ETE-5' entre humano y ratón indican que en la región cercana al sitio de inicio de la transcripción se presenta cierta identidad (figura

16), mientras que en otras regiones no hay similitud en la secuencia; sin embargo, a pesar de las diferencias en la secuencia, algunas partes del espaciador de humano y de ratón forman estructuras secundarias muy similares (González et al., 1990). Las estructuras secundarias reportadas en humano y ratón son muy estables, como sucede en T. cruzi (figuras 14A y 15). En los tripanosomatidios, sólo en T. cruzi se ha obtenido la secuencia completa del ETE-5', por lo que no es posible determinar si a nivel de estructura secundaria hay similitud en este espaciador, entre este grupo de protozoarios. El análisis estructural del ETE-5' de la unidad de RNAr de T. cruzi permitirá futuros estudios tendientes a determinar posibles funciones de esta región, como su participación en la formación y transporte de partículas pre-ribosomales.

La composición de bases del ETE-5' de T. cruzi es la siguiente: G= 25.1%, A= 24.8%, T= 30.4% y C= 19.5%. El contenido de A+T es del 55.2%, siendo éste un valor relativamente bajo, considerando que los espaciadores transcritos internos de la unidad de RNAr de T. cruzi tienen un contenido de A+T del 64% (Gómez, 1990). En la parte secuenciada del espaciador intergénico la composición de bases es muy similar a la del ETE-5' (G= 24.9%, A= 18.6%, T= 32.1% y C= 24.3%).

Comparación de la secuencia que rodea el sitio de inicio de la transcripción en la unidad de RNAr.

El alineamiento de las secuencias que forman la región promotora del RNAr en T. cruzi, T. brucei y C. fasciculata reveló que no existe similitud en esta región entre los tripanosomatidios (figura 12). Este hecho resultó interesante, dado que existen reportes que indican que entre organismos emparentados se presenta cierta similitud en la secuencia de la región promotora del RNAr (Balzi et al., 1985; Sommerville, 1984). Al comparar, específicamente, la región que rodea al sitio de inicio de la transcripción (de los nucleótidos -20 a +10) se observa que entre diferentes grupos de organismos, como mamíferos, anfibios y levaduras, se presentan bloques de secuencias conservadas, mientras que entre los tripanosomatidios no se presentan éstos (figura 16). De las 30 bases analizadas, entre humano, ratón y rata se presenta identidad en 18 posiciones (60%). Entre las tres especies de Xenopus hay identidad en 23 posiciones (76.6%), y en las levaduras las bases idénticas son 20 (66.6%). Entre los tripanosomatidios sólo hay identidad en 3 posiciones (10%).

Recientemente fue reportado que al comparar una parte de la secuencia del extremo amino de la histona H4, entre varios organismos, se observa un mayor número de diferencias entre T. cruzi y T. brucei, que entre humano y erizo de mar

**Figura 16.** Comparación de la secuencia que flanquea el sitio de inicio de la transcripción de la unidad de RNAr de, (1) mamíferos: Humano (Financsek et al., 1982), rata (Rothblum et al., 1982), ratón (Financsek et al., 1982); (2) anfibios: X. laevis (Sollner-Webb y Reeder, 1979), X. borealis (Furlong et al., 1983), X. clivii (Bach et al., 1981); (3) levaduras: S. cerevisiae (Bayev et al., 1980), S. rosei (Verbeet et al., 1983), K. lactis (Verbeet et al., 1984); y (4) tripanosomatidios: C. fasciculata (Grondal et al., 1990), T. brucei (White et al., 1986), T. cruzi distal (este trabajo) y T. cruzi proximal (Dietrich et al., 1993). La secuencia comparada abarca de los nucleótidos -20 a +10, en relación al sitio de inicio de la transcripción (+1). Los nucleótidos idénticos entre las tres especies de un grupo particular se encierran en un rectángulo. Las similitudes entre los promotores distal y proximal de T. cruzi se indican con un asterisco.



- 2 0 + 1 + 1 0

	T	T	G	G	G	C	C	G	C	G	G	G	T	T	A	T	T	G	C	T	G	C	T	G	G	A	G	A	T	A	T	T	G	C	T	G	A	C	A	C	G	C		
Humano	T	A	T	T	G	T	A	C	C	T	G	G	A	G	A	T	A	T	T	G	C	T	G	C	T	G	G	A	G	A	T	A	T	T	G	C	T	G	A	C	A	C	G	C
Rata	T	A	T	T	G	T	A	C	C	T	G	G	A	G	A	T	A	T	T	G	C	T	G	C	T	G	G	A	G	A	T	A	T	T	G	C	T	G	A	C	A	C	G	C
Ratón	T	A	T	T	G	T	A	C	C	T	G	G	A	G	A	T	A	T	T	G	C	T	G	C	T	G	G	A	G	A	T	A	T	T	G	C	T	G	A	C	A	C	G	C

<i>Xenopus laevis</i>	G	C	A	T	G	T	G	C	G	G	G	C	A	G	G	A	A	G	G	T	A	G	G	G	G	A	G	A	G	A	C
<i>Xenopus borealis</i>	G	C	A	C	G	T	G	C	G	G	A	C	A	G	G	A	A	G	G	T	A	G	G	G	G	A	G	A	G	G	C
<i>Xenopus clivii</i>	G	C	A	T	G	T	G	C	C	G	A	C	A	G	G	A	A	G	G	T	A	G	G	G	G	A	G	A	G	A	A

<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	A	A	G	T	A	G	T	T	G	G	A	G	A	G	G	T	A	C	T	T	C	A	T	G	C	G	A	A	A	G	C
<i>Saccharomyces rosei</i>	T	T	T	T	G	G	G	C	A	G	A	A	G	G	A	A	C	T	T	C	A	T	G	C	G	A	A	A	G	C	
<i>Kluyveromyces lactis</i>	A	A	T	A	G	G	C	C	G	G	A	G	G	T	A	C	T	T	C	A	T	G	C	G	A	A	A	G	C		

<i>Crithidia fasciculata</i>	G	G	C	T	G	T	T	T	T	G	C	T	A	A	A	A	C	T	C	G	T	G	T	C	T	G	A	G	G		
<i>Trypanosoma brucei</i>	A	A	A	A	G	T	A	G	C	G	C	T	T	A	C	G	G	C	G	T	A	C	G	A	G	C	A	G	G		
<i>Trypanosoma cruzi</i> distal	A	T	T	T	G	T	G	T	C	T	A	G	T	A	C	A	T	C	A	T	G	G	G	A	G	C	G	G	T	A	T
<i>Trypanosoma cruzi</i> proximal	T	T	G	C	A	C	A	A	T	T	G	T	G	T	G	T	C	A	T	G	C	T	G	T	G	T	G	C	A		

\* \* \* \* \* \* \* \*

(Hecker, 1993). Esta observación, junto con datos obtenidos al analizar secuencias de moléculas maduras de RNAr (Hernández et al., 1990; Gómez et al., 1991) y del gen de  $\beta$ -tubulina (Amorim et al., 1993), sugieren que los tripanosomatidios son un grupo de organismos que durante la evolución se separó tempranamente del resto de los eucariontes, y que dentro de la familia Trypanosomatidae se incluyen organismos genéticamente muy distintos, a pesar de ser morfológicamente muy similares.

Los resultados obtenidos en este trabajo apoyan las observaciones realizadas con la histona H4, las moléculas de RNAr y el gen de  $\beta$ -tubulina. Estas diferencias en secuencias de ácidos nucleicos y proteínas, se suman a las diferencias fisiológicas y parasitológicas observadas entre T. cruzi y T. brucei, lo que indica que la validez del género Trypanosoma debe ser reconsiderada (Gómez et al., 1991; Hecker, 1993; Amorim et al., 1993).

Retomando los resultados presentados en la figura 16, tenemos que entre mamíferos, anfibios y tripanosomatidios se presenta una T en la posición -1 y una G en la posición +4. En las levaduras estas bases se encuentran desplazadas una posición (T en -2 y G en +3). En todos los casos, excepto en C. fasciculata, una purina es el primer nucleótido transcrito. Se ha demostrado que mutaciones en los nucleótidos -1 y +1 pueden disminuir drásticamente la tasa

de transcripción (Zomerdijk et al., 1991; Rudenko et al., 1991). El papel de la G en la posición +4 no ha sido determinado, aunque la conservación de esta base probablemente refleje su importancia funcional.

#### ¿Dos regiones promotoras en la unidad de RNAr de T. cruzi?

Durante la preparación de este trabajo, fue publicado un estudio análogo llevado a cabo con la cepa CL de T. cruzi (Dietrich et al., 1993). El sitio de inicio de la transcripción propuesto en ese reporte se ubica 270 pb "rio abajo" del sitio de inicio aquí presentado (figura 6); esto indica que el sitio de inicio localizado en la cepa CL podría en realidad ser un sitio de procesamiento, aunque la presencia de dos promotores no puede descartarse. Convenimos en denominar promotor distal al identificado en este trabajo, y promotor proximal al localizado por Dietrich et al. (1993).

Las primeras 814 bases de nuestra secuencia (figura 6) claramente se alinean con la secuencia homóloga de la cepa CL. La comparación de las dos secuencias de T. cruzi indicó la presencia de 88 inserciones o deleciones y 83 substituciones. Estos cambios se distribuyeron a lo largo de toda la secuencia, sin concentrarse en alguna región en particular. Al comparar la secuencia que flanquea a los dos probables sitios de inicio de la transcripción, se encontró

que la secuencia  $-4\text{TCATGNNG}+4$  se presenta tanto en el promotor distal como en el proximal (figuras 6 y 16). Esta región podría ser funcionalmente importante, dada su conservación, y el hecho de que incluya el nucleótido +1. Además, se localizó otra región en la que se presenta similitud entre los dos promotores, ubicada en el promotor distal entre las bases -22 a -11, y el promotor proximal entre los nucleótidos -17 a -4:

Promotor distal      -22C-CA-TTTGTGTCT-11

Promotor proximal    -17CACAATTTGTGTGT-4

El papel fisiológico de estas secuencias deberá ser analizado en un sistema de transcripción in vitro, o en células transfectadas con genes reporteros bajo el control del promotor aquí propuesto.

Nuestros datos no descartan la funcionalidad del probable promotor proximal. En el ensayo de protección con nucleasa S1 (figura 10) se observa un fragmento abundante cuyo tamaño aproximado podría corresponder a un transcrito derivado del promotor proximal (banda más cercana al fragmento 7 totalmente protegido, figura 10, panel 2). Se plantea la posibilidad de que los dos promotores sean funcionales, bajo similares o diferentes condiciones fisiológicas.

Evidencias que sugieren que la región promotora de la unidad de RNAr descrita en este trabajo es funcional.

Para probar que la región promotora del RNAr de T. cruzi caracterizada en este trabajo es activa, son necesarios ensayos de transcripción in vitro, o transfecciones con genes reporteros. Sin embargo, la evidencia experimental presentada en este reporte, y que a continuación se comenta, sugiere que el sitio de inicio de la transcripción aquí localizado es un sitio real, y que la región promotora es funcional:

1) Los resultados obtenidos en los experimentos tipo Northern (figura 8) claramente muestran que con el fragmento 8-3 no se presenta ninguna señal de hibridación, ni siquiera a tiempos de exposición muy prolongados. Esto nos indicó que el fragmento genómico 8-3 no se transcribe, sino que la transcripción comienza dentro del fragmento 8-2.

2) La distancia entre el sitio de inicio de la transcripción y la región codificadora del RNAr 18S en T. cruzi y T. brucei es similar (1768 pb y aproximadamente 1200 pb, respectivamente). En ambos casos la ubicación del sitio de inicio se llevó a cabo mediante ensayos de protección con nucleasa S1. En T. brucei ya se han llevado a cabo transfecciones con genes reporteros (Rudenko et al., 1991).

encontrándose que la región promotora identificada es funcional.

3) Al analizar los sitios de restricción de Hinf I en la región que rodea al probable promotor de RNAr (figura 13), se encontró que en las cuatro cepas de T. cruzi estudiadas existe poca variabilidad en esta región, lo que sugiere que esta parte del genoma es funcionalmente importante.

4) La presencia de secuencias conservadas ( $-^4\text{TCATGNGG}^4$  y  $-^{22}\text{C-CA-TTTGTGTCT}^{-11}$ ) entre los dos probables promotores de T. cruzi (distal y proximal) sugiere la relevancia funcional de estas regiones.

5) En la mayoría de los organismos estudiados se han localizado secuencias repetidas en los espaciadores intergénicos de la unidad de RNAr, los cuales funcionan como activadores de la transcripción (Reeder, 1984). Se ha encontrado que generalmente el sitio de inicio de la transcripción se localiza a aproximadamente 200 pb "río abajo" del último elemento repetido del espaciador (Kuhn et al., 1990; Putnam y Pikaard, 1992). Los datos reportados por Dietrich et al. (1993) y observaciones realizadas en el laboratorio del Dr. Hernández (no publicadas), indican que en el espaciador intergénico de T. cruzi se presentan elementos repetidos de aproximadamente 170 pb; el último de estos elementos repetidos se ubica a 146 pb "río arriba" del

sitio de inicio de la transcripción localizado en esta tesis (de los nucleótidos 17 a 187 de la secuencia presentada en la figura 6).

## B I B L I O G R A F I A.

- Amorim, M.I., Momen, H. y Traub-Cseko, Y.M.: Trypanosoma rangeli: sequence analysis of the  $\beta$ -tubulin gene suggests closer relationship to Trypanosoma brucei than to Trypanosoma cruzi. Acta trop. 53 (1993) 99-105.
- Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.M., Seidman, J.G., Smith, J.A. and Struhl, K. (Eds.), Current Protocols in Molecular Biology. Green Publishing Associates, Massachusetts General Hospital, Harvard Medical School, Cambridge, MA, 1991.
- Bach, R., Allet, B. and Crippa, M.: Sequence organization of the spacer in the ribosomal genes of Xenopus clivii and Xenopus borealis. Nucleic Acids Res. 9 (1981) 5311-5330.
- Balzi, E., Di Pietro, A., Goffeau, A., Van Heerikhuizen, H. and Klootwijk, J.: The RNA polymerase I initiation site and the external transcribed spacer of the fission yeast Schizosaccharomyces pombe ribosomal RNA genes. Gene 39 (1985) 165-172.
- Bayev, A.A., Georgiev, O.I., Hadjiolov, A.A., Kermekchiev, M.B., Nikolaev, N., Skryabin, K.G. and Zakharyev, V.M.: The structure of the yeast ribosomal RNA genes. 2. The nucleotide sequence of the initiation site for ribosomal RNA transcription. Nucleic Acids Res. 8 (1980) 4919-4926.
- Bell, S.P., Learned, R.M., Jantzen, H. y Tjian, R.: Functional cooperativity between transcription factors



- UBF1 and SL1 mediates human ribosomal RNA synthesis.  
Science 241 (1988) 1192-1197.
- Bourbon, H., Michot, B., Hassouna, N., Feliu, J. y  
Bachelierie, J.P.: Sequence and secondary structure of  
the 5' external transcribed spacer of mouse pre-rRNA.  
DNA 7 (1988) 181-191.
- Burke, J.F.: High-sensitivity S1 mapping with single-  
stranded (<sup>32</sup>P)DNA probes synthesized from bacteriophage  
M13 templates. Gene 30 (1984) 63-68.
- Camargo, E.P.: Growth and differentiation of Trypanosoma  
cruzi. Origin of metacyclic trypanosomas in liquid  
medium. Revta. Int. Met. Trop. Sao Paulo 6 (1964) 220-  
224.
- Clark, C.G.: On the evolution of ribosomal RNA. J. Mol.  
Evol. 25 (1987) 343-350.
- Dias, J.C.P.: Acute Chagas disease. Mem. Inst. Oswaldo Cruz  
79 (1984) 85-91.
- Dietrich, P., Soares, M.B., Affonso, M.H.T. and Floeter-  
Winter L.M.: The Trypanosoma cruzi ribosomal RNA-  
encoding gene: analysis of promoter and upstream  
intergenic spacer sequences. Gene 125 (1993) 103-107.
- Financsek, I., Mizumoto, K., Mishima, Y. and Muramatzu, M.:  
Human ribosomal RNA gene: nucleotide sequence of the  
transcription initiation region and comparison of three  
mammalian genes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79 (1982)  
3092-3096.

- Furlong, J.C., Forbes, J., Robertson, M. and Maden, B.E.H.:  
The external transcribed spacer and preceding region of  
Xenopus borealis rDNA: comparison with the corresponding  
region of Xenopus laevis rDNA. Nucleic Acids Res. 11  
(1983) 8183-8196.
- Furlong, J.C., Forbes, J., Robertson, M. y Maden, B.E.H.:  
The external transcribed spacer and preceding region of  
Xenopus borealis rDNA : comparison with the  
corresponding region of Xenopus laevis rDNA. Nucleic  
Acids Res. 11 (1983) 8183-8196.
- García, E.S. y Azambuja, P.: Development and interactions of  
Trypanosoma cruzi within the insect vector. Parasitol.  
today 7 (1991) 240-243.
- Geiduscheck, P.E. y Tocchini-Valentini, G.P.: Transcription  
by RNA polymerase III. Ann. Rev. Biochem. 57 (1988) 873-  
914.
- Gómez, E., Valdés, A.M., Piñero, D. and Hernández, R.: What  
is a genus in the Trypanosomatidae family? Phylogenetic  
analysis of two small rRNA sequences. Mol. Biol. Evol. 8  
(1991) 254-259.
- Gomez, E.: RNA ribosomal de Trypanosoma cruzi: análisis  
estructural y filogenético de las regiones que codifican  
para las moléculas S1 y S3. (1990). Tesis. UACPyP del  
CCH. UNAM.
- González, I.L., Chambers, C., Gorski, J.L., Stambolian, D.,  
Schmickel, R.D. y Sylvester, J.E.: Sequence and

- structure correlation of human ribosomal transcribed spacers. *J. Mol. Biol.* 212 (1990) 27-35.
- Gray, M.W.: Unusual pattern of ribonucleic acid components in the ribosome of Crithidia fasciculata, a trypanosomatid protozoan. *Mol. Cell. Biol.* 1 (1981) 347-357.
- Grondal, E.J.M., Evers, R. and Cornelissen, A.W.C.A.: Identification and sequence analysis of the ribosomal DNA promoter region of Crithidia fasciculata. *Nucleic Acids Res.* 18 (1990) 1333-1338.
- Grummt, I., Roth, E. and Paule, M.R.: Ribosomal RNA transcription in vitro is species-specific. *Nature* 296 (1982) 173-174.
- Grummt, I., Roth, E. y Paule, M.: Ribosomal transcription in vitro is species-specific. *Nature* 296 (1982) 173-174.
- Hecker, H.: Man and sea urchin - More closely related than african and american trypanosomes? *Parasitol. Today* 9 (1993) 57.
- Hernández, R., Díaz de León, F. and Castañeda, M.: Molecular cloning and partial characterization of ribosomal RNA genes from Trypanosoma cruzi. *Mol. Biochem. Parasitol.* 27 (1988) 275-280.
- Hernández, R., Nava, G. and Castañeda, M.: Small size ribosomal RNA species in Trypanosoma cruzi. *Mol. Biochem. Parasitol.* 8 (1983) 297-304.
- Hernández, R., Ríos, P., Valdés, A.M. and Piffero, D.: Primary structure of Trypanosoma cruzi small-subunit

- ribosomal RNA coding region: comparison with other trypanosomatids. *Mol. Biochem. Parasitol.* 41 (1990) 207-212.
- Hernández-Rivas, R., Martínez-Calvillo, S., Romero, M. y Hernández, R.: Trypanosoma cruzi 5S rRNA genes: molecular cloning, structure and chromosomal organization. *FEMS Microbiol. Letters* 92 (1992) 63-68.
- Higgins, D.G. y Sharp, P.M.: CLUSTAL: a package for performing multiple sequence alignment on a microcomputer. *Gene* 73 (1988) 237-244.
- Ishikawa, Y., Safrany, G., Hisatake, K., Tanaka, N., Maeda, Y., Kato, H., Kominami, R. y Muramatsu, M.: Structure of the core promoter of human and mouse ribosomal RNA gene. Asymmetry of species-specific transcription. *J. Mol. Biol.* 218 (1991) 55-67.
- Jantzen, H., Admon, A., Bell, S.P. y Tjian, R.: Nucleolar transcription factor hUBF contains a DNA-binding motif with homology to HMG proteins. *Nature* 334 (1990) 830-836.
- Kahn, S., Colbert, T.G., Wallace, J.C., Hoagland, N.A. y Eisen, H.: The major 85 KDa surface antigen of the mammalian-stage forms of Trypanosoma cruzi is a family of sialidases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88 (1991) 4481-4485.
- Kierszenbaum, F. y Hudson, L.: Autoimmunity in Chagas disease: cause or symptom? *Parasitol. today* 1 (1985) 4-9.

- Kuhn, A. y Grummt, I.: Dual role of the nucleolar transcription factor UBF: trans-activator and antirepressor. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89 (1992) 7340-7344.
- Kuhn, A., Deppert, U. y Grummt, I.: A 140-base-pair repetitive sequence element in the mouse rRNA gene spacer enhances transcription by RNA polymerase I in a cell-free system. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87 (1990) 7527-7531.
- Labhart, P. y Reeder, R.H.: High initiation rates at the ribosomal gene promoter do not depend upon spacer transcription. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86 (1989) 3155-3158.
- Lapalme, G., Cedergren, R.J. y Sankoff, D.: An algorithm for the display of nucleic acids secondary structure. Nucleic Acids Res. 10 (1982) 8351-8356.
- Lehrach, H., Diamond, D., Wozney, J.M. and Boedtke, H.: RNA molecular weight determinations by gel electrophoresis under denaturing conditions: a critical reexamination. Biochemistry 16 (1977) 4743-4751.
- MacDonald, R.J., Swift, G.H., Przybyla, A.E. and Chirgwin, J.M.: Isolation of RNA using guanidinium salts. Methods Enzymol. 152 (1987) 219-227.
- Martínez-Calvillo, S.: Clonación del extremo 3' del cistron de RNA ribosomal de Trypanosoma cruzi. (1990). Tesis, Facultad de Ciencias, UNAM.

- McGhee, R.B. y Cosgrove, W.B.: Biology and physiology of the lower Trypanosomatidae. *Microbiol. Rev.* 44 (1980) 140-173
- Nogueira, N.: En Parasite antigens, toward new strategies for vaccines: american trypanosomiasis. (1986). T.W. Pearson ed., Marcel Dekker Inc., Nueva York.
- Paule, M.R., Bateman, E., Hoffman, L., Iida, C., Imboden, M., Kubaska, W., Kownin, P., Li, H., Lofquist, A., Risi, P., Yang, Q. y Zwick, M.: Initiation and regulation mechanisms of ribosomal RNA transcription in the eukaryote Acanthamoeba castellanii. *Mol. Cell. Biochem.* 104 (1991) 119-126.
- Pereira, M.E.A.: Cell biology of Trypanosoma cruzi. En Modern parasite biology: cellular, immunological and molecular aspects. (1990). David, J.W. Eds. W.H. Freeman and Company, Nueva York.
- Pustell, J. y Kafatus, F.C.: A convenient and adaptable package of computer programs for DNA and protein sequence management, analysis and homology determination. *Nucleic Acids Res.* 12 (1984) 643-656.
- Putnam, C.D. y Pikaard, C.S.: Cooperative binding of the Xenopus RNA polymerase I transcription factor xUBF to repetitive ribosomal gene enhancers. *Mol. Cell. Biol.* 12 (1992) 4970-4980.
- Reeder, R.H.: Enhancers and ribosomal gene spacers. *Cell* 38 (1984) 349-351.

- Reeder, R.H.: rRNA synthesis in the nucleolus. TIG 6 (1990) 200-205.
- Rothblum, L., Reddy, R. and Cassidy, B.: Transcription initiation site of rat ribosomal DNA. Nucleic Acids Res. 10 (1982) 7345-7363.
- Rudenko, G., Chung, H.M., Pham, V.P. y Van der Ploeg, L.T.H.: RNA polymerase I can mediate expression of CAT and neo protein-coding genes in Trypanosoma brucei. EMBO J. 10 (1991) 3387-3397.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. y Maniatis, T.: Molecular cloning, a laboratory manual. Segunda ed. Cold Spring Harbor, Nueva York (1989).
- Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A.R.: DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74 (1977) 5463-5467.
- Schnapp, A., Rosenbauer, H. y Grummt, I.: Trans-acting factors involved in species-specificity and control of mouse ribosomal gene transcription. Mol. Cell. Biochem. 104 (1991) 137-147.
- Sollner-Webb, B. and Reeder, R.: The nucleotide sequence of the initiation and termination sites for ribosomal RNA transcription in Xenopus laevis. Cell 18 (1979) 485-499.
- Sollner-Webb, B. y Mougey, E.B.: News from the nucleolus: rRNA gene expression. TIBS 16 (1991) 58-62.
- Sollner-Webb, B. y Tower, J.: Transcription of cloned eukaryotic ribosomal RNA genes. Ann. Rev. Biochem. 55 (1986) 801-830.

- Sommerville, J.: RNA polymerase I promoters and transcription factors. *Nature* 310 (1984) 189-190.
- Southern, E.M.: Detection of a specific sequence among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* 98 (1975) 503-517.
- Thiry, M.: New data concerning the functional organization of the mammalian cell nucleolus: detection of RNA and rRNA by in situ molecular immunocytochemistry. *Nucleic Acids Res.* 20 (1992) 6195-6200.
- Verbeet, M.Ph., Klootwijk, J., Van Heerikhuizen, H., Fontijn, R., Vreugdenhil, E. and Planta, R.J.: Molecular cloning of the rDNA of Saccharomyces rosei and comparison of its initiation region with that of Saccharomyces carlsbergensis. *Gene* 23 (1983) 53-63.
- Verbeet, M.Ph., Klootwijk, J., Van Heerikhuizen, H., Fontijn, R.D., Vreugdenhil, E. and Planta, R.J.: A conserved sequence element is present around transcription initiation site for RNA polymerase A in Saccharomycetoidae. *Nucleic Acids Res.* 12 (1984) 1137-1148.
- White, R.J. y Jackson, S.P.: The TATA- binding protein: a central role in transcription by RNA polymerases I, II and III. *TIG* 8 (1992) 284-288.
- White, T.C., Rudenko, G. and Borst, P.: Three small RNAs within the 10 Kb trypanosoma rRNA transcription unit are analogous to domain VII of other eukaryotic 28S rRNAs. *Nucleic Acids Res.* 14 (1986) 9471-9489.



- Xie, W.Q., O'Mahony, D.J., Smith, S.D. y Rothblum, L.:  
Complementary in vivo and in vitro analysis of the  
interactions between the cis-acting elements of the rat  
rDNA promoter. Mol. Cell. Biochem. 104 (1991) 127-135.
- Yanisch-Perron, C., Vieira, J. y Messing, J.: Improved M13  
phage cloning vectors and host strains: nucleotide  
sequences of the M13mp18 y pUC19 vectors. Gene 33 (1985)  
103-119.
- Young-Choe, S., Schultz, M.C. y Reeder, R.H.: In vitro  
definition of the yeast RNA polymerase I promoter.  
Nucleic Acids Res. 20 (1992) 279-285.
- Zavala-Castro, J.E., Velasco-Castrejón, O. y Hernández, R.:  
Molecular characterization of mexican stocks of  
Trypanosoma cruzi using total DNA. Am. J. Trop. Med.  
Hyg. 47 (1992) 201-209.
- Zomerdijk, J.C.B.M., Kieft, R., Shiels, P.G. y Borst, P.:  
Alpha-amanitin-resistant transcription units in  
trypanosomes: a comparison of promoter sequences for a  
VSG gene expression site and for the ribosomal RNA  
genes. Nucleic Acids. Res. 19 (1991) 5153-5158.
- Zuker, M. y Stiegler, P.: Optimal computer folding of large  
RNA sequences using thermodynamics and auxiliary  
information. Nucleic Acids Res. 9 (1981) 133-148.

## APENDICE.

- Agar suave: peptona 0.8%, extracto de levadura 0.8%, NaCl 0.5% y agar 0.5%.
- Buffer de fosfatos de sodio:  $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$  0.025 M, pH 7
- Medio de infusión de hígado y triptosa (LIT): infusión de hígado 0.5%, triptosa 0.2%, NaCl 0.4%, KCl 0.04%,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0.8%, glucosa 0.2%, suero bovino fetal 10% y hemina 0.0025%.
- Medio Luria: Peptona 1%, extracto de levadura 0.5%, NaCl 1% y agar 1.5%.
- Medio YT: peptona 0.8%, extracto de levadura 0.8%, NaCl 0.5% y agar 1.5%.
- PBS: NaCl 0.13 M, KCl 2.68 mM,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  10 mM,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1.7 mM, pH 7.4.
- SE: NaCl 150 mM, EDTA 100 mM, pH 8.0
- Solución Denhardtts 1X: Ficoll 400 0.02%, PVP-40 0.02% y albumina sérica bovina 0.02%.
- Solución desnaturalizadora: NaOH 2% y NaCl 8.7%.
- Solución neutralizadora: NaCl 8.7% y Tris-HCl 6.6%, pH 7.
- SSC 1X: NaCl 150 mM y citrato de sodio 15 mM.
- TBE 1X: Tris-HCl 5.4%, ácido bórico 2.74% y EDTA 0.46%.
- TE: Tris-HCl 10 mM (pH 8.0) y EDTA 1 mM.
- TNE 1X: Tris-HCl 0.01 M (pH 8.0), NaCl 0.1 M y EDTA 1 mM, pH 8.0.
- 6,6.0.2 : Tris-HCl 6 mM (pH 7.4), NaCl 6 mM y EDTA 0.2 M.