



2
20j

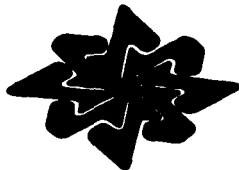
**UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTONOMA DE MEXICO**

**Unidad Académica de los Ciclos de Profesional
y Posgrado - CCH
Instituto de Investigaciones Biomédicas**

**"Aislamiento y Caracterización de Clonas
de cDNA que Codifican para la proteína
Ribosomal S4 de *Trypanosoma cruzi*"**

T E S I S
para la obtención del título de
Licenciado en Investigación Biomédica Básica

SERGIO PALACIOS BONETA



JUNIO DE 1997

**CEPIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

***A mi familia,
mi Papá, mi Mamá, y mi hermano
A mi abuelito Enrique
A mis tíos Enrique y René***

A Itzel

***Al Dr. Sergio Sánchez Esquivel,
A la Dra. Ana Luisa Anaya Lang.
Quienes siempre me han brindado su apoyo***

***A mis maestros, compañeros y a todos aquellos que han
contribuido en mi formación***

A la Universidad Nacional Autónoma de México

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN	vi
ILUSTRACIONES	viii
AGRADECIMIENTOS	xi

I.- INTRODUCCIÓN

1.1.-<i>Trypanosoma cruzi</i>	1
1.2.-Ciclo de vida	2
1.3.-Procesos Genéticos de <i>Trypanosoma cruzi</i>	4
1.4.-Antecedentes	8
1.5.-PCNA	8
1.6.-El Ribosoma Eucariótico	9
1.7.-Genes para RNA ribosomal en Tripanosomas	13
1.8.-Proteína Ribosomal S4	15

Objetivos del Trabajo 18

II.- MATERIALES Y MÉTODOS

2.1.-Cultivo y Extracción de ácidos nucleicos de <i>Trypanosoma cruzi</i>	19
2.1.1 Cultivos	19
2.1.2.-Extracción del DNA	19
2.1.3.-Extracción de RNA total	20
2.2.-Preparación de Plásmidos, recuperación de insertos y marcaje radioactivo de los mismos	21

2.2.1.-Preparación de células competentes y transformación	21
2.2.2.-Descripción de plásmidos: PCNA	22
2.2.3.-Descripción de plásmidos: Proteína ribosomal S4	23
2.2.4.-Preparación de plásmidos a pequeña escala	23
2.2.5.-Preparación de plásmidos a gran escala	24
2.2.6.-Recuperación de insertos	27
2.2.7.-Marcaje del inserto utilizado como sonda mediante el método de "iniciador al azar"	26
2.3.-Southern Blot de DNA genómico	26
2.3.1.-Digestión y transferencia	26
2.3.2.-Hibridación	27
2.4.-Northern Blot de RNA total de <i>T. cruzi</i>	28
2.5.-Screening de la biblioteca genómica insertada en el cósmido pcosTL	28
2.5.1.-Southern blot de las clonas positivas	29
2.6.- Screening de la biblioteca de cDNA	31
2.6.1.-Preparación e infección de las células con el fago λ	31
2.6.2.-Transferencia de las placas de lisis a membranas	32
2.6.3.-Screening de las membranas con sondas marcadas radioactivamente	32
2.6.4.-Excisión del vector λ-ZAP-II al plásmido Bluescript	33
2.6.5.- Southern blot de las clonas obtenidas	34

RESUMEN

Trypanosoma cruzi es el agente etiológico de la enfermedad de Chagas. Este parásito ha mostrado que posee características y mecanismos atípicos en el manejo y expresión de su genoma. Este hecho, aunado a la importancia médica del organismo, hacen de *T. cruzi* un interesante modelo de importancia médica y biológica. Con el interés de estudiar genes relacionados con la proliferación se eligieron dos modelos: el gene del antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA, factor auxiliar de la DNA polimerasa III) y el de la proteína ribosomal S4 (componente de la subunidad pequeña (40S) del ribosoma). Para la clonación de estos genes se utilizaron como sondas heterólogas una clona de cDNA que codifica para el PCNA del maíz (*Zea mays*) (López et al., 1995) y una clona de cDNA de *Trypanosoma brucei* cuyo producto tiene homología parcial con la proteína ribosomal S4 de mamíferos (El-Sayed, et al., 1995). Se analizó sin éxito una biblioteca genómica de *T. cruzi* insertada en el vector cosmídico pcosTL. Al analizar una biblioteca de cDNA construida en el vector fágico λ -ZAP-II se aislaron doce clonas cuyos insertos mostraban señal con la sonda de la proteína ribosomal S4 y cuatro que mostraban señal con la sonda de PCNA. Al digerir las preparaciones de los plásmidos escindidos *in vivo* de las clonas positivas, se observaron dos poblaciones de clonas aisladas con la sonda de S4: una que mostraba una banda de inserto (aproximadamente 1.25 Kb) y otra con dos bandas (aproximadamente 1.25 y 1.7 Kb). Mas tarde se comprobó que la banda de 1.7Kb era producto de una digestión parcial. Las clonas aisladas con el inserto de PCNA tenían insertos de 2.1, 2.3 y 1.4 y 2.3

Kb. La secuencia del extremo 5' del inserto de la clona aislada con la sonda de PCNA no mostró secuencias del miniexón (SL), marcos abiertos de lectura ni homología parcial con la sonda utilizada. Por otra parte, la secuencia del inserto de las clonas aisladas con la sonda de la proteína ribosomal S4 mostraron insertos de 937 y 945 bases para las clonas S4-2 y S4-6, respectivamente. La única diferencia correspondió a una inserción de 21 nucleótidos en el extremo 3' de la clona S4-2. Trece bases del miniexón (SL) fueron secuenciadas, por lo que se observó una región no traducida 5' de 22 nucleótidos y 3' de 80 y 59 nucleótidos para la clona S4-2 y S4-6, respectivamente. El inserto contiene un marco abierto de lectura que codifica para una proteína de 273 aminoácidos, con un peso de 30,839 Da y con un contenido de aminoácidos básicos (22%) mayor al de aminoácidos ácidos (9%). La alineación de la secuencia deducida de aminoácidos con la de secuencias de la proteína ribosomal S4 de otros organismos muestra grandes dominios conservados, sobre todo en el extremo amino terminal. Un análisis filogenético de la secuencia de la proteína ribosomal S4 dio como resultado un árbol cuya topología coincide en gran medida con la de un marcador evolutivo clásico, como es el rRNA 18S.

ILUSTRACIONES**FIGURAS**

- Figura 1.1.- Ciclo de vida de *Trypanosoma cruzi*. 3**
- Figura 1.2.- Algunas unidades de transcripción de *Trypanosoma brucei*. 4**
- Figura 1.3.-Procesamiento del RNA mensajero en eucariontes. 6**
- Figura 1.4.- El ribosoma eucariótico. 10**
- Figura 1.5.- Organización de los genes ribosomales. 14**
- Figura 2.1.- Vector pcosTL. 29**
- Figura 2.2.- Escisión del Plásmido Bluescript SK. 33**
- Figura 2.3.- Diagrama del proceso de infección y escisión. 34**
- Figura 3.1.- Southern blot de DNA genómico de *T. cruzi*. 44**
- Figura 3.2.- Northern blot de RNA total de *T. cruzi*. 45**
- Figura 3.3.- Southern blot de las clonas aisladas de la biblioteca de DNA genómico de *T. cruzi*. 47**
- Figura 3.4.- Clonas aisladas de la biblioteca de cDNA de *T. cruzi*. 49**
- Figura 3.5.- Alineamiento de las clonas S4-2 y S4-6 51**
- Figura 3.6. Secuencia de aminoácidos deducida a partir de las clonas de cDNA obtenidas. 52**
- Figura 3.7. Alineamiento de la secuencia deducida de aminoácidos de la proteína ribosomal S4 de *T. cruzi* con secuencias publicadas de la misma proteína de otros organismos 55**

Figura 3.8. Arbol filogenético elaborado a partir de la alineación de secuencias de aminoácidos de la proteína ribosomal S4 y de la secuencia del rRNA 18S 56

TABLAS

Tabla 1.1: Algunas diferencias entre los ribosomas eucarióticos y procarióticos. 12

Tabla 1.2: Distribución filogenética de los homólogos de las proteínas ribosomales de rata. 13

Tabla 2.1: Digestiones de clonas genómicas y controles 30

Tabla 2.2.- Secuencia de los iniciadores utilizados 36

Tabla 2.3.- Reacción de marcaje. 39

Tabla 2.4.- Fórmula de preparación del gel de secuencia 49

Tabla 3.1. Porcentaje de similitud de la secuencia deducida de aminoácidos de la proteína ribosomal S4 de *T. cruzi* con respecto a secuencias publicadas de otros organismos. 53

El presente trabajo se llevó a cabo en el laboratorio del Dr. Roberto Hernández Fernández del Departamento de Biología Molecular, con la colaboración de la Dra. Imelda López Villaseñor del Departamento de Biotecnología, del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México.

AGRADECIMIENTOS

A los Doctores Roberto Hernández Fernández e Imelda López Villaseñor por haberme permitido realizar el presente trabajo bajo su dirección.

A mi jurado, los Doctores Luis Servín, David Romero, Gerardo Gamba y Marco A. Meraz por la lectura, revisión y evaluación del presente trabajo.

A los Doctores Silvia Galván y Antonio Lazcano por haberme asesorado en la utilización de programas de análisis filogenético y en la interpretación de los resultados.

I

INTRODUCCIÓN

1.1 *TRYPANOSOMA CRUZI*

Trypanosoma cruzi es un protozooario hemoflagelado, agente etiológico de la enfermedad de Chagas. Fue descubierto en 1910 por el biólogo brasileño Carlos Chagas, al examinar los intestinos de las chinches hematófagas. Este parásito está distribuido en Centro y Sudamérica y es responsable de un millón de casos anuales y de 45 000 muertes por enfermedad de Chagas. Se calcula que existen de 16 a 18 millones de individuos infectados, de los cuales 2 a 3 millones ya han manifestado complicaciones crónicas, y 3 millones se encuentran en el período de incubación (OMS, 1996).

La transmisión de la enfermedad se lleva a cabo a través de las heces de los insectos vectores, las chinches de los géneros *Panstrongylus*, *Rhodnius* y *Triatoma*, o mediante transfusiones sanguíneas.

La enfermedad de Chagas manifiesta una etapa crónica y una aguda. La fase aguda, mas común y grave en niños menores de 5 años, comienza con una inflamación en el sitio de la infección, causando un nódulo denominado chagoma. Posteriormente, el parásito invade otros órganos, como vísceras huecas del tracto digestivo o corazón. En el tejido cardiaco provoca miocarditis que puede causar la muerte. La infección puede iniciarse con la penetración del parásito a través de la membrana conjuntiva del ojo, causando irritación e inflamación; a este edema se le conoce como signo de Romaña. La fase crónica, común en adultos, frecuentemente se establece después de un período indeterminado que puede durar años. Durante la fase crónica se incrementa la invasión del parásito a tejido cardiaco y a ganglios

nerviosos. En algunos casos también se destruyen ganglios nerviosos en el esófago o intestino grueso, causando relajación de la capa muscular. A estos síntomas se les denominan megaesófago y megacolon, siendo fatal el primero al impedir la deglución (revisado por Schmidt y Roberts, 1989).

1.2 CICLO DE VIDA

Trypanosoma cruzi es un parásito heteroxeno, es decir, que en una parte de su ciclo de vida vive en la sangre o tejidos de un hospedero vertebrado, y en otra vive en el intestino de un insecto vector hematófago.

El tripanosoma tiene tres fases en su ciclo de vida: tripomastigote, amastigote y epimastigote. El tripomastigote es el estadio infeccioso (no replicativo) del parásito, mide aproximadamente 20 μm de largo y 2 μm de ancho, y posee una estructura en forma de disco o tubular (denominada cinetoplasto) posterior al núcleo. El amastigote corresponde a la fase replicativa intracelular, tiene una forma redonda y con un flagelo corto. Se reproduce por fisión binaria, con un tiempo de duplicación en cultivo de 7 a 14 horas. El epimastigote tiene el cinetoplasto localizado anterior al núcleo, y tiene una forma de huso con un tamaño que va de 20 μm a 40 μm de longitud. Corresponde al estadio replicativo presente en el vector.

Al picar el insecto vector, los tripomastigotes son liberados en las heces y penetran la piel a través de una herida (que puede ser la picadura) o de las mucosas. Posteriormente penetran a las células, y ahí se

diferencian a amastigotes; éstos se dividen por fisión binaria para luego rediferenciarse a tripomastigotes que lisan a la célula, se liberan y pueden infectar otras células o mantenerse temporalmente en el torrente sanguíneo. Los tripomastigotes también pueden entrar a un insecto vector al ser ingeridos durante una picadura. En el insecto vector, los tripomastigotes se diferencian a epimastigotes, que migran hacia la parte final del intestino; allí se unen a las glándulas rectales del insecto y se diferencian a tripomastigotes metacíclicos, los cuales son liberados en las heces del insecto durante la picadura.

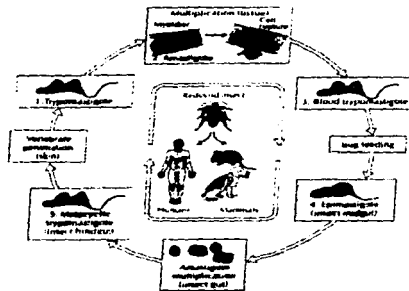


Figura 1.1.-Ciclo de vida de *Trypanosoma cruzi*. Después de una parasitemia inicial de tripomastigotes (forma flagelada)[1], los parásitos penetran el tejido cardiaco y otros tejidos, donde se diferencian a amastigotes (forma aflagelada) [2]. La división intracelular del parásito provoca la ruptura de la célula, ocasionando que los parásitos entren al torrente sanguíneo o penetren otros tejidos. El ciclo se completa cuando un insecto adquiere los parásitos al alimentarse con sangre[3]. Los tripanosomas se diferencian a epimastigotes en el intestino del insecto [4], se reproducen y migran a la parte posterior del intestino donde se convierten a tripomastigotes metacíclicos. [5]. (Tomado de Braunwald, 1995)

1.3 PROCESOS GENÉTICOS DE *TRYPANOSOMA CRUZI*

T. cruzi es un organismo que ha mostrado una gran variedad de mecanismos atípicos en la expresión de su genoma. Dadas las características de patogenicidad de este organismo, los estudios básicos de organización y expresión de su genoma adquieren no sólo un interés biológico sino también biomédico.

Se ha observado que es un organismo diploide con por lo menos 20 pares de cromosomas y que, a diferencia de *T. brucei*, carece de minicromosomas (Gibson y Miles, 1986). Los genes codificadores de proteínas de algunos tripanosomatídeos están organizados en unidades de transcripción policistrónicas, genes repetidos en tándem y separados por regiones intergénicas, que son transcritos y procesados simultáneamente; esta organización ha sido muy estudiada en *Trypanosoma brucei* (revisado por Graham, 1995).

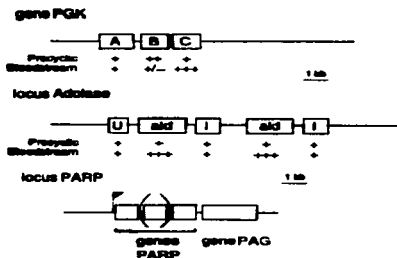


Figura 1.2:- Algunas unidades de transcripción de *Trypanosoma brucei*. Los (+) indican el nivel de transcripción en la fase señalada (procyclic: tripomastigote procíclico; bloodstream: tripomastigote sanguíneo). (Tomado de Graham, 1995).

Todos los genes descritos hasta ahora en este organismo carecen de intrones, por lo que el procesamiento del RNA mensajero es distinto al del resto de los eucariontes. Este procesamiento, denominado trans-splicing (en contraposición al cis-splicing del resto de los eucariontes) consiste en la adición en el extremo 5' de un miniexón común a todos los transcritos (revisado por Stuart, Feagin y Abraham, 1989). Este miniexón, denominado "spliced leader" (SL) es una secuencia de 39 nucleótidos derivada de una secuencia precursora de 110 bases (SL-RNA), cuyos genes se encuentran organizados en cúmulos de 0.6 Kb. (McCarthy-Burke, C., Taylor, Z., y Buck, G., 1989). La adición de este mini exón da como resultado, además de la adición de un "cap" de 5' metil-guanosina que confiere estabilidad al transcrito, y una molécula en forma de "Y" derivada de las porciones escindidas de los transcritos, con una unión 2'-3'-ADP en el sitio de la bifurcación. Se cree que este proceso pueda constituir un nivel de regulación de la expresión de los genes codificados en unidades de transcripción policistrónicas (revisado por Boothroyd, Muhich y Sutton, 1988). La poliadenilación está al parecer relacionada con el trans-splicing, aunque no se ha identificado una secuencia consenso en la región no traducida en el extremo 3' del mensajero para este proceso; al parecer, se ha identificado una región rica en pirimidinas dentro del espaciador intergénico que pudiera controlar la poliadenilación (revisado por Graham, 1995).

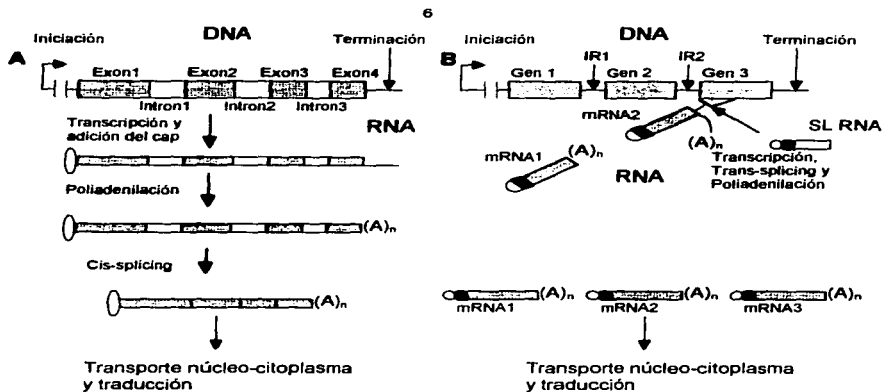


Figura 1.3:- Procesamiento del RNA mensajero en eucariotes. Cis- splicing (A) y Trans-splicing (B). (Adaptado de Graham, 1995)

El cinetoplasto es una estructura en forma tubular o de disco particular del orden Kinetoplastida. Esta estructura se encuentra localizada en la parte posterior del organismo dentro de la mitocondria, y está organizado como una red de moléculas circulares de DNA grandes y pequeñas, denominadas kDNA. Las moléculas grandes (maxicirculos) contienen el equivalente típico del DNA mitocondrial, y en ellas se han encontrado codificados dos genes de RNA ribosomal y genes de proteínas tales como citocromos, apocitocromos o subunidades de la NADH deshidrogenasa (rev. por Benne, et al., 1986). Durante mucho tiempo se desconoció la función de las moléculas pequeñas (minicirculos), pero se ha encontrado recientemente que codifican para

unas pequeñas moléculas de RNA "guía", cuya función se discutirá más adelante. En el cinetoplásto hay aproximadamente 20,000 minicírculos y de 20 a 50 maxicírculos (Schmidt y Roberts, 1989).

En este genoma se ha observado un intrigante proceso de edición del mRNA, el cual consiste en la adición o remoción de uridinas post-transcripcionalmente. Esta adición puede ser desde 4 nucleótidos (Benne et al., 1986) hasta el 60% del total del transcrito (Feagin, Abraham y Stuart, 1988), y crea codones de iniciación y terminación de la traducción, y sitios de poliadenilación que no estaban codificados en el genoma mitocondrial (revisado por Stuart, Feagin y Abraham, 1989). Al parecer, la edición se lleva a cabo del extremo 3' hacia el 5' y siempre teniendo en el extremo 3' una purina (Benne et al., 1986).

Se ha propuesto un modelo para este proceso de edición del RNA mensajero: Existe evidencia de una especie de RNA que coordina la adición o remoción de las uridinas. Estos RNA guías (gRNA) son complementarios en su extremo 3' con el transcrito no editado y en su extremo 5' con el transcrito editado. En su mayoría, están codificados en los minicírculos del DNA mitocondrial, y su tamaño se estima que sea de aproximadamente 80 nucleótidos (Blum, Bakalara y Simpson, 1990).

El estudio de este organismo ha revelado nuevos procesos involucrados en la expresión del genoma, los cuales a su vez se han observado en otros organismos. Es evidente que el estudio de este organismo seguirá contribuyendo a un mejor entendimiento acerca de la regulación y los procesos genéticos en los eucariontes primitivos.

1.4 ANTECEDENTES

Este proyecto surgió con el interés de identificar y estudiar genes potencialmente expresados diferencialmente durante la fase de proliferación celular en *T. cruzi*. Se eligieron como modelos el gene que codifica para el producto homólogo al antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA) y el gene que codifica para la proteína ribosomal S4. Clonas heterólogas de ambos se encontraban disponibles en el laboratorio. PCNA de *Zea mays* (López et al., 1995), y una clona EST parcial de la proteína ribosomal S4 de *T. brucei* (El-Sayed, et al., 1995). Se ha demostrado que la expresión de ambos genes (S4 y PCNA) se incrementa durante la fase de proliferación celular en otros organismos (Fairman, 1990; Celis et al., 1987; Wool, 1979). Esto hace de esta proteína un buen marcador de proliferación celular.

1.5 PCNA

Esta proteína de 36 kDa fue identificada inicialmente como un autoantígeno en pacientes con lupus eritematoso sistémico. Al mismo tiempo, se había identificado una proteína cuya expresión era dependiente del ciclo celular. A esta última se le denominó inicialmente "ciclina", aunque después se comprobó que ambas proteínas eran la misma, y se le denominó PCNA (Antígeno Nuclear de Proliferación Celular) (Fairman, 1995; Celis et al., 1995). El PCNA no ha sido descrito todavía en ningún protozoario.

El PCNA es un factor que confiere procesividad a un subtipo de DNA polimerasa mamífera (DNA polimerasa δ), equivalente a la DNA polimerasa III de eucariontes simples (revisado por Stillman, 1989). Esta polimerasa es la responsable de la síntesis de la hebra continua, aunque también se ha visto que participa en la reparación del DNA por excisión (Li, et al., 1994, Stillman, 1989, Cellis et al., 1987). La estructura tridimensional de la forma trimérica (que es la funcional) del PCNA es de un toroide, el cual se cree que envuelve a la horquilla de replicación, actuando como una abrazadera que rodea a la hebra de DNA (Fukuda et al., 1995, Krishna, et al., 1994).

Al aislar la proteína y analizar su estructura y secuencia en especies filogenéticamente distantes entre sí, se ha visto que es una proteína conservada, lo que sugiere una misma función en todas las especies (López et al. 1995; Fukuda et al., 1994; Krishna et al., 1994; Fairman, 1995; Travali, et al., 1989).

1.6 EL RIBOSOMA EUCARIÓNTICO

El ribosoma es un complejo de proteínas y RNA, y es el organelo encargado de catalizar la síntesis de proteínas. Un ribosoma típico está compuesto por dos subunidades, que juntas contienen cuatro moléculas de RNA ribosomal (rRNA) y 80 proteínas. El coeficiente de sedimentación de los ribosomas eucarióticos es de 80S, mientras que para las subunidades es de 40S y 60S. La subunidad pequeña (40S) contiene una molécula de rRNA 18S (1.9 Kb) y 30 proteínas. La subunidad grande (60S) contiene tres moléculas de rRNA 5S (120

nucleótidos), 5.8S (156 nucleotidos) y 28S (4.7 Kb); y aproximadamente 50 proteínas (Russell, 1992).

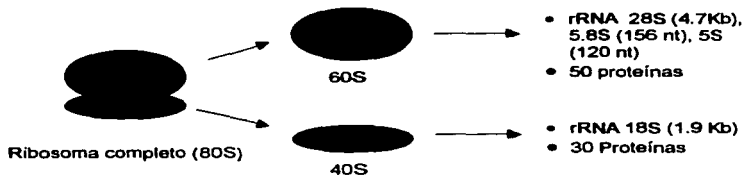


Figura 1.4: El ribosoma eucariótico

Las proteínas ribosomales están clasificadas en base a dos características, la primera es de acuerdo a su patrón de migración (M), en geles de dos dimensiones, y la segunda, dependiendo de la subunidad en la que se encuentran: L (componentes de la subunidad grande) o S (componentes de la subunidad pequeña). Sin embargo, se ha visto que algunas proteínas clasificadas inicialmente de esta manera resultaron ser conglomerados de varias proteínas o incluso la misma proteína en las dos subunidades (Wool, 1979), por lo que en estos casos se asignan letras minúsculas.

Las proteínas ribosomales son mayoritariamente básicas, aunque existen en la subunidad ribosomal grande una familia importante de proteínas que se caracterizan por tener un alto contenido de aminoácidos ácidos y por tener residuos de serina fosforilados en el extremo carboxilo. Estas proteínas, localizadas en la subunidad grande se denominan proteínas ribosomales "A" o "P", y se pueden encontrar

homólogos para estas proteínas en todas las especies (eubacterias, arqueobacterias y eucariontes). En eucariontes superiores existen tres clases de estas proteínas: P0 (34 kDa), P1 y P2 (≈ 11 kDa), (revisado por Wool, Chan y Glück, 1995), aunque en *T. cruzi* han sido identificados cuatro tipos de homólogos de proteínas P, denominadas TcP0, TcP1, TcP2a y TcP2b (revisado por Levin et al., 1993). Cabe señalar que la homología entre las proteínas P de eucariontes superiores y las de *T. cruzi* se da por secuencia y por peso molecular, ya que las proteínas P de *T. cruzi* carecen de los residuos fosforilables en el extremo carboxilo. Se ha observado que la expresión de estas proteínas parece variar en los distintos estadios del ciclo de vida del parásito (revisado por Skeiky et al., 1993) y que pacientes chagásicos y con Lupus Eritematoso Sistémico producen gran cantidad de anticuerpos contra estas proteínas (revisado por Levin et al., 1993). Los genes que codifican para las proteínas ribosomales P en *T. cruzi* se encuentran en por lo menos dos o más copias por genoma haploide distribuidas en varios cromosomas, y existe evidencia de que el transcrito mensajero de la proteína TcP2b genere tres transcritos distintos debido a sitios alternos de poliadenilación (Skeiky et al., 1993). A pesar de la gran similitud estructural observada entre ribosomas eucarióticos y procariontes, existen diferencias entre los mismos (Ver tabla 1.1). Es posible que el mayor número de proteínas en el ribosoma eucariótico pueda deberse a que existe una mayor interacción de los ribosomas con otros organelos, y a la necesidad de transporte de los ribosomas desde el núcleo hacia el citoplasma; la

fosforilación pudiera ser un sistema de regulación de síntesis de los componentes ribosomales (Wool, 1979).

Características	Ribosoma Eucariótico¹	Ribosoma Procariontíco²
Tamaño del Ribosoma	80S	70S
Tamaño de Subunidades	40S y 60S	30S y 50S
Numero de Proteínas	≈80	54
Moléculas de rRNA	5S, 5.8S, 18S y 28S	23S y 16S
Fosforilación de proteínas	Si	No
Tamaño promedio de proteínas ribosomales	21,000 Da	18,000 Da

1.- Ribosoma de hígado de rata. 2.- Ribosoma de *E. coli*.

Tabla 1.1: Algunas diferencias entre los ribosomas eucarióticos y procariontícos.

Dado que el ribosoma eucariótico contiene aproximadamente 16 proteínas más que el procariontíco, es evidente que algunas proteínas ribosomales son únicas para los ribosomas eucarióticos. De esta manera, se pueden apreciar 3 grupos de proteínas ribosomales: aquellas distribuidas en eucariontes, procariontes y arqueobacterias (grupo I); aquellas distribuidas en eucariontes y arqueobacterias (grupo II), y aquellas presentes solamente en eucariontes (grupo III) (Wool, Chan y Glück, 1995). En la tabla 1.2 se observa la distribución filogenética de los homólogos de las proteínas ribosomales de rata.

Subunidad Pequeña			Subunidad Grande		
Grupo I	Grupo II	Grupo III	Grupo I	Grupo II	Grupo III
Sa	S4	S1*	P0	L4	L6*
S2	S19	S3a	P1	L16	L7a
S3	S24	S6	P2	L18a	L10*
S5	S27a	S7	L3	L19	L10a*
S9		S8	L5	L21	L13
S11		S10	L7	L24	L14*
S13		S12	L8	L30	L15
S14		S17	L9	L31	L22
S15		S21	L11	L32	L27
S15a		S25	L12	L35a	L28
S16		S27	L13a	L36a	L29
S18		S26	L17	L37	L34
S20		S28	L23	L39	L36
S23		S30	L23a		L37a
S29			L26		L38
			L27		L40
			L35		L41

*La secuencia de estas proteínas es parcial, por lo que su inclusión en el grupo III es provisional.

Tabla 1.2: Distribución filogenética de los homólogos de las proteínas ribosomales de rata (tomado de Wool, Chang y Glück, 1995).

1.7 GENES PARA RNA RIBOSOMAL EN TRIPANOSOMAS.

En tripanosomas los genes ribosomales (rRNA) son transcritos en unidades grandes de transcripción, las cuales están agrupadas en tándem en 2 ó 3 cromosomas (rev. por Vanhamme y Pays, 1995). Estas unidades, además de codificar para los rRNA 18S y 5.8S, contienen la región codificadora de un rRNA 28S atípicamente procesado como dos moléculas grandes (24S α y 24S β) y cuatro

moléculas de RNA pequeñas de 220, 180, 140 y 70 nucleótidos respectivamente (Hernández, Nava y Castañeda, 1983). En *T. cruzi* el sitio de inicio de la transcripción de la unidad de rRNA ha sido localizado a 1768 bases del gene de rRNA 18S. Al comparar la secuencia de este promotor con las regiones homólogas no se encontraron dominios conservados entre otras especies de tripanosomatídios (Martínez-Calvillo y Hernández, 1994). El rDNA que codifica para el rRNA 5S se localiza en un locus independiente a la unidad de transcripción. Aunque ambos loci se encuentran reiterados, existen 16 veces más copias del gen del rRNA 5S (Hernández-Rivas et al., 1992) que de la unidad principal de transcripción, que está repetido unas cien veces por núcleo (Castro, Hernández y Castañeda, 1980).

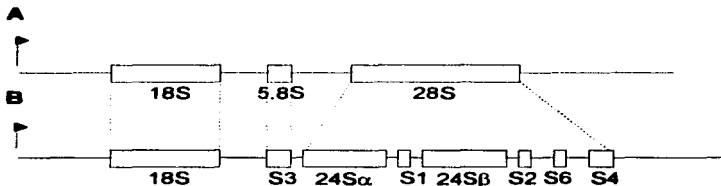


Figura 1.5. Organización de los genes ribosomales. (A) Esquema generalizado en eucariotes superiores, y (B) genes de *Trypanosoma cruzi* (Hernández et al., 1993) (La figura no está a escala)

Estas particularidades hacen importante el estudio del ribosoma de *T. cruzi*, ya que podría revelar nuevas interacciones del rRNA con las proteínas ribosomales y quizá hasta nuevos modelos de interacción del ribosoma con el RNA mensajero.

1.8 PROTEÍNA RIBOSOMAL S4

La proteína ribosomal S4 es una proteína básica, hidrofílica de aproximadamente 30,000 Da y que tiene de 261 a 283 aminoácidos. Esta proteína ha sido aislada, identificada y clonada en varios organismos eucariontes, donde destacan vertebrados (Fisher et al. 1990; Gayathri Devi, Chan y Wool, 1989), levadura (Synetos, Dabeva y Warner, 1991), plantas (Braun et al., 1994) e insectos (Yokokura, Tei y Yamamoto, 1993) y se ha visto que conserva, en promedio, más del 50% de similitud entre organismos filogenéticamente distantes. Por ello se considera que pertenece al grupo de proteínas altamente conservadas. En su estructura primaria, existe un mayor número de aminoácidos básicos (aproximadamente 30% más que los residuos ácidos), en especial en los residuos próximos al extremo amino terminal (Braun et al., 1994; Synetos, Dabeva y Warner, 1992; Gayathri Devi, Chan y Wool, 1989).

Al parecer, esta proteína se encuentra en la interfase de interacción entre las dos subunidades ribosomales (Uchimi, Kikuchi y Ogata, 1986), y en el área de interacción codón-anticodón (Mundus et al., 1993). Asimismo, se ha observado que esta proteína puede ser entrecruzada con el factor de iniciación eucariótico eIF-3 (Westermann y Nygard, 1983). Todas estas observaciones sugieren que la proteína ribosomal S4 participa en la asociación de las subunidades ribosomales, en el reconocimiento del mRNA y codón-anticodón, así como en la iniciación de la traducción (Gayathri Devi, Chan y Wool, 1989). Esta proteína ribosomal ha mostrado características

interesantes en varios organismos. En el humano se ha visto que existen dos isoformas de esta proteína, las cuales están codificadas respectivamente en el cromosoma X (RPS4X) y en el Y (RPS4Y). La isoforma RPS4X es uno de los pocos genes que escapan a la inactivación del cromosoma X. Esta proteína se ha asociado con síndrome de Turner (XO), posiblemente por ser la isoforma RPS4X de alguna manera insuficiente y contribuir de esta manera al fenotipo característico de este síndrome (Fisher et al, 1990). El homólogo de esta proteína en *Saccharomyces cerevisiae*, denominado S7, se encuentra codificado en dos genes distintos, RPS7A y RPS7B. La región codificadora de estos dos genes solamente difiere en 14 nucleótidos, ninguno de los cuales afecta la estructura primaria de la proteína. Los genes contienen intrones distintos, de 257 y 269 nucleótidos para RPS7A y RPS7B, respectivamente. Ambos genes pueden mantener la viabilidad de manera individual, aunque la mutación de uno de ellos disminuye la tasa de crecimiento (Synetos, Dabeva y Warner, 1992)

Estudios de esta proteína en la rata sugieren que existen de 7 a 11 copias de este gene, aunque no se ha mostrado que sean todas funcionales (Gayathri Devi, Chan y Wool, 1989). En *Drosophila*, estudios de hibridación *in situ* muestran dos bandas en el cromosoma X, lo que quizá se deba a la existencia de dos genes activos o un pseudogen (Yokokura, Tei y Yamamoto, 1993).

El establecer la secuencia, estructura e interacción de esta proteína con los otros componentes ribosomales podría ayudar a entender una parte de la estructura del organelo, los dominios funcionales que

pudieran existir y definir las interacciones que ocurren durante el reconocimiento del mRNA y la traducción, y el aislamiento de su gene o su producto nos da una herramienta importante para analizar su programa de expresión.

1. Introducción a la Biología Molecular y Celular, 2da edición, © 2004, Garland Science, un imprinto de Elsevier. Todos los derechos reservados.

OBJETIVOS DEL TRABAJO

- **Demostrar la presencia de secuencias complementarias a los genes de S4 y PCNA en el genoma y el RNA de *Trypanosoma cruzi*.**
- **Aislar clonas recombinantes de una biblioteca de cDNA de *T. cruzi* (cepa Tulahuén) que hibriden con las sondas heterólogas para S4 y PCNA.**
- **Corroborar mediante comparación de secuencias la clonación de los genes de *T. cruzi* correspondientes a la proteína ribosomal S4 y el PCNA.**
- **Realizar un estudio filogenético con las secuencias obtenidas y con secuencias de la proteína ribosomal S4 de otros organismos.**

II

MATERIALES Y MÉTODOS

2.1.-CULTIVO Y EXTRACCIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS DE TRYPANOSOMA CRUZI.

2.1.1.-CULTIVOS

Se hicieron cultivos de epimastigotes de la cepa CL Brener en medio de infusión de hígado-triptosa, y fueron mantenidos a 28°C, hasta obtener una cuenta de parásitos adecuada.

2.1.2.-EXTRACCIÓN DEL DNA

Se centrifugaron los 100 ml del cultivo a 8000 rpm durante 10 minutos. Se decantó el sobrenadante. El botón obtenido se aflojó con una varilla de vidrio y se resuspendió en 10 ml de SSC 1X (NaCl 0.15M, citrato de sodio 0.015M). Esta suspensión se vació a un tubo de centrifuga Nalgene y se centrifugó a 8000 rpm durante 10 minutos. Se decantó el sobrenadante y el botón se resuspendió en 2 ml de SE frío (NaCl 0.15 M, EDTA 0.1M pH 8.0). Posteriormente se agregaron 105 µl de Pronasa (10 mg/ml, preincubada 1 hora a 37°C) y 100µl de Sarkosyl 10%. Se mezcló bien y se incubó 1 hora a 50°C. Después de esto se añadieron 23µl de RNAasa pancreática (10 mg/ml) y se incubó 1 hora a 50°C. Se añadieron 112µl más de pronasa y se incubó 30 minutos a 50°C.

Posteriormente se realizó una extracción fenólica agregando a la suspensión 1 volumen de fenol preequilibrado con Tris-Cl 0.1M pH 8.0, agitando y centrifugando después a 8000 rpm durante 10 min. Se recuperó el sobrenadante, y a éste se le agregó un volumen de fenol-

cloroformo (1:1), se agitó y se centrifugó de la misma manera. Al sobrenadante recuperado se le agregó 1 volumen de cloroformo, se agitó y se centrifugó. El sobrenadante obtenido se precipitó dos veces con LiCl (concentración final de 0.8M) y 2 1/2 volúmenes de etanol absoluto frío, durante 10 minutos a 4°C. Se centrifugó a 7000 rpm durante 10 minutos, se decantó el sobrenadante y el botón obtenido se dejó secar a temperatura ambiente. Este botón se resuspendió en 1 ml de TE (Tris-Cl 10mM pH 7.5, EDTA 0.1 mM) y se almacenó a -20°C. La concentración de DNA se determinó espectrofotométricamente por absorbancia a 260 nm.

2.1.3.-EXTRACCIÓN DE RNA TOTAL

Se colectó un cultivo en fase media de crecimiento logarítmico, centrifugándolo a 6000 rpm 10 minutos a 4°C. Posteriormente las células fueron lavadas dos veces en solución PBS (NaCl 0.15 M, KCl 2.68 mM, Na₂HPO₄ 10 mM, KH₂PO₄ 1.7 mM, pH 7.4) y congeladas en nitrógeno líquido. Al paquete celular se le adicionaron 10 volúmenes de una solución 5 M de isotiocianato de guanidina, EDTA 25 mM, Tris-Cl 20 mM pH 7.6, Sarkosyl 2% y β-mercaptoetanol 0.1%. El homogenizado se descongeló a temperatura ambiente agitando con vortex. Posteriormente se centrifugó a 13,000 rpm durante 20 minutos, y el sobrenadante obtenido fue precipitado con 0.025 volúmenes de una solución 1M de ácido acético y 0.75 volúmenes de etanol absoluto. Se centrifugó a 9000 rpm durante 10 minutos y el precipitado obtenido se resuspendió en 10 ml de solución 6M de hidrocloreuro de

guanidina pH 7.5, EDTA 25 mM y 11.2mM de β -mercaptoetanol. Se precipitó con 0.05 volúmenes de ácido acético 1M y 0.5 volúmenes de etanol a -20°C y se centrifugó a 9000 rpm durante 10 minutos. El precipitado obtenido se disolvió en 5 ml de una solución de hidrocloruro de guanidina 6M (pH 7.5), 25 mM EDTA y 11.2mM β -mercaptoetanol y se precipitó de nuevo. Este precipitado se resuspendió en 3 ml de Tris-Cl 10 mM pH 7.5, EDTA 1 mM, NaCl 0.3 M y SDS 1% y se precipitó en 2 volúmenes de etanol absoluto. El botón obtenido se resuspendió en 5 ml de H_2O tratada con dietil-pirocarbonato (DEPC) y se extrajo con fenol y fenol-cloroformo (1:1). El producto final de la extracción fue resuspendido en 500 μl de H_2O tratada con DEPC y se le determinó la concentración espectrofotométricamente (1 D.O. a 260 nm=40 $\mu\text{g/ml}$)

2.2.-PREPARACIÓN DE PLÁSMIDOS, RECUPERACIÓN DE INSERTOS Y MARCAJE RADIATIVO DE LOS MISMOS

2.2.1.-PREPARACIÓN DE CÉLULAS COMPETENTES Y TRANSFORMACIÓN

Se hicieron cultivos de 25 ml de *E. coli* y se incubaron toda la noche a 37°C en agitación. Este cultivo fue diluido 1:80 en un matraz nefelométrico (0.63 ml de cultivo inicial en 50 ml de medio rico NZCYM) y se incubó a 37°C hasta obtener una $\text{D.O}_{600}=0.2-0.3$. Posteriormente, el cultivo se centrifugó a 6000 rpm durante 10 minutos a 4°C . El botón obtenido se aflojó con agitación suave y se resuspendió en medio volumen inicial de 100 mM de CaCl_2 . Se reposó a 4°C durante 30 minutos, y se centrifugó de nuevo a 6000 rpm

durante 10 minutos. Pasado esto, se resuspendió el botón en 1/10 de volumen de CaCl_2 100 mM y se almacenó la suspensión a 4°C.

Para la transformación, se agregaron 1-10 μl de solución de DNA de plásmido a 200 μl de células competentes. Se dejó reposar en hielo durante 30 minutos, después de lo cual se incubaron a 42°C por 45 segundos. Posteriormente se dejaron reposar en hielo durante 5 minutos, se agregaron 800 μl de medio NZCYM sin antibiótico y se incubaron las células a 37°C durante 1 hora. Después de esto, se tomaron 50 μl de la suspensión de células y se plaquearon en caja de petri con medio rico NZCYM y antibiótico. El restante de las células se centrifugó durante 10 segundos en microfuga, se desechó el sobrenadante y el botón obtenido se resuspendió en el líquido restante. El volumen total de aproximadamente 50 μl de esta suspensión se plaqueó en una caja de petri con medio NZCYM y antibiótico. Las cajas se dejaron toda la noche a 37°C y, ya que aparecieron las colonias, se almacenaron a 4°C.

2.2.2.- DESCRIPCIÓN DE PLÁSMIDOS: PCNA

Para el estudio del PCNA se utilizó un monitor heterólogo de PCNA de maíz (*Zea mays*). Esta sonda se aisló a partir de una biblioteca de cDNA de maíz con un fragmento del gene de PCNA de arroz. La clona aislada tiene 1146 pb en total, las cuales codifican para una proteína de 263 aminoácidos y 29,342 Da (López et al., 1995). Este inserto fue después clonado en el vector pBluescribe.

2.2.3.- DESCRIPCIÓN DE PLÁSMIDOS: PROTEÍNA RIBOSOMAL S4

Para la proteína ribosomal S4 se utilizó una clona EST (expressed sequence tag) con homología parcial a la proteína ribosomal S4 de humano (El-Sayed et al., 1995). Esta clona fue aislada a partir de una biblioteca de cDNA de *Trypanosoma brucei rhodesiense* construida con fragmentos de PCR, utilizando como iniciador la secuencia SL común a todos los transcritos, en el vector λ -ZAP-II. Estas fueron escindidas *in vivo* al plásmido pBluescript y secuenciadas parcialmente en sus extremos 5' (aproximadamente 200 nt) y luego comparada con las secuencias almacenadas en la base de datos GenBank (El-Sayed et al., 1995).

2.2.4.- PREPARACIÓN DE PLÁSMIDOS A PEQUEÑA ESCALA (MINIPREPARACIÓN)

Se creció un cultivo de *E. coli* en 3 ml de medio rico NZCYM, agregando el antibiótico apropiado (50 μ g/ml). Se agregaron 1.5 ml de este cultivo a un tubo de microfuga, se centrifugó a 12,000 rpm durante 30 segundos, se desechó el sobrenadante y se repitió la operación. El botón obtenido se agitó para ablandarlo, y se resuspendió en 100 μ l de solución 1 (glucosa 50 mM, Tris-Cl 25 mM pH 8.0, EDTA 10 mM pH 8.0), agitando vigorosamente. Posteriormente se le agregaron 200 μ l de solución 2 (NaOH 0.2N, SDS 1%, preparada al momento), se mezclaron los tubos por inversión y se almacenaron en hielo. Pasado esto, se agregaron 150 μ l de solución 3 (Acetato de potasio 5M, ácido acético glacial 11.5%), se agitaron y se almacenaron en hielo de 3 a 5

minutos. Los tubos se centrifugaron a 12,000 rpm durante 5 minutos, y el sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo. A este se le añadió un volumen igual de fenol:cloroformo (1:1), se agitó y se centrifugó a 12,000 rpm durante 2 minutos. El sobrenadante se recuperó y se precipitó con 2 volúmenes de etanol absoluto a temperatura ambiente durante 2 minutos, después de los cuales se centrifugó a 12,000 rpm durante 5 minutos. El botón obtenido fue lavado con etanol 70% a -20°C, y se dejó secar al aire durante 10 minutos. Se resuspendió en 50µl de TE (10mM Tris pH 7.5, 0.1 mM EDTA) y la concentración aproximada se determinó por electroforésis en un gel de agarosa.

2.2.5.- PREPARACIÓN DE PLÁSMIDOS A GRAN ESCALA (MAXIPREPARACIÓN)

Se crecieron 60 ml de *E. coli* en medio rico NZCYM. Este cultivo se centrifugó a 8000 rpm durante 8 minutos, después de lo cual se aflojó el botón mediante agitación. Este botón se resuspendió en 2 ml de solución 1 fría (ver minipreparación) y se agitó fuertemente. Posteriormente se añadieron 4ml de solución 2 (ver minipreparación) y se mezcló mediante inversión. Se añadieron 3 ml de solución 3 fría (ver minipreparación) y se agitó el tubo durante 10 segundos. Pasado esto, el tubo se mantuvo en hielo de 3 a 5 minutos. Se centrifugó a 8000 rpm durante 10 minutos y el sobrenadante se recuperó y se le añadió un volumen de fenol-cloroformo (1:1), se agitó y se centrifugó 5 minutos a 8000 rpm. El sobrenadante se recuperó y se precipitó con 2 volúmenes de etanol absoluto a temperatura ambiente durante 2 minutos. Posteriormente se centrifugó a 8000 rpm durante 10 minutos, se removió el sobrenadante al dejar el tubo en posición invertida. El botón

se enjuagó con etanol al 70%, se centrifugó de nuevo y se decantó. El botón se dejó secar al aire durante 10 minutos, después de los cuales se resuspendió en 800 μ l de TE y se almacenó a -20°C .

2.2.6.- RECUPERACIÓN DE INSERTOS

Se digirieron 6-10 μ g de DNA de plásmido, en donde se encontraba clonado el inserto de interés. Los productos de digestión se separaron en un gel de agarosa 0.8% en TBE (Tris-Cl, boratos, EDTA) de 100 ml de volumen a 100 V, hasta que el frente de la corrida se aproxime 0.5 cm. al borde del gel. Posteriormente se recortó la banda del gel y se colocó en un tubo de microcentrifuga de 500 μ l, en donde se había hecho un orificio en la parte inferior y se había colocado fibra de vidrio, apretándola hacia el fondo del tubo con una pipeta pasteur. Este tubo se colocó a su vez dentro de otro tubo de 1.5 ml, y se centrifugó a 6000 rpm durante 5 minutos. Al líquido recuperado en el tubo inferior se le añadió un volumen igual de fenol:cloroformo (1:1) y se agitó. Posteriormente se centrifugó y se recuperó el sobrenadante, al cual se le agregaron 2 volúmenes de etanol y 1/10 de volumen de LiCl 8M. Este se dejó precipitar 2 horas a -20°C , después de lo cual se centrifugó 10 minutos en microfuga. El botón obtenido se enjuagó con etanol 70% y se dejó secar al aire durante 10 minutos; se resuspendió en 20 μ l TE y se almacenó a -20°C . La concentración aproximada se determinó mediante electroforesis de 1 o 2 μ l de la solución en un gel de agarosa al 0.8%.

2.2.7.-MARCAJE DEL INSERTO MEDIANTE EL MÉTODO DE "INICIADOR AL AZAR"

Se tomaron 24 ng de inserto en un volumen de 20 μ l y se desnaturalizaron a 96°C durante 10 minutos. Posteriormente, se agregaron 4 μ l de dATP, dGTP, dTTP y 1 μ l de solución de dCTP 9 μ M, 5 μ l de amortiguador de reacción, 5 μ l de primero, 6.3 μ l dCTP-[α]-P³² (50 μ Ci totales) y 2 μ l de polimerasa Klenow. Esta reacción se incubó a 37°C durante 3 horas. Posteriormente se purificó la sonda en una columna de Sephadex G-50 hidratada y empacada en TE, centrifugando 5 minutos a 2000 rpm y colocando un tubo de microfuga abajo de la columna. La muestra recuperada se llevó a 100 μ l, se tomó 1 μ l y se le midió la radiactividad incorporada en un contador de centelleo (estimación de radiaciones Serenkoff).

La sonda marcada se desnaturalizó agregando 1/10 de volumen de NaOH 3M, se incubó a temperatura ambiente durante 5 minutos. Posteriormente se pasó a hielo y se le agregaron 1/10 de volumen de HCl 3N y 1/20 de volumen de Tris-Cl 1M pH 7.4.

2.3.- SOUTHERN BLOT DE DNA GENÓMICO

2.3.1- DIGESTIÓN Y TRANSFERENCIA

Se digirieron 30 μ g de DNA genómico de *T. cruzi* (Digestión: 30 μ l solución de DNA, 3 μ l enzima, 4 μ l buffer 10X, 3 μ l H₂O estéril) y se incubó a 37°C toda la noche. Para el blot de PCNA, se utilizaron *EcoRI*, *Pst1* y *HindIII*, mientras que para S4 se utilizaron *Pst1*, *EcoRI/Pst1* y *EcoRI*. De esta digestión, se corrieron dos tantos de 15 μ l en dos carriles en un gel de agarosa 8%. (100ml) a 80 V durante cuatro

horas. Posteriormente, el gel se enjuagó con agua desionizada y se colocó en una solución desnaturalizante (NaCl 1.5M, NaOH 0.5M) en agitación durante 50 minutos. Pasado esto, el gel se enjuagó y se colocó en dos cambios de 15 minutos de solución neutralizante (NaCl 1.5M, Tris-HCl 0.5M pH 7.2, EDTA 0.1mM) en agitación. El gel se enjuagó y se colocó en una cámara de transferencia con SSC 20X (NaCl 3M, Citrato de sodio 0.3M), en donde el DNA separado se transfirió a una membrana de nylon Hybond (Amersham Ltd., U.K.), previamente colocada sobre la cara inferior del gel, durante toda la noche. Posteriormente, la membrana fue retirada, se dejó secar en papel filtro y el DNA se fijó en el horno a 80°C en condiciones de vacío durante dos horas.

2.3.2.-HIBRIDACIÓN

Se marcaron 50 ng del inserto de PCNA y de S4 con 50µCi, utilizando dCTP-[α]-³²P con actividad de 3000µCi/mM. La membrana se prehibridó durante dos horas en solución de hibridación (Formamida 50%, Denhardt's 4X (Albúmina bovina sérica 2%, Ficoll 2%, PVP 2%), 02% SDS, 2mM EDTA, 120 mM amortiguador de fosfatos, 2X SSC) a 37°C en horno de hibridación en un volumen de 20 ml. Posteriormente, se hibridó con la sonda marcada radioactivamente toda la noche con un volumen de 9 ml en las mismas condiciones. Pasado esto, se hicieron tres lavados de 20 minutos a 37°C con una solución de 2X SSC y 0.2% SDS en el horno de hibridación. Se expuso la membrana

a una placa fotográfica con pantalla intensificadora toda la noche a -70°C .

2.4.- Northern Blot de RNA total de *T. cruzi*.

Se aplicaron 12 μg de RNA total de *T. cruzi* en un gel de agarosa al 10% en amortiguador MOPS/EDTA (MOPS 0.2M, Acetato de sodio 0.5M, 0.01M EDTA) y 6% de formaldehído, y se corrieron a 80 V. El RNA se transfirió a una membrana de nylon Hybond, previamente colocada sobre la cara inferior del gel, durante toda la noche.

La prehibridación se hizo en un volumen de 20 ml agregando DNA de esperma de salmón (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$) durante dos horas, a 37°C en horno de hibridación. La hibridación se llevó a cabo con un volumen de 10 ml y con 50 ng del inserto marcado con 50 μCi de dCTP- $[\alpha]$ - ^{32}P durante toda la noche. Posteriormente, las membranas se lavaron con una solución de SSC 2X + SDS 0.2% tres veces durante 20 minutos a 37°C . Las membranas se expusieron a placas fotográficas durante dos días y 1 1/2 semana.

2.5.- Screening de la biblioteca genómica insertada en el cósmido *pcosTL*

Se marcaron 24 ng de sonda de PCNA con 50 μCi de dCTP- $[\alpha]$ - ^{32}P con el método anteriormente descrito. La biblioteca se recibió en una membrana de papel, y fue elaborada en el laboratorio del Dr. John Kelly, a partir de digestiones parciales del DNA genómico de *T. cruzi* (cepa CL Brener) con *Sau3AI* (Fig. 2.1).

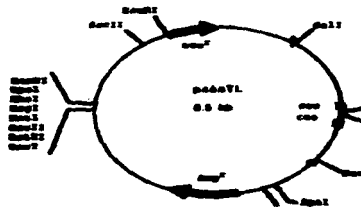


Figura 2.1. Vector pcostL (Kelly, Das y Tomás, 1994)

La membrana se prehibridó en 15 ml de solución de hibridación, durante 3 horas a 37°C en un horno de hibridación. Posteriormente, ésta se hibridó durante toda la noche en un volumen de 10 ml de solución de hibridación sin DNA de espermatozoos de salmón. Acabado esto, se le hicieron tres lavados de 20 minutos cada uno, a 37°C con una solución de 0.2% SDS, 2X SSC. Se expuso durante dos días a temperatura ambiente. La membrana, junto con la placa expuesta, fue enviada al laboratorio de origen, donde seleccionaron y enviaron DNA de las clonas que mostraban señal positiva.

2.5.1.- SOUTHERN BLOT DE LAS CLONAS POSITIVAS RECIBIDAS

Se recibió el DNA liofilizado de tres clonas (denominadas 2, 4 y 6). Este DNA se resuspendió en 100 µl de agua destilada estéril, y se utilizaron 5µl de esta solución para checar la concentración del DNA.

Se llevaron a cabo digestiones de las clonas y de dos controles: uno positivo (digestión del DNA de la sonda insertada en el vector Bluescript) y uno negativo (digestión del vector pcosTL). (ver tabla 2.1)

Muestra	Clonas 2, 4 6	PCNA (en Bluescribe)	pcosTL
Cantidad de DNA	15 μ l	15 μ l	18 μ l
Buffer TE	3 μ l	3 μ l	-
Buffer de reacción (10X)	2 μ l	2 μ l	2 μ l
Enzima	1.5 μ l (EcoRI y SalI)	1.5 μ l (EcoRI)	1.5 μ l (EcoRI y SalI)

Tabla 2.1: Digestiones de clonas genómicas y controles

Estas digestiones se llevaron a cabo a 37°C durante toda la noche. Posteriormente se corrieron estas muestras en un gel de agarosa (0.8% en TBE) a 80 V hasta que el frente de corrida llego al borde del gel. Esto se transfirió a una membrana de nylon mediante el protocolo descrito anteriormente. La prehibridación se llevo a cabo en un volumen de 20 ml de solución de hibridación durante 3 horas a 37°C. La hibridación se hizo en 10 ml durante toda la noche con 50 ng de sonda de PCNA marcada con 50 μ Ci de dCTP-[α]-³²P, después de lo cual se hicieron tres lavados de 20 minutos en una solución de SDS 0.2%, SSC 2X a 37°C. La membrana se expuso un día a temperatura ambiente.

2.6.- SCREENING DE LA BIBLIOTECA DE CDNA

2.6.1.-PREPARACIÓN E INFECCIÓN DE LAS CÉLULAS CON EL FAGO λ

(Manual Stratagene, La Jolla, CA.)

Se inocularon 50 ml de NZCYM conteniendo maltosa 0.2% en un matraz Erlenmeyer con *E. coli* cepa XL-Blue-1. Este cultivo se incubó toda la noche a 37°C con agitación moderada. El cultivo se centrifugó en un tubo de centrifuga estéril 10 minutos a 2000 rpm. Se decantó el sobrenadante y el botón fue resuspendido suavemente en 15 ml de $MgSO_4$ 10mM. La suspensión de células fue diluida hasta obtener $D.O_{600}=0.5$ (Aprox. 1:5). Posteriormente, la solución de fago fue diluida con amortiguador SM (NaCl 0.58%, $MgSO_4$ 0.2%, Tris-Cl pH 7.5 0.05M, gelatina 0.01%) hasta obtener una concentración de 5000 ufp/caja. Se añadieron 200 μ l de células $D.O_{600}=0.5$ a un tubo de microfuga y se inocularon con el fago diluido. Los tubos fueron incubados a 37°C por 15 minutos. Mientras los tubos se incubaban, se licuó el agar suave (0.7%) y se pusieron 3 ml en tubos estériles con tapa. Al agar, que tiene que estar enfriado a 45°C, se añadieron las células incubadas, se agitaron en vórtex suavemente y se esparcieron uniformemente sobre cajas de medio con agar sin antibiótico. Las cajas se dejaron reposar a temperatura ambiente 10 minutos hacia arriba; posteriormente se voltearon y se incubaron toda la noche a 37°C.

2.6.2.-TRANSFERENCIA DE LAS PLACAS DE LISIS A MEMBRANAS

Las cajas obtenidas se enfriaron a 4°C durante dos horas. Sobre éstas, se colocó una membrana Hybond durante un minuto. Se marcaron tres puntos asimétricos con tinta negra y una aguja hipodérmica. La membrana fue colocada (con las placas hacia arriba) en una caja de petri, sobre un círculo de papel filtro saturado con solución desnaturalizante (ver Southern blot), durante 7 minutos. Se pasó la membrana a otro papel filtro con solución neutralizante (ver Southern blot), se esperaron 3 minutos. La operación se repitió en otro papel saturado. La membrana fue lavada ligeramente con SSC 2X y se dejó secar sobre papel filtro durante una hora. Se calentó en horno al vacío a 80°C durante dos horas.

2.6.3.-SCREENING DE LAS MEMBRANAS CON SONDAS MARCADAS RADIATIVAMENTE

Las membranas obtenidas de la transferencia de placas de lisis se hibridaron con 50 ng de DNA de inserto, marcado con 50µCi de dCTP-[α]-³²P. Se prehibridaron en un volumen de 20 ml durante dos horas a 37°C en un horno de hibridación. La hibridación se llevó a cabo toda la noche, en un volumen de 10 ml.

Se hicieron tres lavados de 20 minutos con 2X SSC + 0.2% SDS a 37°C con agitación constante. Las membranas hibridadas fueron expuestas toda la noche a placas fotográficas con pantalla intensificadora. Las placas positivas fueron aisladas y el fago fue difundido en 1ml de amortiguador + 20µl de cloroformo.

Posteriormente, el stock de fago fue diluido hasta obtener una concentración de 100 ufp/caja, y se llevó a cabo un screening secundario de las placas. Se aislaron las placas que daban señal y se almacenaron en SM + 20µl cloroformo. De esta manera, se obtuvieron nueve clonas candidatas para S4 (I-IX) y tres para PCNA (A,B,C).

2.6.4.-EXCISIÓN DEL VECTOR λ-ZAP-II AL PLÁSMIDO pBLUESCRIPT

A las placas obtenidas se les llevó a cabo la excisión *in vivo* del fago al plásmido pBluescript SK- (ver figura 2.2)

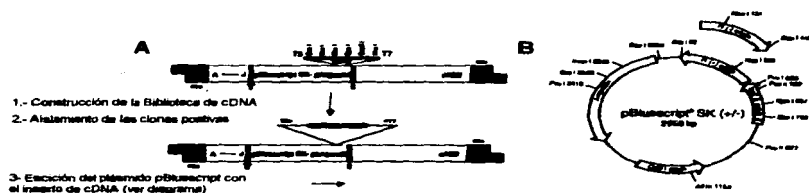


Figura 2.2. Excisión del Plásmido Bluescript SK.
 A. Vector λ-ZAP-II. B.- Plásmido pBluescript SK +/-.

(Protocolo según manual Stratagene)

En un tubo cónico de 50 ml, se agregaron 200µl de un cultivo de células *E. coli* cepa XL1-Blue-MRF' (OD₆₀₀=1.0), 100µl de stock de fago aislado de las placas positivas (>1 x 10⁵ partículas) y 10µl de stock de fago ExAssist (>1 x 10⁶ ufp/ml). Esto se incubó a 37°C

durante 15 minutos, y posteriormente se añadieron 5ml de 2X YT y se incubaron durante 2-2.5 horas con agitación. Se calentó el tubo a 70°C durante 20 minutos y se centrifugó a 4000 rpm durante 15 minutos. El sobrenadante se decantó en un tubo estéril, y este contenía el plásmido empacado como fago filamentososo y fue almacenado a 4°C. Para platear el fago, se añadieron 200µl de células *E. coli* cepa SOLR (OD₆₀₀=1.0) a dos tubos de 1.5 ml. Se añadieron 1µl de stock a un tubo y 50µl a otro. Estos tubos fueron incubados a 37°C durante 15 minutos. Se platearon 100µl de cada tubo en cajas con medio NZCYM + ampicilina (50µg/ml) y se incubaron toda la noche a 37°C.



Figura 2.3 Diagrama del proceso de infección y excisión

2.6.5- SOUTHERN DE LAS CLONAS OBTENIDAS

De las colonias obtenidas, se hicieron extracción de plásmido a pequeña escala (miniprep) de seis clonas de S4 y tres de PCNA (por

duplicado). De el resto del cultivo, se hicieron stocks en glicerol 12.5%, que se almacenaron a -70°C.

Los minipreps fueron digeridos con *EcoRI* y *Kpn1* toda la noche. Posteriormente, fueron corridos en un gel de agarosa 0.8%, el cual fue fotografiado. Las clonas de PCNA mostraron dos bandas, mientras que las clonas de S4 mostraron dos poblaciones: una que presentaba dos bandas, y otra que presentaba tres.

Este gel fue transferido a una membrana de nylon Hybond. Posteriormente, las membranas fueron prehibridadas con 20 ml de solución de prehibridación, durante dos horas a 37°C. La hibridación se llevó a cabo con 50 ng de inserto, marcada con 50µCi de dCTP-[α]-³²P en un volumen de 10 ml a 37°C durante toda la noche. Posteriormente, se hicieron tres lavados a 37°C durante veinte minutos con SSC 0.2X + SDS 0.2%. Las membranas fueron expuestas toda la noche a una placa de rayos X.

2.7.- SECUENCIACIÓN DE TRES CLONAS (2 DE S4 Y UNA DE PCNA)

Se escogieron tres clonas para secuenciar: una de PCNA(C₂) y dos de S4(2₂ y 6₁) (una que presentaba inicialmente tres bandas y otra con dos). Se incluyó un control de DNA del fago M13.

2.7.1.-Iniciadores utilizados

Iniciadores	Secuencia
M13-reversa	5'-ggaaacagctatgacctg-3'
M13(-40)	3'-tgaccggcagcaaaatg-5'
S41	5'-gtatccggttggcttcat-3'
S43	5'-tgattggcaaggacatgc-3'
S44	5'-ctcctgaatcacggtgat-3'
S45	5'-caacaggaatgcggccag-3'
S46	5'-ataagagtcctgcactca-3'

Tabla 2.2.- Secuencia de los primeros utilizados

Para la primera secuenciación se utilizó el iniciador M13-reversa. En base a las secuencias obtenidas, se fueron diseñando los oligonucleótidos iniciadores necesarios, hasta llegar al otro extremo del inserto y utilizando la preparación de cadena sencilla. La lectura de la cadena complementaria se llevó a cabo con preparación de plásmido (doble cadena) y los oligonucleótidos iniciadores utilizados fueron el M13(-40) y el resto diseñados conforme a la secuencia de la cadena codificadora.

2.7.2.-BIOLOGÍA DEL BACTERIÓFAGO M13

El bacteriófago M13 pertenece a la familia de los fagos filamentosos, los cuales contienen una molécula circular de DNA de cadena sencilla con un tamaño de aproximadamente 6400 nucleótidos. Estos fagos infectan solamente a células que contienen el factor episomal F', el cual codifica para el pilus sexual, ya que es por esta estructura por la

cual el virus penetra a la célula. Ya dentro de la célula, el DNA de estos organismos es convertido a DNA de doble cadena, la cual es la forma replicativa del virus. Al terminar los ciclos de replicación, las partículas virales son excretadas al exterior de la célula en estructuras de DNA de cadena sencilla, junto con otras proteínas estructurales. El sitio de replicación ocurre en armonía con el ciclo de la célula infectada, por lo que éstas no son lisadas. Esto ocasiona que grandes cantidades de partículas virales sean sintetizadas en cada generación de bacterias, llegando a títulos de hasta 10^{12} UFP/ml (revisado por Sambrook et al., 1989). La inserción de DNA ajeno en el genoma del virus no afecta la capacidad replicativa de éste. Esta capacidad de sintetizar grandes cantidades de partículas virales de una sola cadena hace a este fago una herramienta extremadamente útil en procesos de secuenciación, mutagénesis puntual o síntesis de sondas de una sola cadena. El vector pBluescript posee los promotores f1 en dos orientaciones, lo que permite la recuperación de la cadena sencilla de la hebra codificadora (pBluescript SK(+)) o no codificadora (pBluescript SK(-)). La recuperación de la cadena no codificadora nos permitió secuenciar directamente la cadena codificadora de los insertos.

2.7.3.-OBTENCIÓN DE LA CADENA SENCILLA

Se inocularon células *E.coli* cepa XL-Blue-MRF^r, transformadas con el DNA de las clonas positivas, en 5 ml de 2X YT con 50 µg/ml de ampicilina y 10µl de stock de fago ayudador VCSM13. El cultivo se incubó durante 1-2 horas con agitación fuerte. Posteriormente, se agregó kanamicina a 70µg/ml y se dejó crecer por 24 horas más. De

este cultivo, se centrifugaron 1.5 ml durante 5 minutos en microfuga. Se removió 1 ml del sobrenadante y se agregaron 150 μ l de PEG 20%/ NaCl 2.5 M. Se dejó precipitando en hielo durante 15 minutos.

Posteriormente, se centrifugó en microfuga durante 5 minutos, se decantó y el botón obtenido se resuspendió en 400 μ l de acetato de sodio 0.3 M pH 6.0/ EDTA 1mM, agitando con vórtex. Se realizó una extracción con 1 volumen de fenol-cloroformo 1:1 y se centrifugó por 2 minutos para separar las fases. La fase acuosa fue extraída y precipitada con 1ml de etanol. Se centrifugó durante 5 minutos, se removió el etanol y el botón se dejó secar a temperatura ambiente por diez minutos. Se resuspendió en 20 μ l de TE y se corrieron 2 μ l en gel de agarosa al 0.8% para verificar la concentración.

2.7.4.- UNIÓN DEL INICIADOR CON LA CADENA SENCILLA

Se pusieron 2.5 μ l de solución de DNA de cadena sencilla, 1 μ l de solución de primer, 2 μ l de amortiguador 5X y 5.5 μ l de agua destilada. Se incubó la reacción durante 15 minutos a 37°C.

Mientras se incubaba esta reacción, se añadió una alícuota de 2.5 μ l de ddNTP (A,C,G,T) en una microplaca y se dejaron a 37°C en un calentador de bloque.

2.7.5.- UNIÓN DEL INICIADOR CON LA CADENA DOBLE

Se agregaron 5 μ l de DNA de plásmido, 1 μ l de NaOH 1N, 1 μ l de solución de iniciador (10ng/ μ l) y 1 μ l H₂O estéril. Esto se incubó a 68°C durante 10 minutos. Posteriormente, se agregó 1 μ l de solución de

amortiguador TES (0.56M en H₂O) y se dejó reposar 10 minutos a temperatura ambiente.

2.7.6.-REACCIÓN DE MARCAJE

Pasada la incubación, se agregaron 8µl de la siguiente solución:

TE	22.4µl
DTT 0.1M	4.4µl
Mezcla de marcado	1.8µl
³⁵ S dATP	2.0µl
Amortiguador de dilución de enzima	4.0µl
Secuencia ver. 2.0	1.2µl

Tabla 2.3.- Reacción de marcaje. (la enzima se agregó inmediatamente antes de agregar la solución)

Esta reacción se dejó incubar durante 3 minutos a temperatura ambiente.

2.7.7.-REACCIONES DE TERMINACIÓN

Se agregaron 4µl de la reacción de marcaje a los ddNTP alicuotados en la microplaca y se dejaron incubar a 37°C durante 3 minutos.

2.7.8.-TÉRMINO DE LA REACCIÓN

Se añadieron 4µl de mezcla azul a cada pozo. Las reacciones se mantuvieron almacenadas a -20°C toda la noche mientras el gel se preparaba.

2.7.9.-PREPARACIÓN DEL GEL Y ELECTROFORÉSIS

Se elaboraron las siguientes soluciones:

Stock de acrilamida 40%		Mezcla de acrilamida	6%	4%
Acrilamida	190g	Stock 40%	37.5ml	25 ml
Bis-acrilamida	10g	10X TBE	25ml	25 ml
Agua destilada	300ml	Urea	115g	115 g
		Agua c.b.p.	250 ml (100ml)	250 ml (112.5ml)

Mezcla de gel

Mezcla de acrilamida	60ml
Persulfato de amonio 10%	0.5 ml
N',N',N',N'-Tetrametiletildiamina (TEMED)	25µl

Tabla 2.4.- Fórmula de preparación del gel de secuencia

La mezcla de gel se agregó a los vidrios de la cámara, previamente armados y sellados de la parte inferior con papel filtro y acrilamida polimerizada. Este gel se dejó polimerizar toda la noche, cuidando que no se deshidrataran los bordes expuestos. Las muestras se desnaturalizaron a 80°C por 2 minutos y se pasaron inmediatamente a hielo. Se cargaron 2µl de cada muestra a dos tiempos (2 y 4 horas). El gel se corrió a 60 Watts en una cámara de electroforesis de secuencia Gibco. Posteriormente, se transfirió a una hoja de papel filtro y se

colocaron en un secador de geles durante 1 hora a 70°C. Este gel fue expuesto toda la noche sin pantalla.

Para obtener la secuencia más hacia el extremo 3', el corrimiento fue repetido con las mismas reacciones, solo que esta vez se cargaron 3µl y se dejó correr 6 horas.

2.8.-ANÁLISIS DE LAS SECUENCIAS

2.8.1.-ALINEAMIENTO DE LAS SECUENCIAS OBTENIDAS CON LAS SECUENCIAS ALMACENADAS EN LA BASE DE DATOS GENBANK

Inicialmente, las secuencias obtenidas fueron alineadas con otras secuencias almacenadas en la base de datos GenBank, utilizando el programa BLAST (Altschul, 1990). Las secuencias fueron sometidas a un análisis de alineamiento básico local, comparándolas con secuencias de proteínas completas y con secuencias obtenidas de cDNA de mRNA almacenadas en la base de datos GenBank.

Posteriormente, las secuencias completas de aminoácidos se alinearon con secuencias de otros organismos utilizando el programa ClustalW (Thompson, Higgins, y Gibson, 1994) y corrigiendo después la alineación manualmente.

2.8.2.- ANÁLISIS FILOGENÉTICO

El estudio filogenético se llevó a cabo utilizando el programa CLUSTALW y el paquete de análisis filogenético PHYLIP (Felsenstein, J. 1993). El procedimiento con el que el programa CLUSTALW alinea las secuencias consiste, primero, en calcular una matriz de distancias

observadas conforme a una alineación por pares de todas las secuencias (Pairwise alignment), expresada como el número de aminoácidos idénticos entre el número de residuos comparados (excluyendo los espacios). Posteriormente, utilizando esa matriz de distancias, se construye un "árbol guía" con el método de "Neighbor Joining" (utilizando las distancias observadas). Ya que este método calcula árboles sin raíz, ésta se coloca en el punto en donde el promedio de la distancia a ambos lados de la raíz es el mismo. Este árbol se usa para asignar un determinado "peso" a cada secuencia. Este "peso" depende de la distancia de la secuencia a la raíz del árbol, y las secuencias que comparten una misma rama interna (agrupamientos) comparten también el valor del peso asignado a esa rama.

Las secuencias se alinean empezando por las más parecidas. Cada paso del proceso consiste en alinear dos secuencias, las cuales constituyen un alineamiento el que, a su vez, se alinea con la siguiente secuencia. Mediante la asignación de "pesos" a los aminoácidos de las secuencias (utilizando una matriz de sustitución de aminoácidos de serie BLOSUM) y a las secuencias individuales (obtenidos con el árbol guía) se puede variar la penalización a la inserción de espacios, dependiendo del aminoácido y de su posición en la secuencia.

La matriz del árbol filogenético se calcula con el método de "Neighbor Joining", utilizando el alineamiento previamente obtenido. Este método, inicialmente, coloca a las secuencias en un árbol sin ramas internas. Posteriormente, une las secuencias más cercanas con una rama interna y el procedimiento se repite al tratar las dos secuencias

unidas como si fueran una sola. Esto se repite $n-3$ veces (siendo n = número de secuencias) y originando árboles sin raíz.

Las distancias calculadas para obtener el árbol, representan el promedio de aminoácidos substituidos por cada sitio, las cuales son corregidas para substituciones múltiples utilizando la fórmula de Kimura. Usualmente, las distancias observadas no representan el número real de substituciones que pudieron haber ocurrido durante la evolución.

La confiabilidad de los grupos obtenidos con el árbol filogenético (ramas internas) es determinada mediante un análisis de "bootstrap". Este método parte de la premisa de que todos los sitios son independientes, y consiste en tomar muestras de datos de la alineación al azar. Con cada muestra de datos, se calcula una matriz de distancias, y un árbol de la manera ya descrita, repitiéndose este proceso 1000 veces.

Las variaciones de las distancias obtenidas con las muestras, son comparadas con el árbol previamente calculado. La confiabilidad de los agrupamientos (ramas internas) es aceptable cuando estos aparecen en un 95% de las repeticiones.

Para el árbol filogenético del rRNA 18S se utilizaron solamente las regiones conservadas del rRNA de todos los organismos.

III

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1.- BÚSQUEDA DE SECUENCIAS COMPLEMENTARIAS A LOS MONITORES EN EL GENOMA DE *T. CRUZI*.

Para la búsqueda inicial de secuencias relacionadas a las dos sondas génicas heterólogas utilizadas (PCNA de *Z. mais* y proteína ribosomal S4 de *T. brucei*), se hibridaron digeridos del DNA genómico de *T. cruzi* con insertos radiactivos de ambas clonas. La figura 3.1 muestra que en ambos casos hay señal de hibridación, y el número de bandas observadas no indica que el DNA relacionado sea del tipo repetitivo e interdisperso, que es lo que se ha observado en la mayoría de los genes caracterizados en *T. cruzi*. Quizá se trate de genes presentes de 2 a 4 veces, como resulta el caso de otros genes codificadores de proteínas en tripanosomas.

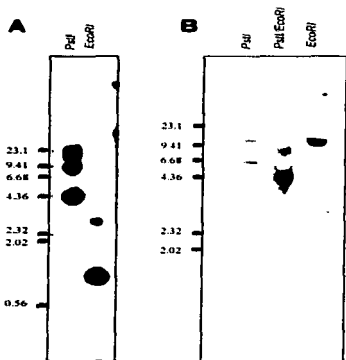


Figura 3.1 Southern blot de DNA genómico de *T. cruzi*. **A)** Sonda de PCNA de maíz. Se observan bandas de 4, 8.6, 14.6 y 22.9 kb con *Pst*I y de 3.4 y 1.85 con *Eco*RI. **B)** Sonda de la proteína ribosomal S4 de *T. brucei*. En la digestión con *Pst*I se observan dos bandas de 10.4 y 4.9 Kb, mientras que en la digestión con *Eco*RI se puede ver una sola banda de 8.8 Kb. En la digestión con *Eco*RI y *Pst*I, se pueden ver bandas de 8 y 4.2 Kb. Se utilizó como marcador de tamaño DNA de fago λ digerido con *Hind*III

3.2.- BÚSQUEDA DE SECUENCIAS COMPLEMENTARIAS A LOS MONITORES EN EL RNA TOTAL DE *T. CRUZI*.

Para comprobar que en el RNA transcrito de células en fase de proliferación existían secuencias relacionadas a las sondas utilizadas, se hicieron Northern blots de RNA total con las sondas marcadas radioactivamente. En el análisis con la sonda de S4 se observó una banda con señal de 1 kb. Esto concuerda con el tamaño que necesitaría un transcrito que codificara para una proteína del tamaño de la proteína ribosomal S4 (261-263 aminoácidos)(Figura 3.2). El estudio en donde se utilizó la sonda de PCNA dio como resultado una señal baja e inespecífica.

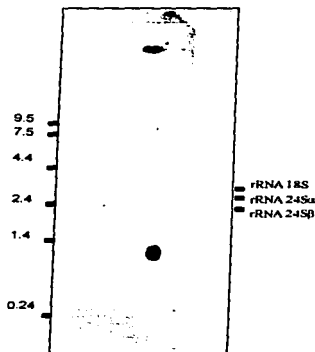


Figura 3.2 Northern blot de RNA total de *T. cruzi*, utilizando la sonda de la proteína ribosomal S4 de *T. brucei*. Se puede ver una banda con señal de aproximadamente 1 Kb. Como marcador de tamaño se utilizó una escalera de RNA (RNA ladder). En la derecha se señalan las especies ribosomales.

3.3.- BÚSQUEDA DE CLONAS GENÓMICAS QUE CODIFIQUEN PARA EL PCNA DE *T. CRUZI*

Para aislar clonas genómicas relacionadas al gen PCNA de *T. cruzi* se realizó una búsqueda por hibridación en una biblioteca genómica construida en el vector cosmídico pcosTL. Este vector facilita la transfección de largos

fragmentos de DNA a *T. cruzi*. La biblioteca se construyó con fragmentos de DNA genómico de *T. cruzi* de 20 a 50 kb obtenidos a partir de una digestión parcial de *Sau3a*. Mediante métodos automatizados, se aislaron 7200 colonias, con las cuales se elaboraron membranas de alta densidad (Zingales et al., 1997). Para corroborar que los insertos de las clonas aisladas de esta biblioteca contenían secuencias relacionadas a la sonda utilizada, el DNA de tres clonas presuntamente positivas (denominadas 2, 4 y 6) fue digerido, transferido e hibridado con el inserto de PCNA marcado junto con DNA de pcosTL (control negativo) y DNA de PCNA (controles positivos) (Figura 3.3).

La señal de hibridación de las clonas candidatos a ser recombinantes con PCNA dieron una señal igual que la obtenida con los controles negativos (DNA de vector) por lo que se consideraron artificios del screening. Finalmente, no se pudo demostrar la clonación del gene de PCNA de *T. cruzi* en esta biblioteca. No se realizó una búsqueda de clonas que codificaran para la proteína ribosomal S4 en esta biblioteca porque todavía no se contaba con esta sonda en el laboratorio, y debido a la inconsecuencia que representaba el recibir las clonas del laboratorio de origen.

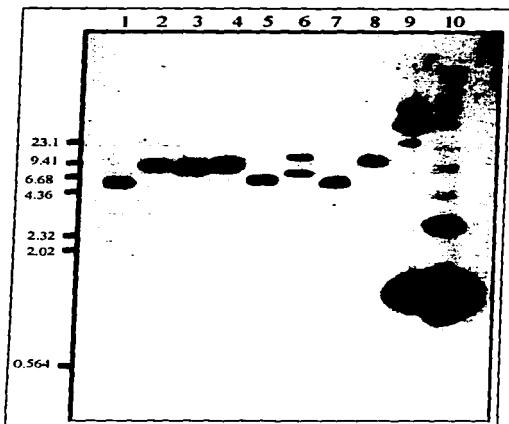


Figura 3.3 Southern Blot de las clonas aisladas de la biblioteca de DNA genómico de *T. cruzi* con la sonda de PCNA de maíz. 1: clona 2/*EcoRI*; 2: clona 2/*SaI*; 3: clona 4/*EcoRI*; 4: clona 4/*SaI*; 5: clona 6/*EcoRI*; 6: clona 6/*SaI*; 7: *pcosTU/EcoRI*; 8: *pcosTU/SaI*; 9: Inserto de PCNA liberado con *EcoRI*; 10: Inserto de PCNA purificado. Se utilizó como marcador de tamaño DNA de fago λ digerido con *HindIII*.

3.4.- BÚSQUEDA DE CLONAS DE cDNA QUE CODIFIQUEN PARA LA PROTEÍNA RIBOSOMAL S4 Y EL PCNA DE *T. CRUZI*

Para obtener la secuencia de los genes de PCNA y la proteína ribosomal S4 de *T. cruzi* se llevó a cabo una búsqueda de clonas en una biblioteca de cDNA. Esta biblioteca estaba construida en el vector de expresión λ -ZAP-II (Stratagene, La Jolla, California, EE.UU.) a partir

de poli-(A)+ RNA obtenido de epimastigotes de *T. cruzi* (cepa Tulahuén), y tenía un título de 1×10^{10} ufp/ml (Santúza Teixeira, comunicación personal). Se analizaron aproximadamente 40,000 placas con el monitor de S4 de *T. brucei*, y 20,000 con el de PCNA de maíz, las cuales se transfirieron a membranas de nylon y se hibridaron con insertos de las sondas marcados radioactivamente.

3.4.1.-CLONAS AISLADAS

De este análisis se obtuvieron seis clonas candidato con el inserto de PCNA de maíz y doce con el inserto de la proteína ribosomal S4 de *T. brucei*. Para comprobar que el inserto de las clonas obtenidas hibridaba con las sondas, se escindieron a plásmidos, se digirieron con *EcoRI* y *KpnI* y se les hibridó con insertos de las sondas marcadas correspondientes.

Se pudieron observar dos poblaciones de clonas aisladas con la sonda de S4: unas que mostraban una banda de inserto (aprox. 1.25 Kb) y otras dos bandas(aprox. 1.25 y 1.7 Kb). Más tarde se comprobó que la banda de 1.7 era producto de una digestión parcial. Las clonas aisladas con el inserto de PCNA tenían insertos de 2.1, 2.3 y 1.4 y 2.3 Kb. La figura 3.4 muestra que hay señal intensa de hibridación en todos los insertos de las clonas, a excepción de la clona A de PCNA. La señal observada en la banda de 2.8 Kb corresponde al vector pBluescript SK-.

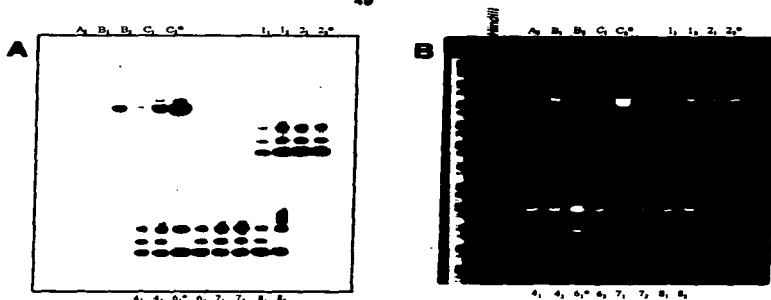


Figura 3.4. Southern blot de las clones aisladas de la biblioteca de cDNA de *T. cruzi*. A, B, y C fueron aisladas con la sonda de PCNA de maíz; 1 a 8 fueron aisladas con la sonda de S4 de *T. brucei*. Se digirieron preparaciones de plásmido escindido *in vivo* (ver materiales y métodos) con *EcoRI* y *KpnI*. A) Autoradiografía. B) gel teñido con bromuro de etidio. Las clones secuenciadas se señalan con asteriscos (*). Se utilizó como marcador de tamaño DNA de fago λ digerido con *HindIII*.

3.5.- ANÁLISIS DE LAS SECUENCIAS OBTENIDAS

Se escogieron dos clones de S4 (S4-2 y S4-6) y una de PCNA (C2) para la secuenciación del inserto. Para esto, se utilizó el método de didesoxinucleótidos, utilizando oligonucleótidos como iniciadores para la reacción. Conforme se determinaba la secuencia del inserto, se diseñaron oligonucleótidos que sirvieran como iniciadores para secuenciar el resto del inserto y de las dos cadenas. El vector en el que se encontraban las clones (pBluescript SK-) permite la recuperación de cadena sencilla, por lo cual esta preparación se utilizó en la secuencia de la cadena codificadora. La cadena complementaria se secuenció con preparación de cadena doble.

Se determinó que las clonas S4-2 y S4-6 tenían insertos de 937 y 945 bases, respectivamente, y solamente diferían en una inserción de 21 nt en la región no codificadora del extremo 3' de la clona S4-2. Se deduce que ambas clonas están completas ya que, en el extremo 5', se encontró un fragmento de 13 bases del mini-exón (SL) común a todos los transcritos en *T. cruzi*. La figura 3.5 muestra una alineación de la secuencia de ambas clonas. Las secuencias tienen una región no traducida 3' de 22 nucleótidos y 3' de 80 y 59 nucleótidos para la clona S4-2 y S4-6, respectivamente, lo cual cae dentro del intervalo de tamaños de regiones no traducidas publicadas en otros genes de proteínas ribosomales de *T. brucei*. Asimismo, contienen un marco abierto de lectura de 819 bases, el cual codifica potencialmente para una proteína de 273 aminoácidos y con un peso molecular de 30,839 Da. (figura 3.6). Se puede observar que la proteína deducida muestra un alto porcentaje de aminoácidos básicos (61 residuos de Arg+Lys+His comparado con 27 Asp+Glu).

Inicialmente, la secuencia parcial del extremo 5' fue sometida a una búsqueda de alineamientos (BLAST; Altschul, S., 1990) con las secuencias almacenadas en la base de datos GenBank. Este análisis reveló homología parcial de la secuencia codificada por el inserto de ambas clonas aisladas con la sonda de la proteína ribosomal S4 de *T. brucei* con proteínas S4 de otros organismos (gallina, humano, papa, rata, etc.), mientras que no hubo similitud con la secuencia obtenida con la sonda de PCNA de maíz. Posteriormente se trató de secuenciar el extremo 3' de este inserto, pero no se logró atravesar la cola de adeninas del transcrito. Dada la dificultad de determinar la identidad de las clonas aisladas con la sonda de PCNA, se decidió continuar el

3.5.1.- ESTUDIOS DE COMPARACIÓN DE SECUENCIAS Y ANÁLISIS FILOGENÉTICO.

Para determinar el grado de homología e identificar dominios altamente conservados de esta proteína, se alinearon las secuencias de aminoácidos obtenidas a partir de la secuencia del inserto de las clonas aisladas con secuencias de la proteína ribosomal S4 de otros

Protein Length#274		MW=30839	
Amino acid	Num	%mol/mol	%w/w
A Ala	21	7.69	5.23
C Cys	2	0.73	0.68
D Asp	13	4.76	4.84
E Glu	14	5.13	5.76
F Phe	2	2.56	3.23
G Gly	22	8.06	4.62
H His	7	2.56	3.04
I Ile	10	6.96	6.97
K Lys	26	9.62	10.62
L Leu	21	7.69	7.70
M MET	11	4.03	4.59
N Asn	10	3.66	3.69
P Pro	13	4.76	4.18
Q Gln	7	2.56	2.86
R Arg	28	10.26	13.63
S Ser	7	2.56	2.06
T Thr	14	5.13	4.66
V Val	23	8.42	7.57
W Trp	1	0.37	0.57
Y Tyr	7	2.56	3.55

```

1  TTTACTATTATTGAATGGAGCCTTTTGTGATTATGACCAAGAAGTAACGTGATGGTCT
2  M T K K H L K A L I
61  TTTATGCCCCAAGGACTTGGATGCTGACGAACGCTCAAGGCGGTGTTCGCTGCAGTGTCT
120  I A P P F C W M L E P K L T G V F A P A T I
121  TGGTGGAAAGGAGAGCTGGTGGATGGCATGACTTTATATGATCATCCGCAATTCGCT
180  A A G T A T G C G T G A A G C C G A G G C T C A G T G A T T T T G C A G G A G G T T T G A T G T
240  G A G C A T A A C C C C C A A G A G A C C A G A T C C C G G T T G G C T G G G A G G T T T T T G A M I
300  K P R K C T K Y P V G M D V Y E I
361  G G A C C G A G C C G G A T G C T T T G C C A T T T A C C A G C T G A A G G C C G C T T T G C G T T T
420  P A T T C D R F R I L Y L A C D V T K R F A L L I
481  A A G I T T T G C G A G C T G A G G G A A C A T C A A G T C C T G A A G T G A G G A A G G T A T A T A T
540  K V G E A E G N I K L L K V E N V Y T E
601  G A T G G C C C A T T G T T G C C A T G A C A C A C C G G T C A C C G T T G T T A C C C G A T T
660  T G R I P V A M T H D G H R I R P G D P
721  G C C C C C A C C T T G C G C A C G C T T G A G A C C T G A G G A G A G A G C T G G T G A G C
780  P A K L L E E K K V Y C D
841  C A T G A T T T G G E A T G A A T T G T G A T G C C C G G G C C G G A A G G T G T T T
900  I K S J N S K V V M V T G G A H R G R A
961  T G C G A T C A T G C C A T T G T G A G C T G T G G C G T G C A T T C A C C C T T G A T T
1020  E E I I C I E E N H P G A F D I A K D D P
1081  T G C G G G G A C A C A I T T G C T C A T G C G T C C A A C A T T T T G A T T G C A C A G A G A T
1140  A A G - E F A T T R A B N I F V I G K D M
1201  G C A G A T T T C T G T G A G T G A A G A A C A G G T C G A T C A A C T G A T T C A G A
1260  D S V V P V P L P K G G G E R I R H V I G E
1321  G C T A G T A A A G C T T A T G T T T A G C G C A C A A G A C A T C A G A C T G A G C T A T G
1380  A E K E L I A A E A A P H M V I T A G A C A
1441  G A A G A A G A T T T G C T T G A A T T T T T T C A T T T A T T T T A T T G T A T T
1500  G A G E
1561  T T T T T T T A A A A A A A A A A A A A A A A A A A A A A A A A A A A

```

Figura 3.6. Secuencia de aminoácidos deducida a partir de las clonas de cDNA obtenidas. A) Composición de aminoácidos B) Secuencia de aminoácidos deducida a partir de la secuencia de cDNA (se utilizó la clona S4-2; ambas clonas tienen idénticos marcos abiertos de lectura)

organismos. Esto permitirá determinar la utilidad de esta proteína para estudios filogenéticos y de clasificación, así como los posibles sitios activos o funcionales. Se obtuvieron las secuencias completas de varios organismos, y se compararon las secuencias de DNA codificadoras y las secuencias de aminoácidos deducidas utilizando el paquete de análisis filogenético CLUSTALW (Thompson J., et al., 1994) y utilizando los parámetros estándar. Posteriormente, se obtuvieron matrices de las distancias genéticas entre las distintas secuencias utilizando el mismo programa, y los dendrogramas fueron dibujados con el programa DRAWTREE y DRAWGRAM, del paquete de análisis filogenético PHYLIP (Felsenstein, J., 1989).

Al alinear las secuencias de aminoácidos, se puede observar un grado alto de conservación, inclusive con especies filogenéticamente distantes. La tabla 3.7 muestra el porcentaje de similitud de la secuencia deducida de aminoácidos de la proteína ribosomal S4 de otras especies con la secuencia obtenida de *T. cruzi*.

Organismo	Similitud con <i>T. cruzi</i>
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	52%
<i>Rattus rattus</i>	56%
<i>Homo sapiens</i> (isoforma Y)	53%
<i>Cricetus griseus</i>	56%
<i>Solanum tuberosum</i>	55%
<i>Gossypium hirsutum</i> ?	55%
<i>Drosophila melanogaster</i>	52%
<i>Gallus gallus</i>	56%
<i>Tetrahymena thermophila</i>	48%
<i>Trypanosoma brucei</i>	85%
(secuencia parcial de 78 aminoácidos)	
Similitud con Eucariontes	32%

Tabla 3.1. Porcentaje de similitud de la secuencia deducida de aminoácidos de la proteína ribosomal S4 de *T. cruzi* con respecto a secuencias publicadas de otros organismos.

El alineamiento de la secuencia de aminoácidos revela la presencia de regiones altamente conservadas (Figura 3.8). Estas regiones muy probablemente sean dominios funcionales o sitios activos, y podrían participar en procesos como la unión de las dos subunidades ribosomales, en el reconocimiento del mRNA y del codón-anticodón, o en la iniciación de la traducción. Se ha demostrado que la proteína ribosomal S4 muy probablemente participa en estos mecanismos (Uchimi, Kikuchi y Ogata, 1986; Mundus et al., 1993; Westermann y Nygard, 1983; Gayathri Devi, Chan y Wool, 1989).

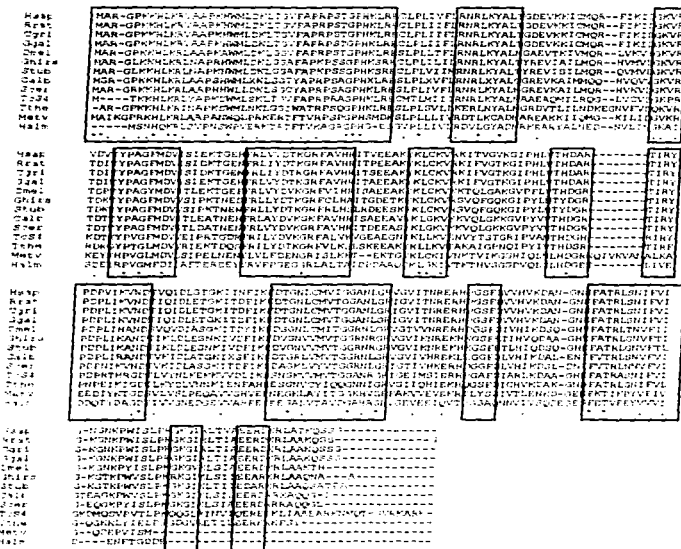


Figura 3.7. Alineamiento de la secuencia deducida de aminoácidos de la proteína biosomal S4 de *T. cruzi* con secuencias publicadas de la misma proteína de otros organismos. Los dominios altamente conservados están señalados con recuadros, mientras que los aminoácidos conservados en todas las especies están señalados con asteriscos (*) y los conservados en todas menos una especie con puntos.(). Organismos vertebrados: Hsae: *Homo sapiens* (isoforma S4Y)(Fisher, et al., 1990 Ac.No. 337512), Rrat: *Rattus rattus*, (Gayathri-Devi et al., 1989. No. Ac.X14210), Cgri: *Cnecetus griseus*, (Ebihara y Onodera, 1996. No. Ac.1350996); Ggal, *Gallus gallus* (Zinn et al., 1994. No. Ac. 1362730); invertebrados: Dmel: *Drosophila melanogaster*, (Yokokura et al., 1993. No. Ac. 730662); Plantas: Ghirs: *Gossypium hirsutum* (Turley et al., 1985. No. Ac. 1173256) Slab: *Solanum tuberosum* (Braun et al., 1984. No. Ac.1173257); Hongos: Clre: *Candida albicans* (Deinbeck et al., 1996. No. Ac.1350982); Seer: *Saccharomyces cerevisiae* (Synetos et al., 1997. No. Ac. 630026); Protozoarios: TcS4: *Trypanosoma cruzi*, Tth: *Tetrahymena thermophila* (Andersen, et al.) Archaeobacterias: Metv: *Methanococcus vannielii* (Auer et al., 1989 No. Ac. 133944), Halm: *Haloarcula mansourni* (Arndt, 1990. No. Ac. 279639).

Con base en el alineamiento de la secuencia de DNA de la región codificadora de la proteína ribosomal S4, se elaboró un árbol filogenético, con el objeto de mostrar gráficamente las distancias génicas entre las secuencias de esta proteína ribosomal de organismos filogenéticamente distintos y representativos de los distintos *phyta* del dominio eucariótico. La matriz de distancias fue elaborada por el programa CLUSTALW, y fue graficada con el programa DRAWTREE, del paquete de análisis filogenético PHYLIP. La topología del árbol obtenido se comparó con la de un árbol elaborado con un marcador evolutivo clásico, como lo es el rRNA 18S. La figura 3.9 muestra ambos arboles, y se puede observar que la topología es aproximadamente la misma. Dado que para la elaboración del árbol de rRNA 18S se utilizaron solamente las regiones constantes, algunas especies cercanas (rata y humano) no se muestran claramente separadas. Un análisis de muestreo al azar ("bootstrap"; ver Métodos y materiales) del alineamiento, mostró que los agrupamientos obtenidos con ambos marcadores se obtienen en más del 95% de las repeticiones.

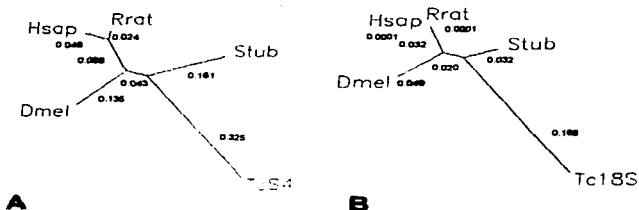


Figura 3.8. Árbol filogenético elaborado a partir de la alineación de secuencias de aminoácidos de la proteína ribosomal S4 (A) y de la secuencia del rRNA 18S (B). Se señalan las distancias génicas entre las secuencias de los organismos analizados, expresadas como el promedio de sustituciones por sitio, corregidas para sustituciones múltiples (ver materiales y métodos). (Stub: *Solanum tuberosum*; TcS4: *Trypanosoma cruzi*; Hsap: *Homo sapiens* (isoforma S4Y); Rrat: *Rattus rattus*).

IV

CONCLUSIONES

1. Existen secuencias complementarias a la sonda de la proteína ribosomal S4 en el genoma de *Trypanosoma cruzi*.
2. Existen transcritos complementarios al monitor de la proteína ribosomal S4 de *Trypanosoma brucei* en el RNA total de *Trypanosoma cruzi*.
3. No se logró la clonación del gene de PCNA de *T. cruzi* en la biblioteca genómica insertada en el vector pcosTL.
4. Se determinó la secuencia de dos clonas de cDNA que codifican para la proteína ribosomal S4 de *T. cruzi*. Estas clonas tienen un inserto de 937 y 945 (S4-2 y S4-6, respectivamente), y difieren en una inserción de 21 nucleótidos en la región no traducida del extremo 3', por lo que tienen regiones no traducidas 5' de 22 nucleótidos y 3' de 80 y 59 nucleótidos. Dado que se secuenciaron 13 nucleótidos correspondientes al extremo 3' del mini-exón (SL), se deduce que la secuencia codificadora de ambas clonas está completa.
5. Ambas clonas poseen un marco abierto de lectura idéntico de 819 bases, el cual codifica para una proteína de 273 aminoácidos, con alto número de aminoácidos básicos, y un peso molecular de 30, 839 Da.
6. La secuencia de aminoácidos deducida a partir de las clonas de cDNA aisladas posee gran similitud con secuencias de proteínas ribosomales S4 previamente publicadas de otros organismos.
7. El árbol filogenético elaborado a partir del estudio comparativo con secuencias representativas de varios phyla posee una topología similar a la obtenida con árboles elaborados con un marcador evolutivo clásico, como es el rRNA 18S.

V

PERSPECTIVAS

Las clonas caracterizadas representan la primera secuencia de una proteína ribosomal básica descrita en *Trypanosoma cruzi*. La gran similitud obtenida en el análisis filogenético hace de esta proteína un posible marcador filogenético para estudios tanto en especies cercanas como lejanas. Un estudio comparativo detallado de la secuencia de aminoácidos deducida permitirían una identificación funcional y/o estructural de los dominios altamente conservados en especies fillogenéticamente distintas. Estos dominios quizá estén sometidos a una presión funcional, por lo que se hace factible la determinación de la participación de los dominios conservados en procesos en los que se ha obtenido evidencia indirecta de la posible participación de la proteína ribosomal S4, como son el reconocimiento de las subunidades ribosomales, la subunidad pequeña del ribosoma y el mRNA, y el reconocimiento codón-anticodón. Un análisis de este tipo también permitiría buscar dominios de unión a rRNA no descritos anteriormente. La identificación y comparación de secuencias ultraconservadas en el extremo amino terminal de la secuencia deducida podría revelar señales de transporte citoplasma-núcleo para esta y otras proteínas ribosomales.

El presente trabajo abre la posibilidad de investigar una posible regulación coordinada del gene de la proteína ribosomal S4 con el componente de RNA ribosomal en la biosíntesis de ribosomas de células en estado proliferativo. Esta regulación ha sido extensamente descrita en procariontes, aunque relativamente poco trabajo de investigación ha sido llevado a cabo en modelos eucariontes.

APÉNDICE 1: MEDIOS DE CULTIVO**LIT (Infusión de Hígado-Triptosa)**

NaCl	4 g/l
KCl	6.4 g/l
Na₂HPO₄	8 g/l
Glucosa	2 g/l
Triptosa	5 g/l
Caldo de infusión de hígado	5 g/l
Hemina	5 ml
Suero fetal bovino	50 ml
Solución penicilina-estreptomicina	10 ml
El pH se ajustó con HCl a 7.2	

NZCYM

Hidrolizado enzimático de caseína	10 g/l
NaCl	5 g/l
Extracto de Levadura	5 g/l
Casaminoácidos	1 g/l
MgSO₄	2 g/l

YT 2X

Triptona	16 g/l
Extracto de Levadura	10 g/l
NaCl	5 g/l

**ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA**

Luria-Bertani (LB)**NaCl** 10 g/l**Bactotripton** 10 g/l**Extracto de Levadura** 5 g/l**Medio sólido** 1.5 % agar**Agar suave** 0.7% agar

APÉNDICE 2: CEPAS BACTERIANAS

JM109: e14⁻ (*mcrA*⁻), *recA1*, *endA1*, *gyrA96*, *thi-1*, *hsdR17*, *supE44*, *relA1*, Δ (*lac proAB*)

- Utilizada en minipreparaciones y maxipreparaciones de plásmidos. Mantenido en NZCYM+ 50µg/ml ampicilina.

XL1-Blue :*recA1*, *endA1*, *gyrA96*, *thi-1* *hsdR17*, *supE44* *relA1* [*lac*⁻ *proAB* *lacI*^p Δ M15 Tn10 (Tet^r)^f

- Utilizada en la titulación y screening de la biblioteca de cDNA, y en screenings secundarios. Mantenido en LB+50µg/ml tetraciclina.

SOLR: e14⁻ (*mcrA*), Δ (*mcrCB-hsdSMR-mrr*) 171, *sbpC*, *recJ*, *UMUC::Tn5(Kan^r)*, *uvrC*, *lac*, *gyrA96*, *relA1*, *thi-1*, *endA1*, λ^R , [*F*⁻ *proAB*, *lacI*^p Δ M15]Su⁻

- Utilizada en la escisión del vector λ -ZAP-II al plásmido pBluescript SK(-). Mantenido en medio NZCYM+50µg/ml kanamicina.

XL1-Blue-MRF⁻: Δ (*mcrA*)183, Δ (*mcrCB-hsdSMR-mrr*)173, *endA1*, *supE44*, *thi-1*, *recA1*, *gyrA96*, *relA1*, *lac*, [*F*⁻ *proAB*, *lacI*^pZDM15], Tn10 (tet^r)

- Utilizada en recuperación de cadena sencilla. Mantenido en LB+50µg/ml tetraciclina.

ABREVIATURAS

μCi	microcuries
μg	microgramos
μl	microlitros
D.O.	Densidad Óptica
dATP	trifosfato de dideoxiadenina
dCTP	trifosfato de dideoxicitosina
DEPC	Dietilpirocarbonato
dGTP	trifosfato de dideoxiguanina
DTT	Ditiotreitol
dTTP	trifosfato de dideoxitimina
EDTA	etilendinitrietetraacétato sódico
LIT	Medio de infusión de hígado
MOPS	Ácido 3-[N-Morpholino] propanosulfónico
PEG	Polietilenglicol
rpm	revoluciones por minuto
SDS	dodecil sulfato de sodio
SSC	Amortiguador de cloruro y citrato de sodio
TBE	Amortiguador de tris-hidroximetilaminometano-boratos-EDTA
TE	Amortiguador de tris-hidroximetilaminometano-EDTA
TEMED	N',N',N',N', tetrametilendiamina
TES	Ácido (N-tris[Hidroximetil] metil-2-aminometano)sulfónico
Tris-Cl	Amortiguador de tris-hidroximetilaminometano-HCl
UFP	Unidades Formadoras de Placas de Lisis

BIBLIOGRAFÍA

1. Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., Lipman, D.J., 1990. Basic Local Alignment Search Tool, *J. Mol. Biol.* 215:403-10
2. Auer, J., Spicker, G., Bock, A., 1989. Organization and structure of *Methanococcus* transcriptional unit homologous to the *Escherichia coli* "spectinomycin operon". Implications for the evolutionary relationship of 70S and 80S ribosomes. *J. Mol. Biol.* 209:21-36.
3. Arndt, E., 1990. Nucleotide sequence of four genes encoding ribosomal proteins from the S10 and spectinomycin operon equivalent region in the archaeobacterium *Halobacterium marismortui*. *FEBS Lett.* 267:193-198.
4. Benne, R., Sloof, P., De Vries, B.F., Van den Burg, J., Harkvoort, T.B.M., Muijers, A.O., 1988. Unusual features of k-DNA from Trypanosomes: a novel mechanism of gene expression (RNA editing), the absence of tRNA genes and the variable presence of a cytochrome oxidase subunit gene, *en Current communications in molecular biology: Molecular genetics of parasitic protozoa*, por Turner, M.J., y Arnot, D., (Eds.) Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Press.
5. Benne, R., Van der Brug, J., Brakenhoff, J., Sloof, P., Van Boom, J., Tromp, M., 1986. Major transcript of the frameshifted coxII gene from trypanosome mitochondria contains four nucleotides that are not encoded in the DNA. *Cell* 46:819-826.
6. Blum, B., Bakalara, N., Simpson, L., 1990. A model for RNA editing in kinetoplastid mitochondria "guide" RNA molecules transcribed from maxicircle DNA provide the edited information. *Cell* 60:189-198.
7. Boothroyd, J.C., Muhich, M.L., Sutton, R.E., 1988. Processing of mRNA in Trypanosomes, *en Current communications in molecular biology: Molecular genetics of parasitic protozoa*, por Turner, M.J., y Arnot, D., (Eds.) Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Press.

8. Braun, H., Emmermann, M., Mentzel, H., Klaus Schmitz, U., 1994. Primary structure and expression of a gene encoding the cytosolic ribosomal protein S4 from potato. *Biochem. Biophys. Acta* 1218:435-438.
9. Braunwald, E., *Atlas of Heart Disease, Volume 2: Cardiomyopathies, Myocarditis, and Pericardial Disease*. London: Current Medicine, 1995.
10. Castro, C., Hernández, R., Castañeda, M., 1981. *Trypanosoma cruzi* rRNA: internal break in the large molecular mass species and number of genes. *Mol. Biochem. Parasitol.* 2:219-233.
11. Celis, J., Madsen, P., 1986. Increased nuclear cyclin/PCNA antigen staining of non S-phase transformed human amnion cells engaged in nucleotide excision DNA repair. *FEBS Letters* 209:277-283.
12. Celis, J., Madsen, P., Celis, A., Nielsen, H., Gesser, B., 1987. Cyclin (PCNA, auxiliary protein of DNA polymerase δ) is a central component of the pathway leading to DNA replication and cell division. *FEBS Letters*, 220:1-7.
13. El-Sayed, N., Alarcon, C., Beck, J., Sheffield, V., Donelson, J., 1995. cDNA expressed sequence tags of *Trypanosoma brucei rhodesiense* provide new insights into the biology of the parasite. *Mol. Biochem. Parasitology* 73:75-90.
14. Fairman, M.P., 1990. DNA polymerase δ /PCNA: Actions and interactions. *Journal of Cell Science* 95:1-4.
15. Feagin, J., Abraham, J., Stuart, K., 1988. Extensive editing of the cytochrome c oxidase III transcript in *Trypanosoma brucei*. *Cell* 53:413-422.
16. Felsenstein, J. 1993. PHYLIP (Phylogeny Inference Package) version 3.5c. Distributed by the author. Department of Genetics, University of Washington, Seattle.
17. Fisher, E., Beer-Romero, P., Brown, L., Ridley, A., McNeil, J., Lawrence, J., Willard, H., Bieber, F., Page, D., 1990. Homologous ribosomal protein genes on the human X and Y chromosomes: escape from X inactivation and possible implications for Turner syndrome. *Cell* 63:1205-1218.

18. Fukuda, K., Morioka, H., Imajou, S., Ikeda, S., Ohtsuka, E., Tsurimoto, T., 1995. Structure-function relationship of the eukaryotic DNA replication factor, Proliferating Cell Nuclear Antigen. *J. Biol. Chem.* 270:22527-22534.
19. Gayathri Devi, K., Yuen-Ling, C., Wool, I., 1989. The primary structure of rat ribosomal protein S4. *Biochim. Biophys. Acta* 1008:258-262.
20. Gibson, W., Miles, M. 1986. The karyotype and ploidy of *Trypanosoma cruzi*, *The EMBO Journal*, 5:1299-1305.
21. Graham, S. V., 1995. Mechanisms of stage-regulated gene expression in kinetoplastida. *Parasitology Today*, 11:217-223.
22. Hernandez, R., Martínez-Calvillo, S., Hernandez-rivas, R., Gomez, E., 1993. *Trypanosoma cruzi* ribosomal RNA genes: a review. *Biol. Res.* 26:109-114.
23. Hernández, R., Nava, G., Castañeda, M., 1983. Small size rRNA species in *Trypanosoma cruzi*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 8:297-304.
24. Hernández-Rivas, R., Martínez-Calvillo, S., Romero, M., Hernández, R., 1992. *Trypanosoma cruzi* 5S rRNA genes: molecular cloning, structure and chromosomal organization. *FEMS microbiology letters* 92:63-68.
25. Huang, J., Van der Ploeg, L., 1990. Requirement of a polypirimidine tract for trans-splicing in trypanosomes: discriminating the PARP promoter from the immediately adjacent 3' splice acceptor site. *EMBO Journal* 10:3877-3885.
26. Kelly, J., Das, P., Tomás, A., 1994. An approach to functional complementation by introduction of large DNA fragments into *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania donovani* using a cosmid shuttle vector. *Mol. Biochem. Parasitology* 65:51-62
27. Kelly, J., Ward, H., Miles, M., Kendall, G., 1992. A shuttle vector which facilitates the expression of transfected genes in *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania*. *Nuc. Acids Res.* 20:3963-3969.
28. Krishna, T., Xiang-Peng, K., Gary, S., Burgers, P., Kuriyan, J., 1994. Crystal structure of the eukaryotic DNA polymerase processivity factor PCNA. *Cell* 79:1233-1243.
29. Levin, M., Kaplan, K., Ferrari, I., Arteman, P., Vazquez, M., Panebra, A., 1993. Humoral autoimmune response in Chagas' disease: *Trypanosoma cruzi*

- ribosomal antigens as immunizing agents. *FEMS immunology and Medical Microbiology* 7:205-210.
30. Li, R., Waga, S., Hannon, G., Beach, D., Stillman, B., 1994. Differential effects by the p21 CDK inhibitor on PCNA-dependent DNA replication and repair. *Nature* 371:534-537.
 31. Li, X., Li, J., Harrington, J., Lieber, M., Burgers, P., 1995. Lagging strand DNA synthesis at the eukaryotic replication fork involves binding and stimulation of FEN-1 by Proliferating Cell Nuclear Antigen. *J. Biol. Chem* 270:22109-22112.
 32. López, I., Khan, S., Vázquez-Ramos, J., Hussey, P., 1995. Molecular cloning of a maize cDNA clone encoding a putative proliferating cell nuclear antigen. *Biochim. Biophys. Acta* 1260:119-
 33. Madsen, P., Celis, J., 1985. S-Phase patterns of cyclin (PCNA) antigen staining resemble topographical patterns of DNA synthesis. *FEBS Letters*, 193:5-11.
 34. Martínez-Calvillo, S., Hernández, R., 1994. *Trypanosoma cruzi* ribosomal DNA: mapping of a putative distal promoter. *Gene* 142:243-247.
 35. McCarthy-Burke, C. Taylor, Z., Buck, G., 1989. Characterization of the spliced-leader genes in *Trypanosoma cruzi*. *Gene* 82:177-189.
 36. Mundus, D., Bulgin, K., Yamkovoy, V., Malygin, A., Repkova, M., Vratskikh, L., Venjaminova, A., Vladimirov, S., Karpova, G., 1993. Structural arrangement of the codon-anticodon interaction area in human placenta ribosomes. Affinity labelling of the 40S subunits by derivatives of oligoribonucleotides containing the AUG codon. *Biochim. Biophys. Acta* 1173:273-282.
 37. Organización Mundial de la Salud, 1997. Boletín en WWW. (<http://www.who.ch/>), Organización de las Naciones Unidas.
 38. Palm, L., Andersen, J., Rahbek-Nielsen, H., Hansen, T., Kristiansen, K., Hjørup, P., 1995. The phosphorylated ribosomal protein S7 in *Tetrahymena* is homologous with mammalian S4 and the phosphorylated residues are located in the C-terminal region. *J. Biol. Chem.* 270:6000-6005.
 39. Russel, P. 1992. *Genetics*, Third edition. New York: Harper Collins Publishers.

40. Sambrook, J., Fritsch, J., Maniatis, T., **Molecular Cloning: A Laboratory Manual.** Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Press, 1989.
41. Schijman, A., Levin, M., 1992. Nucleotide sequence of a cDNA encoding a *Trypanosoma cruzi* acidic ribosomal P0 protein: a novel C-terminal domain in *T. cruzi* ribosomal P proteins. *Nucleic Acids Research* 20:2894.
42. Schmidt, G., Roberts, L., 1989. *Foundations of Parasitology*, Toronto: Times-Mirror/Mosby.
43. Skeiky, Y., Benson, D., Guderian, J., Sleath, P., Parsons, M., Reed, G., 1993. *Trypanosoma cruzi* acidic ribosomal P protein gene family. *Journal of Immunology* 151:5504-5515.
44. Stillman, B., 1989. Initiation of eukaryotic DNA replication in vitro. *Ann. Rev. Cell. Biol.* 5:197-245.
45. Stuart, K., Feagin, J., Abraham, J., 1989. RNA editing: the creation of nucleotide sequences in mRNA—a minireview. *Gene* 82:155-160.
46. Stuart, K., Feagin, J.E., 1988. Regulation of gene expression in *Trypanosomes* by mRNA editing, in *Current communications in molecular biology: Molecular genetics of parasitic protozoa*, por Turner, M.J., y Arnot, D., (Eds.) Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Press.
47. Synetos, D., Dabeva, M., Warner, J., 1992. The yeast ribosomal protein S7 and its genes. *J. Biol. Chem.* 267:3008-3013.
48. Thompson, J., Higgins, D., Gibson, T., 1994. ClustalW: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*, 22:4673-4680.
49. Thompson, J.D., Higgins, D.G. and Gibson, T.J., 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*, 22:4673-4680.

50. Travali, S., Ku, D., Rizzo, M., Ottavio, L., Baserga, R., Calabretta, B., 1989. Structure of the human gene for the proliferating cell nuclear antigen (PCNA). *J. Biol. Chem.* 264:7466-7472.
51. Turley, R.B., Ferguson, D.L., Meredith, W.R., 1995. A cDNA encoding ribosomal protein S4e from cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *Plant Physiol.* 108:431-432.
52. Uchimi, T., Kikuchi, M., Ogata, K., 1986. Cross-linking study on protein neighborhoods at the subunit interface of rat liver ribosomes with 2-iminothiolane. *J. Biol. Chem.* 261:9663-9667.
53. Vanhamme, L., Pays, E., 1995. Control of gene expression in Trypanosomes. *Mic. Rev.* 59:223-240.
54. Vazquez, M., Schijman, A., Panebra, A., Levin, M., 1993. Nucleotide sequence of a cDNA encoding another *Trypanosoma cruzi* acidic ribosomal P2 type protein (TcP2b). *Nucleic Acids Research* 20:2893.
55. Westermann, P., Nygard, O., 1983. The spatial arrangement of the complex between eukaryotic initiation factor eIF-3 and 40 S ribosomal subunit. Cross-linking between factor and ribosomal proteins. *Biochim. Biophys. Acta* 741:103-108.
56. Wool, I., 1979. The structure and function of eukaryotic ribosomes. *Ann. Rev. Biochem* 48:719-54.
57. Wool, I., Chang, Y-L., Glück, A., 1995. Structure and Evolution of mammalian ribosomal proteins. *Biochem. Cell Biol.* 73:933-947.
58. Wool, I., Endo, Y., Chan, Y-L., Glück, A., 1990. Structure, Function and Evolution of Mammalian Ribosomes, en *The Ribosome: Structure, Function and Evolution*, por Hill, W., Dahlberg, A., Garret, R., Moore, P., Schlessinger, D., y Warner, J. (Eds.) American Society of Microbiology, 1990.
59. Yokokura, T., Tei, H., Yamamoto, S., 1993. Sequence and expression of a gene encoding a ribosomal protein S4 homolog from *Drosophila melanogaster*. *Gene* 132:251-254.

60. Zingales, B., Rodinell, E., Degrave, W., Da Silveira, J., Levin, M., LePaslier, D., Modabber, F., Dobrokhotov, B., Swindle, J., Kelly, J., Aslund, L., Hoheisel, J., Ruiz, A., Cazzulo, J., Petersson, V., 1997. The *Trypanosoma cruzi* genome initiative. *Parasitology Today* 13:16-22.
61. Zinn, A.R., Alagappan, R.K., Brown, L.G., Wool, I., Page, D.C., 1994. Structure and function of ribosomal protein S4 genes on the human and mouse sex chromosomes. *Mol. Cell.Biol.* 14:28485-2492.