

Tesis de Posgrado

Familia de proteínas ribosomales P en Trypanosoma cruzi : identificación de las proteínas TcPO, TcP1, Tcp2a y Tcp2b clonado de sus ARNm y caracterización genómica parcial

Schijman, Alejandro Gabriel

1992

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias
Biológicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Schijman, Alejandro Gabriel. (1992). Familia de proteínas ribosomales P en Trypanosoma cruzi : identificación de las proteínas TcPO, TcP1, Tcp2a y Tcp2b clonado de sus ARNm y caracterización genómica parcial. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2508_Schijman.pdf

Cita tipo Chicago:

Schijman, Alejandro Gabriel. "Familia de proteínas ribosomales P en Trypanosoma cruzi : identificación de las proteínas TcPO, TcP1, Tcp2a y Tcp2b clonado de sus ARNm y caracterización genómica parcial". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1992. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2508_Schijman.pdf

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

POR EL TITULO DE
IAS BIOLÓGICAS

ANO JORGE LEVIN

2

*Tesis.
2508.*

EN INGENIERIA GENÉTICA Y
(INGEBI-CONICET)

AGRADECIMIENTOS.

Al Dr Héctor Torres, por haberme ofrecido el ámbito del INGEBI para iniciar mi formación como Biólogo Molecular.

Al Dr Mariano J. Levin, por haberme transmitido su experiencia y la fuerza de su vocación; por su preocupación constante y apasionada, y por haber puesto los medios del laboratorio a mi disposición para superar las dificultades en el trabajo.

A Enrique Mesri, a Gabriela Levitus, a Patricia Levy - Yeyati y Sonia Lafon, porque las circunstancias de la vida nos acercaron para aprender a trabajar juntos todos los días y durante un tiempo muy importante para cada uno de nosotros. Y aunque los caminos naturalmente se separan, siempre queda la huella del lugar inicial.

A Martín Vazquez y Nelson Duseti, por que juntos disfrutamos las épocas de gloria del grupo P, y por todo lo que aprendí en la batalla conjunta de los rastreos, los subclonados y las secuenciaciones.

A Dan Kaplan y Alfredo Panebra, porque son compañeros nobles y amigos sinceros.

A los que pasaron y se fueron del grupo CHAGAS, como Reinaldo, Liz y Fabián, por ser compañeros valiosos, y a los que vinieron y se quedan que les valga la pena.

A los Dres Mirtha Flawia, M. Tellez de Iñón, Luis Jimenez de Asua, Gerardo Glikin, Alejandro Mentaberry, Alejandro Paladini y Alberto Kornblihtt, por que mostraron sincero interés en mi trabajo, por sus aportes y apoyo permanentes.

A la Dra Mireille Hontebeyrie - Joskowicz, por su excelente disposición y estímulo durante mi estadía en *L' Unité d'Immunoparasitologie* del Instituto Pasteur. A Charlie Roth y Catherine Jaquemot por su aprecio y consideración. A Hernando del Portillo, Nestor Kerner, Glaucia Paranhos, Karin Nietsche y Claude por los bellos momentos de compañerismo y amistad.

Al Dr José Luis Ramirez Ochoa, Palmira Guevara, Ivan Galindo, Alicia, Mina, el Chiwi, por haberme tratado tan machete en mi estadía en Caracas. A Alida Hung por su alegría y su dedicación, a Isabel Cano por los largos días de CHEF, a Clara por que extraño el "CHE VOS" y a Teresa por que la vaca Mariposa tuvo un terné.

Al inolvidable equipo del célebre 2 1 1, porque siempre tenían los secretos precisos para salir airoso de los protocolos entreverados.

A mis compañeros y amigos del INGEBI, a Fernando Bravo, por que sus mates son los mejores, a Betina Orman porque siempre me viene a saludar con una sonrisa, a Mercedes Goin, chiquita y aguantadora, a Nora Paños por haber sido la Mc Clincton del INGEBI, a Jorge Muschietti por el afecto de una vieja amistad, a Omar Coso porque su chocolate me salvó de desfallecer la larga noche de la impresión de estos agradecimientos, a Pablo Ravinowicz porque es muy buen pibe, a Andres Muro, por su serenidad, a Horacio Martinetto porque soportó mi ineficacia como ministro de radioactivo, a Flor, a Malala, a Rosana, a Rita, a Norberto Malarini, a Ximena, a Silvia Cabral, a Leo Erijman, a Liliana Haim, a Javier Cáceres, a Graciela Bianchini, a Diego, a Gustavo, a Anabella, a Pablito, a Albertito, a Claudia por la convivencia en los pasillos, las centrífugas, y los seminarios.

A Tito, Mari y Leonor; a Irma, Mariano, Luis y Marta por sus labores imprescindibles.

A Adriana Urman por sus instrucciones precisas para facilitar la escritura de esta Tesis y a Marcelo y Ricardo por las Figuras.

Finalmente, a mi querido maestro Horacio Amauri, porque al fin terminé de escribir, a la Dra Flavia Thompson por su ternura, y a mis padres por su amor infinito.

ABREVIATURAS

aa.....	aminoácido.
ADN.....	ácido desoxiribonucleico
ADNc.....	ácido desoxiribonucleico copia
ADNasa.....	Desoxirribonucleasa
ARN.....	ácido ribonucleico
ARNasa.....	Ribonucleasa
ARNm.....	ARN mensajero
ATP.....	adenosina trifosfato
β -gal.....	β -galactosidasa
BPB.....	azul de bromo-fenol.
BrEt.....	Bromuro de Etidio
BSA.....	sero albúmina bovina
cpm.....	cuentas por minuto
ClGu.....	cloruro de guanidinio
d.d.....	bidestilada
DMF.....	Dimetilformamida
D.O.....	Densidad óptica
dc.....	doble cadena
DTT.....	ditiotreitól
EDTA.....	ácido etilén diamino tetraacético
ETOH.....	etanol
GP.....	glicoproteína
GTP.....	guanosina trifosfato
HCl.....	ácido clorhídrico
hs.....	horas
IPTG.....	isopropil- β -D-tiogalactósido
Kb.....	Kilobase
kDa.....	Kilodaltones
LES.....	lupus eritematoso sintético
Mg ²⁺	cación magnesio
min.....	minutos
mg.....	miligramo

ml.....mililitro
mM.....milimolar (milimol por litro)
M.....molar (mol por litro)
Mn²⁺.....catión manganeso
MOPS.....ácido 3-[N-morfolino]propano sulfónico.
NaCl.....cloruro de sodio
nM.....nanomolar (nanomoles por litro)
nm.....nanometros
O.N.....durante la noche
PBS.....tampón fosfato salino
PEG.....polietilenglicol
PFGE.....electroforesis en gradiente de campos pulsados
PMSF.....fenil-metil sulfonil fluoruro.
pmol.....picomol
PSA.....persulfato de amonio
rpm.....revoluciones por minuto
SAM.....S-adenosil-metionina.
SDS.....dodecil sulfato de sodio
sc.....simple cadena
SSC.....solución citrato salina
t.amb.....temperatura ambiente
TBE.....tampon tris borato EDTA.
TBS.....tampon tris salino
TEMED.....N,N,N',N' tetrametil etilendiamina
Tris.....2-amino-2-hidroximetil-1-3-propano diol
Tul 2.....cepa Tulahuén 2 de *T. cruzi*.
u.f.p.....unidades formadoras de placa.
UV.....ultravioleta
µg.....microgramo
µl.....microlitro
µM.....micromolar (micromoles por litro)
x-gal.....5-Bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranosido..

INDICE GENERAL

Pág.

INTRODUCCION

I.1.	LA ENFERMEDAD DE CHAGAS.....	1
I.1.1.	Reseña Histórica.....	1
I.1.2.	Epidemiología.....	2
I.1.3.	Vías de infección.....	2
I.1.4.	Fases de la enfermedad de Chagas.....	5
1.4.1.	Fase aguda.....	5
1.4.2.	Fase crónica.....	5
I.2.	<i>Trypanosoma cruzi</i>	9
I.2.1.	Ubicación sistemática.....	9
I.2.1.1	Características del Orden kinetoplástida.....	9
I.2.1.2	Características del Género <i>Trypanosoma</i>	13
I.2.2.	Características del <i>T. cruzi</i>	14
I.2.2.1	Formas del desarrollo de <i>T. cruzi</i>	14
I.2.2.2	Hospedadores.....	15
1.2.2.3	Cepas de <i>T. cruzi</i>	17
I.1.2.4	Estructura genética de las poblaciones de <i>T. cruzi</i>	17
I.2.2.5	Clonado de genes de <i>T. cruzi</i>	19
I.1.2.6	Organización de genes de <i>T. cruzi</i>	21
I.3.	PROTEINAS RIBOSOMALES P.....	23
I.3.1.	Aspectos estructurales, funcionales y evolutivos.....	23
I.3.2.	Estructura de las proteínas ribosomales P.....	25
I.3.2.1	Proteínas ácidas L7/L12.....	25
I.3.2.2	Proteína L10.....	26
I.3.3.	Incorporación a ribosomas y fosforilación.....	29
I.3.4.	Organización genómica de las proteínas ribosomales P.....	30
I.4.	ANTECEDENTES DEL TRABAJO DE TESIS.....	31
I.4.1.	Introducción.....	31
I.4.2.	Respuesta autoinmune frente a proteínas ribosomales P en la cardiopatía chagásica crónica.....	32
I.4.3.	Caracterización de la familia de proteínas ribosomales P de <i>T. cruzi</i>	35
I.5.	OBJETIVOS DE LA TESIS.....	37

MATERIALES Y METODOS

II.1.	MATERIALES.....	38
II.1.1.	Soluciones y <i>buffers</i> de uso frecuente.....	38
II.1.2.	Medios de cultivo bacteriano.....	38
II.1.3.	Productos radioactivos.....	39
II.1.4.	Enzimas.....	39
II.1.4.1	Enzimas de restricción.....	39
II.1.4.2	Enzimas de modificación.....	40
II.1.4.3	Polimerasas.....	40
II.1.4.4	Nucleasas.....	41
II.1.5.	Cepas de <i>Trypanosoma cruzi</i>	41
II.1.6.	Cepas de <i>Escherichia coli</i>	41
II.1.6.1	Genotipos.....	41
II.1.6.2	Mantenimiento de las cepas bacterianas.....	44
II.1.7.	Vectores de clonado.....	44
II.1.8.	Bibliotecas de ADNc de <i>T. cruzi</i>	45
II.1.9.	Fagos recombinantes con secuencias clonadas de <i>T. cruzi</i> ...	45
II.1.10.	Oligonucleótidos diseñados a partir de secuencias de <i>T. cruzi</i>	46
II.1.11.	Marcadores de PM de ADN.....	46
II.1.11.	Sueros humanos.....	46
II.1.11.1	Pacientes chagásicos.....	46
II.1.11.2	Pacientes lúpicos.....	47
II.2.	METODOS.....	47
II.2.1.	Extracción y cuantificación de ácidos nucleicos.....	47
II.2.1.1	Preparación de ADN total de <i>T. cruzi</i>	47
II.2.1.2	Preparación de ADN de fagos Lambda.....	48
II.2.1.3	Extracción de ADN de plásmidos.....	49
II.2.1.3.1	En pequeña escala (Minipreparaciones).....	49
II.2.1.3.2	En gran escala (Maxipreparaciones).....	50
II.2.1.4	Preparación de ADN del fago M13.....	52
II.2.1.4.1	Preparación de ADN de la forma replicativa del fago M13.....	52
II.2.1.4.2	Preparación de ADN simple cadena del fago M13.....	52
II.2.1.5	Preparación de ARN de <i>T. cruzi</i>	53
II.2.1.5.1	Método de extracción con isotiocianato de guanidinio (GTC) en colchón de Cloruro de Cesio.....	53
II.2.1.5.2	Purificación de ARN poli A+.....	54
II.2.1.6	Métodos de dosaje de ácidos nucleicos.....	55
II.2.1.6.1	Cuantificación de ADN.....	55
II.2.1.6.2	Cuantificación de ARN.....	55
II.2.3.	Métodos electroforéticos.....	56
II.2.3.1	Electroforesis en geles nativos de agarosa.....	56
II.2.3.2	Electroforesis en gradientes de campos eléctricos pulsados.....	56
II.2.3.2.1	Principio.....	56
II.2.3.2.2	Preparación de parásitos de <i>T. cruzi</i> para experiencias de separación cromosómica.....	57

II.2.3.2.3	Condiciones de electroforesis.....	57
II.2.3.1.2	Electroforesis en geles de agarosa alcalina.....	58
II.2.3.3	Electroforesis de ARN en geles de agarosa- formaldehído.....	58
II.2.3.3.1	Preparación de la muestra para la siembra en el gel.....	58
II.2.3.3.2	Preparación del gel desnaturalizante con formaldehído....	59
II.2.3.4	Electroforesis en geles nativos de poliacrilamida.....	59
II.2.3.5	Purificación de ADN a partir de geles nativos de agarosa.....	60
II.2.3.5.1	Método de electroelución.....	60
II.2.3.5.2	Método de elución de geles de agarosa de bajo punto de fusión (LMP).....	60
II.2.4.	Construcción de bibliotecas.....	61
II.2.4.1	Construcción de una biblioteca de ADN copia enriquecida en transcriptos P-JL5.....	61
II.2.4.1.1	Fundamentos de la metodología empleada.....	61
II.2.4.1.2	Síntesis de la primera cadena.....	62
II.2.4.1.3	Síntesis de la segunda cadena.....	64
II.2.4.1.4	Purificación del ADN copia.....	64
II.2.4.1.5	Acondicionamiento del ADN copia para el clonado en λ gt11.....	64
II.2.4.2	Construcción de bibliotecas genómicas enriquecidas en fragmentos de restricción de ADN genómico de <i>T. cruzi</i>	65
II.2.4.2.1	Obtención de los insertos genómicos.....	65
II.2.4.2.2	Reacciones de Ligado vector-fracciones genómicas.....	66
II.2.4.2.2.1	Bibliotecas λ gt10-EcoR1.....	66
II.2.4.2.2.2	Bibliotecas pBS-Hind III.....	66
II.2.5.	Clonado por ARN-PCR.....	67
II.2.6.	Identificación de secuencias por hibridización.....	69
II.2.6.1	Transferencia de ADN de fagos recombinantes.....	69
II.2.6.1.1	Rastreo de bibliotecas.....	69
II.2.6.1.2	Ensayo de placas de lisis.....	70
II.2.6.1.3	Identificación de fagos M13 recombinantes.....	70
II.2.6.2	Transferencia de ADN de colonias recombinantes.....	70
II.2.6.3	Transferencia de ADN de geles de agarosa: <i>Southern blots</i>	72
II.2.6.4	Transferencia de ARN de geles de agarosa-formaldehído: <i>Northern blots</i>	72
II.2.6.5	Condiciones de hibridización.....	73
II.2.6.5.1	Hibridización con Formamida.....	73
II.2.6.5.2	Hibridización rápida.....	73
II.2.6.6	Condiciones de lavado.....	73
II.2.7.	Preparación de sondas radioactivas.....	74
II.2.8.	Rastreo inmunológico de las bibliotecas en λ gt11.....	75
II.2.8.1	Preparación de bacterias <i>E. coli</i> RY1090 para infección con λ gt11.....	75
II.2.8.2	Plaqueo de la biblioteca de λ gt11 en <i>E. coli</i> RY 1090.....	75
II.2.8.3	Transferencia de las proteínas de fusión producidas por los fagos recombinantes a nitrocelulosa.....	75
II.2.8.4	Detección de las proteínas con anticuerpos.....	76

II.2.8.4.1	Bloqueo e incubación con el suero.....	76
II.2.8.4.2	Revelado inmunoenzimático de la unión proteína de fusión-IgG de suero-anti IgG biotinilada-avidina-peroxidasa biotinilada.....	77
II.2.8.5	Purificación de un clon positivo.....	77
II.2.8.5.1	Extracción de fagos con señal positiva.....	77
II.2.8.5.2	Rastreos sucesivos: purificación de fagos con señal positiva.....	77
II.2.8.5.3	Amplificación de los fagos.....	78
II.2.9.	Análisis inmunológico de fagos recombinantes.....	78
II.2.9.1	Lisogenización de <i>E. coli</i> Y1089 con fagos λ gt11.....	78
II.2.9.2	Inducción de la expresión de las proteínas de fusión.....	79
II.2.9.3	Preparación de lisado de <i>E. coli</i> Y1089 lisógena para λ gt11 salvaje.....	80
II.2.9.4	Inmunopurificación de anticuerpos anti-proteínas de fusión.....	80
II.2.9.5	Reactividad de los sueros con fagos recombinantes.....	81
II.2.9.5.1	Preparación de las bacterias para la infección.....	81
II.2.9.5.2	Crecimiento, inducción de los fagos recombinantes y transferencia de las proteínas a filtros de nitrocelulosa.....	81
II.2.10.	Determinación de la longitud de los insertos de los fagos recombinantes.....	82
II.2.10.1	Reacción de "fill-in" de extremos EcoR1.....	82
II.2.10.2	Determinación del tamaño de los insertos por PCR.....	83
II.2.10.3	Análisis de insertos clonados en plásmidos por mapeo de restricción.....	84
II.2.11.	Subclonado en el fago vector M13.....	84
II.2.11.1	Preparación del vector.....	84
II.2.11.2	Preparación del inserto.....	84
II.2.11.3	Reacciones de Ligado.....	85
II.2.11.4	Preparación de células competentes para transformación...86	
II.2.11.4.1	Método del Cloruro de Calcio.....	86
II.2.11.4.2	Método de transformación de alta eficiencia.....	86
II.2.11.5	Transformación de los productos de ligación.....	87
II.2.12.	Secuenciación de ADN.....	88
II.2.12.1	Prueba de complementaridad de ADNsc subclonados en M13...88	
II.2.12.2	Secuenciación de ADN de doble cadena: apareamiento templado- <i>primer</i>	88
II.2.12.3	Reacción de secuenciación de ADN por el método de terminación de cadena con dideoxinucleótidos.....	89
II.2.12.4	Armado y corrida de geles de poliacrilamida para secuenciación de ADN.....	90

RESULTADOS

III. I.	PLANTEO GENERAL.....	94
III.1.1.	Identificación y clasificación de fagos que expresan antígenos ribosomales P.....	94
III.1.2.	Identificación inmunológica.....	95
III.1.2.1	Reactividad diferencial de los fagos recombinantes frente a sueros chagásicos.....	95
III.1.2.2	Ensayo de placas de lisis con anticuerpos anti-JL5 y anti-JL52.....	95
III.1.3.	Identificación por homología de secuencias de ADN.....	98
III.1.3.1	Ensayo de placas de lisis con sondas radioactivas.....	98
III.2.	Proteína ribosomal Tc P-JL5.....	100
III.2.1.	Caracterización de los fagos del grupo P-JL5.....	100
III.2.1.1	Caracterización de los fagos S16 y S18.....	100
III.2.1.2	Caracterización del fago S23.....	100
III.2.1.3	Descripción de la secuencia del ADNc S23.....	103
III.2.2.	Clonado del ARNm P-JL5 de tamaño completo.....	104
III.2.2.1	Rastreo de un fago conteniendo la secuencia amino-terminal de P-JL5.....	104
III.2.3.	Clonado de la familia de transcriptos P-JL5.....	108
III.2.3.1	Construcción de una biblioteca de ADNc enriquecida.....	108
III.2.3.2	Subclonado y secuenciación de los ADNc P-JL5.....	109
III.2.3.3	Identificación de transcriptos que codifican para isoformas de la proteína P-JL5.....	110
III.2.4.	Organización genómica de P-JL5.....	113
III.2.4.1	Caracterización genómica de P-JL5.....	113
III.2.5.	Clonado de genes P-JL5.....	118
III.2.5.1	Bibliotecas enriquecidas en fragmentos Eco R1.....	118
III.2.5.1.1	Descripción de la secuencia del fragmento EcoR1 1 kb.....	120
III.2.5.2	Bibliotecas enriquecidas en fragmentos Hind III.....	120
III.2.5.3	Mapa de restricción de los plásmidos pBS-HindIII: H13, H15 y H18.....	122
III.2.5.4	Secuenciación de los fragmentos HindIII.....	123
III.2.5.4.1	Secuenciación de las regiones codantes: Identificación de las porciones C-terminales de tres isoformas P-JL5.....	123
III.2.5.4.2	Secuenciación de los extremos 3' no codantes de los genes P-JL5 B y C.....	124
III.2.5.4.3	Comparación de las secuencias 3' flanqueantes de los genes P-JL5 A, P-JL5 B y P-JL5 C.....	126
III.2.6.	Análisis preliminar de polimorfismo de restricción de la familia de genes P-JL5 en cepas de <i>T. cruzi</i>	128
III.2.7.	Localización cromosómica de genes P-JL5 en <i>T. cruzi</i> (Tul 2).....	131
III.3.	Proteínas ribosomales Tc P-G13 y Tc P-L6.....	132
III.3.1.	Proteína ribosomal P-G13.....	132
III.3.1.1	Caracterización del fago G-13.....	132
III.3.1.2	Aislamiento y caracterización del fago Mat 1.....	133

III.3.1.3	Caracterización del ARNm P-G13.....	135
III.3.1.4	Organización genómica de P-G13.....	136
III.3.1.4.1	<i>Southern blots</i>	136
III.3.1.4.2	Construcción de bibliotecas enriquecidas en fragmentos genómicos P-G13.....	138
III.3.2.	Proteína ribosomal P-L6.....	139
III.3.2.1	Caracterización del fago L6.....	139
III.3.2.2	Análisis por <i>Northern</i> y <i>Southern blot</i> de P-L6.....	140
III.4.	Proteína ribosomal Tc P-JL52.....	142
III.4.1.	Caracterización del fago JL52.....	142
III.4.1.1	Caracterización inmunológica.....	142
III.4.1.2	Caracterización genética.....	144
III.4.1.3	Secuenciación del ADNc JL52.....	145
III.4.2.	Caracterización del fago CH3.....	147
III.4.2.1	Subclonado y secuenciación del fago CH3.....	147
III.4.3	Identificación de la secuencia completa de TcP0.....	150
III.4.3.1	Clonado y secuenciación del extremo 5' del ARNm TcP0.....	150
III.4.3.2	Secuenciación del fragmento N-P0.....	152
III.4.4	Localización cromosómica de los genes TcP0.....	155

DISCUSION

IV.1.	Proteína ribosomal Tc P-JL5.....	158
IV.1.1	Análisis de la secuencia aminoacídica.....	158
IV.1.2	Caracterización de las isoformas de TcP2a en la cepa Tul 2.....	163
IV.1.2.1	Análisis de las regiones codantes de los 4 transcriptos TcP2a.....	163
IV.1.2.2	Señales de trans-splicing en los transcriptos P-JL5.....	164
IV.1.3	Organización genómica de Tc-PJL5.....	167
IV.1.3.1.	Comparación de las regiones 3' flanqueantes de los genes P-JL5 clonados.....	168
IV.1.3.2	Marcos de lectura abiertos en regiones 3' de genes P-JL5.....	169
IV.2.	Proteínas ribosomales P-G13 y P-L6.....	171
IV.2.1	Proteína ribosomal P-G13: "Tc P2b".....	171
IV.2.2	Proteína ribosomal P-L6: "TcP1".....	172
IV.2.3	Organización genómica en TcP2b y TcP1.....	173
IV.3.	Proteína ribosomal TcP0.....	174
IV.3.1.	Análisis de la secuencia aminoacídica.....	174
IV.3.2	Comparación de la secuencia de TcP0 con la de otros organismos.....	174
IV.3.2.1	Dominio putativo de interacción con el ARN ribosomal.....	176
IV.3.2.2	Análisis de la bisagra y la region C-terminal.....	177
IV.3.3	Organización genómica de TcP0.....	180
IV.3.4	Antigenicidad de las Proteínas P0.....	181

IV.4	Familia de antígenos ribosomales P de <i>T.cruzi</i>	182
IV.4.1	Organización de las proteínas P en el ribosoma de <i>T.cruzi</i>	183
IV.4.2	Estructura y evolución del sistema P en <i>T.cruzi</i>	184
CONCLUSIONES		190
APENDICE		
VI.1	Utilización de codones en las proteínas ribosomales P de <i>T.cruzi</i>	193
VI.2	Comparación de los extremos 3' no codantes de los ADNc de proteínas ribosomales P de <i>T.cruzi</i>	199
BIBLIOGRAFIA		205

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

I.1. LA ENFERMEDAD DE CHAGAS.

I.1.1. Reseña Histórica.

En 1909, Carlos Chagas, médico brasileño, fue comisionado por el Ministerio de Salud Pública del Brasil para estudiar la presencia de focos de paludismo en el población de Lassance, estado de Minas Gerais. Así, descubrió una población importante de insectos hematófagos domiciliarios, infectados por un tripanosoma hasta ese momento desconocido, al que denominó *Schizotrypanum cruzi* en homenaje a su maestro, el Dr Oswaldo Cruz. La detección del parásito en sangre de niños con cuadros febriles, en sangre de animales domésticos, y una serie de resultados experimentales en monos inoculados con tripanosomas provenientes de sangre de pacientes infectados, lo llevaron a postular la existencia de una nueva enfermedad:

Julgamos tratar-se de uma trypanozomiase humana, molestia ocasionada pelo Trypanosoma cruzi, cujo transmissor é o Conorrhinus sanguisuga..." (Chagas, 1909).

El hallazgo de Chagas fue criticado; el científico fue calificado como "un hombre que busca en la selva enfermedades que no existen" (citado por Koberle, 1968).

La revalorización del descubrimiento de la enfermedad de Chagas se debe al trabajo de investigación del médico argentino Salvador Mazza, quién impulsó la creación de un Instituto Nacional, dedicado a estudiar las enfermedades propias de la región. En 1928 se creó oficialmente la "Misión de Estudios de la Patología Regional Argentina" (MEPRA), institución en la que se confirmó la existencia de la enfermedad de Chagas, se impulsaron estudios epidemiológicos y se logró aumentar el conocimiento de los síntomas y lesiones característicos de esta infección.

I.1.2. Epidemiología.

La enfermedad de Chagas o tripanosomiasis americana afecta a unas 16 a 18 millones de personas en las áreas endémicas, delimitadas por los paralelos 42 N y 46 S que abarcan desde el Sur de Estados Unidos de Norteamérica hasta Argentina y Chile, elevándose a 60 mil la tasa anual de mortandad causada por esta endemia (UNDP/World Bank/WHO, Tropical Diseases Research, 1991). Su distribución geográfica coincide con la de los insectos transmisores de hábitos domiciliarios (Romaña, 1963); 90 millones de personas están expuestas a la infección, concentradas sobre todo en las áreas rurales, dada la vinculación que existe entre la proliferación de los vectores y la precariedad de las viviendas, en las cuales pueden alimentarse, guarecerse y proliferar: "*melhorar a residencia humana e não mais consentir que o nosso camponês tenha como abrigo a caua primitiva, infestada pelo inseto que lhe suga o sangue e lhe injeta o parasito, caua às vezes imprestável como habitação de suínos é de todo incompatível com a civilização de un povo*" (Chagas, citado en Koberle, 1968).

Se considera la enfermedad de Chagas como una enfermedad socioeconómica típica, inseparable de la pobreza y el subdesarrollo (Marsden, 1988; Warren, 1989).

I.1.3. Vías de infección.

La picadura del insecto vector en las horas de sueño nocturno, constituye la principal vía de infección de *T. cruzi* (Brener, 1973). Inmediatamente después de succionar la sangre, el hematófago defeca liberando los parásitos (tripomastigotes metacíclicos) en las heces contaminadas. El prurito causado por la picadura lleva al individuo a facilitar el contacto de las heces contaminadas con la herida, favoreciendo la infección. Las mucosas bucal o conjuntiva son otras vías frecuentes de infección por *T. cruzi* (Romaña, 1963).

Introduccion

Los tripomastigotes metacíclicos invaden células de varios tejidos, donde se diferencian a amastigotes, los cuales sufren ciclos de división binaria cada aprox. 12 horas. Una proporción de amastigotes se diferencia a tripomastigotes, los cuales, liberados por lisis de la célula huésped, reingresan en el torrente sanguíneo. Los tripomastigotes sanguíneos podrán infectar otras células y eventualmente podrán ser ingeridos por picadura del vector. Al llegar al intestino medio del insecto, los tripomastigotes sanguíneos, se diferencian a epimastigotes (forma replicativa); en el recto se diferencian a tripomastigotes metacíclicos, estadio infectivo del parásito, completándose el ciclo (García y Azambuja, 1991)(ver Figura I.1).

El grado creciente de urbanización en América Latina, a partir de la década del 70, ha extendido la infección chagásica a áreas urbanas, transmitida sobre todo por transfusión sanguínea (Amado Neto, 1968; Schmuñiz, 1985; UNDP/WORLD BANK/WHO, Tropical Diseases Research, 1989-1990).

Se han descripto otras vías de infección, como la congénita (Schmuñiz y Szarfman, 1977; Díaz, 1979), y la accidental por contaminación con heces de triatominos, con parásitos en cultivo, o bien con sangre de animales inoculados en el Laboratorio (Brener, 1990).

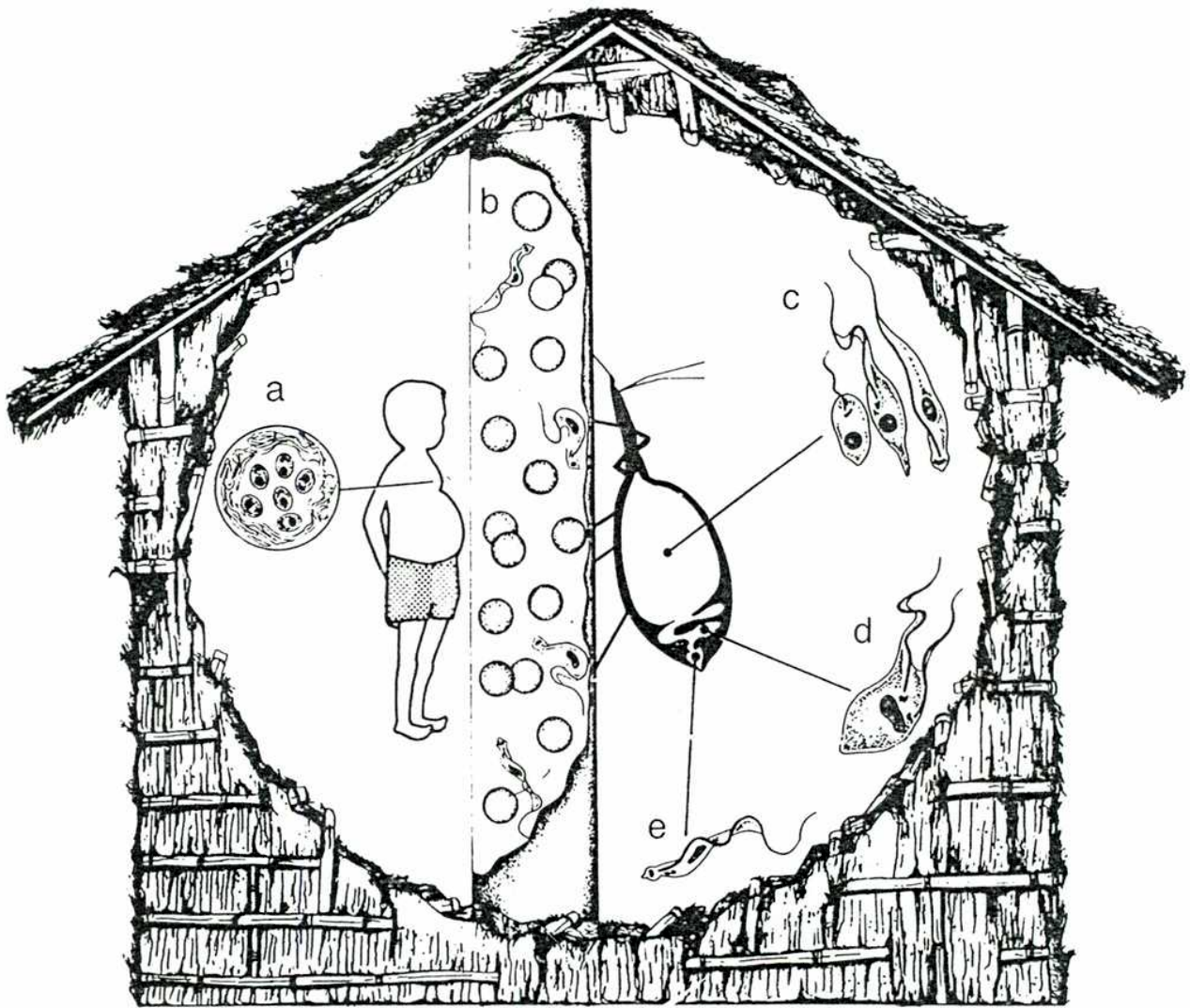


Figura I.1

Ciclo de vida de *Trypanosoma cruzi*

Tripomastigotes sanguíneos (b) de una persona infectada son ingeridos por el insecto vector. Estos se diferencian a epimastigotes en el primer tramo del tubo digestivo (c). Se replican en el intestino medio (d), se diferencian eventualmente a tripomastigotes metacíclicos en el recto (e), y se liberan con las heces, excretadas durante la ingesta de sangre. Al infectar células del hospedador mamífero, los tripomastigotes metacíclicos se diferencian a amastigotes replicativos (a) que finalmente se transforman en tripomastigotes sanguíneos, completándose el ciclo (tomado de García y Azambuja, 1991).

I.1.4. Fases de la enfermedad de Chagas.

La enfermedad de Chagas se desarrolla en dos fases:

1.4.1 Fase aguda.

El período agudo es en general asintomático; se estima que más del 90 % de los individuos infectados pasa a la fase crónica sin advertirlo (Rosenbaum, 1964).

El conjunto de signos clínicos que caracterizan la fase aguda comprende: fiebre, parasitemia detectable, linfadenopatía, hepatosplenomegalia, vómitos, diarrea y especialmente, los signos de puerta de entrada, como el ojo de Romaña (Figura I.2). En un bajo número de casos (1-5 %) se observa la aparición de una miocarditis, generalmente reversible, caracterizada por taquicardia, cardiomegalia y disfunción cardíaca, a veces acompañada por alteraciones electrocardiográficas (Laranja y col., 1956; Rosenbaum, 1964).

1.4.2 Fase crónica.

La mayor parte de la población crónicamente infectada no presenta evidencias discernibles de enfermedad; sólo un porcentaje de hasta el 30 %, con grandes diferencias regionales, desarrolla al cabo de 10, 20 o más años, síntomas y/o signos de daño visceral. Esto es lo que se denomina enfermedad de Chagas crónica, cuya manifestación clínica más frecuente en Argentina es una cardiopatía.

En la cardiopatía chagásica crónica, desde los estadios iniciales hasta los cuadros terminales, se detectan focos inflamatorios activos, los que podrían desempeñar un rol preponderante en la destrucción lenta y progresiva del miocardio (Chiale y Rosebaum, 1989). La manifestación más severa de la

cardiopatía chagásica crónica es el desarrollo de una panmio-
carditis, que se caracteriza por el daño miocárdico en ausen-
cia de nidos de amastigotes (Rosebaum, 1964)(Figura I.2).



Figura I.2

Fases de la enfermedad de Chagas.

Izquierda. Fase aguda, Signo de Romaña. Fotografía: WELLCOME, tomada de UNDP/World Bank/WHO, TDR (1991).

Derecha. Fase crónica: célula muscular de Miocardio humano con miofibrillas desplazadas lateralmente y ensanchamiento del espacio intermiofibrilar (x 2800). Fotografía tomada de Tafuri (1975).

Introduccion

Otras alteraciones clínicas de la enfermedad de Chagas crónica son las formas digestivas o megasíndromes (Koberle, 1968), y las alteraciones del sistema nervioso periférico (Sica y col., 1986; Losavio y col., 1989). La incidencia de las distintas manifestaciones varía considerablemente con la región geográfica considerada (Rezende, 1976).

Los hallazgos anatomopatológicos de las etapas aguda y crónica de la enfermedad de Chagas han sugerido que en la evolución de la misma podría estar involucrada la respuesta inmune del huésped. El escaso número de parásitos y el tipo de células halladas en los infiltrados de las lesiones crónicas, han llevado a proponer que la patología chagásica crónica se desencadena como consecuencia de un proceso autoinmune (Hudson, 1985).

Sin embargo, el origen del fenómeno autoinmune ha sido tema de debate. Por un lado, se ha propuesto que los parásitos causan un desequilibrio en la regulación del sistema inmune, promoviendo la expansión policlonal de linfocitos B, con la consiguiente hipergammaglobulinemia y aparición de autoanticuerpos (Said y col., 1985; D'Imperio Lima y col., 1986; Hontebeyrie-Joskowicz y col., 1987; Minoprio y col., 1988). Se ha planteado también que la infección crónica podría originar una desregulación del sistema de células T supresoras (Ramos y col., 1979; Reed y col., 1983). Otra interpretación adjudica el origen autoinmune del Chagas crónico al mimetismo molecular, que implica la existencia de determinantes antigénicos compartidos por el parásito y el hospedador (Sadigursky y col., 1982; Acosta y col., 1983; Petry y col., 1988; Van Voorhis y Eisen, 1989; Szarfman, y col., 1982; Levin y col., 1989; Levitus y col., 1991; Kerner y col., 1991; Petry y Van Voorhis, 1991).

La diversidad de los síndromes clínicos en la enfermedad de Chagas y de las respuestas inmunológicas ante la infección parasitaria han sido atribuidas a:

la influencia de factores del hospedador, a saber: la especie animal, su composición genética y su estado fisiológico. Una misma cepa de *T. cruzi* puede presentar varios grados de virulencia en diferentes especies de hospedadores (Trischmann y col., 1978; Wrightsman y col., 1982). Además una misma cepa puede provocar una enfermedad más severa al infectar un hospedador recién nacido o joven, que un adulto.

la cepa de *Trypanosoma cruzi*. La importancia de la cepa parasitaria en la afección chagásica, fue evaluada en experiencias con líneas consanguíneas de ratón. Animales genéticamente homogéneos presentaron perfiles inmuno-bio-patológicos diferentes, de acuerdo a la cepa con la cual fueron desafiados experimentalmente. Así, se caracterizaron, por ejemplo, las cepas de laboratorio Y y CL (Silva y Nussenzweig, 1953; Brener, 1969), consideradas cepas polares, en base a las siguientes características:

intensidad en la parasitemia: la cepa Y induce dos picos de parasitemia, a los cinco y siete días de la infección; mientras que la cepa CL induce un solo pico de parasitemia a los 10 días (Brener, 1977).

letalidad de la infección: la cepa Y provoca mortandad en ratones al décimo día post-infección, y la cepa CL presenta una tasa inferior de mortandad que ocurre recién a partir de los 15-20 días de la infección (Brener, 1977).

tropismo tisular: la cepa CL es **miotrópica** mientras que la cepa Y, como la cepa Tulahuén, son **macrofagotrópicas** (Melo y Brener, 1978).

I.2. *Trypanosoma cruzi*.

I.2.1. Ubicación sistemática.

El agente causal de la enfermedad de Chagas es el *Trypanosoma cruzi* cuya ubicación sistemática es la siguiente (Hoare, 1972; Levine col., 1980):

Reino: Protista
Phylum: Sarcomastigophora
Subphylum: Mastigophora
Clase: Zoomastigophorea
Orden: Kinetoplastida
Suborden: Trypanosomatina
Familia: Trypanosomatidae
Género: *Trypanosoma*
Subgénero: *Schizotrypanum*
Especie: *cruzi* (Chagas, 1909)

I.2.1.1 Características del Orden kinetoplástida.

El orden kinetoplastida comprende organismos que poseen una estructura mitocondrial particular, denominada **kinetoplasto**. Este consiste en una red de moléculas de ADN, formada por 5000 a 10000 minicírculos entrelazados y por unos 20 a 50 maxicírculos (revisión en Simpson, 1987). Los minicírculos de *T. cruzi*, de 1,4 kb, presentan una estructura peculiar, repetida cuatro veces, que consiste en regiones de secuencia variable alternadas con regiones de secuencia conservada, de 120 pb, denominadas minirepeticiones (Degraeve y col., 1988). Los minicírculos codifican ARN guías, involucrados en el proceso de edición de ARN (Sturm y Simpson, 1990, Stuart, 1991). Los maxicírculos son moléculas de 39 kb que corresponden al genoma mitocondrial

Introduccion

(Leon y col., 1980), en el cual se han identificado genes para proteínas de la cadena respiratoria y para ARN ribosomales mitocondriales (Simpson y col., 1987; Sloof y col., 1985; 1987).

La ruta glicolítica se encuentra compartimentalizada: la mayoría de las enzimas intervinientes están localizadas en organelas denominadas glicosomas, clasificadas como microcuerpos. Los glicosomas contienen, además, ciertas enzimas asociadas usualmente con los microcuerpos, como las que intervienen en la β -oxidación de ácidos grasos (Michels y Opperdoes, 1991).

Los kinetoplástidos cuentan con un mecanismo inusual de regulación de la expresión génica mitocondrial: la edición de los ARNm. Este mecanismo consiste en la inserción y/o delección de uridinas en sitios específicos de los transcriptos primarios mitocondriales (Benne y col., 1986; Feagin y col., 1987). Este mecanismo postranscripcional, ocurre en sentido 3' a 5' y requiere de la intervención de moléculas pequeñas de ARN (aprox. 60 b) denominadas ARN guías que son codificadas por maxicírculos y/o minicírculos, dependiendo de la especie de tripanosomátido (Stuart, 1991).

La existencia de familias de genes nucleares repetidos en tandem, que expresan transcriptos policistrónicos, luego procesados para formar ARNm maduros capaces de ser traducidos (Borst, 1986; Miller y Wirth, 1988).

El mecanismo de transcripción discontinua o **trans-splicing**, que comprende la adición de un miniexón en el extremo 5' de todos los transcriptos primarios nucleares. El miniexón presenta una secuencia de 39 bases, conservada entre los tripanosomátidos; es aportada por la región 5' de una molécula de ARN no poliadenilada, de 85-140 b según la especie (110 b en *T. cruzi*), denominada ARN dador del miniexón (*SL-RNA* o *med-RNA*), que se tran-

Introduccion

scribe en forma independiente a la de los genes que codifican proteínas (Campbell y col., 1984; Dorfman y Donelson, 1984; Borst, 1986).

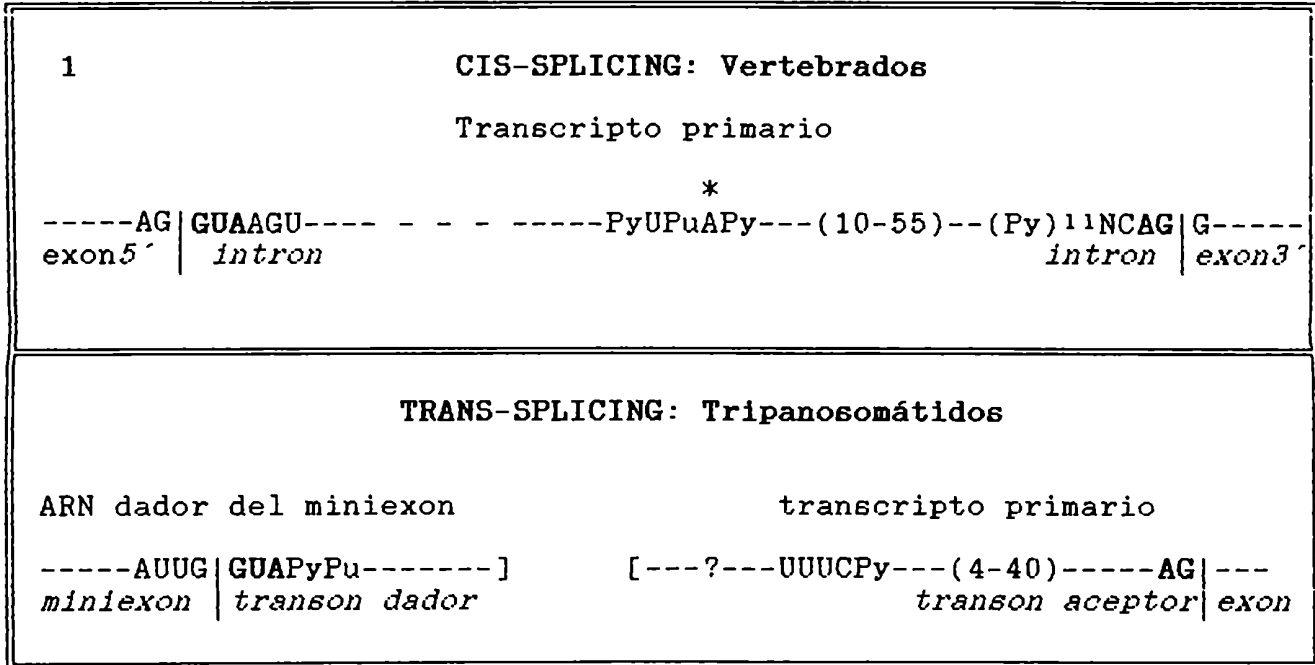
Además del *SL-RNA*, en el *trans-splicing* intervienen ARN pequeños nucleares (snRNAs) análogos a U2, U4, U5 y U6 de otros eucariontes (Mottram y col., 1989; Tsudi y Ullu, 1990). Sin embargo, no se ha detectado un *snRNA* análogo a U1, que reconoce el sitio 5' del intron en el mecanismo de *cis-splicing*.

El *SL-RNA* juega un rol dual en el *trans-splicing*: a) como ARN sustrato y b) como componente del complejo de ribonucleoproteínas; se ha propuesto que el *SL-RNA* activa autónomamente su propio sitio 5', tomando el rol del complejo U1-*snRNPs* en la reacción de *trans-splicing* (Bruzik y col., 1990).

En el mecanismo de *trans-splicing* los sitios 5' (GU) y 3' (AG) aceptores del miniexón son similares a los contenidos en los intrones en genes eucariontes (Figura I.3) (Laird, 1989); asimismo la estructura en forma de " Y ", que se forma por la unión 2'5' fosfodiéster entre los transones de ambas moléculas intervinientes, es análoga al *lariat* formado en el *cis-splicing* (Murphy y col., 1986).

Los genes del miniexón están codificados en copias múltiples por una secuencia de 0,4 kb a 1,35 kb, según la especie, que se encuentra organizada en *clusters* de al menos 20 copias en tandem (De Lange, 1983; 1984; Dorfman y Donelson, 1984); además se han detectado orfones (Nelson, 1983).

La mayoría de los genes estructurales posee múltiples sitios aceptores del miniexón a una distancia de 10 a 200 bases río arriba del codón de iniciación de la traducción. Estos se hallan en las regiones 5'flanqueantes de los genes y en las regiones intergénicas de transcriptos policistrónicos. El mecanismo de *trans-splicing* permitiría resolver los precursores policistrónicos en unidades monocistrónicas maduras (Muhich y Boothroyd, 1988; Van der Ploeg, 1986). Se ha propuesto además que removería las extensas regiones 5'flanqueantes de los genes de tripanosomátidos, en las cuales pueden existir otros codones de iniciación potenciales (Huang y Hirsh, 1989).



2

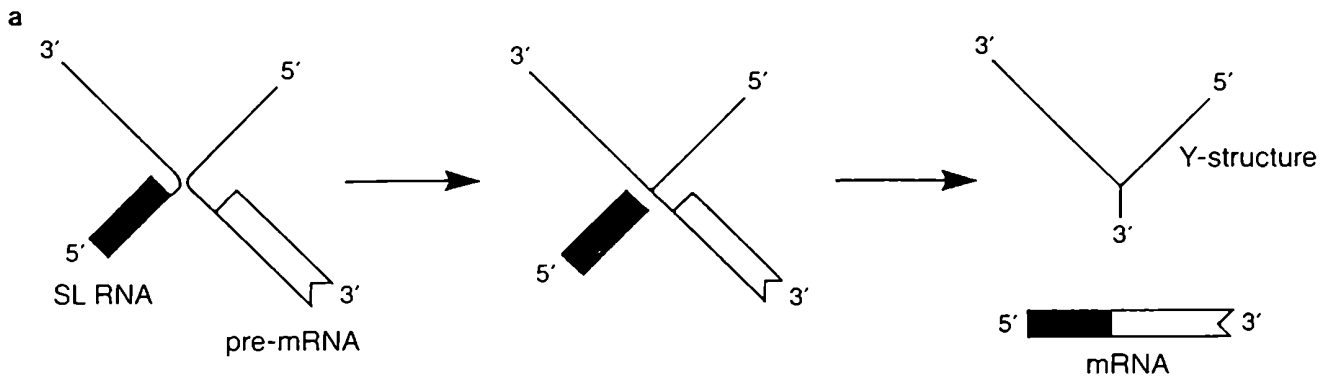


Figura I.3

1. Comparación de las señales consenso de *splicing* en vertebrados (cis) y tripanosomátidos (trans).
2. Ilustración del mecanismo de *trans-splicing*: el rectángulo negro indica la secuencia del miniexón, el rectángulo vacío indica la región codante del ARNm. Tomado de Donelson y Zeng (1990).

Introduccion

Los kinetoplástidos presentan estructuras de CAP inusuales, exclusivas del *SL-RNA* y de los *snRNAs*, que consisten en 7-monometilguanósinas que se ligan a las cuatro bases 5' modificadas de estos ARNs, denominadas estructuras de *CAP 4* (Petry y col., 1987; Freistadt y col., 1988). A partir de extractos nucleares de *T. cruzi* se ha caracterizado una actividad de guanidiltransferasa que copurifica con complejos de ribonucleoproteínas, y presenta características peculiares como su dependencia de ATP y su especificidad por las moléculas de *SL-RNA* y *snRNA* (Zwierzynski y Buck, 1991).

Mediante *trans-splicing*, el *SL-RNA* transfiere al precursor de ARNm el miniexón provisto del CAP; de esta manera, este mecanismo provee la estructura de CAP a todos los transcriptos que codifican proteínas o *trans-capping*, lo cual podría tener incidencia en su traducción y/o estabilidad (Lenardo y col., 1985; Donelson y Zang, 1990).

I.2.1.2. Características del Género *Trypanosoma*.

El género *Trypanosoma* comprende parásitos digenéticos (I.2.2.1.1.) que presentan en su ciclo de vida la forma tripomastigote. Este género incluye dos grupos:

Grupo Salivaria: constituido por un conjunto de especies patógenas, que se multiplican en el hospedador mamífero como tripomastigotes, completan su desarrollo en la glándula salival del vector, y son transmitidos por inoculación, con las secreciones salivares (ej: *T. brucei*).

Grupo Estercoraria: constituido por un conjunto de especies no patógenas (con excepción de *T. cruzi*), que se multiplican en el mamífero como amastigotes o epimastigotes, completan su desarrollo en el intestino del vector y son transmitidos por contaminación, con las heces (Hoare, 1972).

I.2.2. Características de *Trypanosoma cruzi*.

I.2.2.1. Formas del desarrollo de *T. cruzi*.

Trypanosoma cruzi presenta 3 estadios, distinguibles según las características del flagelo y la posición relativa del kinetoplasto respecto al núcleo celular (Brenner, 1973) (Fig I.4).

Epimastigote :

Es la forma flagelada replicativa en el intestino medio del insecto vector. El flagelo emerge de la región lateral anterior respecto a la dirección del movimiento del organismo y el kinetoplasto es anterior al núcleo celular.

Tripomastigote:

Es la forma flagelada no replicativa dentro de ambos hospedadores. El flagelo emerge del extremo apical posterior y el kinetoplasto es posterior al núcleo celular. Se denominan tripomastigotes sanguíneos a las formas circulantes en el mamífero, y tripomastigotes metacíclicos a las formas diferenciadas en el insecto, que son las formas infectivas.

Los tripomastigotes sanguíneos pueden infectar macrófagos, por un evento fagocítico (Zingales y col., 1985) y otros tipos celulares, por un evento dirigido por el parásito y mediado por receptores (Ortega-Barria y col., 1991; Schenckman, 1991).

Amastigote:

Es la forma no flagelada, de localización intracelular en vacuolas ácidas (Ulisses de Carvalho y col., 1989) y replicativa en el citoplasma hospedador (Ley y col., 1990).

I.2.2.2. Hospedadores.

El ciclo de vida de *T. cruzi* involucra el desarrollo en dos tipos de hospedadores:

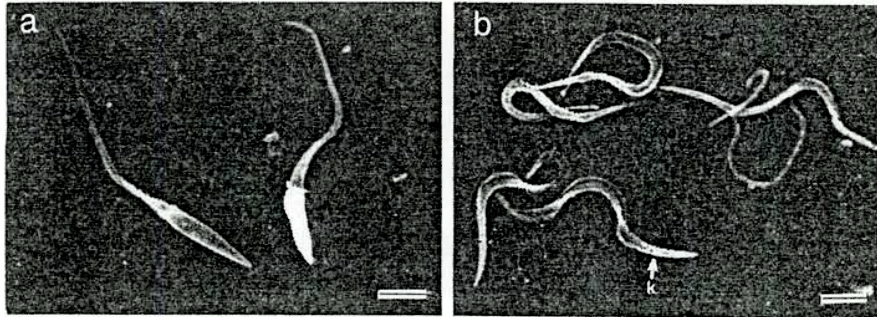
hospedador vertebrado: más de cien especies de mamíferos, incluyendo el hombre, animales domésticos y reservorios silvestres pertenecientes a los órdenes Marsupialia, Edentata, Rodentia, Carnivora, Lagomorpha, Artiodactyla, Chiroptera y Primata (Brener, 1979).

hospedador invertebrado: más de ochenta especies de insectos pertenecientes a la familia Reduviidae, subfamilia Triatominae. Los géneros *Panstrongylus*, *Triatoma* y *Rhodnius* son los más frecuentes (Figura I.4). Dado que los triatominos suelen picar en el rostro, se los ha denominado "barberos": "On trouve ces insectes en quantité très grande dans les mauvaises petites maisons habitées par la population pauvre. Ils se logent dans les fissures des parois ou les creux obscurs et ne sortent que la nuit. Ils piquent plus volontiers l'homme et attaquent spécialement au visage, habitude qui les a fait désigner sous le nom de barbiers. Leur piqûre est très douloureuse, leur voracité très grande, aussi deviennent-ils un véritable fléau pour les habitants qui ne jouissent plus que d'un sommeil troublé." (Chagas, 1909a).

En nuestro país el principal es *Triatoma infestans*, del idioma quechua surge su denominación popular de "vinchucaca" (Mazza, 1943).

1.

Samuel Goldenberg



Wanderley de Souza

2

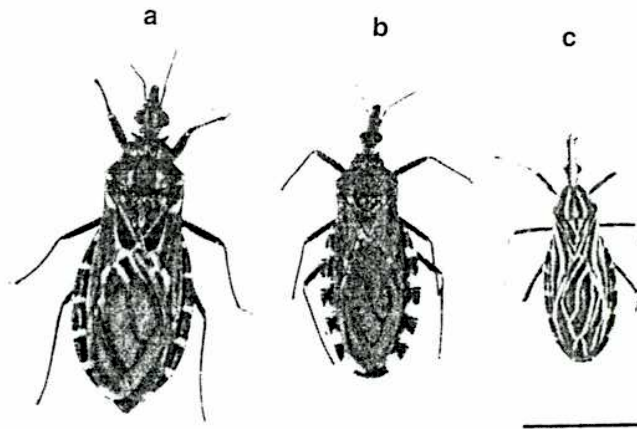


Figura I.4

1. Formas del desarrollo de *T. cruzi*: a) Epimastigotes, b) tripomastigotes, en los cuales se identifica el kinetoplasto en la región posterior del parásito. Barra en escala = 2 μ m. Microscopía electrónica de barrido tomada de García y Azambuja, (1991).
2. Vectores de *T. cruzi*: a) *Pastronylus megistus*, b) *Triatoma infestans*, c) *Rhodnius prolixus*. Barra en escala = 1 cm. Fotografía tomada de García y Azambuja (1991).

I.2.2.3. Cepas de *Trypanosoma cruzi*.

Se ha descrito que las poblaciones naturales de *T. cruzi* presentan una composición heterogénea, en base a diferentes estudios, como por ejemplo:

estudios de patogenicidad en ratones (Postan y col., 1983).
análisis de la tasa de crecimiento y de la metaciclologénesis en una misma especie de vector (revisión en García y Azambuja, 1991).

determinación del tamaño celular (Engel y col., 1982).

cuantificación del ADN nuclear (Dvorak y col., 1982).

caracterización de perfiles electroforéticos de antígenos de superficie (Kirchhoff y col., 1984).

Caracterización de perfiles izoenzimáticos: **Zimodemas** (Tibayrenc y col., 1986).

"Fingerprinting" de minicírculos: **Ezquizodemas** (Morel y col., 1980; Frasch y col., 1981)

RFLP genómicos revelados por sondas de secuencias clonadas (Henriksson y col., 1990; Dietrich y col., 1990).

Análisis de electrocariotipo por PFGE (Gibson y Miles, 1986; Engman y col., 1987; Aymerich y Goldenberg, 1989; Henriksson y col., 1990).

I.2.2.4. Estructura genética de las poblaciones de *T. cruzi*.

Los estudios de zimodemas y ezquizodemas en *T. cruzi* evidenciaron perfiles heterocigotas típicos para una proporción de los loci analizados, sugiriendo que es un organismo diploide (Tibayrenc y col., 1986). El carácter diploide fue confirmado por estudios de cariotipo molecular determinados por la metodología de electroforesis en campos eléctricos pulsados (PFGE) (Schartz y Cantor, 1984), complementados con la localización cromosómica de secuencias de genes clonados, por Southern blot (Aymerich y Goldenberg, 1989; Henriksson y col., 1990).

Además las determinaciones del cariotipo molecular de diferentes cepas, evidenciaron variabilidad en la ubicación cromosómica de los genes analizados. Aún no ha podido determinarse el complemento cromosómico exacto de *T. cruzi*, pero existen al menos 16 a 22 cromosomas diferenciables, que abarcan tamaños de 550 a 1500 kb (Gibson y Miles, 1986; Engman y col., 1987; Aymerich y Goldenberg, 1989; Henriksson y col., 1990). La existencia de minicromosomas en *T. cruzi* (50 kb a 200 kb) no sería un fenómeno generalizado en las poblaciones naturales, como ocurre en *T. brucei* (Van der Ploeg y col., 1984a,b). Estos fueron detectados en casos excepcionales (Engman y col., 1987; Aymerich y Goldenberg, 1989).

Se han presentado evidencias sobre la existencia de ADN extracromosómico (LED) en *T. cruzi*. Se trata de una molécula de ADN circular de 75 kb presente en varias cepas del parásito, en la cual se han identificado secuencias de ARN ribosomal y de minixón, y repeticiones múltiples de una secuencia de 196 pb (Wagner y col., 1991).

La recombinación sexual en *T. cruzi* no ha sido detectada, en contraste con lo observado en *T. brucei* durante su estadio en el insecto vector (Jenni y col., 1986).

En base a una serie de estudios de genética poblacional, Tybayrenc (1986) ha propuesto que las poblaciones naturales de *T. cruzi* presentan una *estructura clonal*. Estos análisis se basaron en dos tipos de criterios:

Criterios de Segregación:

Algunos zimodemas muestran heterocigosis fija para varios loci, a través de las generaciones parasitarias, lo que es incompatible con una segregación mendeliana, siendo indicativo de un mecanismo de reproducción clonal.

No fueron detectados varios de los genotipos segregantes probables por combinación de los alelos presentes en la población parasitaria, aún cuando los genotipos parenta-

Introducción

los correspondientes coexisten en un mismo insecto vector u hospedador mamífero. La proporción de estos alelos en la población se aparta del equilibrio de Hardy-Weinberg (Tibayrenc y Ayala, 1991).

Criterios de recombinación:

Existen genotipos idénticos, ampliamente distribuidos e hiper representados en poblaciones de regiones geográficas alejadas, como por ejemplo el clonet* 39 detectado en Chile, Bolivia y Sudeste del Brasil, que es heterocigota en 3 de 15 loci analizados.

No se detectan genotipos recombinantes.

Los genotipos descritos están asociados a un desequilibrio de ligamiento génico, con un valor mayor al observado en especies que se reproducen por autofecundación.

Existe correlación entre sets independientes de marcadores genéticos (Tibayrenc y Ayala, 1991).

* Clonet es un término propuesto por Tibayrenc y Ayala (1991) para denominar, en una especie con reproducción clonal, a un grupo de poblaciones aisladas que aparentan ser genéticamente idénticas, en base a una serie particular de marcadores genéticos, lo cual no significa que pertenezcan a un mismo clon.

I.2.2.5. Clonado de genes de *T. cruzi*.

La necesidad de implementar estrategias de vacunación, de diagnóstico y tratamiento de la enfermedad de Chagas, y el surgimiento de la metodología del ADN recombinante, impulsaron a varios grupos de investigación a clonar antígenos de *T. cruzi* (revisión en Frasch y col., 1991), secuencias de ADN repetitivas y específicas (Gonzalez y col., 1984; Wincker y col., 1990; Moser y

Introduccion

col., 1989; Avila y col., 1991; Requena y col., 1992); o enzimas características (Michels y Oppendoes, 1991; North y col., 1990; Campetella y col., 1992).

Varios antígenos de *T.cruzi* han sido clonados a partir de bibliotecas de expresión genómicas o de ADNc del parásito, por rastreo con sueros humanos o de animales infectados, o bien con anticuerpos poli, o monoclonales. En diferentes laboratorios se clonaron porciones correspondientes a antígenos equivalentes. Varios de estos antígenos presentaron secuencias repetidas en tandem, conservadas en distintas cepas y stocks parasitarios, y por ende candidatos potenciales para el diagnóstico de la infección por *T.cruzi*.

Algunos de los antígenos mencionados fueron evaluados como reactivos de diagnóstico serológico en dos estudios multicéntricos:

Organizado por el " WHO Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases en el cual se analizó un panel de 50 sueros (Moncayo y Luquetti, 1990).

Organizado por el proyecto Iberoamericano de Biotecnología EN el cual se analizó un panel de 236 sueros (Levin y col., 1991).

En ambos casos, los antígenos Ag1/JL7/H49, Ag2 y A13 (Ibañez y col., 1988; Paranhos y col., 1990) resultaron ser excelentes marcadores de infección chagásica crónica (índice Kappa > 0,80), (Levin y col., 1991).

Los antígenos identificados presentaron localizaciones celulares diferentes (revisión en Frasch y col., 1991) (Tabla I.T-1):

Proteínas intracelulares	
Hsp 70	repeticiones de 4 aa, choque térmico.
JL8/CRA/Ag 30/TCR27	(160- 225 kDa) repeticiones de 14 aa.
Cruzipaína	cisteín proteasa lisosomal.
JL9/ Ag 36	repeticiones de 38 residuos, homólogo a la proteína asociada a microtúbulos de <i>T.brucei</i>
JL5	proteína ribosomal P (Int. Cap 4).
Proteínas flagelares	
JL7/FRA/Ag1	(170-300 kDa) repeticiones de 68 aa.
FCaBP	(24 kDa) asociada a Ca ⁺⁺ , función motora.
FCH-F8-4	antígeno protectorio.
Antígenos de superficie	
Flia de Antígenos de 85 kDa	integración y penetración de tripomastigotes a células huesped.
SAPA	actividades transialidasa y neuraminidasa. diagnóstico de infección temprana

Tabla I.T-1

Antígenos clonados de *T.cruzi*: Localización celular y comentarios.

I.2.2.6 Organización de genes de *T.cruzi*.

La mayoría de los genes caracterizados en *T.cruzi* están organizados en familias multigénicas, constituidas por copias duplicadas en tandem (ver Tabla IT-2); hasta el momento se ha descrito un solo gen nuclear de copia única (Gonzalez y col., 1990).

Identidad	Organización Genómica	Referencia Bibliográfica
Ubiquitina	cluster de 100 copias en 27 kb genes de poliubiquitina (PUB) + gen fusión ubi-cola de 52 aa C-terminales no ubi.	Kirchhoff y col., 1988. Swindle y col., 1988.
GP85	familia multigénica compleja constituida por subpoblaciones génicas relacionadas, algunas copias dispersas en el genoma, otras en telómeros	Affranquino y col., 1989 Peterson y col., 1990. Takle y Cross, 1991. Kahn y col., 1990. Pereira y col., 1991.
Hsp 70	7-10 copias en tandem agrupa- das en un único locus	Requena y col., 1988. Engman y col., 1989.
Hsp70 mt	2 copias en tandem	Engman y col., 1989a.
Hsp 85	6-10 copias en tandem	Dragon y col., 1987.
IF8	aprox. 30 copias	Gonzalez y col., 1985.
Cruzipaina	copias en tandem 2-4 cromosomas	Aslund y col., 1991. Campetella y col., 1992.
GAPDH glicosomal	dos copias en tandem en cromosoma de 0,85 Mb	Kendall y col., 1990.
KAP	Proteína asociada a cineto- plastos; copia única	Gonzalez y col., 1990.
miniexón	Unidades de 1,35 kp en tandem 200 copias en pocos cromosomas	De Lange y col., 1984.
ARNr	aprox.100 copias, unidades con regiones codantes de ARN 18S, ARNr α y β , y ARNs S1, S2, S3 S4 y S6	Castro y col., 1981. White y col., 1986. Spence y col., 1987. Hernandez y col., 1988.
CZAR	Retrotransposon; 20-30 copias insertas en genes del miniexón con ORF1 y ORF2, homólogas a GAG y POL retrovirales.	Villanueva y col., 1992
RLE	Elemento tipo retrotransposon 317 pb; poliadenilado, inserto en región intergénica de ORFs de GAPDHg, en dirección opuesta	Kendall y col, 1990.

Tabla I.T-2

I.3. PROTEINAS RIBOSOMALES P.

I.3.1. Aspectos estructurales, funcionales y evolutivos.

La subunidad mayor del ribosoma contiene una estructura en forma de cresta que sobresale del cuerpo de la subunidad, conocida como pedúnculo ribosomal (*stalk*), conservada universalmente. El pedúnculo ribosomal está involucrado en la unión de los factores de la traducción, dependientes de la hidrólisis de GTP, durante la biosíntesis de proteínas (Liljas, A, 1982).

Esta estructura está formada por proteínas pequeñas que presentan características inusuales: están presentes en copias múltiples en el ribosoma y son acídicas, en contraste con la mayoría de las proteínas ribosomales, de copia única y básicas. Estas proteínas denominadas proteínas A (acídicas), comparten una composición aminoacídica excepcional, con aproximadamente 20% de alaninas, pocos residuos aromáticos, sólo una o dos argininas y generalmente sin cisteínas.

El componente más estudiado de este grupo de proteínas ribosomales es la proteína acídica L7/L12 (12.178 Da) de *Escherichia coli* (Terhorst y col., 1973). L7 es la forma de la proteína L12, acetilada en la serina aminoterminal. L7/L12 está presente en el ribosoma en cuatro copias: dos dímeros L7/L12, que interactúan con la proteína ribosomal L10 (17.736 Da), localizada en la base de la estructura peduncular de la subunidad 50 S. L10 interactúa además con el ARNr 23S y con la proteína L11 (Egebjerg y col., 1990). L7/L12 se une a los factores de la traducción (Weissbach, 1980; Tate y col., 1990).

Las archaeobacteria poseen proteínas con funciones análogas a L7/L12 y L10 de eubacteria, denominadas L12e y L10e respectivamente (Itoh, T y col., 1988; Matheson y col., 1988, Shimmin y Dennis, 1989).

Introduccion

En contraste con eubacteria y archaeobacteria, que poseen un único tipo de proteína ácida L7/L12, las células eucariotes tienen dos proteínas ácidas distintas, denominadas L12eI y L12eII (Newton y col., 1990), además de la proteína equivalente a L10, L10e. Dado que en algunos organismos eucariotes estas proteínas se encuentran fosforiladas, se las conoce como **proteínas P**: siendo P1 y P2 las equivalentes a L12eII y L12eI respectivamente, y P0 la equivalente a L10e (Rich y Steitz, 1987). Su organización en el ribosoma eucariote es similar: dos dímeros P1 y dos dímeros P2 forman un complejo pentamérico con la proteína P0 (Uchiumi y col., 1987).

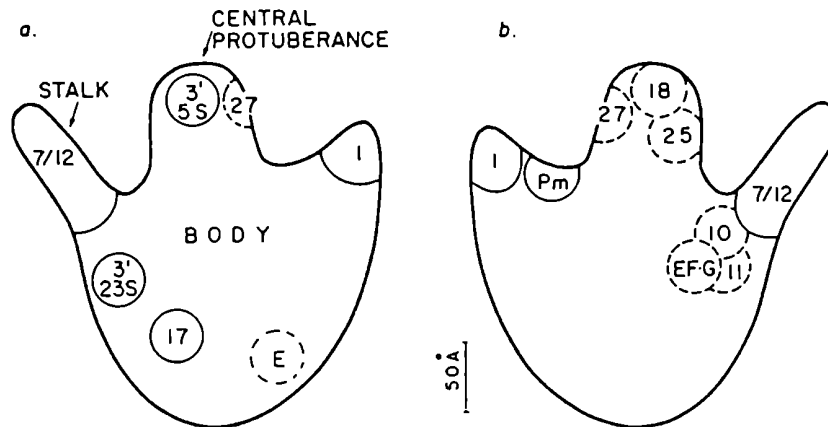


Figura I.5:

Ubicación de la familia de proteínas ribosomales ácidas de *E. coli* en la subunidad ribosomal mayor.
Izquierda: Vista externa. Derecha: Vista interna. Los círculos indican las posiciones de las proteínas y del ARNr en proyección bidimensional de cada superficie de la subunidad.
E: sitio de salida del polipéptido naciente. Tomado de Noller y Nomura (1987).

I.3.2. Estructura de las proteínas ribosomales P.

I.3.2.1. Proteínas acídicas L7/L12.

La estructura de las proteínas L12e de archaeobacteria y P1/P2 de eucariontes es similar, las secuencias aminoacídicas pueden ser alineadas.

La estructura de estas proteínas es conocida: la región globular abarca las porciones aminoterminal y central. A ésta le siguen una región hidrofóbica rica en alaninas y prolinas, con estructura de bisagra, una región rica en aminoácidos cargados, en su mayoría acídicos, y un extremo C-terminal constituido por el heptapéptido [M G F G L F D] que se halla conservado en las proteínas ribosomales P de organismos eucariontes.

Las proteínas P1 y P2 divergen en la región globular, P2 es la equivalente en eucariontes a la L12e de archaeobacteria; en cambio, la proteína P1 es exclusiva de eucariontes. Para análisis filogenéticos se considera la región globular de estas proteínas, debido al alto grado de variabilidad de la secuencia de la bisagra y el alto grado de conservación del dominio C-terminal (Newton y col., 1990).

Las proteínas de tipo P2 o L12e presentan una lisina en segunda posición, y un residuo básico, usualmente arginina en la región globular.

Las proteínas de tipo P1 presentan, al alinearse con las secuencias de las de tipo P2 o L12e, una extensión en la región aminoterminal; generalmente poseen una serina en segunda o tercera posición, y un residuo triptofano conservado en la región globular. En cambio, las P2 no presentan triptofanos.

Las proteínas L7/L12 de eubacteria y cloroplastos (Otaka y col., 1985) también poseen sus dominio N-terminal y C-terminal separados por una bisagra. Sin embargo, es difícil hallar un alineamiento con las secuencias análogas en archaeobacteria y

Introduccion

eucariontes; solo se observa homología significativa si se alinean la región N-terminal de L7/L12 con la C-terminal de los representantes de archaeobacteria y eucariontes. Los rearrreglos en la estructura de L7/L12 de eubacteria y cloroplastos se han interpretado como la consecuencia de un evento de translocación dentro del gen, que debió haber ocurrido en un estadio temprano de la evolución en el linaje de las eubacterias (Ramirez, C., 1989; Shimmin y col., 1989).

La región bisagra es probablemente la responsable de conferir los cambios conformacionales detectados en L12 durante la elongación, particularmente la posibilidad de rotación del dominio C-terminal (Bushuev y col., 1989). Este movimiento podría estar implicado en la interacción de L12 con los factores de elongación EF-G y EF-Tu (Gudkov y Bubanencko, 1989).

Desde el punto de vista evolutivo, las propiedades flexibles de la bisagra, el caracter ácido, y la presencia de copias múltiples de L12 en el ribosoma, confieren al sistema ribosomal [L12 - factores de elongación - actividad GTPasa] una cierta semejanza con los sistemas contráctiles [miosina-actina-actividad ATPasa](Moller, 1991).

I.3.2.2. Proteína L10.

Las proteínas L10e de archaeobacteria y P0 eucarionte también son alineables. Ambas presentan una región globular, una región rica en alaninas y prolinas y un dominio C-terminal altamente cargado. La región globular presenta secuencias modulares de 26 aminoácidos de estructura secundaria similar; existen 3 módulos en archaeobacteria y dos en eucariontes (Figura I.6).

Introduccion

La proteína L10 de eubacteria es más corta, presenta una deleción interna (117 residuos en *E.coli*) quedando en la región globular un módulo completo más uno truncado; las regiones de la bisagra y C-terminal también se hallan truncadas.

Rich y Steitz (1987) observaron por primera vez que las proteínas P0 y las dos proteínas acídicas P1 y P2 humanas exhibían un alto nivel de homología en sus regiones carboxi-terminales: en particular la porción que abarca un módulo de la región globular, la bisagra, la región acídica y el extremo carboxiterminal. En algunas especies de archaeobacteria, la similitud de secuencia entre L10e y L12e se extiende unos 70 aminoácidos desde los extremos carboxiterminales hacia el centro de las proteínas (Shimmin y col., 1989). Esto sugirió que los genes que codifican las proteínas L10e y L12e de eucariontes y archaeobacteria se constituyeron en parte, a partir de una secuencia primordial común. De estas comparaciones estructurales se ha interpretado que la proteína L10e/P0 pudo haberse originado a partir de la fusión entre la tercera parte de una copia extra de L12e/P1/P2 y la región aminoterminal de otro gen, con la consiguiente duplicación de la secuencia modular proveniente de la porción de L12e, de dicha fusión génica (Ramirez y col., 1989).

En eubacteria, la similitud de secuencia entre L10 y L12 no es detectable debido al rearreglo estructural de L12 y a que los dominios de la bisagra y C-terminales de L10 están truncados.

El esquema de las estructuras de las proteínas L10e y L12e en los tres reinos se ilustra en la Figura I.6.

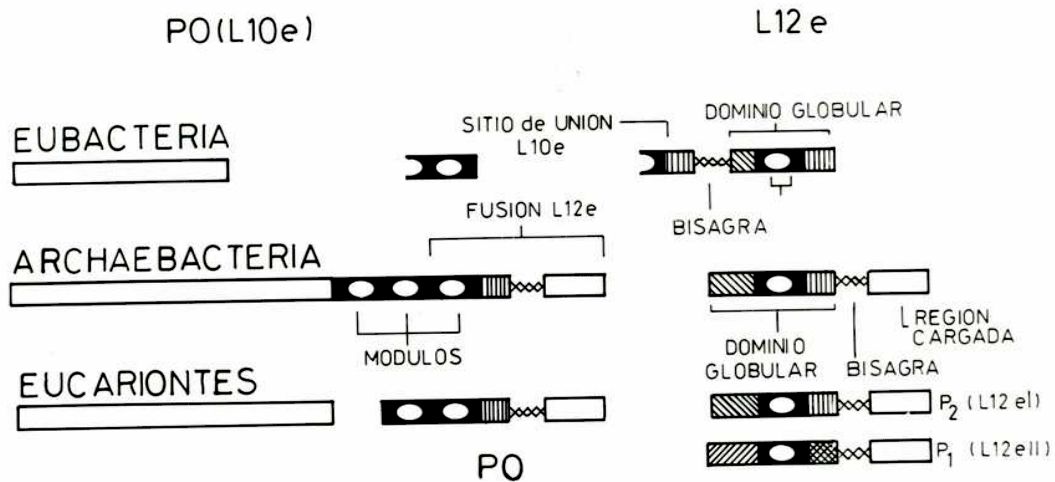


Figura I.6

Esquema de la estructura de las proteínas ribosomales ácidas (P) de eubacteria, archaeobacteria y eucariotes. Las proteínas L12e de archaeobacteria y eucariotes están compuestas por una región globular, una bisagra y un dominio carboxiterminal cargado. Las proteínas L10e de archaeobacteria y de eucariotes contienen una fusión del 75% de una copia de la proteína L12e/P2 y una triplicación o duplicación de una secuencia modular de 26 residuos presente en la porción L12e de la fusión. En eucariotes existe un segundo tipo de proteínas L12e: P1 que difiere de P2 en la región globular P1. La proteína L12 procarionte retiene la región globular con el módulo interno, pero la bisagra está translocada hacia el extremo aminoterminal de la región globular. Tomado de Ramirez y col. (1989).

I.3.3. Incorporación a ribosomas y fosforilación.

Las proteínas P están fosforiladas en el ribosoma eucarionte (Amons y col., 1979, 1982; Zinker y Warner, 1976).

El blanco de la fosforilación en las proteínas ribosomales P es una serina ubicada en un entorno ácido de reconocimiento para casein kinasas (Chan, P y col., 1989). En *A.salina* se identificó la serina fosforilable (aa 98) ubicada en el dominio C-terminal rico en aminoácidos ácidos EESEEEEDDD (Amons y col., 1979; 1982). Esta serina se encuentra conservada en las proteínas P de vertebrados, que presentan en esa región una serina adicional EESEESDDDD. En levaduras el dominio C-terminal ácido E/K/AEESDD/ED posee la serina presente en vertebrados y ausente en *Artemia*; sin embargo, la fosforilación no ocurre en este residuo, sino en una serina de la porción globular (aac 19): Sc P2 β AAPSAAD (Naranda y Ballesta, 1991).

Además de los complejos de proteínas P en ribosomas se han detectado complejos P citosólicos (140 kDa)(Elkon y col., 1986). Estos complejos citoplasmáticos presentan menor grado de fosforilación que los complejos incorporados a ribosomas. La fosforilación parece aumentar la actividad de las proteínas ácidas (Mac Connell y Kaplan, 1982) y su afinidad por los ribosomas (Sanchez-Madrid y col., 1981). A partir de estos hallazgos se ha propuesto que la fosforilación podría desencadenar la integración de estas proteínas al ribosoma.

Si bien la fosforilación ha sido descrita en varios organismos como *A.salina*, *S. cerevisiae*, *R.norvegicus* y *H.sapiens*, no sería un fenómeno universal dentro de los eucariontes, ya que se ha demostrado que las proteínas homólogas del protozoo *Tetrahymena piriformis* no se fosforilan *in vivo* (Sandermann y col., 1979). En *Tetrahymena* la región C-terminal ácida no presenta serinas, pero se conserva la serina de la porción globular, equivalente a la fosforilable en las proteínas P de levaduras (Hansen y col., 1991).

I.3.4. Organización genómica de las proteínas ribosomales P.

En *E.coli*, la proteína L7/L12 es expresada por el gen *rpLL* (Terhorst y col., 1973). Mutaciones en el gen *rpLL* están asociadas a errores de incorporación de aminoácidos durante la síntesis de polipéptidos, indicando que estas proteínas están implicadas en el control de la fidelidad traduccional (Kirshom y col., 1985).

El locus *rpLL* forma parte del operón *rif* de eubacterias que contiene los cistrones para las proteínas ribosomales L11, L1, L10 y L12, incluyendo hacia el extremo 3' los genes para las subunidades β y β' de la ARN polimerasa (Post y col., 1979).

En archaeobacteria los genes de la familia de proteínas ribosomales P están organizados de manera similar a eubacteria, sin embargo el operón no contiene los genes de la ARN polimerasa (Shimmin y col., 1989; 1989a).

En eucariontes los genes para proteínas ribosomales P se encuentran en loci independientes. Algunos de los genes de la familia de proteínas ribosomales P de *T.thermophila*, *S.cerevisiae* y *Sc. pombe* presentan intrones (Newton y col., 1990; Hansen y col., 1991).

Los organismos multicelulares desde *A.salina* hasta *H. sapiens* presentan loci únicos para las proteínas P1 y P2. En cambio, *Saccharomyces cerevisiae* y *Schizosaccharomyces pombe* presentan cuatro genes para las proteínas ribosomales acídicas. En base a la traducción de las secuencias de las regiones globulares, dos de estos genes se clasifican dentro de la clase P1: P1 α y P1 β (o L12eIIa y b, resp.), y los otros dos en la clase P2: P2 α y P2 β (o L12eIa y b, resp.). En *S.cerevisiae* las regiones globulares de las proteínas de tipo P1 presentan un 52% de homología entre sí y las de tipo P2 un 56 % de homología entre sí; las de tipo P1 comparten con las de tipo P2 alrededor de un 20% de homología (Newton y col., 1990).

I.4. ANTECEDENTES DEL TRABAJO DE TESIS.

I.4.1 Introducción.

Dada la incidencia de la cardiopatía chagásica en nuestro país el laboratorio se interesó en la caracterización de los blancos moleculares de la respuesta inmunológica en los pacientes chagásicos con miocardiopatía chagásica.

En colaboración con el equipo de cardiólogos del hospital Ramos Mejía (dir: Dr M.Rosembaum), se elaboró el proyecto de utilizar péptidos clonados de *T.cruzi*, con el objetivo de detectar diferencias serológicas entre pacientes chagásicos con diferentes cuadros clínicos. En el caso de existir péptidos reconocidos diferencialmente por individuos chagásicos crónicos con y sin cardiopatía, el rastreo serológico diferencial podría servir de base para el desarrollo de un método de pronóstico y/o diagnóstico de la cardiopatía chagásica.

Asimismo, los anticuerpos contra estos péptidos podrían ser herramientas valiosas para la investigación del proceso inmuno-patogénico de la cardiopatía.

De acuerdo con estos objetivos, se construyó una biblioteca de expresión de ADNc de epimastigotes de *T.cruzi* (cepa Tul 2) en el bacteriófago λ gt11 (Levin y col., 1989; Mesri, Tesis doctoral, 1990). Inicialmente, esta biblioteca se rastreó con suero de un paciente chagásico (JL) que sufría una cardiopatía crónica en fase terminal.

Dos de los clones aislados, denominados JL5 y JL52, reaccionaron predominantemente con una batería de sueros de pacientes con cardiopatía crónica, y débilmente con sueros de individuos infectados sin evidencias clínicas de cardiopatía (Levin y col., 1989; Mesri, E. Tesis Doctoral, 1990).

Introduccion

La técnica de selección de anticuerpos anti-JL5 y anti-JL52 a partir de suero de paciente, permitió deducir que estos antígenos podrían ser porciones de una proteína de 38 kDa presente en extractos totales de los tres estadios de *T. cruzi* (Levin y col., 1989). Además, anticuerpos anti-JL5 presentaron una débil reacción cruzada con la proteína de fusión β -galactosidasa-JL52 (Levitus, Tesis Doctoral, 1991).

El ADNc JL5 fue subclonado en M13mp18/EcoR1 y secuenciado. La secuencia, que se presenta en la Figura I.7, permitió identificar la porción 3' de un ARNm poliadenilado, con un marco de lectura abierto de 35 residuos en fase con el de la β -galactosidasa. El péptido recombinante correspondía a la porción carboxiterminal de una proteína parasitaria. La comparación de la secuencia aminoacídica de JL5 en el banco de datos del Instituto Pasteur (París) indicó que presentaba alta homología con las porciones carboxiterminales de las proteínas ribosomales P de organismos eucariotes (CAP 3, Introducción) (Figura I.7)

El ADNc del fago JL52 no pudo ser subclonado en M13 mp18/EcoR1; el ADN del fago recombinante digerido con EcoR1 generaba los dos brazos del vector sin liberar el inserto, sugiriendo que se había perdido uno de los sitios EcoR1 en el proceso de clonado (Mesri, tesis doctoral, 1990).

I.4.2. Respuesta autoinmune frente a proteínas ribosomales P en la cardiopatía chagásica crónica.

Las proteínas P humanas fueron definidas como autoantígenos en Lupus eritematoso sistémico (LES) (Elkon y col., 1985; Francoeur y col., 1985). El 12% de pacientes con LES, que incluye una subpoblación con manifestaciones de psicosis, compromiso muscular y cardíaco, presenta autoanticuerpos anti-P (Bonfa y Elkon, 1986). Los sueros de pacientes lúpicos anti-P positivos recono-

Introduccion

cieron proteínas ribosomales P de otros organismos eucariontes, desde *Plasmodium falciparum* hasta el hombre, pero no reaccionaron con la proteína L7/L12 de *E.coli* (Elkon y col., 1986).

La reactividad anti-P de estos sueros estaba dirigida hacia un epítopo constituido por los 11 residuos carboxiterminales de las proteínas P (Elkon y col., 1988).

La identificación de la secuencia del ADNc JL5 de *T.cruzi* confirmó la conservación del autoepítopo lúpico (Figura I.7).

La naturaleza autorreactiva de los anticuerpos dirigidos hacia la región C-terminal de la proteína P de *T.cruzi*, fue demostrada en experiencias de Western blot con extractos de ribosomas humanos y de proteínas de fusión β -galactosidasa-proteínas ribosomales P1 y P2 humanas (Levitus y col., 1991).

El péptido sintético R-13 constituido por los 13 residuos carboxiterminales de JL5, permitió delimitar la especificidad compartida por los anticuerpos anti-JL5 de sueros chagásicos y por los anti-P de sueros lúpicos (Mesri y col., 1990; Levitus y col., 1991).

El perfil de isotipos de inmunoglobulinas anti-R13, de sueros chagásicos crónicos, coincidió con el perfil de anticuerpos anti-*T.cruzi*; y fue distinto a la distribución isotípica anti-R13 de los sueros lúpicos (Levitus y col., 1991). Estas experiencias sugirieron que en la cardiopatía chagásica crónica, los autoanticuerpos anti-R13 se originarían por un mecanismo de mimetismo molecular (Damian, 1989) y no por un mecanismo de activación policlonal de linfocitos B (D'Imperio Lima y col., 1986).

1

```

1 GAATTC↓CCCGCTTCTGCACCCACTGCCGCTGCCGCCGCTCTGGTGGTSCCGCCGCGCTGCTGCAGCTGCGGAAGAGGAGGAGGACGATGACATGGGATTGGT
E F P A S A P T A A A A A S G G A A A P A A A A E E E E D D D M G F G
106 CTTTGTGACTAAAGACAAATGCTTATTTTATTTTATTTTGGATTTTGTTCGTGTGTGCCATGAAGAGCGCTAAAAAAAAAAAAAAAAAAGSAATTC
L F D *
    
```

2

A.

```

JL5      ASAPTAAAAASGGAAAPAAAA.....EEEEDDDMGFGLFD
YPA1     +G*S++P*++*++*+G+D**...EEKEEEEAK**S*****
ASRP12'  +GVGA*P**+G+***TE*P**KEEKKEEKKEES****+*****
ASRP12   PT+GAP****G*+*****E*KEAKKEEKKEES****+*****
RLRP2    P++GAV*V++P*****+APAAEE.KEES**KK*+*****
P2       V+VSA+P+++P+***+AP***.EKKKDEKKEES**S*****
P1       *P*AG**P*+GP+P+TA**V*EKKVEAKKEES**S*****
P0       V+*APV***T+++P**A**P*...KVEAKEES**S+*****
    
```

B.

```

eL12/12'  A. salina      E E E D E D M G F G L F D
P1/P2     H. sapiens    E E S D D D M G F G L F D
P0        H. sapiens    E E S D E D M G F G L F D
R-13     T. cruzi      E E E D D D M G F G L F D
    
```

Figura I.7

1. Secuencia del ADNc JL5 de *T.cruzi*. Tomado de Levin y col.(1989).
2. A) Comparación de la secuencia aminoacídica de JL5 con los extremos C-terminales de las proteínas ribosomales P de *S. cerevisiae* (YPA1), *A. salina* (ASRP12/12') y *H. sapiens* (P0, P1 y P2). Se introdujeron gaps para comparar motivos homólogos. Los asteriscos representan residuos idénticos y los signos + indican cambios conservativos (T-S, D-E, A-S, A-G).
 B) Comparación de las secuencias aminoacídicas del péptido sintético R-13 derivado de JL5 con los 13 residuos C-terminales P de *H.sapiens* y *A.salina*. Se subraya el epítipo ribosomal P de lupus eritematoso sistémico. Tomado de Mesri y col.(1990)

I.4.3. Caracterización de la familia de proteínas ribosomales P de *T. cruzi*.

El sistema de proteínas ribosomales P de *T. cruzi* fue caracterizado empleando:

anticuerpos anti-JL5 y anti-JL52 inmunoseleccionados a partir de sueros de pacientes chagásicos crónicos con miocarditis.

suero de conejo inmunizado con la proteína de fusión JL5 (Levitus, tesis doctoral, 1991).

sueros de pacientes con lupus eritematoso sistémico con título anti-P (Levitus, tesis doctoral, 1991).

Así, fracciones ribosomales de epimastigotes de *T. cruzi* fueron analizadas por *Western blot* (Figura I.8):

los anticuerpos anti-JL5 reconocieron una banda doble de 14-15 kDa, una banda de 19 kDa y otra de 38 kDa, esta última fue reconocida solo con algunas preparaciones, dependiendo del suero utilizado para la inmunoselección.

el suero anti-JL5 de conejo reconoció el doblete de 14-15 kDa.

los anticuerpos anti-JL52 reconocieron predominantemente la banda de 38 kDa y, en algunas experiencias, un conjunto de bandas en el rango 23-32 kDa.

los sueros lúpicos empleados, reconocieron los péptidos de 14-15 kDa y 19 kDa pero no detectaron la banda de 38 kDa.

Los PM de las bandas de 14-15 kDa y 38 kDa son semejantes a los informados para las proteínas P1-P2 y P0 eucariontes, respectivamente (Towbin y col., 1982; Vidales y col., 1981; Elkon y col., 1985; Francoeur y col., 1985).

Introduccion

Los pI determinados para los polipéptidos de 14-15 kDa y 19 kDa fueron de 5,3 y 5,7 respectivamente, es decir, estaban en el rango descrito para las proteínas ribosomales P (ácidas) de otros organismos (Vidales y col., 1981; Elkon y col., 1985). En electroforesis bidimensionales el doblete de 14-15 kDa se resolvió en 2 especies principales y 4 o 5 de menor intensidad (Levitus, tesis doctoral, 1991); la especie de 14kDa con menor pI que la de 15 kDa.

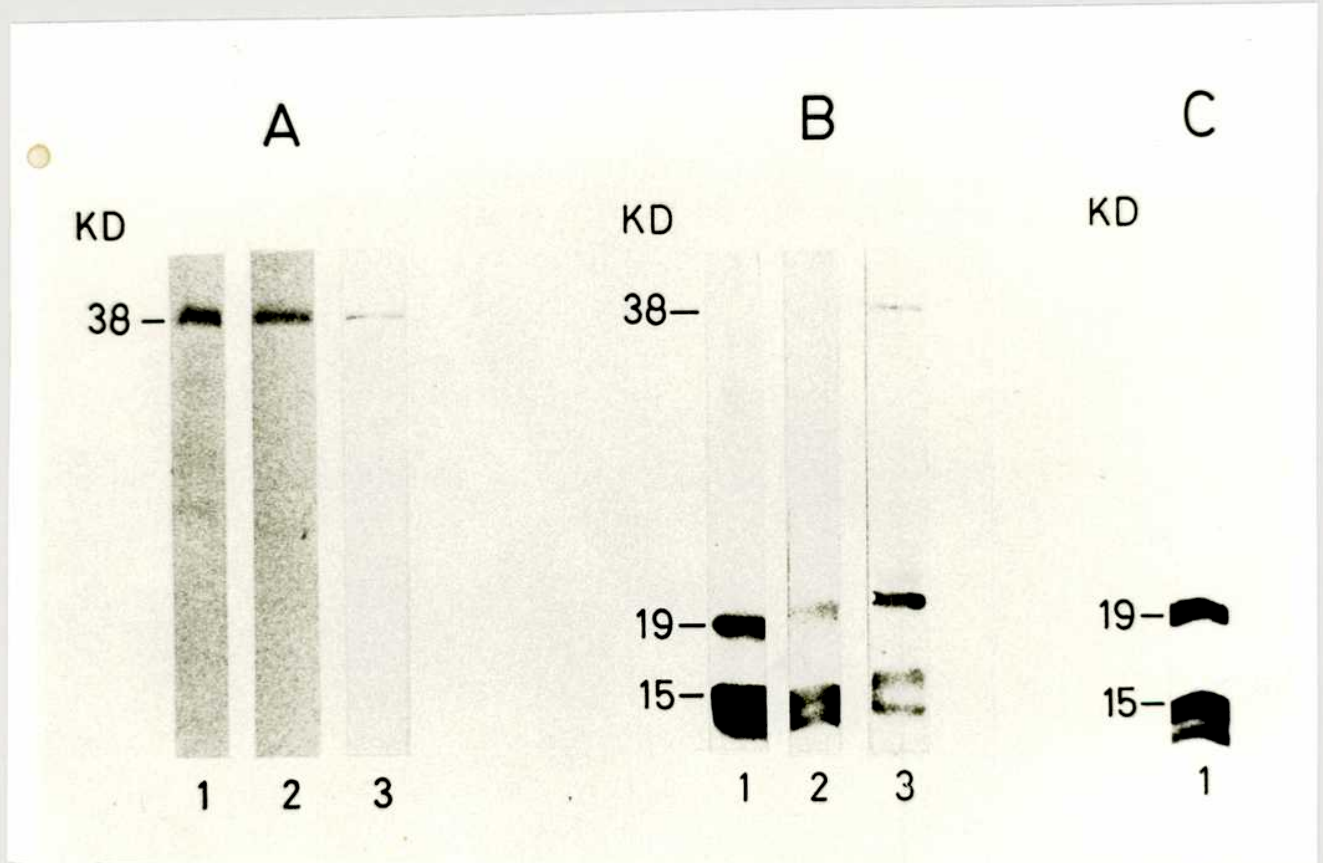


Figura I.8

Familia de proteínas ribosomales P de *Trypanosoma cruzi*

Western blots de proteínas ribosomales de epimastigotes de *T. cruzi* (Tul 2).

A) Reactividad con anticuerpos anti-JL52 inmunoseleccionados de sueros de tres individuos chagásicos (1, 2 y 3).

B) Reactividad con anticuerpos anti-JL5 inmunoseleccionados purificados a partir de los sueros chagásicos de A).

C) Reactividad con un suero lúpico anti-P + (dil 1:200).

Tomado de Schijman y col., (1992).

I.5. OBJETIVOS DE LA TESIS.

La caracterización inmunológica de ribosomas de *T.cruzi* con anticuerpos anti-P (Cap 4) puso de manifiesto la existencia de una familia de proteínas ribosomales P constituida por algunos miembros con características semejantes a las descritas en otras familias P eucariontes (14 kDa y 15 kDa), y por otros miembros (38 kDa y 19 kDa) con características inusuales.

Para proseguir el estudio de la familia de proteínas P en *T.cruzi*, se plantearon los siguientes objetivos:

Abordar el clonado de la secuencia completa de las proteínas correspondientes a las porciones codificadas por los ADNc JL5 y JL52, y determinar la identidad P de dichas secuencias por comparación con las secuencias de proteínas ribosomales P de otros organismos.

Abordar el clonado de proteínas ribosomales P distintas a las codificadas por JL5 y JL52.

Iniciar la caracterización de la organización genómica de la familia ribosomal P en *T.cruzi*.

M A T E R I A L E S Y
M E T O D O S

II.1. MATERIALES

II.1.1. Soluciones y buffers de uso frecuente.

SM = Solución de dilución fagos: NaCl 0,58%, MgSO₄.7 H₂O 0,2%, Tris-ClH (pH 7,5) 100 mM, gelatina (Merck) 0,01%.

TBS = Tris-ClH 50 mM, pH 7,4, NaCl 150 mM.

TBS-T = TBS, 0,05% Tween 20.

TBS-G-L (Solución de bloqueo e incubación con sueros) = TBS, 3% leche descremada en polvo (Molico), 2% glicina (Mallinckrodt), 1 mM PMSF (Sigma), 0,01% azida.

TBE 10X = (1 litro) Tris base 108 g, ácido bórico 55 g, EDTA 0,5 M (pH 8,0) 40 ml.

TE = 1 mM EDTA, 10 mM Tris-ClH pH 8,0.

TMN 10X = 100 mM Tris-ClH pH 8,0, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl₂.

BPB 6X = TBE 6X, 60% Glicerina, 0,25% azul de bromofenol, 0,25% Xylen cianol.

SSC 20X = NaCl 3 M, citrato de sodio 0,15 M, pH 7,0.

MOPS 10X = MOPS 0,2 M, NaAcO 50 mM, EDTA 10 mM, pH 7,0.

Solución de hibridización = formamida deionizada 50%, NaCl 5.85 %, SDS 1%, DNA de timo desnaturalizado 10 min a 100°C, 100 µg/ml, reactivo de Denhardt 5X.

Reactivo de Denhardt = 1% glicina, 1% polivinilpirrolidona, 1% ficoll.

II.1.2. Medios de cultivo bacteriano:

Medio LB (Luria-Bertani):

Por litro:- Bacto triptona 10 g.
- Bacto extracto de levadura 5 g.
- NaCl 10 g.

Ajustado a pH 7.5 con NaOH.

Autoclavado a 1,2 atmósferas durante 20 min.

LB-AMPI: LB + Ampicilina 100 µg/ml, que se agrega al medio autoclavado y enfriado hasta 55°C.

LB-AGAR: LB + agar 1.5%.

LB-AGAROSA BLANDA: LB + agarosa 0.7%.

Medio M9 (Medio Mínimo):

Por litro:- Na₂HPO₄ 6 g.
- KH₂PO₄ 3 g.
- NaCl 0,5 g.
- NH₄Cl 1 g.

Ajustado a pH 7,4.

Autoclavado a 1,2 atmósferas durante 20 min.

- 1M MgSO₄ 2 ml.
- 20% glucosa 10 ml.
- 1M CaCl₂ 0.1 ml.

La glucosa se esterilizó por filtración en filtros *Millipore* de 0.2 μ m.

Medio SOB:

Por litro:- Bacto triptona 20 g.
- Bacto extracto de levadura 5 g.
- NaCl 5M 2 ml.
- KCl 100 mM 25 ml.

Una vez autoclavado se le agregó:

- MgCl₂ 1M 10 ml.
- MgSO₄ 1M 10 ml.

Medio 2X YT:

Por litro:- Bacto triptona 16 g.
- Bacto extracto levadura 10 g.
- NaCl 5 g.

Ajustado a pH 7,0 con NaOH y autoclavado.

II.1.3. Productos radiactivos

Se utilizaron deoxinucleótidos provistos por New England Nuclear (NEN), Boston, MA, USA.

- dATP α P³² (NEG-012 H) y dCTP α P³² (NEG-013 H), 10 mCi/ml en 10 mM Tricine; actividad específica de 3000 Ci/mmol.
- dATP α S³⁵, (NEG-034 H) 1176 Ci/mmol.

II.1.4. Enzimas

II.1.4.1. Enzimas de restricción:

Todas las enzimas utilizadas fueron de origen comercial (Appligene, Promega, Amersham, BRL o Pharmacia). Las digestiones fueron realizadas de acuerdo a los siguientes criterios:

Se utilizó 3-5 U de enzima por μ g de ADN a digerir. Se incubó la reacción durante 2-3 hs a 37 °C (en digestiones de ADN genómico se utilizó 5 U de Enzima por μ g de ADN y se incubó la di-

gestión durante la noche a 37°C). En ningún caso el volumen de enzima agregado superó el 10% del volumen final de la mezcla de reacción.

Los *buffers* de incubación para cada una de las enzimas de restricción utilizadas fueron preparados según las fórmulas detalladas en Sambrook y col., 1989; o bien se utilizó el sistema de *buffers* (A, B, L, M y H) de la firma Boehringer Mannheim.

En los casos de digestiones dobles, se incubó primero la reacción con la enzima de restricción activa a menor concentración de NaCl, agregando luego la cantidad de sal correspondiente, para llevar a la concentración salina óptima para la segunda enzima de restricción. Alternativamente, una vez cumplido el tiempo de incubación con la primer enzima se precipitó el ADN con etanol y se resuspendió en el buffer correspondiente a la segunda enzima.

II.1.4.2. Enzimas de modificación:

Polinucleótido kinasa del fago T₄ (Amersham, Pharmacia): utilizada para fosforilar las extremidades 5' de fragmentos de ADN (por ej: fragmentos amplificados por PCR).

Fosfatasa alcalina de intestino de ternero (CIP) (Pharmacia); utilizada para defosforilar los grupos fosfato 5' de vectores linealizados.

ADN Ligasa del fago T₄: (Pharmacia, Promega) utilizada para el ligado de insertos de ADNc y genómicos en vectores de clonado y subclonado.

II.1.4.3. Polimerasas:

Fragmento Klenow de la ADN polimerasa I (Amersham): utilizado para a) experiencias de extensión de *primer*, b) marcación de sondas por *random priming*, y c) rellenado de extremos recesivos (*fill in*).

Buffer M 1X =	Tris-HCl	10mM
	MgCl ₂	10mM
	NaCl	50mM
	DTT	1mM
	pH a 37°C =	7.5

Polimerasa Taq I (Promega, Perkin Elmer Cetus): utilizada en la metodología de PCR (reacción en cadena de la polimerasa).

Transcriptasa reversa (Amersham, Appligene): utilizada para la síntesis de la primera cadena de ADN copia a partir de templados de ARN total o poli A⁺.

II.1.4.4. Nucleasas:

ADNasa I: utilizada para eliminar el ADN bacteriano en la preparación de ADN de fagos λ .

ARNasa ,libre de ADNasa: utilizada para eliminar el ARN de las preparaciones de ADN.

II.1.5 Cepas de *Trypanosoma cruzi*

Se utilizaron ácidos nucleicos y/o inclusiones en agarosa blanda de parásitos de las cepas siguientes:

Cepa	Estadío	Procedencia
Tul 2	Epimastigotes	Inst. Fatah Chabén, Argentina
CL	Epimastigotes	Inst. Pasteur, Francia
Y	Epimastigotes	Inst. Pasteur, Francia
G	Epimastigotes	Esc.Paulista de Med., Brasil
RA	Epimastigotes	Fac. de Med., UBA, Argentina
RA	Tripomastigotes	Fac. de Med., UBA, Argentina

II.1.6 Cepas de *Escherichia coli*:

II.1.6.1. Genotipos:

1. **Y1089:** (lacU169), proA⁺, lon, araD139, strA, hflA150, (chr::Tn10), (pMC9). Uso: lisógenas para λ gt11, producción de proteínas de fusión.
2. **Y1090** (Lac U169), proA, lon, araD139, strA, supF, [trp:tn10], pMC9, (r⁻, m⁺). pMC9= pBR322, lacI. Uso: propagación y rastreo inmunológico de bibliotecas de expresión en λ gt11.

Materiales y Métodos

supF y supE: genes que codifican para un ARN de transferencia supresor de mutaciones ámbar (suprime la mutación Sam100 de λ gt11).

hflA: (high frequency lisogenization) La ausencia del producto del gen hflA aumenta la estabilidad de la proteína cII del fago. Esta activa la transcripción del represor cI, responsable del establecimiento de la lisogenia.

lacI^q: mutación del gen lacI que provoca un aumento en la producción del represor del operón lac.

lon: gen que codifica para una proteasa ATP-dependiente, responsable de la degradación de proteínas foráneas o anormales en *E. coli*.

3. JM101 thi-1, (lac-proAB), F' [traD36 proAB+ lacI^q ZM15]
Uso: transformación con fago M13 y propagación de fagos para obtención de ADN sc para secuenciación.

thi: mutación en el metabolismo de tiamina, la bacteria requiere tiamina para su crecimiento en medio mínimo.

(lac-proAB): deleción en el cromosoma bacteriano que abarca parcialmente los genes β -D-galactosidasa y los genes para el metabolismo de prolina. La bacteria requiere prolina para su crecimiento en medio mínimo.

traD36: (Transfer factor mutation) previene la transferencia del episoma F'.

4. DH5 α F' endA1, hsdR17 (r-, m+), supE44, thi-1, recA1, gyrA, relA1, θ 80lacZ M15, (lacZYA-argF)U169, F' lacI Z M15. Uso: transformación con fago M13.

La cepa *E. coli* DH5 α F' tiene ciertas ventajas sobre otros hospedadores de M13:

Puede ser mantenida en medio rico (LB o YT) sin perder el episoma F' (a diferencia de la serie JM no depende de la presión de selección conferida por el marcador proAB en el F', que obliga a mantener a las cepas de la serie JM en medio mínimo). El genotipo incluye el marcador RecA1 que asegura la estabilidad de los insertos clonados mientras que la serie JM es rec+.

Es restricción negativa (rk-) y modificación positiva (mk+), por lo que cualquier secuencia puede ser fácilmente subclonada. Tiene una mayor eficiencia de transformación ($\geq 10^7$ ufp/ml). Esta cepa también tiene un background genético lac para permitir α -complementación con el polipéptido codificado por M13 serie mp. Se mantiene en presencia de kanamicina.

Materiales y Métodos

Esta cepa fue utilizada para transformar sobretodo subclones conteniendo insertos >700 pb, y productos de ligación por extremos romos, casos en los que frecuentemente se obtiene menor proporción de recombinantes comparativamente a los subclonados por extremos cohesivos y de insertos pequeños.

5. **L87** hsdR (r-, m+), trpR, metA, supE, supF, tonA
Uso: clonado en λ gt10. Cepa permisiva.
6. **NM514** HsdR (r-, m-), argH, galE, galX, strA, lycB7 (hfl+)
Uso: selección de fagos λ gt10 recombinantes; la mutación para alta frecuencia de lisogenia (hfl) determina que el fago salvaje siga el camino de la lisogenia y no produzca placas de lisis, en cambio el fago recombinante cI- puede replicar y lisar las células. Por lo tanto el plaqueo de bibliotecas λ gt10 en cepas hfl+ resulta en un porcentaje elevado de recombinantes.
7. **LE392** supE44, supF58, hsdR514, galK2, galT22, metB1, trpR55, lac Y1. Uso: propagación de fagos λ .
8. **HB101** supE44, hsdS20(r-B m-B), rec A13, ara-14, proA2, lac Y1, galK2, rpsL20, xyl-5, mtl-1. Uso: preparación de plásmidos a gran escala.
9. **MC1061** hsdR, mcrB, araD139, (araABC-leu)7679, lacX74, gal U, galK, rpsL, thi. Uso: transformación con plásmidos.

II.1.6.2. Mantenimiento de las cepas bacterianas.

Las cepas Y1090 e Y1089, se mantuvieron en placas de LB-agar-amp por cortos períodos (15 días) a 4°C .

La cepa JM101 se mantuvo a 4°C en M9-agar y se repicó a placas de LB-agar para la obtención de colonias frescas a partir de las cuales se prepararon las células competentes para las transformaciones (ver II.2.11.3).

Las cepas se mantuvieron por varios meses en cultivos líquidos con 50% de glicerol a -70°C, o en agar blando a 4°C.

II.1.7 Vectores de clonado:

Bacteriófagos:

λ gt10: inm434, b527 (Amersham). Contiene un sitio Eco R1 único, dentro del gen represor cI dentro del cual se insertan los fragmentos de ADN recombinantes. La función del gen cI en el ciclo de vida normal de lambda es elegir entre la lisis y la lisogenia de la cepa de *E. coli* infectada. El fago parental favorece el camino lisogénico debido a que el gen cI está activo y produce placas turbias en *E. coli* salvaje y la cepa L87 (ver II.1.6.1.). El fago recombinante presenta el gen cI inactivo, por lo tanto favorece el camino lítico y produce placas claras en *E. coli* salvaje y la cepa L87.

λ gt11 :lac5, shndIII 2-3, srI-3, cI857, srI-4, nin5, srI-5, sam100. (Promega, Amersham).

Sam100: mutación ámbar involucrada en la lisis de la membrana bacteriana. Produce la acumulación de partículas fágicas dentro de huéspedes no supresores (sin supF).

cIts857: mutación termosensible que produce la inactivación del represor cI a 42°C, originando la inducción del ciclo lítico.

M13 mp18 EcoR1 BAP, Pst1 BAP (Pharmacia): extremos cohesivos

M13 mp10 Sma1 BAP (Amersham): extremos romos.

Uso: subclonado de fragmentos de hasta aprox. 2 kb, para secuenciación a partir de una matriz de ADN sc con primer universal por el método de terminación de cadena con di-deoxinucleótidos (ver II.2.12.3).

Plásmidos:

PBlueScribe SK+ (Stratagene) Hind III.
Es un vector fagémido de 3.204 pb derivado de pUC 19. Lleva un origen de replicación colE1, resistencia a ampicilina, promotores T3 y T7 flanqueando el polilinker de pUC 19 y un promotor lacZ para selección de colonias azules y blancas o inducción de proteínas de fusión con IPTG. Lleva un origen de replicación del fago M13, que permite el rescate de ADN sc, vía infección con fago helper F1, para secuenciación de ADN simple cadena o mutagénesis específica de sitio. La cadena rescatada de pBS (+) contiene la hebra codante del gen de la β -galactosidasa.

II.1.8. Bibliotecas de ADNc DE *T. cruzi*:

Biblioteca de expresión en λ gt11 de ADNc de epimastigotes de la cepa Tul 2 (E.A. Mesri, tesis doctoral, 1990).
Biblioteca de expresión en λ gt11 de ADNc de tripomastigotes sanguíneos de la cepa RA (P. Levy Yeyati, tesis doctoral, 1992).

II.1.9. Fagos recombinantes con secuencias clonadas de *T. cruzi*:

Los fagos λ gt11 - [JL5, JL52, A1 y JL7] utilizados en este trabajo, fueron aislados a partir de una biblioteca de ADN complementario de *T. cruzi* (cepa Tulahuen 2, estadio epimastigote) (Levin y col., 1989).

La proteína recombinante expresada por el fago JL7, permite diagnosticar serológicamente la infección crónica con *T. cruzi* (Levin y col., 1991).

II.1.10. Oligonucleótidos diseñados a partir de secuencias de *T.cruzi*.

Identidad	Secuencia	Orientación	Aplicación
Miniexón	AACGCTATTATTGATACAGT	<i>sense</i>	Clonado por ARN-PCR
P-JL5 24mer	GTCAAAAAGACCAAATCCCATGTC	<i>antisense</i>	Biblioteca ADNc
20mer	GGCAGTGGGTGCAGAAGCGG	<i>antisense</i>	Secuenciación
N-PJL5	AGCCTTCAATACGGCCTCAAC	<i>antisense</i>	primer extension
3'Eco1kb	GGTAGAAAGTATCATAAAGAATGC	<i>antisense</i>	Secuenciación
5'Eco1kb	TTGTCTTGTCAGATGAAGTA	<i>sense</i>	Clonado por PCR
P-JL52 N-P0	CTTCTTGCCCATCACAAGTTCAC	<i>antisense</i>	Clonado por ARN-PCR
CH3 (1)	AACACCGGCATGGAGCCC	<i>sense</i>	Secuenciación
CH3 (2)	AACGCGTCCATGATCATATG	<i>antisense</i>	Secuenciación

II.1.11. Marcadores de PM de ADN.

Lambda EcoR1-HindIII = 21,8 kb; 5,24 kb; 4,21 kb; 3,41 kb; 1,98 kb; 1,90 kb; 1,57 kb; 1,32 kb; 0,93 kb; 0,84 kb; 0,58 kb.

Lambda Hind III = 23,130 kb; 9,42 kb; 6,56 kb; 4,4 kb; 2,3 kb; 2,027 kb; 0,564 kb; 125 kb.

Phi X 174/ Hae III = 1.353 pb; 1078 pb; 872 pb; 603 pb; 310 pb; 281 pb; 271 pb; 234 pb; 194 pb; 118 pb; 72 pb.

pBR322/ Msp 1 = 622 pb; 527pb; 404pb; 309pb; 242pb; 238pb; 217pb; 201pb; 180pb; 160pb; 147pb; 123pb; 110pb; 90pb; 76pb; 67pb; 34pb.

II.1.11. Sueros humanos

II.1.11.1. Pacientes chagásicos:

Sueros de individuos infectados con *Trypanosoma cruzi* provenientes de la zona endémica del norte y centro de la Argentina, que fueron examinados en el Servicio de Cardiología del Hospital Ramos Mejía (Director Dr. M. Rosenbaum), por el grupo de médicos coordinados por el Dr P.Chiale.

Se consideraron individuos infectados a aquéllos que presentaron reacción seropositiva en por lo menos dos de los siguientes ensayos: fijación de Complemento, hemaglutinación indirecta e inmunofluorescencia indirecta. Aquellos sujetos seronegativos para los tres ensayos se consideraron no infectados.

II.1.11.2. Pacientes lúpicos:

Sueros de individuos europeos con *Lupus eritematoso sistémico* (LES). La caracterización de los sueros se realizó en la "Unité d'Immunohematologie et Immunopatologie" del Instituto Pasteur (París), dirigido por el Dr. G. Dighiero.

Se utilizaron aquellos sueros con actividad anti-proteínas ribosomales P (Elkon y col., 1989).

II.2. METODOS.

II.2.1. EXTRACCION Y CUANTIFICACION DE ACIDOS NUCLEICOS.

II.2.1.1. Preparación de ADN total de *Trypanosoma cruzi*:

El ADN genómico de *T. cruzi* se preparó siguiendo el protocolo descrito a continuación:

- Se resuspendió suavemente 1 g (peso húmedo) de parásitos en 20 vol de buffer 1. Se agregó proteinasa K (100 ug/ml final) y se incubó durante la noche a 37°C.
- Se extrajo 3 veces con fenol y 3 veces con cloroformo-isoamílico.
- Se recuperó la fase acuosa.
- Se precipitó el ADN en 2,5 vol de Etanol absoluto y 0,1 vol de NaAcO 3M, pH 6.
- Se resuspendió en 10 ml de TE y se llevó a una concentración de 0,83g/ml de CsCl más 0,01% de BrEt. Se realizó una ultracentrifugación en Sorvall OTD 65B con rotor de ángulo fijo 50ti a 40000 rpm, durante 36 Hs a 18°C. Se recuperó la banda de ADN lineal (Sambrook y col., 1989).
Se extrajo el BrEt 7 veces con butanol 2. Se precipitó en presencia de NaAcO 0,3 M y 2,5 vol de Etanol absoluto durante 15 min a -70°C, y se recuperó el ADN por centrifugación durante 20 min a 10000 rpm a temp. amb.
- Se lavó 2 veces con Etanol 70% a T.amb y se secó al vacío.
- Se guardó disuelto en TE a una concentración de 500 ng/μl.

II.2.1.2 Preparación de ADN de fagos Lambda:

El ADN de fagos recombinantes se purificó utilizando el método siguiente:

- Se inocularon 10 ml de medio LB - Mg²⁺- maltosa. en tubos Falcon de 50 ml, con 200 µl de células crecidas durante toda la noche en LB Mg²⁺ maltosa, y un taquito de agar conteniendo una placa de lisis del fago correspondiente.
- Para λgt11 se utilizó la cepa Y1090, realizándose la infección a 42°C con agitación a 200 rpm durante 5-6 hs.
 - Para λgt10 se utilizó la cepa LE392, realizándose la infección a 42°C con agitación de 200 rpm durante la noche.
 - Como control de lisis se incluyó un tubo conteniendo células sin infectar. Concluido el tiempo necesario para la lisis bacteriana, evidenciada por la diferencia de D.O. entre los tubos infectados y el control de células sin infectar, se agregó 200 µl de CHCl₃ y se incubó durante 5 - 10 min más a 37 °C, con el objeto de lisar las bacterias remanentes.
 - Se centrifugó durante 5 min a 4000 rpm, para eliminar los restos celulares y una alícuota del SN fue conservada a 4°C como stock de fagos (título aproximado 10¹⁰ ufp/ml).
 - Se tomaron 8 ml de SN, se mezclaron con 8 ml de buffer TM, pasando todo el contenido a un tubo Corex de 30 ml. Se agregó 320 µl de ADNasa I/ ARNasa A (1 mg/ml de cada una en TM).
 - Se mezcló por inversión y se incubó 15-30 min a T.amb..
 - Se concentraron luego los fagos por precipitación en PEG-NaCl, por agregado de 2 ml de NaCl 5N, 2,2 g de PEG 6000. Se disolvió completamente el PEG mezclando por inversión.
 - Se dejó por 15 min en hielo. Se centrifugó por 10 min a 12000 g a 4°C.
Se descartó el SN, se resuspendió el pellet de fagos en 300 µl de buffer TM. Se transfirió a un tubo Eppendorf. Se agregó 300 µl de CHCl₃, se mezcló bien y se centrifugó por 5 min para separar las fases.
 - Se transfirió la fase acuosa superior a un tubo nuevo, cuidando de no remover la interfase de PEG. Se realizaron 2 nuevas extracciones.
Se agregó a la fase acuosa 15 µl de EDTA 0,5 M pH 8 y 30 µl de NaCl 5 M.
Se agregó 350 µl de fenol equilibrado con Tris pH 7,6, se mezcló con vortex y centrifugó durante 5 min para separar las fases. Se repitió la extracción.
 - A la fase acuosa se le agregó 875 µl de etanol. Se incubó durante 20 min a -70 °C y se recogió el ADN por centrifugación durante 15 min.
Se lavó el pellet con etanol 80 %. Se centrifugó por 2 min a 4°C, se descartó el etanol y se secó al vacío.
 - El ADN fue resuspendido en 50 µl de buffer TE.

El rendimiento fue de aproximadamente 2-5 μg de ADN/ml de lisado. Las preparaciones resultaron adecuadas para corte de restricción y subclonado.

II.2.1.3. Extracción de ADN de Plásmidos:

II.2.1.3.1. En pequeña escala (Minipreparaciones).

Los plásmidos fueron preparados según dos métodos distintos, según el objetivo del experimento:

Met.A] para rastreo de plásmidos recombinantes.

Met.B] para mapeo de restricción y secuenciación de ADN dc.

Método A:

- A partir de una colonia aislada se inocularon 3 ml de medio LB ampi y se incubaron con agitación a 37 °C hasta saturación. Se transfirió 1 ml de bacterias a un tubo Eppendorf y se cosechó por centrifugación a 4000 rpm por 5 min.
- Se descartó el sobrenadante y el pellet se resuspendió en 70 μl de buffer STET (Sacarosa 8 %, Tritón X-100 5 %, EDTA 50 mM, Tris.HCl pH 8,0 50 mM) empleando vortex.
 - Se agregó lisozima (0,7 mg/ml final), mezclando con vortex.
 - Se hirvió la suspensión durante 40 seg y se pasó a hielo.
 - Se centrifugó durante 10 min en frío.
 - Se descartó el precipitado con la ayuda de un escarbadietes o *tip* p20/p200.
 - Se extrajo una vez con fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (25:24:1).
 - Se precipitó con 1 volumen de isopropanol. Se dejó a temp. amb. durante 15 min.
 - Se centrifugó durante 5 min. a temp. amb.
 - Se descartó el SN y se secó al vacío.
 - Se retomó el pellet en 20 μl de buffer TE.
 - Se usaron 3 μl para analizar plásmidos recombinantes por restricción agregando al buffer de digestión ARNasa libre de ADNasas, a una concentración final de 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

Método B:

Se utilizó una modificación del método de Birnboim y Doly (1979) para secuenciar ADN dc.

- A partir de una colonia aislada se inocularon 5 ml de LB + 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de ampicilina en tubos de polipropileno (Falcon 2070) de 50 ml.
- Se incubaron con agitación durante la noche a 37 °C.
- Las bacterias fueron cosechadas por centrifugación a 4000 rpm por 15 min a temp. amb..

Materiales y Métodos

- El pellet bacteriano se resuspendió en 90 μ l 25 mM Tris-ClH pH 8,0, 10 mM EDTA, 50 mM glucosa.
- La suspensión de bacterias se transfirió a un tubo Eppendorf.
- Se agregó 10 μ l de lisozima 50 mg/ml disuelta en buffer Tris-EDTA-glucosa.
- Se mezcló suavemente por inversión y se dejó a temp. amb. durante 5 min.
- Se agregó 200 μ l de NaOH 0,2 N - SDS 1 % preparado en el momento. Se mezcló por inversión y se incubó en hielo por 15 min.
- Se centrifugó durante 10 min a 4°C en una microcentrífuga. Cuidadosamente se removió 350 μ l del SN y se transfirieron a un tubo Eppendorf.
- Se realizaron 2 extracciones con 1 vol de fenol-cloroformo isoamílico (25:24:1). Se centrifugó por 15 min a temp.amb.
- Se descartó el sobrenadante y se dejó drenar el exceso de líquido por inversión del tubo abierto sobre papel absorbente.
- El pellet se disolvió en 100 μ l de TE.
- Se trató con 2,5 μ l de ARNasa 10 mg/ml durante 10 min. a temp. amb..
- Se agregó 80 μ l de H₂O y 20 μ l de NaAcO 3 M, pH 5,2.
- Se extrajo una vez con fenol-cloroformo, tomando los 180 μ l superiores de la fase acuosa, a la cual se le hizo otra extracción con cloroformo, recuperando los 160 μ l superiores de la nueva fase acuosa, que fue transferida a un nuevo tubo Eppendorf.
Se agregó 2 vol de etanol absoluto, se mezcló por vortex, y se dejó precipitar por 20 min a -70°C.
Se recuperó el pellet por microcentrifugación y se lavó con etanol 70%. Se drenó el etanol remanente y se secó el pellet al vacío.
El ADN fue resuspendido en 20 μ l de Tris 10 mM pH 7,6. El rendimiento aproximado fue de 3 μ g de ADN/ml de cultivo. Los plásmidos recombinantes preparados por éste método resultaron adecuados como templados de secuenciación de ADN de doble cadena, como se detalla en II.2.12.2.

II.2.1.3.2. En gran escala (Maxipreparaciones):

- Se inoculó 5 ml de medio LB-ampi con una colonia aislada de bacterias transformadas por un plásmido con resistencia a Ampicilina. Se incubó a 37°C con agitación, hasta obtener un cultivo saturado (toda la noche).
El cultivo en 5 ml fue utilizado como inóculo para 500 ml de LB-ampi. Se incubó a 37°C con agitación durante la noche hasta saturación.
- Se centrifugó a 5000 xg por 10 min; se descartó el sobrenadante y el pellet se lavó en buffer TGE (Tris - HCl 25 mM, pH 8,0; glucosa 50 mM; EDTA 10 mM).
- El pellet lavado fue resuspendido en 8 ml de buffer TGE.

Materiales y Métodos

- Se agregó 16 ml de NaOH, 0,2N, 1% SDS (p/v); se mezcló por inversión y se dejó por 5 min a temp. amb..
- Se añadió 12 ml de KAcO 5M pH 5,2 frío y se mezcló por inversión.
 - Se dejó en hielo durante 10 min.
 - Se centrifugó a 10000 xg durante 30 min a 4°C. Se recuperó el sobrenadante y se le agregó 0,6 vol de isopropanol, se mezcló y se dejó 15 min a temp. amb..
 - Se centrifugó a 12000 xg por 30 min, se descartó el sobrenadante y se resuspendió el pellet plasmídico en 7 ml de buffer TE.

Purificación de ADNccc por centrifugación en gradientes de CsCl-Bromuro de Etidio.

- Por cada ml de solución de ADN, se agregó 1 g de CsCl, mezclando suavemente hasta lograr la disolución de la sal.
Se añadió 0,8 ml de una solución de Br.Et. (10 mg/ml en H₂O) por cada 10 ml de solución de ADN/CsCl, se mezcló bien y se estimó la densidad final de la solución pesando el tubo (aprox. 1,55 g/ml).
- Se centrifugó la solución a 8000 rpm por 5 min a temp. amb..
- Se descartaron los complejos de proteínas bacterianas - Br.Et formados, transvasando con cuidado la solución con ayuda de una pipeta Pasteur a un tubo de ultracentrífuga.
- Se ultracentrifugó en rotor 50 Ti a 36000 rpm, a 18°C durante 36 hs.
- La banda inferior correspondiente al ADN ccc fue extraída con pipeta Pasteur.
- El Br.Et. fue removido por extracción (7 veces) con butanol saturado en H₂O.
- La fase acuosa obtenida fue llevada a 8 ml con H₂O, agregando 0,8 ml de NaOAc 3M pH 5,2, más 17,6 ml de etanol y se dejó en tubo Corex de 30 ml durante 15 min a - 70 °C.
- El precipitado se recogió por centrifugación y se resuspendió en H₂O. El ADN se cuantificó a 260 nm y la calidad de la preparación se verificó en un minigel de agarosa.

- El rendimiento fue de 500 µg ADN plasmídico/ml de cultivo.

II.2.1.4. Preparación de ADN del fago M13.

II.2.1.4.1 Preparación de ADN de la forma replicativa del Fago M13.

La forma replicativa del Fago M13 (RF) es ADN de circular. Su preparación se llevó a cabo de la siguiente manera:

- Se utilizó un stock de fagos M13 de 10^{11} ufp/ml para infectar 2,5 ml de un cultivo de bacterias JM101 ($DO_{600} \approx 0,8$), se mezcló y se dejó durante 5 min a temp. amb..
- Las células infectadas fueron diluidas en 250 ml de LB precalentado a 37 °C. Se incubó por 5 hs a 37 °C con agitación vigorosa. Se cosecharon las células por centrifugación a 4000 xg, por 15 min a 4°C.
- El sobrenadante se removió y el pellet se resuspendió en buffer STE frío (0,1 M NaCl, 10 mM Tris.Cl pH 8,0, 1 mM EDTA pH 8,0).
- Se recuperaron las células lavadas por centrifugación a 4000 xg por 15 min a 4°C. Luego el ADN RF de M13 fue aislado por el método de lisis alcalina y purificado por centrifugación en gradiente de CsCl-Br.Et. según se detalló en la sección II.2.1.3.2.

II.2.1.4.2. Preparación de ADN simple cadena del Fago M13.

A. En pequeña escala:

- Se partió de una placa aislada (formada por inhibición de crecimiento bacteriano) de fagos M13 recombinantes. Se tomó la placa incluida en un bloque de agar, o bien se tomó una porción de la misma con un escarbadiante o con una punta para micropipeta P-200.
- La placa fue transferida a un tubo de 2 ml de 2x YT conteniendo 10 µl de un cultivo saturado de células JM101.
- Se incubó durante 5-6 hs a 37 °C.
- Se transfirió a un tubo Eppendorf, se centrifugó a 5000 rpm por 10 min y el sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo. Se volvió a centrifugar por 5 min.

- Se transfirió 1,2 ml del sobrenadante a un tubo nuevo al que se le agregó 200 µl de una solución 20% PEG 6000/2,5 N NaCl. Se mezcló por inversión y se precipitó durante 15 min a temp. amb..
- Se centrifugó durante 10 min, se descartó el sobrenadante, se centrifugó nuevamente para recoger el PEG remanente en las paredes del tubo, que se removió cuidadosamente con pipeta Pasteur afilada.
El pellet se resuspendió en 200 µl de TE y se hizo una extracción con 100 µl de fenol: se mezcló con vortex por un min., se dejó reposar por 5 min, se volvió a mezclar y finalmente se separaron las fases por centrifugación.
- Se transfirió la fase superior cuidando de no tomar material de la interfase y se realizó una nueva extracción.
- Se extrajo una vez con 3 vol. de éter-H₂O y se precipitó la fase acuosa con NaAcO 0,3 M y 2,5 vol de etanol absoluto.
- Se dejó precipitando a -70°C durante 20 min, se centrifugó durante 15 min, descartando el sobrenadante.
- El pellet fue lavado con etanol 70%, secado al vacío y disuelto en 22 µl de buffer TE.

Se utilizaron 5-7 µl de cada preparación de ADNsc para la secuenciación por el método de terminación de cadena (II.2.12.3).

II.2.1.5. Preparación de ARN de *Trypanosoma cruzi*

II.2.1.5.1. Método de extracción con isotiocianato de guanidinio (GTC) en colchón de Cloruro de Cesio.

Para garantizar la calidad de las preparaciones de ARN se utilizó material de vidrio esterilizado por horneado durante varias horas a 200 °C, H₂O bidestilada tratada con 0,1% DEPC, material de plástico nuevo autoclavado 3 veces y guantes nuevos.

- Se resuspendió el pellet de parásitos (se utilizó entre 500 mg y 1 g de pellet peso húmedo) en 2,5 ml de GTC.
- Se pasó 30-60 veces por jeringa G-23 para romper el ADN.
- Se mezcló por vortex intensamente durante 5 min.

Materiales y Métodos

- Se colocó cuidadosamente el homogenato sobre 1,5 ml de CsCl 6M/EDTA 0,1 M, constituyéndose 2 fases; el CsCl es la inferior y el homogenato la superior.
- Se centrifugó a 35000 rpm en ultracentrífuga Sorvall OTD 65B durante 18 hs en SW 56 a 18°C. Al final de la corrida se visualizó un pellet de ARN.
Se extrajo la fase superior más 500 µl de la solución de CsCl con pipeta Pasteur de modo de no alterar el pellet de ARN.
Se lavaron las paredes del tubo con 500 µl de GTC. Se volvió a extraer la fase superior. Este procedimiento se repitió 2 veces más.
 - Finalmente, se descartó todo el sobrenadante de CsCl.
 - El pellet fue resuspendido en 200 µl de GTC con pipetman P-1000, punta azul hasta lograr su resuspensión completa (unas 50 veces).
El ARN fue transvasado a un tubo Eppendorf, y se agregó 3 vol de Etanol. Se precipitó a -70°C durante 1 hora.
 - Se centrifugó a 12000 xg durante 30 min a 4°C.
 - El pellet se lavó con 1 ml de Etanol 70% evitando resuspenderlo. Se centrifugó a 12000 xg por 5 min. Se realizó otro lavado.
El pellet se secó al vacío durante 5 min y se resuspendió en 100 µl de TE.

El ARN resultó adecuado para experiencias de Northern blot y clonado por PCR. Para la construcción de bibliotecas de ADN copia se utilizó ARN poli A+, preparado según se indica en II.2.1.5.2.

II.2.1.5.2. Purificación de ARN poli A+.

El ARN poly A+ se purificó por cromatografía en oligo dT-celulosa (Aviv y Leder, 1972).

Se utilizaron columnas de diversos volúmenes según la cantidad de ARN a procesar; básicamente éstas se confeccionaron en puntas azules con un volumen asentado de 0,5 ml y con capacidad de procesar hasta 5 mg de ARN total. Todas las operaciones se realizaron a temperatura ambiente con material libre de ARNasas.

- La oligo dT-celulosa se equilibró inicialmente con 5 vol (de columna) de buffer de carga (LB: Tris-HCl 20 mM pH: 7,6, LiCl 0,5 M, EDTA 1 mM y 0,1% SDS).
- El ARN total a una concentración no mayor a 2,5 mg/ml se incubó a 65°C por 5 min (para desestabilizar la estructura secundaria) y se enfrió a 0°C.
- Se agregó 1 vol de LB 2X, y se sembró en la columna.
- El percolado se volvió a calentar a 65°C por 5 min, se enfrió y se volvió a sembrar en la misma columna. Esta operación se repitió una vez más.

- El último percolado, que es la fracción llamada poli A-, (constituida en su mayor parte por ARN ribosomal) se precipitó con 2,5 vol de etanol absoluto. Se dejó 10 min a -70°C y se centrifugó a 10.000 rpm por 10 min. El pellet se resuspendió en el menor volumen posible de H_2O bidestilada.
- Se lavó la columna con 10 vol de buffer de lavado (WB: Tris-HCl 20 mM pH:7,6, LiCl 0,1 M; EDTA 1 mM y 0,1% SDS).
- Se eluyó el ARN poli A+ con 2 ml de H_2O bidestilada.
- Se precipitó el ARN poli A+ con NaAcO 3M pH 5,2, y 2,5 vol de etanol absoluto. Luego de haberse incubado toda la noche a -20°C se centrifugó a 10.000 rpm, durante 10 min a 4°C . El pellet se disolvió en el menor volumen de H_2O posible y se guardó a -70°C hasta su uso.
- Las columnas fueron regeneradas luego de cada experiencia lavando con 3 vol. de H_2O destilada, 3 vol. de NaOH 0,1 M y finalmente se llevaron hasta pH neutro con H_2O destilada. En caso de no utilizarse inmediatamente se dejaron secar y se guardaron a 4°C .

La calidad del ARN se verificó por electroforesis en geles denaturantes de agarosa-formaldehído, utilizando como controles ARN total y ARN poli A- (II.2.3.3.).

Con estas preparaciones de ARN poli A+ se construyeron las bibliotecas de ADN copia.

II.2.1.6. Métodos de dosaje de ácidos nucleicos.

II.2.1.6.1. Cuantificación de ADN.

Se midió la concentración de ADN por absorbancia a 260 nm, considerando que la relación $1 \text{ DO}_{260} \approx 50 \mu\text{g/ml}$ de ADN.

En casos en que la cantidad de ADN resultó insuficiente para cuantificar por absorbancia a 260 nm, una alícuota de ADN fue sembrada en minigeles de agarosa conteniendo Br.Et., incluyendo en la corrida diluciones de ADN del fago λ de concentración conocida, para comparar la intensidad de fluorescencia de las diluciones con la del ADN incógnita. La masa mínima detectable por banda es de alrededor de 10 ng.

II.2.1.6.2. Cuantificación de ARN:

Se utilizó el método del orcinol (Schneider, 1957) que se basa en la reacción de los residuos ribosa, liberados por la hidrólisis ácida del ARN con el orcinol y que, en presencia de Fe^{3+} produce una coloración verde.

A 330 μl de distintas diluciones de ARN en H_2O bidestilada estéril se le agregó 670 μl de reactivo orcinol preparado en el momento (1% orcinol p/v, 0,5% $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ p/v en HCl concentrado), se calentó a 100°C durante 5 min y luego se enfrió 5 min en hielo. Se leyó la D.O a 660 nm ($1 \text{ D.O.}_{660 \text{ nm}} = 25 \mu\text{g/ml}$ de ARN).

Se usó como standard poli A sintético.

II.2.3. METODOS ELECTROFORETICOS

II.2.3.1. Electroforesis en geles nativos de agarosa.

Las electroforesis en geles de agarosa se realizaron en las condiciones siguientes:

La agarosa fue disuelta a una concentración adecuada de acuerdo a la longitud del ADN a visualizar (ver Tabla) en buffer TBE 1x, por calentamiento en horno microondas. Antes de armar el gel se agregó Br.Et.a una concentración final de 0,5 µg/ml. Las muestras de ADN fueron sembradas con buffer BPB 1x.

La electroforesis se llevó a cabo con buffer TBE 1x, generalmente en un campo eléctrico de 5-10 V/cm, a temp. amb..

Los geles fueron visualizados mediante transiluminador de luz ultravioleta de 300 nm y fueron fotografiados con una cámara Polaroid MP-4 con filtro rojo (RPC4) utilizando película Polaroid 665 o 667.

% de Agarosa	Aplicación
0,4	ADN λ gt11/EcoR1 y λ gt10/EcoR1
0,7	ADN M13 sc
0,8-1	Southern blots genómicos - mapas restricción
1-1,5	Mapas de restricción de plásmidos recombinantes elución de ADN de 500 pb a 2 Kpb
2-3	productos de amplificación por PCR (200-500 pb)

II.2.3.2. Electroforesis en gradientes de campos eléctricos pulsados.

II.2.3.2.1 Principio:

El material genético de los tripanosomátidos está constituido por pequeños cromosomas que no se condensan durante su ciclo de vida. Esto determina que las técnicas de hibridización in situ de cromosomas sean inadecuadas para el análisis del genoma de estos organismos. El método de electroforesis en campos pulsados (PFGE) (Schartz y Cantor, 1984; Carle y Olson, 1984) permite la alta resolución de moléculas de ADN en un rango de 10 kb a más de 25 Mb. En este tipo de electroforesis las moléculas de ADN son forzadas a cambiar continuamente la dirección de su movimiento de reptación por los poros de la matriz de agarosa. Esto se consigue sometiendo al gel a campos eléctricos alternos en direcciones de 90° o más. Los dos campos se aplican generalmente por intervalos iguales, constituyendo el PULSO de la corrida. La movilidad relativa de moléculas de ADN de distinto tamaño depende de la fuer-

za del campo eléctrico y del pulso. Para obtener una buena resolución los pulsos deben ser lo suficientemente largos para permitir que las moléculas de ADN puedan reorientarse y luego "reptar". El movimiento neto de la molécula dependerá de su tiempo de reorientación y ocurrirá en la dirección de la resultante de los campos eléctricos. Las moléculas de ADN más largas tardan más tiempo en reorientarse por lo cual se retrasan en la corrida. Las moléculas pequeñas con tiempos de reorientación despreciables frente al pulso, se mueven sólo por reptación y por lo tanto su migración es independiente de su longitud. En la práctica, con corridas de 10 V/cm se utilizan pulsos de 1-10 seg para moléculas de alrededor 100 kb y pulsos de 50-100 seg para moléculas de 1000 kb (Smith y col, 1987).

II.2.3.2.2. Preparación de parásitos de *T. cruzi* para experiencias de separación cromosómica:

Se cosecharon 10^9 células de epimastigotes de cultivo (cepas CL, Tul 2 y G). Los parásitos se resuspendieron en buffer PSG en 0.5% de agarosa de bajo punto de fusión y se volcaron en moldes para formar los bloques de siembra. Una vez gelificados, los bloques fueron tratados con una solución de lisis conteniendo 0,5% EDTA/1% SLS/ 2mg/ml de Proteinasa K. Los bloques fueron incubados a 56°C por 48 hs, y luego conservados a 4°C.

II.2.3.2.3. Condiciones de electroforesis:

Se usó la técnica de CHEF (contour-clamped homogeneous electric fields) que genera campos eléctricos homogéneos dando lugar a patrones de bandas cromosómicas derechas (Chu y col, 1986). Se empleó el aparato de CHEF del Laboratorio de Genética Molecular de la Universidad Central de Venezuela, Caracas (Director: Dr José Luis Ramirez) de 24 electrodos (diseño modificado por Olson, Carle y Link, no publicado), con aluminio del lado exterior, en el piso de la cuba de electroforesis, para una mejor dispersión del calor (Galindo y Ramirez Ochoa, 1989).

Se armaron geles de 10 x 10 cm con 1,5% de agarosa en buffer TBE 0,5x.

Se aplicó una precorrida a 290 mA y 160 V con pulsos de 1 seg, durante 30 min.

Se sembraron los bloques con la ayuda de una pipeta Pasteur con un "rulo" en el extremo. Los bloques se cubrieron con agarosa 3% de bajo punto de fusión. Como marcadores de PM se usaron cromosomas de *S. cerevisiae* (cepa AB1380):

[N° de cromosoma: kpb] = I:250; II:835; III:360; IV:1600; V:580; VI:280; VII:1125; VIII:580; IX:450; X:780; XI:690; XII:1090 + ADNr; XIII:950; XIV:810; XV:1125; XVI:970.

Materiales y Métodos

Las corridas se realizaron a 290 mA-160 V a 14°C. Las condiciones de corrida fueron determinadas experimentalmente, modificando los pulsos eléctricos y el tiempo total de la electroforesis para favorecer la resolución de cromosomas en el rango de PM donde se detectaba la señal de hibridización con las sondas de interés.

Al finalizar la corrida, el gel fue teñido en un solución de 0,01% de Br.Et. durante 15 min, y los cromosomas visualizados en un transiluminador de U.V.. Para las experiencias de Southern blot, el gel fue lavado con: una solución de HCl 0,25 M, por 30 min, con una solución denaturante de NaOH 0,5 M/NaCl 1,5 M, dos veces por 20 min y con una solución neutralizante de NH₄AcO 1M, dos veces por 20 min. Los geles fueron transferidos a filtros de Nylon e hibridizados en las condiciones descritas para Southern Blots (II.2.6.3).

II.2.3.1.2. Electroforesis en geles de agarosa alcalina:

La agarosa fue disuelta en H₂O en horno microondas. Se la dejó enfriar hasta aprox.50°C, y se agregó el buffer alcalino de corrida (Buffer 10 x = NaOH 300 mM - EDTA 20 mM).

Las muestras fueron resuspendidas en buffer de siembra alcalino (buffer 1x = NaOH 30 mM - EDTA 2 mM - Ficoll 400 3 % - verde de bromocresol 0,3 mg/ml) y hervidas durante 2 min antes de ser sembradas. La electroforesis se realizó en buffer alcalino 1x, a 5 V/cm, a 4°C.

II.2.3.3. Electroforesis de ARN en geles de agarosa-formaldehído.

Estos geles fueron utilizados, para visualizar la calidad de las preparaciones de ARN para construir bibliotecas de expresión, clonado por PCR y experiencias de *Northern blot*.

II.2.3.3.1 Preparación de la muestra para la siembra en el gel:

Por cada carril del gel se preparó:

- 1-5 µg de ARN total (control calidad de preparaciones de ARN).
- 25 µg de ARN total o 5 µg de ARN poli A⁺ (*Northern blot*).

En ambos casos se agregó:

- 50%Formamida.
- 6% de Formaldehído.
- 1x de MAE (ver armado del gel).

El volúmen de la mezcla a sembrar se completó con H₂O. El ARN se incubó a 65°C durante 15 min, se lo pasó a hielo y se le agregó 1 µl de Br.Et. 0,2 mg/ml y buffer de siembra BPB 1x.

II.2.3.3.2 Preparación del gel desnaturalizante con formaldehído:

Se preparó 1,5% de agarosa con el agregado de 6% formaldehído y tampón MAE 1X (Lehrach y col., 1977).

MAE 10X: MOPS 0,2 M.

NaAcO 50 mM.

EDTA 10 mM. llevado finalmente a pH:7,0 con NaOH.

El formaldehído utilizado fue previamente deionizado y se controló que su pH no fuera menor que 5.

Como criterio de la calidad de la corrida y como marcadores de PM se verificó la presencia y posición de las bandas de ARNr de *T. cruzi*: ARNr18S (2500 b) y especies α (1700 b) y β (2000b) derivadas del ARNr 24S (Castro y col, 1981).

La corrida se realizó a 8 V/cm a temperatura ambiente y se agregó tampón de corrida hasta cubrir apenas el gel. El ARN se visualizó directamente con lámpara de luz U.V. Se fotografió como se detalla en II.2.3.1.

Las electroforesis para Northern blot se corrieron dentro de la heladera, en Buffer MOPS 1x a 50 V durante toda la noche, hasta que el BPB hubo migrado aproximadamente 18 cm.

Para verificar la calidad de preparaciones de ARN se usaron minigeles, adecuando las cantidades de los reactivos y condiciones de electroforesis a las dimensiones del gel.

II.2.3.4. Electroforesis en geles nativos de poliacrilamida

Estos geles fueron utilizados para experiencias de *Fill-in*.

Se utilizaron geles verticales de 20 x 35 cm, con espaciadores de 0,3 - 0,4 mm. Se utilizó una solución stock de acrilamida 29 % y bisacrilamida 1 %. La polimerización se llevó a cabo en 50 ml de TBE 1x final con el agregado de 140 μ l de PSA 10 % y 50 μ l de TEMED.

Las muestras se sembraron en buffer de siembra BPB - XC 1x. Las corridas se realizaron a potencia constante (40 W) en TBE 1x a temp. amb..

Después de cada corrida se quitó uno de los vidrios, y se cubrió la superficie del gel con *Saran-Wrap*. El gel fue expuesto sobre placa autoradiográfica con pantalla intensificadora a -70°C. El tiempo de exposición dependió de la marca detectada en el gel con un contador geiger.

II.2.3.5. Purificación de ADN a partir de geles nativos de agarosa.

II.2.3.5.1. Método de electroelución:

La muestra de ADN a purificar se separó por electroforesis en geles de agarosa nativa teñida con Br.Et. Se cortó un taco de agarosa (taco 1) conteniendo la banda de interés con un bisturí.

En una zona virgen del gel se removió otro taco de agarosa (taco 2) de mayor tamaño al que contiene el ADN a purificar, de manera de tener un hueco. Este hueco fue tapizado con una membrana de diálisis, previamente hervida 10 min en 2% NaHCO₃/EDTA 1 mM y luego 10 min en agua. Sobre la membrana de diálisis se colocó el taco (1) que contiene la banda, agregándole buffer TBE 1x, de manera de no superar la altura del taco (1).

El fragmento de ADN fue entonces electroeluido a 140 V. La migración de la banda se siguió con la ayuda de una lámpara de luz UV. Una vez que el fragmento fue visualizado en contacto con la membrana de diálisis, ésta se quitó del hueco cuidadosamente, sin desconectar la fuente. La superficie de la membrana en contacto con el ADN (cara anterior) se dejó apoyar sobre una gota de buffer TE previamente depositada sobre un trozo de *parafilm*. El pasaje del ADN a la gota de TE se facilitó frotando la cara posterior con la ayuda de una pinza. Se lavó la cara anterior de la membrana sobre una nueva gota de TE, se procedió como antes. Finalmente, se juntaron las fracciones en un tubo *Eppendorf*.

Se hizo una extracción con Fenol-cloroformo y dos extracciones con eter-H₂O recuperando cada vez la fase acuosa por microcentrifugación.

Se precipitó el ADN con AcONa 0,3 M y 2 vol de Etanol absoluto, a -70°C durante 20 min, y se obtuvo el pellet de ADN purificado por microcentrifugación durante 10 min.

Se resuspendió en H₂O bidestilada autoclavada y se estimó la calidad y masa del ADN obtenido en un gel analítico de agarosa.

II.2.3.5.2. Método de elución de geles de agarosa de bajo punto de fusión (LMP):

Se utilizó agarosa LMP (BRL) o Nu Sieve GTC. El procedimiento para armar el gel y el porcentaje de agarosa a utilizar fueron similares a los descriptos para geles de agarosa nativa, excepto que las electroforesis en agarosa LMP de concentraciones menores a 1% se realizaron a 4°C.

Una vez realizada la electroforesis, se visualizó el fragmento de interés con un transiluminador UV, y se cortó un bloque de agarosa conteniendo el fragmento.

El bloque de agarosa fue colocado dentro de un tubo *Eppendorf* con 200 µl de buffer TE y 100 µl de NaAcO 3 M, pH 6. Luego se incubó a 65°C por 15 min para fundir la agarosa.

Se agregó un volumen de fenol equilibrado a 65 °C, y se agitó con vortex. Se centrifugó por 3 min en microcentrífuga. Se repitió la extracción con fenol y se realizaron 2 extracciones con cloroformo-isoamílico, recuperando siempre la fase superior acuosa. El ADN se concentró con 2 vol de Etanol absoluto, durante 30 min en hielo. Se recuperó por microcentrifugación por 10 min, se lavó el pellet con Etanol 70%, se secó y finalmente se resuspendió en Buffer TE.

II.2.4. CONSTRUCCION DE BIBLIOTECAS.

II.2.4.1. Construcción de una biblioteca de ADN copia enriquecida en transcritos P-JL5.

II.2.4.1.1. Fundamentos de la metodología empleada:

Esta genoteca fue construida en el vector λ gt11, a partir de ARN poli A⁺ del estadio Epimastigote de *Trypanosoma cruzi* (cepa Tul 2). Se utilizó como iniciador específico de retrotranscripción el oligonucleótido sintético 24mer correspondiente a los 8 codones Carboxiterminales de la proteína ribosomal P-JL5 (ver Tabla II.1.10).

El ARN poli A⁺ fue obtenido según el procedimiento descrito (II.2.1.5.2.). Las manipulaciones fueron llevadas a cabo teniendo en cuenta las precauciones descritas en Sambrook y col (1989) para evitar la degradación del ARN.

Para la síntesis de ADN copia se utilizó el Kit *cDNA Synthesis System Plus* de la firma Amersham (RPN.1256). Se empleó el método de la ARNasa H, endoribonucleasa capaz de digerir ARN en el híbrido ARN/ADN que se forma como consecuencia de la síntesis de la primera cadena de ADNc. Esta digestión origina *gaps*, proveyendo *primers* con extremos 3'OH, que son utilizados en el paso siguiente por la ADN polimerasa I, la cual reemplaza la hebra de ARN por ADN, en una reacción similar a la de *Nick translation* (Sambrook y col, 1989). En un último paso, la ADN polimerasa del fago T₄ remueve extremos protruyentes 3' en la primera cadena de ADN copia.

Se siguió básicamente el protocolo del manual del *kit* en las condiciones establecidas para 1 µg de ARN, con las modificaciones necesarias, dado el diseño de esta genoteca con un oligonucleótido específico.

II.2.4.1.2. Síntesis de la primera cadena:

buffer 5 x	4 µl
PPi(pirofosfato de sodio)	1 µl
HPRI(inhibidor de ARNasas de placenta humana)	1 µl
mezcla de dNTPs modificada:	
dGTP 10 mM/dTTP 10 mM/dATP 5 mM/dCTP 5 mM	2 µl
oligonucleótido P-JL5 (300 pmoles)	2 µl
dATP [α P ³²] 10 µCi/µl	1 µl
dCTP [α P ³²] 10 µCi/µl	1 µl
ARN poliA ⁺ 1 µg (preincubado a 70°C por 2')	2 µl
H ₂ O csp 20 µl	6 µl

Se agregaron 20 unidades de transcriptasa reversa (20 U/µl).
Se incubó a 42 °C por 1 hora y se dejó en hielo.

La evaluación de la incorporación se realizó por precipitación según el siguiente protocolo:

- Se diluyó 1 µl de la mezcla de reacción después de la incubación con la retrotranscriptasa en 9 µl de EDTA 200 mM.
Se sembraron 5 µl de la dilución en el centro de dos discos de papel Whatman DE81, que se rotularon como T (radioactividad total) e I (radioactividad incorporada).
- El filtro I se lavó 6 veces, 5 min cada vez en Na₂HPO₄ 0,5 M. Luego se lavó el disco dos veces en H₂O, 1 min cada lavado, y dos veces en etanol 95%, 1 min por lavado.
 - Ambos filtros, T e I, fueron secados en estufa a 42 °C.
 - Se contó en un contador de centelleo líquido agregando mezcla centelleadora Tolueno-Omnifluor.
- El porcentaje de incorporación de la primera cadena fue de 0,7%.

El control de calidad de la primera cadena de ADNc se llevó a cabo en una reacción en paralelo. El producto de síntesis fue precipitado con NaAcO 0,3M y 2 vol. de etanol absoluto, resuspendido en buffer alcalino y sembrado en un gel de agarosa alcalina (II.2.3.1.2). El resultado de la experiencia se muestra en la Figura M&M-1.

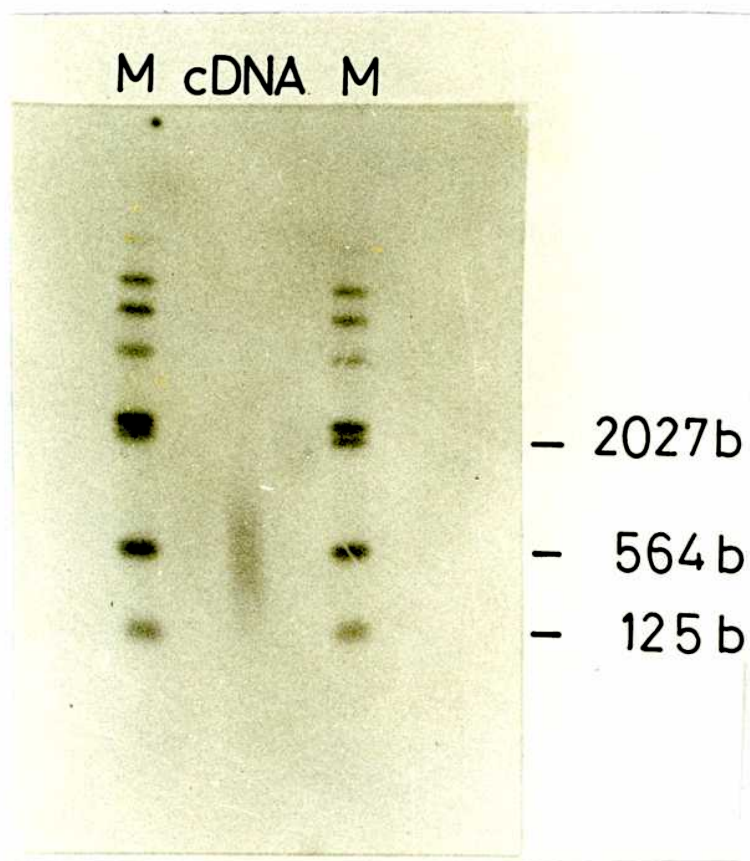


Figura M&M-1
Síntesis de la primera cadena de ADNc con primer JL5 24mer (II.1.10)
Marcadores λ /Hind III. Autorradiografía de un gel de agarosa alcalina 1%.

II.2.4.1.3. Síntesis de la segunda cadena:

Los reactivos fueron agregados en hielo en el siguiente orden:

Mezcla de reacción de ADNc primera cadena	19	µl
Buffer de reacción de ADNc segunda cadena	37,5	µl
<i>E.coli</i> ribonucleasa H (0,8 U)	1	µl
<i>E.coli</i> ADN polimerasa I(23 U)	6,6	µl
H ₂ O	36	µl

Se mezcló y se incubó 1 hora a 12°C y luego 1 hora a 22°C.

Se incubó a 70°C por 10 min.

Se hizo un *spin down* y se agregó en hielo 2 U de ADN polimerasa de T4. Se mezcló y se incubó 10 min a 37°C.

La reacción se detuvo agregando 10 µl de EDTA 0,25 M pH 8.

Se tomó 1 µl de la reacción para contar la radioactividad incorporada de la misma forma que se hizo para la segunda cadena.

El rendimiento de síntesis de la segunda cadena fue de aproximadamente 60% respecto de la primera cadena.

II.2.4.1.4. Purificación del ADN copia:

El ADNc dc fue purificado por dos extracciones con 1 vol de fenol-cloroformo isoamílico, más una extracción con un vol de cloroformo-isoamílico.

Se concentró por precipitación con 1 vol de NH₄AcO 4 M y 4 vol de etanol frío. Se dejó a -70°C por 20 min.

Se llevó a temp. amb. con agitación suave para disolver deoxi-nucleótidos no incorporados, eventualmente precipitados durante la incubación en frío.

Se centrifugó durante 10 min, se removió cuidadosamente el sobrenadante, se lavó en 50 µl de NH₄AcO + 100 µl de etanol absoluto frío a temp. amb..

Al pellet lavado se le agregó 200 µl de etanol absoluto frío, se centrifugó por 2 min y se removió cuidadosamente el sobrenadante.

El pellet se secó moderadamente bajo línea de vacío.

El ADNc se resuspendió en 10 µl de *buffer* TE.

II.2.4.1.5. Acondicionamiento del ADN copia para el clonado en λgt11.

Los pasos que se enumeran a continuación fueron llevados a cabo según las indicaciones del manual de clonado de ADNc en λgt11, de la firma Amersham.

- Metilación de sitios internos EcoR1 en el ADNc.
- Agregado de linkers EcoR1.
- Digestión del ADNc con Eco R1.

- Separación de los linkers en exceso.
- Reacciones de Ligado a los brazos del vector.
- Empaquetamiento in vitro.
- Plaqueo y titulación de la biblioteca

II.2.4.2. Construcción de bibliotecas enriquecidas en fragmentos de restricción de ADN genómico de *T. cruzi*.

Se construyeron genotecas enriquecidas en fragmentos genómicos que contienen secuencias P-JL5 (ver RES. III.2.4.1.; III.2.4.2.) y P-G13 (III.3.1.4.2.):

El diseño de las bibliotecas se basó en los perfiles de Southern blots genómicos revelados con las sondas correspondientes.

II.2.4.2.1. Obtención de los insertos genómicos:

Se realizaron digestiones de 100 µg de ADN total de epimastigotes de *T. cruzi* (Tul 2) con 5 U/µg de las enzimas EcoR1 o Hind III, incubando a 37°C durante la noche (ver II.1.4.1). Se tomó una alícuota de cada digestión, que se sembró en un minigel de agarosa con marcadores de PM adecuados (ver II.1.10) y se transfirió para verificar la presencia de los fragmentos de interés por Southern Blot. El resto del material digerido fue precipitado con etanol y conservado a -20°C. Una vez verificada la digestión por Southern, se sembró en un gel preparativo de agarosa (aprox. 5 mm de espesor) el producto de cada digestión. Se extrajeron tacos de agarosa de las zonas correspondientes al PM de los fragmentos hibridizantes y se purificaron por electroelución (II.2.3.5.1.).

Biblioteca	Rango de PM eluído de agarosa	Vector
EcoR1 1 kb 2,5 kb 5,6 kb	0,8 a 1,2 kb 2,2 a 2,7 kb 5 a 6 kpb	λgt10/EcoR1
Hind III 1,3-1,5-1,8 6 kb	1,2 a 2 kb 5 a 7 kb	pBlueScribe/HIII

Las fracciones de insertos obtenidos en cada caso fueron cuantificadas sembrando una alícuota en un minigel de agarosa; la integridad de los fragmentos de interés fue verificada por Southern blot a partir del material corrido en el minigel.

Se estimó el número de fragmentos diferentes en los bloques de agarosa utilizando la fórmula propuesta por Yee (1988):

$$N = (M/K) [e^{-L/K} - e^{-U/K}]$$

donde N: número de fragmentos diferentes en un taco de agarosa determinado (en ausencia de secuencias repetitivas).

M: tamaño del genoma de *T. cruzi*.

K: PM promedio de los fragmentos de restricción (en un gel de agarosa con buena resolución, el pico de intensidad de fluorescencia con BrEt corresponde al PM que es igual a 3K; ver Yee, 1988)

L y U = PM de los fragmentos menores y mayores incluidos en el taco de agarosa, respectivamente.

II.2.4.2.2. Reacciones de Ligado vector - fracciones genómicas:

II.2.4.2.2.1. Bibliotecas λ gt10 - EcoR1:

Alícuotas de los fragmentos Eco R1 purificados fueron ligados al vector λ gt10 en tres relaciones de masa inserto-vector, manteniendo constante la masa de vector (500 ng).

Fracciones de las reacciones de ligación fueron empaquetadas in vitro, según las instrucciones del manual del Kit de la firma Promega.

Las fracciones empaquetadas fueron tituladas por infección a la cepa permisiva L87, y a la cepa selectiva de recombinantes NM 514 (ver II.1.6.1) utilizando los reactivos del kit "cDNA cloning system- λ gt10" de la firma Amersham, siguiendo las indicaciones del manual.

La reacción de ligado óptima fue utilizada para un nuevo empaquetamiento, la biblioteca se plaqueó en la cepa selectiva NM514 y se rastreó por el procedimiento descrito en II.2.6.1.1.

II.2.4.2.2.2 Bibliotecas pBS - Hind III:

Preparación del vector Bluescribe (STRATAGENE):

5 μ g de vector fue digerido con HindIII durante 2 hs. Una vez verificada la linearización del plásmido en un minigel de agarosa, se removió la enzima por una extracción con fenol-cloroformo. El ADN se precipitó con 2 vol de etanol y AcONa 0,3 M. Se resuspendió en Tris-ClH 10 mM (pH 8,3), se guardó una alícuota de vector digerido (aprox. 500 ng) y el resto fue llevado a 50 μ l de Tris-ClH 10 mM (pH 8,3).

Los grupos fosfato 5' fueron removidos con fosfatasa alcalina de intestino de ternero (CIP):

ADN (4,5 μ g \approx 5 pmol de fosfatos 5')	50 μ l.
buffer CIP 10x	10 μ l
H ₂ O csp 100 μ l	39 μ l
CIP 0,05 unidades	1 μ l

Materiales y Métodos

- Se incubó por 30 min a 37°C.
- Se inactivó la enzima por incubación con proteinasa K 100 µg/ml (conc. final) en presencia de 0,5% SDS, EDTA 5mM (pH: 8,0) a 56°C durante 30 min.
- Se hizo una extracción con fenol y una con fenol-cloroformo y se precipitó con AcONa 0,3 M más dos vol. de etanol absoluto. Se hizo un lavado en etanol 70% y se resuspendió el ADN en buffer TE.
- Se verificó la eficiencia de defosforilación por autoligación y transformación del vector digerido antes y después de la reacción con CIP, plaqueando en presencia de 100 mM IPTG y 2% X-Gal.

Ligado de insertos Hind III al vector pBS HindIII-CIP

Se ensayaron 3 puntos de ligación al vector pBS HindIII fosfata-seado, dejando constante la masa de vector (10 ng).

Alícuotas de cada reacción de ligación fueron tituladas por transformación de la cepa DH5α de *E. coli*, llevada a estado de competencia por el método de alta eficiencia (II.2.11.3.2.).

A partir de los resultados del ensayo, se hicieron nuevas reacciones de ligación en las condiciones del punto óptimo.

Para rastrear ésta biblioteca se utilizó la técnica de hibridización de colonias (II.2.6.2.). Se estimó el número mínimo de colonias a rastrear de acuerdo al número de fragmentos independientes purificados según la fórmula de Yee (1988).

II.2.5. CLONADO POR ARN-PCR

Aproximadamente 2 µg de ARN total de *T. cruzi* fueron incubados con retrotranscriptasa utilizando hexámeros al azar en las siguientes condiciones de reacción:

buffer PCR Cetus II 10x	2 µl
MgCl ₂ 25 mM	4 µl(5 mM)
RNAsin (Promega)	1 µl(2 U)
dNTPs	8 µl(4 mM)
Hexámeros al azar	1 µl(2,5 µM)
AMV transcriptasa reversa (Promega)	2 µl(40 U)
ARN total (preincubado a 70°C, 2')	2 µl(2 ug)

La reacción fue incubada a 25 °C por 10 min, a 42°C por 40 min, y luego a 95°C por 5 min.

Materiales y Métodos

El volumen total de la reacción fue transferido a un tubo conteniendo 80 μ l de :

PCR buffer II	8	μ l
MgCl ₂ 25 mM	4	μ l (2mM)
primer 3' N-P0 (ver II.1.9)	1	μ l (0.15uM)
primer 5' miniexon (ver II.1.9)	1,6	μ l (0.15uM)
Taq polimerasa(Promega)	1	μ l (2.5 U)
H ₂ O csp 80 μ l	64,4	μ l

Se agregaron 50 μ l de aceite mineral (Sigma). La reacción se llevó a cabo en un aparato programable de la marca HYBAID modelo IHB101. Se utilizó el siguiente programa de amplificación:

CICLO	PASO	TEMP. (°C)	TIEMPO	LOOPS
1	1.01	94°C	5'	1
	1.02	52°C	1'	
2	2.01	72°C	1'	40
	2.02	94°C	1'	
	2.03	52°C	1'	
3	3.01	72°C	10'	1

Luego de concluido el programa de amplificación se sembró 1/10 de la reacción en un minigel de agarosa 2 % para verificar la amplificación.

Para hacer a estos insertos susceptibles de subclonado, fue necesario rellenar los extremos para generar productos de extremos romos (*blunt end*).

Los productos de la reacción de PCR fueron incubados a 37°C por 15 min con 2 U de Klenow (no fue necesario agregar dNTPs porque la reacción de PCR llevó dNTPs en exceso).

Se hizo una extracción con fenol-cloroformo 1:1 y el producto se precipitó con 1/10 vol de NaAcO 3M pH 6 y 2 vol de Etanol absoluto. Se dejó 20 min a -70°C, se centrifugó durante 10 min a 11000xg, se lavó con Etanol 70% y se secó el pellet.

El producto de PCR fue purificado por elución de un gel de agarosa de bajo punto de fusión según el procedimiento descrito en II.2.3.5.2.

Dado que los productos de PCR no llevan grupo fosfato en sus extremos 5' fue necesario fosforilar los extremos del producto purificado por la acción de la polinucleótido Kinasa.

El pellet obtenido fue resuspendido en:

buffer PNK 5x	2 μ l
DTT 0.1 M	1 μ l
ATP 100 μ M	2 μ l
H ₂ O	4 μ l
PNK DE T ₄	1 μ l

Se incubó 30 min a 37°C

Se inactivó la enzima a 65°C por 10 min.

II.2.6. IDENTIFICACION DE SECUENCIAS POR HIBRIDIZACION.

II.2.6.1. Transferencia de ADN de fagos recombinantes.

El método de transferencia y fijación de ADN de fagos recombinantes fue empleado para a) rastreos primarios de bibliotecas de ADNc y genómicas construídas en los vectores de clonado λ gt10/11, con sondas radiactivas, b) para ensayos de placas de lisis (*dot blot*) de λ gt10/11 y c) para identificación de subclones de fagos M13 recombinantes.

II.2.6.1.1 Rastreo de bibliotecas:

Para el primer rastreo se emplearon placas de Petri de 150 mm de diámetro. Se plaquearon aprox. 20000 pfu/placa. Se utilizaron filtros de nitrocelulosa (Schleicher & Schuell BA85) por duplicado, previamente rotulados con lápiz o marcador para nitrocelulosa.

El primer filtro se apoyó cuidadosamente sobre la placa y se dejó transferir durante 1 min. En ese lapso se hicieron marcas asimétricas en el filtro con una aguja embebida en tinta china, o quemada a la llama.

La replica del filtro se dejó sobre la placa durante 30 seg más que el primer filtro, y se hicieron las mismas marcas para poder orientar la réplica. En algunos casos se hicieron hasta cuadruplicados, aumentando en 30 seg. el tiempo de contacto de los fagos con cada réplica. Luego de la transferencia, los filtros se apoyaron sobre un colchón de papel Whatmann 3 MM, embebido en solución desnaturizante (Solución 1: 0,5 N NaOH, 1,5 N NaCl) con la cara que estuvo en contacto con los fagos hacia arriba, durante 3 min.

Luego, se pasaron a un colchón con solución neutralizante (solución 2: 1,5 N NaCl, 0,5 M tris.HCl pH 8,0) por 3 min. Después se pasó el filtro a una solución de lavado (solución 3: 6x SSC) por 3 min.

Los filtros se dejaron secar sobre papel Whatmann a temp. amb. y luego se colocaron en un horno a 80°C, durante 2 hs para fijar el ADN. Finalmente se guardaron a temp. amb. hasta el momento de la hibridización.

II.2.6.1.2. Ensayo de placas de lisis:

500 µl de bacterias Y1090 susceptibles de infección (II.2.8.1) fueron diluidas en 3 ml de LB agarosa blanda a 48°C y sembradas en una placa de LB-agar ampi. La placa se incubó a 37°C durante 30 min. Los fagos a analizar fueron luego sembrados como puntos alineados sobre el cesped bacteriano (título aprox 10^{10} ufp/ml). Los fagos fueron incubados a 37 °C hasta la aparición de placas de lisis claras. En ese momento se procedió a la transferencia de acuerdo a lo descrito en II.2.6.1.1.

II.2.6.1.3. Identificación de fagos M13 recombinantes:

En algunas experiencias de subclonado en M13 las placas de retardo obtenidas por transformación de *E.coli* JM101 se rastrearon con sondas radioactivas. Para ésto se realizó una réplica en nitrocelulosa de la placa con los transformantes y otra de la placa de control de ligación de vector solo.

II.2.6.2. Transferencia de ADN de colonias recombinantes:

Este procedimiento se realizó para rastrear las bibliotecas genómicas construidas en el plásmido pBlueScribe (II.2.4.2.2.2). Una vez conocido el título de la biblioteca se plaquearon 100 a 300 colonias en placas de 9 mm y se dejaron crecer hasta solo 1 a 2 mm de diámetro. Se guardaron durante 1 hora a 4°C. Los filtros de nitrocelulosa, previamente rotulados e hidratados (sobre una placa de agar estéril) se apoyaron sobre las colonias por 1 min, lapso en el cual se marcó en forma asimétrica la posición del mismo con una aguja impregnada en tinta china. La placa original se conservó a 4°C como *master*. El filtro se utilizó como modelo para una réplica, que se realizó por contacto de la cara con las colonias a un filtro nuevo, con la aplicación de un peso uniforme durante 1 min, lapso en el cual se marcaron en el filtro nuevo los puntos en coincidencia con la placa original. Ambos filtros fueron colocados sobre placas de LB-agar ampi e incubados a 37 °C para permitir el crecimiento de las colonias sobre los mismos cuidando hasta unos 2 mm de diámetro como máximo (para evitar el background en la hibridización). Los filtros fueron procesados según II.2.6.1.1, e hibridizadas según II.2.6.5.

Los clones positivos fueron repicados para obtener colonias aisladas. Varias colonias de cada clon positivo fueron estriadas en disposición de grilla para una segunda ronda de rastreo. En la Figura M&M-2 se muestra el rastreo de una fracción de la biblioteca pBS-HindIII 1,3-1,8 kB (Res, Cap P-JL5, III.2.4.2).

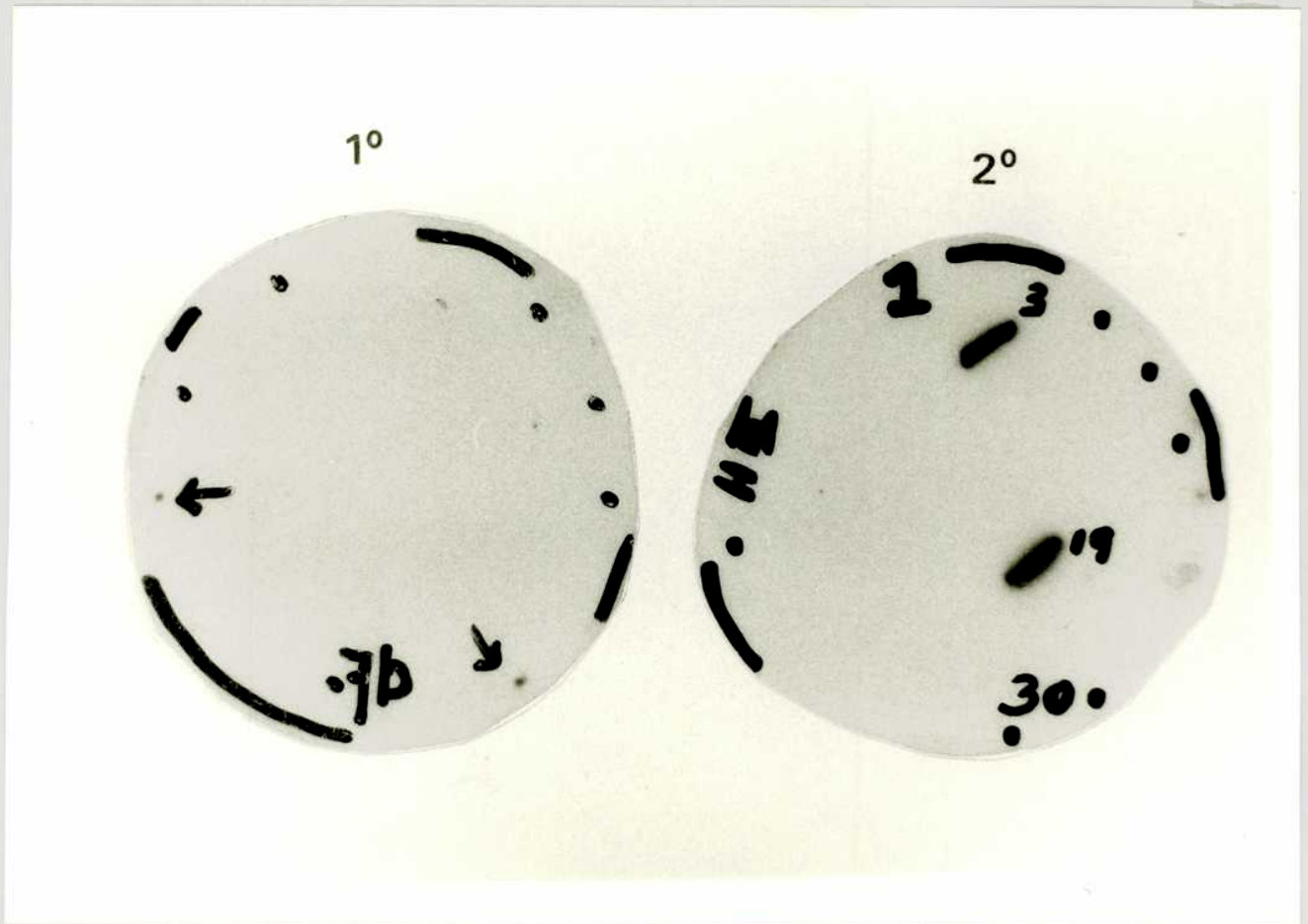


Figura M&M-2

Rastreo de la biblioteca genómica de *T. cruzi* construida en el plásmido pBS-HindIII, con la sonda JL5 radioactiva. Izquierda: rastreo de una placa con 300 colonias. Derecha: 2do rastreo de una placa con estrias dispuestas en grilla, a partir de colonias aisladas de los positivos del primer rastreo. La hibridización se llevó según II.2.6.5.

II.2.6.3. Transferencia de ADN de geles de agarosa: Southern blots.

Con el objeto de hibridizar ADN separado por electroforesis en geles de agarosa se procedió como se describe a continuación:

Los geles fueron fotografiados, incluyendo una regla para poder orientar las distancias de corrida de las bandas hibridizantes respecto a las de los marcadores de PM.

Luego fueron tratados en una solución desnaturalizante (NaOH 0,2N y NaCl 0,6N) por 30 min a temp. amb., con agitación constante. En el caso de ADN genómico se pretrató durante unos 10 minutos con una solución de HCl 0,25N. Se renaturalizó con dos lavados en una solución de NaCl 1,5 M, Tris.HCl 0,5 M pH 7,5 durante 30 min; o bien con NH_4AcO 1 M pH 7, dos veces durante 1 hora a temp. amb..

A continuación se transfirió el ADN a un filtro de nylon Hybond N o Hybond N+ por capilaridad, según el método de Southern (1975) en buffer 20 x SSC durante la noche. Antes de sacar el filtro se marcaron los lugares de siembra, se enjuagó la membrana suavemente con 2 X SSC y finalmente el ADN se fijó al filtro por exposición durante 5 min a la luz ultravioleta.

En algunas experiencias con Hybond N+ se transfirió y se secó en una sola etapa en solución alcalina 0,4 N NaOH durante 20 min a temp. amb..

Los filtros se guardaron secos entre 2 papeles Whatmann a temp. amb. hasta el momento de su hibridización.

Para poder reutilizar filtros de nylon ya hibridizados, éstos se sumergieron en una solución de 0,1% SDS, que se llevó a ebullición durante 30-60 min dejándolos enfriar hasta temperatura ambiente.

II.2.6.4. Transferencia de ARN de geles de agarosa-formaldehído: Northern blots:

Los geles de agarosa-formaldehído (ver II.2.3.3.) fueron fotografiados (incluyendo una regla para poder orientar las distancias de corrida de las bandas hibridizantes a las de los ARN ribosomales patrones), fueron lavados por unos 30 min en agua con agitación constante. Luego se sumergieron en NaOH 50 mM por 30 min y se neutralizaron con Tris.HCl 100 mM pH 7 durante otros 30 min. Finalmente se equilibraron en 10x SSC y transfirieron a filtros Hybond N como en los Southern blots (II.2.6.3.).

II.2.6.5. Condiciones de hibridización:

Los filtros fueron colocados dentro de bolsas de polietileno selladas. Por cada cm^2 de filtro Hybond N+ o nitrocelulosa se utilizó 0,05 ml de solución de hibridización. En casos de rastreo con filtros redondos se colocaron varios en una misma bolsa. Se usó 1 ml de solución de hibridización por filtro de 9 mm de diámetro, más 2 ml adicionales por bolsa; o bien 3 ml por filtro de 15 mm de diámetro más 5 ml adicionales por bolsa.

Generalmente, las hibridizaciones se llevaron a cabo en condiciones de alta rigurosidad (Britten y Davidson, 1985) según se detalla a continuación.

II.2.6.5.1. Hibridización con Formamida:

Se prehibridizó por dos hs a 42°C en una solución conteniendo SSC 5x, formamida 50%, Denhardt's 5x, EDTA 5 mM, $\text{PO}_4\text{H}_2\text{Na}$ 50 mM pH 6,5 y ADN de timo de ternero 250 $\mu\text{g}/\text{ml}$ precalentado a 100°C durante 5 min.

En las experiencias de Northern blot, la solución de prehibridización incluyó Formamida 50%, Sulfato de Dextrano 10%, NaCl 1N, SDS 1%, Denhardt's 5x, ADN de timo de ternero 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ precalentado a 100°C por 5 min.

La sonda (Act. Esp. 10^7 - 10^8 cpm/ μg ADN) se agregó desnaturalizada (100°C por 5 min) a 0,5- $1 \cdot 10^6$ cpm/ml de solución de hibridización.

Se hibridizó a 42°C , con agitación lenta, durante la noche.

II.2.(6).5.2. Hibridización rápida:

En algunas experiencias se usó la mezcla de hibridización rápida, *Rapid hybridization system* de la firma Amersham (UK). La prehibridización se llevó a cabo a 65°C durante 15 min, luego se inyectó la sonda radioactiva, desnaturalizada a 100°C por 5 min. La hibridización se realizó a la misma temperatura durante 2 hs.

II.2.6.6. Condiciones de lavado:

Generalmente, se realizaron dos lavados a temp. amb. durante 30 min en 2x SSC/0,2% SDS.

Dos lavados a 67°C durante 30 min en 0,2x SSC/0,2% SDS. En casos donde se obtuvo una señal fuerte (>100 cps) se realizaron lavados adicionales en 0,1x SSC/0,2% SDS hasta 67°C .

Después de cada lavado los filtros se monitorearon con un contador Geiger hasta obtener una relación señal-ruido de fondo diferenciable.

Los filtros se expusieron sobre películas AGFA-GEVAERT Curix RP1 con pantalla intensificadora, a -70°C , por tiempo variable de acuerdo a la marca retenida.

II.2.7 PREPARACION DE SONDAS RADIOACTIVAS:

Se utilizó el Método de marcación por cebado al azar (*random priming*) empleando el kit de *Multiprime DNA labelling system* (Amersham) RPN.1601 Y/Z o RPN 1601 Y/Z, siguiendo las indicaciones de los manuales adjuntos.

Las reacciones de marcado fueron realizadas con 25 a 50 ng de ADN en 10 μl de H_2O , a partir de insertos amplificados por PCR, de insertos electroeluidos de geles de agarosa, o bien de insertos incluidos en taquitos de agarosa de bajo punto de fusión.

Las muestras fueron desnaturalizadas a $95-100^{\circ}\text{C}$, por 2-5 min y sumergidas de inmediato en hielo.

De acuerdo al deoxinucleótido radiactivo utilizado, dCTP [αP^{32}] 3000 Ci/mmol, o dATP [αP^{32}] 3000 Ci/mmol, se emplearon distintos kits en las siguientes condiciones:

Reactivos	RPN 1600	RPN 1601
Deoxinucleótido radiactivo	dATP αP^{32} (5 μl)	dCTP αP^{32} (5 μl)
Buffer de reacción/dNTP mix	-	5/10 μl
Buffer de reacción	2,5/5 μl	-
dCTP - dGTP - dTTP fríos	2/4 μl c/u	-
Random hexamers/BSA	2,5/5 μl	2,5/5 μl
H_2O csp 25/50 μl	x μl	x μl
dNTP αP^{32} 10 $\mu\text{Ci}/\mu\text{l}$	2,5/5 μl	2,5/5 μl
Klenow 1 U/ μl	2 μl	2 μl

Los componentes se mezclaron por spin down y la reacción se dejó no menos de 5 hs a temperatura ambiente. Concluida la reacción de marcado se agregó 5 μl de ADN carrier, un vol de 4M AcONH_4 pH: 4.5 y 4 vol de Etanol absoluto. Se dejó 15 minutos a -70°C . Se calentó el tubo a 37°C por 2 min, para resuspender los nucleótidos libres que pudieron haber precipitado.

La muestra se centrifugó a 12000 rpm en microcentrífuga durante 15 min. El pellet se lavó en 0,5 ml de una solución de 0,67 M AcONH_4 , 67 % de etanol, a temp. amb., por centrifugación. Se secó al vacío, se estimó la marca con contador Geiger. La sonda se resuspendió en 100-200 μl de buffer TE y se desnaturalizó a $95-100^{\circ}\text{C}$ por 5 min, inmediatamente antes de ser usada.

En los casos de sondas preparadas a partir de agarosa de bajo punto de fusión, se tomó el taco de agarosa, con aprox. 250 ng del fragmento a marcar, el cual fue transferido a un tubo Eppendorf. Se agregó 3ml H_2O por gramo de agarosa.

Se hirvió durante 7 min para fundir la agarosa y desnaturalizar el ADN. La muestra fue alicuotada en fracciones de 25 μ l, con 25-50 ng de ADN por fracción que se conservó a -20°C. Cada fracción fue descongelada una sola vez; fue calentada a 100°C por 1 min, transferida a un baño de 37°C por 10 min y marcada según el procedimiento recién descrito.

II.2.8. RASTREO INMUNOLOGICO DE LAS BIBLIOTECAS EN λ gt11.

II.2.8.1. Preparación de bacterias *E. coli* RY1090 para infección con λ gt11.

Se inoculó una colonia aislada de *E. coli* RY 1090 en 100 ml de LB, 50 μ g/ml ampicilina, 0,2% maltosa y se incubó durante la noche a 37°C con agitación. Las bacterias se cosecharon por centrifugación a 4000 rpm durante 5 min a 4°C, y se resuspendieron en 0,4 vol de MgSO₄ 10 mM estéril y helado.

Las bacterias preparadas se conservaron a 4°C por no más de 15 días.

II.2.8.2 Plaqueo de la biblioteca de λ gt11 en *E. coli* RY 1090)

Aproximadamente $4 \cdot 10^4$ ufp en 100 μ l de SM se mezclaron con 600 μ l de bacterias competentes (ver paso anterior) y se incubaron durante 20 min a 37°C. A continuación se mezclaron con 3,5 ml de LB-top-agarosa fundido a 48°C, se homogeneizaron y vertieron sobre cajas de Petri conteniendo LB-ampicilina previamente mantenidas a 42°C.

Se incubó a 42°C hasta que las playas de lisis fueron claramente visibles (alrededor de 3 hs).

II.2.8.3. Transferencia de las proteínas de fusión producidas por los fagos recombinantes a nitrocelulosa

Se colocó sobre las placas líticas un disco de nitrocelulosa (Schleicher and Schuell BA85) o Hybond C (Amersham), previamente embebido en una solución de IPTG 10 mM y secado sobre papel de filtro (se puso en contacto con los fagos la cara del disco que no estuvo en contacto con el papel).

La posición del filtro de nitrocelulosa se marcó con una aguja o alfiler embebido en tinta china, atravesando el filtro y el agar. Se hicieron tres marcas asimétricas de uno, dos y tres puntos.

Las cajas de Petri con la nitrocelulosa se incubaron invertidas durante 2 hs a 37°C.*

A continuación se retiraron los discos de nitrocelulosa cuidadosamente, y se los lavó durante 10 min con TBS. En el caso de requerir una réplica, se volvió a colocar un nuevo filtro con IPTG y se incubó durante otras 3 hs a 37°C.

* El IPTG actúa por desrepresión de la transcripción a partir del promotor P Lac de λ gt11 al unirse al represor lac, por consiguiente se produce la síntesis de las proteínas de fusión β -galactosidasa-ADNc de *T. cruzi*. Las proteínas de fusión liberadas por la lisis bacteriana son adsorbidas a la nitrocelulosa.

II.2.8.4. Detección de las proteínas con anticuerpos.

Las proteínas transferidas a nitrocelulosa se detectaron, en todos los casos, siguiendo las indicaciones de los fabricantes del kit Vecta Stain ABC (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA).

II.2.8.4.1 Bloqueo e incubación con el suero

Para evitar la unión inespecífica de los anticuerpos a la nitrocelulosa, el filtro se colocó en solución de bloqueo (SB: 2% glicina, 4% leche descremada (Molico), en TBS), durante 20 min como mínimo (1).

Se retiró la solución anterior y se incubó con el suero, previamente diluido 1:1000 - 1:2000, en SB conteniendo 0,05% de Tween 20, 5% de lisado de *E. coli* RY1089 lisogénica para λ gt11 wt, 0,05% Tween 20, 1 mM PMSF, 0,01% azida.

La incubación se realizó a temp. amb. con agitación, por 3 hs o durante la noche, o a 4°C, durante la noche cuando se requirió recuperar la dilución del suero.

Los anticuerpos no unidos se eliminaron con 3 lavados de 5 min en TBS-TW.

Se agregó el segundo anticuerpo (anti-IgG humana total, biotinilado, preparado en cabra (kit ABC Vecta Stain, Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA)), diluido 1:200 en SB-TW y se incubó por 45 min.

Luego de 3 lavados de 5 min en TBS-TW, se colocó el complejo avidina-biotina-peroxidasa, (preparado 30 min antes como sugieren los fabricantes: 2 gotas de A (avidina DH) + 2 gotas de B (peroxidasa biotinilada) en 10 ml de TBS) y se incubó por 45 min más. El exceso de complejo se eliminó con 3 lavados de 3 min en TBS.

II.2.8.4.2. Revelado inmunoenzimático de la unión proteína de fusión-IgG de suero-anti IgG biotinilada-avidina-peroxidasa biotinilada.

Para el revelado, se agregaron 15 mg de 4-cloro-1-naftol (Merck, Darmstadt, Germany) disueltos en 5 ml de metanol frío y 8 μ l de H₂O₂ 30 % a 20 ml de 50 mM Tris-HCl pH: 6.8. Esta solución se volcó inmediatamente sobre el filtro y se incubó en la oscuridad hasta la aparición de las señales (5 a 15 min).

La reacción se detuvo lavando el filtro con H₂O.

Para la detección de proteínas utilizando anticuerpos inmunopurificados (II.2.9.4.), se siguió el protocolo descrito sin diluir la solución de anticuerpos.

(1) Todas las incubaciones y lavados se efectuaron a temperatura ambiente y con agitación, adaptando los volúmenes de cada reactivo al número y tamaño de los filtros, de modo de mantenerlos siempre cubiertos y sin superponerse entre sí.

II.2.8.5 Purificación de un clon positivo.

II.2.8.5.1. Extracción de fagos con señal positiva.

Siguiendo las marcas del filtro, se ubicó la zona correspondiente al fago con señal positiva en el rastreo inmunológico. Es útil hacer un calco del filtro en papel transparente para luego, sobre un transiluminador ubicar las playas de lisis de la zona correspondiente a la señal positiva que se pueda extraer con una pipeta Pasteur de diámetro grueso, o con una pipeta automática cuyo cono se ha cortado para que tenga un diámetro mayor. El fragmento de agar con las placas de lisis, se aspira y se resuspende en 1 ml de SM con 30 μ l de cloroformo, y se deja eluyendo por lo menos una noche antes del rastreo siguiente.

II.2.8.5.2. Rastros sucesivos: purificación de fagos con señal positiva.

Para purificar el fago recombinante positivo, se repite el rastreo inmunológico con los fagos extraídos de la zona correspondiente a la señal positiva, a una densidad de ufp por caja de Petri menor. Los fagos que a su vez produzcan una señal positiva, se vuelven a rastrear, y el procedimiento se repite respetando las cantidades de ufp por caja de Petri que se indican a continuación. Cuando en dos rastros sucesivos (generalmente el cuarto y el quinto), todos los fagos producen una señal positiva, se considera purificado, el fago puede ser amplificado para su posterior caracterización.

	Placa grande 15 cm	Placa chica 9 cm
1° rastreo	40000 ufp	15000 ufp
2° rastreo		1500 ufp
3° rastreo		150 ufp
4° rastreo		20 ufp

II.2.8.5.3 Amplificación de los fagos:

Para obtener una suspensión de fagos de aproximadamente 10^{10} ufp/ml, se infectaron 200 μ l de bacterias *E. coli* Y1090 preparadas como se detalla más adelante (2.18.1) con 10 μ l de la dilución de fagos del último rastreo (aprox. 10^6 ufp/ml). Luego de 20 min a 37°C se mezclaron con 3 ml de top-agarosa (previamente fundida y mantenida a 50°C) y se sembraron en una placa de Petri (96 mm) de LB-agar-amp. Esta se colocó a 42°C. Al cabo de 4 hs se observó el crecimiento a confluencia de los fagos. Se agregaron 5 ml de SM por placa y se incubó durante toda la noche a 4°C. Al día siguiente se pasó la suspensión de fagos a un tubo de polipropileno. Los fagos remanentes se colectaron en 2 ml de SM que se agregaron a la preparación anterior. Se agregó cloroformo (3% final) y se dejó agitando suavemente durante 15 min a temp. amb.. Las bacterias no infectadas y los restos celulares se separaron por centrifugación a 3000g x 10 min a 4°C. Se colectó el sobrenadante, se agregó cloroformo (0,3% final) y se mantuvo a 4°C.

El título del sobrenadante obtenido fue de aproximadamente 10^{10} - 10^{12} ufp/ml.

II.2.9 ANALISIS INMUNOLOGICO DE FAGOS RECOMBINANTES

II.2.9.1 Lisogenización de *E. coli* Y1089 con fagos λ gt11:

En el presente trabajo se prepararon bacterias lisógenas para el fago λ gt11 salvaje y los fagos recombinantes S23, CH3 y JL52.

Se inoculó una colonia aislada de *E. coli* Y1089 (crecida en LB-agar-amp) en 3 ml de LB-amp conteniendo 0,2% de maltosa y se dejó crecer durante toda la noche a 37°C con agitación. Este cultivo saturado se diluyó 100 veces en 50 ml de LB-amp-10 mM MgSO₄ y se incubó con agitación a 37°C hasta una DO₆₀₀ = 0,25. Se infectaron 100 μ l de bacterias (aprox. 2×10^7 células) con un volumen igual de fagos (10^8 ufp en SM), durante 30 min a 30°C⁽¹⁾. La mezcla se diluyó sucesivamente hasta 1:10⁵ y 100 μ l de esta dilución final se rastrilló sobre una placa de LB-agar-amp. Luego de incubar la placa toda la noche a 30°C, se obtuvieron colonias aisladas cuya lisogenia se ensayó tomando cada

una con un escarbadiante y marcando una cruz sobre dos placas de LB-agar-amp (esto se repitió para 25 colonias aisladas), cuidando de reproducir el esquema de siembra en ambas. Una de ellas se incubó a 30°C y la otra a 42°C durante toda la noche. Se consideraron lisógenas aquellas bacterias que crecieron a 30°C y no a 42°C (a esta temperatura se induce el ciclo lítico del fago debido a la inactivación del represor cI. La falta de supresión de la mutación Sam100 provoca una acumulación de partículas fágicas dentro de la bacteria, inhibiendo su crecimiento. La frecuencia de lisógenas obtenidas en las diferentes experiencias varió entre 10 y 50%. Para conservarlas, se estrilaron separadamente sobre LB-agar-amp y luego de incubarlas toda la noche a 30°C, se las guardó a 4°C. A partir de algunas colonias aisladas se prepararon cultivos saturados (a 30°C) en LB-amp, se mezclaron con glicerol en volúmenes iguales y se mantuvieron a -70°C.

(1) La relación fagos/bacterias debe ser aprox. 5/1.

II.2.9.2 Inducción de la expresión de las proteínas de fusión:

Para obtener altos niveles de expresión de las proteínas de fusión a partir de bacterias lisógenas, se emplearon las condiciones de incubación propuestas por Hall y col. (1984), en las cuales la replicación del fago se produce por inactivación del represor cI a 42 °C y la síntesis de la proteína de fusión se induce por el agregado de IPTG al sistema. Los cambios de temperatura indicados se realizaron utilizando tres baños agitadores diferentes, calibrados a 30, 37 y 42°C.

Se inocularon 3 ml de LB-amp con 30 µl de bacterias lisógenas (cultivo líquido mantenido en glicerol a -70 °C) y se incubó durante toda la noche a 30 °C. Este cultivo saturado se diluyó 1:100 en LB ampli (1) y se dejó crecer a 30°C hasta una DO₆₀₀ = 0,4. (En estas condiciones, el represor cI del fago permanece activo, manteniendo el estado de lisogenia).

La inducción de la replicación del fago se produjo incubando a 42°C durante 30 min. (A esta temperatura el represor cI se inactiva, permitiendo la replicación del fago. Este se acumula en el interior de la célula debido a la incapacidad de la cepa *E. coli* Y1089 de suprimir la mutación Sam100, involucrada en la lisis de la membrana bacteriana).

Luego se agregó IPTG (Sigma, St. Louis, MO, USA) (5 mM IPTG final, a partir de una solución madre 100 mM) y se incubó a 37°C por 2 hs más. (El IPTG desplaza al represor del operón lac, permitiendo la transcripción a partir del promotor del gen de la β-galactosidasa y dando como resultado una gran producción de proteína de fusión).

II.2.9.3 Preparación de lisado de *E. coli* Y1089 lisógena para λ gt11 salvaje:

El lisado de bacterias *E. coli* Y1089 lisógenas para λ gt11 salvaje utilizado para competir la reactividad inespecífica de los sueros, se preparó a partir de 1 l de cultivo inducido según II.2.9.3. Las bacterias se centrifugaron a 1.500g x 10 min a temp. amb., se resuspendieron en 50 ml de TBS y se lisaron por 3 ciclos de congelamiento-descongelamiento (nitrógeno líquido-agua corriente). El homogenato final se guardó a -20°C.

II.2.9.4 Inmunopurificación de anticuerpos anti-proteínas de fusión:

Los anticuerpos contra las proteínas de fusión fueron inmunoseleccionados a partir de sueros chagásicos siguiendo el método descrito por Hall y col.(1984). Este se basa en la elución ácida de los anticuerpos unidos a las proteínas de fusión previamente inmovilizadas sobre filtros de nitrocelulosa.

La proteína de fusión se inmovilizó sobre nitrocelulosa incubando un filtro de Hybond-C (Amersham, Buckinghamshire, England) de 5 cm² con 3 ml de proteína recombinante purificada (II.2.9.2), durante 2 h⁽¹⁾. Se lavó 10 min con TBS para eliminar el exceso de proteína, se bloqueó durante 20 min (ver II.2.8.4.1) y se incubó durante toda la noche a 4°C con 5 ml de suero, diluido 1:10 en solución de bloqueo conteniendo 30% de lisado de *E. coli* Y1089 lisógena para λ gt11 salvaje⁽²⁾. Los anticuerpos no unidos se removieron con 3 lavados de 10 min en TBS-TW y 2 lavados de 5 min. en 0,15 M NaCl-TW (0,15 M NaCl conteniendo 0,05% de Tween 20). La elución ácida se llevó a cabo incubando el filtro durante 30 min con 5 ml de tampón E (0,2 M glicina, 0,15 M NaCl, 10 μ g/ml BSA, 1 mM PMSF (Sigma, St. Louis, MO, USA), 0,05% Tween 20, pH:2,8). El material eluido se pasó a un tubo plástico y, manteniéndolo en hielo, se neutralizó rápidamente con 5 ml de 1 M Tris-HCl pH: 8,0 y 2 ml de solución de bloqueo. Esta preparación de anticuerpos se alicuotó en tubos eppendorf y se guardó a -20°C.

(1) Salvo en los casos en que se indica lo contrario, todas las incubaciones se realizaron a temperatura ambiente y con agitación.

(2) Para eliminar la reactividad inespecífica de los sueros se empleó, alternativamente y con igual rendimiento, una preincubación durante 1 h de los 5 ml de suero con un filtro de nitrocelulosa conteniendo lisado de *E. coli* Y1089 lisógena para λ gt11 salvaje, diluido 1:3 en TBS e inmovilizado como se indicó para las proteínas de fusión.

II.2.9.5. Reactividad de los sueros con fagos recombinantes:

Para determinar la reactividad de los sueros contra los diferentes fagos recombinantes se utilizó, básicamente, el método descrito por Mesri (1990).

II.2.9.5.1. Preparación de las bacterias para la infección:

Se inocularon 50 ml de LB-amp con una colonia aislada de *E. coli* Y1090 y se dejó crecer durante toda la noche a 37°C con agitación. A partir de este cultivo saturado, las bacterias se cosecharon por centrifugación a 1.500g x 10 min a 4°C, se resuspendieron en 8 ml de 10 mM MgSO₄ (frío y estéril) y se conservaron a 4°C durante 15 días como máximo.

II.2.9.5.2. Crecimiento, inducción de los fagos recombinantes y transferencia de las proteínas a filtros de nitrocelulosa:

Para la formación del césped bacteriano, se mezclaron 500 µl de bacterias con 3 ml de "top"-agarosa (previamente fundida y mantenida a 50°C), se sembraron sobre una placa (96 mm) de LB-agar-amp y se dejaron crecer a 37°C. Luego de 30 min se retiró la caja y se dejó secar abierta, cerca del mechero, durante 10 min. Se depositaron asimétricamente y en orden, 2 µl de cada preparación de fagos amplificadas (aprox. 10¹⁰ ufp/ml) y luego de dejar secar 10 min, la placa se incubó a 42°C por 40 min (al final de esta etapa puede ya observarse el comienzo de la lisis bacteriana). Por otro lado, se recortó un filtro de nitrocelulosa (Hybond-C, Amersham, Buckinghamshire, England), se lo marcó en un extremo, se lo sumergió en 10 mM IPTG (1), y se lo dejó secar sobre papel Whatman 3MM. El filtro así preparado se apoyó sobre los fagos sembrados (haciendo coincidir, por ej., la marca del filtro con la ubicación del fago salvaje) y se incubó la placa a 37°C (durante esta etapa se produce la inducción de la expresión de la proteína de fusión, que junto con las proteínas bacterianas y del fago quedan inmovilizadas sobre el filtro). Luego de 2 h se retiró el filtro (puede observarse lisis confluyente en los sitios de siembra de los fagos), se colocó directamente en solución de bloqueo y se siguió exactamente el protocolo descrito en II.2.8. 4.

(1) En nuestro laboratorio obtuvimos idénticos resultados sin necesidad de embeber el filtro en IPTG. Probablemente el nivel basal de producción de la proteína de fusión resulte suficiente para su detección por este método.

II.2.10. DETERMINACION DE LA LONGITUD DE LOS INSERTOS DE LOS FAGOS RECOMBINANTES.

Para determinar la longitud de los insertos correspondientes a los clones aislados de las bibliotecas construídas en los fagos λ gt10 y λ gt11, se usaron dos estrategias metodológicas:

Aislamiento del ADN de los fagos amplificados. Corte con EcoR1 para liberar los insertos. Rellenado de los extremos EcoR1 por reacción de *Fill-in* con dATP α P³². Visualización de la longitud de los insertos en geles nativos de poliacrilamida.

Amplificación por PCR del ADN del inserto directamente a partir de fagos λ gt11, utilizando *primers* complementarios a las regiones flanqueantes al sitio EcoR1 de clonado.

II.2.10.1. Reacción de fill-in de extremos EcoR1:

Corte de ADN de lambda con EcoR1.

El ADN de fago λ purificado (II.2.1.2) fue digerido con la enzima Eco R1, para liberar los insertos correspondientes.

25 μ g de ADN se digirió con 3-5 unidades de Enzima Eco R1 con buffer de alta sal 1x (Buffer High 10 x: 100 mM Tris.HCl, Mg Cl₂ 50 mM, NaCl 500 mM, pH 7,5) en un volumen total para llevar el ADN a una concentración final de 100 ng/ μ l.

Se incubó la reacción a 37°C durante 2 a 4 horas.

La comprobación del corte se hizo sembrando una alícuota en un minigel de agarosa 0.4%, por visualización de los brazos del vector.

Reacción de fill-in

Generalmente se procesaron varios clones simultáneamente por lo cual se preparó un "cóctel" de reactivos.

Para 10 muestras - H ₂ O		88 μ l
- buffer M 10x	20 μ l	
- dATP[α P ³²]3000 Ci/mmol	2 μ l	
- fragmento Klenow(10 U)	10 μ l	

Luego se agregaron 12 μ l del cóctel a 8 μ l de ADN de λ digerido (\approx 800 ng). Se incubó 30 min a temp. amb. y se detuvo la reacción con 3 μ l de loading buffer.

Se corrieron los productos de *Fill in* en un gel nativo de poliacrilamida 4% a 6%, incluyendo en la corrida marcadores de PM radioactivos.

Preparación de marcadores de PM de ADN radioactivos:

PAT/Hinf1 o Lambda/HindIII-EcoR1	1 µg	5 µl)
Buffer 10x (M)		2 µl
H ₂ O		11 µl
dATPαP ³² (2µCi/µl)		1 µl
Klenow (1 U/µl)		1 µl
Volumen Total		20 µl

Se incubó a temp.amb. por 20 min. Se sacó una alícuota y se le agregó buffer de siembra (BPB 6x).

Para corridas en geles de agarosa alcalinos se agregó buffer de siembra alcalino (II.2.3.1.2).

II.2.10.2 Determinación del tamaño de los insertos por PCR:

Este procedimiento fue utilizado para determinar la longitud de los insertos clonados en λgt11.

Se utilizó el Kit GENEAMP de la firma Perkin-Elmer Cetus.

Cada reacción de PCR se llevó a cabo en un volumen final de 100 µl.

Una alícuota de fagos amplificados ($\approx 10^{10}$ µfp/ml medio SM) fue centrifugada por 5 min en microcentrífuga para bajar el debris. Se tomaron 2 - 10µl de la parte superior del sobrenadante, se pasó a un tubo Eppendorff llevando a 50µl con H₂O.

Se calentó durante 5 min a 100°C.

Se agregó luego en el siguiente orden:

buffer de reacción		10 µl
MgCl ₂ 25 mM		10 µl
dATP 10 mM		2 µl
dCTP 10 mM		2 µl
dGTP 10 mM		2 µl
dTTP 10 mM		2 µl
primer 1218 λgt11 (forward) 25 µM		10 µl
primer 1222 λgt11 (reverse) 25 µM		10 µl
AmpliTaq ADN Polimerasa 1U		1 µl
Aceite mineral SIGMA		50 µl

Secuencia de los primers:

1218 5'd(GGTGGCGACGACTCCTGGAGCCCG)3' 12pb upstream sitio EcoR1.
 1222 5'd(TTGACACCAGACCACCTGGTAATG)3' 20pb downstream sitio EcoR1.

Estos primers son complementarios a la porción de la β-galatosidasa del vector λgt11.

La reacción se llevó a cabo en un aparato programable de la marca HYBAID modelo IHB101.

Se utilizó el siguiente programa de amplificación:

CICLO	PASO	TEMP	TIEMPO	LOOP
1	1.01	92°C	7'	1
	1.02	50°C	2'	
2	2.01	72°C	1'	40
	2.02	92°C	1'	
	2.03	50°C	0.40'	
3	3.01	72°C	7'	1

Una vez concluido el programa de amplificación (\approx 5 hs) se agregó a cada tubo de reacción 100 μ l de cloroformo para extraer el aceite mineral. Se recuperó la fase acuosa conteniendo el producto de amplificación. Para determinar el PM del producto de PCR, se corrió una alícuota de 10 μ l en un minigel de 2% de agarosa con Br.Et., incluyendo marcadores de PM, Phi X 174/HaeIII.

II.2.10.3. Análisis de insertos clonados en plásmidos por mapeo de restricción:

Los fragmentos genómicos clonados en el vector PBlueScribe, fueron caracterizados por mapeo de restricción, con el objeto de diseñar el subclonado y secuenciación. Se utilizaron los criterios de corte indicados en II.1.4.1.

II.2.11 SUBCLONADO EN EL FAGO VECTOR M13.

II.2.11.1. Preparación del vector:

El ADNdc de la forma replicativa (RF) del fago M13 fue empleado para subclonar los insertos derivados de clones PBlueScribe, λ gt10/gt11 recombinantes. Se utilizaron vectores comerciales:

M13RF mp18, M13RF mp19, M13 mp18/EcoR1 fosfataseado (Pharmacia)
M13 mp10/SmaI fosfataseado (Amersham).

En algunas experiencias de subclonado se utilizó el sitio PstI del polilinker de M13. Para esto se cortó 1 μ g de ADNRF de M13mp18 con PstI y se fosfatasearon los extremos EcoR1 con fosfatasa alcalina de intestino de ternero (II.2.4.2.2.2.).

II.2.11.2. Preparación del inserto:

Como fuente de inserto se utilizó:

Fragmentos purificados de geles de agarosa, provenientes de digestiones de los insertos clonados en λ gt10/gt11 o PBlueScribe, o de productos amplificados por PCR a partir de fagos λ gt11 recombinantes.

Productos del corte EcoR1 de ADN de λ gt11 recombinantes, sin purificar el inserto (los brazos de λ ligados al fago M13 no son capaces de formar un recombinante viable, por lo tanto no es indispensable separarlos del inserto). Esta estrategia fue elegida para experiencias de subclonado de insertos de tamaño < 400 pb, ya que debido a la relación de masa entre el fago λ gt11 (43,70 Kb) y los insertos (150-400 pb), para eluir 100 ng de inserto de un gel de agarosa es necesario cortar al menos 10 μ g de ADN de λ .

Productos de amplificación por PCR clonados a partir de ARN de *T. cruzi*.

II.2.11.3. Reacciones de Ligado:

Las experiencias de ligado a ADN de M13 se llevaron a cabo con:

buffer ligasa T4	ATP	DTT	H ₂ O
1x	1 mM	10mM	csp 10 μ l

Se utilizaron diferentes condiciones de acuerdo al tipo de extremos a ligar:

Extremos	relación molar vector:inserto	Vector	Ligasa	Temp	Tiempo
<i>Cohesivos</i>	1:1/1:5/1:10	10 ng	1 U	14-16°C	12-18 hs
<i>Romos</i>	1:5/1:10	50 ng	2 U	22°C	12-18 hs

Como control de ligación se incluyó una reacción de ligado con vector sin inserto (este control permite estimar el background de vector no linealizado + vector linealizado no fosfataseado (placas azules) y vector fosfataseado y delecionado capaz de autoligarse (1) (placas blancas, falsos positivos).

Parte de los productos de ligación fueron utilizados para ensayos de transformación de una cepa de *E. coli* F⁺ (que le confiere un fenotipo portador de pili), JM101 o DH5 α F', llevadas a estado de competencia (II.2.11.3).

(1) La defosforilación con Fosfatasa alcalina suele ser un paso poco reproducible que puede dar lugar a deleciones de los extremos del vector linealizado. Si eventualmente, estos vectores se autoligan, dan lugar a placas blancas no recombinantes (falsos positivos).

II.2.11.4 PREPARACION DE CELULAS COMPETENTES PARA TRANSFORMACION.

II.2.11.4.1. Método del Cloruro de Calcio:

- Se inoculó una colonia aislada de *E. coli* JM101 seleccionada en medio mínimo (selección F') en 2 ml de medio 2TY.
- Se incubó O.N. a 37°C con agitación.
- Una parte del cultivo saturado obtenido se diluyó 1:5 en 2TY (5 ml) e incubó a 37°C a saturación para utilizarlo como césped bacteriano; otra parte, fue diluida 1:100 en 50 ml de 2TY, e incubada a 37°C hasta D.O. 0,2-0,4.
- El cultivo en fase exponencial fue cosechado por centrifugación por 10 min a 3000 rpm.
- Se resuspendió suavemente en 0,5 vol (25 ml) de CaCl₂ 50 mM estéril frío. Se Dejó 1 h en hielo.
- Se centrifugó a 3000 rpm por 10 min a 4°C. Se resuspendió el *pellet* en 1/10 del volumen original (5 ml).
Las células se guardaron a 4°C hasta su empleo

En general, las bacterias fueron transformadas unas horas después de preparadas, dado que la eficiencia de transformación se incrementa de 4 a 6 veces si se dejan en frío durante las primeras 12-24 horas en estado de competencia (Saambrook y col., 1989).

II.2.11.4.2. Método de transformación de alta eficiencia (Hanahan, 1985).

- Se partió de colonias frescas (DH5a y DH5aF': ver II.1.6.1) crecidas a 37°C la noche anterior a la preparación de las células competentes.
- Se picaron unas 4-5 colonias y se inocularon a 1 ml de medio SOB en un tubo Eppendorf. Se crecieron 1 hora a 37°C.
- El inóculo se pasó a 50 ml de SOB en un erlenmeyer de 500 ml.
- Se incubó con agitación aireada a 37°C hasta DO₅₅₀ = 0.45-0.55 ($\approx 8 \cdot 10^7$ células/ml).
- Se pasó el cultivo a dos tubos Corex de 30 ml. Se centrifugó a 4000 rpm por 10 min a 4°C

Se resuspendió en 1/3 vol de TFB. Se incubó 15 min en hielo.

TFB = KCl	1000 mM
MnCl ₂	45 mM
CaCl ₂	10 mM
HaCoCl ₃	3 mM
K-Mes	10 mM

Mes = 0.5 M Mes pH 6.5 (equilibrado con KOH).

Se centrifugó a 4000 rpm por 20min a 4°C.

Se resuspendió en 1/12 de volumen de TFB.

Se agregó DnD 3.5% final.

Se mezcló e incubó en hielo por 10 min.

DnD = DTT 1 M
DMSO 90%
AcoK 10 mM

Se agregó DnD 7% final.

Finalmente se incubó por otros 20 min en hielo.

Las células competentes fueron guardadas a 4°C hasta el momento de la transformación.

Este método permitió obtener una eficiencia de transformación de 5.10⁷ ufp/μg de ADN RF de M13 wt.

II.2.11.4 Transformación de los productos de ligación.

Se mezcló 0,3 - 0,5 vol de cada reacción de ligación con 200 μl de bacterias competentes.

Se dejó durante 30 min en hielo.

Se incubaron las bacterias 2 min a 42°C (*shock* térmico).

Se pasó inmediatamente a hielo por 5 min.

Se agregó 200 μl de un cultivo saturado de JM101 (cesped), 40 μl de 2% X-Gal, 20 μl de IPTG 100 mM.

Se transfirió a LB-agarosa blanda y mantenida a 48°C.

Se plaqueó sobre LB-agar.

Se incubó toda la noche a 37°C.

En cada experiencia de transformación se incluyó un control sin ADN, un control de transformación con vector solo autoligado, y un control de eficiencia con ADN RF de fago M13 wt (0,1-1 ng).

Se analizó la eficiencia de subclonado teniendo en cuenta que las placas de retardo de crecimiento azules corresponden a los fagos no recombinantes (M13 wt lac Z+) y las blancas corresponden a posibles M13 recombinantes (lac Z-).

Generalmente se tomaron directamente las placas blancas para preparar ADN de simple cadena. En algunos casos se decidió seleccionar los subclones positivos por hibridización.

II.2.12. SECUENCIACION DE ADN

II.2.12.1. Prueba de complementaridad de ADNsc subclonados en M13.

Este procedimiento fue utilizado para determinar la orientación de los insertos subclonados en el fago M13. Consiste en verificar el retardo de la migración en geles de agarosa de un híbrido parcial formado por complementaridad de secuencias de dos insertos de ADNsc subclonados en orientaciones opuestas en el fago M13. De esta manera se seleccionaron para secuenciar ADNsc en ambas orientaciones.

Se partió de minipreparaciones de ADN simple cadena (II.2.1.4.2), que se incubaron de a pares:

5 μ l ADNsc A (100-200 ng)
 5 μ l ADNsc B (100-200 ng)
 1 μ l NaCl 2.5 M

Se desnaturalizó por 30' a 60°C.

Se dejó enfriar lentamente en baño seco a 60°C hasta temp. amb..

Se agregó 2 μ l de loading buffer.

Se corrió la mezcla en un minigel de agarosa 0.7%.

Se identificaron los subclones complementarios por retraso en la corrida respecto a controles de ADNsc sin aparear.

II.2.12.2 Secuenciación de ADN de doble cadena: apareamiento templado-primer:

Este procedimiento se empleó para secuenciar insertos clonados en el plásmido pBS. El ADN plasmídico fue preparado por el método descrito en II.2.1.3.1.

Se resuspendió 1 μ g de ADN en 8 μ l de buffer TE. Se agregó 2 μ l de NaOH 2M y se incubó a temp. amb. por 5 min para desnaturar el ADN.

Se agregaron 7 μ l de primer (2 pmol/ μ l) y se mezcló suavemente. Se neutralizó con 3 μ l AcONa 3M, pH 4,5, se volvió a mezclar. Se concentró con 75 μ l de etanol absoluto frío. Se mezcló bien y se dejó en hielo seco por 20 min. Se microcentrifugó durante 10 min a temp. amb.. Se removió el sobrenadante, se enjuagó con 70% de etanol. Se secó el ADN al vacío. Se resuspendió en 7 μ l de H₂O y se procedió a partir del paso (2) de marcado en el procedimiento de secuenciación por el método de terminación (II.2.12.3).

II.2.12.3. Reacción de secuenciación de ADN por el método de terminación de cadena con dideoxinucleótidos (Sanger y col, 1977).

Las reacciones de secuenciación por Sanger se llevaron a cabo con el kit *Sequenase* (version 2.0 de U.S.B). *Sequenase* es la denominación comercial de la ADN polimerasa de T7 modificada in vitro para una alta procesividad.

Reactivos:

"primer" - 40 de M13: 5' -GTTTTCCCAGTCACGAC- 3' (5 ng/ul)

"primers" específicos (ver II.1.10)

Buffer Sequenase 5X= 200 mM Tris-HCl pH=7.5
100 mM MgCl₂
250 mM NaCl

Mezcla de marcación(dGTP) 5X= 7.5 uM dGTP
7.5 uM dCTP
7.5 uM dTTP

ddG Mezcla de terminación(dGTP)=80 uM dGTP, 80 uM dATP, 80 uM dCTP,
80 uM dTTP, 8 uM ddGTP, 50 mM NaCl.

ddA Mezcla de terminación(dGTP)=80 uM dGTP, 80 uM dATP, 80 uM dCTP,
80 uM dTTP, 8 uM ddATP, 50 mM NaCl

ddT Mezcla de terminación(dGTP)=80 uM dGTP, 80 uM dATP, 80 uM dCTP
80 uM dTTP, 8 uM ddTTP, 50 mM NaCl.

ddC Mezcla de terminación(dGTP)=80 uM dGTP, 80 uM dATP, 80 uM dCTP
80 uM dTTP, 8 uM ddCTP, 50 mM NaCl.

Buffer de dilución de la Enzima=10 mM Tris-HCl pH=7.5
5.0 mM DTT
0.5 mg/ml BSA.

Buffer Mn= 0.15 M isocitrato de sodio
0.1 M MnCl₂.

Solución *stop* = 95% formamida
20 mM EDTA
0.05% azul de bromofenol
0.05% xilen cianol

Procedimiento de secuenciación:

1) Mezcla de apareamiento:

ADNsc	7 μ l (0,5- 1 μ g)
buffer sequenasa	2 ul
primer	1 ul
Total	10 ul

Se calentó la mezcla a 65°C por 2 min en un baño seco y se dejó enfriar lentamente hasta una temperatura menor a 35°C. Mientras se dejaba enfriar se prepararon 4 tubos conteniendo c/u 2.5 μ l de la mezcla de terminación con el dideoxinucleótido correspondiente (ddA, ddC, ddG, ddT). Se precalentaron en un baño de agua a 37°C.

Se diluyó la mezcla de marcación 1:5 en H₂O.

Se diluyó la Sequenasa en el buffer de dilución 1:8.

2) Reacción de marcado:

A la mezcla de apareamiento se agregó:

DTT 0.1M	1 ul
mezcla de marcación 1:5	2 ul
dATP[S ³⁵]	0.5 ul
Sequenasa 1:8	2 ul

Se mezcló e incubó a temp.amb. durante 3-5 min.

Para leer cerca de la zona del primer se utilizó Buffer de Manganeso, agregado en la reacción de marcado (1 μ l).

3) Reacción de terminación:

Se transfirió 3,5 μ l de la reacción de marcado a cada tubo de terminación (ddA, ddC, ddG, ddT) y se incubó a 37°C por 5'.

Se detuvo la reacción por agregado de 4 μ l de solución de *stop*.

II.2.12.4 Armado y corrida de geles de poliacrilamida para secuenciación de ADN.

Preparación del gel:

Se utilizaron geles desnaturalizantes de 6 a 8 % de poliacrilamida (38:2) en TBE 1X preparada a partir de una solución stock de acrilamida 40%:

Acrilamida 380 g
N,N'-metilenbisacrilamida 20 g

H₂O para 100 ml

Se disolvió a 37°C y se filtró. Se conservó la solución madre por no más de un mes a 4°C. Para los geles de secuencia de 30 x 40 cm se prepararon 100 ml de solución de acrilamida-urea de la siguiente forma:

42 g urea (7 M final)
15 ml de acrilamida 40 % (6 % final)
TBE 1X hasta 100 ml

Se disolvió la urea. Se dejó en hielo. Inmediatamente antes de volcar la solución se agregó:

100 µl TEMED
280 µl persulfato de amonio 10 %.

Se utilizaron vidrios de cuarzo de 20 x 35 cm o de 30 x 40 cm. Los vidrios se limpiaron bien y luego se siliconaron con un algodón embebido en *silic-glass*.

Se usaron espaciadores de 0.4 mm y se sellaron los vidrios con cinta aislante de alto voltaje. Luego se volcó la solución de acrilamida-urea a un flujo constante evitando la formación de burbujas de aire.

Se utilizaron peines de diente de tiburón (sharp) y espaciadores de 0,3 - 0,4 mm.

Se dejó polimerizar el gel durante al menos dos horas, antes de largar la corrida.

Sembrado del gel:

El gel fue precorrido a 60 Watts durante 30 min

Las muestras fueron incubadas a 75°C por 2 min antes de cargarlas en el gel. Se sembraron 3 µl de cada tubo por depósito en el orden A, C, G, T de izquierda a derecha. Generalmente el segundo depósito se sembró 30 min después de que el BPB del primer depósito saliera del gel. La corrida se detuvo al llegar el BPB del segundo depósito al fondo del gel.

Las electroforesis se llevaron a cabo aplicando una potencia constante de 35 W para geles de 20 x 35 cm y de 60 W para geles grandes de 30 x 40 cm.

Concluida la migración el gel se desmontó de la cuba y se separó un vidrio cuidadosamente. Se fijó durante 15 min en una mezcla 10 % etanol + 10 % ácido acético. Se lavó con abundante agua. Luego se colocó sobre el gel una hoja de papel Whatman 3 MM de manera de pasar el gel al papel. Se cubrió con *Saran-Wrap* y se secó durante 2 hs a 80 °C en un aparato de secado al vacío Hoeffler

Materiales y Métodos

modelo SE 1160. Se quitó el *Saran-Wrap* que cubría el gel, y éste se expusó directamente sobre película autoradiográfica sin pantalla intensificadora a temp. amb. por 48-72 hs.

R E S U L T A D O S

III.1. PLANTEO GENERAL

La táctica empleada para iniciar la caracterización molecular de la familia de antígenos ribosomales P de *T. cruzi*, fue seleccionar y clasificar una batería de fagos recombinantes λ gt11, que habían sido purificados por rastreo con sueros de pacientes chagásicos crónicos, de una biblioteca de ADNc de epimastigotes (cepa Tul 2) (Mesri, 1990) y de una biblioteca de ADNc de tripomastigotes sanguíneos (cepa RA) (Levy Yeyati, 1992).

III.1.1. IDENTIFICACION Y CLASIFICACION DE FAGOS QUE EXPRESAN ANTIGENOS RIBOSOMALES P.

La clasificación de la batería de fagos disponibles se basó en dos tipos de análisis:

Análisis de identidad inmunológica.

Reactividad diferencial de los fagos recombinantes frente a sueros de pacientes chagásicos: selección de fagos que reaccionen diferencialmente con sueros de pacientes chagásicos crónicos, con cardiopatía (Mesri, 1990; Levitus, 1991).

Reactividad inmunológica de los fagos recombinantes con anticuerpos anti-JL5 y anti-JL52 (Int., I.4.1).

Análisis de identidad genética.

Homología de ADN entre los fagos inmunoseleccionados, determinada por *Dot blot* (M&M, II.2.6.1).

III.1.2. IDENTIFICACION INMUNOLOGICA.

III.1.2.1. Reactividad diferencial de los fagos recombinantes frente a sueros chagásicos.

Se ensayó la reactividad de fagos recombinantes frente a sueros de pacientes chagásicos por el ensayo de placas de lisis (M&M, II.2.9.5). Un ejemplo de este ensayo se muestra en la Figura R-1.

III.1.2.2. Ensayo de placas de lisis con anticuerpos anti-JL5 y anti-JL52.

Teniendo en cuenta los datos de la Fig R-1, se planteó una segunda experiencia, utilizando como inmunosondas, anticuerpos monoespecíficos anti-JL5 y anti-JL52 (M&M, II.2.9.4). El resultado de este ensayo se observa en la Figura R-2. Los anticuerpos anti-JL5 reaccionaron con los fagos G13, L6 y S23. Los anticuerpos anti-JL52 reaccionaron solo con el fago CH3. Esta experiencia permitió agrupar los fagos en dos grupos:

grupo anti-JL5 positivo: JL5, S23, S16, S18, L6 y G13.

grupo anti-JL52 positivo: JL52 y CH3.

En todos los casos la reactividad de los fagos S23, L6 y G13 fue similar a la de JL5. En cambio, la reactividad de JL52 fue semejante a la de JL5 en la mayoría de los casos, pero con llamativas excepciones (suero A.S. en Figura R-1). Los fagos CH3 y 31 reaccionaron de manera similar a JL52. El fago JL7 fue empleado como marcador de infección por *T.cruzi* (Mesri, Tesis doctoral, 1990).

Estos ensayos permitieron identificar fagos con propiedades antigénicas similares a JL5, por un lado, y a JL52, por otro.

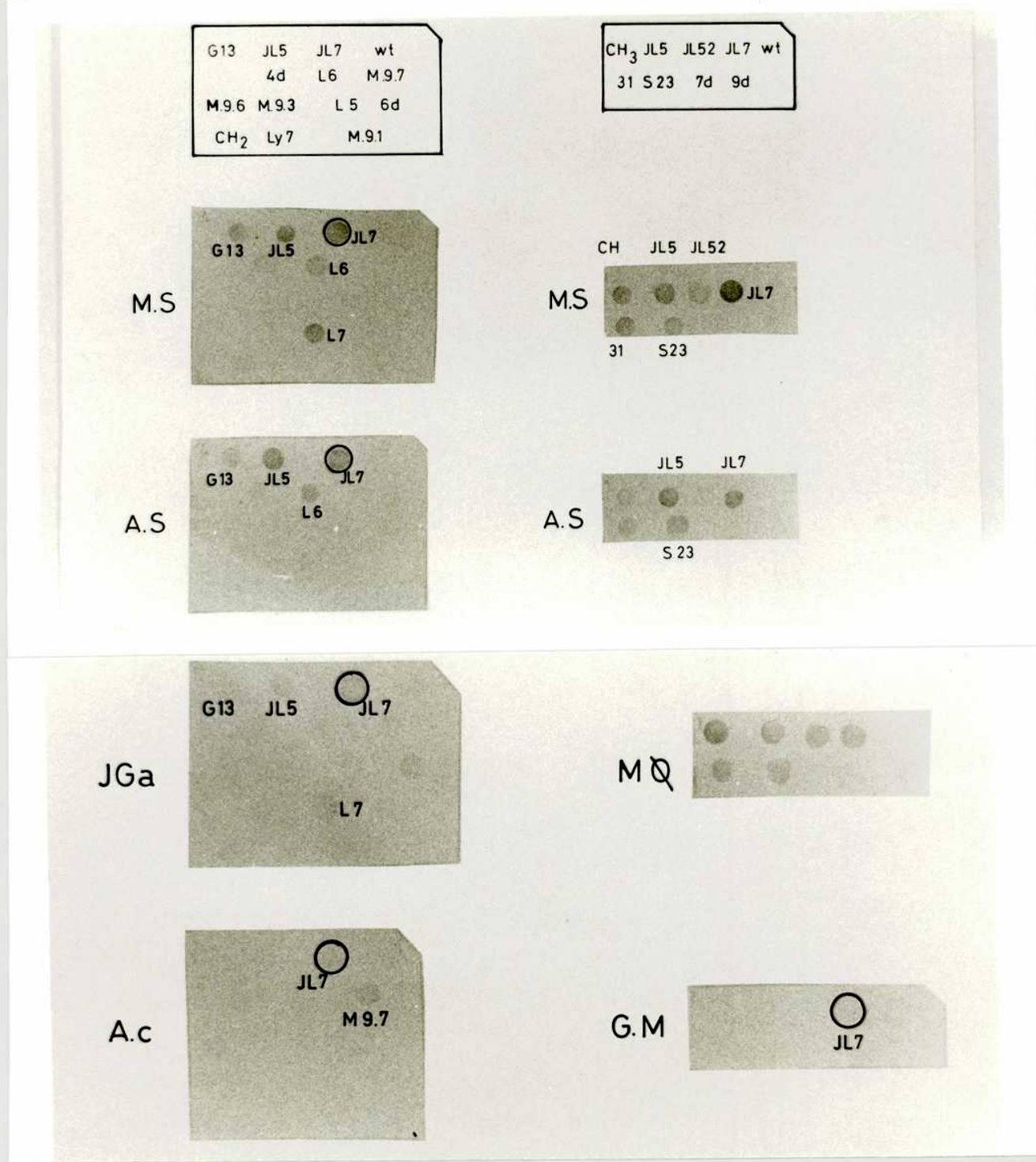


Figura R-1

Reactividad inmunológica de fagos λ gt11 recombinantes con sueros de pacientes chagásicos con y sin cardiopatía (dil 1:500). Se indica la disposición de los fagos en los filtros de nitrocelulosa. Se utilizó el procedimiento detallado en M&M (II.2.9.5).

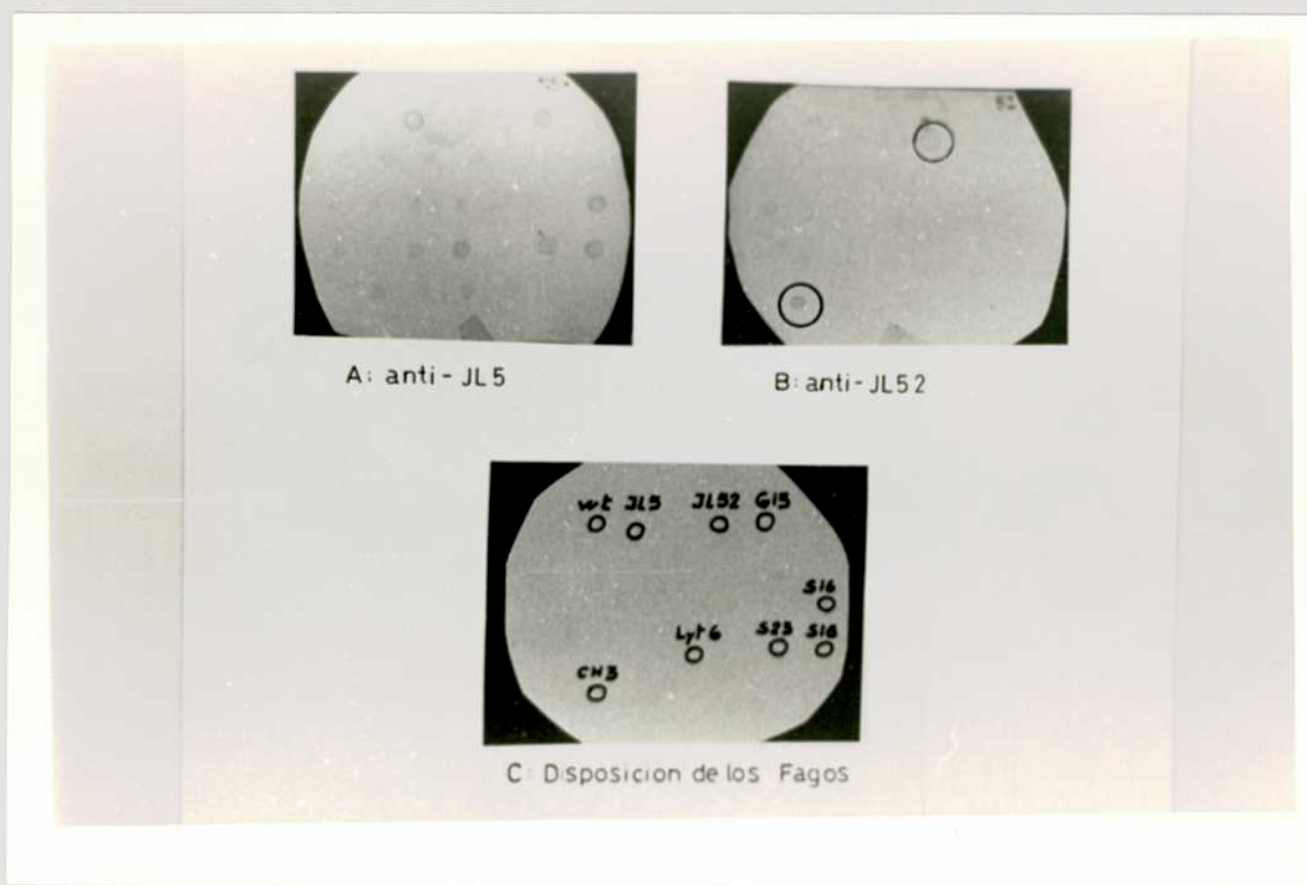


Figura R-2

Ensayo de placas de lisis de fagos λ gt11 con anticuerpos inmunoseleccionados de sueros de pacientes chagásicos (M&M, II.2.9.4). Los fagos se sembraron sobre un césped de *E.coli* Y1090. Antes de la formación de las placas de lisis se cubrieron con un filtro de nitrocelulosa para transferir las proteínas de fusión expresadas por los fagos recombinantes (M&M, II.2.9.5.2). (A) anti-JL5, (B) anti-JL52. La disposición de los fagos en los filtros de nitrocelulosa se indica en el panel C.

III.1.3. IDENTIFICACION POR HOMOLOGIA DE SECUENCIAS DE ADN.

III.1.3.1. Ensayo de placas de lisis con sondas radioactivas.

Los fagos mencionados en las experiencias anteriores fueron analizados por la técnica de *Dot blot* (M&M, II.2.6.1).

Los insertos de los fagos CH3, G13, L6 y S23 fueron utilizados para preparar sondas radioactivas (M&M, II.2.7). Las autoradiografías correspondientes se muestran en la Fig R-3. La sonda CH3 hibridizó únicamente con ADN de los fagos CH3 y JL52, en coincidencia con la reactividad con anticuerpos anti-JL52 (ver Figura R-2). La sonda S23 hibridizó con JL5, S16 y S18 pero no hibridizó con L6 ni con G13. La sonda G13 solo hibridizó con el ADN de G13 y la sonda L6 lo hizo solo con ADN del fago L6.

El análisis de los ensayos de placas de lisis con sueros, inmunosondas y sondas radioactivas permitió clasificar los fagos en cuatro grupos según se indica en la Tabla R-T1.

GRUPOS	Fago	tamaño(pb)*	Biblioteca de origen
P-JL5:	JL5	200	ADNc de epimastigotes
	S16	200	ADNc de epimastigotes
	S18	200	ADNc de epimastigotes
	S23	400	ADNc de tripomastigotes
P-G13:	G13	220	ADNc de tripomastigotes
P-L6:	L6	200	ADNc de tripomastigotes
P-JL52:	JL52	400	ADNc de epimastigotes
	CH3	1100	ADNc de tripomastigotes

* tamaño de insertos estimado a partir de amplificación por PCR (M&M, II.2.10.2)

La caracterización de cada grupo de fagos recombinantes se expone en los capítulos siguientes.

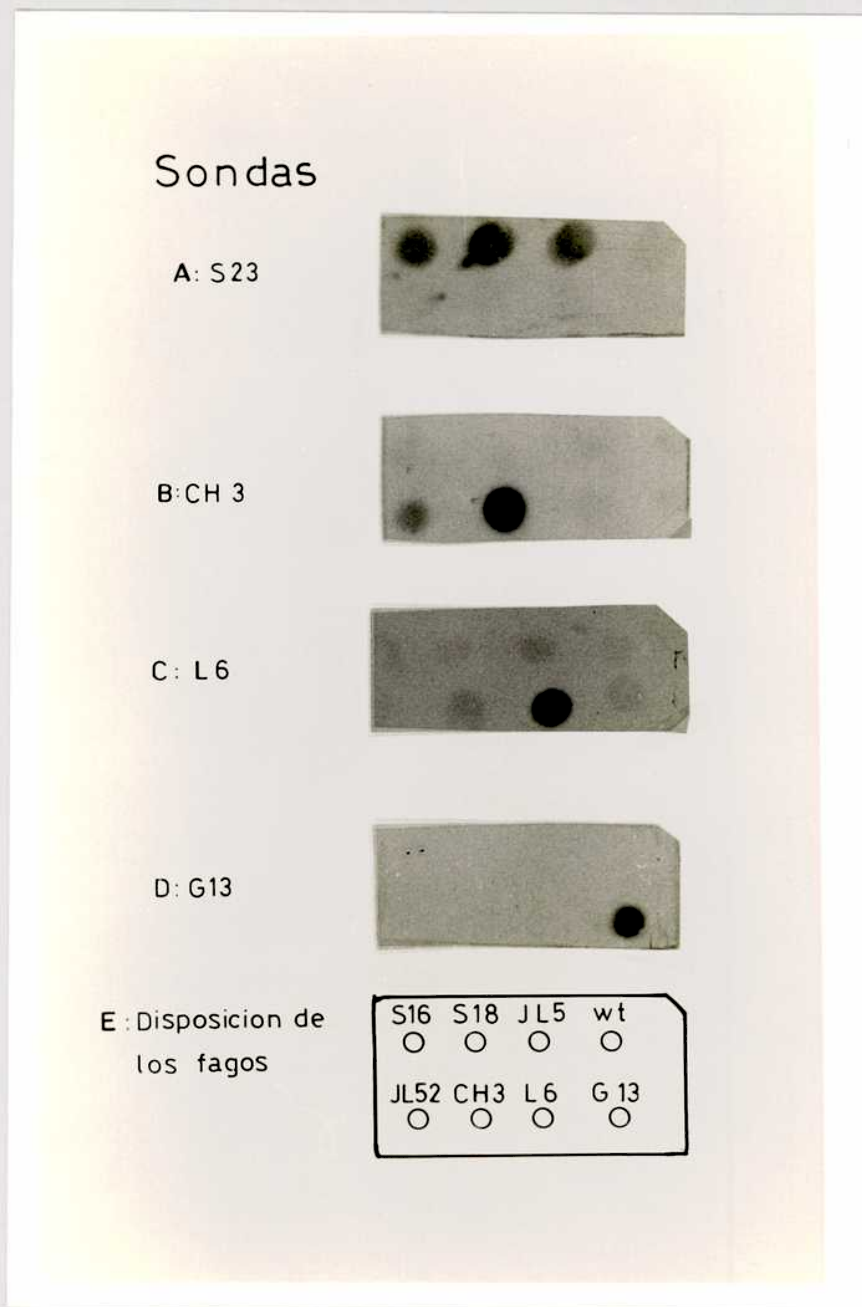


Figura R-3

Hibridización de ADN de los fagos λ gt11 recombinantes por *Dot Blot* con las sondas A) S23, B) CH3, C) L6 y D) G13, marcadas por *random priming* (II.2.6.1). La disposición de los fagos en los filtros de nitrocelulosa se indica en el panel E.

III.2.: PROTEINA RIBOSOMAL Tc P-JL5

III.2.1. CARACTERIZACION DE LOS FAGOS DEL GRUPO P-JL5.

El origen del ADNc JL5 fue descrito en la Introducción (I.4.1). Su secuencia codificaba los 35 aminoácidos carboxiterminales de una proteína ribosomal P de *T. cruzi* (ver Int., Figura I.7). Esta porción de la proteína P-JL5 incluía las regiones de la bisagra, rica en alaninas y prolinas, la región rica en aminoácidos ácidos y el heptapéptido C-terminal conservado en las proteínas P de eucariontes.

III.2.1.1. Caracterización de los fagos S16 y S18.

El tamaño de los insertos de estos fagos fue semejante al del ADNc JL5. La secuencia de ambos fue idéntica a JL5, indicando que se trataba de un mismo clon, aislado de la misma biblioteca amplificada, o bien de una contaminación del fago JL5 en los stocks utilizados para los ensayos de placas de lisis.

III.2.1.2. Caracterización del fago S23.

El fago *S23* fue aislado de la biblioteca de ADNc de tripomastigotes sanguíneos (cepa RA) y clasificado dentro del grupo P-JL5 (Tabla RT-1).

En *Northern blots* de ARN total de epimastigotes de *T. cruzi* (Tul 2), la sonda S23 hibridizó con bandas de longitud similar a las especies de ARNm detectadas con la sonda del fago JL5 original (Levin y col, 1989) (Fig R-4).

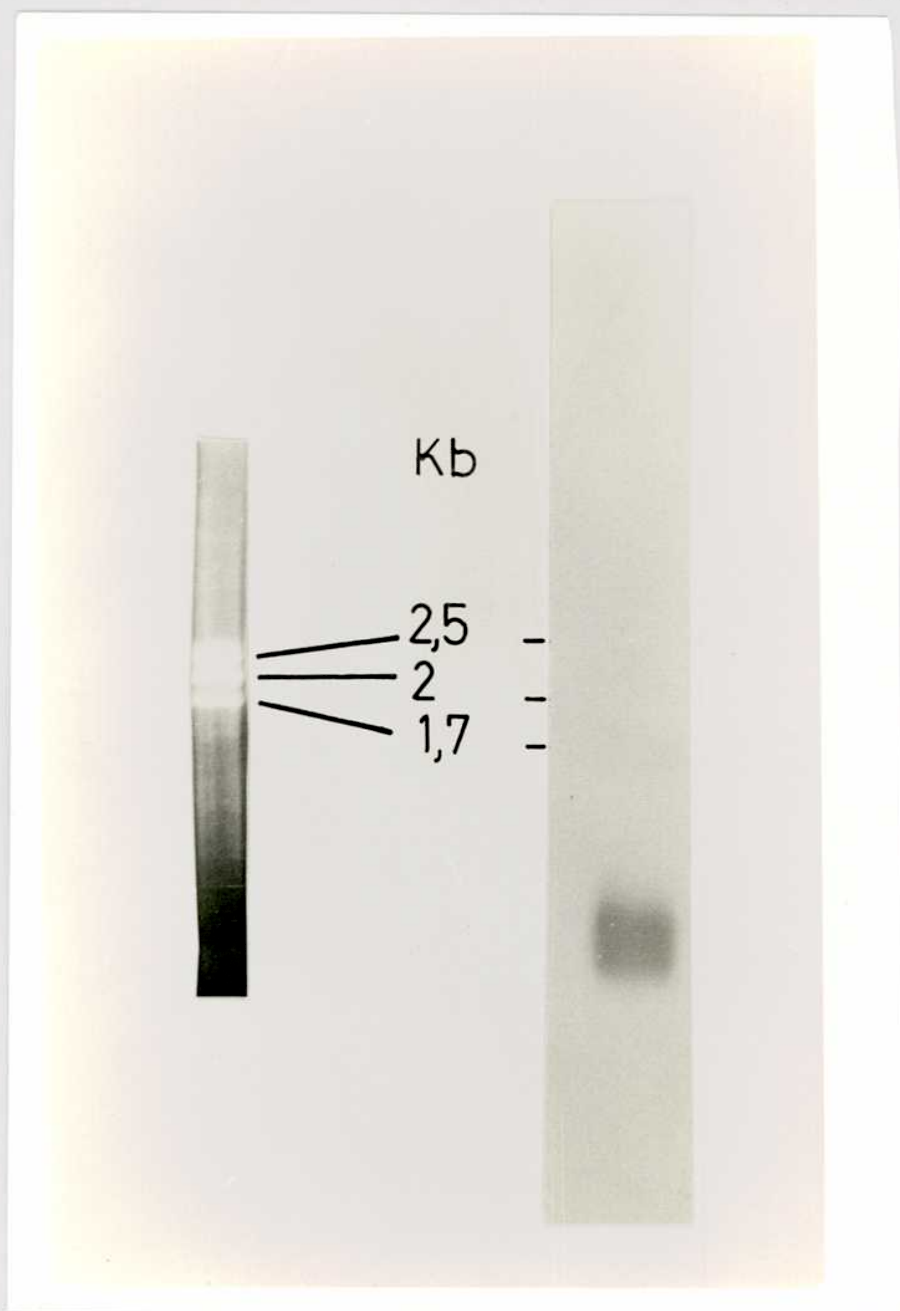


Figura R-4

Análisis de *Northern Blot* de ARN total de epimastigotes de *T. cruzi* (Tul 2). Se sembraron 20 μ g de ARN en un gel de 1,5 % agarosa-formaldehído (M&M, II.2.3.3). Se muestran las especies α (1,7 kb) y β (2 kb) del ARNr 24 S y el ARNr 18 S (2,5 kb) de *T. cruzi*, utilizados como referencia de PM (Castro y col, 1981). El gel fue procesado según se indica en M&M (II.2.6.4) y fue hibridizado con sonda S23 marcada por *random priming* (M&M, II.2.7). Las condiciones de hibridización y lavados a alta rigurosidad se indican en M&M II.2.6.5.1.

Resultados

El inserto *S23* fue subclonado en el vector M13mp18 EcoR1/BAP y secuenciado (M&M, II.2.11; II.2.12). La secuencia nucleotídica y aminoacídica deducida, se presenta en la Figura R-5.

```

          10          20          30          40          50
          *          *          *          *          *
GAA TTC CCC GCT TAC GCT CTT GTT GGC TTA TCT GGG GGG ACC CCC TCG AAG TCT GCC
e  f  p  A  Y  A  L  V  G  L  S  G  G  T  P  S  K  S  A

          60          70          80          90          100          110
          *          *          *          *          *          *
GTT GAG GCC GTA TTG AAG GCT GCC GGC GTT CCT GTT GAT CCT TCT CGC GTG GAT GCA
V  E  A  V  L  K  A  A  G  V  P  V  D  P  S  R  V  D  A

          120          130          140          150          160          170
          *          *          *          *          *          *
CTT TTT GCC GAG TTT GCA GGC AAG GAC TTT GAT ACG GTA TGC GCT GAA GGC AAA TCG
L  F  A  E  F  A  G  K  D  F  D  T  V  C  A  E  G  K  S

          190          200          210          220          230
          *          *          *          *          *
AAG CTT GTA GGA GGG GTT GCA CGT CCC AAT GCT GCC ACC GCT TCT GCA CCC ACT GCC
K  L  V  G  G  V  A  R  P  N  A  A  T  A  S  A  P  T  A

          240          250          260          270          280          290
          *          *          *          *          *          *
GCT GCC GCC GCC TCT GGT GGT GCC GCC GCG CCT GCT GCA GCT GCG GAA GAG GAG GAG
A  A  A  A  S  G  G  A  A  A  P  A  A  A  A  E  E  E  E

          300          310          320          330          340          350
          *          *          *          *          *          *
GAT GAC GAC ATG GGA TTT GGT CTT TTT GAC TAA AGAC AAATGCTTAT TTTATTTTAT TTTT
D  D  D  M  G  F  G  L  F  D  *

          360          370          380          390          400          410
          *          *          *          *          *          *
GATTTT GTTTGTGTGC TGTCCATGAA GAGGCGCTAG AGTCCTGTGA ATAAAAAAAAA GGAATTC

```

Figura R-5

Secuencia nucleotídica y aminoacídica deducida del ADNc *S23*. La traducción de la secuencia nucleotídica se realizó con el sistema: *PUSTELL Sequence Analysis Software* (International Biotechnologies, Inc (IBI) N.H.). Se indican en *itálica* los sitios EcoR1 de clonado.

III.2.1.3. Descripción de la secuencia del ADNc S23.

La secuencia del inserto S23 evidenció un ADNc, originado a partir de un transcripto poliadenilado, que codificaba 102 aminoácidos en fase de lectura con la β -galactosidasa; los 35 codones carboxiterminales resultaron idénticos a los de JL5.

Las secuencias nucleotídicas de S23 y JL5 pudieron ser alineadas en toda su extensión, sin embargo el extremo 3' no codante de S23 presentó 14 pb adicionales 5' adyacentes a la cola de poli A. Esto indicó que el ARNm S23, se poliadeniló 14 b río abajo que el correspondiente a JL5.

El alineamiento de las regiones 3' no codantes de ambas secuencias permitió detectar dos sustituciones nucleotídicas.

Comparación de las secuencias 3' no codantes de los ADNc JL5 y S23

JL5 TAA AGACAAATGC TTATTTTATT TTATTTTGA TTTTGGTTTCT GTGTTGTCCA

*

S23 TAA AGACAAATGC TTATTTTATT TTATTTTGA TTTTGGTTTGT GTGCTGTCCA

JL5 TGAAGAGGCG CT(A)_n

S23 TGAAGAGGCG CTAGAGTCCTGTGAAT(A)_n

Las secuencias nucleotídicas de las regiones codantes comunes en S23 y JL5 resultaron idénticas; la región más aminoterminal aportada por S23 presentó homología con las regiones equivalentes de las proteínas P1 y P2 eucarióticas (Int., Cap 3). Sin embargo, no era completa: no se encontró la metionina N-terminal.

Resultados

La secuencia aminoacídica completa de P-JL5 consta de 107 residuos (PM = 10,510), en concordancia con el PM estimado en *Western blots* de ribosomas de *T.cruzi* con anticuerpos anti-JL5 (14-15 kDa; Int, I.4.3). Asimismo, el tamaño del ARNm P-JL5, deducido por superposición de secuencias N-S23 y JL5, coincide con el de la banda de aprox. 600 b revelada por *Northern blot* (Figura R-4; Levin y col., 1989).

La secuencia nucleotídica completa del ARNm P-JL5 de *T.cruzi* (Tul 2) y la secuencia aminoacídica deducida se muestran en la Figura R-6.

Resultados

```

          10          20          30          40          50
          *          *          *          *          *
GTTCCTGTACTATATTG TTG TCT TGT CAG ATG AAG TAC CTT GCC GCT TAC GCT CTT GTT
| m i n i e x ó n      M  K  Y  L  A  A  Y  A  L  V
└ 5' N-S23
                                     L 5'S23

          60          70          80          90          100          110
          *          *          *          *          *          *
GGC CTC TCA GGA GGG ACC CCC TCA AAG TCT GCA GTT GAG GCC GTA TTG AAG GCT GCC
 G  L  S  G  G  T  P  S  K  S  A  V  E  A  V  L  K  A  A

          120          130          140          150          160          170
          *          *          *          *          *          *
GGC GTT CCT GTC GAT CCT TCT CGC GTG GAT GCA CTT TTT GCC GAG TTT GCA GGC AAG
 G  V  P  V  D  P  S  R  V  D  A  L  F  A  E  F  A  G  K

          180          190          200          210          220
          *          *          *          *          *
GAC TTT GAT ACG GTA TGC ACT GAA GGC AAA TCG AAG CTT GTA GGA GGG GTT ACA CGT
 D  F  D  T  V  C  T  E  G  K  S  K  L  V  G  G  V  T  R

          230          240          250          260          270          280
          *          *          *          *          *          *
CCC AAT GCT GCC ACC GCT TCT GCA CCC ACT GCC GCT GCC GCC TCT AGT GGT GCC
 P  N  A  A  T  A  S  A  P  T  A  A  A  A  A  S  S  G  A
                                     └ 5' JL5

          290          300          310          320          330          340
          *          *          *          *          *          *
GCC GCG CCT GCT GCA GCT GCG GAA GAG GAG GAG GAC GAT GAC ATG GGA TTT GGT CTT
 A  A  P  A  A  A  A  E  E  E  E  D  D  D  M  G  F  G  L
                                     3' N-S23

          350          360          370          380          390
          *          *          *          *          *
TTT GAC TAA AGA CAA ATG CTT ATT TTA TTT TAT TTT TGA TTT TGT TTC TGT GTT GTC
 F  D  -

          400          410          420          430
          *          *          *          *
CAT GAA GAG GCG CTA AAA AAA AAA AAA AAA AAA
                                     3' JL5

```

Figura R-6

Secuencia nucleotídica y aminoacídica deducida del transcripto P-JL5. La secuencia del ARNm P-JL5 fue depositada en el banco de datos EMBL con el n° de acceso: X 52323 / P-JL5, 1990. Se indican las posiciones de los extremos de los fragmentos superpuestos N-S23, S23 y JL5.

Resultados

La comparación de las secuencias nucleotídicas de las regiones comunes en N-S23 (Tul 2) y S23 (RA), evidenció la existencia de diez cambios nucleotídicos, tres de ellos dando lugar a sustituciones aminoacídicas: dos cambios de Thr por Ala (residuos 55 y 66) y uno de Ser por Gly (residuo 84) en S23 y N-S23, respectivamente:

P-JL5 (N-S23) MKYLAAYALV GLSGGTPSKS AVEAVLKAAG VPVDPSRVDA LFAEFAGKDF

S23 AYALV GLSGGTPSKS AVEAVLKAAG VPVDPSRVDA LFAEFAGKDF

P-JL5 DTVCAEGKSK LVGGVARPNA ATASAPTAAA AASGGAAAPA AAAEEEEEDDD MGFGLFD

S23 DTVCTEGKSK LVGGVTRPNA ATASAPTAAA AASSGAAAPA AAAEEEEEDDD MGFGLFD
JL5 ATASAPTAAA AASSGAAAPA AAAEEEEEDDD MGFGLFD

A pesar de que los ADNc S23 y N-S23 provienen de dos cepas diferentes de *T. cruzi*, la variación en las secuencias sugirió que podría existir más de un gen que exprese P-JL5. Asimismo, el cambio de Gly por Ser ocurría también con respecto a la secuencia del fago JL5 original, que fue aislado de la misma biblioteca que N-S23.

Análisis de *Southern blot* genómico de *T. cruzi* (Tul 2) indicó la existencia de al menos 4 loci para P-JL5 (ver este Cap; II.2.3.1, Figura R-8). El perfil genómico de fragmentos de restricción indicaba que la proteína ribosomal P-JL5 estaría codificada por una familia multigénica; entonces se decidió investigar la existencia de transcritos distintos en una misma cepa y estadio parasitario.

Para analizar esta hipótesis se construyó una nueva biblioteca de ADNc de epimastigotes de *T. cruzi* (Tul 2), enriquecida en moléculas de ARNm P-JL5.

III.2.3. Clonado de la familia de transcriptos P-JL5:

III.2.3.1. Construcción de una biblioteca de ADNc enriquecida.

La construcción de la biblioteca se basó en el uso de un oligonucleótido complementario a la secuencia codante del octapéptido carboxiterminal *DMGFGLFD* de P-JL5, como cebador específico para la reacción de transcripción reversa, a partir de ARN poli A⁺ del parásito (M&M, II.2.4.1; Figura M&M-1). Los ADNc sintetizados fueron clonados en el vector λ gt11 (M&M; II.2.4.1.4). Del rastreo de 10000 fagos (90% recombinantes) con una sonda radioactiva N-S23, se seleccionaron unos 50 clones positivos, de los cuales 15 fueron purificados tras tres rondas de rastreo y amplificados a un título de 10^{10} - 10^{11} ufp/ml (M&M, II.2.6.1.1; II.2.8.5.3).

Con el objetivo de subclonar y secuenciar aquellos ADNc que presentan secuencias codantes completas de P-JL5, se seleccionaron siete fagos que presentaron insertos de al menos 350 pb (Tabla R-T2). El tamaño de los insertos se determinó por amplificación por PCR a partir de los fagos amplificados (M&M, II.2.10.2) y/o por *Fill in* de ADN digerido con Eco R1 (M&M, II.2.10.1).

Fagos	Tamaño de insertos (PCR)	(Eco R1)
PA	250	ND
PB	250	ND
PC	220	ND
PE	400	350
*PF	1000	350 + 600
PJ	280	ND
PM	300	ND
*PO	650	350 + 250
PQ	220	ND
PR	320	ND
P123	400	350
P127	400	350
3D	280	ND
*5D	1000	420 + 570
9D	400	350

TABLA RT-2

* En algunos casos (PF, PO y 5d) se observó divergencia entre el tamaño del producto de amplificación por PCR y el de los insertos liberados con Eco R1 por digestión del ADN del fago.

III.2.3.2. Subclonado y secuenciación de los ADNc P-JL5:

Los insertos de los 7 fagos seleccionados, fueron subclonados en el vector M13mp18. Los ADNc cuyos tamaños determinados por PCR y por corte con Eco R1 coincidían, fueron subclonados a partir del inserto amplificado por PCR. Aquellos con longitud divergente (Tabla R-T2) fueron subclonados por purificación de los fragmentos Eco R1 de un gel de agarosa y subclonado independiente de cada fragmento (M&M, II.2.11.2). Los subclones obtenidos fueron procesados para su secuenciación (M&M, II.2.12).

III.2.3.3. Identificación de transcriptos que codifican para isoformas de la proteína P-JL5.

La secuenciación de los 7 ADNc P-JL5 permitió clasificarlos en 4 subgrupos de acuerdo a sustituciones nucleotídicas características:

Subgrupos	Clones de ADNc
P-JL5 A :	5d
P-JL5 B :	9d, PO
P-JL5 C :	P127, PF
P-JL5 D :	PE

Las secuencias nucleotídicas de los ADNc de los cuatro subgrupos P-JL5 se muestran en la Figura R7-A. Se encontraron sustituciones en 14 posiciones de la región codante.

En el extremo 5' las 7 moléculas de ADNc seleccionadas presentaron porciones del miniexón de longitud variable (4 a 22 pb). Los ADNc correspondientes a los subgrupos P-JL5 B, C y D presentaron una región 5' no codante de 12 pb, como en el caso del ADNc N-S23 (ver Fig R-6). En cambio, el ADNc P-JL5 A, presentó una región 5' no codante de 62 pb (ver Fig R7-A)

Resultados

```

A   ATACAGTTTCTGTACTATATTGATAATTTTCAGGATCCGGCCAGCTGCCCGGAG
B   ... TTTCTGTACTATATTG
C   ... ATTG
D   AGTTTCTGTACTATATTG

A   GATTATTCTGCTTTATAAGTTGTCTTGTTCAG ATGAAGTACCT TGCCGCTTAT GCTCTTGTTG
B   TTGTCTTGTTCAG ATGAAGTACCT TGCCGCTTAC GCTCTTGTTG
C   TTGTCTTGTTCAG ATGAAGTACCT TGCCGCTTAC GCTCTTGTTG
D   TTGTCTTGTTCAG ATGAAGTACCT TGCCGCTTAC GCTCTTGTTG

A   GCCTCTCAGG GGGGACCCCC TCAAAGTCTG CAGTTGAGGC CGTATTGAAG GCTGCCGGCG
B   GCCTCTCAGG AGGGACCCCC TCAAAGTCTG CAGTTGAGGC CGTATTGAAG GCTGCCGGCG
C   GCTTATCTGG GGGGACCCCC TCGAAGTCTG CCGTTGAGGC CGTATTGAAG GCTGCCGGCG
D   GCCTCTCAGG AGGGACCCCC TCAAAGTCTG CAGTTGAGGC CGTATTGAAG GCTGCCGGCG

                                     Pst1
A   TTCCTGTCGA TCCTTCTCGC GTGGATGCAC TTTTGGCCGA GTTTGCAGGC AAGGACCTTG
B   TTCCTGTCGA TCCTTCTCGC GTGGATGCAC TTTTGGCCGA GTTTGCAGGC AAGGACTTTG
C   TTCCTGTTGA TCCTTCTCGC GTGGATGCAC TTTTGGCCGA GTTTGCAGGC AAGGACTTTG
D   TTCCTGTCGA TCCTTCTCGC GTGGATGCAC TTTTGGCCGA GTTTTCAGGC AAGGACTTTG

A   ATACGGTATG CACTGAAGGC AAATCGAAGC TTGTAGGAGG GGCTACACGT CCAATGCTG
B   ATACGGTATG CACTGAAGGC AAATCGAAGC TTGTAGGAGG GGTTACACGT CCAATGCTG
C   ATACGGTATG CGCTGAAGGC AAATCGAAGC TTGTAGGAGG GGTTGCACGT CCAATGCTG
D   ATACGGTATG CACTGAAGGC AAATCGAAGC TTGTAGGAGG GGTTACACGT CCAATGCTG

                                     HindIII
A   CCACCGCTTC TGCACCCACT GCCGCTGCCG CCGCCTCTAG TGGTGCCGCC GCGCCTGCTG
B   CCACCGCTTC TGCACCCACT GCCGCTGCCG CCGCCTCTAG TGGTGCCGCC GCGCCTGCTG
C   CCACCGCTTC TGCACCCACT GCCGCTGCCG CCGCCTCTGG TGGTGCCGCC GCGCCTGCTG
D   CCACCGCTTC TGCACCCACT GCCGCTGCCG CCGCCTCTAG TGGTGCCGCC GCGCCTGCTG

                                     Pst1
A   CAGCTGCGGA AGAGGAGGAG GACGATGACA TGGGATTTGG TCTTTTTGAC
B   CAGCTGCGGA AGAGGAGGAG GACGATGACA TGGGATTTGG TCTTTTTGAC
C   CAGCTGCGGA AGAGGAGGAG GACGATGACA TGGGATTTGG TCTTTTTGAC
D   CAGCTGCGGA AGAGGAGGAG GACGATGACA TGGGATTTGG TCTTTTTGAC
PvuII                                     región del oligonucleótido

```

Figura R7-A

Alineamiento de las secuencias nucleotídicas de transcritos P-JL5.
 Las secuencias nucleotídicas de 6 ADNc fueron agrupadas en cuatro tipos de transcritos P-JL5, según las sustituciones de bases marcadas en **negrita**. Se indican: en el extremo 5' las secuencias parciales del miniexón (los puntos indican variabilidad en la longitud del miniexón en los ADNc de un mismo tipo); en el extremo 3' la secuencia complementaria a la del oligonucleótido utilizado para la síntesis del ADNc (M&M, II.2.4.1). Se subrayan el codón de iniciación y los sitios de restricción Hind III, Pst 1, y Pvu II.

Resultados

El alineamiento de las secuencias aminoacídicas deducidas de los ADNc, permitió identificar 4 isoformas de P-JL5 (Figura R7-B), distinguibles por mutaciones puntuales. Se encontraron variaciones en 6 codones:

Ser (P-JL5-D) por Ala (P-JL5 A-B-C)
Leu (P-JL5-A) por Phe (P-JL5 B-C-D)
Ala (P-JL5-C) por Thr (P-JL5 A-B-D)
Ala (P-JL5-A) por Val (P-JL5 B-C-D)
Ala (P-JL5-C) por Thr (P-JL5 A-B-D)
Gly (P-JL5-C) por Ser (P-JL5 A-B-D).

1

A MKYLAAYALV GLSGGTPSKS AVEAVLKAAG VPVDPSRVDA LFAEFAGKDL
B MKYLAAYALV GLSGGTPSKS AVEAVLKAAG VPVDPSRVDA LFAEFAGKDF
C MKYLAAYALV GLSGGTPSKS AVEAVLKAAG VPVDPSRVDA LFAEFAGKDF
D MKYLAAYALV GLSGGTPSKS AVEAVLKAAG VPVDPSRVDA LFAEFSGKDF

51

A DTVCTEGKSK LVGGATRPNA ATASAPTAAA AASSGAAAPA AAAEEEEEDDD MGFGLED
B DTVCTEGKSK LVGGVTRPNA ATASAPTAAA AASSGAAAPA AAAEEEEEDDD MGFGLED
C DTVCAEGKSK LVGGVARPNA ATASAPTAAA AASGGAAAPA AAAEEEEEDDD MGFGLED
D DTVCTEGKSK LVGGVTRPNA ATASAPTAAA AASSGAAAPA AAAEEEEEDDD MGFGLED

Figura R7-B

Alineamiento de las secuencias aminoacídicas P-JL5. Traducción de las secuencias de la Figura R7-A. Se subrayan los cambios aminoacídicos entre las isoformas P-JL5.

III.2.4. ORGANIZACION GENOMICA DE P-JL5.

III.2.4.1. Caracterización genómica de P-JL5.

El inserto JL5 fue utilizado como sonda radioactiva para identificar fragmentos genómicos homólogos por *Southern Blot* (M&M, II.2.6.3). El ADN de epimastigotes (Tul 2) digerido con Bam H1, Eco R1, Hind III y Kpn 1, originó 4 fragmentos genómicos hibridizantes diferentes (Figura R8-A)

Bam H1: 1 kb; 2,2 kb; 4,5 kb; 8,9 kb.

Eco R1: 1 kb; 5,6 kb; 7,5 kb; 11 kb.

Hind III: 1,3 kb; 1,5 kb; 1,8 kb; 6,4 kb.

Kpn 1: 5,5 kb, 6 kb, 8,8 kb y 10 kb

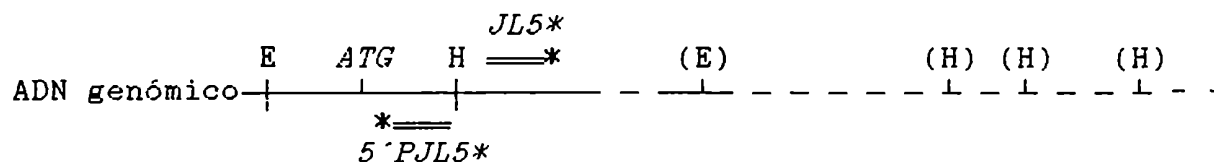
Teniendo en cuenta que el inserto JL5 no presenta sitios de corte para ninguna de estas enzimas, se asumió que la proteína ribosomal P-JL5 estaría codificada por al menos 4 genes ubicados en entornos genómicos distintos. De estos cuatro sitios de restricción analizados, solo el sitio Hind III se halla en todos los ADNc P-JL5 (ver Figura R 7-A). Por lo tanto, los fragmentos Hind III revelados con la sonda JL5, corresponden a las porciones 3' de los genes P-JL5. Teniendo en cuenta la existencia en *T. cruzi* de familias de genes organizados en tandem, se analizó este tipo de organización para el sistema P-JL5, por digestiones parciales con Hind III. Estas no revelaron el perfil en escalera esperado para casos de copias en tandem.

Southern blots de ADN digerido con Bam H1 y Eco R1, hibridizados con sonda N-S23 reveló el mismo perfil de fragmentos que el obtenido con la sonda JL5, indicando que los fragmentos genómicos EcoR1 y Bam H1 deberían contener las regiones codantes completas de las copias genómicas P-JL5 (Fig R8-B).

Una sonda 5'P-JL5 (ver Fig R8-C), permitió identificar:

4 fragmentos genómicos Hind III: de 8 kb, 12kB, >12 kb no revelados por la sonda JL5, más uno de 6,4 kb, tamaño semejante a uno de los fragmentos HindIII detectados por JL5 (ver Figura R8-A). Los 3 fragmentos Hind III de mayor PM corresponden a las porciones 5' adyacentes al sitio Hind III interno de los genes P-JL5. Este también podría ser el caso del fragmento de 6,4 kb, pero no puede descartarse de que se trate de un único fragmento Hind III de 6,4 kb, polimórfico para el sitio HindIII interno de la región codante P-JL5.

un solo fragmento Eco R1 + HindIII de 400 pb, sugiriendo que las 200 pb 5'adyacentes al codón de iniciación eran similares en las distintas copias P-JL5 (Figura R8-C y esquema).



Se indican en **negrita** las extensiones de las sondas 5'P-JL5 y JL5 (ver esquema en Res., II.2.1) E: Eco R1; ATG: codón de iniciación P-JL5; H:Hind III; Pv:Pvu II; Ps: Pst1. Las líneas discontinuas y los sitios de corte entre paréntesis simbolizan fragmentos genómicos ubicados en loci distintos, deducidos de las experiencias de *Southern Blot*.

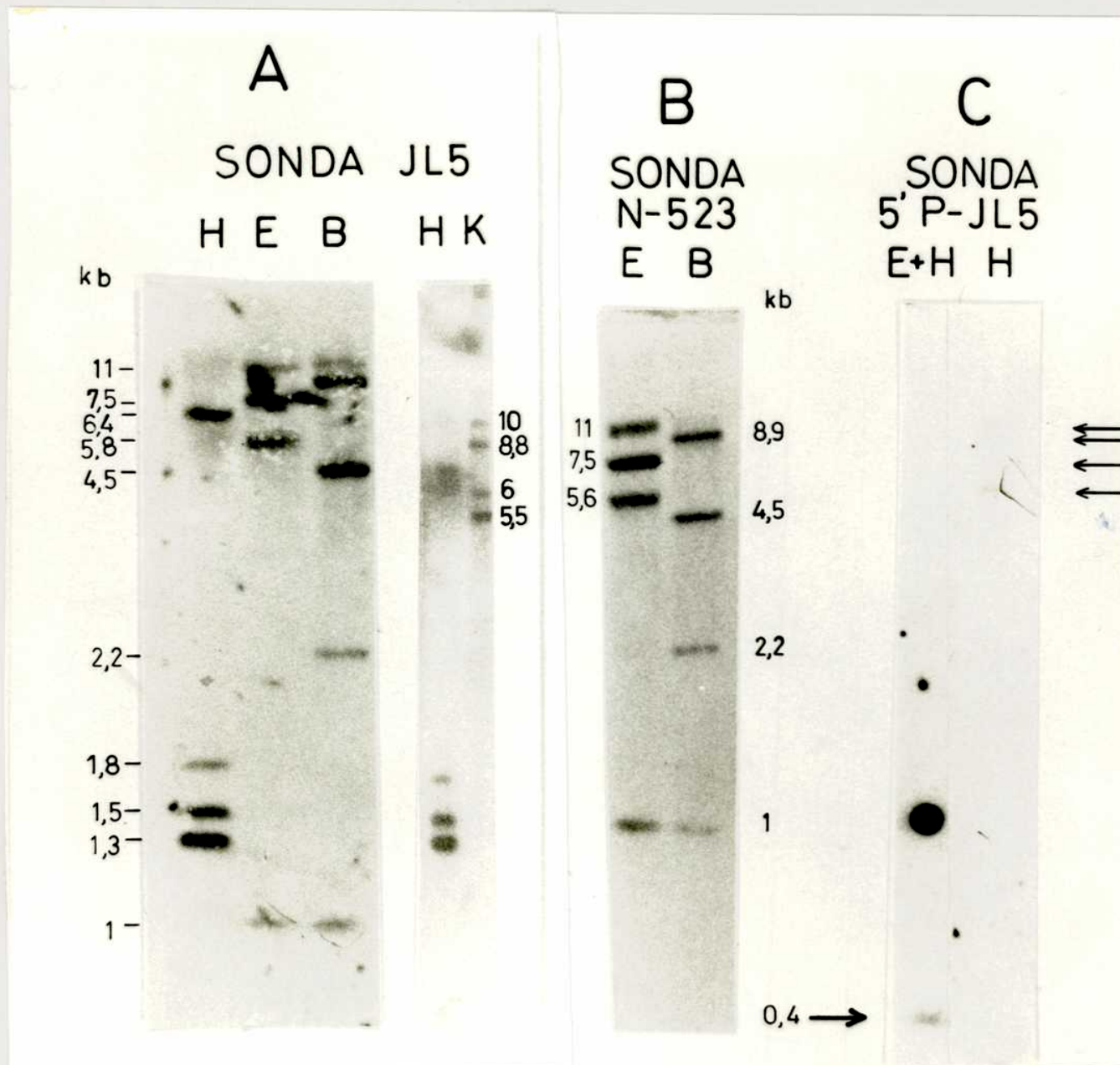


Figura R-8

Southern blot de ADN genómico de epimastigotes de la cepa Tul 2 de *T. cruzi*. El ADN genómico fue digerido con las Enzimas de Restricción indicadas en la Figura: B: Bam H1, E: Eco R1, H: Hind III, K: Kpn I; E + H: Eco R1 + Hind III (M&M, II.1.4).

A) Sonda JL5 ; izquierda: gel de agarosa 1% con 8 μ g de ADN por carril; derecha: gel de agarosa 0,8% con 3 μ g de ADN por carril

B) Sonda N-S23; gel de agarosa 1% con 8 μ g de ADN por carril.

C) Sonda 5'P-JL5; gel de agarosa 1% con 3 μ g de ADN por carril. Las flechas indican las bandas HindIII y la banda EcoR1-Hind III de 0,4 kb. La transferencia de los geles se realizó a filtros Hybond N según M&M, II.2.6.3. Las sondas fueron preparadas por *random priming* (M&M, II.2.7) y las hibridizaciones fueron realizadas a alta rigurosidad según (M&M, II.2.6.5).

Resultados

Para analizar las regiones 3'flanqueantes de los genes P-JL5, el ADN genómico se digirió con Pst1, con Pvu II, con Pst1 + PvuII, Pst1 + Eco R1 y Pst1 + HindIII. Como sonda radioactiva 3' P-JL5, se usó un fragmento 3' Pst1-EcoR1 obtenido por corte del ADNc S23 con Pst1 (Fig R-9).

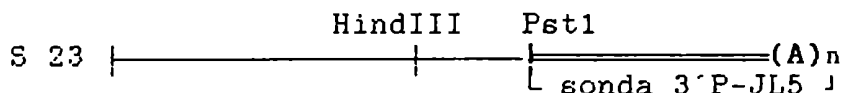
El perfil de hibridización de ADN digerido con Pvu II mostró una banda intensa de 300 pb y una débil de 700 pb (Fig R9-A). El perfil Pst1 mostró tres bandas (750 pb, 900 pb y 1100 pb) (Fig R9-B, carril 1). Dado que el número de fragmentos genómicos Pst1(3) y PvuII(2) fue menor al número de loci P-JL5 detectados (4), se infirió que:

tres de los cuatro loci compartirían secuencias similares en la región definida por el sitio PvuII, a aprox. 240 pb 3' del codón TAA (ver esquema) mientras el cuarto presentaría polimorfismo para este sitio.

dos de los cuatro loci presentarían secuencias similares de 750 pb, 900 pb o 1100 pb, definidas por alguno de los sitios Pst1 en común.

El perfil de hibridización de las digestiones dobles (Fig R9-B) sugirió que:

los fragmentos Pst1 presentan fragmentos internos PvuII-PvuII de 300 pb (carril 2) correspondientes al detectado por corte simple(Fig R9-A) No se observó el fragmento PvuII de 700 pb. el fragmento Pst1 de 1100 pb posee un sitio Eco R1 (carril 3). los fragmentos genómicos 3'HindIII contienen los fragmentos Pst1 (carril 4).



Se indica en **negrita** el fragmento Pst1 3' del ADNc S23 utilizado como sonda 3' JL5 (140 pb).

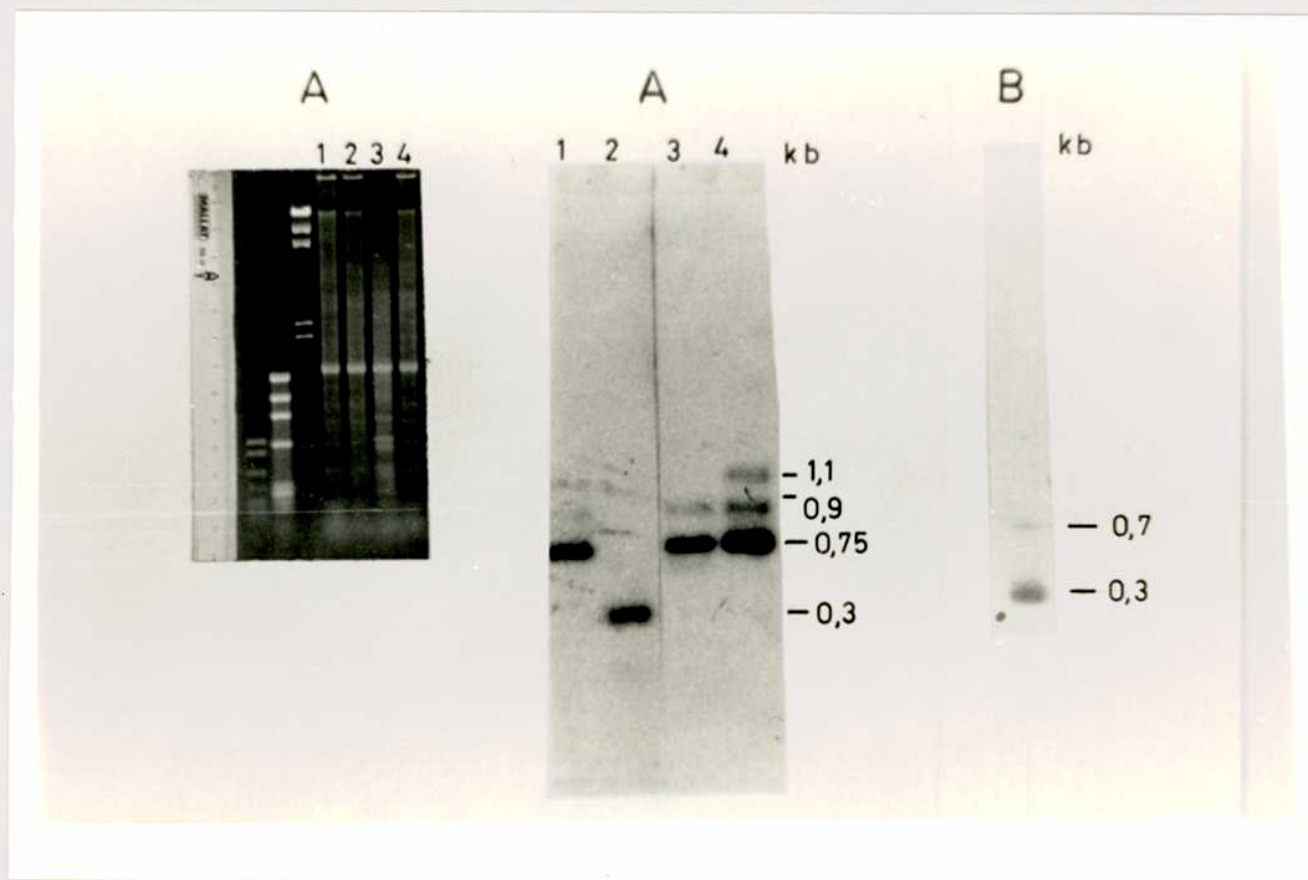


Figura R-9

Southern blot de digestiones de ADN genómico de epimastigotes de la cepa Tul 2 de *T. cruzi* hibridizado con sonda 3'JL5 marcada por *random priming*.

- A) Gel 1% de agarosa con 5 μ g de ADN por carril digerido con: 1) PstI, 2) PstI + Pvu II, 3) Pst I + EcoR1, 4) PstI + Hind III.
 B) Gel 1% de agarosa con 8 μ g de ADN digerido con PvuII. Las Enzimas de Restricción indicadas en la Figura: B: Bam H1, E: Eco R1, H: Hind III, K: Kpn I; E + H: Eco R1 + Hind III (M&M, II.1.4).

Las condiciones experimentales fueron similares a las indicadas en la Figura R-8. Marcadores de PM: de izq a der: pBR322/MspI - Phi X174/Hae III - λ HindIII.

III.2.5. CLONADO DE GENES P-JL5 .

Se decidió construir bibliotecas enriquecidas en los fragmentos genómicos Eco R1 de 1 kb y 5,6 kb, conteniendo secuencias codantes completas, y en los fragmentos genómicos HindIII de 1,3 kb, 1,5 kb, 1,8 kb y 6,4 kb, conteniendo las regiones 3' de los diferentes genes P-JL5 (M&M.II.2.4.2).

III.II.5.1. Bibliotecas enriquecidas en fragmentos Eco R1.

Fragmentos genómicos Eco R1 de 1 y 5,6 kb fueron clonados en el vector λ gt10 como se indica en M&M,II.2.4.2.2.1.

Se plaquearon 50000 fagos independientes (75 y 50 % de recombinantes en las biblioteca de 1 y 5,6 kb, respectivamente), se transfirió a filtros de nitrocelulosa (filtro original y réplica) y se hibridizó en condiciones de alta rigurosidad con una sonda N-S23 radioactiva (M&M,II.2.6.1.1). Se obtuvieron clones positivos solo de la biblioteca EcoR1 1 kb (3 fagos independientes). Estos fueron amplificados y se preparó ADN de dos de los mismos para obtener los insertos genómicos de 1 kb. Se subclonaron en el vector M13mp18/Eco R1 BAP y se secuenciaron. La secuencia de ambos fragmentos EcoR1 secuenciados fue idéntica (Figura R-10).

Para poder secuenciar 1 kb se utilizaron 2 oligonucleótidos sintéticos que se indican en la Figura R-10.

GAATTCTATATATTGAATGAGAATAAAAGATTGAGGCAATTAACTAAAGAACCTTT**TTTCCT**AACTTG
Eco R1

TTTGG**TTTC**CATAGATAATTT**CAGGATCCGGCCAGCTGCCCGGAGGATTATTCTGCTTTATAAGTTG**
Bam H1

1
TCTTGTCAG **ATG** AAG TAC CTT GCC GCT TAT GCT CTT GTT GGC CTC TCA GGG
M K Y L A A Y A L V G L S G
GGG ACC CCC TCA AAG TCT GCA **GTT GAG GCC GTA TTG AAG GCT** GCC GGC
G T P S K S A V E A V L K A A G
GTT CCT GTC GAT CCT TCT CGC GTG GAT GCA CTT TTT GCC GAG TTT GCA
V P V D P S R V D A L F A E F A
GGC AAG GAC CTT GAT ACG GTA TGC ACT GAA GGC AAA TCG AAG CTT GTA
G K D L D T V C T E G K S K L V
GGA GGG GCT ACA CGT CCC AAT GCT GCC ACC GCT TCT GCA CCC ACT GCC
G G A T R P N A A T A S A P T A
GCT GCC GCC GCC TCT AGT GGT GCC GCC GCG CCT GCT GCA GCT GCG GAA
A A A A S S G A A P A A A A E
GAG GAG GAG GAC GAT **GAC ATG GGA TTT GGT CTT TTT GAC TAA** AGACAAAT
E E E D D D M G F G L F D *

GCTTATTTTATTTTATTTTGGATTTTGTCTCTGTTTCCATGAAGAGGCGCCGGAGTCCTGTGAA
TAAAATGCGAGAGAGTAAATAAAAGTAGGATCAGTAACTGCTGCACTCAAACGCATGGCAAAAAGG
GTACGCCATTGGGTTGGCCTTTTTTTTAGGAGCTTGTGAAAAGAATGATCACGGGAGAGCTGGCTAA
CTTAATTAATGTATGTATATCCTGATAAATGAATGCATTCTTTATGATACTTTCTACCGTATGAA
TCTTTTGGGAAGAACGCGACTTTGTAGGGGCGGGAACCGATAGAGGCCGGATAATATTTTAAATTTT
ATTTTGCATCCCACCCACCCCTTGATTCCCACCACGCGGGGTCTTGTGGTTGGAGGACCCCA
AAGTCTGCCACTTCGTAAGTAATAATATTTCAAATCCTAACTGAGGACAAAGGACCATGCTAATGGT
CCACAGAATTC

Figura R-10

Secuencia nucleotídica del fragmento Eco R1 1 kb, conteniendo la secuencia codante completa del gen P-JL5-A de *T. cruzi*. Esta secuencia fue archivada en el banco de datos EMBL con el n° de acceso: X57841\ *T. cruzi* P-JL5 A gene (1991). Se subrayan las regiones de los oligonucleótidos internos utilizados para la secuenciación y los sitios Eco R1 y Bam H1. Se indican en negrita señales consenso de trans-splicing (Int, Cap 2).

III.2.5.1.1. Descripción de la secuencia del fragmento EcoR1 1kb.

Las secuencias nucleotídica y aminoacídica deducida del gen P-JL5, contenido en el fragmento Eco R1 de 1kb, resultó idéntica a la del ADNc P-JL5 A (Figura R7). Se lo denominó entonces gen P-JL5 A.

La región 5' no codante del gen P-JL5 A se extendió 146 pb río arriba del codón de iniciación ATG y la secuencia 3' flanqueante se extendió 489 pb río abajo del codón de terminación TAA.

III.2.5.2. Bibliotecas enriquecidas en fragmentos Hind III:

Fragmentos genómicos Hind III de 1,2 a 2 kb y de 5-7 kb fueron purificados de un gel de agarosa (M&M, II.2.4.2) y ligados al vector pBlueScribe SK+ - HindIII (M&M, II.2.(4)2.2.2). Las bibliotecas pBS-Hind III se obtuvieron por transformación de la cepa de *E.coli* DH5 α F' con las reacciones de ligación (M&M, II.2.11.3.2).

La biblioteca pBS-Hind III enriquecida en fragmentos P-JL5 de 1,3, 1,5 y 1,8 kb contó con 60 % de recombinantes. La construcción de la biblioteca enriquecida en fragmentos HindIII de 6,4 kb no resultó. Se obtuvo una cantidad insuficiente de colonias recombinantes (ver M&M, II.2.4.2.1).

Las bibliotecas se rastrearon con la sonda JL5 (M&M, II.2.6.2). A partir de las colonias positivas aisladas, se hicieron minipreparaciones de plásmidos, que se analizaron por digestión con Hind III seguida de *Southern blot* con sonda JL5 (Fig R11-A). Las colonias fueron clasificadas como H13, H15 y H18. Los insertos Hind III purificados (M&M, II.2.3.5.2) hibridizaron con una sonda 3'P-JL5 y no hibridizaron con una sonda 5'P-JL5, en concordancia con los perfiles Hind III de los *Southern* genómicos (Res, III.2.4.1.) (Fig R11-B).

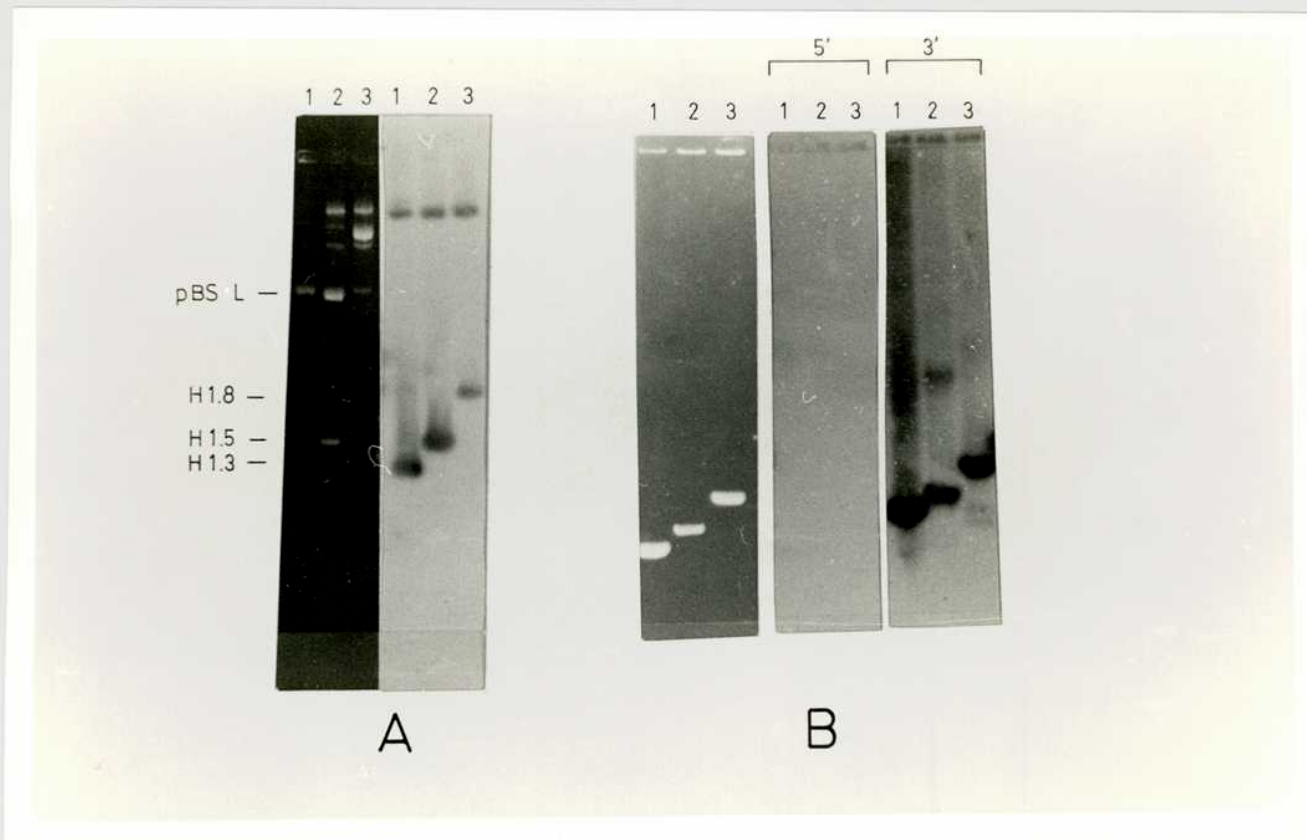
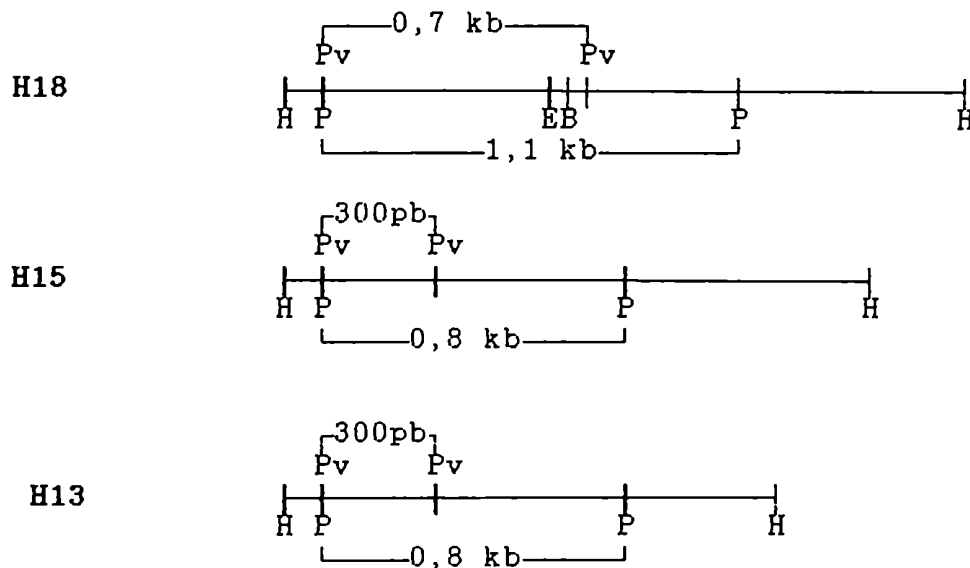


Figura R-11

- A) Gel de agarosa y *Southern blot* de ADN de plásmidos obtenidos de las colonias recombinantes H13, H15 y H18 y digeridos con Hind III. Se hibridizó con sonda JL5 marcada por *random priming*.
- B) Gel de agarosa y *Southern blots* de los insertos HIII purificados, a partir de digestiones de los plásmidos recombinantes H13, H15 y H18. El mismo filtro (Hybond N) fue hibridizado con una sonda 5'-JL5 (Res, II.2.1.), y relavado para una nueva hibridización con una sonda 3'-JL5 (Fig R-9).

III.2.5.3. Mapa de restricción de los plásmidos pBS-HindIII: H13, H15 y H18.

Los plásmidos H13, H15 y H18 fueron mapeados con enzimas de restricción. Se realizaron digestiones simples con Bam H1(B), EcoR1(E), Pvu II(Pv), Pst1(P), Sal 1, Kpn 1 y Sac 1; y dobles por agregado de HindIII a alícuotas de cada una de las digestiones simples (M&M, II.2.10.3). Los mapas se indican en el esquema de La Figura R-12.



Escala: [-] = 50 pb

No se encontraron sitios Kpn 1, Sal 1 ni Sac 1 en ninguno de los plásmidos. El inserto genómico H18 presentó un sitio Pst1 de 1,1 kb; coincidente con el tamaño un fragmento Pst1 revelado por *Southern blots* genómicos (Fig. R-9). Asimismo, presentó un sitio Eco R1 y un sitio Bam H1, a aproximadamente 600 pb río abajo del sitio Hind III interno P-JL5. Dado que la secuencia del fragmento EcoR1 de 1kb reveló la presencia de un sitio BamH1 en el extremo 5' no codante de P-JL5 (ver Figura R-10) se infirió que la porción del gen P-JL5 del fragmento H18, estaría contenida en los fragmentos BamH1 de 1kb y EcoR1 de 1 kb, detectados en los *Southern* genómicos (Fig R3-A-B).

Resultados

Los insertos H13 y H15 presentaron fragmentos internos Pst1 de 800 pb, de tamaño similar al de aprox. 750 pb detectado en los *Southern blots* genómicos (Fig R-9). Por lo tanto, el fragmento genómico Pst1 de 900 pb detectado en los *Southern* genómicos correspondería a otro gen P-JL5, probablemente al contenido en el fragmento Hind III de 6,4 kb.

III.2.5.4. Secuenciación de los fragmentos HindIII:

III.2.5.4.1. Secuenciación de las regiones codantes:

Identificación de las porciones C-terminales de tres isoformas P-JL5.

Para identificar las porciones carboxiterminales de las formas P-JL5 codificadas por los fragmentos genómicos H13, H15 y H18, el ADN doble cadena de cada plásmido recombinante fue secuenciado parcialmente, utilizando el *primer* universal -20 de M13, y el *primer* complementario al octapéptido carboxiterminal de P-JL5 (Fig R-12).

	Hd. III					
H13	<u>AAGCTT</u>	GTAGGAGG	GGTTGCACGT	CCCAATGCTG	CCACCGCTTC	
H15	<u>AAGCTT</u>	GTAGGAGG	GGTTACACGT	CCCAATGCTG	CCACCGCTTC	
H18	<u>AAGCTT</u>	GTAGGAGG	GGCTACACGT	CCCAATGCTG	CCACCGCTTC	
H13	TGCACCCACT	GCCGCTGCCG	CCGCCTCTGG	TGGTGCCGCC	GCGCCTGCTG	
H15	TGCACCCACT	GCCGCTGCCG	CCGCCTCTAG	TGGTGCCGCC	GCGCCTGCTG	
H18	TGCACCCACT	GCCGCTGCCG	CCGCCTCTAG	TGGTGCCGCC	GCGCCTGCTG	
H13	CAGCTGCGGA	AGAGGAGGAG	GACGATGACA	<u>TGGGATTTGG</u>	<u>TCTTTTTGAC</u>	
H15	CAGCTGCGGA	AGAGGAGGAG	GACGATGACA	<u>TGGGATTTGG</u>	<u>TCTTTTTGAC</u>	
H18	CAGCTGCGGA	AGAGGAGGAG	GACGATGACA	<u>TGGGATTTGG</u>	<u>TCTTTTTGAC</u>	

Figura R-13

Secuencias nucleotídicas obtenidas por el método de terminación de cadena con dideoxinucleótidos a partir de minipreparaciones de ADN de los plásmidos respectivos (M&M, II.2.(12)2).

Resultados

El análisis de las secuencias parciales H13, H15 y H18 reveló que:

cada uno de los fragmentos genómicos codificaba el extremo carboxiterminal de una forma P-JL5 distinta.

cada fragmento presentaba secuencias idénticas a la de alguno de los transcritos clonados.

las secuencias compartidas por H18 y el fragmento genómico EcoR1 de 1kb resultaron idénticas.

De esta forma pudo identificarse la región 3' de los genes que codifican por lo menos tres de las isoformas P-JL5:

GEN P-JL5	CLON GENOMICO	CLON DE ADNc
Gen P-JL5 A	H18	5d
Gen P-JL5 B	H15	9d, N-S23, PO
Gen P-JL5 C	H13	JL5, PF, P127

III.2.5.4.2. Secuenciación de los extremos 3' no codantes de los genes P-JL5 B y C.

Los plásmidos pBS H13 y pBS H15 fueron digeridos con Pst1. Los insertos Pst1-Pst1 (800 pb) fueron purificados por electroelución (II.2.3.5.1) y subclonados en un vector M13mp18/Pst1 dp. para su secuenciación (Figura R-14)

A. Subclon H13 Pst1-Pst1 (784 pb)

```

1 CTGCAGCTGC GGAAGAGGAG GAGGACGATG ACATGGGATT TGGTCTTTTT GACTAAAAGAC
61 AAATGCTTAT TTTATTTTAT TTTTGATTTT GTTTCTCTGT TGTCCATGAA GAGGCGCTGG
121 AGTCCTGTGA ATAAAATGCG AGAGAGTAAA TAAAAGTAGG AACAGTAACT GCTGCACTCA
181 AACGCATGGC AAAAAAGGGT ACGCCATTGG GTTGGCCTTT TTTTTCTTT TTTTCCCTT
241 TTAATTTTTG CTCTTATGAC CCTTCAGACA CGTAGAGAGA CAAGTACGAT ACAAGCCAGC
301 TGACGCTCTC GTCGTTAGTT GCACTGTGCG CGGCTTGTTT GAGCTTTTGT TTGGAAGGAC
361 CGCGAGAGTT CTGGACAATC AAAGCCGCGC ACCAAAAGAT GGAAAATCAG TTTGCGCGGT
421 TGCCAAACAA CGTCGACAAG AGGACTGCGA ACTTTGCGAA CGTTACTGCC ATCGAGTTTC
481 ATCTGTTTGC CCTGACTCGA AGGATATCGA ACGTTTTGAG GCTTTGGGAT ATAAGGAGGT
541 AGCAAGAAGG ACTTCCTTAG ATGGATTACC CACGGTTCAG TAGATGTCTA GGTGCGAGAA
601 CGCTGTTTCG GAGTTCTCAA GAGTTCTTTT TTRACTCGCG CACAAGCCTA GTAAGGTGGC
661 ATTTGAGGAT GTTGACCCGA AAAGTGGCTT GAAAAAAGT GAGGAAGGTG GTGATGGTGA
721 AGCCAACCGA GCTTCATAAA AAGGTACTTA GTGGTGGATC TCAATAGATC ACGCCATCCT
781 GCAG

```

B. Subclon H15 Pst1-Pst1 (774 pb)

```

1 CTGCAGCTGC GGAAGAGGAG GAGGACGATG ACATGGGATT TGGTCTTTTT GACTAAAAGAC
61 AAATGCTTAT TTTATTTTAT TTTTGATTTT GTTTCTGTGT TGTCCATGAA GAGGCGCTAG
121 AGTCCTGTGA ATAAAATGCG AGAGAGTAAA TAAAAGTAGG AACAGTAACT GCTGCACTCA
181 AACGCATGGC AAAAAAGGGT ACGCCATTGG GTTGGCCTTT TTTTTTTTCC CCCTTTCAAG
241 TTTTGCTCTT ATGACCCTTC AGACACGTAG AGACAAGTAC GATGACAAGT CAGCTGACGC
301 TCTCGTCGTT AGTTGCGCTG TCGCGATTGT TCGAGGCTTT TGTTTGAAG GACCGCGAGA
361 GTTCTGGACA ATCAAAGCCG CGCACCAAAA GATGGAAAaT CAGTTTGCGC GGTTGCCAA
421 CAACGTCGAC AAGACCACTG TGAACCTTGC GAACGTTACT GCCATCGGGT TTCATCTGTT
481 TGCCCTGCCT CGAAGGATAT CGAACGTTTT GAGGCTTTGG GATATAAGGA GGTAGCACGA
541 AGGACTTCCT TAGATGGATT ACCCACGGTT CAGCAGATGT CTAGGTGCGA GAACGCTGTT
601 TCGGAGTTCT CAAGAGTTCT TTTTTCACCT GCGCACAAGC CTAGTAAGGT GGCATTTGAA
661 GATGTTGACC CGAAAAGTGG CTTGAAAAAA AGTGAGGAAG GTGGTGATGG TGAGCCAACC
721 GAGCTTCATA AAAAGGTA CTAGTGGTGG TCAATAGATC ACGCCATCCT GCAG

```

Figura R-14

- A) Secuencia nucleotídica del fragmento Pst1 de 784 pb contenido en el inserto H13 (P-JL5 C).
- B) Secuencia nucleotídica del fragmento Pst1 de 774 pb contenido en el inserto H15 (P-JL5 B).
- Se indican en **negrita** las regiones codantes C-terminales de ambos genes P-JL5.

III.2.5.4.3. Comparación de las secuencias 3'flanqueantes de los genes P-JL5 A, P-JL5 B y P-JL5 C.

Las regiones 3'flanqueantes de las copias genómicas P-JL5 A, B, y C fueron alineadas (Figura R-15). Las secuencias P-JL5 B y P-JL5 C pudieron alinearse en toda su extensión. Sin embargo, la secuencia del gen P-JL5 A diverge de las otras dos inmediatamente después de un motivo de poli T, a partir de la posición 170 (ver Figura R-15). Más allá del punto de divergencia con la secuencia P-JL5 A, las secuencias P-JL5 B y P-JL5 C poseen un sitio Pvu II en la posición 242 (ver Figura R-15) ausente en P-JL5 A. Este corresponde a la región 3' del fragmento PvuII-PvuII de 300 pb detectado en los *Southern blots* genómicos (Fig R-9).

```

1
A AGAC AAATGCTTAT TTTATTTTAT TTTTGATTTT GTTTCTCTGT TTTCCATGAA GAGGCGCCGG
  : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
C AGAC AAATGCTTAT TTTATTTTAT TTTTGATTTT GTTTCTCTGT TGTCCATGAA GAGGCGCTGG
  : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
B AGAC AAATGCTTAT TTTATTTTAT TTTTGATTTT GTTTCTGTGT TGTCCATGAA GAGGCGCTAG

65
A AGTCCTGTGA ATAAAATGCG AGAGAGTAAA TAAAAGTAGG ATCAGTAACT GCTGCACTCA
  : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
C AGTCCTGTGA ATAAAATGCG AGAGAGTAAA TAAAAGTAGG AACAGTAACT GCTGCACTCA
  : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
B AGTCCTGTGA ATAAAATGCG AGAGAGTAAA TAAAAGTAGG AACAGTAACT GCTGCACTCA

125
A AACGCATGGC AAAAAAGGGT ACGCCATTGG GTTGGCCTTT TTTTTAGGAG CTTGTGAAAA
  : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
C AACGCATGGC AAAAAAGGGT ACGCCATTGG GTTGGCCTTT TTTTCTTT TTTTCCCTT
  : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
B AACGCATGGC AAAAAAGGGT ACGCCATTGG GTTGGCCTTT TTTTTTTT-----CCCCCTT

170

185
A GAATGATCAC GGGAGAGCTG GCTAACTTAA TTAATGATG TGTATATCCT GATAAATGAA-
  : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
C TTAATTTTTG CTCTTATGAC CCTTCAGACA CGTAGAGAGA CAAGTACGAT -ACAAGCCAGC
  : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
B TCAAGTTTTG CTCTTATGAC CCTTCAGACA CGTAGAGA-- CAAGTACGAT GACAAGTCAGC
  : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :

```

Pvu II

Resultados

```

245
A TGCATTCTTT ATGATACTTT CTACCGTATG AATCTTTTGG GAAGAACGCGA CTTTGTAGGG
  : : : : : : : : : : : : : : : :
C TGACGCTCTC GTCGTTAGTT GCACTGTGCG CGGCTTGTTT GA-GCTTTTGT TTGGAAGGAC
  : : : : : : : : : : : : : : : :
B TGACGCTCTC GTCGTTAGTT GCGCTGTGCG GA--TTGTTT GAGGCTTTTGT TTGGAAGGAC

305
A GCGGGAACCG ATAGAGGCCG GATAATATTT TTAATTTTAT TTTGCCATCC CACCCACCCC
  : : : : : : : : : : : : : : : :
C CGCGAGAGTT CTGGACAATC AAAGCCGCGC ACCAAAAGAT GGAAAATCAG TTTGCGCGGT
  : : : : : : : : : : : : : : : :
B CGCGAGAGTT CTGGACAATC AAAGCCGCGC ACCAAAAGAT GGAAAATCAG TTTGCGCGGT

365
A CTTGATTCCC ACCACGCGGC GGGGTCTTGT GGTGGAGGA CCCCAAAGTC TGCCACTTCG
  : : : : : : : : : : : : : : : :
C TGCCAAACAA CGTCGACAAG AGGACTGCGA ACTTTGCGAA CGTTACTGCC ATCGAGTTTC
  : : : : : : : : : : : : : : : :
B TGCCAAACAA CGTCGACAAG ACCACTGTGA ACTTTGCGAA CGTTACTGCC ATCGGGTTTC

425
A TAAGTAACAC CACGCGGCGG GGTCTTGTGG TTGGAGGACC CCAAAGTCTG CCACTTCGTA
  : : : : : : : : : : : : : : : :
C ATCTGTTTGC CCTGACTCGA AGGATATCGA ACGTTTTGAG GCTTTGGGAT ATAAGGAGGT
  : : : : : : : : : : : : : : : :
B ATCTGTTTGC CCTGCCTCGA AGGATATCGA ACGTTTTGAG GCTTTGGGAT ATAAGGAGGT

485
A AGTAATAATA TTTCAAATCC TAACTGAGGA CAAAGGACCA TGCTAATGGT CCACAGAATTC
  : : : : : : : : : : : : : : : :
C AGCAAGAAGG ACTTCCTTAG ATGGATTACC CACGGTTCAG TAGATGTCTA GGTGCGGAGAAC
  : : : : : : : : : : : : : : : :
B AGCACGAAGG ACTTCCTTAG ATGGATTACC CACGGTTCAG CAGATGTCTA GGTGCGGAGAAC

```

Figura R-15

Alineamiento de las secuencias 3' flanqueantes de los genes P-JL5 A, P-JL5 B y P-JL5 C. Se considera posición 1, a la primera base río abajo del codón de terminación TAA.

III.2.6. Análisis preliminar de polimorfismo de restricción de la familia de genes P-JL5 en cepas de *T. cruzi*:

El inserto JL5 fue empleado como sonda radioactiva para analizar el perfil genómico de restricción de la familia P-JL5 en las cepas de laboratorio CL e Y (cepas polares, Int., Cap 2) (Fig. R-16), de la cepa Gamma (G) de *T. cruzi* (Figura R-17) y de *Trypanosoma equiperdum* (Figura R-18).

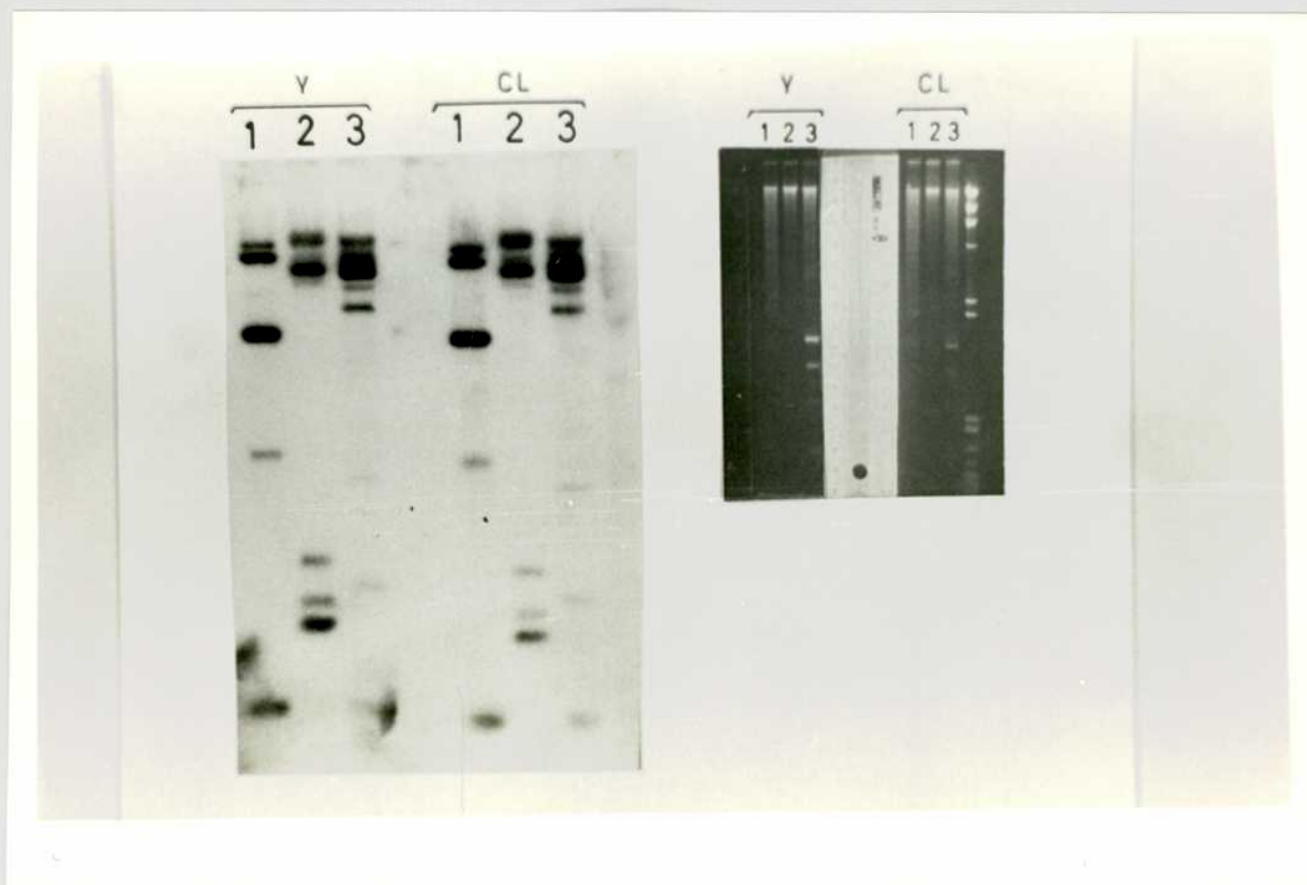


Figura R-16

Southern blot de ADN genómico de epimastigotes de las cepas Y y CL de *T. cruzi* digerido con enzimas de restricción. 1) Bam H1, 2) Hind III y 3) Eco RI. Se sembraron 3 μ g de ADN en un gel de agarosa 1% (Foto derecha). Marcadores de PM λ /Hind III + pBR322/Msp1. El filtro fue hibridizado con una sonda JL5 en las mismas condiciones de la Figura R-8)



Figura R-17

Southern blot genómico de la cepa Gamma de *T. cruzi* hibridizado con sonda JL5, a partir de un gel de agarosa 0,8 %.

Carriles 1 a 6: 3 μ g de ADN genómico de epimastigotes de *T. cruzi*, cepa Gamma, digerido con las siguientes Enzimas: 1) Pst1, 2) Kpn1, 3) Hind III, 4) Eco R1, 5) Bgl 2, 6) Bam H1.

Carriles 8 a 10: 3 μ g de ADN genómico de epimastigotes de *T. cruzi*, cepa Tul 2 digerido con: 8) Pst1, 9) Kpn 1, 10) Hind III. Las condiciones de hibridización fueron las mismas que en la Figura R-8.

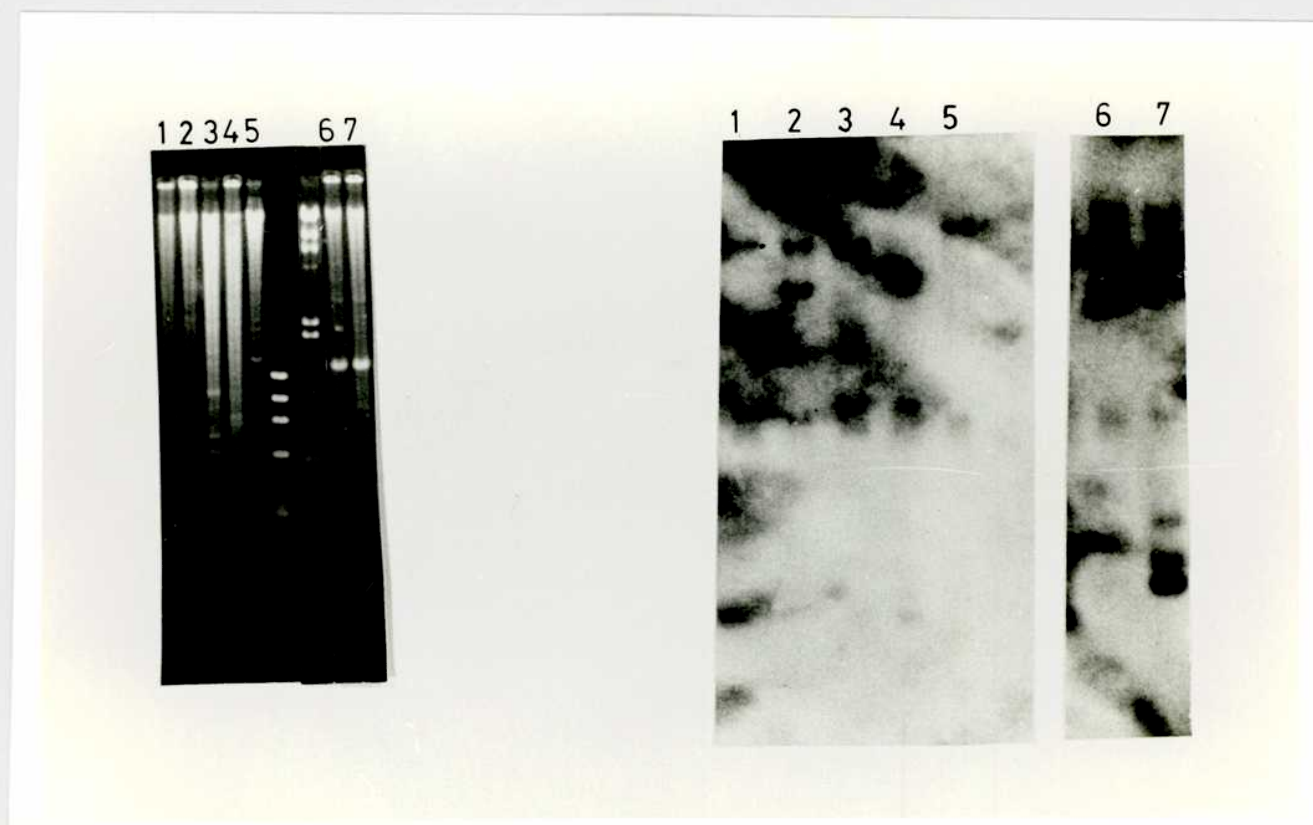


Figura R-18

Carriles 1 a 5: *Southern blot* genómico de *T. equiperdum*, digerido con: 1) Hind III, 2) Kpn I, 3) Pvu II, 4) Pst 1, 5) Bam H1 e hibridizado con sonda JL5.

Carriles 6 y 7: *Southern blot* genómico de *T. cruzi* (Tul 2) digerido con: 6) Kpn 1, 7) Hind III e hibridizado con la sonda JL5.

Se hibridizó a 37°C en presencia de 50% de formamida durante la noche y se lavó a 37°C en 0.2x SSC y 0.2% SDS.

III.2.7. Localización cromosómica de genes P-JL5 en *T. cruzi* (Tul 2).

Se ensayó la separación de cromosomas de *T. cruzi* por electroforesis en gradiente de campos pulsados (PFGE) (M&M, II.2.3.2). La hibridización con una sonda JL5 reveló tres bandas cromosómicas de PM mayor a 1000 kpb; y señal en la zona de compresión de cromosomas.

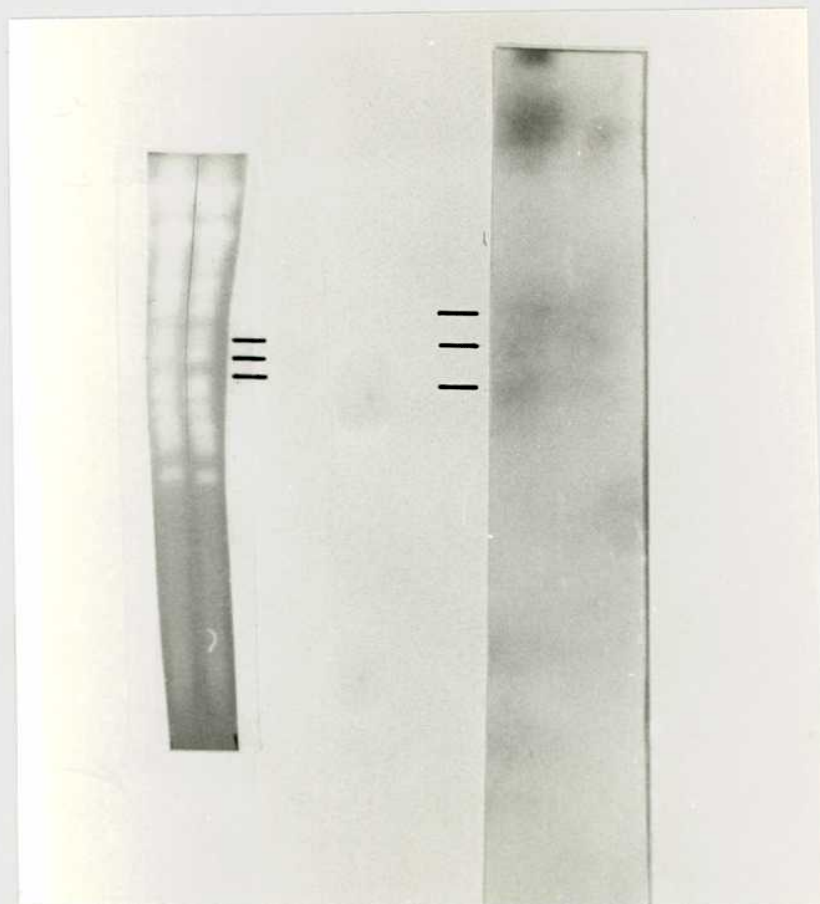


Figura R-19

Southern Blot de cromosomas de *T. cruzi* (Tul 2) separados por PFGE (CHEF), hibridizado con sonda JL5. Los procedimientos de preparación de tacos de agarosa con parásitos se prepararon según se indica en M&M.II.2.3.2.2. Las condiciones electroforéticas fueron: pulsos de 5 min, durante 72 hs, a 100 mA. Las condiciones de hibridización fueron a 65°C en 6x SSC, Denhardt's 5x, 0,5% SDS, 100 µg/ml y los lavados a 65°C en 0,2 x SSC y 0,1 % SDS.

III.3. PROTEINAS RIBOSOMALES Tc P-G13 y Tc P-L6.

Los fagos G13 y L6 fueron aislados de una biblioteca de tripomastigotes sanguíneos de *T. cruzi* (cepa RA) por rastreo inmunológico. Estos recombinantes antigénicos reaccionaron con anticuerpos anti-JL5 inmunopurificados (ver Figura R-2, Res, III.1.2.2). Las experiencias de *Dot blot* con sondas radioactivas JL5, G13 y L6, indicaron que los ADNc G13 y L6 presentaban secuencias nucleotídicas que codificaban antígenos ribosomales P diferentes a P-JL5: denominados P-G13 y P-L6.

III.3.1. PROTEINA RIBOSOMAL P-G13.

III.3.1.1. Caracterización del fago G-13.

El ADNc G13 fue subclonado en el vector M13mp18/Eco R1 y secuenciado. La secuencia del ADNc G13 posee 229 pb; presentó un marco de lectura abierto para 16 aminoácidos en fase con el de la β -galactosidasa, seguidos de un región 3' no codante de 163 pb, más un extremo de 14 adeninas (Figura R-20-A).

La secuencia de aminoácidos permitió explicar su reactividad con anticuerpos anti-JL5, ya que G-13 presentó el extremo carboxiterminal característico de las proteínas ribosomales P. Los 14 residuos C-terminales de G-13 fueron idénticos a los de P-JL5, divergiendo hacia la región N-terminal (AA en P-JL5, KE en P-G13); las secuencias nucleotídicas correspondientes al heptapéptido identificatorio de las proteínas ribosomales P presentaron sustituciones (Figura R-20-B).

A.

```

1   AG AAG GAA GAA GAG GAG GAG GAC GAT GAC ATG GGC TTT GGT CTG TTT GAC
    K  E  E  E  E  E  D  D  D  M  G  F  G  L  F  D
51  TAAGTGCAGC GGCATGCAAC GTGCCGGAGC AGAAAGGGAC TGCGTCACTG CTCTAGAACA
    *
111 AGGAAGAACA  TACTGGCCGC CGTATTTGGG GTGTGCAAGA CTGGAAGGCA TCTTGCAGTT

171 CGGCAACTTT  TTTTGATTCT GTTTTTTCTA TTTATGAATG AATTTAAAAA AAAAAAAAAA
  
```

B.

```

          GCT GCG GAA GAG GAG GAG GAT GAC GAC ATG GGA TTT GGT CTT TTT GAC
JL5      A  A  E  E  E  E  D  D  D  M  G  F  G  L  F  D
          *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *
G13      K  E  E  E  E  E  D  D  D  M  G  F  G  L  F  D
          AAG GAA GAA GAG GAG GAG GAC GAT GAC ATG GGC TTT GGT CTG TTT GAC
  
```

Figura R-20

A: Secuencia nucleotídica y aminoacídica deducida del ADNc G13.

B: Alineamiento de los 16 residuos Carboxiterminales de P-JL5 y P-G13. Se subrayan las bases diferentes en las secuencias.

III.3.1.2. Aislamiento y caracterización del fago MAT-1:

Con el objeto de conocer la secuencia de la región amino-terminal de P-G13, se utilizó el inserto G-13 como sonda radioactiva para rastrear las bibliotecas de ADNc disponibles en el laboratorio. Se rastrearon 30000 fagos de la biblioteca de ADNc de epimastigotes y 20000 de una fracción de la biblioteca de tripomastigotes sanguíneos (M&M, II.2.6.1.1.).

Resultados

De estos rastreos se obtuvo un único fago positivo, MAT-1, de la biblioteca de tripomastigotes. El inserto fue amplificado por PCR, subclonado *blunt* en el vector M13mp10/SmaI (II.2.11.3) y secuenciado (II.2.12).

MAT-1 presentó una secuencia de 307 pb constituida por una región codante de 36 residuos, correspondientes a la región carboxiterminal de P-G13, y un extremo 3'no codante de 164 pb seguido de una cola de 31 adeninas. La extensión aminoterminal de MAT-1 permitió identificar la región bisagra de P-G13 (Figura R21-A).

Las secuencias nucleotídicas correspondientes a los 16 residuos C-terminales compartidos por G-13 y MAT-1 resultaron idénticas. Sin embargo, las regiones 3'no codantes presentaron algunas diferencias (Figura R21-B).

A.

```

1 GAATTCCTGCA GCC GCT CCT GCT GCT GCT GCT GGC GGT GCC GCC GCC CCT
      A A A P A A A A G G A A A P
51 GCC GCC GCT GAC GCC AAG AAG GAA GAA GAG GAG GAG GAC GAT GAC ATG
      A A A D A K K E E E E E D D D M
1α00 GGC TTT GGT CTG TTT GAC TAA GTGCAGCGGCATGCAACGTGCCGGAGCAGAAAGGGA
      G F G L F D *
160 CTGCGTCACTGCGCACTTGAACAAGGAAAAACATACTGGCCGCGTATTTGGGGTGTGCATGAC
225 TGGAAGGCATCTTGCAGTTCGGCAACTTTTTTTTGATTCTGTTTTTTCTATTTATGAATGAATT
294 AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAGGAATTC
  
```

B.

```

G13 TAA GTGCAGCGGCATGCAACGTGCCGGAGCAGAAAGGGACTGCGTCACTGCTC--TAGAACA
      * :::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::: : : :::::
MAT1 TAA GTGCAGCGGCATGCAACGTGCCGGAGCAGAAAGGGACTGCGTCACTGCGCACTTGAACA

G13 AGGAAGAACATACTGGCCGCGTATTTGGGGTGTGCAAGACTGGAAGGCATCTTGCAGTT
      ::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::
MAT1 AGGAAAAACATACTGGCCGCGTATTTGGGGTGTGCATGACTGGAAGGCATCTTGCAGTT

G13 CGGCAACTTTTTTT-GATTCTGTTTTTTCTATTTATGAATGAATTT(A)n
      ::::::::::::::::::::
MAT1 CGGCAACTTTTTTTTGATTCTGTTTTTTCTATTTATGAATGAATT-(A)n
      Hinf1
  
```

Figura R-21

A. Secuencia nucleotídica del inserto MAT-1 y traducción de la región codante. B) Comparación de las secuencias 3'no codantes de los ADNc G13 y MAT-1. Las identidades nucleotídicas se indican con [:]. Se subraya el sitio de restricción Hinf 1.

III.3.1.3. Caracterización del ARNm P-G13.

Northern blots de ARN total de epimastigotes (Tul 2) hibridizados con una sonda G13 radioactiva permitieron identificar un ARNm de aproximadamente 600 b, tamaño similar a la banda mayoritaria de ARNm P-JL5 (Figura R-22). El tamaño de la banda en el *Northern* sugirió que P-G13 correspondería a una proteína ribosomal P de bajo PM, semejante a P-JL5, y equivalente a las proteínas P1 o P2 de otros eucariontes.

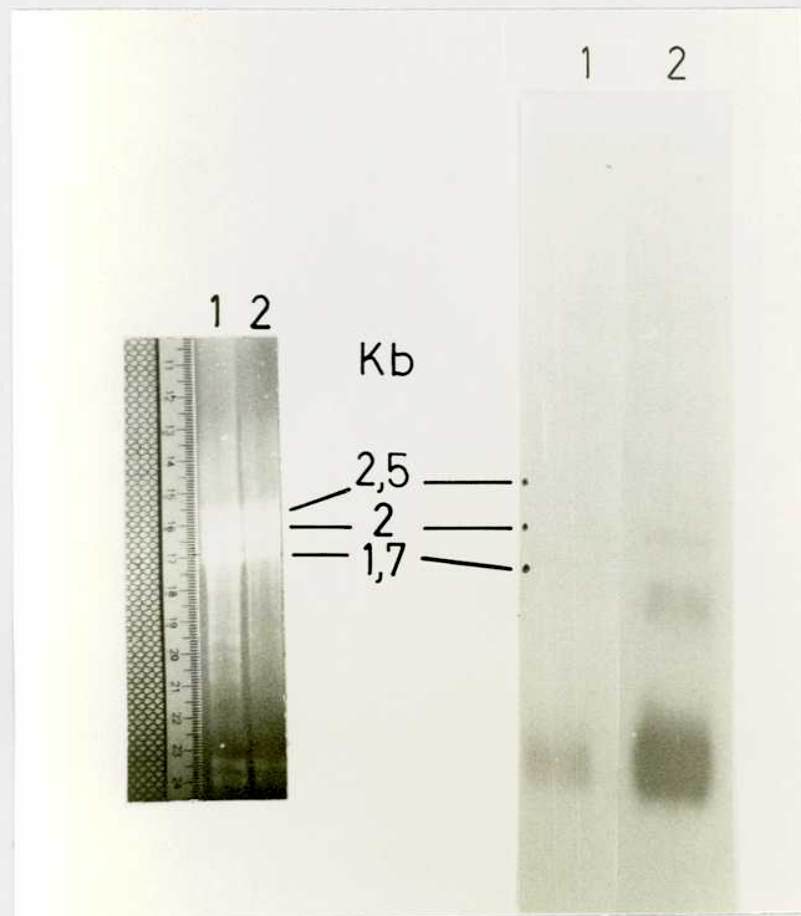


Figura R-22

Northern Blot de 25 μ g de ARN total de epimastigotes de *T. cruzi* (Tul 2) con sonda G-13 marcada por *random priming*. Se indica la posición de migración de las especies de ARN ribosomal de *T. cruzi*. Las condiciones de electroforesis, hibridización y lavados fueron similares a las de la Fig.R-4.

III.3.1.4 Organización genómica de P-G13:

III.3.1.4.1. *Southern blots*:

Southern de ADN de epimastigotes de *T.cruzi* digerido con enzimas de restricción que no cortan dentro de las secuencias G13 ni MAT-1, fueron hibridizados con la sonda MAT-1. Se obtuvieron dos fragmentos genómicos Bam H1 (7 kb y 2,7 kb) y Eco R1 (10 kb y 2,5 kb) (Figura R-22, carriles 1 y 3 respectivamente).

El perfil de restricción sugirió la existencia de al menos dos copias genómicas para P-G13 ubicadas en entornos diferentes.

La digestión doble BamH1 + Eco R1 (Fig R-22, carril 2), dió lugar a dos fragmentos, un fragmento BamH1-EcoR1 de 2,2 kb y otro BamH1-BamH1 de 2,7 kb, también detectado por digestión simple con BamH1 (carril 1). Por lo tanto, el fragmento BamH1-BamH1 de 2,7 kb estaría contenido en el fragmento EcoR1-EcoR1 de 10 kb, ya que el otro fragmento Eco R1 es de menor tamaño (2,5 kb; carril 3). De esta manera, se identificaron los fragmentos Bam H1 y Eco R1 correspondientes a cada locus P-G13 (individualizados con flecha negra o blanca en Figura R-22).

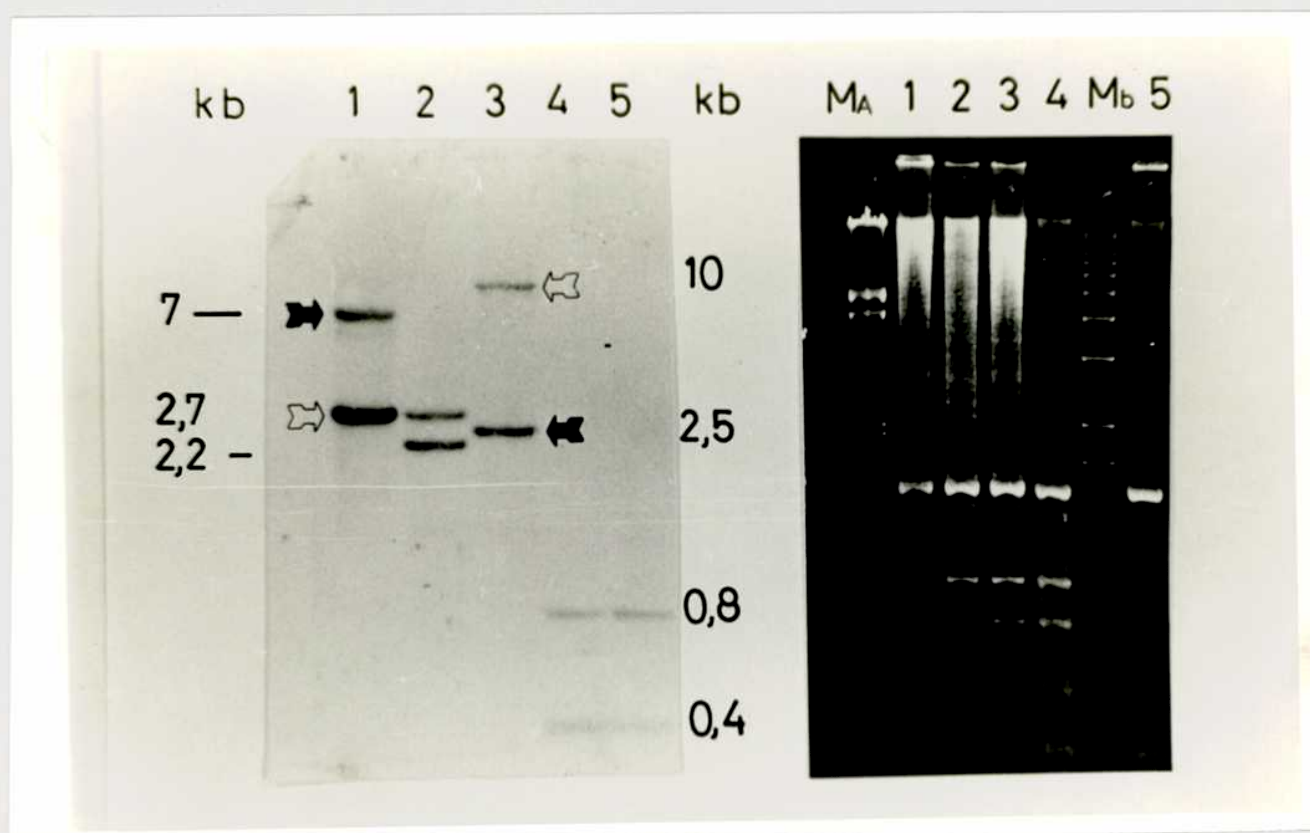


Figura R-23
Caracterización genómica de P-G13

A: Southern blot genómico de *T. cruzi* (Tul 2) a partir 10 μ g de ADN digerido con: 1) Bam H1, 2) Eco R1 + BamH1, 3) Eco R1, 4) Eco R1 + Hinf 1, 5) Hinf 1, corridos en un gel de agarosa 0,9%. Marcadores de PM = Ma: λ HindIII; Mb: 1 kb Ladder. El gel fue transferido a filtro Hybond N+ e hibridizado con la sonda MAT-1 empleando el Kit de hibridización rápida (M&M, II.2.6.5.2.)

III.3.1.4.2. Construcción de bibliotecas enriquecidas en fragmentos genómicos P-G13:

La digestión doble Hinf1 + EcoR1, y la digestión simple Hinf 1, originaron dos fragmentos Hinf1-Hinf1 de 400 pb y 800 pb (carriles 4 y 5 de Fig R-23). Teniendo en cuenta que:

el ARNm de P-G13 es similar en tamaño al de P-JL5 (Fig.R-22) el sitio Hinf1 3' se localiza en las regiones 3' no codantes de los ADNc G13 y MAT-1 (Fig R-21-B)

es esperable que el fragmento Hinf1-Hinf1 de 800 pb contenga la secuencia codante completa de una copia P-G13, más regiones 5' flanqueantes; y que el sitio Hinf 1 5' del fragmento de 400 pb se localice al inicio de la región codante de la otra copia P-G13. Ambos fragmentos están contenidos en los fragmentos Eco R1.

Con el objeto de clonar un gen P-G13, se construyó una biblioteca enriquecida en una población de fragmentos genómicos Eco R1 de alrededor 2,5 kb en el fago λ gt10 (M&M, II.2.4.2). La biblioteca λ gt10/P-G13 resultó con 80% de fagos recombinantes y se rastrea actualmente.

III.3.2 PROTEINA RIBOSOMAL P-L6:

III.3.2.1. Caracterización del fago L6:

El ADNc L6 fue subclonado en M13mp18\EcoR1 y secuenciado (Figura R-24-A). El inserto presentó 201 pb, un marco de lectura abierto de 18 aminoácidos en fase con la β -galactosidasa y un extremo 3' no codante de 119 pb, más una cola de 26 adeninas.

La secuencia de aminoácidos deducida presentó el motivo C-terminal de las proteínas ribosomales P, explicando su reactividad con anticuerpos anti-JL5 (Figura R-2, Res, III.1.2.2). Al alinear la secuencia de L6 con la de MAT-1, se observaron 7 sustituciones silenciosas, una en el codón de terminación, cuatro en el dominio de residuos acídicos y dos en la región de la bisagra. Sin embargo, en la región que codifica el heptapéptido C-terminal P, fueron idénticas (Figura R-24-B).

L6 presentó en la región de residuos cargados dos lisinas, conservadas en P-G13 y ausentes en P-JL5. La secuencia 3' no codante de L6 no pudo alinearse con las de MAT1 ni G13, indicando que P-L6 y P-G13 son transcriptos de genes ribosomales P diferentes, en concordancia con los resultados iniciales de *Dot blot* (Figura R-3, Res, III.1.3).

A.

```

1   CCGCG AAG AAG GAA GAG GAA GAG GAA GAC GAC GAT ATG GGC TTT GGT CTG
    A   K   K   E   E   E   E   E   D   D   D   M   G   F   G   L
51  TTT GAC TAG GCGCAGAAGCC CCTTTCTTGA AGGATTTACA CACAAGTGGC ATGGTTTT
    F   D   *
109 GTTTTTTGTG TTTTGTTTTC TCAAATATTT ATTCACTCAA CAAAAAATGA GTATATATAT
169 AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAA
  
```

B.

```

MAT1   AC GCC AAG AAG GAA GAA GAG GAG GAG GAC GAT GAC ATG GGC TTT
        A   K   K   E   E   E   E   E   D   D   D   M   G   F
L6     CC GCG AAG AAG GAA GAG GAA GAG GAA GAC GAC GAT ATG GGC TTT

MAT1   GGT CTG TTT GAC TAA
        G   L   F   D   *
L6     GGT CTG TTT GAC TAG
  
```

Figura R-24

A. Secuencia nucleotídica y aminoacídica deducida del ADNc L6.
 B. Alineamiento de L6 con MAT-1. Se indican las diferencias nucleotídicas entre ambas secuencias.

III.3.2.2. Análisis por Northern y Southern blot de P-L6.

El *Northern blot* de ARN total de epimastigotes (cepa RA) hibridizado con una sonda L6 radioactiva, permitió identificar una banda de aproximadamente 700 pb, compatible con una proteína ribosomal P de bajo PM, es decir tipo P1 o P2 (Figura R-25-A). El *Southern Blot* genómico (Tul 2) identificó fragmentos únicos para las digestiones con BamH1 (7,2 kb), Eco R1 (7,2 kb) y Hind III (6,4 kb) (Figura R-25-B).

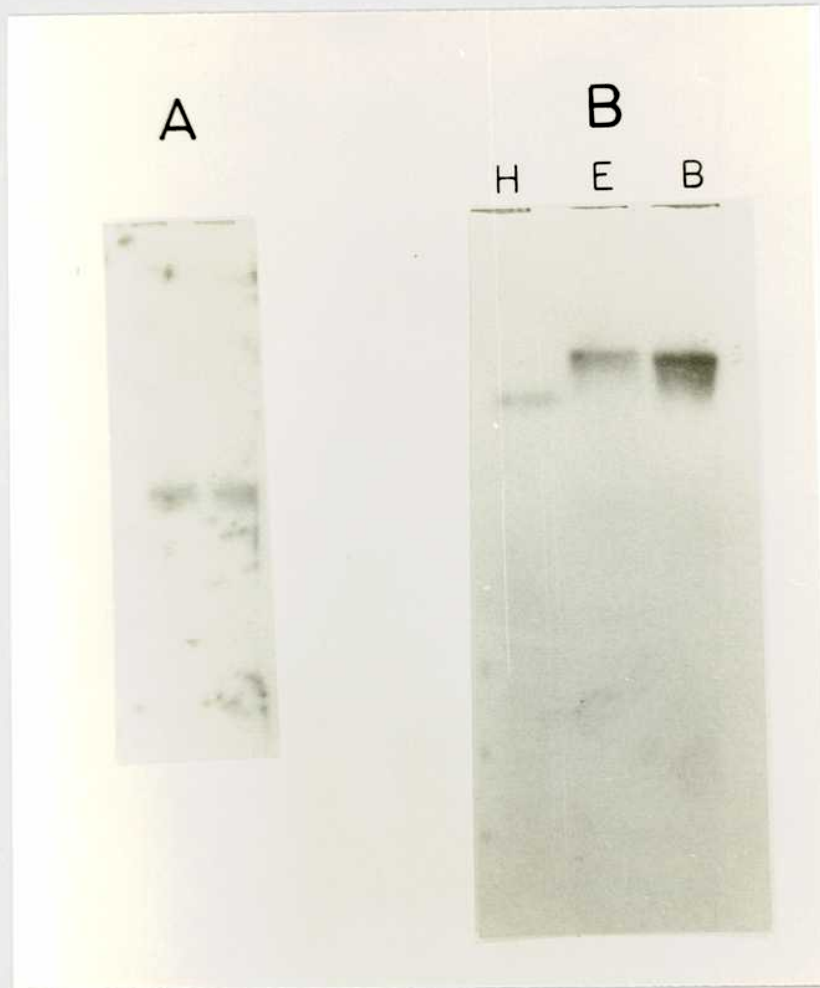


Figura R-25

- A) *Northern blot* de 25 μg de ARN total de epimastigotes de *T. cruzi* (cepa RA), hibridizado con una sonda L6 marcada por *random priming*. Las condiciones experimentales fueron similares a la de la Figura R-4.
- B) *Southern Blot* de 10 μg de ADN genómico de epimastigotes de *T. cruzi* (Tul 2) digerido con H) Hind III, E) Eco R1 y B) Bam H1 e hibridizado con sonda L6. Las condiciones experimentales fueron similares a las de la Figura R-23.

III.4. PROTEINA RIBOSOMAL Tc P-JL52

III.4.1. Caracterización del fago JL52.

El aislamiento del fago JL52 fue descrito en Int., (I.4).

III.4.1.1. Caracterización inmunológica:

En Western blots de preparaciones de ribosomas de *T. cruzi*, anticuerpos anti-JL52 inmunopurificados (M&M, II.2.9.4) reaccionaron predominantemente con una proteína de 38 kDa; sin embargo sueros lúpicos anti-P positivos no reconocieron la proteína P38 (Int., I.4.3; Fig I.8).

La reactividad del antígeno recombinante JL52 fue evaluada contra sueros lúpicos mediante un ensayo de placas de lisis (M&M, II.2.9.5)(Figura R-26). Los sueros LES anti-P positivos reaccionaron con los fagos JL5 y A1, pero no lo hicieron con JL52 (Fig. R-26; A1 codifica los 15 aminoácidos C-terminales de P-JL5, Levin y col, 1990). Los 3 fagos reaccionaron con sueros de individuos chagásicos crónicos.

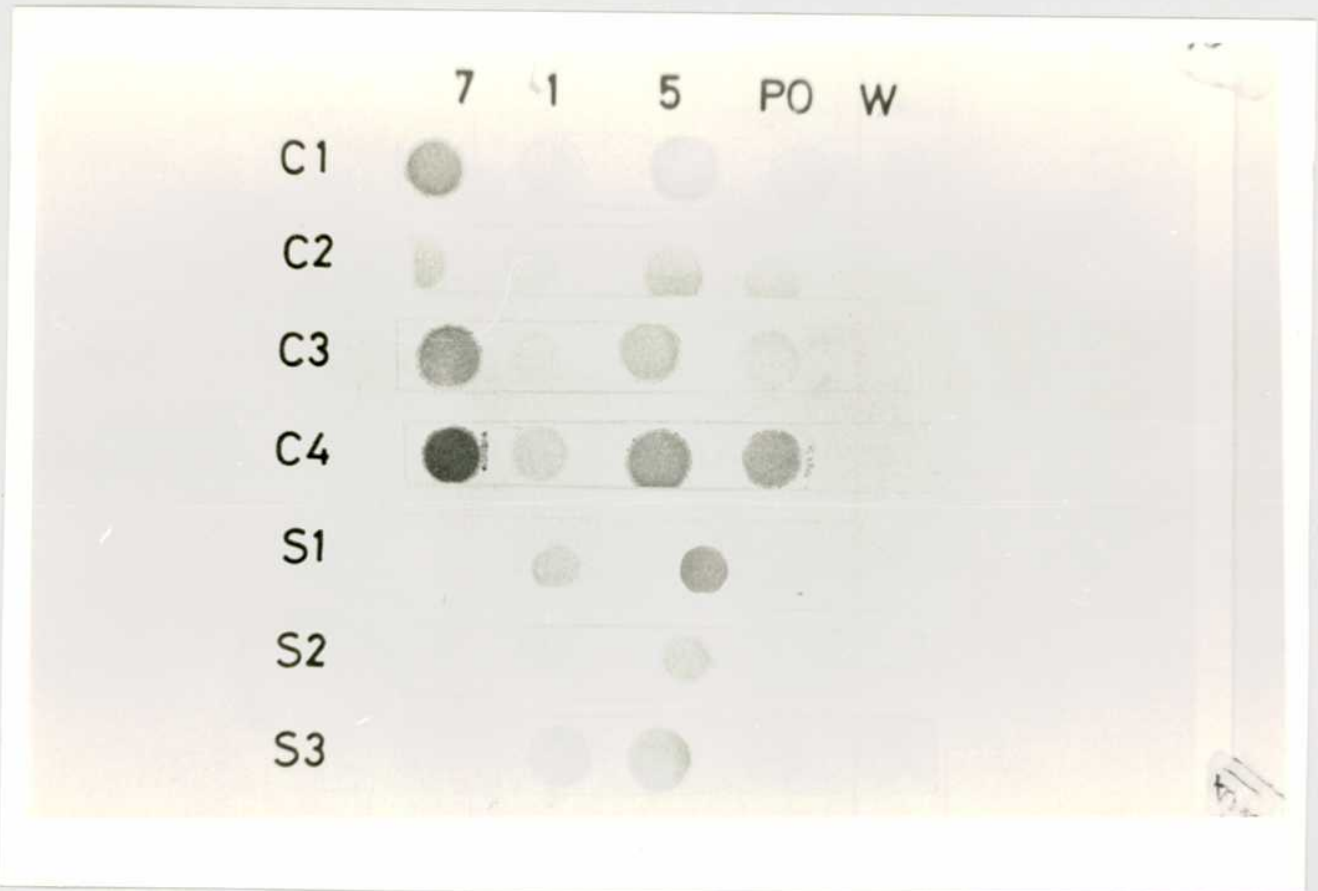


Figura R-26

Ensayo de placas de lisis del fago JL52 (P0) con sueros de individuos chagásicos y lúpicos.

Las muestras C1 a C4 pertenecen a pacientes con cardiopatía chagásica crónica (diluciones 1: 500). Las muestras séricas S1 a S3 a pacientes LES anti-P positivos (diluciones S1 y S2 = 1:200; S3 = 1:500). La disposición de los fagos en la tira de nitrocelulosa se indica en el borde superior de la Figura: 7) recombinante JL7 (Levin y col, 1989); 1) A1 (Levin y col, 1990); 5) JL5; P0) JL52; W) λ gt11 salvaje. En los ensayos correspondientes a los sueros S1 y S2 el fago JL5 está corrido levemente hacia la derecha.

III.4.1.2. Caracterización genética:

Experiencias de *Northern Blot* de ARN poli A⁺ de epimastigotes (Tul 2) con una sonda radioactiva JL52 revelaron una especie de aproximadamente 1100 b (Figura R-27-A), de longitud semejante al tamaño del ARNm descrito para las proteínas ribosomales P0 de eucariontes (Rich & Steitz, 1987).

Experiencias de *Southern blot* de ADN genómico (Tul 2) hibridizado con la sonda JL52 revelaron un fragmento PstI de 600 pb y dos fragmentos Bam HI de 6,5 kb y 12 kb (Figura R-27-B).

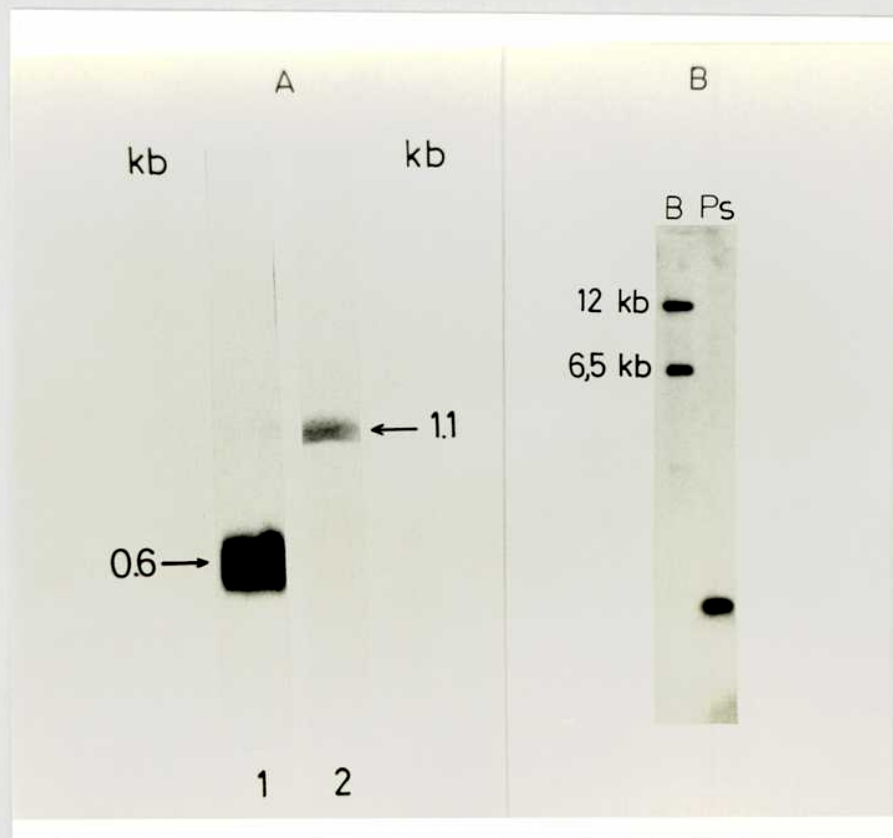


Figura R-27

A. *Northern blot* de 20 μ g de ARN total de epimastigotes de *T. cruzi* (Tul 2) hibridizado con 1) sonda JL5 marcada por *random priming*; 2) sonda JL52 marcada por *random priming*. Condiciones experimentales de Figura R-4.

B. *Southern blot* de 10 μ g de ADN genómico de *T. cruzi* (Tul 2) con sonda JL52. Condiciones experimentales de Figura R-23.

III.4.1.3. Secuenciación del ADNc JL52.

El producto de amplificación por PCR (400 pb) a partir del fago λ gt11 recombinante, fue subclonado *blunt* en el vector M13/Sma1 (M&M, II.2.11.3 y secuenciado (M&M, II.2.12) (Figura R-28-A).

La secuencia del inserto JL52 (335 pb) presentó un marco de lectura abierto de 78 aa. en fase con el de β -galactosidasa, seguido de un extremo 3' no codante de 101 pb, más una cola poli A+. La traducción de JL52 permitió identificar la porción C-terminal de un polipéptido con características de proteína ribosomal P:

una región rica en alaninas.

una región C-terminal ácida compuesta por residuos glutámicos y aspárticos.

Sin embargo, el heptapéptido característico de las proteínas P de eucariontes, *M G F G L F D* se encontraba modificado en P-JL52: *F G M G A L F*. En el extremo N-terminal se identificaron residuos His, Ile, Lys, Leu y Tyr, en posiciones conservadas respecto a las porciones C-terminales de proteínas ribosomales P0 de otros eucariontes, residuos ausentes en las regiones equivalentes de las proteínas P de bajo PM (Int, I.3.2) (Fig R-28-B).

A.

```

CAT ATG ATC ATG GAC GCG TTC AAG ACC CTT CTT GGC GCC TCC GTT GCC
H M I M D A F K T L L G A S V A
ACC GAA TAC GAG TTC GAT GAG TTT GAT GGC AAG AAC CTG CGC AAG GCC
T E Y E F D E F D G K N L R K A
GCT CTG GAG GGC AAC CTC GGT GGA GGT GTG GCT GAC GCT GCT GCC GTT
A L E G N L G G G V A D A A A V
GCC GAC ACC GGC GCT GCT GCC GCT CCT GCC GCT GCC GCT GAA TCC GAA
A D T G A A A A P A A A A E S E
GAG GAG GAT GAT GAT GAC GAC TTT GGC ATG GGG GCG CTG TTC TAAGCTA
E E D D D D D F G M G A L F *
CGCAATGGAGAACTGCAGTTTTATTTTGGATTTTTTTTTTTTTTTTGTGTGTGTGTTTTGTTTTATT
TGAGCCTGCGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
    
```

B.

```

Tc C-P0      1 H-MIMDAFKTLLGASVATEYEF-D-EFDGKNLRKAALEGN---LGGG
Sc L10e      *T+*N+-+*D**+VAI*AS*H+P+I*-*L-VD*IENP*-+----++++
Hs P0        *S+*NG-+*A+*+L**E+*T*PLA*---*V--**F*-++PSA++++
    
```

```

Tc C-P0      42 --VADAAAVADTGAAAA-PAAAAESEEEDD-DDDFGMGALF
Sc L10e      AP---**TS*A+*-D**-*EE*A+*****+S*****+*-*D
Hs P0        AP**-*TT*A-P*****A**K+EAK**S++S*****+*-*D
    
```

Figura R-28

- A. Secuencia nucleotídica y aminoacídica del ADNc JL52 de *T. cruzi*. El asterisco indica el codón de finalización de la traducción. La secuencia fue depositada en el banco EMBL, número de acceso X 62144.
- B. Comparación de las secuencias de aminoácidos de P-JL52 y las porciones C-terminales de L10e de *S. cerevisiae*, desde el residuo 237 hasta el residuo C-terminal (Newton y col, 1990), y P0 humana, desde el residuo 239 hasta el residuo C-terminal (Rich y Steitz, 1987). Los asteriscos indican aminoácidos idénticos entre P-JL52 y las otras proteínas P0. Las cruces indican sustituciones conservativas de aminoácidos (T-S, D-E, R-K-Q-N, A-S, A-G, F-L-M-I-V, y E-Y fueron considerados grupos homólogos, Ramirez y col, 1989).

III.4.2. Caracterización del fago CH3:

El fago CH3 fue aislado de una biblioteca de tripomastigotes sanguíneos (cepa RA). Fue clasificado dentro del grupo P-JL52, de acuerdo a los siguientes criterios:

La proteína de fusión β -gal-CH3 presentó una reactividad similar a la de JL52 frente a sueros chagásicos crónicos, (ver Figura R-1)

reaccionó con anticuerpos anti-JL52 (ver Figura R-2).

una sonda CH3 radiactiva hibridizó con ADN del fago JL52 (ver Figura R-3).

III.4.2.1 Subclonado y secuenciación del fago CH3.

El tamaño del inserto CH3, amplificado por PCR, fue de alrededor 1000 pb. El fragmento digerido con Eco R1 a partir del producto de amplificación fue subclonado en el vector M13mp18. La secuencia del ADNc CH3 se muestra en la Figura R-29.

La secuencia de CH3 (993 pb) permitió identificar un ADNc con un marco de lectura de 290 aa en fase con el de la β -galactosidasa, seguido de una secuencia 3' no codante de 103 pb, con su extremo poliadenilado.

A.

```

1  GAATTCCATA ACGTCCGCTC GCAGCAGGTG CATGACGTTG GTCGCGACCT CCGTGGTTTG
61 GGTGAACTTG TGATGGGCAA GAAGACGCTC CAGAAGAAGA TTGTGGAGAG GCGCGCGGAG
121 GACAAGAAGG CCAGCGCGTA CGACAAGTTG CTTTACAACA CGTGCATCGA AAAGAAGCTG
181 TTGTGCGGCA ACACCGCCCT CATCTTTACG AACGAGGAGA TCCCAGTCAT CACGGCCGTG
241 CTGGACAAGC ACCGCGTACA GGCCCCCGCC CGTGTGGGCG CATCGCCATG CGACGTCATT
301 GTCCCCGCTG GTAACACCGG CATGGAGCCC AAGGCGACAT CCTTCTTCCA GGCCTGAAAC
361 ATTGCGACGA AGATTGCAAA GGGTACAGTC GAAATTGTGA GTGACAAGAA GGTACTGAGC
421 GCTGGTGATC GTGTGGACAA CTCGACGGCC ACGCTGCTGC AGAAGCTGGA TATCTCCCCG
481 TTCTACTACC AGGTGGAGGT GCAGTCCGTG TGGGACCGTG GTATGCTGTT TCTTCGCGAG
541 GACCTTTCCA TCACCGACGA CGTTGTGGAG AAATACCTTC TGGAAGGTAT CAGCAACGTT
601 GTGGTTTCGC TGGGTGCTGG CATCCCGACG GCAGCGACCT TGCCACATAT GATCATGGAC
661 GCGTTCAAGA CCCTTCTTGG CGCCTCCGTT GCCACCGAAT ACGAGTTCGA TGAGTTTGAT
721 GGCAAGAACC TGCGCAAGGC CGCTCTGGAG GGCAACCTTG GTGGAGGTGC GGCTGACGCT
781 GCTGCCGCTA CCGACACCGG CGCTGCTGCC GCTCCTGCCG CTGCCGCTGA GCCCGAAGAG
841 GAGGATGATG ACGACGACTT TGGCATGGGG GCGCTGTTCT AACCTACAAG GTAGAGAAGA
901 AAGTTTTCGG AACTTATTTT ATTTTGTTTT TTGTTTTTTA TTTCTCATAT TAAAAAATAA
961 AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAGGAA TTC

```

B.

Dominio de unión al ARNr

```

1  efnNVRSQV HDVRRDLRGL GELVMGKKTL QKKIVERRAE DKKASAYDKL LYNTCIEKKL
61 LCGNTALIFT NEEIPVITAV LDKHRVQAPA RVGASPCDVI VPAGNTGMEP KATSEFFQALN
121 IATKIAKGTV EIVSDKKVLS AGDRVDNSTA TLLQKLDISP FYYQVEVQSV WDRGMLFLRE
181 DLSITDDVVE KYLLEGISNV VVSLGAGIPT AATLPHMIMD AFKTLGASV ATEYEFDEFD
241 GKNLRKAALE GNLGGGAADA AAATDTGAAA APAAAAEPEE EDDDDDFGMG ALF

```

Figura R-29

- A) Secuencia nucleotídica del inserto CH3/EcoR1. Para secuenciar 993 pb se emplearon oligonucleótidos internos como primers: oligonucleótido 1, correspondiente a la secuencia codante entre posiciones 313 - 330; y 2, complementario a la secuencia entre posiciones 646 - 665, ambas regiones se subrayan en la Figura.
- B) Secuencia aminoacídica deducida del inserto CH3. Se indican en minúsculas los aminoácidos correspondientes a la fusión con la β -galactosidasa en el fago λ gt11 recombinante. Se indican en **negrita** motivos conservados en proteínas P0 de otros organismos.

Resultados

Los 78 aminoácidos C-terminales de CH3 resultaron 95 % homólogos a los de JL52. Se identificaron 4 sustituciones aminoacídicas en la región bisagra y el dominio ácido. El heptapéptido C-terminal resultó idéntico (Figura R-30-A).

Las secuencias nucleotídicas de los extremos 3' no codantes presentaron un 63% de homología (3 gaps)(Figura R-30-B)

A.

```

PJL52   H M I M D A F K T L L G A S V A T E Y E F D E F D G K N L R
        * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
CH3     H M I M D A F K T L L G A S V A T E Y E F D E F D G K N L R

PJL52   K A A L E G N L G G G V A D A A A V A D T G A A A A P A A A
        * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
CH3     K A A L E G N L G G G A A D A A A A T D T G A A A A P A A A

PJL52   A E S E E E D D D D D E G M G A L E
        * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
CH3     A E P E E E D D D D D E G M G A L E
  
```

B.

```

JL52   GCTACGCAATGGAGAACTGC-AGTTTTATTTT--GATTTTTTTTTTTTTTGT-GTGTGTGT
        : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
CH3     CCTAC--AAGGTAGAGAAGAAAGTTTTTCGGAACTTATTTTATTTTGTTTTTTGTTTTTTA

JL52   TTTGTTTTATTTGAGCCTGCG(A)n
        : : : : : : : : :
CH3     TTTCTCATATTT(A)n
  
```

Figura R-30

- A. Alineamiento de la secuencia aminoacídica deducida del ADNc JL52 (aa. 1 a 78) con la porción C-terminal deducida del ADNc CH3 (aa. 213 a 290). Los asteriscos indican aminoácidos idénticos. Se consideraron sustituciones conservativas T-S, D-E, R-K-Q-N, A-S, A-G, F-L-M-I-V, y F-Y (Ramirez y col, 1989).
- B. Alineamiento de los extremos 3' no codantes de los ADNc JL52 y CH3. Los nucleótidos idénticos se indican con el símbolo (:).

Resultados

P-CH3 se extendió 212 residuos hacia el extremo N-terminal de la proteína, pero su secuencia no llegó a la metionina inicial.

La comparación de la secuencia aminoacídica P-CH3 con la de las proteínas ribosomales P de otros organismos eucariontes confirmó que correspondía a la proteína ribosomal P0 de *T. cruzi* (Int., I.3.2.2). En particular, en la región aminoterminal de P-CH3 se identificó un motivo distintivo de las proteínas ribosomales P0, que es homólogo al dominio de interacción de la proteína ribosomal L10 de *E. coli* con el ARNr 23 S (Egebjerg y col, 1990)(ver Figura R-29-B).

III.4.3. Identificación de la secuencia completa de TcP0.

III.4.3.1 Clonado y secuenciación del extremo 5' del ARNm TcP0.

Para clonar el extremo aminoterminal de la proteína P0 de *T. cruzi*, se empleó la metodología de *RNA-PCR* a partir de ARN total de epimastigotes de la cepa RA de *T. cruzi* (M&M, II.2.5). La reacción de retrotranscripción se realizó por cebado al azar y la amplificación se llevó a cabo utilizando como cebador 3', un oligonucleótido complementario al segmento delimitado por las posiciones 62-84 del ADNc CH3 (que codifica parte del dominio conservado de interacción con el ARNr 24S). Como cebador 5' se utilizó el segmento correspondiente a las primeras 20 b del minixón de *T. cruzi* (Milhausen y col, 1984).

Se amplificó un único fragmento, N-P0, de alrededor de 230 pb (Figura R-31-A).

El fragmento N-P0 radioactivo detectó dos fragmentos genómicos de 12 kb y de 6,5 (Figura R-31-B), similares a los fragmentos BamH1 homólogos a la sonda JL52 (Fig R-27-B). Dado que las secuencias de N-P0, JL52 y CH3 no poseen un sitio Bam H1 interno, se infirió que *T. cruzi* (Tul 2) posee al menos dos copias génicas para la proteína P0.

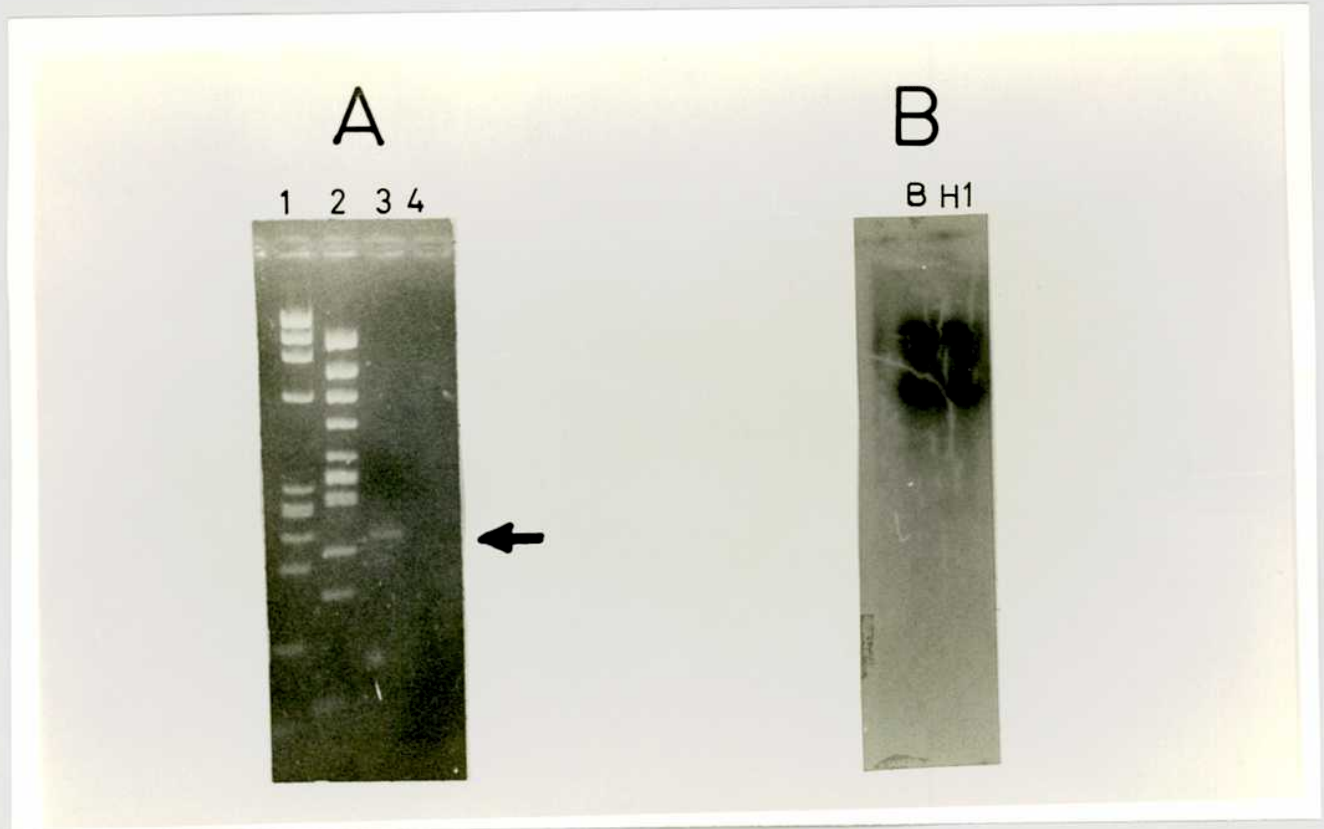


Figura R-31

- A. Clonado del extremo 5' del transcripto TcP0 por ARN-PCR (M&M, II.2.5) Gel de agarosa 2%: 1) Phi X174/Hae III; 2) Phi X174/HincII; 3) Producto de amplificación por PCR a partir de 2 μ g de ARN; 4) Control sin ARN.
- B. *Southern* genómico de *T. cruzi* (Tul 2) digerido con Bam H1 e hibridizado con el *amplicón* N-P0 marcado por *random priming*.

III.4.3.2. Secuenciación del fragmento N-P0:

N-P0 fue ligado *blunt* en el vector M13mp10/ Sma1. Dadas las diferencias entre las secuencias JL52 y CH3, se secuenciaron nueve clones M13 independientes. Las secuencias (227 pb) resultaron idénticas entre sí (Figura R-32).

El fragmento N-P0 permitió identificar la secuencia N-terminal de la proteína ribosomal TcP0.

En su extremo 5' presentó la secuencia completa del miniexón, seguida de 27 pb no codantes, hasta el codón de iniciación. Los 77 nucleótidos 3' correspondían a los 5' del ADNc CH3 (ver Figura R-29)

m i n i e x ó n

```

AACGCTATTA TTGATACAGT TTCTGTACTA TATTGAATCC GGGACTCAAG TATCTTTTTA
TTATGCCGTC TGTCTCCGAG GCCAAGCGGG AGTACGAGGA GCGTTTCAAT GGCTGCCTCA
CCAAGTACGG CGCGTGCTCT TGTGCTGATG ATAACGTCCG CTCGCAGCAG GTGCATGACG
TTCGTGCGGA CCTCCGTGGT TTGGGTGAAC TTGTGATGGG CAAGAAG

```

Figura R-32

Secuencia nucleotídica de N-P0. Se indican el miniexón y el codón de iniciación de la proteína TcP0. Los segmentos correspondientes a los primers utilizados para la reacción de PCR están subrayados.

La secuencia del ARNm TcP0 de tamaño completo fue construida por superposición de los fragmentos N-P0 y CH3 (Figura R-33). Consta de 1131 pb, en concordancia con el tamaño del ARNm detectado por Northern blot (ver Figura R-27-A), codifica para 321 aa, (PM calculado = 34756.800), en concordancia con los datos de Western blot (Int., I.4.3) y el punto isoeléctrico es de 5,66.

Resultados

10 20 30 40 50
 * * * * *
A ACG CTA TTA TTG ATA CAG TTT CTG TAC TAT ATT GAA TCC GGG ACT CAA GTA TCT TTT
 m i n i e x ó n

60 70 80 90 100 110
 * * * * * *
 ATT ATG CCG TCT GTC TCC GAG GCC AAG CGG GAG TAC GAG GAG CGT TTC AAT GGC TGC
 M P S V S E A K R E Y E E R F N G C

120 130 140 150 160 170
 * * * * * *
 CTC ACC AAG TAC GGC CGC GTG CTC TTC TGC CTG ATG GAT AAC GTC CGC TCG CAG CAG
 L T K Y G R V L F C L M D N V R S Q Q

180 190 200 210 220
 * * * * *
 GTG CAT GAC GTT CGT CGC GAC CTC CGT GGT TTG GGT GAA CTT GTG ATG GGC AAG AAG
 V H D V R R D L R G L G E L V M G K K

230 240 250 260 270 280
 * * * * * *
 ACG CTC CAG AAG AAG ATT GTG GAG AGG CGC GCG GAG GAC AAG AAG GCC AGC GCG TAC
 T L Q K K I V E R R A E D K K A S A Y

290 300 310 320 330 340
 * * * * * *
 GAC AAG TTG CTT TAC AAC ACG TGC ATC GAA AAG AAG CTG TTG TGC GGC AAC ACC GCC
 D K L L Y N T C I E K K L L C G N T A

350 360 370 380 390 400
 * * * * * *
 CTC ATC TTT ACG AAC GAG GAG ATC CCA GTC ATC ACG GCC GTG CTG GAC AAG CAC CGC
 L I F T N E E I P V I T A V L D K H R

410 420 430 440 450
 * * * * *
 GTA CAG GCC CCC GCC CGT GTG GGC GCA TCG CCA TGC GAC GTC ATT GTC CCC GCT GGT
 V Q A P A R V G A S P C D V I V P A G

460 470 480 490 500 510
 * * * * * *
 AAC ACC GGC ATG GAG CCC AAG GCG ACA TCC TTC TTC CAG GCA CTG AAC ATT GCG ACG
 N T G M E P K A T S F F Q A L N I A T

520 530 540 550 560 570
 * * * * * *
 AAG ATT GCA AAG GGT ACA GTC GAA ATT GTG AGT GAC AAG AAG GTA CTG AGC GCT GGT
 K I A K G T V E I V S D K K V L S A G

Resultados

```

                    580                    590                    600                    610                    620
                    *                    *                    *                    *                    *
GAT CGT GTG GAC AAC TCG ACG GCC ACG CTG CTG CAG AAG CTG GAT ATC TCC CCG TTC
D  R  V  D  N  S  T  A  T  L  L  Q  K  L  D  I  S  P  F

630                    640                    650                    660                    670                    680
*                    *                    *                    *                    *                    *
TAC TAC CAG GTG GAG GTG CAG TCC GTG TGG GAC CGT GGT ATG CTG TTT CTT CGC GAG
Y  Y  Q  V  E  V  Q  S  V  W  D  R  G  M  L  F  L  R  E

        690                    700                    710                    720                    730                    740
        *                    *                    *                    *                    *                    *
GAC CTT TCC ATC ACC GAC GAC GTT GTG GAG AAA TAC CTT CTG GAA GGT ATC AGC AAC
D  L  S  I  T  D  D  V  V  E  K  Y  L  L  E  G  I  S  N

        750                    760                    770                    780                    790
        *                    *                    *                    *                    *
GTT GTG GTT TCG CTG GGT GCT GGC ATC CCG ACG GCA GCG ACC TTG CCA CAT ATG ATC
V  V  V  S  L  G  A  G  I  P  T  A  A  T  L  P  H  M  I

800                    810                    820                    830                    840                    850
*                    *                    *                    *                    *                    *
ATG GAC GCG TTC AAG ACC CTT CTT GGC GCC TCC GTT GCC ACC GAA TAC GAG TTC GAT
M  D  A  F  K  T  L  L  G  A  S  V  A  T  E  Y  E  F  D

        860                    870                    880                    890                    900                    910
        *                    *                    *                    *                    *                    *
GAG TTT GAT GGC AAG AAC CTG CGC AAG GCC GCT CTG GAG GGC AAC CTT GGT GGA GGT
E  F  D  G  K  N  L  R  K  A  A  L  E  G  N  L  G  G  G

        920                    930                    940                    950                    960                    970
        *                    *                    *                    *                    *                    *
GCG GCT GAC GCT GCT GCC GCT ACC GAC ACC GGC GCT GCT GCC GCT CCT GCC GCT GCC
A  A  D  A  A  A  A  T  D  T  G  A  A  A  A  P  A  A  A

        980                    990                    1000                    1010                    1020
        *                    *                    *                    *                    *
GCT GAG CCC GAA GAG GAG GAT GAT GAC GAC GAC TTT GGC ATG GGG GCG CTG TTC TAA
A  E  P  E  E  E  D  D  D  D  D  F  G  M  G  A  L  F  *

1030                    1040                    1050                    1060                    1070                    1080
*                    *                    *                    *                    *                    *
CCT ACA AGG TAG AGA AGA AAG TTT TCG GAA CTT ATT TTA TTT TGT TTT TTG TTT TTT

        1090                    1100                    1110                    1120                    1130
        *                    *                    *                    *                    *
ATT TCT CAT ATT TAA AAA AAA AAA AAA AAA AAA AAA AAA AAA AA

```

Figura R-33

Secuencia del ARNm completo de la proteína ribosomal TcP0. Esta secuencia fue archivada en el banco de datos EMBL con el número de acceso X65066.

III.4.4. Localización cromosómica de los genes TcP0:

Se realizaron experiencias de *PFGE* (CHEF) para identificar los loci P0 en bandas cromosómicas de *T. cruzi* (M&M, II.2.3.2). Dado que experiencias iniciales con parásitos (Tul 2) revelaron que el ADNc JL52 hibridizaba en la zona de compresión de bandas cromosómicas de alto PM (ver M&M, II.2.3.2.1) se ensayaron condiciones electroforéticas que permitieran resolver la separación en esa zona. En estas experiencias se incluyeron parásitos de la cepa G (Tabla RT-4 y Figura R-34).

Experiencia A (80 V, 150 mA)		Experiencia B (80 V, 150 mA) Agarosa <i>Fast Lane</i> (FMC-Bioproducs)	
Tpo Pulso	Tpo Corrida	Tpo Pulso	Tpo Corrida
1. 90 seg	18 hs	1. 100 seg	26 hs
2. 200 seg	20 hs	2. 150 seg	15 hs
3. 350 seg	22 hs	3. 200 seg	12 hs
4. 500 seg	24 hs	4. 250 seg	12 hs
		5. 350 seg	12 hs
		6. 500 seg	20 hs
Tiempo Total:	84 hs		97 hs

TABLA RT-4.

Descripción del perfil de la experiencia A:(Figura R-34-A):

La cepa Tul 2 presentó dos bandas cromosómicas hibridizantes y una banda más débil cercana al origen de siembra de los bloques de parásitos, señaladas con flechas en la Figura R 33 A-II. En el gel de agarosa correspondiente (Fig 33 A-I) puede observarse que estas bandas hibridizantes coinciden con tres bandas cromosómicas de alto PM, la intermedia (indicada con Flecha (2)) migra como el cromosoma mayor de *S.cerevisiae* AB1380 (IV: 3,2 Mb), la más pesada está muy próxima al origen de siembra de los bloques de parásitos.

La cepa G, cuyo cariotipo difiere del de Tul 2, presentó una sola banda hibridizante débil de aprox. 1 Mb (carril G).

Descripción del perfil de la experiencia B:(Figura R-34-B):

El Southern blot a partir del gel de agarosa *Fast Lane* coincidió en la detección de las bandas cromosómicas (2) y (3) de la experiencia A para Tul 2. El cariotipo molecular de la cepa G reveló una única banda de 1 Mb.

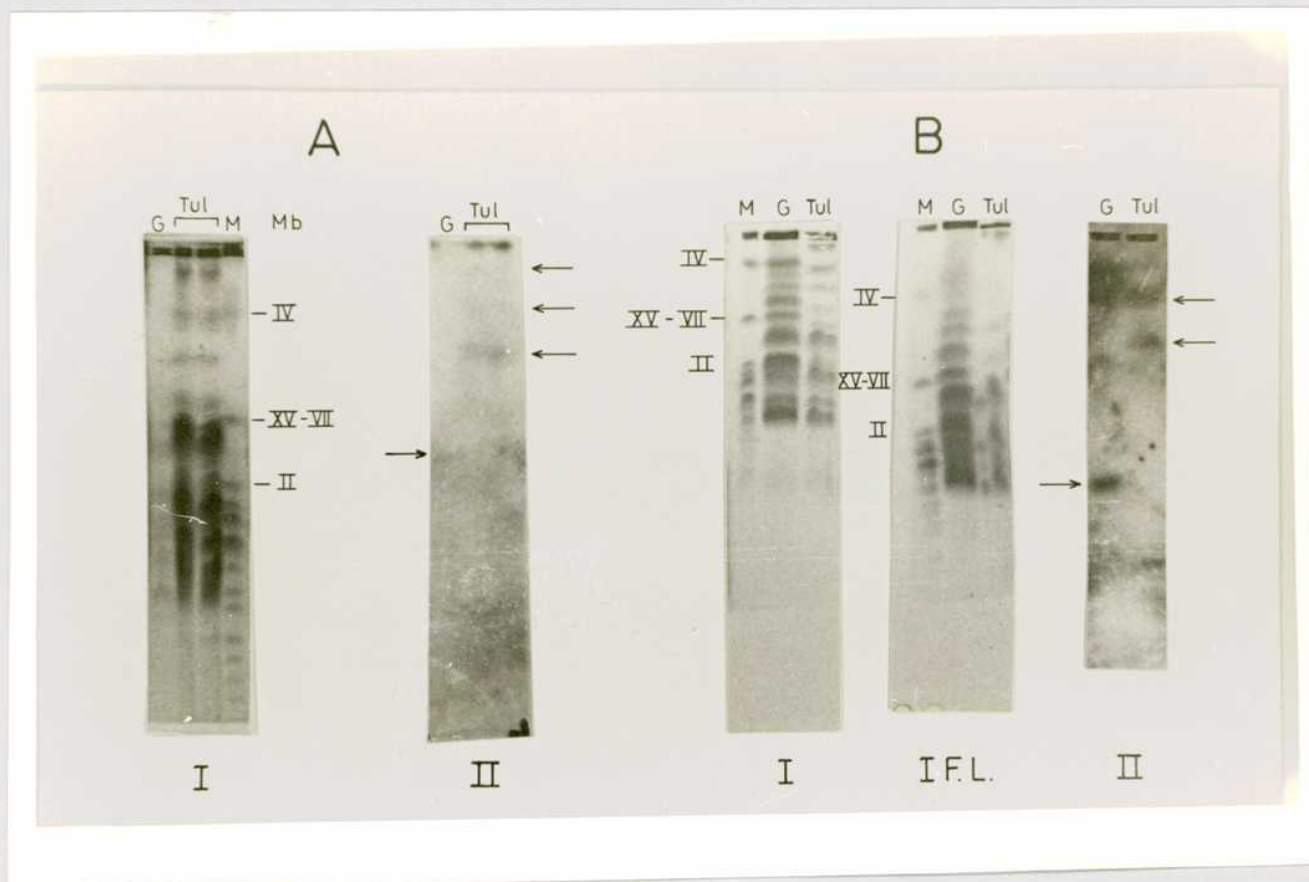


Figura R-34
Localización cromosómica de loci TcP0

A: Condiciones de electroforesis de la experiencia A de la Tabla RT-4. Gel de agarosa (I) y Southern (II) con muestras de *T. cruzi* (cepa G, Tul 2).

B: Condiciones de electroforesis de la experiencia B de la Tabla RT-4. Gel de agarosa (I), de agarosa Fast Lane (I.F.L) y Southern blot a partir de I.F.L (II), con muestras de *T. cruzi* (cepas G y Tul 2).

Cromosomas marcadores de PM de *S. cerevisiae* AB1380: IV= 3,2 Mb; XV, XVII= 2,2 Mb; II = 1 Mb (Galindo y Ramirez Ochoa, 1989).

Los filtros fueron hibridizados con la sonda CH3 marcada con random priming, usando el Kit de hibridización rápida en condiciones de alta rigurosidad (M&M, II.2.6.5.2.)

D I S C U S S I O N

IV.I. PROTEINA RIBOSOMAL Tc P-JL5.

IV.I.1 Análisis de la secuencia aminoacídica:

REGION GLOBULAR: Determinación de la identidad P2.

La secuencia aminoacídica de Tc P-JL5 fue alineada con la de las proteínas P1 y P2 de eucariontes, y L12e de archaeobacteria (Andreassen , comunicación personal)(Figura D1). La comparación permitió determinar que P-JL5 es una proteína de tipo P2, identidad que puede apreciarse al analizar los siguientes rasgos de la secuencia:

Los 7 aminoácidos N-terminales *MKYLAAY* de P-JL5 son idénticos a los de las P2 de *S.cerevisiae* y *Sc.pombe*.

La región globular de P-JL5 presenta una serie de aminoácidos conservados en la mayoría de las proteínas de tipo P2:

Residuo	Posición de alineamiento
Pro	31
Gly	44
Gly	61
Arg	38
Gly	61
Lys	62
Gly	72
Lys	75

Sin embargo, no se conservan los residuos Val (V:43), Glu (E:45), Leu (L:59), Ile (I:69), compartidos por la mayoría de las P2 del alineamiento.

Discusión

La proteína P-JL5 no posee el triptofano (posición 51 en Fig D1) característico de las P1. No obstante, se identificó un motivo, *KAAGVPVDPS*, presente en las P1 de otros eucariontes (posiciones 41-50 en el alineamiento); es notable que éste motivo en TcP-JL5 presente mayor homología con los equivalentes de las P1 de *G.gallus*, *R.norvegicus* y *H.sapiens*, que con el de eucariontes inferiores (Figura D1).

Se determinó la homología entre TcP-JL5 y las dos proteínas L12e de *S.cerevisiae*: L12 eIA y L12 eIB (nomenclatura de Newton y col, 1990) que corresponden a las YP2 β y YP2 α , en la nomenclatura de Wool y col (1991). En el cálculo se consideraron solo las regiones globulares de las proteínas (posiciones 1 a 76 del alineamiento de la Figura D1), criterio empleado para estudios evolutivos de proteínas ribosomales P de otros organismos (Newton y col, 1989) (ver Int.. I.3.2.1). TcP-JL5 presenta mayor homología con Sc L12eIA, de ahí su denominación de TcP2A (Tabla DT1).

Cabe destacar que TcP2A presenta la serina N-19, conservada en Sc eIA y no en SceIB, en posición equivalente a la serina fosforilable en levaduras (Naranda y Ballesta, 1991).

Proteínas	Long.(1)	Aa.idénticos	Homología	Espacios
P-JL5/SceIA	61	23	38 %	2
P-JL5/SceIB	60	19	32%	2

Tabla DT1

Homología entre TcP-JL5 (TcP2a) y las P2 de *S.cerevisiae*.

(1) $L = R - E/2$, donde R es el número de residuos dentro de la región de comparación (posiciones 14 a 76) y E es el número de residuos no comparables dentro de la región de alineamiento, ya que corresponden a las posiciones de los espacios (gaps).

Leyenda de Figura D1:

Alineamiento de Secuencias de proteínas ribosomales L12e, P1 y P2 de archaeobacteria y eucariontes.

Hs	<i>H. sapiens</i>	Rich y Steitz, 1987
Rn	<i>R. norvegicus</i>	Wool y col, 1990
Gg	<i>G. gallus</i>	Ferro y Reinach., 1988
Dm	<i>D. melanogaster</i>	Wigboldus, 1987; Qian y col, 1987
As	<i>A. salina</i>	Amons y col., 1982
Sc	<i>S. cerevisiae</i>	Remacha y col., 1988; Mitsui y Tsurugi, 1988; Newton y col., 1990
Sp	<i>Sc. pombe</i>	Beltrame y Bianchi., 1990
Pp	<i>P. penicillatus</i>	Andreassen., comunicación personal
Dd	<i>D. discoideum</i>	Prieto y col., 1991
Tc	<i>T. cruzi</i>	Schijman y col., 1990; Vazquez y col., 1992
Bv	<i>B. bovis</i>	Andreassen, comunicación personal
Tt	<i>T. thermophila</i>	Hansen y col, 1991
Mv	<i>M. vanniellii</i>	Strobel y col, 1988
Sa	<i>S. acidocaldarius</i>	Matheson y col, 1988
Se	<i>S. solfataricus</i>	Ramirez y col, 1989
Hh	<i>H. halobium</i>	Itoh, 1988
Hc	<i>H. cutirubrum</i>	Ramirez y col, 1989
Hm	<i>H. marismortui</i>	Arndt y Weigel, 1990

Las secuencias fueron alineadas usando el programa TREEALIGN (Hein, 1990) y el alineamiento resultante fue ajustado a mano para obtener máxima homología (Andreassen, Laboratorio de Biología Molecular de Odense, Dinamarca, comunicación personal)

A partir del alineamiento de la Figura D-1 se construyó un árbol filogenético (Figura D2). En este dendrograma, las ramificaciones obtenidas a partir de las secuencias P muestran que el linaje que conduce a TcP2a surge de un antepasado común con el que conduce a *Dictyostelium discoideum*. Es llamativo que la línea filética de *T. cruzi* sea posterior a la del ciliado *T. thermophila*, dado que estudios filogenéticos realizados en base a secuencias de ARN ribosomal indican que los tripanosomátidos provienen de una ramificación anterior a la que dió origen a los ciliados (Sogin y col,1986).

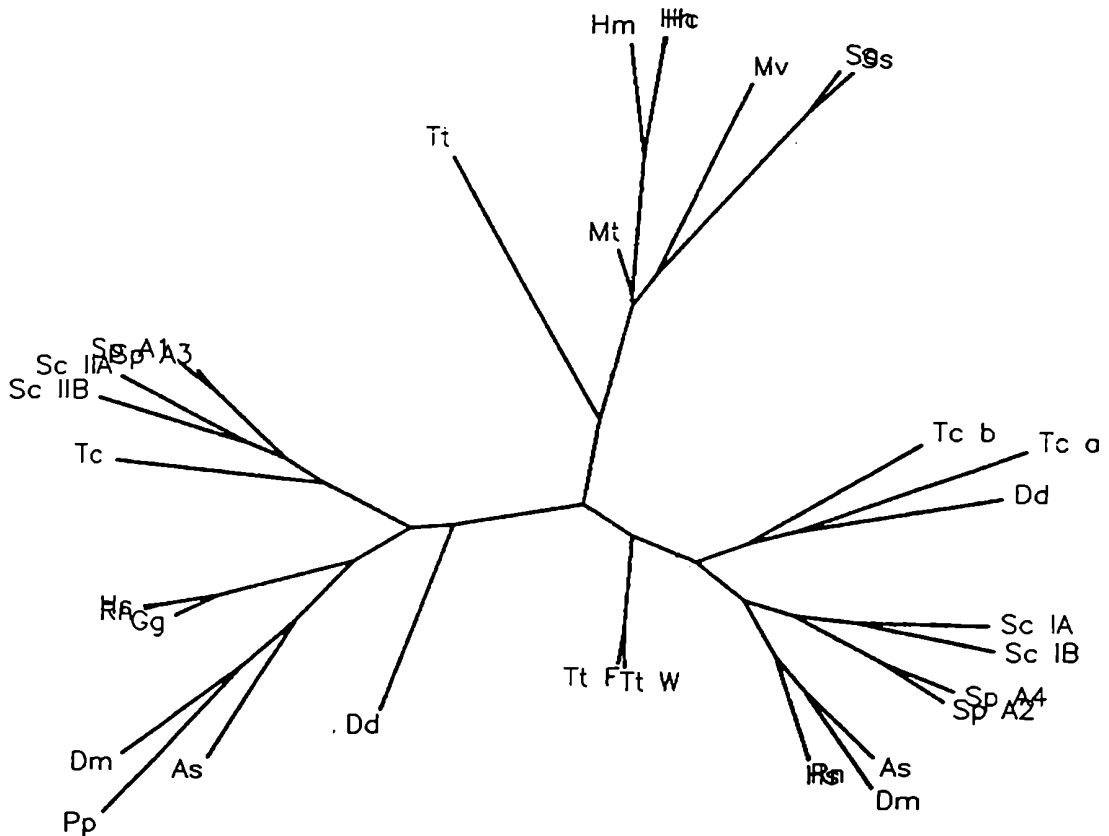


Figura D2

Se utilizó el programa PROTPARS de la serie PHYLIP (Felsenstein, 1990)(Andreassen, comunicación personal)

IV.I.2 Caracterización de las isoformas de TcP2a en la cepa Tul 2 de *T. cruzi*.

IV.I.2.1. Análisis de las regiones codantes de los 4 transcriptos TcP2a

El alineamiento de las regiones codantes para las cuatro isoformas TcP2a (Tul 2) clonadas permitió detectar sustituciones nucleotídicas, que se detallan en la Tabla DT2 (ver Res, Figura R.7-B).

CODON	P-JL5 A	P-JL5 B	P-JL5 C	P-JL5 D
7	TAT Tyr	TAC Tyr	TAC Tyr	TAC Tyr
12	CTC Leu	CTC Leu	TTA Leu	CTC Leu
13	TCA Ser	TCA Ser	TCT Ser	TCA Ser
14	GGG Gly	GGA Gly	GGG Gly	GGA Gly
18	TCA Ser	TCA Ser	TCG Ser	TCA Ser
21	GCA Ala	GCA Ala	GCC Ala	GCA Ala
33	GTT Val	GTT Val	GTC Val	GTT Val
46	GCA Ala	GCA Ala	GCA Ala	TCA Ser
50	CTT Leu	TTT Phe	TTT Phe	TTT Phe
55	ACT Thr	ACT Thr	GCT Ala	ACT Thr
65	GCT Ala	GTT Val	GTT Val	GTT Val
66	ACA Thr	ACA Thr	GCA Ala	ACA Thr
84	AGT Ser	AGT Ser	GGT Gly	AGT Ser

Tabla DT2.

Se observa que en la región aminoterminal (Codones 1-33) todas las sustituciones son silenciosas; incluso el codón N-12 de P-JL5 C presenta dos sustituciones nucleotídicas respecto a las otras isoformas que conservan la leucina; notablemente estas sustituciones CTC por TTA ocurren en contra de la tendencia en el uso de codones de las proteínas P de *T. cruzi* (Apéndice, VI.1). Esto sugiere un rol para la región aminoterminal de P-JL5 que requeriría una secuencia aminoacídica muy conservada. Se ha propuesto que esta región de las P sería la responsable

Discusión

de interactuar con el ribosoma (Remacha y col, comunicación personal; Matheson y col, 1991). En cambio, en la región central y en la bisagra todas las sustituciones nucleotídicas determinan cambios en los aminoácidos, A-S, F-L, T-A, V-A, T-A y S-G (posiciones 46-84 en Tabla DT2).

Las secuencias nucleotídicas de los extremos carboxiterminales son idénticas en las cuatro isoformas.

Es interesante notar que para cada posición variable los cambios se producen en una sola de las cuatro formas. La forma P-JL5 B lleva los codones que son mayoritarios en cada una de las posiciones variables (ver Res; Figura R7-B, pág. 112). Así, es posible especular que el gen P-JL5 B puede ser la copia original a partir de la cual surgieron las otras copias por duplicación génica.

IV.I.2.2. Señales de trans-splicing en los transcriptos P-JL5:

En los extremos 5' de todos los transcriptos derivados de los genes P-JL5 B, C y D, el minixón se adicionó a 12 bases del codón de iniciación. Sin embargo en el ADNc P-JL5 A el sitio de adición ocurrió a 62 b río arriba del ATG (ver Res, Fig. 7-A, pág. 111).

En el extremo 5' no codante (transon) del fragmento genómico Eco R1 1 kb se buscaron señales de *trans-splicing* 5' = TTTCPy y 3' = AG (Laird y col., 1987). Se encontraron dos motivos TTTCC a [-68/-72] y [-85/-89] pb río arriba del codón de iniciación de la traducción; también se identificaron 6 dinucleótidos AG, río abajo de los motivos TTTCC (Figura D3). De estos 6 AG, los únicos sitios aceptores en los ARNm secuenciados (ver Figuras R-6 y R7-A) corresponden a los dinucleótidos AG en posiciones -63 y -13 en el fragmento genómico (ver Figura D-3); ubicados a 20/3 pb y 67/50 pb río abajo de ambas señales TTTCC, respec-

tivamente. La distancia entre los sitios de *trans-splicing* en el transon acceptor están en el rango descrito para genes de otros tripanosomátidos (Int; Fig I.3; pág. 12) (Laird, 1990).

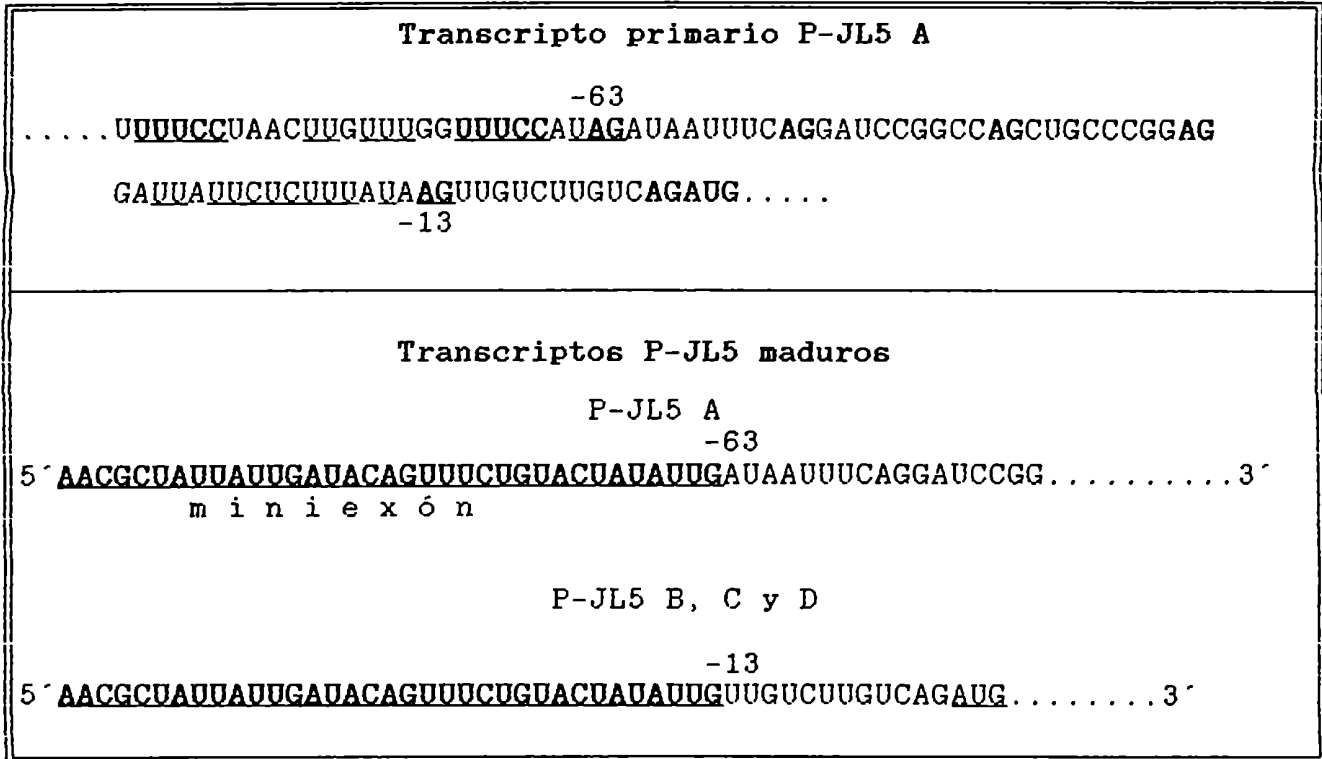


Figura D3

Layden y Eisen (1988) han propuesto que la elección de un sitio 3' AG determinado está determinada en parte por la composición nucleotídica de su entorno. En particular las 15 bases 5'adyacentes al sitio elegido en varios transcritos de *T. brucei* y en los de ubiquitina de *T. cruzi*, presentaron un contenido en Pirimidinas mayor del 65%. Efectivamente, los sitios AG -13 y -63 utilizados en los ARNm maduros P-JL5, son los que presentan mayor proporción de pirimidinas respecto al resto de los sitios AG presentes en el transon (ver Tabla DT3).

Sitio AGs	Py(n°)	Py(%)
-1	9	60
-13	11	73
-32	8	53
-42	9	60
-53	9	60
-63	11	73
-96	5	33
-110	3	20
-116	4	27
-124	8	53

Tabla DT3

Py(n°) = cantidad de pirimidinas en las 15 bases adyacentes al sitio AG.

* Los sitios AG en posiciones -96 a -124 están localizados río arriba de las señales TTTCC.

IV.I.3. Organización genómica de TcP-JL5.

Los Southern blots genómicos en la cepa Tul 2 revelaron que P-JL5 es codificada por una familia multigénica con al menos cuatro loci independientes (Res, III.2.4. pag 113). Experiencias de PFGE detectaron hibridización en 3 especies cromosómicas y en la zona de compresión del gel (sugiriendo que podrían existir más loci en cromosomas no resueltos en las condiciones ensayadas).

Dado que existen evidencias de diploidía en *T. cruzi* (ver Int,I.2.2.4, pág.17) es necesario analizar si las copias genómicas P-JL5 identificadas y parcialmente caracterizadas, corresponden a genes duplicados o a formas alélicas de un mismo gen. El polimorfismo de restricción y la secuenciación parcial de distintas copias genómicas de TcP-JL5 (Res.,III.2.5) son indicativos de loci independientes (por ejemplo, en el caso del par de alelos descrito para el gen del antígeno 2 de *T. cruzi* , Henriksson y col., 1990, las regiones flanqueantes a las unidades repetitivas codificadas por este gen resultaron idénticas para más de 20 sitios de restricción en una región cromosómica abarcando 20 kb). Cabe la discusión sobre la forma P-JL5 D, que posee una única sustitución respecto a la forma P-JL5 B (Ser por Ala, respectivamente). Hasta el momento se ha aislado un único fago λ gt11 con ésta característica; no se ha identificado la secuencia genómica correspondiente. Por lo tanto, no es posible determinar si P-JL5 D deriva de un cuarto gen P-JL5, o es un alelo del gen P-JL5 B; tampoco se puede descartar que se trate del producto de un error de la retrotranscriptasa durante la síntesis de ADNc.

IV.I.3.1. Comparación de las regiones 3' flanqueantes de los genes P-JL5 clonados:

Del alineamiento de las secuencias 3' flanqueantes de los genes P-JL5 A, B y C se observó que:

Los fragmentos de 800 pb definidos por los sitios PstI comunes en los genes P-JL5 B y C pudieron alinearse, incorporando dos gaps (Fig R-15, págs 116-117).

La secuencia 3' no codante del gen P-JL5 A pudo alinearse con las otras dos únicamente a lo largo de una región de 170 bases río abajo del codón stop de P-JL5, a partir de la cual diverge totalmente. El punto de divergencia ocurre después de un tracto de timinas. Cuatro nucleótidos río abajo del punto de divergencia en P-JL5 A se identificó un motivo GCTTGTG:

```

PJL5 A AACGCATGGCAAAAAAGGGTACGCCATTGGGTTGGCCTTTTTTTTtagga GCTTGTG aaaa
      ::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::
PJL5 C AACGCATGGCAAAAAAGGGTACGCCATTGGGTTGGCCTTTTTTTTtcttt ttttcc cctt
PJL5 B AACGCATGGCAAAAAAGGGTACGCCATTGGGTTGGCCTTTTTTTTt--- ---ccc cctt
    
```

Este motivo es idéntico al hallado en la región intergénica que separa los dos marcos de lectura de las GAPDH glicosomales de *T. cruzi* y de *T. brucei*: GCTTGTGG (Kendall y col, 1990), y que además se localiza próximo al punto en el cual divergen las regiones 3' flanqueantes de estos genes. Estos motivos son homólogos a las secuencias CHI de *E. coli* que promueven la recombinación cuando esta secuencia es reconocida por la recombinasa Rec BCD (Stahl y col., 1975; revisión en Thaler y Stahl, 1988); estos motivos estarían asociados al mecanismo de conversión génica, encargado de mantener la identidad nucleotídica entre copias de genes duplicados en tripanosomátidos (Marchand y col., 1988; Le Blancq y col., 1988). Es relevante, pues, la presencia de este motivo en la proximidad del punto de divergencia 3' del gen P-JL5 A respecto a los otros dos genes caracterizados.

IV.I.3.2. Marcos de lectura abiertos en regiones 3' de genes P-JL5.

La secuencia 3'flanqueante del gen P-JL5 A en el fragmento Eco R1 es de 476 pb. En esta región existe un marco de lectura abierto de 33 residuos. La región 5' adyacente a este marco presenta varias señales potenciales de *trans-splicing*, y la región 3' flaqueante presenta un motivo ATTTTATTTT repetido en las regiones 3'flaqueantes de los genes P-JL5. Este motivo ha sido detectado en regiones equivalentes de los otros genes ribosomales P de *T.cruzi* (ver Apéndice). El sitio Eco R1 3' interrumpe otro marco de lectura que comienza siete codones antes (Figura D4).

También se han encontrado marcos de lectura abiertos en las regiones 3' de los genes P-JL5 B y C.

La comparación de estas secuencias con un banco de datos (GENE BANK - EMBL data base) no reveló homologías.

```

AGACAAATGCTTATTTTATTTTATTTTGGATTTGTTTCTCTGTTTTCCATGAAGAGGCGCCGGAGTCCT
GTGAATAAAATGCGAGAGAGTAAATAAAAGTAGGATCAGTAACTGCTGCACTCAAACGCATGGCAAAAAA
GGGTACGCCATTGGGTTGGCCTTTTTTTTAGGAGCTTGTGAAAAGAATGATCACGGGAGAGCTGGCTAAC
TTAATTAATG TAT GTG TAT ATC CTG ATA AAT GAA TGC ATT CTT TAT GAT ACT TTC
      M   Y   V   Y   I   L   I   N   E   C   I   L   Y   D   T   F
TAC CGT ATG AAT CTT TTG GGA AGA ACG CGA CTT TGT AGG GGC GGG AAC CGATAG
  Y   R   M   N   L   L   G   R   T   R   L   C   R   G   G   N   R   *
GAGGCCGGATAATATTTTAAATTTTATTTTGCCATCCCACCCACCCCCTTGATTCCCACCACGCGGCGGG
GTCTTGTGGTTGGAGGACCCCAAAGTCTGCCACTTCGTAAGTAATAATATTTCAAATCCTAACTGAGGAC
AAAGGACC ATG CTA ATG GTC CAC AGA ATT C
      M   L   M   V   H   R   I
    
```

IV.I.4. Caracterización de genes Tc P-JL5 en otras cepas de *T.cruzi*.

El ADNc S23 de la biblioteca de tripomastigotes sanguíneos de la cepa RA (secuencia en Fig.R-5, pág. 102), presentó los aminoácidos característicos de la isoforma P-JL5-C (Tul 2), difiriendo en dos sustituciones nucleotídicas silenciosas.

Discusión

Es interesante notar que el extremo del ARNm poliadenilado S23 se extendió unas 14 bases río abajo respecto a JL5 (Figura D5). La secuenciación del clon genómico H13 (Tul 2) permitió identificar la secuencia adicional de S23, sugiriendo que el transcripto S23 proviene del gen equivalente a P-JL5 C en la cepa RA (P-JL5 C-RA) que se poliadeniló en un sitio diferente. Esto podría estar relacionado con la sustitución G por A que ocurre precisamente en el primer sitio de poliadenilación (ver esquema)

Extremos 3' en transcriptos P-JL5 C de las cepas Tul 2 y RA.

```
ADNc Tul  AGACAAATGC TTATTTTATT TTATTTTGA TTTTGTTCCT GTGTTGTCCA
           ::::::::::: ::::::::::: ::::::::::: ::::::::::: :::::::::::
Gen Tul   AGACAAATGC TTATTTTATT TTATTTTGA TTTTGTTCCT CTGTTGTCCA
           ::::::::::: ::::::::::: ::::::::::: ::::::::::: : :::: :::::::
ADNc RA   AGACAAATGC TTATTTTATT TTATTTTGA TTTTGTTCGT GTGCTGTCCA

ADNc Tul  TGAAGAGGCG CT(A)n
           ::::::::::: ::
Gen Tul   TGAAGAGGCG CTGGAGTCCTGTGAATAAAATG
           ::::::::::: :: :::::::::::
ADNc RA   TGAAGAGGCG CTAGAGTCCTGTGAAT(A)n
```

Figura D5

Los Southern blots de las cepas CL e Y revelaron también un sistema multigénico para P-JL5, sin embargo la cepa G solo presentó un solo fragmento genómico hibridizante en la mayoría de las digestiones realizadas (Res; Figura R-17; pág 129). Sería muy interesante identificar entonces, que isoformas P-JL5 se conservan en esta cepa, aislada de Marsupiales (Franco da Silveira, comunicación personal).

IV.2. PROTEINAS RIBOSOMALES P-G13 Y P-L6:

El clonado de los ADNc G13 y L6 permitió identificar en *T. cruzi* dos proteínas ribosomales P distintas a P-JL5 y P0. Los análisis por Northern blot sugerían que se trataba de proteínas ribosomales P de bajo PM. Esto fue demostrado con el clonado de los ADNc de tamaño completo correspondientes a ambas proteínas (Vazquez, M., Schijman, A., Levin, M. (1992). *Nucleic. Acids Res.* 20: 2599 y Vazquez, M.; Schijman, A.; Panebra, A.; Levin, M.; (1992) *Nucleic. Acids Res.* 20: 2894.

IV.2.1 Proteína ribosomal P-G13 " TcP2b "

La secuencia completa de P-G13, obtenida por M. Vazquez (comunicación personal) presentó 114 residuos. La comparación con otras secuencias aminoacídicas P reveló que es una proteína de tipo P2, por lo que se denominó TcP2b.

El extremo aminoterminal de TcP2b deducido de la secuencia nucleotídica presenta dos metioninas, separadas por una serina. El dipéptido N-terminal MS es característico de las proteínas de tipo P1. A partir de la segunda metionina el motivo *M K Y L A A Y A L* (posiciones de alineamiento 3 a 11) es idéntico al extremo aminoterminal de Tc P-JL5. Si bien la microsecuenciación del extremo amino terminal de la proteína permitirá identificar la secuencia de la proteína TcP2b, la secuencia nucleotídica de la zona 5'adyacente a la primera metionina coincide con la secuencia consenso de Kozak, indicativa de la metionina N-terminal (Kozak, 1984). La secuencia aminoacídica completa de TcP2b y su comparación con TcP2a se presenta en la Figura D6.

	1		10		20		30
TCP2b	M S	<u>M K Y L A A Y A L</u>	A S L N K P T P G A A D V E A I C K A				
		* * * * *	* * * * + + * +		* * +	+ * * * +	* *
PJL5	- -	M K Y L A A Y A L V G L S G G T P S K S A V E A V L K A					
			40		50		60
TCP2b	<u>C G I E V E S D A L S F V M E S I A G R S V A T L V A E G A</u>						
	* + * +	+ +			* * +	* +	* *
PJL5	A G V P V D P S R V D A L F A E F A G K D E D T V C T E G K						
			70		80		90
TCP2b	A K M S A V A V S A A P A A G D A A A P A A A A - G G A A						
	+ * * + *				* + *	* * * *	* * * *
PJL5	S K L V G G V T R P N A A T A S A P T A A A A A S G G A A						
			100		110		
TCP2b	A P A A A D A K K E E E E E D D D M G F G L F D						
	* * * * *	*			* * * * * * * * * * * * * * * *		
PJL5	A P A A A - A - - - E E E E D D D M G F G L F D						

Figura D6

Alineamiento de las secuencias aminoacídicas de las proteínas TcP2a y TcP2b. Se indica con asteriscos * los residuos idénticos y con +, los cambios conservativos.

IV.2.2. Proteína ribosomal P-L6: " TcP1 "

La secuencia aminoacídica completa de P-L6, obtenida por M. Vazquez (comunicación personal) presentó 109 residuos (Figura D7). La comparación de su secuencia aminoacídica con el resto de las proteínas ribosomales P, reveló que es una proteína de tipo P1, razón por la cual se la denominó TcP1. Presentó un extremo amino-terminal MS característico de las P1, y el motivo conservado KAAGVDVS, también presente en TcP-JL5. Llamativamente, TcP1 comparte mayor homología con la P1 humana que con la de *S.cerevisiae* (Figura D7).

```

      1              10              20
TcP1  M - S S K Q Q L A C T Y A A L I L A D S G K T D M D S - L L
HP1   * A * V - S E * * * I * S * * Y * H * D E V * V E T D K I N
YP1a  * - * T E S A * - - S * * * * * * * * * * E T E I S S E K * *

      31              40              50
TcP1  K V T K A A G V D V S K G M A S A F A S I L K N V D I N D V
HP1   A L I * * * * * N * G P F W P G L * * K A * A * * N * G S L
YP1a  T L * N * * N * P D E N I W * D I * * K A * D G Q N L K * I

      61              70              80
TcP1  L S K V S F G G V A P A A G G A T A A P A A A A A A A P
HP1   I C N * G A * * P * * * * * A * P * G G P * P S T * * * *
YP1a  * V N T S A - - - - - G * A A P A G V A G G V * G G E * G

      91              100
TcP1  A A A A A - - - K K E E - E E E D D D M G F G L F D
HP1   * E E K K V E A * * * * S * * S * * * * * * * * * *
YP1a  E * E * E K E E E E A K - * * S * * * * * * * * * *

```

Figura D7

Alineamiento de las secuencias aminoacídicas de TcP1, Hs P1 y ScP1a. La región globular se extiende desde la posición de alineamiento 1 a 64; la bisagra desde la posición 65 a la 95, y el dominio C-terminal desde la posición 96 a la 116. Los límites de estos dominios se indican con las flechas. Los asteriscos * indican residuos idénticos.

V.2.3 Organización genómica en TcP2b y TcP1.

Southern blots genómicos permitieron identificar la existencia de al menos dos loci independientes para TcP2b. Los ADNc G13 y Mat1 provienen de la misma biblioteca de *T. cruzi* (RA), por lo tanto las variaciones de secuencia en las regiones 3'flanqueantes sugieren que cada uno correspondería al transcrito de una copia genómica distinta.

El Southern blot de TcP1 reveló bandas únicas de alto PM para enzimas que no presentan sitios en la secuencia, indicando que él o los genes para TcP1 están concentrados en una úni-

Discusión

ca región por genoma haploide. Para descartar la posibilidad de que TcP1 está codificada por varias copias agrupadas, (por ej: en tandem) será necesario utilizar enzimas que corten una sola vez dentro de TcP1 y realizar digestiones parciales.

Un análisis exhaustivo de estas proteínas y de la expresión de sus genes se realiza actualmente (M.Vazquez, Tesis doctoral en realización).

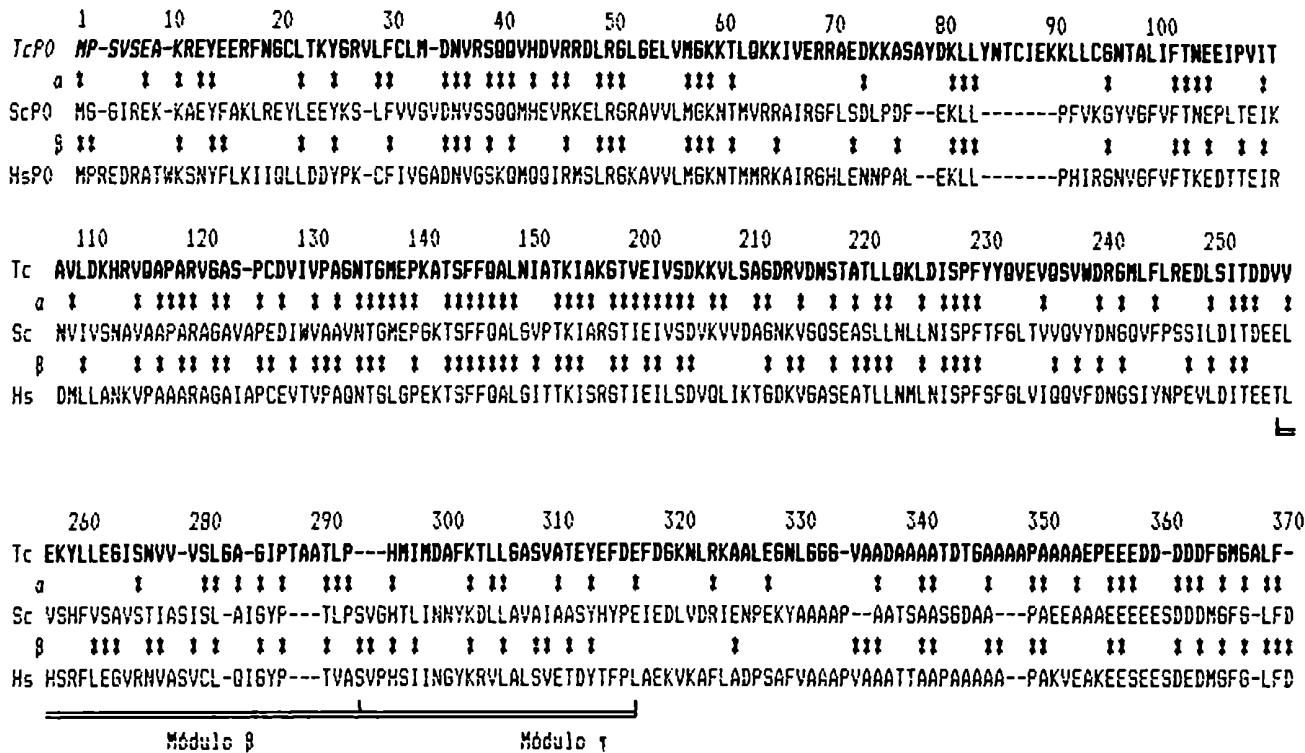
IV.3. PROTEINA RIBOSOMAL TcP0

IV.3.1. Análisis de la secuencia aminoacídica:

La secuencia aminoacídica de la proteína P0 de *T. cruzi*, TcP0, derivada de las secuencias de ADNc N-P0 (Res, III.4.3.2) y CH3 (Res III.4.2.1) tiene 321 residuos. Entre las proteínas equivalentes de eucariontes es la de mayor PM; la L10e de *D. discoideum* tiene 305 residuos, la de *S. cerevisiae* 312, y las P0 de artrópodos y mamíferos tienen 317 residuos (ver Int, I.3). TcP0 es más acídica que las P0 de otros eucariontes (pI: 5,66) (49 residuos ácidos y 40 básicos) (Wool y col, 1991; Rich y Steitz, 1987). Posee 39 alaninas, 14 de las cuales se concentran en la región bisagra, característica que comparte con el resto de las proteínas P. Por otro lado, posee 5 cisteínas, residuo generalmente ausente en las proteínas P de otros organismos, y presenta 3 histidinas, ausentes en TcP1, TcP2b y TcP-JL5.

IV.3.2. Comparación de la secuencia de TcP0 con la de otros organismos:

Para su comparación, la secuencia aminoacídica de TcP0 se alineó con las proteínas equivalentes de *S. cerevisiae* (ScP0) y humana (HsP0). Para optimizar el alineamiento se incorporaron *gaps*; se identificaron motivos conservados en las especies comparadas (Figura D8).



F I S U R A D - 8

Alineamiento de TcP0, ScP0 y HsP0. Los asteriscos indican aminoácidos idénticos entre TcP0 y ScP0 (a) y entre TcP0 y HsP0 (β).

IV.3.2.1. Dominio putativo de interacción con el ARN ribosomal

En las posiciones 45 a 65 del alineamiento, TcP0 presenta un motivo rico en residuos básicos que es homólogo al dominio de interacción de la proteína L10 con el ARNr 23S (Egebjerg y col, 1990), dominio conservado en todas las P0 eucariontes (Figura D9-A).

En este dominio se pueden identificar pares de residuos básicos conservados (A, B y C de Figura D9-B). En TcP0 existen pares adicionales en la región adyacente (D, E y F), que abarcan el segmento donde se establece el *gap* principal en el alineamiento de la Figura D8. En esta región de TcP0, se puede observar un motivo, duplicado, DKLL--NT (recuadro en Fig D9-B).

La secuencia peculiar de esta región de TcP0 podría estar asociada a su interacción con el ARNr 24 S de *T. cruzi* (Castro y col, 1981, Hernandez y col, 1983), explicando además la diferencia de longitud entre TcP0 (321 aa) respecto a las P0 de otros eucariontes (312-317 aa), evidenciada por el *gap* del alineamiento de la Figura D8.

A.

Tc P0	N-42	RRDLRGLGEL--VMGKKTQKKIVE
Ec L10	N-41	*KAG*EA*VYMR*VR-N**LRRRA**
Hm L10	N-51	*-**H*TA**R*SR-N**LERALD
Dd P0	N-42	*KSI**I*AV--L*****MIR*VIR
Sc P0	N-42	*KE***RAVV--L***N*MVRRAIR
Dm P0	N-44	*TS****AVV--L***N*MMR*AIR
Hs P0	N-44	*MS****AVV--L***N*MMR*AIR

Figura D9-A

A. Comparación de la región homóloga de TcP0 con el dominio de interacción de *E. coli* L10-ARNr 23S y con las regiones equivalentes de las proteínas P0 de *H. marismortui* (Hm L10); *D. discoideum* (DdP0); *S. cerevisiae* (ScP0), *D. melanogaster* AP3 (DmP0) y *H. sapiens* (HsP0). Los asteriscos indican residuos idénticos con TcP0.

B.

						+*** ** + *** **
Tc	N-42	RRDLRGLGELVMG	<u>KKTLQ</u>	<u>KKIVERRAED</u>	<u>KKASAY</u>	DKLLYNTCIE <u>KKLL</u> CGNT
		A	B	C	D	E
Sc	N-42	RKELRGRAVVL	MGKNTM	VRRRAIR	GFLSDL	PDF---EKLL-----PFV
						KGYV
He	N-44	RMSLRGKAVVL	MGKNTM	MRKAIR	GHLENN	PAL---EKLL-----PHIR
						GNV

Figura D9-B

B. Análisis de la región de interacción con el ARNr, indicando en subrayado los pares de residuos básicos y en recuadro la secuencia adicional en TcP0 respecto a las P0 de otros eucariotes.

IV.3.2.2. Análisis de la bisagra y la región C-terminal.

El tamaño de la región bisagra y del extremo C-terminal son similares en las tres proteínas comparadas. Sin embargo el motivo del heptapéptido C-terminal distintivo de la familia de proteínas ribosomales P de eucariotes (MGFGLFD), se encuentra modificado en TcP0 (FGMGALF). Los cambios son:

una delección del residuo ácido (Asp) C-terminal; queda un residuo hidrofóbico (Phe) en dicha posición.

la inversión Met por Phe.

la inserción de una Ala. La posición de ambas Gly permanece conservada.

La naturaleza del extremo C-terminal de TcP0 permitió explicar la no reactividad de los sueros lúpicos con la proteína P38 (ver Int, I.4, pág. 35). El epitope lúpico (SDDDMGFGLFD) conservado en TcP-JL5, TcP2b y TcP1 (EDDDMGFGLFD) no se encuentra en TcP0 (DDDDFGMGALF). La diferencia principal reside en el heptapéptido C-terminal. El extremo C-terminal de TcP0 es

Discusión

único entre la familia de proteínas ribosomales P eucariontes, y entre los miembros de la familia P de *T.cruzi* hasta ahora caracterizados. Se asemeja al extremo C-terminal de las proteínas L10e de algunas especies de archaebacteria como *M.vanielli* y *Halobacterium marismortui* (Figura D10).

<i>H.m</i>	L10e	D	D	D	D	D	D	D	E	D	G	D	A	L	G	A	M	F	-	
<i>M.v</i>	L10e	E	E	K	K	E	E	A	A	P	A	A	A	G	L	G	L	L	F	-
<i>T.c</i>	P0	E	P	E	E	E	D	D	D	D	D	D	F	G	M	G	A	L	F	-
<i>B.b</i>	P0	A	E	E	P	E	E	E	E	D	D	D	M	G	F	S	-	L	F	D
<i>D.d</i>	L10e	E	E	K	K	E	E	S	D	D	D	D	M	G	M	G	-	L	F	D
<i>H.s</i>	P0	K	E	E	S	E	E	S	D	E	D	D	M	G	F	G	-	L	F	D

Si se compara la secuencia completa de la proteína TcP0 con otras proteínas equivalentes de archaebacteria y eucariontes y se construye un árbol filogenético (Andreassen, comunicación personal) se observa que *T.cruzi* presenta mayor distancia evolutiva respecto a las archaebacteria que por ejemplo el protozoo *Babesia bovis*, cuyo extremo C-terminal es del tipo P canónico (Figura D 11).

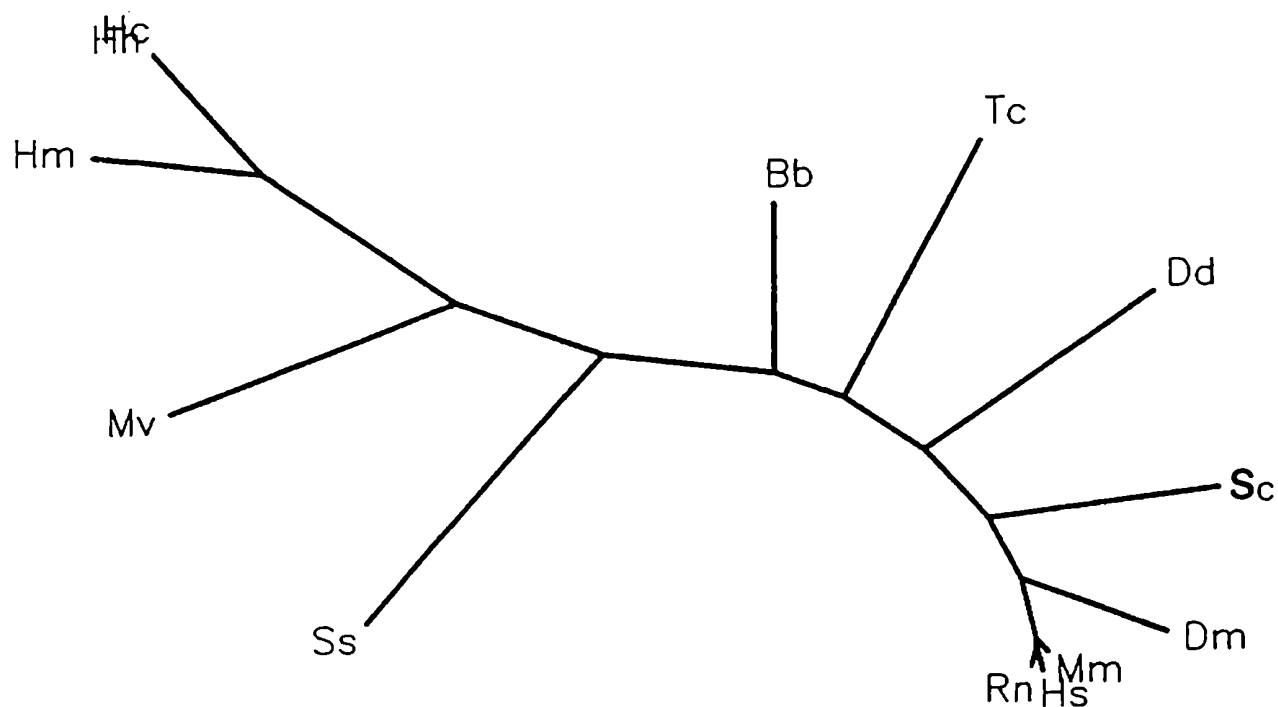


Figura D11

Dendrograma construido por el Dr Andreassen (Laboratorio de Biología Molecular de Odense, Dinamarca, comunicación personal) utilizando el criterio de parsimonia de proteínas (Prot Pars). Se incluyen las secuencias L10e de 5 especies de archaeobacteria y P0 de 7 especies de eucariontes. El nombre de las especies analizadas se indica en la leyenda de la Figura D1.

IV.3.3. Organización genómica de TcP0

Los ADNc CH3 (cepa RA) y JL52 (cepa Tul 2) presentaron 8 sustituciones nucleotídicas en las regiones codantes alineables y 4 cambios de aminoácidos. En los extremos 3' no codantes la homología fue del 63 %. Esta divergencia podría deberse a la heterogeneidad de las cepas Tul y RA, o bien indicar que existen 2 tipos de ARNm, transcriptos de genes P0 diferentes, como lo sugieren los datos de localización cromosómica de TcP0 en la cepa Tul 2 y el perfil de restricción genómico con Bam H1 (Res; III.Fig R-31, pág.151, Fig R-34, pág.156). El clonado de los genes P0 de una misma cepa permitirá descartar una de las hipótesis.

El cambio aminoacídico Pro (CH3) por Ser (JL52) en la región acídica C-terminal de las dos formas TcP0 podría ser trascendente:

el motivo de P0 (P-CH3) es equivalente al de la P0 del protozoario *B.bovis*.

Tc P0 AAAPAAAAEPEEEEDDDDFGMGALF
 P0 B.b EAAPEAAEEPEEEEE--DDMGFS-LFD

el motivo de P0 (P-JL52) ESEEE se encuentra en las proteínas ribosomales P de *A.salina*, *D.melanogaster*, *G.gallus* y mamíferos (Int, I.3) y corresponde a la serina fosforilable en las P de *A.salina* (Amons y col, 1979).

Teniendo en cuenta la influencia de la fosforilación en la actividad de estas proteínas (Naranda y Ballesta, 1991) las formas P0 :CH3 y P0 :JL52 podrían tener roles distintos en *T.cruzi*. Esta hipótesis se basa en datos de diferentes equipos que adjudican funciones y localizaciones celulares diversas para proteínas de tipo P0 (Tabla DT4)

LOCALIZACION	COMENTARIOS	REFERENCIA BIBIOGRAFICA
Ribosoma Sub. Mayor	Interacción con P1-P2 y ARNr en base stalk	Rich y Steitz, 1987
Citoplasma de cel. HeLa	Complejos P1/P2/P0 (140 kDa)	Elkon y col., 1986
Núcleo matriz nuclear	Reparación de ADN	Grabowski y col., 1991
Memb.plasmática de hepatoma y neuroblastoma	Western blots con anti-P revelan péptido de 38 kDa	Koren y col., 1992

IV.3.4. Antigenicidad de las Proteínas P0.

Como se mencionó en la Introducción (I.4), los anticuerpos anti-JL52 inmunopurificados revelaron en Western blots de *T.cruzi* otros polipéptidos además de la P0 ribosomal, de PM entre 23 kDa y 32 kDa. En experiencias con anticuerpos anti-P0 de *Drosophila* se detectaron dos proteínas con localizaciones distintas: una en la matriz nuclear y otra en el citoplasma de células de *Drosophila*, asociada a ribosomas (Grabowski y col, 1991). Además, la P0 de *Drosophila* fue clonada por rastreo con anticuerpos - anti [endonucleasa apurínica\ apirimidínica humana]. Estas evidencias plantean una discusión interesante: tanto la P0 de *Drosophila*, como TcP0:JL52 y las P de *A.salina* y mamíferos, presentan el motivo de fosforilación consenso para casein kinasas de tipo II, XSXXEX. Este motivo ha sido identificado además, en fosfoproteínas nucleolares como la "numatrina" B23 (37 kDa, pI 5,1) (Feuerstein y Randazzo, 1991) y la "nucleolina" C23 de eucariontes (75 kDa, Maridor y Nig, 1990).

Consenso	Casein Kinasa II: X S X X E X
PKc	A G L V A D A V A D S E S E D E E D L D
C23	- - - A A P A A P A S E D E D E E D D D
B23	H L V A V E E D A E S E D E D E E D V K
TcP0(JL52)	A A A A P A A A A E S E E E D D D D D F

Estos datos, sugieren la hipótesis que tanto los anticuerpos anti-JL52 como los anti-endonucleasa reconocen epitopes definidos por estos residuos acídicos, que se hallan conservados en proteínas con funciones y localizaciones celulares distintas.

La presencia de epitopes compartidos por antígenos ribosomales P y proteínas con otras localizaciones celulares y, notablemente, la detección inmunológica de una proteína tipo P0 en membrana plasmática (Koren y col., 1992), constituyen, en conjunto, datos relevantes respecto al posible rol patogénico de los autoanticuerpos anti-P en enfermedades como el lupus o la miocardiopatía chagásica crónica.

IV.4. FAMILIA DE ANTIGENOS RIBOSOMALES P DE *T. cruzi*:

Los resultados de esta Tesis sentaron las bases que permitieron identificar la estructura primaria de cuatro tipos de proteínas diferentes de la familia ribosomal P: TcP1, TcP2a(P-JL5), TcP2b y TcP0.

La caracterización genómica parcial de este sistema reveló una familia multigénica, constituida por al menos dos copias génicas TcP0, dos TcP2b y 4 TcP-JL5 (TcP2a). Aún falta profundizar éste análisis y obtener más información acerca de la organización genómica de TcP1.

De acuerdo a las secuencias de ADNc clonadas, *T. cruzi* (Tul 2) expresa al menos cuatro tipos de transcriptos distintos para las isoformas de la proteína ribosomal TcP2a, probablemente, dos transcriptos para la proteína TcP2b (cepa RA) y dos para las proteínas TcP0.

Además de las proteínas P clonadas, las experiencias de Western blot de ribosomas de epimastigotes, revelan por lo menos una proteína P adicional de alrededor 19 kDa (Int., Fig.I.8; I.4.3). Un experimento reciente de ARN-PCR, empleando un oligonucleótido complementario a la secuencia codante del octapéptido C-terminal P y otro correspondiente a la secuencia del miniexón como cebadores, permitió detectar los fragmentos esperados de 350 pb correspondientes a las P de bajo PM y, un fragmento de 800 pb. Este podría corresponder a la amplificación del ARNm de la proteína de 19 kDa. Actualmente, se trabaja en su clonado y secuenciación (M.Vazquez, tesis doctoral en realización).

T. cruzi expresa una variedad mayor de proteínas ribosomales P que el resto de los eucariontes. La extensión de este análisis a otros kinetoplástidos permitirá conocer si esta es una característica común a todo el orden.

IV.4.I. Organización de las proteínas P en el ribosoma de *T. cruzi*.

En procariontes y eucariontes las proteínas acídicas se encuentran en cuatro copias por subunidad ribosomal. Los ribosomas de *E. coli* contienen cuatro copias del único producto del gen rpIL (dos con la serina aminoterminal acetilada, Terhorst y col., 1973). Los ribosomas de *A. salina* en cambio contienen dos homodímeros de cada uno de los productos de los genes eL12 (P1) y eL12' (P2) (Uchiumi y col., 1987) organización que se conserva en los vertebrados (Rich y Steitz, 1987).

Discusión

Los ribosomas de levaduras poseen cuatro proteínas acídicas diferentes, que estarían organizados como un heterodímero Pla-P1b y un heterodímero P2a-P2b (Beltrame y Bianchi, 1990).

Si el sistema ribosomal P de *T. cruzi* es semejante al de otros eucariontes unicelulares faltaría identificar un subtipo TcP1. Si esto fuera así, la organización podría también ser heterodimérica: dos dímeros TcP2a(P-JL5)-TcPb(P-G13) y TcP1(P-L6)-TcP1(?).

Se ha descrito en *S. pombe*, que solo una de cada clase de proteína Pla/b y P2a/b es esencial para el crecimiento del organismo (Beltrame y Bianchi, 1990). Se propuso entonces que las formas esenciales podrían formar homodímeros, conteniendo la mínima información estructural requerida para el ensamblaje y la función ribosomal, mientras que homodímeros de las proteínas no esenciales serían no funcionales (Beltrame y Bianchi, 1990).

Esto lleva a preguntar si las isoformas de TcP2a y TcP2b son funcionalmente equivalentes en el ribosoma.

Estudios de complementación con las P de *T. cruzi* en un sistema heterólogo: cepas de levadura defectivas para cada una de las proteínas acídicas, permitirá aportar datos en relación a este tema de discusión (Remacha y col., 1990; Dr Ballesta, Proyecto de cooperación en vías de realización).

IV.4.2. Estructura y evolución del sistema de proteínas P en *T. cruzi*: Comparación de las regiones globulares de las proteínas de bajo PM:

Con el objeto de estimar la homología entre las regiones globulares de las proteínas P de *T. cruzi*, se alinearon las secuencias aminoacídicas de TcP1, TcP2a y TcP2b (Figura D12).

	1	10	20	30
TcP1	M S S K Q Q L A C T - Y A A L I L A D S G K T D M D S L L K V T			
TcP2b	M S - - - M K Y L A A Y A - L A S L N K P T P G A A D V E A I C			
PJL5	- - - - - M K Y L A A Y A - L V G L S G G T P S K S A V E A V L			
	40	50	60	
TcP1	K A A G V D V S K G M A S A - F A S I L K N V D I N D V L S K			
TcP2b	K A C G I E V E S D A L S F V M E S I A G R S V A T L V A E G			
PJL5	K A A G V P V D P S R V D A L F A E F A G K D E D T V C T E G			
	70	80	90	
TcP1	V S F - - G G V - - - A P A A G G A T A A P A A A - A A A A			
TcP2b	A A K M S A V A V S A A P A A G D A A A P A A A A - G G A A			
PJL5	K S K L V G G V T R P N A A T A S A P T A A A A A S G G A A			
	100	110		
TcP1	A P A A A A A K K E E E E E D D D M G F G L F D			
TcP2b	A P A A A D A K K E E E E E D D D M G F G L F D			
PJL5	A P A A A - A - - - E E E E D D D M G F G L F D			

Figura D12

El porcentaje de residuos idénticos se indica en la Tabla DT5. TcP1 presenta una homología del 27% con TcP2a y del 24% con TcP2b, respectivamente; este grado de homología es equivalente al que existe en *S.cerevisiae*, entre la ScP1a (L12 eIIB) respecto a las dos ScP2: 25% con L12eIA y 20 % con L12eIB, respectivamente (Newton y col., 1990). En cambio, las dos P2 de *T.cruzi* son más divergentes entre sí (43% de homología) que las P2 de *S.cerevisiae*(56% de homología).

Proteínas	L	I(%)	E
P2a/P2b	56	24(43)	2
P2a/P1	51	14(27)	8
P2b/P1	54	13(24)	6

- (1) $L = R - E/2$, donde R es el número de residuos dentro de la región de comparación (posiciones 14 a 76) y E es el número de residuos no comparables dentro de la región de alineamiento, y corresponden a las posiciones de los *gaps*. La región de comparación considerada, posiciones 1 a 64, corresponde a la región globular utilizada para determinar relaciones evolutivas en la familia P (Newton y col, 1990).

Ramirez y col (1989) identificaron en las proteínas L10e de archaeobacteria la existencia de una región globular constituida por tres módulos, dos de los cuales se conservan en las P0 de eucariontes. Uno de estos módulos se halla también en la región globular de las proteínas P de bajo PM L12e/P1/P2. Las duplicaciones de éstos módulos en las L10e/P0 han sido interpretadas como la consecuencia de un evento de fusión génica que pudo haber originado a la proteína L10e en el antecesor común de los tres reinos: eubacteria, archaeobacteria y eucariontes (ver Int., Figura I.6, pág. 28).

Con la intención de visualizar la relación estructural de TcP0 con las proteínas de bajo PM de *T. cruzi* se alinearon las secuencias aminoacídicas completas de TcP1, TcP2a y TcP2b con TcP0 (aa 193-321), incluyendo todos los *gaps* necesarios para visualizar la conservación de motivos, recuadrados en la Figura D 13.

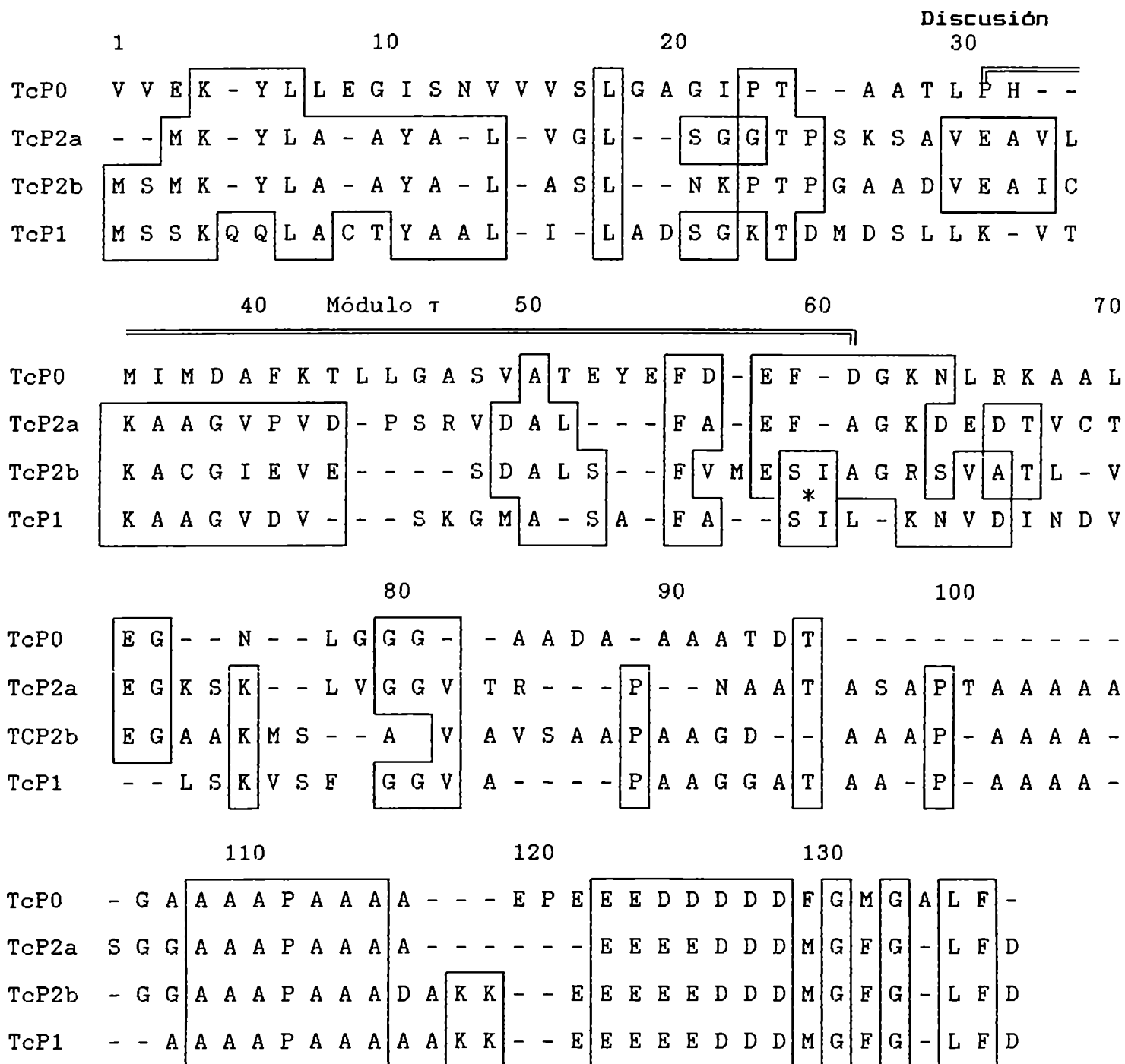


Figura D13

Comparación de las proteínas de la familia P de *T. cruzi*.

Se recuadran los motivos conservados y se indica el módulo en la región globular.

En esta comparación se puede observar:

Heptapéptido carboxiterminal:

En las tres P de bajo PM, éste motivo es idéntico al de eucariontes, con un residuo ácido en su extremo C-terminal (D). En TcP0 sin embargo se asemeja a la secuencia archaebacteriana, con un residuo final hidrofóbico (F) (Matheson y col., 1991).

En el sistema P del protista *T. thermophila* también existen diferencias en los extremos C-terminales, pero todos son de tipo archaebacteriano (Andreassen, comunicación personal). Es decir, el sistema P de *T. cruzi* tiene la peculiaridad de poseer proteínas P con extremos C-terminales claramente diferentes.

Región ácida:

El motivo ácido EEEEDDD se conserva; TcP2b y TcP1 presentan lisinas, que son halladas en las regiones equivalentes de la mayoría de las P eucariontes. En *T. cruzi* esta región carece de serinas (la excepción es la proteína TcP0 de la cepa Tul 2, Disc., IV.3.3) en contraste con las P de eucariontes metazoos. La ausencia de serinas en la región ácida es una característica compartida por las P de los protozoos *Tetrahymena thermophila* y *Babesia bovis* (Andreassen, comunicación personal; Hansen y col., 1991).

Bisagra:

Se conserva el motivo AAAPAAA, duplicado en TcP2b; el resto de la bisagra es variable, siendo más corta en TcP0.

Porción modular:

En el límite 3' del módulo τ el motivo FDEFDGK de TcP0 es semejante al FAEFAGK en TcP2a (posición 55-63 de Fig D-13), con ambos aspárticos sustituidos por alaninas.

Avanzando hacia la región aminoterminal se encuentra el motivo KAXXGXXV (posición 36-43) conservado en las tres proteínas de bajo PM y ausente en TcP0; a partir de esa posición aumenta la divergencia de TcP0 con el resto. Esto permite ubicar el límite aminoterminal de la porción P2 de TcP0 entre el motivo KAXXGXXV y el motivo FAEFAGK, que marcaría el sitio donde ocurrió la fusión génica en la P0 ancestral.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

1. Se determinó la secuencia completa de la proteína TcP-JL5 (TcP2a) a partir del clonado de un ADNc y de un gen.

Se identificaron cuatro isoformas de la proteína TcP-JL5 que se transcriben en epimastigotes de la cepa Tul 2.

3. Se caracterizaron tres copias genómicas de la subfamilia TcP-JL5, sus secuencias parciales permitieron identificar los genes de tres de las isoformas transcritas.
4. La organización genómica de la subfamilia TcP-JL5 en la cepa Tul 2 consta de al menos cuatro loci en diferentes entornos genómicos. Análisis de cariotipo molecular indicaron la existencia de loci TcP-JL5 en por lo menos tres especies cromosómicas de la cepa Tul 2.
5. Existe polimorfismo de cepas en la distribución genómica de la subfamilia de genes TcP-JL5.
6. Se ha caracterizado la secuencia parcial de las porciones C-terminales de dos isoformas de la proteína Tc-P2b. TcP2b estaría codificada por al menos dos genes en la cepa Tul 2.
7. Se ha caracterizado la secuencia parcial de la porción C-terminal de la proteína Tc-P1.
8. Se determinó la secuencia completa del ADNc de la proteína TcP0 y la secuencia de la porción C-terminal de una isoforma.
9. La caracterización de la secuencia C-terminal de TcP0 permitió explicar su comportamiento inmunológico diferente al resto de las proteínas ribosomales P de *T. cruzi*.

Conclusiones

10. Experiencias de cariotipo molecular localizaron genes TcP0 en dos bandas cromosómicas en la cepa Tul 2, y en una sola banda cromosómica en la cepa G.
11. El sistema de proteínas ribosomales P de *T. cruzi* es el más complejo de los sistemas homólogos conocidos, en cuanto al elevado número de genes. Se han detectado al menos nueve genes en la cepa Tul 2.
12. *T. cruzi* es el único organismo conocido que presenta antígenos ribosomales P con secuencias C-terminales claramente diferentes.

A P E N D I C E

VI. APENDICE

APORTES DE LAS SECUENCIAS DE LAS PROTEINAS RIBOSOMALES P A LA BIOLOGIA MOLECULAR DE *Trypanosoma cruzi*.

VI.1 Utilización de codones en las proteínas ribosomales P de *T. cruzi*

Los genes que codifican las proteínas GAPDHg, Hsp 83, Tubulina, Hsp 70 y ubiquitina de *T. cruzi*, revelan una fuerte tendencia hacia los nucleótidos C y G en la tercera posición de los codones (Kendall y col, 1990).

Se analizó la frecuencia relativa (observada/esperada en función de la composición nucleotídica) de la tercera base de los codones en TcP0, TcP1, TcP2a y TcP2b con el programa PUSTEL SEQUENCE ANALYSIS, IBI, Inc. (Tabla A.1). Se observó que si bien el nucleótido C presenta un sesgo favorable en tres de las cuatro proteínas P analizadas, también la T es utilizada preferentemente (frecuencia relativa >1,2%). La base menos usada en la tercera posición es la A.

Frecuencias nucleotídicas de regiones codantes			
	Total	3era base	Obs./Esp.
TcP-JL5 57% G+C	T= .246	T= .370	1,5
	C= .274	C= .278	1,01
	A= .167	A= .185	0,90
	G= .295	G= .185	0,62
TcP2b 63% G+C	T= .197	T= .265	1,35
	C= .300	C= .389	1,29
	A= .171	A= .088	0,51
	G= .332	G= .257	0,77
TcP1 59% G+C	T= .209	T= .282	1,35
	C= .291	C= .409	1,40
	A= .200	A= .082	0,41
	G= .300	G= .227	0,75
TcP0 58 % G+C	T= .204	T= .199	0,97
	C= .277	C= .388	1,4
	A= .208	A= .062	0,29
	G= .311	G= .351	1,12

TABLA A.1

Asimismo. el análisis de la frecuencia de dinucleótidos en las regiones codantes P, indicó el uso preferencial del par TG y el no uso del par TA (Tabla A.2).

Dinucleótidos Inusuales
Tasa de frecuencias observadas/esperadas
(Observadas)

	>1.2	<0.8
TcP-JL5	TG*=1.312(.095)	CG*= .799(.065)
	GA*=1.298(.071)	AT*= .745(.034)
	GC*=1.293(.105)	GT*= .677(.049)
	CT*=1.278(.086)	TC*= .685(.046)
	TT*=1.270(.077)	TA*= .609(.028)
TcP2b	TG*=1.617(.106)	TC*= .796(.047)
	GA*=1.401(.079)	GT*= .719(.047)
	GC*=1.327(.132)	AC*= .690(.035)
	AA*=1.314(.038)	GG*= .639(.071)
	CT*=1.294(.076)	TA*= .350(.012)
	AT*=1.225(.041)	
TcP1	TG*=1.739(.109)	AC*= .781(.045)
	AA*=1.591(.064)	AT*= .725(.030)
	GC*=1.354(.118)	TC*= .648(.039)
	CT*=1.345(.082)	GG*= .640(.058)
	GA =1.162(.070)	TA*= .362(.015)
TcP0	TG*=1.406	GG*= .762
	GA*=1.250	TA*= .512

Tabla A.2

Del análisis del uso de codones de la Tabla A.3 se observa que ninguna de las cuatro secuencias P contiene los siguientes codones:

codón	aminoácido
TTA y CTA	leucina
ATA	isoleucina
TGT	cisteína
TAT	tirosina
CAG	glutamina
CGA y AGA	arginina

En la selección de determinados codones sinónimos, puede estar involucrada la composición nucleotídica de las regiones codantes correspondientes (Osawa y col., 1992). Así, el no uso de los codones TTA y CTA para Leu y ATA para Ileu, podría estar asociado a los valores inusualmente bajos en la frecuencia del dinucleótido TA y del nucleótido A en la tercera base del codón.

En el caso de la familia de 6 codones sinónimos de arginina no se utiliza CGA ni AGA, y se utiliza preferencialmente el codón CGT. En *TcP0* (22 codones Arginina) el nucleótido A es el menos utilizado en la tercera posición (frecuencia relativa 0,29%). Sin embargo si se analiza la frecuencia de dinucleótidos, se puede observar que el par GA es muy frecuente (frecuencia relativa > 1,2%) y el dinucleótido GT es poco frecuente (ver Tabla DT5). Por lo tanto, este sesgo desfavorable para CGA y AGA podría estar asociado a la abundancia intracelular relativa de los ARNt isoaceptores co-rrespondientes (Osawa y col., 1992). En *E.coli* y *S.cerevisiae* el codón más frecuentemente utilizado en familias de seis codones es el reconocido por la especie de ARNt más abundante (Ikemura, 1981; 1982).

Sería interesante extender estas observaciones a todas las secuencias disponibles de *T.cruzi* para un análisis estadístico. La única información disponible hasta el momento es el análisis de 69 genes de *T.brucei*, incluyendo VSGs, ESAGs y genes "housekeeping" (Michels, 1986; Parsons y col., 1991). Este estudio mostró que los genes housekeeping presentan un sesgo en contra de la base A, en concordancia con lo que se observa para las P de *T.cruzi* (A=0,51). Asimismo, el análisis de la frecuencia de dinucleótidos en *T.brucei*, reveló el uso preferencial del par TG y el menor uso del par TA en los 3 tipos de genes (Parsons y col., 1991).

TABLA A.3
 Uso de codones en las proteínas ribosomales P

		TcP1		TcP-JL5(B)		TcP2b		TcP0	
		A	B	A	B	A	B	A	B
Ala	GCT=A	4.48	(.082)	3.62	(.074)	4.46	(.088)	2.30	(.040)
	GCC=A	6.09	(.155)	4.47	(.102)	4.99	(.149)	1.82	(.043)
	GCA=A	.52	(.009)	3.17	(.046)	1.03	(.018)	.69	(.012)
	GCG=A	.35	(.009)	.75	(.019)	1.32	(.044)	.93	(.025)
Arg	CGT=R	.00	(.000)	.45	(.009)	.00	(.000)	1.06	(.019)
	CGC=R	.00	(.000)	.41	(.009)	.00	(.000)	.91	(.022)
	CGA=R	.00	(.000)	.00	(.000)	.00	(.000)	.00	(.000)
	CGG=R	.00	(.000)	.00	(.000)	.26	(.009)	.12	(.003)
	AGA=R	.00	(.000)	.00	(.000)	.00	(.000)	.00	(.000)
	AGG=R	.00	(.000)	.00	(.000)	.00	(.000)	.15	(.003)
Asn	AAT=N	.00	(.000)	1.19	(.009)	.00	(.000)	.35	(.003)
	AAC=N	1.56	(.018)	.00	(.000)	1.00	(.009)	2.59	(.031)
Asp	GAT=D	2.17	(.027)	2.82	(.037)	3.14	(.035)	1.65	(.022)
	GAC=D	3.65	(.064)	2.54	(.037)	2.06	(.035)	3.12	(.056)
Cys	TGT=C	.00	(.000)	.00	(.000)	.00	(.000)	.00	(.000)
	TGC=C	.50	(.009)	.45	(.009)	.89	(.018)	.88	(.016)
Gln	CAA=Q	.00	(.000)	.00	(.000)	.00	(.000)	.00	(.000)
	CAG=Q	1.04	(.018)	.00	(.000)	.00	(.000)	1.39	(.025)
Glu	GAA=E	2.27	(.027)	1.98	(.019)	3.63	(.035)	1.39	(.019)
	GAG=E	1.01	(.018)	2.94	(.046)	2.79	(.053)	2.79	(.056)
Gly	GGT=G	2.90	(.055)	.84	(.019)	1.61	(.035)	1.58	(.031)
	GGA=G	.00	(.000)	1.51	(.037)	1.32	(.044)	1.39	(.037)
	GAA=G	2.27	(.027)	1.77	(.028)	.00	(.000)	.15	(.003)
	GGG=G	.34	(.009)	.70	(.019)	.00	(.000)	.10	(.003)
His	CAT=H	.00	(.000)	.00	(.000)	.00	(.000)	.53	(.006)
	CAC=H	.00	(.000)	.00	(.000)	.00	(.000)	.19	(.003)
Ile	ATT=I	1.04	(.009)	.00	(.000)	1.32	(.009)	1.79	(.016)
	ATC=I	1.49	(.018)	.00	(.000)	1.74	(.018)	2.37	(.028)
	ATA=I	.00	(.000)	.00	(.000)	.00	(.000)	.00	(.000)
Leu	CTT=L	1.43	(.018)	2.71	(.046)	.75	(.009)	2.15	(.025)
	CTC=L	1.03	(.018)	.49	(.009)	1.48	(.026)	.99	(.016)
	CTA=L	.00	(.000)	.00	(.000)	.00	(.000)	.00	(.000)
	CTG=L	1.49	(.027)	.00	(.000)	.89	(.018)	2.47	(.043)
	TTA=L	.00	(.000)	.00	(.000)	.00	(.000)	.00	(.000)
	TTG=L	.69	(.009)	.50	(.009)	.00	(.000)	.96	(.012)

Lys	AAA=K	4.55 (.036)	1.67 (.009)	1.77 (.009)	.34 (.003)
	AAG=K	3.79 (.045)	4.96 (.046)	4.53 (.044)	4.85 (.065)
Phe	TTT=F	3.98 (.036)	3.02 (.046)	3.44 (.026)	1.46 (.012)
	TTC=F	.00 (.000)	.00 (.000)	.00 (.000)	2.15 (.025)
Pro	CCT=P	1.54 (.027)	1.46 (.028)	1.48 (.026)	.20 (.003)
	CCC=P	.00 (.000)	1.32 (.028)	.00 (.000)	.58 (.012)
	CCA=P	.00 (.000)	.00 (.000)	.57 (.009)	.58 (.009)
	CCG=P	.00 (.000)	.00 (.000)	.29 (.009)	.39 (.009)
Ser	TCT=S	.00 (.000)	2.17 (.037)	.00 (.000)	.27 (.003)
	TCC=S	1.54 (.027)	.00 (.000)	1.48 (.026)	1.19 (.019)
	TCA=S	.00 (.000)	1.52 (.019)	.00 (.000)	.00 (.000)
	TCG=S	.50 (.009)	.45 (.009)	.89 (.018)	.71 (.012)
	AGT=S	.00 (.000)	.71 (.009)	.00 (.000)	.24 (.003)
	AGC=S	2.60 (.045)	.00 (.000)	1.55 (.026)	.52 (.009)
Thr	ACT=T	.00 (.000)	1.52 (.019)	.87 (.009)	.00 (.000)
	ACC=T	1.07 (.018)	1.37 (.019)	.00 (.000)	1.75 (.028)
	ACA=T	.78 (.009)	1.07 (.009)	1.00 (.009)	.52 (.006)
	ACG=T	.52 (.009)	.63 (.009)	1.00 (.009)	1.39 (.025)
Tyr	TAT=Y	.00 (.000)	.00 (.000)	.00 (.000)	.00 (.000)
	TAC=Y	.75 (.009)	1.52 (.019)	1.74 (.018)	2.11 (.025)
Val	GTT=V	2.08 (.027)	2.01 (.037)	2.04 (.026)	.24 (.003)
	GTC=V	.50 (.009)	.45 (.009)	.89 (.018)	1.06 (.019)
	GTA=V	.00 (.000)	2.12 (.028)	.00 (.000)	.47 (.006)
	GTG=V	1.45 (.027)	.42 (.009)	1.21 (.026)	2.05 (.040)
*	TAA=-	.00 (.000)	1.19 (.009)	1.53 (.009)	.35 (.003)
	TAG=-	.72 (.009)	.00 (.000)	.00 (.000)	.00 (.000)
	TGA=-	.00 (.000)	.00 (.000)	.00 (.000)	.00 (.000)

A: tasa de frecuencias observadas / esperadas por codón respecto a la composición nucleotídica de las regiones codantes de cada proteína.
B: frecuencia observada de cada codón en la proteína correspondiente.

VI.2. Comparación de los extremos 3' no codantes de los ADNc de proteínas ribosomales P de *T.cruzi*:

Búsqueda de secuencias consenso de poliadenilación:

En los kinetoplástidos no se han descrito señales de clivaje y poliadenilación análogas a la AAUAAA de los ARNm eucariontes (Sather y Agabian, 1990). Experiencias con extractos nucleares de *T.cruzi* demostraron la poliadenilación de transcriptos exógenos en forma inespecífica (Zwierzynski y col, 1989).

Dado que los fagos JL5, G13, L6, JL52, CH3, S23 provienen de bibliotecas de ADNc sintetizados a partir de un *primer* oligo dT, se realizó una búsqueda de motivos conservados en los extremos 3' de estos clones de *T.cruzi*, con objeto de identificar señales potenciales de poliadenilación (Figura A.1).

Esta comparación permitió identificar tres motivos conservados, en algunos casos repetidos:

- I. G T T T T
- II. T T T A T T/G
- III. A/T T G A A/G

Para completar la comparación se incluyeron secuencias de las regiones 3' no codantes de una serie de ADNc de *T.cruzi* clonados por otros grupos de investigadores (Figura A.1). Se observó:

- I) el motivo GTTTT, entre 6 y 58 bases río arriba del sitio de poliadenilación.
- II) El motivo TTTATT\G, a una distancia más variable, entre 1 a 95 bases río arriba.

III) El motivo III (T/A TGA A/G), entre 4 y 25 bases río arriba del sitio de poliadenilación, en promedio el más próximo de los tres motivos al tracto poli A.

En algunas secuencias como TcP2b, P0(Tul 2), SA85-1 y ubiquitina estos motivos se encuentran superpuestos: se conserva la orientación de los motivos 5' I-II-III 3'.

El motivo I fue detectado en 13 de los 15 ADNc analizados El motivo II en 14/15 y el motivo III en 13/15. La excepción fueron los genes de choque térmico, que presentan en su extremo 3' repeticiones características de motivos CTT y ATT (Dragon y col., 1987).

La secuencia AAAATTYT (Y=pirimidina) propuesta inicialmente como señal de poliadenilación en tripanosomátidos fue identificada solo en los ARNm para los antígenos de superficie de 85 kDa (Kahn y col, 1990, Fouts y col, 1991). La señal AACACC presente en el ADNc IF8, propuesta por Gonzalez y col., (1985) solo fue hallada en el extremo 3' no codante del ADNc TSA-1 (Fouts y col., 1991)

En levaduras existen dos tipos de señales de poliadenilación (Irniger,S y col, 1991):

una señal fuerte , unidireccional TTTTAT.

una señal menos eficiente, bidireccional TAG...TATGT...TTT.

La señal TTTTAT se asemeja al motivo TTTATT/G presente en los extremos 3' de los ARNm de *T. cruzi*.

La detección de motivos diferentes en los genes para proteínas de choque térmico, en los genes de antígenos de superficie de 85 kDa y en el resto de los ADNc analizados, sugiere que en *T. cruzi* pueden existir secuencias 3' no traducidas (3'UTRs) asociadas a la regulación particular de los distintos grupos de ARNm (Jackson y Standart, 1990; Shaw y Kamen,1986).

B: Otros ADNc clonados de *T. cruzi*

1) Cruzipaina (Aslund y col., 1991)

GGGCACTCTTTGTTTCTGATGCTGCCTTTTTTCTCATTCTTACTTTTTTTATTATTATTGAG
CGAGCGTCGGTGCTGCGGCACACTGGGCAAATAAGTCCAGTGGAGTGGATTGCTTATTGA
TTTGCTCCATGTATTTTATTTCTTTTTGAGCACAACTGCAAATATGTGTCCGCGATCGA
CGACGTATCAGCCACGCGTGTGTTTTTCTATTATATGCTTCTGTTGAGCGCCCGA_n

2) SA85-1(1.1) (Kahn y col., 1990)

(894 b río abajo del codón TGA)

TTTTGTGTGGTTTTCTTATCATGATTTGTGTGTATCCGTAATAGAGGACGACATTTTCTT
TTTCTTGTTTTTCTTGTTTTTCTTGTTTTCCTTTTTTTTTCTTTCATTTTTTCCCC
AAAGTGTGATTTGTGGAATGGTGAAGATGAATTTTTTAAATTTTAATAGTTTTTATGA
(A)_n

3) TSA-1 (Fouts y col., 1991)

(701 b río abajo del codón TAG)

CAATTTTGGAAACAACATGGTAGTTAGGTTCTTTTTTGTGTTTGTGTTTTTCTTTTTTT
TTTTTGCGTGTGTGTGAAACAGTAAACAGTAATAGAGGACGACAATTTTTTTTTTTTTTT
TGCGTGTGTGTGGAACAGTAATAGAGGACAACCTTTTTCTTTTTTAATAATTATTTTGTG
TGAGGGGGTTAATATATGATGAAAGGGAATTTGTTTTTCTAAATTATTTTGAATAAATT
TTTTATGAATTGCCGCTGTTTGGTCTCGAGTACC(A)_n 3505

4) Ubiquitina (Swindle y col., 1988)

TCTGCGATGCTGGACCGACGCATTGAAATACACACCGTCTTCGGCGTTCCTTTTTTTTTT
ATATGTTTTTTTTATTGAGAAGATGTTTTGTTCT(A)_n

5) IF8 (Gonzalez y col., 1985)

AGCTCGCGGGCCGCAGAGTGACGTGCCCGCGCCGTTGCCAATGTAAACACCGTGTCCGCA
TGCGGCGAGGCACTTGTTTTTGCTGGGCGGAGCACATTCTCCACTTTTATGTAGTTGATGG
TCATTTTTACCTTCTACTGTCGTT(A)_n

KAP (Gonzalez y col., 1990)

CTATTTTATTTTATTTTATTTCTTTATTATTATTTATTTCATTAATTGTTGGAGGGCTCTC
TTGTCATTCCCACCTCCACCTCCACCTTCTTCTCACCTATGCAGCGCACATATTTGA(A)
n

6) Hsp70(RA) (Engman y col., 1989a)

GAGCGCATCCCCGAAGATGTTCTCATGGCGGCGTCTGCTCGCGAACCAATAGCCCGTTGG
TTTTCTCCCTGTAGAGCGTAGAGGTCTGCGACAAACCCAGCTGCCATCACTATTTATTA
TTGGTTTTTCCCCTCTCCATTATTATTATTATTATTATTGTTTTTCTTCGCTCTCCATT
ATTATTATTGTTATTATTATTACGGTTGTTT(A)_n

7) HSP85 (Dragon y col., 1987)

AAGTGCTGCATTTGCCGTGGACCTTCCTTTCTTTTTCTTTTTCTTTTTCTTTTTCTTTGT
GATGCGCTGGGGCTTTCTAACAGGAAATTCTTCTTTCCCACCCACACTATTATTATTATT
ATTACTATTATTATTATTATTATTATTATTATTGGCTCGGTAAGGGAATAA(A)_n

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

BIBLIOGRAFIA

- Abreu Salgado, A. y Pellegrino, J. (1968) Distribuição geográfica. En: Doença de Chagas, Cançado, R. (Ed.), Belo Horizonte, pp. 143-162.
- Acosta, A.M. y Santos Busch, C.A. (1985) Autoimmune myocarditis induced by *Trypanosoma cruzi*. *Circulation* 71:1255-1261.
- Affranchino, J.L., Ibáñez, F.C., Luquetti, A.O., Rassi, A., Reyes, M.B., Macina, R.A., Aslund, L., Petterson, U. y Frasch, A.C.C. (1989) Identification of a *Trypanosoma cruzi* antigen that is shed during the acute phase of Chagas disease. *Mol. Biochem. Parasitol.* 34:221-228.
- Amado Neto, V. (1968) Transmissão por transfusão de sangue. En Doença de Chagas, Cançado, R. (Ed.), Belo Horizonte, pp. 130-142.
- Amons, R., Pluijms, W. y Moller, W. (1979) The primary structure of ribosomal protein eL12/eL12-P from *Artemia salina* 80S ribosomes. *FEBS Lett.* 104:85-89.
- Andrade, Z.A. (1991) Pathogenesis of Chagas' disease. *Res. Immunol.* 142:126-130.
- Andrade, Z.A. y Andrade, S. (1979) Patología en *Trypanosoma cruzi* e Doença de Chagas. Brener, Z. y Andrade, Z. (eds.) Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, pp. 199-248.
- Andrews, N.W., Hong, K.S., Robbins, E.S. y Nussenzweig, V. (1987) Stage-specific surface antigens expressed during the morphogenesis of vertebrate forms of *Trypanosoma cruzi*. *Exp. Parasitol.* 64:474-484.
- Araujo, F.G. y Remington, F.C. (1981) Characterization of stages and strains of *Trypanosoma cruzi* by analysis of cell surface components. *J. Immunol.* 127:855.
- Arndt, E. y Weigel, C. (1990) Nucleotide sequence of the genes encoding the L11, L1, L10 and L12 equivalent ribosomal proteins from the archaeobacterium *Halobacterium marismortui*. *Nucleic Acids. Res.* 18:1285.
- Aviv, H. y Leder, P. (1972) Purification of biologically active globin messenger RNA by chromatography on oligo-thymidilic acid cellulose. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 69:1408-1412.
- Aymerich, S. y Goldenberg, S. (1989) The karyotype of *Trypanosoma cruzi* Dm 28c: comparison with other *T. cruzi* strains and trypansomatides. *Exp. Parasitol.* 69:107-115.

Bibliografia

- Beard, C.A., Wrightsman, R.A. y Manning, J.E. (1988) Stage and strain specific expression of the tandemly repeated 90 kDa surface antigen family in *Trypanosoma cruzi*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 28:227-234.
- Benne, R., Van den Burg, J., Brakenhoff, J.P., Sloof, P. y Van Boom, J.H. (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.
- Benton, W.D. y Davies, R.W. (1977) Screening λ gt recombinant clones by hybridization to single plaques *in situ*. *Science* 196:180-182.
- Birnboim, H.C. y Doly, J. (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* 7:1513-1523.
- Blum, B., Bakalara, N. y 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.
- Bonfa, E.S.J., Golombek, L.D., Kaufman, S., Skelly, H., Weissbach, N., Brot, N., y Elkon, K.B. (1987) Association between lupus psychosis and anti-ribosomal P protein antibodies. *N. Engl. J. Med.* 617:265-271.
- Borst, P. (1986) Discontinuous transcription and antigenic variation in Trypanosomes. *Ann. Rev. Biochem.* 55:701-732.
- Brener, Z. (1965) Comparative studies of different strains of *Trypanosoma cruzi*. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 59:19-26.
- Brener, Z. (1973) The Biology of *Trypanosoma cruzi*. *Ann. Rev. Microbiol.* 27:347-383.
- Brener, Z. (1977) Intraespecific variations in *Trypanosoma cruzi*: two types of parasite populations presenting distinct characteristics. *Paho. Sci. Publ.* 347:11-21.
- Brener, Z. (1979) O parasito: relaço es hospedeiro-parasito. En *Trypanosoma cruzi* e Doença de Chagas. Brener, Z., Andrade, Z. (Eds.) Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, pp. 1-41.
- Brener, Z. y Kretlli, A. (1990) Immunology of Chagas' disease. "Modern parasite biology. Cellular, immunological and molecular aspects" (D.J. Wyler). W.H. Freeman y Co., New York.
- Britten, R.J. y Davidson, E.H. (1985). Hybridization Strategy. 3-14. En: *Nucleic acid hybridisation, a practical approach.* (eds) B.D. Hames y S.J. Higgins. IRL Press. England.

Bibliografia

- Bulmer, M. (1990) The effect of context on synonymous codon usage in genes with low codon usage bias. *Nucleic Acids Research* 18: 2869-2873.
- Burnet, F.M. y White, D.O. (1972) *Natural History of Infectious Diseases*, Cambridge University Press.
- Carle, G.F y Olson, M. (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:3756-3760.
- Castro, C., Hernandez, R, y Castañeda, M. (1981) *Trypanosoma cruzi* ribosomal RNA: internal break in the large-molecular-mass species and number of genes. *Mol. Biochem. Parasitol.* 2:219-233.
- Catro, C., Craig, S. y Castañeda, M. (1981) Genome organization and ploidy number in *Trypanosoma cruzi*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 4:273-282.
- Chagas, C. (1909) Nova tripanosomiase humana. Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schysotrypanum cruzi* N. Gen., *N. sp.*, o agente etiológico da nova entidade mórbida do homen. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 1:159-218.
- Chagas, C. (1909a) Nouvelle espèce de Trypanosomiase humaine. *Bulletin de la Soc. Pathol. Exot.* II(6):4.
- Chagas, C. (1911) Moléstia de Chagas ou tiroidite parasitaria. Nova Doença humana transmitida pelo "barbeiro". Segunda Conferência na Academia Nacional de Medicina. *Tipogr. Leuzinger* (Rio de Janeiro).
- Chan, P-K., Aldrich, M., Cook, R. y Busch, H. (1986) Amino Acid Sequences of Protein B23 phosphorylation site. *J. Biol. Chem.* 261:1868-1872.
- Chiale, P. y Rosebaum, M.B. (1989) Clinical and pharmacological characterization and treatment of potentially malignant arrhythmias of chronic chagasic cardiomyopathy. E.M. Vaughan Williams y T.J. Campbell (ed.) *Handbook of experimental pharmacology.* Springer-Verlag KG, Berlin, 601-620.
- Chu, G., Vollrath, D. y Davis, R. (1986) Separation of DNA molecules by contour-clamped homogeneous electric fields. *Science* 234:1582-1585.
- Cohen, I.R. y Young, D.B. (1991) Autoimmunity, microbial immunity and the immunological homunculus. *Immunol. Today* 12:105-110.
- D'Imperio Lima, M.R., Eisen, H., Minoprio, P., Joskowicz, M. y Coutinho, A. (1986). Persistence of polyclonal B cell activation with undetectable parasitemia in late stages of experimental Chagas disease. *J. Immunol.* 137:353-356.

Bibliografia

- Damian, R. (1964) Molecular mimicry: antigen sharing by parasite and host and its consequences. *Am. Naturalist*. 98:129-149.
- De Lange, T., Berkvens, T.M., Veerman, H.J.G., Frasch, A.C.C., Barry, J.D. y Borst, P. (1984) Comparison of the genes coding for the common 5' terminal sequence of messenger RNAs in three trypanosome species. *Nucleic Acids Res.* 12:4431-4443.
- De Lange, T., Liu, A.Y.C., Van der Ploeg, L.H.T., Borst, P., Tromp, M.C. y Van Boom, J.H. (1983) Tandem repetition of the 5' miniexon of variant surface glycoprotein genes: a multiple promoter for VSG gene transcription? *Cell* 34:891-900.
- Degrave, W., Fragoso, S.P., Britto, C., van Heuverswyn, H., Kidane, G.Z., Cardoso, M.A.B., Mueller, R.U., Simpson, L. y Morel, C.M. (1988) Peculiar sequence organization of kinetoplast DNA minicircles from *Trypanosoma cruzi*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 27:63-70.
- Dictyostelium discoideum*: identification of a novel carboxy-terminal sequence in "A" proteins. *Nucleic Acids Res.* 19:1340.
- Dietrich, P., Dussan, M.P., Floeter-Winter, L.M., Trebilcock, Alfonso, Plessman, Camargo E. y Soares, M.B.. Restriction fragment length polymorphisms in the ribosomal gene spacers of *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma conorhini*. *Mol. and Biochem. Parasitol.* 42:13-20 (1990).
- Donelson, J.E. y Zeng, W. (1990) A comparison of trans-RNA splicing in Trypanosomes and Nematodes. *Parasitol. Today* 6:327-334.
- Dorfman, D. y Donelson, J. (1984) Characterization of the 1,35 kb DNA repeat unit containing the conserved 35 nucleotides at the 5' termini of the VSG mRNAs in *Trypanosoma brucei*. *Nucleic Acids Res* 12:4907-4920.
- Dragon E.A., Stacey, R., Sias, ? , Kato, E.A. y Gabe, J.D. (1987) The genome of *T. cruzi* Contains a Constitutively Expressed, Tandemly Arranged Multicopy Gene Homologous to a Major Heat Shock Protein. *Mol. Cell Biol.* 7:1271-1275.
- Dvorak, J.A. (1984) *J. Cell. Biochem.* 24:357-371.
- Dvorak, J.A. (1985) Single cell isolates of *Trypanosoma cruzi*: How and why? *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 18:29-38.
- Elkon, K., Bonfa, E., Llobet, R., Dnho, W., Weissbach, H. y Brot, N. (1988) Properties of the ribosomal P2 protein autoantigen are similar to those of foreign protein antigens. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:5186-5189.

Bibliografia

- Damian, R. (1964) Molecular mimicry: antigen sharing by parasite and host and its consequences. *Am. Naturalist*. 98:129-149.
- De Lange, T., Berkvens, T.M., Veerman, H.J.G., Frasch, A.C.C., Barry, J.D. y Borst, P. (1984) Comparison of the genes coding for the common 5' terminal sequence of messenger RNAs in three trypanosome species. *Nucleic Acids Res.* 12:4431-4443.
- De Lange, T., Liu, A.Y.C., Van der Ploeg, L.H.T., Borst, P., Tromp, M.C. y Van Boom, J.H. (1983) Tandem repetition of the 5' miniexon of variant surface glycoprotein genes: a multiple promoter for VSG gene transcription? *Cell* 34:891-900.
- Degrave, W., Fragoso, S.P., Britto, C., van Heuverswyn, H., Kidane, G.Z., Cardoso, M.A.B., Mueller, R.U., Simpson, L. y Morel, C.M. (1988) Peculiar sequence organization of kinetoplast DNA minicircles from *Trypanosoma cruzi*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 27:63-70.
- Dictyostelium discoideum*: identification of a novel carboxy-terminal sequence in "A" proteins. *Nucleic Acids Res.* 19:1340.
- Dietrich, P., Dussan, M.P., Floeter-Winter, L.M., Trebilcock, Alfonso, Plessman, Camargo E. y Soares, M.B.. Restriction fragment length polymorphisms in the ribosomal gene spacers of *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma conorhini*. *Mol. and Biochem. Parasitol.* 42:13-20 (1990).
- Donelson, J.E. y Zeng, W. (1990) A comparison of trans-RNA splicing in Trypanosomes and Nematodes. *Parasitol. Today* 6:327-334.
- Dorfman, D. y Donelson, J. (1984) Characterization of the 1,35 kb DNA repeat unit containing the conserved 35 nucleotides at the 5' termini of the VSG mRNAs in *Trypanosoma brucei*. *Nucleic Acids Res* 12:4907-4920.
- Dragon E.A., Stacey, R., Sias, ? , Kato, E.A. y Gabe, J.D. (1987) The genome of *T. cruzi* Contains a Constitutively Expressed, Tandemly Arranged Multicopy Gene Homologous to a Major Heat Shock Protein. *Mol. Cell Biol.* 7:1271-1275.
- Dvorak, J.A. (1984) *J. Cell. Biochem.* 24:357-371.
- Dvorak, J.A. (1985) Single cell isolates of *Trypanosoma cruzi*: How and why? *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 18:29-38.
- Elkon, K., Bonfa, E., Llobet, R., Dnho, W., Weissbach, H. y Brot, N. (1988) Properties of the ribosomal P2 protein autoantigen are similar to those of foreign protein antigens. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:5186-5189.

Bibliografía

- Elkon, K.B., Parnassa, A.P. y Lee Foster, C. (1985) Lupus auto-antibodies target ribosomal P proteins. *J. Exp. Med.* 162:459-471.
- Elkon, K.B., Skelly, S., Parnassa, A.P., Moller, W., Danho, W., Weissbach, H. y Brot, N. (1986) Identification and chemical synthesis of a ribosomal protein antigenic determinant in systemic lupus erythematosus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83:7419-7423.
- Engel, J.C., Dvorak, J.A., Segura, E.L. y Crane, M.S.J. (1982) *Trypanosoma cruzi*: Biological characterization of 19 clones derived from two chronic chagasic patients. I. Growth kinetics in liquid medium. *J. Protozool.* 29:555-560.
- Engman, D., Reddy, L.V., Donelson, J.E. y Kirchhoff, L.V. (1987) *Trypanosoma cruzi* exhibits inter and intra strain heterogeneity in molecula karyotype and chromosomal gene location. *Mol. Biochem. Parasitol.* 22:115-123.
- Engman, D.M., Kirchoff, V.L. y Donelson, J.E. (1989a) Molecular cloning of a mitochondrial member of the hsp70 family. *Mol. Cell. Biol.* 9:5163.
- Engman, D.M., Sias R.S., Gabe J.D., Donelson J.E. y Dragon E. (1989) Comparison of HSP70 genes from two strains of *T. cruzi*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 32: 285-288.
- Feagin, J.E., Jasmer, D.P. y Stuart, K. (1987) Developmentally regulated addition of nucleotides within apocytochrome B transcripts in *Trypanosoma brucei*. *Cell* 49:337-345.
- Felsenstein, J.: Phylip manual version 3.3. University Herbarium, University of California, Berkeley, CA, 1990.
- Fenton, B.H. y Joiner, K.A. (1991) Strategies of obligate intracellular parasites for evading host defences. *Imunoparasitology Today* A22.
- Feuerstein, N., Chan, P-K. y Mond, J.J. (1988) Identification of Numatrin, the nuclear matrix protein associated with induction of Mitogenesis, as the Nucleolar Protein B23. *J. Biol. Chem.* 263, 22:10608-10612.
- Fouts, D.L., Ruef, B.J., Ridley, P.T., Wrightsman, R.A., Peterson, D.S. y Manning, J.E. (1991) Nucleotide sequence and transcription of an 85 kDa surface antigen gene of *Trypanosoma cruzi*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 46:189-200.
- Frasch, A.C.C. (1988). Multiple *Trypanosoma cruzi* antigens containing tandemly repeated amino acid sequence motifs. *Mol. Biochem. Parasitol.* 30:27-34.

Bibliografía

- Frasch, A.C.C. (1989) Specific Antibody Response during the Acute Period of Chagas Disease. *Parasitol. Today* 5:355.
- Frasch, A.C.C., Goijman, S., Cazzulo, J. y Stoppani, A. (1981) Constant and variable regions in DNA minicircles from *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli*: application to species and stock differentiation. *Mol. Biochem. Parasitol.* 4: 163-170.
- Freistadt, M.S., Cross, G.A. y Robertson, H.D. (1988) *J. Biol. Chem.* 263:15071-15075.
- Galindo, I. y Ramirez Ochoa, J.L. (1989) Study of *Leishmania mexicana* electrokaryotype by clamped homogeneous electric field electrophoresis. *Mol. Biochem. Parasitol.* 34:245-252.
- García, E.S. y Azambuja, P. (1991) Development and interactions of *Trypanosoma cruzi* within the insect vector. *Parasitol. Today* 7:240-244.
- Gibson, W. y Miles, M. (1986) The karyotype and ploidy of *Trypanosoma cruzi*. *EMBO J.* 5:1299-1305.
- Gonzalez, A., Lerner, T.J., Huecas, M., Sosa-Pineda, B., Nogueira, N. y Lizardi, P.M. (1985) Apparent generation of a segmented mRNA from two separate tandem gene families in *Trypanosoma cruzi*. *Nucleic. Acids. Res.* 13:5789-5804.
- Gonzalez, A., Prediger, E., Huecas, M.E., Nogueira, N. y Lizardi, P.M. (1984) Minichromosomal repetitive DNA in *Trypanosoma cruzi*: its use in a high sensitive parasite detection assay. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:3356-3360.
- Gonzalez, A., Rosales, J.L., Ley, V. y Diaz, C. (1990) Cloning and characterization of a gene coding for a protein (KAP) associated with the kinetoplast of epimastigotes and amastigotes of *Trypanosoma cruzi*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 30:27-36.
- Hall, R., Hyde, J.E., Goman, M., Simmons, D.L., Hope, I.A., Mackay, M., Scaife, J., Merkli, B., Richle, R. y Stocker, J. (1984) Major Surface Antigen gene of a Human Malaria parasite Cloned and Expressed In Bacteria. *Nature* 311:379-382.
- Hamel, E., Koka, M. y Nakamoto, T. (1972) Requirement of an *Escherichia coli* 50 S ribosomal protein component for effective interaction of the ribosome with T and G factors and guanosine triphosphate. *J. Biol. Chem.* 246:805-814.
- Hanahan, D. (1985) Techniques for transformation of *Escherichia coli*. En: *DNA cloning. A practical approach.* (eds: Glover, D.M.) 1:109-135.

Bibliografía

- Hansen, T.S., Andreasen, P.H., Dreisig, H., Hojrup, P., Engberg, J. y Kristiansen, K. (1991) *Tetrahymena thermophila* acidic ribosomal protein L37 contains an archaebacterial type of C-terminus. *Gene* 105:143-150.
- Henriksson, J., Aslund, L., Macina, R.A., Franke de Cazzulo, B., Cazzulo, J.J., Frasch, A.C.C. y Pettersson, U. (1990) Chromosomal localization of seven cloned antigen genes provides evidence of diploidy and further demonstration of karyotype variability in *Trypanosoma cruzi*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 42: 213-224.
- Hernandez, R., Diaz-de León, F. y Castañeda, M. (1988) Molecular cloning and characterization of ribosomal RNA genes from *Trypanosoma cruzi*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 27:275-280.
- Hoare, C.A. (1964) Morphological and taxonomic studies on mammalian trypanosomes. X. Revision and Systematics. *J. Protozool.* 11:200-207.
- Hoare, C.A. (1972) *The Trypanosomes of Mammals*, Blackwell Scientific Publications.
- Hontebeyrie-Joskowicz, M., Saïd, G., Milon, G., Marchal, G. y Eisen, H. (1987) L3T4+ T cells able to mediate parasite-specific delayed-type hypersensitivity play a role in the pathology of experimental Chagas' disease. *Europ. J. Immunol.* 17:1027-1033.
- Huang, X. y Hirsh, D. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:8640-8644.
- Hudson, L. (1985) Autoimmune phenomena in chronic chagasic cardiopathy. *Parasitol. Today* 1:6-7.
- Hunter Newton, C., Shimmin, L.C., Yee, J. y Dennis, P.P. (1990) A family of genes encode the multiple forms of the *Saccharomyces cerevisiae* ribosomal proteins equivalent to the *Escherichia coli* L12 protein and a single form of the L10-equivalent ribosomal protein. *J. Bacteriol.* 172:579-588.
- Hyunt, T.V., Young, R.A. y Davis, R.W. Constructing and screening cDNA libraries in gt10 and gt11. In: D.M. Glover ed. *DNA cloning techniques: a practical approach*. Oxford: IRL Press, 1985: 45-79.
- Ibañez, C.F., Affranchino, J.L., Macina, R.A., Reyes, M.B., Leguizamon, S., Camargo, M.E., Aslund, L., Pettersson, U. y Ikemura, ?? 1981, 1982
- Irniger, S y col, 199

Bibliografia

- Itoh, T., Kamazaki, T., Sugiyama, M. y Otaka, E. (1988) Molecular cloning and sequence analysis of the ribosomal "A" protein from the archaebacterium *Halobacterium halobium*. *Biochim. Biophys. Acta* 949:110-118.
- Jackson, R.J. y Standart, N. (1990) Do the poly (A) tail and 3' untranslated region control mRNA translation?. *Cell*. 62:15-24.
- Jenni, L., Marti, S., Schweitzer, J., Betschart, R.W.F., Le Page, , Wells, J.M., Tait, A., Paindavoine, P., Pays, E. y Steinert, M. (1986) Hybrid formatin between African trypanosomes during cyclical transmission. *Nature* 322:173-175.
- Kahn, S., Van Voorhis, W.C. y Eisen, H. (1990) The major 85 kD Surface antigen of the mammalian form of *Trypanosoma cruzi* is encoded by a large heterogeneous family of simultaneously expressed genes. *J.Exp. Med.* 172:589-597.
- Kendall G., Wilderspin, A.F., Ashall, F., Miles, M. y Kelly, J.M. (1990) *Trypanosoma cruzi* glycosomal glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase does not conform to the hotspot topogenic signal model. *EMBO J.* 9:2751-2758.
- Kenikoff, S. y Cohen, E.H. (1984) Sequences responsible for transcription termination on a gene segment in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 4:1515-1520.
- Kerner, N., Liégeard, P., Levin, M. y Hontebeyrie-Joskowicz, M. (1991) *Trypanosoma cruzi*: Antibodies to a Map-Like protein in Chronic Chagas' disease cross-react with mammalian cytoskeleton. *Exp. Parasitol.* 73:451-459.
- Khoury, E.L., Ritacco, V., Cossio, P.M., Laguens, R.P., Szarfman, A., Diez, C. y Arana, R.M. (1979) Circulating antibodies to peripheral nerve in American trypanosomiasis (Chagas' disease). *Clin. Exp. Immunol.* 36:8-15.
- Kierszenbaum, F. (1986) Autoimmunity in Chagas' disease. *J. Parasitol.* 72:201-211.
- Kierszenbaum, F., Cuna, G.R., Beltz, L. y Sztejn, M.B. (1990) *Trypanosoma cruzi* reduces the number of high-affinity IL-2 receptors on activated Human lymphocytes by suppressing the expression of the p55 and p70 receptor components. *Parasitology Today* 6:261-264.
- Kipnis, T., Krettli, A. y Da Silva, D. (1985) Transformation of trypomastigote forms of *T. cruzi* into activators of alternative complement pathway by immune IgG fragments. *Scand. J. Immunol.* 22:217.

Bibliografía

- Kipnis, T.L., Calich, V.L.G. y Dias Da Silva, W. (1979) *Parasitology* 78:89-98.
- Kipnis, T.L., Tambourgi, D., Sucupira, M. y Dias da Silva, W. (1986) Effect of *T. cruzi* membrane components the formation of the classical pathway C3 convertase. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 19:271-278.
- Kirchhoff, L.V., Engel, J.C., Dvorak, J.A. y Sher, A. (1984) Strains and clones of *Trypanosoma cruzi* differ in their expression of a surface antigen identified by a monoclonal antibody. *Mol. Biochem. Parasitol.* 11:81.
- Kirchhoff, L.V., Kim, K.S., Engman, D.M. y Donelson, J.E. (1988) Ubiquitin genes in trypanosomatidae. *J. Biol. Chem.* 263: 12698.
- Koberle, F. (1968) Chagas' disease and Chagas' syndromes: the pathology of American trypanosomiasis. *Adv. Parasitol.* 6:63-116.
- Koren, E., Reichlin, W., Koscec, M., Fugare, D. y Reichlin, M. (1992) Autoantibodies to the Ribosomal P proteins react with a plasma membrane-related Target on human cells 89: 1236-1241.
- Kozak, M. (1984) Compilation and analysis of sequences upstream from the translational start site for eukaryotic mRNAs. *Nucleic. Acids. Res.* 12:857-872.
- Krowczynska, A., Coutts, M., Makrides, S. y Brawerman, G. (1989) The mouse homologue of the human acidic ribosomal phosphoprotein P0: a highly conserved polypeptide that is under translational control. *Nucleic. Acids. Res.* ???
- Lafaille, J.J., Linss, J., Krieger, M.A., Souto-Padrón, T., De Souza, W, y Goldenberg, S. (1989) Structure and expression of two *Trypanosoma cruzi* genes encoding antigenic proteins bearing repetitive epitopes. *Mol. Biochem. Parasitol.* 35:127-136.
- Laird, P.W. (1989) Trans-splicing in Trypanosomes-archaism or adaptation? *Trends Genet.* 5:204-208.
- Lanar, D.E., Levy, L.S. y Manning, J.E. (1981) Complexity and content of the DNA and RNA in *Trypanosoma cruzi*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 3: 327-341
- Laranja, F.S., Dias, F., Nobreg, G. y Miranda, A. (1956) Chagas' disease. A clinical, epidemiologic and pathologic study. *Circulation.* 14:1035-1060.
- Le Blancq, S.M., Swinkels, B.W., Gibson, W.C. y Borst, P. (1988) Evidence for gene conversion between the phosphoglycerate kinase genes of *Trypanosoma brucei*. *J. Mol. Biol.* 200:439-447.

Bibliografía

- Lee, M.G-S., Polvere, R.I., y Van der Ploeg, L.H.T. (1990) Evidence for segmental gene conversion between a cognate hsp 70 gene and the temperature-sensitively transcribed hsp 70 genes of *Trypanosoma brucei*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 41:213-220.
- Lehrach, H., Diamond, D., Wozney, J.M., Boedtker, H. (1977) RNA molecular weight determinations by gel electrophoresis under denaturing conditions, a critical examination. *Biochemistry* 16: 4743.
- Lenardo, M., Dorfman, D., Donelson, J. (1985) The spliced leader sequence of *Trypanosoma brucei* has a potential role as a cap donor structure. *Mol. Cell. Biol.* 9:2487-2490.
- Leon, W., Frasch, A.C.C., Hoeijmakers, J.H.J., Fase-Fowler, F., Borst, P., Brunel, F. y Davison, J. (1980) Maxicircles and minicircles in kinetoplast DNA from *Trypanosoma cruzi*. *Biochem. Biophys. Acta* 607:221-231.
- Levin, M.J., Levitus, G., Kerner, N., Lafon, S., Schijman, A., Levy Yeyati, P., Finkielsten, C., Chiale, P., Schejtman, D. y Hontebeyrie-Joskowicz, M. (1990) Autoantibodies in Chagas' Heart disease: Possible Markers of severe Chagas' Heart Complaint. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 85:539-543.
- Levin, M.J., Mesri, E.A., Benarous, R., Levitus, G., Schijman, A., Levy-Yeyati, P., Chiale, P., Ruiz, A., Kahn, A., Rosebaum, M.B., Torres, H.N. y Segura, E.L. (1989) Identification of major *Trypanosoma cruzi* antigenic determinants in chronic Chagas heart disease. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 41:530-539.
- Levitus, G., Hontebeyrie-Joskowicz, M., Van Regenmortel, M.H., Levin, M.J. (1991) Humoral autoimmune response to ribosomal P proteins in chronic Chagas' heart disease. *Clin. Exp. Immunol.* 85:413-417.
- Levy-Yeyati, P., Bonnefoy, S., Mirkin, G., Debrabant, A., Lafon, S., Panebra, A., Gonzalez-Cappa, E., Dedet, J.P., Hontebeyrie-Joskowicz, M. y Levin, M. (1991) *Immunol. Lett.* 31:27-34.
- Ley, V., Robbins, E.S., Nussenzweig, V. y Andrews, N.W. (1990) The exit of *Trypanosoma cruzi* from the phagosome is inhibited by raising the pH of acidic compartments. *J. Exp. Med.* 171:401-413.
- Liljas, A. (1982) Structural studies of ribosomes. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 40:161-228.
- Liljas, A., Thirup, S. y Matheson, A.T. (1986) Evolutionary Aspects of Ribosome-Factor Interactions. *Chemica Scripta* 26B: 109-119.

Bibliografía

- Lin, A., Wittmann-Liebold, B., McNally, J. y Wool, I.G. (1982) The primary structure of the acidic phosphoprotein P2 from rat liver 60S ribosomal subunits. *J. Biol. Chem.* 257:9189-9197.
- Losavio, A., Jones, M.C., Sanz, O.P., Mirkin, G., Gonzalez Cappa, S.M., Muchnik, S. y Sica, R.E.P. (1989) A sequential study of the peripheral nervous system involvement in experimental Chagas' disease. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 41:539-547.
- Maasen, J.A., Schop, E.N., Brands, J.H.G.M., Van Hemert, F.J., Leustra, J.A. y Muller, W. (1985) Molecular cloning and analysis of cDNA sequences for the two ribosomal proteins from *Artemia*: the coordinate expression of genes for ribosomal proteins and elongation factor 1 during embryogenesis of *Artemia*. *Eur. J. Biochem.* 149:609-616.
- Maniatis, T. et al,????? Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, CSH, New York, 1982.
- Marsden, P.D. South American Trypanosomiasis and Leishmaniasis: Endemic Diseases of Continental Dimensiones affecting Poor, Neglected, and Underfunded Peaople. (1988) en *The Biology of Parasitism*, 77-92. Alan R. Liss, Inc.
- Martins, S.M., Hudson, L.A., Krettli Cancados, J.R. y Brener, Z. (1985) Human and mouse serum recognize the same polypeptide associated with immunological resistance to *T. cruzi* infection. *Clin. Exp. Immunol.* 61:343-350.
- Matheson, A.T., Louise, K.A., Tak, B.B. y Bock, A. (1988) The complete aminoacid sequence of the ribosomal A protein (L12) from the archaebacterium *Sulfolobus acidocaldarius*. *FEBS Lett.* 231:331-335.
- Mattei, D., Scherf, A., Bensaude, O. y Pereira da Silva, F (1989) *Eur. J. Immunol.* 19:1823.
- Mazza, S. (1934) Casos agudos benignos de enfermedad de Chagas comprobados en la provincia de Jujuy. *MEPRA* 28:41-46.
- Mazza, S. (1943) Comprobaciones de *Triatoma platensis*, *Eutriatoma oswaldoi*, *Pastrongylus seai* y *Psamulester coreodes* en la provincia de Santiago del Estero, todas ellas sobre infestación por *T. cruzi*. Otros datos sobre infestación esquizotripanosómica natural silvestre de *Triatoma infestans*. *Prensa Médica Arg.* 30:1583-1595.
- Melo, R.C. y Brener, Z. (1978) Tissue tropism of different *Trypanosoma cruzi* strains. *J. Parasitol.* 64:475-482.

Bibliografía

- Mesri, E. (1990) Clonado y caracterización genética de antígenos de *T. cruzi*. Diagnóstico serológico diferencial de distintas formas clínicas de la Enfermedad de Chagas. Tesis de Doctorado. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires.
- Michels, P.A.M. (1986) Evolutionary aspects of trypanosomes: Analysis of genes. *Journal of Molecular Evolution* 24:45-52
- Michels, P.A.M. y Opperdoes, F.R. (1991) The evolutionary origin of glycosomes. *Parasitol. Today* 7:105-109.
- Milhausen, M., Nelson, R.G., Sather, S., Selkirk, M. y Agabian, N. (1984) Identification of a small RNA containing the Trypanosome spliced leader: a donor of shared 5' sequences of trypanosomatid mRNAs? *Cell* 38:721-729.
- Miller S.I. y Wirth, P.F. (1988) *Mol. Cell Biol.* 8: 2567-2603.
- Minoprio, P., Burlen, O., Pereira, P., Guilbert, B., Hontebeyrie Joskowicz, M. y Coutinho, A. (1988) Most B cells in acute *Trypanosoma cruzi* infection lack parasite specificity. *Scand. J. Immunol.* 28:513.
- Minoprio, P., Eisen, H., Forni, L., D'Imperio Lima, M.R., Joskowicz, M. y Coutinho, A. (1986) Polyclonal lymphocyte responses to murine *T. cruzi* infection. Quantitation of both T and B responses. *Scand. J. Immunol.* 24:661-668.
- Minoprio, P., Eisen, H., Joskowicz, M., Pereira, P. y Coutinho, A. (1987) Suppression of polyclonal antibody production in *T. cruzi* infected mice by treatment with anti-L3T4 antibodies. *J. Immunol.* 139:545-550.
- Minoprio, P., Itohara, S., Heusser, C., Tonegawa, S. y Coutinho, A. (1989) Immunobiology of murine *T. cruzi* infection: the predominance of parasite-nonspecific response and the activation of TcRI T cells. *Immunol. Rev.*:112-183.
- Mitsui, K. y Tsurugi, K. (1988) cDNA and deduced aminoacid sequence of acidic protein A0 from *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic. Acids. Res.* 16:3573.
- Moller, W. (1991). Functional aspects of ribosomal proteins. *Biochimie* 73:1093-1100.
- Moncayo, A. y Luqueti A.O. (1990) Multicenter double blind study for valuation of *Trypanosoma cruzi* defined antigens as diagnostic reagents. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 85:489.

Bibliografía

- Moncayo, A. y Luquetti, A.O. (1990) Multicentre double blind study for evaluation of *Trypanosoma cruzi* defined antigens as diagnostic reagents. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Río de Janeiro, 85:489-495.
- Morel, C.M. (1988) Kinetoplast DNA minicircles as multipurpose molecular markers for *Trypanosoma cruzi* characterization and detection. En Molecular biology and infectious diseases. Elsevier, París. pp. 247-250.
- Morel, C.M., Chiari, E., Camargo, E.P., Mattei, D.M., Romanha, A.J. y Simpson, L. (1980) Strains and clones of *Trypanosoma cruzi* can be characterized by restriction endonuclease fingerprinting of kinetoplast DNA minicircles. Proc. Natl. Acad. Sci (Wash.) 77:6810-6814.
- Morris, S.A., Tanowitz, B.H., Wittner, M. y Bilezikian, J.P. (1990) Pathophysiological insights into the cardiomyopathy of Chagas' disease. Circulation. 82:1909-1990.
- Moser, D.R., Cook, G.A., Ochs., D.E., Bailey, C.P, Mc Kanem M.R. and Donelson, J.E. (1989) Detection of Trypanosome congolense and Trypanosoma brucei subspecies by DNA amplification using the polimerase reactin. Parasitology 99, 57-66
- Moser, D.R., Kirchhoff, L.V. y Donelson, J.E. (1989) Detection of *Trypanosoma cruzi* by DNA amplification using the polymerase chain reaction. J. Clin. Microbiol. 27:1477-1482.
- Mottram, J., Perry, K.L., Lizardi, T.M., Lührmann, R., Agabian, N. y Nelson, R.G. (1989) Mol. Cell. Biol. 9:1212-1223.
- Muhich, M.M. y Boothroyd, J.C. (1988) Polycistronic transcripts in Trypanosomes and their accumulation during heat shock: evidence for a precursor role in mRNA synthesis. Mol. Cell. Biol. 8:3837-3846.
- Murphy, W.J., Watkins, K.P. y Agabian, N. (1986) Identification of a novel Y branch structure as an intermediate in trypanosome mRNA processing: evidence for trans-splicing. Cell 47:517-525.
- Nelson, R.G., Parsons, M., Baar, P.J., Stuart, K, Selkirk, M. y Agabian, N. (1983) Sequence homologous to the variant antigen mRNA spliced leader are located in tandem repeats and variable orphons in *Trypanosoma brucei*. Cell 34:901-909.
- Nogueira, N., Bianco, C. y Cohn, Z. (1975) Studies on selective lysis and purification of *T. cruzi*. J. Exp. Med. 142:224-232.
- Norris, K. (1989) Compl. Inflam. 6:378.

Bibliografia

- Ortega-Barria, E. y Pereyra, M.E.A. (1991) A novel *T. cruzi* Heparin-binding protein Promotes Fibroblast Adhesion and Penetration of Engineered Bacteria and Trypanosomes into Mammalian Cells. *Cell*. 67:411-421.
- Osawa, S, Jukes, T.H., Watanabe, K, y Muto, A. (1992) Recent Evidence for Evolution of the Genetic Code. *Microbiol. Rev.* :229-264.
- Otaka, E., Ooi, T., Kumasaki, T. e Itoh, T. (1985) Examination of Protein Sequence Homologies: Six *Escherichia coli* L7/L12 Type Ribosomal "A" Protein Sequences from Eukaryotes and Metabacteria, Contrasted with Those from Prokaryotes. *J. Mol. Evol.* 22:342-350.
- Ouaisi, M.A., Cornette, J., Afchain, D., Capron, A., Gras-Masse, H. y Tartar, A. (1986) *Trypanosoma cruzi* infection inhibited by peptides modeled from a fibronectin cell attachment domain. *Science* 234:603-607.
- Paranhos, G.S., Cotrim, P.C., Mortara, R.A., Rassi, A., Corral, R., Freilij, H.L., Grinstein, S., Wanderley, J., Camargo, M. y Franco da Silveira, J.S. (1990) *Experimental Parasitology* 71:284-293.
- Parsons, M., Suart, K. y Smiley, B. (1991) *Trypanosoma brucei*: Analysis of Codon Usage and Nucleotide Composition of Nuclear Genes. *Experimental Parasitology* 73:101-105.
- Perry, K.L., Watkins, K.P. y Agabian, N. (1987) *Trypanosoma* mRNAs have unusual "cap 4" structures aquired by addition of a spliced leader. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:8190-8194.
- Peterson, D.S., Fouts, D.L. y Manning, . (1989) The 85 kD surface antigen gene of *Trypanosoma cruzi* is telomeeric and a member of a multigene familiy. *EMBO. J.* 8:3911.
- Peterson, D.S., Wrightsman, R.A. y Manning, J.E. (1986) Cloning of a major surface-antigen gene of *Trypanosoma cruzi* and identification of a nonapeptide repeat. *Nature (London)* 322:566.
- Peterson, I., Hardy, S.J.S. y Liljas, A. (1976) The ribosomal protein L8 is a complex of L7/L12 and L10. *FEBS Lett.* 64:135-138.
- Petry, K. y Eisen, H. (1989) Chagas' disease: A model for the study of autoimmune diseases. *Parasitol. Today.* 5:111-116.
- Petry, K. y Van Vooris, W.C. (1991) Antigens of *Trypanosoma cruzi* that mimics mammalian nervous tissues: investigations of their role in the autoimmune pathophysiology of chronmic Chagas' disease. *Res. Immunol.* 142: 151-156.

Bibliografía

- Petry, K., Voison, P., Baltz, T. y Labouesse. (1987) Epitopes common to trypanosomes (*T. cruzi*, *T. dionisii*, and *T. vespertilionis* [*Schizotrypanum*]): astrocytes and neurons. *J. Neuroimmunol.* 16:237.
- Pettersson, L. (1979) Studies on the RNA and protein binding sites of the *E. coli* ribosomal protein L10. *Nucleic. Acids. Res.* 6:2637-2646.
- Pinto Diaz, J.C. (1979) Mecanismos de transmissao. En: *Trypanosoma cruzi* e Doença de Chagas. Brener, Z. y Andrade, Z. (Eds.) Guanabara Koogan, Río de Janeiro, pp. 152-174.
- Post, L.E., Strycharz, A., Nomura, M., Lewis, H. y Dennis, P.P. (1979) Nucleotide sequence of the ribosomal protein gene cluster adjacent to the gene for RNA polymerase subunit in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76:1697-1701.
- Postan, M., Dvorak, J.A. y Mc Daniel, J.P. (1983) Studies of *Trypanosoma cruzi* clones in inbred mice. I. A comparison of the course of infection of C3H/HEJ mice with two clones isolated from a common source. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 32:497-506.
- Prieto, J., Candel, E. y Coloma, A. (1991) Nucleotide sequence of a cDNA encoding ribosomal acidic phosphoprotein P1 from Van der Ploeg, L.H.T. (1986) Discontinuous transcription and splicing in trypanosomes. *Cell.* 47:479-480.
- Proudfoot, N. (1991) Poly (A) signals. *Cell* 64:671-674.
- Qian, S., Zhang, J-Y, Kay, M.A. y Jacobs-Lorena, M. (1987) Structural analysis of *Drosophila* rpA1 gene, a member of the eukaryotic "A" type ribosomal protein family. *Nucleic. Acids. Res.* 15:987-1003.
- Ramirez, C., Shimmin, L.C., Hunter Newton, C., Matheson, T. y Dennis, P.P. (1989) Structure and evolution of the L11, L1, L10 and L12 equivalent ribosomal proteins in eubacteria, archaeobacteria and eucaryotes. *Can. J. Microbiol.* 35:234-244.
- Reed, S.G., Rotters, S.B. y Goidl, E.A. (1983) Spleen cell-mediated suppression of IgG production to a non parasite antigen during chronic *Trypanosoma cruzi* infection in mice. *J. Immunol.* 131:1978-1982.
- Remacha, M., Sáenz-Robles, M.T., Dolores Vilella, M., Ballesta, J.P.G. (1988) Independent genes coding for three acidic proteins of the large ribosomal subunit from *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 263:9094-9101.

Bibliografía

- Remacha, M., Santos, C. y Ballesta, J.P.G. (1990) Disruption of single-copy genes encoding acidic ribosomal proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 10:2182-2190.
- Requena, J.M., Jimenez-Ruiz, A., Soto, M., Lopez, M.C. y Alonso, C. (1992) Characterization of a highly repeated interspersed DNA sequence of *Trypanosoma cruzi*: its potential use in diagnosis and strain classification. *Mol. Biochem. Parasitol.* 51:271-280.
- Requena, J.M., López, M.C., Jimenez-Ruiz, A., Morales, G., Alonso, C. (1989) Complete nucleotide sequence of the hsp70 gene of *Trypanosoma cruzi*. *Nucleic. Acids. Res.* 17:797.
- Requena, J.M., Lopez, M.C.; Jimenez - Ruiz, A., de la TORRE, J.C. y Alonso, C. (1988) A head to-tail tandem organization of hsp70 genes in *T. cruzi*. *Nucl. Acid Res.* 16: 1393-1406.
- Rezende, J.M. (1979) Clínica: Manifestaciones digestivas. En *Trypanosoma cruzi e Doença de Chagas*. Brener, Z. y Andrade, Z. (eds.) Guanabara Koogan, Río de Janeiro, pp. 312-361.
- Rich, B.E. y Steitz, J.A. (1987) Human acidic ribosomal proteins PO, P1 and P2: Analysis of cDNA clones, *in vitro* synthesis and assembly. *Mol. Cell. Biol.* 7:4065-4074.
- Romaña, C. (1963) Enfermedad de Chagas. López Libreros Ed., Buenos Aires.
- Rosenbaum, M.B. (1964) Chagasic myocardopathy. *Progr. Cardiovasc. Dis.* 1:199-225.
- Russo, M., Starobinas, N., Minoprio, P., Couthinio, A. y Hontebeyrie-Joskowicz, M. (1988) Parasitic load increases and myocardial inflammation decreases in *T. cruzi* infected mice after the inactivation of helper cells. *Ann. Inst. Pasteur/Immunol.* 139:225-234.
- Sadigursky, M., Acosta, A.M. y Santos Buch, C.A. (1982) Muscle sarcoplasmic reticulum antigen shared by a *Trypanosoma cruzi* clone. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 31:934-941.
- Said, G., Joskowicz, M., Barreira, A.A. y Eisen, H. (1985) Neuropathy associated with experimental Chagas' disease. *Ann. Neurol.* 18:676-683.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. y Maniatis, T.: Molecular cloning. A Laboratory Manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989.

Bibliografía

- Sanchez-Madrid, F., Vidales, J y Ballesta, J.P.G. (1981) Effect of phosphorylation on the additivity of acidic proteins from *Saccharomyces cerevisiae* for the ribosome. *Eur. J. Biochem.* 114:609-613.
- Sanchez-Madrid, F., Vidales, Juan y Ballesta, J.P.G. (1981) Functional role of acidic ribosomal proteins. Interchangeability of proteins from bacteria and eukaryotic cells. *Biochem.* 20:3263-3266.
- Sandermann, J., Kruger, A. y Kristiansen, K. (1979) Characterization of acidic 60 S ribosomal proteins in *Tetrahymena pyriformis*. *FEBS Let.* 107:343-347.
- Sanger, F., Nicklen, S. y Coulson, A.R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74:5463-5467.
- Schenkman, S., Diaz, C. y Nussenzweig, V. (1991) Attachment of *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes to receptors at restricted cell surface domains. *Exp. Parasitol.* 72:76-86.
- Schmuñis, G.A. (1985) Chagas disease in blood transfusion. In: *Infection, Immunity and Blood Transfusion.* Alan R. Liss Inc. 127-145.
- Schmuñis, G.A. (1987) Autoimmunity in Chagas' disease. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 82:287-310.
- Schmuñiz, G.A. y Szarfman, A. (1977) La enfermedad de Chagas congénita. *Medicina (Buenos Aires)* 37:47-53.
- Schneider, W.C. (1957) *Methods in Enzimology* 3: 680.
- Schreiber, R.D. (1984) Complement receptors. *Springer Semin. Immunopathol.* 7:221.
- Schwartz, D.C. y Cantor, C.R. (1984) Separation of yeast chromosomes-sized DNAs by pulse field gradient gel electrophoresis. *Cell* 37:67-75.
- Segura, E.L., Vasquez, C., Bronsina, A., Campos, J.M., Cerisola, J.E. y Gonzales-Cappa, E. (1977) Antigens of the subcellular fractions of *T. cruzi* II. Flagellar and membrane fraction. *J. Protozool.* 24:540.
- Sharp, P. (1987) Trans-splicing. Variation on a familiar theme. *Cell* 50:603-612.
- Shaw, G. y Kamen, R. (1986) A conserved AU sequence from the 3' untranslated region of fGM-CSF mRNA mediates selective mRNA degradation. *Cell* 46:659-667.

Bibliografía

- Shimmin, L.C. y Dennis, P.D. (1989) Characterization of the L11, L1, L10 and L12 equivalent ribosomal protein gene cluster of the halophilic archaeobacterium *Halobacterium cutirubrum*. *EMBO J.* 8:1225-1235.
- Shimmin, L.C., Hunter Newton, C., Ramirez, C., Yee, J., Downing, W., Louie, A., Matheson, A.T. y Dennis, P.P (1989) Organization of genes encoding the L11, L1, L10 and L12 equivalent ribosomal proteins in eubacteria, archaeobacteria and eucaryotes. *Can.J. Microbiol.* 35:164-170.
- Shimmin, L.C., Ramirez, C., Matheson, A.T. y Dennis, P.P. (1989b) Sequence alignment and evolutionary comparison of the L19 and L12 equivalent ribosomal proteins from archaeobacteria, eubacteria and eucaryotes. *J. Mol. Evol.* 29:448-462.
- Sica, R.E. Filipini, D., Panizza, M., Fumo, T., Baso, S., Lazzari, J. y Molina, H.A. (1986) Involvement of the peripheral sensory nervous system in human chronic Chagas disease. *Medicina (B Aires)* 46:662-668.
- Silva, L.H.P., y Nussenzweig, V. (1953). Sobre una cepa de *Trypanosoma cruzi* altamente virulenta para o camundongo branco. *Folia. Clin. Biol.* 20, 197-207.
- Simpson, L. (1987) The mitochondrial genome of kinetoplastid protozoa: genomic organization, transcription, replication and evolution. *Annu. Rev. Microbiol.* 41:363-382.
- Simpson, L., Neckelmann, N., de la Cruz, V.F., Simpson, A.M., Fegin, J.E., Jasmer, D.P. y Stuart, K. (1987) Comparison of the maxicircle (mitochondrial) genomes of *Leishmania tarentolae* and *Trypanosoma brucei* at the level of nucleotide sequence. *J. Biol. Chem.* 262:6182-6196.
- Sloof, P., Van den Burg, J., Voogd, A. y Benne, R. (1987) The nucleotide sequence of a 3,2 kb segment of mitochondrial maxicircle DNA from *Crithidia fasciculata* containing the gene for cytochrome oxidase subunit III, the N-terminal part of the apocytochrome B gene and a possible frameshift gene. Further evidence for the use of unusual initiators triplets in trypanosome mitochondria. *Nucleic. Acids. Res.* 15:51-65.
- Smith, C.L., Warburton, P.E., Gaal, A. y Cantor, C.R. (1987) Analysis of genome organization and rearrangements by pulsed field gradient gel electrophoresis. En: *Genes and Proteins* (ed: Jeyaseelan, K., Chung, M.C.M. and Kon, O.L.
- Smith, G.R., Kunes, S.M., Schulz, D.W., Taylor, A. y Triman, K.L. (1981) Structure of Chi Hotspots of generalized recombination. *Cell* 24:429-436.

Bibliografía

- Sogin, M.L., Elwood, H.J.A. y Gunderson, J.H. (1985) Evolutionary diversity of eukaryotic small-subunit rRNA genes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 83:1383-1387.
- Southern, E.M. (1975) Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* 98: 503-517.
- Strobel, O., Kopke, A.K.E., Kamp, R.M., Bock, A.A. y Wittmann-Liebold, B. (1988) Primary structure of the archaebacterial *Methanococcus vannielii* ribosomal protein L12. *J. Biol. Chem.* 263:6538-6546.
- Stuart, K. (1991) RNA editing in trypanosomatid mitochondria. *Ann. Rev. Microbiol.* 45:327-344.
- Sturm, N.R. y Simpson, L. (1990) Kinetoplast DNA minicircles encode guide RNAs for editing of cytochrome oxidase subunit III mRNA. *Cell* 61:871-878.
- Sutton, R.E., Boothroyd, J.C. (1986) Evidence for trans-splicing in trypanosomes. *Cell* 47:527-535.
- Swindle, J., Ajioka, J. Eisen, H., Sanwal, B., Jackemot, C., Browder, Z. y Buck, G.A. (1988) The genomic organization and transcription of the ubiquitin genes of *Trypanosoma cruzi*. *EMBO J.* 7:1121-1127.
- Szarfman, A., Esser, K., Nowack, H. y Timpl, R. (1987) Circulating antibodies to mouse laminin in Chagas disease, American cutaneous leishmaniasis, and normal individuals recognize terminal galactosyl(α 1-3)-galactose epitopes. *J. Exp. Med.* 166:419-432.
- Szarfman, A., Terranova, V.P., Renard, S.L., Foidart J.M., Lima, F.M., Scheinman, J.I. y Martin, G.R. (1982) Antibodies to laminin in Chagas' disease. *J. Exp. Med.* 155:1161-1171.
- Takle, G. y Hudson, L. Discussion of paper presented by J.D. Barry: Cell surface proteins of *T. cruzi*. En: *New Strategies in Parasitology: proceedings of an international symposium*, Brock-et Hall, Hertfordshire, 22-25 April 1989, editado por K.P.W.J. Mc Adam, U.K. pp:117-120.
- Takle, G.B. y Cross, A.M. (1991) An 85 kD kilodalton surface antigen gene family of *Trypanosoma cruzi* encodes polypeptides homologous to bacterial neuraminidases. *REVISTA??*48:185-198.
- Takle, G.B., Young, A., Snary, D., Hudson, L. y Nicholls, S.C. (1989) Cloning and expression of a trypomastigote-specific 85-kilodalton surface antigen gene from *Trypanosoma cruzi*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 37:57.

Bibliografia

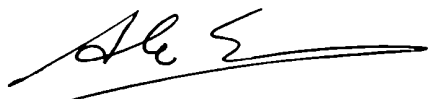
- Terhorst, C., Moeller, W., Laursen, R. y Wittman-Liebold, B. (1973) The primary structure of an acidic protein from 50 S ribosomes of *Escherichia coli* which is involved in GTP hydrolysis dependent on elongation factors G
- Tibayrenc, M. y Ayala, F.J. (1991) Towards a population genetics of microorganisms: The clonal theory of parasitic protozoa. *Parasitol. Today* 7:228-232.
- Towbin, H., Rosenfelder, G., Wieslander, J., Avila, J.L., Rojas, M.,
- Trischmann, T. y Bloom, B.R. (1982) Genetics of murine resistance to *T. cruzi*. *Infec. Immun.* 35:546-51.
- Trischmann, T., Tanowitz, H., Wittner, M., Bloom, B. (1978) *T. cruzi*: Role of the immune response in the natural resistance of inbred strains of mice. *Exp. Parasitol.* 45:160-168.
- Trischmann, T.M. (1983) Non-antibody mediated control of parasitemia in acute experimental Chagas' disease. *J. Immunol.* 130: 1953-1957.
- Tschudi, C. y Ullu, E. (1990) *Cell* 61:459-466.
- Tsurugi, K. y Ogata, K. (1985) Evidence for the exchangeability of ribosomal acidic proteins on cytoplasmic ribosomes in regenerating rat liver. *J. Biochem.* 98:1427-1431.
- Tybayrenc, M. y Ayala, F.J. (1987) *Trypanosoma cruzi* populations: More clonal than Sexual. *Parasitol. Today.* 3:189-190.
- Tybayrenc, M., Ward, P., Moya, A. y Ayala, F.J. (1986) Natural populations of *Trypanosoma cruzi*, the agent of Chagas' disease, have a complex multiclonal structure. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 83:115-119.
- Tybayrenc, M., Ward, P., Moya, A. y Ayala, F.J. (1986) TITULO??? *Proc. Natl. Acad. Sci.* 83:115-119.
- Uchiumi, T., Wahha, A.J. y Traut, R.R. (1987) Topography and stoichiometry of acidic proteins in large ribosomal subunits from *Artemia salina* as determined by crosslinking. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:5580-5584.
- Ulisses de Carvalho, T.M. y de Souza, W. (1989) Early events related with the behavior of *Trypanosoma cruzi* within an endocytic vacuole in mouse peritoneal macrophages. *Cell Struct. Funct.* 14:383-392.
- UWorld Health organization (1991) in Tropical diseases: Progress in reseach, 1989-1990 (WHO)(Geneva) Tropical Diseases Research report (1989-1990).

Bibliografía

- Van der Ploeg, L.H.T., Cornelissen, A.W.C.A, Barry, J.D. y Borst, P. (1984b) Chromosomes of kinetoplastida. *EMBO J.* 3:3109-3115.
- Van der Ploeg, L.H.T., Schwartz, D.C., Cantor, C.R. y Borst, P. (1984a) Antigenic variation in *Trypanosoma brucei* analyzed by electrophoretic separation of chromosome-sized DNA molecules. *Cell* 37:77-84.
- Van Voorhis, W.C. y Eisen, H. (1989) A surface antigen of *Trypanosoma cruzi* that mimics mammalian nervous tissue. *J. Exp. Med.* 169:641-652.
- Vidales, F.J., Sanchez Madrid, F. y Ballesta, J.P.G. (1981) The acidic proteins of eukaryotic ribosomes: a comparative study. *Biochem. Biophys. Acta* 656:28-35.
- Villanueva, M.S. (1992) *Mol. Cell. Biol.*, in press..
- Wagner, V. y So, M. (1991) Large extrachromosomal DNA (LED) in *Trypanosoma cruzi*. Abstract N°10. En: Molecular Parasitology Meeting, Sept. 1991. Harvard School of Public Health, Boston, MA, USA.
- Walsh, J.A. (1988) Establishing health priorities in the developing World. United Nations, Development Programme, New York.
- Warren, K.S. Selective primary health care and parasitic diseases, En *New Strategies in Parasitology: proceedings of an international symposium*, Brocket Hall, Hertfordshire, 22-25 April 1989, editado por K.P.W.J. Mc Adam , U.K. pp. 217-234.
- Wigboldus, J.D. (1987) cDNA and deduced aminoacid sequence of *Drosophila* rp21 C, another "A"-type ribosomal protein. *Nucleic Acids.Res.* 15:10064.
- Wincker, P., Roizes, G. y Goldenberg, S. (1990) Characterization of a *Trypanosoma cruzi* specific nuclear repeated sequence. *Mol. Biochem. Parasitol.* 41:147-152.
- Wood, J.N., Hudson, L., Jessel, T.M. y Yamamoto, M. (1982) A monoclonal antibody defining antigenic determinantes on subpopulations of mammalian neurones and *Trypanosoma cruzi* parasites. *Nature (London)* 296:34-38.
- Wool, I.G., Chan, Y.L., Gluck, A., Susuki, K. (1991) The primary structure of rat ribosomal proteins P0, P1 and P2 and a proposal for a uniform nomenclature for mammalian and yeast ribosomal proteins. *Biochimie.* (1991) 73, 861-870.

Bibliografia

- Yee, T. (1988) Estimating the number of restriction fragments in a gel slice. *Focus*. 10:57.
- Zingales, B. y Colli, W. (1985) *Trypanosoma cruzi*: interaction with host cells. *Curr. Topics Microbiol. Immunol.* 117:129-152.
- Zinker, S. y Warner, J.R. (1976) The ribosomal proteins of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 251:1799-1807.
- Zwierzynski, T.A. y Buck, G.A. (1991) RNA-protein complexes mediated *in vitro* capping of the spliced leader primary transcript and U-RNAs in *Trypanosoma cruzi*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 88:5626-5630.
- Zwierzynski, T.A., Widmer, C. y Buck, G.A. (1989) *In vitro* 3' end processing and poly(A) tailing of RNA in *Trypanosoma cruzi*. *Nucleic Acids. Res.* 17:4647-4660.


Alejandro G. Schijman


MARIANO J. LEVIN