

Tesis de Posgrado

Estructura genómica y diseño de nuevos vectores de transfección para *Trypanosoma cruzi*

Lorenzi, Hernán Alejandro

2001

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:

Lorenzi, Hernán Alejandro. (2001). Estructura genómica y diseño de nuevos vectores de transfección para *Trypanosoma cruzi*. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3420_Lorenzi.pdf

Cita tipo Chicago:

Lorenzi, Hernán Alejandro. "Estructura genómica y diseño de nuevos vectores de transfección para *Trypanosoma cruzi*". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2001. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3420_Lorenzi.pdf

EXACTAS UBA

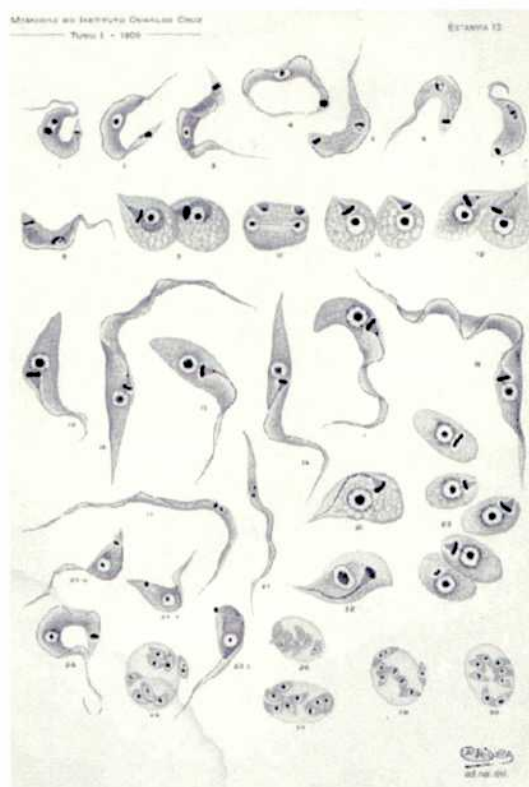
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

Estructura genómica y diseño de nuevos vectores de transfección para *Trypanosoma cruzi*.



Lic. Hernán Alejandro Lorenzi

3420

TESIS PARA OPTAR AL TITULO DE DOCTOR
DE LA UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES
DIRECTOR: Dr. Mariano Jorge Levin
2001

RESUMEN

Trypanosoma cruzi es un parásito protozoario causante de la enfermedad de Chagas. Dentro del marco del proyecto genoma de *T. cruzi* y como un activo aporte a su concreción, se ha caracterizado un nuevo tipo de marcador genético asociado a la secuencia repetida SIRE denominado SAS, que condujo a la identificación de cuatro nuevos genes y de las secuencias repetidas TcREL y VIPER. Para contribuir a la construcción del mapa físico, se construyó y caracterizó una biblioteca de ADN genómico de *T. cruzi* en vectores YAC con un tamaño promedio de inserto de 365 kpb, que fue utilizada para construir el mapa físico de una región de ~900 kpb del cromosoma XVI y comenzar la construcción del mapa físico del cromosoma XX. También se construyeron cromosomas circulares en levaduras por el método de clonado RAT utilizando las secuencias repetidas como base del clonado, y se probó la utilidad de un vector de fragmentación que sirvió para ubicar el gen TcP2 β cerca de una región telomérica de un cromosoma de ~1 Mpb.

Para contribuir con los estudios genómicos funcionales se diseñó y construyó el vector necesario para obtener cromosomas artificiales de *T. cruzi*.

Finalmente, estos estudios llevaron a utilizar comparaciones de secuencia para definir las características de sintenia de extensas regiones genómicas de *T. cruzi*, *Trypanosoma brucei* y *Leishmania major*.

Palabras clave:

Trypanosoma cruzi, marcadores genómicos, organización genómica, cromosoma artificial, fragmentación cromosómica.

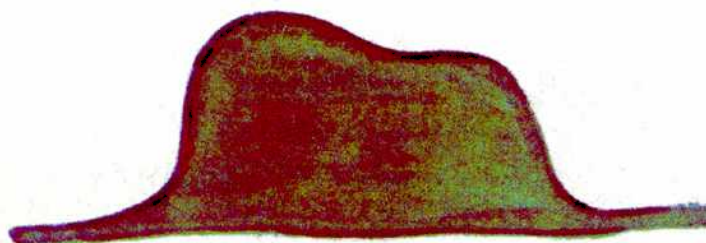
Genomic structure and development of novel transfection vectors for *Trypanosoma cruzi*.

ABSTRACT

Trypanosoma cruzi is a parasitic protozoan that causes Chagas disease. As part of the *T. cruzi* genome project and to contribute to its concretion we have characterized a new type of chromosomal marker associated to the repetitive element SIRE named SAS, that allowed the identification of four novel genes and two repetitive sequences, TcREL and VIPER. To accomplish the construction of the physical map of the *T. cruzi* genome, we constructed and characterized a genomic YAC library of *T. cruzi* with an average insert-size of 365 kbp that was used to get the physical map of a ~900 kbp region from chromosome XVI and to start the assembly of contigs from chromosome XX. In addition, we also constructed circular artificial chromosomes in yeast, based on a *T. cruzi* repetitive sequence by RAT cloning, and verified the utility of a fragmentation vector in the position of the TcP2 β gene near a telomeric region of a chromosome of ~1 Mbp. To perform functional genomic studies we designed and constructed a vector that can be used as an artificial chromosome in *T. cruzi*. Finally, comparison and sequence analysis allowed us the identification of large genomic sintenic regions among *T. cruzi*, *Trypanosoma brucei* and *Leishmania major*.

Keywords:

Trypanosoma cruzi, genomic markers, genomic organization, artificial chromosome, chromosome fragmentation.



A Juani y Rodo

AGRADECIMIENTOS

Gracias al Dr. Mariano Levin por darme la posibilidad de realizar esta Tesis en su laboratorio y por ayudarme siempre que lo necesité.

Gracias al Dr. Héctor Torres por permitirme trabajar durante todos estos años en el INGEBI.

Gracias a los chicos del laboratorio y en especial a Martín, Alejandro, Claudia, Cecilia, Serge, Mariana, Sonia, Inés y Ami, porque sin ellos esta Tesis no hubiera sido posible.

Gracias a Marcia Santos y a Franco da Silveira.

Gracias a los chicos del INGEBI, que me ayudaron siempre y de los cuales aprendí mucho.

Y gracias a vos Sole, por ser mi flor en un universo lleno de estrellas.

Esta Tesis fue realizada gracias al apoyo de los siguientes organismos:
INSERM-CONICET cooperation program; Projet genome *Trypanosoma cruzi*, INGEBI-CEPH, Ministere d' Affaires Etrangeres (Francia); Programa Genoma de *Trypanosoma cruzi* asociado al Proyecto Genoma Humano de la Universidad de Buenos Aires; Organización Mundial de la Salud; The United Nations Development Program for Research and Training in Tropical Diseases; Fundación Antorchas; Proyecto Genoma de *Trypanosoma cruzi* (CYTED); Universidad de Buenos Aires y CONICET a través de sus programas de becas de iniciación y perfeccionamiento.

PUBLICACIONES

Schijman AG, Vázquez MP, Ben-Dov CP, Ghio S, Lorenzi H, Levin MJ. **Cloning and sequence analysis of TcP2 β cDNA variants of Trypanosoma cruzi.** *Biochim Biophys. Acta.*1264:15-18.1995.

Brandariz S, Ferrari Y, Saumier M, Perrot V, Lorenzi H, Vazquez M, da Silveira JF, Cano Y, Zingales B, Gruber A, Degrafe W, Rondineli E, Gonzales A, Cortes A, Alonso C, Requena JM, Ramirez JL, Aldao RR, Cohen D, Le Paslier D, Levin MJ. **The Trypanosoma cruzi Genome Project: Genome Sequence Sampling (GSS) strategy for high resolution physical mapping.** *Mem Inst Oswaldo Cruz.*90:Suppl I:20-21.1995.

Vazquez M, Beljord C, Lorenzi H, Bienvenu T, Levin MJ. **Detection of polymorphism in the Trypanosoma cruzi TcP2 β gene family by single strand conformational analysis (SSCA).** *Gene.*180:43-48.1996.

Ferrari I, Lorenzi H, Brandariz S, da Silveira JF, Requena JM, Schijman A, Vazquez M, Santos MR, Ben-Dov C, Medrano C, Kaplan D, Ghio S, Elías F, López Bergami P, Cano I, Zingales B, Urményi TP, Rondinelli E, Gonzalez A, Cortes A, Alonso C, Ramirez JL, Chiurrillo MA, Rangel Aldao R, Brandao A, Degrafe W, Perrot V, Saumier M, Billaut A, Cohen D, Le Paslier D, Levin MJ. **Towards the physical map of the Trypanosoma cruzi nuclear genome: construction of YAC and BAC libraries of the reference clone CL-Brener.** *Mem Inst Oswaldo Cruz.*92:843-852.1997.

Santos M, Cano MI, Schijman AG, Lorenzi H, Vazquez M, Levin M, Ramirez JL, Brandao A, Degrafe W, da Silveira JF. **The Trypanosoma cruzi genome project: Nuclear karyotype and gene mapping of clone CL Brenner.** *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 92:821-828.1997.

Vázquez M, Lorenzi H, Schijman A, Ben-Dov C, Levin MJ. **Analysis of the distribution of SIRE in the nuclear genome of Trypanosoma cruzi reveals its linkage to other repetitive sequences and protein coding genes.** *Gene.*239:207-216.1999.

Santos M, Lorenzi H, Do Carmo M, Cerda P, Schijman A, Brandao A, Gomes H, Chiurrillo MA, Ramirez JL, Degrafe W, Levin MJ, da Silveira JF. **Physical Map of large chromosomal region harboring (encompassing) genes for two immunodominant repetitive antigens os Trypanosoma cruzi.** *Genome Res.*9:1268-1276.1999.

Ghio S, Elías F, López Bergami P, Lorenzi H, Mahler E, Ben-Dov C, Burgos J, Quintana F, Volchof R, Vázquez M, Schijman A, Levitus G, Berek C, González A, Levin MJ. **Aportes del proyecto genoma de Trypanosoma**

cruzi a la comprensión de la patogénesis de la cardiomiopatía chagásica crónica. *Medicina*.59:18-24.1999.

Vázquez M, Ben-Dov C, Lorenzi H, Moore T, Schijman A, Levin MJ. **The short interspersed repetitive element of *Trypanosoma cruzi*, SIRE, is part of VIPER, an unusual retroelement related to long terminal repeat retrotransposons. *Proc Natl Acad Sci USA*.97:2128-2133.2000.**

Lorenzi H, Vázquez M, Levin MJ. **The genes for a DEAH RNA helicase, a NifU like protein and the translation factor eIF6 constitute the SZ5 locus of *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol*.111:207-211.2000.**

INDICE

INTRODUCCIÓN	1
1.1 La enfermedad de Chagas	1
1.2 El ciclo de vida	2
1.3 Diagnóstico de la enfermedad	3
1.4 Tratamiento	3
1.5 Clasificación de las cepas de <i>T. cruzi</i>	4
1.6 Variabilidad cariotípica en <i>T. cruzi</i>	7
1.7 Ploidía	10
1.8 Organización genómica	10
1.9 Análisis de la distribución de nucleótidos como herramienta para el estudio de genomas	16
1.10 Conservación de la organización genómica entre distintas especies de kinetoplástidos	17
1.11 Promotores	17
1.12 Regulación de la expresión genética	19
1.13 Organización telomérica	20
1.14 El Proyecto Genoma de <i>Trypanosoma cruzi</i>	20
1.15 Bibliotecas disponibles	21
1.16 Información disponible en las bases de datos	22
1.17 Marcadores ESTs	23
1.18 Manipulación genética en tripanosomátidos	27
1.19 Objetivos	29
MATERIALES Y METODOS	30
2.1 Soluciones y medios utilizados	30
2.1.1 Medios	30
2.1.2 Soluciones generales	31
2.1.3 Soluciones para preparar células competentes	31
2.1.4 Soluciones para la preparación de esferoplastos de levadura	31
2.1.5 Soluciones para la transformación de esferoplastos de levadura	32
2.1.6 Solución DB 0.5	32
2.1.7 Soluciones para preparación de bloques de levadura	32
2.1.8 Soluciones de lavado de las hibridaciones	33
2.1.9 Soluciones para minipreparación de ADN plasmídico	33
2.1.10 Oligonucleótidos utilizados	33
2.1.11 Plásmidos	35
2.2 Bacterias	35
2.2.1 Cepas bacterianas	35
2.2.2 Mantenimiento de las cepas	35
2.3 Cepa de referencia de <i>T. cruzi</i>	35
2.4 Bibliotecas	36
2.5 Manipulación de fagos recombinantes	36

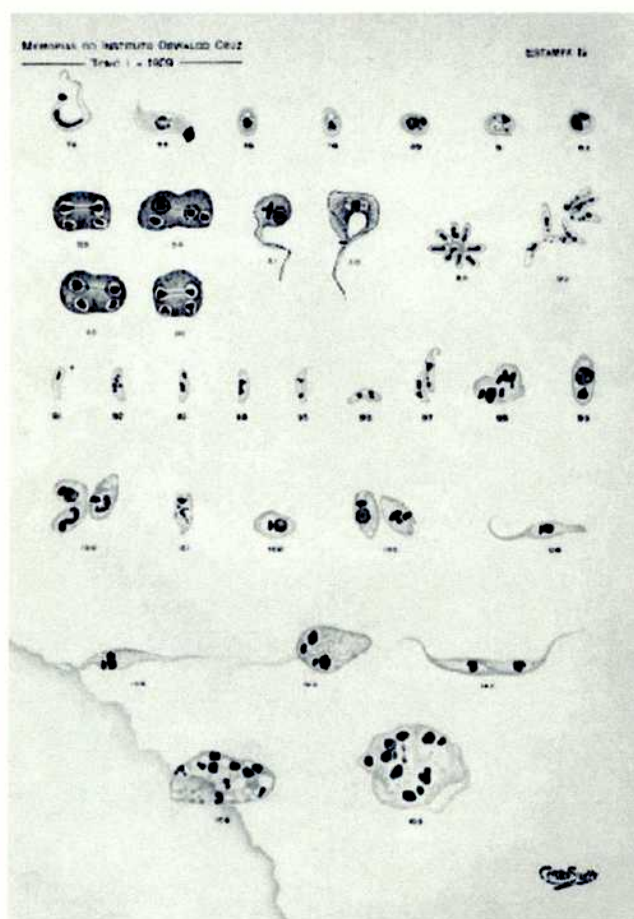
2.5.1	Plaqueo de la biblioteca de ADNc en λ - ZapII	36
2.5.2	Plaqueo de la biblioteca λ gt11	36
2.5.3	Purificación de clones positivos	37
2.5.4	Amplificación de los fagos recombinantes	38
2.5.5	Escisión <i>in vivo</i> del plásmido pBS SK- de λ -ZapII	38
2.6	Transferencia del ADN de los fagos recombinantes a filtros de nylon: (Método de transferencia de Benton Davis)	39
2.7	Preparación de bacterias competentes de <i>E. coli</i> DH5 α para transformar	40
2.8	Transformación de bacterias competentes DH5 α	40
2.9	Preparación de vector para clonado de productos de PCR	41
2.10	Preparación de sondas radioactivas	41
2.11	Hibridación con sondas radioactivas	42
2.12	Electroforesis con ARN para Northern blot	43
2.13	Transcripción reversa de ARN total de <i>T. cruzi</i>	43
2.14	Preparación de ADN total de <i>T. cruzi</i>	44
2.15	Southern blots	44
2.16	Amplificación por PCR	45
2.17	Subclonado en plásmidos	45
2.18	Subclonado en el plásmido pGEM-T Easy	46
2.18.1	Análisis de los plásmidos recombinantes	46
2.19	Electroforesis en geles de agarosa	46
2.20	Electroforesis en geles de campos pulsados (PFGE)	47
2.21	Electroforesis en geles de campos invertidos (FIGE)	47
2.22	Extracción de fragmentos de ADN en geles de agarosa de bajo punto de fusión	48
2.22.1	Protocolo alternativo de purificación usando el kit Wizard DNA Clean-Up	49
2.23	Digestión de ADN con enzimas de restricción	49
2.24	Extracción de ADN plasmídico	50
2.24.1	Purificación por PEG (8000) para secuenciación automática	50
2.25	Secuenciación de ADN utilizando el kit de secuencia <i>f</i> mol	51
2.25.1	Geles de poliacrilamida	52
2.26	Secuenciación automática	52
2.26.1	Reacciones con Kits de Perkin Elmer)	53
2.27	Preparación de membranas de YACs	54
2.28	Protocolo de bloques de YACs	55
2.29	Purificación de ADN total de YACs por el método de esferoplastos	56
2.30	Transformación de esferoplastos de levadura	57
2.30.1	Transformación con el vector RAT y el ADN genómico blanco	58
2.31	Transfección de epimastigotes de <i>T. cruzi</i>	58
2.32	Preparación de bloques de <i>T. cruzi</i>	59

2.33	Preparación de extractos de <i>T. cruzi</i> para ensayos CAT ...	59
2.34	Medición de actividad CAT	60
2.35	Purificación de bandas cromosómicas a partir de geles preparativos corridos en PFGE o FIGE	60
2.36	Construcción de la biblioteca YAC	61
2.36.1	Preparación de ADN genómico de <i>T. cruzi</i> para construir las bibliotecas YAC	61
2.36.2	Digestión parcial del ADN genómico de CL Brener	61
2.36.3	PFGE preparativos del ADN digerido parcialmente	61
2.36.4	Preparación del vector pYAC4	62
2.36.5	Ligación y transformación del ADN y transformación de esferoplastos de levadura	62
2.37	Digestión de los bloques de <i>T. cruzi</i> con <i>Bal31</i>	62
2.38	Estudio de la distribución de nucleótidos	63
RESULTADOS		64
3.	Caracterización de marcadores genómicos asociados a la secuencia repetida SIRE (SAS, sitios asociados a SIRE)	64
3.1	Caracterización de los fragmentos SZ10, SZ12 y SZ31	65
3.2	Caracterización de los fragmentos SZ14 y SZ23	68
3.3	Caracterización del fragmento SZ5	69
3.4	El <i>locus</i> SZ5 es un ejemplo de sintenia inter-especie entre <i>T. cruzi</i> y <i>T. brucei</i>	79
3.5	Caracterización del fragmento SZ15	85
4.	Construcción de una biblioteca genómica YAC del clon CL Brener de <i>Trypanosoma cruzi</i>	88
4.1	Preparación del ADN genómico de epimastigotes de <i>T. cruzi</i>	88
4.2	Estudios de representatividad de la biblioteca genómica YAC	89
4.3	Verificación de la identidad del ADN clonado en la biblioteca YAC	90
4.4	Rastreo del gen que codifica para la proteína gp90	90
4.5	Rastreo del gen que codifica para la proteína hsp70	91
4.6	Rastreo del gen que codifica para la proteína JL7-H49	91
4.7	Caracterización de la estabilidad de la biblioteca genómica YAC de <i>T. cruzi</i>	92
4.9	Mapa físico del cromosoma XVII	92
4.10	Mapa físico de los cromosomas XIX y XX	93
4.11	Purificación de las bandas cromosómicas XIX y XX	95
4.12	Construcción de una sub-biblioteca YAC del cromosoma XX	96
4.13	Generación de marcadores EST (Expressed Sequence Tags) cromosoma específicos	97
4.14	Análisis de sintenia de grandes fragmentos genómicos en	

tripanopsomátidos	98
4.15 La región analizada del cromosoma III de <i>T. cruzi</i> se conserva en <i>L. major</i>	105
4.16 Estudio de la distribución de nucleótidos en la región sinténica	106
4.17 Una alternativa al método clásico de clonado en YACs: construcción de YACs por recombinación asociada a la transformación en levaduras	111
5. Desarrollo de vectores de fragmentación en <i>T. cruzi</i>	114
5.1 Construcción de los vectores pLFGAP, pLFSIRE y pH64 ..	114
5.2 Transfecciones con el vector de fragmentación pLF2	118
6. Desarrollo de un cromosoma artificial de <i>Trypanosoma cruzi</i> (CrAT)	122
6.1 Transfecciones con el vector pTNT1	122
6.2 Transfecciones con el vector pTNT2	123
6.3 Construcción de la biblioteca del CrAT B2	131
6.4 Construcción de un cromosoma artificial con extremos teloméricos que contienen diferentes genes de resistencia	132
7. Estudio del promotor ribosomal de <i>T. cruzi</i>	136
7.1 Transfecciones con el vector pPwt linealizado	136
7.2 Construcción de los vectores pPwt, pDK, pDS y pDP.....	138
7.3 Ensayos de expresión del gen CAT con los vectores pPwt, pDK, pDS y pDP	139
7.4 Estudios de la recombinación en el promotor ribosomal ..	140
7.5 Identificación del sitio de recombinación	141
7.6 Búsqueda de un promotor ribosomal sin actividad recombinogénica	143
7.7 Estudio de la actividad recombinogénica de los distintos promotores	144
7.8 Integración en transfecciones transitorias	146
DISCUSION	148
8.1 Marcadores Genómicos SAS	148
8.2 Análisis de los fragmentos SZ10, SZ12 y SZ31	149
8.3 Análisis de las secuencias SZ23 y SZ14	149
8.4 Caracterización de SZ5	150
8.5 Caracterización del clon SZ15	152
8.6 Sintenia en <i>T. cruzi</i> , <i>T. brucei</i> y <i>L. major</i>	154
8.7 Construcción y caracterización de la biblioteca YAC de <i>T. cruzi</i>	158
8.8 Sub-biblioteca cromosoma-específica	159
8.9 Construcción de YACs mediante la técnica de clonado RAT	160

	<i>Indice</i>
8.10 Fragmentación cromosómica	160
8.11 Desarrollo del cromosoma artificial	162
8.12 Análisis del promotor ribosomal	164
8.13 La región MP de 98 pb que contiene el tsp1 es suficiente para obtener completa actividad del promotor ribosomal en las cepas del grupo I y II de <i>T. cruzi</i>	167
CONCLUSIONES	169
BIBLIOGRAFÍA	171

INTRODUCCION



INTRODUCCION

1.1 La enfermedad de Chagas

La enfermedad de Chagas, denominada así en honor al fisiólogo Carlos Chagas que describió la enfermedad en 1909, existe sólo en el continente americano. La misma es causada por el parásito protozoario *Trypanosoma cruzi* y transmitida a humanos por el insecto triatomino conocido popularmente como vinchuca en Argentina. La distribución geográfica de la enfermedad se extiende desde México hasta el sur de nuestro país. Esta enfermedad afecta entre 16 a 18 millones de personas y alrededor de 100 millones (el 25% de la población de América Latina) se encuentra en riesgo de contraer la enfermedad [Moraes-Souza, H., 1999].

Se han descripto dos estadios de la enfermedad de Chagas en humanos: la fase aguda que aparece inmediatamente después de la infección y la fase crónica que aparece luego de un período asintomático (etapa indeterminada) que puede durar varios años. La fase aguda es generalmente asintomática pero puede llegar a manifestarse como fiebre, anorexia, linfadenopatía, una suave hepatoesplenomegalia y miocarditis. Las lesiones de la fase crónica afectan irreversiblemente órganos internos como el corazón, esófago, colon y el sistema nervioso periférico. Luego de varios años de un período asintomático, 27% de los enfermos presentan síntomas cardíacos (miocarditis) que pueden llegar a provocar muerte súbita, 6% desarrollan daños viscerales, principalmente megavisceras y 3% presentan problemas a nivel del sistema nervioso periférico [Brener, Z. 1992; Pinto Dias, J.C. 1992].

El riesgo de infección con Chagas está directamente relacionado con la pobreza: un hábitat favorable para el insecto hematófago que transmite el parásito lo constituyen las paredes de adobe y los techos de paja característicos de las casas pobres de las áreas rurales y de las villas localizadas en la periferia de las ciudades. Los movimientos migratorios rurales y urbanos ocurridos en América Latina durante los '70 y '80

cambiaron el patrón epidemiológico clásico de la enfermedad de Chagas convirtiéndose en una infección urbana que puede ser transmitida por transfusión sanguínea. La proporción de sangre infectada en los bancos de sangre en algunas ciudades del continente varían entre el 3% al 53% indicando que la prevalencia en la sangre infectada con *T. cruzi* es mayor que la registrada para la infección con HIV y hepatitis B y C. De acuerdo con el informe de desarrollo humano de la UNDP, el promedio del producto bruto anual per-cápita en América Latina es de 2966 U\$. Así, la pérdida económica causada al continente debido a la mortalidad o incapacidad producida por esta enfermedad a la franja de la población correspondiente a los jóvenes adultos (la clase económicamente más activa) alcanzaría la cantidad de 8156 U\$ millones que equivale al 2,5% de la deuda externa total del continente en 1995 [Informe de la Organización Mundial de la Salud: www.who.int/ctd/chagas/disease.htm].

1.2 El ciclo de vida

El insecto vector, la vinchuca, se infecta al alimentarse de sangre contaminada con parásitos proveniente de humanos o de animales. El parásito se multiplica como epimastigote por fisión binaria en el intestino del insecto y luego se diferencia al estadio tripomastigote metacíclico, la forma infectiva para el hospedador mamífero. Luego, durante una ingesta de sangre a partir de un segundo hospedador vertebrado, los tripomastigotes metacíclicos son liberados en las heces del insecto cerca del sitio de la picadura. El hospedador entonces se infecta por la entrada del parásito a través de lesiones en la piel, de membranas mucosas o de conjuntivas. Una vez dentro, los tripomastigotes invaden las células del hospedador donde se diferencian a la forma replicativa intracelular amastigote. Los amastigotes se multiplican y diferencian a la forma tripomastigote los cuales son liberados al torrente sanguíneo como tripomastigotes circulantes. Estos tripomastigotes son incapaces de dividirse (a diferencia de los tripanosomas africanos). La replicación sólo se

produce cuando el parásito entra a otra célula o es ingerido por otro vector diferenciándose nuevamente a la forma epimastigote [Tyler, K.M. et. al., 2001].

Trypanosoma cruzi también puede ser transmitido por transfusión de sangre, transplacentariamente y por accidentes de laboratorio [Mazza S, et. al. 1936; Moraes-Souza H, 1999; Morel C, 1999; Pinto Dias JC, 1992; Brener Z, 1992].

1.3 Diagnóstico de la enfermedad

Actualmente se utilizan tres ensayos distintos para diagnosticar la enfermedad. Como criterio se considera que una persona esta infectada cuando al menos dos de los tres ensayos siguientes dan positivos:

- Hemoaglutinación indirecta
- Inmunofluorescencia
- Detección de anticuerpos por ELISA.

Alternativamente se pueden utilizar la técnica de PCR, xenodiagnóstico o visualización directa de parásitos en sangre al microscopio óptico [Schijman A, 2000].

1.4 Tratamiento

La medicación para la enfermedad de Chagas suele ser efectiva cuando es suministrada durante la fase aguda de la infección. Las drogas disponibles para el tratamiento son benznidazol y nifurtimox.

Para el período indeterminado o la fase crónica de la enfermedad no hay ningún medicamento probado que haya sido efectivo. El tratamiento en estos casos involucra manejar los síntomas asociados con la enfermedad. Sin embargo, estudios recientes han demostrado que pacientes crónicos o indeterminados tratados con benznidazol disminuyen su título de anticuerpos hasta hacerse negativos [Sosa Estani S, 1999]. Actualmente la

Organización Mundial de la Salud está recomendando la utilización de Benznidazol para el tratamiento de pacientes crónicos o indeterminados.

Desde 1994, el Programa de Control de Chagas en Argentina incluye el subprograma "Detección y Tratamiento de Chicos Infectados con *T. cruzi* con hasta 14 años de edad" el cual monitorea chicos que viven en casas con control de la población de triatomíneos. Esta es una condición necesaria para la administración del tratamiento específico. Actualmente el tratamiento en Argentina se recomienda para (a) todos los pacientes que se encuentran en la etapa aguda; (b) chicos y gente joven en la fase indeterminada; (c) adultos en la fase indeterminada o con lesiones cardíacas incipientes; (d) donantes o receptores de transplantes [Sosa Estani S, 1999].

1.5 Clasificación de las cepas de *T. cruzi*

Las cepas de *T. cruzi* son poblaciones multiclonales complejas que difieren tanto en sus características biológicas y genéticas así como en su comportamiento en el hospedador mamífero. Estas cepas representan subespecies de *T. cruzi* basadas en características intrínsecas como la variación antigénica, susceptibilidad a la quimioterapia, patrones isoenzimáticos y patrones genómicos de ADNk. Estudios de la relación hospedador-parásito han mostrado diferencias en el determinismo de las lesiones tisulares producidas dependiendo del tropismo, la virulencia y la patogenicidad de las cepas de *T. cruzi*. Andrade y colaboradores propusieron en 1970 agrupar las cepas de *T. cruzi* en 3 grupos bien definidos o biodemas denominados tipo I, II y III basados en estudios intensivos de las características biológicas y patogénicas de cada cepa. Análisis de isoenzimas (zimodema) de cepas representantes de cada uno de estos tres biodemas propuestos permitieron discriminar entre los tres tipos de cepas y dieron una buena correlación con los datos biológicos [Tibayrenc M, 1988; Andrade V, 1983]. De esta manera, el biodema de tipo

II corresponde al zimodema 2, el biodema III al zimodema 1 y el biodema I al zimodema 2b o 3.

Las características biológicas y bioquímicas de los distintos tipos de cepas de *T. cruzi* se correlacionan con distintas lesiones tisulares como fue observado generando infecciones agudas en ratón utilizando distintas cepas de parásitos [Andrade SG, 1985; Andrade LO, 1999]. En la fase crónica de la enfermedad también se ha observado una clara diferencia en el tipo de lesiones histopatológicas en función del tipo biológico de cepa. Las cepas de tipo III (zimodema 1) eran las más patógenas produciendo lesiones intensas en músculo esquelético y cardíaco, observándose tejidos parasitados incluso en estadios tardíos de la infección. Las cepas de tipo I y II también producían lesiones cardíacas durante la fase crónica de la enfermedad en ratones [Andrade, S.G. 1990]. Estos dos últimos tipos producen además daños en las neuronas del plexo mioentérico.

El zimodema 2 (biodema tipo II) ha sido identificado por Lauria-Pires y Texeira en 1996 en un stock de *T. cruzi* de un paciente con la forma digestiva de la enfermedad de Chagas sugiriendo la participación de este zimodema en la patogénesis de megasíndromes de la enfermedad de Chagas [Lauria-Pires, 1996].

También se ha encontrado correlación entre el tipo de cepa y la resistencia a la quimioterapia con Benznidazol o Nifurtimox [Revollo S, 1998].

En 1988, Tibayrenc y Ayala realizaron un análisis isoenzimático tomando 15 genes distintos. Así, analizando 121 cepas de *T. cruzi*, encontraron una mayor heterogeneidad que aquella descrita por Miles en 1980, agrupando las 121 cepas en 43 zimodemas distintos. Basándose en esto, Tibayrenc y Ayala propusieron un modelo de la estructura poblacional de las cepas de *T. cruzi* basados en la existencia de líneas clonales, sin interacciones sexuales, separadas entre sí por un largo proceso evolutivo. Esto sugirió la posible correlación entre la clasificación bioquímica y las propiedades biológicas de *T. cruzi*. De acuerdo con esta teoría, las cepas de *T. cruzi* son clones naturales y la selección natural, favoreciendo sólo ciertas

combinaciones genéticas, determina la existencia de un número limitado de zimodemas, representados por tres clones mayoritarios (zimodemas 1, 2 y 3).

Debido a que el análisis de estos marcadores genómicos con alta tasa evolutiva no permite la agrupación de las distintas cepas en grupos definidos, en 1993 Souto y Zingales propusieron la utilización de la clasificación de cepas por amplificación por PCR del dominio variable D7 del gen que codifica el ARNr 24Sα. Mediante este método, pudieron agrupar 16 stocks de *T. cruzi* en dos grupos [Zingales B, 1999].

Más tarde, Souto y colaboradores describieron una segunda región variable correspondiente a la secuencia espaciadora del gen codificante para el mini-exón que también mostraba dimorfismo entre cepas de *T. cruzi* por PCR [Zingales B, 1998].

Por amplificación de ambos marcadores fue posible agrupar las distintas cepas en uno de los siguientes tres grupos:

grupo	Marcador ADNr	Marcador Mini-exón
1	125 pb	300 pb
2	110 pb	350 pb
1/2	110 pb y 125 pb	300 pb

Tabla 1.1: Tamaño de los productos de amplificación por PCR de la región variable del locus ribosomal y del mini-exón.

Análisis por RAPD mostraron variabilidad entre aislamientos individuales, sin embargo estudios del árbol filogenético indicó la presencia de dos ramas principales o linajes, una de las cuales correlacionaba precisamente con aislamientos del grupo 2 (linaje 2) mientras que la otra correlacionaba con aislamientos de los grupos 1 y 1/2 (linaje 1). Las cepas correspondientes al zimodema 2 equivalen al linaje 1 mientras que las cepas del zimodema 1 corresponden al linaje 2. Con respecto al zimodema 3 (2b), estudios de la secuencia espaciadora del mini-exón determinó que el mismo corresponde a un sublinaje del linaje 2 [Fernández et al 1998a]. Este agrupamiento bipolar ha sido confirmado posteriormente por análisis

de *riboprinting* [Stothard J, 1998], secuencia y actividad del promotor ribosomal y mini-exón [Floeter-Winter LM, 1997; Nunes LR, 1997a y 1997b), marcadores microsatélite [Olivera RP, 1998] y la estructura del espaciador del mini-exón [Fernandes O, 1999].

El linaje 1 de *T. cruzi* presenta una fuerte asociación con el ciclo doméstico de la enfermedad mientras que el linaje 2 parece estar asociado al ciclo selvático [Fernandes O, 1999; Zingales B, 1998]. Es más, el análisis de 68 stocks de *T. cruzi* aislados de mamíferos y triatomíneos en el estado de Río de Janeiro, Brasil, sugieren una mejor adaptación del linaje 1 a los primates mientras que el linaje 2 parece adaptarse mejor a los marsupiales [Fernandes O, 1999].

Criterio de clasificación			
Características biológicas y patogénicas (Andrade et al 1970)	Biodema tipo I	Biodema tipo II	Biodema tipo III
Isoenzimas (Miles et al 1980)	Zimodema 2b o Z3	Zimodema Z2	Zimodema Z1
PCR del dominio D7 del gen ribosomal 21Sa y del espaciador del mini-exón (Souto et al 1996)	Grupo 2	Grupo 1 y 1/2*	Grupo 2
Análisis filogenético por UPGMA a partir de ensayos de RAPD (Souto et al 1996)	Linaje 2	Linaje 1	Linaje 2

Tabla 1.2: Clasificación de las cepas de *T. cruzi*. * El grupo 1/2 aparece en ciertos estudios filogenéticos asociado al linaje 2, dependiendo de los parámetros utilizados.

1.6 Variabilidad cariotípica en *T. cruzi*

Trypanosoma cruzi tiene un genoma muy plástico. Se pueden observar polimorfismos en el tamaño de los cromosomas entre diferentes cepas así como entre clones originados a partir de la misma cepa. De esta manera, el tamaño del genoma puede variar enormemente dependiendo de la cepa estudiada. El contenido de ADN total estimado varía desde 125 a 280 fg/célula para varias cepas incluyendo el ADN del kinetoplasto (ADNk) que representa alrededor de un 16% a 30% del ADN total. Sin considerar el

ADNk, el genoma de *T. cruzi* es de un tamaño aproximado de 80-160 Mpb [Henriksson J, 1996].

Durante la mitosis, la cromatina de *T. cruzi* se encuentra muy poco condensada y por lo tanto deben utilizarse técnicas alternativas que permitan visualizar sus cromosomas. Es por ello que para estudiar y caracterizar el cariotipo de *T. cruzi* se utiliza la técnica de electroforesis en campos pulsados (PFGE). Utilizando condiciones de corrida estándar con varias cepas de *T. cruzi* se obtiene un patrón de aproximadamente 20 bandas cromosómicas que van desde las 450 kpb hasta los 3,5 Mpb [Cano MI, 1995]. En algunos aislamientos se pudieron detectar cromosomas menores con un tamaño estimado de 50 kpb a 200 kpb. Las bandas más grandes varían entre 2,5 a 4 Mpb dependiendo de la cepa. Estos tamaños son similares a los encontrados en otros kinetoplástidos como *T. brucei*, *Leishmania sp* y *Trypanosoma rangeli*. Las bandas cromosómicas separadas por PFGE y teñidas con bromuro de etidio presentan diferentes intensidades reflejando posiblemente la presencia de múltiples cromosomas en alguna de las bandas. Esto sugiere que el número total de cromosomas es considerablemente mayor a las 20 bandas cromosómicas observadas inicialmente. Utilizando condiciones de corrida de PFGE optimizadas para resolver diferentes rangos de tamaño se pudo establecer que cada una de las 20 bandas cromosómicas estaban compuestas por más de un cromosoma. Actualmente, se estima que el número total de cromosomas en *T. cruzi* es de 80 (o 40 pares de cromosomas homólogos), considerando un genoma de 100 Mpb y un tamaño cromosómico promedio de 1,2 Mpb [Henriksson J, 1996].

Existe un gran polimorfismo en el cariotipo entre diferentes cepas de *T. cruzi*. Sin embargo, el cariotipo molecular dentro de cada cepa es muy estable y representativo de todos los estadios del parásito. La única excepción detectada hasta el momento ha sido rearrreglos registrados en el cromosoma que porta los genes que codifican el mini-exón. Estos rearrreglos provocan cambios en el número de copias del gen del mini-exón.

Al igual que en otros tripanosomátidos, en *T. cruzi* se ha detectado un elemento extracromosómico denominado LED que contiene varias copias del gen del mini-exón y genes ribosomales. Esta molécula extracromosómica podría estar involucrada en el rearrreglo de los cromosomas que portan los genes del mini-exón.

Se ha encontrado una cierta correlación entre el patrón cariotípico y los zimodemas. Cepas pertenecientes a uno de los 43 zimodemas descritos por Tibayrenc, muestran patrones de hibridación semejantes con distintos marcadores genómicos [Henriksson J, 1993]. Es más, cepas dentro de los zimodemas clásicos Z1 y Z2 descritos por Miller muestran también algunos patrones similares de hibridación [Henriksson J, 1996].

Una diferencia particular entre las cepas de los zimodemas Z1 y Z2, es que los marcadores suelen hibridar con cromosomas más grandes en el caso de las cepas de Z2 con respecto a las pertenecientes a Z1. Este incremento generalizado en el tamaño cromosómico de los miembros del zimodema 2, puede reflejar un evento de especiación y apoya la relación distante que existe entre los miembros de ambos zimodemas [Henriksson J, 1996].

Un estudio realizado con 5 grupos de marcadores genómicos ligados, cada uno formado por 2 a 4 marcadores, permitió determinar que, salvo excepciones, la estructura cromosómica se encuentra conservada en la mayoría de los cromosomas. Esto es así, incluso entre cepas pertenecientes a distintos zimodemas, a pesar del gran polimorfismo observado en los cromosomas [Henriksson J, 1996].

Se ha observado que el ADN repetitivo está involucrado en la aparición de polimorfismo en los cromosomas de varios parásitos protozoarios. En *T. cruzi* se han descrito un gran número de secuencias repetidas, algunas de las cuales representan una proporción importante del ADN genómico total. Ejemplos de estas últimas, son el ADN satélite de 196 pb de largo y la secuencia E13 que comprenden el 9% y el 7% del genoma respectivamente. Estudios realizados comparando cepas con distinto contenido de ADN indicaron una correlación entre el incremento del

tamaño cromosómico y el contenido de secuencias repetitivas tanto codificantes (como el gen codificante para la histona H1) como no codificantes (ADN satélite y otras secuencias repetidas). Es posible que estas amplificaciones de secuencias repetidas contribuyan significativamente al incremento en el tamaño cromosómico en las cepas pertenecientes al zimodema Z2 [Henriksson J, 1996].

1.7 Ploidía

En la actualidad no está claro cual es la ploidía de *T. cruzi*. Varios estudios apoyan una constitución cromosómica diploide mientras que otros sugieren aneuploidía. Análisis por RFLP y PFGE utilizando distintos marcadores moleculares, dan en su mayoría un patrón de una o dos bandas. La conclusión más probable es que las dos bandas correspondan a dos alelos polimórficos localizados en dos cromosomas homólogos separados y la banda única refleje la ausencia de polimorfismo genético o cromosómico favoreciendo entonces la hipótesis de diploidía. Sin embargo, estos resultados también pueden tener otra explicación, como por ejemplo que *T. cruzi* es una célula haploide con varios genes o cromosomas duplicados [Henriksson J, 1996].

La gran proporción de bandas dobles obtenidas en estos estudios indica que al menos la mayoría de los cromosomas de *T. cruzi* son disómicos, pero hasta que todos los cromosomas no hayan sido identificados con varios marcadores el interrogante acerca de la ploidía permanecerá abierto.

1.8 Organización genómica

El genoma de *T. cruzi* tiene un contenido de GC del 51%, menor al 63% encontrado en *Leishmania*. También posee una alta representación de repeticiones de di-trinucleótidos de A y T.

El número estimado de genes en *T. cruzi* es entre 5000 - 10000, con una densidad de 1 gen cada 3,5 a 4 kpb, considerando que el tamaño haploide

del genoma de la cepa CL Brener de *T. cruzi* es de aproximadamente 45 Mpb [Porcel B, 2000]. Dado que una parte considerable del genoma de *T. cruzi* esta compuesto por grandes familias génicas así como por secuencias repetidas, este número de genes posiblemente esté sobreestimado.

En *T. cruzi* los genes codificantes para proteínas no poseen intrones de clase II y se encuentran generalmente asociados formando densas agrupaciones denominadas unidades transcripcionales. Estas agrupaciones suelen estar constituidas por genes no relacionados, aunque pueden encontrarse unidades transcripcionales compuestas por varias repeticiones de un mismo gen formando grandes familias multigénicas, como es el caso de los genes codificantes para la histona H2A [Vanhamme L, 1995].

En *T. cruzi* los genes suelen estar separados por regiones cortas de entre 150 pb a 500 pb de longitud denominadas regiones intergénicas. Las unidades transcripcionales son transcritas por la ARN polimerasa II como largos ARN policistrónicos inmaduros, aunque hasta el momento no se ha descrito la presencia de promotores específicos para esta polimerasa. Los genes pertenecientes a una misma unidad policistrónica pueden mostrar diferentes niveles de expresión, sugiriendo que el control de la expresión genética opera principalmente a nivel post-transcripcional [Vanhamme L, 1995].

La transcripción policistrónica emplea un mecanismo de corte y empalme para procesar los transcriptos primarios en ARNm maduros monocistrónicos, adicionando un m⁷G-CAP en el extremo 5' y una cola de poliAes en el extremo 3' [Vanhamme L, 1995].

El proceso de "*capping*" es llevado a cabo mediante un mecanismo denominado *trans*-splicing. Los complejos ribonucleoproteicos necesarios para la reacción son similares a los involucrados en el proceso de *cis*-splicing de eucariotas superiores, a excepción del U1 snRNP el cual no ha sido encontrado hasta el momento. Esta maquinaria adiciona en el extremo 5' del sitio de corte del transcripto primario un oligoribonucleótido

común a todos los ARNm denominado "*spliced leader*" o SL (de 39 nt de largo), el cual lleva un m⁷G-CAP en su extremo 5'. El SL proviene del procesamiento de una molécula de ARN donante (de 110 nt de largo) la cual es codificada por el gen del mini-exón que se encuentra formando grandes agrupaciones en tándem [Vanhamme L, 1995].

Las regiones intergénicas contienen las señales necesarias para que se produzca el *trans*-splicing. Ellas son un tracto de polipirimidinas (pPY) que puede variar en su longitud y tamaño y un dinucleótido AG, aceptor del SL, que se encuentra localizado a unas 30-60 bases río abajo del pPY y hacia arriba del codón de iniciación del gen. Tanto la región de pPY como el AG aceptor conforman el sitio 3'ss ("*splicing site*"). También se han descrito procesos de *trans*-splicing alternativos en donde se utilizan diferentes dinucleótidos AG aceptores presentes entre el tracto de pPY y el ORF localizado río abajo, dando como resultado ARNm con extremos 5' UTR de extensión variable. En estos casos, la población de ARNm que utiliza el AG más cercano al tracto de pPY suele ser la preponderante [Hummel H, 2000].

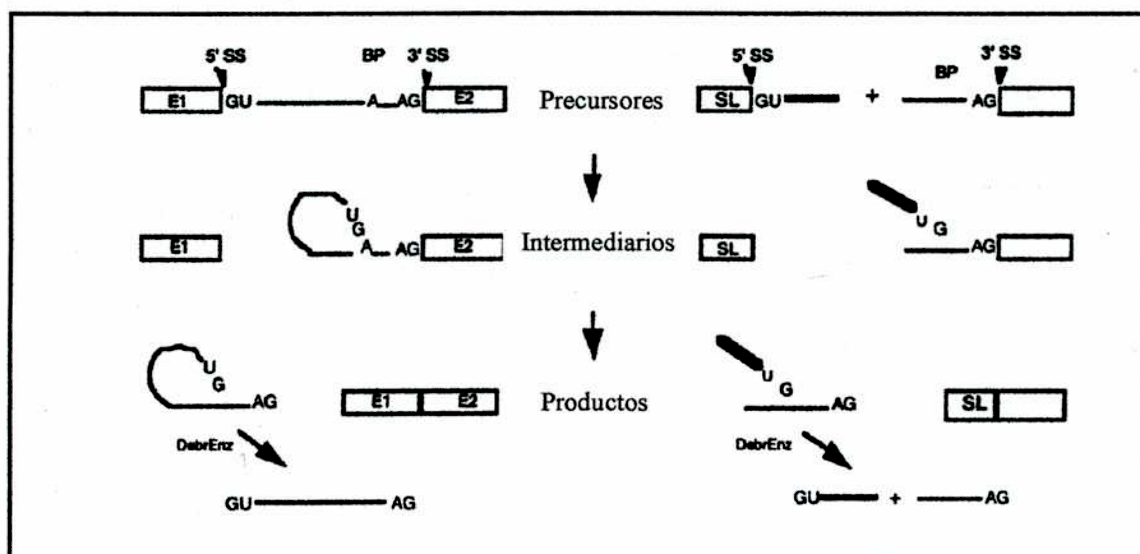


Figura 1.1: Comparación entre el *cis*-splicing y el *trans*-splicing. A la izquierda se detalla el proceso de *cis*-splicing entre dos exones dando como producto el empalmado de exones y lazo de ARN correspondiente al intrón. A la derecha se detalla el proceso de *trans*-splicing que da como resultado la adición del SL al ARNm y como subproducto la estructura en Y correspondiente a la región intergénica y el "intrón" (extremo 3') del ARN del SL.

Con respecto al sitio de ramificación o "*branch site*" utilizado durante el *trans*-splicing, no se ha identificado hasta el momento una secuencia consenso análoga a la de eucariotas superiores, aunque se sabe que es utilizado un nucleótido de adenina, al igual que en el *cis*-splicing [Pastel E, 1989].

Por otro lado, el proceso de poliadenilación no ha sido completamente caracterizado. A pesar que no se ha encontrado una secuencia consenso como en eucariotas superiores, se sabe que este proceso está acoplado al proceso de *trans*-splicing (Fig 1.2). La maquinaria de poliadenilación se posa sobre el tracto de pPY y censa cual es el AG a utilizar como aceptor del SL para luego cortar y agregar el poliA 100 a 150 nt hacia arriba del AG aceptor. El agregado de la cola de poliA siempre se produce a continuación de una adenina [Vasella E, 1994]. A diferencia de la poliadenilación de los ARNm en eucariotas superiores, en los cuales existe un único sitio de inserción del poliA, en tripanosomas la poliadenilación no siempre se da en el mismo lugar, lo cual genera una población de mensajeros maduros que se diferencian en el largo de la región 3'UTR.

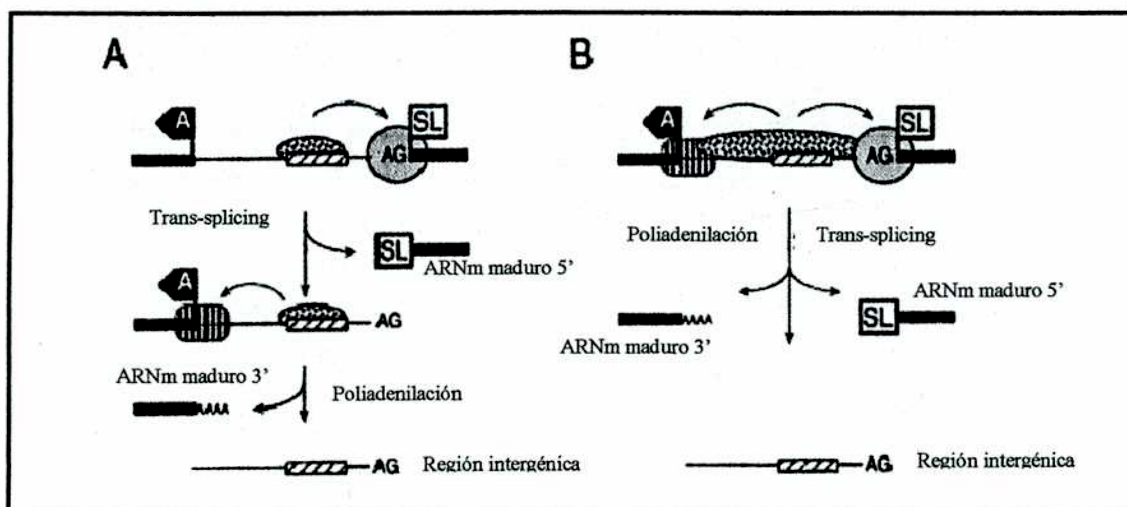


Figura 1.2: Modelos propuestos para el acoplamiento del TS y la poliadenilación. (A) Se propone que primero se produce el TS del gen 3' y luego ocurre la poliadenilación del gen hacia arriba. (B) Ambos procesos ocurren simultáneamente.

En resumen, el tracto de pPY y el AG aceptor de las regiones intergénicas participan y regulan ambos procesos de maduración del ARNm. A pesar de ser procesos acoplados, esto no significa que no puedan producirse independientemente [Vasella E, 1994]. Estudios realizados con el gen que codifica para la proteína hsp70 en *T. brucei* describen la presencia de algunos transcriptos poliadenilados sin SL [Huang J, 1991]. El fenómeno opuesto también fue descrito para el gen de la α -tubulina, donde alrededor del 50% de los transcriptos que contienen SL no están poliadenilados [Vanhamme L, 1995].

Más allá de ello, estos dos eventos de procesamiento parecen ocurrir muy rápidamente después de la síntesis del ARN y probablemente sean procesos co-transcripcionales.

La secuenciación completa de un contig que abarca ~93 kpb del cromosoma III del clon CL Brener de *T. cruzi* permitió dilucidar como es la organización genómica en este parásito. En un primer análisis de la secuencia se identificaron 151 ORFs mayores a 300 pb, 38 de los cuales fueron identificados mediante el programa de detección de genes humanos GRAIL y la expresión de otros 4 ORFs fue confirmada por identificación de ADNc homólogos. Los genes identificados se organizan formando dos unidades transcripcionales orientadas en sentido contrario. A partir de la base 34000 del contig, los ORFs detectados por GRAIL se encuentran en la hebra directa mientras que río arriba de esta posición, se localizan en la hebra inversa. Esta disposición sugiere que los genes ubicados delante de la base 34000 son transcriptos sobre la hebra inversa, mientras que aquellos localizados después de esta posición, lo hacen sobre la otra hebra [Andersson B, 1998]. Así, la región localizada entre las dos unidades transcripcionales podría contener una región promotora bidireccional o dos regiones promotoras separadas, una para cada unidad transcripcional [Andersson B, 1998].

En la zona ubicada entre las dos unidades transcripcionales, se observan 3 ORFs por tres secuencias repetidas: un elemento VIPER y dos

secuencias que presentan homología con los elementos repetidos TRS1.6 o INGI de *T. brucei*. Llama la atención el hecho que la región donde se produce un cambio en la orientación de los genes sea rica en elementos repetidos. Esto podría estar dar indicio acerca de uno de los mecanismos responsables del alto grado de polimorfismo observado en los cromosomas de *T. cruzi*. Si los cromosomas de este parásito están compuestos por largas unidades transcripcionales dentro de las cuales se encuentran intercalados elementos repetidos, estos podrían proporcionar la homología suficiente como para que se produzca una recombinación homóloga entre dos cromosomas no relacionados.

Este tipo de organización genómica también ha sido descrita en *Leishmania major* [Myler P, 1999]. La secuenciación completa del cromosoma 1 de 269 kpb permitió identificar 79 genes. Los mismos están organizados formando dos unidades transcripcionales, una compuesta por 50 genes en la hebra directa y la otra localizada en la cadena complementaria conteniendo los genes restantes. Las dos unidades transcripcionales están separadas por sólo 1,6 kpb y son transcritas en direcciones opuestas desde esta región de 1600 pb hacia los telómeros.

Datos obtenidos de la secuenciación parcial del cromosoma 3 de *L. major* [Myler P, 1999] indican que también este cromosoma esta compuesto por dos unidades transcripcionales. Sin embargo, al contrario que el cromosoma 1, el sentido de transcripción es desde los telómeros hacia el centro del cromosoma. Basadas en esto, varias hipótesis pueden explicar la regulación de la transcripción en el cromosoma 1 de *Leishmania*: (a) Delante de cada unidad transcripcional se encuentra una región promotora para la polimerasa II donde comienza la transcripción, la cual continua hacia los telómeros; (b) La transcripción puede comenzar en varios sitios diferentes a lo largo del cromosoma; y (c) La región que separa las dos unidades transcripcionales pueden contener un origen de replicación y/o funcionar como un centrómero.

1.9 Análisis de la distribución de nucleótidos como herramienta para el estudio de genomas

Recientemente, analizando genomas bacterianos se ha observado una correlación entre la dirección de la replicación y de la transcripción, con un incremento en el contenido de purinas en la cadena líder durante la replicación del ADN [Freeman J, 1998; Grigoriev A, 1998]. De esta manera, cuando se grafica el exceso de purinas (*EP*) en función de la posición en el genoma, se obtiene una curva en forma de "V" con un mínimo que coincide con el origen de replicación del ADN bacteriano y un máximo correspondiente al terminador de la replicación [Freeman J, 1998]. Resultados similares también han sido obtenidos con otro análisis estadístico denominado *GC skew acumulativo*, que refleja la variación en la proporción $(G-C)/(G+C)$ de ventanas sucesivas de pequeño tamaño que cubren todo un cromosoma. El origen de replicación y el terminador suelen coincidir con la zona donde se obtiene un *GC skew* mínimo o máximo respectivamente [Freeman J, 1998; Grigoriev A, 1998].

Se han propuesto dos teorías para explicar la distribución asimétrica de nucleótidos: (a) La fuerte correlación entre el exceso de purinas y la dirección de la replicación sugiere que, durante la duplicación del ADN, se producen errores o mutaciones que llevan a un incremento en el número de purinas en la cadena líder. Por ejemplo, se ha demostrado que la frecuencia de deaminación de citosinas aumenta 100 veces cuando el ADN está como simple cadena, causando un incremento en la proporción de G y T en esa hebra [Grigoriev A, 1998], y (b) Los mecanismos de reparación acoplados a la transcripción eliminarían la mayor parte de los daños causados al ADN en la cadena molde (citosinas deaminadas y dímeros de timidinas) produciendo como resultado un incremento en el contenido de purinas en la hebra codificante. Dado que los genes presentan una marcada tendencia a ser transcritos en la dirección de la replicación del ADN, esto conduciría a una acumulación de purinas en la cadena líder [Francino MP, 1997].

Un estudio de la distribución de nucleótidos realizado en el cromosoma 1 de *Leishmania major* demostró que, a diferencia de lo observado en bacterias, el *EP* disminuye en el sentido de la transcripción al igual que el *GC skew acumulativo* [McDonagh P, 2000]]. Se ha propuesto que esta asimetría en la distribución de nucleótidos podría deberse a que las dos hebras de ADN se transcriben completamente [McDonagh P, 2000]. El único factor que contribuiría a esta asimetría sería la replicación del ADN, favoreciendo la acumulación de pirimidinas en la hebra líder que coincide con la cadena codificante [McDonagh P, 2000].

1.10 Conservación de la organización genómica entre distintas especies de kinetoplástidos

Varios estudios han indicado recientemente la existencia de sintenia – regiones conservadas de ADN entre organismos de distinto género o especie - entre parásitos de la familia de los kinetoplástidos. Sintenia inter-especie ha sido documentada para *T. cruzi*/*T. brucei* [Redpath M, 1998, resultados de la tesis], y sintenia inter-género para *T. cruzi*/ *T. brucei*/ *Trypanosoma congolense*/ *Trypanosoma vivax*/ *L. donovani* [Bringaud F, 1998]. Debido que estos organismos, relacionados evolutivamente, tienen ciclos de vida diferentes y causan enfermedades disímiles en humanos, resulta lógico esperar que los genes responsables de realizar las funciones celulares básicas (genes “housekeeping”) mantengan una organización genómica similar. Por otro lado, es probable que las características fenotípicas y de comportamiento infectivo de cada especie esté relacionado con grupos de genes y secuencias de ADN genómico específicos, como se ha descrito para bacterias [Groisman EA, 1996].

1.11 Promotores

Una particularidad de *T. cruzi* y de los kinetoplástidos en general es la ausencia aparente de promotores para la ARN polimerasa II que dirijan la

transcripción de los genes codificantes de proteínas. La transcripción en estos organismos sin embargo es hebra-específica y llevada a cabo por ARN polimerasas que presentan sensibilidades al tratamiento con alfa-amanitina similares a las ARN polimerasas I, II y III de mamíferos [Donelson J, 1999].

Como era de esperar, han sido encontrados promotores para la ARN polimerasa I, resistente a alfa-amanitina, delante de los genes codificantes para el ARNr. Sin embargo, este tipo de promotores también han sido encontrados dirigiendo la transcripción de los genes codificantes para las glicoproteínas variables de superficie (VSG) y prociclinas en *T. brucei* [Vanhamme L, 1995].

En forma similar, una actividad ARN polimerasa III, con sensibilidad intermedia al tratamiento con alfa-amanitina, transcribe los genes codificantes para los pequeños ARN, típicamente reconocidos por la ARN polimerasa III en otros eucariontes [Gunzl A, 1995].

Por último, se ha observado que la mayoría de los genes codificantes para proteínas, son transcritos con una actividad polimerasa sensible al tratamiento con alfa-amanitina, típico de la transcripción por ARN polimerasa II [Donelson J, 1999]. Sin embargo, hasta el momento no se ha podido encontrar este tipo de promotores delante o entre los genes que componen las unidades transcripcionales. Es más, en ausencia de regiones promotoras, ciertos plásmidos derivados del vector pBR322 de *Escherichia coli* pueden expresar genes reporteros en *T. cruzi* y otros kinetoplástidos [Kelly J, 1992]. Esto sugiere que en los kinetoplástidos no existirían promotores definidos para polimerasa II sino que cualquier secuencia de ADN es capaz de iniciar la transcripción con una cierta probabilidad. Esta hipótesis llamada "*landing pad*" por Beverly y colaboradores [Resumen No. 38, Molecular Parasitology Meeting, Woods Hole, U.S.A., 1996] propone además que cuanto más larga sea la molécula de ADN, mayor será la probabilidad de poder iniciar la transcripción.

Recientemente se han encontrado ciertas excepciones a esta regla. Una de ellas son los genes que codifican para el ARN del mini-exón, los cuales presentan una región con actividad promotora, sensible a alfa-amanitina, río arriba de cada región codificante [Gilinger G, 2001]. Posibles regiones promotoras también han sido descritas para los genes hsp70 y actina. Sin embargo, al clonar estas regiones delante del gen reportero luciferasa, no se observaron incrementos significativos de la actividad [Häusler T, 1996].

1.12 Regulación de la expresión genética

Como se mencionó anteriormente, los genes codificantes para proteínas en *T. cruzi* están organizados en largas unidades transcripcionales policistrónicas. En tripanosomas no está claro todavía como es la maquinaria involucrada en dirigir y regular la transcripción de estos genes y a diferencia de lo que ocurre en eucariotas superiores, aun no se han encontrado promotores para polimerasa II. Debido al tipo de organización de los genes en *T. cruzi*, una regulación de la expresión genética al nivel de la transcripción implicaría que los genes pertenecientes a una misma unidad policistrónica presentarían una misma tasa de transcripción. Sin embargo, se ha observado que estos genes presentan niveles variables de expresión genética en un determinado estadio. Por esto se considera que la regulación de la expresión genética en tripanosomátidos ocurre post-transcripcionalmente. Se ha observado que el control transcripcional de los genes se produce a nivel de amplificación génica, *trans*-splicing, poliadenilación, estabilidad del ARNm, regulación de la tasa de traducción y estabilidad de las proteínas [Vanhamme L, 1995; Belli S, 2000].

También ha sido sugerido que en tripanosomas puede haber mecanismos epigenéticos de control de la expresión genética. Se han observado variaciones en los niveles de condensación de la cromatina durante los diferentes estadios de estos parásitos acompañada por cambios en los niveles y tipos de histonas presentes. En tripanosomas, la concentración

intracelular de las histonas centrales (H2A, H2B, H3 y H4) es más alto en el estadio tripomastigote no replicativo que en la forma replicativa epimastigote. El nivel de histona H1 aumenta en el estadio tripomastigote pudiendo ayudar con la estabilización de la cromatina cuando el parásito es sometido a mayores temperaturas en el huésped mamífero. Alternativamente, la histona H1 incrementaría el grado de condensación de la cromatina, silenciando los genes que no son requeridos por el parásito durante la infección [Belli S, 2000].

1.13 Organización telomérica

Los telómeros de *T. cruzi* están compuestos por repeticiones en tándem de la secuencia GGGTTA con un tamaño promedio que varía con la cepa. En las regiones subteloméricas se encuentran secuencias asociadas con el gen gp85/sialidasa, el elemento repetido SIRE, el SAS SZ23, y también el retrotransposón L1Tc [Chiurillo MA, 1999; Lúcio H, 1999].

Un estudio de los telómeros mostró una organización diferente en función de la cepa de *T. cruzi* analizada. En un grupo de cepas, el tamaño de los telómeros era relativamente corto y homogéneo (0,5 a 1,5 kb) mientras que en otro grupo, el largo de las repeticiones era heterogéneo, formando telómeros más grandes (1,0 a >10,0 kb). Estos dos grupos se ajustan bastante bien con la clasificación de las cepas de *T. cruzi* basándose en los genes del ARNr, el espaciador del mini-exón e isoenzimas, sugiriendo que el control diferencial del largo telomérico y su organización es un evento que apareció temprano en la historia evolutiva de *T. cruzi* [Lúcio H, 1999].

Con respecto a la organización de la cromatina telomérica, se ha observado que sólo parte de esta región se encuentra asociada a histonas formando nucleosomas mientras que otras regiones no [Lúcio H, 1999].

1.14 El Proyecto Genoma de *Trypanosoma cruzi*

La necesidad de comprender los mecanismos genéticos que *Trypanosoma cruzi* pone en juego para colonizar a un individuo y de encontrar una

estrategia para eliminar la enfermedad de Chagas establecieron las bases para el lanzamiento del Proyecto Genoma de *Trypanosoma cruzi*, cuyo fin es la secuenciación total de su genoma. *T. cruzi* posee características genéticas únicas que impiden el estudio genético clásico de sus propiedades. Entre ellas podemos citar la gran variedad de cepas, acompañada por variaciones importantes en el tamaño de los genomas respectivos, la ausencia de condensación cromosómica durante la metafase y una pobre definición cariotípica con la consecuente deficiencia en la definición de los marcadores cromosomales. Es por esto que se decidió elegir como cepa de referencia el clon CL Brener para el proyecto genoma de *T. cruzi* (reuniones del CYTED 1994, OMS 1994 y reunión del proyecto genoma OMS-CYTED 1996).

A partir del lanzamiento del Proyecto Genoma de *T. cruzi* se ha determinado el cariotipo molecular de la cepa CL-Brener (tamaño del genoma nuclear 87 Mpb). Utilizando electroforesis en campos pulsados (PFGE) se revelaron 20 bandas cromosómicas: 12 bandas cromosómicas de tamaño mega, de 1 a 3.5 Mpb, y ocho cromosomas de menor tamaño, entre 1 y 0.45 Mpb (Cano MI, 1995). Las 20 bandas fueron reconocidas por sondas teloméricas, confirmando su identidad como cromosomas. La coloración con bromuro de etidio de las bandas cromosómicas indicaría la existencia de fenómenos de comigración de bandas o aneuploidía [Henriksson J, 1996].

1.15 Bibliotecas disponibles

Con el fin de incrementar el número de marcadores disponibles para el proyecto y de contar con las herramientas suficientes que permitan la construcción de los mapas físicos y el posterior secuenciamiento del genoma de *T. cruzi*, se construyeron varios tipos de bibliotecas genómicas y de ADNc. Debido a que existen regiones del genoma que son más fácilmente clonables que otras, según la técnica y el vector utilizados, es

importante contar con la mayor variedad de bibliotecas para asegurar una buena representación del genoma de *T. cruzi*.

Así, se prepararon bibliotecas de grandes fragmentos de ADN genómico en vectores YAC (cromosoma artificial de levadura) y BAC (cromosoma artificial de bacterias) con la asistencia técnica del CEPH (Paris, Francia). La biblioteca YAC equivale aproximadamente 10 equivalentes genómicos, con insertos promedio de 360 kpb y las bibliotecas BAC constan de 2000 y 9000 clones con insertos de 25 a 60 kpb, representando en su conjunto 5 equivalentes genómicos. Ambas bibliotecas fueron caracterizadas por PCR y rastreos con secuencias repetitivas o de copia única [Ferrari I, 1997].

Otras bibliotecas que se encuentran disponibles son [información en www.dbbm.fiocruz.br/TcruziDB/]:

- Biblioteca de ADNc normalizada y no normalizada de la cepa CL Brener del estadio epimastigotes de *T. cruzi* (Dr. Edson Rondinelli, UFRJ, Rio de Janeiro, Brasil).
- Biblioteca de ADNc de amastigotes (en construcción, Antonio Gonzales, Granada, España).
- Biblioteca de ADNc de tripomastigotes (en construcción, Antonio Gonzales, Granada, España).
- Biblioteca genómica de cósmidos de la cepa CL Brener de *T. cruzi* (Dr. Joerg Hoheisel, Heidelberg, Alemania).
- Biblioteca BAC de la cepa CL Brener de *T. cruzi* (Dr. Bjorn Andersson, Universidad de Upsala, Suecia).
- -Biblioteca BAC (Denis le Paslier) 2000 clones, tamaño promedio de inserto de 100 kpb.
- -Biblioteca genómica de la cepa CL Brener en el vector λ FIX II, tamaño promedio de inserto de 15 kpb (Dr. Edson Rondinelli, UFRJ, Rio de Janeiro, Brasil).

1.16 Información disponible en las bases de datos

En los últimos tiempos, y gracias al avance del proyecto genoma de *T. cruzi*, se han incrementado el número de secuencias enviadas a los bancos de datos. Mientras que hasta 1996 se habían enviado sólo 357 secuencias genómicas, durante los últimos cinco años ese número se ha incrementado notablemente alcanzando actualmente más de 12232 secuencias. El número de ESTs (Expressed Sequence Tags) ha alcanzado un valor de 10133 secuencias (datos obtenidos de la base de datos del NCBI). En conjunto, esto equivale aproximadamente a más de 8 Mpb secuenciadas.

También se han creado nuevas bases de datos que no sólo contienen datos genómicos de *T. cruzi* (secuencias genómicas, ESTs, etc) sino también otro tipo de información como aspectos del ciclo de vida y de su metabolismo. La red de laboratorios del proyecto genoma de *Trypanosoma cruzi* ha puesto a disposición diferentes bases de datos las cuales pueden consultarse por internet:

Iniciativa del genoma de <i>T. cruzi</i>	http://www.dbbm.fiocruz.br/TcruziDB/
BD AceDB de <i>T. cruzi</i> del Fiocruz (AceDB)	http://www.dbbm.fiocruz.br/TcruziDB/database.html
BD del TIGR (secuencias "shot gun" de BACs)	http://www.tigr.org/tdb/mdb/tcdb/
BD del proteoma de <i>T. cruzi</i>	http://www.ebi.ac.uk/parasites/TcGN/Proteome/proteome.html
BD de secuencias de <i>T. cruzi</i> traducidas en los 6 marcos de lectura	http://www.ebi.ac.uk/cgi-bin/parasites/sixframe.p
BD de GSS y EST de la Universidad de San Martín	http://www.iib.unsam.edu.ar/genomelab/tcruzi/index.html

Tabla 1.3: Dirección de internet de algunas de las bases de datos disponibles de la red de laboratorios del proyecto genoma de *T. cruzi*.

1.17 Marcadores ESTs (Expressed Sequence Tags)

La secuenciación a gran escala de marcadores EST constituye una de las estrategias utilizadas por la red de laboratorios del proyecto genoma de *T. cruzi* para descubrir genes nuevos. Hasta la fecha se han secuenciado y registrado en la base de datos GenBank alrededor de 10100 ESTs, que equivalen a más de 3 Mpb [datos del GenBank]. La gran mayoría de estos marcadores provienen de bibliotecas de ADNc del estadio epimastigote de este parásito.

Se estima que este número representa ~55% del número total de genes expresados en el estadio epimastigote y por lo menos un 30% del número total de genes únicos en *T. cruzi*.

Un estudio realizado por Porcel y colaboradores a partir de 5013 secuencias EST reveló 778 grupos (52% del total de secuencias) y 2382 singletes (48%). La redundancia de secuencias estimada fue de ~50% y 3000 transcriptos diferentes fueron identificados. El ADNc encontrado más frecuentemente era el que codificaba para la familia multigénica de las mucinas (2.1%) seguido por los mensajeros de las histonas H2A (1.4%) y H3 (1%). Del total de las secuencias analizadas, sólo el 33% presentaba homologías con alguna secuencia de la base de datos GenBank, a 20% de las cuales se le pudo asignar una posible función. El 14% (450) de las secuencias presentaba similitudes significativas con *Saccharomyces cerevisiae* o *Caenorhabditis elegans* y de éstas el 12% (365) eran compartidas por los 3 organismos, representadas mayormente por genes "housekeeping". El bajo porcentaje de similitudes obtenido entre *T. cruzi* y *S. cerevisiae* y *C. elegans* podría estar reflejando la divergencia evolutiva de los tripanosomátidos, similar a lo que ha sido sugerido también para otro protozooario *Toxoplasma gondii* [Ajioka et al. 1998]. Por último, 7.8% de las secuencias presentaban similitudes significativas sólo con otros kinetoplástidos de los cuales más del 50% no tienen función conocida [Porcel B, 2000].

Los EST que no presentan similitud significativa con otras secuencias o que sólo lo hacen con secuencias pertenecientes a otros parásitos

relacionados, pueden representar adaptaciones filogenéticas y/o patológicas específicas, sugiriendo posibles blancos para el desarrollo de drogas antiparasitarias.

La secuenciación de ESTs como estrategia para el descubrimiento de genes nuevos en tripanosomátidos presenta el problema que no todos los genes se encuentran igualmente representados en la población de transcriptos celulares de un estadio. Mientras que algunos genes como los codificantes para las mucinas se encuentran muy representados, otros, identificados a partir de secuencias genómicas, no se encuentran en las base de datos de EST. Así, los niveles de expresión génica parecen variar considerablemente entre distintos genes y para un mismo gen en diferentes estadios. Además, se ha observado que el grado de redundancia de la biblioteca de epimastigotes es considerable llegando a valores aproximados del 50% [Informe de la Red de Laboratorios del Proyecto Genoma de *T. cruzi*, 1999]. Dado la alta densidad génica que presenta *T. cruzi*, parece lógico que una mejor estrategia es secuenciar fragmentos de ADN genómico. Esto presenta varias ventajas: (1) el ADN es más fácil de preparar; (2) la redundancia de secuencias es baja; (3) no hay tendencia a secuenciar siempre los genes que presentan un mayor nivel de expresión [Ivens A, 1999]. Es más, estudios realizados por Agüero y colaboradores [Agüero F, 2000] a partir de 11500 secuencias genómicas (representando ~4,3 Mpb) permitió identificar 2670 genes, 946 de los cuales no habían sido identificados hasta el momento en *T. cruzi*. Sin embargo, también se encontró una alta redundancia en el genoma, donde ~35% de las secuencias pertenecían a unas pocas grandes familias de secuencias, incluyendo ciertas familias multigénicas como sialidasas, mucinas, glicoproteína gp63 y cruzipaina, retrotransposones y otras secuencias repetidas.

A continuación se detalla el número de genes identificados hasta julio de 2001 en *T. cruzi* agrupados por su función, según datos obtenidos de la base de datos de parásitos del EBI (www.ebi.ac.uk).

METABOLISMO (56)

- Metabolismo de aminoácidos (16)
- Metabolismo de nitrógeno y sulfuro (3)
- Metabolismo de nucleótidos (13)
- Metabolismo de fosfatos (4)
- Metabolismo de compuestos carbonados y carbohidratos (21)
- Metabolismo de lípidos, ácidos grasos e isoprenoides (3)
- Metabolismo de vitaminas, cofactores, y grupos prostéticos (5)
- Metabolismos secundarios (12)

ENERGIA (12)

- Glucólisis y gluconeogénesis (4)
- Respiración (4)
- Metabolismo de reservas energéticas (glucógeno y trealosa) (3)
- Ciclo del glioxilato (1)

CRECIMIENTO Y DIVISION CELULAR Y SINTESIS DE ADN (29)

- Crecimiento celular (8)
- Polaridad celular (5)
- Síntesis de ADN y replicación (1)
- Recombinación y reparación de ADN (2)
- Control del ciclo celular y mitosis (10)
- Citocinesis (3)

TRANSCRIPCION (22)

- Transcripción de ARNr (6)
- Transcripción de ARNt (6)
- Transcripción de ARNm (6)
- Otras actividades transcripcionales (4)

SINTESIS DE PROTEINAS (13)

- Proteínas ribosomales (9)
- Traducción (iniciación, elongación y terminación) (4)

PROTEINAS QUE ACTUAN SOBRE OTRAS PROTEINAS (53)

- Plegado y estabilización de proteínas (7)
- Localización, ordenado y translocación de proteínas (3)
- Modificación de proteínas (16)
- Ensamblado de complejos proteicos (4)
- Proteólisis (23)

TRANSPORTE FACILITADO (5)

- Canales iónicos (1)
- Transportadores con actividad ATPasa (4)

TRANSPORTE INTRACELULAR (12)

- Transporte vesicular (3)
- Transporte vacuolar (6)
- Transporte extracelular (secreción) (1)
- Importación celular (2)

 BIOGENESIS CELULAR (6)

- Biogénesis nuclear (3)
- Biogénesis vacuolar y lisosomal (3)

COMUNICACION CELULAR/TRANSDUCCION DE SEÑALES (29)

- Transducción de señales sin especificar (2)
- Morfogénesis (6)
- Osmosensores (9)
- Vía de respuesta nutricional (8)
- Otras actividades de transducción de señales (4)

RESCATE CELULAR, DEFENSA Y MUERTE CELULAR (11)

- Respuesta al stress (8)
- Reparación de ADN (1)
- Detoxificación (5)

HOMEOSTASIS IONICA (5)

- Homeostasis de iones metálicos (5)

MISCELLANEA DE GRANDES FAMILIAS PROTEICAS (35)

- Portadoras de dominios ADN-J (2)

Pegado a ARN (4)
Pegado a ADN (2)
Pegado a GTP (2)
Proteínas / Antígenos de superficie (12)
Otros antígenos (11)
Mucinas (2)

PROTEINAS HIPOTÉTICAS (18)
PROTEINAS NO CLASIFICADAS (43)
TOTAL DE PROTEINAS: 349

1.18 Manipulación genética en tripanosomátidos

Como fue mencionado anteriormente, *T. cruzi* exhibe varias propiedades bioquímicas inusuales incluyendo el *trans*-splicing, la edición de ARN y la transcripción policistónica. Para avanzar en el estudio de los mecanismos involucrados en estas propiedades inusuales, se han desarrollado en *T. cruzi* diferentes sistemas de transformación de ADN. Primero, el uso de la recombinación homóloga permite incorporar eficientemente genes que confieren resistencia a antibióticos dentro de regiones específicas de un cromosoma [Otsu K, 1993; Cooper R, 1993]. Este método permite tanto la expresión de genes heterólogos así como la disrupción de genes, incluyendo escisiones y mutaciones sitio-específicas. Segundo, para evitar efectos deletéreos o mutaciones en una región específica del cromosoma, se han creado varias construcciones plasmídicas que permiten la formación de moléculas de ADN circular extracromosómicas (episomas) en *T. cruzi* u otros tripanosomátidos [Kelly J, 1992]. Estos plásmidos, una vez dentro de la célula, forman episomas constituidos por varias copias del plásmido original dispuestas en tándem. Estos episomas parecen establecerse fácilmente en *T. cruzi*, *Leishmania sp* y *Leptomonas sp* aunque sólo se ha descrito un caso en *Trypanosoma brucei* [Clayton C, 1999]. Los mecanismos y las secuencias involucradas en la replicación y segregación de estas moléculas de ADN son hasta el momento desconocidos. Sin embargo, estos episomas pueden ser mantenidos por largos períodos de tiempo en ausencia de selección [Kelly J, 1992]. Una segunda familia de vectores la constituyen los vectores pRIBOTEX [Martínez-Calvillo S, 1997] y pTREX [Vázquez M, 1999]. Estas moléculas de ADN circular portan el promotor ribosomal de *T. cruzi* permitiendo una activa transcripción de los

genes que se encuentran insertados río debajo disminuyendo el tiempo requerido de selección. Otra diferencia fundamental entre estos vectores y los antes mencionados es que tanto pTREX como pRIBOTEX no se mantienen como episomas de alto peso molecular sino que se integran en el cromosoma correspondiente al *locus* ribosomal por lo general como copia única. Aun no esta claro si la ausencia de elementos extracromosómicos derivados de estos dos vectores, se debe a la imposibilidad de poderse replicar autónomamente por la alta tasa de transcripción o porque existe un mecanismo de recombinación altamente eficiente y específico dependiente de la presencia del promotor ribosomal.

1.19 Objetivos

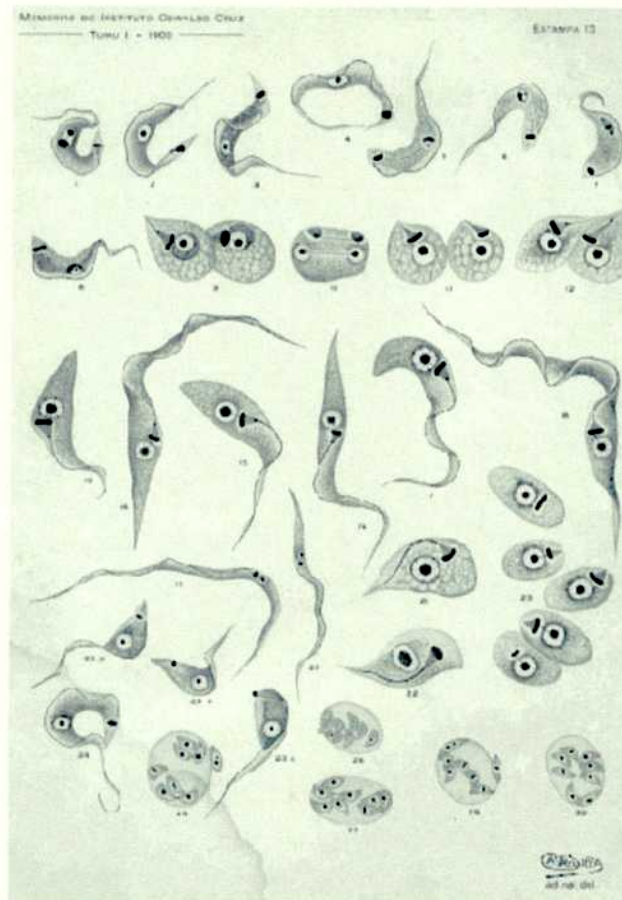
En 1994 comenzó el proyecto genoma de *Trypanosoma cruzi* cuyo objetivo final es la secuenciación total del genoma nuclear. Basándose en la tecnología disponible en ese momento, se diseñó una estrategia basada en la construcción inicial de los mapas físicos de cada uno de los cromosomas del parásito. Esto permite seleccionar un número mínimo de fragmentos superpuestos de ADN clonados (contigs), que representan el total del genoma, para su secuenciación.

Para construir el mapa físico, se necesitó poner a punto diferentes técnicas que permitiesen, por un lado, generar un gran número de marcadores, y por el otro, localizar dichos marcadores en los distintos cromosomas del parásito. Además, era necesario disponer de varios tipos de bibliotecas genómicas representativas, que contengan fragmentos de ADN de distinto peso molecular.

De acuerdo con lo expuesto, se proponen los siguientes objetivos para esta tesis:

- (1) Incrementar el número de marcadores genómicos disponibles para el proyecto genoma de *T. cruzi*.
- (2) Construir una biblioteca de grandes fragmentos genómicos en vectores YAC utilizando diferentes estrategias.
- (3) Construcción de los mapas físicos de los cromosomas XVI, XVII, XIX y XX de *T. cruzi*.
- (4) Desarrollar un vector de fragmentación para determinar la localización relativa de marcadores en cada cromosoma.
- (5) Construcción de una cromosoma artificial de *T. cruzi*, que pueda ser utilizado inicialmente como un vector eficiente para estudios genómicos funcionales.

MATERIALES Y METODOS



MATERIALES Y METODOS

2.1 SOLUCIONES Y MEDIOS UTILIZADOS

2.1.1 Medios

- ♦ **LB:** 1% bacto-triptona (Difco, Detroit, MI, USA), 0.5% extracto de levadura (Difco, Detroit, MI, USA), 1% NaCl, pH: 7.0.
- ♦ **LB-amp:** LB + 100 mg/ml ampicilina.
- ♦ **LB-agar:** LB + 1.5% bactoagar (Difco, Detroit, MI, USA).
- ♦ **LB-top agarosa:** LB + 0.7% agarosa.
- ♦ **Medio 2xYT:** (para un litro) bacto-triptona 16 g, extracto de levadura 10 g, NaCl 5 g
- ♦ **Medio mínimo M9 (+ Tiamina):** Na_2HPO_4 6 g/l, KH_2PO_4 3 g/l, NaCl 0.5 g/l, NH_4Cl 1 g/l, se autoclava y luego se adiciona: glucosa 2 g/l (esterilizada por filtración), MgSO_4 2mM, CaCl_2 2g/l . Se adiciona con Tiamina 1mM.
- ♦ **Medio SOB:** (1Litro) Bacto triptona 20 g, Bacto extracto de levadura 5 g, NaCl 5M 2 ml, KCl 100 mM 25 ml. Autoclavar y agregar MgCl_2 1M 10ml y MgSO_4 1M 10ml.
- ♦ **Medio LIT:** Infusión de hígado 5 gr, triptosa 5 gr, NaCl 1M 68 ml, KCl 1M 5.3 ml, Na_2HPO_4 1M 22ml, glucosa 20% 10 ml, hemina 1 ml, penicilina-estreptomicina 100X 10 ml, 10% de suero fetal bovino inactivado.
- ♦ **Medio mínimo SD YNB** sin aminoácidos y sin sulfato de amonio 1.7 g, Sulfato de amonio 5 g, Glucosa 20 g, llevar a 1 L con agua y a pH=5.8.
- ♦ **Medio YPD** Extracto de levadura 20 g, Glucosa 20 g, Peptona 20 g, llevar a 1 L con agua (para medio sólido agregar 15 g por 1 L de medio)
- ♦ **Medio AHC YNB** sin aminoácidos 6.7 g, Hidrolisado ácido de caseína 10 g, Adenina hemi-sulfato 0.02 g, llevar a 1 L con agua.

- ♦ **Medio TOP Agar y medio para placas del metodo de transformación de esferoplastos de levadura:**

Solución A 2M sorbitol

Solution B 1.7 g YNB sin aminoácidos y sin sulfato de amonio, 30 g Dextrosa, 5 g (NH₄)₂SO₄, 25 g Bacto agar, llevar a 500 ml con agua.

Autoclavar las soluciones A y B separadas. Mezclar 500 ml de solución A con 500 ml de solución B. Agregar suplementos.

2.1.2 Soluciones generales

- ♦ **PBS** 10X: 8% p/v NaCl, 0.2% KCl, 1.4% Na₂HPO₄, 0.24% KH₂PO₄ a pH 7.4.
- ♦ **SM**: 50 mM Tris-HCl pH: 7.5, 100 mM NaCl, 8 mM MgSO₄, 0.02% gelatina.
- ♦ **TE**: 10 mM Tris-HCl pH: 8, 1mM EDTA.
- ♦ **TBE** 10X: (1 litro) Tris base 108 g, ácido bórico 55 g, EDTA 0.5 M (pH 8.0) 40 ml.
- ♦ **TAE** 50X: (1 litro) Tris base 242 g, ácido acético glacial 57.1 ml, EDTA 0.5M (pH 8.0) 100 ml.
- ♦ **SSC** 20X: Citrato de sodio 88.2 g, llevar a pH=7 con HCl
- ♦ **Buffer de siembra 6X**: (Ácidos nucleicos) 60% Glicerina, 0.25% azul de bromofenol, 0.25% Xilencianol.

2.1.3 Soluciones para preparar células competentes

- ♦ **TFB I**: Acetato de potasio 5 M 1.5 ml, MnCl₂ 1 M 12.5 ml, KCl 2 M 12.5 ml, CaCl₂ 1 M 2.5 ml, glicerol 37.5 ml llevar a pH 5.8 con ácido acético 0.2 M y a un volumen final de 250 ml. Esterilizar por filtrado.
- ♦ **TFB II**: MOPS pH 7.2 M 12.5 ml, CaCl₂ 1 M 18.8 ml, KCl 2 M 1.25 ml, glicerol 37.5 ml llevar a pH 6.5 con ácido acético 0.2 M y a un volumen final de 250 ml. Esterilizar por filtrado.

2.1.4 Soluciones para la preparación de esferoplastos de levadura

- ♦ **SCE** 1 M sorbitol, 0.1 M Citrato de sodio, 0.06M EDTA pH=7. Esterilizar por filtración. Guardar a temperatura ambiente.
- ♦ **SCEM** 20 ml SCE, 43 µl 2-Me 14 M.
- ♦ **Solución de lisis** 20 mM Tris-ClH pH=8, 100 mM EDTA, 2% Sarkosyl de SIGMA, 2 mg/ml de Proteinasa K. Guardar a -20°C.

2.1.5 Soluciones para la transformación de esferoplastos de levadura:

- ♦ **2M Sorbitol** 182.2 g de Sorbitol en 500 ml de agua.
- ♦ **SPE** 250 ml Sorbitol 2 M, 5 ml Na₃PO₄, pH 7.5 1 M, llevar a 500 ml con agua. Esterilizar por filtración. Guardar a temperatura ambiente. Antes de usar agregar 2-Me.
- ♦ **Solución de Zymolyase 100T** 10 mg/ml en 50% glicerol. Guardar a -20°C.
- ♦ **STC** 250 ml sorbitol 2 M, 5 ml Tris-HCl 1 M pH=7.5, 5 ml CaCl₂ 1 M, llevar a 500 ml con agua. Esterilizar por filtración. Guardar a temperatura ambiente.
- ♦ **Solución de PEG (20% PEG8000)** Agregar 100 g de PEG 8000 a 490 ml de agua. Agregar 5 ml Tris-HCl 1 M pH=7.5 y autoclavar. Al sacar del autoclave agitar con agitador magnético. Después de enfriarse agregar 5 ml CaCl₂ 1M. Puede formarse precipitado pero no pasa nada. Esterilizar por filtración. Guardar a temperatura ambiente.
- ♦ **SOS** 250 ml sorbitol 2 M, 3.3 ml de CaCl₂ 1M, 1.25 g extracto de levadura, 2.5 g bactopectona, llevar a 500 ml con agua. Esterilizar por filtración. Guardar a temperatura ambiente.

2.1.6 Solución DB 0.5 para bloques de parásitos 0.5 M EDTA pH=8, 1% N-lauril sarcosina, 0.5 mg/ml de Proteinasa K.

2.1.7 Soluciones para preparación de bloques de levadura

- ♦ **LDS** Dodecil sulfato de sodio 5 g, EDTA pH=8 0.5 M 100 ml, Tris-HCl pH=8 1 M 5 ml, llevar a 500 ml con agua, esterilizar por filtración y guardar a temp. amb.
- ♦ **100% NDS** Mezclar 350ml H₂O, 93g EDTA y 0.6g Tris base. Llevar a pH >8 con 100 a 200 pellets de NaOH sólido. Agragar N-lauril sarcosina (5g perdisueltos en 50ml de H₂O). Llevar a pH 9.5 con NaOH concentrado. Llevar a 500ml con agua. Esterilizar por filtración y guardar a temp. amb.
- ♦ **Solución I** Sorbitol 1 M 10 ml, EDTA pH=8 0.5 M 400 ml, 2-Me 14 M 10 ml.
- ♦ **Solución de enzima** Zimoliasa a 6 mg/ml en solución I.
- ♦ **Solución de Agarosa** Sorbitol 1 M 10 ml, EDTA pH=8 0.5 M 400 ml, agarosa SeaPlake 0.2 g, fundir en microondas y equilibrar a 40°C. Luego agregar 2-Me 14 M 10 ml. Mantener a 40°C.
- ♦ **Solución II** Sorbitol 1 M 10 ml, EDTA pH=8 0.5M 400ml, Tris pH=7.5 1 M 100 ml, 2-Me 14 M 10 ml, zymoliasa 20 mg.

2.1.8 Soluciones de lavado de las hibridaciones:

- ♦ **I** (500ml): 2 x SSC + 0.2 % SDS: 50 ml 20 x SSC, 10 ml 10% SDS.
- ♦ **II** (500ml): 0.2 x SSC + 0.2 % SDS: 5 ml 20 x SSC, 10 ml 10% SDS.

2.1.9 Soluciones para minipreparación de ADN plasmídico:

- ♦ **I** : Glucosa 50 mM, Tris-HCl pH=8 25 mM, EDTA pH=8 (Autoclavar)
- ♦ **II**: NaOH 0.2 N, SDS 1%
- ♦ **III** (100 ml): KAc 5 M 60 ml, ácido acético glacial 11.5 ml, H₂O dd 28.5 ml.

2.1.10 Oligonucleótidos utilizados

- ♦ SIRE 0: 5'-TCCTCCGGGCAGCTGGCCGGATCCTGA-3'
- ♦ SIRE 1: 5'-GGAGGACCCAAAGTCGTCC-3'
- ♦ SIRE 2: 5'-GATCTTGGGAGAGCTGGCTA-3'

- ♦ SIRE 3: 5'-CTTACGAAGTGGCAGACTTT-3'
- ♦ Z5C: 5'- TTTGCTCTCGTGGTGGAA-3'
- ♦ Z5D: 5'- GGGCTTTGGACCACCTTT-3'
- ♦ Z5E: 5'- TTATCGTAAAGATGGGTG-3'
- ♦ Z5F: 5'- AGACGATGGATCCTGACA-3'
- ♦ Z5G: 5'- AACATCGCTCTCTATGGA- 3'
- ♦ Z5H: 5'- GGATAAGACAGAGGAACA-3'
- ♦ Z5I : 5'-GCTCATGGGCGCTCGTTCC-3'
- ♦ Z5J: 5'-GGAAACGCGCGCATGATT-3'
- ♦ Z5K: 5'- ACGCTTCGGATCACGGT-3'
- ♦ Z5L: 5'-TTCACGAGGGAGGAGTT-3'
- ♦ Z5M: 5'-GGTCTTGGGATGCACCAT-3'
- ♦ Z5T: 5'-CCATGGTGCAGCGGGAT-3'
- ♦ Z5P: 5'-GGTCACAAGCATAGCGTT-3'
- ♦ Z5R: 5'-CGCATGATGCAACTGCA-3'
- ♦ FORWARD: universal para pBluescript
- ♦ REVERSE: universal para pBluescript
- ♦ T7: universal
- ♦ SK: universal
- ♦ RibDS: 5'-GTGTGTACTTGTGCGCAT-3'
- ♦ Mp3Bam: 5'-GGATCCAATACCGCTCCATG-3'
- ♦ MP5: 5'-GAGCTCCCTAAAAAATTTTGG-3'
- ♦ MP3: 5'-TCTAGAATACCGCTCCATGATG-3'
- ♦ PROM5: 5'-GCACCCACCTTTCCCGT-3'
- ♦ PROM3: 5'-CACACGGCGCTTTGACT-3'
- ♦ HSP70sense: 5'-GGGCACCGGTAAGCGGAACCAG-3'
- ♦ HSP70antisense: 5'-TCCTGACGAAGACGACGGGTTCG-3'
- ♦ GP90sense: 5'-TATAGGATCCCCTGTGAACACTCGG-3'
- ♦ GP90antisense: 5'-TTAGTCTAGATTTCCCGTCCTTGAT-3'
- ♦ JL7-H49sense: 5'-GCGGAATTCATGGAGCAGGAGCGCAGG-3'
- ♦ JL7-H49antisense: 5'-GCGGGATCCAACAAAGTGGCTGTCTCGTC-3'

2.1.11 Plásmidos

- ♦ **pGEM-T easy:** lacZ, pGEM-5Zf(+) 3'T, Amp^r (Promega)
- ♦ **pGEM-3Zf(+):** lacZ, Amp^r (Promega)
- ♦ **pBlueScript:** lacZ, Amp^r
- ♦ **pTREX:** Amp^r, Neo^r
- ♦ **pRIBOTEX:** Amp^r, Neo^r

2.2 BACTERIAS

2.2.1 Cepas bacterianas.

- ♦ ***E. coli* JM109:** *supE44*, *endA1*, *hsdR17*, *gyrA96*, *relA1*, *thi* Δ (*lac-proAB*), *recA1*. Mantenido en medio M9 + Tiamina.
- ♦ ***E. coli* DH5 α :** F'/*endA1*, *hsdR17*, *supE44*, *thi-1* *recA1*, *gyrA* *relA1* Δ *lacZYA-argF*) U169 *deoR* (Δ 80*dlac* Δ (*lacZ*)M15). Mantenido en medio LB Agar + Kanamicina.
- ♦ ***E. coli* Y1090:** Δ *lacU169*, *proA*⁺, Δ *lon*, *araD139*, *strA*, *supF*, (*trp* *c22::Tn10*), (pMC9). pMC=pBR322, *lacI*^Q. Mantenido en medio LB Agar + Ampicilina

2.2.2 Mantenimiento de las cepas: Las cepas se mantuvieron en placas del medio correspondiente a 4°C por cortos períodos de tiempo (15 días) y en cultivos líquidos con 50% de glicerol a -70°C durante meses.

2.3 CEPA DE REFERENCIA DE *T. cruzi*

La cepa de referencia utilizada por el proyecto genoma de *Tripanosoma cruzi* se origina a partir de un clon de la cepa CL de *T. cruzi* denominado clon CL Brener. El mismo cumple el ciclo de propagación insecto-vertebrado, asegurando que toda la información genética que determina la infectividad está presente en el clon. La misma también presenta estabilidad genética en condiciones de crecimiento de laboratorio (Brener, Z., comunicación, Parasite Genome Network Planning Meeting, Fiocruz, Rio de Janeiro, Brasil, 14-15 de Abril de 1994). Esta cepa es mantenida

actualmente en nuestro laboratorio a 30°C en medio de cultivo LIT y replicada cada 7 días.

2.3 BIBLIOTECAS

- ♦ **Biblioteca de expresión de *T. cruzi* en λ gt11:** *lac5*, Δ *shndIII* λ 2-3, *srI* λ 3⁰, *clts857*, *srI* λ 4⁰, *nin5*, *srI* λ 5⁰, Sam100. Clonado de ADNc de *T. cruzi* cepa Tulahuen II, en el sitio *EcoRI*.
- ♦ **Biblioteca genómica de *T. cruzi* en λ - Zap II:** λ *sbhI* λ 1⁰ (T amp ColE1 *ori lacZ'* promotor T3-sitio múltiple de clonado-promotor T7 I) *srI* λ 3⁰ *clts857* *srI* λ 4⁰ *nin5* *srI* λ 5⁰. Clonado de ADNc de *T. cruzi* cepa Tulahuen II, en el sitio *EcoRI*, ésta biblioteca fue cedida por el Dr. S. Reed, Seattle Biomedical Research Institute, Seattle, WA, USA.
- ♦ **Biblioteca normalizada de ADNc de *T. cruzi* en pT7T3-18D:** vector plasmídico (Pharmacia) en el cual se clonaron ADNc de *T. cruzi* provenientes del clon CL Brener, obtenidos mediante un proceso de normalización que permite que se encuentren más fácilmente los mensajeros con bajo nivel de expresión. La biblioteca fue construida en el laboratorio del Dr. Edson Rondinelli del instituto Fiocruz de Rio de Janeiro, Brasil.

2.5 MANIPULACION DE FAGOS RECOMBINANTES

2.5.1 Plaqueo de la biblioteca de ADNc en λ - ZapII

- Incubar por 15 min. 600 ml de bacterias JM109 crecidas en medio M9 (+ tiamina) a 37° C.
- Mezclar con 8 ml de LB-top agarosa a 48°C, homogeneizar y volcar sobre placas de Petri de 150 mm precalentadas a 37°C por lo menos 30 min. Incubar toda la noche (12 hs, mínimo).

2.5.2 Plaqueo de la biblioteca λ gt11:

Preparación de las bacterias Y1090:

- Inocular una colonia aislada de *E. coli* Y1090 en 5 ml de LB conteniendo 100 µg/ml de ampicilina.
- Incubar durante toda la noche a 37°C con agitación.
- Al día siguiente inocular 100 µl del cultivo en 50 ml de LB con 100 µg/ml de ampicilina, 0.2% maltosa y 0.5 ml de MgSO₄ 1M; incubar a 37°C con agitación hasta que llegar a DO_{660nm} = 0.5.
- Cosechar las bacterias por centrifugación a 3000 rpm durante 10 min a 4°C y se resuspender en 0.4 volúmenes de MgSO₄ 10 mM estéril y frío. Las bacterias así preparadas pueden ser mantenidas a 4°C por no más de 15 días.

Plaqueo de la biblioteca:

- Incubar 600 µl de bacterias Y1090 20 min a 37°C con 4 x10⁴ ufp en 100 µl de SM.
- Luego mezclar con 8 ml de LB-top agarosa previamente equilibrada a 48°C, homogeneizar y volcar sobre placas de Petri de 150 mm precalentadas a 37°C por lo menos 30 min.
- Incubar toda la noche (12 hs, mínimo).

2.5.3 Purificación de clones positivos:

Extracción de fagos con señal positiva:

- Siguiendo las marcas del filtro, hacer un calco en una hoja de nylon transparente para poder así ubicar las playas de lisis de los fagos positivos.
- Extraer la zona de la placa correspondiente a la señal positiva con una pipeta automática cuya punta se cortó previamente para aumentar su diámetro.
- Colocar el fragmento de agar con las playas de lisis extraída en un tubo Eppendorf® con 1ml de SM más 30 µl de cloroformo y dejar durante una noche a 4°C para que los fagos difundan.

Rastreos sucesivos: purificación de fagos con señal positiva.

- Para purificar el fago recombinante positivo, repetir el rastreo con sonda radioactiva a partir de los fagos extraídos de la zona correspondiente a la señal positiva, a una densidad menor de ufp por caja de Petri (50-100 ufp).
- Aislar los fagos que a su vez produzcan una señal positiva y volver a rastrear.
- Repetir el procedimiento hasta que en el rastreo todos los fagos den señal positiva. En ese momento se considera al clon purificado.

2.5.4 Amplificación de los fagos recombinantes:

- Con el objeto de obtener una suspensión de fagos de aproximadamente 10^{10} ufp/ml, infectar 200 μ l de un cultivo de *E. coli*, de la cepa adecuada (JM109 ó Y1090), competentes para infección, con 10 μ l de fagos (aproximadamente 10^6 ufp/ml).
- Luego de 20 min a 37°C agregar 3 ml de top-agarosa (previamente fundida y mantenida a 48°C) y colocar la mezcla en una placa de Petri (de 96 mm) conteniendo LB-agar (con o sin ampiclina).
- Incubar a 37°C. Dejar crecer toda la noche hasta confluencia de las playas de lisis de los fagos.
- Agregar 5 ml de SM por placa e incubar no menos de 2 hs con agitación.
- Luego pasar la suspensión a un tubo Eppendorf®.
- Recolectar los fagos remanentes en la placa con 2 ml más de SM y juntar con los 5 ml anteriores. Agregar cloroformo (3% final) y agitar suavemente durante 15 min a temperatura ambiente.
- Separar las bacterias no infectadas y los restos celulares de la suspensión de fagos por centrifugación a 12000 rpm durante 10 min.
- Recoger el sobrenadante y luego del agregado de cloroformo (0.3%V/V) mantener a 4°C.

2.5.5 Escisión *in vivo* del plásmido pBS SK- de λ -ZapII

- Se usa la cepa JM109 que es Rec A-/F' +
- Mezclar 200 µl de JM109 (DO₆₆₀=1) + 100 µl de λ- ZapII (10⁵ ufp) o 10 µl de fago (10⁸ ufp)+ 20 µl de Fago Helper R408 (1.5 10¹¹ ufp/ml). Colocar en un tubo falcon de 50 ml.
- Incubar 15 min a 37° C.
- Agregar 5 ml de medio 2xYT.
- Continuar la incubación 4hs más a 37°C con agitación.
- Incubar la mezcla a 70°C por 20 min para inactivar al fago y matar las bacterias.
- Centrifugar a 1000 x g 5 min.
- Pasar el sobrenadante a un tubo estéril (contiene el fago f1 helper y el f1 con el plásmido pBS). Se puede conservar un mes a 4°C.
- Mezclar 200 µl de JM109 + 200 µl de fago f1.
- Incubar 15 min a 37° C
- Plaquear sin diluir y una dilución 1/100.
- Si el número de colonias es adecuado, picar y crecer toda la noche en LB o SOB a 37°C.

2.6 TRANSFERENCIA DEL ADN DE LOS FAGOS RECOMBINANTES A FILTROS DE NYLON: (Método de transferencia de Benton Davis)

Sobre las cajas de Petri utilizadas en los rastreos se colocó un filtro de nylon (Hybond-N⁺®, Amersham) de modo que las placas de lisis quedaran cubiertas por el mismo; se realizaron marcas sobre el filtro para la posterior identificación y después de 1 minuto (en el caso de duplicados 2 min y en el caso de triplicados 3 min) se retiraron los filtros con una pinza y se colocaron 5 min sobre un papel Whatman[®] 3MM (el lado que estuvo en contacto con las placas de lisis se colocó opuesta al Whatman[®] 3MM) embebido con una solución desnaturalizante; luego se transfirió durante 5 min a una solución neutralizante y por último se realizó un lavado de 5 min en iguales condiciones en una solución de 2xSSC. Se dejó secar sobre

un papel Whatman® 3MM. Una vez secos, se realizó la fijación apoyando las membranas sobre tres hojas de papel Whatman® 3MM embebidas en NaOH 0.4 N y se dejó fijar entre 20 min a 60 min. Luego se envolvieron las membranas en nylon y se conservaron a 4°C hasta su posterior utilización. Para el rastreo de la biblioteca construida en el vector pT7T3-18D se utilizó el mismo protocolo para transferir el ADN de las colonias transformadas.

2.7 PREPARACIÓN DE BACTERIAS COMPETENTES DE *E. coli* DH5α PARA TRANSFORMAR

- Tomar un erlenmeyer de 500 ml con 50 ml de medio LB e incubar con 50 ml de bacterias DH5F'α (previamente crecidas a 37° C toda la noche) hasta llegar a una $DO_{660}=0.45-0.55$.
- Enfriar rápidamente en baño de hielo-agua durante 30 min.
- Pasar el cultivo a dos mamaderas pre-enfriadas de 250 ml y centrifugar a 2500 rpm, 10 min a 4°C.
- Luego eliminar el sobrenadante y resuspender en 100 ml de solución TFB I fría. Centrifugar a 3500 rpm, 10 minutos a 4° C.
- Descartar el sobrenadante y resuspender el precipitado en 20 ml de volumen de TFB II e incubar en hielo.
- Alicuotar 500 µl de células en tubos pre-enfriados y congelar inmediatamente en nitrógeno líquido
- Guardar en freezer a -70°C.

2.8 TRANSFORMACIÓN DE BACTERIAS COMPETENTES DH5α

- En un Ependorff ® agregar 100 µl de bacterias competentes + más 5 µl del plásmido a transformar o de la ligación.
- Dejar 30 min en hielo.
- Shock térmico a 42°C, 2 min.
- 5 min en hielo.

- Llevar a 1 ml con el agregado de SOC o LB.
- Llevar 1 h a 37°C y luego centrifugar 1 min. A 13000 rpm.
- El precipitado se resuspende en 100 µl de sobrenadante.
- Para rastrillar se utiliza 100 µl de bacterias, 20 µl de IPTG 100 mM, 40 µl de X-Gal 2%.
- Incubar toda la noche a 37°C.

2.9 PREPARACIÓN DE VECTOR PARA CLONADO DE PRODUCTOS DE PCR

- Digerir el plásmido pGEM3zf(+) con la enzima *EcoRV* (deja extremos romos).
- Inactivar la enzima calentando a 65°C 20 min.
- Precipitar el ADN agregando 1/10 volumen de NaAc 3 M y 2 volúmenes de EtOH absoluto.
- Dejar 1 hs. a -20°C y centrifugar 15 min a 13000 rpm 15 min.
- Lavar una vez con 500 µl de EtOH 70%. Dejar secar y resuspender el pellet en buffer TE.
- Incubar con 1 U de Taq polimerasa por cada µg de ADN en 20 µl de volumen final usando buffer Taq estándar en presencia de 2 mM de dTTP durante 2 hs a 72°C.
- Extraer con fenol:cloroformo:isoamílico 25:24:1.
- Precipitar el ADN agregando 1/10 volumen de NaAc 3 M y 2 volúmenes de EtOH absoluto.
- Resuspender en buffer TE.

2.10 PREPARACIÓN DE SONDAS RADIATIVAS:

Las sondas radiactivas se prepararon con el kit *Megaprime® ADN labelling system* (Amersham).

Se colocó 4 µl del templado de ADN en TE (50 µg/µl) con 2.5 µl de *primer solution* (solución de nonúmeros al azar) y 10 µl de agua deionizada. Se

hirvió 5 min e inmediatamente se colocó en hielo. Se centrifugó unos segundos para bajar lo que se condensó en las paredes del tubo.

Se agregó 5 µl de Labelling Mix (mezcla de nucleótidos fríos), 2.5 µl de [$\alpha^{32}\text{P}$]dCTP 25 µCi y 1 µl de fragmento Klenow, y se incubó 20 min a 37°C. Luego se colocó en hielo.

Para el precipitado de la sonda se colocaron 2 µl de carrier ADN, 13.5 µl (½ volumen) de acetato de amonio 7.5 M y 81 µl (2 volúmenes) de etanol absoluto; se dejó 20 min a -70°C. A continuación se incubó 2 min a 37°C para resuspender los nucleótidos que no se incorporaron en la sonda, y se centrifugó inmediatamente durante 15 min a 12000 rpm.

Se descartó el sobrenadante y se lavó el precipitado con 500 µl de etanol 67%, 0.67 M de acetato de amonio. Se centrifugó otros 15 min en iguales condiciones; se desechó el sobrenadante y se dejó secar en estufa a 37°C. Cuando estuvo seco se resuspendió en 100 µl de TE pH 8.0. En todos los pasos de precipitación se midió la marca radiactiva, utilizando un contador Geiger en precipitados y sobrenadantes como control de la correcta incorporación de los isótopos radiactivos en la sonda en preparación.

2.11 HIBRIDACIÓN CON SONDAS RADIATIVAS

Se colocaron los filtros en bolsas de nylon con solución de hibridización comercial: *Rapid hybridization system* de Amersham. (3ml por filtro de 15 mm de diámetro + 5 ml adicionales por bolsa)

La pre-hibridación se llevó a cabo a 65°C entre 15 min a 1 h, luego se agregó la sonda radiactiva, desnaturalizada a 100°C durante 5 min. La hibridación se realizó con agitación suave a la misma temperatura por un período no menor a 2 horas.

Los filtros fueron lavados en condiciones de alta homología: 2 lavados de 25 min cada uno a temperatura ambiente y con agitación en solución I de lavado y 2 lavados de 20 min a 65°C con agitación en solución II de lavado.

Entre los lavados se monitorearon los filtros con un contador Geiger para obtener una buena relación entre la sonda hibridada específicamente y el ruido de fondo.

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.

2.12 ELECTROFORESIS CON ARN PARA NORTHERN BLOT

Se preparó los materiales a usar lavándolos con soluciones con 0.1 M NaOH, 1mM EDTA y enjuagando con agua tratada con dietilpirocarbonato 0.1% (DEPC) y/o autoclavándolo 2 veces. Las soluciones también fueron tratadas con DEPC 0.1%. El manejo del material se realizó con guantes descartables cambiándolos frecuentemente.

Se corrió el ARN obtenido en un gel de agarosa 1% en buffer MOPS 1X, 6.6 % formaldehído en agua libre de ARNasa. Las muestras sembradas fueron preparadas en un volumen final de 40 μl , y contenían 4 a 10 μg de ARN total, 4 μl de MOPS 10X, 8 μl de formaldehído 37.5% y 22 μl de formamida deionizada. Se calentó a 65°C durante 10 min, y luego se dejó 2 min en hielo. A cada muestra se agregó 2 μl de bromuro de etidio (10 mg/ml) y buffer de siembra para ácidos nucleicos 6X y se sembró en el gel. El gel fue corrido en buffer MOPS 1X con 6.6% de formaldehído a 75 V constantes. El gel fue observado en un transiluminador de luz UV y fotografiado. Se transfirió a una membrana de nylon Hybond N⁺® (Amersham) durante toda la noche usando como buffer MOPS 10X. El ARN se fijó a la membrana por "autocrosslinking" con un UV Stratalinker® 1800 de Stratagene. La membrana fue hibridada con sondas realizadas a partir de los genes TcRH1, TcNU1 o TcEIF6 según el caso durante toda la noche.

2.13 TRANSCRIPCIÓN REVERSA DE ARN TOTAL DE *T. cruzi*

Para la transcripción reversa se utilizó 1 μg de ARN total de *T. cruzi*, buffer M-MLV® RT 1X (Promega), 10 U de inhibidor de ARNasa, dNTP 2mM, 200 ng de hexámeros al azar, 600 U de enzima M-MLV® RT y agua csp 20 μl .

Se incubó durante 10 min a 25°C, 40 min a 42°C y 5 min a 95°C.

2.14 PREPARACIÓN DE ADN TOTAL DE *T. cruzi*

- Tomar 1 ml de un cultivo saturado de epimastigotes de *T. cruzi* (1×10^8 cel/ml) y centrifugar a 3000 rpm 10 min.
- Resuspender en 1 ml de PBS 1X y volver a centrifugar a 3000 rpm 10 min.
- Resuspender en 1 ml de solución de lisis (Tris-HCl 10 mM pH=8, EDTA 100 mM pH=8, 1% N-Lauril Sarcosina).
- Agregar 2 µl de ARNasa 10 mg/ml e incubar a 37°C 1 hs.
- Agregar 500 µl de fenol:cloroformo:isoamílico 25:24:1. Mezclar por inversión y centrifugar 5 min a 13000 rpm.
- Con un tip azul cortado tomar la fase acuosa y pasarla a otro tubo. Repetir el paso anterior.
- Agregar 500 µl de cloroformo:isoamílico 24:1. Centrifugar 5 min a 13000 rpm.
- Tomar la fase acuosa con un tip azul cortado y pasarla a otro tubo.
- Agregar 1 volumen de isopropanol 100%. Dejar a temperatura ambiente 10 min.
- Centrifugar 10 min a 13000 rpm.
- Lavar el pellet con 500 µl de EtOH 70%.
- Centrifugar 10 min a 13000 rpm.
- Secar el pellet a temperatura ambiente. Resuspender en 200 µl de TE.

2.15 SOUTHERN BLOTS

Se digirió 5 µl de ADN de *Trypanosoma cruzi* y fue corrido junto con un marcador de peso molecular 1 Kb Ladder (BRL) en un gel de agarosa 0.8 % a 25 V. Se transfirió a una membrana de nylon Hybond N⁺® con una solución de NaOH 0.4 N durante toda la noche.

Las membranas se guardaron a -20°C hasta su hibridación con sondas radiactivas.

2.16 AMPLIFICACION POR PCR

Se amplificó por PCR los insertos a partir de ADN genómico o ADNc. Se tomó 200 fmoles de ADN, se le colocó 50 pmoles de cada primer, 200 μ M de dNTPs, 2.5 μ M de $MgCl_2$, Buffer Taq para 1X final, 2.5 U de enzima Taq polimerasa y agua deionizada de máxima pureza csp 100 μ l. Como control de contaminación se utilizó un tubo que no contenía ADN; y como control de que los procedimientos realizados fueron correctos, se amplificó plásmidos con insertos conocidos.

La reacción se realizó en GeneAmp PCR System 9600 Perkin Elmer y las condiciones fueron las siguientes:

Desnaturalización del ADN	1 min. a 94°C	] durante 30 ciclos
Pegado de los oligonucleótidos	1 min a temperatura variable de acuerdo al T_m de los oligonucleótidos	
Síntesis de ADN	1 min. por cada 1000 pb a amplificar a 72°C	
Completado de cadenas	10 min. a 72° C	

Luego se corrió 5-10 μ l de cada reacción en un gel de 0.8-1 % de agarosa en TAE 1X con 1 μ l bromuro de etidio (10 mg/ml) a 100 V. Para la determinación del tamaño de los insertos amplificados, se usó como marcador de peso molecular 100 pb ladder o 1 kb DNA ladder. Se observaron en un transiluminador de luz U.V. de 300 nm y se fotografiaron.

2.17 SUBCLONADO EN PLÁSMIDOS

Para subclonar en los plásmidos se utilizó los insertos que habían sido amplificados por PCR y/o cortados con las enzimas de restricción correspondientes, extraídos después de la corrida en un gel preparativo de 0.8 - 1% de agarosa de bajo punto de fusión. Para la ligación se utilizó la relación molar vector:inserto de 1:1 y 1:5. Las experiencias de ligado de los

insertos y los plásmidos se llevaron a cabo en un volumen de 10 µl con 20 ng de plásmido, 1 U de T4 ADN ligasa durante 12-18 hs a 16°C. Como control de ligación se incluyó una reacción de ligado de vector sin inserto (autoligado).

2.18 SUBCLONADO EN EL PLÁSMIDO pGEM-T Easy®(Promega)

Este vector se empleó para realizar un clonado directo de productos de PCR. El plásmido posee la característica de tener bases T protruyentes en los extremos 3'. Este tipo de extremos permite la ligación en forma muy eficiente de fragmentos de PCR amplificados que presentan bases deoxiadenina en sus extremos generadas por la Taq polimerasa en forma independiente del templado. Este vector permite además una selección rápida de las colonias recombinantes por α -complementación.

2.18.1 Análisis de los plásmidos recombinantes

Se picaron con escarbadiantes colonias blancas (o en su defecto al azar), se colocaron en tubos con 3 ml de medio LB con ampicilina y se dejaron crecer durante toda la noche. Como control se picó una colonia azul (o de un plásmido sin inserto). Se colocaron en tubos Eppendorf® 100 µl de los cultivos con 50 µl de fenol-cloroformo (1:1) y 10 µl de buffer de siembra 6X para ácidos nucleicos. Se agitó en vórtex durante 1 min, se centrifugó durante 5 min a 12000 rpm a temperatura ambiente. Se corrió 20-25 µl de la fase acuosa en un gel 0.6-0.8 % con 1 µl de bromuro de etidio (10 mg/ml) y se comparó el ADN plasmídico de control con el de las muestras de posibles recombinantes. En los casos que se observó que el plásmido tenía mayor tamaño que el control sin inserto se hizo una extracción del ADN plasmídico.

2.19 ELECTROFORESIS EN GELES DE AGAROSA

Los fragmentos de ADN se separaron por electroforesis en geles de agarosa. El porcentaje de agarosa usado fue variable oscilando en el rango

de 0.5-1%, dependiendo del tamaño de los fragmentos a resolver. Los geles se prepararon y la electroforesis se realizó en buffer TAE 1x. Las muestras fueron mezcladas en proporción 1:5 con el buffer de siembra 6X (30% de glicerol /0.25% azul de bromofenol /0.25% xilen-cianol FF). La electroforesis se llevó a cabo en un aparato de electroforesis horizontal de BRL (Horizon) a 100 V (voltaje constante).

El ADN fue coloreado agregando BrEt 1 µg/ml al gel. El ADN fue visualizado en un transiluminador "Baby Imager" (Appligene). La determinación del tamaño de los fragmentos de ADN se llevó a cabo mediante la comparación con marcadores de peso molecular apropiados.

2.20 ELECTROFORESIS EN GELES DE CAMPOS PULSADOS (PFGE)

La corrida electroforética se realizó en un CHEF II de la firma Bio Rad. La mejor resolución para YACs se obtuvo en un gel 1% de agarosa Sea Kem GTG (FMC) en las siguientes condiciones: Intervalos de pulsos de 60 seg.-120 seg.; 6.0 V/cm; 14°C y un tiempo de corrida de 26 horas. Para geles analíticos de la cepa Tulahuen II de *T. cruzi* las condiciones de corrida fueron las siguientes: buffer TBE 0.5X; 60 seg-90 seg, 6 V/cm, 16 hs; 200 seg-500 seg., 3 V/cm, 20 hs; 500 seg-1200 seg, 2.7 V/cm, 24 hs; 14°C; gel SeaKem 1%.

Las condiciones de corrida para purificar las bandas cromosómicas XIX y XX por geles preparativos del clon CL Brener de *T. cruzi* fueron las siguientes: buffer TAE 1X; agarosa SeaPlake 0.8%; 15 seg-300 seg, 3 V/cm, 30 hs; 500 seg-900 seg, 2.7 V/cm, 30 hs; 900 seg-1500 seg, 2.7 V/cm, 30 hs; 14°C.

Para determinar la posición de los marcadores SAS, se utilizaron cromoblots cedidos por el Dr. Franco da Silveira, San Pablo, Brasil. Estos cariotipos electroforéticos se obtuvieron según se describe en [Cano MI, 1995].

2.21 ELECTROFORESIS EN GELES DE CAMPOS INVERTIDOS (FIGE)

La corrida electroforética se realizó en un FIGE Mapper de la firma BioRad®. La mejor resolución para los clones pTNT se obtuvo en un gel 1% de agarosa SeaKem GTG (FMC) en las siguientes condiciones: intervalos de pulsos de 0.1 a 2.0 seg. en rampa lineal. Voltaje hacia delante de 180 V y voltaje hacia atrás de 120 V en buffer TBE 0.5X a 18°C y un tiempo de corrida de 16 hs. Para geles preparativos las condiciones de corrida fueron las siguientes: gel 1% de agarosa SeaPlake GTG (FMC), intervalos de pulsos de 0.1 a 3.5 seg. en rampa lineal. Voltaje hacia delante de 180 V y voltaje hacia atrás de 120 V en buffer TBE 0.5X a 18°C y un tiempo de corrida de 16 hs.

Para determinar la estructura linear/circular de los CrATs las 2 condiciones de corrida utilizadas fueron las siguientes:

- ♦ **Condición 1:** gel 1% de agarosa SeaPlake GTG (FMC), intervalos de pulsos de 1.5 a 2.0 seg. en rampa lineal. Voltaje hacia delante de 180 V y voltaje hacia atrás de 120 V en buffer TBE 0.5X a 18°C y un tiempo de corrida de 20 hs.
- ♦ **Condición 2:** gel 1% de agarosa SeaPlake GTG (FMC), intervalos de pulsos de 0.1 a 2.0 seg. en rampa lineal. Voltaje hacia delante de 180 V y voltaje hacia atrás de 120 V en buffer TBE 0.5X a 18°C y un tiempo de corrida de 16 hs.

2.22 EXTRACCIÓN DE FRAGMENTOS DE ADN EN GELES DE AGAROSA DE BAJO PUNTO DE FUSIÓN

Después de correr en un gel de 1% agarosa de bajo punto de fusión, se cortaron los fragmentos correspondientes, en un transiluminador de luz UV con un bisturí lo más pequeño posible, tratando de no tomar agarosa sin ADN.

Se colocó el fragmento de agarosa en un tubo Eppendorf® con 200 µl de TE y 100 µl de acetato de sodio 3 M pH= 6. Se dejó el tubo en un baño de 65°C por 10 min. Luego se agregó 500 µl de fenol precalentado a 65°C, se mezcló con vortex y se centrifugó 3 min a 12 rpm. Se tomó el sobrenadante

(fase acuosa superior) y se repitió la extracción con fenol. Para retirar el fenol remanente se hicieron 2 lavados con 500 μ l de éter saturado con agua, se agitó y luego se desechó. Se dejó unos minutos a temperatura ambiente hasta que el éter que pudiera quedar se volatilizara.

Se le agregó 2 volúmenes de etanol absoluto frío y se dejó 20 min a -70°C para que precipite, y a continuación se centrifugó 20 min a 12000 rpm. Se descartó el sobrenadante y se lavó el precipitado con 200 μ l de etanol 70%, se centrifugó nuevamente en las mismas condiciones que antes y se extrajo el sobrenadante y se dejó secar en una estufa a 37°C . Se resuspendió con una pipeta y vortex en 30 μ l de TE.

2.22.1 Protocolo alternativo de purificación usando el kit Wizard DNA Clean-Up® (Promega)

Para purificar los insertos cortados con las correspondientes enzimas de restricción, se corrieron en un gel de 0.8-1% agarosa de bajo punto de fusión. Se cortaron los fragmentos correspondientes, en un transiluminador de luz UV con un bisturí, tratando de no tomar agarosa sin ADN. Se le agregó 200 μ l de TE y se los incubó en un baño a 68°C hasta que la agarosa se disolvió completamente. Luego se le agregó 1 ml de resina del kit Wizard DNA Clean Up® (Promega), se mezcló por inversión varias veces y se dejó que tomara temperatura ambiente. Se pasó la suspensión por una minicolumna provista por el kit y se lavó 2 veces con isopropanol 80%. Se centrifugó 2 min a 12000 rpm para desechar los restos del alcohol y se incubó a 70°C . Inmediatamente se le agregó a la columna 30-40 μ l de TE o agua deionizada precalentados a la misma temperatura y se dejó durante 1 min. Se centrifugó la minicolumna 20 seg a 12000 rpm para eluir el ADN.

2.23 DIGESTION DE ADN CON ENZIMAS DE RESTRICCION

Las enzimas de restricción y su buffer apropiado fueron obtenidas de *New England Biolabs* y fueron utilizadas según indicaciones de la empresa. Se

utilizaron 2-3 U/ μ g de ADN y se incubó a la temperatura indicada por la empresa.

2.24 EXTRACION DE ADN PLASMIDICO

Se utilizó una modificación del método de Birnboim y Doly, lisis alcalina (1979)

- A partir de una colonia aislada se inocularon 5 ml de LB+50 μ g/ml de ampicilina en tubos de ensayo.
- Incubar con agitación durante la noche a 37°C.
- Cosechar las bacterias por centrifugación a 4000 rpm por 5 min a temperatura ambiente.
- Agregar 300 μ l de solución I fría y reuspender por vortex.
- Agregar inmediatamente 300 μ l de solución II mezclar cuidadosamente por inversión, e incubar por 3-5 min (no más) en hielo.
- Añadir 300 μ l de solución III fría y mezclar por inversión. Dejar en hielo por 10 min.
- Centrifugar 10 min a 13000 rpm.
- Agregar al sobrenadante ARNasa A (libre de ADNsa) concentración final = 50 μ g/ml. Incubar por 20 min a 37°C.
- Añadir 600 μ l de cloroformo:isoamílico (24:1)
- Centrifugar 3 min a 12000 rpm y quedarse con la fase acuosa.
- Añadir 1 volumen de Isopropanol 100%, mezclar por inversión e incubar por 10 min (como mínimo) a temperatura ambiente.
- Centrifugar a 13000 rpm a temperatura ambiente.
- Lavar el precipitado con 500 μ l de etanol 70%.

Secar el precipitado y resuspender en 32 μ l de H₂O bidestilada para secuenciación o sino en 50 μ l de buffer TE pH=8.

2.24.1 Purificación por PEG (8000) para secuenciación automática.

- Al plásmido resuspendido en H₂O se le agregan 40 μ l de una solución de PEG (8000) 13% + 8 μ l de NaCl 4 M, e incubar 30 min en hielo.

- Centrifugar 15 min a 4°C (IMPORTANTE)
- Lavar el precipitado con ETOH 75%.
- Secar el precipitado y resuspender en 20 µl de H₂O bidestilada.

2.25 SECUENCIACIÓN DE ADN UTILIZANDO EL KIT DE SECUENCIA *fmol*® (Promega)

La secuenciación de ácidos nucleicos se llevó a cabo por el método de terminación de cadena con dideoxinucleótidos. Para ello se utilizaron los kits de secuenciación *fmol*® (Promega) y se siguieron las indicaciones de los fabricantes.

Se mezcló en un tubo 5 µl de Buffer *fmol* 5X (que contiene los dNTPs sin marcar), 3 pmol oligonucleótido, 100 ng de ADN a secuenciar, 0.5 µl de [α -³⁵S]dATP 10µCi/µl y agua hasta alcanzar un volumen final de 16 µl. Se agregó 1 µl de Taq ADN Polimerasa (Sequencing Grade). 4 µl de esta mezcla se trasvasaron a cuatro tubos rotulados A, C, G, T conteniendo cada uno 2 µl de la mezcla apropiada de d/ddNTP. Posteriormente se agregó una gota (aproximadamente 20 µl) de aceite mineral. Luego se realizó una reacción de PCR con el siguiente programa: 2 min a 94°C para la desnaturalización del ADN doble cadena, y 30 ciclos con los siguientes parámetros: 30 seg a 94°C (desnaturalización), 30 seg a 42°C (apareamiento del oligonucleótido) y 1 min a 70°C (elongación).

Una vez finalizada la reacción se agregó 3 µl de Solución Stop a cada tubo. Los tubos fueron precalentados a 70°C durante 2 min antes de sembrar las muestras en el gel. Se utilizó una cuba de electroforesis Gibco-BRL® de geles verticales de 30 x 40 cm, con espaciadores de 0.3 mm. Se emplearon geles de poliacrilamida 8% y 7 M de urea. Los geles se prepararon a partir de una solución stock de acrilamida-bisacrilamida (40:2) 40%. Se disolvió a 37°C en agitador 42 g de urea (Sigma) con 15 ml del stock de acrilamida 40%, más 10 ml de TBE 10X y fue llevado hasta 100 ml con agua deionizada. La polimerización se realizó con 280 µl de persulfato de amonio

10% y 0.08% V/V de TEMED. La electroforesis se llevó a cabo aplicando una potencia constante de 60 W. Concluida la migración se enjuagó el gel con agua corriente, para retirar la urea remanente. Los geles se secaron en vacío a 80°C durante 2 horas. Los filtros se expusieron sobre películas AGFA-GERVAERT Curix RP1 durante una noche a temperatura ambiente (Sambrook, 1989).

2.25.1 Geles de poliacrilamida

Se corrieron geles de poliacrilamida 8% y 7 M de urea.

Se utilizó geles verticales de 30 x 40 cm, con espaciadores de 0.3 mm.

Los geles se prepararon a partir de una solución stock de acrilamida-bisacrilamida (40:2) 40% . Se disolvió a 37°C en agitador, 42 g de urea (Sigma) con 15 ml del stock de acrilamida 40%, más 10 ml de TBE 10X y fue llevado hasta 100 ml con agua deionizada.

La polimerización se realizó con 280 µl de persulfato de amonio (0.8 mg/ml) y 0.08% V/V de TEMED.

La electroforesis se llevó a cabo aplicando una potencia constante de 60 W. Generalmente se hicieron dos descargas (se sembraron dos veces las muestras) para lograr leer aproximadamente 350 pb.

Concluida la migración se fijó el gel con metanol 10%, ácido acético y agua, durante 15 min. A continuación se enjuagó el gel con agua corriente, para retirar la urea remanente.

Los geles se apoyaron sobre Whatman® 3MM y se cubrieron con nylon. Luego se secaron en vacío a 80°C durante 2 hs. Los geles se expusieron sobre películas AGFA-GERVAERT Curix RP1 a temperatura ambiente, en tiempo variable según la actividad del radioactivo utilizado.

2.26 SECUENCIACION AUTOMATICA

Se usó el sistema de secuenciación modelo 373 de Applied Biosystems, que es un instrumento automático con barrido de gel. El ADN se preparó como se describe más adelante. Las reacciones de secuenciamiento se

llevaron a cabo con oligonucleótidos marcados con colorantes fluorescentes o con dNTPS marcado como se describe más adelante

Los fragmentos marcados con el colorante son sometidos a una electroforesis en gel de poliacrilamida y separados por su tamaño. Cuando los fragmentos alcanzan una posición fija por encima de la cámara inferior del buffer, la fluorescencia de los colorantes es excitada por la luz del láser, el cual hace UN barrido de atrás hacia adelante a lo largo de esta área del gel. Un tubo fotomultiplicador (PMT) detecta la luz fluorescente y lo convierte en una señal eléctrica. Estas señales son luego transmitidas a la computadora y almacenadas para su procesamiento.

2.26.1 Reacciones (Kits “ Prism Ready Reaction” de Perkin Elmer)

Dye terminator (oligonucleótido sin marcar)

- ADN molde: 1µg
- Oligonucleótido: 32 pmoles
- Mezcla de reacción: 9.5 µl (contiene los dNTPS+ dNTPs modificados, buffer de reacción y la AmpliTaq® polimerasa)
- Agregar H₂O csp 20 µl

Reaccion de PCR

96° C	30 seg	} 25 ciclos
50° C	5 seg	
60° C	4 seg	

Mantener a 4°C

Purificación de las muestras :

- Cada tubo de reacción se pasa a un tubo Eppendorf® de 1.5 ml y se agregan 2.5 µl de CTAB 5% y mezclar bien todo a temperatura ambiente.
- Centrifugar 3-4 min 12000 rpm.
- Descartar el sobrenadante y agregar 50 µl de NaCl 1.2 M y 125 µl de EtOH absoluto, mezclar bien con pipeta.

- Centrifugar 5 min.
- Sacar sobrenadante y agregar 500 μ l de EtOH 70%.
- Secar el precipitado en vacío.

Dye primer (oligonucleótido marcado)

Reacciones de PCR

- Se preparan un tubo Eppendorf® de 0.2 μ l para cada nucleótido (4 en total):

	A	C	G	T
ADN (200ng/ μ l)	1 μ l	1 μ l	2 μ l	2 μ l
Mezcla de reacción	4 μ l	4 μ l	8 μ l	8 μ l
95°C 30 seg	} 15 ciclos			
55°C 30 seg				
70°C 60 seg				
95°C 30 seg	} 15 ciclos			
70°C 60 seg				

Mantener a 4°C

Purificación de las muestras:

- Transferir el contenido de los cuatro tubos a un tubo Eppendorf ®
- Agregar 80 μ l de EtOH 95% + 1.5 μ l de NaAc 3 M frío
- 10 min a 15 min en hielo.
- Centrifugar a 13000 rpm 15 min a 4°C.
- Lavar el precipitado con 250 μ l de EtOH 70%.
- Secar el precipitado en vacío.

2.27 PREPARACION DE MEMBRANAS DE YACs

- Autoclavar las membranas intercaladas en papel Wattman.
- Descongelar los glicerolos a 4°C.
- Inocular 100-200 μ l de cultivo en medio SD (URA-); (TRP-).

- Recongelar inmediatamente los glicerolos.
- Incubar a 30°C durante 24-48 hs.
- Tratar las membranas con papel Wattamn embebido en solución SCEM + 1mg/ml Zymolyase 60-T
- Dejar toda la noche a 30°C
- Colocar la membrana 5 min en un Wattman embebido en 10% SDS.
- Colocar la membrana 5 min en un Wattman embebido en 0,5 M de NaOH.
- Colocar la membrana 5 min en un Wattman embebido en 2XSSC, 0.2 M Tris-HCl pH=7.5.
- Dejar secar brevemente en un Wattman.
- Repetir los pasos 8,9,10 hasta ver desaparecer las colonias (más o menos 3 veces) y luego prehibridar.

2.28 PROTOCOLO DE BLOQUES DE YACS

Antes de comenzar:

Preparar 50 ml de solución de agarosa (Ver REACTIVOS Y SOLUCIONES). Fundir en microondas, agregar el 2-Me y dejar equilibrar en un baño a 40°C. Colocar una cinta adhesiva en una cara de los moldes para bloques.

- Crecer un cultivo en medio rico YPD durante toda la noche hasta llegar a saturación (aproximadamente 5×10^7 - 1×10^8 cel/ml). Hacer una dilución 1:10 en agua y contar las células en una cámara de Neubauer.
- Centrifugar 1.5 ml de células a 1000 x g por 5 min y remover el sobrenadante.
- Resuspender las células en 1.2 ml de 50 mM EDTA (pH=8). Volver a centrifugar.
- Resuspender el pellet en 50 μ l de solución I y agregar suficiente solución de enzima para llegar a una concentración final de 1 mg/ml de enzima (5 μ l), de manera tal de tener 2×10^9 levaduras/ml.
- Calentar la mezcla brevemente a 40°C.

- Inmediatamente agregar un volumen igual de solución de Agarosa (55 μ l, concentración final de 1×10^9 levaduras/ml de bloque).
- Mezclar con un tip cortado en la punta y colocar la muestra rápidamente en el molde de los bloques.
- Dejar los moldes a 4°C por 10 min para que solidifique la agarosa.
- Colocar los bloques en 1ml de solución II por ml de bloque.
- Incubar 2hs a 37°C.
- Reemplazar la solución II por 1ml de LDS por ml de bloque.
- Incubar a 37°C por 1hs y luego reemplazarla con la misma solución e incubar a 37°C toda la noche.
- Lavar los bloques con 1 ml de 20% NDS por ml de bloque durante 2 hs a Temperatura ambiente. Repetir el lavado

2.29 PURIFICACION DE ADN TOTAL DE YACs POR EL METODO DE ESFEROPLASTOS

- Colocar una colonia aislada crecida en medio AHC fresco o un pequeño número de células a partir de un cultivo en glicerol congelado en 5 ml de AHC en un tubo de centrifuga de polipropileno de 50 ml.
- Incubar de 24 a 48 hs a 30°C en shaker (250 rpm) hasta llegar a fase logarítmica o a una $DO_{650}=1$.
- Centrifugar 5 min a $1600 \times g$ (3000 rpm) a temperatura ambiente. Descartar el sobrenadante.
- Resuspender el pellet en 10 ml de 50 mM EDTA pH=8. Mezclar con vortex.
- Centrifugar 5 min a 1600g. Descartar el SN. Resuspender el pellet en 50 mM EDTA pH=8.
- Centrifugar 5 min a $1600 \times g$. Descartar el SN. Resuspender el pellet en 100 μ l SCE. Incubar 5 min a temperatura ambiente.
- Agregar 100 μ l de SCE+200 U/ml de zymoliase y 20 μ l de 0.28 M de 2-Me. Incubar 2 hs a 37°C agitando durante la incubación.

- Agregar los esferoplastos a un tubo que contenga 220 μ l de solución de lisis. Agitar el tubo mientras se agregan los mismos.
- Incubar 2 hs a 50°C.
- Extraer el ADN con fenol:cloroformo:Isoamílico 25:24:1, precipitar con $\frac{1}{2}$ vol. de 7.5 M NH₄Ac y 2.5 vol. de EtOH 100%.
- Secar el pellet de ADN con vacío. Resuspender el pellet en 100 μ l de TE.
- Opcionalmente agregar 2 μ l de ARNasa libre de ADNasa. Incubar 15 min a 37°C.
- Repetir los pasos 10 y 11.

2.30 TRANSFORMACION DE ESFEROPLASTOS DE LEVADURA

- Crecer un cultivo de 50 ml de levaduras (50 ml en un erlenmeyer de 500 ml) con buena agitación para asegurar buena aireación a 30°C toda la noche hasta llegar a un DO₆₆₀=1.
- Centrifugar las células a 3100 x g, por 3 min a ~5°C.
- Lavar 1 X con agua, 20-50 ml.
- Lavar 1 X con 1 M sorbitol, 20-50 ml.
- Agregar 20 ml SPE y agitar con vortex; después agregar 20 μ l de Zymolyase 20T y 40 μ l de 2-Me 14 M y mezclar con vortex.

Los próximos pasos deben ser suaves.

- Incubar a 30°C por 20 min con agitación suave.
- Test de lisis:

A varios tiempos antes de los 20 min, medir la DO₆₆₀ de:

A. Células tratadas después de diluir 1:10 en 1M sorbitol

B. Células tratadas después de diluir 1:10 en 2% SDS

Las células están listas cuando la diferencia entre las dos lecturas es de 3 a 7 veces

- Lavar 2-3 veces en 25 ml de 1 M sorbitol. Centrifugar a 600 x g por 10 min a ~5°C
- Resuspender suavemente en 2 ml STC. Estos esferoplastos pueden ser mantenidos hasta 1 hs a temperatura ambiente

2.30.1 Transformación con el vector RAT y el ADN genómico blanco.

- Mezclar 1 µg (10 µl) del vector TAR linealizado y 5 µg de ADN genómico aislado suavemente de un bloque de agarosa profundido tratado con beta-agarasa.
- Agregar 500 µl de esferoplastos competentes a la mezcla de ADN.
- Mezclar con cuidado e incubar 10 min a temperatura ambiente.
- Agregar 8.0 ml de solución de PEG. Mezclar suavemente. Incubar 10 min a temperatura ambiente.
- Centrifugar 5 min a 600 x g, 5°C.
- Agregar 2 ml SOS y mezclar a mano. Incubar 40 min a 30°C sin agitación.
- Fundir TOP agar (mismos ingredientes que las placas) y poner en un baño a 48°C.
- Poner a equilibrar tubos de plástico a 48°C. Se necesitarán 5 tubos por cada transformación. Una vez equilibrados, poner 8 ml de TOP agar en cada tubo.
- Agregar 400 µl de la suspensión en SOS a cada tubo conteniendo el TOP agar. Mezclar suavemente.
- Plaquear rápidamente.
- Permitir solidificar.
- Incubar las placas a 30°C. Las transformantes pueden ser vistas a partir del tercer día.

2.31 TRANSFECCION DE EPIMASTIGOTES DE *T. cruzi*

Las electroporaciones se llevaron a cabo con un electroporador BioRad® gene pulser según las siguientes condiciones: Se crecieron epimastigotes de la cepa Tulahuen II o CL Brener de *T.cruzi* en medio LIT a 28°C hasta alcanzar una densidad de 10⁷ parásitos/ml (10 ml totales). Luego fueron recolectados por centrifugación, lavados 1 vez con PBS 1X y resuspendidos en 0.35 ml de buffer de electroporación (PBS 1X, 0.5 mM

MgCl₂, 0.1 mM CaCl₂) Luego se mezclaron con 100 µg de ADN plasmídico (purificado con columnas de Quiagen®) o con un volumen equivalente de buffer TE en cubetas de electroporación de 0.2 cm. Las células fueron electroporadas con un único pulso de 400 V 500 µF con constantes de tiempo que variaron entre 3.8 y 4.8 msec. Posteriormente las células fueron diluidas en 10 ml de medio LIT e incubadas 24 hs a 28°C. Luego se las pasó a medio LIT con G418 para seleccionar los clones resistentes.

2.32 REPARACION DE BLOQUES DE *T. cruzi*

- Cosechar los parásitos por centrifugación a 1500 rpm 10 min, lavar 2 veces con PBS 1X/Glucosa 2% y determinar el número de células totales en cámara de Neubauer.
- Resuspender las células en PBS 1X/Glucosa 2% a una concentración de 2x10⁸ parásitos/ml y calentar levemente (~30 seg) a 50°C.
- Agregar un volumen igual de 1.4% de agarosa SeaPlake en PBS 1X previamente equilibrada a 50°C. Mezclar y transferir a los moldes.
- Dejar endurecer 5-10 min en hielo.
- Incubar las muestras en 3-5 volúmenes de DB 0.5 por 48 hs a 50°C con agitación suave.
- Guardar las muestras a 4°C.

2.33 PREPARACION DE EXTRACTOS DE *T. cruzi* PARA ENSAYOS CAT

- Centrifugar los cultivos a 3000 rpm 10 min.
- Resuspender en 1 ml PBS 1X y pasar a Eppendorf®.
- Centrifugar a 3000 rpm 10 min.
- Resuspender los parásitos en 150 µl de 0.25 M Tris-HCl pH=8.
- Congelar y descongelar 3 veces en nitrógeno líquido, mezclando con vortex después de cada descongelado para asegurar buena homogenización. La correcta lisis de los parásitos es fundamental.
- Incubar a 65°C 10 min.
- Centrifugar a 13000 rpm 10 min.
- Transferir 100 µl de SN a un nuevo tubo.

2.34 MEDICION DE ACTIVIDAD CAT

- Preparar la mezcla siguiente por cada extracto: cloranfenicol C¹⁴ (0.25 mCi/ml) 3 µl, n-butil CoA 5.4 µl, Tris-HCl 0.25 M pH=8 51 µl.
- Mezclar 40 µl del extracto con 60 µl de la mezcla.
- Incubar a 37°C.
- A los 20 min extraer 30 µl de cada muestra con 70 µl de xileno. Mezclar bien con vortex.
- Centrifugar y pasar 50 µl de la fase orgánica a un nuevo tubo.
- Re-extraer el primer tubo con 75 µl de xileno. Mezclar bien con vortex.
- Centrifugar, tomar 75 µl de la fase orgánica y mezclar con los 50 µl anteriores.
- Extraer el combinado con 75 µl de 0.25 M Tris-HCl pH=8. Mezclar bien con vortex.
- Centrifugar y colocar 80 µl de la fase orgánica en un vial.
- Agregar a cada vial 2 ml de tolueno omnifluor.
- Medir actividad en contador de centelleo.

2.35 PURIFICACION DE BANDAS CROMOSOMICAS A PARTIR DE GELES PREPARATIVOS CORRIDOS EN PFGE O FIGE

- Cortar el fragmento de agarosa SeaPlake que contiene la banda de ADN a purificar.
- Estimar el volumen y agregarle un volumen similar de buffer TE. Fundir a 65°C de 5 a 10 min.
- Agregar 1 volumen de fenol-Tris a temperatura ambiente. Mezclar por inversión.
- Centrifugar 5 min a 10000 rpm y transferir la fase acuosa a un nuevo tubo. Repetir la extracción con fenol.
- Centrifugar como antes y transferir la fase acuosa a un nuevo tubo que contiene 0.1 volúmenes de LiCl 4M. Mezclar por inversión; un

precipitado blanco se forma inmediatamente. Colocar el tubo en hielo 2 min. Centrifugar a 10000 rpm 5 min.

- Transferir a un nuevo tubo sin tomar el pellet transparente. Agregar 2 μ l de glicógeno cada 50 μ l de SN y precipitar con 2.5 volúmenes de etanol frío. Mezclar y dejar a -70°C 30 min.
- Centrifugar a 10000 rpm, 15 min. Lavar el pellet con 5 ml de etanol 70%.
- Dejar secar y resuspender en 120 μ l de agua o TE

2.36 CONSTRUCCIÓN DE LA BIBLIOTECA YAC

2.36.1 Preparación de ADN genómico de *T. cruzi* para construir las bibliotecas YAC

Se prepararon bloques de agarosa conteniendo aproximadamente 20 μ g de ADN genómico del clon CL Brener según se describe anteriormente en el punto 24 de materiales y métodos.

2.36.2 Digestión parcial del ADN genómico de CL Brener

Se preincubaron los bloques de agarosa en buffer de digestión en presencia de 10 mM de MgCl_2 y luego se agregó 5 U de *EcoRI* por cada μ g de ADN y se incubó a 37°C por 1 h 30 min. La reacción se detuvo agregando EDTA hasta llegar a una concentración final 20 mM. El fraccionamiento por tamaño del ADN fue seguido por PFGE preparativos.

2.36.3 PFGE preparativos del ADN digerido parcialmente

Se sembraron los bloques conteniendo ADN digerido parcialmente en un gel preparado con agarosa SeaPlake 0.8% en buffer TBE 0.5X. Luego los fragmentos de ADN de distinto tamaño se separaron por PFGE usando las siguientes condiciones: 140 V, 18 hs, 12°C con pulsos de 60 seg. En estas condiciones, los fragmentos de más de 400 kpb quedan retenidos en la zona de compresión del gel. Se extrajo el ADN de esta región y se la dejó equilibrando en buffer de ligación.

2.36.4 Preparación del vector pYAC4

Se linearizó el vector pYAC4 por digestión con *Bam*HI y luego se defosforilaron ambos extremos. Después de extraer con fenol-cloroformo y precipitar con etanol, se digirió el sitio de clonado con *Eco*RI, seguido por defosforilación, extracción con fenol-cloroformo y precipitación con etanol.

2.36.5 Ligación y transformación del ADN y transformación de esferoplastos de levadura

Las tiras de agarosa que contienen el ADN digerido seleccionado se lavaron 2 veces en buffer de ligación (66 mM Tris-HCl, pH 7.5; 10 mM MgCl₂) sin ATP. Luego se le agregó un exceso 80 molar del vector y se fundió las tiras de agarosa a 68°C por 10 min y la mezcla se cargó en moldes antes de dejar solidificar a temperatura ambiente. La agarosa se equilibró posteriormente en buffer de ligación en presencia de 1 mM de ATP y 15 U de T4 ADN Ligasa (Boehringer Mannheim, Germany) por cada 1 g de agarosa. La ligación se llevó a cabo a 4°C por 1 h y luego a 14°C durante toda la noche. Los productos de ligación fueron seleccionados por tamaño según se describe en 2.36.3. Finalmente, se cortó la región del gel que contiene el ADN ligado de los parásitos y se la dejó equilibrando en buffer de β -agarasa. Luego de degradar la agarosa con β -agarasa, se procedió a transformar esferoplastos de levadura según lo descrito en el punto 22 con 10 μ l de la ligación, plaqueando en medio sólido SD sin uracilo e incubando a 30°C durante 6 días. Las colonias rojas se picaron en placas con doble selección sin uracilo ni triptofano.

2.37 DIGESTIÓN DE BLOQUES DE *T. cruzi* CON Bal31

- Equilibrar cada bloque en 1 ml de buffer TE a 4°C por 1 h.
- Sacar el TE y agregar 1 ml de buffer *Bal31*. Dejar a 4°C por 1 h.
- Sacar el buffer y agregar 200 μ l de nuevo buffer *Bal31* conteniendo las unidades de enzima requeridas. Incubar a 4°C 1 h.
- Incubar a 37°C durante 2 hs.

2.38 ESTUDIO DE LA DISTRIBUCIÓN DE NUCLEOTIDOS

- Los parámetros *GC skew* y *AT skew* acumulativos, fueron calculados utilizando una ventana de 10000 nucleótidos según la fórmula 1, donde X_i es el puntaje acumulado por el algoritmo; L es la longitud de la secuencia analizada; j es la posición de la ventana dentro de la secuencia; δ_R es el número total de purinas (ya sea G o A) y δ_Y es el número total de pirimidinas (ya sea G o T).

$$X_i = \sum_{L=1}^{L-10000} \left[\sum_{j=1}^{J+10000} [(\delta_R - \delta_Y) / (\delta_R + \delta_Y)] \right] \quad 1$$

- El exceso de purinas fue calculado según la ecuación 2, donde X_i es el puntaje acumulado por el algoritmo; L es la longitud de la secuencia analizada y δ_N es el puntaje acumulado por el nucleótido N (A, T, G o C) desde la posición 1 hasta la posición L .

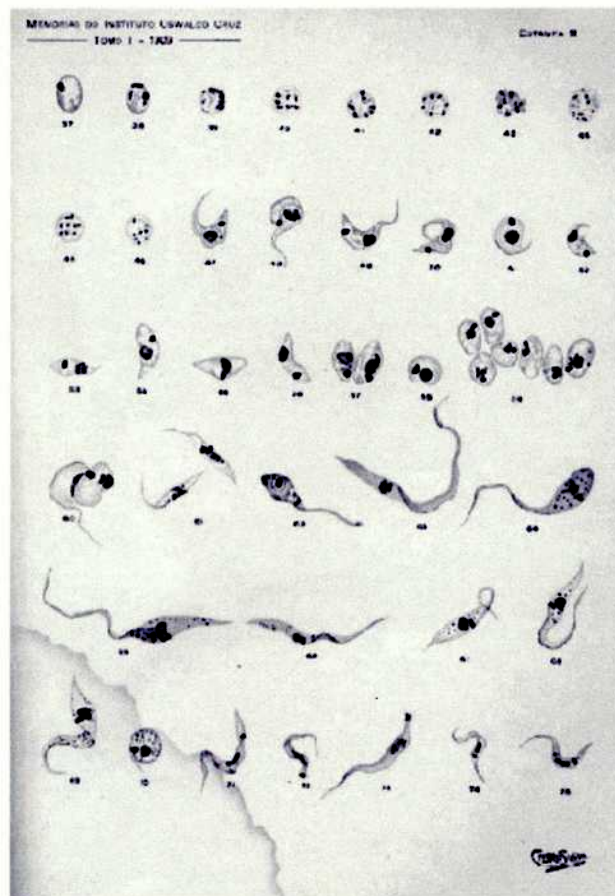
$$X_i = \sum_{1}^L [\delta_A + \delta_G - \delta_T - \delta_C] \quad 2$$

- El exceso de secuencias codificantes fue calculado según la ecuación 3, como la sumatoria de todos los nucleótidos encontrados a lo largo de una secuencia codificante (δ_{COD}) menos los nucleótidos que pertenecen a una secuencia molde (δ_{MOL}). Las bases que se encuentran en las regiones no codificantes suman cero. L , es el largo total de la secuencia y X_i es el puntaje acumulado por el algoritmo.

$$X_i = \sum_{1}^L [\delta_{COD} - \delta_{MOL}] \quad 3$$

RESULTADOS

PARTE I



RESULTADOS

3. Caracterización de marcadores genómicos asociados a la secuencia repetida SIRE (SAS, sitios asociados a SIRE)

Con el fin de incrementar el número de marcadores genómicos que permitan la construcción del mapa físico del genoma de *T. cruzi*, se rastreó una biblioteca genómica de *T. cruzi* construida en el fago λ ZAPII utilizando una sonda específica de la secuencia repetida SIRE. Se aislaron así, 17 fragmentos genómicos positivos para dicha secuencia. Se generó un mapa de restricción de cada uno por análisis con enzimas de restricción y Southern blot (Fig 3.1). La secuenciación de los extremos de los distintos fragmentos aislados permitió determinar que correspondían a distintos loci.

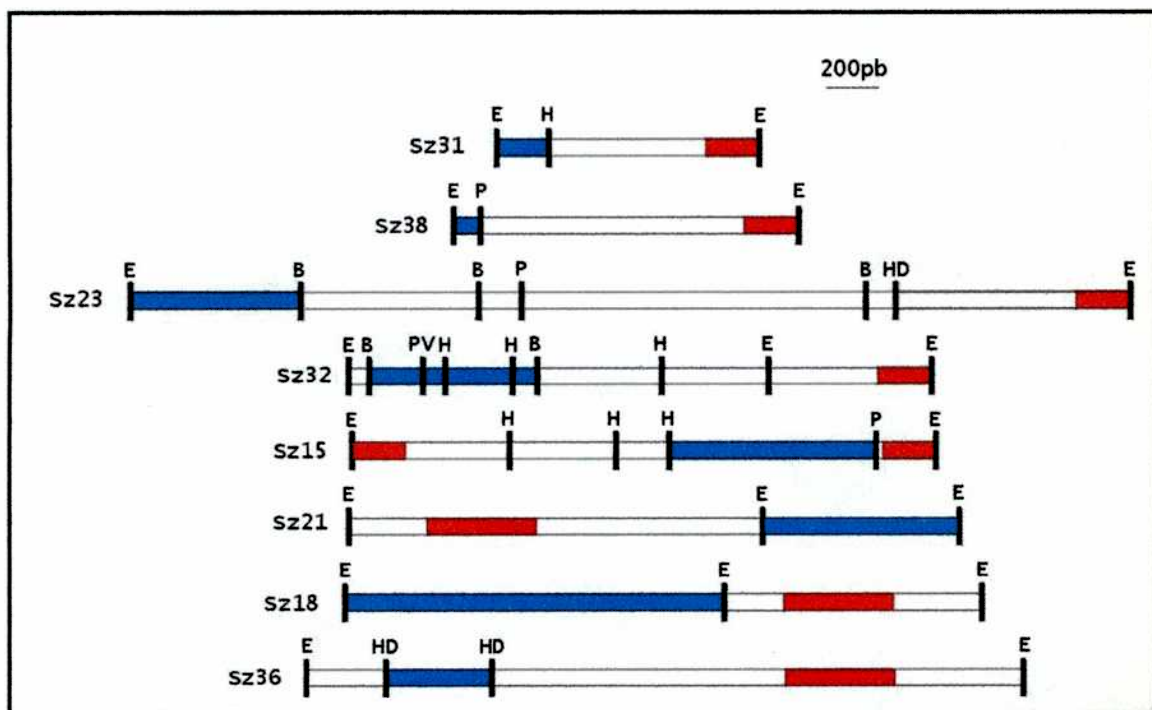


Figura 3.1: Mapa de los clones SZ. Los rectángulos naranjas indican las regiones correspondientes al elemento repetido SIRE y los rectángulos azules corresponden a las secuencias utilizadas como SAS. E: *EcoRI*, H: *HincII*, P: *PstI*, B: *BamHI*, HD: *HindIII*, PV: *PvuII*.

Las regiones adyacentes al elemento repetido SIRE, llamadas SAS (de

Secuencia Asociada a SIRE) fueron utilizadas como sondas para determinar su localización cromosómica por Southern blot de cariotipos electroforéticos del clon CL-Brener (PFGE, ver materiales y métodos, pag 47). Los marcadores así generados se resumen en la tabla 3.1.

SAS	longitud (pb)	No. De bandas en Southern blot	Bandas cromosómicas	Homologías
sz2	360		-	Sin homología
sz5	700	2	III, VII	ORF : Familia DEAH de helicasas de ARN y familia EIF-6
sz7	200 y 240	1	VII, XV	Sin homología
sz10	250	5	-	SZ12, SZ31, gen FL-160 de <i>T.cruzi</i> , vp85 de <i>T.cruzi</i>
sz12	700	Varias		SZ31, SZ10, gen FL-160 de <i>T.cruzi</i> , vp85 de <i>T.cruzi</i>
sz14	900		XIII, XVI, XVII, XVIII, XIX	SZ23, <i>T.cruzi</i> GP85/Sialidasa
sz15	2000	Varias	-	Transcriptasa reversa de retrovirus
sz18	1000	-	-	Sin homología
sz23	640	5	XIII, XVI, XVII, XVIII, XIX	SZ14; ORF : Sin homología
sz31			-	SZ10, SZ12, gen FL-160 de <i>T.cruzi</i> , vp85 de <i>T.cruzi</i>
sz32	600	1	VI, VII	Sin homología
sz36	1900	1	-	Sin homología
sz38	100	-	-	Sin homología
sz39	1000	1	II, X, XII, XV	ORF Sin homología

Tabla 3.1: Detalle de los SZ caracterizados hasta el momento:

Un estudio más detallado de las secuencias, permitió identificar marcos de lectura abiertos, u ORFs, por Open Reading Frame, en los SAS SZ5, SZ10, SZ12, SZ14, SZ15, SZ23, SZ31 y SZ39.

3.1 Caracterización de los fragmentos SZ10, SZ12 y SZ31

Los ORFs correspondientes a SZ10, SZ12 y SZ31 presentaron homologías significativas entre sí y con la región que codifica para el extremo C-terminal de la proteína *vp85* de *T. cruzi* (AF051695), que está relacionada con la virulencia de este parásito [Weston D, 1999].

Es interesante notar, que la secuencia no codificante localizada río abajo de los ORF mencionados (region 3' UTR), también está muy conservada, no

sólo entre estos SAS y la región 3' UTR del gen que codifica para *vp85*, sino también con una porción de 181pb correspondiente al 3' UTR del gen FL-160 (AF080220) y de la secuencia repetida E22 de *T. cruzi* (Fig 3.2, X95485). Esta región, denominada TcREL, se encuentra flanqueada por largos poliTs. Las secuencias correspondientes a esta region presentan mas de un 70% de identidad. Este análisis permitió detectar una nueva secuencia repetida, TcREL, que podría jugar algún papel en la regulación de la expresión de los genes que la contienen.

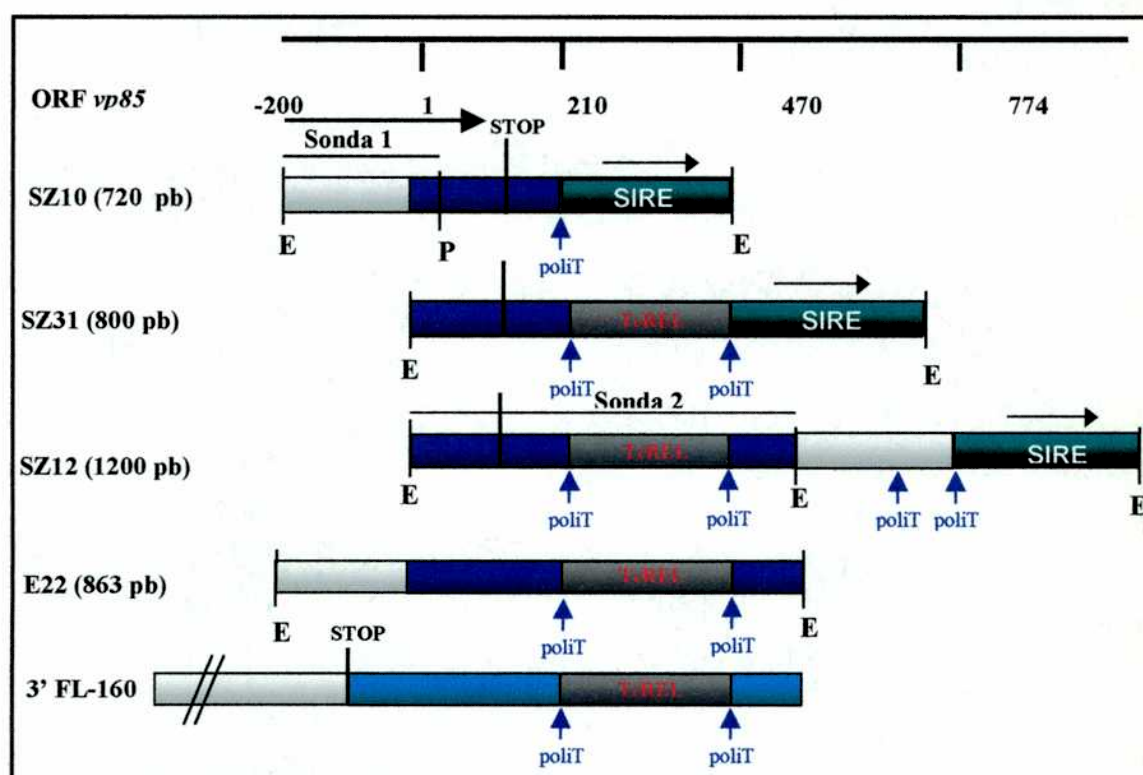


Figura 3.2: Esquema de los clones SZ10, SZ31, SZ12, E22 y región 3' del gen que codifica para la proteína FL-160. Rectángulo verde, secuencia SIRE; rectángulo gris, secuencia TcREL (70% de identidad); rectángulo azul, zonas con 50% a 60% de identidad; rectángulo celeste, región 3' no codificante del gen FL-160; rectángulo blanco, regiones sin homología significativa; STOP, codón de fin de traducción; poliT, región rica en el nucleótido timidina; E, sitio *EcoRI*. Las flechas indican la orientación 5' → 3' de la secuencia codificante del gen que codifica para la proteína *vp85* y de la secuencia repetida SIRE. En la parte superior del gráfico se indican las distancias en nucleótidos relativas al extremo 5' de los clones SZ31 y SZ12.

Ensayos de Southern blot utilizando una sonda específica de la región 5'

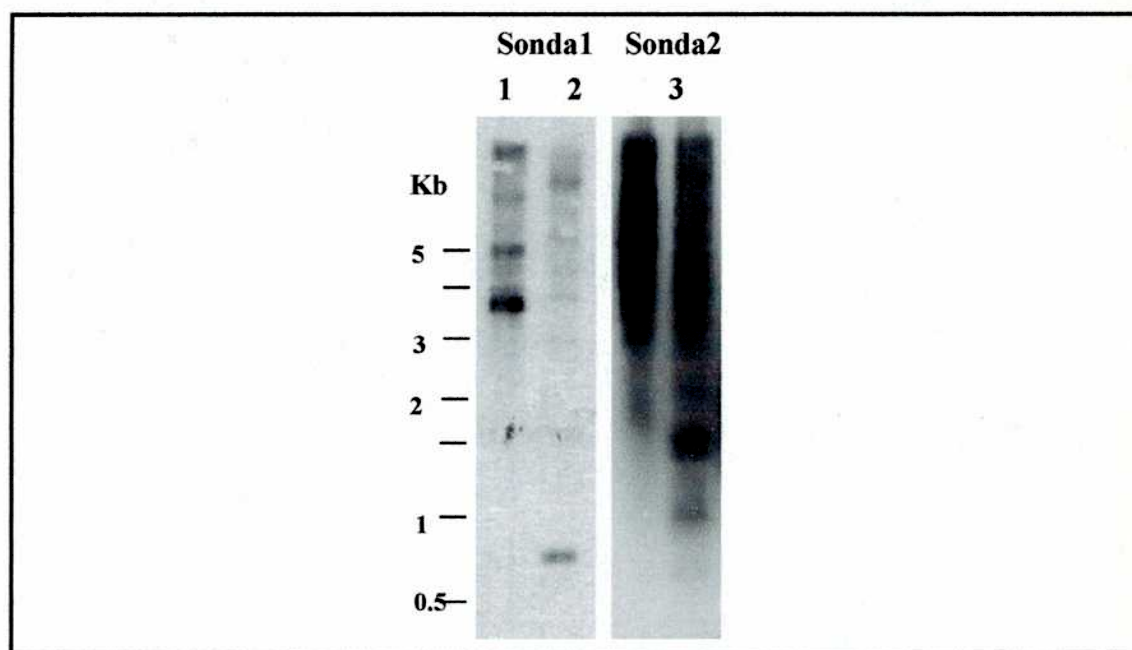


Figura 3.3: Southern blots a partir de ADN genómico de la cepa Tulahuen II de *T. cruzi* digerido con *EcoRI* (1) y *BamHI* (2). Panel izquierdo y derecho, hibridación con sonda 1 o 2 respectivamente (ver figura 2).

En la figura 3.4, se muestra el alineamiento del SAS SZ12 con las regiones 3' de los genes *vp85*, *FL160* y del elemento *E22*.

[illegible]

Figura 3.4: Alineamiento de secuencias correspondientes a los fragmentos SZ12, E22, región 3' codificante y no codificante del gen vp85.1 y región 3' no codificante del gen FL160 (FL160-2). En rojo con fondo amarillo se indica la posición de los codones STOP. Solo rojo indica la secuencia consenso TcREL y en azul la región rica en Ts. Las minúsculas y mayúsculas indican nucleótidos poco y muy conservados, respectivamente.

El análisis de los ORFs correspondientes a los SAS SZ14 y SZ23, permitió

determinar que ambos eran homólogos (identidad mayor al 70%) al extremo 5' del fragmento genómico pVATc17 de *T. cruzi* (No de Acceso GenBank AF100651) [Chiurrillo MA, 1999]. pVATc17 forma parte de una región subtelomérica, y esta localizada a 1000 pb río arriba de la secuencia telomérica. Usando SZ23 como sonda, se rastreó la dbEST del GenBank. Se detectaron por lo menos 10 ESTs de *T. cruzi* homólogos a las tres secuencias mencionadas, sugiriendo que este tipo de *locus* se expresa en epimastigotes.

A diferencia de los fragmentos SZ10, 12 y 31, la región ubicada río abajo de los ORFs de SZ14 y 23 no esta conservada. Sin embargo, la organización genómica de los *loci* SZ14, 23 y pVATc17 es similar. Río abajo del ORF se encontró una secuencia repetida SIRE insertada en la misma orientación pero a distinta distancia con respecto al codón STOP de cada fragmento (Fig 3.5).

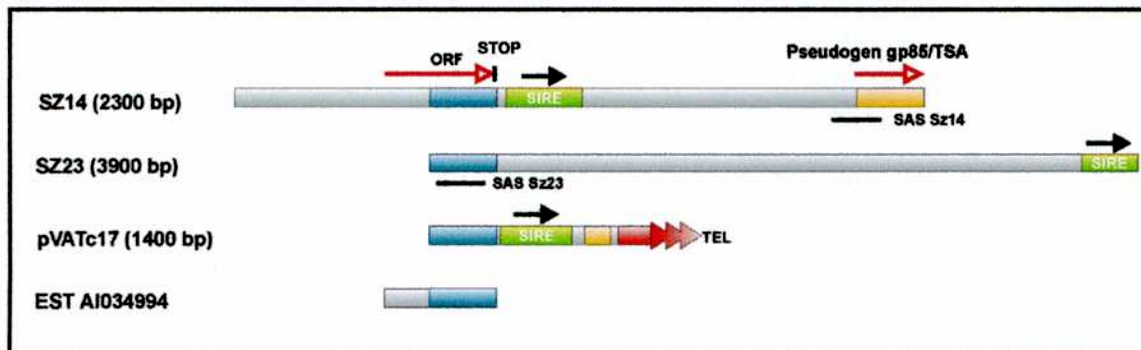


Figura 3.5: representación esquemática de los fragmentos genómicos SZ14, SZ23, pVATc17 y el EST AI034994. La zona celeste indica región con más de 70% de identidad. El rectángulo amarillo indica homología con el gen que codifica la proteína gp85. El rojo corresponde a la región subtelomérica de *T. cruzi*. Las flechas rojas indican la orientación de los marcos de lectura abiertos y las negras indican la orientación 5'→3' de la secuencia repetida SIRE.

3.3 Caracterización del fragmento SZ5

El ORF correspondiente a la región 5' del fragmento SZ5, denominado gen TcRH1, presentó una homología significativa ($E < 10^{-10}$) con la subfamilia de helicasas de ARN, DEAH-box [Wagner J, 1998]. Esta familia de proteínas interviene en el mecanismo de *cis*-splicing en eucariotas superiores

[Lüking A, 1998].

Análisis de Southern blot indicaron que TcRH1 es un gen de copia única en CL Brener (Fig 3.6).

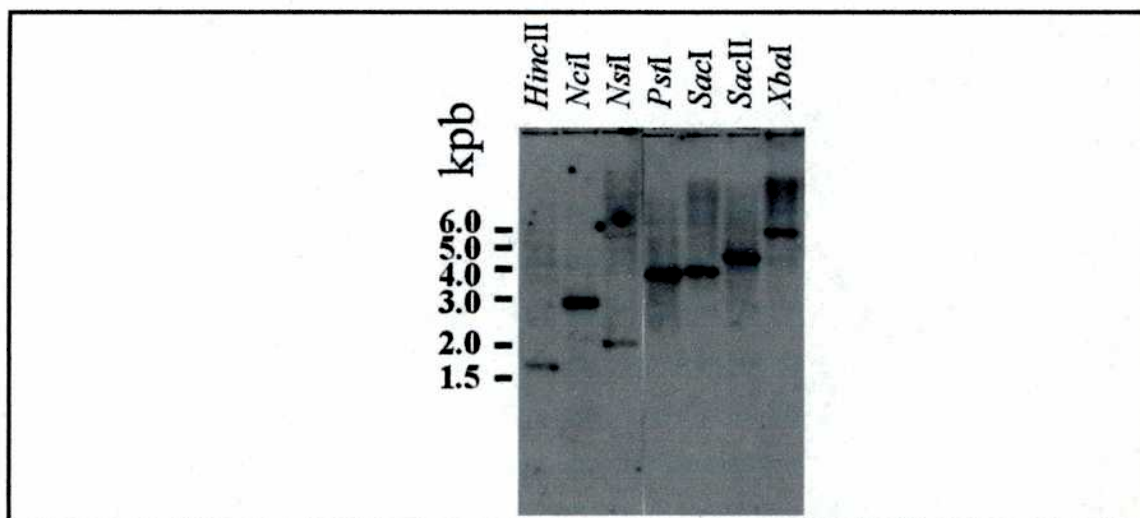


Figura 3.6: Southern blot a partir de ADN genómico del clon CL Brener hibridado con el SAS SZ5. En la parte superior se indican las enzimas de restricción utilizadas. A la izquierda se detallan los pesos moleculares correspondientes.

Ensayos de Northern blot utilizando una sonda del gen TcRH1, indicaron que el mensajero correspondiente tenía un tamaño de aproximadamente 3.0 kb (Fig 3.7). Este tamaño corresponde al mensajero esperado teniendo en cuenta la secuencia completa del gen (ver pag 74 de la secuencia).

Para clonar la región 5' del gen TcRH1, se realizó una reacción de RT-PCR a partir de ARN total del estadio epimastigote de la cepa Tulahuen II de *T. cruzi* utilizando los primers Z5 y MX (específicos de la región 5' del fragmento SZ5 y la región 3' del miniexón de *T. cruzi* respectivamente).

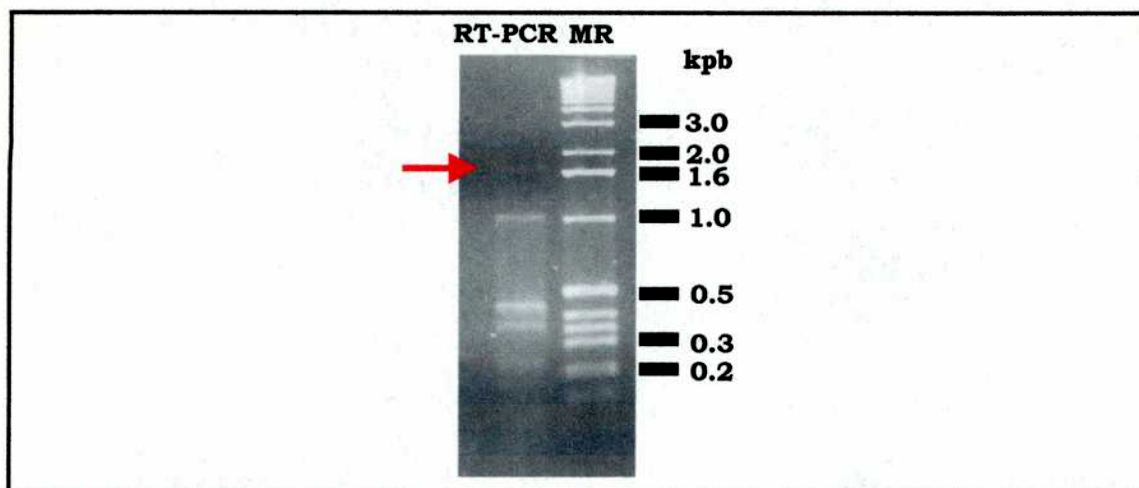


Figura 3.7: Amplificación por RT-PCR con los primers MX y Z5 del extremo 5' del ARNm que codifica para TcRH1. La flecha indica la banda que por Southern blot da positiva con el SAS SZ5. MR, marcador de peso molecular; RT-PCR, producto de la RT-PCR. A la derecha se indican los pesos moleculares correspondientes.

Debido a que el primer Z5 es complementario a una región conservada de la familia de proteínas DEAH-box de helicasas de ARN, se esperaba obtener varios productos de amplificación, lo que se confirmó posteriormente. Para determinar cual de las bandas contenía el extremo 5' faltante, el Southern de la amplificación se hibridó con el SAS SZ5. De esta manera, se identificó una banda de aproximadamente 1.5 kpb (flecha en Fig 3.7).

Dado que esta banda se encontraba minoritariamente representada, se purificó a partir de geles preparativos y luego se la sometió a una segunda ronda de amplificación por PCR. El producto así obtenido fue clonado en el vector pGEM-Teasy generando el plásmido pRT5. Su secuenciamiento permitió determinar que las primeras 290 pb del extremo 3' eran 100% idénticas al extremo 5' de SZ5, confirmando así que ambos fragmentos comprendían las regiones 5' y 3' del gen TcRH1 (Fig 3.8).

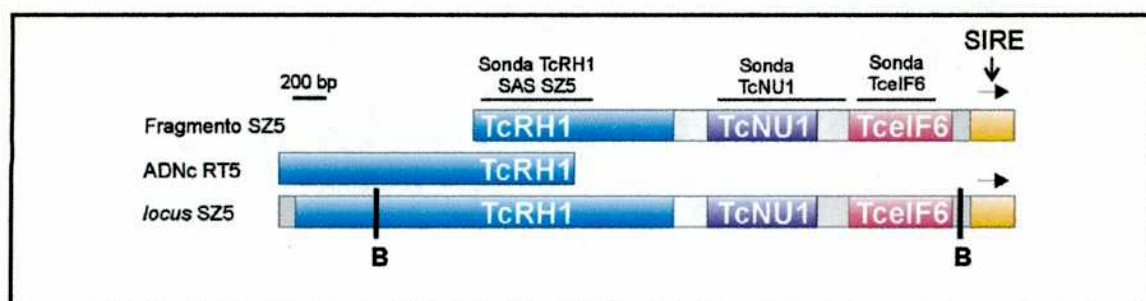


Figura 3.8: Esquema del locus SZ5. Los rectángulos celeste, violeta y rojo indican las regiones codificantes. Los rectángulos amarillos indican la secuencia SIRE. Los rectángulos blancos indican regiones no codificantes. El sitio de restricción *BstXI* es indicado con una B.

La secuencia completa del fragmento SZ5 permitió determinar que el ORF completo del gen TcRH1 tiene una longitud de 2703 pb y codifica para una proteína de 901 aminoácidos con un peso estimado de 100,4 kDa.

	I	Ia	Rv
	GETGSGKtTQxxq	TqPRRvAA	
TcRH1 189	IIVGETGSGKTTQLLYEENLCRTPPCLTEGGDGGGKGKEEKEGEEEGASEEKRFICTQPRRIAASVAERV		263
HRH1 585	.VI.....IT...A.AGYTSRGKIG-----	V..M...K..	630
prp22 503	V.....IT...D..GFSNYGMIG-----	V..V...K..	548
	xxE	vgYxiRf	TxxxyxTDGxLL
TcRH1 264	AQEMNTRCGSIVGYKVRFEKLGPTTRLLFVTDGMMKLKELVGDPELRTVSAIMVDEAHERSINTDILLGLLKDIR		340
HRH1 631	SE.FGCCL.QE...TI..EDCTS.E.VIKYM....L.R.CLI..DLTQYAI..L.....T.H..V.F....KTK		706
prp22 549	.E.VGCKV.HD...TI..EDVT..D..IKYM....LQR.ALL...MSKY.V..L.....TVA..V.FA...KAK		682
	III	II	IV
	SAT	gRxxpv	LVFxx
TcRH1 341	NKQLKVIVASATINAEKL-QFFDGAPIFSIKGTNIPVDVSYLTPMADYVSATAESVLRDCMPPKPLPGDILVFL		414
HRH1 707	RQDM.L..T...LD.V.FS.Y.YE...T.P.RTY..EIL.TK..ET..LD.SLIT.MQIHLEP-----		779
prp22 683	RPE.....T...L.SA.FSEY.LNC..IN.P.KTF..E.L.SQT.QM..IE.ALDC.IDIHINEG-----		698
	IV	V	
	xG	QxxxF	RxxvxaTNiAetSLTiXGxxvVx
TcRH1 415	PGQEDIENCAAAIVKHSQTSGGQLRPLMVLPIYASLPFREQRRRIYEVPPPTTRKVVIAATNIAETSITIDGVVYV		489
HRH1 780	T...E.DTACEILYERMKSL.PDVPE.II..V.SA..SEM.T..FDPA..GS.....L....IY...		855
prp22 699	T...E.DS.CEILYDRVK.L.DSIGE.LI..V.SA..SEI.SK.F.PT.KGS....F.....IY...		773
	VI		
	DxGxxkxxxy S	QRxGRxGRxxxxG	
TcRH1 490	DCGLCKQNYNYQSMVEELRVLPISQASAKQRTGRAGRT-QRECYRSYTVHTFRNELQ		546
HRH1 856	.P.FV..KV..SKTGIDQ.V.T.....Q.K..A.....GPGK...L..ERAY.D.ML		913
prp22 774	.P.FA.I.I..ARAGI.Q.I.S.....Q.N..K.....GPGK...L..ESA.Y..ML		831

Figura 3.9: alineamiento de las secuencias correspondientes a TcRH1, HRH1 y prp22. En negrita se indican los motivos conservados entre los miembros de esta familia de proteínas. Los números romanos indican los dominios característicos que definen la familia de helicasas de ARN DEAH-box. Subrayado se encuentra una inserción rica en los aminoácidos Lys, Gly y Glu presente en TcRH1. Los puntos indican aminoácidos idénticos. Las rayas indican gaps.

La región central del polipéptido (residuos 192-527) contiene los siete dominios conservados (I, Ia, II, III, IV, V, VI) característicos de la subfamilia

de las ARN helicasas DEAH-box [Lüking A, 1998]. Esta porción presenta un 46% de identidad con la región central de la proteína prp22 de *Saccharomyces cerevisiae* y su homóloga humana HRH1, ambas son helicasas DEAH-box involucradas en la liberación del ARNm maduro del spliceosoma [Ono Y, 1994] (Fig 3.9). Confirmando esta identidad, los primeros 191 aminoácidos de TcRH1 contienen una elevada proporción de arginina, aspártico, glutámico y serina, característico de las proteínas prp22, HRH1 y prp16 [Zhou Z, 1998].

Río abajo del gen TcRH1 y río arriba de la secuencia repetida SIRE, se detectaron 2 nuevos ORFs (Fig 3.8). El primero de ellos, denominado TcNU1, se encuentra 223 pb río abajo del codón stop del gen TcRH1 y tiene una longitud de 783 pb. Este ORF codifica para un polipéptido de 261 aminoácidos de longitud con un peso estimado de 29.7 kDa. El segundo ORF, TcEIF6, tiene una longitud de 861 pb y se encuentra 287 nt río abajo del codón stop del gen TcNU1 y 129 pb río arriba de la secuencia repetida SIRE.

```

AAGTGCACGT GTGGAGTTCG GCTTTTGTG CCTCTCTCCG TGTTTGTA TTTCCCCCTG
GAGCAAAAGA ATTTTGTGAG GAATAGAAAA GGCATCCTAA AAAAGGGGGT TAGACGATGG
ATCTGACAA GTCCGCGAAG GCGCAACAAG GCGTCCCGCG ATGCATATCT TCGCAAGCAG
GCACTCAAGC GAGAGAAGCT GCCTCAGCTG TTTTGCAGGA AAAAATATCG GAGATTGAGG
CGGGGGTTTT GCCGCATTCC CTTGCCGAGA TTGAGTTGTT AAGTAAACGC GCCCGAGAAG
TACAGGCCAC TGCTCAACTG CAGATCACAG CGCAACTACG ACAGGAACCT CTTGAGGAGG
ACGGTGCTTT GGCCTCGCAC GCTTCGGATC ACGGTGGCGA TTCGTCAATTA CCGCTCAACC
AGGTGGAATT GATGCAACAG AGCAGTTCTG TGGGCTACCA AGAGAAATCT CACAATTTTG
TGGCAATGGA CGAGTCTGTC GTGGATGAAC GCATCAAGAA ACATGACTTT GTGGAGGATA
AGACAGAGGA ACAGATTAAG CAGGAGCGTA CAGTGGCAAT ACAGGAACAA CACCGCCGTC
TTCAAGAGCA ACGACGATCT CTGCCATTTT ATCATTACG CGAGGCACTC CTTGAAATAA
TTCGAAAGAA CACCGTAGTG ATCATTGTGG GAGAAACGGG GTCTGGCAAG ACCACGCAAC
TGTTGCAATA TCTGTATGAG GAAATCTTT GCAGGACTCC CCCATGTCTA ACTGAAGGTG
GCGATGGTGG TGGGAAGGGG AAAGAAGAAA AAGAAGGAGA GGAAGAGGAA GGGGCGAGCG
AGGAAAAGCG ATTTATTGAT ACTCAGCCTC GACGTATTGC GGCAATCAGC GTAGCGGAGC
GAGTGGCACA AGAGATGAAT ACGCGCTGTG GGAGTATTGT TGGGTACAAG GTACGATTTG
ATGAAAAATT AGGGCCAACG ACGCGGCTTC TTTTGTGAC GGATGGCATG ATGTTGAAGG
AACTCGTTGG AGATCCGAG CTTCCGACCG TCAGTGCCAT CATGGTGGAC GAGGCCCATG
AGCGTTCAAT TAATACGGAT ATTCTCTTTG GCTTGCTGAA GGACATTACC CGCAGGAACA
AGCAGCTGAA AGTGATTGTT GCCAGTGCCA CGATCAATGC CGAAAAGTTA CAGTTCTTTG
ACGGGGCACC CATCTTTAGC ATAAAGGGAA CGAACATTCC TGTCGATGTG TCGTACTTAA
CAGAGCCGAT GGCAGACTAT GTGAGTGCCA CTGCTGAGTC CGTCTCCGT GATTGCATGC
CACCAAAACC CTTACCGGGG GACATACTTG TGTTCCTTCC CGGTCAAGAA GATATTGAAA
ACTGCGCCGC CGCCATCGTG AAGCATAGCC AAATTCAGG TGGGCAACTG CGTCCCTTGA
TGGTGCTACC CATCTACGCA TCTCTCCAC CACGAGAGCA AAGGCGTATT TACGAGGTCC
CACCAAAAC CACACGGAAG GTTGTGATCG CGACAAACAT TGCTGAAACA TCCATCACTA
TCGATGGAGT GGTGTACGTC GTGGATTGTG GGCTTTGCAA GCAAAACATAT TATAATTACC TcH
AGTCCATGGT GGAGGAATTG CGTGTGTTGC CAATCTCGCA AGCCAGCGCT AAGCAGAGAA
CAGGTGAGC AGGACGAAC CAAAGGGAGT GTTACCGTTC GTACACGGTC CACACCTTTT
GTAATGAGCT TCAGCAAGAA ACGGTTCCGG AGATTACGCG GAGTTGTATG AGTTCTGTTG
TTTTACAGCT GAAGGCGCTT GGTATTGATA ATTTGTTACA GTTTGAGTTT ATTGATGCAC
CCTCTACGGC CTCGTTGGAA CGGGCTTTGG CCACCTTTAC CTGCTGGCGC AATTTAAACC
GAATGGTGG TGCATTACC GGAAGACGCA TGGCAGAATT TCCACTGGAT CCCTCACTGA

```

```

GCAAAATGTAT TCTTCGTGGG AGCGCTTTGT GGTGTCTTCG TCACATGTCA ATTGCCGTGG
CGATGCTCAC TCTCGACTCG GTGTTTGTGG TGAGTCGGGA TCCGAAGGAG CGGGCTTCTA
TGGCGAGTGC TAGAGACGTT TTGTTTTCGG CTGGAACCGG TGATGTCATG GGGTACGTGA
GGTTAATGGA AGAGTGGATG CGTGACGCCC CCTCGATGCA TGAGTTCGT CAATCACACT
CAGTGAAACGC AAAGGCTCTT CTGCCAGCTC GAGACGTGTT GGATCACATA CTACACACAT
GTGAACGCTCT AGGCCTTGAT TTGCCAGTG GAAGACCAGG AAACATCGCT CTCTATGGAT
CCTTTCGTGG GGGCCTTAC CTTATGAATG TTGCCAAAT TGAATGCCGA CCGGAGGACT
TATCTGATTG TGGCCCGAGA GATGCCCTCG TAAGCCGAG TGCTCACAA CATAATAATT
ACAATGCATT GGATGCCGAG GAAACGGCAA CGGCGGAGTT GCACCCGTCG AGTTACCTTT
TTAATGCTGG ACTGGAAAAA AAAGATGGGA AGAGCAACAG AAATGGCAGC ATGGGTCTCAA
CTGCCCGGAC TCTGCGAGAG AGGCCAGAGC TCGTTGTTTT CACACAGCTA CGGTACACGA
GTAAACGCTA CATGATGCAC GTGACGGCTA TTTCTTCCGT GGACTGGGTT CTGACGACGG
CCCTGAAAAA TATTTCACGA GGGAGGAGTT GGAACAAAG TTGCGGAAAC GCGCGCATGA
TCTATGCCGG AGGCGTTGCT CAAAGAGAGG AGAGAGAGGG GAGGAGGGGA GAAAACATTT
AAGAACGCGT TCTCTCCGAT GATTTGTTTT TCTCTTTTTG TAGACATGTC ATCTGCCGGT
TTCAATTGTT ATTATTATTA TTATTATTAT TATTAAATGCT GTTCTGCGG AACCGTGTCT BX1
GTTGAAATCA TTTTATTCCT TTCTTCTTTT TCTTTGCTGT TGTTTCTGTT TGCTATTTTG
TCTATGCCGG AGGCGATTGG CGGTGCGAAA GGGGCGACAT TTTGCTTTGG GTGGGTGCG
AGGCAATGTT TCGTCGCTCC ATGCGACTGC GCATGATGCA ACTGCACGCC GCCCCCACGC
CGAACCTCT CTGCTCGCA TTTCATATCC CTTCTCGAC GTACGATGGT TTTATCCCCA
ATGGCCAGAC TTGCGAGGTG GCACACCGTG GGCTGGCTTG GGTGCACCTT CTGAGCAATG
GCATTTTGA ACAATATGGG CAGGAGGTAG CGAGTGTGTT CATTGCGCCG CGGCTGTGT
CCATCACAGT TTATCCAAAC GTGGAGTGGT CGAAGCTGGA GTGGAGCATC AGTTCCTTTA
TTGGCCACTA TTTATTGTTT GTTAACGAGT GTGTGCTGCT CGCAAAAGAG TACACGCTCA
TGGAGGATGA TCTTCGGATT CATGAAGAGG ATTGCGAGGT GCTCCAGTGC ATCAAGGAGC TcNU1
TGTTGCGGGA ACAGGTTGCT CCCATGGTGC AGCGGAGTGG CGGCGATGTT AAGCTTTTGA
ACTTTAATGA GGAACAGGT GTGCTGTCAC TTGCGATGCT TGGGCGATGT CGTACTTGCC
CCTCTTCCAG CAACACTCTC AAAGATGGCA TCGAGCGAGT CATGAACAT TTTTGTCCGT
AGGTGACGGA GGTGGTAGAA GACAAGGCC ACGCCTTCTA CGAGGAGTAT GAATTACTGT
TTCAATCGGA GGAGGCGCTT CGACGGGAGG CAGCGCGAAT CGACGCGATG CGCCGCGGGA
AAATTTCCCC GAAGGCGAGC GCGTCGCTGA TGTCGTTTGA CGCCCTTCAC GAGCCAGAGC
GTGATGAGTG ACGGCGGGAC GAACCCATTT TTATGTTGCT TTGGTTTGCC TGTGGCGTAT
CGAGTCATGT GTGCGTGCAA TGGGCATCGA CTTAGTTGTA ATTGCTTTT GTGTGTTTT BX1A
TTTCTACGGG GGATGTGTCA TGCCCGCCAA AAATGCTGC GGGTGGTTC TTGTCGATTT
TTCGTTTGG CTTCTGCGCT TATTATTATT ATTTTATTA TTTTCTTTT CTCCTCATTC
ACAGGCATT GTGGTGGTGA TTCTGGCGAT TTTGAGTACA ATAAGAAGCC ACATGATT
CTGCGTAACA COTTTGAGAG CTCTGATGAC GTTGGCGTGT TTCAACGCT GACGAACGCT
ATGCTTGTGA CCGCGGGCGG CTCACAGAAC TTCTACTCCG TTTTGTAGCA GGAGCTGGCG
AACCACATCC CGGTGGTGTG CACGTCCATT GGTGGATCTC GCGTATGTTG ACGCTCACA
TGTGGCAACC GCCACGGACT TGTGGTGCTC TCGATTGCGA CCGACCAGGA CCTGCGAGC
TGCGCAACT CACTCCCGGA CTCTGTGAAG GTGCAGCGCG TAGAAGAACC GCTTAATGCA
CTTGGGAATT GCGTCGTGTG CAACGATCAC GTGGCACTGA TCCACACAGA CCTGAGTCGG
GAGACAGAGG AGATTTTGGC TGACACTCTG CAGGTACAAA CGTTTCGCAC CTCCATCGCT TceIF6
GAAAATGCCCT TAGTCGGTAG TTACGCCGTG GTTAACAACA AGGGTTGCAT GGTGCATCCC
AAGACCCCGG CACAGGATAT GGACGAGATC GCCTCCCTTC TGCAGGTCCC TGTAGTGGCC
GGTACGATCA ACCGGGGCAA TGCCGCCATT GGCTCCGGCC TTGTCGTAAA CGACTGGGCA
GCGTTCTGTG GTTTGAACAC AACCGCCACA GAAATTACTG TAGTTGAGCG CATCTTCCAG
TTGCGCAGGG ATCTTGGTGG GGACGAGCCA AACCTGCTGC AGCAGTTACG GGGACACCTT
CGTGGATGAG TTGGCGTAGG AATGGACGGA GACAACGATG GGGGGGGAAG AGGGCGGACA
CAAATTAATT AGCATCCAAC CACAGTATA CATGTATATA TATATATATA TATATATATA
TATACAAAGG GAAAAAATAG GAGCTTGTGA AAAGAATGAT CCGGGGAGAG CTGGCTAACT
TAATTAATGA ATGTACATCC TGATAAATGA AGGCATTCTT TATGATACTT TCTGCCGTAT
GAATCTTTTG GGAAGAAGCG GACTTTTtag GGGCAGGGAA CCGATAGAGG CCAGATAATT
TTTTGTTTTT ATTTTGCAT TCCACCCACC CCCTTTTGAT TCCACACAG CGGTGGGGTC SIRE
TTGTGGTTGG AGGACCCAG GAGTGTGCCT CTTGTAAGT AATAATATGT AAATCCTAAC
TGAGGACAAA GGACCATGCT AGTGTGCCAC AGAATTC

```

Figura 3.10: Secuencia completa del locus SZ5. En azul y subrayado se indican los posibles dinucleótidos AG aceptores del miniexón y el posible tracto de polipirimidinas utilizado durante el tran-splicing. En verde se indican las regiones codificantes. En rojo se muestra la secuencia correspondiente al elemento repetido SIRE. Recuadro azul, región intergénica BX1. Recuadro rojo, región intergénica BX1A.

Búsquedas de homología utilizando el programa BLASTP contra la base de datos NR del GenBank, reveló que la región C-terminal de la secuencia

aminoacídica de la proteína TcNU1 presentaba 45% de identidad con el dominio C-terminal de la familia de proteínas NifU [Hwang D, 1996]. Estas proteínas intervienen en la formación de grupos Fe-S de la enzima nitrogenasa en bacterias fijadoras de nitrógeno. Aunque la función de este dominio aun no se conoce, se sospecha que intervendría en la formación o la estabilidad de grupos Fe-S [Yuvaniyama P, 2000]. Es interesante subrayar que las dos cisteínas características del dominio C-terminal de esta familia de proteínas también están conservadas en TcNU1 (Cisteínas 175 y 178, asteriscos en Fig 3.11).

```

* *
veeVideeiRPmLqrDGGdIElvdVdgkdgkVkvRlQgACgGcmsStmTLkggyierkLrerlgevvrV
TcNU1 136 IKELLREQVRPMVQRDGGDVKLNFNEETGVVSLAMLGACRTCPSSNTLKDGIERVMKHFLPEVTEV 203
Spomb 161 ....IETSI..SI.E.....EERG.D.K.T...KLR.....S..AV...N..QQML..YI...E.. 228
Bsubt 42 VQ.VL-DKL..FLL.....CE.VDVD.--.I.K.RLL...GS....TI...A....ALLEEV.G.V.. 107

```

Figura 3.11: Alineamiento de las secuencias correspondientes al dominio C-terminal de TcNU1 y dos dominios similares presentes en la proteína NifU de Spomb indica NifU de *Schizosaccharomyces pombe* (Spomb) y de *Basilus subtilis* (Bsubt). En negrita se indican los motivos muy conservados (mayúsculas) y medianamente conservados (minúsculas) del dominio C-terminal de esta familia de proteínas. Con asteriscos y en rojo se indican las dos cisteínas conservadas de este dominio. Los puntos indican aminoácidos idénticos. Las rayas indican gaps.

El análisis de la secuencia aminoacídica codificada por el tercer ORF, TcEIF6, indica que este polipéptido comparte 61% de identidad con la familia de factores de traducción eucariota eIF6.

TcIF6	1	MILRNTFESSDDVGVFSTLTN-AMLVTAGGSONFYSVFEQELANHIPVVYTSIGGSRVIGRLTCGNRHGIGRLIG	74
Musms	1	.AV.AS..N.NCE..C.AK..AYC..AI...E.....G..SDA....HA...C.I....MCV.....M..	74
Spomb	1	.A..AQ..N.NEI....N...SYA..AL...E.....A..GDVV...HTT...T.I.....K.....	74
TcIF6	75	GR LTCGNRHGLVVP SIATDQELQH LRNSLPDSVKVQRVEERL NALGN CVVCNDHVALIHTDLSRETEEILIL IHT	149
Musms	75	..MCV.....L..NNT.....I.....QIR.....S...VTT...Y...V.P..D.....V.V.P	149
Spomb	75	L...ST..N.....P..I...D...S...I.A...Y...V.P.IE.....V.V.P	149
TcIF6	150	DL SRETEEILRDTLQVQTFR TS IAENALVGSYAVVNNKGC MVHPKTPAQDMD EIASLQVPV VAGTINRGNA AIG	224
Musms	150	..D.....A.V.K.EV...QTV.DQV....C.FS.Q.GL...SIE.Q..LS.....L...V...SEV.A	224
Spomb	150	.IE.....IA.V.D.EV...QTV.G.V.T...CAL S.Q.AL...R.SI.EQ..LS.....L.....SDV..	224
TcIF6	225	SGLVVNDWA AFGCLNTTATEITVVERIFQLRDLGGGRANLLQQLRDTLVD---	275
Musms	225	A.M.....C....D..S..LS...SV.K.N---EAKPSTIATSM..S.I.SLT	274
Spomb	225	A.....C..A..D....LA.C.S..K.Q---DAQPSAIIS-N...VESYT	273

Figura 3.12: Alineamiento de las secuencias correspondientes a TcEIF6 junto con los factores de traducción eIF-6 de *Mus musculus* (Musms) y de *Schizosaccharomyces pombe* (Spomb). Los puntos indican aminoácidos idénticos. Las rayas indican gaps.

Estas proteínas se asocian a la subunidad ribosomal 60s impidiendo su

interacción con la subunidad 40s [Wood L, 1999]. Dado que la identidad se da en toda la extensión de TcEIF6, es posible que esta proteína sea el factor de traducción eIF6 en *T. cruzi* (Fig 3.12)

Por hibridación de cromoblots de la cepa CL Brener con una sonda específica del gen TcRH1, se estableció que el locus SZ5 se encuentra localizado en las bandas cromosomales III y VII (de 0.7 Mpb y 0.9 Mpb respectivamente, Fig 3.13A).

Para determinar si la organización genómica del locus SZ5 se mantenía en ambos cromosomas, se hibridó un Southern blot de ADN genómico total de la cepa CL Brener, digerido con la enzima *Bst*XI, con sondas específicas de los genes TcRH1, TcNU1 y TcEIF6. Las tres sondas revelaron una única banda de un tamaño aproximado de 4.1 kpb confirmando que los tres genes están ligados en ambos cromosomas (Fig 3.13B).

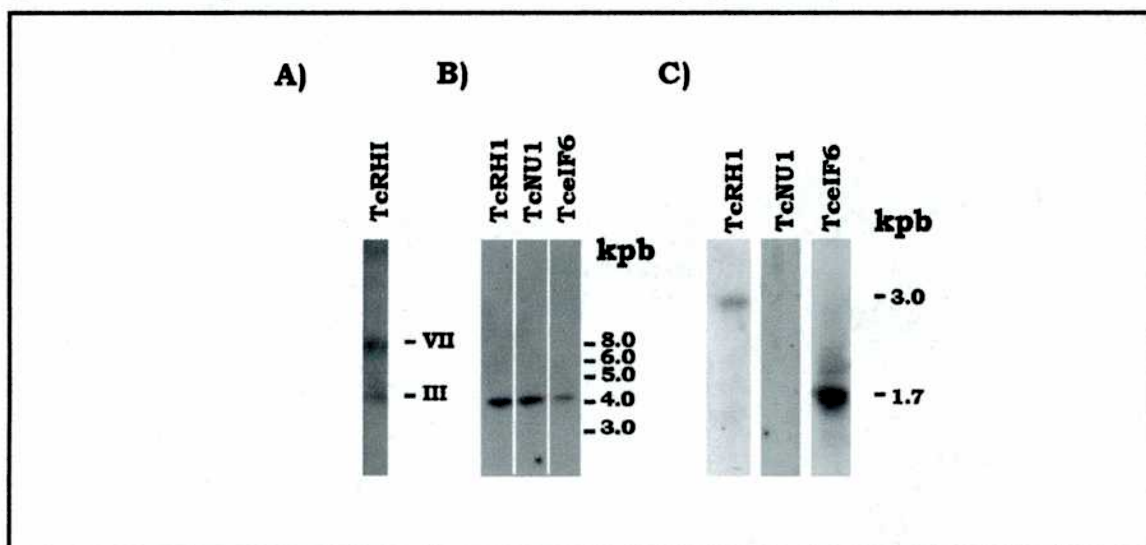


Figura 3.13: (A) Cromoblot del clon CL Brener usando una sonda específica del locus SZ5. (B) Southern blots a partir de ADN genómico total del clon CL Brener digerido con *Bst*XI. (C) Northern blots a partir de ARN total del estadio epimastigote del clon CL Brener. TcRH1, TcNU1 y TcEIF6, calles hibridadas con una sonda específica para el gen TcRH1, TcNU1 o TcEIF6 respectivamente. A la derecha de las figuras (B) y (C) se indican las posiciones relativas de los marcadores de peso molecular.

Para estudiar su expresión, se realizaron ensayos de Northern blot a partir de ARN total del estadio epimastigote de *T. cruzi*, utilizando sondas específicas de cada ORF. Las sondas TcRH1 y TcEIF6 revelaron una banda

de 3.0 kb y 1.7 kb respectivamente, mientras que con la sonda TcNU1 no se observaron bandas (Fig 3.13C).

Para determinar si la ausencia de expresión observada en TcNU1 se debe a la influencia de las regiones intergenicas que lo flanquean, region BX1 rio

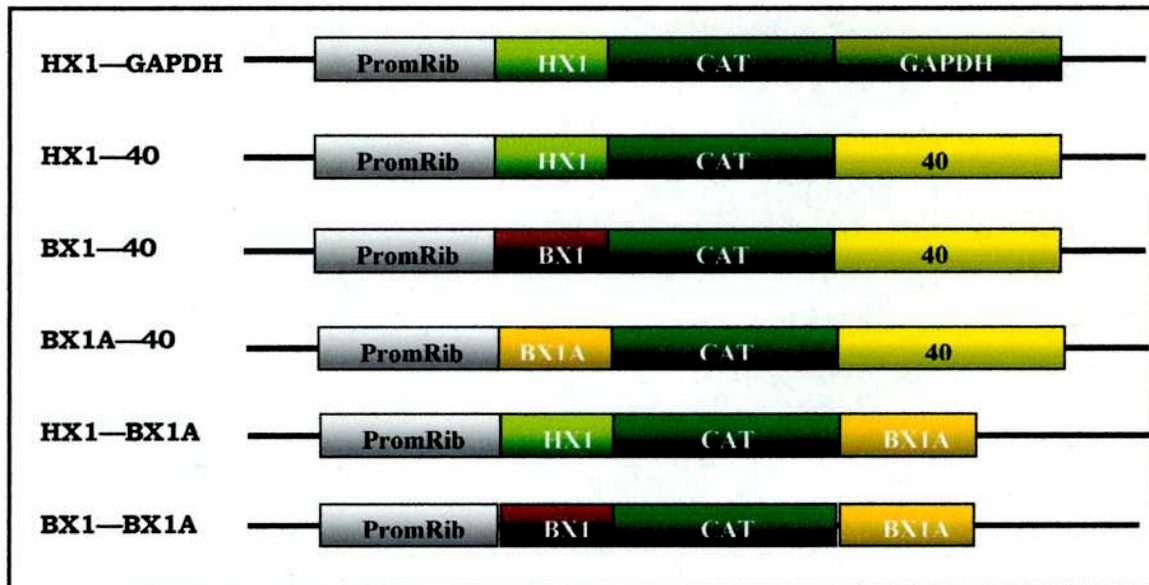


Figura 3.14: Esquema de las construcciones utilizadas para estudiar las regiones intergenicas BX1 y BX1A. PromRib, promotor ribosomal; HX1, región intergenica HX1; BX1, región intergenica BX1; BX1A, región intergenica BX1A; 40, región de procesamiento del virus SV40; GAPDH, región intergenica del gen GAPDH; CAT, gen que codifica para la enzima cloranfenicol acetil transferasa.

arriba y region BX1A rio abajo, se realizaron experiencias de transfección estable con plasmidos de expresión en los que se clonaron las regiones BX1 y BX1A delante y detrás del gen que codifica para la enzima cloranfenicol acetil transferasa (CAT). Como controles se utilizaron las siguientes regiones: (1) HX1, correspondiente a la secuencia 5' no codificante del gen que codifica para la proteína ribosomal TcP2 β de *T. cruzi* [Schijman A, 1995]; (2) GAPDH, región intergenica del gen que codifica para la gliceraldehido 3 fosfato deshidrogenasa [Kendall G, 1990] y (3) SV₄₀ que corresponde a una región de procesamiento derivada del virus SV₄₀. Estas secuencias permiten altos niveles de expresión genética y procesamiento del ARNm [Vázquez M, 1999]. En la figura 1.14 se

muestran las diferentes construcciones utilizadas.

Los resultados de las transfecciones se muestran en la figura 1.15. Los niveles de actividad CAT alcanzados cuando las regiones BX1 o BX1A se encuentran río arriba son del 7% y del 35% respectivamente, porcentajes calculados con respecto a la transfectantes que contienen HX1—40 (100%). BX1A también produce una disminución en los niveles de expresión del 78% cuando se encuentra localizada en la región 3' del gen CAT. El efecto producido por estas dos regiones se ve potenciado cuando BX1 y BX1A se encuentran río arriba y río abajo del gen CAT respectivamente, obteniéndose solo un 4% de actividad CAT con respecto al control HX1—40. Esto explica los resultados de la figura 1.13, donde no se observan niveles detectables de ARNm para TcNU1 en epimastigotes.

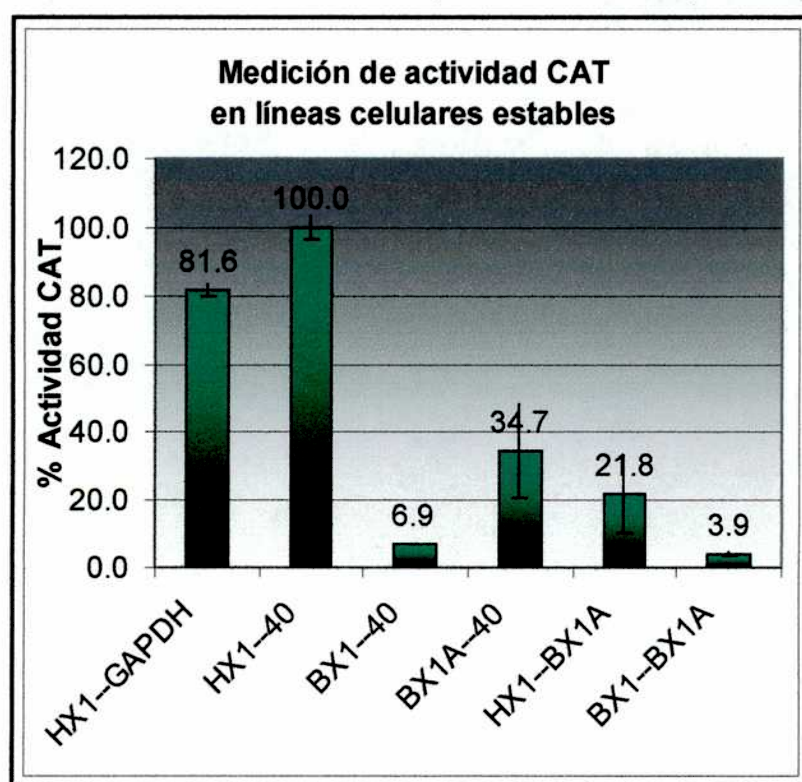


Figura 3.15: Ensayos de actividad CAT en líneas celulares transfectadas establemente con el vector correspondiente. Los números sobre cada barra indica la actividad CAT registrada expresada como porcentaje con respecto al control (HX1—40). Las barra de error corresponde a un desvío estándar con respecto a la media.

Por último, para determinar si efectivamente, el primer dinucleótido AG

después del tracto de polipirimidinas es el receptor del miniexón en las regiones BX1 y BX1A (reacción de trans-splaiicing, ver pp en introd.) se clonó el producto de RT-PCR del extremo 5' de los ARNm provenientes de las líneas celulares transfectadas con las construcciones BX1CAT40 y BX1A—40 en el vector pGEM-Teasy. La secuenciación de los fragmentos SL-CAT correspondientes, indicó que, cumpliendo con lo previsto [Hummel H ,2000] el primer dinucleótido AG utilizado en ambos casos es el primero después de la región de polipirimidinas. En BX1 se encuentra 56 pb río arriba del codón de iniciación del gen TcNU1 y en BX1A, el dinucleótido AG utilizado se encuentra 52 pb río arriba del gen TcEIF6.

3.4 El locus SZ5 es un ejemplo de sintenia inter-especie entre *T. cruzi* y *T. brucei*

Para investigar si la organización genómica del locus SZ5 se mantiene en otros kinetoplástideos, se realizó un análisis de similitud de secuencias en la base de datos HTGS del GenBank utilizando el programa TBLASTX. Los resultados obtenidos confirman que un locus homologo se encuentra en el cromosoma 10 de *T. brucei* (Fig 3.16). La proteína TcRH1 presenta 61% de identidad en toda su extensión con su homóloga de *T. brucei*, TbRH1. Las proteínas codificadas por los genes TcNU1 y TcEIF6 se encuentran más conservadas, llegando a un 80% de identidad para TcNU1 y 89% para TcEIF6. Dada la conservación de la organización genómica de este locus, así como el de las proteínas que codifica, es factible que los tres genes de *T. cruzi* y *T. brucei* sean ortólogos.

Resultados preliminares en *Leishmania major* sugieren que genes homólogos a TcRH1, TcNU1 y TcEIF6 también se encuentran ligados en el cromosoma 36 aunque todavía falta definir su organización (sentido de transcripción de los tres genes implicados).

```

      10      20      30      40      50      60
5' GTTGGGTCTTTCCACCCAGCTGCTTTTTTTTTTTTGCAGTCCCCTCACATGGGGTAGGT
      70      80      90     100     110     120
CGAATGCTGCAGGAAATTTAAAAAAAACGGTAATTTTGGTTATCTTCAATGTTTTT
      130     140     150     160     170     180
AAAAATGTTGAATCATCTTTTATTTTAAAGAACTCTCTTTCCCTCTCTTT
      190     200     210     220     230     240
TCCATCATGCTACTCGGTGGTTTACACATGTAAATAAAAAGGGGAGGATCACTCAGTT
      250     260     270     280     290     300
ATCTTCCGAAGCAAATGGACAGGGAAGCCATGCGTCGGGCTCAGCAGACATCTCGTGATG
TbRH1      M D R E A M R R A Q Q T S R D A
TcRH1      M D P D K S R K A Q Q G V P R C
      310     320     330     340     350     360
CTTATTTACGCAAGCGTGTCTGCTATGCGAGAGAAGGCAGCATCTGTTGTCCTGCAGGAGA
TbRH1      Y L R K R A A M R E K A A S V V L Q E K
TcRH1      I S S Q A G T Q A R E A A S A V L Q E K
      370     380     390     400     410     420
AGATCACTGAGATAGAGGCCGGAGTGTGCCCAGTTCTTTACTGAAATTGAGTTGTTAA
TbRH1      I T E I E A G V L F S S F T E I E L L S
TcRH1      I S E I E A G V L F H S L A E I E L L S
      430     440     450     460     470     480
GCAAGCGTGTCTCAAGAGGTGAAGGCTGCTGAGCGGCTGCAGGTTGCAGCAAAACATGCGAC
TbRH1      K R A Q E V K A A E R L Q V A A N M R Q
TcRH1      K R A R E V Q A T G Q L Q I T A Q L R Q
      490     500     510     520     530     540
AGGAAATAATCACGCTGGATGGGGACCGGCTCTTGGAGAAAAGCGCCATCGGGATGTGG
TbRH1      E I I T L D G G P A L G E K R H R D V V
TcRH1      E L L E E D G A L A S H A S D H G G D S
      550     560     570     580     590     600
TGGTTCACCCGCTGATCCAGGAGGAAATGATTGTCCAGGAGGATACGCAGAGACACGCGG
TbRH1      V P P L I Q E E M I V Q E D T Q R H A E
TcRH1      S L P L N Q V E L M Q Q S S S V G Y Q E
      610     620     630     640     650     660
AGGCGTCTCACGGTTTTTGTGGCGATGGACAAAGCCATCATTGATGATCGCATCGAGAAGC
TbRH1      A S H G F V A M D K A I I D D R I E K H
TcRH1      K S H N F V A M D E S V V D E R I K K H
      670     680     690     700     710     720
ATGATTACACGGAAGAAGTGACAGAAGAGAGATAAAGCGTGAGCGCACAGCGCGCTAC
TbRH1      D Y T E E V T E E E I K R E R T A A L Q
TcRH1      D F V E D K T E E Q I K Q E R T V A I Q
      730     740     750     760     770     780
AAAATCAGAACC GCCGGTTG CAGGAGCAGCGCCGCTCTCTCTCCATTTATCAGTCGCGTG
TbRH1      N Q N R R L Q E Q R R S L P I Y Q S R G
TcRH1      E Q H R R L Q E Q R R S L P I Y H S R E
      790     800     810     820     830     840
GTGCACTCTTGAATTGATTCCGAACAATCCCGTGGTGATCATTGTGGGAGAACTGGTT
TbRH1      A L L E L I R N N P V V I I V G E T G S
TcRH1      A L L E I I R K N T V V I I V G E T G S
      850     860     870     880     890     900
CAGGTAAGACAACGCAGCTGCTTCACTACCTCTACGAGGAGAATTTACACGAACCTGCC
TbRH1      G K T T Q L L Q Y L Y E E N L H E P A P
TcRH1      G K T T Q L L Q Y L Y E E N L C R T P E
      910     920     930     940     950     960
CACCACGCTCTGCGAAGCGGAAGGTGTGACATCTGAACCCGTAGGGGAAGTGACACAAG
TbRH1      P T S A N A E G V T S E P V G E V T Q G
TcRH1      C L T E G D G G K G K E K E G E E E E G A S E E
      970     980     990     1000    1010    1020
GGAAGCGACTTATATGCAGCGAGCCGAGGAGGCTCGCTGCCATTAGTGTGCCGAGCGTG
TbRH1      K R L I C T Q P R R L A A I S V A E R V
TcRH1      K R F I C T Q P R R I A A I S V A E R V
      1030    1040    1050    1060    1070    1080
TAGCACAAGAAATGAATACGCGATGTGGTAGCATCGTAGGATACAAGGTGCGTTTGTATG
TbRH1      A Q E M N T R C G S I V G Y K V R F D D
TcRH1      A Q E M N T R C G S I V G Y K V R F D E
      1090    1100    1110    1120    1130    1140
ACCGTACTGGGCCGCTGACACGTGTTCTTTTCGTGACGGATGGTATGATGCTGAAGGAAG

```

TbRH1 R T G P L T R V L F V T D G M M L K E V
TcRH1 K L G P T T R L L F V T D G M M L K E L
 1150 1160 1170 1180 1190 1200
 TTGTCGGAGACCCCAAGCCTTAACACAGTCGCCGCCATCATGGTGGATGAAGCCCATGAAA
TbRH1 V G D P S L N T V A A I M V D E A H E R
TcRH1 V G D P E L R T V S A I M V D E A H E R
 D E A H E R
 1210 1220 1230 1240 1250 1260
 GGTCCTCAATACTGACATACTCCTTGGACTGCTAAAGGATATCATACGGGGTAACAAAC
TbRH1 S L N T D I L L G L L K D I I R G N K Q
TcRH1 S I N T D I L L G L L K D I T R R N K Q
 T D
 1270 1280 1290 1300 1310 1320
 AGTTGAGGGTAATTGTGGCGAGTGCACAAATAATGCGGATAAATTTAGCGACTTCTTTA
TbRH1 L R V I V A S A T I N A D K F S D F F N
TcRH1 L K V I V A S A T I N A E K L Q F F D G
 S A T
 1330 1340 1350 1360 1370 1380
 ATAGAGCAGCCATATTTACAGTAAAGCCGCTCCTTCCCGTTGATACTTCGTACATCA
TbRH1 R A P I F T V K G R S F P V D T S Y I T
TcRH1 - A P I F S I K G T N I P V D V S Y L T
 1390 1400 1410 1420 1430 1440
 CTGAACCACTGTGCTGACTATGTGAAGGCCAGTGTGGATTGTATACTCATGCTCCAGCTA
TbRH1 E P V A D Y V K A S V D C I L M L H A T
TcRH1 E P M A D Y V S A T A E S V L R D C M P P
 1450 1460 1470 1480 1490 1500
 CGAAGCCGCTGCCAGGGGACATCCTTGTCTTTCTTCCAGGACAGGAAGAAATCGAAAGTT
TbRH1 K P L P G D I L V F L P G Q E E I E S C
TcRH1 K P L P G D I L V F L P G Q E D I E N C
 L V F G
 1510 1520 1530 1540 1550 1560
 GTGTGCGCCGCTTCGCGAGGCTCTTGTGAGACCGCGGTCAACTCCGTCCTTTGTGG
TbRH1 A A A V R E A L V E T A G Q L R P L L V
TcRH1 A A A I V K H S Q T S G G Q L R P L M V
 1570 1580 1590 1600 1610 1620
 TTCTTCCGCTCTATTCTCCCTTCCCTCCGTCGAGCAGAAGCGGATATGAGGTGCCTC
TbRH1 L P V Y S S L P P R E Q K R I Y E V P P
TcRH1 L P I Y A S L P P R E Q R R I Y E V P P
 Q F
 1630 1640 1650 1660 1670 1680
 CGCCAAACACCAGGAAGGTTGTTATCGCCACAAATATTGCGGAAACGTCCATCACTATTG
TbRH1 P N T R K V V I A T N I A E T S I T I D
TcRH1 P T T R K V V I A T N I A E T S I T I D
 R T N A E S T
 1690 1700 1710 1720 1730 1740
 ATGGCATAGTGTATGTTGTGGACTGTGGACTGTGTAAGCAGAATTACTATAACCCCGGG
TbRH1 G I V Y V V D C G L C K Q N Y Y N H R A
TcRH1 G V V Y V V D C G L C K Q N Y Y N Y Q S
 G V D G
 1750 1760 1770 1780 1790 1800
 CAATGATAGAGGAACCTCGGGTGCTTCCCATTTACAGGCAAGTGCTACACAGCGGGCGG
TbRH1 M I E E L R V L P I S Q A S A T Q R A G
TcRH1 M V E E L R V L P I S Q A S A K Q R T G
 Q R G
 1810 1820 1830 1840 1850 1860
 CCCGTGCTGGCGTACACGGGAAGGTGATTGTTATCGTCTTTACACAACCTACAGTTTC
TbRH1 R A G R T R E G D C Y R L Y T T Y T F H
TcRH1 R A G R T Q R E - C Y R S Y T V H T F R
 R G R G
 1870 1880 1890 1900 1910 1920
 ATAATGAGTTCCCTCGGAAACCGTTCCCGAGATTTGCGGTCTTCGATGAGCTCTGTGG
TbRH1 N E F P S E T V P E I L R S S M S S V V
TcRH1 N E L Q Q E T V P E I Q R S C M S S V V
 1930 1940 1950 1960 1970 1980
 TTCTGCAACTCAAGGCTCTTGGCATCAACAATTTACTTCAGTTTGTGATGCAC
TbRH1 L Q L K A L G I N N L L Q F E F I D A P
TcRH1 L Q L K A L G I D N L L Q F E F I D A P
 1990 2000 2010 2020 2030 2040
 CGTCGAGCCCTCACTAGAGCGAGCCTTGGATCACCTATACCTGCTTGGTGCCATGAAG
TbRH1 S T A S L E R A I D H L Y L L G A M K Q

TcRH1 S T A S L E R A L A T F T C W R N L N R
 2050 2060 2070 2080 2090 2100
 AAGATGGCCGACTGACACTTACCGGGAGGCGCATGGCAGAGTTCCTTTGGACCCGTCGC
TbRH1 D G R L T L T G R R M A E F P L D P S I
TcRH1 M V G A - L T G R R M A E F P L D P S I
 2110 2120 2130 2140 2150 2160
 TAAGCAAAAGTGTATTTCGTGCCTCTGCAATGGGGTGTGCGACACATGGCAATTGCTG
TbRH1 S K S V I R A S A M G C L R H M A I A V
TcRH1 S K C I L R G S A L W C L R H M S I A V
 2170 2180 2190 2200 2210 2220
 TGGCGATGCTTTCTTTGGACTCCATTTTCATAAATAACAAGAGATCCAAAGGAGCGTATAG
TbRH1 A M L S L D S I F I N T R D P K E R I A
TcRH1 A M L T L D S V F V V S R D P K E R A S
 2230 2240 2250 2260 2270 2280
 CCATGACGAGCGCAAGGGATAAGATGTTTTCCTCCGGCAATGGCGATGTTGTTGGCTATG
TbRH1 M T S A R D K M F S S G N G D V V G Y V
TcRH1 M A S A R D V L F S A G N G D V M G Y V
 2290 2300 2310 2320 2330 2340
 TTCGGCTAATGGAGGAGTGGCTGCGGTCAAGGTCCTTGAAGCAGGAATTCTGCGATACAA
TbRH1 R L M E E W L R S G S L K Q E F C D T N
TcRH1 R L M E E W M R A R P S M H E F C Q S H
 2350 2360 2370 2380 2390 2400
 ATTATGTGAATTCTAAGTCTCTCTTGGCGCGCGGGACATTCTTGACCAATACTCAAAA
TbRH1 Y V N S K S L L R A R D I L D Q I L K T
TcRH1 S V N A K A L L P A R D V L D H I L H T
 2410 2420 2430 2440 2450 2460
 CGTGTGAGCGACTTGGTTTGTATCTTCCAATGGACAGGAAGCTGATGCTCTCTCTGTAG
TbRH1 C E R L G F D L P N G Q E A D A L S V E
TcRH1 C E R L G L D L P S G R P G N I - - -
 2470 2480 2490 2500 2510 2520
 AGGCTTTGACAAAAGCTCTGCTTTCAGGGTTCTTTATGAACGTTTCCGTACTAGGTCTGG
TbRH1 A L T K A L L S G F F M N V S V L G L D
TcRH1 A L Y G S F L G G P Y L M N V A K I E C R
 2530 2540 2550 2560 2570 2580
 ATAAACGAACGTACTCCATTGTGCGCCGATTGACCCACCGTAAGTCGTTGGGTGCTG
TbRH1 K R T Y S I V R F I D P T V S R L G A A
TcRH1 P E D L S D C A P R D A S V S R S G - -
 2590 2600 2610 2620 2630 2640
 CATCTCAAGTTGGCAGTGGTAATCGCTTCGGTGATGCAGAACTCGCGGTGGAGTTACATC
TbRH1 S Q V G S G N R F G D A E S A V E L H F
TcRH1 H N H N N Y N A L D A E E T A T A E L H F
 2650 2660 2670 2680 2690 2700
 CCTCAAGTTATCTTTCCGAAGTGGCAGGACACATGGTGAGAGAAGTAAAGGTTTAC
TbRH1 S S Y L F R T G T S T H G E R S K G L P
TcRH1 S S Y L F N A G L E K K D G K S N R N G
 2710 2720 2730 2740 2750 2760
 CTCCTACTCTTCCATGGTTGCGATGGAAGAAAGACAGGCTCGTAGTTTTCACACAGC
TbRH1 P T P S M V A M E E R F R L V V F T Q L
TcRH1 S M V S T A P T L R E R P E L V V F T Q L
 2770 2780 2790 2800 2810 2820
 TTCGCTGCACGAAAAAGCGGTACATGATGCACGTTACGGCCGTCCTCCGCGGACTGGG
TbRH1 R C T K K R Y M M H V T A V P S A D W V
TcRH1 R Y T S K R Y M M H V T A I S S V D W V
 2830 2840 2850 2860 2870 2880
 TGTGCGCGTCGCCCCCTGTAATTAACTTACAAAGGAAGAGTTGGAGGTGGAACGCACA
TbRH1 L A V A P V N Y F T K E E L E V E T H K
TcRH1 L T T A L K I I S R G R S W K Q S C G N
 2890 2900 2910 2920 2930 2940
 AGCGGAAACACGTTTGAAAAATCGTTGACTGGCTTTCCCAACCCCGCCGAGTGGATGGG
TbRH1 R K H V *
TcRH1 A R M I S P K R V R Q R R K R E G R R G E N I *
 2950 2960 2970 2980 2990 3000
 ATGGTGTCTGGTAAGGACAGTATTTGGCATCGGATTCGTTGTTCTTTTGTGTGATATTT
 3010 3020 3030 3040 3050 3060
 TGTTCCCTTGAACCGTTGCGGCTGTCTGACGCTTCTCGGTTAGGCAACGGTGATGCGA
 3070 3080 3090 3100 3110 3120
 CTATCCATAAAGCGGTTAATGACAAATCTCCTCTTTCCGCTGTGTGTGACAACACTGG
 3130 3140 3150 3160 3170 3180
 TACTTCGTTCACTTCTTTGTTTCCCTTACTCCCTTTCGGAATTGCTTTGTAGGG
 3190 3200 3210 3220 3230 3240

GTTGAACATAGTGAACAGTTTGAACCCCTGTCGTCGGACGGGTATTGGACGGTGAAAGTT
 3250 3260 3270 3280 3290 3300
 TATGGTGAACCTGGTGTTCACCTCCGTCATCACGGGGCTGAATGGTAGGTTCTGTTAT
 3310 3320 3330 3340 3350 3360
 TACCATTATTATAGCACTTTTCGGGGACACCACCGGGGCTCATCATGCTACGTGGCACA
TbNU1 M L R G T
TcNU1 M F R R S
 3370 3380 3390 3400 3410 3420
 CGGCTCATGTTGATGATGCAGTTGCACTCTCTCCCAACGCCAAATCCTTCTTGTACACT
TbNU1R L M L M M Q L H S L E T P N F S C Y T
TcNU1M R L R M M Q L H A A E T P N F L C L A
 3430 3440 3450 3460 3470 3480
 TTTCATATCCCATCATCCACGTACGACAACCTTATTCCGGATGGTCAGACATGCGATGTT
TbNU1F H I P S S T Y D N F I F D G Q T C D V
TcNU1F H I P S S T Y D G F I F N G Q T C E V
 3490 3500 3510 3520 3530 3540
 GCGAGATGGGCCTTGCCTGGGTTCATCCGCTTAGTCAGGGTATCTTCGAACAGTACCCG
TbNU1A H M G L A W V H P L S Q G I F E Q Y P
TcNU1A H R G L A W V H P L S N G I F E Q Y G
 3550 3560 3570 3580 3590 3600
 CAGGAGTAGCGAGTGTCTTCATTGCTCCCGGCATACGTCCATAACGGTACATCCCCAC
TbNU1Q E V A S V F I A P R H T S I T V H P H
TcNU1Q E V A S V F I A P R H V S I T V Y P N
 3610 3620 3630 3640 3650 3660
 GTCGACTGGAATAAATTGGAGTGGAGTATCAGTTCTTTTATCGGGCATTACCTTGTCTTC
TbNU1V D W N K L E W S I S S F I G H Y L V F
TcNU1V E W S K L E W S I S S F I G H Y L L F
 3670 3680 3690 3700 3710 3720
 ACAAACGCATGCTTCTCGCGCAGCAGAATATGCTTGGCTTGAGGATGACCTTGTGATC
TbNU1T N A C F P A A A E Y A L L E D D L V I
TcNU1V N E C V P A A K E Y T L M E D D L R I
 3730 3740 3750 3760 3770 3780
 CACGAGGATGACTCAGAGGTTTTCAGTGCATTAAGGAGTTGGTGGCGGAACAGGTGCGC
TbNU1H E D D S E V L Q C I K E L V R E Q V R
TcNU1H E E D S E V L Q C I K E L L R E Q V R
 V R
 3790 3800 3810 3820 3830 3840
 CCAATGGTTCAGCGTGACGGTGGTGACGTGAAACTCCTTAACCTCAACGAAAAACAGGC
TbNU1P M V Q R D G G D V K L L N F N E K T G
TcNU1P M V Q R D G G D V K L L N F N E E T G
 P L D G G D E L V
 3850 3860 3870 3880 3890 3900
 GTTGATCACTTGTCTATGCTCGGTGCGTGGCGCACCTGTCCATCATCACAAAACAGTTA
TbNU1V V S L A M L G A C R T C P S S Q N T L
TcNU1V V S L A M L G A C R T C P S S S N T L
 V V L G A C G C S T L
 3910 3920 3930 3940 3950 3960
 AAGGATGGTGTGGAGCGACTATGAAGCACTTCTTGGCGGAGGTGAAGGAAGTAGTGGAG
TbNU1K D G V E R L L K H F L P E V K E V V E
TcNU1K D G I E R V M K H F L P E V T E V V E
 3970 3980 3990 4000 4010 4020
 GCGAAAGGCATGCATTCTACGAGGAATACGGACTTTTGTGATTCCGGAGAAGGCACCTC
TbNU1A K G H A F Y E E Y G L L F D S E K A L
TcNU1D K G H A F Y E E Y E L L F H S E E A L
 4030 4040 4050 4060 4070 4080
 CGCGAAGAAGCTGCTCGTGTAGACGCAGTGCCGCGGAGAAAAATTCTATCTACACCACG
TbNU1R E E A A R V D A V R R R K I S I Y T T
TcNU1R R E A A R I D A V R R R K I S P K A T
 4090 4100 4110 4120 4130 4140
 GCGCCACTCATGCCTTTCGAGGCGTTGAATGAGCCCGATGGGGATGAGTGA*GCGTTAAG
TbNU1A P L M P F E A L N E P D G D E *
TcNU1A S L M S F D A L H E P D G D E *
 4150 4160 4170 4180 4190 4200
 TAACTTGCACTTTACTGTGCGTGAATCGGCGTCACTTCCCACTGTTGCTCTCGCGGATGG
 4210 4220 4230 4240 4250 4260
 TAGTCATAGTTTACCGTTTCGATTTATGACAGTTGAGTAGCAGCGCAGAGCGTATCAATA
 4270 4280 4290 4300 4310 4320
 TACTCTGGTGTGTCATTTAGTGTATTCTGTTACTTGTATCTCCTTCCCTCCTTTTGC
 4330 4340 4350 4360 4370 4380
 CTGGCATCACTGGCCCGCATACCGGAATGTTTCACTTTAGTTGTGCTCTTCTCGTCTC
 4390 4400 4410 4420 4430 4440

TTTAAACTATTTCACTCCGCTCCTTCCCCCTTTTTCAAAAAACCTGTAAACGTC
 4450 4460 4470 4480 4490 4500
 ATACTGCTATTTGTACATTAGTGTGGAGCCACGTGGAATTAAGAGAGGGAGCTAAGTATG

TbIF6
TcIF6

4510 4520 4530 4540 4550 4560
 ACACGTGCGTACGCGCTTCGAGAGCTCTGACGATGTGGGTGTGTTTGCCCGCCTAACGAAC

TbIF6I L R T R F E S S D D V G V F A R L T N
TcIF6I L R N T F E S S D D V G V F S T L T N

4570 4580 4590 4600 4610 4620
 GCGTATTGTCTTGTGCGCGCTGGTGTTCACAGAACTTCTATTCCGTGTTTGAGCAGGAG

TbIF6A Y C L V A A G A S Q N F Y S V F E Q E
TcIF6A M - L V T A G G S Q N F Y S V F E Q E

4630 4640 4650 4660 4670 4680
 TTGGCATCACATATTCCTGTTGTACACGTCGATTGGCGGTTCTCGCGTTGTGGGCGCT

TbIF6L A S H I P V V Y T S I G G S R V V G R
TcIF6L A N H I P V V Y T S I G G S R V I G R

4690 4700 4710 4720 4730 4740
 CTGACGATTGGAACCGCCATGGTCTCGTCTGCCATCCATCACCCTGACCAGGAGCTC

TbIF6L T I G N R H G L V V P S I T T D Q E L
TcIF6L T C G N R H G L V V P S I A T D Q E L

4750 4760 4770 4780 4790 4800
 CAACATCTGCGCAACTCCCTTCCTGATTCTGTGAAGTGCAGATGGTGAAGAGCGGCTC

TbIF6Q H L R N S L P D S V K V Q M V E E R L
TcIF6Q H L R N S L P D S V K V Q R V E E R L

4810 4820 4830 4840 4850 4860
 AGTGGCTTAGGAACTGCGTTGTATGCAATGACCACGTTGCACTTATCCACAGGATCTG

TbIF6S A L G N C V V C N D H V A L I H T D L
TcIF6N A L G N C V V C N D H V A L I H T D L

4870 4880 4890 4900 4910 4920
 AGTCGGGAGACGGAGGAAGTGTGTCGTCACGCTGCAGGTGCAGACATTCCGTACATCC

TbIF6S R E T E E V I R D T L Q V Q T F R T S
TcIF6S R E T E E I L R D T L Q V Q T F R T S

4930 4940 4950 4960 4970 4980
 ATTGCAGAGAATGCTCTGGTGGTAGCTACGCAGCCGTGACGAATAAGGGTGCATGGTG

TbIF6I A E N A L V G S Y A A V T N K G C M V
TcIF6I A E N A L V G S Y A V V N N K G C M V

4990 5000 5010 5020 5030 5040
 CATCCAAAGACACCAGCACAAGATATGGATGAGATTGCTTCACTTCTGCAGGTCCCCGTG

TbIF6H P K T P A Q D M D E I A S L L Q V P V
TcIF6H P K T P A Q D M D E I A S L L Q V P V

5050 5060 5070 5080 5090 5100
 GTGGCTGGGACAATTAACCGCGGTAATGCAGCCATTGGCTCCGGTCTTGTGGTGAATGAC

TbIF6V A G T I N R G N A A I G S G L V V N D
TcIF6V A G T I N R G N A A I G S G L V V N D

5110 5120 5130 5140 5150 5160
 TGGGACGCGTCTGTGGGCTCAACACCCTGCAACGGAATAACAGTGGTGGAGCGCATC

TbIF6W A A F C G L N T T A T E I T V V E R I
TcIF6W A A F C G L N T T A T E I T V V E R I

5170 5180 5190 5200 5210 5220
 TTCCAGCTTCGTAGGGATTAGGTGGGGATGAGTCGAACCTTACTGCAGCAGTTGCGCGAT

TbIF6F Q L R R D L G G D E S N L L Q Q L R D
TcIF6F Q L R R D L G G D E P N L L Q Q L R G

5230 5240 5250 5260 5270 5280
 ACGTTGGTGGATGAAGTGGCAATGTGGTGTAAATCGTCGGGCGCATCCGAGACGAAGA

TbIF6T L V D E L A *
TcIF6H P R G *

5290 5300 5310 5320 5330 5340
 TAATGGACAATTTCATCTTCGAAAGAACATTATCTGTGTTCCGCTTCTCTTTTAATAG

5350 5360 5370 5380 5390 5400
 TAATCAACACTAACGCGGGCTAAAGTACCGAGTCTTTAAACGTTTTGTATTCTTCTCCC 3'

Figura 3.16: Secuencia nucleotídica del locus SZ5 de *T. brucei*. En azul y subrayado se indican los posibles trectos de polipirimidinas y dinucleótidos AG aceptores del mini-exón; en gris se indican las regiones codificantes y debajo la secuencia aminoacídica correspondiente alineada con la proteína homóloga de *T. cruzi*. Los rectángulos celestes resaltan los aminoácidos conservados entre las dos proteínas. En negrita se indican los motivos conservados característicos de la familia de proteínas DEAH-Box y del dominio C-terminal de la familia NifU.

3.5 Caracterización del fragmento SZ15

El análisis del ORF presente en el SAS SZ15 permitió identificar motivos característicos de la familia de las transcriptasas reversas (RT). Entre éstos, se detectó un dominio de ARNasaH presente en distintas RT como la del retrovirus HIV-2 (No Acceso GeneBank P04584) y la del retrotransposón Burdok de *Drosophila melanogaster* [Tchurikov NA, 1989].

La secuenciación completa de SZ15 permitió determinar que este locus contiene un nuevo tipo de retroelemento, no descrito hasta el momento en tripanosomatídeos, que denominamos VIPER. Este elemento tiene una longitud de 2359 pb y se encuentra delimitado en su extremo 5' por las primeras 150 pb de SIRE y en su extremo 3' por las 270 pb finales de SIRE (ver esquema en Fig 3.17A). A pesar que en VIPER no se observan marcos de lectura abiertos extensos, dado que presenta motivos de ARNasaH y de transcriptasa reversa (RT), su estructura sugiere que codifica un ORF degenerado, un pseudogén, derivado de una secuencia retroviral progenitora que quizás contenía uno o más marcos de lectura abiertos. Comparando la secuencia VIPER con la base de datos de ESTs del GenBank, se detectaron varios fragmentos con homologías significativas que permitieron reconstruir su único ORF. El mismo, comienza en la posición 708 (ver esquema) y codifica para una hipotética RT de 487 aminoácidos. El codón stop de este ORF se halla localizado dentro de la región 3' de SIRE. Los motivos de RT y de ARNasaH que presenta este polipéptido se hallan separados por un péptido espaciador, como en otros retroelementos [Xiong Y, 1990]. La figura 1.17B muestra como se alinea la hipotética RT de VIPER, con la de un retrotransposón LTR de *D. melanogaster* denominado Burdock [Tchurikov N, 1989] y con la RT del retrovirus TRB del arroz [Hay J, 1991].

Análisis de Southern blot indicaron que VIPER se encuentra muy repetido en el genoma de *T. cruzi* [Vázquez M, 2000].

Por comparación de secuencias con la base de datos GSS del GenBank, se detectaron secuencias genómicas de *T. brucei* que al ser traducidas presentan una significativa similitud de secuencia con la RT de VIPER (Fig 3.18).

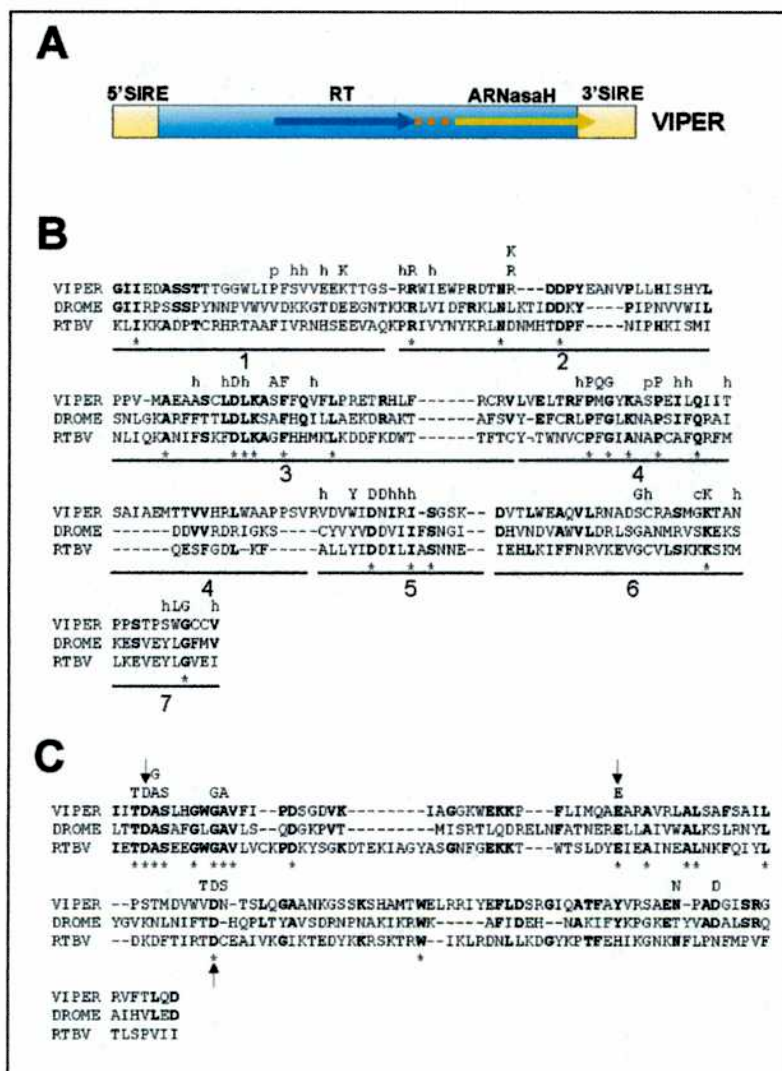


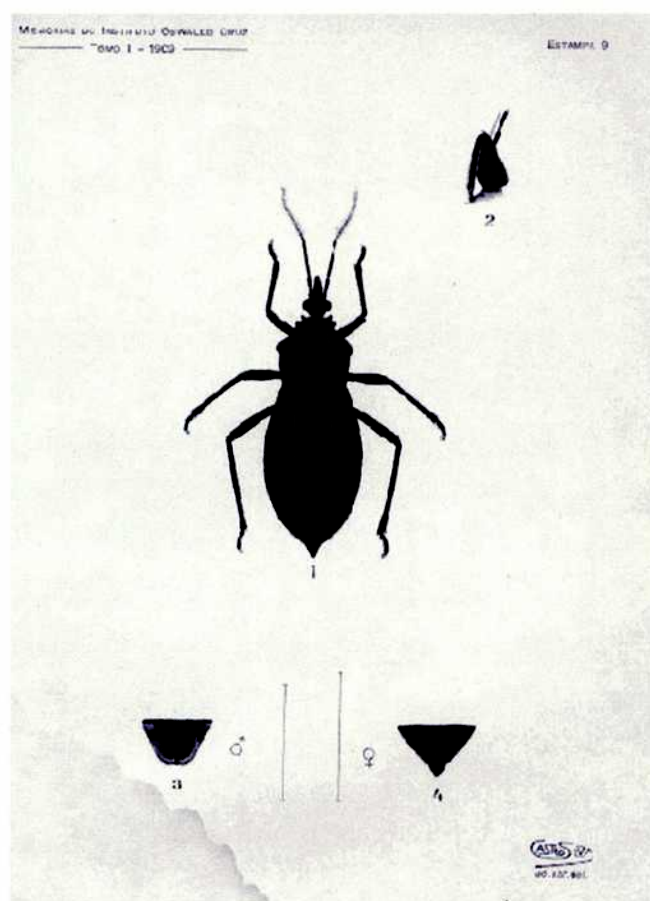
Figura 3.17: A) Esquema de VIPER. Rectángulos amarillos, región 5' y 3' de SIRE; flecha azul, región codificante con dominios de RT; flecha naranja, región codificante con dominios ARNasaH; línea punteada, región espaciadora. b) Alineamiento del dominio RT de VIPER con el del retrotransposón LTR Burdock de *Drosophyla melanogaste* (DROME) y con la RT del retrovirus RTBV del arroz. Los dominios conservados, propuestos por Xiong y Eickbush están numerados del 1 al 7 [Xiong Y, 1990]. Los residuos conservados entre VIPER y las otras dos secuencias se muestran en negrita. Los residuos conservados en las tres secuencias se indican con un asterisco. Los aminoácidos altamente conservados entre las RT según el análisis de Xiong y Eickbush se indican sobre la secuencia en el lugar correspondiente. h, aminoácido hidrofóbico; p, residuo polar pequeño. B) Alineamiento de los dominios ARNasaH. Los aminoácidos muy conservados según el análisis de Doolittle, et al. [Doolittle R, 1989], son indicados sobre la secuencia. Las flechas indican 3 aminoácidos esenciales para la actividad de las ARNasaH.

Es interesante destacar que esta similitud se pierde en la región del ORF de VIPER correspondiente a la secuencia 3' de SIRE (datos no mostrados). Tanto en la RT de VIPER como en su secuencia homóloga en *T. brucei* se conserva el motivo WIDN así como varios de los dominios de ARNasaH.

Tb	DD-YEAIVP PGNVSHYPDAVHDETAALFDLKASFFKKVGLLT
Tc	DDPYEANVPLLHISHYLPVPMAGGRFLPGFKGILESSL-LPR
	** *** ** :*** * * : * : *
Tb	DTRSCFLCRTAGGKLVELARLPMGYKCCPEILHTVTRVLGDSAVVKTEYAAESSLKVHV
Tc	ETRHLEFCRVEDGTLVELTRFPMGYKASEILQIITSAIAEMTTVVHRLWAAPSVRVDV
	:** * ** * ****:***** ****: * * :***: :*** **: *
Tb	WIDNIRISGPHKTVKEWGTHIAKNMKEGVTVSKQQKMVTR-YGFIGVLFHDHKQTVLLN
Tc	WIDNIRISGSKSDVTLWEAQVLRNADSCRASMGKTANRTPPSTPSWGCCVVT--QHAISL
	***** : * * : : * * : : * * : * *
Tb	AKTIRRLRESAPLETATIKRMESVVSRLMIYAAGIRGAIFFRHYFFLKMVRRRLSELNRCV
Tc	SESFFSVRAMPALNSCPILAEMVMASRFLYAPPILGTRLCQYFFIKAVRRRLSALNRGI
	: : : : * * : : * * : : : : * * : : : : * * : : : : *
	TDAS GA
Tb	LAQNDMARLSLOAIRMGQELSGLE---KEPVKESRLTSATSVTDASIHGWGALLFKDS
Tc	VLETSPANLPFSAVGLGERLRHTIENNRKRIIKPT-ERASAAITDASLHGWGAVFIPDS
	: : * * * : : * * * : : * * : : : : * * : : : : *
	E TDS
Tb	GKVWASGG-QEQPHCISHTKARAVTLALRAEQSLLNNIHVCVDNTVMHVTKKGNTHS
Tc	GDVKIAGGKWEKKFELIMQARAVRLPLSAFSAILPSTMDVWVDNTSLQGAANKGSSKS
	* * : ** * : * * : : * * * * * * * : * * : : * * : : *
	N D
Tb	DASVQEVSLIDHAYLEEGIEA-LDYVVSANFADGISRRRAVFPDLAKGWNIX-GA---
Tc	HAMTWELRRIYEFDSRGIQATFAYVRSANPADGISRGVFTLQDLAKGWNLRGAAGS
	* * : * * * * * * * * * * * * * * * *

Figura 3.18: comparación de VIPER con una secuencia homóloga de *T. brucei*. Los asteriscos indican aminoácidos idénticos; los dos puntos, cambios conservativos (según el programa de análisis de proteínas PROSIS). Tb, *Trypanosoma brucei*; Tc, *Trypanosoma cruzi*. En azul se indican los aminoácidos conservados en el dominio ARNasaH de las RT.

RESULTADOS PARTE II



4 Construcción de una biblioteca genómica YAC del clon CL Brener de *Trypanosoma cruzi*

Una de las estrategias utilizadas para facilitar la secuenciación del genoma de *T. cruzi*, es la construcción previa del mapa físico de cada uno de sus cromosomas. Para ello es fundamental contar con una buena colección de marcadores genómicos que sean representativos de todo el genoma junto con varias bibliotecas genómicas que contengan distintos tamaños de inserto. En base a esto, se decidió construir una biblioteca de grandes fragmentos de ADN genómico de *T. cruzi* en vectores YAC, que junto a los marcadores SAS generados anteriormente, permita la construcción del mapa físico de los diferentes cromosomas del parásito.

4.1 Preparación del ADN genómico de epimastigotes de *T. cruzi*

Para construir la biblioteca YAC, base del mapa físico, es necesario obtener ADN genómico de *T. cruzi* intacto. Para ello, se resuspendieron 3×10^9 epimastigotes en 3 ml de agarosa de bajo punto de fusión que sirvieron para preparar aproximadamente 30 bloques de 100 μ l cada uno, conteniendo cada uno alrededor de 20 μ g de ADN genómico. La integridad del material fue analizada por corridas en PFGE. Posteriormente, se pusieron a punto las condiciones para obtener fragmentos de ADN de tamaño entre 300 kpb a 500 kpb por restricción parcial con la enzima EcoRI. Así, los mejores resultados fueron obtenidos utilizando 5 U de enzima por cada 1 μ g de ADN genómico. Para preparar los insertos, se digirió parcialmente 100 μ g de ADN genómico. Luego se seleccionó el ADN del rango mencionado en PFGE preparativos. Aquellos fragmentos que presentaron un tamaño entre 300 kpb a 500 kpb fueron recuperados del gel y ligados en agarosa a los brazos del vector pYAC4 (ver materiales y métodos, pag 61). Los productos de la ligación fueron sometidos a una segunda vuelta de selección por tamaño en PFGE preparativos. Una vez recuperado el ADN, se trató con la enzima agarasa para eliminar la

agarosa remanente. Luego, el ADN ligado fue utilizado para transformar esferoplastos de la cepa AB1380 de levaduras. Los YACs con inserto (detectados por su característico color rosa debido a que el gen SUP4ARNt es interrumpido por el fragmento clonado) fueron ordenados en placas de 96 wells.

Para determinar el tamaño promedio de inserto de la biblioteca, se tomaron 60 clones YAC al azar y se determinó su tamaño por Southern blot de cariotipos electroforéticos de PFGE usando una sonda específica de uno de los brazos del vector YAC. Los resultados indicaron que el tamaño promedio de los insertos de la biblioteca es de 365 kpb (Fig 4.1).

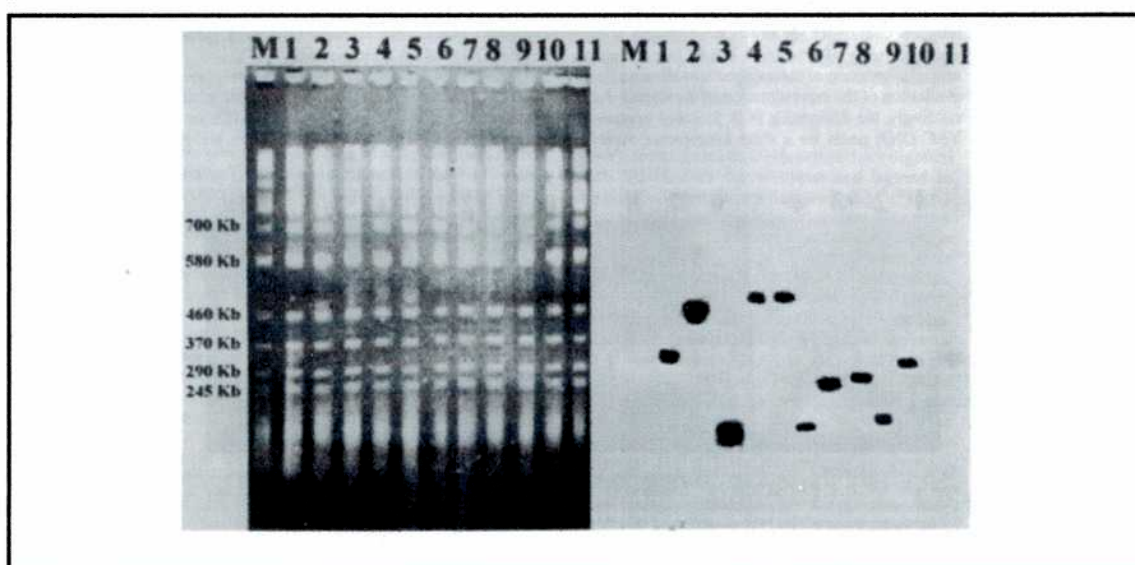


Figura 4.1: Panel izquierdo, tinción con bromuro de etidio de una separación por PFGE de ADN genómico de 11 clones YAC provenientes de la biblioteca genómica de *T. cruzi*. A la izquierda se indican los tamaños correspondientes al marcador de peso molecular en kpb (calle M). Panel derecho, Southern blot a partir de la misma corrida en PFGE e hibridada con una sonda específica para uno de los brazos del vector YAC.

4.2 Estudios de representatividad de la biblioteca genómica YAC

Se utilizaron dos métodos para evaluar la representatividad de la biblioteca: (1) preparación de filtros a partir de cada placa de 96 wells con posterior hibridación con sondas específicas e identificación de YACs positivos y (2) utilización de la técnica de PCR tridimensional para

amplificar secuencias específicas utilizando como templado diferentes mezclas de ADN provenientes de distintos clones cada una.

4.3 Verificación de la identidad del ADN clonado en la biblioteca YAC

Para confirmar que el ADN clonado en la biblioteca YAC era de *T. cruzi*, se desarrolló un protocolo de PCR para amplificar la secuencia repetida SIRE, específica de este parásito, a partir de "pools" de ADN de los YACs. La figura 4.2 muestra el resultado del rastreo de una de las placas de 96 wells. En este caso, 18 de las 20 mezclas de ADN dieron productos de amplificación provenientes de SIRE o de secuencias derivadas de este elemento repetido, indicando que 55 de los 96 clones contenían SIRE o secuencias relacionadas.

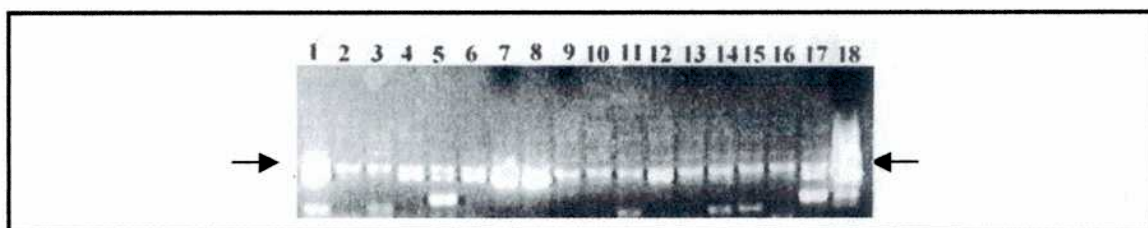


Figura 4.2: Rastreo por PCR de la secuencia repetida SIRE a partir de mezclas de ADN provenientes de distintos clones YAC de la biblioteca genómica de *T. cruzi*. Las flechas indican el producto de amplificación de tamaño esperado.

4.4 Rastreo del gen que codifica para la proteína gp90

En el genoma de *T. cruzi* se encuentran aproximadamente 40 copias del gen codificante para la proteína gp90, localizándose en 10 de las 20 bandas cromosómicas [Cano MI, 1995]. Rastreos por PCR, a partir de mezclas de ADN representativas de 200 clones, permitió identificar 12 YACs positivos para gp90 que fueron confirmados posteriormente por Southern blot de PFGE (Fig 4.3).

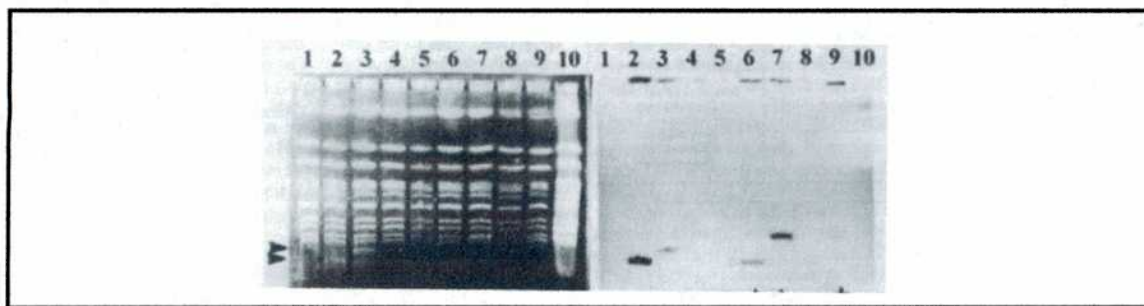


Figura 4.3: Panel izquierdo, tinción con bromuro de etidio de una separación por PFGE de ADN genómico de 10 clones YAC provenientes de la biblioteca genómica de *T. cruzi*. Panel derecho, Southern blot a partir de la misma corrida en PFGE e hibridada con una sonda específica para el gen gp90.

4.5 Rastreo del gen que codifica para la proteína hsp70

El gen hsp70 se encuentra localizado en las bandas cromosómicas IX y X de *T. cruzi* [Cano MI, 1995]. Por PCR tridimensional a partir de ADN proveniente de 400 YACs se identificó un fragmento genómico que poseía la secuencia codificante de este gen.

4.6 Rastreo del gen que codifica para la proteína JL7-H49

Los genes codificantes para esta proteína se localizan en las bandas cromosómicas XVI y XVII y se encuentran ligados al gen que codifica la proteína JL8 [Cano MI, 1995]. Por hibridación de 10 membranas de nylon con una sonda específica del gen JL7, representando un total de 960 clones, se identificaron 3 clones positivos para el gen JL7-H49 de *T. cruzi*. Esto fue confirmado con posterioridad por PCR a partir del ADN genómico de los YACs correspondientes.

Estos primeros resultados mostraron que la biblioteca genómica YAC era representativa del genoma nuclear ya que contiene un 60% de los YACs positivos para SIRE, 10% positivos para gp90 y un bajo porcentaje de representatividad para los genes JL7-H49 y hsp70.

Con el fin de estudiar la presencia de quimeras, se realizaron ensayos de Southern blot de los clones YAC positivos para gp90, JL7-H49 y hsp70 y se compararon los tamaños de los fragmentos de restricción obtenidos a

partir de ADN de cada clon, con aquellos obtenidos por restricción de ADN genómico de la cepa CL Brener de *T. cruzi*. En todos los casos analizados no se observó la presencia de YACs quiméricos.

4.7 Caracterización de la estabilidad de la biblioteca genómica YAC de *T. cruzi*

Finalmente, se completó la caracterización de la biblioteca genómica YAC, determinando la estabilidad de los cromosomas artificiales. Para ello se tomaron 20 YACs al azar y se determinó por Southern blots de PFGE el tamaño de los insertos de los YACs luego de 100 repiques. En ningún caso se observaron variaciones en el tamaño de los YACs (Fig 4.4) demostrando que son estables, requisito indispensable para utilizarlos en la construcción del mapa físico.

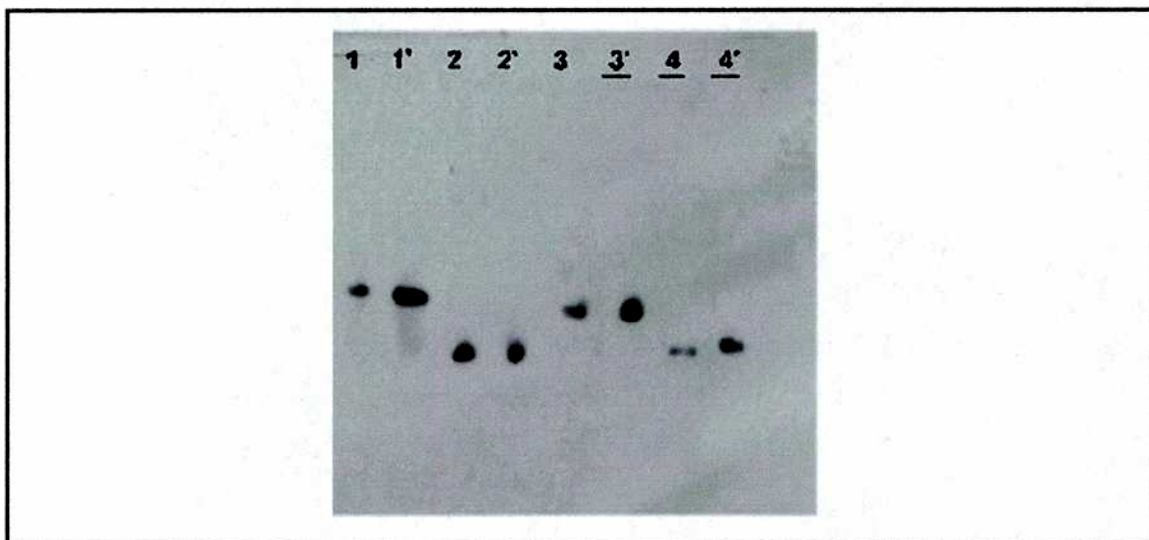


Figura 4.4: Radiografía de un cromoblot de PFGE de cuatro clones YAC antes (N) y después (N') de 100 repiques con sonda específica de uno de los brazos del vector YAC.

4.9 Mapa físico del cromosoma XVII

En colaboración con el laboratorio del Dr. Franco da Silveira, Universidad de San Pablo, Brasil, se comenzó la construcción del mapa físico del cromosoma XVII. En dicho cromosoma se localizan dos copias del gen H49 y una del gen JL8 [Cano MI, 1995].

Rastreo de la biblioteca YAC con estos genes y otros marcadores EST, permitió el aislamiento de 9 YACs que cubren esta región. Posteriormente, se pudo determinar el tamaño de los insertos por Southern blot de PFGE hibridados con sondas específicas para los genes H49 y JL8. Los YACs Y7A2 (600kpb), Y7H8 (400kpb), Y7H7 (300kpb), Y5G9 (180kpb), Y8E1 (200kpb), Y9H8 (180kpb) y Y6B7 (200kpb) son positivos para el marcador H49. Los YACs Y7A7, Y5G9, Y9H8 y Y6B7 son positivos para el marcador JL8.

Por mapeo de restricción parcial e hibridación con otros marcadores y con sondas de extremos de los YACs construidas utilizando la técnica de Bubble PCR [Vázquez M, 1999] se logró ensamblar un continuo de fragmentos clonados (contig) que abarca un tercio (0.8Mpb) del cromosoma XVII de 4.6 Mpb [Santos M, 1999](Fig 4.5).

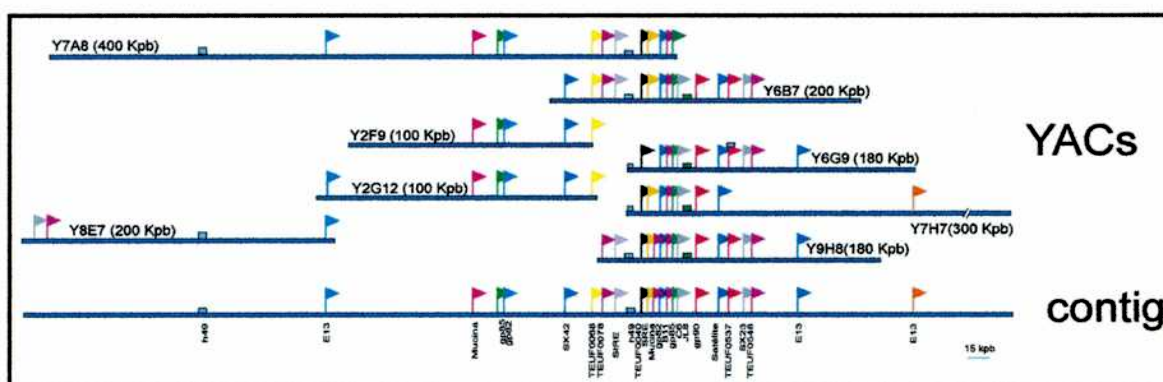


Figura 4.5: esquema del mapa físico de una región del cromosoma XVII de la cepa CL Brener de *T. cruzi*.

4.10 Mapa físico de los cromosomas XIX y XX

Para construir los mapas físicos de los cromosomas XIX y XX se rastreó la biblioteca genómica YAC con dos marcadores específicos de ambas bandas cromosómicas: TcP0 y TcP1. De esta manera, se hibridaron membranas conteniendo 1000 YACs de la biblioteca con una sonda del gen TcP0, que es un marcador específico de estas bandas cromosómicas. Los YACs positivos en este primer rastreo fueron confirmados por amplificación del gen TcP0 por PCR y por hibridación de Southern blots de PFGE (Fig 4.6).

Así se pudieron aislar dos YACs (clones 117 y 496) que contenían al gen TcP0.

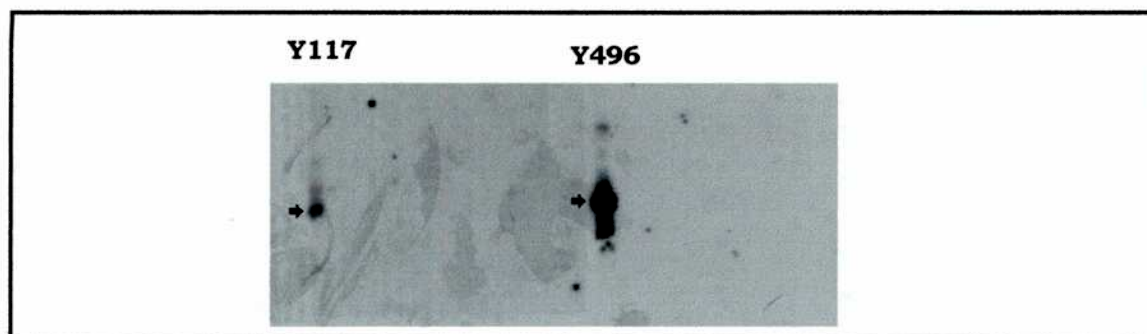


Figura 4.6: Southern blot de PFGE hibridado con sonda específica del gen TcP0. Las flechas indican la banda correspondiente al YAC 117 (izquierda) y 496 (derecha).

Al igual que el cromosoma XVII, se determinó el tamaño de los YACs positivos por Southern blots de PFGE. El YAC 117 contiene un inserto de 175 Kpb y el YAC 496 uno de 240 Kpb. Este último también hibrida con la secuencia repetida SIRE.

También se realizaron Southern blots a partir de ADN genómico total de cada YAC hibridados con una sonda específica para el gen TcP0

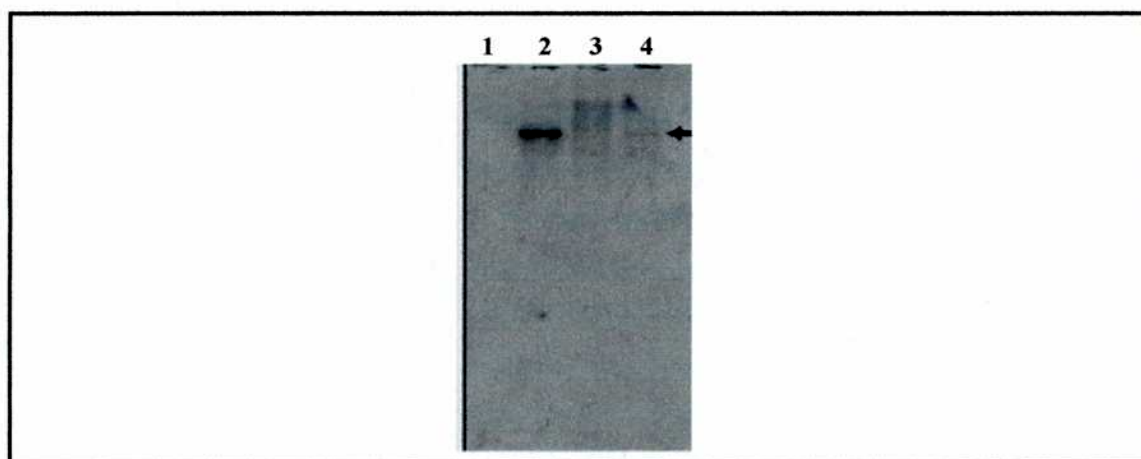


Figura 4.7: Southern blot de ADN genómico total digerido con EcoRI de: levadura (calle 1); clon 117 (calle 2); clon 496 (calle 3); *Trypanosoma cruzi* (calle 4). La flecha indica la banda que contiene al gen TcP0.

observándose que mientras el YAC 117 dio como resultado una banda de 6.5 kpb al igual que el ADN genómico de la cepa CL Brener, el YAC 496

dio una banda de mayor peso molecular, sugiriendo la presencia de una posible quimera (Fig 4.7).

4.11 Purificación de las bandas cromosómicas XIX y XX

Otra forma para identificar YACs con fragmentos de los cromosomas XIX y XX. Esta consiste en realizar un rastreo de la biblioteca genómica YAC utilizando como sonda las bandas cromosómicas purificadas. Se pusieron a punto las condiciones de corrida en PFGE preparativos que permitieron resolver las bandas cromosómicas de 3.3 Mpb y 3.5 Mpb (cromosomas XIX y XX respectivamente). Estas condiciones fueron: buffer TAE 1x, agarosa SeaPlake 0.8%, 15 seg – 300 seg 30 hs 3V/cm, 500 seg – 900 seg 30 hs 2,7V/cm, 900 seg – 1500 seg 30 hs 2,7V/cm 14°C, ángulo 120°.

Una vez separadas y purificadas, se controló la pureza de las bandas. Para ello, a partir del ADN purificado se realizaron amplificaciones por PCR utilizando cebadores específicos para los marcadores cromosómicos TcP0 y TcP1 como control positivo y como control negativo cebadores específicos para marcadores de otras bandas cromosómicas como por ejemplo el gen ribosomal TcP2β. El análisis por PCR demostró que el ADN purificado provenía de las bandas cromosómicas de interés y que, al menos para los marcadores utilizados, no contenían cantidades detectables de ADN perteneciente a otros cromosomas. La figura 4.8 muestra una corrida de PFGE de ADN total de la cepa CL Brener de *T. cruzi* y de los ADN purificados de las bandas cromosómicas XIX y XX. La flecha indica la zona de compresión donde sólo corren las bandas XIX y XX.

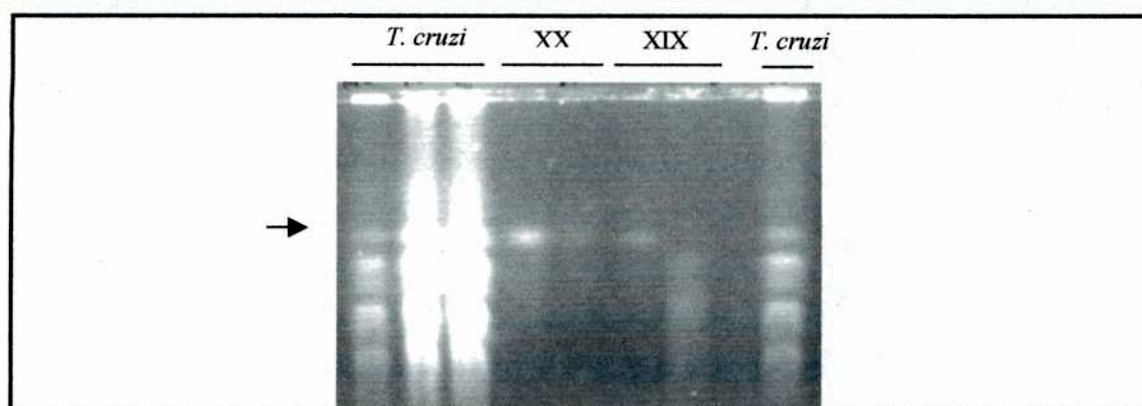


Figura 4.8: PFGE de las bandas cromosómicas XIX y XX purificadas. *T. cruzi*: calles correspondientes a ADN genómico total de la cepa CL Brener de *T. cruzi*; XX ADN purificado del cromosoma XX; XIX: ADN purificado del cromosoma XIX.

4.12 Construcción de una sub-biblioteca YAC del cromosoma XX

Se utilizó la banda del cromosoma XX purificada para hacer una sonda cromosoma-específica con la cual hibridar la biblioteca YAC. El rastreo de una membrana de nylon conteniendo 1000 YACs con esta sonda, permitió construir una sub-biblioteca 64 YACs enriquecida en clones con fragmentos genómicos pertenecientes al cromosoma XX de *T. cruzi* (Fig 4.9).

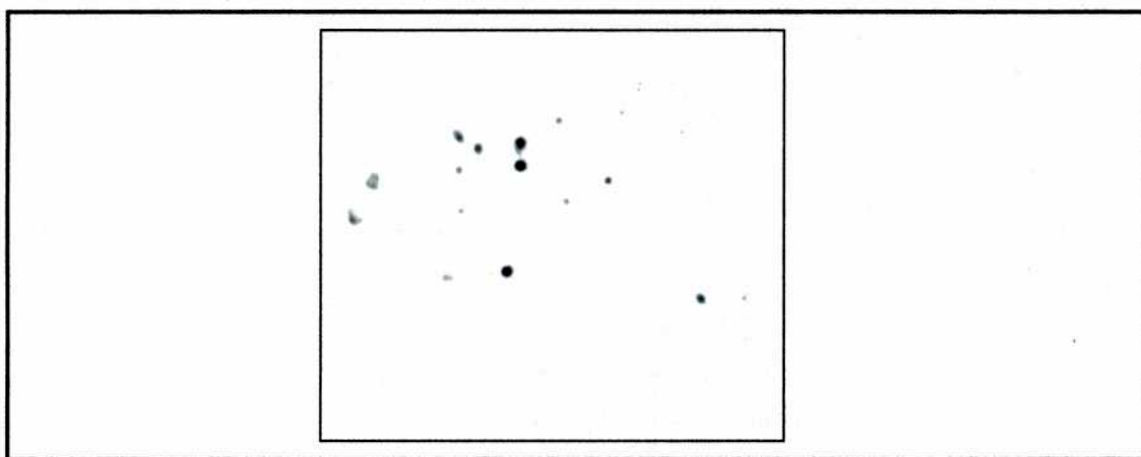


Figura 4.9: rastreo de la biblioteca YAC utilizando como sonda ADN purificado proveniente del cromosoma XX.

La hibridación de esta sub-biblioteca con la secuencia repetida SIRE indicó que aproximadamente el 50% de los clones contenían dicha secuencia

repetida. Posteriormente, se rastreó la sub-biblioteca con una sonda específica para el marcador TcP0 obteniendo 6 posibles clones positivos, 4 de los cuales fueron reconfirmados posteriormente por hibridación con un cromoblot de PFGE (Tabla 4.1). Esto permitió corroborar que la sub-biblioteca contenía fragmentos pertenecientes a las bandas cromosómicas XIX y XX.

YAC	Tamaño	SIRE	TcP0
16		+	-
18		-	-
34	180kpb	+	+
43		-	-
54	150kpb	+	+
62	170kpb	+	+
63	175kpb	+	+

Tabla 4.1: caracterización de 7 YACs específicos del cromosoma XX

4.13 Generación de marcadores EST (Expressed Sequence Tags) cromosoma específicos

Para incrementar el número de marcadores EST sobre las bandas

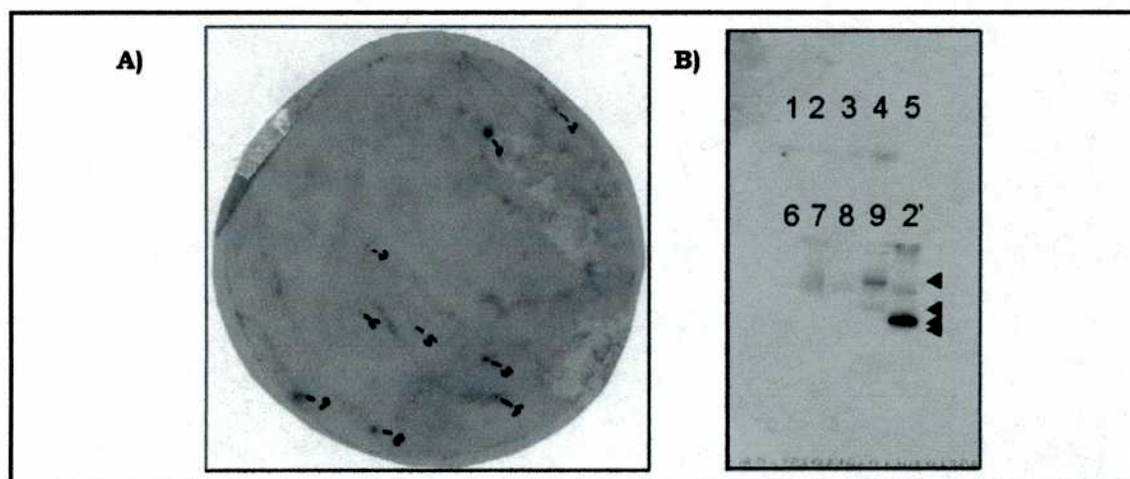


Figura 4.10: A) Rastreo de la biblioteca de ADNc de *T. cruzi* con ADN purificado del cromosoma XIX utilizado como sonda. B) Confirmación por Southern blot de los clones de ADNc aislados en el primer rastreo digeridos con EcoRI e hibridados con sonda específica del cromosoma XIX. Las flechas indican las bandas correspondientes a la hibridación específica de los insertos con el ADN del cromosoma XIX.

cromosómicas XIX y XX, se diseñó un protocolo de hibridación de sondas cromosómicas sobre bibliotecas de ADNc de *T. cruzi*. La puesta a punto del método se realizó con una sonda derivada del cromosoma XIX con la cual se rastreó una biblioteca de ADNc del estadio epimastigote de *T. cruzi*. Se aislaron así 9 clones positivos (Fig 4.10A), de los cuales sólo 3 (clones 2', 8 y 9) confirmaron reactividad *a posteriori* con la misma banda cromosómica (Fig 4.10B).

Se secuenciaron los extremos de los ADNc provenientes de los clones 2', 8 y 9 (Fig 4.11) y se realizó una búsqueda de secuencias homólogas en la base de datos del GenBank, determinando que los mismos no poseían homología con algún gen conocido.

Clon 9 AGTCCCTTTAAAAAGAAGTGGAGGCACTAAGAGCGTCTTTTACCTGCTTCCACGCGGCACGGTTGATAGGGCCTGGGTGGGGG AGATGAGCGGGCGGTTAAACACACATTTTGCCGCAACCACAAATAGTAGTAAAATTTAAACACTGGTAAATATTATTGGAAC ACTTCGACCAGACACATTTCTTGCGCCACATCGTTATTGTCTGGAGTATGCGCATGGCGGGGCCTTGTCGCCACTTTTCCTTCCAA AATGGGAGGAGGGGAGCAGCAGGGGAAGTCCACAGTTCGGTT Clon 2' TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTCATTGCTCCCGAAAAGCAAAACACACACACAGGGGGAGAGAGAGAGAGAGGTC GCCCCACTCAATGCAATAAAAAACAAAACAGAAACAGTTACGGTGCTCCGCCCATGCAGCCAGGCAGGACGGCAGCGGTGCGTGTGCG TGCAAAAAGAGAGACCAACGGGCTGTCATGGGTGTGTCATGCATATATATACAAATGGGCACATTATGTGTGTGCTTCGTGGGTGA GGTGAGGGCGAGAGTCCATGCAAGGGGGCACACAGAGAGTGGGTGAAAGACGA Clon 8 TTTNTCAGCGCCGAAAACGTACGAACGAACACAAACAAAA AAAAAGTAAAAATAAAAAATAAATCGCACCGACGTTTCCCCCACAAGTGCGGGGGCGGCGGTAGGAGATGTACATCAGCGCGCG GCCGTGCGAGAGAATGCACGGGCAGGCGGCACGGGGCCAGCACGCAACGGCAGCCAAAACAAAAGATGGTCACACCCGGAAGAAC CAGGCGCAAAACAAACGGCGAAAGTTACGCCAAGCAGCACAACCAAGACAATGGCNTTTTACATCCACACCGTTGCAGGGTG CTCAAATTTACGCGGCGCACCTTTCGGTGGGTACGCGGAGAGCGGC

Figura 4.11: secuencias de los extremos de los fragmentos de ADNc de los clones 2', 8 y 9.

4.14 Análisis de sintenia de grandes fragmentos genómicos en tripanosomátidos.

El mapa físico de un genoma es la representación de las moléculas de ADN que conforman sus cromosomas, y se construye a partir de la superposición de grandes fragmentos de ADN clonados. La construcción del mapa físico de un cromosoma es una forma conveniente de analizar la estructura y el orden de los genes que contiene, y permite realizar comparaciones entre mapas físicos de diferentes especies y/o géneros.

Es por ello que, a partir de la construcción del mapa físico del cromosoma

XVI del clon CL Brener, se realizó un estudio comparativo para determinar si los marcadores utilizados se encontraban también ligados en *T. brucei* y *L. major*. Luego de realizar una búsqueda de homologías con cada uno de los marcadores utilizados para en el armado del contig del cromosoma XVI no se detectaron grupos de ligamiento conservados entre las tres especies de tripanosomatídeos.

Con objeto de analizar la existencia de sintenia en largas regiones cromosómicas se decidió analizar un fragmento secuenciado de 94 kpb correspondiente al cromosoma III del clon CL Brener de *T. cruzi*. Esta región posee dos unidades transcripcionales orientadas en sentido opuesto, separadas entre si por una zona rica en secuencias repetidas, entre las que figura VIPER [Andersson B, 1998]. Debido a que la RT de VIPER tambien se encuentra en *T. brucei* (homologia a nivel de secuencia de amino acidos), se decidió analizar si en *T. brucei*, VIPER esta asociado a los mismos genes a los que se asocia en el cromosoma III de *T. cruzi*.

Para este estudio se utilizaron secuencias de ADN provenientes de cuatro cósmidos de *T. cruzi* (No. Acceso GenBank AF052831, AF052832, AF052833, AF242860) abarcando una región de 123 kpb del cromosoma III, que contiene dos unidades transcripcionales separadas por un fragmento de aproximadamente 15 kpb que contiene la secuencia VIPER. Utilizando la secuencia de 123 kpb como sonda contra la base de datos HTGS y NR de *T. brucei* del GenBank mediante los programas TBLASTX, TBLASTN y BLASTP se encontro lo siguiente (Fig 4.12):

De la traducción de los 35 marcos de lectura abiertos anotados para la secuencia de 123 kpb de *T. cruzi*, 25 presentaron homología significativa ($E < 10^{-10}$) con ORFs presentes en el cromosoma 1 de *T. brucei*. De los 25 genes homólogos, tres de ellos correspondían a una de las unidades transcripcionales y los 22 restantes a la otra.

Cuando se analizó la organización genética del cromosoma 1 de *T. brucei*, se determinó que no sólo se conserva la posición relativa de los genes homólogos, sino también el sitio en el que cambia la orientación del

sentido de la transcripción de ambas unidades policistrónicas, es decir, en la región intergenica que separa los genes 3 y 4 en ambas especies (Fig 4.12). Esto sugiere que estas unidades transcripcionales se encontraban ligadas y en orientación opuesta ya en el ancestro común a *T. cruzi* y *T. brucei*, que probablemente existió hace más de 600 millones de años (cita). La extensa región intergénica que separa ambas unidades transcripcionales esta minada por secuencias repetidas.

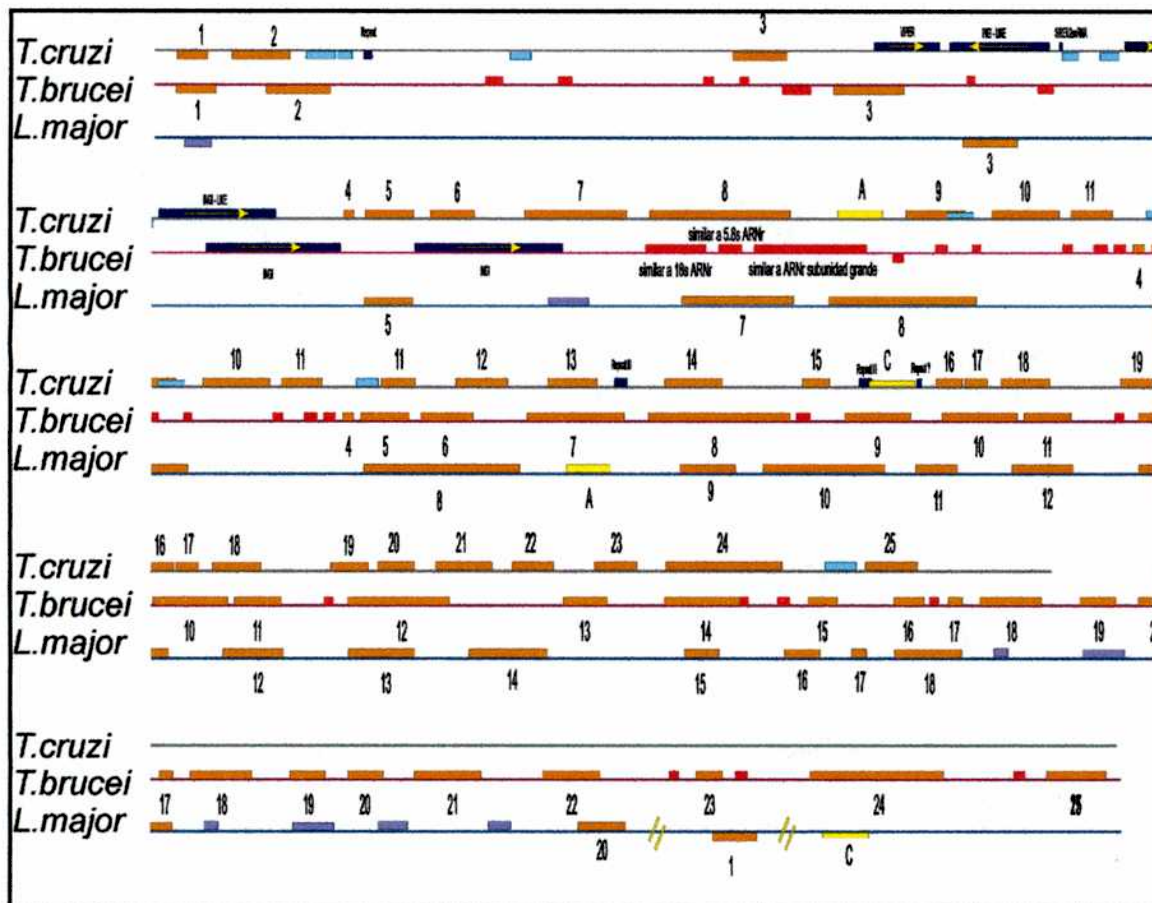


Figura 4.12: Esquema de la región sinténica del cromosoma III de *T. cruzi* y sus homólogas correspondientes al cromosoma 1 de *T. brucei* y en el cromosoma 12 de *L. major*. Rectángulos celestes, genes específicos de *T. cruzi*; rectángulos rojos, genes específicos de *T. brucei*; rectángulos violetas, genes específicos de *L. major*; rectángulos naranjas, genes conservados en los 3 parásitos; rectángulos azul oscuro, secuencias repetidas; rectángulos amarillos, genes conservados en *T. cruzi* y *L. major*. Con flechas amarillas se indica la orientación de los elementos repetidos. Los genes con marco de lectura abierto en la hebra directa o inversa se ubican por sobre o por debajo de la línea respectivamente.

En el caso de *T. brucei* se encuentran dos retrotransposones INGI de ~5 kpb cada uno orientados en la misma dirección (Fig 1.12). Por otro lado, en *T. cruzi* se encuentra VIPER seguido río abajo por dos secuencias repetidas con diferentes grados de homología a INGI de ~4.3 kpb cada una, orientadas en sentido contrario. Ambas presentan una significativa homología con INGI ($E < 10^{-20}$) a nivel de secuencia peptídica, siendo la más conservada de las dos, la que se localiza mas río abajo y que posee la misma orientación que los dos elementos INGI del cromosoma 1 de *T. brucei* (Fig 4.12). De esta manera, se podría especular que la inserción de al menos uno de estos dos elementos (el de igual orientación que en *T. brucei*) haya ocurrido antes de la separación evolutiva entre *T. cruzi* y *T. brucei*.

Un análisis comparativo de la región que comprende los primeros 15 genes homólogos entre *T. cruzi* y *T. brucei* permitió determinar que la distancia entre estos genes está relativamente conservada, a excepción de las regiones intergénicas que separan los genes 3 y 4 y 4 y 5 (Tabla 4.2).

Existen otras particularidades que se conservan entre las regiones analizadas, tanto en *T. brucei* como en *T. cruzi*, la región comprendida

Región intergénica	<i>T. cruzi</i> Long (pb)	<i>T. brucei</i> Long (pb)
I 1-2	939	1805
I 2-3	16329	18541
I 3-4	15300	43863
I 4-5	3838	270
I 5-6	647	354
I 6-7	1833	2004
I 7-8	879	890
I 8-9	4256	2006
I 9-10	1008	1175
I 10-11	453	260
I 11-12	4925	2466
I 12-13	1495	4200
I 13-14	2493	2082
I 14-15	2965	2522

Tabla 4.2: Comparación de las regiones intergénicas de *T. cruzi* y *T. brucei*

entre los genes 2 y 3, de más de 10000 pb de extensión, posee un muy bajo contenido de GC (Fig 4.13).

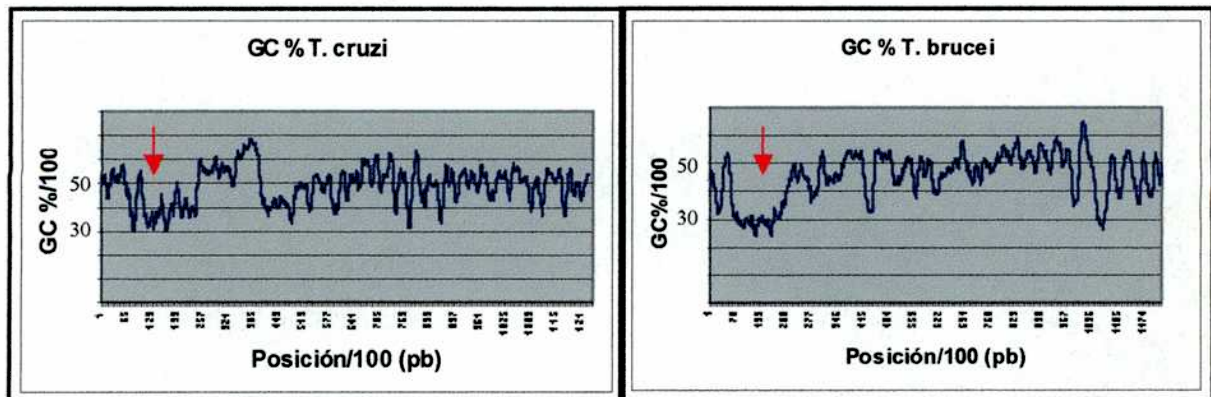


Figura 4.13: Porcentaje de contenido de GC de la región correspondiente al cromosoma III de *T. cruzi* y su homóloga en *T. brucei*. Las flechas rojas indican la región intergénica con bajo contenido en GC localizada entre los genes 2 y 3.

El tamaño de las proteínas codificadas por los primeros 15 genes homólogos también se conserva. Una excepción es la proteína codificada por el gen 12 que es dos veces más larga en *T. brucei* que en *T. cruzi*, aunque no puede descartarse la utilización de un codón atg interno como codón de inicio de traducción (Tabla 4.3). Las variaciones en la extensión de las regiones codificantes se deben principalmente a cambios en la posición del codón de inicio de traducción o a la existencia de inserciones o escisiones. En contraposición, la posición de los codones stop se encuentra generalmente conservada.

ORF	<i>T. cruzi</i>		<i>T. brucei</i>	
	Long. (aa)	Cont. GC (%)	Long. (aa)	Cont. GC (%)
1	363	53.5	511	44.4
2	703	54.6	791	50.6
3	662	40.3	865	46.7
4	133	44.9	133	48.6
5	584	44.8	607	48.3
6	545	43.6	656	50.8
7	1237	48.5	1182	53.9
8	1718	50.7	1737	53.5
9	723	53.1	807	55.7
10	814	58.4	912	56.4
11	497	61.2	569	53.6

12	633	54.8	1249	57.8
13	600	59.4	539	51.8
14	704	49.7	925	54.5
15	334	55.8	3 53	53.4

Tabla 4.3: Comparación de las regiones codificantes de *T. cruzi* y *T. brucei*.

El contenido en GC no presentó variaciones significativas en los genes homólogos a excepción de los genes 1, 6, 11 y 13. En estos casos, la variación se debe principalmente a un cambio en la frecuencia de G y/o C en la tercera posición de los codones sinónimos (aquellos que codifican para el mismo aminoácido).

Utilizando el programa CodonW, se calculó el uso de codones para los 15 genes y se lo comparó con el uso esperado [datos de la página de internet www.kazusa.or.jp/codon/] tanto en *T. cruzi* como en *T. brucei* (Tabla 4.4).

En la región comparada, la relación del uso de codones entre *T. cruzi* y *T. brucei* es cercana a 1 (TcObs/TbObs). La excepción la constituyen algunos codones que ya en el calculo entre las relaciones de usos esperados (TcCU/TbCU) se alejan de 1 (Tabla 4.4, columnas 8 y 9). Es interesante observar que los usos observados suelen ser más próximos a 1 que la relación entre los usos esperados (Tabla 4.4, casillas en amarillo).

		TcCU*	Tc*	Tb*	TbCU*	TcObs/TcCU	TcObs/TbObs	TcCU/TbCU	TbObs/TbCU
Phe	UUU	24.5	24.2	18.91	17.9	0.99	1.17	1.26	1.06
	UUC	13.8	9.06	14.34	18.2	0.66	0.73	0.76	0.68
Leu	UUA	4.9	8.91	10.16	7	1.82	0.88	0.70	1.45
	UUG	14.9	24.5	21.72	15.9	1.51	1.04	0.94	1.37
		TcCU*	Tc*	Tb*	TbCU*	TcObs/TcCU	TcObs/TbObs	TcCU/TbCU	TbObs/TbCU
	CUU	20.3	23.3	20.47	21.5	1.15	1.14	0.94	0.95
	CUC	14.7	11.7	16.56	17.7	0.80	0.71	0.83	0.94
	CUA	3.5	6.09	6.563	8.5	1.74	0.93	0.41	0.77
	CUG	29	21.1	18.13	18.7	0.73	1.16	1.55	0.97
		TcCU*	Tc*	Tb*	TbCU*	TcObs/TcCU	TcObs/TbObs	TcCU/TbCU	TbObs/TbCU
Ile	AUU	19.7	26.6	24.03	19.8	1.35	1.21	0.99	1.11
	AUC	15	14.5	14.06	15.6	0.83	0.89	0.96	0.90
	AUA	4.9	7.81	10.78	10.3	1.59	0.72	0.48	1.05
Met	AUG	24.6	15.6	15.63	25.2	0.64	1.00	0.98	0.62
		TcCU*	Tc*	Tb*	TbCU*	TcObs/TcCU	TcObs/TbObs	TcCU/TbCU	TbObs/TbCU
Val	GUU	18.5	18.4	18.91	21.4	1.00	0.98	0.86	0.88

	GUC	13.5	11.6	7.656	12	0.86	1.51	1.13	0.64
	GUA	5.7	7.66	11.41	12	1.34	0.67	0.48	0.95
	GUG	37.2	24.8	24.53	27	0.67	1.01	1.38	0.91
		TcCU*	Tc*	Tb*	TbCU*	TcObs/TcCU	TcObs/TbObs	TcCU/TbCU	TbObs/TbCU
Ser	UCU	10.4	16.4	14.22	10.5	1.58	1.15	0.99	1.35
	UCC	13.6	16.7	16.56	11	1.23	1.01	1.24	1.51
	UCA	9.1	16.1	15.31	10.7	1.77	1.05	0.85	1.43
	UCG	13.3	15.2	13.59	8.7	1.14	1.11	1.53	1.56
		TcCU*	Tc*	Tb*	TbCU*	TcObs/TcCU	TcObs/TbObs	TcCU/TbCU	TbObs/TbCU
Pro	CCU	8	11.6	14.84	10.2	1.45	0.78	0.78	1.46
	CCC	12	14.5	16.09	10.6	1.21	0.90	1.13	1.52
	CCA	11.8	17.2	15.94	12	1.46	1.08	0.98	1.33
	CCG	15.4	19.2	15.63	9.9	1.25	1.23	1.56	1.58
		TcCU*	Tc*	Tb*	TbCU*	TcObs/TcCU	TcObs/TbObs	TcCU/TbCU	TbObs/TbCU
Thr	ACU	11.2	10.9	14.22	14.6	0.98	0.77	0.89	1.13
	ACC	14.9	14.3	14.81	14.7	0.83	0.96	1.17	1.01
	ACA	14.9	18.3	17.03	18.5	1.23	1.07	0.81	0.92
	ACG	26.4	20.9	18.28	15.8	0.79	1.15	1.67	1.16
		TcCU*	Tc*	Tb*	TbCU*	TcObs/TcCU	TcObs/TbObs	TcCU/TbCU	TbObs/TbCU
Ala	GCU	17.8	13.4	17.19	20.9	0.75	0.78	0.85	0.82
	GCC	25.9	14.7	13.59	20.3	0.57	1.08	1.28	0.67
	GCA	18.6	16.9	16.25	26	0.91	1.04	0.72	0.63
	GCG	30.6	17.5	15.31	20.4	0.57	1.14	1.50	0.75
		TcCU*	Tc*	Tb*	TbCU*	TcObs/TcCU	TcObs/TbObs	TcCU/TbCU	TbObs/TbCU
Tyr	UAU	7.1	13.3	13.59	10.6	1.87	0.98	0.67	1.28
	UAC	17.6	18	17.66	15.9	1.02	1.02	1.11	1.11
		TcCU*	Tc*	Tb*	TbCU*	TcObs/TcCU	TcObs/TbObs	TcCU/TbCU	TbObs/TbCU
His	CAU	8.5	13.8	15.16	9	1.62	0.91	0.94	1.68
	CAC	13.5	17.5	16.09	14.9	1.30	1.09	1.05	1.25
Gln	CAA	10.4	13.6	14.34	15.4	1.31	1.10	0.68	0.80
	CAG	23.3	17.7	18.91	20.6	0.76	0.93	1.13	0.92
		TcCU*	Tc*	Tb*	TbCU*	TcObs/TcCU	TcObs/TbObs	TcCU/TbCU	TbObs/TbCU
Asn	AAU	15.8	16.7	15	17	1.06	1.11	0.93	0.88
	AAC	21	14.5	16.25	23.4	0.69	0.89	0.90	0.69
Lys	AAA	15.2	13.1	11.25	26	0.86	1.17	0.58	0.43
	AAG	37.7	18.1	20	35.1	0.48	0.91	1.07	0.57
		TcCU*	Tc*	Tb*	TbCU*	TcObs/TcCU	TcObs/TbObs	TcCU/TbCU	TbObs/TbCU
Asp	GAU	21.2	17.3	18.91	26.1	0.82	0.92	0.81	0.72
	GAC	27.4	13.9	14.34	26.9	0.51	1.13	1.02	0.46
Glu	GAA	23.2	14.8	14.34	33.1	0.55	1.04	0.70	0.37
	GAG	45.1	18.4	18.91	39.6	0.41	0.98	1.14	0.48
		TcCU*	Tc*	Tb*	TbCU*	TcObs/TcCU	TcObs/TbObs	TcCU/TbCU	TbObs/TbCU
Cys	UGU	6.2	14.2	13.75	8.2	4.29	1.03	0.76	1.68
	UGC	14.6	17	17.5	11.7	1.35	0.97	1.08	1.50
Trp	UGG	11.9	15.6	15.63	9.8	1.31	1.00	1.21	1.59
		TcCU*	Tc*	Tb*	TbCU*	TcObs/TcCU	TcObs/TbObs	TcCU/TbCU	TbObs/TbCU

Arg	CGU	14.3	24.2	23.44	15.5	1.55	0.95	0.92	1.51
	CGC	19.1	20.5	16.88	15.1	1.07	1.21	1.26	1.12
	CGA	6.7	16.1	11.88	7.1	4.40	1.36	0.94	1.67
	CGG	10.1	16.1	17.5	9.7	1.59	0.92	1.04	1.80
		TcCU*	Tc*	Tb*	TbCU*	TcObs/TcCU	TcObs/TbObs	TcCU/TbCU	TbObs/TbCU
Ser	AGU	11.1	15.3	17.97	11.5	1.38	0.85	0.97	1.56
	AGC	15.5	14.2	16.25	13.9	0.92	0.88	1.12	1.17
Arg	AGA	4.1	7.5	9.844	6.4	1.83	0.76	0.64	1.54
	AGG	7.7	11.4	14.22	7.9	1.48	0.80	0.97	1.80
		TcCU*	Tc*	Tb*	TbCU*	TcObs/TcCU	TcObs/TbObs	TcCU/TbCU	TbObs/TbCU
Gly	GGU	19.3	18.3	21.41	23.8	0.95	0.85	0.81	0.90
	GGC	28.3	15.8	14.22	18.5	0.56	1.11	1.53	0.77
	GGA	14.3	13.9	14.38	15.9	1.13	0.97	0.77	0.90
	GGG	14.6	14.5	14.5	14.1	1.00	1.16	1.21	1.03

Tabla 4.4: análisis del uso de codones para los 15 primeros genes homólogos de *T. cruzi* y *T. brucei*. En azul se indican los 20 aminoácidos con sus codones correspondientes. TcCU, uso de codones calculado para *T. cruzi*; Tc, uso de codones de los 15 genes homólogos de *T. cruzi*; TbCU, uso de codones calculado para *T. brucei*; Tb, uso de codones para los 15 genes homólogos de *T. brucei*; TcObs/TcCU y TbObs/TbCU, relación entre la frecuencia observada y esperada de cada codón en los 15 genes comparados en *T. cruzi* o *T. brucei* respectivamente; TcCU/TbCU, relación las frecuencias de uso de codones esperadas entre *T. cruzi* y *T. brucei*; TcObs/TbObs, relación de las frecuencias observadas del uso de codones entre *T. cruzi* y *T. brucei*. * Frecuencia de los codones cada 1000 aminoácidos. En el análisis no se incluyen los codones stop. En amarillo se resaltan las relaciones que muestran un uso diferencial de codones entre *T. cruzi* y *T. brucei*, ya sea observada o esperada.

4.15 La región analizada del cromosoma III de *T. cruzi* se conserva en *L. major*

El análisis del banco de datos HTGS permitió ubicar una zona homóloga a la descrita previamente en *L. major*. Los resultados de este análisis se muestran en el esquema de la figura 4.12 que representa el alineamiento de las regiones de *T. cruzi* y *T. brucei* junto con un contig preliminar correspondiente al cromosoma 12 de *L. major*.

De los 35 ORF anotados para *T. cruzi*, 21 se conservan en el locus de *L. major*. La posición relativa de los ORF homólogos también se conserva, a excepción del gen 1 y el gen C que se encuentran a 70 kpb y 158 kpb río abajo del gen 18 respectivamente y los genes 23 y 24 que se encuentran a 357 kpb río abajo del gen 18.

Es llamativo que en este parásito también se conserva el cambio de

orientación de las dos unidades transcripcionales, aunque, a diferencia de lo observado en *T. cruzi* y *T. brucei*, la distancia entre las unidades no contiene secuencias repetidas.

4.16 Estudio de la distribución de nucleótidos en la región sinténica

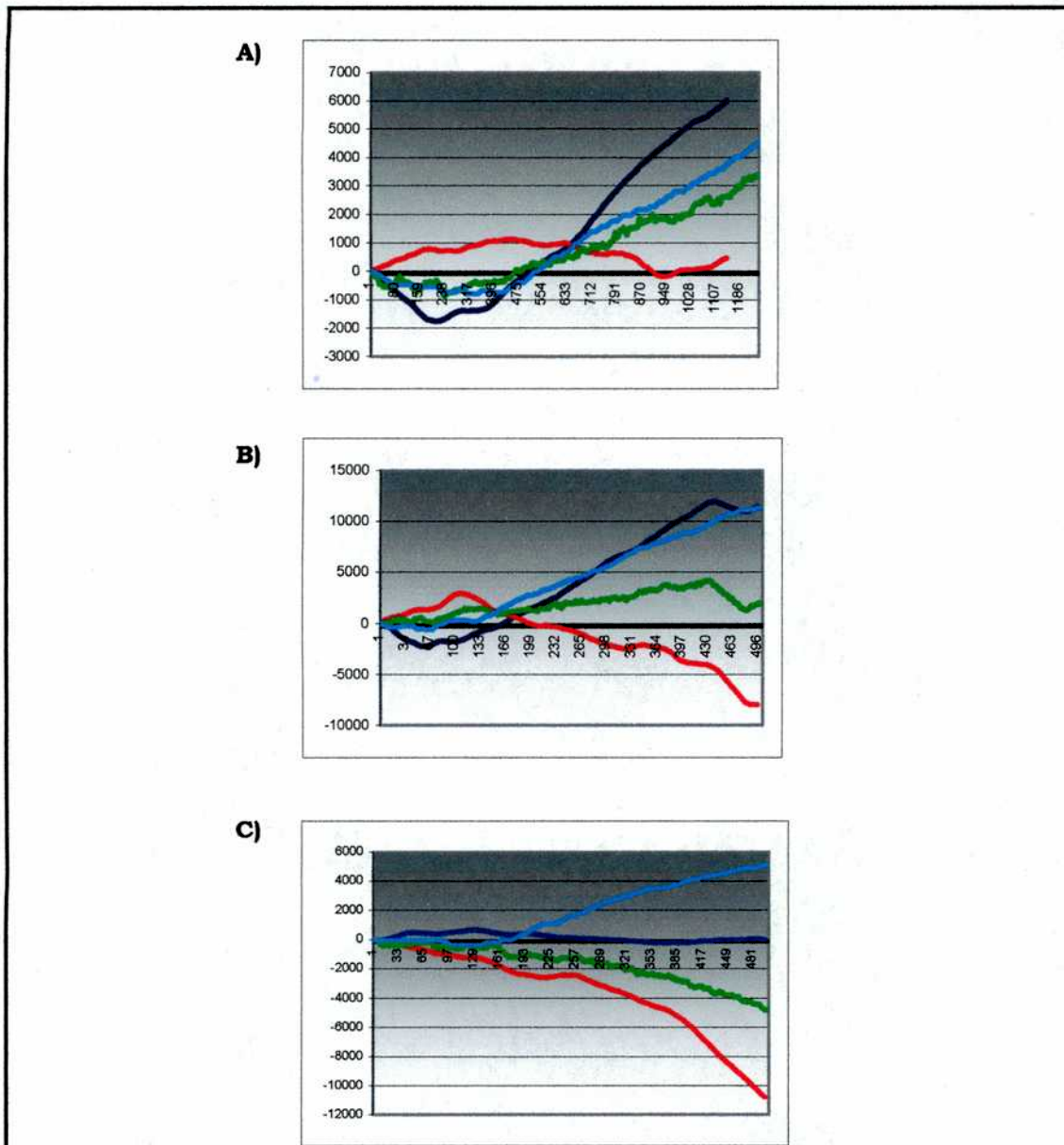


Figura 4.14: GC skew, AT skew y exceso de purinas de las regiones sinténicas de (A) *T. cruzi*, (B) *T. brucei* y (C) *L. major*. Línea celeste, exceso de secuencias codificantes; línea azul, GC skew; línea verde, AT skew; línea roja, exceso de purinas; eje vertical, puntaje del estadístico en unidades arbitrarias; eje horizontal, posición a lo largo de la región sinténica en unidades arbitrarias.

Se realizó un estudio sobre la distribución de bases en la región del cromosoma III de *T. cruzi* y de sus homólogas en *T. brucei* y *L. major* para determinar si en estos parásitos se cumplen las reglas descriptas para genomas bacterianos.

En la figura 4.14 se grafican el exceso de purinas (*EP*), el *GC skew* y el *AT skew* junto con el exceso de secuencia codificante (suma de las diferencias entre el número de bases codificantes en la hebra directa y la hebra inversa).

El análisis de *EP* mostró una distribución de nucleótidos asimétrica. En particular, se observó una correlación positiva entre el *EP* y la dirección de transcripción de los genes en *T. cruzi* y *T. brucei* mientras que en *L. major* la correlación fue negativa. En los dos primeros casos, el mínimo correspondió a la región localizada entre las dos unidades transcripcionales, mientras que en esta posición se registró un máximo en *L. major* (Fig 4.14, línea verde).

Resultados análogos fueron obtenidos cuando se analizó el *GC skew* (Fig 4.14, línea azul), donde se registró un mínimo que coincide con la región donde se produce el cambio en la orientación de los genes y una correlación positiva con respecto al sentido de transcripción tanto en *T. brucei* como en *T. cruzi*, mientras que lo opuesto fue observado en *L. major*.

Llamativamente, en las tres especies se observó una relación inversa entre el *AT skew* y la dirección de transcripción de los genes, con un máximo en la región que separa las dos unidades transcripcionales (Fig 4.14, línea roja). En *T. cruzi*, esta tendencia es menos marcada que para *Leishmania* y *T. brucei*.

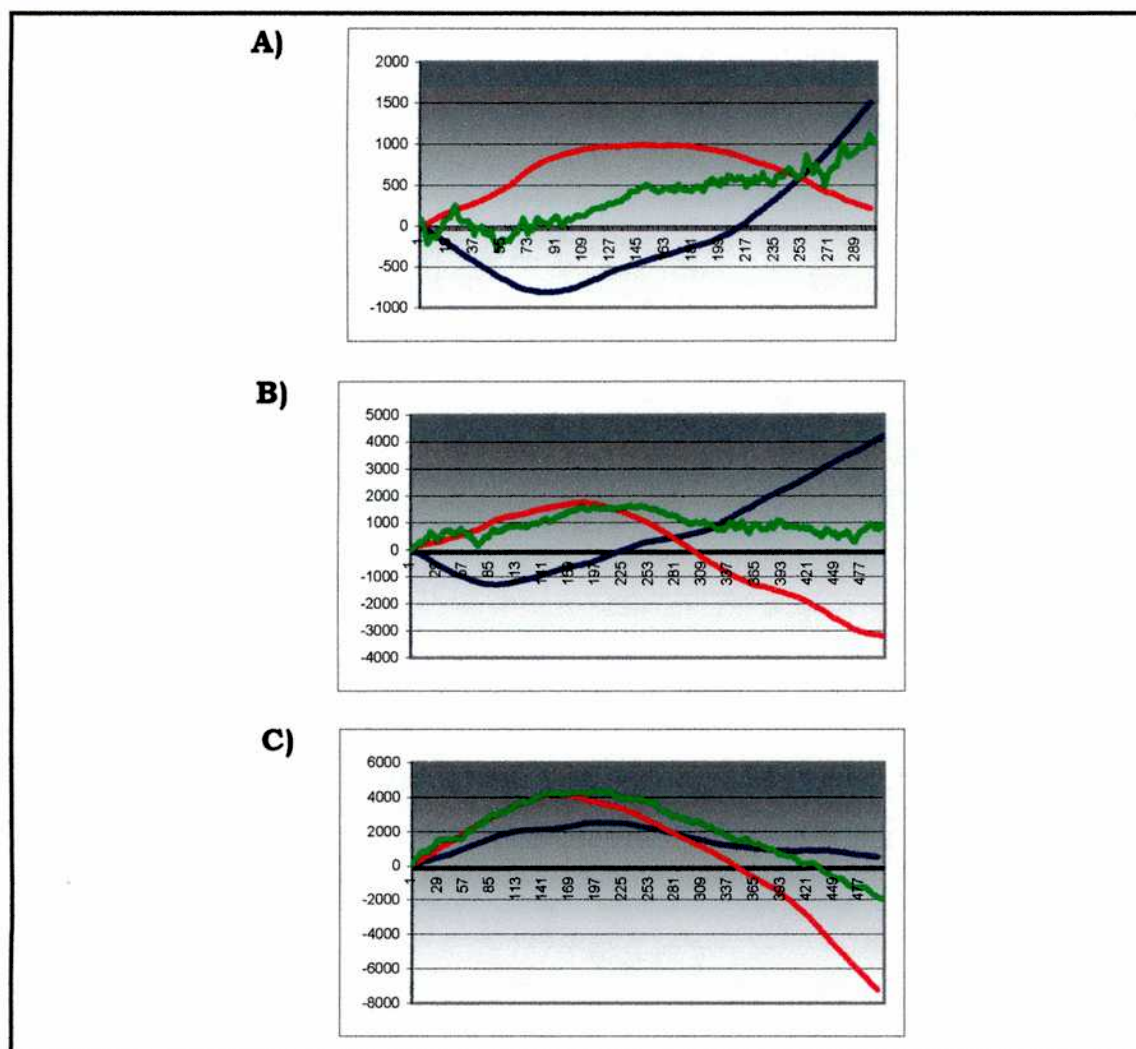


Figura 4.15: GC skew, AT skew y exceso de purinas de las regiones intergénicas sinténicas de (A) *T. cruzi*, (B) *T. brucei* y (C) *L. major*. Línea celeste, exceso de secuencias codificantes; línea azul, GC skew; línea verde, AT skew; línea roja, exceso de purinas; eje vertical, puntaje del estadístico en unidades arbitrarias; eje horizontal, posición a lo largo de la región sinténica en unidades arbitrarias.

Los resultados obtenidos en esta región del cromosoma 12 de *L. major* son comparables a los observados en su cromosoma 1, en donde se detectó una correlación negativa entre el *EP* y el *GC skew* y la dirección de la transcripción [McDonagh P, 2000].

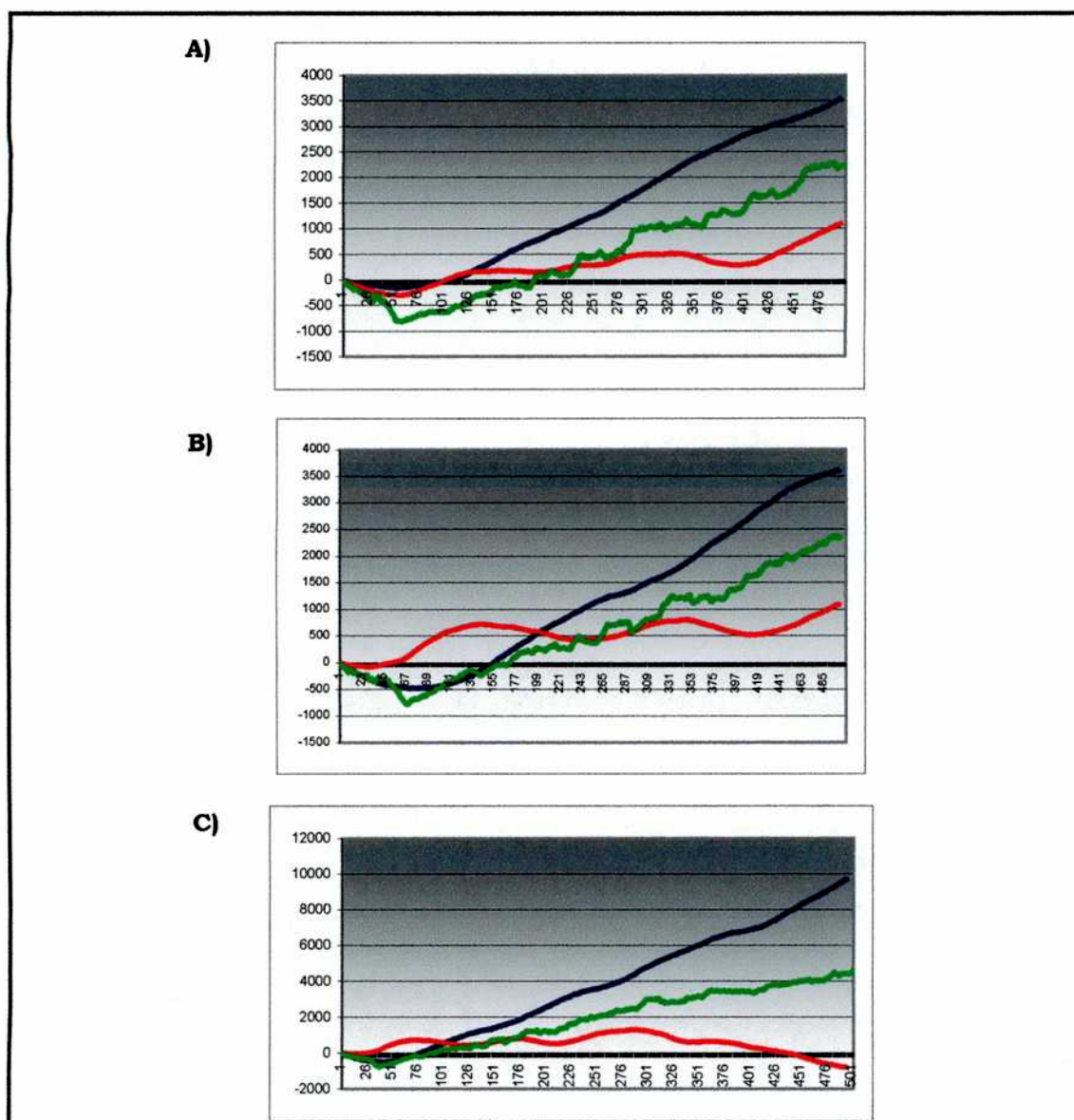


Figura 4.16: *GC skew*, *AT skew* y exceso de purinas de las regiones codificantes sinténicas de (A) *T. cruzi*, (B) *T. brucei* y (C) *L. major*. Línea celeste, exceso de secuencias codificantes; línea azul, *GC skew*; línea verde, *AT skew*; línea roja, exceso de purinas; eje vertical, puntaje del estadístico en unidades arbitrarias; eje horizontal, posición a lo largo de la región sinténica en unidades arbitrarias.

Para determinar si la tendencia en la distribución de bases se incrementa

en las regiones intergénicas, por estar sometidas a una menor presión de selección, se analizó por separado el *EP*, *GC skew* y *AT skew* de las regiones codificantes y no codificantes (Fig 4.16 y 4.15 respectivamente).

Así, las regiones intergénicas de *T. cruzi*, *T. brucei* y *L. major* presentan una tendencia similar al análisis global realizado anteriormente (en la Fig 4.14). Sin embargo, un análisis de las regiones codificantes en *L. major*, reveló una tendencia distinta a aquella observada en el análisis global y de sus regiones intergénicas. En este caso, tanto el *EP* como el *GC skew* y *AT skew* presentan una correlación positiva con respecto al sentido de transcripción de los genes (Fig 4.16).

Un fenómeno similar también ocurre en *T. cruzi*, donde el *AT skew* presenta una tendencia positiva con respecto al sentido de transcripción, en contraposición a lo observado para las regiones intergénicas (Fig 4.16, línea roja).

Luego se analizó la distribución de los nucleótidos en las regiones codificantes según la posición que ubicaban dentro de cada codón, encontrándose un comportamiento similar en los tres parásitos.

La primera posición del codón, presentó una correspondencia positiva entre la dirección de transcripción y el contenido de purinas, el *GC skew* y el *AT skew* (línea celeste en Fig 4.17).

La segunda posición presentó una tendencia negativa del *GC skew* y positiva del *AT skew* con respecto al sentido de transcripción, no advirtiéndose un exceso de purinas significativo (línea verde en Fig 4.17).

Finalmente, en la tercera posición, se observó un comportamiento opuesto a la segunda, registrándose una correlación positiva con el *GC skew* y una negativa con el *AT skew* (línea roja en Fig 4.17).

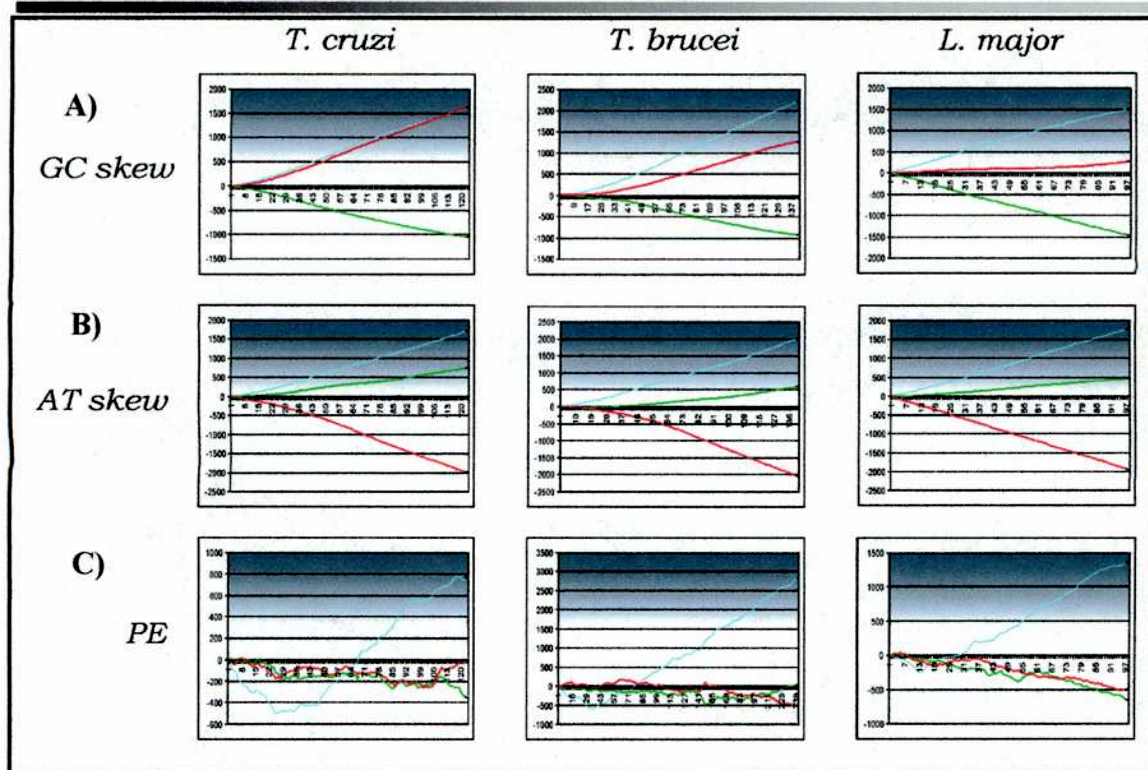


Figura 4.17: GC skew (A), AT skew (B) y exceso de purinas (C) de las regiones codificantes sinténicas de *T. cruzi* (panel izquierdo), *T. brucei* (panel central) y *L. major* (panel derecho). Línea celeste, posición 1 del codón; línea verde, posición 2 del codón; línea roja, posición 3 del codón; eje vertical, puntaje del estadístico en unidades arbitrarias; eje horizontal, posición a lo largo de la región sinténica en unidades arbitrarias.

Dado que el exceso de purinas es casi equivalente a la suma de los skew GC y AT integrados utilizando un intervalo muy chico, la ausencia de correlación entre el EP y el sentido de transcripción en las posiciones 2 y 3 de los codones, podrían deberse a las tendencias opuestas que presentan los skew GC y AT en la segunda y tercera posición.

4.17 Una alternativa al método clásico de clonado en YACs: construcción de YACs por recombinación asociada a la transformación en levaduras.

Debido a que los genomas presentan distintas regiones con diferente capacidad de ser clonadas, se decidió generar una segunda biblioteca YAC utilizando la técnica de clonado por recombinación asociada a la

transformación en levaduras. Esta técnica permite generar YACs lineales o circulares al co-transformar levaduras con ADN genómico total de un determinado organismo y un vector linealizado que contiene en uno o ambos extremos una secuencia específica de dicho ADN. Este vector debe contener además un gen de selección en levaduras (por ejemplo el gen que permite un crecimiento en un medio sin histidina) y una secuencia telomérica en un extremo para generar YACs lineales. Con el fin de determinar si era posible generar YACs lineales o circulares mediante esta técnica aprovechando la gran dispersión de la secuencia repetida SIRE en el genoma nuclear de *T. cruzi*, se construyeron tres vectores: pCS1, pCS2 y pLS1 (Fig 4.18).

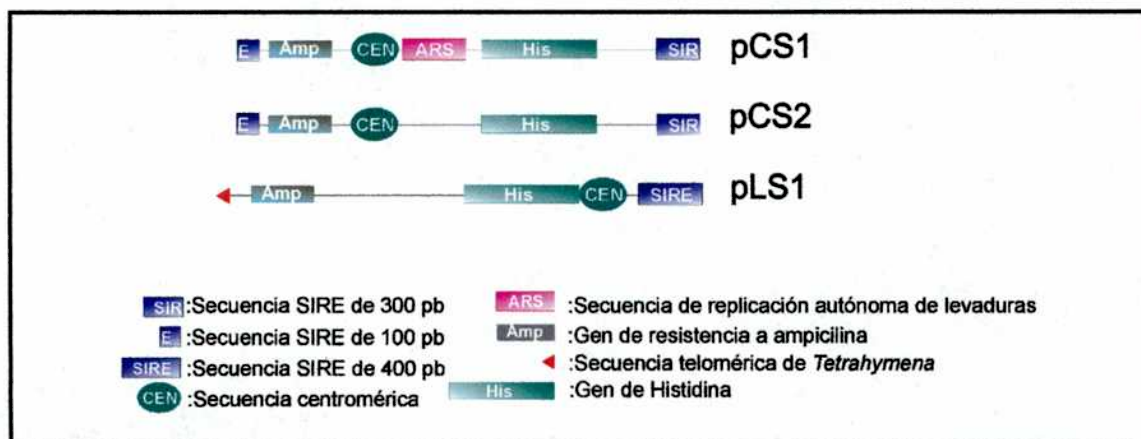


Figura 4.18: esquema de los vectores pCS1, pCS2 y pLS1.

Los vectores pCS1 y 2 están diseñados para generar YACs circulares llevando en sus extremos 300 y 100 pb de la secuencia SIRE, y un gen de selección por histidina. El vector pLS1, lleva una secuencia telomérica del ciliado *Tetrahymena sp.* en un extremo, un gen de selección por histidina y la secuencia SIRE de 400 pb en el otro.

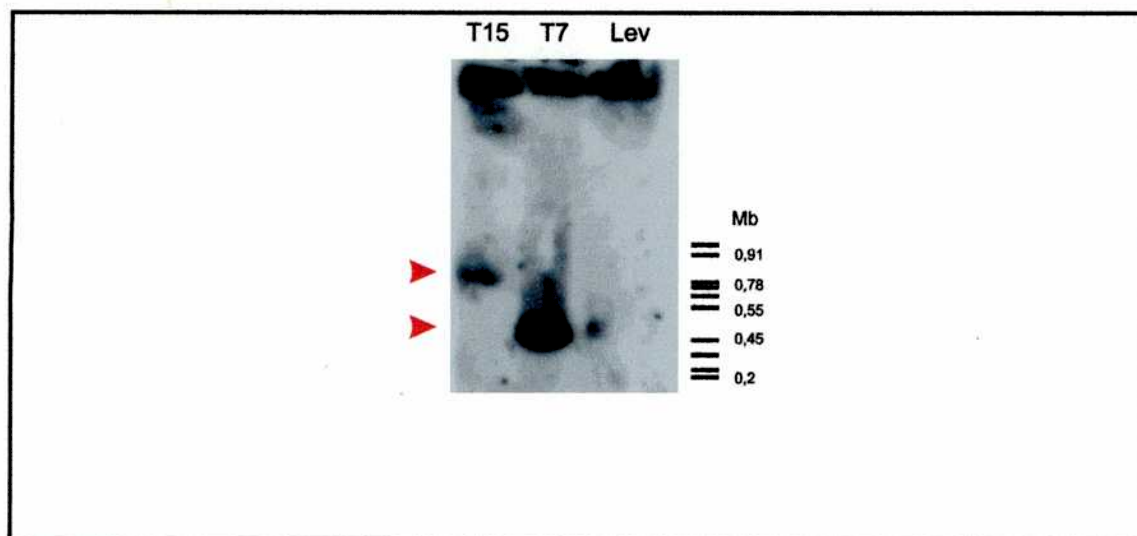
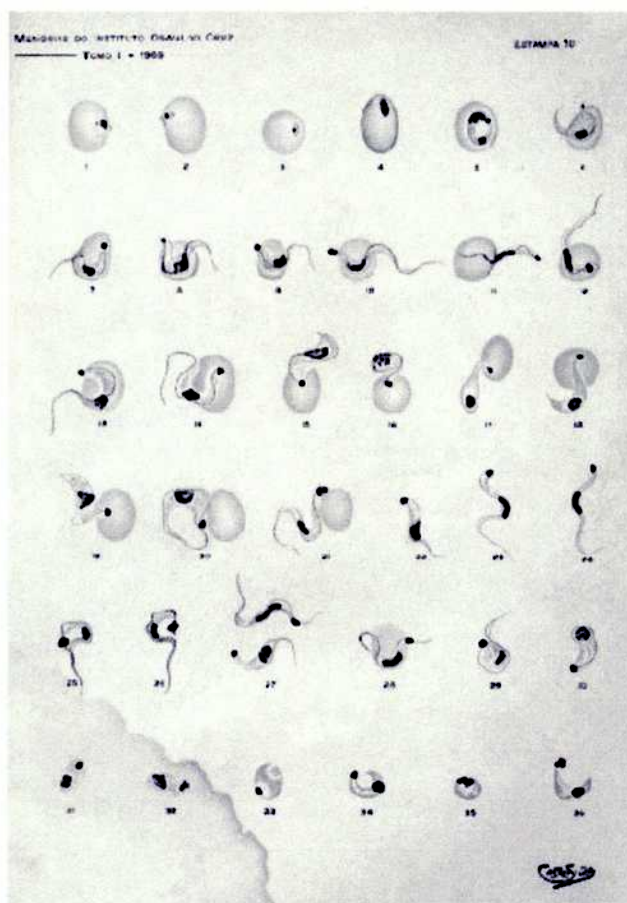


Figura 4.19: Cromoblot de PFGE de ADN genómico total de los clones T7 y T15 con una sonda específica del elemento repetido SIRE. Las flechas rojas indican la posición de los YAC obtenidos linealizados.

Durante la puesta a punto de esta técnica con el vector pCS1 y ADN genómico total de *T. cruzi*, se obtuvieron dos clones positivos denominados T7 y T15. A pesar que las moléculas circulares de muy alto peso molecular quedan retenidos en el lugar de siembra en corridas de PFGE, linealizaciones espontáneas permiten determinar el tamaño de los clones por PFGE (Larionov V, comunicación personal). Por análisis de Southern blot de PFGE hibridados con SIRE, se determinó que el clon T15 posee un inserto mayor a 600 kpb mientras que el clon T7 posee un inserto cercano a los 500 kpb (Fig 4.19).

RESULTADOS

PARTÉ III



5 Desarrollo de vectores de fragmentación en *T. cruzi*

5.1 Construcción de los vectores pLFGAP, pLFSIRE y pH64

En todo proyecto genoma es de gran utilidad contar con una herramienta eficaz que permita determinar la posición de los diferentes marcadores genéticos que se vayan generando con respecto a los telómeros o centrómeros de un determinado cromosoma. Dado que *T. cruzi* presenta una muy baja condensación cromosómica durante la división mitótica y no posee un ciclo de reproducción sexual, técnicas como la de hibridación *in situ* o métodos de genética clásica no son utilizados para posicionar un marcador en un cromosoma. Para contribuir a la construcción del mapa físico de este genoma, se decidió utilizar una nueva herramienta, denominada fragmentación cromosómica, que permite localizar marcadores con respecto a los telómeros de los cromosomas correspondientes [LeBowitz J, 1998].

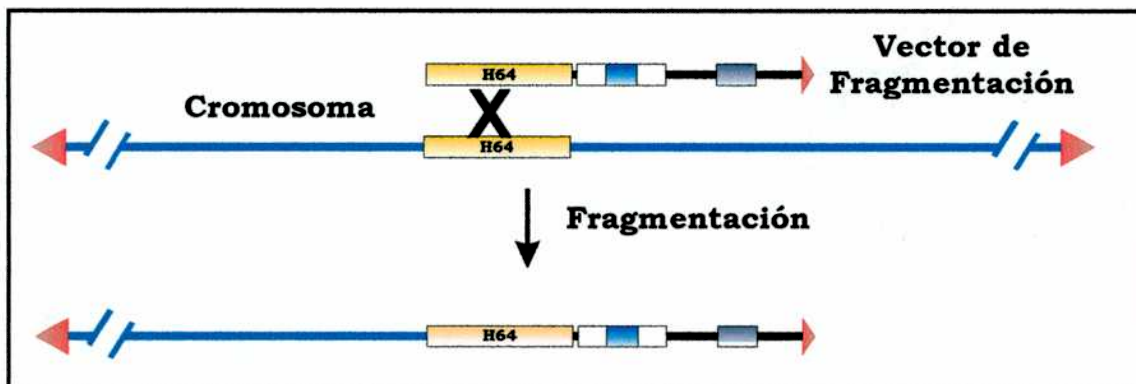


Figura 5.1: esquema de fragmentación cromosómica en el locus H64. Rectángulo celeste, gen de resistencia a G418; rectángulo amarillo, secuencia marcadora; rectángulo violeta, gen de resistencia a ampicilina; triángulos rojos, secuencia telomérica.

El principio que permite la fragmentación es semejante al que sirvió para obtener los cromosomas circulares por la técnica de RAT (pag 111), es decir la capacidad de recombinación, pero en este caso referida a *T. cruzi*. Así, la recombinación se establece entre una secuencia en un cromosoma (que contiene la secuencia a posicionar) y un vector linealizado (vector de fragmentación) que contiene en su extremo el marcador que se quiere

posicionar en el cromosoma. La disminución en el tamaño del cromosoma resultante es utilizada para calcular la distancia del marcador al extremo telomérico (Fig 5.1).

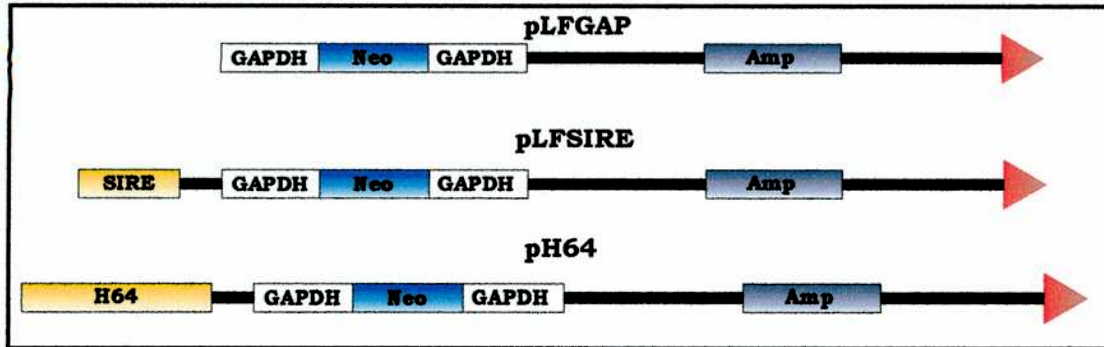


Figura 5.2: Representación esquemática de los vectores de fragmentación pLFGAP, pLFSIRE y pH64. *Neo*, gen de resistencia a G418; GAPDH, región intergénica del gen GAPDH, Amp, gen de resistencia a Ampicilina; H64, marcador del locus TcP2βH6.4; triángulo rojo, secuencia telomérica de *Tetrahymena sp.*

Como primer paso, se construyeron los vectores pLFGAP y pLFSIRE. Los mismos poseen una secuencia telomérica de *Tetrahymena sp* de 200 pb en un extremo, un gen de selección en bacterias que confiere resistencia a ampicilina y el gen *Neo* que confiere resistencia a G418, flanqueado en sus extremos 5' y 3' por la región intergénica del gen GAPDH de *T. cruzi* para que el ARNm sea procesado correctamente por el parásito. El vector pLFSIRE contiene además la secuencia repetida SIRE de *T. cruzi* de 400 pb (Fig 5.2).

En una segunda etapa, se desarrolló el vector pH64 que contiene una secuencia telomérica de *Tetrahymena sp* de 700 pb en un extremo y una secuencia de 1400 pb correspondiente al locus H6.4 del gen TcP2β de *Trypanosoma cruzi* en el otro [Vázquez M, 1994] (Fig 5.2).

En el caso de los vectores pLFGAP y pH64, las secuencias blanco de recombinación son la región intergénica del gen GAPDH y la región que contiene al gen TcP2βH6.4 respectivamente.

Las primeras experiencias de fragmentación fueron llevadas a cabo con los vectores pLFGAP y pLFSIRE. Los mismos se linearizaron con enzimas de restricción de manera que quedara la secuencia telomérica en un extremo

y la secuencia intergénica de GAPDH (pLFGAP) o SIRE (pLFSIRE) en el otro. Después de electroporar la cepa Tulahuén II y dejar recuperar en medio LIT durante 24 hs, se seleccionaron los parásitos resistentes en medio de cultivo con 100 µg/ml de G418 durante 21 días. Posteriormente, se purificó ADN genómico y se analizaron las transfectantes por cromoblots de PFGE. En todos los casos no se detectaron variaciones en el cariotipo electroforético.

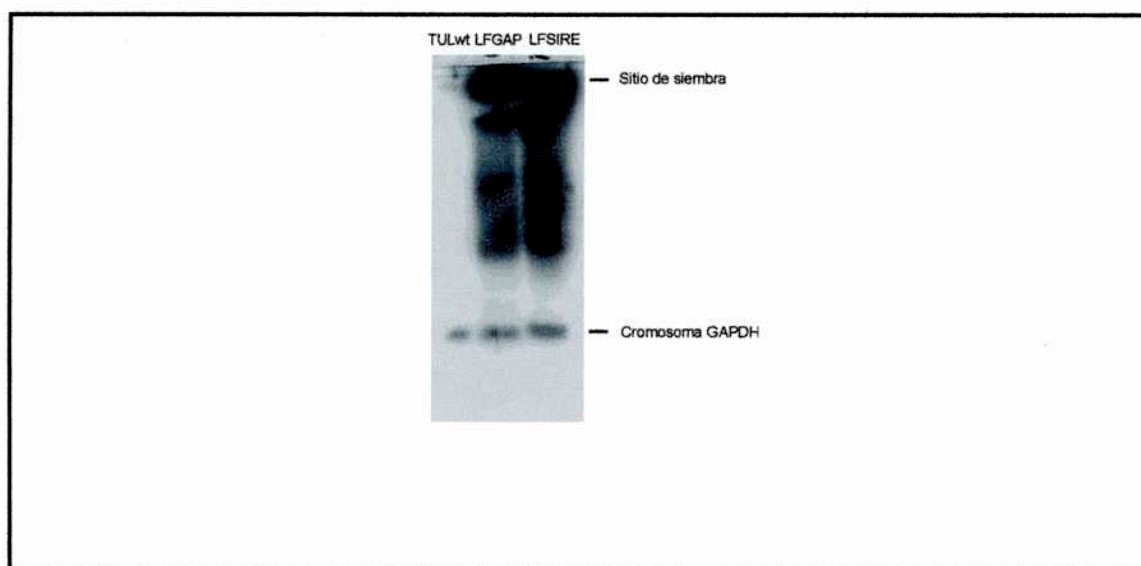


Figura 5.3: Southern blot de PFGE hibridado con una sonda específica de la región intergénica del gen GAPDH de *T. cruzi*. TULwt, ADN total de la cepa Tulahuén II salvaje de *T. cruzi*; LFGAP, ADN genómico de *T. cruzi* transfectado con el vector pLFGAP; LFSIRE, ADN genómico de *T. cruzi* transfectado con el vector pLFSIRE.

La hibridación de cromoblots de PFGE con la región intergénica del gen GAPDH mostró una banda muy fuerte de hibridación que corresponde al sitio de siembra y bandas muy difusas hacia abajo. En ningún caso, el tamaño del cromosoma que contiene al gen GAPDH mostraba alteraciones con respecto al control, tanto en los clones transfectados con pLFGAP como con pLFSIRE (Fig 5.3).

Cuando se hibridó el mismo cromoblot con el gen *Neo*, sólo se obtuvo la banda intensa del sitio de siembra y las bandas difusas de menor tamaño, no apareciendo la banda correspondiente al cromosoma que contiene al gen GAPDH. Esto indicó que no había ocurrido recombinación alguna del

vector pLFGAP con el *locus* GAPDH ni del vector pLFSIRE con alguno de los cromosomas. Es más, el patrón de hibridación indicaba la probable formación de un plásmido circular de muy alto peso molecular, que al ser corridos en PFGE quedan retenidos en el sitio de siembra en forma de círculo abierto dando una serie de bandas difusas que corresponden a distintas formas de superenrollamiento y/o linearizaciones espontáneas [Martínez-Calvillo S, 1997].

Para investigar en que estructura se encontraba el vector, se realizaron ensayos de Southern blot a partir de ADN genómico total digerido con las enzimas de restricción *ScaI* y *SphI* que linearizan al vector circular por el gen de resistencia a ampicilina y *Neo* respectivamente. La hibridación con el gen *Neo* dio una banda del tamaño correspondiente al plásmido lineal lo que estaría indicando la presencia de un tándem (Fig 5.4). Sin embargo, también se pudieron observar varias bandas de menor y mayor peso molecular que corresponderían a otro tipo de rearrreglos.

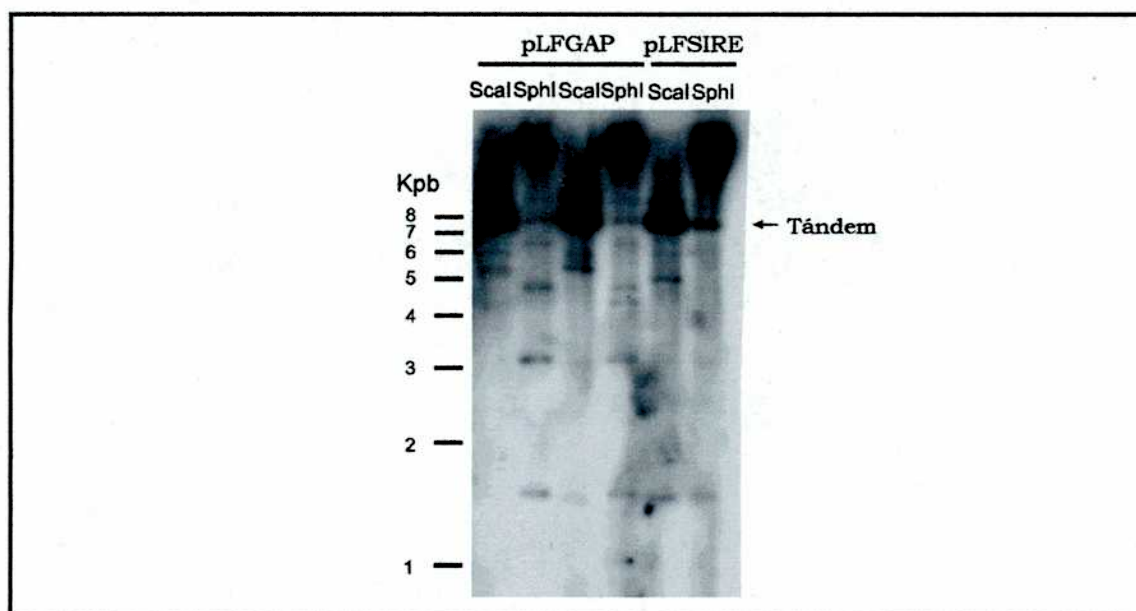


Figura 5.4: Southern blots de ADN genómico total de *T. cruzi* transfectado con el vector pLFGAP o pLFSIRE, digerido con *ScaI* o *SphI* e hibridado con sonda específica del gen *Neo*. La flecha indica la banda esperada correspondiente a un tándem.

Para descartar que la recircularización de los vectores se debía a secuencias teloméricas demasiado cortas para ser funcionales, o a que la secuencia blanco de recombinación (SIRE o GAPDH) no era del tamaño necesario para recombinar [Papadopoulou B,1997], se diseñó un nuevo vector (pH64) conteniendo una secuencia telomérica de *Tetrahymena sp* de mayor longitud (700 pb) y la secuencia correspondiente al locus TcP2 β H6.4 (1400 pb) como blanco de recombinación (Fig 5.2).

Este vector linearizado se utilizó en un nuevo ensayo de transfección, seleccionando los clones resistentes en medio LIT con 60 μ g/ml de G418.

El análisis de cromoblot de PFGE mostró exactamente el mismo patrón de hibridación que los clones anteriores sugiriendo que la secuencia telomérica de *Tetrahymena sp* no es funcional en *T. cruzi*.

5.2 Transfecciones con el vector de fragmentación pLF2

De acuerdo con los resultados se construyeron dos nuevos vectores, pLF2

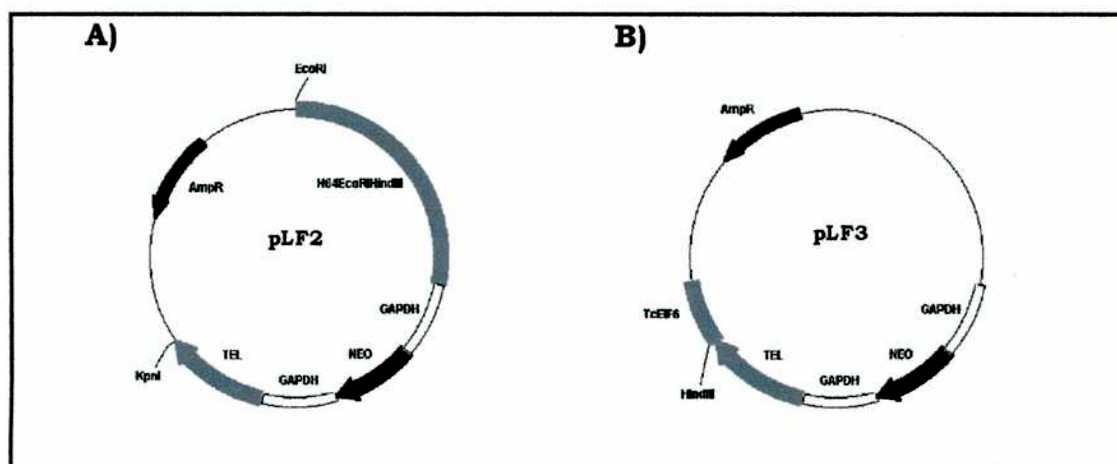


Figura 5.5: Vectores de fragmentación pLF2 (A) y pLF3 (B). H64EcoRIHindIII, marcador genético del locus H6.4 del gen TcP2 β ; TcEIF6, marcador genético correspondiente a la región 5' del gen TcEIF6 del locus SZ5 de *T. cruzi*; Neo, gen de resistencia a neomicina; TEL, Secuencia telomérica de *T. cruzi*; AmpR, gen de resistencia a Ampicilina; GAPDH, regiones intergénicas del gen de la gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa; HindIII, EcoRI y KpnI, sitios de restricción utilizados para linealizar los vectores.

y pLF3, en los cuales se reemplazó la secuencia de *Tetrahymena sp* por una secuencia telomérica y sub-telomérica de *T. cruzi* de 900 pb [Chiurrillo

MA, 1999]. Además se colocó una secuencia blanco de recombinación más extensa correspondiente al *locus* H64 del gen ribosomal TcP2 β , de 1900 p, o la región 5' del gen TcEIF6 del *locus* SZ5 de 600 pb para los vectores pLF2 o pLF3 respectivamente (Fig 5.5).

Los primeros ensayos se realizaron con el vector pLF2, el cual fue linearizado con las enzimas de restricción *EcoRI* y *KpnI* antes de ser transfectado. Luego de 4 semanas de selección en medio LIT con 60 μ g/ml de G418 los clones resistentes fueron analizados por electroforesis en

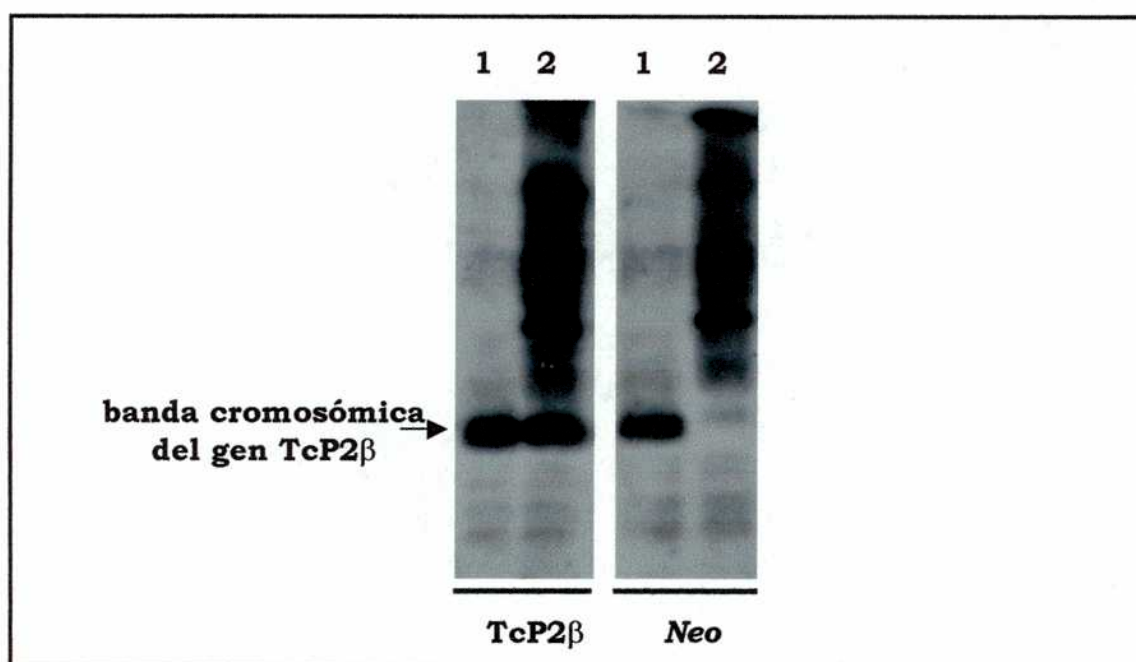


Figura 5.6: análisis por PFGE de las líneas transfectadas con pLF1 (1) y pH64 (2) e hibridadas con TcP2 β (panel izquierdo) o con el gen de resistencia a Neomicina (panel derecho).

campos pulsados y Southern blot. La figura 5.6 muestra la hibridación de los cromoblots con sondas específicas del gen *Neo* y el gen TcP2 β . Como control se incluyó uno de los clones transfectados con pH64, el cual se mantiene como episoma de alto peso molecular sin integrarse al cromosoma correspondiente.

El hecho de no se observar diferencias entre el cariotipo electroforético de

la cepa transfectada y salvaje podría indicar que: (1) la localización del *locus* TcP2 β H6.4 está próxima al extremo telomérico del cromosoma de manera tal que la resolución del PFGE no permite apreciar la variación de peso molecular, o (2) el vector se ha insertado en dicho *locus* en lugar de producir una fragmentación.

Southern blot a partir de ADN genómico total de los clones transfectados sugirió que el vector de fragmentación recombinó por su región 5' con el *locus* correspondiente al gen TcP2 β (Fig 5.7). Esto se aprecia por la aparición en todos los casos de una nueva banda, tanto en las digestiones con *Bam*HI y *Kpn*I hibridadas con el gen TcP2 β , como en la digestión con *Eco*RV hibridada con una sonda específica a la región ubicada río abajo del gen TcP2 β (sonda 2, ver esquema Fig 5.8, Fig 5.7).

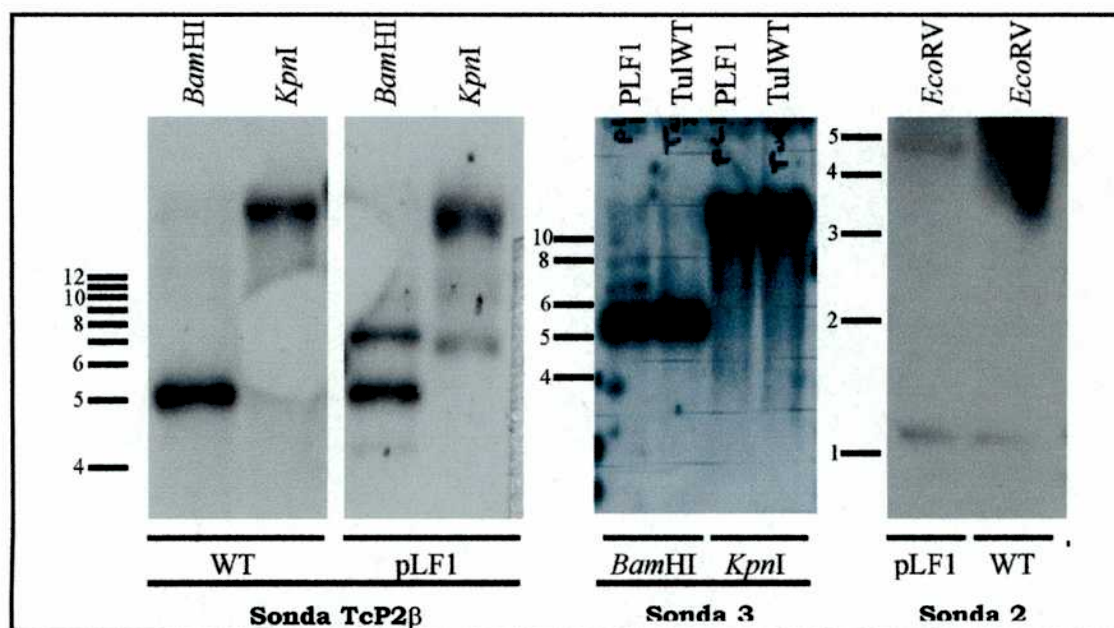


Figura 5.7: Southern blots a partir de ADN genómico total de la cepa Tulahuén II de *T. cruzi* salvaje (WT) o transfectada con el vector linealizado pLF2 (pLF2). Sonda TcP2 β , 2 y 3, ver esquema de la Fig 5.8.

Por digestión con *Bam*HI se observó la aparición de una banda nueva sugiriendo que el vector podría haber fragmentado el cromosoma.

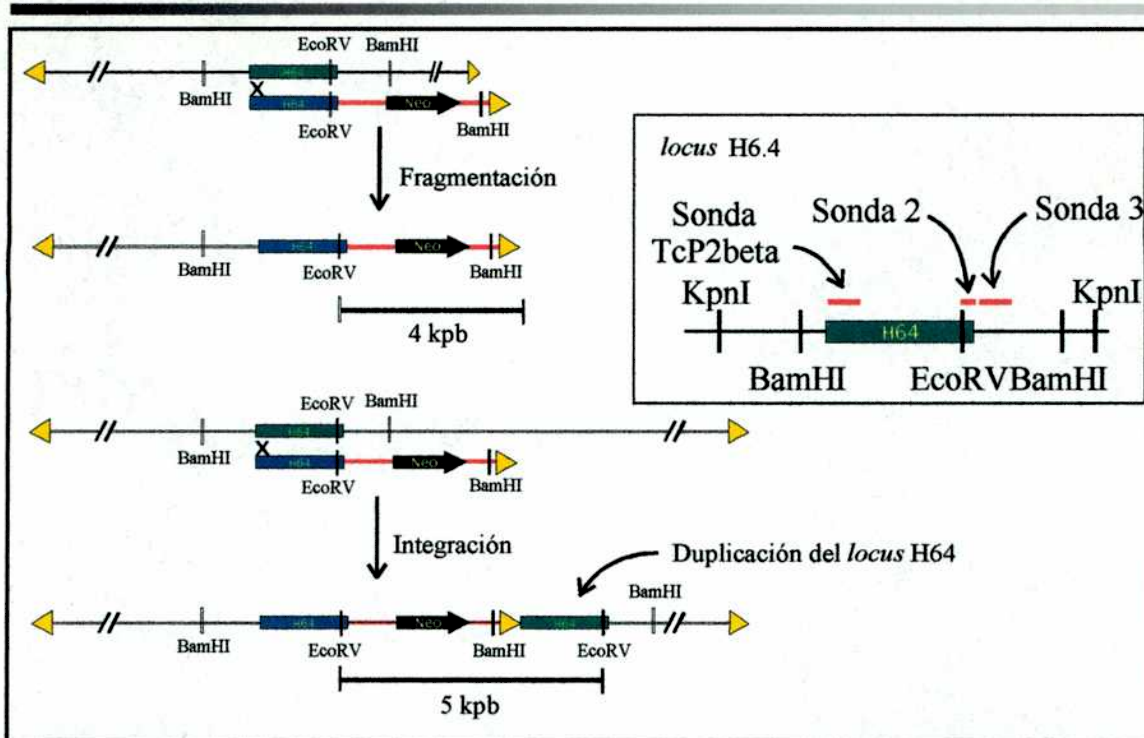


Figura 5.8: Esquema representativo de la posible integración o fragmentación del vector pLF2. Línea roja, vector de fragmentación pLF2; línea negra, cromosoma; rectángulo azul, marcador del locus H6.4 del vector; rectángulo verde, marcador del locus H6.4 salvaje; triángulos amarillos, secuencias teloméricas. En el recuadro se muestra la posición de las distintas sondas utilizadas durante los Southern blots.

El vector pLF2 posee un sitio *BamHI* interno río arriba de la secuencia telomérica. Una integración debería dar como resultado la aparición de una copia nueva del gen TcP2 β separada de la primera por dicho sitio de restricción, esperándose así un patrón compuesto por tres bandas (Fig 5.8). La hipótesis de fragmentación se ve apoyada además por el hecho que Southern blots de ADN genómico total digerido con *BamHI* o *KpnI*, no muestran diferencias entre la cepa salvaje y la transfectada cuando se usa una sonda específica de la región 3' del locus TcP2 β H6.4 que no esta presente en el vector pLF2 (sonda 3 en Fig 5.8), (Fig 5.7).

RESULTADOS
PARTE IV



6 Desarrollo de un cromosoma artificial de *Trypanosoma cruzi* (CrAT)

6.1 Transfecciones con el vector pTNT1

Para preparar el análisis funcional de genes y fragmentos genómicos que surjan del proyecto genoma de *T. cruzi*, se comenzó la formulación de un nuevo tipo de vector de clonado y expresión para este parásito: el cromosoma artificial de *T. cruzi* (CrAT). La primera construcción realizada (pTNT1) poseía una secuencia telomérica de *Tetrahymena* de 300pb en cada extremo y una única copia del gen *Neo* flanqueado en sus extremos 5' y 3' por la región intergénica del locus GAPDH de *T. cruzi*. El extremo 5' de este gen se encuentra a 2.9 kpb del comienzo de la secuencia telomérica y el tamaño total del vector es de aprox. 9.0 kpb (Fig 6.1).

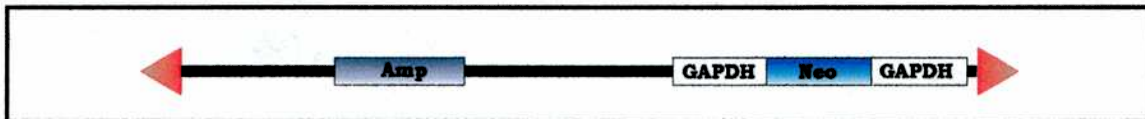


Figura 6.1: esquema del vector pTNT1. Triángulos rojos, secuencias teloméricas de *Tetrahymena*; rectángulo violeta, gen de resistencia a ampicilina; rectángulo celeste, gen de resistencia a neomicina; rectángulos blancos, región intergénica del gen GAPDH; línea negra, secuencia del vector pBluescript.

Este vector fue transfectado en forma lineal en cultivos de epimastigote de *T. cruzi* y luego de seleccionar los clones con 60 µg/ml de G418 durante 4 semanas se preparó ADN genómico total y en bloques de agarosa para su análisis.

Cromoblots hibridados con una sonda específica del gen *Neo* mostraron un patrón de hibridación típico de un episoma de alto peso molecular, indicando que el vector pTNT1 se recircularizó y amplificó aumentando su tamaño como lo hicieron los vectores de fragmentación previamente descriptos (Fig 6.2). Los resultados de Southern blots, a partir de ADN genómico total, indican que dicho episoma no sólo está formado por unidades del vector repetidas en tándem sino también por copias rearrregladas (aparición de bandas de peso molecular distinto al de una unidad de vector).

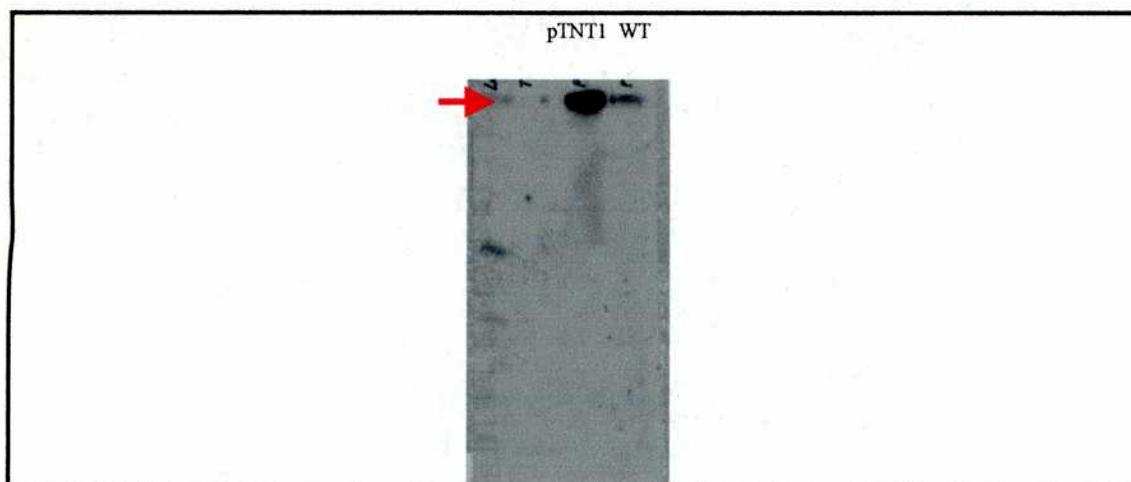


Figura 6.2: Cromoblot de PFGE de ADN genómico de parásitos transfectados con el vector pTNT1 hibridado con una sonda específica del gen *Neo*. pTNT1, parásitos transfectados con el vector pTNT1, WT, parásitos sin transfectar. La flecha roja indica el sitio de siembra.

6.2 Transfecciones con el vector pTNT2

En esta etapa, la secuencia telomérica de *Tetrahymena sp* se reemplazó por las regiones teloméricas de *T. cruzi* de 900 pb. Debido a que la presencia de las secuencias teloméricas orientadas en sentido opuesto desestabilizaron al vector circular en su pasaje por bacterias, entre ambas secuencias teloméricas se clonó una secuencia espaciadora de 1.0 kpb, proveniente del locus H6.4 del gen TcP2beta de *T. cruzi* (Fig 6.3).

Una vez linearizado con *HindIII*, el vector pTNT2 fue transfectado a epimastigotes. Luego de seleccionar durante 4 semanas en medio LIT conteniendo 60 µg/ml de G418, se analizaron las células transfectantes por electroforesis de campos invertidos (FIGE) y Southern blots a partir de ADN genómico total.

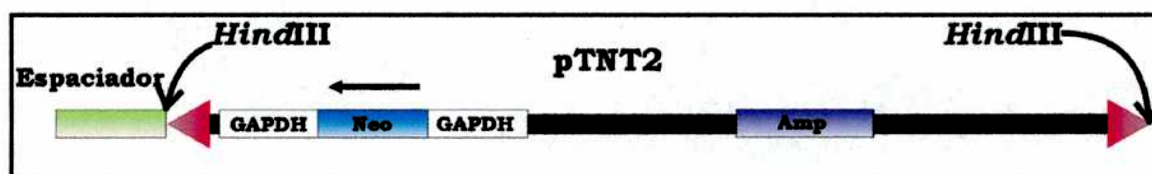


Figura 6.3: Esquema del vector pTNT2 linearizado con la enzima *HindIII*. Triángulos rojos, secuencia telomérica de *T. cruzi*; Amp, gen de resistencia a Ampicilina; Neo, gen de resistencia a Neomicina; GAPDH, región intergénica del gen GAPDH; rectángulo verde, región espaciadora; línea negra, esqueleto plasmídico.

Por tinción del gel de FIGE con bromuro de etidio, se advirtió la aparición de una banda de un tamaño aproximado de 97 kpb. Una sonda específica del vector reveló varias bandas en un rango que va desde 80 kpb a 150 kpb (Fig 6.4).

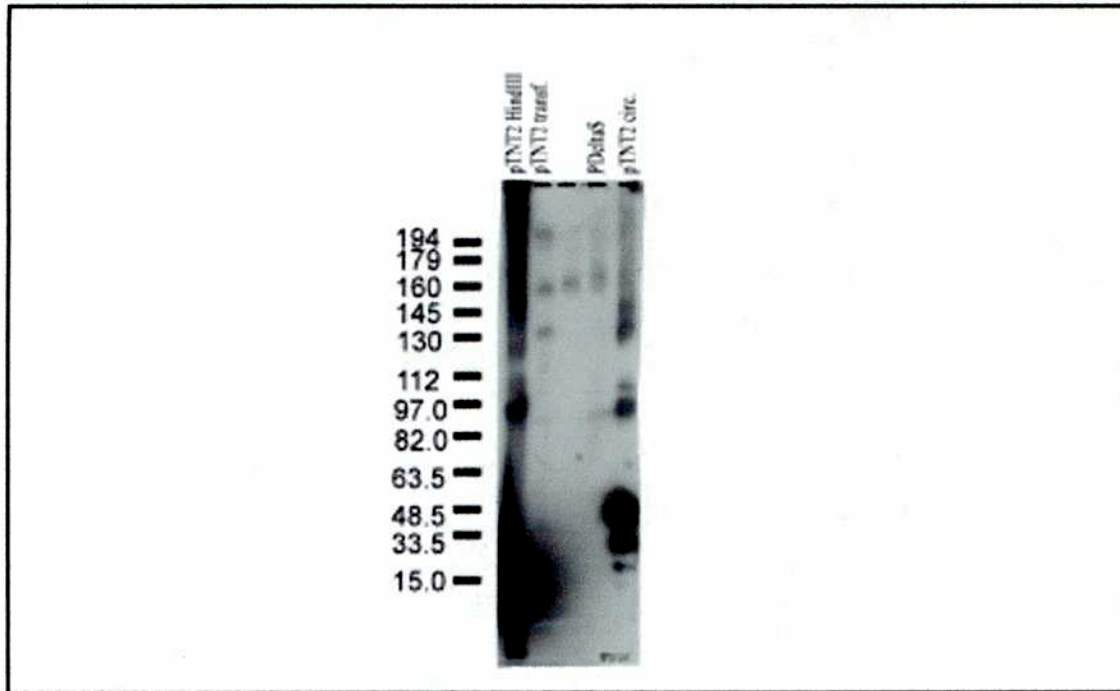


Figura 6.4: Análisis por FIGE de la línea celular transfectada con pTNT2 linealizado. pTNT2*HindIII*, vector pTNT2 digerido con *HindIII*; pTNT2transf., población de parásitos transfectados con pTNT2 lineal; pDeltaS, control de episoma de alto peso molecular; pTNT2 circ., Plásmido circular pTNT2.

Para determinar si las mismas eran lineales, se realizaron ensayos de digestión con exonucleasa *Bal31* (Fig 6.5). Luego, el ADN digerido se corrió en FIGE y se transfirió e hibridó con una sonda específica del plásmido. Todas las bandas positivas fueron digeridas por *Bal31*, sugiriendo que la banda que contiene al vector se encuentra, en todos los casos, como una molécula lineal. Como la hibridación del FIGE evidenció varias bandas, esto se podría explicar de dos maneras, (1) que cada célula posee más de una copia del vector con distinto peso molecular, o (2) que la presencia de varias bandas se debe a que el análisis fue realizado a partir de una población de parásitos, donde células diferentes contienen un cromosoma

artificial de tamaño diferente en cada caso.

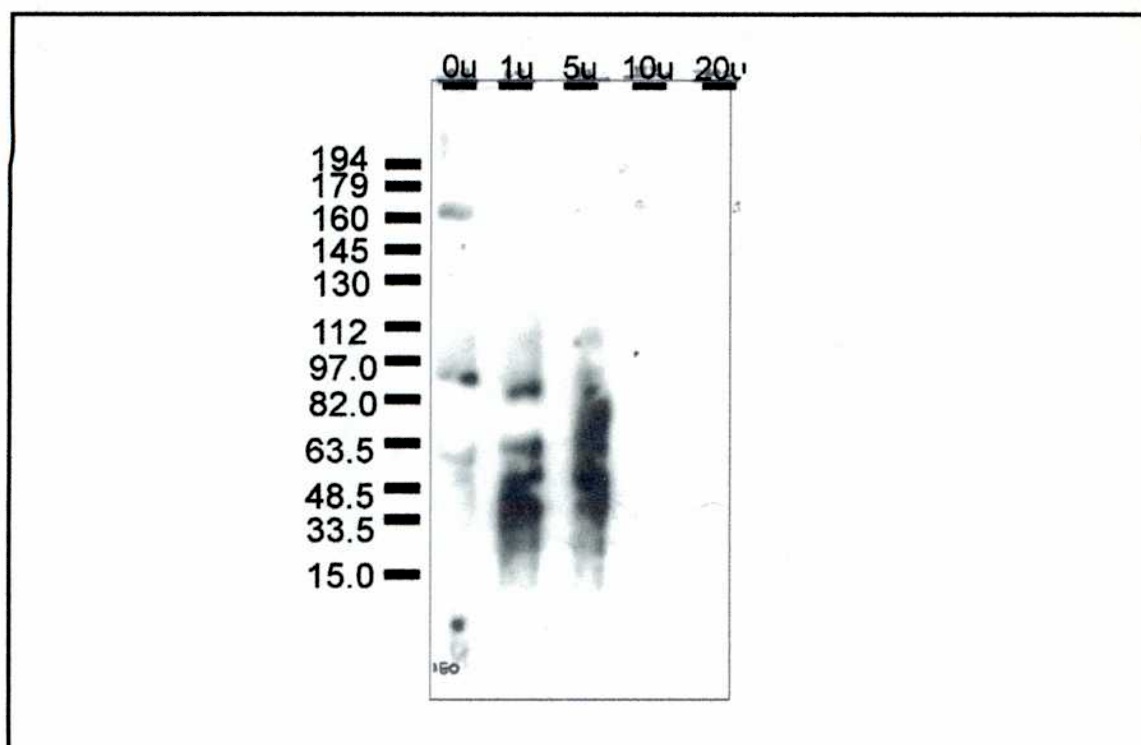


Figura 6.5: Tratamiento del ADN cromosómico de la línea celular transfectada con pTNT2 con 0, 1, 5, 10 y 20 unidades de exonucleasa *Bal31*.

Para investigar estas hipótesis, se realizó el clonado de los parásitos por diluciones mínimas. Luego, cada una de las poblaciones clonales obtenidas fue analizada por FIGE e hibridación con la sonda específica del gen *Neo*. Los resultados se muestran en la figura 6.6. A diferencia de la población policlonal, **las poblaciones clonales presentan una única banda positiva**. Esto sugiere que cada célula posee un único tipo de cromosoma artificial, aunque aun no se ha determinado su número de copias por célula. Es interesante recalcar, que el tamaño de los cromosomas artificiales es heterogéneo, encontrándose inclusive algunos de bajo peso molecular (40 kpb) que no habían sido identificados en la población policlonal. Esto sugiere que los mismos se encontraban minoritariamente representados. La mayoría de los parásitos clonados presenta un cromosoma artificial de 97 kpb, indicando que el mismo se

encuentra mayoritariamente representado en la población policlonal. Esto también explica porque la banda de 97 kpb hibrida con mayor intensidad cuando se analiza esta población (Fig 6.6).

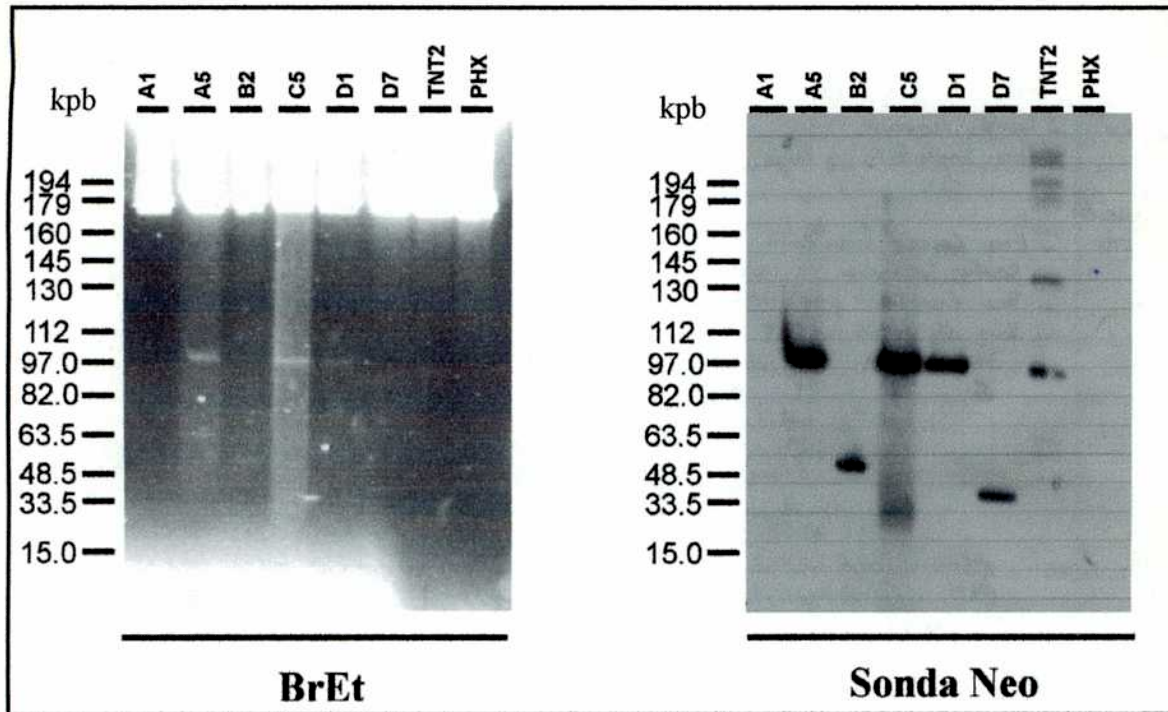


Figura 6.6: análisis por FAGE del ADN de parásitos clonados por diluciones mínimas. Panel izquierdo, tinción con bromuro de etidio; Panel derecho, cromoblot hibridado con sonda específica para el gen de resistencia a Neomicina. A la izquierda de cada panel se muestran las posiciones relativas de los marcadores de peso molecular en kb. TNT2, población policlonal; A1, A5, B2, C5, D1 y D7, poblaciones clonales; PHX, población control que posee un episoma de alto peso molecular.

La intensidad de hibridación de todas las bandas son similares entre sí (Fig 6.6, panel derecho y Fig 6.7), sugiriendo que todos contienen el mismo número de copias del vector inicial (pTNT2).

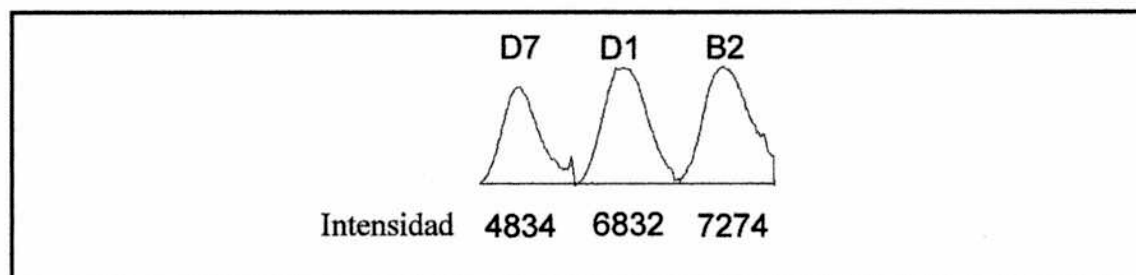


Figura 6.7: cuantificación de la intensidad de hibridación de las líneas clonales D7, D1 y B2.

Por lo tanto, el incremento del peso molecular puede explicarse por la incorporación de secuencias no presentes en el vector original. Este fenómeno ya ha sido observado en cromosomas artificiales de *Trypanosoma brucei* [Patnaik P, 1993; Gwo-Shu Lee I, 1995].

Para estudiar la organización genómica del cromosoma artificial, se hibridaron Southern blots de ADN genómico de los clones A5, B2 y D7 con sondas específicas del gen *Neo*, del esqueleto plasmídico o de la secuencia espaciadora (Fig 6.8).

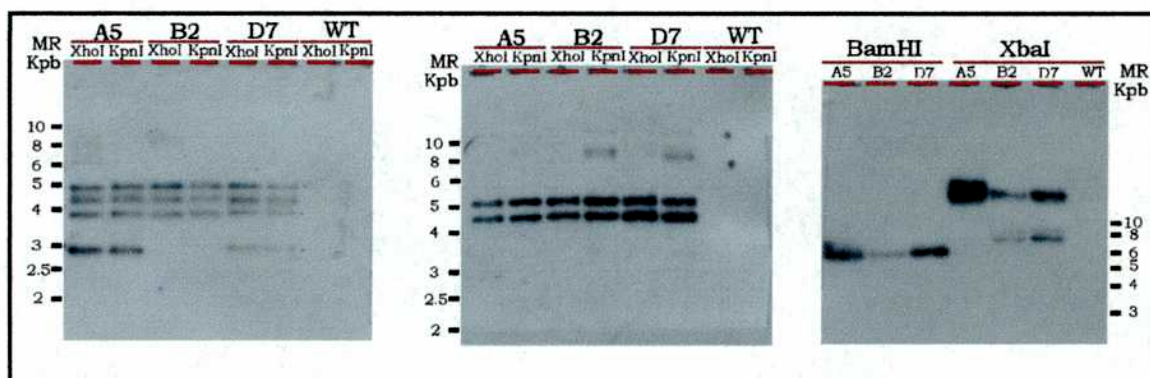


Figura 6.8: Southern blot de los clones A5, B2 y D7 usando una sonda específica del esqueleto plasmídico (panel izquierdo), de la secuencia espaciadora (panel central), o del gen *Neo* (panel derecho). WT, parásitos sin transfectar. *XhoI*, *KpnI*, *BamHI* y *XbaI*, enzimas de restricción utilizadas.

A pesar que la estructura definitiva de este CrAT no pudo ser establecida, los resultados indican que en cada uno de los casos analizados el cromosoma contiene al menos 3 copias intactas del vector pTNT2 dispuestas en tándem (aporte de 3 copias de vector al tamaño total del

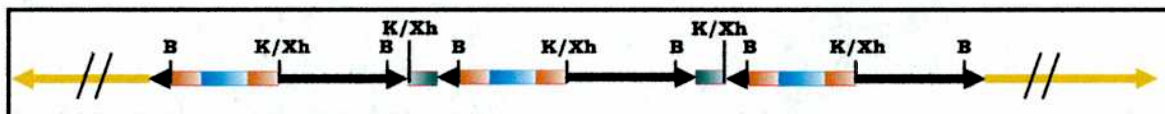


Figura 6.9: Esquema de la hipotética estructura del CrAT. Línea negra, esqueleto plasmídico; triángulos negros/amarillos, secuencias teloméricas; línea amarilla, secuencias adicionales al vector original; rectángulo celeste, gen *Neo*; rectángulo rojo, región intergénica del gen GAPDH; rectángulo verde, secuencia espaciadora. B, sitio *BamHI*; K/Xh, sitios *KpnI* y *XhoI*.

cromosoma= 24kpb) y separadas entre si por una copia de la secuencia espaciadora orientada en la dirección 5'->3' o 3'->5' (Fig 6.9).

La estructura de los cromosomas fue confirmada luego por dos métodos independientes: (a) Southern blot de una digestión de ADN total con *Bal31* y (b) corridas en FIGE utilizando distintos pulsos.

En el primero de los casos, se digirió ADN genómico total de cada clon con la exonucleasa *Bal31* a distintos tiempos y posteriormente se trató con la enzima *BamHI*. Finalmente, se corrió el ADN en geles de agarosa y se transfirió e hibridó con una sonda específica del gen *Neo* y del SAS SZ5 como control de hibridación de una molécula lineal (Fig 6.10). Los resultados indicaron que las bandas correspondientes al CrAT eran sensibles al tratamiento con *Bal31*.

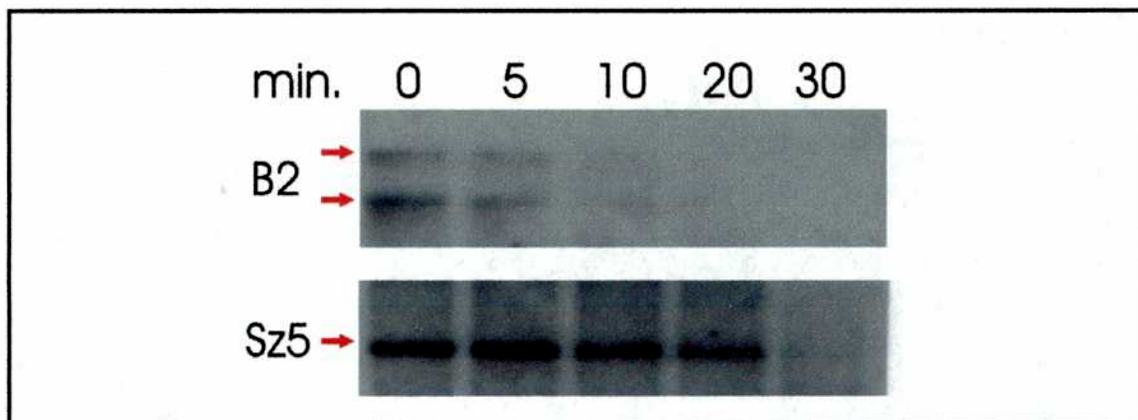


Figura 6.10: Southern blot de una digestión con *BamHI* de ADN genómico total tratado previamente con *Bal31* durante 0, 5 10 20 o 30 minutos. SZ5, hibridación control con una sonda del locus Sz5; B2, hibridación con una sonda específica del gen *Neo*.

(b) Otra forma de demostrar si una molécula es lineal o circular, es observar su migración en un gel de agarosa cuando es sometida a distintas condiciones de corrida, comparándola con un marcador de peso molecular lineal. Si una variación en las condiciones de corrida cambia la migración relativa de la molécula de ADN con respecto al marcador de peso molecular lineal, entonces la molécula es circular [Birren B, 1993].

En la figura 6.11 se muestra la migración por FIGE del CrAT B2, de 48 kpb, en dos condiciones distintas. En todos los casos, la banda correspondiente al CrAT migró en forma similar al marcador de peso molecular lineal, sugiriendo, una vez más, una estructura lineal para esta molécula.

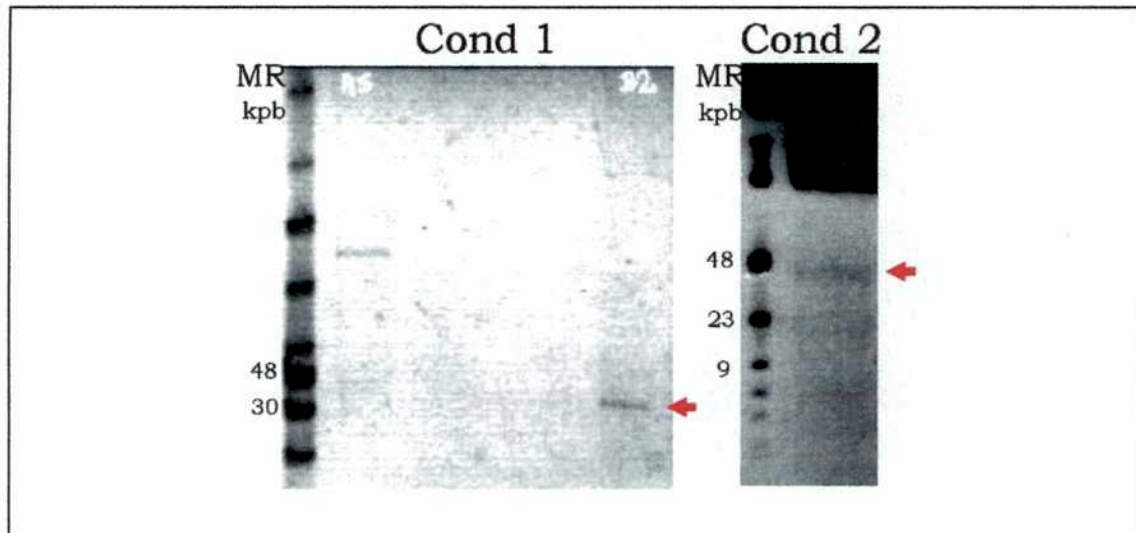


Figura 6.11: Tinción con BrET (en negativo) de dos corridas electroforéticas por FIGE del CrAT B2 usando dos condiciones de pulso distintas. A la derecha de cada panel se indican los tamaños correspondientes a los marcadores de peso molecular. Las flechas rojas indican la banda correspondiente al CrAT B2.

Finalmente, para estudiar la estabilidad del cromosoma artificial, se crecieron las poblaciones clonales A5, B2 y D7 en ausencia o en presencia de 60 $\mu\text{g/ml}$ o 300 $\mu\text{g/ml}$ de G418 durante 64 generaciones (aproximadamente 2 meses). Posteriormente, se analizó cada una de las poblaciones por Southern blot de corridas en FIGE o a partir de ADN genómico digerido con *BamHI*, utilizando siempre como sonda al gen *Neo*. Los resultados indican que el CrAT es mantenido aún en ausencia de G418, aunque pudieron observarse apariciones de nuevas bandas en las poblaciones seleccionadas con 300 $\mu\text{g/ml}$ de G418 (Fig 6.12).

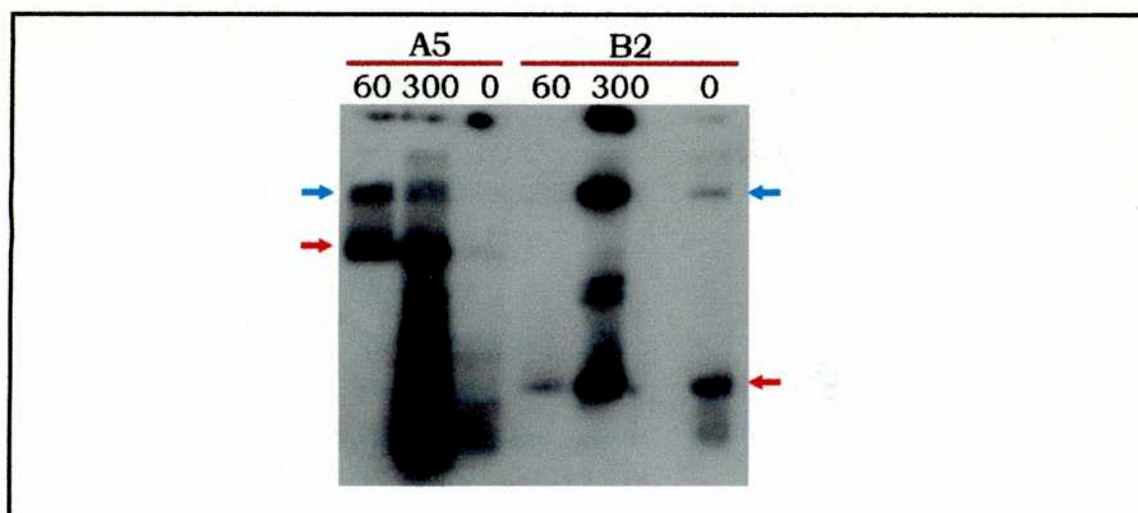


Figura 6.12: análisis por Southern blot de un FIGE de los clones A5 y B2 crecidos en medio LIT con 0, 60 o 300 $\mu\text{g/ml}$ durante 64 generaciones e hibridado con una sonda específica del gen que confiere resistencia a neomicina. Las flecha indican las bandas correspondientes al cromosoma artificial original.

Para estimar si el número de copias del gen *Neo* había variado al cambiar las concentraciones de G418, se hibridó el Southern blot de ADN genómico total del clon B2 digerido con *Bam*HI con el SAS SZ5 y se cuantificaron las intensidades relativas de las banda correspondiente al gen *Neo* con respecto a la banda específica del SAS SZ5 para cada tratamiento. En la tabla 6.1 se detallan los resultados obtenidos (Fig 6.13):

Concentración G418	Intensidad <i>Neo</i>	Intensidad SZ5	Relación <i>Neo</i> /SZ5
60 $\mu\text{g/ml}$	4296.48	3435.59	1.25
300 $\mu\text{g/ml}$	1809.82	1411.04	1.28
0 $\mu\text{g/ml}$	5368.10	4662.58	1.15

Tabla 6.1: cuantificación de la intensidad de las bandas obtenidas por hibridación de un Southern blot a partir del ADN genómico del clon B2 digerido con *Bam*HI e hibridado con una sonda específica del gen *Neo* y otra correspondiente al SAS SZ5 como control.

Como puede observarse, no parece haber variaciones en cuanto el número de copias del gen *Neo*, tanto en el caso de los parásitos crecidos en ausencia de antibiótico como aquellos crecidos en presencia de 300 $\mu\text{g/ml}$ de G418.

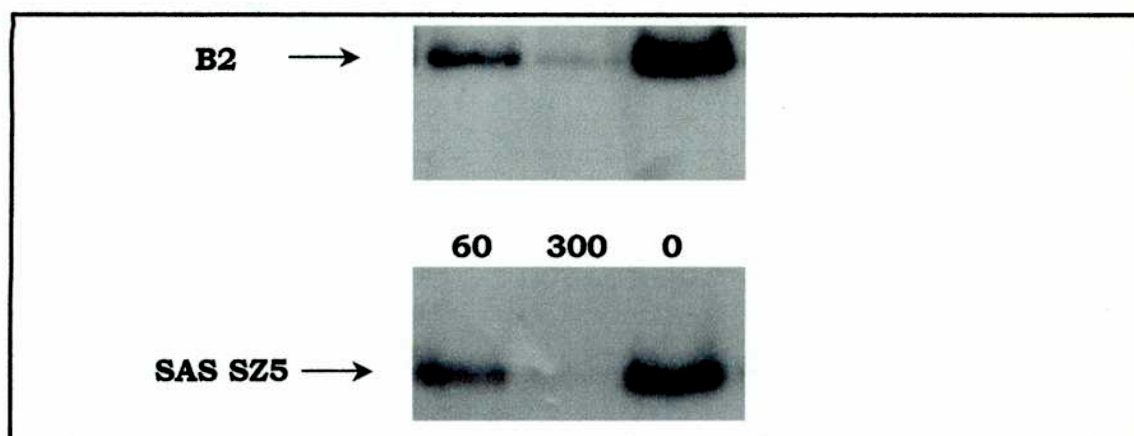


Figura 6.13: Southern blot a partir del ADN genómico del clon B2 crecido con 60 $\mu\text{g/ml}$, 300 $\mu\text{g/ml}$ o 0 $\mu\text{g/ml}$ de G418, digerido con *Bam*HI e hibridado con una sonda específica del gen *Neo* y otra correspondiente al SAS SZ5 como control. Las flechas indican las bandas correspondientes a cada sonda.

6.3 Construcción de la biblioteca del CrAT B2

Para identificar las secuencias de *T. cruzi* incorporadas por el vector pTNT2, se contruyó una biblioteca a partir de ADN purificado del CrAT B2. Para ello, se corrió ADN genómico total del clon B2 en FIGE preparativos, se cortó la banda correspondiente al CrAT B2 y se purificó por extracción con fenol-cloroformo y precipitación con etanol. El ADN así purificado se digirió parcialmente con la enzima de restricción *Sau*3AI y se clonó en el vector pGEM3zf(+), digerido con *Bam*HI y desfosforilado. El tamaño promedio de los insertos de esta biblioteca fue de 700pb.

El rastreo de 40 clones de esta biblioteca con sonda pTNT2 permitió identificar un fragmento de aproximadamente 1.2 kpb (denominado clon 50) que no reacciona con pTNT2, pero sí con el CrAT B2 y con un cromosoma de alto peso molecular de la cepa CL Brener (Fig 6.14) sugiriendo que el aumento del peso molecular del CrAT B2 se debió en parte a la incorporación de ADN genómico de *T. cruzi*.

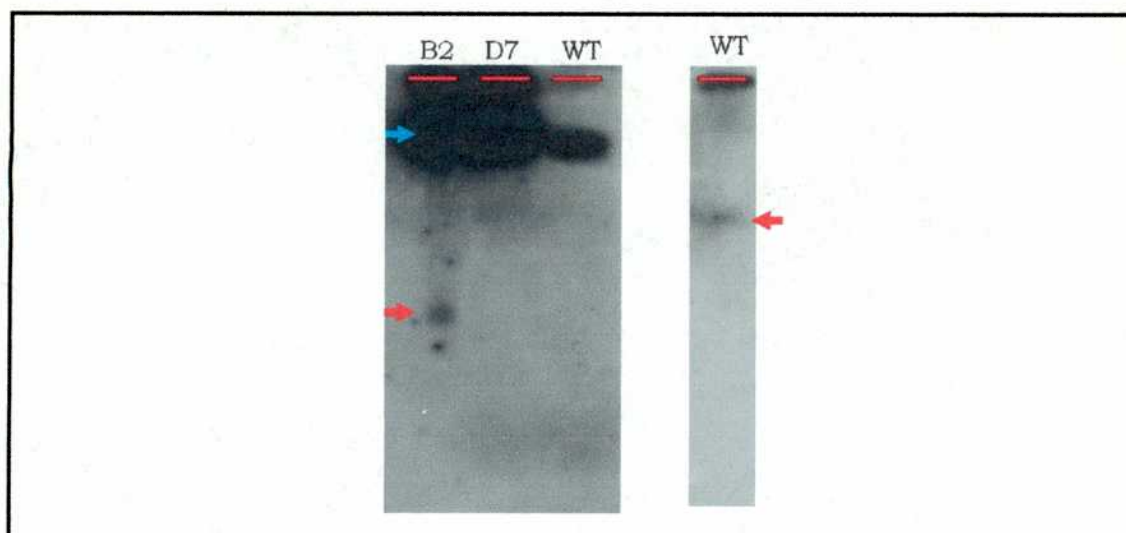


Figura 6.14: Panel izquierdo, Southern blot de ADN genómico total del clon B2, D7 o CL Brener sin transfectar (WT) separado por FIGE usando una sonda proveniente del clon 50. La flecha azul indica la banda correspondiente a la zona de compresión del ADN genómico total. La flecha roja indica la banda correspondiente al CrAT B2. Panel derecho, cromoblot de ADN genómico total del clon CL Brener salvaje usando una sonda específica del clon 50. La flecha roja indica la banda correspondiente a unos de los cromosomas de mayor peso molecular de *T. cruzi*.

Las secuencias obtenidas por secuenciación parcial de los extremos de este fragmento genómico no mostraron homología con ninguna secuencia almacenada en la base de datos GenBank. Tampoco pudieron identificarse marcos de lectura abiertos pero sí regiones ricas en polipirimidinas, típicas de las regiones inergénicas de *T. cruzi*.

6.4 Construcción de un cromosoma artificial con extremos teloméricos que contienen diferentes genes de resistencia

Para desarrollar un vector que permita clonar grandes fragmento de ADN que se mantengan establemente en *T. cruzi* como un cromosoma artificial, se construyó un nuevo vector denominado pTNPT (Fig 6.15). Este vector es un derivado del plásmido pTNT2 al que se agregó un gen de resistencia a puromicina, *Pac*, inmediatamente río arriba de una de las secuencias teloméricas. Para el correcto procesamiento de este gen, se ubicó en su extremo 5' la región HX1 y en su extremo 3' la región intergénica GAPDH

(Fig 6.15). De esta manera, los dos genes de resistencia, *Neo* y *Pac*, se encuentran orientados en direcciones opuestas (centro-telomero), separados entre sí por el esqueleto plasmídico de 3 kpb y con sus extremos 3' inmediatamente río arriba de cada extremo telomérico. Así, ambos extremos del vector poseen una secuencia GAPDH y una secuencia telomérica, generando una repetición invertida de 1.6 kpb que lo hace inestable cuando es amplificado en *E. coli*. Por lo tanto, fue necesario agregar una secuencia espaciadora, de aproximadamente 2 kpb y derivada del vector de clonado pYAC4, entre los dos extremos teloméricos.

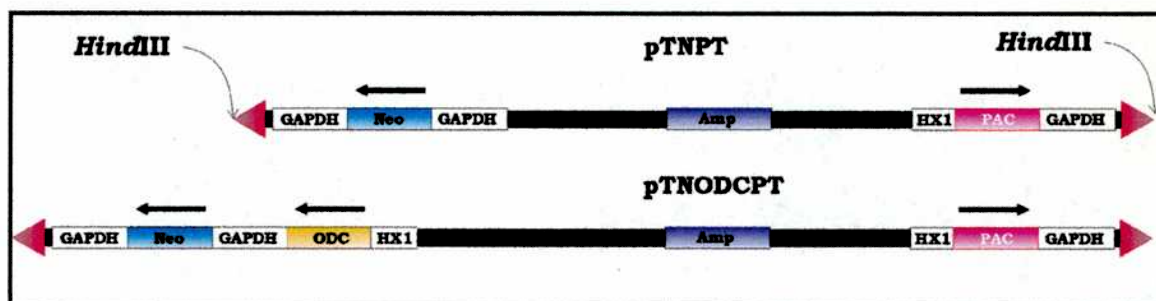


Figura 6.15: esquema de los vectores pTNPT y pTNODCPT linealizados con *HindIII*. Triángulos rojos, secuencias teloméricas de *T. cruzi*; GAPDH, región intergénica del gen GAPDH; *Neo*, gen *Neo*; ODC, gen que codifica para la ornitina decarboxilasa; HX1, región intergénica del gen TcP2β; Amp, gen de resistencia a ampicilina; PAC, gen de resistencia a Puromicina; Rectángulo negro, esqueleto plasmídico. Las flechas indican la orientación de los genes.

En un primer ensayo, se clonó el gen de *Chritidia fasciculata* ornitina decarboxilasa (ODC) inmediatamente río arriba del gen *Neo*, el cual permite crecimiento en un medio sin poliaminas (vector pTNODCPT, Fig 6.15). Luego de linearizar el vector con *HindIII*, se purificó la banda correspondiente al CrAT en geles preparativos y posteriormente se transfectaron epimastigotes del clon CL Brener. Los parásitos fueron seleccionados en medio LIT con las siguientes concentraciones de antibiótico: (a) 100 µg/ml de G418, (b) 60 µl/ml de G418 y 10 µg/ml de Puromicina, o (c) 20 µg/ml de Puromicina. Finalmente, se aislaron 3 poblaciones monoclonales crecidas en condición (a), 4 con doble selección (condición b), y 2 solo con puromicina (c).

Cada uno de los clones obtenidos se analizó por Southern blot de PFGE y FIGE usando una sonda específica del gen *Neo* (Fig 6.16). De los 9 clones analizados, 4 presentaban una única banda con un tamaño aproximado entre 100 kpb y 2 Mpb. Los cuatro clones restantes presentaron un patrón de hibridación característico de una molécula circular de alto peso molecular, sugiriendo que algunas de las moléculas transfectadas se habría recircularizado y rearreglado. Dos clones aislados en la condición (b) llaman la atención. El CrAT E5 (Fig 6.16, panel derecho), con un tamaño cercano a las 2 Mpb y el CrAT C5. Es posible que el E5 represente una copia integrada del vector en alguno de los cromosomas del parásito, o un vector al que se le han incorporado fragmentos genómicos de gran tamaño.

De mantenerse la organización genómica del vector en el CrAT C5, de aproximadamente 100kpb, estaría sugiriendo que la transcripción se produce en ambas direcciones. El estudio de las propiedades de estos CrATs continua actualmente en nuestro laboratorio.

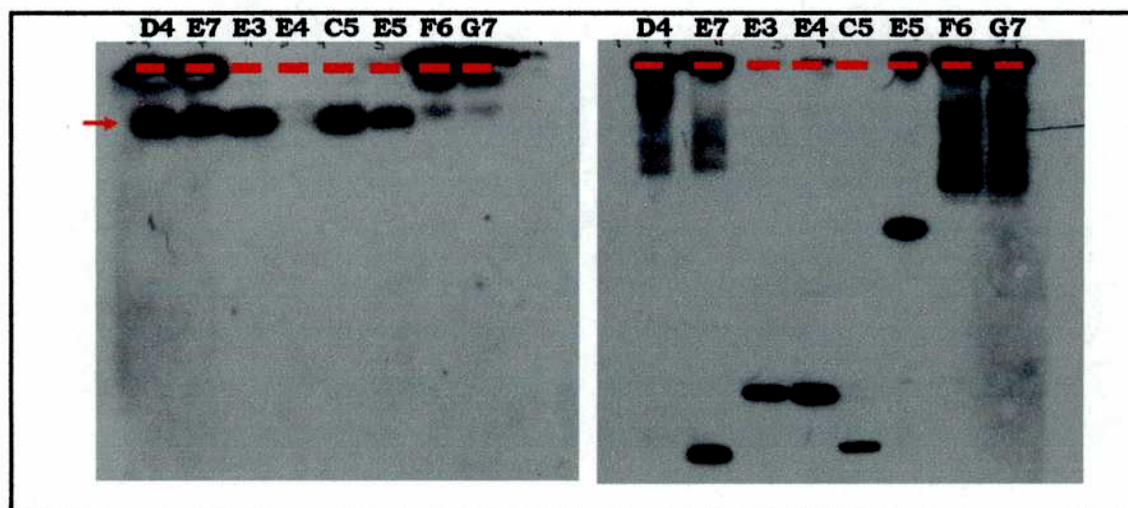


Figura 6.16: Southern blot de ADN genómico de los clones transfectados con el vector pTNPT usando una sonda específica del gen *Neo*. Panel izquierdo, FIGE; panel derecho, PFGE. La flecha indica la zona de compresión del gel donde corre el ADN genómico. D4 y E7, clones seleccionados con G418; E3 y E4, clones seleccionados con Puromicina; C5, E5, F6 y G7, clones seleccionados con G418+Puromicina.

Por último, para determinar si los niveles de expresión alcanzados por el

gen ODC clonado en los CrATs son suficientes como para permitir el crecimiento de *T. cruzi* en ausencia de poliaminas, se crecieron los clones C5 y E5 en el medio mínimo SDM-79. Los resultados obtenidos muestran que los dos clones crecen en este medio (Fig 6.17).

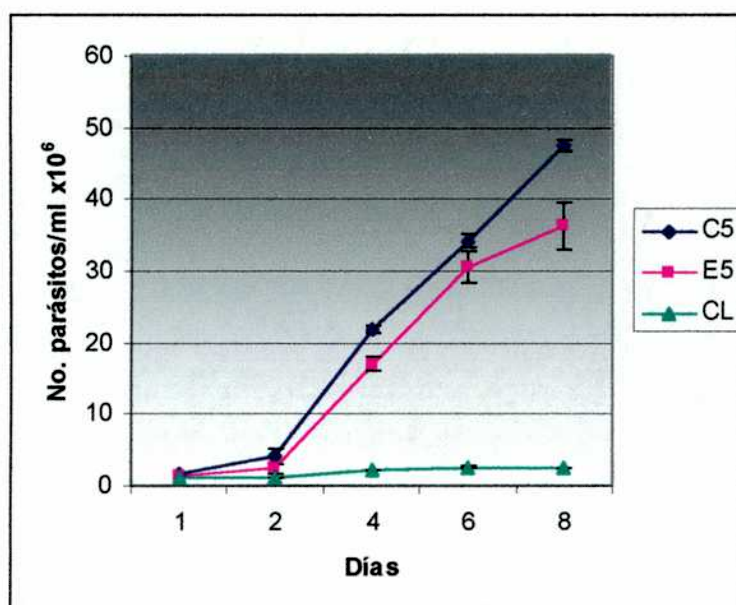
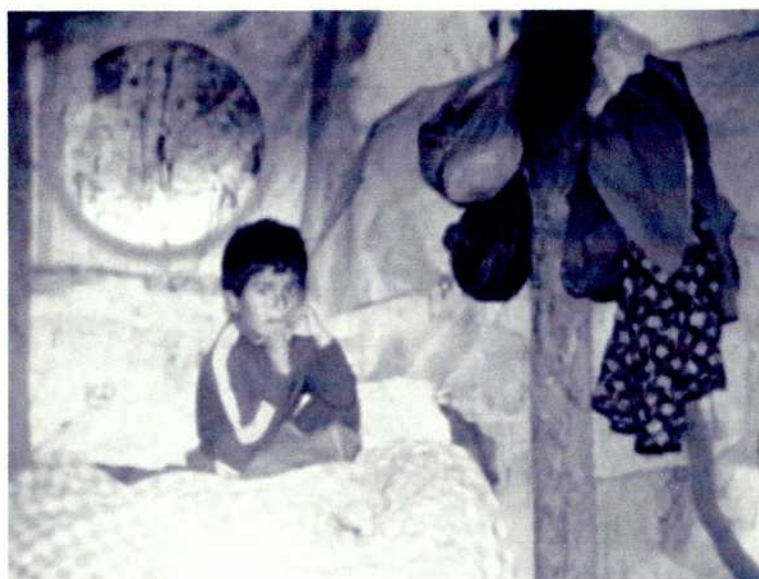


Figura 6.17: Curva de crecimiento de los clones C5 (—◇—), E5(—■—) o CL Brener sin transfectar (—▲—) en medio mínimo SDM-79 sin poliaminas.

RESULTADOS
PARTE V



7 Estudio del promotor ribosomal de *T. cruzi*

7.1 Transfecciones con el vector pPwt linealizado

Al desarrollar el cromosoma artificial de *T. cruzi*, se pensó en la posibilidad de usarlo como plataforma para sobre-expresar proteínas propias o heterólogas de interés.

En *T. cruzi* no se conocen promotores para la ARN polimerasa II a pesar de que dicha enzima parece ser la encargada de la transcripción de la mayoría de los genes estructurales en *T. cruzi* (ver introducción, pag 11). Por el contrario, el promotor de la ARN polimerasa I, que transcribe los genes ribosomales, ya ha sido descrito en *T. cruzi* [Martínez-Calvillo S, 1994]. A pesar que la secuencia consenso no se conoce con exactitud, se sabe que dicho promotor esta comprendido dentro de una región de 800 pb localizada 1.5 kpb río arriba del gen que codifica para el ARNr 18s. Como en *Trypanosoma cruzi* y en otros tripanosomátidos en general, el agregado del CAP en el extremo 5' del ARNm inmaduro, no se encuentra

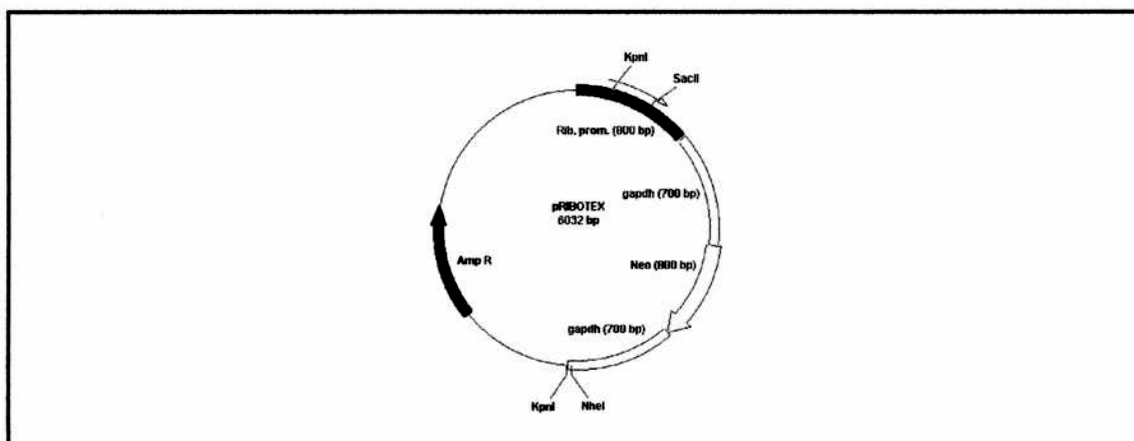


Figura 7.1: esquema del vector pRIBOTEX. Rib. prom, región de 800 pb que contiene el promotor ribosomal de *T. cruzi*; gapdh, región intergénica del gen GAPDH; Neo, gen de resistencia a G418.

asociado a la transcripción sino al proceso del agregado del mini-exón durante el *trans*-splicing, es posible expresar genes, como el de la proteína cloranfenicol acetil transferasa (CAT), bajo la dirección del promotor de ARN polimerasa I. La transcripción por esta enzima es hasta 10.000 veces

más eficiente que la realizada por la ARN pol II [Martínez-Calvillo S, 1997]. De esta manera, se pensó en introducir un promotor ribosomal en el cromosoma artificial de *T. cruzi* para dirigir la transcripción del gen de selección *Neo*, lo cual permitiría una selección mucho más rápida e incrementaría la expresión de cualquier gen que se introduzca río abajo. Resultados previos han demostrado que transfecando un vector circular denominado pRIBOTEX (Fig 7.1), que contiene el gen de resistencia *Neo* bajo la dirección del promotor ribosomal, el vector se integra en el *locus* del ARNr del parásito. En ningún caso se observó recombinación con el *locus* correspondiente al gen GAPDH, ni vectores que se mantengan en forma de episomas.

Este caso particular del promotor ribosomal se opone a lo que suele suceder en *T. cruzi*. Para que haya recombinación homóloga entre una secuencia del genoma del parásito con su homóloga presente en el vector, la última debe encontrarse en uno de los extremos de un vector linearizado. Si el mismo vector es circular, no se observa recombinación homóloga. Esto llevó a plantear las siguientes hipótesis:

- 1- En *T. cruzi* no es posible expresar genes bajo la dirección del promotor ribosomal fuera del *locus* ribosomal.
- 2- La secuencia promotora utilizada en los plásmidos contiene en sus primeras 200 pb una serie de repeticiones en tándem características de los promotores ribosomales, y que se encuentran en varias copias río arriba

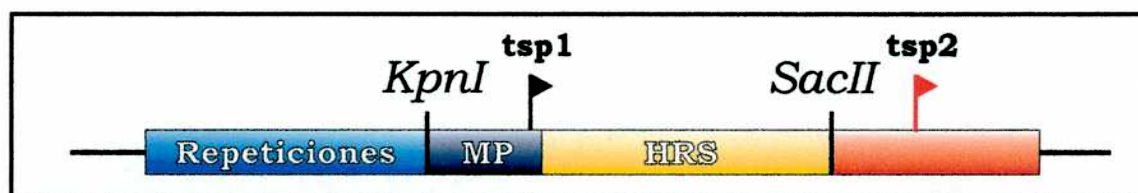


Figura 7.2: esquema del promotor ribosomal contenido en el vector pRIBOTEX. El rectángulo gris indica la zona donde se encuentran los elementos ribosomales repetidos en tándem. La flecha negra indica el sitio de inicio de transcripción. En rojo figura un probable sitio de inicio de transcripción. *KpnI* y *SacII*, sitios de corte de enzimas de restricción. Las regiones MP (violeta) y HRS (amarilla) se definen mas abajo.

del promotor en el *locus* ribosomal (Fig 7.2). Debido a que en el promotor

ribosomal estas repeticiones en tándem se encuentran en gran número, es probable que promuevan la recombinación homóloga entre el vector y el *locus* ribosomal [Martínez-Calvillo S, 1997].

Para poner a prueba la primera hipótesis, se decidió transfectar el vector pRIBOTEX linearizado en el sitio *NheI* (región 3' de la región intergénica del gen GAPDH) para estudiar si era posible dirigir la recombinación del vector hacia el *locus* del gen GAPDH (Fig 7.3). Luego de seleccionar con 500 µg/ml de G418, se analizaron los parásitos transfectados por PFGE y Southern blots. La hibridación de los cromoblots con sondas específicas del gen ribosomal 21α o de la región intergénica del gen GAPDH indicaron que el vector se insertó en el *locus* ribosomal incrementado su tamaño en aproximadamente 50 kb (Fig 7.3).

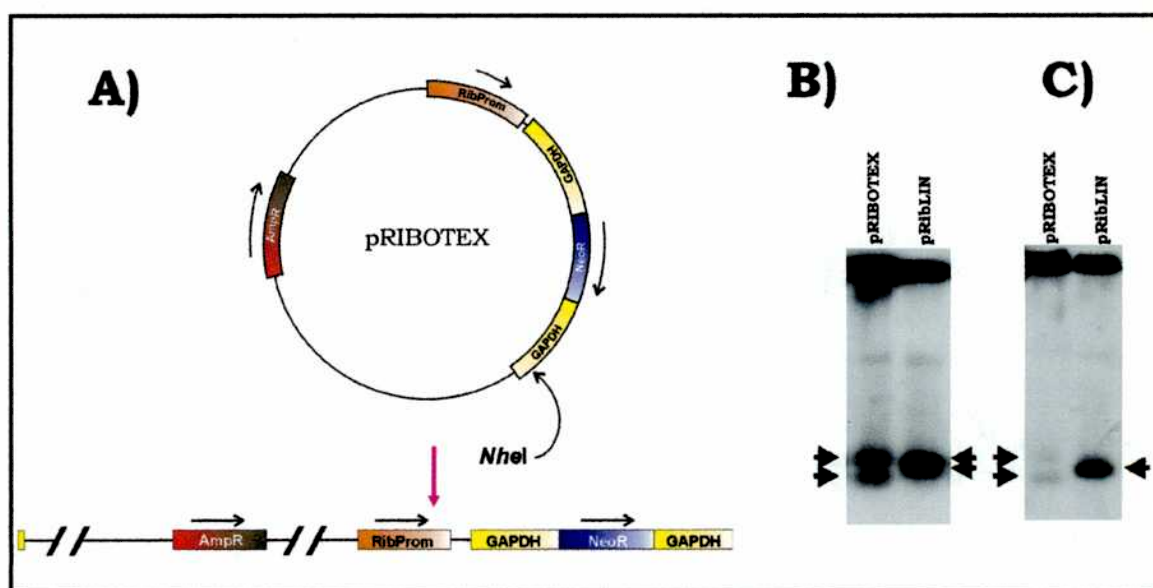


Figura 7.3: (A) Esquema de la linearización de pRIBOTEX con *NheI*; (B y C) Análisis por PFGE de las líneas transfectadas con pRIBOTEX o pRIBOTEX linealizado en GAPDH (pRibLIN). pRibLIN, línea transfectada con pRibLIN; pRIBOTEX, línea transfectada con pRIBOTEX circular. (B). Cromoblot hibridado con sonda específica del gen del ARNr 21α. Las flechas indican la posición de los cromosomas ribosomales; (C) Cromoblot hibridado con sonda específica del gen *Neo*. Las flechas indican la posición de los cromosomas que contienen integrado el vector correspondiente.

7.2 Construcción de los vectores pPwt, pDK, pDS y pDP

Para determinar si la recombinación de pRIBOTEX se debía a la presencia de las repeticiones del extremo 5' del promotor ribosomal, se construyeron cuatro vectores que contenían el gen CAT bajo la dirección del promotor entero (pPwt) o un promotor con deleciones parciales producidas por digestión con *KpnI* (pDK) y *SacII* (pDS). La cuarta construcción no contiene promotor y fue utilizada como control (pDP) (Fig 7.4). Las construcciones circulares fueron transfectadas y se siguieron por medición de la actividad CAT en líneas transitorias y estables. Además se analizó la capacidad de los vectores de recombinar con el *locus* ribosomal.

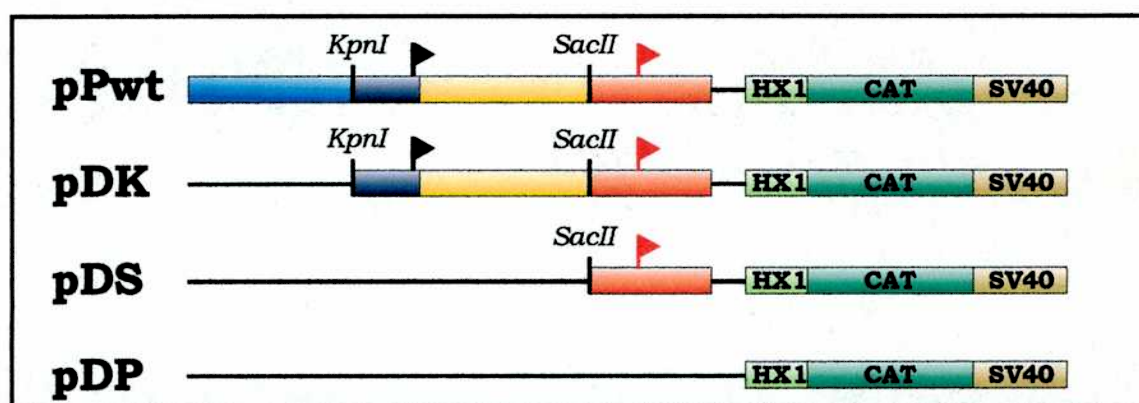


Figura 7.4: esquema de los vectores pPwt, pDK, pDS y pDP. Rectángulo azul, región que contiene las repeticiones ribosomales; rectángulo violeta, región MP; rectángulo amarillo, región HRS; rectángulo rojo, región que contiene el *tsp2*; HX1, región HX1, SV40, región SV40; CAT, gen CAT; flecha negra, *tsp1*; flecha roja, *tsp2*.

7.3 Ensayos de expresión del gen CAT con los vectores pPwt, pDK, pDS y pDP

Los ensayos transitorios indican que la eliminación de las repeticiones localizadas en las primeras 200 pb del promotor ribosomal del vector pDK no afecta los niveles de expresión del promotor. Por otro lado, las construcciones pDS y pDP mostraron una gran caída en los niveles de expresión de CAT (7.5).

Se ha postulado que el promotor ribosomal utilizado contiene un sitio de inicio de transcripción localizado aproximadamente a 90 pb río abajo del sitio *KpnI* (*tsp1*) y otro ubicado 70 pb por debajo del sitio de restricción

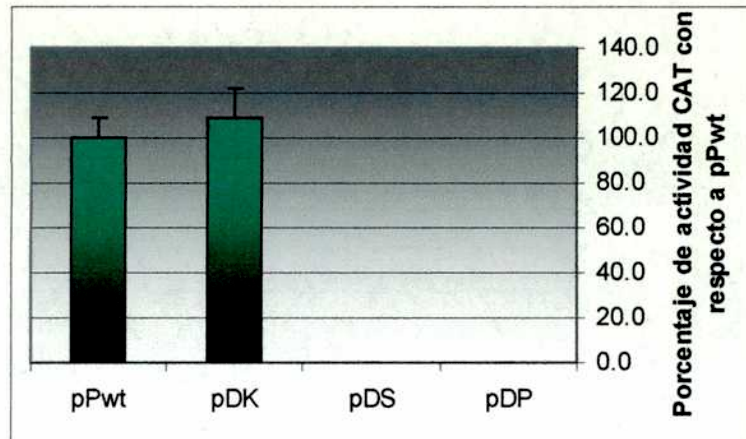


Figura 7.5: medición de los ensayos CAT de las líneas transfectadas en forma transitoria con las construcciones pPwt, pDK, pDS y pDP. Los resultados se expresan como porcentaje con respecto al control pPwt.

SacII (*tsp2*) que podría ser funcional [Dietrich P, 1993], (Fig 7.2). Dado que pDK contiene los dos sitios de inicio de transcripción y que pDS sólo conserva al segundo, es posible especular, basándose en los resultados obtenidos, que el *tsp2* no es funcional o si lo es, lo sea con muy baja actividad. Cuando se analizaron las líneas estables, se observó un incremento en la actividad CAT de las líneas transfectadas con pDS y pDP, con respecto a lo observado con las transfecciones transitorias, (Fig 7.6).

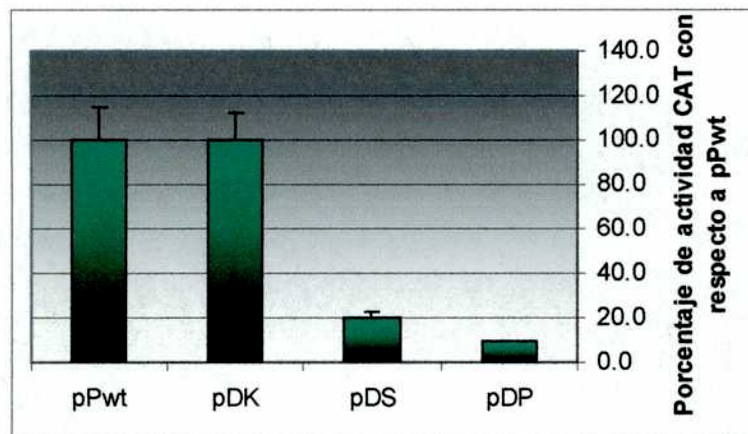


Figura 7.6: medición de los ensayos CAT de las líneas transfectadas en forma estable con las construcciones pDK, pDS y pDP. Los resultados se expresan como porcentaje de actividad CAT con respecto al control pDK.

7.4 Estudios de la recombinación en el promotor ribosomal

Cuando las líneas estables fueron analizadas por Southern blot y cromoblots, se observó que los vectores pPwt y pDK se habían integrado al *locus* ribosomal (Fig 7.7). En cambio, los vectores pDS y pDP formaron episomas de alto peso molecular constituidos por unidades en tándem del vector original (Fig 7.7). Esto explica también el aumento en la expresión de CAT observada en estas líneas estables, ya que al amplificarse el vector, aumenta el número de copias del gen CAT por molécula de episoma y por lo tanto sus niveles de expresión.

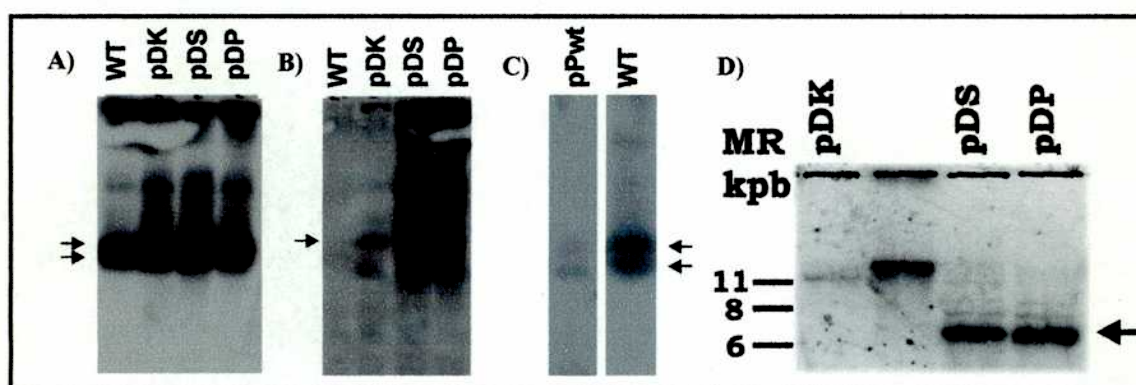


Figura 7.7: (A y B) Cromoblots de las transfecciones estables con las construcciones pDK, pDS y pDP hibridados con una sonda específica de la repetición ribosomal (A) y del gen *Neo* (B). En (A), las flechas indican las bandas correspondiente a los cromosomas que contienen los genes ribosomales. En (B), La flecha indica la banda correspondiente al cromosoma que contiene integrada la construcción pDK. (C, panel izquierdo) Cromoblot de la transfección estable con las construcción pPwt hibridado con una sonda del gen *Neo*. (C, panel derecho) Cromoblot de ADN de la cepa Tulahuen II sin transfectar hibridado con una sonda específica del gen ribosomal 21 α . Las flechas indican las bandas correspondiente a los cromosomas que contienen los genes ribosomales. (D) Southern blot de ADN genómico de las transfecciones estables con pDK, pDS y pDP, digeridos con *Xho*I usando una sonda específica del gen *Neo*. La flecha indica la banda correspondiente a una unidad de vector linealizada.

La inserción de pDK en el *locus* ribosomal indica que la recombinación no se debe a la presencia de las repeticiones presentes en el promotor ya que son inexistentes en esta construcción.

7.5 Identificación del sitio de recombinación

Dado que las repeticiones no eran las responsables de la actividad recombinogénica del promotor, se decidió determinar cual era el sitio de recombinación. Para ello se recuperó la construcción pPwt integrada, por

digestión de ADN genómico total con *SacI*, ligación y transformación en bacterias. Luego, se secuenció el promotor ribosomal de la cepa no

pribot	CCCGTCGCAATCGGCGCCGTCCGAACGCGGAAATGTTCCGAGAATAATACGGCTGGGCTG
Integ	CCCGTCGCAATCGGCGCCGTCCGAACGCGGAAATGTTCCGAAATAATACGGCTGGGCTG
promWT	CCCGTCGCAATCGGCGCCGTCCGAACGCGGAAATGTTCCGAAATAATACGGCTGGGCTG
pribot	CGCCGCGCGTTCCCGCGGTGAACCAACTATTGTGCGATGTGCAGCATCCTATTGTGGTGC
Integ	CGCCGCGCGTTCCCGCGGTGAACCAACTATTGTGCGATGTGCAGCATCCTATTGTGGTGC
promWT	CGCCGCGCGTTCCCGCGGTGAACCAACTATTGTGCGATGTGCAGCATCCTATTGTGGTGC
pribot	TTTACCGCACACCAAGTTTCCTTGCGGGGCTTATTGGTGTGTTGGATTTTAAATTTTGG
Integ	TTTACCGCACACCAAGTTTCCTTGCGGGGCTTATTGGTGTGTTGGATTTTAAATTTTGG
promWT	TTTACCGCACACCAAGTTTCCTTGCGGGGCTTATTGGTGTGTTGGATTTTAAATTTTGG
pribot	ATGATTCGGAGGAATTTTTGCAATTTTGGGTACCCCTAAAAAAATTTGGAGTTTCCG
Integ	ATGATTCGGAGGAATTTTTGCAATTTTGGGTACCCCTAAAAAAATTTGGAGTTTCCG
promWT	ATGATTCGGAGGAATTTTTGCAATTTTGGGTACCCCTAAAAAAATTTGGAGTTTCCG
pribot	GGGTTCGATCCAACCTGTGCTTTTTTAACCGTCCATTGTGTCTAGTACATCATGGAGCG
Integ	GGGTTCGATCCAACCTGTGCTTTTTTAACCGTCCATTGTGTCTAGTACATCATGGAGCG
promWT	GGGTTCGATCCAACCTGTGCTTTTTTAACCGTCCATTGTGTCTAGTACATCATGGAGCG
pribot	GTATTCTCTCCGGTGGCCAGGTGGCGTCGGAAGGAATCGGTGTCCCTCAGGATGTTTGG
Integ	GTATTCTCTCCGGTGGCCAGGTGGCGTCGGAAGGAATCGGTGTCCCTCAGGATGTTTGG
promWT	GTATTCTCTCCGGTGGCCAGGTGGCGTCGGAAGGAATCGGTGTCCCTCAGGATGTTTGG
pribot	TTTTTCGTTTTTTTTTTTTCGGTCTTTTGTTCGCATCGCCGATCGTGTGCGGCGCGAC
Integ	TTTTTCGTTTTTTTTTTTTCGGTCTTTTGTTCGCATCGCCGATCGTGTGCGGCGCGAC
promWT	TTTTTCGTTTTTTTTTTTTCGGTCTTTTGTTCGCATCGCCGATCGTGTGCGGCGCGAC
pribot	CTTCTTTTGGGCTCATTGGTCAGTGAGGTTTATAATAAAGTGGATCATTGGGTTTTTGG
Integ	CTTCTTTTGGGCTCATTGGTCAGTGAGGTTTATAATAAAGTGGATCATTGGGTTTTTGG
promWT	CTTCTTTTGGGCTCATTGGTCAGTGAGGTTTATAATAAAGTGGATCATTGGGTTTTTGG
pribot	CCCTTTGCGGGGCACCCGCGGAATGGGGGAGGGATTTCATATAATGTAGTGACACAT
Integ	CCCTTTGCGGGGCACCCGCGGAATGGGGGAGGGATTTCATATAATGTAGTGACACAT
promWT	CCCTTTGCGGGGCACCCGCGGAATGGGGGAGGGATTTCATATAATGTAGTGACACAT
pribot	TGTGTGTGGGTGCGAAATGTCATGCCGTGTGCAATGTTTATTGCGTGTGTCGCGTGTG
Integ	TGTGTGTGGGTGCGAAATGTCATGCCGTGTGCAATGTTTATTGCGTGTGTCGCGTGTG
promWT	TGTGTGTGGGTGCGAAATGTCATGCCGTGTGCAATGTTTATTGCGTGTGTCGCGTGTG
pribot	CTTTTGTGATTCCACCACTTGTGTGTTTACCTTATCGTCTCTCCCTCGCGTTGGCTG
Integ	CTTTTGTGATTCCACCACTTGTGTGTTTACCTTATCGTCTCTCCCTCGCGTTGGCTG
promWT	CTTTTGTGATTCCACCACTTGTGTGTTTACCTTATCGTCTCTCCCTCGCGTTGGCTG
pribot	TGCGTGAAT
Integ	TGCGTGAAT
promWT	TGCGTGAAT

Figura 7.8: Secuenciación del promotor ribosomal recuperado de las líneas transfectadas con pPwt. Integ, vector recuperado; pribot, secuencia original del vector pPwt; promwt, secuencia del promotor salvaje de la cepa Tulahuén II. Los rectángulos grises indican el lugar en donde divergen la secuencia del vector y la del promotor salvaje. En rojo se indica la región HRS en donde ocurre la recombinación. En letras negras con fondo amarillo se indican la posición del *tsp1* y del *tsp2*.

transfectada, el promotor ribosomal del plásmido pPwt y el recuperado de las células transfectadas con dicho vector. De esta manera, pudo establecerse que la región de recombinación estaba localizada dentro de

una zona de 131 pb de longitud (que denominamos región HRS, amarilla en Fig 7.8) entre las posiciones +101 y +232 con respecto al *tsp1*. Esto confirmó además, que la recombinación no se produjo en la zona correspondiente a las repeticiones (Fig 7.2).

7.6 Búsqueda de un promotor ribosomal sin actividad recombinogénica

Como el vector pPwt recombina por la región HRS del promotor ribosomal, se decidió investigar si eliminando esta secuencia era posible eliminar la actividad recombinogénica del promotor. Así, se generaron cinco nuevas construcciones por escisiones de distintas porciones del promotor ribosomal (Fig 7.9): (a) pRMP, contiene una región promotora que abarca el extremo 5' del promotor ribosomal hasta 10 pb río abajo del *tsp1* incluyendo la repetición ribosomal; (2) pR5MP, es similar a pRMP pero con

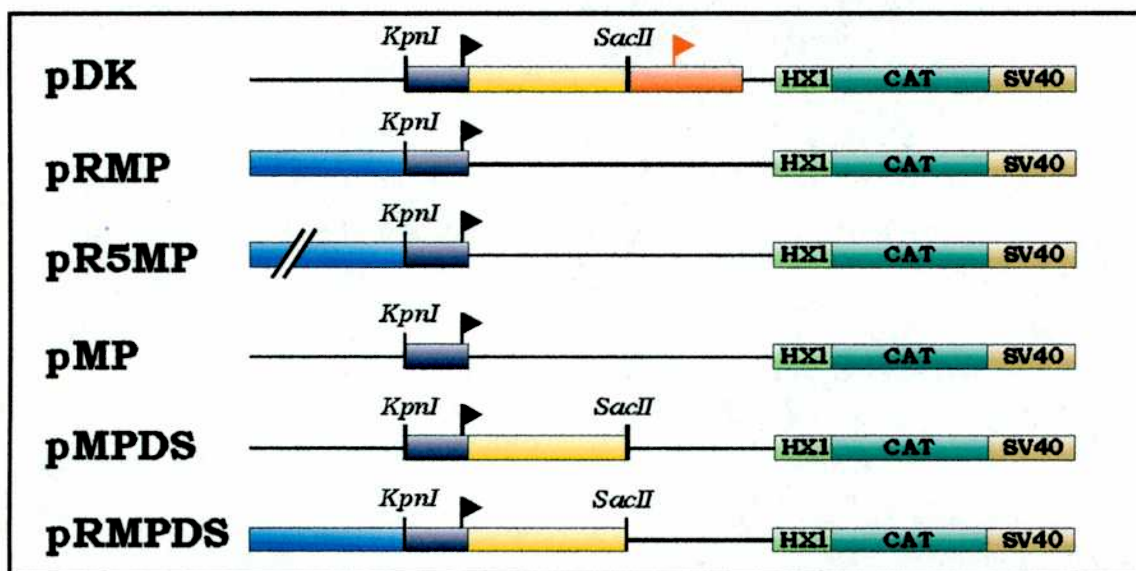


Figura 7.9: Esquema de las construcciones pDK, pRMP, pR5MP, pMP, pMPDS y pRMPDS. Rectángulo azul, región que contiene las repeticiones ribosomales; rectángulo violeta, región MP; rectángulo amarillo, región HRS; rectángulo rojo, región que contiene el *tsp2*; HX1, región HX1, SV40, región SV40; CAT, gen CAT; flecha negra, *tsp1*; flecha roja, *tsp2*.

5 repeticiones ribosomales en tándem; (3) pMP, similar a pRMP pero sin las primeras 200 pb de la repetición ribosomal; (4) pMPDS, que contiene la

secuencia HRS debajo del *tsp1* y (5) pRMPDS, que contiene tanto la región HRS como las repeticiones ribosomales, pero que no contiene el posible segundo sitio de transcripción.

Inicialmente, estas construcciones se transfectaron de manera transitoria, para determinar el funcionalidad del promotor en cada caso.

La actividad CAT en ensayos transitorios indicó que los vectores pRMP y pR5MP presentaban un ~25% de la actividad del control positivo, pDK. En

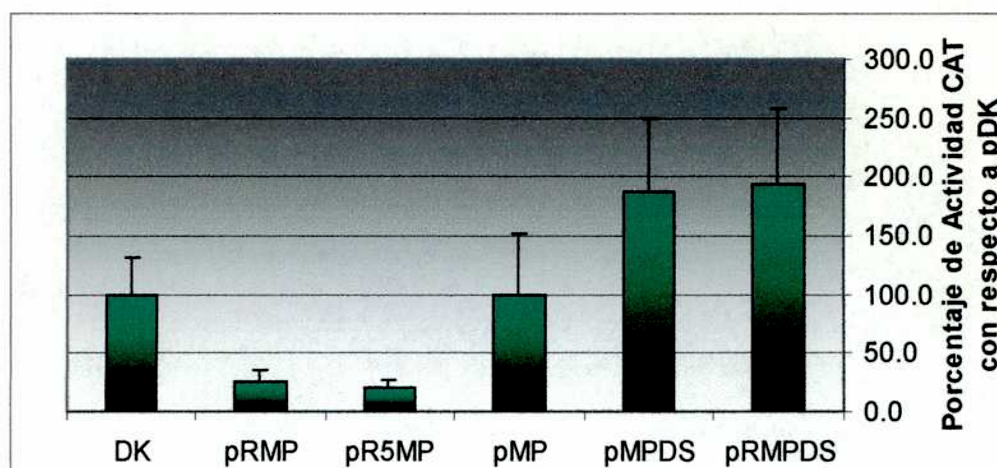


Figura 7.10: medición de los ensayos CAT de las líneas transfectadas en forma transitoria con las construcciones pDK, pRMP, pR5MP, pMP, pRMPDS y pMPDS. Los resultados se expresan como porcentaje de actividad CAT con respecto a pDK.

contraste, pMP, pMPDS y pRMPDS mostraron una actividad promotora similar a la observada con pDK (Fig 7.10).

7.7 Estudio de la actividad recombinogénica de los distintos promotores

Luego de los ensayos transitorios, se obtuvieron las líneas estables correspondientes. Análisis de Southern blots y cromoblots a partir de las mismas, permitió determinar que todas presentaron recombinación en el *locus* ribosomal (Fig 7.11). Sin embargo, el análisis de copias recuperadas del vector pMP a partir de líneas celulares estables, sugieren que este vector es rearrreglado antes o durante el proceso de recombinación en el

locus ribosomal (datos no mostrados).

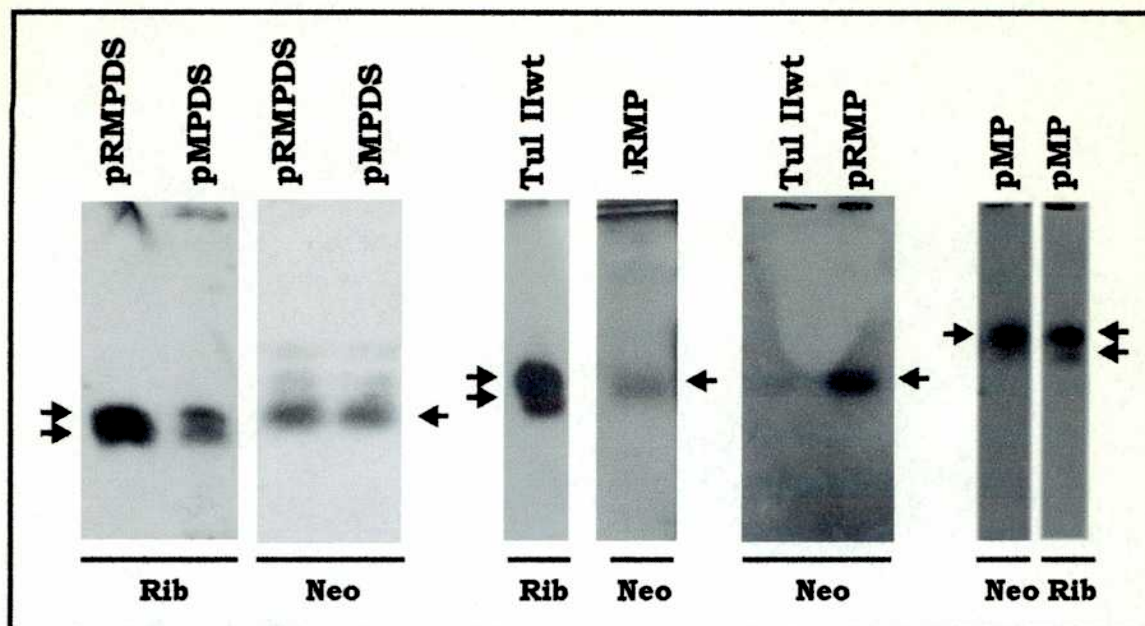


Figura 7.11: Cromoblots de las transfecciones estables con las construcciones pRMP, pMP, pRMPDS y pMPDS. Cromoblots hibridados con una sonda específica del locus ribosomal (A,C,E) y del gen *Neo* (B,D,F). Las flechas indican la banda correspondiente al cromosoma que contiene los genes ribosomales.

Como la actividad CAT obtenida con pRMP (y pR5MP) en ensayos

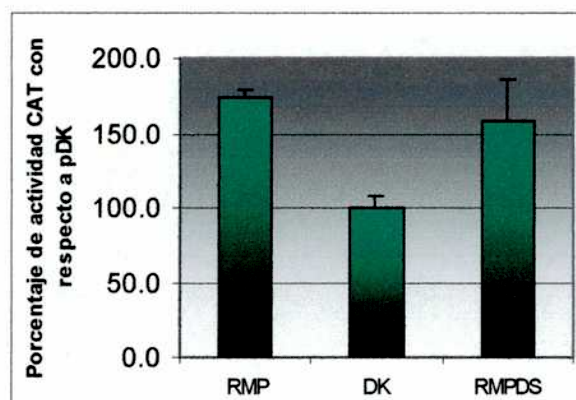


Figura 7.12: ensayos CAT de las líneas transfectadas en forma estable con los vectores pDK, pRMP y pRMPDS. Los resultados se expresan como porcentaje de actividad CAT con respecto a pDK.

transitorios resultó significativamente menor a la registrada con pDK, se decidió determinar si las células establemente transfectadas con pRMP se comportaban de manera similar. Así, se analizaron las actividades CAT de

las líneas celulares estables transfectadas con pRMP y pRMPDS y pDK como controles. Contrariamente a lo observado en las líneas transitorias, las células con integración de pRMP presentan la misma actividad que las otras dos construcciones (Fig 7.12).

7.8 Integración en transfecciones transitorias

Finalmente, para determinar el momento en que ocurre la recombinación, se transfectaron epimastigotes con el vector pDK y se analizó la presencia de copias integradas por PCR y Southern blots a partir de ADN genómico purificado después de 5, 24 y 48 horas post-transfección (Fig 7.13). Los resultados demuestran que a las 5 hs post-transfección ya hay copias integradas de pDK en el locus ribosomal. Southern blots hibridados con una sonda específica del gen *Neo* indicaron que un gran número de copias

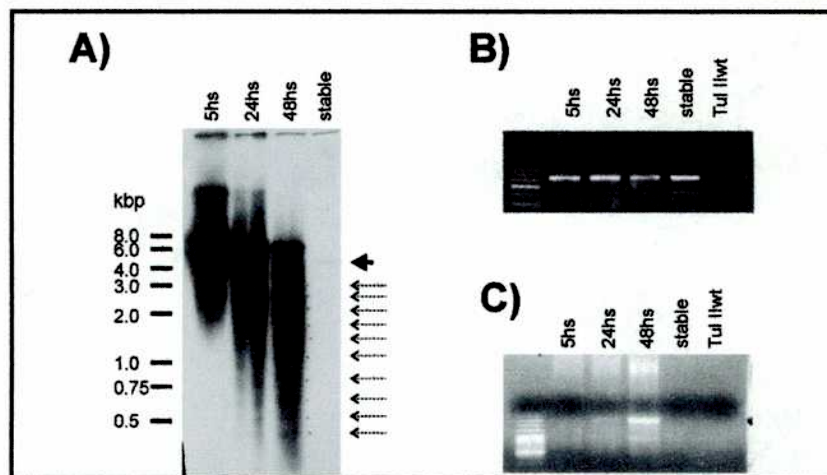
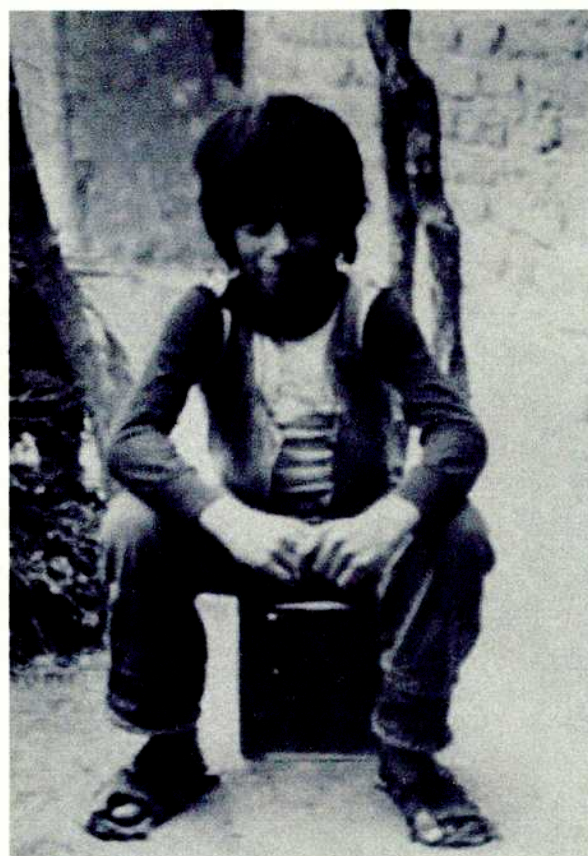


Figura 7.13: (A) Southern blot a partir de ADN genómico total purificado a las 5hs, 24hs y 48hs post-transfección con el vector pDK e hibridado con una sonda específica del gen *Neo*. (B y C) Análisis por PCR utilizando primers específicos de la construcción pDK integrada (B) o de la construcción pDK episomal (C). La flecha en negrita indica la banda correspondiente al vector pDK integrado. Las flechas finas señalan el patrón en escalera observado.

de pDK entra a los epimastigotes durante la electroporación pero son rápidamente degradadas mostrando un perfil en escalera dentro de las primeras 48 hs (Fig 7.13A).

Los datos obtenidos nos obligan a descartar la posibilidad de incluir el promotor ribosomal dentro de cualquier tipo de construcción destinada a obtener cromosomas artificiales para *T. cruzi*.

DISCUSSION



DISCUSION

Un factor importante de todo proyecto genoma es poder contar con un gran número de marcadores genómicos que permitan la construcción del mapa físico como paso previo a su completa secuenciación. Dichos marcadores deben estar distribuidos por todo el genoma de manera tal que cada región cromosómica pueda ser identificada al menos por una secuencia marcadora. No todas las regiones del genoma de un organismo son clonadas con la misma facilidad ni se expresan con la misma intensidad. Por lo tanto, para el proyecto genoma de *T. cruzi*, es de vital importancia desarrollar un gran número de técnicas alternativas que permitan, en su conjunto, generar marcadores cromosómicos representativos de la totalidad de su genoma.

8.1 Marcadores Genómicos SAS

Aprovechando que el elemento repetido SIRE se encuentra distribuido a lo largo de todo el genoma de *T. cruzi*, se estudió la factibilidad de utilizar las secuencias adyacentes como un nuevo tipo de marcador cromosómico denominado SAS. De esta manera, el aislamiento y caracterización de 14 fragmentos genómicos positivos para SIRE, permitió determinar que los SAS pueden funcionar como excelentes marcadores genómicos. Los SAS suelen ser secuencias de copia única o poco repetidas que se encuentran en uno o pocos cromosomas. Cerca del 50% de los clones SZ poseen marcos de lectura abiertos, sugiriendo que SIRE puede encontrarse asociado a secuencias codificantes. Por lo tanto, la utilización de los SAS como secuencia marcadora presenta la ventaja adicional de permitir el descubrimiento de nuevos genes como ocurrió con los SAS SZ5, SZ23 y SZ14.

8.2 Análisis de los fragmentos SZ10, SZ12 y SZ31

Utilizando el programa BLAST se determinó que los SAS SZ10, 12 y 31 tienen homología significativa con la región 3' codificante y no codificante del gen de la proteína vp85, que está relacionada con la virulencia de *T. cruzi* [Weston D, 1999] y con la secuencia repetida E22. Río abajo de la región codificante se detectó una secuencia muy conservada de 181 pb flanqueada por poliTs que fue denominada TcREL. TcREL no sólo se conserva en las secuencias SZ12, 31, E22 y vp85 sino también en la región 3' UTR del gen de la proteína FL-160 de *T. cruzi* [Van Voorhis W, 1989]. Cabe destacar que la expresión del gen FL-160 está controlada en parte por secuencias de la región 3' UTR del ARNm, que se localizan inmediatamente río debajo de TcREL (Weston D, 1999). Dado que fuera de TcREL el gen FL-160 no presenta homología significativa con ninguna de las secuencias analizadas, TcREL podría ser un nuevo elemento repetido. Esto fue confirmado por ensayos de Southern blot (Fig 3.3, pag 67) donde al utilizar una sonda que incluía la secuencia TcREL se obtuvo un patrón de hibridación característico. Los extremos 3' de SZ10, 12 y 31 contienen un elemento repetido SIRE. El análisis de las secuencias adyacentes indicó que SIRE se encuentra integrado en regiones de poliTs distintas, presentes río abajo del codón stop correspondiente a cada fragmento (Fig 3.2, pag 66).

8.3 Análisis de las secuencias SZ23 y SZ14

Los fragmentos SZ23 y 14 también están relacionados. En el extremo 5', ambas secuencias genómicas contienen un ORF de 354 pb que comparten un 70% de identidad entre sí. Este marco de lectura abierto se encuentra también asociado a los telómeros de *T. cruzi* presentando homología con el extremo 5' del fragmento telomérico pVATc17 [Chiurrillo MA, 1999]. Aunque la secuencia aminoacídica codificada por este ORF no presenta similitud con proteínas conocidas, por comparaciones de secuencia con la

base de datos dbEST sí pudo establecerse que ésta se expresa al menos en epimastigotes de *T. cruzi*.

Una diferencia con los fragmentos genómicos relacionados al gen *vp85*, es que la similitud entre SZ23, 14 y pVATc17, desaparece río abajo del codón stop del ORF correspondiente. Sin embargo, la organización genómica de los tres *loci* se mantiene, conteniendo un elemento SIRE insertado a una distancia variable del ORF, pero con la misma orientación (Fig 3.5, pag 69).

8.4 Caracterización de SZ5

El *locus* SZ5 se encuentra en las bandas cromosómicas III y VII de 0.7 y 0.9 Mpb respectivamente, en el clon CL-Brener de *T. cruzi* (Fig 3.13, pag 76) [Lorenzi H, 2000]. Dado que los análisis de Southern blot indican que este *locus* es de copia única, es posible que las bandas III y VII sean un par de cromosomas homólogos polimórficos.

El análisis de SZ5 permitió detectar tres genes nuevos. Uno de ellos, denominado TcRH1, tiene una homología muy significativa con la subfamilia de helicasas de ARN DEAH-box [Lüking A, 1998]. Estas proteínas intervienen en la reacción de *cis*-splicing en eucariotas superiores. Sin embargo, esta reacción sólo ha sido descripta en tripanosomátidos durante la maduración del ARNm de la polimerasa de poliA en *T. brucei* [Mair G, 2000]. Es posible entonces, que esta familia de proteínas intervenga en el *trans*-splicing, proceso que esta relacionado con el *cis*-splicing. Dentro de la familia DEAH-box, la proteína TcRH1 presenta mayor identidad con la proteína *prp22* de *Saccharomyces cerevisiae*, que participa en la liberación del spliceosoma del ARNm maduro [Schwer B, 1998].

La proteína codificada por el gen TcRH1 contiene los siete dominios que caracterizan a la familia DEAH-box [Lüking A, 1998]. La distancia entre los dominios también está conservada, a excepción del mayor espacio entre el dominio I y la debido a una inserción rica en residuos glicina, lisina y ácido glutámico, que no se encuentra en el resto de los miembros de esta

familia.

El segundo ORF del *locus* SZ5, el gen TcNU1, presenta un dominio C-terminal con 45% de identidad con el dominio C-terminal de la familia de proteínas NifU de las bacterias fijadoras de nitrógeno [Hwang D, 1996]. Este tipo de proteínas participa en la formación de grupos Fe-S de la enzima nitrogenasa y tiene una organización modular con dominios N- y C-terminales [Agar JN, 2000]. Dentro de este último, hay 4 Cys (Cys137, Cys139, Cys172 y Cys175) que interaccionan con los grupos [2Fe-2S] y que junto con otras tres cisteínas del dominio N-terminal (Cys35, Cys62 y Cys106) son fundamentales para obtener una actividad fisiológica completa [Agar JN, 2000]. En TcNU1 no sólo las Cys 172 y 175 se encuentran conservadas, sino también existen las tres Cys en la región N-terminal (Cys23, Cys43 y Cys109) en una disposición similar a las del dominio N-terminal de NifU. No es extraño encontrar una enzima con estas características en un organismo eucariota unicelular y parásito, en levaduras se ha informado la existencia de una proteína con este dominio C-terminal que participaría en la formación o estabilidad de grupos [2Fe-2S] de ciertas enzimas respiratorias mitocondriales [Schilke B, 1999].

El tercer gen del *locus* SZ5, TcEIF6, codifica para una proteína de 281 aminoácidos de longitud que presenta 61% de identidad en toda su extensión con el factor de traducción eucariota EIF-6 [Wood L, 1999]. Esta proteína estabiliza la subunidad 60s impidiendo su asociación con la subunidad 40s [Wood L, 1999; Si K, 1999]. Ensayos hechos en levaduras con una mutante termosensible para esta proteína, demuestran que cuando la proteína se inactiva, disminuye la cantidad de subunidades 60s en la célula y el número total de ribosomas 80s [Wood L, 1999].

Por ensayos de Northern blot se observó que los genes TcRH1 y TcEIF6 se expresan en el estadio epimastigote del clon CL Brener (Fig 3.13, pag 76). TcRH1 hibrida con una banda de aproximadamente 3000 bases, coincidiendo con el tamaño esperado (35 bases correspondiente a la secuencia mini-exón + 110 bases del 5' UTR + 2703 bases del ORF + aprox

100 bases del 3'UTR + cola del poliadeninas, Fig 3.13, pag 76). Para TcEIF6, el tamaño del ARNm obtenido fue de aproximadamente 1700 bases sugiriendo que la secuencia SIRE localizada río abajo del ORF TcEIF6 forma parte de la región 3'UTR del mensajero maduro (Fig 3.13, pag 76).

Por último, a pesar de que no se encontró expresión del gen TcNU1 en epimastigotes de *T. cruzi*, es posible que el mismo se exprese en algún otro estadio del parásito. De ser así, las regiones intergénicas BX1 y BX1A, adyacentes al ORF TcNU1, serían de particular importancia ya que permitirían la expresión de proteínas de manera estadio-específicas.

La utilización de estas dos regiones en experimentos de transfección en epimastigotes utilizando el gen CAT, indica que tanto BX1 como BX1A disminuyen un 93% y un 63% respectivamente los niveles de expresión de CAT comparados con el control positivo HX1 (Fig 3.15, pag 78). El poder inhibitorio de BX1 se ve potenciado casi un 50% más, cuando río abajo de CAT se coloca la secuencia BX1A, llegando a registrarse una disminución del 96% con respecto al control pHX1CAT40 (Fig 3.15, pag 78).

Es interesante resaltar, que la disminución del 96% se logra cuando el gen CAT se encuentra bajo la dirección de un promotor fuerte, como lo es el promotor ribosomal de *T. cruzi*. En condiciones normales, el gen TcNU1 es transcrito por la ARN polimerasa II y por lo tanto es de esperar que la disminución en los niveles de expresión debida a las secuencias BX1 y BX1A flanqueantes, reduzcan a valores cercanos a cero los niveles de ARNm. Esto explica así los resultados de Northern blot obtenidos.

Por último, merece destacarse que, la identificación del dinucleótido AG que funciona como aceptor del miniexón durante la reacción de transplicing en BX1 y BX1A, determinó que el AG utilizado es el primero que se encuentra río abajo del tracto de polipirimidinas, confirmando hipótesis previas al respecto [Hummel H ,2000].

8.5 Caracterización del clon SZ15

El análisis de la secuencia completa del clon SZ15 permitió establecer que el mismo constituía un nuevo tipo de elemento repetido no descrito hasta el momento en *Trypanosoma cruzi* que denominamos VIPER. El mismo tiene una longitud de 2359 pb y se encuentra delimitado en su extremo 5' por las primeras 150 pb de SIRE y en su extremo 3' por las 270 pb restantes del mismo elemento repetido (esquema Fig 3.17A, pag 86). Comparaciones de secuencia permitieron posteriormente determinar que la mitad 5' presenta mas variabilidad que la mitad 3' de VIPER.

VIPER no presenta marcos de lectura abiertos extensos aunque la secuencia presenta motivos de ARNasaH y de transcriptasa reversa (RT), indicando que el mismo podría tratarse de un pseudogen derivado de una secuencia progenitora que contenía uno o más marcos de lectura abiertos. La identificación de ESTs de *T. cruzi* que presentan homologías altamente significativas con VIPER indica que ciertas copias del mismo se expresan al menos en epimastigotes. A partir de estos ESTs se reconstruyó un posible ORF de VIPER, que codifica para una proteína de 487 residuos. Aun queda por determinar si esta proteína puede funcionar efectivamente como una transcriptasa reversa, ya que el motivo [YF]-X-D-D, característico del sitio activo de esta familia de proteínas, se encuentra reemplazado por el motivo WIDN que se encuentra muy conservado en distintas secuencias de VIPER de la base de datos GSS del GenBank [Xiong Y, et al 1990]. Es interesante notar, sin embargo, que en ambos casos el primer residuo de este motivo es un aminoácido aromático y el cuarto corresponde a un glutámico para las RT clásicas, mientras que en VIPER es una glutamina, un derivado aminado del glutámico.

La asociación del elemento VIPER a la secuencia repetida SIRE llevó a plantearse si ambas secuencias se hallaban evolutivamente relacionadas. En otras palabras: ¿Es VIPER el resultado de la inserción de un retroelemento dentro de la secuencia SIRE, o la secuencia SIRE deriva de un elemento repetido de mayor tamaño que le dio origen por escisiones sucesivas?

Resultados obtenidos por comparación de secuencias en la base de datos GSS del GenBank, permitió determinar cual de estas dos hipótesis puede ser la correcta. La traducción de secuencias genómicas de *T. brucei* permitieron detectar secuencias con homología muy significativa con la proteína codificada por el ORF reconstruido de VIPER ($E=1 \times 10^{-20}$, Fig 3.18, pag 87). Esta homología se pierde en la región en que el ORF de VIPER se introduce dentro de la secuencia 3' de SIRE.

Este resultado podría sugerir que, un ancestro de VIPER presente en el antepasado común a ambos tripanosomas, podría haberse integrado dentro de SIRE, como parte del proceso de especiación que llevo a la constitución de *T. cruzi* como tal.

Tanto en VIPER como en el posible retroelemento de *T. brucei* se conserva el motivo WIDN así como varios de los dominios de ARNasaH, incluyendo la distancia entre RT y ARNasaH, distancia muy variable en otras RT (Fig 3.18, pag 87)[Xiong Y, et al 1990].

8.6 Sintenia en *T. cruzi*, *T. brucei* y *L. major*

Una de las ventajas de la secuenciación a gran escala de los proyectos genoma, es que permiten realizar estudios evolutivos comparando las secuencias de los genomas provenientes de distintos organismos.

Analizando las secuencias enviadas a las bases de datos, se pudo identificar una secuencia genómica correspondiente al cromosoma 10 de *T. brucei* homóloga al locus SZ5 de *T. cruzi*. Esta región posee 3 genes homólogos a los genes TcRH1, TcNU1 y TcEIF6, dispuestos en la misma orientación, conservando la organización genómica del locus. Como era de esperar, las regiones intergénicas son las que presentan mayor variabilidad. En particular esta se debe a inserciones y escisiones. Con respecto a los genes, el gen TcEIF6 es el más conservado, seguido por el gen TcNU1 y TcRH1 (Fig 3.16, pags 80-84).

En *T. cruzi* como en *T. brucei* se observó un mayor porcentaje de GC en las regiones codificantes (52% y 51% respectivamente) con respecto a las regiones intergénicas (41% y 45% respectivamente).

Al analizar una porción secuenciada del cromosoma III de *T. cruzi* de 123 kpb y compararla contra la base de datos, se observa que esta región se conserva en otros tripanosomátidos. En este caso, se encontró una región homóloga en el cromosoma 1 de *T. brucei* y otra en el cromosoma 12 de *L. major* (Fig 4.12, pag 100).

Las tres regiones presentan un muy alto grado de conservación, no sólo a nivel del orden relativo de los genes, sino también a nivel de la orientación de los mismos. El hecho que se conserve la organización genómica en dos unidades transcripcionales opuestas separadas por la región intergénica localizada entre los genes 3 y 4, sugiere que esta disposición se encontraba en el ancestro común de los tres parásitos (Fig 4.12, pag 100). Sin embargo, el grado de conservación parece ser mayor entre *T. cruzi* y *T. brucei*, aunque no puede descartarse que este efecto se deba, en parte, a una baja calidad de la secuencia de *L. major*, la cual todavía se considera preliminar.

La región que presenta mayor variabilidad es la comprendida entre los genes 3-4 y 4-5. Esta región se caracteriza por un bajo contenido de GC, sugiriendo que podría tratarse de un origen de replicación o de una región promotora donde comenzaría la transcripción de las dos unidades transcripcionales en sentidos opuestos. Además, en el caso de *T. cruzi* y *T. brucei*, esta región parece presentar una tendencia a acumular secuencias repetidas. En *T. cruzi* se encuentra VIPER y una secuencia similar a INGI mientras que en *T. brucei* hay insertados dos retroelementos INGI. No queda claro cual es el papel que dichos elementos pueden estar jugando en esta región tan particular del cromosoma.

El análisis de la distribución de nucleótidos mostró un patrón de distribución similar entre *T. cruzi* y *T. brucei*, mientras que en *L. major* se observó una tendencia diferente.

En tripanosomas se observa una correlación positiva entre la dirección de transcripción y las relaciones *GC skew* y *EP*, semejante a lo observado en la mayoría de los genomas bacterianos [Freeman J, 1998]. Se ha propuesto, que esta distribución desigual de nucleótidos se debe a la asimetría de la replicación del ADN, causando que las cadenas líder y rezagada acumulen mutaciones diferencialmente [Grigoriev A, 1998].

Por otro lado, Francino y Ochman, sugieren que la distribución asimétrica de nucleótidos se debe a un efecto transcripcional. Los sistemas de reparación acoplados a la transcripción, removerían las mutaciones más frecuentes (citosinas deaminadas y dímeros de timidinas) en la hebra molde, la cual tendería a acumular pirimidinas [Francino M, 1997]. Además, la cadena molde, esta protegida significativamente contra daños en el ADN durante la transcripción, mientras que la hebra codificante permanece expuesta como simple cadena (la forma del ADN más vulnerable a las mutaciones). En este tipo de modelo, la selección evolutiva debería incrementar el contenido de purinas, menos sensibles a mutaciones, en la hebra codificante, explicando así también las correlaciones observadas en *T. cruzi* y *T. brucei* [Freeman J, 1998].

En *L. major* se vio una correlación negativa entre la dirección de transcripción y el *EP*, el *GC skew* y el *AT skew*. Un estudio realizado en el cromosoma 1 de *L. major* arroja los mismos resultados que la distribución observada en el cromosoma 12 [McDonagh P, 2000]. McDonagh y Stuart tratan de explicar esta distribución inusual de nucleótidos proponiendo un modelo en el cual las dos hebras del cromosoma se transcriben en toda su extensión. Así, la acumulación de pirimidinas asociada a la transcripción ocurriría en ambas cadenas, dado que ambas son usadas como molde durante la transcripción. Esto causaría una compensación en la acumulación de pirimidinas en ambas hebras y conduciría a una acumulación de purinas en la hebra rezagada durante la replicación, como resultado del proceso de mutación asociado a la replicación. Este modelo predice que el origen de replicación estaría localizado en la región de

máximo *GC skew* y no en el mínimo como ocurre en bacterias. Sin embargo, no se pueden descartar otras explicaciones sobre esta distribución inusual de nucleótidos, como por ejemplo la utilización de procesos inusuales de reparación de ADN. Es más, ensayos de “*nuclear run-on*” realizados sobre los cromosomas 1 y 3 de *L. major* permitieron determinar que los niveles de transcripción no son iguales para ambas hebras. Estos estudios demostraron que la hebra molde es transcripta con mayor intensidad que la hebra complementaria (es decir, la cadena codificante [Martínez-Calvillo S, 2001]).

Sin embargo, a diferencia del cromosoma 1 de *L. major*, las regiones codificantes del fragmento del cromosoma 12 mostraron una tendencia opuesta a la observada en el análisis global de este cromosoma, presentando la misma distribución que las secuencias codificantes de *T. cruzi* y de *T. brucei*. Sin embargo, cuando se analizó la distribución de bases en función de la posición del codón, se observó que en la tercera posición (sometida a una menor presión de selección) el *GC skew* es mucho menor en *Leishmania* que en los tripanosomas, manteniendo el *GC skew* observado en las regiones intergénicas.

Considerando que la distribución de nucleótidos en *T. cruzi* y *T. brucei* es semejante y que esta distribución también se conserva en *L. major*, por lo menos en sus regiones codificantes, parecería factible que el ancestro común a los tres kinetoplástidos presentara una distribución asimétrica similar a la de *T. cruzi* y *T. brucei*. Luego, cuando *L. major* se separó evolutivamente de las líneas que conducirían a *T. cruzi* y *T. brucei*, cambios en los procesos que causan la distribución de nucleótidos en *Leishmania* produjeron una disminución gradual en los contenidos de purinas de las cadenas de ADN de las hebras codificantes, invirtiendo el *GC skew* y el *EP* globales. Es de esperar que la acumulación asimétrica de purinas/pirimidinas ocurra más lentamente en las regiones codificantes, porque están sometidas a una mayor presión de selección que las regiones intergénicas. Esto explicaría porque las regiones codificantes de *L. major*

presentan una distribución de nucleótidos semejante a la de tripanosomas y también porqué la tercera posición del codón presenta un *GC skew* mucho menor al observado en *T. cruzi* y *T. brucei*, tendiendo a un *GC skew* negativo, como se observa en las regiones intergénicas.

Finalmente, al estudiar la primera posición de los codones, para los tres parásitos estudiados se observa una tendencia a la acumulación de purinas en la hebra codificante. Esto determina que el *EP* de esta posición presente una excelente correlación positiva con la dirección de transcripción.

En conclusión, el *locus* SZ5, así como otros ejemplos anteriormente descriptos, tales como el *locus* del gen del transportador de glucosa TcrHT1 [Bringaud F, 1998], son ejemplos claros de la existencia de sintenia entre kinetoplastidos. Sin embargo, los casos analizados hasta el momento abarcan unas pocas kilopares de bases involucrando una única unidad transcripcional.

8.7 Construcción y caracterización de la biblioteca YAC de *T. cruzi*

Utilizando el vector pYAC4 se construyó una biblioteca genómica de la cepa CL Brener de *T. cruzi*. La misma posee un tamaño promedio de inserto de 365 kpb implicando, aproximadamente, 10 equivalentes genómicos. Mediante la utilización de diferentes sondas se ha podido determinar que la biblioteca es representativa.

También se ha demostrado que grandes fragmentos de ADN de *T. cruzi* clonados en vectores YAC son estables y no sufren alteraciones por lo menos durante 100 repiques.

Como parte del estudio de la representatividad de esta biblioteca genómica, también se han podido aislar dos clones YAC positivos para el gen TcP0 de *T. cruzi* (marcador específico de los cromosomas XIX y XX), siete YACs positivos para JL7-H49 y cuatro para JL8 (específicos para las bandas cromosómicas XVI y XVII).

8.8 Sub-biblioteca cromosoma-específica

Para facilitar y acelerar la construcción de los mapas físicos de las bandas cromosómicas XIX y XX, se decidió generar sub-bibliotecas YAC específicas para ambos cromosomas. Para ello fue necesario poner a punto la electroforesis preparativa de cromosomas de *T. cruzi* para aislar las bandas cromosómicas de interés. Una vez purificadas, se analizó el grado de pureza de las mismas por amplificación de diferentes marcadores por PCR. Utilizado este material como sonda, se pudo generar una sub-biblioteca enriquecida en clones específicos del cromosoma XX constituida por 64 clones YAC a partir de la cual, mediante un rastreo con una sonda específica del gen TcP0 se pudo aislar 4 YACs TcP0 positivos.

La misma estrategia fue utilizada para generar marcadores EST específicos del cromosoma XIX, por rastreo de una biblioteca de ADNc. Este método tiene la ventaja adicional que la secuenciación de estos marcadores posibilita el descubrimiento de nuevos genes. Mediante esta técnica se aislaron 3 clones positivos para la banda cromosómica XIX, que también hibridaron con otras bandas cromosomales (datos no mostrados).

A pesar del gran número de secuencias repetidas que se encuentran presentes en el genoma de *T. cruzi*, que podrían interferir en la utilización de cromosomas como sondas, las experiencias llevadas a cabo con la biblioteca YAC demuestran que es factible su utilización en la construcción de bibliotecas enriquecidas en la banda cromosómica de interés. Sin embargo, en el caso de las bibliotecas de ADNc esta técnica no resultó tan efectiva. Una posible explicación de los resultados obtenidos es que en el caso de los clones YAC, cada uno de los insertos representa una porción importante de la banda cromosómica, dentro de las cuales pueden encontrarse un gran número de secuencias de una o pocas copias. Como las sondas generadas por marcación al azar de la banda cromosómica de interés, representan en forma proporcional el número de copias de cada secuencia dentro del cromosoma, es de esperar que un gran fragmento de ADN rico en secuencias poco repetidas y proveniente de la banda

cromosómica de interés, hibridará (por sumatoria de secuencias únicas) con una intensidad igual o mayor que un fragmento de ADN no relacionado con el cromosoma (el cual posee una o algunas copias de una secuencia repetida).

En el caso de las bibliotecas de ADNc, cada uno de los clones proviene de un único gen que por lo general es poco repetido a excepción de algunos que llevan consigo un fragmento de una secuencia repetida. De esta manera, los primeros hibridarán con una muy baja señal mientras que los segundos darán una señal mucho más alta por compartir una secuencia repetida con el cromosoma de interés. Por lo tanto, en este último caso, es de esperarse un mayor número de clones falsos positivos que en el caso de los YAC.

8.9 Construcción de YACs mediante la técnica de clonado RAT.

Como SIRE es una secuencia muy repetida que se encuentra dispersa en el genoma de *T. cruzi* SIRE llevó a postular su utilización en la construcción de vectores YAC mediante la técnica de clonado por recombinación asociada a la transformación.

Por lo tanto, se construyeron 3 vectores diferentes con uno de los cuales se obtuvieron dos fragmentos clonados de ~500 kpb. Sin embargo, los estudios realizados hasta el momento no permiten afirmar si dichas secuencias provienen de *T. cruzi*.

8.10 Fragmentación cromosómica

Junto con el incremento de los marcadores específicos de cromosoma, se comenzó con el desarrollo de un vector de fragmentación que permita determinar la distancia de un determinado marcador al telómero por observación de las alteraciones en el cariotipo electroforético de los parásitos transfectados.

En los primeros intentos de fragmentación con los vectores pLFGAP, pLFSIRE y pH64, no se obtuvieron clones resistentes a G418 que tuvieran

alterado su cariotipo, sino que conservaban el vector transfectado en forma de episoma de alto peso molecular. Las tres construcciones transfectadas permitieron descartar que la ausencia de recombinación se deba a una secuencia blanco o a una secuencia telomérica demasiado cortas. Es posible, que a pesar que la secuencia telomérica de *Tetrahymena sp* es funcional en levaduras, no lo sea en *Trypanosoma cruzi*.

En base a lo expuesto anteriormente, se construyó el vector de fragmentación pLF2, que contiene secuencias teloméricas de *T. cruzi*. Los resultados obtenidos con este vector, sugieren que la carencia de recombinación cromosoma-específica se debía a que la secuencia telomérica de *Tetrahymena sp* no era funcional.

Aunque no se tienen evidencias concluyentes de que el vector pLF2 haya producido una fragmentación en vez de una integración, hay ciertos indicios en favor de la primera hipótesis:

1-En el análisis de Southern blot a partir de ADN genómico digerido con *BamHI*, sólo aparece una banda adicional (Fig 5.7, pag 120). Esto indicaría que el vector pLF2 podría haber fragmentado debido a que, como posee un sitio *BamHI* interno, una integración debería dar como resultado la aparición de una segunda copia del gen TcP2 β separada de la primera por dicho sitio de restricción. De esta manera, se esperaría un patrón compuesto por tres bandas (Fig 5.8, pag 121).

2- Southern blots a partir de ADN genómico total digerido con *BamHI* o *KpnI* e hibridados con una sonda específica de la región 3' del locus H6.4, no contenida en el vector, no muestran diferencias entre los clones salvajes y los clones transfectados (Fig 5.7, pag 120).

El resultado obtenido indicaría que el gen TcP2 β del locus H6.4 estaría cerca del telómero. Esta posición es crucial para explicar el fenómeno de expansión del número de copias observado en este gen, mediado probablemente por un mecanismo asociado al elemento SIRE [Vázquez M, 1994]. Así podría explicarse la aparición de varias copias de este mismo gen rodeadas o asociadas a SIRE en otros entornos genómicos.

8.11 Desarrollo del cromosoma artificial

La evidencia de que la secuencia telomérica de *T. cruzi* esta jugando algún papel importante en cuanto a la estabilidad del vector transfectado, se vio reflejada también en el desarrollo del cromosoma artificial de *T. cruzi*. El primer vector construido, pTNT1, contenía en sus extremos la secuencia telomérica de *Tetrahymena sp* y como resultado de las transfecciones sólo se obtuvieron episomas de alto peso molecular. En cambio, cuando las secuencias de *Tetrahymena sp* fueron reemplazadas por una secuencia telomérica y subtelomérica de *T. cruzi*, se obtuvieron vectores que presentaban un patrón de migración en FIGE completamente diferente y compatible con la migración de una banda cromosómica artificial lineal. En este caso, el vector pTNT2 transfectado era sensible al tratamiento con exonucleasa Bal31, indicando que no se encuentra en forma circular. La naturaleza lineal del vector fue posteriormente confirmada al observar el patrón de migración del vector comparado con el de un marcador lineal (Fig 6.11, pag 129).

Los clones seleccionados contenían moléculas del vector original con un tamaño que variaba entre 35 kpb a 100 kpb. La naturaleza de las secuencias responsables del incremento en el tamaño de los cromosomas artificiales se desconoce. Si este aumento en el tamaño se debiera a una amplificación de la secuencia del vector en forma de tándem, la intensidad de las bandas durante la hibridación del FIGE de la figura 4.6 con la sonda específica del gen de *Neo*, deberían ser directamente proporcionales al incremento en el tamaño del vector. Es decir, la calle correspondiente al clon A5 que posee un vector de alrededor de 100 kpb debería hibridar con una intensidad aproximadamente tres veces mayor que el clon D7, cuyo vector tiene cerca de 35 kpb. La cuantificación de las intensidades de hibridación del FIGE permite, inicialmente, descartar esta hipótesis.

Otra posible explicación del incremento en los tamaños del vector podría ser la incorporación de secuencias genómicas del parásito. Esto ya ha sido

informado para *T. brucei*, el cual al ser transfectado con un vector lineal que funciona como un cromosoma artificial, agrega secuencias al vector, incrementando así su tamaño [Gwo-Shu Lee I, 1995; Patnaik P, 1996].

Southern blots a partir del ADN genómico de cada clon, indicaron que los CrAT de los clones A5, B2 y D7 contenían la misma estructura básica: tres copias del vector original dispuestas en tándem, separadas una de otra por la secuencia espaciadora orientada en ambas direcciones. Esto último sugiere que el espaciador fue incorporado al vector post-transfección y no es un artefacto producido por una digestión parcial con *HindIII* durante la linearización de pTNT2 (Fig 6.9, pag 127).

También se ha demostrado que el cromosoma artificial se mantiene en forma estable por más de 60 generaciones en ausencia de selección, no observándose variaciones en el número de copias por célula aunque sí se detectaron rearrreglos tanto en ausencia como en presencia de 300 µg/ml de G418 (Fig 6.12 y 6.13, pags 130 y 131 y Tabla 6.1, pag 130).

Todavía no está claro por qué el vector incrementa su tamaño, aunque se especula que las moléculas de ADN en tripanosomas deben tener un tamaño mínimo para poder replicarse y expresarse [Patnaik P, 1997]. Esto se ve reflejado en el aumento de tamaño observado tanto en los episomas como en los vectores que permanecen como elementos extracromosómicos lineales. Una posible explicación, puede ser la ausencia en estos vectores, de orígenes de replicación específicos de *T. cruzi*. Por lo tanto, la multimerización puede ser la consecuencia de la existencia de orígenes de replicación débiles. Como la iniciación de la replicación es considerada generalmente como un factor limitante durante la división celular, los vectores multiméricos pueden mantenerse (replicando al menos una vez por cada ciclo celular) incrementando el número de sitios a partir de los cuales puede comenzar la transcripción [Patnaik P, 1997].

El análisis de un fragmento de ADN proveniente del CrAT B2 confirmó que el vector pTNT2 incorpora secuencias de ADN de *T. cruzi* cuando es transfectado en forma lineal (Fig 6.14, pag 132). Parece probable que estas

secuencias ayuden al incremento del tamaño total del CrAT en lugar de jugar un papel como orígenes de replicación, ya que los episomas circulares, formados por repeticiones en tándem del vector original, no necesitan incorporar secuencias de *T. cruzi* para mantenerse en forma estable.

Este trabajo permitió avanzar en la concepción de un cromosoma artificial de *T. cruzi* que pudiera incorporar grandes fragmentos genómicos, propios o de otras especies, apto para estudios funcionales. Los primeros pasos en esta dirección son satisfactorios y muestran la factibilidad de expresar genes heterólogos en este vector produciendo cambios en el fenotipo de *T. cruzi* (Fig 6.17, pag 135). Esto sienta las bases para intentar el clonado de grandes fragmentos de ADN genómico nuclear de especies emparentadas. El próximo paso, continuación directa de este trabajo de tesis, llevará al clonado de grandes fragmentos genómicos de *Chritidia sp*, intentando obtener cromosomas lineales estables de gran tamaño, que confieran a *T. cruzi* la capacidad de crecer en un medio sin poliaminas.

8.12 Análisis del promotor ribosomal

Para utilizar el cromosoma artificial para sobre-expresar proteínas, se estudió la factibilidad de incorporarle un promotor ribosomal. Hasta ahora, vectores de expresión que poseen este tipo de promotores como pTREX y pRIBOTEX, se integran en el *locus* ribosomal en vez de mantenerse en forma episomal. Plásmidos de replicación autónoma en *T. brucei* que contienen el promotor del gen PARP, específico de ARN polimerasa I, son incapaces de replicar como episoma cuando este promotor es reemplazado por el promotor ribosomal [Patnaik P, 1994]. Es más, al igual que en *T. cruzi*, los plásmidos que poseen el promotor ribosomal se integran en el genoma sin existir un análisis sobre como se realiza y a que sitios apunta la integración. El fin de este estudio fue determinar si era posible disociar la actividad recombinogénica de la

actividad promotora para luego incorporar el promotor ribosomal al cromosoma artificial.

Aunque inicialmente fue sugerido que la recombinación del vector pRIBOTEX en el *locus* ribosomal podría deberse a la presencia de las repeticiones ribosomales localizada 90 pb río arriba del *tsp1* [Martínez-Calvillo S, 1997], las transfecciones realizadas con pDK demostraron que la presencia de esta repetición no es esencial para que ocurra la integración. Es más, por recuperación del vector integrado y posterior secuenciación se pudo determinar que la recombinación ocurre dentro de una región de 101 pb de longitud localizada 100 pb río abajo del *tsp1*.

Un fenómeno similar fue descrito en levaduras donde la secuencia recombinogénica HOT1, compuesta por el promotor ribosomal y una región que actúa como enhancer localizada río arriba, promueve la recombinación de la secuencia posicionada río abajo. Para que ello ocurra, se requiere que ambas secuencias (blanco y recombinante) sean transcritas por la ARN polimerasa I [Voelkel-Meiman K, 1987]. De la misma manera, en *T. cruzi*, la región MP que rodea al sitio de inicio de transcripción *tsp1* estimula la recombinación homóloga de la secuencia localizada río abajo (Fig 7.2, pag 137 y Fig 7.8, pag 142). Es más, la integración podría depender también de que las secuencias involucradas sean transcritas por la ARN polimerasa I. Evidencia de esto es el hecho que los vectores utilizados no recombinan por las secuencias HX1 o GAPDH, sino que lo hacen por las regiones homólogas al *locus* ribosomal.

También se ha determinado que el proceso de recombinación comienza inmediatamente después de la transfección. Análisis por PCR permitió identificar copias integradas de pDK en el *locus* ribosomal a las 5 horas post-transfección (Fig 7.13, pag 146). Southern blots a partir de ADN genómico total de parásitos transfectados con pDK, indican que los plásmidos no integrados son rápidamente degradados, mostrando un patrón de degradación en escalera con un espaciamiento de

aproximadamente 230 pb, lo que sugiere una posible interacción temprana del ADN plasmídico con histonas [Lúcio H, 1999].

Como la recombinación comienza al menos 5 hs post-transfección y 48 hs después la mayoría del vector introducido se ha degradado, es probable que un componente importante de la actividad CAT medida en ensayos transitorios se deba a las transcripción de las copias integradas en el *locus* ribosomal (transfecciones con pPwt, pDK, pRMP, pMP, pRMPDS, pMPDS y pMPCATDS). Así, la caída del 70% en la actividad CAT medida en ensayos transitorios con pRMP y pR5MP podría ser el reflejo de una disminución en la eficiencia de recombinación. Esto se vería apoyado por: (1) en líneas celulares transfectadas establemente, pDK y pRMP presentan niveles semejantes de expresión CAT y (2) cuando se transfecta con el vector pRMPDS, que contiene inmediatamente río abajo del *tsp1* la región HRS por donde ocurre la integración de pRIBOTEX, se observan niveles altos de actividad CAT transitoria comparables a los que se obtienen con pDK [Fig 7.10, pag 144].

Sin embargo, dado que el vector pMP que carece tanto de la repetición ribosomal como de la secuencia HRS, presenta una actividad similar a la observada para pDK, la disminución en la actividad de los vectores pRMP y pR5MP parecería deberse a un efecto combinado de la presencia de la repetición ribosomal y la ausencia de la región HRS.

Se ha descrito que las repeticiones ribosomales localizadas 5' al *tsp* pueden llegar a funcionar como secuencias terminadoras de la transcripción para la ARN pol I en eucariotas superiores [Jansa P, 2001]. De esta manera la presencia de una o varias copias de la repetición ribosomal podrían afectar la transcripción a lo largo del vector circular impidiendo la expresión continua del gen CAT partir de un único complejo de iniciación de la transcripción. Este efecto ha sido descrito en *T. brucei* utilizando vectores circulares de expresión que utilizan la ARN polimerasa del bacteriófago T7 [Wirtz E, 1994]. Esta polimerasa transcribe en forma continua a lo largo del vector transcribiendo más de una vez cada gen

antes de separarse del templado. Cuando a este tipo de vectores se le agrega una secuencia terminadora específica de la ARN polimerasa T7, la actividad del gen reportero cae un 70% con respecto al control sin terminador, similar a la caída observada en pRMP y pR5MP.

Si la repetición ribosomal juega un papel como secuencia terminadora, la región HRS podría facilitar la recombinación de los vectores al *locus* ribosomal enmascarando el efecto causado por la repetición en el vector episomal. Alternativamente, esta región podría estar inhibiendo de alguna manera el efecto causado por la repetición ribosomal.

8.13 La región MP de 98 pb que contiene el *tsp1* es suficiente para obtener completa actividad del promotor ribosomal en las cepas del grupo I y II de *T. cruzi*

Por escisiones sucesivas de la secuencia de 800 pb de longitud que contenía al promotor ribosomal del grupo II de *T. cruzi* se identificó una región comprendida entre las posiciones -86 a +12 con respecto al *tsp1* (región MP) que es suficiente para obtener el 100% de actividad promotora. También se pudo determinar que el posible *tsp2*, localizado 600 pb río abajo del *tsp1*, no es funcional al menos en la cepa Tulahuén II del grupo II de *T. cruzi*. La región MP también es activa cuando la construcción pMP fue transfectada en epimastigotes del clon CL Brener perteneciente al grupo I (datos no mostrados). Esto concuerda con resultados recientes que localizan al *tsp* del promotor ribosomal de la cepa CL Brener en la posición -2 con respecto al *tsp* análogo de los promotores ribosomales del grupo II [Wen L, 2001].

Es interesante subrayar que la región MP de tan solo 98 pb, es suficiente para promover la integración en el *locus* ribosomal, indicando que este proceso es muy eficiente. Sin embargo, plásmidos integrados recuperados por digestión y transformación en bacterias, junto con estudios de Southern blot sugieren que el vector pMP recombina en el *locus* ribosomal pero no de la misma forma que lo hace pPwt. Por el contrario, parece que

el plásmido que contiene pMP sufre algún tipo de rearrreglo, antes o durante la integración, transformando la estructura original del vector. La causa de este comportamiento podría deberse al hecho que la única región homóloga al *locus* ribosomal que posee el vector pMP (la región MP) estaría involucrada tanto en la recombinación como en la transcripción.

CONCLUSIONES



CONCLUSIONES

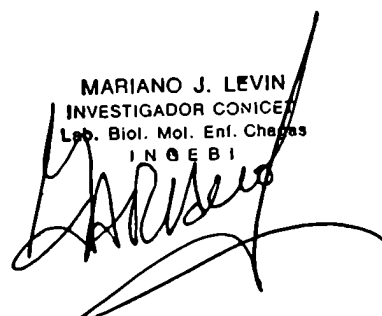
En base a los resultados obtenidos durante la realización de esta tesis se obtuvieron las siguientes conclusiones:

- 1- SIRE se encuentra ligado a un nuevo elemento repetido denominado TcREL en los fragmentos genómicos SZ10, SZ12 y SZ31, que constituyen el extremo 3' de distintas copias del gen vp85. TcREL está insertado también en la región 3' no codificante del gen FL-160.
- 2- En el fragmento SZ5, SIRE se encuentra asociado a tres genes que codifican para una posible ARN helicasa DEAH-box, una proteína que podría estar involucrada en la formación o estabilidad de grupos [Fe-S] y un probable factor de traducción. La organización genómica de este *locus* se conserva también en el cromosoma 1 de *T. brucei*.
- 3- SIRE forma parte de un nuevo tipo de elemento repetido denominado VIPER, el cual parece haberse originado por la inserción de un retroelemento dentro de la secuencia SIRE. Este retroelemento también se encuentra en *T. brucei*. En VIPER, el motivo WIDN se encuentra muy conservado tanto en *T. cruzi* como en *T. brucei*. La localización y composición de este dominio sugieren que podría ser el equivalente al dominio [YF]-X-D-D que caracteriza a las RT clásicas.
- 4- La biblioteca genómica YAC construida durante el transcurso de esta tesis, es representativa del genoma de *T. cruzi*. Estos YACs son estables y no contienen quimeras.
- 5- A partir de la biblioteca YAC y de los marcadores generados durante el proyecto, se construyó un mapa físico del cromosoma XVI del clon CL Brener de *T. cruzi* que comprende una región de ~800 kpb.
- 6- Se construyeron tres vectores YAC para clonar fragmentos grandes de ADN genómico por la técnica de clonado por RAT. Su utilización permitió obtener dos YACs con fragmentos de ADN de ~600 kpb y ~500 kpb aunque aun no se pudo determinar si efectivamente provienen de *T. cruzi*.
- 7- Se construyó una molécula de ADN lineal que se mantiene en forma estable en *T. cruzi* comportándose como un cromosoma artificial. Una vez transfectado, el vector aumenta su tamaño incorporando secuencias del genoma de *T. cruzi*.
- 8- La región MP de 98 pb, que se encuentra comprendida entre las posiciones -86 a +12 con respecto al *tsp1*, es suficiente para obtener completa actividad del promotor ribosomal en las cepas Tulahuén II (grupo II) y CL Brener (grupo I) de *T. cruzi*.

9- El promotor ribosomal presenta un mecanismo de recombinación homóloga que es muy específico y eficiente. Este mecanismo es independiente de la presencia de las repeticiones ribosomales pero sí depende de la región MP que incluye al *tsp1*.

10- La organización genómica de una región de 129 kpb del cromosoma III de *T. cruzi* se conserva en el cromosoma 1 de *T. brucei* y en el cromosoma 12 de *L. major*. Esta región es un ejemplo de la existencia de sintenia inter-especie e inter-género en estos parásitos. El cambio en el signo de los estadísticos *EP*, *GC skew* y *AT skew* en la zona que separa las dos unidades transcripcionales de esta región, sugiere que allí puede encontrarse un posible origen de replicación y/o un origen de transcripción de las dos unidades transcripcionales.


Hernán Lorenzi

MARIANO J. LEVIN
INVESTIGADOR CONICET
Lab. Biol. Mol. Enf. Chagas
IN OEBI


BIBLIOGRAFIA



BIBLIOGRAFIA

Agar JN, Yuvaniyama P, Jack RF, Cash VL, Smith AD, Dean DR, Johnson MK. **Modular organization and identification of a mononuclear iron-binding site within the NifU protein.** *J Biol Inorg Chem.* 5:167-177.2000.

Agüero F, Verdún R, Frasch A, Sánchez D. **A random sequencing approach for the analysis of *Trypanosoma cruzi* genome: General structure, large gene and repetitive DNA families and Gene discovery.** *Genome Res.*10:1996-2005.2000.

Ajioka J, Boothroyd J, Brunk B, Hehl A, Hillier L, Manger I, Marra M, Overton G, Roos D, Wan K. **Gene discovery by EST sequencing in *Toxoplasma gondii* reveals sequences restricted to the Apicomplexa.** *Genome Res.*8:18-28.1998.

Andersson B, Åslund L, Tammi M, Tran A, Hoheisel J, Petterson U. **Complete Sequence of a 93.4-kb contig from chromosome 3 of *Trypanosoma cruzi* containing a strand switch region.** *Genome Res.*8:809-816.1998.

Andrade SG. ***Trypanosoma cruzi*: clonal structure of parasite strains and the importance of principal clones.** *Mem Inst Oswaldo Cruz.*94:185-187.1999.

Andrade, L.O.; Machado, C.; Chiari, E.; Pena, S.; Macedo, A. **Differential tissue distribution of diverse clones of *Trypanosoma cruzi* in infected mice.** *Mol Biochem Parasitol.*100: 163-172. 1999

Andrade, S.G. **Influence of the *Trypanosoma cruzi* strain on the pathogenesis of chronic myocardiopathy in mice.** *Mem Inst Oswaldo Cruz* 85: 17-25. 1990.

Andrade, S.G. **Morphological and behavioral characterization of *Trypanosoma cruzi* strains.** *Rev Soc Bras Med Trop* 18:39-46. 1985

Andrade, V.; Brodskyn, C.; Andrade, S.G. **Correlation between isoenzyme patterns and biological behaviour of different strains of *Trypanosoma cruzi*.***Trans R Soc Trop Med Hyg* 76: 796-799. 1983

Belli SI. **Chromatin remodeling during the life cycle of trypanosomatids.** *Int Journal for Parasitol.* 30:679-687.2000.

Birren B, Lai E. **Pulsed field gel electrophoresis: a practical guide. Capítulo 10.2: Pulsed field separation of circular DNAs.** *Academic Press INC.*155-157.1993.

Brandariz S, Ferrari Y, Saumier M, Perrot V, Lorenzi H, Vazquez M, da Silveira JF, Cano Y, Zingales B, Gruber A, Degrafe W, Rondineli E, Gonzales A, Cortes A, Alonso C, Requena JM, Ramirez JL, Aldao RR, Cohen D, Le Paslier D, Levin MJ. **The *Trypanosoma cruzi* Genome Project: Genome Sequence Sampling (GSS) strategy for high resolution physical mapping.** *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.*90:20-21.1995.

Brener, Z.; Wendel, S. (Edt.); Brener, Z. (Edt.); Camargo, M.E. (Edt.); Rassi, A. (Edt.). En: **Chagas Disease - American Trypanosomiasis: its impact on transfusion and clinical medicine.** *ISBT Brasil, Sao Paulo, Brasil.* 1992.

Bringaud F, Vedrenne C , Cuvillier A , Parzy D, Baltz D, Tetaud E , Pays E , Venegas J,

Bringaud F, Vedrenne C, Cuvillier A, Parzy D, Baltz D, Tetaud E, Pays E, Venegas J, Merlin G, Baltz T. **Conserved organization of genes in trypanosomatids.** *Mol Biochem Parasitol*.94:249-64.1998.

Brisse S, Barnabé C, Tibayrenc M. **Trypanosoma cruzi: how many relevant phylogenetic subdivisions are there?** 14:178-179.1998.

Cano MI, Gruber A, Vazquez M, Cortes A, Levin MJ, Gonzalez A, Degraeve W, Rondinelli E, Zingales B, Ramirez JL, *et al.* **Molecular karyotype of clon CL Brener chosen for the Trypanosoma cruzi genome project.** *Mol Biochem Parasitol*.71:273-278.1995.

Carlos M Morel. **Chagas Disease, from Discovery to Control - and Beyond: History, Myths and Lessons to Take Home.** *Mem Inst Oswaldo Cruz*.94:3-16, 1999.

Chiurillo MA, Cano I, da Silveira JF, Ramirez JL. **Organization of the telomeric and sub-telomeric regions of chromosomes from the protozoan parasite Trypanosoma cruzi.** *Mol Biochem Parasitol*.100:173-183.1999.

Clayton C, Ha S, Rusché L, Hartmann C, Beverly S. **Tests of heterologous promoters and intergenic regions in Leishmania major.** *Mol Biochem Parasitol*.105:163-167.2000.

Clayton CE. **Genetic manipulation of kinetoplastida.** *Parasitol Today*.15:372-378.1999.

Company M, Arenas J, Abelson J. **Requirement of the RNA helicase-like protein PRP22 for the release of messenger RNA from spliceosomes.** *Nature*.249:487-493.1991.

Cooper R, de Jesus AR, Cross GA. **Deletion of an immunodominant Trypanosoma cruzi surface glycoprotein disrupts flagellum-cell adhesion.** *Journal Cel Biol*.122:149-156.1993.

Dietrich P, Soares MB, Affonso MH, Floeter-Winter LM. **The Trypanosoma cruzi ribosomal RNA-encoding gene: analysis of promoter and upstream intergenic spacer sequences.** *Gene*.125:103-107.1993.

Donelson J, Gardner M, El-Sayed N. **More surprises from kinetoplastida.** *Proc Natl Acad Sci USA*.96:2579-2581.1999.

Doolittle R, Feng D, Johnson M, McClure M. **Origins and evolutionary relationship of retroviruses.** *Q Rev Biol*.64:1-30.1989.

Ersfeld K, Melville S, Gull K. **Nuclear and genome organization of Trypanosoma brucei.** *Parasitol Today*.15:58-63.1999.

Fernandes O, Mangia RH, Lisboa CV, Pinho AP, Morel CM, Zingales B, Campbell DA, Jansen AM. **The complexity of the sylvatic cycle of Trypanosoma cruzi in Rio de Janeiro state (Brazil) revealed by the non-transcribed spacer of the mini-exon gene.** *Parasitology*.118:161-166. 1999.

Fernandes O, Sturm NR, Derré R, Campbell DA. **The mini-exon gene: a genetic marker for zymodeme III of Trypanosoma cruzi.** *Mol Biochem Parasitol*.95:129-133.1998.

Ferrari I, Lorenzi H, Brandariz S, da Silveira JF, Requena JM, Schijman A, Vazquez M, Santos MR, Ben-Dov C, Medrano C, Kaplan D, Ghio S, Elías F, López Bergami P, Cano I,

- Zingales B, Urményi TP, Rondinelli E, Gonzalez A, Cortes A, Alonso C, Ramirez JL, Chiurillo MA, Rangel Aldao R, Brandao A, Degraive W, Perrot V, Saumier M, Billaut A, Cohen D, Le Paslier D, Levin MJ. **Towards the physical map of the *Trypanosoma cruzi* nuclear genome: construction of YAC and BAC libraries of the reference clone CL-Brener.** *Mem Inst Oswaldo Cruz*.92:843-852.1997.
- Floeter-Winter LM, Souto RP, Stolf BS, Zingales B, Buck GA. **Can activity of the rRNA gene promoter be used as a marker of speciation?** *Exp Parasitol*.86:232-234.1997.
- Francino MP, Ochman H. **Strand asymmetries in DNA evolution.** *Trends Genet*.13:240-245.1997.
- Freeman J, Plasterer T, Smith T, Mohr SC. **Technical Comment: Patterns of genome organization in bacteria.** *Science*.279:1827a.1998.
- Freitas-Junior L, Marques Porto R, Pirrit L, Schenkman S, Scherf A. **Identification of the telomere in *Trypanosoma cruzi* reveals highly heterogeneous telomere lengths in different parasite strains.** *Nucl Acids Res*. 27:2451-2456.1999.
- Gilinger G, Bellofatto V. **Trypanosome spliced leader RNA genes contain the first identified RNA polymerase II gene promoter in these organisms.** *Nucl Acids Res*.29:1556-1564.2001.
- Grigoriev A. **Analyzing genomes with cumulative skew diagrams.** *Nucl Acids Res*.26:2286-2290.1998.
- Gunzl A, Tschudi C, Nakaar V, Ullu E. **Accurate transcription of the *Trypanosoma brucei* U2 small nuclear RNA gene in a homologous extract.** *Journal Biol Chem*. 270:17287-291.1995.
- Gwo-Shu Lee I, Yaping E, Axelrod N. **Construction of trypanosome artificial mini-chromosomes.** *Nucl Acids Res*.23:4893-4899.1995.
- Häusler T, Clayton C. **Post-transcriptional control of hsp70 mRNA in *Trypanosoma brucei*.** *Mol Biochem Parasitol*.76:57-71.1996.
- Hay J, Jones M, Blakebrough M, Dasgupta I, Davies J, Hull R. **An analysis of the sequence of an infectious clone of rice tungro bacilliform virus, a plant pararetrovirus.** *Nucl Acids Res*.19:2615-2621.1991.
- Hay JM, Jones MC, Blakebrough ML, Dasgupta I, Davies JW, Hull R. **An analysis of the sequence of an infectious clone of rice tungro bacilliform virus, a plant pararetrovirus.** *Nucl Acids Res*.19:2615-2621.1991.
- Hecker H, Betschart B, Burri M, Schlimme W. **Functional morphology of trypanosome chromatin.** *Parasitol Today*.11:79-83.1995.
- Henriksson J, Åslund L, Pettersson U. **Karyotype variability in *Trypanosoma cruzi*.** *Parasitol Today*. 12:108-114.1996.
- Henriksson J, Pettersson U, Solari A. ***Trypanosoma cruzi*: correlation between karyotype variability and isoenzyme classification.** *Exp Parasitol*.77:334-48.1993.

- Huang GS, Keil RL. **Requirements for activity of the yeast mitotic recombination hotspot HOT1: RNA polymerase I and multiple cis-acting sequences.** *Genetics*. 141: 845-855. 1995.
- Huang J, Van der Ploeg LH. **Maturation of polycistronic pre-mRNA in *Trypanosoma brucei*: analysis of trans-splicing and poly(A) addition at nascent RNA transcript from the hsp70 locus.** *Mol Cell Biol*. 11:3180-3190. 1991.
- Hummel H, Gillespie D, Swindle J. **Mutational analysis of 3' splice site selection during trans-splicing.** *Journal Biol Chem*. 275:35522-35531. 2000.
- Hwang DM, Dempsey A, Tan KT, Liew CC. **A modular domain of NifU, a nitrogen fixation cluster protein, is highly conserved in evolution.** *Journal Mol Evol*. 43:536-540. 1996.
- Imamura O, Saiki K, Tani T, Ohshima Y, Sugawara M, Furuichi Y. **Cloning and characterization of a human DEAH-box RNA helicase, a functional homolog of fission yeast Cdc28/Prp8.** *Nucl Acids Res*. 26:2063-2068. 1998.
- Ivens A, Blackwell J. **The *Leishmania* genome comes of age.** *Parasitol Today*. 15:225-231. 1999.
- Jansa P, Burek C, Sander E, Grummt I. **The transcript release factor PTRF augments ribosomal Gene transcription by facilitating reinitiation of RNA polymerase I.** *Nucl Acids Res*. 29: 423-429. 2001.
- Kelly J, Ward H, Miles M, Kendall G. **A shuttle vector which facilitates the expression of transfected Genes in *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania*.** *Nucl Acids Res*. 20:3963-3969. 1992.
- Kendall G, Wilderspin A, Ashall F, Miles M, Kelly J. ***Trypanosoma cruzi* glycosomal glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase does not conform to the hotspot topogenic signal model.** *EMBO Journal*. 9:2751-2758. 1990.
- Kimmel B, ole-Moiyoi O, Young J. **Ingl, a 5.2-kb dispersed sequence element from *Trypanosoma brucei* that carries half of a smaller mobile element at either end and has homology with mammalian LINEs.** *Mol Cell Biol*. 7:1465-1475. 1987.
- Larionov V, Kouprina N, Graves J, Chen X, Korenberg J. **Specific cloning of human DNA as yeast artificial chromosomes by transformation-associated recombination.** *Proc Natl Acad Sci USA*. 93:491-496. 1996.
- Lauria-Pires, L.; Teixeira, A. **Virulence and pathogenicity associated with diversity of *Trypanosoma cruzi* stocks and clones derived from Chagas disease patients.** *Amer J Trop Med Hyg* 55:304-310. 1996
- LeBowitz JH, Dilmeç N. **Using Chromosome Fragmentation to Generate Partially Monosomic *Leishmania*.** *Molecular Parasitology Meeting IX*, Marine Biological Laboratory, Woods Hole, MA. USA. Sept. 13-17, 1998
- Lorenzi H, Vázquez M, Levin M. **The genes for a DEAH RNA helicase, a NifU like protein and the translation factor eIF6 constitute the SZ5 locus of *Trypanosoma cruzi*.** *Mol Biochem Parasitol*. 111:207-211. 2000.

- Lüking A, Stahl U, Schmidt U. **The protein family of RNA helicases.** *Crit Rev Biochem Mol Biol.* 33:259-296.1998.
- Luo H, Gilinger G, Mukherjee D, Bellofatto V. **Transcription initiation at the TATA-less spliced leader RNA gene promoter requires at least two DNA-binding proteins and a tripartite architecture that includes an initiator element.** *Journal Biol Chem.*274:31947-31954.1999.
- Mair G, Shi H, Li H, Djikeng A, Aviles HO, Bishop JR, Falcone FH, Gavrilescu C, Montgomery JL, Santori MI, Stern LS, Wang Z, Ullu E, Tschudi C. **A new twist in trypanosome RNA metabolism: cis-splicing of pre-mRNA.** *RNA.* 6:163-169.2000.
- Martín F, Marañón C, Olivares M, Alonso C, López M. **Characterization of a non-long terminal repeat retrotransposon cDNA (L1Tc) from *Trypanosoma cruzi*: homology of the first ORF with the ape family of DNA repair enzymes.** *Journal Mol Biol.*247:49-59.1995.
- Martínez-Calvillo S, Hernández R. ***Trypanosoma cruzi* ribosomal DNA: mapping of a putative distal promoter.** *Gene.*142:243-247.1994.
- Martínez-Calvillo S, López I, Hernández R. **pRIBOTEX expresión vector: pTEX derivative for a rapid selection of *Trypanosoma cruzi* transfectants.** *Gene.* 199:71-76.1997.
- Martínez-Calvillo S, Yan S, Nguyen D, Stuart K, Myler P. **Transcription on *Leishmania major* Friedlin chromosomes 1 and 3.** *Molecular Parasitology Meeting, Woods Hole, USA.* 265B.2001
- Mazza S, Montana A, Benitez C, Juzin E. **Transmisión de "*Schizotrypanum cruzi*" al niño por leche de la madre con enfermedad de Chagas.** *MEPRA* 28: 41-46.1936
- McDonagh P, Myler P, Stuart K. **The unusual gene organization of *Leishmania major* chromosome 1 may reflect novel transcription processes.** *Nucl Acids Res.*28:2800-2803.2000.
- Melville S. **The african trypanosome genome project: focus on the future.** *Parasitol Today.*14:129-131.1998.
- Merlin G, Baltz T. **Conserved organization of genes in trypanosomatids.** *Molec Biochem Parasit.*94:249-264.1998.
- Momen, H. **Taxonomy of *Trypanosoma cruzi*: a Commentary on Characterization and Nomenclature.** *Mem Inst Oswaldo Cruz.*94:181-184.1999.
- Moraes-Souza, H. **Chagas Infection Transmission Control: Situation of transfusional transmission in Brazil and other Countries of Latin America.** *Mem Inst Oswaldo Cruz.*94: 419-423.1999.
- Murphy N, Pays A, Tebabi P, Coquelet H, Guyaux M, Steinert M, Pays E. ***Trypanosoma brucei* repeated element with unusual structural and transcriptional properties.** *Journal Mol Biol.*195:855-871.1987.
- Myler P, Audleman L, deVos T, Hixson G, Kiser P, Lemley C, Magness C, Rickel E, Sisk E, Sunkin S, Swartzell S, Westlake T, Bastien P, Fu G, Ivens A, Stuart K. ***Leishmania major***

friedlin chromosome 1 has an unusual distribution of protein-coding genes. *Proc Natl Acad Sci USA*.96:2902-2906.1999.

Noyes H. **Can trypanosoma trees be trusted?** *Parasitol Today*.14:49-50.1998.

Nunes LR, Carvalho MRC, Buck GA. **Trypanosoma cruzi strains partition into two groups based on the structure and function of the spliced leader and rRNA gene promoters.** *Mol Biochem Parasitol*.86:211-224.1997b.

Nunes LR, Carvalho MRC, Shakarian AM, Buck GA. **The transcription promoter of the spliced leader gene from Trypanosoma cruzi.** *Gene*.188:157-168.1997a.

Ochman H, Soncini FC, Solomon F, Groisman EA. **Identification of a pathogenicity island required for Salmonella survival in host cells.** *Proc Natl Acad Sci USA*.93:7800-7804.1996.

Oliveira RP, Broude NE, Macedo AM, Cantor CR, Smith CL, Pena SDJ. **Probing the genetic population structure of Trypanosoma cruzi with polymorphic microsatellites.** *Proc Natl Acad Sci USA*.95:3776-3780.1998.

Oliveira, R.P.; Melo, A.I.R.; Macedo, A.M.; Chiari, E.; Pena, S.D.J. **The Population Structure of Trypanosoma cruzi: Expanded analysis of 54 strains using eight polymorphic CA-repeat microsatellites.** *Mem Inst Oswaldo Cruz*.94:65-70.1999.

Ono Y, Ohno M, Shimura Y. **Identification of a putative RNA helicase (HRH1), a human homolog of yeast prp22.** *Mol Cel Biol*.14:7611-7620.1994.

Otsu K, Donelson J, Kirchoff L. **Interruption of a Trypanosoma cruzi gene encoding a protein containing 14-amino acid repeats by targeted insertion of a neomycin phosphotransferase gene.** *Mol Biochem Parasitol*.57:317-330.1993.

Papadopoulou B, Dumas C. **Parameters controlling the rate of gene targeting frequency in the protozoan parasite Leishmania.** *Nucl Acids Res*.25:4278-4286. 1997.

Pastel E, Perry K, Agabian N. **Mapping of branch sites in trans-spliced pre-mRNAs of Trypanosoma brucei.** *Mol. Cel. Biol*.9:4291-4297.1989.

Patnaik P, Axelrod N, Van der Ploeg L, Cross G. **Artificial mini-chromosomes for Trypanosoma brucei.** *Nucl Acids Res*. 24:668-675.1996.

Patnaik P, Fang X, Cross G. **The region encompassing the procyclic acidic repetitive protein (PARP) gene promoter plays a role in plasmid DNA replication in Trypanosoma brucei.** *Nucl Acids Res*. 22:4111-4118.1994.

Patnaik P. **Studies with artifitial extrachromosomal elements in Trypanosomatids: could specificity in the initiation of DNA replication be linked to that in transcription?** *Parasitol Today*.468-471.1997.

Pinto Dias, J.C; Wendel, S. (Edt.); Brener, Z. (Edt.); Camargo, M.E. (Edt.); Rassi, A. (Edt.). **En: Chagas Disease - American Trypanosomiasis: its impact on transfusion and clinical medicine.** ISBT Brasil, Sao Paulo, Brasil.1992.

Porcel B, Tran A, Tammi M, Nyarady Z, Rydåker M, Urmenyi T, Rondinelli E, Pettersson U, Andersson B, Åslund L. **Gene survey of the pathogenic protozoan *Trypanosoma cruzi*.** *Genome Res.*10:1103-1107.2000.

Redpath MB, Carnall N, Webb H, Courel M, Amorim A, Guthrie ML, Cardoso de Almeida ML, Carrington M. **Conservation of genetic linkage between heat shock protein 100 and glycosylphosphatidylinositol-specific phospholipase C in *Trypanosoma brucei* and *Trypanosoma cruzi*.** *Mol Biochem Parasitol.*94:113-21,1998.

Revollo, S.; Oury, B.; Laurent, J.P.; Barnabé, C.; Quesney, V.; Carrière, V.; Noël, S.; Tibayrenc, M. ***Trypanosoma cruzi*: impact of clonal evolution of the parasite on its biological and medical properties.** *Exp Parasitol* 89: 30-39. 1998

Santos M, Cano MI, Schijman AG, Lorenzi H, Vazquez M, Levin M, Ramirez JL, Brandao A, Degraive W, da Silveira JF. **The *Trypanosoma cruzi* genome project: Nuclear karyotype and gene mapping of clone CL Brenner.** *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 92:821-828.1997.

Santos M, Lorenzi H, Do Carmo M, Cerda P, Schijman A, Brandao A, Gomes H, Chiurillo M, Ramirez JL, Degraive W, Levin MJ, da Silveira JF. **Physical Map of large chromosomal region harbouring (encompassing) genes for two immunodominant repetitive antigens of *Trypanosoma cruzi*.** *Genome Res.*9:1268-1276.1999.

Schijman AG, Vázquez MP, Ben-Dov CP, Ghio S, Lorenzi H, Levin MJ. **Cloning and sequence analysis of TcP2β cDNA variants of *Trypanosoma cruzi*.** *Biochim. et Biophys. Acta.*1264:15-18.1995.

Schijman AG, Vigliano C, Burgos J, Favalaro R, Perrone S, Laguens R, Levin MJ. **Early diagnosis of recurrence of *Trypanosoma cruzi* infection by polymerase chain reaction after heart transplantation of a chronic Chagas heart disease patient.** *J Heart Lung Transplant.*19:1114-1117.2000.

Schilke B, Voisine C, Beinert H, Craig E. **Evidence for a conserved system for iron metabolism in the mitochondria of *Saccharomyces cerevisiae*.** *Proc Natl Acad Sci USA.*96:10206-10211.1999.

Schwer B, Gross CH. **Prp22, a DExH-box RNA helicase, plays two distinct roles in yeast pre-mRNA splicing.** *EMBO J.*17:2086-2094.1998.

Si K, Maitra U. **The *Saccharomyces cerevisiae* homologue of mammalian translation initiation factor 6 does not function as a translation initiation factor.** *Mol Cell Biol.* 19:1416-1426.1999.

Sosa Estani, S.; Segura, E. **Treatment of *Trypanosoma cruzi* infection in the Undetermined Phase. Experience and Current Guidelines of Treatment in Argentina.** *Mem Inst Oswaldo Cruz.*94:363-365.1999.

Souto RP, Fernandez O, Macedo AM, Campbell DA, Zingales B. **DNA markers define two major phylogenetic lineages of *Trypanosoma cruzi*.** *Mol Biochem Parasitol.*83:141-152.1996.

Stothard J, Frame I, Carrasco H, Miles M. **On the molecular taxonomy of *Trypanosoma cruzi* using riboprinting.** *Parasitology.*117:243-247.1998.

- Tchurikov NA, Gerasimova TI, Johnson TK, Barbakar NI, Kenzior AL, Georgiev GP. **Mobile elements and transposition events in the cut locus of *Drosophila melanogaster*.** *Mol Gen Genet.*219:241-248.1989.
- Thomas MC, González A. **A transformation vector for stage-specific expresión of heterologous genes in *Trypanosoma cruzi* epimastigotes.** *Parasitol Res.*83:151-156.1997.
- Tibayrenc, M.; Ayala, F.J. **Isozyme variability in *Trypanosoma cruzi*, the agent of Chagas disease: genetical, taxonomical, and epidemiological significance.** *Evolution.*42:277-292.1988.
- Tyler, K.M.; Engman, D.M. **The life cycle of *Trypanosoma cruzi* revisited.** *International Journal for Parasitology* 31:472-481.2001.
- Van Voorhis W, Eisen H. **FL-160, a surface antigen of *Trypanosoma cruzi* that mimics mammalian nervous tissue.** *Journal Exp Med.* 169:641-652.1989.
- Vanhamme L, Pays E. **Control of gene expression in trypanosomes.** *Microbiology Reviews.*59:223-240.1995.
- Vasella E, Braun E, Roditi I. **Control of polyadenilation and alternative splicing of transcripts from adjacent genes in procyclic expression site: a dual roll for polypirimidine tracts in trypanosomes?** *Nucl Acids Res.* 22:1359-1364.1994.
- Vazquez M, Beljord C, Lorenzi H, Bienvenu T, Levin MJ. **Detection of polymorphism in the *Trypanosoma cruzi* TcP2 β gene family by single strand conformational analysis (SSCA).** *Gene.*180:43-48.1996.
- Vázquez M, Ben-Dov C, Lorenzi H, Moore T, Schijman A, Levin MJ. **The short interspersed repetitive element of *Trypanosoma cruzi*, SIRE, is part of VIPER, an unusual retroelement related to long terminal repeat retrotransposons.** *Proc Natl Acad Sci USA.*97:2128-2133.2000.
- Vázquez M, Levin MJ. **Functional analysis of the intergenic regions of TcP2b gene loci allowed the construction of an improved *Trypanosoma cruzi* expression vector.** *Gene.* 239:217-225.1999.
- Vázquez M, Lorenzi H, Schijman A, Ben-Dov C, Levin MJ. **Analysis of the distribution of SIRE in the nuclear genome of *Trypanosoma cruzi* reveals its linkage to other repetitive sequences and protein coding genes.** *Gene.*239:207-216.1999.
- Vázquez M, Lorenzi H, Schijman AG, Ben-Dov C, Levin MJ. **Analysis of the distribution of SIRE in the nuclear genome of *Trypanosoma cruzi*.** *Gene.*239:207-216.1999.
- Vázquez M, Schijman A, Levin MJ. **A short interspersed repetitive element provides a new 3' acceptor site for trans-splicing in certain ribosomal P2 β protein genes of *Trypanosoma cruzi*.** *Mol Biochem Parasitol.*67:327-336.1994.
- Vázquez MP, Schijman AG, Levin MJ. **A short interspersed repetitive element provides a new 3' acceptor site for trans-splicing in certain ribosomal P2 beta protein genes of *Trypanosoma cruzi*.** *Mol Biochem Parasitol.*64:327-336.1994.

- Vickerman K. **The evolutionary expansion of trypanosomatid flagellates.** *Int Journal Parasitol.*24:1317-1331.1994.
- Villanueva M, Williams S, Beard C, Richards F, Aksoy S. **A new member of a family of sit-specific retrotransposons is present in the spliced leader RNA genes of *Trypanosoma cruzi*.** *Mol Cel Biol.*11:6139-6148.1991.
- Voelkel-Meiman K, Keil R, Roeder G. **Recombination-stimulating sequences in yeast ribosomal DNA correspond to sequences regulating transcription by RNA polymerase I.** *Cell.*48:1071-1079.1987.
- Wagner JDO, Jankowsky E, Company M, Pyle AM, Abelson JN. **The DEAH-box protein PRP22 is an ATPase that mediates ATP-dependent mRNA release from the spliceosome and unwinds RNA duplexes.** *EMBO J.*17:2926-2937.1998.
- Ward T, Hoang M, Prusty R, Lau C, Keil R, Fangman W, Brewer B. **Ribosomal DNA replication fork barrier and HOT1 recombination hot spot: shared sequences but independent activities.** *Mol Cel Biol.*20:4948-4957.2000.
- Wen L, Xu P, Benegal G, Carvaho M, Butler D, Buck G. ***Trypanosoma cruzi*: exogenously regulated gene expression.** *Experim Parasitol.* 97:196-204.2001.
- Weston D, La Flamme A, Van Voorhis W. **Expression of *Trypanosoma cruzi* surface antigen FL-160 is controlled by elements in the 3' untranslated, the 3' intergenic and the coding regions.** *Mol Biochem Parasitol.*102:53-66.1999.
- Weston D, Patel B, Van Voorhis. **Virulence in *Trypanosoma cruzi* infection correlates with the expression of distinct family of sialidase superfamily genes.** *Mol Biochem Parasitol.* 98:105-116.1999.
- Wirtz E, Hartmann C, Clayton C. **Gene expression mediated by bacteriophage T3 and T7 RNA polymerases in transgenic trypanosomes.** *Nucl Acids Res.*22:3887-3894.1994.
- Wood L, Ashby M, Grunfeld C, Feingold K. **Cloning of murine translation factor 6 and functional analysis of the homologous sequence YPR016c in *Saccharomyces cerevisiae*.** *Journal Biol Chem.*274:11653-11659.1999.
- Xiong Y, Eickbush T. **Origin and evolution of retroelements based upon their reverse transcriptase sequences.** *EMBO Journal.*9:3353-3362.1990.
- Yan S, Lodes M, Fox M, Myler P, Stuart K. **Characterization of the *Leishmania donovani* ribosomal RNA promoter.** *Mol Biochem Parasitol.*103:197-210.1999.
- Yuvaniyama P, Agar JN, Cash VL, Johnson MK, Dean DR. **NifS-directed assembly of a transient [2Fe-2S] cluster within the NifU protein.** *Proc Natl Acad Sci USA.*97:599-604. 2000.
- Zhou Z, Reed R. **Human homologs of yeast prp16 and prp17 reveal conservation of the mechanism for catalytic step II of pre-mRNA splicing.** *EMBO Journal.*17:2095-2106.1998.
- Zhou Z, Reed R. **Human homologs of yeast Prp16 and Prp17 reveal conservation of the mechanism for catalytic step II of pre-mRNA splicing.** *EMBO J.*17:2095-2106.1998.

Zingales B, Souto RP, Mangia RH, Lisboa CV, Campbell DA, Coura JR, Jansen A, Fernandes O. **Molecular epidemiology of American trypanosomiasis in Brazil based on dimorphisms of rRNA and mini-exon gene sequences.** *Int J Parasitol.*28:105-112.1998.

Zingales B, Stolf B, Souto R, Fernandez O, Briones M. **Epidemiology, biochemistry and evolution of *Trypanosoma cruzi* linajes based on ribosomal RNA secuencias.** *Mem Inst Oswaldo Cruz.*94:159-164.1999.