

00381
23
2eq.



**UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTONOMA DE MEXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS
División de Estudios de Posgrado

Análisis funcional de la secuencia promotora del
gene de RNA ribosomal de *Trypanosoma cruzi*
mediante técnicas de transformación molecular

T E S I S

Que para obtener el grado Académico de
DOCTOR EN CIENCIAS (BIOLOGIA)

P r e s e n t a

M. en C. SANTIAGO/MARTINEZ CALVILLO

257349

Director de Tesis: Dr. Roberto José Rafael Hernández Fernández

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

1998



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

PAGINACIÓN

DISCONTINUA

*A mis hermanas: Rosi, Leti, Beti,
Doris, Laura, Gabi y Nazmin, con
todo mi amor.*

AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo se llevó a cabo en el laboratorio del Dr. Roberto Hernández Fernández, en el Departamento de Biología Molecular del Instituto de Investigaciones Biomédicas, en la Universidad Nacional Autónoma de México. Agradezco al Dr. Hernández por la asesoría, enseñanza y apoyo que siempre me ha brindado.

Asimismo, agradezco a Imelda López por la asesoría y ayuda brindadas. También agradezco a César Bravo por su asesoría en los genes de retardamiento, y a Olga Medina por su asesoría en los ensayos CAT y por su constante estímulo.

Agradezco también a mis compañeros de laboratorio: Angeles, Myriam, Pati, Juliana, Mariana, Maru, Norma, Lorena, Michelle y Sergio, por su amistad y ayuda invaluable.

También agradezco a los miembros del comité revisor de esta tesis: Dra. Rosaura Hernández, Dra. Carmen Gómez, Dra. Laura Camarena, Dra. Cristina Fernández, Dr. Ricardo Rosales, Dr. Alejandro García y Dr. Luis Felipe Jiménez, por sus comentarios y sugerencias para mejorar la presentación del presente trabajo.

Finalmente, mi agradecimiento más sincero a la Universidad Nacional Autónoma de México por haberme permitido llevar a cabo en ella mis estudios de Licenciatura, Maestría y Doctorado.

CONTENIDO

RESUMEN	IV
ABSTRACT	VI
INTRODUCCIÓN	1
Aspectos generales	1
Expresión genética en los tripanosomas	5
El DNA del cinetoplasto y su expresión	8
RNA polimerasas en los tripanosomas	10
Genes de RNA ribosomal	11
Secuencias promotoras de la unidad de RNAr	15
RESULTADOS	20
Artículo: pRIBOTEX expression vector: a pTEX derivative for a rapid selection of <i>Trypanosoma cruzi</i> transfectants.	
Manuscrito: A <i>Trypanosoma cruzi</i> ribosomal RNA gene promoter fragment forms a specific complex with nuclei derived proteins.	
Resultados adicionales	31
DISCUSIÓN	40
CONCLUSIONES	49
PERSPECTIVAS	50
REFERENCIAS	51
APÉNDICE	61

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1	Ciclo de vida de <i>Trypanosoma cruzi</i> .	3
FIGURA 2	Transcripción y procesamiento de los RNAm en los tripanosomas.	6
FIGURA 3	Síntesis y procesamiento del transcrito primario del RNAr.	13
FIGURA 4	Organización genómica de la unidad de RNAr de <i>E. coli</i> , <i>X. laevis</i> y <i>T. cruzi</i> .	15
FIGURA 5	Estructura de la región promotora de la unidad de RNA ribosomal.	17
FIGURA 6	Secuencia nucleotídica del fragmento de DNA que contiene la región promotora.	23
FIGURA 7	Selección con G418 de cultivos de <i>T. cruzi</i> transfectados.	24
FIGURA 8	Autorradiografía de una hibridación tipo slot blot con DNA de células transfectadas.	25
FIGURA 9	Análisis tipo Southern con DNA de bajo peso molecular.	26
FIGURA 10	Gel de retardamiento con el promotor del RNAr de <i>T. cruzi</i> .	28
FIGURA 11	Autorradiografía de un gel de retardamiento con el promotor del RNAr.	29
FIGURA 12	Gel de retardamiento con el fragmento 8-3B	30
FIGURA 13	Mapa de p Δ ER172- <i>cat</i> .	35
FIGURA 14	Análisis funcional de la secuencia promotora del RNAr	38

ABREVIATURAS

CAT	Cloranfenicol acetil transferasa
<i>cat</i>	región codificadora de CAT
Ci	Curie
Cm	Cloranfenicol
cpm	Cuentas por minuto
DNA _r	Ácido desoxirribonucleico codificador del RNA _r
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Etilendinitrilotetracetato
GAPDH	Gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa
kb	Kilobases
kDa	Kilodaltones
ME	Miniexón
medRNA	RNA donador del miniexón
<i>neo</i>	Gene de la neomicin fosfotransferasa
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
pre-RNA _m	Precursor del RNA mensajero
RNA pol	RNA polimerasa
RNA _g	Ácido ribonucleico guía
RNA _m	Ácido ribonucleico mensajero
RNA _r	Ácido ribonucleico ribosomal
RNA _t	Ácido ribonucleico de transferencia
S	Unidades Svedberg
SDS	Sulfato dodecil de sodio
TBE	Tris-boratos-EDTA
TE	Tris-EDTA

RESUMEN

Trypanosoma cruzi es el agente etiológico de la enfermedad de Chagas. La importancia de este organismo no es sólo médica, sino también biológica debido, entre otros aspectos, a que presenta mecanismos de expresión genética poco comunes (Vanhamme y Pays, 1995). Nuestro interés en este organismo se ha enfocado al estudio de los genes de RNA ribosomal (RNAr), locus esencial en la síntesis de proteínas. Actualmente es posible transfectar *T. cruzi*, por lo que se espera que en un futuro inmediato se dé un avance fundamental en el estudio de su expresión génica. pTEX es un vector de expresión para *T. cruzi* recientemente descrito (Kelly et al., 1992). Este vector contiene el gene de *neo* por lo que su expresión es seleccionable en presencia de geneticina (G418). pTEX-*cat* es un plásmido derivado que incluye secuencias de *cat* como gene reportero. Con el objeto de estudiar la expresión del locus de RNAr de *T. cruzi*, hemos ya identificado una probable región promotora que contiene el sitio de inicio de la transcripción (+1) (Martínez-Calvillo y Hernández, 1994). Para analizar funcionalmente esta región, un fragmento de 806 pb que contiene el sitio de inicio de la transcripción fue clonado en pTEX y en pTEX-*cat*, substituyendo la región promotora original del vector. Los plásmidos resultantes, pRIBOTEX y pRIBOTEX-*cat*, fueron transfectados por electroporación en *T. cruzi*. Al realizar ensayos de actividad de CAT con extractos de células de *T. cruzi* transfectadas transitoriamente con pRIBOTEX-*cat* y pTEX-*cat* encontramos que el promotor del RNAr es alrededor de 16,000 veces más fuerte que el promotor del gene de gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa, originalmente clonado en pTEX. Seleccionando con geneticina las células electroporadas se obtuvieron líneas transfectadas establemente. El establecimiento de las líneas estables con pRIBOTEX y pRIBOTEX-*cat* se logró al menos dos semanas antes que con pTEX y pTEX-*cat*. El análisis tipo "slot blot" llevado a cabo con las líneas estables nos indicó que las células transfectadas con pRIBOTEX-*cat* contienen

aproximadamente 50 veces menos DNA de plásmido que las células transfectadas con pTEX-*cat*. Sin embargo, al analizar la abundancia del RNAm de *neo* y la actividad de CAT se observaron diferencias menores entre los cultivos. El análisis de hibridación cromosomal de los cultivos estables indicó que pRIBOTEX no es mantenido episomalmente, como pTEX, sino que se integra aparentemente en el cromosoma que contiene los genes de RNAr. La región de DNA con actividad promotora se ha acotado a un fragmento de 355 pb (de -148 a +207) que mantiene la actividad máxima de expresión reportera de CAT. Finalmente, por medio de geles de retardamiento encontramos que en los núcleos de *T. cruzi* hay proteínas capaces de unirse en forma específica a un fragmento de 64 pb que contiene el sitio de inicio de la transcripción del gene del RNAr. Mediante análisis tipo Southwestern identificamos una proteína de 24 kDa que se asocia específicamente al promotor del RNAr.

ABSTRACT

Trypanosoma cruzi is the causative agent of Chagas disease. The importance of this parasite is both medical and biological. Our research group has been interested in the study of the ribosomal RNA (rRNA) genes from this parasite. Nowadays it is possible to transform *T. cruzi*. pTEX is a recently described expression vector (Kelly et al., 1992). This plasmid contains the *neo* gene as a selectable marker. Therefore, transfected cells can be selected in the presence of geneticine (G418). pTEX-*cat*, a pTEX derivative, also contains the *cat* sequences as a reporter. To study the expression of the rRNA locus from *T. cruzi*, we mapped a transcription start point (+1) (Martínez-Calvillo y Hernández, 1994), which forms part of the gene promoter in all species studied to date. In order to analyze this region, we replaced the promoter sequences from pTEX and pTEX-*cat* with an 806 bp DNA fragment bearing the transcription start point for the rRNA gene. The resultant vectors, pRIBOTEX and pRIBOTEX-*cat*, were transfected by electroporation into *T. cruzi*. CAT activity measured in transient assays showed that the rRNA gene promoter is about 16,000 times stronger than the glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase gene promoter, originally cloned in pTEX-*cat*. Moreover, cells transfected with pRIBOTEX and pRIBOTEX-*cat* exhibited logarithmic growth in the presence of G418 two weeks earlier than that observed with cells transfected with pTEX and pTEX-*cat*, which indicates that the rRNA gene promoter stimulates the expression of *neo*. Slot blot hybridization analysis of stably transformed lines showed that cells transfected with pTEX-*cat* had about 50-fold *neo* gene sequences when compared to cultures transformed with pRIBOTEX-*cat*. However, the *neo* RNA steady-state level and the CAT activity observed among the cultures showed only modest differences. The chromosomal analysis of the transfected cultures demonstrated that pRIBOTEX was not episomally maintained as pTEX, but integrated into a chromosome with an electrophoretic mobility undistinguishable from that encoding the rRNA genes.

Preliminary deletion analyses on the rRNA gene promoter have shown a fragment of 355 bp (from -148 to +207, relative to the transcription start point) that sustains maximal CAT activity. Finally, gel retardation analyses showed the occurrence of *T. cruzi* nuclear proteins that specifically recognize a 64 bp rDNA fragment that contains the transcription start point. A Southwestern assay revealed a 24 kDa protein that specifically interacts with the rRNA gene promoter.

INTRODUCCIÓN

Aspectos generales

Trypanosoma cruzi es un protozooario de importancia médica y biológica. Es miembro de la familia Trypanosomatidae, orden Kinetoplastida, en donde además se agrupa a otros organismos parásitos como *Leishmania*, *Crithidia* y *Phytomonas* (McGhee y Cosgrove, 1980; Maslov y Simpson, 1995). Todos ellos se caracterizan por la presencia de una compleja mitocondria, denominada cinetoplasto, cuyo DNA está formado por una intrincada red de moléculas circulares (Shlomai, 1994).

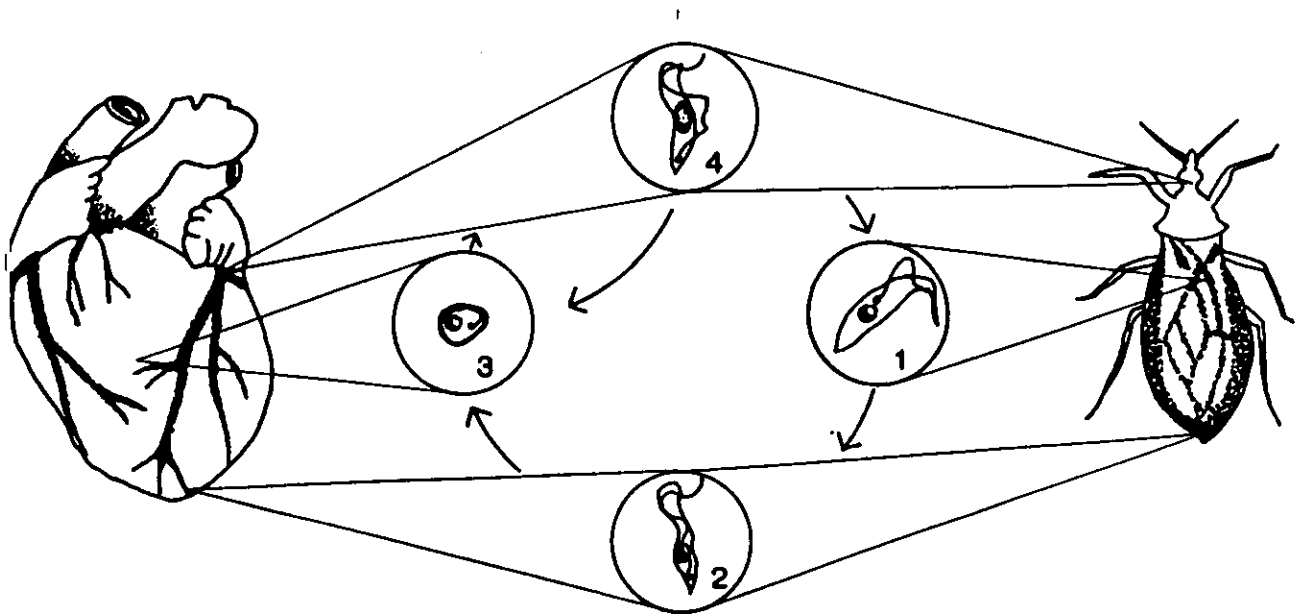
La enfermedad que *T. cruzi* causa en el hombre es la tripanosomiasis americana. El padecimiento es también llamado enfermedad de Chagas, en deferencia al científico brasileño Carlos Chagas, quien fue el primero en describir este mal y su relación con *T. cruzi*. En su fase crónica, esta enfermedad se manifiesta con alteraciones graves en el corazón, esófago y/o colon, que pueden conducir a la muerte del individuo (Kierszenbaum y Hudson, 1985; Nogueira, 1986). La enfermedad de Chagas es uno de los padecimientos infecciosos más ampliamente distribuidos en América Latina, constituyendo un grave problema de salud pública en muchos países de la región. Se calcula que actualmente esta enfermedad ataca a más de 20 millones de personas en nuestro continente (OMS, 1991). En México, en los últimos años se han reportado alrededor de 300 casos de infección por *T. cruzi*. Sin embargo, el número de infectados podría ser mucho mayor, pues estudios seroepidemiológicos llevados a cabo en

Oaxaca, Morelos, Puebla, Guerrero y Jalisco han revelado que en algunas zonas de dichos estados se presentan porcentajes de positividad de entre el 20 y el 60% (Velasco, 1991; Sánchez-Hernández, 1996).

Más de 110 especies de insectos hemípteros de la familia Reduviidae, entre los que destacan *Triatoma infestans*, *Rhodnius prolixus* y *Panstrongilus megistus*, fungen como vectores transmisores de *T. cruzi* (García y Azambuja, 1991). Sin embargo, ésta no es la única vía de transmisión, pues existen reportes de personas contagiadas al recibir una transfusión sanguínea, por ingerir alimentos contaminados con el parásito, por vía transplacentaria y por transplante de órganos (Fife, 1977; Miles, 1979).

T. cruzi también puede infectar a una amplia variedad de mamíferos domésticos y silvestres, tales como perros, gatos, armadillos, tlacuaches, ratas y monos. Estos animales constituyen reservorios del parásito que aumentan la posibilidad de infecciones en humanos (Miles, 1979).

Durante su ciclo biológico, *T. cruzi* presenta tres estadios de desarrollo: epimastigotes, amastigotes y tripomastigotes (figura 1). La definición de estos estadios se basa en la forma general de la célula, la posición del cinetoplasto en relación al núcleo, y la posición de la que emerge el flagelo de la bolsa flagelar (Nogueira, 1986; Pereira, 1990). Los epimastigotes son formas ovoides, de 20 a 40 μm de largo, que se establecen y replican extracelularmente en el intestino del insecto vector. Los amastigotes, organismos redondeados que poseen un flagelo corto,



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

Figura 1. Ciclo de vida de *Trypanosoma cruzi*

constituyen el estadio replicativo intracelular en el hospedero vertebrado. Por su parte, el tripomastigote es el único estadio celular capaz de infectar a los mamíferos. Tiene forma delgada y alargada, con una longitud aproximada de 30 μm , y se observa tanto en el recto del insecto (tripomastigote metacíclico), como en la sangre del mamífero infectado (tripomastigote procíclico o de forma sanguínea). A diferencia de las formas anteriores, los tripomastigotes son células no replicativas.

Generalmente, el parásito inicia la infección en el mamífero hospedero cuando un insecto infectado se alimenta de la sangre de éste (figura 1). Es muy común que el insecto defeque durante o inmediatamente después de la ingesta sanguínea, liberando tripomastigotes metacíclicos en sus heces y orina. Los tripomastigotes penetran en el organismo vertebrado a través de heridas de la piel, como el mismo piquete del insecto, o por membranas mucosas, e invaden las células hospederas. Dentro de las células los tripomastigotes se diferencian en amastigotes, los cuales se dividen varias veces por fisión binaria, para posteriormente transformarse en tripomastigotes procíclicos. Esta forma de tripomastigotes se libera al torrente sanguíneo por lisis celular, pudiendo entonces infectar otras células. Si un insecto vector se alimenta de la sangre infectada, puede ingerir los tripomastigotes presentes en ella. En el intestino del insecto los parásitos se diferencian en epimastigotes, los cuales, después de dividirse repetidamente, migran al recto y se transforman en tripomastigotes metacíclicos. En el momento en el que el insecto ingiere nuevamente sangre de un mamífero puede defecar y liberar así los tripomastigotes (Fife, 1977; Pereira, 1990).

Además de su notoriedad en el campo de la medicina, y quizá por su origen evolutivo temprano, los tripanosomas son un grupo de organismos sumamente interesante desde el punto de vista biológico. En el área de nuestro interés, biología molecular, los tripanosomas representan modelos muy interesantes, pues se ha descrito que presentan mecanismos de expresión genética atípicos a los paradigmas planteados para células de metazoarios.

Expresión genética en los tripanosomas

En el genoma de los miembros de la familia Trypanosomatidae, los genes codificadores de proteínas generalmente se encuentran organizados en unidades de transcripción policistrónicas; esto es, los genes son co-transcritos a partir de un promotor único, dando lugar a RNAs precursores policistrónicos largos (Kooter et al., 1987; Teixeira et al., 1994) (figura 2). Muchas de las unidades de transcripción contienen varias copias de un mismo gene, arregladas en tándem, mientras que otras unidades están formadas por genes relacionados, e incluso por genes no relacionados. Dentro de las unidades policistrónicas, los genes se encuentran separados por secuencias intergénicas cortas (Hehl y Roditi, 1994; Vanhamme y Pays, 1995).

Ninguno de los genes analizados en los tripanosomas posee intrones, por lo que no se requiere del cis-splicing (Breathnach y Chambom, 1981) para generar transcritos máduros. En cambio, todos los RNAm analizados a la fecha son producidos a partir del transcrito

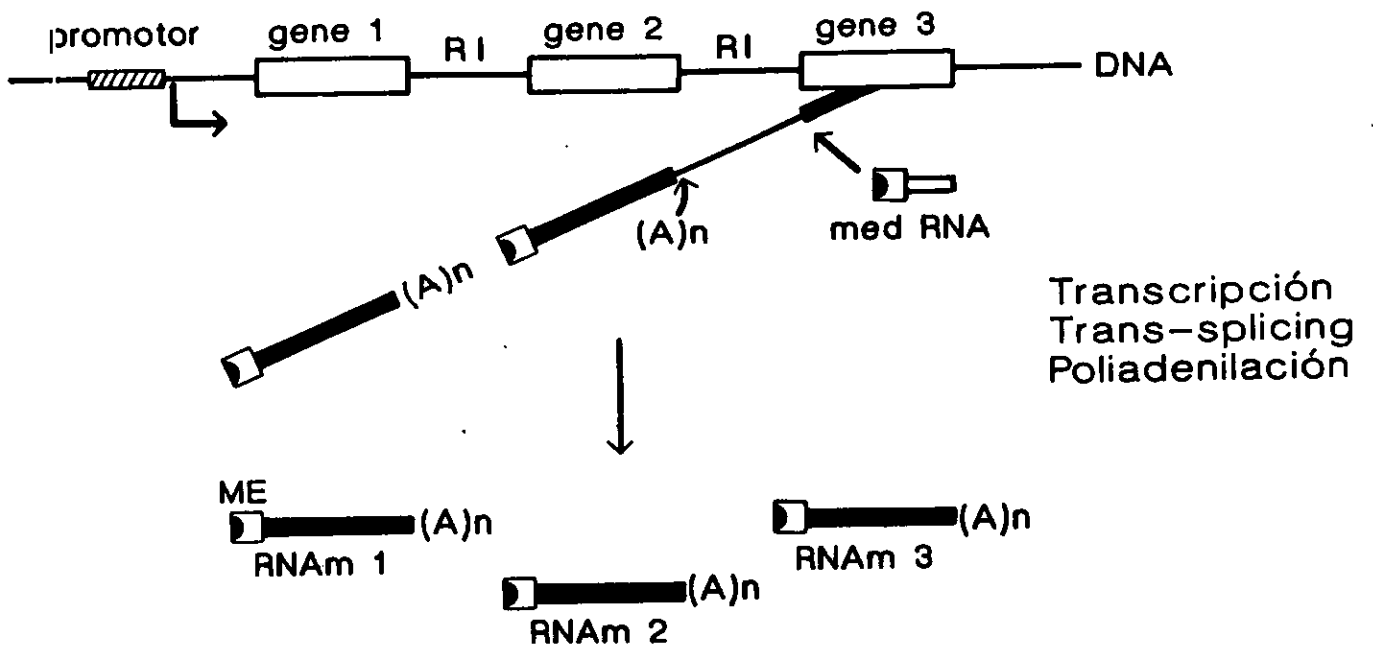


Figura 2. Transcripción y procesamiento de los RNAm en los tripanosomas. (A)n: cola de poli A. ME: miniexón. RI: región intergénica. med RNA: RNA donador del miniexón.

policistrónico mediante trans-splicing y poliadenilación (Vanhamme y Pays, 1995) (figura 2). Por medio del trans-splicing todos los RNAm reciben en su extremo 5' una secuencia común de 39 nucleótidos, denominada miniexón o "spliced leader" (Agabian, 1990; Bonem, 1993). El miniexón, que aporta al pre-RNAm el "cap" (un residuo m^7Gppp), es donado por una molécula de RNA de 140 bases (el med RNA) que es sintetizada en una región distinta del genoma (figura 2). En el trans-splicing interviene una maquinaria similar a la involucrada en el cis-splicing, aunque no han sido identificados los RNAs pequeños nucleares U1 y U5 (Bruzik y Steitz, 1990). El miniexón se adiciona a los RNAm en sitios aceptores localizados generalmente a 30-70 bases "río arriba" del codón de inicio de la traducción. Los sitios aceptores están constituidos por el dinucleótido AG precedido de una región rica en pirimidinas (Huang y Van der Ploeg, 1991).

Por lo que respecta a la poliadenilación, si bien no se han encontrado secuencias consenso en el pre-RNAm, sí se ha reportado que las secuencias ricas en pirimidinas de las regiones intergénicas también son muy importantes para este proceso (Schurch et al., 1994). De hecho, se ha sugerido que en los tripanosomas el trans-splicing y la poliadenilación podrían estar relacionados funcionalmente (Matthews et al., 1994). También se ha reportado que puede presentarse un uso diferencial de sitios de procesamiento tanto en el trans-splicing como en la poliadenilación; es decir, que el procesamiento no necesariamente ocurre en una posición precisa, sino que puede presentarse en varios sitios,

dentro de una región determinada (Layden y Eisen, 1989; Coquelet et al., 1989).

No obstante que todos los genes de una unidad policistrónica son transcritos en la misma cantidad, la abundancia de los RNAm maduros individuales (y la abundancia de las proteínas que éstos codifican) puede ser considerablemente distinta. Consecuentemente, los tripanosomas poseen mecanismos que les permiten controlar post-transcripcionalmente la concentración celular de sus productos génicos. A este respecto, existe evidencia experimental que indica que la regulación del trans-splicing y la poliadenilación juega un papel muy importante en el control de la expresión génica (Graham, 1995; Vanhamme y Pays, 1995). La abundancia relativa de pirimidinas en la región 5' de cada gene puede contribuir a una diferente tasa de trans-splicing, lo que a su vez influencia la cantidad final del RNAm (Kapotas y Bellofatto, 1993). Además, la secuencia de la región 3' no traducida puede ser crítica en la determinación de la estabilidad y abundancia de un RNAm (Berberof et al., 1995; Nozaki y Cross, 1995). Asimismo, el uso alternativo de sitios de procesamiento es un mecanismo que puede regular la expresión estadio específica de un gene (Pays et al., 1989).

El DNA del cinetoplasto y su expresión

El DNA del cinetoplasto, que constituye del 10 al 20% del DNA total celular, está formado por una compleja red de dos tipos de moléculas circulares concatenadas: minicírculos y maxicírculos (Myler, 1993;

Shlomai, 1994). Generalmente, una mitocondria presenta de 5,000 a 10,000 minicírculos, cuyo tamaño varía entre 0.5 y 2.5 kb, dependiendo de la especie. El número de maxicírculos por cinetoplasto es de alrededor de 50, y su tamaño va de 20 a 40 kb. Los maxicírculos de todos los tripanosomas contienen los genes que normalmente se encuentran en los genomas mitocondriales de otros organismos (Hajduk et al., 1993).

Otro de los procesos moleculares atípicos que presentan los miembros de la familia Trypanosomatidae es la edición de los transcritos del cinetoplasto (Benne et al., 1986; Stuart et al., 1997). Mediante este mecanismo, los precursores de los RNAm de la mitocondria sufren la adición (y en menor medida la delección) de uridinas, lo que conduce a la formación o extensión de marcos abiertos de lectura. Por medio de la edición se puede producir más del 50% de las secuencias codificadoras de una proteína (Feagin et al., 1988). El mecanismo por medio del cual se lleva al cabo la edición no ha sido totalmente dilucidado. Sin embargo, se sabe que la información para este proceso es proporcionada por moléculas de RNA pequeñas, de 55 a 70 nucleótidos de largo, que se han denominado RNAs guía (RNAg) (Blum et al., 1990). Los RNAg, codificados tanto en minicírculos como en maxicírculos, poseen una secuencia de 4-18 nucleótidos (secuencia de anclaje) que presenta complementariedad con el pre-RNAm. Dicha secuencia está involucrada en el reconocimiento inicial entre el pre-RNAm y el RNAg. Además, los RNAg tienen una secuencia complementaria a una parte del RNAm editado. Se propone que esta parte del RNAg es la que dirige los cambios del pre-RNAm (Stuart et al., 1997; Benne, 1994).

RNA polimerasas en los tripanosomas.

En organismos eucariontes existen tres clases de RNA polimerasas (RNA pol) (revisado por Roeder, 1996). La RNA pol I se encarga de transcribir los genes del RNA ribosomal (RNAr), mientras que la RNA pol II sintetiza los precursores de los RNAm, y los RNA pequeños nucleares U1 a U5. Por su parte, la RNA pol III transcribe los RNAt, el RNAr 5S, y a unos otros RNA pequeños como el U6 y el 7SL. Aunque en los tripanosomas se ha reportado la presencia de las tres RNA polimerasas (Grondal et al., 1989), éstas presentan algunas características inusuales. Por ejemplo, como se discutirá más adelante, la RNA pol I de *T. brucei* aparentemente no sólo transcribe el RNAr, sino que también sintetiza los RNAm de 2 de las proteínas más abundantes del parásito (Chung et al., 1992). Además, el RNA pequeño nuclear U2 de *T. brucei* es transcrito por la RNA pol III, y no por la RNA pol II (Fantoni et al., 1994). Con respecto al RNA donador del miniexón, en *Leishmania tarentolae* es sintetizado por la RNA pol II (Saito et al., 1994), mientras que en *T. brucei* es transcrito por la RNA pol III (Grondal et al., 1989). Por otra parte, la subunidad mayor de la RNA pol II de *T. brucei* no presenta en su extremo carboxilo las secuencias repetidas de heptapéptidos características de esta enzima en otros eucariontes (Smith et al., 1989).

Nuestro interés principal de estudio en *T. cruzi* ha estado dirigido hacia el análisis de la organización genómica y el control de la expresión de los genes del RNA ribosomal del parásito.

Genes de RNA ribosomal

Las moléculas de RNA ribosomal son componentes estructurales y funcionales de los ribosomas, partículas ribonucleoproteicas encargadas de la síntesis de proteínas. Los ribosomas procariontes y eucariontes son muy similares en forma y función, y en ambos tipos de organismos están compuestos por una subunidad grande y una pequeña. En los ribosomas procariontes (70S), el RNAr 16S forma parte de la subunidad menor (30S), mientras que los RNAr 23S y 5S forman la subunidad ribosomal mayor (50S). Los ribosomas procariontes están constituidos, además, por más de 50 proteínas ribosomales (Nomura, 1990). En células eucariontes los ribosomas (80S) son más grandes y contienen más componentes. En éstos, la subunidad menor (40S) está formada por el RNAr 18S y 33 proteínas diferentes, mientras que la subunidad mayor (60S) está integrada por los RNAr 28S, 5.8S y 5S, unidos a más de 40 proteínas (Warner, 1989).

En eucariontes, los genes que codifican para las moléculas 18S, 5.8S y 28S forman la unidad de RNAr (también conocida como operón o cistrón de RNAr) y se transcriben juntos, en un RNA precursor común. Dicho precursor incluye espaciadores transcritos internos (ETI) y espaciadores transcritos externos (ETE), los cuales son eliminados durante el procesamiento que dará origen a las moléculas de RNAr maduras (figura 3). El número de copias de la unidad ribosomal presente en células eucariontes varía entre 100 y 5000. Dichas copias están normalmente organizadas en tándem, separadas entre sí por espaciadores intergénicos

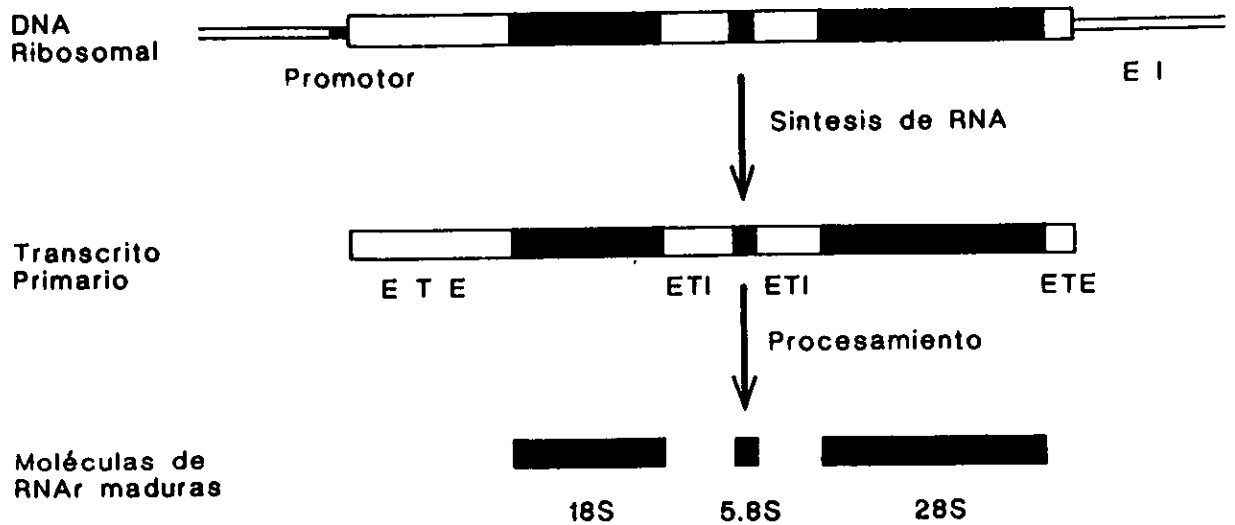


Figura 3. Síntesis y procesamiento del transcrito primario del rRNA. EI: espaciador intergénico. ETE: espaciadores transcritos externos. ETI: espaciadores transcritos internos.

de 2 a 30 kb, y pueden localizarse en uno o más cromosomas o en elementos extracromosomales (Sollner-Webb y Tower, 1986).

Como se mencionó anteriormente, la RNA pol I es la encargada de la transcripción del locus del RNAr (Sollner-Webb y Mougey, 1991). Tanto la transcripción como el procesamiento del transcrito primario se llevan a cabo en los centros fibrilares y el componente fibrilar denso del nucléolo (Shaw y Jordan, 1995). Las regiones codificadoras del RNAr 5S generalmente no forman parte del cistrón ribosomal, sino que constituyen un locus independiente, transcrito por la RNA polimerasa III. En *Saccharomyces cerevisiae* los genes del RNAr 5S se encuentran en los espaciadores intergénicos del cistrón de RNAr, pero son transcritos en orientación opuesta a la unidad ribosomal (Planta y Raué, 1988).

Los protozoarios de la familia Trypanosomatidae presentan una unidad de RNAr con una organización muy compleja. En ella, un extenso procesamiento del RNAr 28S produce 6 moléculas de RNAr independientes: 24S α , 24S β , S1, S2, S4 y S6 (Spencer et al., 1987; Hernández et al., 1988). La organización de los genes de estas moléculas de RNAr se presenta en la figura 4. El análisis de secuencia y estructura secundaria de las seis moléculas de RNAr ha permitido establecer su analogía con los distintos dominios del RNAr 28S típico, encontrándose, por ejemplo, que las moléculas S2, S6 y S4 son análogas al dominio VII de la molécula 28S, mientras que la molécula S1 corresponde a la parte central del dominio IV (White et al., 1996). Además, la molécula S3 es equivalente al RNAr 5.8S, y la molécula S5 corresponde al RNAr 5S. En

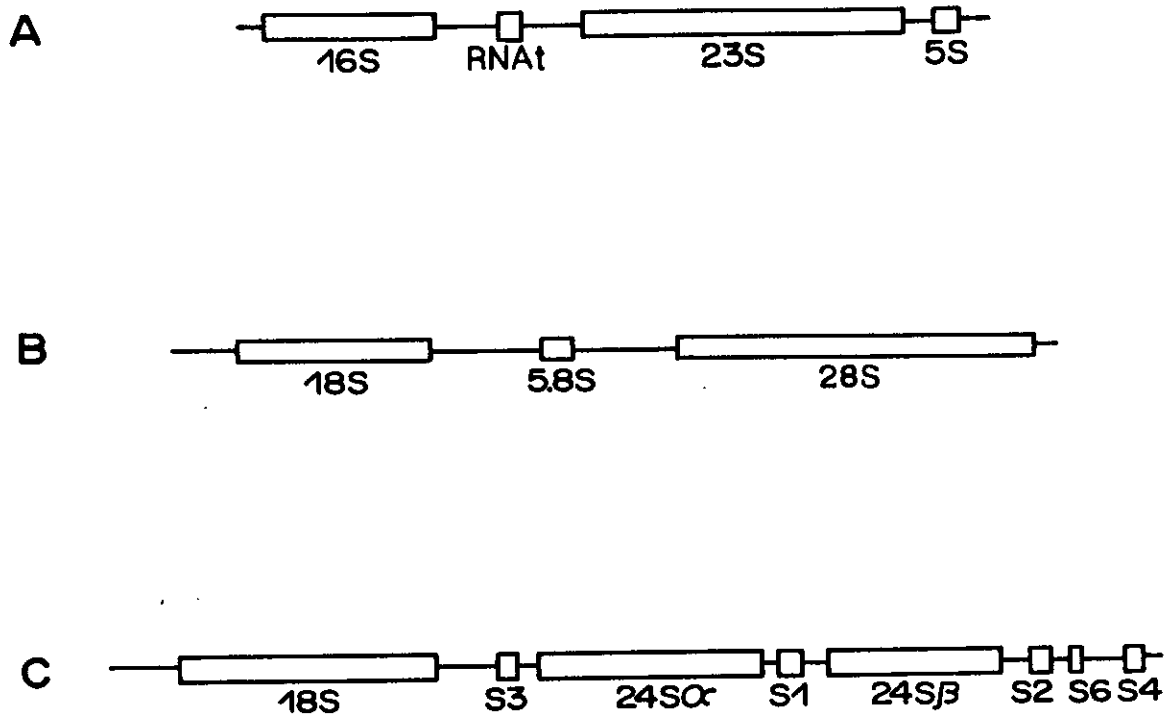


Figura 4. Organización genómica de la unidad de RNA ribosomal de *Escherichia coli* (A), *Xenopus laevis* (B) y *Trypanosoma cruzi* (C).

los tripanosomas, como en la mayoría de los eucariontes, el RNAr S5 no forma parte de la unidad de transcripción (Hernández-Rivas et al., 1992).

Los RNAr son los transcritos más abundantes de una célula, llegando a constituir más del 80% del RNA total celular. La producción del RNAr se incrementa o disminuye, en concierto con los cambios en las condiciones fisiológicas celulares. Esta regulación en la síntesis del RNAr es un mecanismo importante que controla, a su vez, la síntesis de los ribosomas (Reeder, 1992; Gourse et al., 1996). Por ello resulta muy importante el análisis de las regiones promotoras de los genes del RNAr.

Secuencias promotoras de la unidad de RNAr

En contraste con los promotores de los genes transcritos por las RNA polimerasas II y III, el análisis de secuencia nucleotídica en las regiones promotoras de los genes de RNAr en diferentes organismos ha revelado que en ellos no se presentan dominios conservados (Sommerville, 1984). Sólo entre organismos muy relacionados existe similitud en los promotores del RNAr (Balzi et al., 1985). Quizá como consecuencia de la disparidad en las secuencias promotoras, la transcripción del RNAr es especie-específica; esto significa que el promotor de una especie no es reconocido por la maquinaria transcripcional de otra especie (Grummt et al., 1982).

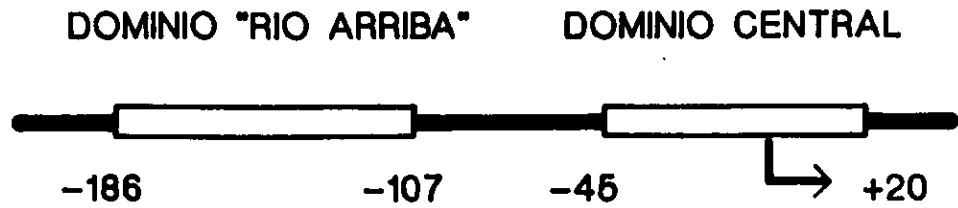
A pesar de las diferencias en secuencia nucleotídica, casi todos los promotores del RNAr analizados hasta hoy presentan una organización estructural común: están formados por un dominio central y un dominio "río

arriba" (Sollner-Webb y Mougey, 1991; Xie et al., 1991; Young Choe et al., 1992) (figura 5A). En células humanas, por ejemplo, el dominio central se extiende del nucleótido +20 al -45, incluyendo el sitio de inicio de la transcripción (+1), y contiene secuencias esenciales para el inicio correcto de la transcripción. El dominio "río arriba" abarca del nucleótido -107 al -186, e incluye secuencias que activan la transcripción (Haltiner et al., 1986; Ishikawa et al., 1991) (figura 5A). La función del dominio "río arriba" se afecta al modificar su distancia u orientación con respecto al dominio central, lo que sugiere que estas dos secuencias de control operan en conjunto para promover una eficiente transcripción por la RNA pol I (Bell et al., 1988).

En los espaciadores intergénicos de las unidades de RNAr suelen presentarse secuencias repetidas, cuyo tamaño y reiteración varían de una especie a otra (Reeder, 1984 y 1990). En algunos casos, la secuencia nucleotídica del elemento repetido puede presentar cierta similitud con la región promotora de la unidad ribosomal (Labhart y Reeder, 1984). En prácticamente todos los organismos analizados, como *Xenopus* y ratón, ha sido demostrado que los elementos repetidos tienen la habilidad de unir factores de transcripción de la RNA pol I, y que funcionan como activadores de la transcripción (Reeder, 1984; Zentgraf y Hemleben, 1992).

Para que la RNA pol I pueda comenzar la transcripción del RNAr se requiere la presencia de un complejo de iniciación, que en vertebrados está formado por las proteínas UBF (upstream binding factor) y SL1 (selectivity factor) (figura 5B). UBF, formado por dos polipéptidos de 94 y 97 kDa,

A



B

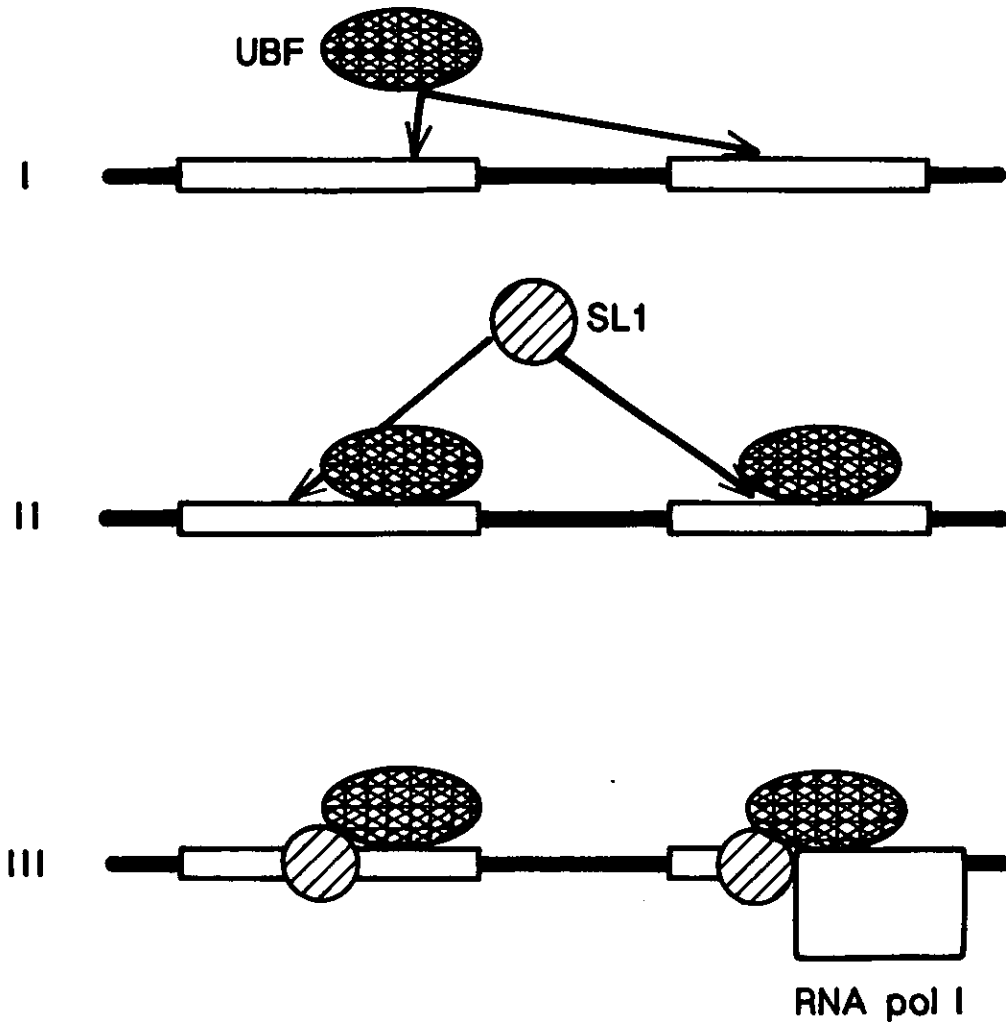


Figura 5. A) Estructura de la región promotora de la unidad de RNAr. La flecha en el dominio central indica el sitio de inicio de la transcripción. B) Los factores UBF y SL1 forman el complejo de iniciación de la transcripción de la RNA pol I.

pertenece a una familia de proteínas que se caracteriza por presentar cajas HMG, que son dominios de unión a ácidos nucleicos (Jantzen et al., 1990). Por su parte, SL1 es un complejo formado por la proteína TBP (TATA-binding protein) y tres factores denominados TAFs (TBP associated factors) (Comai et al., 1992). UBF tiene la capacidad de unirse a los dos dominios del promotor. Posteriormente, SL1 interactúa con UBF, y el complejo resultante es reconocido por la RNA pol I, iniciándose entonces la transcripción (figura 5B).

En células de ratón, la proteína PAF53 está también involucrada en la formación del complejo de iniciación, al mediar la interacción entre la RNA pol I y UBF (Hanada et al., 1996). Además, también en células de ratón han sido caracterizados otros factores que se unen a la RNA pol I, como TIF-IA y TIF-IC, los cuales están involucrados en la regulación de la síntesis del RNAr (Smith et al., 1990; Schnapp et al., 1991).

En la cepa mexicana C4 de *T. cruzi*, recientemente caracterizamos el espaciador transcrito externo del extremo 5' de la unidad de RNAr, y localizamos un sitio de inicio de la transcripción a 1768 pb del gene del RNAr 18S (Martínez-Calvillo y Hernández, 1994). Este sitio de inicio de la transcripción se ubicó 270 pb "río arriba" de un sitio de inicio de la transcripción previamente localizado en una cepa brasileña (Dietrich et al., 1993). Dada su localización con respecto a la región codificadora del RNAr 18S, decidimos denominar promotor proximal al reportado en la cepa brasileña, y promotor distal al localizado en la cepa mexicana (Martínez-Calvillo y Hernández, 1994). Al comparar la secuencia nucleotídica que

flanquea al sitio de inicio de la transcripción de la unidad ribosomal de varios grupos de organismos, encontramos que entre los tripanosomas se presentan las mayores diferencias.

Continuando con el análisis del promotor del RNAr de *T. cruzi*, en el presente trabajo demostramos que las secuencias de DNA que contienen el sitio de inicio de la transcripción pueden dirigir eficientemente la expresión de un gene reportero. También encontramos que *T. cruzi* presenta proteínas nucleares que específicamente se unen a la secuencia promotora del RNAr. Asimismo, reportamos la construcción de un vector de expresión para *T. cruzi* con el promotor ribosomal, y presentamos el análisis de las células transformadas con él.

RESULTADOS

Los resultados de esta tesis se presentan en forma de un artículo y un manuscrito. En una última sección se presentan resultados adicionales.

Artículo

pRIBOTEX expression vector: a pTEX derivative for a rapid selection of *Trypanosoma cruzi* transfectants.

Manuscrito

A. *Trypanosoma cruzi* ribosomal RNA gene promoter fragment forms a specific complex with nuclei derived proteins.

pRIBOTEX expression vector: a pTEX derivative for a rapid selection of *Trypanosoma cruzi* transfectants

Santiago Martínez-Calvillo, Imelda López, Roberto Hernández *

Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Apartado Postal 70-228,
04510 México, D.F., México

Received 21 March 1997; accepted 2 June 1997; Received by A. Bernardi

Abstract

To improve the selection phenotype of the expression plasmid pTEX, a *Trypanosoma cruzi* rDNA (DNA coding for rRNA) gene spacer fragment (806 bp) containing a mapped transcription start point (*tsp*) was cloned in the vectors pTEX and pTEX-*cat*, generating the plasmids pRIBOTEX and pRIBOTEX-*cat*. *T. cruzi* cultures transiently transfected with pRIBOTEX-*cat* expressed a chloramphenicol (Cm) acetyltransferase (CAT) activity 16 000-fold greater than the activity observed with the parental vector pTEX-*cat*. Moreover, *T. cruzi* cells transformed with pRIBOTEX and pRIBOTEX-*cat* exhibited logarithmic growth in the presence of Geneticin (G418) 2 weeks earlier than that observed with controls transformed with pTEX. The plasmid copy number in stably transformed trypanosomes was about 50-times higher in cultures transformed with pTEX-*cat* than in cells transformed with pRIBOTEX or pRIBOTEX-*cat*. However, the *neo* RNA steady-state level and the CAT activity observed among the stably transfected cultures showed only modest differences. Finally, it was found that the pRIBOTEX vector was not episomally maintained as pTEX, but integrated into a chromosome indistinguishable from the one encoding rRNA. These features make pRIBOTEX a useful tool for transfection and rapid expression of genes in *T. cruzi*. © 1997 Elsevier Science B.V.

Keywords: Electroporation; DNA transfection; Transcription; Trypanosome transformation; RNA polymerase I

1. Introduction

Trypanosoma cruzi is a kinetoplastid protozoa of both medical and biological importance. It is the etiological agent of Chagas disease, which affects several million people in Mexico, Central and South America. All kinetoplastids analyzed to date present atypical and fascinating mechanisms of gene expression such as RNA editing of mitochondrial genes (Stuart, 1991) and polycistronic transcription with *trans*-splicing of a 39-nt capped mini-exon sequence to nuclear pre-mRNAs (Graham, 1995). Recent progress in gene expression research within kinetoplastids has been sustained by the development of transfection techniques (Bellofatto and Cross, 1989; Laban and Wirth, 1989). In the case of *T. cruzi*, transient (Lu and Buck, 1991), stable (Kelly et al.,

1992; Hariharan et al., 1993; Otsu et al., 1993; Cooper et al., 1993) and stage-specific (Thomas and González, 1997) vectors have been reported. Among them, pTEX is a multipurpose cloning vector that has been widely used to express genes in *T. cruzi* (Kelly et al., 1992). With the goal of improving the selection phenotype of pTEX, we replaced the upstream region from the glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase encoding genes (*gapdh*) of this plasmid with a DNA fragment bearing a previously mapped *tsp* from the rRNA genes (Martínez-Calvillo and Hernández, 1994). The resultant derivative pRIBOTEX is here analyzed in transient and stably transformed *T. cruzi* cells. pRIBOTEX permits a high transient expression of a reporter gene and a rapid drug selection time, which makes it a useful vector for a wide variety of purposes.

2. Results and discussion

2.1. Construction of the pRIBOTEX vector

The vector pTEX and its derivative pTEX-*cat* were described as *T. cruzi* expression vectors constructed with

* Corresponding author. Tel.: +52 5 6223872; Fax: +52 5 5500048; e-mail: robheria@servidor.unam.mx

Abbreviations: CAT, Cm acetyltransferase; Cm, chloramphenicol; *cat*, gene encoding CAT; G418, Geneticin; *neo*, neomycin-resistance encoding gene; rDNA, DNA coding for rRNA; rRNA, ribosomal RNA; *T.*, *Trypanosoma*; *tsp*, transcription start point.

the aid of sequences derived from the flanking regions of the *gapdh* genes: upstream, intergenic and downstream sequences (Fig. 1), plus the *neo* gene as a selectable marker (Kelly et al., 1992). To improve the selection phenotype of pTEX we replaced the *gapdh* upstream region with a DNA restriction fragment that includes a mapped *tsp* for the rRNA. sequence spanning -328 (*Sac*I) to +478 (*Hinc*II) (Martinez-Calvillo and

Hernández, 1994; GenBank accession number L13926). Downstream from the rRNA *tsp* are several sequence motifs of AG preceded by a short pyrimidine tract. Since we considered that these motifs could potentially function as 3' splice leader acceptor sites for genes cloned in the polylinker (Huang and Van der Ploeg, 1991), no other elements were added to the construct with this aim. The resultant plasmid pRIBOTEX retains

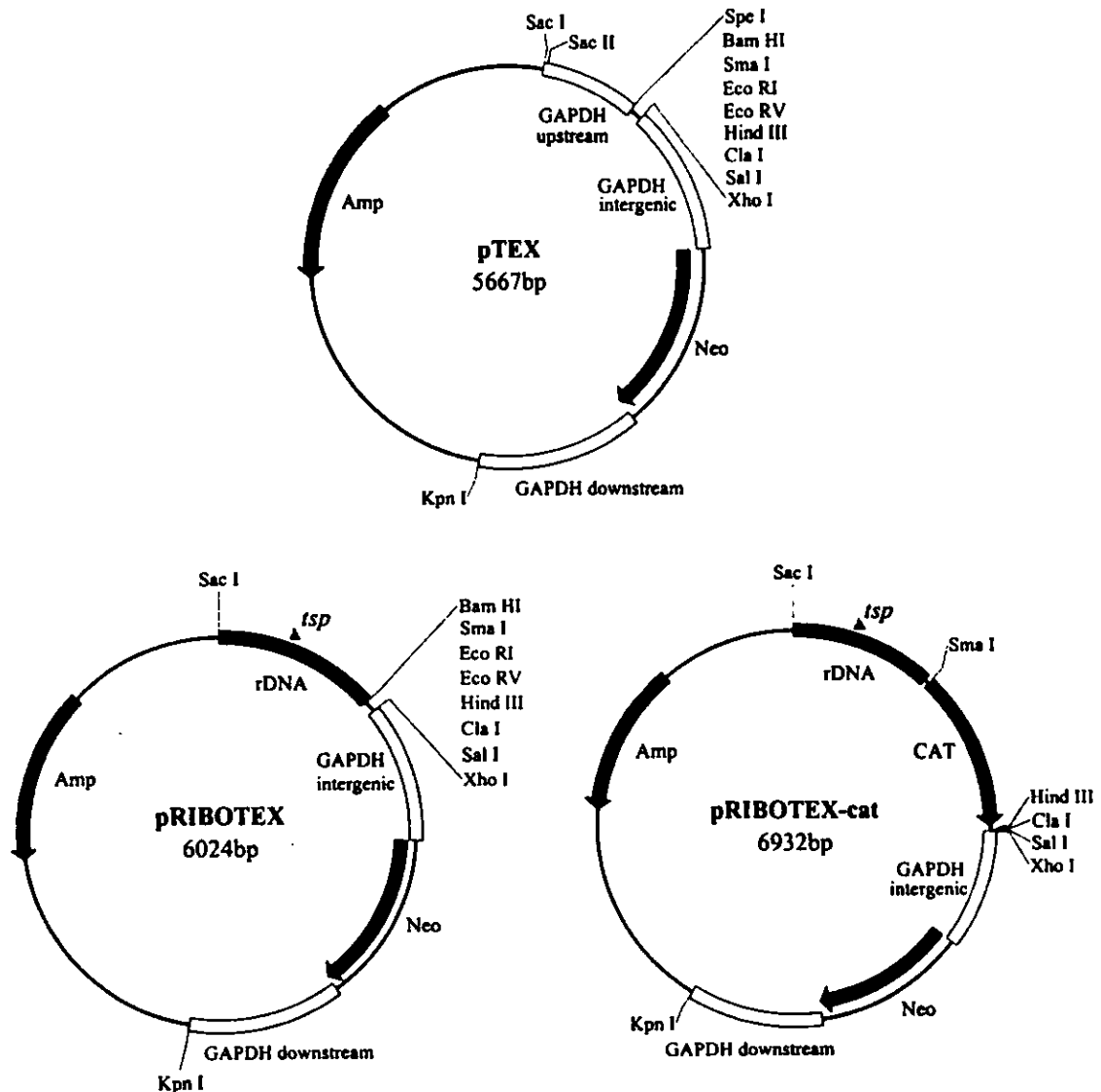


Fig. 1. Restriction map and genetic elements of pTEX, pRIBOTEX and pRIBOTEX-cat. pRIBOTEX is a plasmid derived from the pTEX vector (Kelly et al., 1992). The difference with pTEX is a replacement of the *gapdh* upstream sequence present in the parental plasmid with a DNA fragment that includes a mapped transcription start point (*tsp*) from the *T. cruzi* rRNA gene (Martinez-Calvillo and Hernández, 1994). The *gapdh* upstream region (449 bp) was removed by serial *Spe*I digestion, end-filling by Klenow and *Sac*I cut. On the other hand, an 806 bp rDNA spacer fragment bearing the *tsp* was generated from our genomic clone pRTC20 (Martinez-Calvillo and Hernández, 1994) by *Sac*I and *Hinc*II digestions. The latter was ligated into the double digested pTEX in a forced 5'-3' polarity, upstream from the multiple cloning site. Convenient single restriction sites are shown. The *Spe*I restriction site was destroyed when cloning the rDNA fragment. The complete sequence of pRIBOTEX was deposited in GenBank under the Accession No. AF005420. An identical parallel construction was carried out to generate pRIBOTEX-cat, using pTEX-cat as the parental vector, which contains a *cat* gene cloned into the *Sma*I/*Hind*III sites in the polylinker (Kelly et al., 1992). The *Bam*HI site in pRIBOTEX-cat is not unique.

the *neo* gene flanked by the *gaph* intergenic and downstream sequences. These sequences contribute the signals for *neo* trans-splicing and polyadenylation, respectively (Fig. 1).

2.2. pRIBOTEX shortens the selection time of *T. cruzi* transfectants

The growth of G418 resistant cells was compared among epimastigotes electroporated with pTEX, pRIBOTEX and mock-transfected cells as a negative control. Fig. 2 shows that cells electroporated with pRIBOTEX start the logarithmic phase of growth about 2 weeks earlier than cells electroporated with pTEX. A faster phenotypic selection of this sort was also observed in cultures transfected with pRIBOTEX-*cat* (data not shown). The experimental comparison of the drug selection time of transfectants sustained by pRIBOTEX vs other published vectors is beyond the scope of this work. Nevertheless, the selection time for other vectors has been reported to occur by day 20 after electroporation (Hariharan et al., 1993; Thomas and González, 1997).

Expression of *cat* under transient conditions shows that cells electroporated with pRIBOTEX-*cat* express an enzymatic activity of about 16 000-fold over that observed in cells transfected with the parental plasmid pTEX-*cat* (Table 1). The CAT assays were conducted

Table 1
CAT activities of *T. cruzi* transformants^a

Vector	Transient ^b expression
pRIBOTEX- <i>cat</i>	23 164.00 20 698.00 24 520.00
pTEX- <i>cat</i>	1.64 1.06 1.48
pRIBOTEX ^c	0.17 0.16 0.15

^aValues represent cpm/ μ g of cell extracts/h of incubation at 37°C. To prepare the cell extracts, transformed cells were collected by centrifugation and washed with TEN (40 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM EDTA pH 8.0 and 15 mM NaCl). The cellular pellet was resuspended in 150 μ l of 25 mM Tris-HCl pH 8.0, and lysed with three freeze-thaw cycles. Samples were incubated at 65°C for 10 min, and cell debris was removed by microfuge centrifugation (4°C, 10 min). CAT activity was assayed essentially as described by Seed and Sheen (1988), with ³H-labeled Cm (32 Ci/mmol; Du Pont-NEN), under linear conditions for both protein concentration and reaction time. Generally, the reaction was carried out with 0.4 μ g of total protein for 2 h at 37°C. After incubation, reactions were twice extracted with xylene and the product was quantified by scintillation counting.

^bCAT assays carried out 60 h after electroporation (data from three independent electroporations).

^cNegative control.

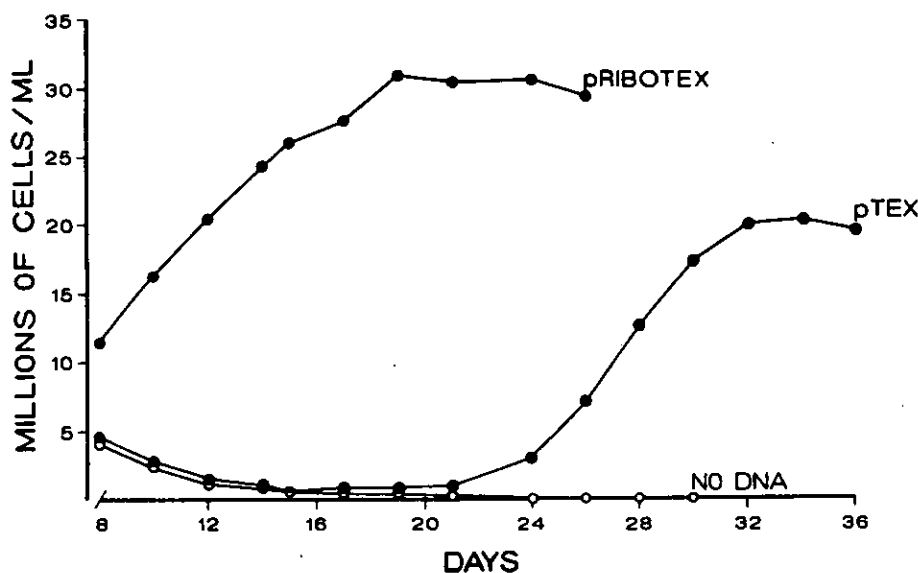


Fig. 2. Drug selection of *T. cruzi* cultures after plasmid electroporation. Growth kinetics are shown for epimastigote cultures electroporated either with plasmid pRIBOTEX, pTEX or mock transfected cells (no DNA) as negative control. Time point 0, not shown in the scale, corresponds to the day when the drug (G418 at 250 μ g/ml) was added to the transfected cultures. Electroporation of epimastigotes from clone CL Brener was performed according to Hariharan et al. (1993) with the following changes: cells were washed once in Zimmerman postfusion medium (Bellofatto and Cross, 1989), and resuspended in the same medium at a concentration of 6×10^8 cells/ml. 100 μ g of supercoiled plasmid DNA (QIAGEN purified) in 50 μ l of TE (10 mM Tris pH 7.4 and 1 mM EDTA) were added to 0.4 ml of the cell suspension in 0.2 cm gap cuvettes. The cells were electroporated with a single discharge of 360 V, 1500 μ F and 13 Ω , using a BTX600 Electro Cell Manipulator (BTX). The electroporated cells were diluted into 10 ml of LIT culture medium (Camargo, 1964) and incubated at 28°C. 60 h later, 1.5 ml of the cultures were brought up to 5.5 ml of LIT medium containing G418 at 250 μ g/ml for the selection of stable transformants, and the rest of the culture was used for transient CAT assays.

under linear conditions for both reaction time and protein concentration. The comparison of CAT activity against the background suggests that the *T. cruzi* rRNA gene promoter could be stronger than previously estimated. (Tyler-Cross et al., 1995). Nevertheless, the different figures obtained by both groups could also be due to differences in experimental protocols and/or *cat* flanking sequences.

The strong transient expression of a reporter gene sustained by pRIBOTEX indicates that this vector may be a useful tool for gene expression and/or protein analysis in *T. cruzi* shortly after transfection. On the other hand, when CAT assays were carried out from stably transfected cellular lines, the enzymatic activities indicated similar values with both pTEX-*cat* and pRIBOTEX-*cat* (figures around 30 000–40 000 cpm/ μ g of cell extracts per h). Nevertheless, by this time the vector gene dosage was found to be quite different among these stable transfectants (see Section 2.3).

2.3. Molecular characterization of stably transformed trypanosomes

To compare the *neo* gene dosage in epimastigotes stably transfected with pRIBOTEX, pRIBOTEX-*cat* and pTEX-*cat*, Southern blots were carried out. Fig. 3A and B shows a remarkably different *neo* gene abundance among cells transfected with pTEX-*cat* (lanes 2) and

both pRIBOTEX (lanes 3) and pRIBOTEX-*cat* (lanes 4). The cultures transformed with pTEX-*cat* had about 50-fold *neo* gene sequences when compared when cultures transformed with pRIBOTEX or pRIBOTEX-*cat*, as analyzed by slot blot hybridization and liquid scintillation radioactive counting (data not shown). The DNA used in the Southern experiment (Fig. 3A and B) was digested with *Sac*I which cuts once in the three vectors (Fig. 1). Lanes 3 and 4 show that DNA from cultures transformed with pRIBOTEX and pRIBOTEX-*cat* hybridize mainly with a band that corresponds to the linearized vector, although two additional and less intense bands can be seen in both lanes. This suggests the integration of a tandemly amplified vector molecule. On the other hand, pTEX was originally described as an episomal vector. A shorter exposure time of the Southern blot showed that the major hybridization signal corresponds to the size of the linearized vector (data not shown), although several other bands could be seen. These might represent integration and/or plasmid rearrangements (see Section 2.4).

The *neo* RNA steady-state level from transfected cultures was analyzed by northern blot hybridizations (Fig. 3C and D). Taking into account the remarkably different *neo* gene abundance observed in these cultures (Fig. 3B), the *neo* RNA differences are modest. These observations reinforce the previous concept that the rDNA promoter is a strong promoter in trypanoso-

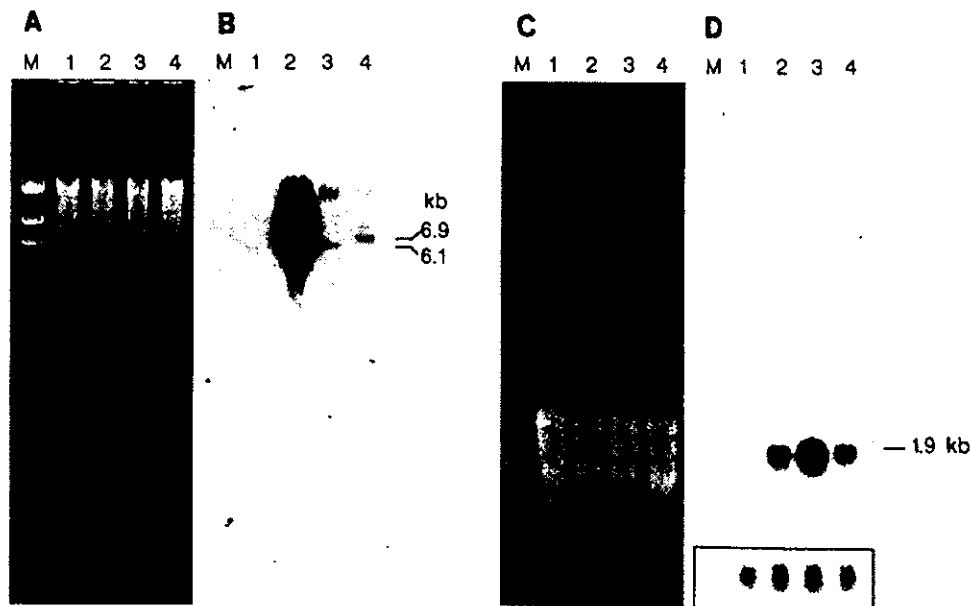


Fig. 3. Southern and Northern hybridization analysis of *T. cruzi* transfectants. *Sac*I digested genomic DNA and total RNA were prepared and analyzed from epimastigotes stably transformed with pTEX-*cat* (lanes 2), pRIBOTEX (lanes 3) and pRIBOTEX-*cat* (lanes 4). Samples from non-transformed trypanosomes were loaded in lane 1 as negative controls. λ *Hind*III digests (A and B) and the 0.24–9.5 kb RNA ladder (GIBCO BRL) (C and D) were used as size standards (lanes M). Both Southern (B) and Northern (D) membranes were hybridized with a *Pst*I restriction fragment (197 bp) from the *neo* gene as a radioactive probe. Ethidium bromide staining of the gels are presented in (A) and (C) to show equal loading. In the case of the Northern blot, the RNA loading was further characterized by hybridization to an unpublished S4 ribosomal protein gene probe (inset at the bottom of D). Total cellular RNA was isolated by a single-step method (Chomczynski and Sacchi, 1987). *T. cruzi* DNA was isolated by a mini-preparation technique (Medina-Acosta and Cross, 1993). Southern and Northern blot experiments were performed by standard techniques.

matids (Janz and Clayton, 1994). Furthermore, the fast G418 phenotypic selection observed in epimastigotes transformed with pRIBOTEX (Fig. 2) reflects a strong early expression of the *neo* gene.

2.4. Chromosomal analysis of transfected cells

The plasmids pTEX and pTEX-*cat* were originally described as episomal vectors (Kelly et al., 1992). To investigate whether the derivative plasmids pRIBOTEX and pRIBOTEX-*cat* were present episomally or integrated into chromosomes, a pulse field gel electrophoretic analysis was carried out. Chromosomal preparations from trypanosomes transformed with pTEX-*cat* exhibited the vast majority of *neo* hybridization signal in the gel origin (Fig. 4A, lane 1), which is consistent with the occurrence of large circular episomal elements (Kelly et al., 1992). Nevertheless, additional hybridization bands were observed which could reflect site-specific integration into the *gapdh* locus and/or random rearrangements in the genome. In the cases when cells were transformed with pRIBOTEX and pRIBOTEX-*cat*, the *neo* gene was localized in a chromosomal sized band (Fig. 4A, lanes 2 and 3). This suggests the integration of the vector into one chromosomal site, as previously suggested in the Southern analysis (Section 2.3). Interestingly, this chromosome has the

same electrophoretic position as that observed with a rDNA probe (Fig. 4B). When this blot was washed and re-hybridized with the *gapdh* intergenic region, a single band (1200 kb) corresponding to the *gapdh* genomic locus was evidenced in the non-transformed cells (Fig. 4C, lane 4). Both pRIBOTEX and pRIBOTEX-*cat* transformed cells show the *gapdh* genomic locus plus a second band (1400 kb) indicating the position of the integrated vector (Fig. 4C, lanes 2 and 3). It is thus likely that the rDNA sequence cloned in pRIBOTEX is driving the vector to integrate into the rDNA locus, even when electroporated as supercoiled plasmid. Moreover, the rDNA fragment cloned in the plasmids bears one copy of a rRNA locus-specific repetitive element of 172 bp that could enhance recombination (Pulido et al., 1996). The integration of these plasmids was also evidenced by the fact that we were unable to recover them using the method described by Hirt (1967), which isolates low molecular weight DNA (data not shown). On the other hand, pTEX-*cat* was efficiently recovered with the Hirt procedure: Southern hybridization bands from the Hirt DNA were virtually identical to those observed from the original total DNA extracted from pTEX-*cat* transformed cells (data not shown). The integration of circular transforming plasmids into the *T. cruzi* genome, although not common (Otsu et al., 1993; Nozaki and Cross, 1994; La Flamme et al., 1996),

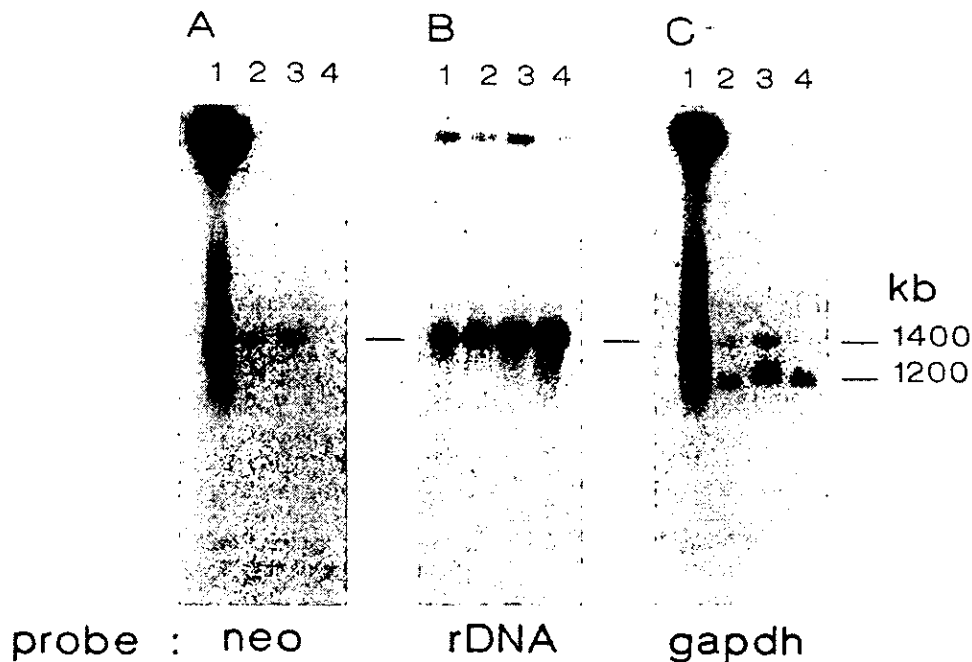


Fig. 4. Chromosomal analysis of *T. cruzi* transfectants. Chromosomes from *T. cruzi* cells transformed with pTEX-*cat* (lane 1), pRIBOTEX (lane 2) and pRIBOTEX-*cat* (lane 3) were separated under transverse alternating field electrophoresis. Chromosomes from non-transformed trypanosomes were analyzed in lane 4. Southern blots were hybridized with a *neo* probe (A), a rDNA fragment from the small subunit coding region (B), or with the *gapdh* intergenic fragment present in pTEX and pRIBOTEX (C). Samples depicted in (A) and (B) were run in parallel in the same gel. The filter shown in (C) corresponds to the one depicted in (B), hybridized after having stripped the rRNA gene probe by boiling in 10 mM EDTA pH 8 and 0.1% SDS, with three changes of buffer. The embedding of parasites for DNA plugs and chromosomal pulse field electrophoretic analysis was carried out as previously described (Hernández-Rivas et al., 1992). *Sacharomyces cerevisiae* chromosomes were used as size standards.

has been reported to occur by homologous recombination (Hariharan et al., 1993). Detailed analysis of the integration site falls out of the scope of this communication, but it is likely that the integrative feature of pRIBOTEX can provide additional stability to the transformants.

2.5. Conclusions

- (1) The upstream region of the *gapdh* encoding genes cloned in the expression vectors pTEX and pTEX-*cat* was replaced with a region carrying the rDNA *tsp*, rendering the derivative plasmids pRIBOTEX and pRIBOTEX-*cat*.
- (2) In transient assays, *T. cruzi* cultures transformed with the derivative plasmid pRIBOTEX-*cat* express about 16 000-fold CAT activity as compared with cultures transformed with the parental vector pTEX-*cat*.
- (3) The pRIBOTEX vectors shorten the selection time of *T. cruzi* stable transformants by 2 weeks.
- (4) The pRIBOTEX vectors stably integrate into a chromosome with an electrophoretic mobility identical to that encoding the rDNA genes.
- (5) These features of pRIBOTEX together with the presence of a multiple cloning site, make this vector a useful tool for a rapid expression of genes in *T. cruzi* cells.

Acknowledgement

We acknowledge John M. Kelly his kind gift of plasmids pTEX and pTEX-*cat*. This work was partially supported by grants from Dirección General de Asuntos del Personal Académico, Universidad Nacional Autónoma de México (IN502495) and Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (1120-PM), to R.H.

References

- Belofatto, V., Cross, G.A.M., 1989. Expression of a bacterial gene in a trypanosomatid protozoan. *Science* 244, 1167–1169.
- Carnargo, E.P., 1964. Growth and differentiation in *Trypanosoma cruzi*. I. Origin of metacyclic trypanosomes in liquid medium. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo* 6, 220–224.
- Chomczynski, P., Sacchi, N., 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 162, 156–159.
- Cooper, R., Ribeiro de Jesus, A., Cross, G.A.M., 1993. Deletion of an immunodominant *Trypanosoma cruzi* surface glycoprotein disrupts flagellum-cell adhesion. *J. Cell Biol.* 122, 149–156.
- Graham, S.V., 1995. Mechanisms of stage-regulated gene expression in Kinetoplastida. *Parasitol. Today* 11, 217–223.
- Hariharan, S., Ajioka, J., Swindle, J., 1993. Stable transformation of *Trypanosoma cruzi*: inactivation of the PUB12.5 polyubiquitin gene by targeted gene disruption. *Mol. Biochem. Parasitol.* 57, 15–30.
- Hernández-Rivas, R., Martínez-Calvillo, S., Romero, M., Hernández, R., 1992. *Trypanosoma cruzi* 5S rRNA genes: molecular cloning, structure and chromosomal organization. *FEMS Microbiol. Lett.* 92, 63–68.
- Hirt, B., 1967. Selective extraction of polyoma DNA from infected mouse cell cultures. *J. Mol. Biol.* 26, 365–369.
- Huang, J., Van der Ploeg, L.H.T., 1991. Requirement of a polypyrimidine tract for trans-splicing in trypanosomes: discriminating the PARP promoter from the immediately adjacent 3' splice acceptor site. *EMBO J.* 10, 3877–3885.
- Janz, L., Clayton, C., 1994. The PARP and rRNA promoters of *Trypanosoma brucei* are composed of dissimilar sequence elements that are functionally interchangeable. *Mol. Cell. Biol.* 14, 5804–5811.
- Kelly, J.M., Ward, H.M., Miles, M.A., Kendall, G., 1992. A shuttle vector which facilitates the expression of transfected genes in *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania*. *Nucleic Acids Res.* 20, 3963–3969.
- Laban, A., Wirth, D.F., 1989. Transfection of *Leishmania enriettii* and expression of chloramphenicol acetyltransferase gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 9119–9123.
- La Flamme, A.C., Buckner, F.S., Swindle, J., Ajioka, J., Van Voorhis, W.C., 1996. *Trypanosoma cruzi*: expression of interleukin-2 utilizing both supercoiled plasmids and linear DNAs. *Exp. Parasitol.* 83, 159–163.
- Lu, H., Buck, G.A., 1991. Expression of an exogenous gene in *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. *Mol. Biochem. Parasitol.* 44, 109–114.
- Martínez-Calvillo, S., Hernández, R., 1994. *Trypanosoma cruzi* ribosomal DNA: mapping of a putative distal promoter. *Gene* 142, 243–247.
- Medina-Acosta, E., Cross, G.A.M., 1993. Rapid isolation of DNA from trypanosomatid protozoa using a simple 'mini-prep' procedure. *Mol. Biochem. Parasitol.* 59, 327–330.
- Nozaki, T., Cross, G.A.M., 1994. Functional complementation of glycoprotein 72 in a *Trypanosoma cruzi* glycoprotein 72 null mutant. *Mol. Biochem. Parasitol.* 67, 91–102.
- Otsu, K., Donelson, J.E., Kirchhoff, L.V., 1993. Interruption of a *Trypanosoma cruzi* gene encoding a protein containing 14-amino acid repeats by targeted insertion of the neomycin phosphotransferase gene. *Mol. Biochem. Parasitol.* 57, 317–330.
- Pulido, M., Martínez-Calvillo, S., Hernández, R., 1996. *Trypanosoma cruzi* rRNA genes: a repeated element from the non-transcribed spacer is locus-specific. *Acta Trop.* 62, 163–170.
- Seed, B., Sheen, J., 1988. A simple phase-extraction assay for chloramphenicol acyltransferase activity. *Gene* 67, 271–277.
- Stuart, K., 1991. RNA editing in trypanosomatid mitochondria. *Annu. Rev. Microbiol.* 45, 327–344.
- Thomas, M.C., González, A., 1997. A transformation vector for stage-specific expression of heterologous genes in *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. *Parasitol. Res.* 83, 151–156.
- Tyler-Cross, R.E., Short, S.L., Floeter-Winter, L.M., Buck, G.A., 1995. Transient expression mediated by the *Trypanosoma cruzi* rRNA promoter. *Mol. Biochem. Parasitol.* 72, 23–31.

Datos no mostrados en el artículo

Probables sitios aceptores del miniexón en el fragmento de DNA ribosomal

Los sitios aceptores del miniexón están formados por un dinucleótido AG antecedido por una pequeña región rica en pirimidinas. En la figura 6 se muestra la secuencia del fragmento de DNA de 806 pb presente en pRIBOTEX y pRIBOTEX-*cat*. Como puede apreciarse en la secuencia, el fragmento de DNA contiene 16 dinucleótidos AG después del sitio de inicio de la transcripción. Muchas de las secuencias AG se localizan cerca de zonas ricas en T y/o C, por lo que potencialmente podrían funcionar como sitios aceptores del miniexón.

Crecimiento de cultivos transfectados con pRIBOTEX-*cat*

La figura 7 muestra la cinética de crecimiento de cultivos de *T. cruzi* transfectados con pRIBOTEX-*cat* y pTEX-*cat*, en presencia de G418. Tal como ocurre con pRIBOTEX y pTEX (fig. 2 del artículo), las células transfectadas con pRIBOTEX-*cat* comienzan a crecer alrededor de dos semanas antes que las células electroporadas con pTEX-*cat*.

Abundancia relativa de los vectores de expresión en las células transformadas

Con el objeto de analizar la abundancia relativa de los vectores de expresión en los cultivos electroporados, llevamos a cabo un experimento de hibridación tipo slot blot, usando como sonda un fragmento del gene de *neo* (fig. 8). La cuantificación de los fragmentos de nitrocelulosa radioactivos en líquido de centelleo nos indicó que los cultivos transfectados con pTEX-*cat* contienen 50 veces más DNA de plásmido que los cultivos electroporados con pRIBOTEX y pRIBOTEX-*cat*.

Localización celular del plásmido pRIBOTEX

Con el fin de corroborar que pRIBOTEX y pRIBOTEX-*cat* no se mantienen como episomas, sino que se integran en el genoma de las células transfectadas, llevamos a cabo una purificación de DNA de bajo peso molecular de los cultivos transfectados establemente. Este DNA fue analizado mediante un experimento tipo Southern, hibridando con un fragmento del gene de *neo*. Como se aprecia en la fig. 9, no se obtuvo señal alguna con el DNA de células transformadas con pRIBOTEX y pRIBOTEX-*cat*. En cambio, pTEX-*cat* sí fue recuperado en el DNA de bajo peso molecular. La banda de 6.5 kb corresponde al plásmido linearizado. Estos resultados confirman que, a diferencia de pTEX-*cat*, pRIBOTEX y pRIBOTEX-*cat* se integran en el genoma de las células transformadas.

1	GAGCTCGGTG	CACCC	TGGGA	TATTTGCGCA	CCCACCTTTC	CCGTCGCAAT	CGGCGCCGTC
61	CGAACGCGGA	AATGTTCCGA	GAATAATACG	GCTGGGCTGC	GCCGCGCGTT	CCCCGCGTGA	
121	ACCAACTATT	GTGCGATGTG	CAGCATCCTA	TTGTGGTGCT	TTACCGCACA	CCAGTTTCCT	
181	TGCGGGG	CTT	ATTTGGTGTG	TTGGATTTTT	AATTTTTTGA	TGATTCGGAG	GAATTTTTTG
241	CAATTTTTGG	GTACCCCTAA	AAAAATTTG	GAGTTCCGG	GGTTCGATCC	AACTTGTGCT	
301	TTTTTAACCG	TCCATTTGTG	TCTAGTACAT	CATGGAGCGG	TATTCTCTCC	GGTGGCCOAG	
361	GTGGCGTCGG	AAGGAATCGG	TGTCCCTCAG	GATGTTTGGT	TTTTCGTTTT	TTTTTTTGGC	
421	GTCTTTTGTT	TCGCATCGCC	GTATCGTGTG	CGGCGCGACC	TTCTTTTTGG	CTCATTGGTC	
481	AGTGAGGTTT	ATAATAAAGT	GGATCATTG	GGTTTTTGGC	CCTTTGCGGC	GCACCCGCGG	
541	AATGGGGAG	GGATTTTCAT	ATAATTGTAG	TGTACACATT	GTGTGTGGGT	CGCAAATGT	
601	CATGCCGTGT	GCAATGTTTA	TTTGCGTGCT	GTGCGTGTCC	TTTTGTGATT	CCACCACTTG	
661	TGTGTATTTT	ACCTTATCGT	CTCTCCCTCG	CGTTGGCTGT	GCGTGAATTG	TCTGTCGCAT	
721	TCGTGGGAAA	TCAAAGGGG	AATCAACGTG	TTCTTTTTTT	TTGAGAGGG	GAGTCAAAGC	
781	GCCGTGTGGA	TGCCAAGTCT	GTGCAAGAGT	TAAC			

Figura 6. Secuencia nucleotídica del fragmento de DNA ribosomal que contiene la región promotora. El sitio de inicio de la transcripción se muestra subrayado (G en la posición 334). Además se señalan los dinucleótidos AG localizados después del sitio de inicio de la transcripción. También se muestra, en un cuadro, la copia del elemento repetido ER-172 presente en el fragmento de DNAr (de las bases 16 a 187).

Figura 7. Selección con G418 de cultivos de *T. cruzi* transfectados. Se muestra la curva de crecimiento de cultivos electroporados con pRIBOTEX-*cat*, pTEX-*cat*, o sin DNA (control). El tiempo 0, no mostrado en la figura, corresponde al día en el que se adicionó G418 (250 $\mu\text{g/ml}$) a los cultivos. Las condiciones de electroporación y selección son descritas en la fig. 2 del artículo.

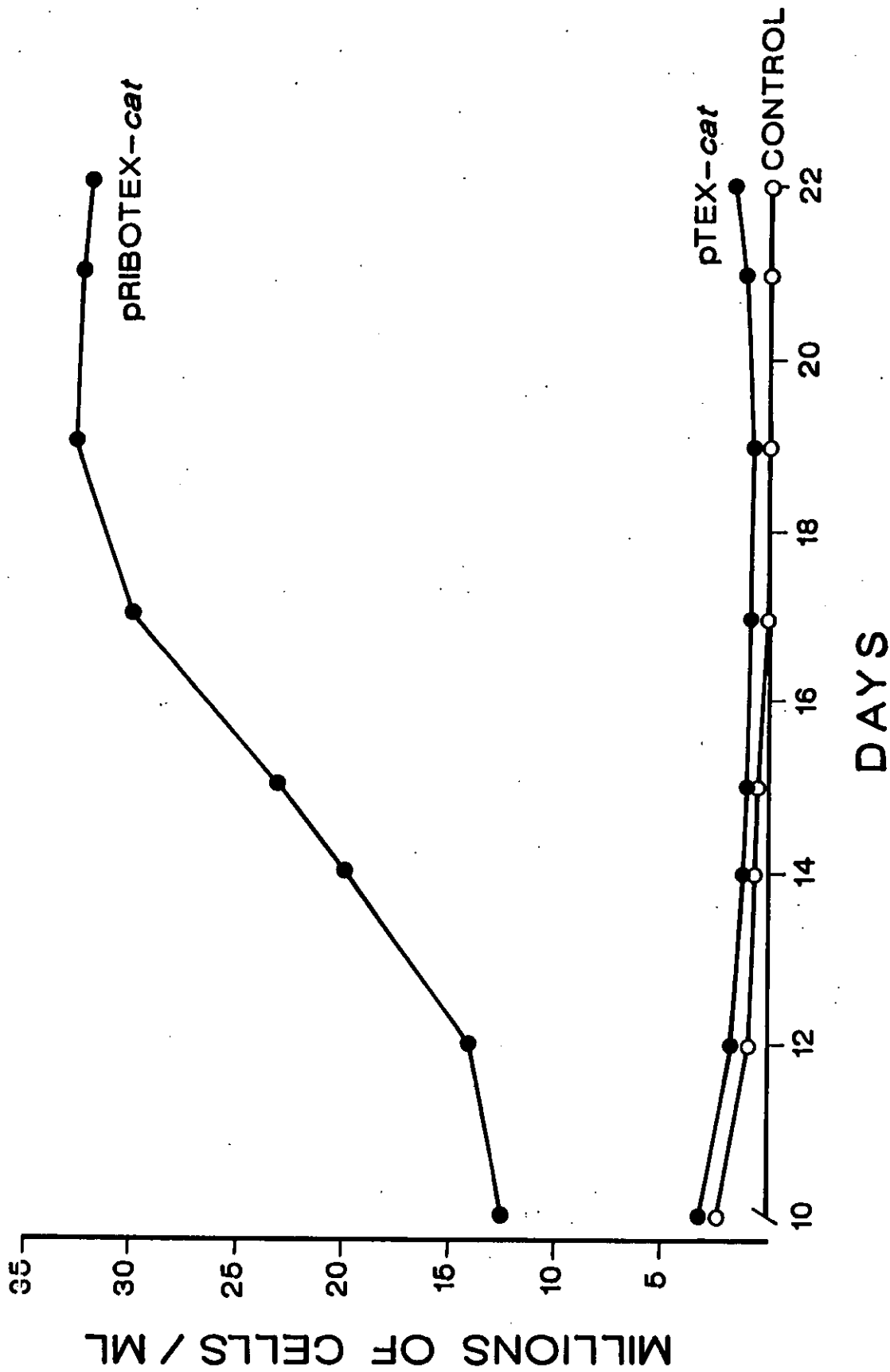
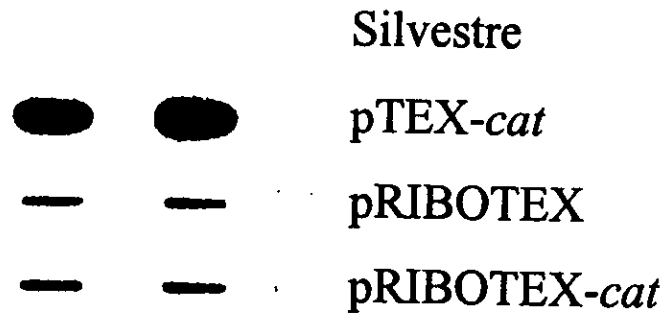


FIGURA 7

Slot Blot



sonda: inserto *neo*

Figura 8. Autorradiografía de una hibridación tipo slot blot con DNA de células transfectadas. DNA total aislado de células transformadas con pRIBOTEX (5 μ g), pRIBOTEX-*cat* (5 μ g) y pTEX-*cat* (0.5 μ g), y DNA de la cepa silvestre (5 μ g), fue transferido a nitrocelulosa, por duplicado, con un aparato de slot blot. La membrana de nitrocelulosa fue entonces hibridada con un inserto de 197 pb del gene de *neo*. Después de obtener la autorradiografía, la nitrocelulosa fue cortada en 8 partes, y en un contador de centelleo líquido se determinó la radioactividad incorporada en cada ranura. Se hizo el ajuste correspondiente de las lecuras del contador, considerando que se transfirió 10 veces menos DNA de las células transformadas con pTEX-*cat*.

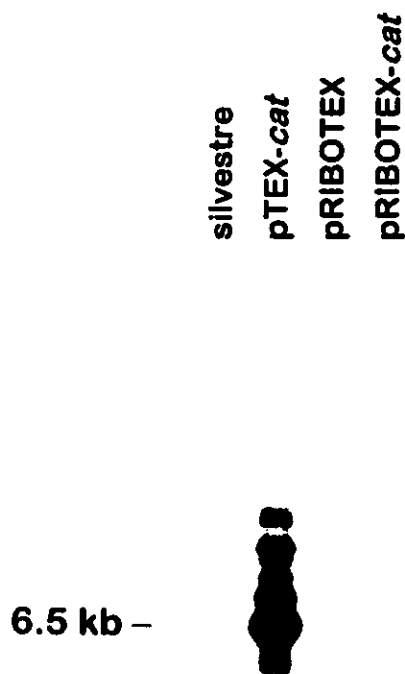


Figura 9. Análisis tipo Southern con DNA de bajo peso molecular. El DNA de bajo peso molecular fue extraído de los cultivos transfectados por el método de Hirt, como lo describe Patnaik et al. (1993). Alrededor de 2 μg de DNA fueron digeridos con *Sac* I, fraccionados en un gel de agarosa al 0.8 %, y transferidos a nitrocelulosa. La hibridación se llevó a cabo con el inserto de 197 pb del gene de *neo*, marcado con $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dATP}$ por random primer.

A *Trypanosoma cruzi* ribosomal RNA gene promoter fragment forms a specific complex with nuclei derived proteins.

Authors: Santiago Martínez-Calvillo, Patricia Espinosa and
Roberto Hernández*

Departamento de Biología Molecular, Instituto de
Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de
México, México, D.F.

*Correspondence to:

Roberto Hernández, Instituto de Investigaciones Biomédicas,
UNAM, Apartado Postal 70228, 04510 México D.F.

Tel: +(525)622 3872, Fax: +(525)550 0048

email: robher@servidor.unam.mx

Abstract

To start the search of proteins from *Trypanosoma cruzi* with a potential role in the synthesis of ribosomal RNA (rRNA), gel retardation analyses of DNA restriction fragments from the rRNA gene promoter region were carried out. Our data show the specific binding of *T. cruzi* nuclear factors to a fragment of 64 bp harboring the rRNA gene transcription start point. Nuclear extracts prepared from exponentially growing epimastigotes or from not growing cells from the stationary phase showed undistinguishable gel shift profiles. A higher steady state concentration of a rRNA precursor was nevertheless observed in cells growing exponentially. A Southwestern analysis revealed a 24kDa protein that specifically interacts with rRNA gene promoter.

Key words: *Trypanosoma cruzi*; DNA-binding protein; rRNA; Transcription

Introduction

Trypanosoma cruzi is a kinetoplastid parasitic protozoa, member of the family Trypanosomatidae. In humans *T. cruzi* causes Chagas disease, a condition that affects more than 20 millions in Mexico, Central and South America. Due to medical reasons *T. cruzi*, as well as other parasitic trypanosomes, have been widely studied. Molecular analyses of gene organization and expression in these species have revealed several atypical and fascinating mechanisms of gene expression such as the trans splicing of nuclear mRNAs, or the extensive edition of mitochondrial mRNAs (kinetoplast transcripts) (1,2). Our research work group has been interested in the molecular analysis of *T. cruzi* rRNA and their genes. These genes are atypical in that the coding region for the large subunit rRNA is organized as two large and five small modules of sequences (3).

In eukaryotes rRNA genes are transcribed by RNA polymerase I, aided by an initiation complex. In vertebrates this complex is formed with the protein factors UBF and SL1 (4). Interestingly enough is the fact that the machinery for rRNA transcription is species specific (5). That is, protein extracts derived from a given species are unable to direct transcription from the promoter of another

species. Specificity of this type has also been described for rRNA genes from trypanosomatids (6,7). Therefore, the analysis of rRNA synthesis must be carried out independently in each species of interest.

As part of our previous work in *T. cruzi*, we have mapped the transcription start point (*tsp*) of rRNA at 1768 bp from the region coding for the small subunit 18S molecule (8). An 806 DNA fragment bearing this rRNA gene *tsp* strongly promoted the expression of both a reporter and a drug resistance genes (9). As a starting approach to identify *T. cruzi* nuclear protein factors that bind to the rRNA gene promoter, data on gel retardation analyses is herein presented. The occurrence of *T. cruzi* nuclear protein(s) that specifically recognize a sequence containing the rRNA genes-*tsp* is shown. Nuclear extracts prepared from growing and not growing epimastigotes showed identical gel shift profiles. Evidence suggesting a differential rRNA synthesis under these growing conditions is presented.

Materials and Methods

Organisms and RNA isolation. *T. cruzi* epimastigotes from clone CL Brener were grown at 28°C in liver infusion-tryptose medium (LIT), supplemented with 10% fetal calf serum. Total cellular RNA was isolated by a single-step method (10). Northern-blot experiments were performed by standard techniques.

Preparation of nuclear extracts. For nuclei preparation, *T. cruzi* cells were collected, washed twice with isotonic phosphate buffer saline (pH 7.2) and resuspended in eight volumes (referred to the apparent volume of the packed cells) of buffer A (10 mM Hepes pH 7.9, 10 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 0.5 mM DTT and 0.5 mM PMSF) (11). The cells were allowed to swell for 20 min on ice, and centrifuged for 10 min at 6,000 rpm in a Sorvall HB-4 rotor at 4°C. The cellular pellet was resuspended in five volumes of buffer A with protease inhibitors (2 mM benzamidine, 5 µg/ml aprotinin, 5 µg/ml pepstatin A and 5 µg/ml leupeptin). Cells were manually disrupted by 30 strokes of a teflon homogenizer. The homogenate was checked microscopically for cell lysis, transferred to an eppendorf tube, and centrifuged for 2 min in a microfuge at 4°C. The pellet

containing nuclei was resuspended in 100 μ l of buffer C (20 mM Hepes pH 7.9, 0.42 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 0.5 mM DTT and 1 mM PMSF) with protease inhibitors. The suspension was stirred for 40 min by gentle rocking at 4°C, and the supernatant (nuclear extracts) was stored at -70°C. Protein concentration was determined by the method of Bradford (12).

Electrophoretic mobility shift assays. Protein-DNA complexes were allowed to form and analyzed as described (13,14). Briefly, 3-9 μ g of nuclear proteins were pre-incubated for 10 min on ice with 1.5 μ g poly (dI-dC) (dI-dC) in 20 μ l of 5 mM Hepes pH 7.9, 80 mM NaCl, 0.5 mM DTT, 20% glycerol, 3 mM MgCl₂ and 3 mM spermidine. Thereafter, 50,000 cpm (0.2 ng) of ³²P-kinased double-stranded DNA probe was added, and incubated for 20 min at 4°C. The DNA-protein complexes were resolved on a 4.5% polyacrylamide gel in 0.5 X TBE buffer. The electrophoresis was carried out in 0.5 X TBE for 3 h at 150 V. The gel was fixed in 10% acetic acid and 10% methanol, dried and autoradiographed. For competition experiments, a 10- to 100-fold excess of either unlabeled competitor DNA restriction fragment or double-stranded oligonucleotide was added to the reaction at the same time that the probe.

Southwestern assays. Southwesterns were performed according to Miskimins et al. (15). Briefly, 30 μ g of nuclear extract were mixed 1:1 with sample buffer (5% SDS, 5 mM Tris-HCl pH 6.8, 200 mM DTT, 20% glycerol and 0.05% pyronin Y). Proteins were first fractionated by SDS-PAGE using a 10% acrylamide separating gel and then electrophoretically transferred to nitrocellulose paper at 500 mA for 2 h in electroblotting buffer (25 mM Trizma base, 190 mM glycine and 20% methanol). The blots were then stored at 4°C. To prevent nonspecific binding, the nitrocellulose filters were blocked with 5% nonfat dry milk in 10 mM Hepes pH 8.0 during 1h at room temperature. The filters then were incubated for 1 h at room temperature in binding buffer (10 mM Hepes pH 8.0, 50 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, 0.1 mM DTT and 0.25% nonfat dry milk) containing 5 X 10⁵ cpm (Cerenkov) of ³²P-labeled DNA per ml. Finally, the filters were washed in binding buffer containing 0.3 M NaCl (three times, each for 40 min) and exposed to X-ray films.

Results

Nuclear protein binding to the rDNA promoter-fragment

With the hypothesis that the *T. cruzi* rDNA *tsp* is present in a functional domain, and to investigate whether there are nuclear proteins capable of binding to this motif, a fragment of 64 nt (8-2A, Figure 1) spanning positions -48 to +16 relative to the mapped *tsp* (8) was used as a probe in gel mobility shift assays. Figure 1A shows the presence of a retarded radioactive complex with the following features: (a) its apparent abundance depended on the amount of extract added (lanes 2-4), (b) the binding was competed with a non radioactive homologous DNA fragment present at 10, 50 and 100 fold molar excess (lanes 5-7, respectively), (c) the radioactive signal could not be competed with the non related AP-1 oligonucleotide at the same molar ratios as above (lanes 8-10, respectively). This complex was also resistant to other non related sequences such as the pUC18 polylinker region (data not shown). No complexes were evidenced in those cases where the DNA probe was a restriction fragment derived from other regions of the external transcribed spacer (fragments 8-2B and 4A, Figure 1B). Likewise, fragment 8-3B spanning positions -111 to -49 relative to the rRNA gene *tsp* (Figure 3) did not show binding ability (data not shown). We cannot rule out that *T. cruzi* proteins interact with these DNA regions in living cells.

Gel shift analyses from growing and not growing epimastigotes

It is expected that ribosome biosynthesis in *T. cruzi* is regulated depending on cell growth as has been found in all cellular types analyzed (16). Searching for the evidence of different pre-rRNA steady state concentrations under different growing conditions, a northern blot hybridization analysis was carried out with total RNA purified from both epimastigotes growing exponentially and not dividing cells from the stationary phase. This blot was hybridized with the genomic clone pRTC20 (3) which carries sequences derived from the transcribed rRNA gene spacer and from the coding region for the 18S rRNA (Figure 1). The autoradiograph depicted in Figure 2B, shows that a pre-rRNA species of approximately 5.3 kb, which is not the complete primary transcript but a relatively stable precursor (8), has a higher steady state concentration in RNA preparations isolated from growing epimastigotes. A difference in the rRNA synthesis under this growing conditions can therefore be expected. On the other hand, we were unable to observe appreciable differences in the complex formed with extracts prepared from cells isolated from these different growing conditions (Figure 2A), suggesting that a putative regulation for rRNA synthesis is not the relative abundance of the DNA interacting protein(s) evidenced in this work.

Southwestern analysis

In order to identify proteins that could interact with the rRNA gene promoter, Southwestern analyses were carried out. Our results indicate that the rDNA fragment containing the *tsp* (fragment 8-2A) binds a protein of 24 kDa (Figure 3). An adjacent fragment from the upstream region, 8-3B, was unable to bind any protein under these conditions (Figure 3).

Discussion

Gel shift analysis has been successfully used to detect protein DNA interactions in a variety of situations (13,14). In trypanosomatid's research this technique has been used just since few years ago (17). In the case of *T. cruzi* species, there is to our knowledge just one report describing complexes formed with the spliced leader gene promoter (18). A DNA fragment containing a *T. cruzi* rRNA *tsp* is here analyzed using this technique. Our results clearly show the occurrence of nuclei derived proteins from epimastigotes that specifically bind a rDNA fragment spanning positions -48 to +16 relative to the *tsp*. Whether these proteins are transcription factors remain to be tested, but its presence is in accordance with our previous results showing that an 806 bp rDNA fragment containing this *tsp* stimulates gene expression (9). That is, the rRNA gene *tsp* surrounding sequences are functionally recognized. The proteins interacting with the *tsp* bearing probe are apparently present at similar concentrations in both exponentially growing and stationary phase derived epimastigotes. Contrary to this result is the northern analysis that shows a higher steady state concentration of a pre-rRNA in the exponentially growing cells. A likely explanation to this disagreement could be that the rRNA biosynthesis is mostly regulated at a level other than transcription initiation. Transcription elongation rate or

pre-rRNA processing are mechanisms that could be likely regulated under these different growing conditions. Nevertheless, it is important to point out that the occurrence of nuclear proteins that in vitro bind the rRNA *tsp* flanking sequences is by no means demonstration of gene transcription in the stationary phase derived cells. It has been reported that quists from *Acanthamoeba castellanii* downregulate their rRNA synthesis. In this case it was found that a modification in the RNA polymerase I is involved, with no differences in the concentration of the transcription initiation factor (TIF) (19).

In the case of *T. brucei* species, there are reports describing the formation of specific gel retarding complexes with the rRNA gene promoter: Mburu and Beebee (20), and Jantz et al. (21) reported complexes with double stranded probes, while Vanhamme et al. (22) reported complexes only with single stranded oligonucleotides containing the noncoding strand of rRNA gene promoter. These groups used different experimental conditions. Therefore, it is difficult to conciliate these different findings.

Regarding Southwestern analysis with rRNA *tsp* bearing DNA sequences, a 24 kDa protein is here reported. A working hypothesis places this protein as a member of the rRNA transcription molecular machinery. Future studies should focus in its isolation and characterization.

Acknowledgments

We acknowledge Alejandro García Carrancá his kind gift of oligonucleotides, and technical help. This work was partially supported by grants from Dirección General de Asuntos del Personal Académico, UNAM (IN502495) and Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (1120-PM), to R. Hernández.

References.

1. Graham SV. Mechanisms of stage-regulated gene expression in Kinetoplastida. *Parasitol Today* 1995; 11: 217.
2. Stuart K. RNA editing in trypanosomatid mitochondria. *Annu Rev Microbiol* 1991; 45: 327.
3. Hernández R, Díaz-de León F, Castañeda M. Molecular cloning and partial characterization of ribosomal RNA genes from *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol* 1988; 27: 275.
4. Reeder RH. Regulation of transcription by RNA polymerase I. In: McKnight SL, Yamamoto KR, Eds. *Transcriptional regulation*. New York, NY: CSHL Press; 1992: 315.
5. Grummt I, Roth E, Paule MR. Ribosomal RNA transcription in vitro is species-specific. *Nature* 1982; 296: 173.
6. Zomerdijk JCBM, Kieft R, Shiels PG, Borst P. Alpha-amanitin-resistant transcription units in trypanosomes: a comparison of promoter sequences for a VSG gene expression site and for the ribosomal RNA genes. *Nuc Acids Res* 1991; 19: 5153.
7. Gay LS, Wilson ME, Donelson JE. The promoter for the ribosomal RNA genes of *Leishmania chagasi*. *Mol Biochem Parasitol* 1996; 77:193

3. Martínez-Calvillo S, Hernández R. *Trypanosoma cruzi* ribosomal DNA: mapping of a putative distal promoter. *Gene* 1994; 142: 243.
9. Martínez-Calvillo S, López I, Hernández R. pRIBOTEX expression vector: a pTEX derivative for a rapid selection of *Trypanosoma cruzi* transfectants. *Gene* 1997; 199: 71.
10. Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 1987; 162: 156.
11. Schreiber E, Matthias P, Muller MN, Schaffner W. Rapid detection of octamer binding proteins with "mini-extracts", prepared from a small number of cells. *Nuc Acids Res* 1989; 17: 6419.
12. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem* 1976; 72: 248.
13. Fried M, Crothers DM. Equilibria and kinetics of lac repressor-operator interactions by polyacrylamide gel electrophoresis. *Nuc Acids Res* 1981; 9: 6505.
14. Strauss F, Varshavsky A. A protein binds to a satellite DNA repeat at three specific sites that would be brought

- into mutual proximity by DNA folding in the nucleosome.
Cell 1984; 37: 889.
15. Miskimins WK, Roberts MP, McClelland A, Ruddle FH. Use of a protein-blotting procedure and a specific DNA probe to identify nuclear proteins that recognize the promoter region of the transferrin receptor gene. Proc Natl Acad Sci USA 1985; 82: 6741.
 16. Hadjiolov AA. The nucleolus and ribosome biogenesis. New York, NY: Springer-Verlag Wien; 1985: 268 pp.
 17. Koronakis VE, Ross AM, Le Page RWF, Hughes C. Nuclear factors binding to the mini-exon repeat of *Trypanosoma brucei*. Mol Biochem Parasitol 1988; 30: 89.
 18. Nunes LR, Carvalho MRC, Shakarian AM, Buck GA. The transcription promoter of the spliced leader gene from *Trypanosoma cruzi*. Gene 1997; 188: 157.
 19. Paule MR, Bateman E, Hoffman L, Iida C, Imboden M, Kubaska W, Kownin P, Li H, Lofquist A, Risi P, Yang Q, Zwick M. Initiation and regulation mechanisms of ribosomal RNA transcription in the eukaryote *Acanthamoeba castellanii*. Mol Cell Biochem 1991; 104: 119.
 20. Mburu PW, Beebee TJC. Preliminary characterization and partial purification of ribosomal gene promoter-binding

- proteins from *Trypanosoma brucei*. *Biochim Biophys Acta* 1993; 1172: 5.
21. Janz L, Hug M, Clayton C. Factors that bind to RNA polymerase I promoter sequences of *Trypanosoma brucei*. *Mol Biochem Parasitol* 1994; 65: 99.
 22. Vanhamme L, Pays A, Tebani P, Alexandre S, Pays E. Specific binding of proteins to the noncoding strand of a crucial element of the variant surface glycoprotein, procyclin, and ribosomal promoters of *Trypanosoma brucei*. *Mol Cell Biol* 1995; 15: 5598.
 23. García-Carrancá A, Alvarez-Salas L, Bravo C, Yaniv M, Gariglio P. A nuclear factor from epithelial cells binds to conserved "TTGGCTT" motifs on the long control region of human papillomavirus type 18 (HPV18). In: Howley PM, Broker TR, Eds. *Papillomaviruses*. New York, NY: Wiley-Liss; 1990: 445.

Figure legends

Figure 1. Specific binding of nuclear proteins to the rRNA gene promoter. **A)** Gel retardation analysis carried out with the *tsp* containing fragment 8-2A. The arrow indicates the radioactive complex formed after incubation of the probe with increasing amounts of nuclear protein extracts as: 0 μg (1), 3 μg (2), 6 μg (3) and 9 μg (4). Nine μg of extract were used in all other conditions shown in this slab. Lanes 5-7 depict the effect of 10-, 50-, and 100- molar fold excess of unlabeled probe as homologous competitor, respectively. A 35 nt double stranded AP-1 oligonucleotide (23) was used as a not related competitor. Lanes 8-10 show its effect at 10-, 50-, and 100- molar fold, respectively. The free probe can be observed by the bottom of the gel. **B)** Gel shift analysis performed with fragments 8-2B (lanes 1-3) and 4A (lanes 4-6), see map at the bottom. The experiments were done with 0 μg (lanes 1 and 4), 5 μg (lanes 2 and 5), and 10 μg of protein extract (lanes 3 and 6). A restriction map of the rRNA genomic clone pRTC20 (3) is shown at the bottom. The bent arrow indicates the mapped *tsp*. The solid boxes represent the restriction fragments used as probes.

Figure 2. Analysis from growing and not growing cells. **A)** Electrophoretic mobility shift assay performed with 9 µg of nuclear proteins from exponentially growing epimastigotes (lane 2) or stationary phase derived cells (lane 3). Lane 1 contains no protein extract as control. The DNA probe used corresponds to the rDNA fragment 8-2A (see Figure 1). **B)** Northern hybridization analysis of *T. cruzi* rRNA. Total RNA (15 µg) from either exponentially growing cells (lane 1) or stationary phase cells (lane 2) was analyzed. The blotted filter was hybridized to the rRNA genomic clone pRTC20 (see Figure 1).

Figure 3. Southwestern analysis with the rDNA promoter. 30 µg of *T. cruzi* nuclear proteins were separated by SDS-PAGE and transferred to nitrocellulose. The filters were hybridized to ³²P random-primed fragments 8-2A (right panel) and 8-3B (left panel). A restriction map of the *tsp* surrounding area is shown at the bottom. The arrow indicates the mapped rDNA *tsp*, and the solid boxes the restriction fragments used as probes.

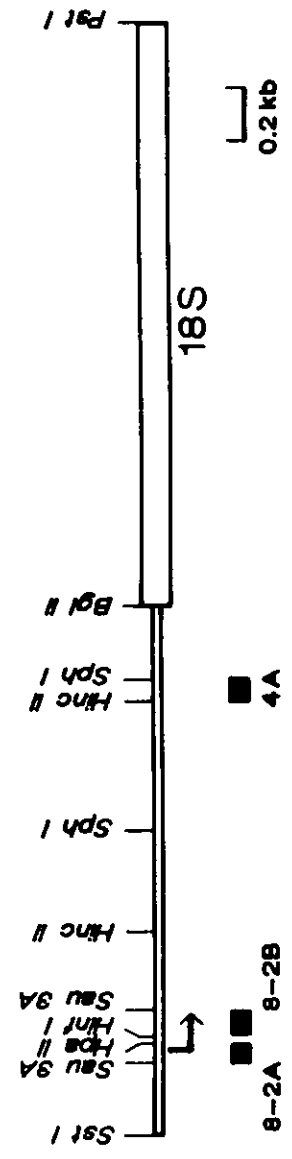
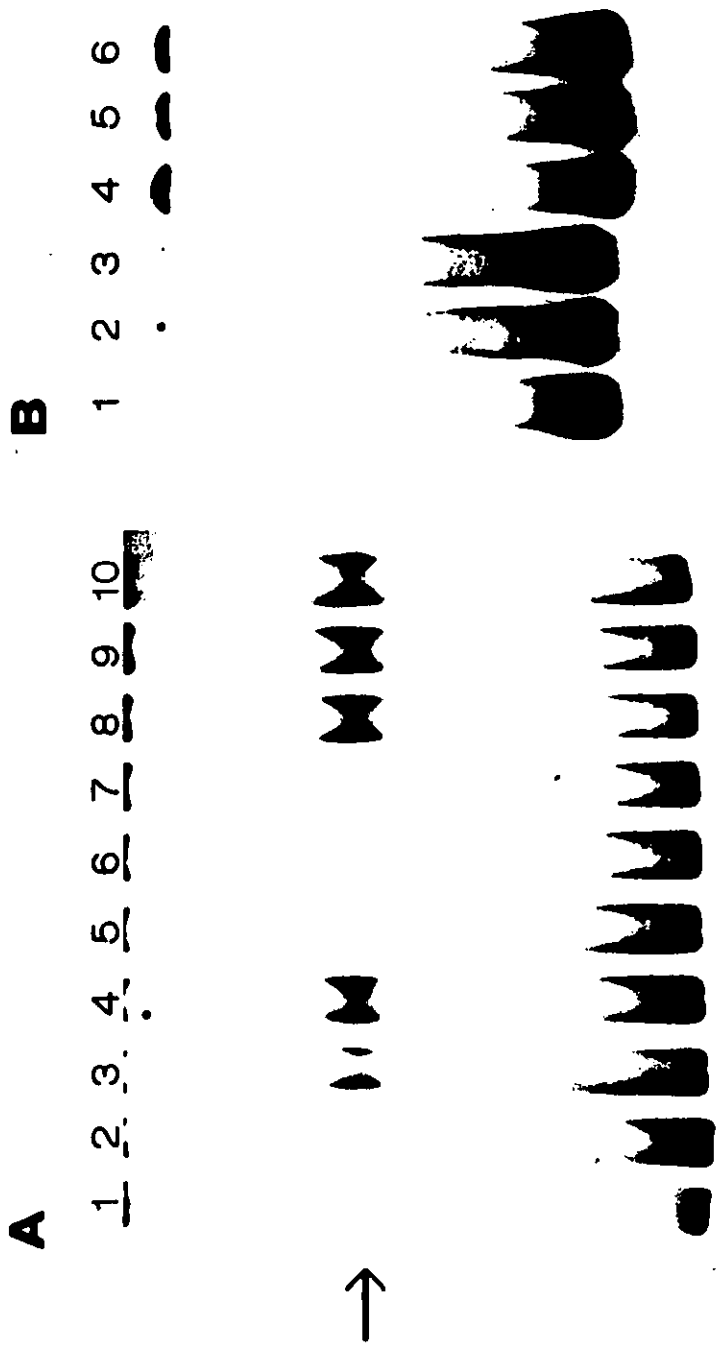


FIGURE 1

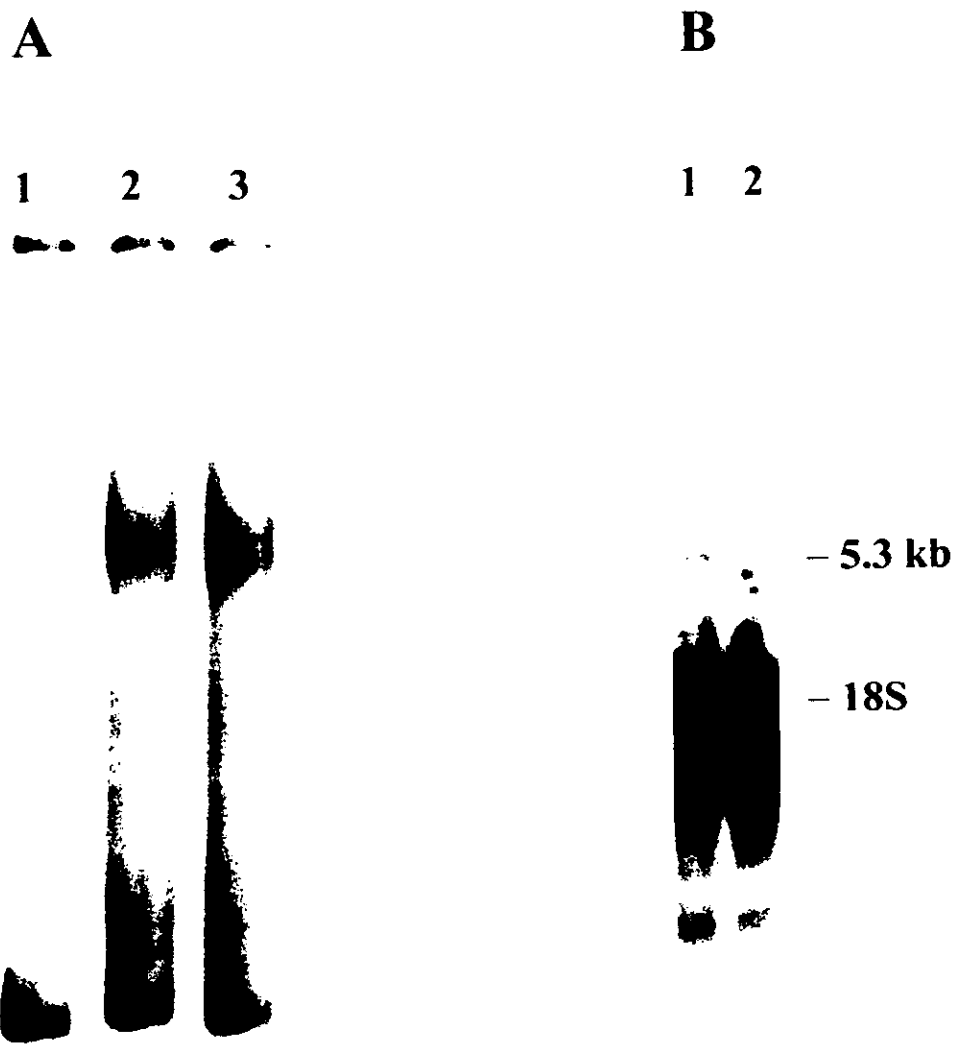


FIGURE 2

8-3B

8-2A

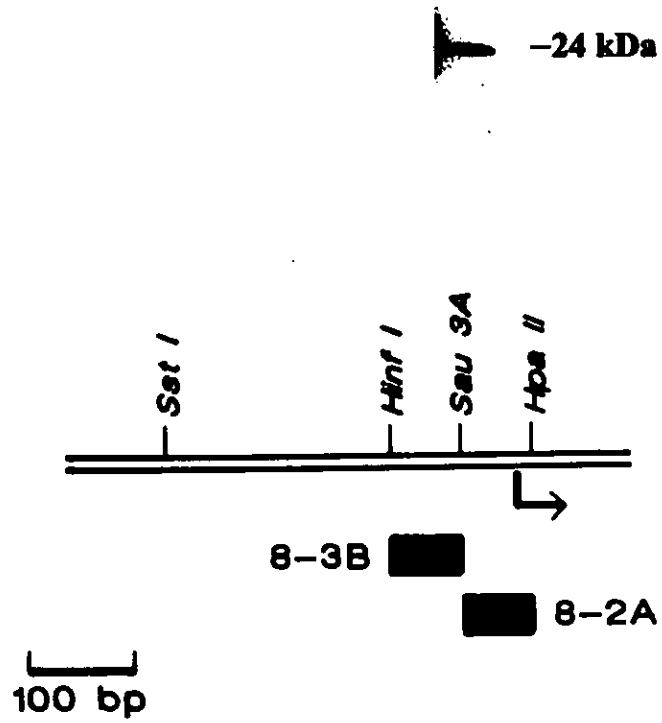


FIGURE 3

Datos no mostrados en el manuscrito

Géles de retardamiento con fragmentos de DNAr

El complejo de retardamiento formado con el inserto 8-2A no se vio afectado en los experimentos de competencia con un oligonucleótido que contiene un sitio de unión al factor AP-1 (fig. 1 del manuscrito). Dicho complejo también fue resistente al competir con otras secuencias no relacionadas al promotor del RNAr, como el polilinker de pUC18 (fig. 10) y oligonucleótidos con sitios de unión al factor Oct-1 y con una caja TATA (fig. 11).

Por otro lado, cuando llevamos a cabo géles de retardamiento con el fragmento 8-3B como sonda (ver mapa de restricción en la fig. 3 del manuscrito) no se formaron complejos DNA-proteína (fig. 12). El mismo resultado se había obtenido con los fragmentos 8-2B y 4A (fig. 1B del manuscrito).

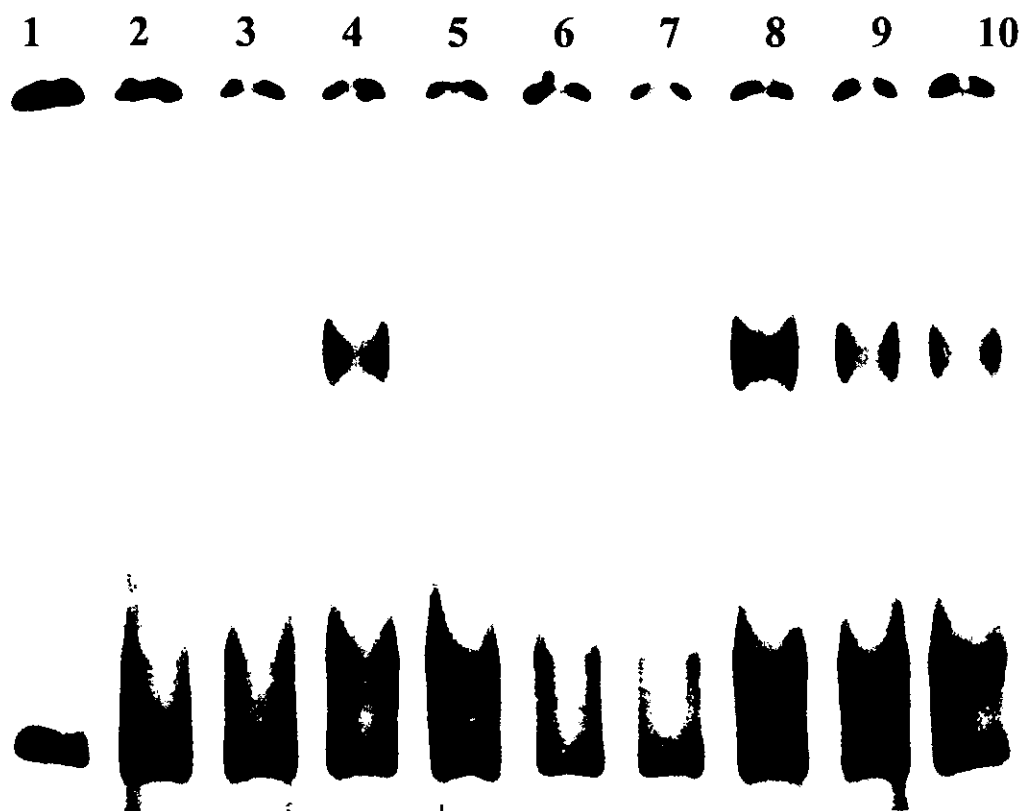


Figura 10. Gel de retardamiento con el promotor del RNAr de *T. cruzi*. Este ensayo se llevó a cabo con el inserto 8-2A, usando 0 µg (1), 3 µg (2), 6 µg (3) y 9 µg de extractos nucleares (4-10). En los carriles 5-7 se compitió con el mismo inserto 8-2A, sin marcar, en un exceso molar de 10, 50 y 100 veces, respectivamente. Los carriles 8-10 muestran la competencia con el polilinker de pUC18, en un exceso molar de 10, 50 y 100 veces, respectivamente.

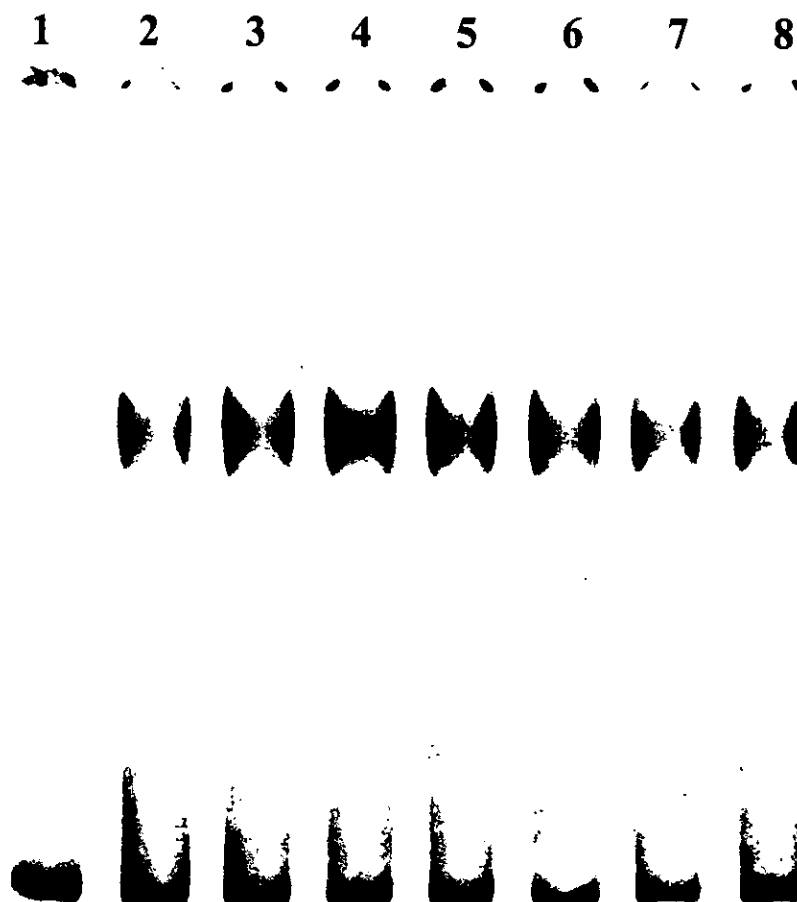


Figura 11. Autorradiografía de un gel de retardamiento con el promotor del RNAr. El ensayo se realizó con el inserto 8-2A, usando 9 μg de extracto nuclear. En el carril 1 se muestra la sonda libre, sin extracto proteico. En los carriles 3-5 se compitió con un oligonucleótido de doble cadena de 25 bases que contiene un sitio de unión de Oct-1 (García-Carrancá et al., 1990), en un exceso molar de 10, 50 y 100 veces, respectivamente. En los carriles 6-8 se muestra la competencia con un oligonucleótido de doble cadena de 25 pb que contiene una caja TATA (García-Carrancá et al., 1990) en un exceso molar de 10, 50 y 100 veces.

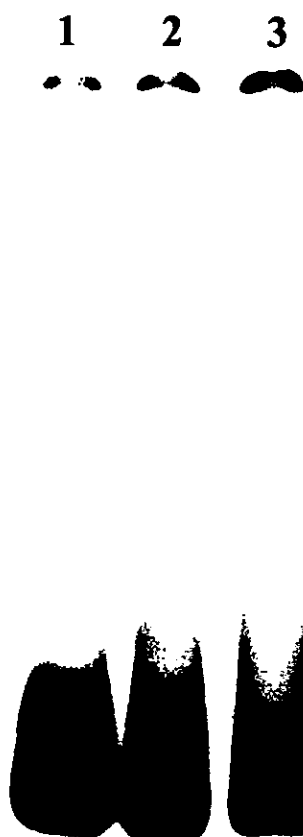


Figura 12. Gel de retardamiento con el fragmento 8-3B. El ensayo se llevó a cabo con 0 μg (carril 1), 5 μg (carril 2) y 10 μg (carril 3) de extractos nucleares de *T. cruzi*, como se indica en la sección de materiales y métodos del artículo.

RESULTADOS ADICIONALES

Análisis funcional del elemento repetido ER-172

En la secuencia de 806 pb de DNAr clonada en pRIBOTEX (fig. 6) hay una copia de un elemento repetido de 172 pb, ER-172, que es específico del espaciador intergénico de la unidad de RNAr de *T. cruzi* (ver apéndice). Con el antecedente de que en la mayoría de los organismos analizados hasta hoy las secuencias repetidas de los espaciadores intergénicos de la unidad de RNAr funcionan como activadores de la transcripción (Reeder, 1984), quisimos averiguar si en *T. cruzi* el ER-172 cumplía una función análoga. Para ello, mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) eliminamos un fragmento de 185 pb que contiene el ER-172 (nucleótidos 1 a 185 de la secuencia de la fig. 6) del inserto de 806 pb. El fragmento resultante fue ligado en pTEX-*cat* al que previamente se le había deletado la región GAPDH upstream, generando el vector p Δ ER172-*cat* (fig. 13). Cuando transfectamos transitoriamente células de *T. cruzi* con p Δ ER172-*cat*, encontramos que la actividad de CAT fue 145 veces menor que la actividad obtenida con pRIBOTEX-*cat* (tabla II); es decir, al eliminar el ER-172 del fragmento que contiene el promotor del RNAr se disminuyó considerablemente la actividad del gene reportero. No obstante, la actividad de CAT obtenida con p Δ ER172-*cat* fue 110 veces mayor que la obtenida con pTEX-*cat* (tabla II).

Para analizar el elemento ER-172 en otro contexto, se construyó una serie de vectores en los que los fragmentos de DNAr fueron clonados en

pTEX-*cat*, sin eliminar ahora la región GAPDH upstream (como se verá más adelante). De esta forma, transfectamos células de *T. cruzi* con pRIBO4-*cat* (con el ER-172) y pRIBO6-*cat* (sin el ER-172) (fig. 14B), y también con pRIBOTEX-*cat* y p Δ ER172-*cat*. Cuando analizamos la actividad transitoria de CAT (tabla III) no encontramos diferencias entre pRIBO4-*cat* y pRIBO6-*cat*, contrariamente a lo que observamos entre pRIBOTEX-*cat* y p Δ ER172-*cat* (tablas II y III). Aparentemente, cuando no está presente la región upstream del locus de GAPDH (como en p Δ ER172-*cat*) el ER-172 estimula la transcripción, mientras que cuando sí está presente la secuencia upstream de GAPDH (como en pRIBO6-*cat*) el ER-172 no activa la transcripción. El probable significado de estos resultados será analizado en la discusión del presente trabajo.

Delimitación del promotor del RNAr

La elevada actividad de CAT obtenida con pRIBOTEX-*cat* (tabla I del artículo, y tabla II) nos indicó que el inserto de 806 pb que contiene el promotor del RNAr cuenta con una o varias regiones que funcionan eficientemente como sitios aceptores del miniexón (fig. 6). Estas regiones son necesarias para que el RNAm de *cat* pueda procesarse correctamente por trans-splicing. El hecho de que los sitios aceptores no hayan sido todavía identificados nos creaba una limitante al intentar caracterizar con más detalle el promotor del RNAr: al deletar o invertir el fragmento de DNAr podríamos estar eliminando o alterando las secuencias necesarias para el procesamiento del transcrito. Por ello, para continuar con el análisis funcional de la secuencia promotora era necesario construir

plásmidos en los que el gene reportero de *cat* estuviera precedido por un sitio aceptor del miniexón endógeno. De esta forma, con un sitio de procesamiento fijo, cualquier cambio en la actividad de CAT sería debido a una mayor o menor transcripción de su gene.

El fragmento GAPDH upstream de pTEX-*cat* (fig. 14A) contiene la región promotora de dicho locus y un sitio aceptor del miniexón. Esta región promotora es débil, pues en ensayos transitorios produce una actividad de CAT sumamente baja (tablas I y II). Por ello, decidimos clonar los fragmentos de DNAr en los sitios *Sac* I y/o *Sac* II de pTEX-*cat* (fig. 13A), utilizando la región GAPDH upstream como fuente del sitio aceptor del miniexón. En la fig. 14B se muestran los fragmentos de DNAr clonados en pTEX-*cat*. pRIBO4-*cat* y pRIBO5-*cat* contienen el fragmento de 806 pb (de *Sac* I a *Hinc* II), en orientación 5'-3' y 3'-5', respectivamente. En pRIBO6-*cat* y pRIBO7-*cat* está clonado el fragmento de 629 pb (sin el elemento ER-172) en ambas orientaciones. Al deletar del inserto de 806 el fragmento de *Sac* II a *Hinc* II se genera un fragmento de 540 pb, el cual fue clonado en pTEX-*cat* para dar lugar a pRIBO8-*cat*. Finalmente, pRIBO9-*cat* contiene un fragmento de 355 pb, que incluye de las bases -148 a +207.

Cuando transfectamos epimastigotes de *T. cruzi* con pRIBO4-*cat* y pRIBO6-*cat* se obtuvo una actividad de CAT muy alta, incluso un poco mayor que la obtenida con pRIBOTEX-*cat* (tablas III y IV). En contraste, con pRIBO5-*cat* y pRIBO7-*cat*, que contienen los insertos de 806 y 629 pb en orientación de 3'-5', la actividad de CAT fue prácticamente nula (fig. 14B y tabla IV). Con los plásmidos pRIBO8-*cat* y pRIBO9-*cat* también se

produjo una actividad de CAT muy elevada (tabla IV). Con esto, hemos encontrado que un fragmento de 355 pb (clonado en pRIBO9-*cat*) es suficiente para obtener la máxima actividad de CAT.

Figura 13. Mapa de p Δ ER172-*cat*. El fragmento de DNA ribosomal de 629 pb (de las bases 186 a 814 de la secuencia presentada en la fig. 5) fue amplificado por PCR, usando como molde al plásmido pRIBOTEX. El oligonucleótido 5' empleado tiene la secuencia 5'-TAGAGCTCGGCTTATTTGGTGTGTTGGATT-3', y la secuencia del oligonucleótido 3' es 5'-CGGTAACTCTTGACAGACTTGGCA-3'. El producto de PCR fue digerido con *Sac* I y *Hinc* II (sitios de restricción presentes en los extremos de los oligonucleótidos) y ligado en pTEX-*cat*, cuya secuencia GAPDH upstream había sido previamente deletada con *Sac* I y *Spe* I. El sitio de *Spe* I fue rellenado con klenow antes de la ligación. La ausencia del elemento repetido ER-172 fue verificada secuenciando los extremos del inserto de DNAr clonado en dicho vector. La flecha sobre el fragmento de DNAr indica el sitio de inicio de la transcripción. Todos los los sitios de corte que se indican son únicos, excepto *Bam* HI.

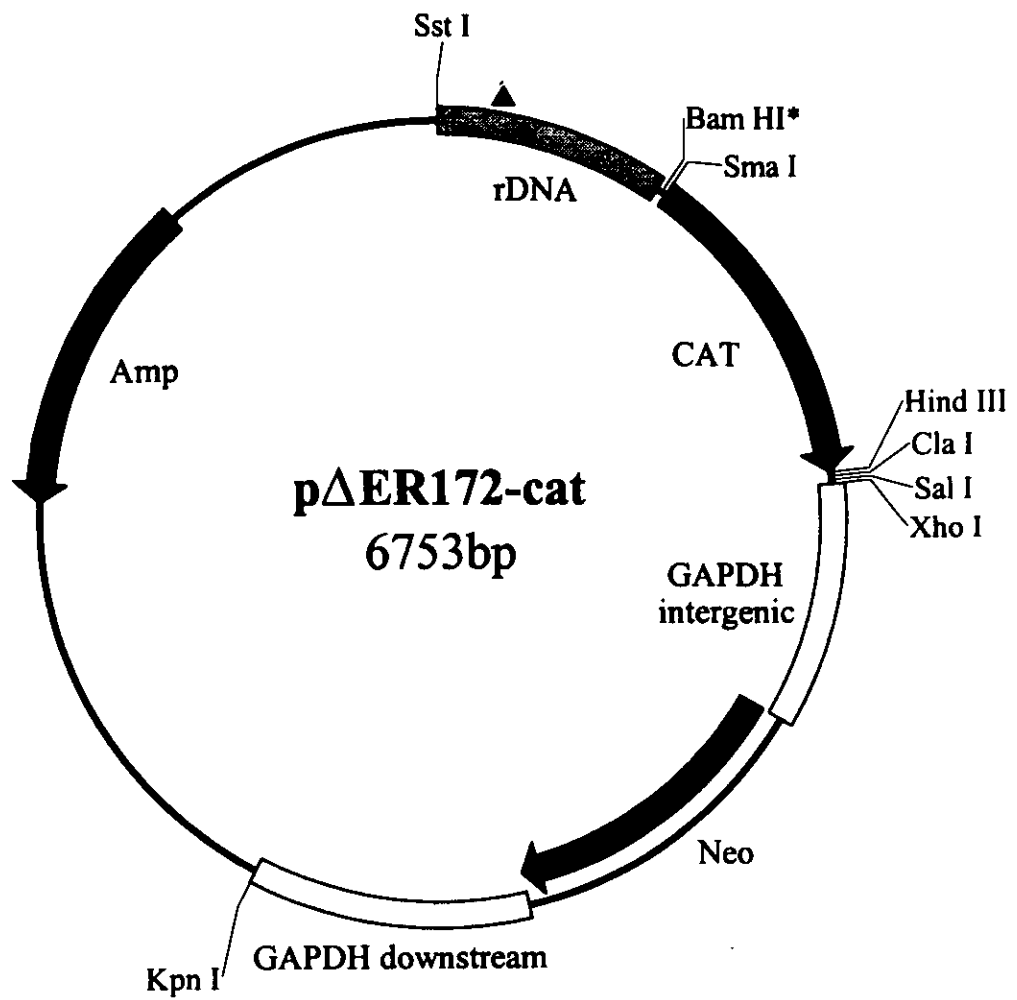


TABLA II

Actividad de CAT en *T. cruzi*^a

Vector	Expresión transitoria ^b
pRIBOTEX- <i>cat</i>	25,570.00
	21,380.00
	20,157.00
pΔER172- <i>cat</i>	166.60
	157.30
	137.30
pTEX- <i>cat</i>	1.64
	1.06
	1.48
pRIBOTEX ^c	0.17
	0.16
	0.15

^a Los valores representan cpm/μg de extracto protéico/hora de incubación a 37°C. Las condiciones de electroporación, la preparación del extracto protéico, y del ensayo CAT se indican en el artículo.

^b Ensayo CAT realizado 60 horas después de la electroporación (datos de tres electroporaciones independientes).

^c Control negativo.

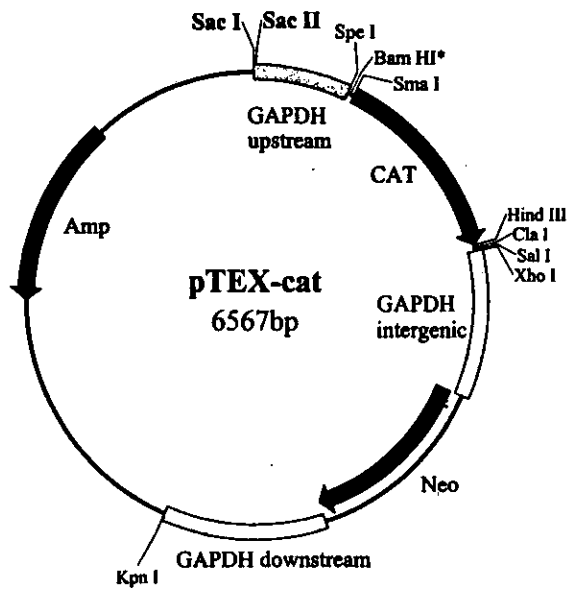
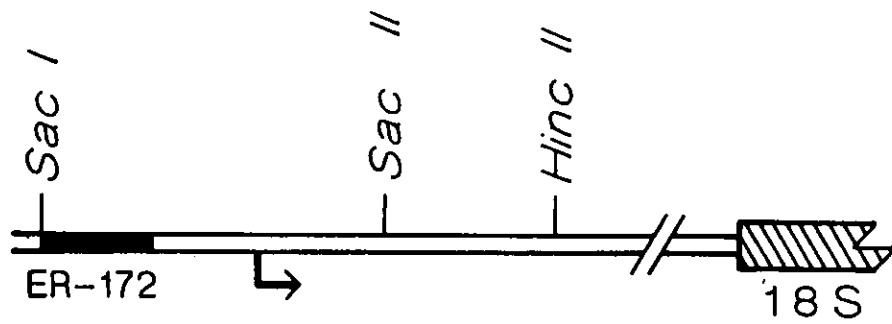
TABLA III

Actividad de CAT en <i>T. cruzi</i> ^a	
Vector	Expresión transitoria ^b
pRIBOTEX- <i>cat</i>	52,466.23
	56,547.50
	57,293.33
pΔER172- <i>cat</i>	318.60
	326.15
	341.66
pRIBO4- <i>cat</i>	90,578.13
	90,451.85
	112,428.35
pRIBO6- <i>cat</i>	91,525.71
	93,555.55
	81,064.60
pTEX- <i>cat</i>	2.53
	2.54
	2.76

^a Los valores representan cpm/ μ g de extracto protéico/hora de incubación a 37°C. Las condiciones de preparación del extracto protéico y del ensayo CAT se indican en el artículo.

^b Ensayo CAT realizado 60 h después de la electroporación (datos de 3 electroporaciones independientes).

Figura 14. Análisis funcional de la secuencia promotora del RNAr. **A)** Mapa de pTEX-*cat* (Kelly et al., 1992), señalándose los sitios de *Sac* I y *Sac* II, en donde fueron clonados los insertos de DNA ribosomal. **B)** Construcción de vectores con el promotor de RNAr. **pRIBO4-*cat*:** el inserto de 806 pb, de *Sac* I a *Hinc* II, fue purificado de la clona pRTC19 (Martínez-Calvillo y Hernández, 1994) y clonado en pTEX-*cat* digerido con *Sac* I y *Sac* II (tratado con la enzima klenow para convertirlo en extremo raso). **pRIBO5-*cat*:** el inserto de 806 pb fue purificado del vector pTRAP-8 (no publicado) con *Sac* II y *Hind* III (rellenado con klenow) y ligado en pTEX-*cat* digerido con *Sac* II y *Sac* I (tratado con klenow). **pRIBO6-*cat*:** el fragmento de 629 pb se obtuvo de p Δ ER172-*cat*, digiriendo con *Sac* I y *Sma* I, y se ligó en pTEX-*cat* digerido con *Sac* I y *Sac* II (tratado con Klenow). **pRIBO7-*cat*:** el inserto de obtuvo de p Δ ER172-*cat* digiriendo con *Sma* I y *Sac* I (tratado con klenow) y se ligó en pTEX-*cat* digerido con *Sac* II (tratado con klenow y fostatasa alcalina); la orientación 3'-5' del inserto se verificó digiriendo con varias enzimas de restricción. **pRIBO8-*cat*:** el inserto de 540 pb se purificó de pRTC19 digiriendo con *Sac* I y *Sac* II y fue ligado en pTEX-*cat* digerido con las mismas enzimas. **pRIBO9-*cat*:** el inserto de 355 pb se aisló de p Δ ER172-*cat* digiriendo con *Sac* I y *Sac* II, y se ligó en pTEX-*cat* digerido con las mismas endonucleasas. En la columna de la derecha se indica el porcentaje de actividad de CAT obtenido con los diferentes vectores. Los números representan un promedio de los tres valores presentados para cada plásmido en la tabla IV, considerando que pRIBO4-*cat* tiene una actividad de CAT del 100 %.

A**B**

	pRIBO4- <i>cat</i>	100 %
	pRIBO5- <i>cat</i>	0.001 %
	pRIBO6- <i>cat</i>	102 %
	pRIBO7- <i>cat</i>	0.001 %
	pRIBO8- <i>cat</i>	114 %
	pRIBO9- <i>cat</i>	106 %

TABLA IV

Actividad de CAT en <i>T. cruzi</i> ^a	
Vector	Expresión transitoria ^b
pRIBO4- <i>cat</i>	104,674.54
	96,836.25
	98,215.58
pRIBO5- <i>cat</i>	0.96
	0.91
	0.89
pRIBO6- <i>cat</i>	103,765.71
	92,387.82
	112,162.26
pRIBO7- <i>cat</i>	0.99
	1.10
	1.12
pRIBO8- <i>cat</i>	115,931.31
	106,335.38
	121,691.01
pRIBO9- <i>cat</i>	115,020.31
	97,653.84
	105,904.28

^a Los valores representan cpm/ μ g de extracto protéico/hora de incubación a 37°C. Las condiciones de preparación del extracto protéico y del ensayo CAT se describen en el artículo.

^b Ensayo CAT realizado 60 h después de la electroporación (datos de 3 electroporaciones independientes).

DISCUSIÓN

Una característica importante de *T. cruzi* es su heterogeneidad en relación a sus propiedades biológicas y médicas, como contenido de DNA, tasa de crecimiento, infectividad y tropismo tisular (Miles, 1979). Además, la variabilidad genética del parásito se ha hecho evidente al analizar electroforéticamente patrones de isoenzimas, patrones de restricción de DNA del cinetoplasto y de DNA del espaciador intergénico de la unidad de RNAr, DNA polimórfico amplificado azarosamente por PCR (RAPD-PCR), cariotipos moleculares, etc. (Tibayrenc et al., 1993; Zavala-Castro et al., 1992). Esto planteó la necesidad de designar una cepa de referencia, que presentara todas las características biológicas importantes del parásito, y que fuera utilizada en todo el mundo para el proyecto del mapeo del genoma de *T. cruzi*, auspiciado por la Organización Mundial de la Salud. La clona CL Brener, derivada de la cepa brasileña CL, fue designada como la clona de referencia (Frasch, et al., 1997).

La región promotora del RNAr que nosotros estamos estudiando fue aislada de la cepa mexicana C4 (Martínez-Calvillo y Hernández, 1994). Sin embargo, decidimos llevar a cabo el análisis funcional del promotor en la clona de referencia internacional. Nuestros resultados demuestran que la región promotora del RNAr de la cepa C4 es fuertemente activa en la clona CL Brener. Esto hace del vector pRIBOTEX una herramienta muy útil para el estudio de diversos aspectos de la expresión genética en la clona de referencia internacional.

La RNA pol I de los tripanosomas puede producir RNAm funcionales

En años recientes, los tripanosomas han sido objeto de amplio estudio, no sólo por su importancia médica, sino también por los aspectos atípicos de su biología molecular. Un ejemplo de estos últimos lo constituye el hecho de que, contrario a lo que sucede en la mayoría de los eucariontes, en los tripanosomas se ha demostrado que la RNA pol I tiene la capacidad de producir eficientemente RNAm funcionales (Rudenko et al., 1991; Zomerdijk et al., 1991a). En otros organismos esto no es posible debido a que la enzima que adiciona el "cap" al extremo 5' de los RNAm se encuentra asociada con la RNA pol II, y no con la RNA pol I; por esto, cuando un RNAm es sintetizado con la RNA pol I, éste carece de un "cap" y por lo tanto es un transcrito inestable que además es traducido con baja eficiencia (Lopata et al., 1986; Chung et al., 1992). En los tripanosomas el "cap" se adiciona post-transcripcionalmente, por trans-splicing, por lo que teóricamente cualquier molécula de RNA puede adquirirlo si posee un sitio aceptor del miniexón, independientemente de la RNA polimerasa que lo haya sintetizado (Rudenko et al., 1991). Nosotros hemos aprovechado este hecho para analizar el promotor del RNAr de *T. cruzi*, usando el gene reportero de CAT. De forma interesante, el fragmento de DNAr de 806 pb presente en pRIBOTEX-*cat* contiene, además de las secuencias promotoras, uno o más sitios aceptores del miniexón crípticos que resultaron muy eficientes; la adición de un sitio aceptor endógeno (del locus de GAPDH) produjo un incremento pequeño (de menos del doble) en la actividad de CAT (compare la actividad de pRIBOTEX-*cat* con la de pRIBO4-*cat*, en la tabla III). En *T. brucei*, en cambio, el promotor del RNAr

requiere forzosamente de la presencia de un sitio aceptor del miniexón para dirigir la expresión de un gene reportero (Rudenko et al., 1991).

Muy interesante es el hecho de que en *Trypanosoma brucei* los genes que codifican para las dos proteínas más abundantes, las glicoproteínas variables de superficie (VSG) y la prociclina, son aparentemente transcritos por la RNA pol I (Van der Ploeg et al., 1992; Chung et al., 1992). Varias líneas de evidencia apoyan esta hipótesis; por ejemplo, la transcripción de estos genes es resistente a altas concentraciones de α -amanitina y sarcosil (que inhiben totalmente a las RNA polimerasas II y III). Además, los promotores de los VSG y la prociclina presentan similitudes estructurales con el promotor del RNAr (Brown et al., 1992; Zomerdijk et al., 1991b). De hecho, se ha demostrado que promotores híbridos, con un dominio del promotor de RNAr y otro del promotor de la prociclina, pueden dirigir eficientemente la expresión del gene reportero de luciferasa (Janz y Clayton, 1994).

Promotores del RNAr en los tripanosomas.

Dentro de la familia Trypanosomatidae, el promotor del RNAr que ha sido más estudiado es el de *T. brucei*. Recientemente se reportó que un fragmento de DNAr de 268 pb, de -258 a +10, contiene todos los elementos requeridos para producir la máxima expresión de un gene reportero (Zomerdijk et al., 1991b; Rudenko et al., 1991). En analogía con otros organismos, en el promotor ribosomal de *T. brucei* está presente un dominio "río arriba", pues deleciones de la región de -258 a -181 producen

una caída de 7 veces en la actividad de CAT (Zomerdijk et al., 1991b). Generando mutaciones y deleciones en la región promotora, se encontró que el dominio central tiene dos regiones muy importantes: de -13 a -42 y de -53 a -62 (Janz y Clayton, 1994). Como en otros promotores ribosomales, mutaciones en las bases que rodean al sitio de inicio de la transcripción (-1 y +1) abaten totalmente la actividad promotora (Rudenko et al., 1991; Zomerdijk et al., 1991b). Por lo que toca a *Crithidia fasciculata*, el promotor de RNAr fue ubicado en un fragmento de 1.3 kb que contiene el sitio de inicio de la transcripción; con este fragmento se construyó un vector de expresión, pero el promotor no ha sido disectado (Biebinger y Clayton, 1996). En *Leishmania chagasi* y *Leishmania amazonensis* recientemente se localizó el sitio de inicio de la transcripción de la unidad de RNAr, pero los promotores no han sido delimitados con detalle. En ambos casos la máxima expresión de los genes reporteros se obtiene con fragmentos mayores de 1kb (Gay et al., 1996; Uliana et al., 1996).

En *T. cruzi*, en el presente trabajo hemos demostrado que un fragmento de 355 pb, de las bases -148 a +207, contiene completa la región promotora del RNAr, pues con él se produce la máxima expresión del gene reportero de CAT (fig. 14B y tabla IV). Futuros análisis nos permitirán determinar si es posible acortar aún más el fragmento sin que disminuya su fuerza promotora. No obstante, con este resultado podemos ya afirmar que de existir un dominio "río arriba" en el promotor ribosomal de *T. cruzi*, éste sería más pequeño que en *T. brucei*, en donde dicho dominio se extiende hasta la base -258 (Zomerdijk et al., 1991b).

Nuestros geles de retardamiento con el DNAr (ver manuscrito) claramente demuestran que el fragmento de 64 pb que incluye el sitio de inicio de la transcripción, y que está contenido en el fragmento de 355 pb, une de manera específica proteínas nucleares de *T. cruzi*. La elevada actividad promotora de esta región nos hace suponer que las proteínas que se le unen son factores transcripcionales. El fragmento de 64 pb abarca de las bases -48 a +16, por lo que podría contener el dominio central del promotor ribosomal, como ocurre en mamíferos y en levadura (Sollner-Webb y Mougey, 1991; Young Choe et al., 1992).

Un punto interesante a destacar es el hecho de que en el fragmento de 355 pb no está contenida la probable región promotora proximal, reportada por Dietrich et al. (1993) en la cepa CL de *T. cruzi* (Martínez-Calvillo y Hernández, 1994). Comparando la actividad de CAT obtenida con pRIBO4-*cat* y pRIBO6-*cat* (que sí contienen el promotor proximal) contra pRIBO9-*cat* (en donde fue deletado el promotor proximal) no se observan diferencias importantes (tabla IV).

El grupo que describió el promotor proximal en la cepa CL reportó recientemente la secuencia del promotor de RNAr de varias cepas sudamericanas de *T. cruzi* (Nunes et al., 1997). La comparación de dichas secuencias permitió dividir en dos grupos a los promotores ribosomales, presentándose alrededor de un 13% de diferencias entre los dos grupos, y diferencias de 0.16 a 1.3% dentro de cada grupo. Cabe aclarar que el fragmento de DNAr que usan en las comparaciones incluye el promotor distal (Martínez-Calvillo y Hernández, 1994), además del proximal.

Transfecciones transitorias llevadas a cabo con plásmidos reporteros contruidos con un promotor representativo de cada grupo indicaron que los promotores del grupo I son funcionales en las cepas de ese mismo grupo, pero no en las cepas que tienen promotor del grupo II. En cambio, los promotores del grupo II resultaron activos en todas las cepas. Cuando nosotros comparamos la secuencia del promotor ribosomal de la cepa C4 con el resto de las secuencias reportadas encontramos que pertenece al grupo II (datos no mostrados), lo cual significa que el vector pRIBOTEX es funcional en todas las cepas, independientemente del grupo al que pertenezcan. El hecho de que pRIBOTEX sea tan activo en la clona CL Brener, que pertenece al grupo I, apoya esta afirmación.

De forma interesante, el análisis de las secuencias promotoras del gene del miniexón de *T. cruzi*, y otros análisis moleculares (Nunes et al., 1997; Souto et al., 1996) han revelado resultados similares a los obtenidos con el promotor del RNAr, en el sentido de que las cepas de *T. cruzi* pueden dividirse en dos subgrupos. Se ha propuesto que los dos subgrupos representan linajes filogenéticos independientes, resultado de una divergencia evolutiva temprana (Souto et al., 1996; Floeter-Winter et al., 1997).

¿Es el elemento ER-172 un activador de la transcripción?

Los elementos repetidos de 60/81 pb de *Xenopus* (Labhart y Reeder, 1984) y los de 140 pb de ratón (Kuhn et al., 1990) funcionan como activadores de la transcripción del locus del RNAr. La estimulación en la

transcripción es mayor al aumentar el número de elementos repetidos, llegando a ser de hasta 5-20 veces en *Xenopus* (Reeder, 1984) y de 2-12 veces en ratón (Pikaard et al., 1990). En protozoarios, aparentemente los enhancers de la unidad de RNAr son menos fuertes que en vertebrados: en *Acanthamoeba castellanii* los elementos repetidos de 140 pb estimulan alrededor de dos veces la síntesis del RNAr (Yang et al., 1994), mientras que las secuencias repetidas de 64 pb de *L. chagasi* incrementan la expresión de un gene reportero sólo 1.5 veces (Gay et al., 1996). Tyler-Cross et al. (1995) reportaron que los elementos repetidos de 172 pb (ER-172) de los espaciadores intergénicos de *T. cruzi* no estimulan la transcripción del promotor ribosomal; sin embargo, la naturaleza repetitiva y la localización de dichos elementos fuertemente sugieren lo contrario. Nuestro propio análisis a este respecto nos dio resultados contradictorios. Por una parte, la delección de la copia del ER-172 de pRIBOTEX-cat (en el plásmido p Δ ER172-cat) fue suficiente para disminuir 145 veces la actividad de CAT (tabla II). Por otro lado, la ausencia del ER-172 en pRIBO6-cat y pRIBO9-cat no generó ningún cambio en la actividad del gene reportero, comparando con pRIBO4-cat y pRIBO8-cat (tablas III y IV). El hecho de que la única diferencia entre p Δ ER172-cat y pRIBO4-cat sea que este último presenta un sitio aceptor del miniexón endógeno (del locus de GAPDH) nos sugiere que la drástica reducción en la actividad de CAT observada con p Δ ER172-cat probablemente se deba a una alteración en el procesamiento del transcrito de CAT, y no a una reducción en la transcripción del mismo. En este plásmido, la eficiencia del trans-splicing del RNAm de CAT pudo haberse afectado como consecuencia de la delección de 185 pb del inserto de DNAr, o debido a la incorporación de un

cambio en la secuencia del fragmento durante la amplificación por PCR. A este respecto, al secuenciar ambos extremos del fragmento de 629 pb clonado en p Δ ER172-*cat* no encontramos ningún cambio; aunque tal vez en los 220 pb no secuenciados (en el centro del inserto) podría presentarse alguna modificación en la secuencia. En forma adicional, parecería poco probable que una sola copia del elemento ER-172 fuera capaz de estimular 145 veces la transcripción del RNAr, considerando que los reportes indican que en los protozoarios los enhancers son poco activos. Nuestros resultados, no obstante, tampoco nos permiten concluir que el ER-172 no es un activador de la transcripción. Probablemente se requieran varias copias del elemento para que la estimulación de la transcripción sea evidente, como en *L. chagasi* (Gay et al., 1996). Será necesario construir nuevos vectores en los que estén presentes varias copias del elemento repetido ER-172 para esclarecer su papel en la síntesis del RNAr.

En resumen, en este trabajo demostramos que las secuencias de DNA que contienen el sitio de inicio de la transcripción del gene del RNAr de *T. cruzi* contienen la región promotora de dicho gene. Nuestros resultados muestran que en un fragmento de 355 pb (de los nucleótidos -148 a +207) está presente la región promotora completa, pues con él se obtiene la máxima expresión de un gene reportero. Mediante ensayos CAT transitorios encontramos que el promotor de RNAr es alrededor de 16,000 veces más fuerte que el promotor del gene de gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa. Por medio de geles de retardamiento encontramos que proteínas nucleares de *T. cruzi* se unen de manera

específica a las secuencias promotoras del RNAr. Además, con el promotor ribosomal construimos el vector de expresión para *T. cruzi* pRIBOTEX. A diferencia de otros vectores, pRIBOTEX permite una muy elevada expresión transitoria y estable de un gene reportero. Además, con pRIBOTEX se acorta al menos dos semanas el tiempo de selección para la obtención de líneas transfectadas establemente (en comparación con el vector pTEX). Otra ventaja de pRIBOTEX es el hecho de que es muy activo en la clona de referencia internacional CL Brener. Todas estas características hacen de pRIBOTEX una herramienta muy útil para la expresión de genes en *T. cruzi*. De hecho, investigadores de varios laboratorios del mundo ya nos han solicitado este vector para estudiar diversos aspectos de la biología de *T. cruzi*.

CONCLUSIONES

- Un fragmento de 806 pb que contiene el sitio de inicio de la transcripción del locus del RNAr de *T. cruzi* es capaz de dirigir eficientemente la expresión del gene reportero de CAT. Cuando el fragmento de DNAr es analizado en la orientación de 3'-5' no se presenta actividad reportera alguna.
- Hemos construido los vectores pRIBOTEX y pRIBOTEX-cat con el fragmento de 806 pb que contiene la región promotora del gene del RNAr. pRIBOTEX permite una muy elevada expresión transitoria y estable de un gene reportero. Con este plásmido, además, se acorta al menos dos semanas el tiempo de selección para la obtención de líneas transfectadas establemente.
- En ensayos CAT transitorios, con extractos de células transformadas con pRIBOTEX-cat y pTEX-cat, encontramos que el promotor del RNAr es cerca de 16,000 veces más fuerte que el promotor del gene de gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa.
- El análisis molecular de los cultivos transformados establemente reveló que: 1) las células transfectadas con pRIBOTEX-cat contienen alrededor de 50 veces menos DNA de plásmido que las células transfectadas con pTEX-cat; y 2) pRIBOTEX se integra en el genoma de *T. cruzi*, mientras que pTEX se mantiene como elemento extracromosomal.
- Haciendo deleciones en el fragmento de 806 pb, encontramos que un fragmento de 335 pb, de las bases -148 a +207, es suficiente para obtener la máxima expresión del gene reportero de CAT.
- Un fragmento de DNAr de 64 pb que contiene el sitio de inicio de la transcripción une de manera específica proteínas nucleares de *T. cruzi*. Con otros fragmentos de DNAr no se observaron complejos DNA-proteína.
- Una proteína de 24 kDa se asocia específicamente con el promotor del gene del RNAr de *T. cruzi*.

PERSPECTIVAS

En el presente trabajo reportamos que un fragmento de DNA de 355 pb (de los nucleótidos -148 a +207) contiene la región promotora del gene de RNAr de *T. cruzi*. Uno de nuestros intereses es encontrar la secuencia mínima que sea capaz de dirigir la máxima expresión del gene reportero de CAT. Para ello llevaremos a cabo deleciones del fragmento de 355 pb. Asimismo, estamos interesados en analizar minuciosamente el promotor, localizando nucleótidos funcionalmente importantes, y determinado si está formado por dos dominios (central y "upstream"), como ocurre en otros organismos eucariontes. La identificación y caracterización de las proteínas que interaccionan con el promotor del gene de RNAr es otra de las áreas que nos gustaría explorar. Resultaría interesante determinar si el complejo de iniciación de la RNA pol I de los tripanosomas está formado por proteínas análogas a UBF y SL1. En los tripanosomas se sabe muy poco sobre las secuencias activadoras de la transcripción. En particular, en *T. cruzi* no se ha descrito ninguna de dichas secuencias, por lo que resulta interesante continuar analizando la probable función de enhancer del elemento ER-172.

El análisis de la secuencia promotora de la unidad de RNA ribosomal de *T. cruzi* es parte de un proyecto que, largo plazo, tiene por objetivo principal el estudiar como se regula y coordina la síntesis del RNAr con la de los otros componentes del ribosoma (esto es, las proteínas ribosomales y el RNAr 5S). La participación de las tres RNA polimerasas en la síntesis de los componentes del ribosoma hace aún más interesante este estudio.

REFERENCIAS

- Ağabian, N., 1990. Trans-splicing of nuclear pre-mRNAs. *Cell* 61, 1157-1160.
- Balzi, E., Di Pietro, A., Goffeau, A., Van Heerikhuizen, H. y Klootwijk, J., 1985. The RNA polymerase I initiation site and the external transcribed spacer of the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe* rRNA genes. *Gene* 39, 165-172.
- Bell, S.P., Learned, R.M., Jantzen, H. y Tjian, R., 1988. Functional cooperativity between transcription factors UBF1 and SL1 mediates human ribosomal RNA synthesis. *Science* 241, 1192-1197.
- Benne, R., Van Den Burg, J., Brakenhoff, J.P.J., Sloof, P., van Bomm, J.H. y Tromp, M.C., 1986. Major transcript of the frameshifted cox II gene from trypanosome mitochondria contains four nucleotides that are not encoded in the DNA. *Cell* 46, 819-826.
- Benne, R., 1994. RNA editing in trypanosomes. *Eur. J. Biochem.* 221, 9-23.
- Biebinger, S. y Clayton, C., 1996. A plasmid shuttle vector bearing an rRNA promoter is extrachromosomally maintained in *Crithidia fasciculata*. *Exp. Parasitol.* 83, 252-258.
- Blum, B., Bakalara, N. y Simpson, L., 1990. A model for RNA editing in kinetoplastid mitochondria: "guide" RNA molecules transcribed from maxicircle DNA provide the edited information. *Cell* 60, 189-198.
- Bonem, L., 1993. Trans-splicing of pre-RNA^m in plants, animals, and protists. *FASEB J.* 7, 40-46.
- Breathnach, R. y Chambon, P., 1981. Organization and expression of eukaryotic split genes coding for proteins. *Ann. Rev. Biochem.* 50, 349-383.
- Brown, S.D., Huang, J. y Van der Ploeg, L.H.T., 1992. The promoter for the procyclic acidic repetitive protein (PARP) genes of *Trypanosoma brucei* shares features with RNA polymerase I promoters. *Mol. Cel. Biol.* 12, 2644-2652.

- Bruzik, J.P. y Steitz, J.A., 1990. Spliced leader RNA sequences can substitute for the essential 5' end of U1 RNA during splicing in a mammalian in vitro system. *Cell* 62, 889-899.
- Comai, L., Tanese, N. y Tjian, R., 1992. The TATA-binding protein and associated factors are integral components of the RNA polymerase I transcription factor, SL1. *Cell* 68, 965-976.
- Coquelet, H., Tebani, P., Pays, A., Steinert, M. y Pays, E., 1989. *Trypanosoma brucei*: enrichment by UV of intergenic transcripts from the variable surface glycoprotein gene expression site. *Mol. Cell. Biol.* 9, 4022-4025.
- Chung, H.M., Lee, M.G.S. y Van der Ploeg, L.H.T., 1992. RNA polymerase I mediated protein-coding gene expression in *Trypanosoma brucei*. *Parasitol. Today* 8, 414-418.
- Dietrich, P., Soares, M.B., Affonso, M.H.T. y Floeter-Winter, L.M., 1993. The *Trypanosoma cruzi* ribosomal RNA-encoding gene: analysis of promoter and upstream intergenic spacer sequences. *Gene* 125, 103-107.
- Fantoni, A., Dare, A.O. y Tschudi, C., 1994. RNA polymerase III-mediated transcription of the trypanosome U2 small nuclear RNA gene is controlled by both intragenic and extragenic regulatory elements. *Mol. Cell. Biol.* 14, 2021-2028.
- Feagin, J.E., Abraham, J.M. y Stuart, K., 1988. Extensive editing of the cytochrome C oxidase III transcript in *Trypanosoma brucei*. *Cell* 53, 413-422.
- Fife, E.H., 1977. *Trypanosoma cruzi*. En *Parasitic protozoa* (J.P. Kreier, ed.). Academic Press, Nueva York, pp. 135-173.
- Floeter-Winter, L.M., Souto, R.P., Stolf, B.S., Zingales, B. y Buck, G.A., 1997. *Trypanosoma cruzi*: Can activity of the rRNA gene promoter be used as a marker for speciation? *Exp. Parasitol.* 86, 232-234.

- Frasch, A.C., Zingales, B., Rondinelli, E., Degraeve, W., da Silveira, J.F., et al., 1997. The *Trypanosoma cruzi* genome initiative. *Parasitol. Today* 13, 16-22.
- García, E.S. y Azambuja, P., 1991. Development and interactions of *Trypanosoma cruzi* within the insect vector. *Parasitol. Today* 7, 240-243.
- García-Carrancá, A., Alvarez-Salas, L., Bravo, C., Yaniv, M., y Gariglio, P., 1990. A nuclear factor from epithelial cells binds to conserved "TTGGCTT" motifs on the long control region of human papillomavirus type 18 (HPV18). En *Papillomaviruses* (P.M. Howley, T.R. Broker, Eds.). Wiley-Liss, New York, pp. 445-454.
- Gay, L.S., Wilson, M.E. y Donelson, J.E., 1996. The promoter for the ribosomal RNA genes of *Leishmania chagasi*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 77, 193-200.
- Gcourse, R.L., Gaal, T., Bartlett, M.S., Appleman, J.A. y Ross, W., 1996, rRNA transcription and growth rate-dependent regulation of ribosome synthesis in *Escherichia coli*. *Ann. Rev. Microbiol.* 50, 645-677.
- Graham, S.V., 1995. Mechanisms of stage-regulated gene expression in kinetoplastida. *Parasitol. Today* 11, 217-223.
- Grøndal, E.J.M., Evers, R., Kosubek, K. y Cornelissen, W.C.A., 1989. Characterization of the RNA polymerases of *Trypanosoma brucei*: trypanosomal mRNAs are composed of transcripts derived from both RNA polymerase II and III. *EMBO J.* 8, 3383-3389.
- Grummt, I., Roth, E. y Paule, M.R., 1982. Ribosomal RNA transcription *in vitro* is species-specific. *Nature* 296, 173-174.
- Hajduk, S.L., Harris, M.E. y Pollard, V.W., 1993. RNA editing in kinetoplastid mitochondria. *FASEB J.* 7, 54-63.
- Haltiner, M.M., Smale, S.T. y Tjian, R., 1986. Two distinct promoter elements in the human rRNA gene identified by linker scanning mutagenesis. *Mol. Cell. Biol.* 6, 227-235.

- Hanada, K., Song, Ch.Z., Yamamoto, K., Yano, K., Maeda, Y., Yamaguchi, K. y Muramatsu, M., 1996. RNA polymerase I associated factor 53 binds to the nucleolar transcription factor UBF and functions in specific rDNA transcription. *EMBO J.* 15, 2217-2226.
- Hehl, A. y Roditi, I., 1994. The regulation of procyclin expression in *Trypanosoma brucei*: making or breaking the rules? *Parasitol. Today* 10, 442-445.
- Hernández, R., Díaz de León, F. y Castañeda, M., 1988. Molecular cloning and partial characterization of rRNA genes from *Trypanosoma cruzi*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 27, 275-280.
- Hernández-Rivas, R., Martínez-Calvillo, S., Romero, M. y Hernández, R., 1992. *Trypanosoma cruzi* 5S rRNA genes: molecular cloning, structure and chromosomal organization. *FEMS Microbiol. Lett.* 92, 63-68.
- Huang, J. y Van der Ploeg, L.H.T., 1991. Requirement of a polypyrimidine tract for trans-splicing in trypanosomes: discriminating the PARP promoter from the immediately adjacent 3' spliced acceptor site. *EMBO J.* 10, 3877-3885.
- Ishikawa, Y., Safrany, G., Hisatake, K., Tanaka, N., Maeda, Y., Kato, H., Kominami, R. y Muramatsu, M., 1991. Structure of the core promoter of human and mouse ribosomal RNA gene. Asymmetry of species-specific transcription. *J. Mol. Biol.* 218, 55-67.
- Jantzen, H., Admon, A., Bell, S.P. y Tjian, R., 1990. Nucleolar transcription factor hUBF contains a DNA-binding motif with homology to HMG proteins. *Nature* 334, 830-836.
- Jarz, L. y Clayton, C., 1994. The PARP and rRNA promoters of *Trypanosoma brucei* are composed of dissimilar sequences elements that are interchangeable. *Mol. Cell. Biol.* 14, 5804-5811.
- Kapotas, N. y Bellofatto, V., 1993. Differential response to RNA trans-splicing signals within the phosphoglycerate kinase gene cluster in *Trypanosoma brucei*. *Nucleic Acids Res.* 21, 4067-4072.

- Kelly, J.M., Ward, H.M., Miles, M.A. y Kendall, G., 1992. A shuttle vector which facilitates the expression of transfected genes in *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania*. *Nucleic Acids Res.* 20, 3963-3969.
- Kierszenbaum, F. y Hudson, L., 1985. Autoimmunity in Chagas disease: cause or symptom? *Parasitol. Today* 1, 4-9.
- Kooter, J.M., van der Spek, H.J., Wagter, R., d'Oliveira, Ch.E., van der Hoeven, F., Johnson, P.J. y Borst, P., 1987. The anatomy and transcription of a telomeric expression site for variant-specific surface antigens in *Trypanosoma brucei*. *Cell* 51, 261-272.
- Kuhn, A., Deppert, U. y Grummt, I., 1990. A 140-base-pair repetitive sequence element in the mouse rRNA gene spacer enhances transcription by RNA polymerase I in a cell-free system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, 7527-7531.
- Labhart, P. y Reeder, R.H., 1984. Enhancer-like properties of the 60/81 bp elements in the ribosomal gene spacer of *Xenopus laevis*. *Cell* 37, 285-289.
- Layden, R.E. y Eisen, H., 1988. Alternate trans-splicing in *Trypanosoma equiperdum*: implications for splice site selection. *Mol. Cell. Biol.* 8, 1352-1360.
- Lopata, M.A., Cleveland, D.W. y Sollner-Webb, B., 1986. RNA polymerase specificity of mRNA production and enhancer action. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83, 6677-6681.
- Martínez-Calvillo, S. y Hernández, R., 1994. *Trypanosoma cruzi* ribosomal DNA: mapping of a putative distal promoter. *Gene* 142, 243-247.
- Maslov, D.A. y Simpson, L., 1995. Evolution of the parasitism in kinetoplastid protozoa. *Parasitol. Today* 11, 30-32.
- Matthews, K.R., Tschudi, C. y Ullu, E., 1994. A common pyrimidine-rich motif governs trans-splicing and polyadenylation of tubulin polycistronic pre-mRNA in trypanosomes. *Genes Dev.* 8, 491-501.

- McGhee, R.B. y Cosgrove, W.B., 1980. Biology and physiology of the lower Trypanosomatidae. *Microbiol. Rev.* 44, 140-173.
- Miles, M.A., 1979. Transmission cycles and the heterogeneity of *Trypanosoma cruzi*. En *Biology of the kinetoplastida* (W.H.R. Lumsden y D.A. Evans, eds.). Academic Press, Londres, pp. 117-196.
- Myler, P.J., 1993. Molecular variation in trypanosomes. *Acta Tropica* 53, 205-225.
- Nogueira, N., 1986. American trypanosomiasis: antigens and host-parasite interactions. En *Parasite antigens, toward new strategies for vaccines* (T.W. Pearson, ed.). Marcel Dekker Inc., Nueva York, pp. 91-110.
- Nomura, M., 1990. History of ribosome research: a personal account. En *The ribosome: structure, function and evolution*. (W.E. Hill, A.E. Dahlberg, R.A. Garret, P.B. Moore, D. Schlessinger y J.R. Warner, eds.). American Society of Microbiology, Washington, D.C., pp. 3-55-
- Nunes, L.R., de Carvalho, M.R. y Buck, G.A., 1997. *Trypanosoma cruzi* strains partition into two groups based on the structure and function of the spliced leader RNA and rRNA gene promoters. *Mol. Biochem. Parasitol.* 86, 211-224.
- OMS. 1991. Control de la enfermedad de Chagas. Informe de un comité de expertos de la Organización Mundial de la Salud. Serie de informes técnicos no. 811. Ginebra, 101 pp.
- Patnaik, P.K., Kulkarni, S.K. y Cross, G.A.M., 1993. Autonomously replicating single-copy episomes in *Trypanosoma brucei* show unusual stability. *EMBO J.* 12, 2529-2538.
- Pay, E., Coquelet, H., Pays, A., Tebani, P. y Steinert, M., 1989. *Trypanosoma brucei*: posttranscriptional control of the variable surface glycoprotein gene expression site. *Mol. Cell. Biol.* 9, 4018-4021.

- Pereira, M.E.A., 1990. Cell biology of *Trypanosoma cruzi*. En Modern parasite biology: cellular, immunological and molecular aspects (J.W. David, ed.). W.H. Freeman and Company, Nueva York, pp. 64-78.
- Pikaard, C.S., Pape, L.K., Henderson, S.L., Ryan, K., Paalman, M.H., Lopata, M.A., Reeder, R.H. y Sollner-Webb, B., 1990. Enhancers for RNA polymerase I in mouse ribosomal DNA. Mol. Cell. Biol. 10, 4816-4825.
- Planta, R.J. y Raué, H.A., 1988. Control of ribosome biogenesis in yeast. TIG 4, 64-68.
- Reeder, R.H., 1984. Enhancers and ribosomal gene spacers. Cell 38, 349-351.
- Reeder, R.H., 1992. Regulation of transcription by RNA polymerase I. En Transcriptional regulation (S.L. McKnight y K.R. Yamamoto, eds.). CSHL Press, Nueva York, pp. 315-347.
- Reeder, R.H., 1990. rRNA synthesis in the nucleolus. TIG 6, 390-395.
- Roeder, R.G., 1996. Nuclear RNA polymerases: role of general initiation factors and cofactors in eukaryotic transcription. Methods Enzymol. 273, 165-171.
- Rudenko, G., Chung, H.M.M., Pham, V.P. y Van der Ploeg, L.H.T., 1991. RNA polymerase I can mediate expression of CAT and neo protein-coding genes in *Trypanosoma brucei*. EMBO J. 10, 3387-3397.
- Sa to, R.M., Elgort, M.G. y Campbell, D.A., 1994. A conserved upstream element is essential for transcription of the *Leishmania tarentolae* mini-exon gene. EMBO J. 13, 5460-5469.
- Sánchez-Hernández, B.E., 1996. Uso de elisa, western blot y hemocultivo para el estudio de la enfermedad de Chagas en el estado de Morelos. Tesis para obtener el título de Químico-biólogo, Escuela de Ciencias Químicas, Universidad Autónoma Benito Juárez de Oaxaca.
- Schnapp, A., Rosenbauer, H. y Grummt, I., 1991. Trans-acting factors involved in species-specificity and control of mouse ribosomal gene transcription. Mol. Cell. Biochem. 104, 137-147.

- Schurch, N., Hehl, A., Vassella, E., Braun, R. y Roditi, I., 1994. Accurate polyadenylation of procyclin mRNAs in *Trypanosoma brucei* is determined by pyrimidine-rich elements in the intergenic regions. *Mol. Cell. Biol.* 14, 3668- 3675.
- Shaw, P.J. y Jordan, E.G., 1995. The nucleolus. *Ann. Rev. Cell Dev. Biol.* 11, 93-121.
- Shlomai, J., 1994. The assembly of kinetoplast DNA. *Parasitol. Today* 10, 341-346.
- Smith, J.L., Levin, J.R., Ingles, C.J. y Agabian, N., 1989. In trypanosomes the homolog of the largest subunit of RNA polymerase II is encoded by two genes and has a highly unusual C-terminal domain structure. *Cell* 56, 815-827.
- Smith, S.D., Oriahi, E., Lowe, D., Yang-Yen, H.F., O'Mahony, D., Rose, K., Chen, K. y Rothblum, L.I., 1990. Characterization of factors that direct transcription of rat ribosomal DNA. *Mol. Cell. Biol.* 10, 3105-3116.
- Sollner-Webb, B. y Mougey, E.B., 1991. News from the nucleolus: rRNA gene expression. *TIBS* 16, 58-62.
- Sollner-Webb, B. y Tower, J., 1986. Transcription of cloned eukaryotic ribosomal RNA genes. *Ann. Rev. Biochem.* 55, 801-830.
- Sornmerville, J., 1984. RNA polymerase I promoters and transcription factors. *Nature* 310, 189-190.
- Souto, R.P., Fernandes, O., Macedo, A.M., Campbell, D.A. y Zingales, B., 1996. DNA markers define two major phylogenetic lineages of *Trypanosoma cruzi*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 83, 141-152.
- Spencer, D.F., Collings, J.C., Schnare, M.N. y Gray, M.W., 1987. Multiple spacer sequences in the nuclear large subunit rRNA gene of *Crithidia fasciculata*. *EMBO J.* 6, 1063-1071.
- Stuart, K., Allen, T.E., Heidmann, S. y Seiwert, S.D., 1997. RNA editing in kinetoplastid protozoa. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 61, 105-120.

- Teixeira, S.M.R., Russell, D.G., Kirchoff, L.V. y Donelson, J.E., 1994. A differentially expressed gene family encoding "amastin", a surface protein of *Trypanosoma cruzi* amastigotes. *J. Biol. Chem.* 269, 20509-20516.
- Tibayrenc, M., Neubauer, K., Barnabe, C., Guerrini, F., Skarecky, D. y Ayala, F.J., 1993. Genetic characterization of six parasitic protozoa: parity between random-primer DNA typing and multilocus enzyme electrophoresis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 1335-1339.
- Tyler-Cross, R.E., Short, S.L., Floeter-Winter, L.M. y Buck, G.A., 1995. Transient expression mediated by the *Trypanosoma cruzi* rRNA promoter. *Mol. Biochem. Parasitol.* 72, 23-31.
- Uliana, S.R.B., Fischer, W., Stempliuk, V.A. y Floeter-Winter, L.M., 1996. Structural and functional characterization of the *Leishmania amazonensis* ribosomal RNA promoter. *Mol. Biochem. Parasitol.* 76, 245-255.
- Van der Ploeg, L.H.T., Gottesdiener, K. y Lee, M.G.S., 1992. Antigenic variation in african trypanosomes. *TIG* 8, 452-457.
- Vanhamme, L. y Pays, E., 1995. Control of gene expression in trypanosomes. *Microbiol. Rev.* 59, 223-240.
- Velasco, O., 1991. La enfermedad de Chagas. Publicación técnica del INDRE no. 8, Secretaría de Salud. México D.F., 56 pp.
- Warner, J.R., 1989. Synthesis of ribosomes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol. Rev.* 53, 256-271.
- White, T.C., Rudenko, G. y Borst, P., 1986. Three small RNAs within the 10 kb trypanosome rRNA transcription unit are analogous to domain VII of other eukaryotic 28S rRNAs. *Nucleic Acids Res.* 14, 9471-9489.
- Xie, W.Q., O'Mahoney, D.J., Smith, S.D. y Rothblum, L., 1991. Complementary *in vivo* and *in vitro* analyses of the interactions between the cis-acting elements of the rat rDNA promoter. *Mol. Cell. Biochem.* 104, 127-135.

- Yang, Q., Zwick, M.G. y Paule, M.R., 1994. Sequence organization of the *Acanthamoeba* rRNA intergenic spacer: identification of transcriptional enhancers. *Nucleic Acids Res.* 22, 4798-4805.
- Young-Choe, S., Schultz, M.C. y Reeder, R.H., 1992. *In vitro* definition of the yeast RNA polymerase I promoter. *Nucleic Acids Res.* 20, 279-285.
- Zavala-Castro, J.E., Velasco-Castrejón, O. y Hernández, R., 1992. Molecular characterization of mexican stocks of *Trypanosoma cruzi* using total DNA. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 47, 201-209.
- Zentgraf, U. y Hemleben, V., 1992. Complex formation of nuclear proteins with the RNA polymerase promoter and repeated elements in the external transcribed spacer of *Cucumis sativus* ribosomal DNA. *Nucleic Acids Res.* 20, 3685-3691.
- Zomerdijk, J.C.B.M., Kieft, R. y Borst, P., 1991a. Efficient production of functional mRNA mediated by RNA polymerase I in *Trypanosoma brucei*. *Nature* 353, 772-775.
- Zomerdijk, J.C.B.M., Kieft, R., Shiels, P.G. y Borst, P., 1991b. Alpha-amanitin resistant transcription units in trypanosomes: a comparison of promoter sequences for a VSG gene expression site and for the ribosomal RNA genes. *Nucleic Acids Res.* 19, 5153-5158.

APÉNDICE



ELSEVIER

Acta Tropica 62 (1996) 163–170

ACTA
TROPICA

Trypanosoma cruzi rRNA genes: a repeated element from the non-transcribed spacer is locus specific

Myriam Pulido, Santiago Martínez-Calvillo, Roberto Hernández *

*Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México,
Apartado Postal 70-228, México D.F. 04510, México*

Received 16 May 1996; accepted 23 August 1996

Abstract

To determine the occurrence of conserved domains of presumed functional selection, a genomic restriction analysis was carried out in the region surrounding a transcription start point (tsp) from the rRNA cistron in *T. cruzi*. The transcribed spacer was found highly conserved among several isolates, whereas at 146 bp upstream from the tsp a highly polymorphic pattern was evidenced with a probe that contains sequences of a repetitive element (172 bp). Both genomic and chromosomal hybridizations indicated the linkage of the repetitive element to coding regions of the rRNA cistron. This represents the first example of a repetitive element not interspersed throughout the genome of *T. cruzi*, and strongly suggests that a functional role is being selected.

Keywords: *Trypanosoma cruzi*; rDNA spacer; Repetitive element

1. Introduction

Trypanosoma cruzi is the ancient protozoan causative agent of Chagas' disease. This organism has a remarkable biological heterogeneity (Dvorak, 1984). Therefore, the analysis of its genome is relevant for both biology and medicine.

As a genetic model we have been studying the *T. cruzi* nuclear cistrons encoding rRNA (Hernández et al., 1993). There are about 110 copies of these genes per nucleus encoded in at least two chromosomes (Castro et al., 1981; Wagner and So, 1990), separated by sequences longer than 20 kb (Hernández and Castañeda, 1983). Interestingly, *T. cruzi* rRNA genes exhibit an unusual organization where the coding regions for three large and 5 small rRNA molecules are separated by internal transcribed spacers (Hernández et al., 1988). Such an atypical gene structure is conserved in all trypanosomatids studied to date, and can be considered as a genetic

* Corresponding author. Tel. (525) 622 3872, Fax (525) 550 0048 E-mail: robher@servidor.unam.mx

hallmark of the family Trypanosomatidae (see Hernández et al., 1993 for review). Neither the transcribed gene spacers nor the external spacers that separate rRNA transcription units are conserved in other trypanosomes. The latter are even heterogeneous in length and/or sequence within individual *T. cruzi* isolates or clones, and have been used as molecular tools for parasite classifications (Zavala-Castro et al., 1992). Searching for conserved sequence domains of presumed functional selection, we carried out a comparative analysis of genomic restriction sites around the rRNA transcription start point (tsp) (Dietrich et al., 1993; Martínez-Calvillo and Hernández, 1994) from different isolates of *T. cruzi*. Our data here presented show that downstream from the tsp (Martínez-Calvillo and Hernández, 1994) there is a strong sequence conservation. On the other hand, upstream from this point within the non transcribed region, there is evident polymorphism of a previously identified direct repeated element (Dietrich et al., 1993). Recently, Tyler-Cross et al. (1995) reported that this repetitive element does not stimulate the expression of a gene reporter. Interestingly, the analysis here presented shows that this sequence is linked to the non-transcribed spacers of rRNA coding regions, and represents the first repetitive DNA not interdispersed throughout the *T. cruzi* genome.

2. Materials and methods

2.1. Isolates, cultures and genomic DNA preparations

Epimastigotes from selected *T. cruzi* Mexican isolates and international reference strains (Zavala-Castro et al., 1992) were cultured and total DNA was prepared as described therein.

2.2. DNA probes and sequence coordinates

As indicated in the figure legends, DNA probes for hybridizations were prepared from gel purified restriction fragments separated from the *T. cruzi* rDNA clone pRTC20 that carries sequences from the rRNA gene spacer (Hernández et al., 1988). This clone has been entirely sequenced (GeneBank accession numbers L13926 and M31432). The repetitive element here analyzed is flanked by positions 16-187 from the accessed sequence L13926. The DNA fragments were radiolabeled by random priming and [α -³²P]dATP from Amersham.

2.3. Genomic DNA and chromosomal southern hybridizations

Southern-blot experiments were carried out by standard techniques (Southern, 1975). For the analysis of chromosomes, epimastigotes were embedded and lysed in agarose blocks as described (Wagner and So, 1990). The embedded material of approximately 1×10^7 parasites was loaded on 0.8% agarose gels and submitted to transverse alternating field electrophoresis (TAFE) as previously described (Hernández-Rivas et al., 1992). Blots were prepared from these gels after

depurination in 0.2 N HCl. The samples were loaded in duplicate to produce equivalent pairs of filters per run. Hybridization conditions were carried as described elsewhere (Zavala-Castro et al., 1992). On the other hand, genomic hybridizations with different probes were carried out on the same membrane. Filters were stripped between probings by boiling in 10 mM EDTA pH 8 and 0.1% SDS with three changes of buffer. The membranes were always inspected by autoradiography for remaining signals of hybridization. If there was any faint band(s) still apparent, the membranes were left for decay until complete disappearance of the radioactive signal.

3. Results

3.1. Mapping of two genomic domains with different polymorphism

With the hypothesis that sequences structurally or functionally important are conserved throughout evolution, we carried out a comparative genomic Southern analysis around the rRNA *tsp* (Martínez-Calvillo and Hernández, 1994) as present in 4 South American clones and 7 Mexican isolates. Fig. 1 shows the hybridization profile of genomic DNA digested with *Hinf*I, hybridized to a 210 bp fragment (8-2) that carries the mapped transcription start sequence (Martínez-Calvillo and Hernández, 1994) (panel B), and the correspondent profile obtained with the upstream adjacent fragment 8-3 (280 bp) (panel A). The former exhibits a micro-heterogeneity consistent with the loss of a *Hinf*I site, whereas the latter shows a highly polymorphic pattern that distinguishes all DNA sources analyzed. The occurrence of *Hinf*I partial digestion products can be virtually ruled out since a parallel genomic digest was also hybridized with a probe derived from the internal region of the transcription unit, where there is no polymorphism, and no indication of partial digestion products was observed (data not shown). It is relevant to stress that the fragment 8-3 contains a repetitive element (172 bp) previously described (Dietrich et al., 1993).

3.2. Genomic linkage of sequences

With the aim to find out whether the repetitive element is present interspersed throughout the genome or only localized within the rDNA spacer, *Hind*III genomic Southern were independently probed with small subunit rRNA (SSU) coding regions and with a DNA fragment bearing the repetitive element of 172 bp (Fig. 2). It is appropriate to point out that a conserved *Hind*III site is present at 1700 bp downstream from the region encoding the 5' end of the SSU rRNA, and that upstream from this site *Hind*III polymorphism occurs within the non-transcribed intergenic spacer. Fig. 2 shows that, with exception of a band in the Mexican stock Ninoa DNA lane, all other bands are present, albeit with different intensities, in both autoradiographs. This indicates a linkage of the repetitive element with the coding region of the rRNA main transcription unit.

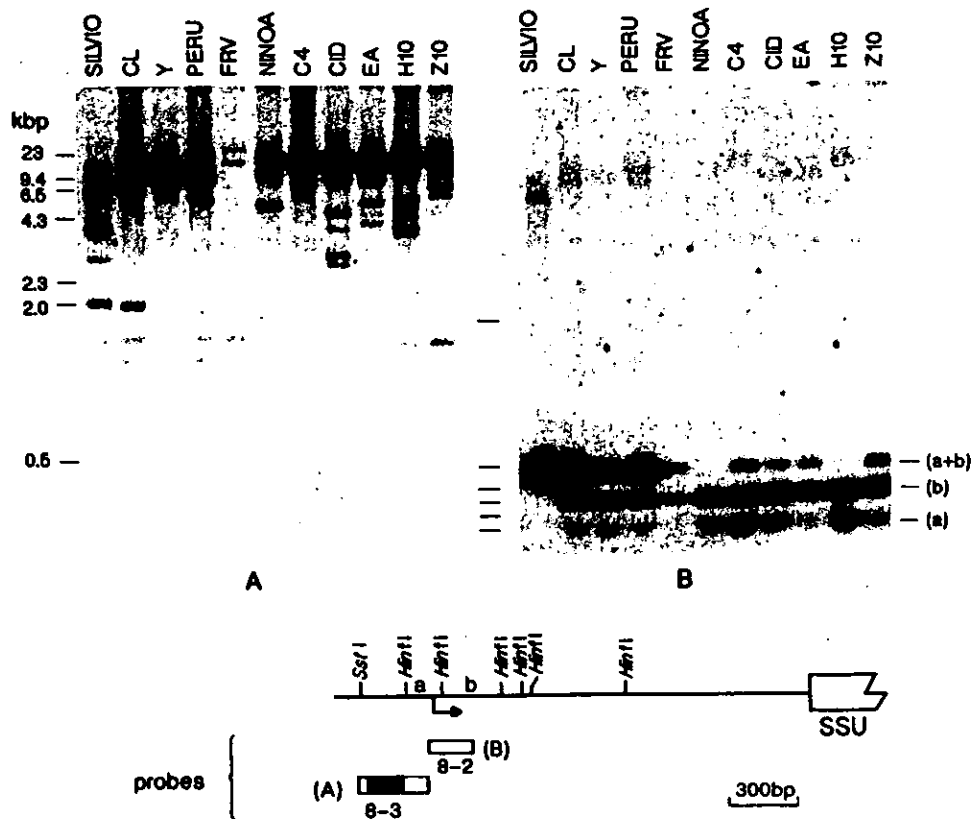


Fig. 1. Southern hybridization analysis of *T. cruzi* genomic DNA to rRNA gene spacer fragments. Total DNA from the indicated isolates or strains were digested with *HinfI* endonuclease and hybridized with cloned labeled fragments as indicated in the restriction map. The solid box within fragment 8-3 represents the 172 bp repeated element. The bent arrow indicates the transcription start point (tsp) mapped in our clone (Martínez-Calvillo and Hernández, 1994). SSU stands for small subunit rRNA coding region. Fragment size markers were λ *HindIII* (left to panel A) and pBR322 *HinfI* (in between panels A and B).

3.3. Chromosomal analysis

Chromosomes from 7 *T. cruzi* stocks were prepared and separated by TAFE (Hernández-Rivas et al., 1992). Southern blots were independently hybridized to both the repetitive element insert (8-3a) and the rRNA coding region (pRTC27). Fig. 3 shows that in all cases both probes hybridize to the same chromosomal bands.

4. Discussion

Several repetitive DNA elements have been reported from *T. cruzi* (Gonzalez et al., 1984; Wincker et al., 1990; Requena et al., 1992, 1994; Vazquez et al., 1994;

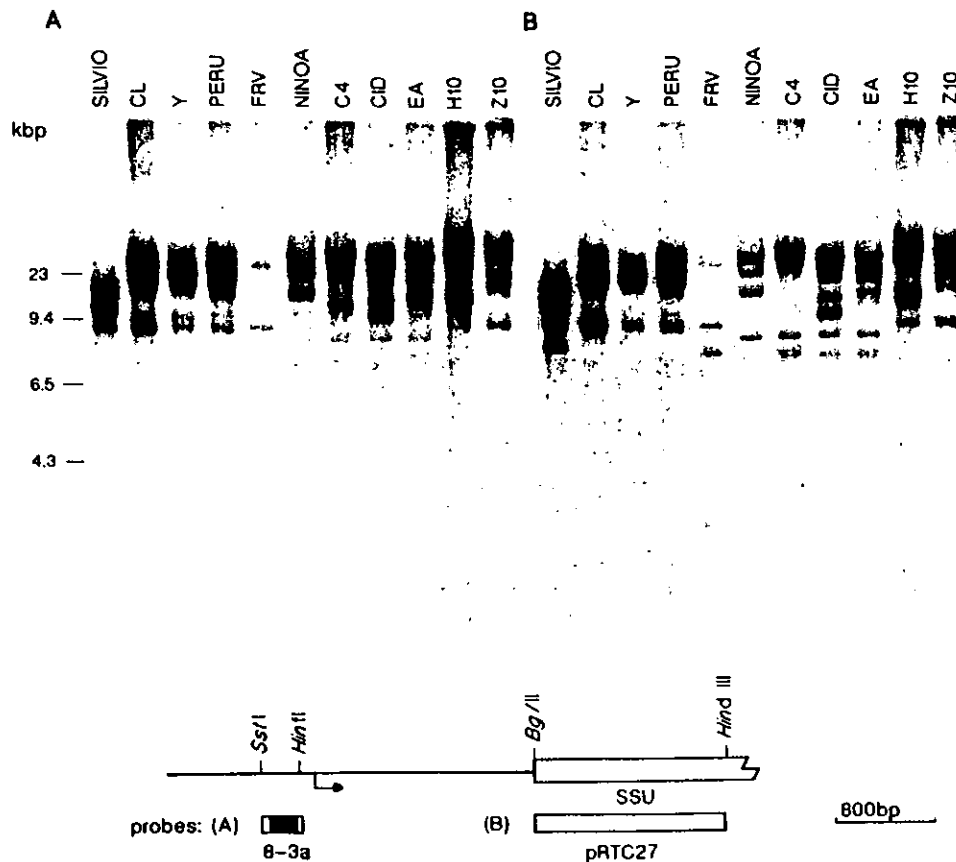


Fig. 2. Genomic linkage of the repetitive element to the rRNA cistron. *Hind*III digests of *T. cruzi* genomic DNAs were probed with a repetitive element bearing fragment (8-3a) or with a cloned insert from the SSU coding region (pRTC27). For additional explanation see legend to Fig. 1.

Gonzalez et al., 1994). Among these there are some found within the rRNA intergenic spacer region (Gonzalez et al., 1994), but in all the cases analyzed the repetitive DNAs occur interspersed along the genome, even in association with protein coding transcripts. A working hypothesis for repetitive motifs located upstream from the rRNA gene promoter is that they function as transcription enhancers, as has been demonstrated in the rRNA cistrons of insects, amphibians and mammals (Labhart and Reeder, 1984; Grimaldi and Di Nocera, 1988; Pikaard et al., 1990). The repetitive elements here analyzed are localized in a position analogous to the enhancers just mentioned, but their role as enhancers could not be demonstrated since they were unable to stimulate the *T. cruzi* rRNA promoter in a transient transfection assay (Tyler-Cross et al., 1995).

The findings here presented show for the first time the linkage of a *T. cruzi* repetitive DNA element to a specific locus (rRNA main transcription unit).

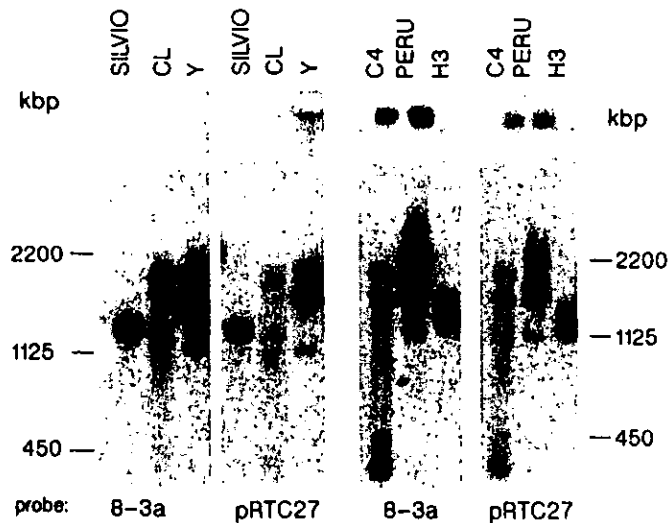


Fig. 3. Chromosomal comparative location of the repetitive element and the rRNA cistron. Southern hybridizations of selected *T. cruzi* isolates or strains chromosomal preparations separated under transverse alternating field electrophoresis. For DNA probes information see restriction map at the bottom of Fig. 2. *S. cerevisiae* chromosomes were used as size markers.

Moreover, taking into account the remarkable heterogeneity present within *T. cruzi* species (Dvorak, 1984), the genetic linkage described suggests that a biological function is being selected throughout evolution. Preliminary experiments of quantitative hybridization indicate that this element is present at different multiplicities depending upon the stock analyzed: the figures range from 2 to 8 fold molar excess to the rRNA coding regions. That is, about 200–800 copies per nuclei (data not shown). The repeats were localized at less than 150 bp upstream from the distal tsp of the rRNA cistron (Martínez-Calvillo and Hernández, 1994), and at about 3.5 kb from the region encoding the 3' end (data not shown).

A role in the enhancement of transcription has not been found for this element (Tyler-Cross et al., 1995). An independent and not exclusive hypothesis for its function could be the stimulation of inter- and intrachromosomal recombination. This role would be relevant in a conceivable mechanism for the rRNA gene homogenization among the 110 or so members of the family. *HOT1* is a recombination hot spot sequence from the rDNA promoter region of *Saccharomyces cerevisiae* (Haber, 1992), and could be paradigmatic in our case.

Finally, this repetitive element can be a very useful tool in the *T. cruzi* genome mapping project currently launched by the World Health Organization, since it represents a locus specific probe for otherwise large and heterogeneous rRNA intergenic regions.

Acknowledgements

We acknowledge I. López for critical reading of the manuscript. This work was partially supported by a grant from Dirección General de Asuntos del Personal Académico UNAM to R. Hernández and B. Espinoza (IN502495)

References

- Castro, C., Hernández, R. and Castañeda, M. (1981) *Trypanosoma cruzi* ribosomal RNA: internal break in the large molecular mass species and number of genes. *Mol. Biochem. Parasitol.* 2, 219–233.
- Dietrich, P., Soares, M.B., Afonso, M.H.T. and Floeter-Winter, L.M. (1993) The *Trypanosoma cruzi* ribosomal RNA-encoding gene: analysis of promoter and upstream intergenic spacer sequences. *Gene* 125, 103–107.
- Dvorak, J.A. (1984) The natural heterogeneity of *Trypanosoma cruzi*: biological and medical implications. *J. Cell. Biochem.* 24, 357–371.
- Gonzalez, A., Prediger, E., Huecas, M.E., Nogueira, N. and Lizardi, P.M. (1984) Minichromosomal repetitive DNA in *Trypanosoma cruzi*: its use in a high-sensitivity parasite detection assay. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81, 3356–3360.
- Gonzalez, N., Galindo, I., Guevara, P., Novak, E., Scorza, J.V., Añez, N., Da Silveira, J.F. and Ramirez J.L. (1994) Identification and detection of *Trypanosoma cruzi* by using a DNA amplification fingerprint obtained from the ribosomal intergenic spacer. *J. Clin. Microbiol.* 32, 153–158.
- Grimaldi, G. and Di Nocera, P.P. (1988) Multiple repeated units in *Drosophila melanogaster* ribosomal DNA spacer stimulate rRNA precursor transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 5502–5506.
- Haber, J.E. (1992) Exploring the pathways of homologous recombination. *Curr. Opin. Cell Biol.* 4, 401–412.
- Hernández, R. and Castañeda, M. (1983) An endonuclease restriction analysis of the ribosomal RNA genes of *Trypanosoma cruzi*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 8, 305–315.
- Hernández, R., Díaz-de León, F. and Castañeda, M. (1988) Molecular cloning and partial characterization of ribosomal RNA genes from *Trypanosoma cruzi*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 27, 275–280.
- Hernández, R., Martínez-Calvillo, S., Hernández-Rivas, R. and Gómez, E. (1993) *Trypanosoma cruzi* ribosomal RNA genes: a review. *Biol. Res.* 26, 109–114.
- Hernández-Rivas, R., Martínez-Calvillo, S., Romero, M. and Hernández, R. (1992) *Trypanosoma cruzi* 5S rRNA genes: molecular cloning, structure and chromosomal organization. *FEMS Microbiol. Lett.* 92, 63–68.
- Labhart, P. and Reeder, R.H. (1984) Enhancer-like properties of the 60/81 bp elements in the ribosomal gene spacer of *Xenopus laevis*. *Cell* 37, 285–289.
- Martínez-Calvillo, S. and Hernández, R. (1994) *Trypanosoma cruzi* ribosomal DNA: mapping of a putative distal promoter. *Gene* 142, 243–247.
- Pikaard, C.S., Pape, L.K., Henderson, S.L., Ryan, K., Paalman, M.H., Lopata, M.A., Reeder, R.H. and Sollner-Webb B. (1990) Enhancers for RNA polymerase I in mouse ribosomal DNA. *Mol. Cell. Biol.* 10, 4816–4825.
- Requena, J.M., Jimenez-Ruiz, A., Soto, M., Lopez, M.C. and Alonso, C. (1992) Characterization of a highly repeated interspersed DNA sequence of *Trypanosoma cruzi*: its potential use in diagnosis and strain classification. *Mol. Biochem. Parasitol.* 51, 271–280.
- Requena, J.M., Martín, F., Soto, M., Lopez, M.C. and Alonso, C. (1994) Characterization of a short interspersed reiterated DNA sequence of *Trypanosoma cruzi* located at the 3'-end of a poly(A)⁺ transcript. *Gene* 146, 245–250.
- Southern, E.M. (1975) Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* 98, 503–517.
- Tyler-Cross, R.E., Short, S.L., Floeter-Winter, L.M. and Buck, G.A. (1995) Transient expression mediated by the *Trypanosoma cruzi* rRNA promoter. *Mol. Biochem. Parasitol.* 72, 23–31.