



UNIVERSIDAD NACIONAL
AVANZADA

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

03062

3.
2 ej.

**CLONACION Y SECUENCIACION DE DOS
GENES DE ACTINA DE
Taenia colium (CESTODA).**

TESIS

ANDRES CANPOS LOPEZ

MAESTRIA EN INVESTIGACION BIOMÉDICA BÁSICA

AÑO 1990

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

INDICE

INTRODUCCION	1
SISTEMATICA DE <u>Taenia solium</u>	2
MORFOLOGIA Y CICLO DE VIDA DE <u>T. solium</u>	3
ANTECEDENTES Y OBJETIVOS	10
ANTECEDENTES:	10
EL CITOESQUELETO	10
LA ACTINA	12
GENETICA Y EVOLUCION DE LA ACTINA	13
OBJETIVOS:	20
PUBLICACION	
Cloning and sequencing of two actin genes from <u>Taenia solium</u> (Cestoda). Campos, A., P. Bernard, A. Fauconnier, A. Landa, E. Gómez, R. Hernández, K. Willms y J. P. Lacllette. Mol. Biochem. Parasitol. (en prensa), 1990.	23
RESUMEN	23
INTRODUCCION	23
MATERIAL Y METODOS	23
RESULTADOS Y DISCUSION	25
AGRADECIMIENTOS	27
REFERENCIAS	28
COMENTARIOS FINALES	30
SOUTHER BLOT	30
USO DE CODONES EN LOS GENES DE ACTINA DE <u>T. solium</u>	30
ISOTIPOS DE ACTINA EN <u>T. solium</u>	32
MOVIMIENTO DE INTRONES EN GENES DE ACTINA	34
CONVERSION GENICA EN <u>T. solium</u>	42
BIBLIOGRAFIA COMPLEMENTARIA	45

RESUMEN

En el presente trabajo de tesis, se decidió utilizar el sistema génico de la actina como un modelo para iniciar el estudio de la biología molecular de Taenia solium.

Se presenta evidencia indicativa de que la actina es codificada por varios genes en T. solium: experimentos de hibridización por la técnica de Southern en los que se enfrentó DNA total de T. solium digerido con varias enzimas de restricción, con una sonda para genes de actina proveniente de Acanthamoeba castellanii, mostraron diferentes bandas de hibridización. Dos de estos fragmentos de 3,850 y 2,700 pb fueron clonados en el sitio EcoRI del pBR322 y denominados pAT5 y pAT6, respectivamente. A partir de estudios de digestiones con endonucleasas de restricción se obtuvieron los mapas de restricción de ambos insertos.

Resultados de secuenciación han demostrado que los insertos en pAT5 y en pAT6 contienen genes de actina completos y que además, presentan diferencias entre uno y otro. Se demostró que los dos genes clonados son interrumpidos por un intrón después del codón 41, encontrándose las secuencias consenso que flanquean a dicho intron y que participan en la maduración del mRNA. El análisis de la secuencia localizada en dirección 3'-5' de la señal de iniciación de ambos genes, reveló la existencia de secuencias similares al "TATA box" y al "CAAT box". Por otro lado, el análisis de la secuencia localizada en dirección 5'-3' después del codón de término, reveló la existencia de una secuencia similar a la señal para la poliadenilación del mRNA.

Clonas aisladas de un banco de cDNA de la etapa larvaria de T. solium fueron secuenciadas demostrando que al menos el gen clonado en pAT6 es expresado en esta fase. La gran homología observada en las secuencias regulatorias y estructurales del gen clonado en pAT5, así como el uso de codones que presenta, sugieren que se trata de un gen verdadero que pudiera ser expresado "in vivo".

Resultados de Northern y Western blots mostraron que el metacéstodo de T. solium expresa un transcrito de actina de alrededor de 1,400 bases y una proteína de 45,000 Da.

La comparación de la secuencia de aminoácidos de la proteína actina de T. solium contra actinas de otras especies, demostró que T. solium posee una actina con características tanto citoplásmicas como musculares.

Además, se proponen dos modelos para explicar el número y posición de intrones en los genes de actina de diferentes especies y finalmente, se presentan datos que sugieren la existencia de conversión génica entre los dos genes de actina de T. solium.

El proyecto descrito aquí, es parte de un trabajo mayor en el que se persigue como objetivo el estudio de la relación huésped-parásito que se establece entre la fase larvaria de T. solium (metacéstodo) y el hombre. Este primer estudio de biología molecular en T. solium cimentará la metodología para realizar otros proyectos en los que se estudie la estructura y regulación de genes que codifiquen para proteínas implicadas en la relación huésped-parásito y que presentan importancia desde el punto de vista de diagnóstico e inmunoprofilaxis.

INTRODUCCION

Existe una gran cantidad y diversidad de organismos vivos en la naturaleza, los cuales interaccionan entre si estableciendo varios tipos de asociaciones. Una de las asociaciones posibles es el parasitismo, que aunque comparte características con otras, tradicionalmente se distingue de ellas por que uno de los organismos (huésped) resulta dañado por el otro (parásito). Los seres humanos son afectados directamente por varios cientos de especies parásitas, e indirectamente por la acción de muchas más sobre sus fuentes de alimento (cultivos, cría de animales, etc.) y otras actividades.

Las enfermedades parasitarias afectan principalmente a la población que habita en los países subdesarrollados. Este es el caso de la teniasis/cisticercosis que en diversas partes de Africa, Asia y en algunos países Latinoamericanos incluyendo a México, causa problemas serios de salud pública y de economía en el mercado de la carne de cerdo (Hird y Pullen, 1979; Flisser, et al., 1982a; Documento VPH/84 FAO/UNDP/WHO, 1984; Aluja, et al., 1987).

Taenia solium es el agente causal de la teniasis humana (ocasionada por el gusano adulto o solitaria) y de la cisticercosis porcina y humana (ocasionada por la fase larvaria o cisticercosis). Puesto que el humano es el único huésped definitivo de T. solium, la prevalencia de la teniasis/cisticercosis depende de la relación que el ser humano mantiene con el cerdo. Las más altas prevalencias se presentan en regiones en donde la población vive

en condiciones insalubres y en promiscuidad con el ganado porcino (Madeley, 1984).

SISTEMATICA DE T. solium.

T. solium es un organismo perteneciente al Phylum Platyhelminthes. Los representantes de este Phylum presentan las características más simples entre los animales con cefalización. Los plathelminths son gusanos planos con cuerpo blando y en forma de cinta. Son organismos acelomados con simetría bilateral y órganos ya conformados por tejidos y organizados en sistemas (Margulis y Schwartz, 1976). Pueden ser de vida libre, comensales y parásitos; se conocen alrededor de 15,000 especies. El Phylum se encuentra dividido en tres clases: Turbellaria, Trematoda y Cestoda. Los Turbeláridos (vgr: las planarias) son de vida libre y ocupan habitats terrestres, marinos y dulceacuicolas. Los Tremátodos (vgr: Fasciola hepatica, Schistosoma mansoni, etc.) son todos parásitos internos o externos mientras que los Céstodos (vgr: T. solium, Echinococcus granulosus, etc.) son exclusivamente parásitos internos. En general, los tremátodos presentan estadios de vida libre mientras que todos los estadios en el desarrollo de los cestodos son parásitos. Como lo enunció Baer (1952): "Tapeworms are by far the most highly specialized parasites known".

T. solium pertenece a la clase Céstoda que incluye organismos con un cuerpo generalmente multisegmentado; con aparato reproductor hermafrodita en cada segmento o proglótido; presentan un aparato fijador denominado escólex en el extremo ante-

rior; tienen un ciclo de vida con metamorfosis y todos son endoparásitos intestinales en su etapa adulta.

La posición taxonómica de T. solium es la siguiente:

Reino: Animalia

Subreino: Metazoa

Phylum: Platyhelminthes

Clase: Cestoda

Subclase: Eucestoda

Orden: Cyclophyllidea

Superfamilia: Taenoidea

Familia: Taenidae

Género: Taenia

Especie: Taenia solium

Etapas larvarias: cisticerco

MORFOLOGIA Y CICLO DE VIDA DE T. solium (fig. A).

T. solium incluye dentro de su ciclo de vida a dos huéspedes: el cerdo como huésped intermediario y el humano como definitivo. La descripción del ciclo de vida se puede iniciar con el gusano adulto o tenia, habitando en el tubo digestivo del ser humano quien es su único huésped definitivo. Presenta una región cefálica llamada escólex en donde se encuentran los órganos de fijación (ventosas y ganchos rostellares), así como algunos elementos neuronales. El escólex se adelgaza en una región llamada cuello que posee una masa central de células mitóticamente activas, de las cuales se derivan los tejidos de la siguiente región: el estróbilo. El estróbilo consta de una

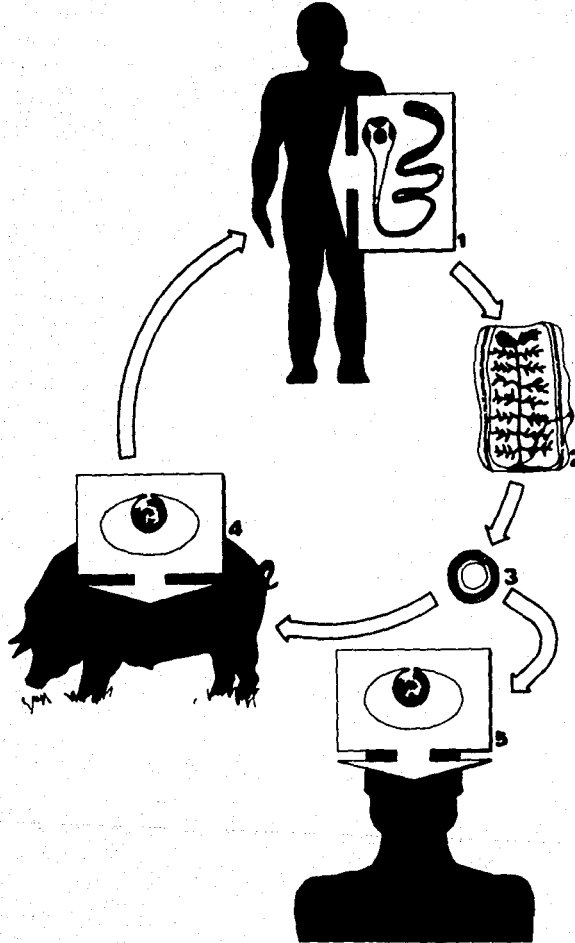


Figura A: Ciclo de vida de *Taenia solium*: 1, Parásito adulto; 2, Proglótido grávido; 3, Huevecillo; 4, y 5, Cisticercos.

gran cantidad de proglótidos. Existe un gradiente anteroposterior de organogénesis reproductiva en el estróbilo, es decir, que los proglótidos más cercanos al cuello son los más jóvenes e indiferenciados, mientras que los más distales no solo presentan genitales perfectamente diferenciados sino que además se encuentran repletos de huevecillos, por lo que se les conoce como proglótidos grávidos. Los proglótidos grávidos son desprendidos espontáneamente y llegan al medio ambiente junto con las heces fecales del huésped.

La descomposición de los proglótidos en el medio ambiente produce la liberación de los huevecillos, los cuales tienen una forma ligeramente elipsoidal con diámetro mayor de 35-45 μ m (Laclette, et al., 1982). Los huevecillos son la única fase del ciclo de vida de este parásito que aparece en el medio ambiente, por lo que presentan una serie de envolturas protectoras (fig. B). La envoltura más externa denominada vitelo se encuentra delimitada por su propia membrana o cápsula. Hacia adentro, la siguiente serie de envolturas, entre las cuales destaca el embrióforo, son originadas por las llamadas células embrioforales que constituyen un sincicio citoplásmico de aspecto granular. La célula embrioforal se encuentra delimitada exteriormente por su propia membrana plasmática y hacia adentro por la membrana oncosferal que envuelve directamente al embrión hexacanto, también conocido como oncosfera (Laclette, et al., 1982). Es posible que los huevecillos de T. solium puedan sobrevivir largos periodos en el medio ambiente, al igual que los de otras especies de ténidos (Gemmel y Lawson, 1982).

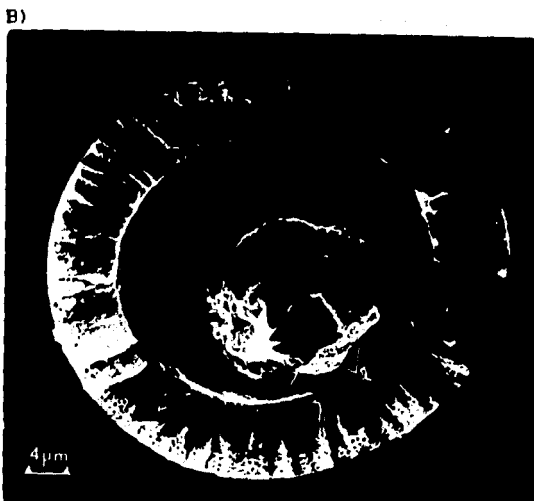
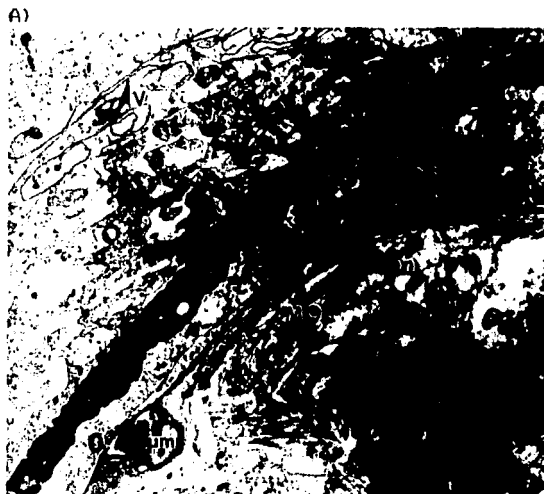


Figura B: Huevecillo de la *I. solium*. A) Corte de un huevecillo inmaduro observado en el microscopio electrónico de transmisión y B) interior de un huevecillo observado en el microscopio electrónico de barrido. CE: célula embriofora; E: embrioforo; G: ganchos oncosferales; MD: membrana oncosferal; Dn: oncosferas; V: vitelo. (Tomadas de Lacroix, et al., 1982).

El ciclo de vida continúa cuando los huevecillos son ingeridos por el huésped intermediario: el cerdo. En el tracto digestivo del huésped intermediario, el ácido clorhídrico y la pepsina gástrica inician la disgregación del embrióforo. Esta envoltura que sin duda es la más importante en cuanto a su papel protector, está formada por bloques protéicos que se mantienen unidos por medio de un material cementante. Posteriormente, la acción de las enzimas intestinales, principalmente de la tripsina terminan la degradación del material cementante (Laclette, et al., 1982). Los bloques embriofóricos se dispersan liberando así a la oncosfera todavía envuelta por su membrana oncosférica (Trejo, 1986). La señal que produce la activación del embrión hexacanto consiste aparentemente en un incremento en la permeabilidad de la membrana oncosférica provocado por las sales biliares (Silverman, 1954). El embrión activado inicia movimientos de sus tres pares de ganchos hasta deshacerse de la membrana. La oncosfera activada atraviesa la mucosa intestinal con ayuda de secreciones líticas así como por acción mecánica hasta alcanzar los capilares sanguíneos y linfáticos que la llevan a diferentes órganos dentro del huésped en donde se desarrolla hasta convertirse en una larva o cisticerco.

El cisticerco de T. solium está formado por una bolsa translúcida de 5 a 10 mm de diámetro con un escólex invaginado y opaco que presenta, al igual que la forma adulta, 4 ventosas y un rostelo con una doble corona de ganchos (Fig. C). El escólex está rodeado por un líquido contenido en la bolsa o pared



Figura C: Microfotografía electrónica de barrido de un escólex de *I. solium*. C: cuello; V: ventosas y; R: rostro. (Tomada de Laclette, 1985).



Figura D: Micrografía electrónica de transmisión de un corte de la pared vesicular del cisticerco de la *I. solium*. C: canales citoplásmicos; M: músculo; MB: membrana basal; MT: microtrícas. (Tomada de Laclette, 1985).

vesicular denominado fluido vesicular. La superficie externa de la pared vesicular está constituida por un tegumento sincicial y continuo cuya membrana plasmática presenta unas prolongaciones digitiformes (Fig. D), a las que Rothman (1963) denominó como microtricas. Se ha calculado que la superficie tegumental en el cisticerco de T. solium es aumentada 136 veces por la presencia de las microtricas (Ramírez-Bon, et al., 1982). El tegumento es la estructura parasitaria que interacciona directamente con el huésped por lo que muchas de sus funciones como la alimentación, excreción y defensa contra la respuesta inmunológica del huésped son llevadas a cabo por este órgano (Lumsden, et al., 1982).

El ciclo se cierra cuando el hombre ingiere carne de cerdo cisticercoso, insuficientemente cocida, de tal modo que las larvas permanecen viables e infectantes. Durante el paso de los cisticercos por el estómago y la primera parte del intestino delgado, el contenido gástrico e intestinal activa al escólex para evaginar de la vesícula protectora. Estudios in vitro indican que la evaginación del cisticerco de T. solium es inducida eficientemente por sales biliares y tripsina (Cañedo, et al., 1982). Una vez evaginado, el escólex se fija a la mucosa intestinal por medio de sus ventosas y ganchos y se desarrolla en una tenia adulta. Al igual que el cerdo, el hombre puede adquirir la cisticercosis al ingerir los huevecillos de T. solium a través de los alimentos y/o de aguas contaminadas.

ANTECEDENTES Y OBJETIVOS

ANTECEDENTES:

EL CITOSQUELETO.

La capacidad de una célula eucariótica para mantener su forma, para dividirse y para realizar una gran variedad de movimientos, reside en una red altamente integrada de proteínas filamentosas que constituyen el llamado citoesqueleto (Weber y Osborn, 1985). Diversos procedimientos bioquímicos y ultraestructurales han logrado definir la existencia de tres sistemas de filamentos: los microtúbulos con un diámetro de 22 nm, los filamentos intermediarios con un diámetro entre 7 y 11 nm y los microfilamentos con un diámetro de 6 nm.

Los microtúbulos están constituidos por la proteína tubulina. En un corte transversal, la pared del microtúbulo está formada por 13 subunidades globulares cada una de las cuales presenta un diámetro de 4 a 5 nm. Las subunidades pueden ser de tipo alfa o beta, ambas con un peso molecular de 55,000 (Darnell, et al., 1986). Los microtúbulos están involucrados en el transporte intracelular de organelos como lisosomas y vesículas, así como también en la formación del huso acromático durante la mitosis. Los microtúbulos juegan un papel importante en las células móviles puesto que son los constituyentes principales de cilios y flagelos.

Los filamentos intermediarios (IF) están formados por un grupo de proteínas que deben su nombre a su diámetro intermedio entre los microtúbulos y los microfilamentos. Se han descrito

5 tipos de IF de acuerdo con su composición proteica y con el tipo celular al que pertenecen (Darnell, et al., 1986; Raxworthy, 1988): las queratinas forman tonofibrillas de células epiteliales, así como estructuras de resistencia como la piel, las uñas, los cuernos, el cabello, etc.; las desminas son filamentos predominantes en células musculares de todos los tipos y se sitúan en la periferia de los discos Z; los neurofilamentos, se localizan en los axones de neuronas de vertebrados, la rigidez de los axones está dada por complejos de neurofilamentos y microtúbulos; la vimentina constituye filamentos en fibroblastos. Finalmente, hay un quinto tipo de IF que está constituido por la proteína fibrilar glial ácida (GFAP).

Los microfilamentos participan en fenómenos que requieren de la generación de tensión: contracción muscular, plegamiento y desplegamiento de la membrana celular así como en el traslado de organelos dentro de la célula (Lehninger, 1982; Pollard y Cooper, 1986). La proteína actina es el componente más abundante de los microfilamentos. Existen diferentes tipos de microfilamentos conformados por distintos tipos de proteínas asociadas a la actina. En cada tipo celular se presentan variaciones en las proteínas que se asocian a la actina (Darnell, et al., 1986).

Con ayuda del microscopio electrónico se han observado las fibras de actina en músculo esquelético. La unidad de la actina es la forma filamentosa (F) y está constituida por subunidades globulares iguales de 4 nm de diámetro cada una. Las subunidades

son conocidas como la forma G y se encuentran unidas a otra formando una hilera. Dos hileras de estas subunidades se unen en espiral formando una hélice con 13.4 moléculas por vuelta constituyendo a la forma F de la actina (Alberts, et al., 1983).

LA ACTINA.

La actina es una proteína que se encuentra en todos los eucariontes llegando a representar hasta un 15 % de la proteína total en las células que se mueven activamente como las amibas; de 5 a 10 % de la proteína total en los fibroblastos y aproximadamente un 2 % de la proteína en células tales como los hepatocitos humanos (Lazarides y Revel, 1979). Desde 1942 Straub identificó a la actina como una de las dos proteínas principales del músculo. A partir de esa fecha la actina ha sido estudiada desde diversos puntos de vista: fisiológico, biofísico, bioquímico, inmunológico, genético, etc.

Existen diferentes isotipos de actina en los vertebrados. En mamíferos se pueden identificar al menos seis isoformas tejido-específicas. Dos de estas isoformas (beta y gama) están involucradas en funciones citoplásmicas, mientras que las otras cuatro se encuentran relacionadas con músculo: una en músculo cardíaco, una en músculo esquelético y dos en músculo liso. De estas últimas, incluso es posible determinar por su estructura primaria el músculo liso del que provienen: de vísceras o de vasos sanguíneos (Vandekerckhove y Weber, 1979, 1984; Vandekerckhove, et al., 1980). En aves se encuentran las mismas isoformas que en mamíferos y además se ha descrito una tercera

isoforma de actina citoplásmica denominada tipo 5 (Bergsma, et al., 1985). A su vez, en peces cartilaginosos y peces óseos (Chondrichthyes y Osteichthyes, respectivamente) se encuentran solo dos formas de actina muscular; una en músculo liso y otra en músculo estriado. En los Urocordados, los Cefalocordados y posiblemente en los Agnatos, existe un solo tipo de actina muscular (Vandekerckhove y Weber, 1984). En los invertebrados estudiados hasta ahora no se han encontrado isotipos.

Todas las actinas tienen su aminoácido N-terminal bloqueado con un grupo acetilo, el cual es añadido postraduccionalmente. Inicialmente, la metionina N-terminal es acetilada y removida por enzimas específicas. Posteriormente, en actinas no musculares el siguiente residuo, un ácido aspártico, es acetilado para completar el proceso. En cambio, en las actinas musculares el siguiente residuo es una cisteína que también se acetila y se corta descubriendo un residuo de ácido aspártico o glutámico. Este aminoácido es luego acetilado para completar el proceso. Cabe mencionar que las células no musculares contienen las enzimas requeridas para procesar correctamente a las actinas musculares (Pollard y Cooper, 1986).

GENETICA Y EVOLUCION DE LA ACTINA.

La actina es una proteína muy conservada en los eucariontes posiblemente debido a la importancia de las funciones celulares que realiza. Se trata de una proteína que a lo largo de la evolución ha mantenido sitios esenciales para la interacción con otras proteínas y consigo misma. Se han caracterizado mas de

60 proteínas que interaccionan con la actina (Pollard, 1984), algunas de las cuales se enlistan en la Tabla I.

La conservación de algunos residuos de aminoácidos nos da idea de su relevancia estructural o funcional en la proteína. Por ejemplo, los grupos sulfhidrilos son requeridos en la actina para su unión con ATP, para su polimerización y para su interacción con miosina: los residuos de cisteína 287 (285*) y 376 (374*) están muy conservados en todas las actinas; el último está relacionado con la unión de la miosina (Hightower y Meagher, 1986). El residuo de tirosina 71 (69*) se encuentra involucrado en el proceso de polimerización y también es conservado en todas las actinas estudiadas (Hightower y Meagher, 1986). El residuo de lisina 237 parece tener importancia en la interacción de la actina con la tropomiosina (El-Saleh, et al., 1984). Los residuos de cisteína 12 (10 *), 219 (217 *) y 259 (257 *) también son conservados en todas las actinas estudiadas y pudieran tener una función estructural.

* De acuerdo a la numeración de Korn, 1982.

Tabla I. Proteínas que interaccionan con la actina citoplásmica de vertebrados *.

PROTEINA	FUNCION
Vinculina	Mediadora de la unión de los filamentos de actina con la membrana celular.
Proteína de peso molecular de 110,000 (microvellos)	Une los extremos de los filamentos de actina a las membranas de los microvellos.
Filamina y frodina	Proteínas similares a la espectrina que entrecruzan los filamentos adyacentes de actina.
Miosina	Causante de los movimientos de los filamentos de actina vgr: en músculo y generadora de tensión en las redes de microfilamentos.
Tropomiosina	En músculo estriado se une a las ranuras de la hélice de actina; regula la unión de la actina con las cabezas de miosina.
Alfa actinina	Participa en la unión de los microfilamentos de actina a las membranas; puede entrecruzar los filamentos de actina formando redes regulares.
Fimbrina	Entrecruza fuertemente a los filamentos adyacentes para formar fibras paralelas de actina.
Villina y gelsolina	En baja concentración de Ca ⁺⁺ sirven de núcleo para la polimerización de filamentos de actina F. A concentraciones micro-molares de iones Ca ⁺⁺ cortan en fragmentos a los filamentos de actina.
Proteínas de casquete (capping proteins)	Se une a uno de los extremos de un filamento, impidiendo la adición o pérdida de los monómeros de actina.
Profilina	Se une a los monómeros de actina G impidiendo su polimerización.

* Tomado de Darnell, et al., 1986.

Con respecto a su origen filogenético, las actinas citoplásmicas de vertebrados se consideran más relacionadas funcional y evolutivamente con las actinas de invertebrados (Nudel, et al., 1982). Incluso se ha sugerido que la separación entre los genes de actina de músculo esquelético y los de actina citoplásmica ocurrió en los deuterostomados (Nudel et al., 1982, 1983). Por otro lado, estudios de secuencias de genes de actina del equinodermo Strongylocentrotus purpuratus, indican que la actina de estos organismos presenta características tanto de la forma muscular como citoplásmica de vertebrados, aunque el mayor número de características corresponde a las citoplásmicas (Cooper y Crain Jr., 1982). En otros organismos eucariontes como Dictyostelium discoideum (acrasiomiceto), Physarum polycephalum (mixomiceto), Saccharomyces cerevisiae (levadura), etc. las secuencias de aminoácidos, revelan una mayor semejanza con las actinas citoplásmicas que con las musculares de vertebrados.

Las modernas metodologías del DNA recombinante, han permitido la clonación y secuenciación de genes de actina de varias especies de plantas, invertebrados y vertebrados. En el cuadro 1 se enlistan las especies para las cuales ya se ha secuenciado uno o varios genes de actina .

La comparación entre las actinas de diferentes especies ha aportado información evolutiva tanto de los organismos como de

Cuadro 1: Lista de especies para las cuales se conoce la secuencia de genes de actina.

ESPECIE	REFERENCIAS
PLANTAS	
<u><i>Zea mays</i></u>	Shah, <u>et al.</u> , 1983
<u><i>Glycine max</i></u>	Shah, <u>et al.</u> , 1982; Shah, <u>et al.</u> , 1983
<u><i>Arabidopsis thaliana</i></u>	Nairn, <u>et al.</u> , 1988
PROTOCTISTAS	
<u><i>Acanthamoeba castellanii</i></u>	Neilen y Gallwitz, 1982
<u><i>Entamoeba histolytica</i></u>	Edman <u>et al.</u> , 1987; Huber, <u>et al.</u> , 1987
<u><i>Tetrahymena thermophila</i></u>	Cupples y Pearlman, 1986
<u><i>Tetrahymena pyriformis</i></u>	Hirono, <u>et al.</u> , 1987
<u><i>Oxytricha fallax</i></u>	Kaine y Spear, 1982
<u><i>Oxytricha nova</i></u>	Greslin, <u>et al.</u> , 1988
<u><i>Trypanosoma brucei</i></u>	Mohamed, <u>et al.</u> , 1988
<u><i>Plasmodium falciparum</i></u>	Wesseling, <u>et al.</u> , 1988a; Wesseling, <u>et al.</u> , 1988b
<u><i>Dictyostelium discoideum</i></u>	Firtel, <u>et al.</u> , 1979
<u><i>Physarum polycephalum</i></u>	Nader, <u>et al.</u> , 1986; Gonzales-v-Merchand y Cox, 1988
HONGOS	
<u><i>Saccharomyces cerevisiae</i></u>	Gallwitz y Seidel, 1980; Ng y Abelson, 1980
<u><i>Saccharomyces carlsbergensis</i></u>	Nellen, <u>et al.</u> , 1981
<u><i>Schizosaccharomyces pombe</i></u>	Mertins y Gallwitz, 1987
<u><i>Thermomyces lanuginosus</i></u>	Wildeman, 1986
<u><i>Aspergillus nidulans</i></u>	Fidel, <u>et al.</u> , 1988
ANIMALES INVERTEBRADOS	
Nematodos:	
<u><i>Caenorhabditis elegans</i></u>	Files, <u>et al.</u> , 1983; Krause, <u>et al.</u> , 1988
Equinodermos:	
<u><i>Strongylocentrotus purpuratus</i></u>	Cooper y Crain Jr., 1982; Akhurst, <u>et al.</u> , 1987
<u><i>Strongylocentrotus franciscanus</i></u>	Foran, <u>et al.</u> , 1985
Insectos:	
<u><i>Drosophila melanogaster</i></u>	Fyrberg, <u>et al.</u> , 1981
<u><i>Bombix mori</i></u>	Mounier y Prudhomme, 1986; Mounier, <u>et al.</u> , 1987
ANIMALES VERTEBRADOS	
Anfibios:	
<u><i>Pleurodeles waltlii</i></u>	Khrestchatisky y Fontes, 1987
<u><i>Xenopus borealis</i></u>	Cross, <u>et al.</u> , 1988
<u><i>Xenopus tropicalis</i></u>	Stutz y Spohr, 1989
<u><i>Xenopus laevis</i></u>	Stutz y Spohr, 1989
Aves:	
<u><i>Gallus gallus</i></u>	Fornwald, <u>et al.</u> , 1982; Kost, <u>et al.</u> , 1983; Chang, <u>et al.</u> , 1985; Bergsma, <u>et al.</u> , 1985
Mamíferos:	
<u><i>Mus musculus</i></u>	Chien-Tsung Hu, <u>et al.</u> , 1986
<u><i>Ratus domesticus</i></u>	Zakut, <u>et al.</u> , 1982; Nudel, <u>et al.</u> , 1983
<u><i>Homo sapiens</i></u>	Hamada, <u>et al.</u> , 1982; Ueyama, <u>et al.</u> , 1984; Nakajima-Iijima, <u>et al.</u> , 1985; Erba, <u>et al.</u> , 1988

la proteína misma. Por otro lado, el estudio de las secuencias de los genes de actina, al igual que el de otras proteínas en eucariontes inferiores, aporta información acerca de su organización genómica: familias génicas, número de genes por proteína, número y posición de exones e intrones en los genes, secuencias regulatorias, etc.

Se han realizado estudios evolutivos comparando la posición de los intrones en los distintos genes de actina. Se ha encontrado que el número y posición de estas secuencias no se conservan en los genes de especies distintas y ni siquiera en familias multigénicas de la especie a la que pertenecen. Por ejemplo C. elegans tiene cuatro genes diferentes para actina; los cuatro genes presentan un intrón después del codón 321, en el gen I y II dicho intrón es de 52 bases, en el gen III es de 53 bases y en el gen IV es de 55 bases. Por otro lado dos de ellos (genes I y III) presentan un intrón de 48 bases después del codón 63; el gen II presenta un intrón de 45 bases en el mismo sitio. El gen IV presenta además, un intrón de 2,081 bases después del codón 18 y uno más de 56 bases después del codón 267 (Files, et al., 1983; Krause, et al., 1988).

Zakut y colaboradores (1982) compararon la posición de los intrones en los genes de actina de frijol de soya y de la rata, observando la conservación de un sitio para un intrón situado después del codón 150 en el frijol de soya y después del codón 151 en la rata. Con base en estos datos, sugieren (aunque no excluyen la posibilidad de que se trate de una coincidencia) la existencia de un intrón ancestral en el codón 150 antes de

la separación entre animales y plantas. Esta idea es compatible con la hipótesis de un gen ancestral común a las plantas y a los animales. La secuencia de dos genes de actina en el hongo multicelular I. lanuginosus (Wildeman, 1988) y en A. nidulans (Fidel et al., 1988) ha mostrado la presencia de 5 intrones en estos genes; tres de los cuales se encuentran en sitios conocidos en otros genes de actina de otras especies y dos en sitios que no se encuentran en los genes de actina estudiados. Por este hecho, Wildeman (1988) sugiere que estos genes pudieran ser muy similares a un gen ancestral de actina común a todos los genes existentes. Este gen ancestral, como se ha propuesto, debió haber presentado intrones en todos los sitios en los que actualmente existen en los genes de actina de las especies actuales.

OBJETIVOS:

Como se mencionó en los antecedentes, se conocen varios isotipos de actina en los vertebrados; se sabe incluso que cada clase presenta un número diferente de isotipos. En cambio, la información acerca de esta proteína en muchos Phyla de invertebrados es muy fragmentada. Por ejemplo, se carece de información al respecto de la existencia de isotipos de actina y se dispone de muy escasa información sobre su relación estructural con la de los vertebrados. Este es el caso de los platihelminos y en particular de los céstodos para los cuales se sabe poco acerca de su citoesqueleto y mucho menos de sus microfilamentos. Lumsden y col. (1982) han identificado, por técnicas de microscopia electrónica, estructuras similares a fibras de actina en las paredes interiores de las microtricas del metacéstodo Spirometra mansonoides.

Por otro lado el alto grado de conservación de la actina a lo largo de la evolución de los eucariontes (ver, Antecedentes: "Genética y evolución de la actina"), permite el uso de sondas heterólogas (obtenidas de otras especies lejanas filogenéticamente) para la clonación de genes de actina de una especie determinada. En consecuencia, el objetivo del presente trabajo consistió en aislar y caracterizar los genes de actina de I. solium.

Se carece de la información más elemental acerca de la genética de los céstodos; se desconoce el tamaño de su genoma, número y tamaño de cromosomas, organización general de los genes, señales regulatorias, etc. En este sentido, la

caracterización de genes de actina de T. solium permitirá no sólo analizar la secuencia de la proteína misma, sino también aportará información sobre la estructura del genoma, así como la posibilidad de establecer las metodologías para estudios de biología molecular y de ingeniería genética en este organismo. Esto es especialmente interesante en la actualidad en que uno de los principales objetivos en el estudio de la biología molecular de los parásitos, es el desarrollo de procedimientos inmunoprolácticos que protejan a la población en contra de infecciones causadas por estos organismos. La clonación y expresión de proteínas antigénicas del parásito, permitirá la obtención de estas proteínas en una mayor cantidad y pureza que la obtenida por métodos bioquímicos tradicionales.

Finalmente, el diseño reciente de programas de computo que aprovechan los datos de secuencias génicas en estudios evolutivos, nos permitirá utilizar la secuencia de los genes de actina para realizar estudios de inferencia filogenética, en los taxones superiores de los platihelminths. Aunque el presente trabajo de tesis no incluye esto dentro de sus objetivos, contribuye a establecer las bases para poder llevarlo a cabo.

En base a lo anterior se plantean los siguientes objetivos generales:

- Estimar el número aproximado de secuencias de DNA relacionadas a actina en el genoma de T. solium.
- Construir un banco de DNA genómico de T. solium en Escherichia coli usando como vector el plásmido pBR322.

- Clonar fragmentos de DNA genómico, seleccionados por hibridación con una sonda de un gen de actina proveniente de Acanthamoeba castellanii.
- Caracterizar y secuenciar los fragmentos clonados para demostrar su homología con genes de actina de otras especies.
- Desarrollar un banco de cDNA a partir de mRNA de la etapa larvaria de T. solium (cisticerco).
- Secuenciar parcialmente los cDNAs positivos a sondas correspondientes a secuencias de actina para obtener evidencia de la expresión de actina en la etapa larvaria de T. solium.

La consecución de estos objetivos permitirá:

- El análisis correspondiente a la posición, número y tamaño de secuencias intrónicas y de las secuencias correspondientes a los exones.
- El estudio de las secuencias regulatorias presentes en los genes de actina de T. solium.
- La determinación de la posible existencia de isotipos de actina en T. solium.
- La búsqueda de homología con otras secuencias de genes de actinas conocidas.
- La determinación del uso de codones para los genes de actina de T. solium.
- La comprobación de la expresión de actina en el cisticerco de T. solium por métodos de biología molecular e inmunológicos.

MOLBIO 01309

Cloning and sequencing of two actin genes from *Taenia solium* (Cestoda)

Andrés Campos¹, Philippe Bernard^{1*}, Alan Fauconnier¹, Abraham Landa¹, Erika Gómez¹, Roberto Hernández², Kaethe Willms¹ and Juan Pedro Lacleste¹

Departments of ¹Immunology and ²Molecular Biology, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City, Mexico

(Received 31 August 1989; accepted 15 November 1989)

Genomic and cDNA actin clones were isolated from *Taenia solium* gene libraries. The actin genes are interrupted by intervening sequences. Protein coding regions of both genes predict the same amino acid sequence. cDNA sequence data indicate that at least one gene is expressed at the larval stage. Results from Northern and Western blots showed that *T. solium* expresses an actin transcript of about 1 400 bases and a protein of 45 000 Da.

Key words: *Taenia solium*; Cestode actin DNA sequencing; Gene cloning; cDNA cloning

Introduction

Actins are contractile proteins that have been preserved with few changes during the evolution of eukaryotic organisms [1, 2]. Actins are generally coded by multigene families [3] although lower eukaryotic species with single copy genes have also been found [4 - 6]. The number of actin genes can vary in different species from 1 to more than 15.

Human and porcine cysticercosis is a parasitic disease caused by the larval stage of *Taenia solium* (Cestoda). The disease is endemic in several countries of Latin America, Africa and Asia. The actin genes were selected as an accessible model

for the study of protein coding genes in this organism. We describe the cloning and sequencing of two actin genes from *T. solium*. Evidence is presented that at least one of the genes is expressed at the larval stage.

Materials and Methods

Collection of *T. solium* larvae. Cysticerci were dissected from skeletal muscle of naturally infested pigs and frozen immediately at -70°C, until use. The cysts were always obtained between 2 and 6 h after slaughter.

Western blots. Crude extracts of *T. solium* or *Taenia crassiceps* cysticerci were obtained as described before [7]. Samples of about 100 µg of the crude extracts were electrophoresed through polyacrylamide gel in the presence of sodium dodecyl sulfate (SDS-PAGE), using 10% preparative gels as described by Laemmli [8]. Immunoblotting was carried out according to Towbin *et al.* [9] on nitrocellulose membranes, using monoclonal antibodies to human actin. Molecular weights of protein bands were estimated using the molecular weight standards from Bio-Rad Laboratories.

Correspondence (present) address: Juan Pedro Lacleste, Dept. of Tropical Public Health, Harvard School of Public Health, 665 Huntington Avenue, Boston, MA 02115, U.S.A.

***Present address:** Laboratoire de Génétique, Université Libre de Bruxelles, Brussels, Belgium.

Note: Nucleotide sequence data reported in this paper have been submitted to the GenBank™ data base with the accession numbers M28996 (pAT3) and M28997 (pAT6).

Abbreviations: IgG, immunoglobulin class G; Pol II, DNA polymerase II; SSC, standard saline citrate.

Isolation of *T. solium* DNA and RNA. 10 g of cysticerci were thawed in 100 ml of standard saline citrate (SSC): 150 mM NaCl/15 mM sodium citrate, pH 7.0, and homogenized with a Teflon tissue grinder. Nuclear material was then collected by centrifugation at $3\ 300\times g$ for 20 min. The pellet was lysed at 50°C for 3 h in 0.5 M EDTA/0.5% Sarkosyl (w/v)/0.1 mg proteinase K ml⁻¹. The lysate was extracted 3 times with phenol, dialyzed against 1 mM EDTA/10 mM Tris-HCl, pH 7.5, and treated with 100 µl RNase A ml⁻¹. DNA was finally purified by ultracentrifugation to density equilibrium in CsCl.

Total cellular RNA was isolated from cysticerci following an adaptation of the guanidine chloride extraction method [10] as described previously [11].

Southern and Northern blot hybridizations. Restriction fragments of *T. solium* DNA were transferred from 0.8 - 1% agarose gels to nitrocellulose membranes following standard techniques [12]. Prehybridization and hybridization were carried out in 50% (v/v) formamide/2 mM EDTA/0.2% (w/v) SDS/4× Denhardt's solution [13]/2× SSC/120 mM sodium phosphate, pH 7.0, at 37°C for 2 and 24 h, respectively. In Southern hybridizations the nick-translated [14] 2.4-kb HindIII insert of an actin clone (pAA3) from *Acanthamoeba castellanii* was used as probe [15]. The nick translation kit and the [α -³²P]dATP were from Amersham International plc.

For Northern hybridizations, total RNA was transferred from 6% formaldehyde/1% agarose gels [16] to Gene Screen membranes (NEN Research Products) according to the manufacturer's directions. After being air-dried, all filter membranes were baked at 65°C for 90 min in a vacuum oven. DNA:RNA hybridization conditions were as for Southern experiments but using the 455-bp BglII - XhoI fragment of pAT5 as probe (see fragment D in Fig. 1). Washing conditions for both Southern and Northern hybridizations were: 0.2% (w/v) SDS in 0.1× SSC for 2 h at 37°C. Hybridization bands were detected by autoradiography of the membranes using intensifying screens.

Construction and screening of a genomic library. *T. solium* genomic DNA was digested with EcoRI restriction endonuclease, ligated into dephosphorylated plasmid pBR322 [17] and used to transform *Escherichia coli* cells MC1061 [18] by standard procedures [19]. 40 000 colonies were screened as described in [20] using the nick-translated 2.4-kb insert from *A. castellanii* actin clone pAA3, as heterologous probe [15]. Hybridization conditions were as above, except that the hybridization mix did not contain SDS. Two positive clones were isolated (pAT5 and pAT6) and used for further analysis.

Construction and screening of a cDNA library. *T. solium* poly(A)⁺ mRNA was obtained by chromatography of total RNA through oligo(dT) cellulose (Sigma Chemical Co.) [21]. Double-stranded cDNA was prepared using the cDNA synthesis system from Amersham International plc, based in the method described by Gluber and Hoffman [22]. Double stranded blunt-ended cDNA was extracted with phenol/chloroform; precipitated with ethanol and methylated with EcoRI methylase. EcoRI linkers (New England Biolabs, Inc.) were added before ligation into λ gt11. The *in vitro* packaging was carried out using the Protoclone λ gt11 system from Promega Biotec. The library was amplified as plate lysates on agar and screened according to Benton and Davis [23] with fragment D of pAT5 as probe (Fig. 1).

Nucleotide sequence analysis. Selected restriction fragments from the 3.85-kb and 2.7-kb inserts of pAT5 and pAT6 (Fig. 1) were subcloned in both orientations into the multiple cloning sites of M13mp18 and M13mp19 vectors [24]. Cloned cDNA inserts were similarly treated. Sequence was carried out with the Sequenase kit (United States Biochemical Corporation) and/or with the Taq DNA polymerase kit (Stratagene) according to the dideoxy chain termination method [25], using either [α -³⁵S]dATP or [α -³²P]dATP (Amersham).

Analysis of the obtained sequences was carried out in a microcomputer with the aid of the Pustell Sequence Analysis System (International Biotechnologies, Inc).

Results and Discussion

The use of an heterologous DNA probe from *A. castellanii* in Southern blot assays, allowed detection of 3 to 8 sequences homologous to actin genes in the DNA from *T. solium*. This number of actin-related sequences is in agreement with the number of actin sequences in other eukaryotic species ranging from 1 in simple eukaryotes [4 - 6] to more than 15 in higher groups [3, 26, 27]. Thus, *T. solium* possesses a small family of actin-related sequences.

Characterization and nucleotide sequence of the actin genes. The restriction maps and sequencing strategy of the pAT5 and pAT6 inserts were deduced by double digestions (Fig. 1). Both sequences (Fig. 2) include coding regions for a complete 376-amino acid actin protein, a single intervening sequence per actin gene and untranslated upstream and downstream flanking regions. The predicted amino acid sequences from the two putative coding regions in pAT5 and pAT6 are identical (Fig. 2). Amino acid residues in sequence are numbered according to Vandekerckhove [28].

The coding region of both genes is interrupted by an intervening sequence beginning after the codon for the amino acid 41. These intronic se-

quences are 395 bp long in pAT5 and 413 bp long in pAT6. The exon-intron junction sequences implicated in the splicing of mRNA are similar to those found in other eukaryotic protein-coding split genes [29]. The 5'-splice junction sequences 5'-CAGGTTAGT-3' in pAT5 and 5'-CAGGTTGGT-3' in pAT6 are similar to the consensus sequence of donor site 5'^ΔAGGT-^ΔAGT-3', proposed by Breathnach and Chambon [30]. The 3'-splice junction sequences 5'-CCTCTTCTAGGG-3' in pAT5 and 5'-TTTCCTCCAGGG-3' in pAT6 are similar to the consensus sequence of acceptor site 5'-PyPyPyPyPyPyX^ΔAGG^Δ-3' [30].

The upstream sequences 5'-CCAAT-3' (position -126) and 5'-CCAAAT-3' (position -95) in pAT5 and 5'-CCAAT-3' (position -130) in pAT6 coincide with consensus sequences of CAAT box structures [31, 32]. The upstream sequences 5'-TATATAA-3' (position -71) in pAT5 and 5'-CATAAAT-3' (position -76) and 5'-TA-TAAGA-3' (position -53) in pAT6 coincide with consensus sequences of TATA box structures [33]. Putative recognition signals for polyadenylation of eukaryotic mRNAs (AAUAAA) [34] are present in pAT5 and pAT6 inserts 63 and 73 nucleotides downstream from the stop codons, respectively.

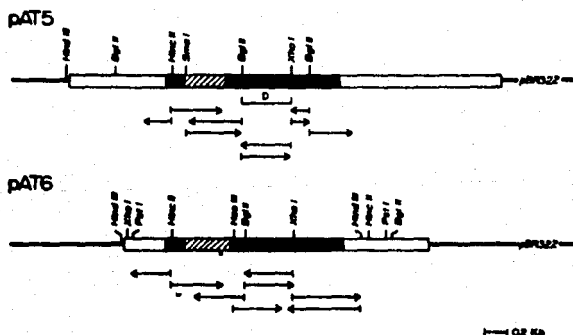


Fig. 1. restriction maps and sequencing strategy of the *T. solium* actin genomic clones pAT5 and pAT6. Both genomic fragments (shown as bars) were cloned in the *EcoRI* site of pBR322. Arrows indicate the direction and the extent of sequenced DNA. Solid bars represent the protein-coding region and the hatched area represents the intron sequences. Other *SmaI* sites in pAT5 and *HaeIII* sites in pAT6 are not shown. Fragment D (from pAT5) was used as probe in several experiments (see text).

```

-148          pAT6  TTCTCCCGCCAGTGTGCAGTCCGTGCCCCACGGCTCAAA11GCAGCTGCGCCAGCGGGTAAATC
          pAT5  CCATTTAGGCAATAGCGGTGACTGCCCTCCACTCTCCAA11GAGTACAGGGTAAAGAGCTGTG
-101  AGGGTGTGCGGGTGTACAGCTTTCCATAATCGACATATGGAGAGTATAAGAAAGCGCTTGTGGGACCCAGTGGCGCATCTTGCAAAGGCCAGCT
  CATATCCCAATATAGCCAGCCCCAACTCTATATAAACCGTGGGTCTCAAGCATCGGCACTGACACTTGTGTGTATCTGTATCTGTATCTGGCTCTCTGCAC
  N R D E V Q A L Y V D G S S R C K A G F A S D D A P R A Y F P 33
  1  ATGGGTGACGAAGAAGTTCAGGCTCTGCTGGTTCACATGGCTCCGGTATGTGCAAGCCGGATTCGGCGGATGATGCTCTGCTGGCTCTCTTCCT
    .....A.....C.....T..G.....G..C..C.....
    S I V G S P R H
101  CCATCGTGTGACGTCCCGTCAAGTGGATTCAGTTCCTCTCTGACTTTCGGTATGCTCTCCATCTTATATTCAGTTCGCCAATATAGCGCAA
  .A.....T..C..T.....GTTAGTCTATTCCTCTCTGCTGTATACCCCGGGTAAATGCAGCAGAAATGACGCTTTATGAACTATGCG
201  CGACACTTACATAAAACCACTACTAAGTTGCAACCGTAGTATAGTGTGTATAGTAGTGTATACAGCTTGAATAATTTTTGTGGCAGAAGTACTGG
  GTTCCGTCGACACCACTCAATGTTTTTTAGCACTGTAGTTATGTCCAGCTTAAACACATTACCGTGAATATGGTGAATAAATATATCTGACAA
301  ATAGTAAATTAACATCCTAGAAAGCAATGGATATATTTAATCAGTCAGGAAGTGAAGTTGGGAGAAAGAGTTCACCGCCACCGCTGGTGGCAAACTC
  GGCAGGGCATATATAGTCAGTAAAGCACTAAGTTAGGGAGATAGATCTTATCGCCACTGTGGTCCAGGACTCTTTTGGCAAGTCAGAGTAAT
401  TCTCTGCACAGTCAAGTAAACATAACTATAGGACATGGCCCAAAAGCAATAGTAACTTTGAGATAGGCACTCTTTTGGATAGGCACTCTTTCTT
  ATACCTAATAGCAATGGCCATAAAGCAATGTGAGTCACTTTCAGATAGAGTACTTCTCTTCTACGCTGCTAGTGCAGCAACCAAAACGAG
    Q S V W V S N G Q E S V D E A R S K 62
501  GACCCGACCGAACCGAGACTTGATTTTTCTCTCCAGGGTGTATGTCGTGGCATGGCCAGAGGATAGCTAAGTCCGCTGATGAGCGCCACTGCACAC
  AGATAATTTTTGCTCTCTAG.....T.....
    R R I L T K Y P I E H S V T R U D D H E I V D S T F Y E L R 96
401  GTGGTATCTCAACCCTGAAGTACCCCATCGACAGCGGATCTGTGACCACTGGGACGACATGGAGAATCTGGCATCAGCTTCTACACGAGCTGGC
    .....C.....
    V A P E E S P V L L T E A P L H P K A R R E K T Y I N F E T F H 129
701  TGTGCTCCGAGAGACCACTGACTGCTGACTGAGGCGCCCTCAACCTTAGCGGAAACCGTGAAGATGACTCAATATGTTCCGATGACTCTCAC
    .....
    T P A N V V G I O A V L S L Y A S E R T T G I V L D S G G V T H 162
801  AGCCCGCATGTATGTCGGATCCAGCAAGTGGTGTGCTCTACGCACTGTGGTGTACCACTGGTATCGTGCCTCGGTGACCGTGTCACTCTCA
    .....C.....
    S V P I T E G Y A L P R A I L R L D L A G D L T D L K I L T E 196
901  GGTGCCCATCTACGAAGTACGCTTCCCTCAGCCATCTGCTGCTCGATTTCGGTCTGTGATCTCACTGACTCACTCAGATGAGATCTCTCAGCA
    .....
    R S F S F T T A E R E I V R D I K E L C V A L D P E R E N A 229
1001  GCGCGGCTACTGTTCAACACACCGCAGAGCTGAAATGCTGGTGCATCAAGGAGAAAGTCTGCTATGTGGTCTCACTTCGACGAGCTGAGTGGC
    .....
    T A A S S S S L E K S V E L P D G V I T I G D E R F R C P E S L 262
1101  ACTGCTGCCCAAGCTCCCTCGAGAAGTCTACGAGCTGCCGATGGTCAGTGCATCACCATCGGCAAGCGCTCCGTTGCTGCTGATCTCTCT
    .....
    F O P S F L G H E S A S I N E S T F H A I R E C D V D I R K D L T A 296
1201  TCCAGCCGCACTTCTCGGATGGAATCTCGGGTATCCAGCACTACTTTAAGGCTATCATGAAGTGCATGACAGTCCGTAAGGATCTCTACGC
    .....A.....
    N V L S G G T R Y P S I A D R R K E I T S L A P S T R K I K 320
1301  CAACACTGTGTGTGTGGCGCACCATATACCAGGATTTGCAGACGGTATGCAGAGGAGATCACTCACTGGCGAAGCACTATGAGATCAAG
    .....
    I V A P P E R K T V S V M I G S I L A S L E T F O R W I D E R E 362
1401  ATAGTGGGCCACTGAGCGCAATFACTGTCTGTGATCGGTGGCTCCA TCTTGTCTCACTCTCCACTTCGACGAGTGGATCTCCAAAGCAGAGT
    .....
    Y D E S G P S I V D E E C F 376
1501  ACCAGAGTCTGGCTGGCATTTTCATCGAAGTCTCTTAAGCACTTCAAGTGAAGTTACCGTTTAAAGGTCACTTAATTTGATCATTTGGCTT
    .....A.....C..C.....GGGTAACTCAAACTACATGTCTCTCTGCTGCTCTTTCAGGATTCAGTATTT
1601  ACCACAGCTTTGGTCAATTAAGCATGTCCAAAGGCTTCCCTTATCCACTTACCAAGCTTTT
    TTTCTTAATTAATTAATAAACAATTCACCTGATATCTATATCTGCGTAGTGGCTGTAGG

```

Fig. 2. nucleotide and predicted amino acid sequences from the minus strands of the inserts in pAT6 and pAT5. Homologous positions in the protein-coding regions are indicated by points. Putative regulatory elements: CAAT and TATA boxes; sequences for splicing and polyadenylation are underlined.

Expression of actin in *T. solium* cysticerci. A total protein extract from *T. solium* cysticerci was subjected to SDS-PAGE and transferred to nitrocellulose membrane. Detection was carried out using a monoclonal antibody against human actin. Results show a single protein band with an

apparent molecular weight of 45 000 (Fig. 3A). The molecular weight of actin detected in the protein extract of *T. crassiceps* cysticerci gave identical results. This molecular weight is similar to actins from different species. The fact that the actin of cysticerci was detected using monoclonal

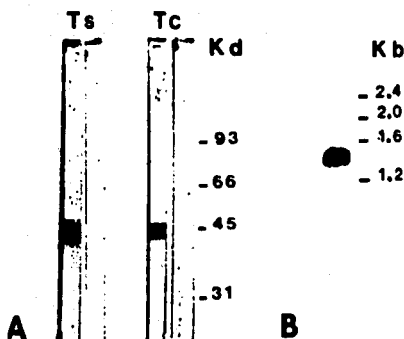


Fig. 3. Expression of actin in cysticerci. (A) Immunoblots of a crude extract from *T. solium* (lanes 1 and 2) or *T. crassiceps* (lanes 3 and 4) using monoclonal antibodies to human actin (lanes 1 and 3) or normal mouse IgG (lanes 2 and 4). (B) Northern blot of total RNA (10 µg) from *T. solium* probed with an exonic sequence (see fragment D in Fig. 1) of *T. solium* actin gene in pAT5. The apparent length of the transcript was calculated using *Trypanosoma cruzi* rRNAs as reference [36].

antibodies specific to human actin suggests that the epitope recognized by the antibody was present in the ancestral species of Bilateria.

The occurrence of actin-related transcripts was analyzed through Northern hybridization of total RNA from *T. solium* cysticerci (Fig. 3B). The exonic 455-bp fragment D from pAT5 (Fig. 1) was used as a probe. Autoradiography showed a single hybridization band migrating as an RNA species of about 1 400 bases. However, the presence of several actin mRNAs of undistinguishable length cannot be ruled out. This length is in agreement with the size of actin transcripts reported for other eukaryotic organisms ranging from 1 200 to 1 900 bases.

Construction of the cDNA library and screening for actin transcripts. The screening of the oligo(dT)-primed cDNA library with the exonic fragment D allowed the isolation of three clones. These clones exhibited identical size inserts of about 1 350 bp, as estimated by electrophoresis. Additionally, partial sequencing of protein coding regions of the three clones showed 100% ho-

mology among themselves, indicating a common origin. One of the clones was sequenced from 7 bases upstream from the initiation methionine up to 95 bases downstream from the stop codon TAA. Analysis of this sequence showed 100% homology with the corresponding protein-encoding and non-translated regions of pAT6.

The absolute homology among the cDNA clones and corresponding regions in pAT6 indicates that this gene is expressed at the larval stage. Furthermore, the absence of the intervening sequence in the cDNA inserts demonstrates the splicing event during expression of this gene member.

The 100% homology among predicted amino acid sequences from the two genes of *T. solium*, as well as the conservation of regulatory sequences, makes it likely that the coding region in pAT5 is also expressed in *T. solium*. It is possible that the expression of these two genes is developmentally regulated as observed in other actin gene families. Evidence from experiments using the non-translated flanking sequences as probes would appropriately answer this question. Future experiments will be performed to test this.

The silent nucleotide substitutions among pAT5 and pAT6 are not homogeneously distributed along the entire protein-coding sequences. Eleven (42%) out of 26 changes appear in the first exon which is only 126 bases (11% of the protein-coding region) long. The higher conservation in the second exon cannot be explained by a particularly stringent selective pressure on the portion of the protein encoded by these region of the genes. The occurrence of gene conversions between non-allelic actin genes, as proposed by Crain et al. [35], seems a more plausible explanation.

The cellular and subcellular distribution of actin in taeniid cestodes is not known. The nucleic acid probes as well as the antibody used here can be used as molecular tools to ascertain the expression and participation of actin in the cytoskeleton and muscular tissue of this and other related organisms.

Acknowledgements

We thank W. Nellen for having provided us with the plasmid pAA3 containing an actin gene

from *A. castellanii*; F. Bolívar for the plasmid pBR322 and J.L. Savorio for the monoclonal antibodies to human actin. This work was sup-

ported by a grant from the John and Catherine MacArthur Foundation, Chicago, IL.

References

- 1 Vandekerckhove, J. and Weber, K. (1984) Chordate muscle actins differ distinctly from invertebrate muscle actins. The evolution of the different vertebrate muscle actins. *J. Mol. Biol.* 179, 391 - 413.
- 2 Hightower, R.C. and Meagher, R.B. (1986) The molecular evolution of actin. *Genetics* 114, 315 - 332.
- 3 Firtel, R.A. (1981) Multigene families encoding actin and tubulin. *Cell* 24, 6 - 7.
- 4 Ng, R. and Abelson, J. (1980) Isolation and sequence of the gene for actin in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77, 3912 - 3916.
- 5 Cupples, C.G. and Peariman, R.E. (1986) Isolation and characterization of the actin gene from *Tetrahymena thermophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83, 5160 - 5164.
- 6 Hirono, M., Endoh, H., Okada, N., Numata, O. and Watanabe, Y. (1987) Cloning and sequencing of the *Tetrahymena* actin gene and identification of its gene product. *J. Mol. Biol.* 194, 181 - 192.
- 7 Lacleite, J.P., Merchant, M.T. and Willms, K. (1987) Histological and ultrastructural localization of antigen B in the metacystode of *Taenia solium*. *J. Parasitol.* 73, 121 - 129.
- 8 Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680 - 685.
- 9 Towbin, H., Staehelin, T. and Gordon, J. (1979) Electro-phoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets. Procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 70, 4350 - 4354.
- 10 Strohman, R.C., Moss, P.S., Micou-Eastwood, J., Spector, D., Przybyla, A. and Paterson, B. (1977) Messenger RNA for myosin polypeptides: isolation from single myogenic cell cultures. *Cell* 10, 265 - 273.
- 11 Díaz de León, L., Aroos, L. and Willms, K. (1982) The uses of cell-free systems for the characterization of *Cysticercus cellulosae* antigens. In: *Cysticercosis, Present State of Knowledge and Perspectives* (Flisser, A., Willms, K., Lacleite, J.P., Larralde, C., Ridaura, C. and Beltrán, F., eds.), pp. 465 - 475, Academic Press, New York.
- 12 Southern, E.M. (1975) Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* 98, 503 - 517.
- 13 Denhardt, D. (1966) A membrane filter technique for detection of complementary DNA. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 23, 640 - 646.
- 14 Rigby, P.W.J., Dieckmann, M., Rhodes, C. and Berg, P. (1977) Labeling deoxyribonucleic acid to high specific activity in vitro by nick translation with DNA polymerase I. *J. Mol. Biol.* 113, 237 - 251.
- 15 Nellen, W. and Galwitz, D. (1982) Actin genes and actin messenger RNA in *Acanthamoeba castellanii*. Nucleotide sequences of the split gene I. *J. Mol. Biol.* 159, 1 - 18.
- 16 Lehrach, H., Diamond, D., Wozney, J.M. and Boedtker, H. (1977) RNA molecular weight determinations by gel electrophoresis under denaturing conditions, a critical reexamination. *Biochemistry* 16, 4743 - 4751.
- 17 Bolívar, F., Rodríguez, K.L., Greene, P.J., Bellach, M.C., Heyneker, H.L. and Boyer, H.W. (1977) Construction and characterization of new cloning vehicles, II. A multipurpose cloning system. *Gene* 2, 95 - 113.
- 18 Casadaban, M.J. and Cohen, S.N. (1980) Analysis of gene control signals by DNA fusion and cloning in *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* 138, 179 - 207.
- 19 Mandel, M., and Higa, A. (1970) Calcium dependent bacteriophage DNA infection. *J. Mol. Biol.* 53, 159 - 162.
- 20 Rowekamp, W. and Firtel, R.A. (1980) Isolation of developmentally regulated genes from *Dictyostellium*. *Dev. Biol.* 79, 409 - 418.
- 21 Aviv, H. and Leder, P. (1972) Purification of biologically active globin messenger RNA by chromatography on oligohymidylc acid-cellulose. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 69, 1408 - 1412.
- 22 Gluber, U. and Hoffman, B.J. (1983) A simple and very efficient method for generating cDNA libraries. *Gene* 25, 263 - 269.
- 23 Benton, W.D. and Davis, R.W. (1977) Screening λ gt recombinant clones by hybridization to single plaques in situ. *Science* 196, 180.
- 24 Yanisch-Perron, C., Vieira, J. and Messing, J. (1985) Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* 33, 103 - 119.
- 25 Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A.R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74, 5463 - 5467.
- 26 Humphries, S.E., Whittall, R., Minty, A., Buckingham, M. and Williamson, R. (1981) There are approximately 20 actin genes in the human genome. *Nucleic Acids Res.* 9, 4895 - 4908.
- 27 Minty, A.J., Alonso, S., Guenet J.L. and Buckingham, M.E. (1983) Number and organization of actin-related sequences in the mouse genome. *J. Mol. Biol.* 167, 77 - 101.
- 28 Vandekerckhove, J. (1984) Amino acid sequence of *Acanthamoeba* actin. *J. Mol. Biol.* 172, 141 - 147.
- 29 Seif, I., Khoury, G. and Dhar, R. (1979) BKV splice sequences based on analysis of preferred donor and acceptor sites. *Nucleic Acids Res.* 6, 3387 - 3397.
- 30 Breathnach, R. and Chambon, P. (1981) Organization and expression of eucaryotic split genes coding for proteins. *Annu. Rev. Biochem.* 50, 349 - 383.
- 31 Efstratiadis, A., Posakony, J.W., Maniatis, T., Lawn, R.M., O'Connell, C., Spritz, R.A., DeRiel, J.K., Forget, B.G., Weissman, S.M., Slightom, J.L., Blech, A.E., Smithies, O., Baralle, F.E., Shoulders, C.C. and Proud-

- foot, N.J. (1980) The structure and evolution of the human globin gene family. *Cell* 21, 653 - 668.
- 32 Benoist, C., O'Hare, K., Breathnach, R. and Chambon, P. (1980) The ovalbumin gene-sequence of putative control regions. *Nucleic Acids Res.* 8, 127 - 132.
- 33 Goldberg, M. (1979). Ph.D. Thesis, Stanford University, Stanford, CA.
- 34 Fitzgerald, M. and Shenk, T. (1981) The sequence 5'-AAUAAA-3' forms part of the recognition site for polyadenylation of late SV40 mRNAs. *Cell* 24, 251 - 260.
- 35 Crain, Jr., W.R. Boshar, M.F., Cooper, A.D., Durica, D.S., Nagy, A. and Steffen, D. (1987) The sequences of a sea urchin muscle actin gene suggests a gene conversion with a cytoskeletal actin gene. *J. Mol. Evol.* 25, 37 - 45.
- 36 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.

COMENTARIOS FINALES.

En el presente trabajo se describe la primera secuencia completa de dos genes de T. solium. Dicho estudio se llevó a cabo utilizando como modelo a la familia génica de actina. Las características estructurales de dos genes de actina de T. solium se encuentran descritas en el artículo anexo.

La caracterización y secuenciación de estos genes ha permitido el estudio de algunos otros aspectos de la Biología Molecular de este organismo. En base a los resultados obtenidos en el trabajo reportado en el artículo, se realizaron diferentes análisis que se presentan a continuación.

SOUTHERN BLOT.

En la página 25 (publicación) se describe un experimento de hibridización tipo Southern en el que se enfrentaron DNA genómico total de T. solium digerido con diferentes enzimas de restricción y DNA correspondiente a un gen de actina de A. castellanii marcado con P-32. Aunque este tipo de análisis no permite determinar el número exacto de genes de actina, el número de bandas hibridizantes indican que T. solium presenta una pequeña familia multigénica de secuencias relacionadas a actina (Fig. E).

USO DE CODONES EN LOS GENES DE ACTINA DE T. solium.

La secuenciación parcial de las clonas del banco de cDNA demostró que el gen de actina clonado en pAT6 es expresado por el cisticerco de T. solium (ver artículo). Por otro lado, se reporta la existencia (tanto en pAT6 como en pAT5) de secuencias

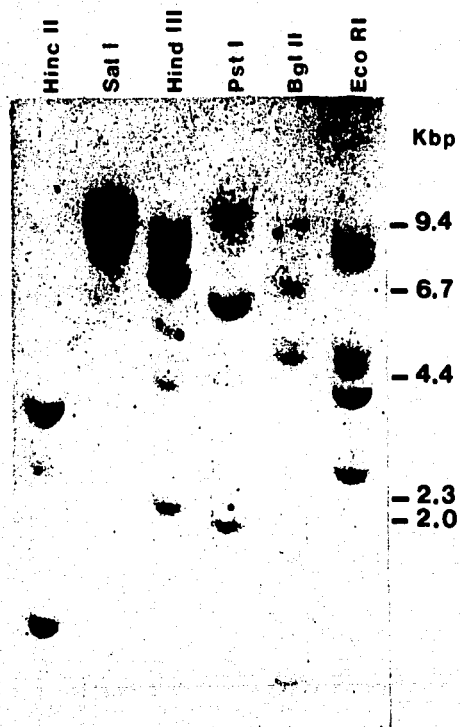


Figura E: Southern blot genómico de DNA total de cisticerco de *I. golium* digerido con diferentes endonucleasas de restricción e hibridizado con el inserto del plásmido pAA3, correspondiente al gen de actina de *A. castellanii* marcado radioactivamente con P^{32} .

consenso para la regulación de la transcripción y maduración del mRNA que pudieran ser funcionales. Estos datos apoyan la idea de que el segundo gen de actina clonado en PAT5 puede ser también, un gen funcional. Un criterio más para apoyar esta idea es la comparación del uso de codones entre una y otra secuencia.

En base a las secuencias obtenidas de los genes de actina de T. solium se determinó y comparó el uso de codones entre estas secuencias (Tabla II). La tabla muestra que el uso de codones en el gen de actina clonado en PAT5 es prácticamente el mismo que el PAT6. Estos datos son una evidencia mas para apoyar la idea de que el gen clonado en PAT5 pudiera expresarse.

ISOTIPOS DE ACTINA EN T. solium.

Uno de los objetivos del trabajo de tesis consistia en determinar la existencia de isotipos de la proteína actina en T. solium. Hasta el momento no se han encontrado isotipos de actina en ningún invertebrado estudiado. La presencia de tejido muscular en T. solium hace pensar en la posibilidad de que en este parásito se encuentren al menos dos isotipos: actina citoplásmica y actina muscular. Aunque en otros invertebrados con tejido muscular no se han encontrado dichos isotipos (Files, et al., 1983; Cooper y Crain Jr., 1982), era pertinente analizar el caso de T. solium.

Para determinar la posible existencia de isotipos en T. solium se realizó un análisis por comparación de la secuencia de aminoácidos deducida a partir de la secuencia de DNA de los genes de actina de T. solium contra otras secuencias de ami-

Tabla II: Comparación del uso de los codones de los aminoácidos entre los genes del anticóden en pAT5 y en pAT6

	pAT5	pAT6		pAT5	pAT6		pAT5	pAT6		pAT5	pAT6			
TTT Phe	(1)	.3%	-	TCT Ser	(7)	1.9%	-	TAT Tyr	(1)	.3%	(2)	.5%		
TTC Phe	(12)	3.2%	-	TCC Ser	(8)	2.1%	(9)	2.4%	TAC Tyr	(14)	3.7%	(13)	3.5%	
TTA Leu	(0)	.0%	-	TCA Ser	(3)	.8%	(2)	.5%	TAA ---	(1)	---	-		
TTG Leu	(3)	.8%	-	TCG Ser	(4)	1.1%	-	TAG ---	(0)	---	-	-		
CTT Leu	(1)	.3%	-	CCT Pro	(8)	2.1%	(6)	1.6%	CAT His	(2)	.5%	-		
CTC Leu	(15)	4.0%	-	CCC Pro	(6)	1.6%	(8)	2.1%	CAC His	(7)	1.9%	-		
CTA Leu	(1)	.3%	(0)	.0%	CCA Pro	(4)	1.1%	-	CAA Gln	(1)	.3%	-		
CTG Leu	(8)	2.1%	(9)	2.4%	CCG Pro	(1)	.3%	-	CAG Gln	(12)	3.2%	-		
ATT Ile	(1)	.3%	(2)	.5%	ACT Thr	(8)	2.1%	-	AAT Asn	(1)	.3%	-		
ATC Ile	(24)	6.4%	(23)	6.1%	ACC Thr	(11)	2.9%	-	AAC Asn	(8)	2.1%	-		
ATA Ile	(1)	.3%	-	ACA Thr	(2)	.5%	-	AAA Lys	(3)	.8%	(2)	.5%		
ATG Met	(16)	4.3%	-	ACG Thr	(3)	.8%	-	AAG Lys	(16)	4.3%	(17)	4.5%		
BTI Val	(4)	1.1%	-	GCT Ala	(8)	2.1%	-	GAT Asp	(7)	1.9%	(9)	2.4%		
GTC Val	(8)	2.1%	-	GCC Ala	(7)	1.9%	(8)	2.1%	GAC Asp	(14)	3.7%	(12)	3.2%	
GTA Val	(3)	.8%	(2)	.5%	GCA Ala	(5)	1.3%	(4)	1.1%	GAA Glu	(8)	2.1%	(6)	1.6%
GTG Val	(9)	2.4%	(10)	2.7%	GCG Ala	(7)	1.9%	-	GAG Glu	(20)	5.3%	(22)	5.9%	
									GGA Gly	(15)	4.0%	(16)	4.3%	
									GGC Gly	(14)	3.7%	(12)	3.2%	
									GGA Gly	(0)	.0%	(3)	.8%	
									GGG Gly	(2)	.5%	(0)	.0%	

Los números entre paréntesis indican el número de veces que se encuentra el códon a lo largo de la secuencia de DNA. Los valores a la derecha del número entre paréntesis indican el porcentaje de uso de cada uno de los codones dentro del total de la secuencia de DNA. Los guiones indican la igualdad en el uso del códon entre pAT5 y pAT6.

noácidos para esta proteína en diferentes especies (Tabla III).

El análisis de la estructura primaria de la proteína actina de T. solium, reveló que la actina de este parásito presenta características tanto citoplásmicas como musculares descritas para vertebrados (Vandekerckhove y Weber, 1978). Al igual que en otras especies de invertebrados (Cooper y Crain, Jr. 1982), la actina de T. solium presenta un mayor número de aminoácidos característicos de actinas citoplásmicas que musculares. De las 21 posiciones de aminoácidos que distinguen entre actinas musculares y citoplásmicas, 16 corresponden a actinas citoplásmicas (residuos 10, 16, 17, 76, 103, 129, 176, 201, 225, 266, 278, 286, 296, 298, 357 y 364) y solo 3 corresponden a actinas musculares (residuos 106, 153 y 271), además presenta 2 aminoácidos que no son característicos de ninguno de estos isotipos (residuos 162 y 259).

MOVIMIENTO DE INTRONES EN GENES DE ACTINA.

El estudio de sistemas génicos codificantes para proteínas como la actina, tiene importancia desde el punto de vista evolutivo. El hecho de que los genes codificantes para esta proteína presenten diferencias en cuanto al número y posición de intrones, tanto entre especies como entre los genes de una misma familia multigénica (ver antecedentes), hace que el modelo génico de actina sea particularmente interesante para el estudio del movimiento de los intrones.

Tabla III: Comparación de algunos aminoácidos de la proteína actina de T. solium con los de otras actinas conocidas.

Origen de la actina	Residuo de aminoácido																											
	10	16	17	76	103	106	129	153	162	176	201	225	259	266	271	278	286	296	298	357	364							
<u>Taenia solium</u> (pAT6)	Val	Met	Cys	Val	Val	Thr	Thr	Leu	Ser	Leu	Thr	Gln	Ser	Leu	Ala	Phe	Val	Thr	Leu	Ser	Ser							
Conejo: esquelética	Cys	Leu	Val	Ile	Met	Thr	Val	Leu	Asn	Met	Val	Asn	Thr	Ile	Ala	Tyr	Ile	Asn	Met	Thr	Ala							
<u>H. sapiens</u> cardíaca	Cys	Leu	Val	Ile	Thr	Thr	Val	Leu	Asn	Met	Val	Asn	Thr	Ile	Ala	Tyr	Ile	Asn	Leu	Ser	Ala							
<u>H. sapiens</u> alfa-cito	Ile	Met	Cys	Val	Val	Thr	Thr	Met	Thr	Leu	Thr	Gln	Ala	Leu	Cys	Phe	Val	Thr	Leu	Ser	Ser							
Bovina cito	Ile/Val	Met	Cys	Val	Val	Val	Thr	Met	Thr	Leu	Thr	Gln	Ala	Leu	Cys	Phe	Val	Thr	Leu	Ser	Ser							
<u>I. borealis</u> cito	Ile	Met	Cys	Val	Val	Thr	Thr	Met	Thr	Leu	Thr	Gln	Ala	Leu	Cys	Phe	Ile	Thr	Leu	Ser	Ser							
<u>C. elegans</u>	Val	Met	Cys	Val	Val	Thr	Thr	Leu	Thr	Leu	Thr	Gln	Ala	Leu	Ala	Tyr	Ile	Thr	Leu	Ser	Ser							
<u>S. purpuratus</u>	Ile	Met	Val	Val	Val	Thr	Ser	Phe	Thr	Leu	Thr	Gln	Ala	Leu	Ala	Tyr	Val	Thr	Leu	Ser	Ser							
<u>A. nidulans</u>	Ile	Met	Cys	Val	Val	Thr	Val	Leu	Val	Ser	Ser	Gln	Ala	Leu	Gly	Phe	Val	Ile	Met	Ser	Ser							
<u>S. cerevisiae</u>	Ile	Met	Cys	Val	Val	Thr	Val	Leu	Val	Leu	Ser	Gln	Ala	Leu	Ala	Tyr	Val	Ile	Met	Ser	Ser							
<u>P. polycephalum</u>	Ile	Met	Cys	Val	Val	Thr	Thr	Met	Thr	Leu	Thr	Gln	Ala	Leu	Ala	Tyr	Val	Val	Leu	Ser	Ser							
<u>D. discoideum</u> Act-12	Ile	Met	Cys	Val	Val	Thr	Thr	Met	Thr	Leu	Thr	Ala	Ala	Leu	Ala	Tyr	Val	Val	Leu	Ser	Ser							
<u>A. castellanii</u>	Ile	Met	Cys	Val	Val	Thr	Thr	Leu	Thr	Leu	Thr	Gln	Ala	Leu	Ala	Tyr	Val	Val	Leu	Ser	Ser							
<u>E. histolytica</u>	Val	Met	Cys	Val	Val	Thr	Thr	Met	Thr	Leu	Thr	Glu	Ala	Leu	Asn	Tyr	Val	Ile	Leu	Thr	Ser							
<u>G. galli</u>	Val	Gly	Met	Ile	ND ⁸	Ser	Val	Leu	Thr	Leu	Thr	Gln	Ile	Ile	Ala	Tyr	Val	Ile	Leu	Ser	Ser							

Los aminoácidos están numerados de acuerdo al esquema propuesto por Vandekerckhove y Weber (1978). Las secuencias son de las siguientes referencias: Conejo: músculo esquelético, citoesquelético cerebral de Barroga y P. polycephalum (Vandekerckhove y Weber, 1978), H. sapiens cardíaca (Hamada, et al., 1982), H. sapiens alfa cito (Erba, et al., 1986), I. borealis (Cross, et al., 1988), C. elegans (Krause, et al., 1989), S. purpuratus (Cooper y Crain, Jr. 1982), A. nidulans (Fidel, et al., 1988), S. cerevisiae (Ng y Abelson, 1980), D. discoideum (Romas y Firtel, 1985), A. castellanii (Hollen y Ballwitz, 1982; Vandekerckhove, et al., 1984), E. histolytica (Edson, et al., 1987), G. galli (Shah et al., 1982).

⁸ ND = Aminoácido no determinado.

El análisis comparativo del número y posición de intrones en diferentes genes de una misma proteína, ha suscitado controversia acerca del origen y posible función de estas secuencias. Existen dos maneras de explicar las diferencias entre los genes: una de ellas propone que el gen ancestral de las actinas presentaba todos los intrones conocidos, algunos de los cuales se han ido perdiendo a lo largo de la evolución (Gilbert, W., 1978; Shah, et al., 1983; Gilbert, et al., 1986); la segunda, apoya la idea de que los intrones se han adquirido en forma independiente (Cavalier-Smith, 1985; Dibb y Newman, 1989) y posteriormente, que algunos de ellos se han perdido.

La idea de la existencia de un gen ancestral que incluyera a todas las secuencias intrónicas conocidas, se basa en el concepto de dominio protéico (Darnell y Doolittle, 1986). Hasta el momento no se ha encontrado ninguna función específica de los intrones, excepto en los pocos casos en los que en ellos se han encontrado secuencias amplificadoras (enhancers) o secuencias regulatorias (Mercola, et al., 1983). Sin embargo, se ha propuesto que los intrones pudieran ser secuencias cuya función consista en separar dominios de una proteína y que a lo largo de la evolución algunos de ellos se han perdido sin alterar la expresión y estructura del producto final.

Si consideramos la idea del gen ancestral y la extrapolamos a la actina, tendríamos que pensar en un gen con todos los intrones en las posiciones representadas en los genes actuales. Se conocen hasta el momento 22 posiciones diferentes de intrones que dividen la secuencia en diferentes exones. Por otro lado, se

tiene evidencia de la existencia de intrones para algunos genes de actina que no dividen la secuencia codificante y que se encuentran en las zonas que flanquean al gen (Tabla IV). Dichos intrones son transcritos a mRNA y son procesados en la maduración de esta molécula.

En base a estos datos se decidió realizar un análisis filogenético de la pérdida (delección) y/o ganancia (inserción) de los intrones en los genes de actina en las especies estudiadas hasta ahora. En el análisis no se consideraron los intrones que se encuentran flanqueando al gen puesto que no se han buscado en muchos de los genes secuenciados.

Como referencia se construyó un dendograma que incluye a las especies de las cuales se dispone la secuencia de DNA genómico correspondiente a genes de actina. El dendograma está basado en la filogenia propuesta por Margulis y Schwartz (1976). Dicho dendograma es una construcción sin raíces (Fig. F y G) en donde únicamente se consideran las relaciones más cercanas entre una especie y otra, sin considerar el parámetro tiempo. En el primer modelo se consideró la existencia de un gen ancestral con todos los intrones posibles y se tomaron en cuenta las potenciales delecciones de estas secuencias a lo largo de la evolución (Fig. F). En el segundo modelo se consideraron primero las inserciones de intrones y luego las delecciones pertinentes de estas secuencias (Fig. G). En ambos modelos se llegó a la distribución actual de intrones (Tabla IV) en los genes de actina conocidos.

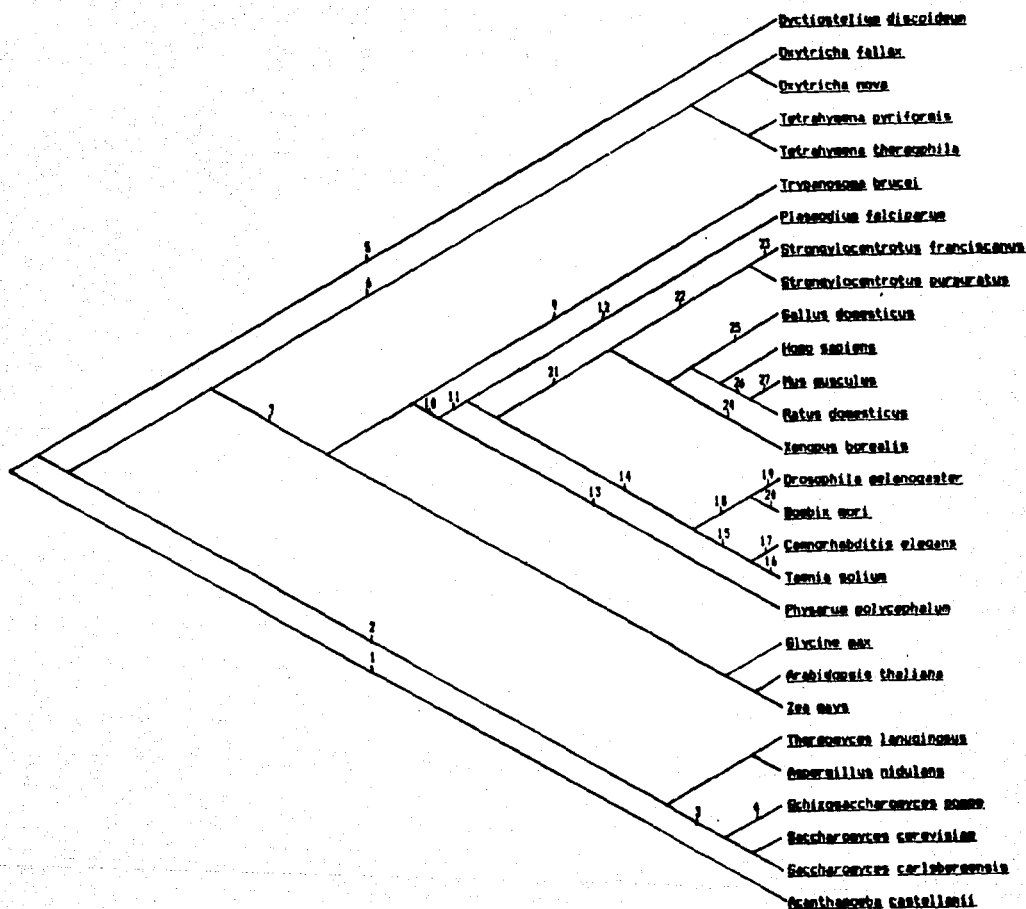


Figura F: Modelo de delección de intrones en los genes de actina a lo largo de la evolución. El dendrograma solo indica las relaciones más cercanas entre una especie y otra. Los números indican los siguientes eventos de delección de intrones²: 1) Δ a-i, k-v; 2) Δ c, d, g-p, r-v; 3) Δ b, e, f, q; 4) Δ s; 5) Δ a-v; 6) Δ a-v; 7) Δ a, g, j, q; 8) Δ b, d, f-i, k, l, n-p, r-t, v; 9) Δ b-d, f-i, k-p, r-v; 10) Δ u; 11) Δ d, i, o, v; 12) Δ b, c, f-h, l, n, p, r-t; 13) Δ b, c, f-h, k-n, p, r, t; 14) Δ h, l-n, t; 15) Δ b, k, r; 16) Δ c, g, p, s; 17) Δ f; 18) Δ c, f, g, p, s; 19) Δ k; 20) Δ b, p; 21) Δ b, c, g, k, r, s; 22) Δ h, o, t; 23) Δ f, p; 24) Δ h, s; 25) Δ h; 26) Δ h; 27) Δ l.

El símbolo Δ indica inserción y el símbolo Δ indica delección.

² La letra indica una posición específica dentro del gen indicada en la tabla de intrones (Tabla IV).

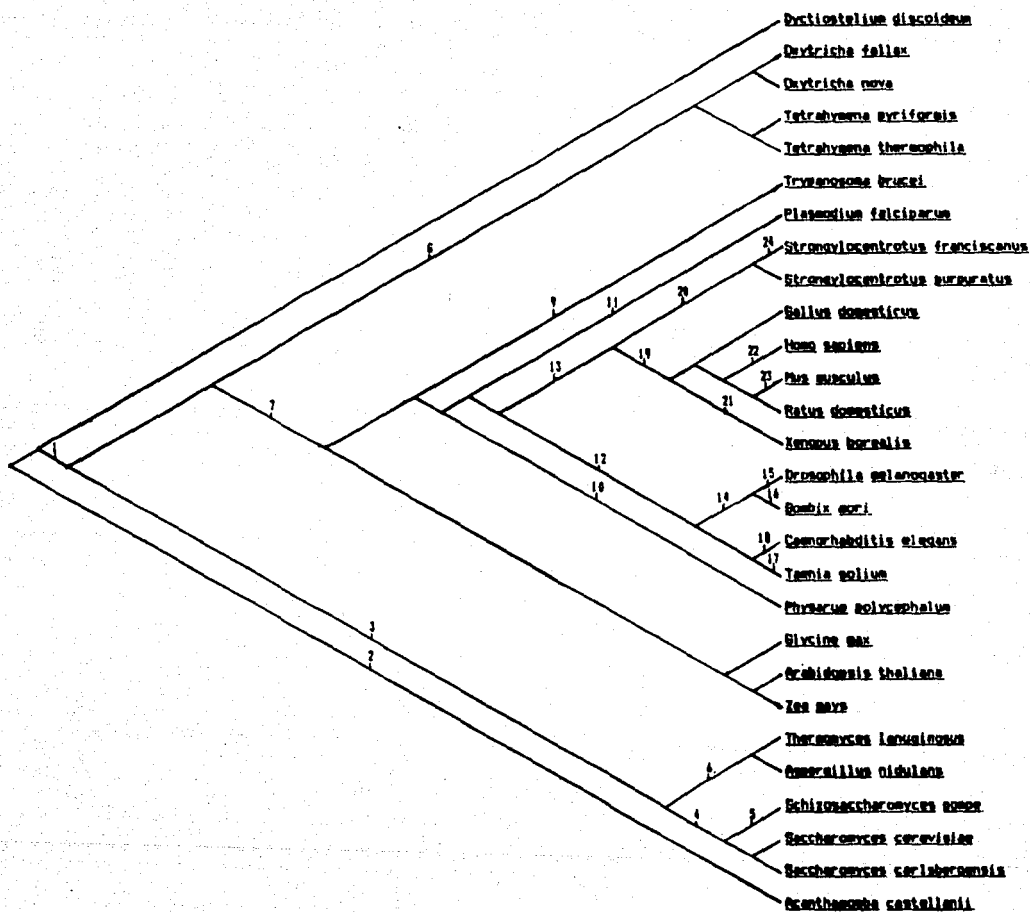


Figura 6: Modelo de inserción y delección de intrones en los genes de actina a lo largo de la evolución. El dendrograma solo indica las relaciones más cercanas entre una especie y otra. Los números indican los siguientes eventos de inserción y delección de intrones: 1) :: f; 2) :: j; 3) :: d; 4) ^ f; 5) ^ a; 6) :: b, e, q; 7) :: c, m; 8) ^ f; 9) ^ c, f, m; 10) :: d, i, o, u, u, ^ c, f, m; 11) ^ c, f; 12) ^ m; 13) :: l, u, p, ^ c; 14) ^ c, f; 15) :: b, r; 16) :: k; 17) ^ c; 18) :: g, p, s, ^ f; 19) :: t; 20) ^ m; 21) ^ m; 22) :: h; 23) ^ l; 24) ^ p.

El símbolo :: indica inserción y el símbolo ^ indica delección.

^a La letra indica una posición específica dentro del gen indicada en la tabla de intrones (Tabla IV).

El análisis mostró que la existencia de un gen ancestral que poseyera todos los intrones conocidos hasta ahora, implica la ocurrencia de 191 eventos, todos ellos deleciones. El modelo de ganancia y pérdida de intrones, implica 45 eventos de los cuáles 21 son deleciones y 25 inserciones.

Tomando en cuenta que en el segundo modelo existe menor número de eventos que en el primero, se consideró a éste, como el más probable.

Por otro lado, el segundo modelo apoya la idea de que el intrón en posición 150 existió en un gen de actina antes de la separación entre los animales y las plantas (Fig. G) tal como fué propuesto por Zacut y colaboradores (1982). Sin embargo esta es en contra de la idea de Wildeman (1988) de que T. lanuginosus presenta diferentes intrones que pertenecieron a un gen ancestral de actina ya que este hongo multicelular posee intrones que no se encuentran en ninguna otra especie estudiada (exceptuando a A. nidulans) (Tabla IV). Este hecho se puede explicar fácilmente con el segundo modelo por medio de la inserción de estos intrones a lo largo del desarrollo evolutivo de estas especies.

En base a el segundo modelo, el intrón situado después del codón 41, parece ser común a la mayoría de las especies ya que se encuentra representado en plantas, hongos, protozoarios y animales invertebrados y vertebrados (Fig. G). Esto indica que el intrón en posición 41 debió haber existido en un gen de actina antes de la separación de estos grupos, tal como se había propuesto en un trabajo previo a esta tesis (Campos, 1988).

Existen ciertas dificultades para explicar la inserción de los intrones. Uno de ellos es que la inserción de estas secuencias en un gen implica la existencia de un mecanismo enzimático complejo que hasta ahora no se conoce. Por otro lado, la inserción de los intrones no puede ser un evento debido al azar. Si la inserción de estas secuencias es un evento preciso, entonces se requiere de un blanco en el DNA que señale el sitio de la inserción. Dicho blanco pudiera ser una secuencia específica en el DNA. Las secuencias consenso que flanquean a los intrones y que forman parte de los exones adyacentes pudiera ser utilizada para la inserción de las secuencias intrónicas (Mount, 1982; Dibd y Newman, 1989).

CONVERSION GENICA EN T. solium.

Las secuencias exónicas de los genes de actina de T. solium clonados en PAT5 y PAT6 constan de 1,128 bases de las cuáles 26 (1.77 %) difieren entre si. A pesar de estas diferencias en la secuencia codificadora no existe diferencia alguna en la secuencia de aminoácidos para la cuál codifican. Esto se debe a que todas las diferencias entre uno y otro gen caen siempre en la tercera base del codón al que pertenecen.

Un análisis de la distribución de estos cambios neutrales, demuestran, al contrario de lo que se esperaria, que las diferencias no se encuentran homogéneamente distribuidas a lo largo de las secuencias codificadoras (fig. H). Como se mencionó en el artículo, la conservación de la homología del segundo exón en ambos genes no se puede explicar por una presión selec-

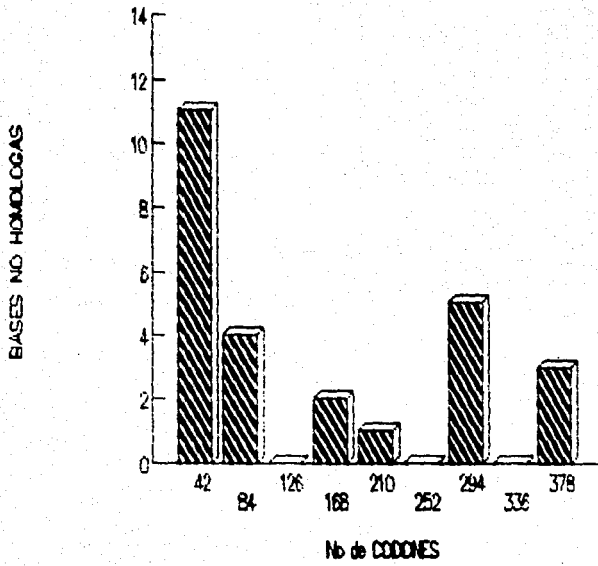


Figura H: Comparación de bases entre las secuencias exónicas de los genes de actina clonados en PAT5 y PAT6.

tiva sobre el segmento de la proteína para la cuál codifica.

La comparación de la secuencia de este exón con respecto al primero, pareciera indicar que existe un mecanismo que pudiera estar remplazando la secuencia de un exón de alguno de los genes por el otro. Este fenómeno es conocido como conversión génica y sucede entre genes alélicos. Existe un caso, en los genes de actina del equinodermo S. purpuratus, en el que se ha propuesto la existencia de conversión génica entre genes no alélicos (Crain, et al., 1987). Este pudiera ser el caso también, de los genes de actina clonados en pAT5 y pAT6 de T. solium.

La importancia del fenómeno de conversión génica entre genes no alélicos, reside en que a lo largo del tiempo estas secuencias permanecerían homólogas previniendo la divergencia entre los miembros de esta familia génica. La conversión génica entre genes de actina podría involucrarse como una posibilidad para explicar la ausencia de isotipos de actina en invertebrados.

BIBLIOGRAFIA COMPLEMENTARIA

Akhurst, R. J., F. J. Calzone, J. J. Lee, R. J. Britten and E. H. Davidson (1987) Structure and organization of the CyIII actin gene subfamily of the sea urchin, Strongylocentrotus purpuratus. J. Mol. Biol. 194, 193 - 203

Alberts, B. D. Bray, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts and J. D. Watson (1983) Molecular biology of the cell. Garland Publishing, Inc. N. Y. 1179 p.

Aluja, A. S. (1982) Frequency of porcine cysticercosis in Mexico. In: Cysticercosis: Present state of knowledge and perspectives. Academic Press, N. Y. 53 - 62

Baer, J. G. (1952) Ecology of animal parasites. University of Illinois Press, Urbana. 224 pp.

Bergsma, D. J., K. S. Chang and R. Schwartz (1985) Novel chicken actin gene: Third cytoplasmic isoform. Mol. Cell. Biol. 5 (5), 1151 - 1162

Campos, A. (1988) Taenia solium: Clonación y caracterización parcial de un gen de actina. Tesis de licenciatura. Facultad de Ciencias, U. N. A. M. 88 p

Cañedo, L., J. P. Lacllette and E. Morales (1982) Evagination of the metacystode of Taenia solium. In: Cysticercosis: Present state of knowledge and perspectives. Academic Press. N. Y. 363 - 373

Cavalier-Smith, T. (1985) Selfish DNA and the origin of introns. Nature 315, 283 - 284

Cooper, D. A. and W. R. Crain Jr. (1982) Complete nucleotide sequence of a sea urchin actin gene. Nucl. Acids Res. 10 (13), 4081 - 4092

Cross, S. G., C. Wilson, H. P. Erba and H. R. Woodland (1988) Cytoskeletal actin gene families of Xenopus borealis and Xenopus laevis. J. Mol. Evol. 27, 17 - 28

Chang, K. S., W. E. Zimmer Jr., D. J. Bergsma, J. B. Dodgson and R. J. Schwartz (1984) Isolation and characterization of six different chicken actin genes. Mol. Cell. Biol. 4 (11), 2498 - 2508

Chien-Tsung Hu, M., S. B. Sharp and N. Davidson (1986) The complete sequence of the mouse skeletal alfa-actin gene reveals several conserved and inverted repeat sequences outside of the protein-coding region. Mol Cell. Biol. 6 (1), 15 - 25

Darnell, J. E. and W. F. Doolittle (1986) Speculations on the early course of evolution. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83, 1271 - 1275

Darnell, J., H. Lodish and D. Baltimore (1986) Molecular cell biology. Scientific American Books, Inc. 1187 p.

Dibd, N. J. and A. J. Newman (1989) Evidence that introns arose at proto-splice sites. EMBO J. 8 (7), 2015 - 2021

Documento VPH/84 FAO/UNDP/WHO (1984) Guidelines on surveillance, prevention and control of taeniasis/cysticercosis. World Health Org., Geneva, Switzerland.

Edman, U., I. Meza and N. Agabian (1987) Genomic and cDNA actin sequences from a virulent strain of Entamoeba histolytica. Proc. Natl. Acad. Sci. 84, 3024 - 3028

El-Saleh, S. C., R. Thieret, P. Johnson and J. D. Potter (1984) Modification of Lys-237 on actin by 2, 4-Pentanedione. J. Biol. Chem. 259 (17), 11014 - 11021

Erba, H. P., P. Gunning and L. Kedes (1986) Nucleotide sequence of the human Gamma cytoskeletal actin mRNA: anomalous evolution of vertebrate non-muscle actin genes. Nucleic Acids Res. 14 (13), 5275 - 5294

Erba, H. P., R. Eddy, T. Shows, L. Kedes and P. Gunning (1988) Structure, chromosome location, and expression of the human Gamma-actin gene: Differential evolution, location, and expression of the cytoskeletal Beta- and Gamma-actin genes. Mol. Cell. Biol. 8 (4), 1775 - 1789

Fidel, S., J. H. Dooman and R. Morris (1988) Aspergillus nidulans contains a single actin gene which has unique intron location and encodes a Gamma-actin. Gene 70, 283 - 293

Files, S. Carr and D. Hirsh (1983) Actin gene family of Caenorhabditis elegans. J. Mol. Biol. 164, 355 - 375

Firtel, A. R., R. Timm, A. R. Kimmel and M. McKeown (1979) Unusual nucleotide sequences at the 5' end of actin genes in Dictyostelium discoideum. Proc. Natl. Acad. Sci. 76 (12), 6206 - 6210

Flisser, A., K. Willms, J. P. Lacleste, C. Larralde, C. Riadura and F. Beltrán (1982) Cysticercosis: Present state of knowledge and perspectives. Academic Press. N. Y. 700 p.

Foran, D. R., P. J. Johnson and G. P. Moore (1985) Evolution of two actin genes in the sea urchin Strongylocentrotus franciscanus. J. Mol. Evol. 22, 108 - 116

- Fornwald, J. A., G. Kuncio, I. Peng and C. P. Ordahl (1982) The complete nucleotide sequence of the chick α -actin gene and its evolutionary relationship to the actin gene family. *Nucleic Acids Res.* 10 (13), 3861 - 3876
- Fyrberg, A. E., B. J. Bond, N. D. Hershey, K. S. Mixter and N. Davidson (1981) The actin genes of *Drosophila*: Protein coding regions are Highly conserved but intron positions are not. *Cell* 24, 107 - 116
- Gallwitz, D. and R. J. Lawson (1980) Molecular cloning of the actin gene from yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res.* 5, 1043 - 1059
- Gallwitz D. and R. Seidel (1980) Molecular cloning of actin gene from *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res.* 8, 1043 - 1059
- Gemmell, M. A. and R. J. Lawson (1982) Ovin cysticercosis: An Epidemiological model for the cysticercosis I. The free-living egg phase. In: *Cysticercosis: Present state of knowledge and perspectives*. Academic Press. N. Y. 87 - 98
- Gilbert, W. (1978) Why genes in pieces? *Nature* 271, 501
- Gonzales-y-Merchand, J. A. and R. A. Cox (1988) Structure and expression of an actin gene of *Physarum polycephalum*. *J. Mol. Biol.* 202, 161 - 168
- Greslin, A. F., S. H. Loukin, Y. Oka and D. M. Prescott (1988) An analysis of the macronuclear actin genes of *Oxytricha*. *DNA* 7 (8), 529 - 536
- Hamada, H., M. G. Petrino and T. Kakunaga (1982) Molecular structure and evolutionary origin of human cardiac muscle actin gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79, 5901 - 5905
- Hird, D. W. and M. M. Pullen (1979). Tapeworms, meat and man: A Brief review and update of cysticercosis caused by *Taenia saginata* and *Taenia solium*. *J. F. Protection* 42 (1): 58 - 64
- Huber, M., L. Garfinkel, C. Gitler, D. Mirelman, M. Revel and S. Rozenblatt (1987) *Entamoeba histolytica*: cloning and characterization of actin cDNA. *Mol. Biochem. Parasitol.* 24, 227 - 235
- Kaine, P. B. and B. B. Spear (1982) Nucleotide sequence of a macronuclear gene for actin in *Oxytricha fallax*. *Nature* 295: 430 - 432
- Khrestchatskiy, M. and M. Fontes (1987) There is an α -actin skeletal muscle-specific gene in a salamander (*Pleurodeles waltlii*). *J. Mol. Biol.* 193, 409 - 412

- Korn, E. D. (1982) Actin polymerization and its regulation by proteins from non muscle cells. *Physiol. Rev.* 623, 672 - 737
- Kost, T. A., N. Theodorakis and S. H. Hughes (1983) The nucleotide sequence of the chick cytoplasmic Beta-actin gene. *Nucleic Acids Res.* 11 (23), 8287 - 8301
- Krause, M., M. Wild, B. Rosenzweig and D. Hirsh (1989) Wild-type and mutant actin genes in Caenorhabditis elegans. *J. Mol. Biol.* 208, 381 - 392
- Laclette, J. P. (1985) Componentes de superficie en el metacéstodo de la Taenia solium. Tesis doctoral. Instituto de Investigaciones Biomédicas, U.N.A.M. 126
- Laclette, J. P., Y. Ornelas, M. T. Merchant and K. Willms (1982) Ultrastructure of the surrounding envelopes of Taenia solium eggs. In: *Cysticercosis: Present state of knowledge and perspectives*. Academic Press, N. Y. 375 - 387
- Lazarides, E. and J. P. Revel (1979) La base del movimiento celular. *Investigación y ciencia* 34, 52 - 66
- Lehninger, A. L. (1982) Principles of biochemistry. Worth publishers, Inc. 1011 p.
- Lumsden, R. D., M. Voge and F. Sogandares-Bernal (1982) The metacestode tegument: Fine structure, development, topochemistry, and interactions with the host. In: *Cysticercosis: Present state of knowledge and perspectives*. Academic Press, N. Y. 307 - 361
- Madeley, J. (1984) Cisticercosis: una enfermedad espantosa. *Salud Mundial*. OMS. Marzo: 10 -12
- Margulis, L. and K. V. Schwartz (1976) Five Kingdoms. W. H. Freeman, San Francisco 338 p.
- Mercola, M., X. Wang, J. Olsen and K. Calame (1983) Transcriptional enhancer elements in the mouse immunoglobulin heavy chain locus. *Science* 221, 663 - 665
- Mertins P. and D. Gallwitz (1987) A single intronless actin gene in the fission yeast Schizosaccharomyces pombe: nucleotide sequence and transcripts formed in homologous and heterologous yeast. *Nucleic Acids Res.* 15 (18) 7369 - 7379
- Mohamed F. B. A., A. Pays, P. Tebabi, B. Dero, T. Seebeck, M. Steinert and E. Pays. (1988) Structure and transcription of the actin gene of Trypanosoma brucei. *Mol. Cell. Biol.* 8 (5), 2166 - 2176

Mounier, N. and J. Prudhomme (1986) Isolation of actin genes in Bombyx mori: The coding sequence of a cytoplasmic actin gene expressed in the silk gland is interrupted by a single intron in an unusual position. *Biochimie* 68, 1053 - 1061

Mounier, N., J. Gaillard and J. Prudhomme (1987) Nucleotide sequence of the coding region of two actin genes in Bombyx mori. *Nucleic Acids Res.* 15 (6), 2781

Mount, S. M. (1982) A catalogue of splice junction sequences. *Nucleic Acids Res* 10, 459 - 472

Nair, C. J., L. Winesett and R. J. Ferl (1988) Nucleotide sequence of an actin gene from Arabidopsis thaliana. *Gene* 65, 247 - 257

Nader, W. F., G. Isenberg and H. W. Sauer (1986) Structure of Physarum actin gene locus ard A: a nonpalindromic sequence causes inviability of phage lambda and rec A-independent deletions. *Gene* 48, 133 - 144

Nakajima-Iijima, S., H. Hamada, P. Reddy and T. Kakunaga (1985) Molecular structure of the human cytoplasmic Beta-actin gene: Interspecies homology of sequences in the introns. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82, 6133 - 6137

Nellen, W. C., Donath, C. and Galwitz, D., (1981) The nucleotide sequences of actin genes from Saccharomyces carlsbergensis and Saccharomyces cerevisiae are identical except for their introns. *J. Mol. Appl. Gen* 1, 239 - 244

Nudel, U., D. Katcoff, R. Zakut, M. Shani, Y. Carmon, M. Finner, H. Czosnek, I. Ginsburg and D. Yaffe (1982) Isolation and characterization of rat skeletal muscle and cytoplasmic actin genes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 79, 2763 - 2767

Nudel, U., R. Zacut, M. Shani, S. Neuman, Z. Levy and D. Yaffe (1983) The nucleotide sequence of the rat cytoplasmic Beta-actin Gene. *Nucl. Acids Res.* 11 (6), 1759 - 1771

Pollard, D. T. (1984) Actin-binding protein evolution. *Nature* 312, 403

Pollard, D. T. and J. A. Cooper (1986) Actin-binding. A critical Evaluation of mechanisms and functions. *Ann. Rev. Biochem.* 55, 987 - 1035

Ramirez-Bopn, E., M. T. Merchant, M. González-del Pliego and Luis Cañedo (1982) Ultrastructure of the bladder wall of the metacestode of Taenia solium. In: *Cysticercosis: Present state of knowledge and perspectives*. Academic Press, N. Y. 261 - 280

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA.

Raxworthy, M. J. (1988) Microtubules, tubulines and associated proteins. *Biochemical Education* 16 (1), 2 - 9

Romans, P. and R. A. Firtel (1985) Organization of the actin multigene family of Dictyostelium discoideum and analysis of variability in the protein coding regions. *J. Mol. Biol.* 186, 321 - 335

Rothman, A. (1963) Electron microscopy studies of tapeworms: the surface structures of Hymenolepis diminuta (Rudolphi, 1819) Blanchard, 1891. *Trans. Am. Microsc. Soc.* 82: 22

Shah, M. D., R. C. Hightower and R. B. Meagher (1982) Complete nucleotide sequence of a soybean actin gene. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 79, 1022 - 1026

Shah, M. D., R. C. Hightower and R. B. Meagher (1983) Genes encoding actin in higher plants: Intron positions are highly conserved but the coding sequences are not. *J. Mol. Appl. Genet.* 2, 111 - 126

Silverman, P. H. (1954) Studies on the biology of some tapeworms of the genus Taenia. I. Factors affecting hatching and activation of taeniid ova and some criteria of their viability. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 48, 207

Stutz, F. and G. Spohr (1987) A processed gene coding for a sarcomeric actin in Xenopus laevis and Xenopus tropicalis. *EMBO J.* 6, 1989 - 1995

Ueyama, H., H. Hamada, N. Battula and T. Kakunaga (1984) Structure of a human smooth muscle actin gene (aortic type) with a unique intron site. *Mol. Cell. Biol.* 4 (6), 1073 - 1078

Vandekerckhove, J. and K. Weber (1978) At least six different actins are expressed in a higher mammal: An analysis based on the amino acid sequence of the amino-terminal tryptic peptide. *J. Mol. Biol.* 126, 783 - 802

Vandekerckhove, J. and K. Weber (1979) The complete amino acid sequence of actins from bovine aorta, bovine heart, bovine fast skeletal muscle, and rabbit slow skeletal muscle. *Differentiation.* 14, 123 - 133

Vandekerckhove, J., J. Leavitt, T. Kakunaga and K. Weber (1980). Coexpression of a mutant Beta-actin and the normal Beta- and Gamma-cytoplasmic actin in a stably transformed human cell line. *Cell* 22, 893 - 899

Vandekerckhove, J., A. A. Lal and E. D. Korn (1984) Aminoacid sequence of Acanthamoeba actin. J. Mol. Biol. 172, 141 - 147 *

Weber, K. and M. Osborn (1985) The molecules of the cell matrix. Scientific American. 4, 92 - 102

Wesseling, J. G., J. M. de Ree, T. Ponnudurai, M. A. Smits and J. G. G. Schoenmakers. (1988a) Nucleotide sequence and deduced amino acid sequence of a Plasmodium falciparum actin gene. Mol. Biochem. Parasitol. 27, 313 - 320

Wesseling, J. G., M. A. Smits and J. G. G. Schoenmakers (1988b) Extremely diverged actin proteins in Plasmodium falciparum. Mol. Biochem. Parasitol. 30, 143 - 154

Wildeman, G. A. (1988) A putative gene present in a thermophilic eukaryote: Novel combination of intron positions. Nucleic Acids Res. 16 (6), 2553 - 2564

Zacut, R., M. Shani, D. Givol, S. Neuman, D. Yaffe and U. Nudel (1982) Nucleotides sequence of the rat skeletal muscle actin gene. Nature 298, 857 - 859

* Esta referencia es la misma que la cita 28 del articulo pero en ella faltaron los dos últimos autores.