

ORGANIZACION DE LA RED PARA EL ESTUDIO DEL GENOMA DE *TRYPANOSOMA CRUZI*

ALBERTO C.C. FRASCH*, **RAMIRO E. VERDUN****, **DANIEL O. SANCHEZ***

Instituto de Investigaciones Biotecnológicas, Universidad Nacional de General San Martín, San Martín, Provincia de Buenos Aires

Resumen Hace cinco años el "Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases (TDR)" de la Organización Mundial de la Salud lanzó un nuevo proyecto en Genoma de Parásitos. Las finalidades eran la obtención de información sobre la organización del genoma e identificación de genes de cinco parásitos, a saber, *Schistosoma*, *Filaria*, *Leishmania* y *Trypanosomas brucei* y *cruzi*. La organización de una red de grupos de investigación, la promoción de la colaboración internacional y el entrenamiento de investigadores de países en vías de desarrollo eran también objetivos principales del programa. Luego de cinco años se ha obtenido una importante cantidad de información que está disponible para investigadores que trabajan en el tema.

Abstract *Organization of the Parasite Genome Programme network.* Five years ago the Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases (TDR) from the World Health Organization (WHO) launched the Parasite Genome Project. The aims were to obtain information on genome organization and gene discovery in five parasites, namely, *Schistosoma*, *Filaria*, *Leishmania* and *Trypanosomas brucei* and *cruzi*. Organization of research networks for each parasite under study, promotion of international collaboration and training of researchers in developing countries, were also main objectives of the programme. After five years, a large amount of information has been obtained, which is now available to researchers in the field.

Key words: *Trypanosoma cruzi*, Chagas disease, Parasite Genome Project

El programa para el estudio de genomas de parásitos organizada por TDR/WHO incluyó al *Trypanosoma cruzi*, agente causante de la enfermedad de Chagas en América¹. Información sobre proyectos genoma de los otros parásitos incluidos en el programa de TDR/WHO puede encontrarse en publicaciones recientes²⁻⁴. El primer paso fue la organización de una red que incluya grupos de investigación con capacidad de trabajar en diferentes áreas del proyecto. Una lista de los laboratorios e investigadores participantes, que incluyen grupos de diferentes países de Europa, de Estados Unidos de Norteamérica y de América del Sur puede encontrarse en una revisión realizada recientemente por los grupos participantes¹. La primera tarea realizada fue la selección de un clon de *T. cruzi* a ser estudiado. El elegido resultó ser el clon CL-Brener, denominado así en honor del Dr. Zigman Brener, su descubridor. A partir de ese momento se seleccionaron proyectos a través de un comité de pares establecido por TDR/WHO. Algunos pro-

yectos fueron financiados por este sistema. Otros grupos de investigación participantes han sido financiados por fuentes alternativas.

Las finalidades científicas que se establecieron para la primera etapa del proyecto fueron: 1. caracterización biológica del clon CL-Brener; 2. construcción de colecciones de fragmentos de ADN genómico clonados en diferentes vectores (YAC, BAC, cósmidos y plásmidos); 3. colecciones de ADN copia (cDNA) a partir de ARN mensajero obtenidos de diferentes estadios del parásito (epimastigotes, tripomastigotes y amastigotes); 4. análisis del patrón de cromosomas del parásito e identificación de marcadores para cada uno de ellos; 5. identificación de genes a través de la secuenciación de clones genómicos y de cDNA obtenidos al azar; 6. secuenciación de cromosomas; 7. generación de una base de datos que incluya la información generada por el proyecto. A continuación se describen brevemente los resultados obtenidos en cada una de estas líneas de trabajo, los cuales han sido obtenidos por diferentes grupos que forman parte de la red.

1. Caracterización biológica del clon CL-Brener

El clon de referencia para el proyecto posee todas las características biológicas esperadas de una cepa infectiva

* Miembro de la Carrera del Investigador del CONICET (Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas).

** Becario de la Universidad Nacional de General San Martín

Dirección postal: Dr. Alberto C.C. Frasch, Instituto de Investigaciones Biotecnológicas, Universidad Nacional de General San Martín, C.C. 30, 1650 San Martín, Prov. Buenos Aires, Argentina
 Fax: (54-11) 4752-9639 E-mail: cfrasch@inti.gov.ar

de *T. cruzi* tales como velocidad de crecimiento, diferenciación, infectividad, virulencia en animales de laboratorio y sensibilidad a los agentes quimioterapéuticos convencionales⁵. También fue caracterizado en cuanto a marcadores moleculares que posibilitan su identificación, seguimiento y el análisis de su estabilidad^{5, 6}.

2. Construcción de colecciones de fragmentos de ADN genómico

Se han construido una serie de colecciones de fragmentos de ADN en diferentes vectores bacterianos que incluyen cósmidos^{7, 8}, YACs y BACs⁹, entre otros. A partir de estas colecciones se generaron sub-colecciones conteniendo clones con fragmentos específicos de los cromosomas III y IV¹⁰ que posibilitaron su mapeo¹¹. Estas colecciones de fragmentos genómicos fueron ordenadas en placas para su distribución a diferentes laboratorios interesados en el tema.

3. Colecciones de ADN copia (cDNA)

Se generó una colección de cDNAs a partir de ARN mensajero de la forma epimastigotes de CL-Brener (Urmenyi TP, Rondinelli E, y colaboradores, resultados no publicados). Aproximadamente 23 000 clones fueron ordenados en placas y distribuidos a diferentes laboratorios que los utilizaron para la identificación de genes en *T. cruzi* (ver próximas secciones). Actualmente se están construyendo colecciones de cDNAs a partir de las formas amastigote y trypomastigote del parásito.

4. Análisis del patrón de cromosomas del parásito e identificación de marcadores

Se separaron las principales bandas cromosomales del parásito por electroforesis en geles de agarosa en campo pulsante. La identificación de bandas se realizó utilizando marcadores por hibridación de las bandas transferidas a filtros de nitrocelulosa^{12, 13}. Una estimación preliminar permite suponer que el clon CL-Brener posee aproximadamente 40 cromosomas por genoma haploide, con un tamaño total de 40-60 Mpb (Megapares de bases).

5. Identificación de genes en *T. cruzi*

En una primera etapa se comenzó con la identificación de genes por secuenciación de cDNAs de la forma epimastigote del *T. cruzi*. Actualmente (30 de abril de 1999) hay 8 069 secuencias, que se denominan ESTs por "expression sequence tags", en la base de datos dbEST del "National Center for Biotechnology Information" (NCBI). Las mismas han sido obtenidas en dife-

rentes laboratorios y algunas de ellas publicadas^{14, 15}. Descartando las secuencias repetidas que se obtienen como consecuencia del proceso de secuenciamiento al azar, la cantidad de ESTs en la base de datos corresponde a aproximadamente 3 000 genes diferentes identificados. Este número obtenido en los últimos 2 años es más de cien veces superior a todos los genes identificados previamente al inicio del proyecto genoma del *T. cruzi*. Una segunda aproximación para la identificación de nuevos genes fue iniciada recientemente en nuestro laboratorio a través de la secuenciación de colecciones de fragmentos genómicos. Hasta el momento se han informado 2 229 de las denominadas GSS por "genomic sequence survey" en la base dbGSS del NCBI (abril 30, 1999, liberación número 043099). En total, la suma de ESTs y GSSs comunicadas significa aproximadamente 4 600 000 bases (estimando un promedio de 450 bases por secuencia), o sea, aproximadamente el 5% del genoma del parásito.

6. Secuenciación de cromosomas

Se ha comenzado con la secuencia de un cromosoma completo (número III, de un tamaño aproximado de 600 000 bases, B. Andersson y colaboradores) que está en su etapa final. Una secuencia parcial de este cromosoma ha sido recientemente publicada¹⁶. Asimismo se comenzó con la secuenciación del cromosoma IV por el mismo grupo.

La secuenciación de GSSs ya comenzada tiende a la obtención de 20 000 secuencias para finales del 1999, con lo que se habrá obtenido un número total de bases secuenciadas de 9 000 000, o sea, aproximadamente un 20% del genoma haploide total. Información sobre secuencias genómicas obtenidas como consecuencia del proyecto incluyen familias de genes y secuencias repetitivas, entre otras¹⁷⁻¹⁹.

7. Generación de una base de datos que incluya la información generada por el proyecto

Se ha generado una base de datos que contiene toda la información producida por los diferentes grupos involucrados²⁰. La misma tiene un formato AceDB y puede ser obtenida en la siguiente dirección:

<ftp://iris.dbbm.fiocruz.br/pub/genomedb/TcruziDb/>.

Agradecimientos: Se agradece a los miembros de la red para el estudio del genoma de *T. cruzi* por la información provista. El trabajo en nuestro laboratorio fue realizado gracias a la contribución del *Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases* de la Organización Mundial de la Salud, la Universidad Nacional de General San Martín, el CONICET (Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas), Ministerio de Cultura y Educación y la Agencia de Promoción Científica y Tecnológica.

Bibliografía

1. The *Trypanosoma cruzi* Genome Consortium. The *Trypanosoma cruzi* genome initiative. *Parasitology Today* 1997; 13: 16-22.
2. Melville SE, Majiwa P, Donelson J. Resources Available from the African Trypanosome Genome Project. *Parasitology Today* 1998; 14: 3-4.
3. The Leishmania Genome Network: The Complete Chromosomal Organization of the Reference Strain of the Leishmania Genome Project, L. major 'Fridlin'. *Parasitology Today* 1998; 14: 301-3.
4. Unnasch TR. The Filarial Genome Project. *Parasitology Today* 1994; 10: 415-6.
5. Zingales B, Pereira ME, Oliveira RP, Almeida KA, Umezawa ES, Souto RP, Vargas N, Cano MI, da Silveira JF, Nehme NS, Morel CM, Brener Z, Macedo A. *Trypanosoma cruzi* genome project: biological characteristics and molecular typing of clone CL Brener. *Acta Trop* 1997; 68: 159-73.
6. Brisse S, Barnabe C, Banuls AL, Sidibe I, Noel S, Tibayrenc M. A phylogenetic analysis of the *Trypanosoma cruzi* genome project CL Brener reference strain by multilocus enzyme electrophoresis and multiprimer random amplified polymorphic DNA fingerprinting. *Mol Biochem Parasitol* 1998; 92: 253-63.
7. Hanke J, Frohme M, Laurent JP, Swindle J, Hoheisel JD. Hybridization mapping of *Trypanosoma cruzi* chromosomes III and IV. *Electrophoresis* 1998; 4: 482-5.
8. Salazar NA. Mucin-like glycoprotein genes are closely linked to members of the transilidase super-family aot multiple sites in the *Trypanosoma cruzi* genome. *Mol Biochem Parasitol* 1996; 78: 127-36.
9. Ferrari I, et al. Towards the physical map of the *Trypanosoma cruzi* nuclear genome: construction of YAC and BAC libraries of the reference clone T. cruzi CL-Brener. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1997; 92: 843-52.
10. Frohme M, Hanke J, Åslund L, Petterson U, Hoheisel JD. Selective generation of chromosomal cosmid libraries within the *Trypanosoma cruzi* genome project. *Electrophoresis* 1998; 19: 478-81.
11. Frohme M, Laurent M, Swindle JP, Hoheisel JD. Hybridization mapping of *Trypanosoma cruzi* chromosomes III and IV. *Electrophoresis* 1998; 19: 482-5.
12. Henriksson J, Porcel B, Rydaker M, Ruiz A, Sabaj V, Galanti N, Cazzulo JJ, Frasch ACC, Pettersson U. Chromosome specific markers reveal conserved linkage groups in spite of extensive chromosomal size variation in *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol* 1995; 73: 63-74.
13. Cano MI y col. Molecular karyotype of clone CL Brener chosen for the *Trypanosoma cruzi* Genome Project. *Mol Biochem Parasitol* 1995; 71: 273-8.
14. Brandão A, Urmenyi T, Rondinelli E, González A, de Miranda AB, Degraive W. Identification of Transcribed Sequences (ESTs) in the *Trypanosoma cruzi* Genome Project. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1997; 92: 863-6.
15. Verdun R, Di Paolo N, Urmenyi TP, Rondinelli E, Frasch ACC and Sánchez DO. Gene Discovery through Expressed Sequence Tag Sequencing in *Trypanosoma cruzi*. *Infection and Immunity* 1998; 5393-8.
16. Anderson B, Åslund L, Tammi M, Tran AN, Hoheisel JD, Pettersson U. Complete sequence of a 93.4-kb contig from chromosome 3 of *Trypanosoma cruzi* containing a strand-switch region. *Genome Res* 1998; 8: 809-16.
17. Bringaud F, Vedrenne C, Cuvillier A, Parzy D, Baltz D, Tetaud E, Pays E, Venegas J, Merlin G, Baltz T. Conserved organization of genes in trypanosomatids. *Mol Biochem Parasitol* 1998; 94: 249-64.
18. Di Noia JM, D'Orso I, Åslund L, Sánchez DO, Frasch ACC. The *Trypanosoma cruzi* Mucin Family Is Transcribed from Hundreds of Genes Having Hypervariable Regions. *The Journal of Biological Chemistry* 1998; 273: 10843-50.
19. Araya J, Cano MI, Gomes HB, Novak EM, Requena JM, Alonso C, Levin MJ, Guevara P, Ramirez JL, Da Silveira JF. Characterization of an interspersed repetitive DNA element in the genome of *Trypanosoma cruzi*. *Parasitology* 1997; 115: 563-70.
20. Degraive W, de Miranda AB, Amorim A, Brandão A, Aslett M, Vandeyar M. TcruziDB, an integrated database, and the WWW information server for the *Trypanosoma cruzi* genome project. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1997; 92: 805-9.

En ciencia no se puede improvisar, es necesaria una preparación previa, que es larga y exige esfuerzo y dirección acertada.

Bernardo A. Houssay (1887-1971)

Misión y responsabilidad del investigador científico, 1961
reproducido en *Ciencia e Investigación* 1996; 49: 105-110