

118
2 ej



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

BIOLOGIA

"CLONACION DEL EXTREMO 3' DEL CISTRON DE RNA
RIBOSOMAL DE Trypanosoma cruzi."

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

B I O L O G O

P R E S E N T A:

SANTIAGO MARTINEZ CALVILLO

FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

CONTENIDO

	página
GLOSARIO	III
RESUMEN	IV
INTRODUCCION	1
OBJETIVO	9
MATERIALES Y METODOS	10
1. Cultivo y extracción de ácidos nucleicos de <i>T. cruzi</i> .	10
1.1 Cultivos celulares.	10
1.2 Extracción de DNA genómico.	10
1.3 Digestiones con endonucleasas de restricción.	11
1.4 Extracción del RNA ribosomal y purificación de la molécula S4 de RNAr.	11
2. Construcción, marcaje e identificación de moléculas recombinantes.	12
2.1 Definición del inserto pRTC81.	12
2.2 Aislamiento y marcaje del inserto pRTC81.	13
2.3 Marcaje de la molécula S4 de RNAr.	14
2.4 Ligaciones.	15
2.5 Preparación y transformación de células compe- tentes de la cepa MC1061 de <i>E. coli</i> .	15
2.6 Hibridación <u>in situ</u> .	17
2.7 Recuperación de DNA de geles de agarosa de bajo punto de fusión.	18

2.8 Purificación de plásmido en pequeña escala.	18
2.9 Purificación de plásmido por gradiente de cloruro de cesio y bromuro de etidio.	19
3. Caracterizaciones génicas.	20
3.1 Experimentos tipo Southern.	20
3.2 Secuenciación de DNA.	21
3.21 Preparación y transformación de células competentes de la cepa JM101 de <i>E. coli</i> .	22
3.22 Preparación de DNA de cadena sencilla.	24
3.23 Reacciones de secuenciación.	24
3.24 Preparación del gel de poliacrilamida y electroforesis.	25
3.3 Secuenciación de RNA.	26
RESULTADOS	29
-Secuenciación de la región 3' del inserto genómico pRTC81.	29
-Ubicación genómica de sitios de restricción hacia el extremo 3' de la unidad de transcripción de RNAr.	31
-Construcción de la biblioteca genómica con <u>Hind</u> III y <u>Bgl</u> II e hibridación.	35
-Construcción de la biblioteca genómica con <u>Hind</u> III y <u>Xho</u> I e hibridación.	41
-Secuenciación de los extremos del fragmento de 1.25 Kb.	45
-Secuenciación del extremo 5' de la molécula S4 de RNAr.	49
DISCUSION	50
CONCLUSIONES	55
APENDICE: Medios de cultivo y soluciones.	56
BIBLIOGRAFIA	57

GLOSARIO

ATP	Trifosfato de adenosina
BND-celulosa	Benzoilato Naftilato DEAE-celulosa
Ci	Curie
cpm	cuentas por minuto
dATP	Trifosfato de desoxiadenosina
ddNTPs	2',3'-didesoxinucleósidos 5'-trifosfatados
DNA	Acido desoxirribonucleico
DNasa	Desoxirribonucleasa
dNTPs	2'-desoxinucleósidos 5'-trifosfatados
dpm	desintegraciones por minuto
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Acido etilendiamino tetracético
IPTG	Isopropil-tiogalactosidasa
Kb	Kilobases
NP40	Nonidet P-40
pb	pares de bases
PEG	Poli(etil)en-glicol
PVP	Polivinil-pirrolidon
RNA	Acido ribonucleico
RNAr	Acido ribonucleico ribosomal
RNasa	ribonucleasa
rpm	revoluciones por minuto
SDS	Dodecil-sulfato de sodio
TEMED	N,N,N',N'-Tetrametil-etilendiamina
X gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -galactósido

RESUMEN

El interés del presente trabajo fue caracterizar el extremo 3' de la unidad de transcripción de RNAR de Trypanosoma cruzi, y determinar si contiene (al igual que otros tripanosomatídeos) la región codificadora de la molécula pequeña S4. La estrategia empleada fue aislar fragmentos genómicos que contuvieran el extremo 3' de la unidad ribosomal de T. cruzi. Como primer paso fueron localizados sitios de restricción en el espaciador externo del cistrón ribosomal. Esto se llevó a cabo mediante experimentos tipo Southern, usando como sonda el inserto ribosomal pRTC81, el cual contiene una parte del gen de la molécula ribosomal 24S β , y las regiones codificadoras de las moléculas S2 y S6 (figura 3). Analizando el mapa de restricción obtenido (figura 15) se decidió construir una biblioteca genómica con Hind III y Xho I, en el vector pUC18 (digerido con Hind III y Sal I). Esta biblioteca fue hibridada in situ con el inserto pRTC81, aislándose finalmente una colonia positiva. Con el objeto de caracterizar el inserto clonado, fueron purificados los plésmidos de la colonia positiva. El tamaño del inserto fue de 2.85 Kb, presentando un sitio interno de Sst I que lo divide en dos fragmentos: de 1.6 y de 1.25 Kb. Por medio de un experimento tipo Southern se encontró que el fragmento de 1.25 Kb presentó señal positiva con la molécula ribosomal S4. Al secuenciar los extremos de este fragmento se encontraron 73 nucleótidos codificadores de la molécula S4. De esta manera, el gen de la molécula S4 fue ubicado a aproximadamente 1500 pb de la región codificadora de S6, en el inserto ribosomal clonado. Además, fueron secuenciados 972 pb del espaciador transcrito interno que separa S6 de S4.

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

Consideraciones Generales.

Trypanosoma cruzi es un protozoo flagelado, parásito del hombre, que pertenece a la familia de los tripanosomatídeos. Se incluye en el Reino Protocista (1), siendo su clasificación la siguiente:

Phylum: Protozoa

Subphylum: Sarcomastigophora

Superclase: Mastigophora

Clase: Zoomastigophorea

Orden: Kinetoplastida

Familia: Trypanosomatidae (2).

Los organismos que se incluyen dentro de la familia Trypanosomatidae se caracterizan por presentar un solo flagelo, y una estructura denominada cinetoplasto, que se localiza en la matriz mitocondrial, y que consiste en una red complejamente organizada de moléculas circulares de DNA (2,3).

La división en géneros, dentro de esta familia, se basa en el tipo de hospederos y en el número de estadios morfológicos que el protozoo presenta durante su ciclo de vida. De los 9 géneros reconocidos, Trypanosoma y Leishmania parasitan tanto a organismos vertebrados como invertebrados, mientras que Crithidia, Leptomonas, Herpetomonas, Rhynchoidomonas y Blastocrithidia parasitan únicamente invertebrados, principalmente insectos.

El género Phytomonas es parásito de plantas y de insectos, y el género - Proleptomonas es de vida libre (2).

T. cruzi parasita a un gran número de mamíferos, incluido el hombre, en el que provoca la enfermedad de Chagas o tripanosomiasis americana. El parásito se transmite al hombre por medio de insectos hematófagos de los géneros Triatoma, Rhodnius y Panstrongylus, y puede producir una gran variedad de cuadros clínicos, que van desde infecciones leves hasta problemas severos de corazón y/o aparato digestivo, que pueden provocar la muerte del individuo (4).

Durante su ciclo de vida, T. cruzi presenta, básicamente, 3 estadios morfológicos: tripomastigote, epimastigote y amastigote (figura - 1). La definición de estos estadios se basa en la forma general de la célula, la posición del cinetoplasto en relación al núcleo, y la región de la que el flagelo emerge de la bolsa flagelar (3).

El tripomastigote es la única forma infectiva, aunque no es capaz de replicarse. Se encuentra tanto en la sangre del hospedero vertebrado, como en la parte distal del intestino en el hospedero invertebrado. El amastigote es el estadio replicativo intracelular en el hospedero vertebrado. Finalmente, el epimastigote es la forma replicativa en el invertebrado (3,5).

El ciclo de vida se inicia cuando un insecto hematófago se alimenta de la sangre de un vertebrado infectado, ingiriendo tripomastigotes de ésta. En el intestino del insecto los tripomastigotes se transforman en epimastigotes replicantes. Los epimastigotes se dividen repetidamente, y en el recto se diferencian en tripomastigotes metacíclicos, los --

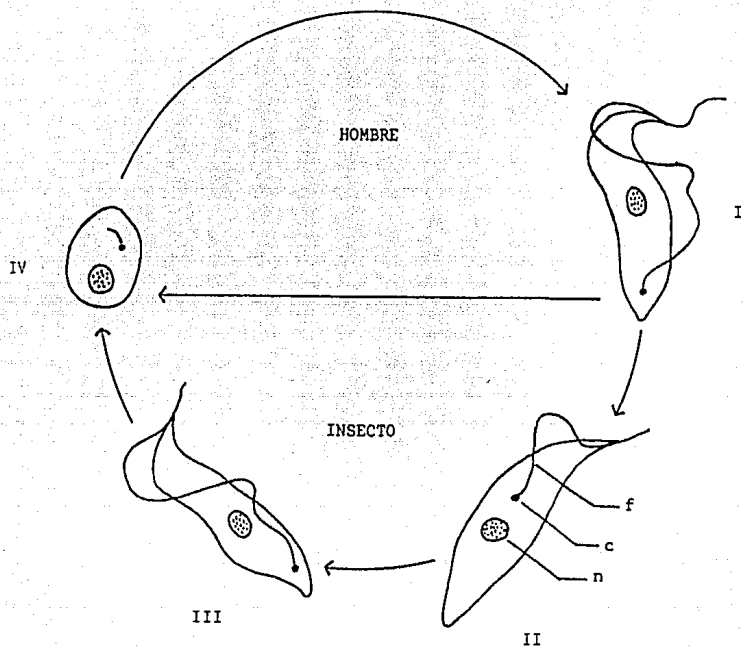


Figura 1. Ciclo de vida de *Trypanosoma cruzi*. I) Tripomastigote. II) Epimastigote. III) Tripomastigote metacíclico. IV) Amastigote. Se señala el cinetoplasto (c), el núcleo (n) y el flagelo (f).

cuales son arrojados en las heces del insecto, en el momento en el que éste repite una ingesta sanguínea de un vertebrado. Los tripomastigotes metacíclicos pueden penetrar al mamífero por heridas de la piel o por -- membranas mucosas. Una vez en el hospedero vertebrado, los tripomastigotes penetran en sus células y se transforman en amastigotes, los cuales se dividen repetidamente por fisión binaria, dando lugar a tripomastigotes. Estos tripomastigotes son liberados al espacio intercelular, pudiendo infectar nuevas células o alcanzar el torrente sanguíneo (5).

El interés internacional mayoritario de investigación se ha enfocado a estudiar la membrana de T. cruzi como la interfase de la relación hospedero-parásito. Nuestro interés de investigación en este organismo es básico, como ilustra el presente trabajo sobre el cistrón de RNA ribosomal.

Aspectos Particulares.

Los ribosomas son partículas ribonucleoproteínicas, formadas por 2 subunidades, en las que se lleva a cabo la síntesis de proteínas. En -- eucariontes, la subunidad menor está formada por la molécula de RNA ribosomal tipo 18S y 33 proteínas diferentes, mientras que la subunidad mayor está constituida por 3 moléculas diferentes de RNA ribosomal (28S, 5.8S y 5S) unidas a más de 40 proteínas.

En procariontes, los ribosomas son más pequeños y contienen menos componentes. En éstos, la subunidad menor está formada por una molécula de RNA ribosomal 16S y 21 proteínas, mientras que la subunidad mayor está integrada por 34 proteínas y 2 moléculas de RNA ribosomal, la 23S y -- la 5S.

En los eucariontes también hay ribosomas en organelos como la mitocondria y el cloroplasto, pero éstos son menores que los ribosomas citoplasmáticos.

Los genes que codifican para las moléculas citoplasmáticas de RNA ribosomal 18S, 5.8S y 28S, en eucariontes, se transcriben como una unidad (figura 2A). Un organismo puede presentar, por genoma haploide, más de 200 copias de esta unidad de transcripción, también denominada cistrón - de RNA ribosomal, las cuales se encuentran generalmente agrupadas en sucesiones lineales, una después de la otra, en uno ó varios sitios del -- cromosoma.

El cistrón de RNA ribosomal es transcrito por la RNA polimerasa I, generando un transcrito primario grande (40-45S), que luego es procesado para originar las moléculas de RNA ribosomal maduras. Tanto la transcripción como el procesamiento se llevan a cabo en el nucleolo.

Los genes que codifican para el RNA ribosomal 5S se localizan, - generalmente, en otros loci, y se transcriben independientemente por la RNA polimerasa III.

En los procariontes, las 3 moléculas de RNA ribosomal que inte--gran los ribosomas (16S, 23S y 5S) forman parte de la unidad de transcrip--ción (figura 2B). En este caso también se genera un transcrito primario que es procesado para formar las moléculas maduras.

Por lo que respecta a T. cruzi, se ha encontrado que sus ribosomas citoplasmáticos están formados por 9 moléculas diferentes de RNA ribosomal (6), y no por 4 moléculas, como ocurre en la mayoría de los euca--riontes. En la subunidad ribosomal menor está presente sólo la molécula 18S, mientras que la subunidad mayor está formada por cantidades equimo-

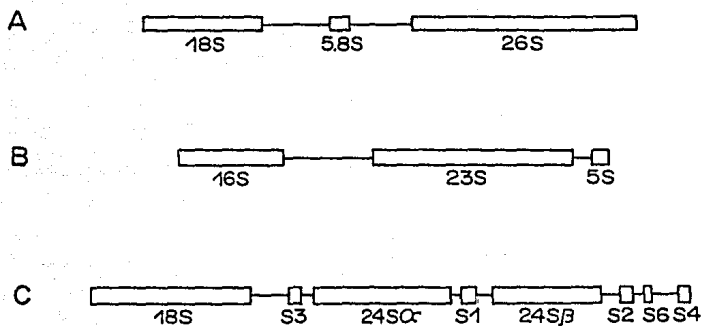


Figura 2. Representación esquemática de las unidades de transcripción de RNA ribosomal de Saccharomyces cerevisiae (A), E. coli (B) y Trypanosoma brucei (C).

lares de 2 moléculas grandes, 24S α y 24S β , y seis moléculas pequeñas, S1 a S6. La organización de los genes que codifican para las 8 moléculas de RNA ribosomal, dentro de la unidad de transcripción, es muy compleja, ya que éstos se encuentran separados por DNA espaciador, que se elimina durante el procesamiento del transcrito primario (figura 2C).

Esta organización atípica del DNA ribosomal está reportada también para otros miembros de la familia Trypanosomatidae, como Trypanosoma brucei (7) y Crithidia fasciculata (8). En estos organismos se han realizado análisis de secuencia de las moléculas S3 y S5, y se ha demostrado su correspondencia con las moléculas 5.8S y 5S, respectivamente, de otros eucariontes (8). Además, se ha encontrado que la secuencia de las moléculas S2, S6 y S4 es análoga a la secuencia del dominio VII de la molécula ribosomal 28S de otros organismos eucariontes (9).

En el laboratorio del Dr. Roberto Hernández se han aislado clones genómicas (10), caracterizadas por hibridación con las diferentes moléculas de RNA ribosomal, que abarcan la mayor parte del cistron ribosomal de T. cruzi. Sin embargo, la región clonada no contiene el extremo 3' de la unidad de transcripción. Por otro lado, datos de mapeo genómico indican que la región codificadora para el RNA S4 se encuentra hacia el extremo 3' de la secuencia clonada (figura 3).

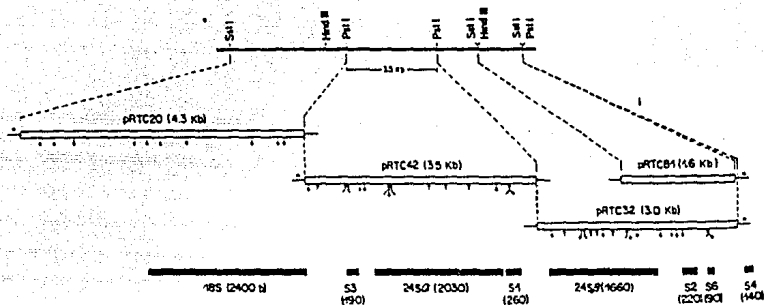


Figura 3. Mapa del cistron de RNA ribosomal de *T. cruzi*. La línea superior representa DNA genómico, mientras que las barras blancas indican insertos genómicos clonados. La posición de las moléculas maduras de RNA se señala en la parte inferior.

OBJETIVO

Dado el interés de aislar (clonar) el extremo 3' de la unidad de transcripción de RNA ribosomal de T. cruzi, el presente trabajo tiene por objetivo ubicar sitios de restricción en el cromosoma de T. cruzi, que permitan realizar una clonación dirigida, para aislar fragmentos genómicos que incluyan la región codificadora del RNA S4.

MATERIALES Y METODOS

1. Cultivo y extracción de ácidos nucleicos de Trypanosoma cruzi.1.1 Cultivos Celulares.

La cepa de T. cruzi utilizada fue aislada en La Cruz, Jalisco - por el grupo del Dr. Jorge Tay, Departamento de Ecología Humana, Facultad de Medicina, U.N.A.M. Los cultivos se realizaron en medio de infusión de hígado y triptosa, suplementado con suero bovino fetal - al 10%; y se mantuvieron en agitación a 28°C (11).

1.2 Extracción de DNA genómico.

Los cultivos celulares fueron cosechados en la fase media del - crecimiento logarítmico, por centrifugación a 10,000 g, durante 10 - min. a 4°C (temperatura mantenida a lo largo de toda la purificación). Posteriormente las células fueron lavadas dos veces en: Tris-HCl -- 20 mM (pH 7.8), KCl 100 mM, CaCl₂ 2 mM y MgCl₂ 5 mM (solución N) y - guardados como precipitado a -70°C. Este material fue descongelado a 4°C, para resuspenderlo en solución N a una densidad de 10⁹ célu-- las por ml. Las células fueron lisadas con NP40 al 1% e inmediata-- mente centrifugadas a 15000 g durante 20 min. a 4°C. El precipitado fue resuspendido en un mismo volumen de NaCl 150 mM, citrato de sodio 15 mM y EDTA 10 mM. Posteriormente se adicionó sarkosil para obtener una concentración final de 1% y se incubó a 37°C por 15 min. La in-- cubación se continuó por 2 h más con pronasa de Sigma Chem. (pre-- incubada 1 h a 37°C) a una concentración de 1 mg/ml. Después de adi-- cionar perclorato de sodio a 1 M final, los ácidos nucleicos se ex--

material se centrifugó primero a 10,000 g por 10 min., después a -- 20,000 g por 10 min. y por último 2 hrs. a 120,000 g. El material ribosomal recogido del último precipitado, fue desproteínizado con 2 ml. de LiCl 2 M, urea 4 M, Tris-HCl 20 mM (pH7.0) y heparina 4 - mg/ml. Después de centrifugar a 20,000 g por 20 min., el precipitado se resuspendió en aproximadamente 1 ml. de agua tratada con - dietil pirocarbonato y fue leído en el espectrofotómetro a 280, 260 y 230 nm.

La purificación de la molécula ribosomal S4 se llevó a cabo - mediante electroforesis del material ribosomal. Tal electroforesis se llevó a cabo en geles de acrilamida al 3.5% y bis acrilamida al 0.15% en TBE/urea 7 M. La muestra se disolvió en TBE/urea 7M/glicerol 20%, y fue calentada a 60°C 3 min. antes de su aplicación. Los geles, de 1.5 mm de espesor, fueron recorridos durante toda la noche a 20 V. La electroforesis se llevó a cabo a 40 V durante 8 hrs. a temperatura ambiente. El material se visualizó mediante la transiluminación de los geles, previamente teñidos con bromuro de etidio 3 ug/ml, con luz ultravioleta de onda corta. La banda de la molécula de RNA S4 fue eluida en SDS 0.3%, NaCl 0.14 M y acetato de sodio 0.05 M (pH 5.1).

2. Construcción, marcaje e identificación de moléculas recombinantes.

2.1 Definición del inserto pRTC81

En el presente trabajo constantemente se hará referencia al inserto pRTC81, por lo que a continuación se presentan sus principales características. Está clonado en el sitio Sst I de pUC18, siendo su

tamaño de 1.6 Kb. Presenta parte de la secuencia codificadora de la molécula 24S de RNA ribosomal, donde se ubica un sitio de Hind III, así como los genes completos de las moléculas S2 y S6 (figura 3).

2.2 Aislamiento y marcaje del inserto pRTC81.

La clona pRTC81 fue digerida con Sst I, para separar el inserto genómico, del vector pUC18. Posteriormente esta digestión se corrió en un gel de agarosa al 0.8%, y usando una lámpara manual de luz ultravioleta de longitud de onda larga se localizó la banda de DNA correspondiente al inserto pRTC81; con una espátula se cortó el fragmento del gel que contenía dicha banda de DNA. Para recuperar el DNA, del fragmento del gel, se realizó una electroelución en bolsas de diálisis, usando amortiguador TBE 1X, de acuerdo al método descrito por Maniatis (13). Posteriormente el DNA se purificó por adsorción a una columna de BND-celulosa (13).

El inserto pRTC81 fue marcado radioactivamente con ^{32}P α dATP -- por medio de la técnica de corte y copiado del molde ("Nick Translation") (14). La DNA polimerasa I de E. coli agrega nucleótidos al extremo 3'-hidroxilo que se genera cuando es cortada una hebra de una molécula de DNA de cadena doble; además, esta enzima puede remover nucleótidos del lado 5' del corte, en virtud de su actividad exonucleolítica de 5' a 3'.

La eliminación de nucleótidos del extremo 5', seguida de la adición de nucleótidos en el extremo 3' da por resultado que el corte -- se mueva o traslade a lo largo del DNA. Si se reemplazan los nucleó-

tidos preexistentes, por nucleótidos radioactivos, es posible preparar moléculas de DNA marcadas. Las reacciones de "nick translation" se llevaron a cabo con 0.2 ug del inserto pR1031, 6 ul de amortiguador "nick-translation" con β -mercaptoetanol 56.8 mM (200 mM Tris pH 7.5, 20 mM $MgCl_2$, 20 ug/ml albúmina sérica bovina), 1 ul de mezcla 1 mM de desoxinucleótidos trifosfatados, 5 ul de dilución de DNasa (0.075 ug/ml), 1.5 ul de ^{32}P α dATP (15 uCi) y 5 unidades de DNA polimerasa I de E. coli, en un volumen de 25 ul. Esta mezcla fue incubada por -- 1.5 h a 14°C. La reacción se detuvo con 2 ul de SDS 20% y 20 ul de EDTA 0.2 M. La separación del DNA marcado radioactivamente, de los desoxinucleótidos no incorporados, se llevó a cabo en una columna de cromatografía de exclusión molecular, con sephadex G-50 (14). El -- DNA marcado fue recogido en el volumen de exclusión, en un tubo eppen dorf. La radioactividad específica obtenida por este procedimiento, registrada en un contador de centelleo líquido, fue de 10^7 cpm/ug de DNA.

2.3 Marcaje de la molécula de rRNA S4

El RNA fue fosforilado in vitro, de acuerdo al método de Maizels (15), mediante la enzima cinasa del fago T4 que transfiere el fosfato gamma del ATP (en este caso ^{32}P) a los extremos 5' hidroxilos del -- RNA. Con el objeto de generar extremos 5'-OH, el RNA fue desfosforilado mediante la enzima fosfatasa alcalina en Tris-HCl 1 M (pH 8.4), - durante 1.5 h a 37°C, y posteriormente extraído con fenol-cloroformo (1:1). La reacción de fosforilación se llevó a cabo con 0.2 ug de -

RNA, 10 unidades de cinasa y 200 uCi/³²Pγ/ATP en 50 ul de Tris-HCl 25 mM (pH 9.3), DTT 10 mM, MgCl₂ 10 mM y espermina 10 mM. La reacción fue detenida en acetato de amonio 1 M y el RNA fue recogido en el volumen de exclusión de una columna de sephadex G-50, equilibrada con Tris-HCl 10 mM (pH 7.0), NaCl 100 mM y EDTA 10 mM. La radioactividad específica obtenida por este procedimiento y registrada en un contador de centelleo líquido fue de 10⁷ cpm/ug de RNA.

2.4 Ligaciones.

Se trabajó con el plásmido pUC18, que es un vehículo de clonación de 2686 pb que presenta un enlazador múltiple (polilinker) que contiene sitios de corte para 13 diferentes enzimas de restricción - (figura 4). Este plásmido porta el gen de β -lactamasa, que confiere resistencia a ampicilina (16), lo que permite la selección positiva de las células transformadas.

El DNA genómico por ligar fue digerido y extraído con fenol y -cloroformo. Las reacciones de ligación se llevaron a cabo, generalmente, con 0.1 ug de pUC18, 0.08-0.24 ug de DNA genómico, 10 unidades de ligasa y ATP 0.5 mM, en 20 ul de Tris-HCl 46 mM, MgCl₂ 6.6 mM y - DTT 10 mM.

2.5 Preparación y Transformación de células competentes de la cepa MC1061 de E. coli.

Se dejó crecer toda la noche un cultivo de la cepa MC1061 de E. coli, a 37°C. Posteriormente se realizó una dilución 1:80 de este - cultivo y se dejó crecer hasta fase logarítmica (DO₅₅₀=0.2), a 37°C

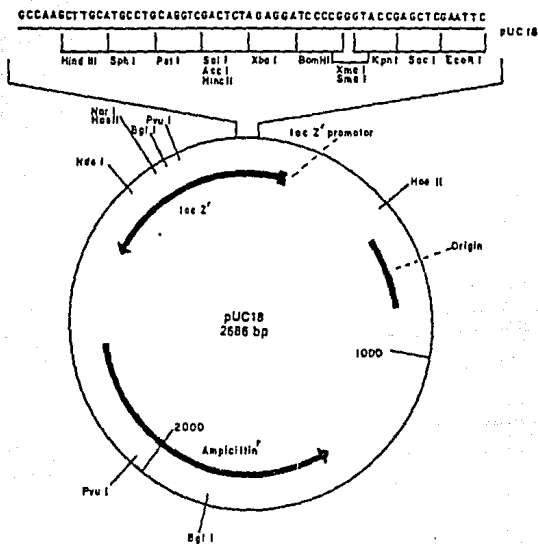


Figura 4. Mapa de restricción del plásmido pUC18. El sitio de corte de Sac I presente en el enlazador múltiple es equivalente al sitio de corte de Sst I.

con agitación fuerte. El cultivo fue centrifugado a 6,000 rpm por 10 min. a 4°C, y las células fueron resuspendidas, en la mitad del volumen inicial, en CaCl_2 100 mM. Se dejó reposar 30 min. a 4°C, y se volvió a centrifugar, bajo las mismas condiciones anteriores. Las células fueron resuspendidas, en 1/10 del volumen inicial, en CaCl_2 100 mM y se guardaron a 4°C. Posteriormente se tomaron 200 ul de células en un tubo eppendorf y se le agregaron 10-20 ng de DNA. Se dejó en hielo por 30 min. y se calentó a 42°C por 90 segundos. Después se agregaron 1.2 ml de medio Luria a cada tubo y se incubaron a 37°C por 50 min. Posteriormente fueron centrifugados en la microcentrifuga, a 13,000 rpm por 5 min., y las células fueron resuspendidas en 150 ul de medio Luria. Se sembraron 30-100 ul en cajas con medio Luria con ampicilina (a una concentración de 50 ug/ml), usando asa triangular. Las eficiencias de transformación fueron calculadas con pUC18 superenrollado como control.

2.6 Hibridación in situ.

La hibridación in situ de colonias transformadas, se efectuó de acuerdo al método descrito por Rowekamp y Firtel (17). A continuación se menciona brevemente este método.

Las colonias fueron transferidas a filtros de papel whatman 540. Posteriormente los filtros se colocaron por 8 min. en solución desnaturalizadora (NaOH 2%, NaCl 8.7%), 10 min. en solución neutralizadora (NaCl 8.7%, Tris 6.6%, llevada a pH 7) y 15 min. en una mezcla de etanol absoluto y LiCl 8 M (9:1). Después, los filtros se dejaron secar a temperatura ambiente y se prehibridaron por 3 horas, en un volumen de 15 ml a 37°C, y se hibridaron por 18-24 horas, en 8 ml de

y glucosa 0.05 M; posteriormente se mantuvo 30 min. en hielo y se le agregaron 200 ul de SDS 1% y NaOH 0.2 N. Se mantuvo en hielo otros 5 min., se agregaron 150 ul de acetato de sodio 3M (pH 4.8) y se mantuvo en hielo por 25 min. más. Después se centrifugó 5 min. a 13,000 rpm y el sobrenadante fue transferido a un nuevo tubo eppendorf, -- agregando 1 ml de etanol y manteniendo a -20°C por 30 min. Posteriormente se centrifugó 10 min., a 13,000 rpm, y el botón fue resuspendido en 200 ul de 6,6,0.2 (6mM Tris-HCl pH 7.4, 6 mM NaCl, 0.2 mM EDTA), agregando después 550 ul de etanol absoluto y 20 ul de LiCl 8 M. Se mantuvo a -20°C por 30 min. y se centrifugó 10 min., a 13,000 rpm. Finalmente el botón fue resuspendido en 70 ul de 6,6,0.2. Se conservó a -20°C .

2.9 Purificación de plásmido por gradiente de cloruro de cesio y -- bromuro de etidio.

Esta técnica se llevó a cabo de acuerdo al método descrito por Maniatis (13), con algunas modificaciones.

La primera parte de esta técnica fue realizada en forma similar a la técnica de "minipreps", pero a gran escala, partiendo de un cultivo celular de 200 ml. Después de la última precipitación, - el material fue sometido a un gradiente de cloruro de cesio, para - lo cual se hizo lo siguiente: el precipitado fue resuspendido en 9 ml de 6,6,0.2 y dividido en partes iguales en 2 tubos. En cada tubo se agregaron 6.25 gr de CsCl_2 y se agitó suavemente, hasta que se -- disolvió totalmente el CsCl_2 . Posteriormente se agregaron 1.5 - ml de una mezcla de Tris 0.45 M (pH 8.0), Tris 0.41 M (pH 9.4) y - EDTA 0.08 M (pH 7.2), así como 0.25 ml de bromuro de etidio - (10 mg/ml) y 0.25 ml de sarkosil al 10%. Toda esta mezcla fue

EDTA 2 mM, SDS 0.2%, fosfatos de sodio 120 mM (pH 7.0), SSC 2X y solución Denhardtts 4X (Ficoll 400 0.002%, PVP-40 0.002% y albúmina sérica bovina 0.02%), por 3 h. Posteriormente los filtros se hibridaron con $3-5 \times 10^6$ cpm de DNA marcado con ^{32}P , desnaturalizado por calor, en 8 ml de una solución preparada bajo las mismas condiciones que la solución de prehibridación. Los filtros fueron lavados en 3 ciclos, que incluyeron: enjuague en SSC 0.2X e incubación en SSC -- 0.2X y SDS 0.1% a 37°C, con agitación constante, durante 1 hora. La autorradiografía se llevó a cabo sobre una placa de rayos X (X Omatt RP Kodak) en presencia de una pantalla intensificadora durante 1-3 días a -70°C.

En los casos en los que se usó RNA marcado radioactivamente como sonda, se siguió prácticamente el mismo protocolo; la única diferencia fue que en la solución de hibridación la concentración final de SSC fue 1X.

3.2 Secuenciación de DNA

La secuenciación nucleotídica se realizó por el método de polimerización sobre moldes de cadena sencilla (19). En este método se lleva a cabo la síntesis de una cadena de DNA por una DNA polimerasa (secuenasa) in vitro, usando un molde de cadena sencilla. La síntesis se inicia sólo en el sitio en el que un oligonucleótido (el cebador) se une al molde. La reacción de síntesis finaliza por la incorporación de un nucleótido análogo, el cual bloquea la -- elongación del DNA. Estos nucleótidos análogos son los 2',3'-dideox-- inucleósidos 5'-trifosfatados (ddNTPs), los cuales carecen del gru-

po 3'-OH necesario para la elongación de la cadena de DNA. Cuando se hacen mezclas apropiadas de los dNTPs y uno de los 4 ddNTPs, la polimerización se detiene, en una fracción de la población de cadenas, en cada sitio donde el ddNTP pueda ser incorporado. Si se preparan 4 reacciones separadas, cada una con un ddNTP diferente, se tiene la capacidad de introducir bloques en toda la secuencia.

En la síntesis también se incluye un nucleótido marcado radioactivamente, de manera que las cadenas marcadas, de varios tamaños, pueden ser visualizadas en una autorradiografía, después de ser separadas, base por base, en electroforesis.

El DNA de cadena sencilla, requerido para secuenciar por este método, puede ser preparado a partir de los vehículos de clonación M13mp18 y M13mp19, los cuales son derivados del DNA del fago M13, que presentan un enlazador múltiple (polilinker) que contiene sitios de corte para 13 endonucleasas diferentes. Este polilinker es igual al de pUC18 (figura 4). M13mp18 y M13mp19 difieren únicamente en la dirección del enlazador múltiple.

El DNA a secuenciar fue ligado en M13mp18 y en M13mp19, bajo condiciones iguales a las señaladas en las ligaciones con pUC18.

3.21 Preparación y transformación de células competentes de la cepa JM101 de E. coli.

M13mp18 y M13mp19 presentan insertado un fragmento del operón de lactosa de *E. coli*, que incluye la región regulatoria y una parte del gen que codifica para la β -galactosidasa. Por otra parte, la cepa JM101 posee un gen incompleto de la misma proteína. Al transformar células JM101 con M13mp18 (o M13mp19) la porción del gen de la pro--

teína en el vehículo, es capaz de complementar el gen incompleto presente en la célula. Esta complementación produce β -galactosidasa activa, que da lugar a placas azules cuando el fago y las células crecen en presencia del inductor isopropil-tiogalactosidasa (IPTG) y del sustrato cromogénico 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -galactosido (Xgal). Si el vehículo de clonación contiene un inserto, no se produce β -galactosidasa (el polilinker está insertado en la porción amino terminal del gen de esta proteína), originándose placas incoloras (14).

La técnica usada para preparar células competentes y transformar es la siguiente: Una asada de células *E. coli* de la cepa JM101 fue inoculada en 50 ml de medio líquido YT (peptona 0.8%, extracto de levadura 0.8% y NaCl 0.5%), y se dejó crecer a 37°C, por 4 horas. Posteriormente el cultivo se transfirió a dos tubos y se mantuvo en hielo por 30 min. y se centrifugó por 10 min. a 6 Krpm. El botón de cada tubo, se resuspendió en 12.5 ml de CaCl_2 100 mM. Se dejó en hielo por 1 hora y se volvió a centrifugar, bajo las mismas condiciones anteriores. Ahora el botón fue resuspendido en 2.5 ml de CaCl_2 100 mM. Las células se guardaron a 4°C. Posteriormente fueron tomados 0.3 ml de estas células competentes y se les añadieron 4 μ l de la mezcla de ligación. Se mantuvieron a 4°C por 40 min. y se les dió un choque térmico a 42°C por 2 min. Después fueron agregados 0.01 ml de IPTG 100 mM, 0.1 ml de Xgal al 2% y 0.2 ml de células JM101 frescas (crecidas por 4 horas). Además se agregaron 3 ml de agar suave (que se prepara igual que el medio YT, pero con agar al 0.6%). Toda esta -

mezcla se agregó sobre cajas con medio YT (con agar al 1.5%) y se -- distribuyó homogéneamente. Las cajas se dejaron a 37°C durante toda la noche.

3.22 Preparación de DNA de cadena sencilla.

Fue inoculada una colonia de la cepa JM101 en medio YT, y se dejó creciendo toda la noche a 37°C. Al día siguiente se tomaron 0.5 ml del cultivo celular y se le agregaron 50 ml de medio YT. Se distribuyó en alícuotas de 3 ml en tubos de ensayo y en cada uno se inoculó una placa incolora. Se incubó por 5 horas a 37°C, con agitación fuerte y se transfirió a tubos eppendorf. El cultivo se centrifugó por 5 min. Se tomó 1 ml del sobrenadante y se agregaron 0.2 ml de - PEG 600 al 20% y NaCl 2.5 M. Se conservó a 4°C por 15 min. y se centrifugó por 10 min. El sobrenadante fue desechado y el botón fue resuspendido en 100 ul de TE (Tris 10 mM pH 8.0, EDTA 1 mM). Posteriormente se agregaron 50 ul de fenol saturado (2 volúmenes de fenol, un volumen de TE, 1/10 de volumen de Tris 1 M pH 9.5) y se mezcló con - vortex por 30 seg. Se dejaron los tubos 20 min. a temp. amb., y se centrifugaron por 5 min. Se tomó el sobrenadante acuoso. De manera similar, se llevó a cabo una extracción con cloroformo y otra más con éter. Finalmente, a la fase acuosa se le agregaron 10 ul de acetato de sodio 3M y 250 ul de etanol, y se dejó a -20°C por 1 hora. Se -- centrifugó por 10 min. y el botón se resuspendió en 20 ul de TE. Se conservó a -20°C.

3.23 Reacciones de Secuenciación.

La secuenciación se llevó a cabo utilizando el equipo de secuenasa (United States Corporation). Se tomaron 7 ul de DNA de cadena senci

lla (1.0 ug) en un tubo eppendorf y se le agregó 1 ul de cebador --- (0.5 pmoles) y 2ul de amortiguador de secuencia (Tris-HCl 40 mM pH 7.5, - MgCl₂ 20 mM, NaCl 50 mM). Se calentó a 65°C por 2 min. y se dejó en friar lentamente a temperatura ambiente. Una vez que la temperatura fue menor a 35°C la unión entre el molde y el cebador se completó.

Posteriormente se preparó la mezcla de marcaje: a los 10 ul de la reacción de unión entre el molde y el cebador se le agregaron 2 ul de mezcla de dNTP (dGTP, dCTP y dTTP, 1.5 uM), 1 ul de DTT 0.1 M, 0.6 ul de α ³²P dATP (5 uCi) y 2 ul de secuenasa (diluida 1:10 en TE). Esta mezcla se incubó a temperatura ambiente por 10 min. Después fue preparada la reacción de término, para lo cual se tomaron - 2.5 ul de cada uno de los 4 ddNTP 8 uM, y se colocaron en 4 tubos -- eppendorf (en cada uno un ddNTP diferente). Se precalentaron a 37°C por 3 min. y a cada tubo se le agregaron 3.5 ul de la reacción de -- marcaje, y se dejaron a 37°C por 5 min. más. Las reacciones se detu vieron con 4 ul de formamida al 95%, EDTA 20 mM, azul de bromofenol 0.05% y xileno-cianol 0.05%.

3.24 Preparación del gel de poliacrilamida y electroforesis.

El gel para secuenciar fue de poliacrilamida al 6%. Para preparar un gel de 70 ml se agregaron. 10.5 ml de mezcla de acrilamida 38%- bisacrilamida 2%, 35 gr de urea, 14 ml de TBE 5 X y 18.9 ml de agua. Además se le adicionaron 0.5 ml de persulfato de amonio al 10% y 18.6 ul de TEMED. El buffer de corrida fue TBE 1 X. El gel se precorrió por 1 hora, a 1,400-2,000 volts, mientras se realizaban las reacciones. Finalizada la precorrida se cargaron 3 ul de cada muestra. -- Justo antes de ser cargadas en el gel, las muestras se calentaron por

2 min. a 80°C. Una vez que el azul de bromofenol llegó al límite del gel se cargaron 3 ul más de cada muestra, en los pozos contiguos. Finalizada la corrida el gel se colocó en una solución de ácido acético al 10% y metanol al 12%, por 1 hora, para remover la urea, y posteriormente se dejó toda la noche a 80°C. La autorradiografía se llevó a cabo sobre una placa de rayos X durante 1-2 días.

3.3 Secuenciación de RNA

La secuenciación de RNA se realizó por el método de las digestiones parciales con ribonucleasas (20, 21), usando el equipo de secuenciación de Bethesda Research Laboratories. Las ribonucleasas utilizadas fueron T1, U2, Phy M, B. cereus y CL3, que cortan en G, A, A + U, C + U, respectivamente.

Inicialmente, la molécula de RNA ribosomal S4 fue desfosforilada y marcada en su extremo 5' con $\gamma^{32}\text{P-ATP}$ (ver sección 2.3). Los nucleótidos no incorporados fueron eliminados por medio de precipitaciones con etanol y acetato de sodio, y mediante electroforesis del material marcado en un gel de acrilamida al 3.5%, bisacrilamida 0.15% y urea 7M. La banda correspondiente al RNA S4 fue eluida en SDS 0.3%, NaCl 0.14 M y acetato de sodio 0.05 M (pH 5.1), durante una noche a 37°C. El material eluido fue precipitado con etanol y acetato de sodio, y finalmente resuspendido en agua tratada con dietil-pirocarbonato, de manera que en 3 ul se tuvieron 5×10^5 dpm.

Posteriormente se prepararon las muestras, agregando en tubos eppendorf lo que a continuación se señala para cada ribonucleasa:

Enzima	RNA Marcado	Agua	Sol. A	Sol. B	Sol. C	Sol. D	tRNA
Phy M y T1	3 ul	-	2 ul	-	-	14 ul	1 ul
U2	3 ul	-	-	2 ul	-	14 ul	1 ul
CL 3	6 ul	11 ul	-	-	2 ul	-	1 ul
<u>B. cereus</u>	6 ul	11 ul	2 ul	-	-	-	1 ul

Solución A: 0.25 M citrato de sodio pH 5.0

Solución B: 0.25 M citrato de sodio pH 3.5

Solución C: 0.1 M NaPO_4 pH 6.5, 0.1M EDTA

Solución D: 10 M urea, 1.5 mM EDTA, 0.05% de xileno-cianol y azul de -
bromofenol.

tRNA: 5 mg/ml.

Realizadas las mezclas anteriores, se tomaron 4 ul de cada una y se colocaron en otros tubos eppendorf, adicionándose en éstos 1 ul (2 unidades) de su RNasa correspondiente. Los tubos en los que se adicionó T1, Phy M, U2 y B. cereus se incubaron a 55°C por 15 minutos, y el tubo con CL3 se incubó a 37°C por 15 min. Para detener las reacciones, todas las digestiones se enfriaron en hielo seco. A las digestiones con CL3 y B. cereus se les adicionaron 5 ul de solución D justo antes de ser colocadas en el hielo seco. De esta forma, las muestras quedaron listas para correrse en un gel de secuencia.

El gel para secuenciar fue de acrilamida al 20%. Para preparar un gel de 70 ml., se agregaron 14 ml de TBE 5X, 13.3 gr de acrilamida, 0.71 gr de bisacrilamida, 35 gr de urea, 100 mg de persulfato de amonio y 25 ul de TEMED. El gel se recorrió a 25 watts por aproximadamente 2 hrs. Finalizada la recorrida, se cargaron 5 ul de cada muestra. Antes de ser cargadas en el gel, las muestras se calentaron por 30 seg. a 90°C. La corrida se realizó a 50 watts, hasta que el azul de bromofenol migró 15 cm. La autorradiografía se llevó a cabo sobre una placa de rayos X, en presencia de una pantalla intensificadora, durante una noche.

R E S U L T A D O S

Secuenciación de la región 3' del inserto genómico pRTC81

Datos obtenidos por el Dr. Roberto Hernández indican que se tienen clonados, en el inserto pRTC81, por lo menos 300 pb "corriente - abajo" del extremo 3' de la secuencia codificadora de S6 (figura 3). Por otra parte, se encuentra reportado que en *T. brucei* la distancia que hay entre los genes que codifican para las moléculas S6 y S4 es de 328 pb (9), y que en *C. fasciculata* esta misma distancia es de 247 pb (8). Por esto, no se descartaba la posibilidad de que en el inserto pRTC81 estuvieran presentes algunos nucleótidos codificadores de la molécula S4, no detectables por las técnicas de hibridación -- utilizadas. Esta posibilidad fue analizada experimentalmente, secuenciando el extremo 3' del inserto pRTC81.

El fragmento Sau 3A - Sst I (320 pb) de pRTC81 (figura 15) se subclonó en los sitios Bam HI y Sst I de los derivados fágicos M13 - mp18 y M13mp19, y se realizó el análisis de la secuencia nucleotídica en moldes de cadena sencilla (figura 5). Al analizar la secuencia, comparando con las secuencias reportadas para *T. brucei* y *C. fasciculata*, se encontró que en el fragmento no se presentaron nucleótidos codificadores para la molécula de rRNA S4. La longitud del fragmento resultó ser de 349 pb, conteniendo 12 pb del gen de la molécula S6 y 337 pb del espaciador transcrito entre S6 y S4, lo cual indica que este espaciador es mayor en *T. cruzi* que en *T. brucei* y *C. fasciculata*.

Tc	GATCACAAGA	CATTTATTTT	TGAAACAAGA	GAAAAAATAA	40
Tb	TT.....	TC			
CfG	T.			
Tc	ATAGGCCAGT	GATAAATATA	TATATATACA	TAAACATGCA	80
	TATACTATGT	GTTGTTGTGT	GTTTGTGTGT	TGTGTTGTCT	120
	CTGCGCCATA	TATATTTATA	AGCACACCTC	TCTCGCATGC	160
	GTGTGTATGT	TGTTGTTGTT	GTTGTTGTGT	TGTGTCCGTT	200
	GTGTGTGTGT	GTGTTGTTGT	GTTGTTGTTG	TGTGTGTGTG	240
	TGTGTTTGTA	TGGACACACC	CACATTCCAC	ACTATATTAC	280
	ACACCATCAT	ACATCACATA	TATCACATAA	TATAAATAAT	320
	AACAATATTA	TATGTGTGCA	CTTGAGCTC		349

Figura 5. Secuencia nucleotídica del fragmento de 349 pb que constituye el extremo 3' del inserto genómico pRTC81, en *T. cruzi* (Tc). Los primeros 12 nucleótidos, que se indican en comparación con *T. brucei* (Tb) y con *C. fasciculata* (Cf), forman parte de la secuencia codificadora de la molécula de rNAr S6. Los 337 nucleótidos restantes constituyen parte del espaciador transcrito interno entre S6 y S4.

Ubicación genómica de sitios de restricción hacia el extremo 3' de la unidad de transcripción de RNAr

Se procedió a ubicar sitios de restricción hacia el extremo 3' del cistrón ribosomal para poder, posteriormente, aislar fragmentos de tal región que contuvieran el gen de la molécula de RNAr S4. Tal mapeo se llevó a cabo mediante experimentos tipo Southern, tomando - como base el sitio Hind III del inserto pRCS1 (figura 15). Para es- to, el DNA genómico de T. cruzi se digirió con las siguientes endonu- cleasas: Cla I, Bgl II, Eco RI, Bam HI, Hinc II, Xho I, Sal I y Hind III. Además se llevaron a cabo digestiones dobles, de cada una de - las enzimas mencionadas, junto con Hind III. La sonda utilizada co- rresponde al inserto pRCS1. Las figuras 6, 7 y 8 muestran las auto- radiografías obtenidas, y en la figura 15 se presenta el mapa de -- restricción construido.

Cabe señalar que entre las numerosas copias del cistrón ribo- somal se presenta heterogeneidad en secuencia en esta región. Así - tenemos, por ejemplo, que mientras la mayoría de las copias presentan un sitio de restricción de Hind III a 7.8 Kb o a 11.9 Kb del extremo 3' del inserto pRCS1, algunas copias de la unidad ribosomal presen- tan este sitio a 3.7 Kb (siendo éste un sitio poco frecuente) (figu- ra 6).

Por otra parte, fueron ubicados sitios de Sau 3A y de Hinf I, - usando como sonda el fragmento de 349 pb que constituye el extremo 3'

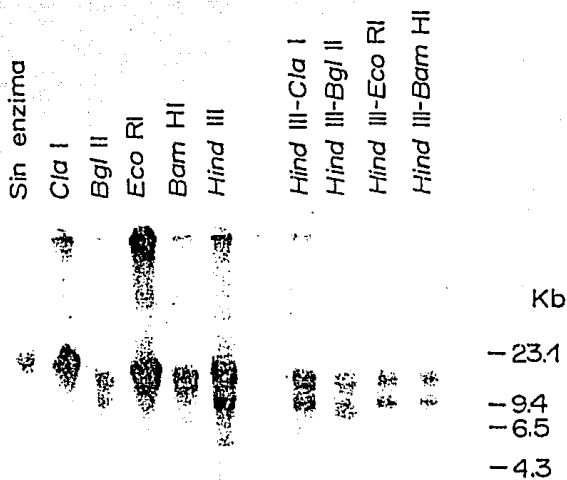


Figura 6. Autorradiografía de la hibridación tipo Southern de DNA genómico de *T. cruzi* digerido, hibridado con el inserto genómico pRTC81.

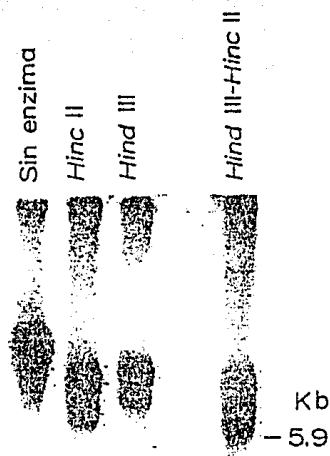


Figura 7. Autorradiografía de la hibridación tipo Southern del DNA genómico de *T. cruzi* digerido con Hinc II y Hind III, usando como sonda el inserto genómico pRTC81.



Figura 8. Autorradiografía de un experimento tipo Southern en el que DNA genómico de *T. cruzi* fue digerido con Xho I, Sal I y Hind III. La sonda utilizada corresponde al inserto pRTC81.

del inserto pRTC81 (figura 15). El sitio de Sau 3A más cercano al extremo 3' del inserto pRTC81 se encontró a aproximadamente 150 pb, y el sitio de Hinf I más cercano se localizó a aproximadamente 540 pb (figuras 9 y 15).

Se ubicó un sitio de restricción de Bgl II a 7.5 Kb del sitio de Hind III del inserto pRTC81. Se decidió utilizar estos dos sitios como puntos de clonación genómica para aislar el extremo 3' del cis-trón de RNA ribosomal (figura 15).

Construcción de la biblioteca genómica con Hind III y Bgl II e hibridación.

Se construyó una biblioteca genómica, insertando en pUC18 (Hind III y Bam HI) DNA genómico de T. cruzi digerido con Hind III y Bgl II. Cabe aclarar que los extremos generados por Bgl II son directamente insertables en el sitio de Bam HI del enlazador múltiple de -- pUC18. Se obtuvieron alrededor de 6,300 colonias transformantes. - Esta biblioteca se hibridó in situ con el inserto pRTC81 como sonda, y se aislaron dos colonias positivas. Con el objeto de purificar las colonias positivas, las zonas de las cajas que mostraron la señal de hibridación fueron resembradas a menor densidad e hibridadas de la misma manera con el inserto pRTC81.

De las dos colonias inicialmente identificadas, solo una conservó hibridación positiva en las resiembras subsiguientes (figura 10).

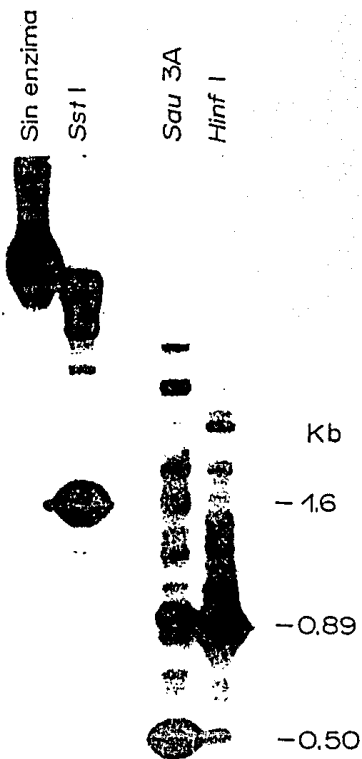


Figura 9. Autorradiografía de la hibridación tipo Southern de DNA genómico de *T. cruzi* digerido, e hibridado con el fragmento de 349 pb que constituye el extremo 3' del inserto pRTC81.

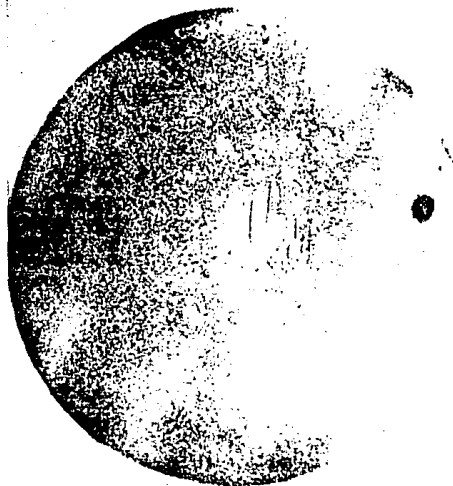


Figura 10. Colonia positiva de la biblioteca genómica con Hind III y Bgl II, usando como sonda el inserto pRTCE1.

La colonia positiva se caracterizó en términos de definir la naturaleza del inserto clonado. Para esto, fueron purificados, a pequeña escala, los plásmidos de la colonia positiva y de 10 colonias sembradas de ésta. Los plásmidos se digirieron con las endonucleasas Hind III y Eco RI, para separar el inserto, del vector. La figura 11 muestra el perfil electroforético de los plásmidos digeridos. Contrariamente a lo esperado (un inserto de 7.5 Kb), la colonia positiva - mostró el perfil de un plásmido recombinante con dos fragmentos, uno de 6.5 kb y otro de 900 pb. La interpretación de este perfil fue que el inserto contenía un sitio interno de Hind III o de Eco RI. Estos sitios no se encontraron previamente representados de forma interna al fragmento genómico mapeado. Entre los plásmidos de las colonias hijas de la colonia positiva se presentó un patrón de bandas heterogéneo; esto es, mientras en algunos se observó sólo un fragmento, en otros se apreciaron hasta cuatro fragmentos de restricción, adicionales al vehículo pUC18 linealizado. De forma adicional, la concentración relativa del inserto de 6.5 Kb, que hibridó con la sonda pRT-C81 (figura 12), se encontró francamente disminuida en las 10 colonias hijas (figura 11). Esta situación se ejemplifica de forma extrema en el perfil electroforético del plásmido aislado de la colonia 10, en donde prácticamente se observó sólo el vector (figura 11).

Esta situación nos indicó que el inserto genómico clonado presentaba una franca inestabilidad, hecha evidente tanto por la aparición heterogénea de sitios internos de restricción, como por la pérdida del DNA clonado.

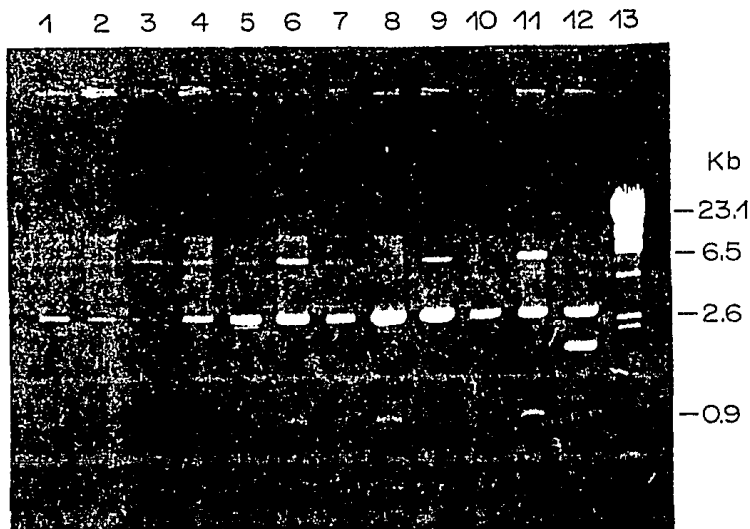


Figura 11. Perfil electroforético de plásmidos positivos de la biblioteca genómica con Hind III y Egl II, digeridos con Hind III y Eco RI. Carriles 1-10: plásmidos de colonias resembradas a partir de la colonia positiva. Carril 11: plásmido de la colonia positiva. Carril 12: clona genómica pRTC81 digerida con Sst I. Carril 13: DNA del fago λ digerido con Hind III.

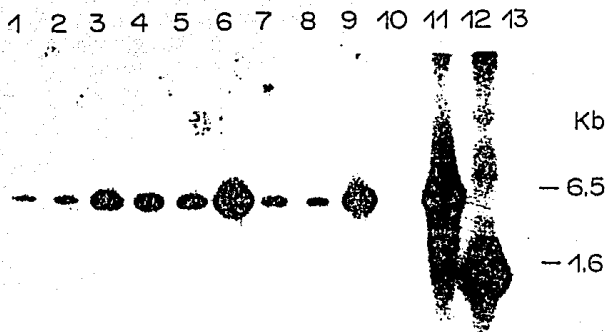


Figura 12. Hibridación tipo Southern de los plásmidos positivos de la biblioteca genómica con Hind III y Egl II. Las digestiones se presentan en el mismo orden que en la figura 11. La sonda utilizada corresponde al inserto genómico pRTC81.

Con intenciones de estabilizar el inserto clonado, DNA del plásmido recombinante de la colonia original y de dos colonias hijas se usó para transformar la cepa DH1 de *E. coli*, que carece del sistema de recombinación recA. Al analizar las digestiones de los plásmidos transformados en DH1 (figura 13), se observó que en todos los casos prácticamente se había perdido el inserto. En los plásmidos de la colonia original se presentó únicamente el fragmento de 900 pb. Esto significó que también en la cepa DH1 fue inestable el inserto ribosomal.

Considerando que parte de la inestabilidad pudiera deberse al tamaño del inserto y al tipo de secuencias que pudiera llevar esta región del cromosoma de *T. cruzi*, se decidió clonar fragmentos más pequeños.

Al analizar el mapa de restricción (figura 15), se consideró -- apropiado utilizar el sitio de Xho I y el de Hind III clonado en pRT C81, como puntos de clonación genómica, para aislar el extremo 3' de la unidad ribosomal. Los sitios de Xho I se ubicaron a 2.4 kb y a 2.85 kb del sitio de Hind III del inserto pRTC81; el sitio localizado a 2.85 kb es poco frecuente (figuras 8 y 15).

Construcción de la biblioteca genómica con Hind III y Xho I e hibridación.

Se construyó una biblioteca genómica, ligando en pUC18 (Hind III - Sal I) DNA genómico de *T. cruzi* digerido con Hind III y Xho I. Cabe señalar que Xho I y Sal I generan extremos compatibles. Se obtu-

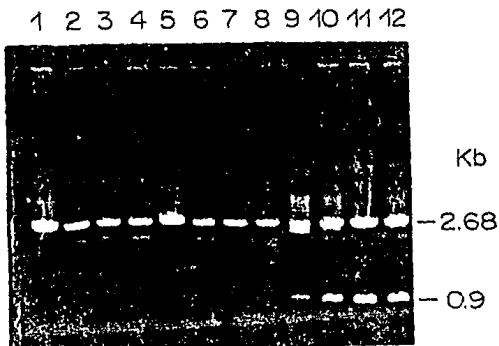


Figura 13. Perfil electroforético de plásmidos recombinantes aislados de la cepa DH1 de *E. coli*, digeridos con *Hind* III y *Eco* RI. Carriles 1-4: plásmidos aislados de células transformadas con el plásmido de la colonia 5 resembrada a partir de la colonia positiva. Carriles 5-8: plásmidos aislados de células transformadas con el plásmido de la colonia 9 resembrada a partir de la colonia positiva. Carriles 9-12: plásmidos aislados de células transformadas con el plásmido de la colonia positiva.

vieron alrededor de 15,000 colonias transformantes. La biblioteca - fue hibridada in situ con el inserto pRTC81, aislándose 16 colonias aparentemente positivas. Con el objeto de purificar las colonias po sitivas, las zonas de las cajas que mostraron la señal positiva fueron resebradas, a menor densidad, e hibridadas de la misma manera - con el inserto pRTC81.

De las 16 colonias inicialmente consideradas sólo una conservó la señal positiva en las subsiguientes resiembras.

Con el objeto de caracterizar el inserto clonado, fueron purifica dos, en pequeña escala, las plásmidos de la colonia positiva. Poste riormente los plásmidos fueron digeridos con Hind III y Eco RI, para separar el vector, del inserto genómico. Al correr las digestione s en un gel de agarosa se observó un inserto de 2.85 Kb.

De acuerdo a los datos del mapa genómico, este inserto de 2.85 Kb debería presentar un sitio de Sst I interno, que lo dividiría en un fragmento de 1.6 Kb, análogo al inserto pRTC81, y un fragmento de 1.25 Kb (figura 15). Por otra parte, el sitio de Sst I del "polilínker" de pUC18 flanquea el inserto ribosomal del mismo lado que el sitio de Eco RI. De esta manera, al digerir el plásmido recombinante con Hind III y Sst I no sólo se esperaba que se separaran el vector y el inserto, sino que a su vez, el inserto se separara de los fragmentos de 1.6 y 1.25 Kb.

Se procedió entonces a digerir los plásmidos con Hind III y Sst I (digestión doble y digestiones sencillas). La figura 14A muestra

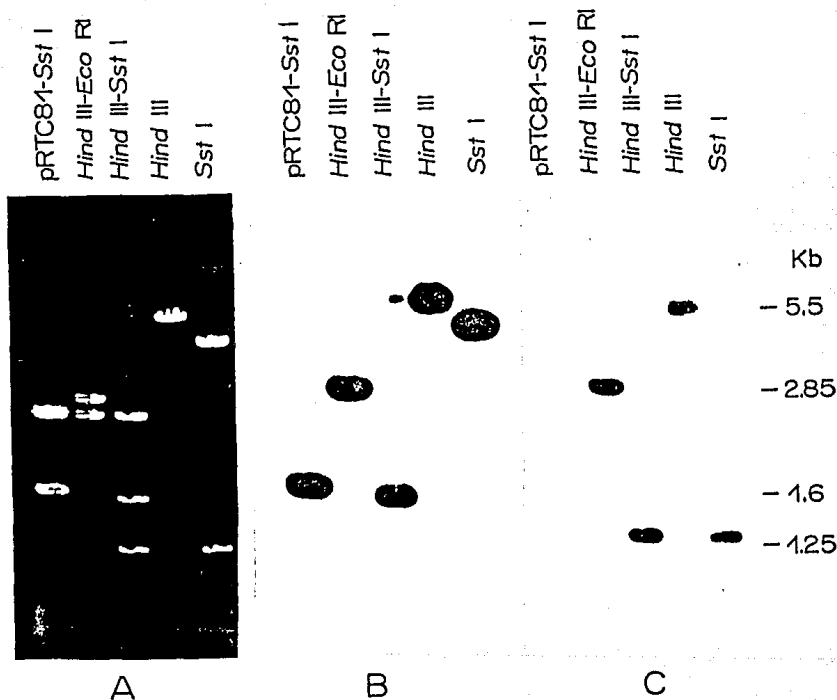


Figura 14. Análisis del DNA plasmídico de la colonia positiva de la biblioteca genómica con Hind III y Xho I: A) en gel de agarosa, B) hibridado con el inserto genómico pRTC81, y C) hibridado con la molécula S4 de RNAr.

el perfil electroforético de los plásmidos digeridos. Como se esperaba, al digerir con Hind III y Sst I se observaron las bandas de -- 1.6 Kb y de 1.25 Kb, además de pUC18 linearizado. Al digerir con -- Hind III se linearizó el plásmido, y al digerir con Sst I se separó el fragmento de 1.25 Kb del resto del plásmido recombinante. Mediante un análisis tipo Southern se determinó que el fragmento de 1.6 Kb presentaba hibridación con el inserto pRTC81 (figura 143). Posteriormente se llevó a cabo otro Southern, usando como sonda la molécula - S4 de RNAr, observándose señal positiva con el fragmento de 1.25 Kb (figura 14C). Esto nos indicó que sí fue clonada la región codificadora de la molécula S4.

Posteriormente se preparó el plásmido recombinante a gran escala, purificándolo por gradiente de cloruro de cesio y bromuro de etid. Esta clona genómica aislada fue denominada pRTC13 (figura 15).

Secuenciación de los extremos del fragmento de 1.25 Kb.

Con el objeto de determinar la posición del gen de la molécula de RNA ribosomal S4, dentro del fragmento de 1.25 Kb (figura 15), se procedió a secuenciar los extremos de dicho fragmento ribosomal.

El fragmento de 1.25 Kb (extremos Sst I y Bam HI) se subclonó - en los sitios Sst I y Bam HI de los vehículos de clonación M13mp18 y M13mp19, y se realizó el análisis de la secuencia nucleotídica sobre moldes de cadena sencilla. (figuras 16 y 17). Al analizar la secuencia, comparando con las secuencias de C. fasciculata y T. brucei, se encontró

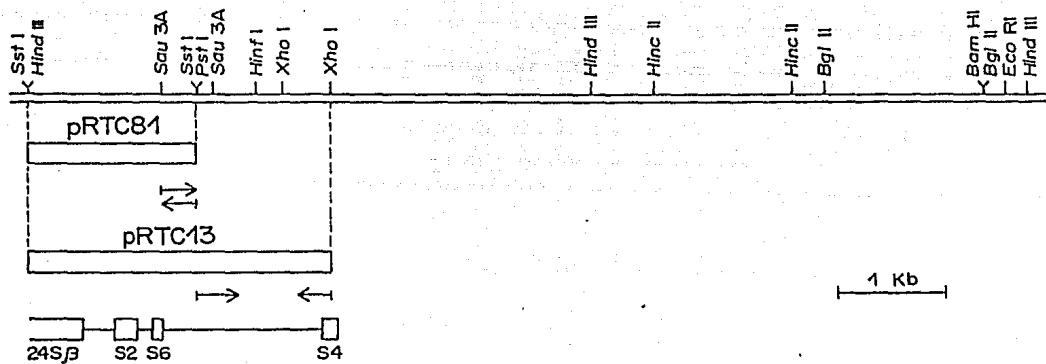


Figura 15. Mapa del extremo 3' del del cistron de RNA ribosomal de *T. cruzi*. La línea superior representa DNA genómico, señalándose los sitios de restricción mapeados; los sitios de restricción que se indican con línea discontinua son poco frecuentes. Se presenta el inserto genómico clonado, pRTC13, así como el inserto genómico pRTC81; las flechas indican las regiones secuenciadas. En la parte inferior se señala la posición de las moléculas de RNA ribosomal.

TcACTGAAGG	GCATCCAAAC	TCGGGGAGAA	GttGCGTTCC	40
TGCAGGGCTA	AAAAACGCAA	AATGCCGAAA	CAATAAAGCG	80
TTAAAGGAAA	GTTTATAAAA	CCAGCCCTTA	AACAATTTTT	120
GTATGTCGGT	ATTGCGTTG	TTGTACCGC	ACTCTCGGTT	160
TGATCGAAAT	TCCAAACAAA	CAAAGGGAC	AGTGGGCACA	200
CCATGTGTAT	AATATATGGG	TATATATATA	TATGTAATA	240
TATATATATA	CGTGTATGTG	TATGGTGTGG	TGTGTCGCTC	280
AGCAGAAAAG	CAGCAGCAGC	ATGAAACCAA	CAAACCACAT	320
ATACCACAAC	CAATATATAT	ATATATACAT	ATATATATGA	360
TAATCACAAC	ACGTCCTGGT	AAT	383	

Figura 16. Secuencia nucleotídica del extremo 5' del fragmento de 1.25 Kb, del inserto genómico pRTC13. Los 383 nucleótidos forman parte del espaciador transcrito interno que separa las regiones codificadoras de S6 y S4. Las bases representadas con letra minúscula son bases dudosas.

Tc	TATGAATCCG	CTGAAGGAAA	GCTGCACGTA	ATCAGCAACG	GATATACGCA	50
	CGAGCGAATT	GAGCGGCATA	ACCTGAATCT	GAGGCAGCAC	CTGGCACGGC	100
	TGGGGACGGA	AGTCGCTGTC	GTTCTCAAAA	TCGGTGGAGC	TGCATGACAA	150
	AGTCATCGGG	CATTATCTGA	ACATAAAACA	CTATCAATAA	GTTGGAGTCA	200
	TTACCCCCAC	AACCAATATA	TATATAATAC	ATATATATAT	GATAAATCAC	250
	<u>AACACGTAAA</u>	<u>TCTCCAAACG</u>	<u>AGAGAACATG</u>	<u>CATGGGCTGG</u>	<u>CATGAGCGGC</u>	300
Tb	TTTT.....T.....	
Cf	CA.....T...	
	ATGCTTCACT	TCGGTGGGGC	TCGAG	325		
Tb	.C..C....G	A.C.....			
CF	C.....			

Figura 17. Secuencia nucleotídica del extremo 3' del fragmento de 1.25 Kb del inserto genómico pRTC13, en *T. cruzi* (Tc). Los primeros 252 nucleótidos forman parte del espaciador transcrito interno que separa S6 y S4. Los últimos 73 nucleótidos, que se indican en comparación con *T. brucei* (Tb) y *C. fasciculata* (Cf), forman parte de la región codificadora de la molécula de rRNA S4. La región secuenciada directamente de la molécula ribosomal S4 se señala con una línea.

que el sitio de Xho I que constituye el extremo 3' del fragmento de 1.25 Kb forma parte de la secuencia codificadora de la molécula S4, lo cual significa que no se clonó completo dicho gen. En la región clonada se presentaron aproximadamente 73 pb del gen de S4, a partir de su extremo 5' (figura 17). Cabe señalarse que el gen de S4 en T. brucei es de 136 pb, y en C. fasciculata tiene un tamaño de 133 pb.

El resto de la región secuenciada constituye parte del espaciador transcrito interno entre S6 y S4, habiéndose secuenciado 635 pb de éste (figuras 16 y 17). Como se mencionó anteriormente, al secuenciar el extremo 3' del inserto pRTC81 se secuenciaron 337 pb de este mismo espaciador (figura 5), por lo que en total se han secuenciado 972 pb de este espaciador interno. El tamaño aproximado del espaciador es de 1500 pb.

Secuenciación del extremo 5' de la molécula S4 de RNA ribosomal.

Se procedió a secuenciar el extremo 5' de la molécula ribosomal S4, con el objeto de determinar con exactitud el extremo 5' del gen de dicha molécula. En la figura 17 se señala la secuencia obtenida. Con esto se confirmó que se tienen clonados 73 pb del gen de la molécula S4.

D I S C U S I O N

Ubicación de la región codificadora de la molécula S4 dentro del cistrón ribosomal.

Anteriormente, había sido localizada la región codificadora de la molécula ribosomal S4, mediante análisis de tipo Southern, en fragmentos de 10 y 20 Kb. Los resultados obtenidos en el presente trabajo - nos permiten conocer la posición que ocupa S4 en la unidad de transcripción ribosomal de *T. cruzi*, ubicándose a unos 1500 pb de la región codificadora de S6. Con esto se comprueba que *T. cruzi*, al igual que *T. brucei* y *C. fasciculata*, presenta en la región 3' de la unidad de transcripción de RNAr las regiones codificadoras de S2, S6 y S4, separadas unas de otras por DNA tipo espaciador. Esta situación se antoja como una organización peculiar y particular a los miembros de la familia Trypanosomatidae.

El inserto genómico clonado, pRTC13, pertenece a una copia de cistrón ribosomal poco frecuente, ya que los datos de mapeo indican que en la mayoría de las copias de la unidad ribosomal la región codificadora de S4 se localiza a aproximadamente 1100 pb de la región codificadora de S6 (figuras 8 y 15).

Características de las regiones secuenciadas

Comparando la secuencia clonada del gen de S4 de *T. cruzi* con las

secuencias de este gen reportadas para otros tripanosomatideos (figura 17), se encontró que existe un 94.5% de homología entre T. cruzi y C. fasciculata, y un 86.6% de homología entre T. cruzi y T. brucei (8,9). Resultados similares se han obtenido en el laboratorio del Dr. Roberto Hernández, al comparar las secuencias de S3 y S1 entre estas tres especies.

Con respecto al espaciador transcrito interno entre S6 y S4, se tiene que mientras en T. cruzi presenta un tamaño aproximado de 1500 pb (1100 pb en la mayoría de las copias de la unidad ribosomal), en T. brucei y en C. fasciculata tiene un tamaño de 328 y 247 pb, respectivamente. De esta manera, el espaciador de T. cruzi resultó ser más grande. Cabe señalarse que en ningún tripanosomatideo se había reportado algún espaciador interno de tal magnitud. Al comparar las secuencias de este espaciador entre estos tripanosomatideos no se encontró homología alguna, aunque como característica general se observó que son ricos en A + T (8,9).

Señales de procesamiento

Fueron analizados los límites entre el espaciador y las regiones codificadoras de S6 y S4 en T. cruzi (figuras 16 y 17), en busca de algún tipo de secuencia consenso que pudiera servir como señal durante el procesamiento del transcrito primario; sin embargo, no se encontraron regiones conservadas en tales regiones. En otros tripanosomatideos tampoco se han encontrado este tipo de señales, aunque se ha reportado

que algunos espaciadores de T. brucei, y de otros organismos, potencialmente pueden formar estructuras tallo-asa, capaces de acercar a las moléculas ribosomales que separan (9, 22). Eventos de este tipo podrían llevarse a cabo durante las primeras etapas del procesamiento del transcrito primario. Será necesario próximamente completar la secuencia del espaciador y analizar los datos computacionalmente con algoritmos que predigan estructuras secundarias potenciales para RNA.

Inestabilidad de fragmentos genómicos con secuencias espaciadoras del cistron de RNAr

Como se mencionó en los resultados, la inestabilidad del inserto ribosomal de 7.5 Kb pudo deberse a su tamaño y/o al tipo de secuencias que pudiera contener. Se encuentra reportado que durante una clonación la estabilidad de un inserto depende en gran medida de su tamaño (13). En general, se recomienda que el inserto no supere en más de 3 veces el tamaño del plásmido. Por esto, el hecho de que el inserto ribosomal de 7.5 Kb sea casi 3 veces más grande que el vector pUC18 podría considerarse como una posible causa de su inestabilidad. Por otra parte, también se ha reportado que fragmentos alterados por eventos de recombinación pueden perderse al intentar clonarlos (23). A este respecto, se ha encontrado que los espaciadores ribosomales externos de la mayoría de los organismos que se han examinado presentan elementos repetidos (24,25,26,27,28). Es probable que de existir éstos en T. cruzi, estén involucrados en eventos de recombinación (28,29).

Significado evolutivo de la fragmentación del gen de la molécula 28S

Se encuentra reportado que en varios grupos de organismos, como - protozoarios (30,31), insectos (22,32,33) y vertebrados (34), el gen - que codifica para el RNAr tipo 28S se encuentra fragmentado en dos par - tes, separadas por DNA espaciador transcrito. Como resultado de proce - samiento postranscripcional, se producen dos moléculas de RNA, 28S α y 28S β . Sin embargo, el procesamiento postranscripcional más complejo, a la fecha conocido, es el que presenta el gen tipo 28S de los tripano - somatídeos, en donde se producen dos moléculas grandes (24S α y 24S β) y cuatro moléculas pequeñas: S1, S2, S4 y S6. Estas seis moléculas se - unen, no covalentemente, en la subunidad ribosomal mayor (8,9,10).

Estos hechos indican que una molécula ribosomal no necesita ser - una cadena polinucleotídica covalentemente continua para ser funcional, es decir, que una equivalencia estructural implica equivalencia funcio - nal, independientemente de que los dominios en cuestión estén covalen - temente unidos o no (8).

Estudios comparativos entre los genes ribosomales de diferentes - especies han revelado que éstos presentan un patrón en el que regiones altamente conservadas en estructura primaria y secundaria alternan con regiones variables, que difieren en tamaño, composición de bases y es - tructura secundaria, aún entre organismos cercanamente relacionados -- (35,36,37). Un hecho importante es que todas las discontinuidades que presentan los genes ribosomales de los tripanosomatídeos, y de otros - organismos, se localizan en regiones variables; esto sugiere que las -

regiones variables están evolutivamente relacionadas con los espaciadores internos transcritos (8,9,38,39).

Dada la presencia de varios espaciadores internos transcritos en el gen tipo 28S de los tripanosomatídeos, y la ausencia de la mayoría de estos espaciadores en los genes ribosomales de otros eucariontes, se ha sugerido que los espaciadores se introdujeron a un gen 28S continuo, después de que los tripanosomatídeos divergieron del resto de los eucariontes. Por otra parte, también se propone que el gen ribosomal 28S ancestral pudo haber sido discontinuo, siendo los espaciadores selectivamente retenidos en la línea de los tripanosomatídeos, y eliminados en el resto de los eucariontes (8,9,38,39). En la actualidad se dispone de pocos datos filogenéticos, por lo que no es posible determinar si el ancestro común de los tripanosomatídeos y otros eucariontes tenía genes ribosomales continuos o discontinuos, siendo necesarios más estudios a este respecto.

CONCLUSIONES

- Fueron ubicados sitios de restricción de Xho I, Hind III, Hinc II, Egl II, Bam HI, Eco RI, Sau 3A y Hinf I, hacia el extremo 3' del cistrón ribosomal de T. cruzi.
- Fue clonado un fragmento de 2.85 Kb que contiene 73 nucleótidos codificadores de la molécula de RNAr S4.
- En el inserto clonado, la región codificadora de la molécula ribosomal S4 fue ubicada a aproximadamente 1500 pb del gen de la molécula S6. Esto nos permitió comprobar que T. cruzi, al igual que T. brucei y C. fasciculata, presenta en la región 3' de la unidad ribosomal las regiones codificadoras de S2, S6 y S4.
- El inserto ribosomal clonado, pRTC13, pertenece a una copia de la unidad ribosomal poco frecuente, pues los datos de mapeo indican que en la mayoría de las copias del cistrón ribosomal la región codificadora de S4 se localiza aproximadamente a 1100 pb del gen de S6.
- Fueron secuenciados 12 pb de la región codificadora de S6 y 972 pb del espaciador transcrito interno que separa S6 de S4. Al analizar los límites entre este espaciador y los genes de S6 y S4, no se encontraron secuencias conservadas que pudieran servir como señal durante el procesamiento del transcrito primario.

APENDICE:

Medios de cultivo y soluciones

- Agar suave: Peptona 0.8%, extracto de levadura 0.8%, NaCl 0.5% y agar 0.6%.
- Medio de infusión de hígado y triptosa: Infusión de hígado 0.5%, triptosa 0.2%, NaCl 0.4%, KCl 0.4%, Na_2HPO_4 0.8%, glucosa 0.2%, suero bovino fetal 10% y hemina 0.0025%.
- Medio Luria: Peptona 1%, extracto de levadura 0.5%, NaCl 1% y agar 1.5%.
- Medio YT: Peptona 0.8%, extracto de levadura 0.8%, NaCl 0.5% y agar 1.5%.
- Solución Denhardtts: Ficoll 400 0.002%, PVP-40 0.002% y albúmina sérica bovina 0.02%.
- Solución desnaturalizadora: NaOH 2% y NaCl 8.7%.
- Solución N: Tris-HCl 20 mM (pH 7.6), KCl 100 mM, CaCl_2 2 mM y MgCl_2 5 mM.
- Solución neutralizadora: NaCl 8.7% y Tris-HCl 6.6%, llevada a pH 7.0.
- SSC: NaCl 150 mM y citrato de sodio 15 mM.
- TBE: Tris-HCl 5.4%, ácido bórico 2.74% y EDTA 0.46%.
- TE: Tris-HCl 10 mM (pH 8.0) y EDTA 1 mM.
- TNE: Tris-HCl 0.01 M (pH 8.0), NaCl 0.1 M y EDTA 0.001 M (pH 8.0).
- 6,6,0.2 : Tris-HCl 6 mM (pH 7.4), NaCl 6 mM y EDTA 0.2 mM.

BIBLIOGRAFIA

1. Margulis, L. y Schwartz, K.V. (1985). Cinco reinos. Guía ilustrada de los phyla de la vida en la tierra. Ed. Labor, Barcelona.
2. McGhee, R.B. y Cosgrove, W.B. (1980). Biology and physiology of the lower Trypanosomatidae. *Microbiol. Rev.* 44: 140-173.
3. De Souza, W. (1984). Cell biology of Trypanosoma cruzi. *Int. Rev. Cytol.* 86: 197-238.
4. Dias, J.C.P. (1984). Acute Chagas disease. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 79: 85-91.
5. Nogueira, N. (1986). En Parasite antigens, toward new strategies - for vaccines: American Trypanosomiasis. (T.W. Pearson, editor), Marcel Dekker Inc., Nueva York.
6. Hernández, R., Nava, G. y Castañeda, M. (1983). Small-size ribosomal RNA species in Trypanosoma cruzi. *Mol. Biochem. Parasitol.* 8: 297-304.
7. Campbell, D.A., Kubo, K., Clark, C.G. y Bouthroyd, J.C. (1987). -- Precise identification of cleavage sites involved in the unusual - processing of Trypanosome ribosomal RNA. *J. Mol. Biol.* 196: 113-124.
8. Spencer, D.F., Collings, J.C., Schnare, M.N. y Gray, M.W. (1987). Multiple spacer sequences in the nuclear large subunit ribosomal - RNA gene of Crithidia fasciculata. *EMBO J.* 6: 1063-1071.
9. White, T.C., Rudenko, G. y Borst, P. (1986). Three small RNAs with in the 10 Kb trypanosome rRNA transcription unit are analogous to domain VII of other eukariotic 28S rRNAs. *Nucleic Acids Res.* 14: - 9471-9489.
10. Hernández, R., Díaz-de León, F. y Castañeda, M. (1988). Molecular cloning and partial characterization of ribosomal RNA genes from - Trypanosoma cruzi. *Mol. Biochem. Parasitol.* 27: 275-280.
11. Camargo, E.P. (1964). Growth and differentiation of Trypanosoma cruzi Origin of metacyclic trypanosomes in liquid medium. *Revta. Inst. - Met. Trot. S. Pulo*, 6: 220-224.
12. Bethesda Research Laboratories, Inc. Catálogo de 1986.

13. Maniatis, T., Fritsch, E.F. y Sambrook, J. (1982). Molecular cloning, a laboratory manual. Cold Spring Harbor, Nueva York.
14. Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Smith, J.A., Seidman, J.G. y Struhl, K. (1987). Current protocols in molecular biology. John Wiley and Sons, Nueva York.
15. Maizels, N. (1976). Dictyostelium 17S, 25S and 5S rDNAs lie within a 38000 base pair repeated unit. Cell, 9: 431-438.
16. Yanisch-Perron, C., Vieira, J. y Messing, J. (1985). Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of -- the M13mp18 and pUC19 vectors. Gene, 33: 103-119.
17. Rowecamp, W. y Firtel, R.A. (1980). Isolation of developmentally - regulated genes from Dictyostelium. Dev. Biol. 79: 409-418.
18. Southern, E.M. (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. J. Mol. Biol. 98: 503-517.
19. Sanger, F., Nicklen, S. y Coulson, A.R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74: 5463-5467.
20. Donis-Keller, H., Maxam, A.M. y Gilbert, W. (1977). Mapping adenines, guanines and pyrimidines in RNA. Nucleic Acids Res. 4: 2527--2538.
21. Peattie, D.A. (1979). Direct chemical method for sequencing RNA. - Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76: 1760-1764.
22. Fujiwara, H. e Ishikawa, H. (1986). Molecular mechanism of intro--duction of the hidden break into the 28S rRNA of insects: implication based on structural studies. Nucleic Acids Res. 14: 6393-6401.
23. Winnacker, E.L. (1987). From genes to clones. VCH, Nueva York.
24. Grummt, I., Rosenbauer, H., Niedermeyer, I., Maier, U. y Ohrlain, A. (1986). A repeated 18 bp sequence motif in the mouse rDNA spacer mediates binding of a nuclear factor and transcription terminator. Cell, 45: 837-846.
25. De Winter, R. y Moss, T. (1987). A complex array of sequences en--hances ribosomal transcription in Xenopus laevis. J. Mol. Biol. -- 196: 813-827.

26. La Volpe, A., Simeone, A., D'Esposito, M., Scotto, L., Fidanza, V., De Falco, A. y Bonacinelli, E. (1985). Molecular analysis of the - heterogeneity region of the human ribosomal spacer. *J. Mol. Biol.* 183: 213-223.
27. Kelly, R.J. y Siegel, A. (1989). The Cucurbita maxima ribosomal -- DNA intergenic spacer has a complex structure. *Gene*, 80: 239-248.
28. Rogers, S.O. y Bendich, A.J. (1987). Ribosomal RNA genes in plants: variability in copy number and in the intergenic spacer. *Plant Mol. Biol.* 9: 509-520.
29. Glass, R.E. (1982). Gene function. *E. coli* and its heritable elements. University of California Press, Los Angeles.
30. Stevens, A.R. y Pachler, P.F. (1972). Discontinuity of 26S rRNA in Acanthamoeba castellanii. *J. Mol. Biol.* 66: 225-237.
31. Eckert, W.A., Kaffenberger, W., Krohne, G. y Franke, W.W. (1978). Introduction of hidden breaks during rRNA maturation on ageing in Tetrahymena pyriformis. *Eur. J. Biochem.* 87: 607-616.
32. Jordan, B.R. Jourdan, R. y Jacq, B. (1976). Late steps in the maturation of *Drosophila* 26S ribosomal RNA: Generation of 5.8S and 2S RNAs by cleavages occurring in the cytoplasm. *J. Mol. Biol.* 101: - 85-101.
33. Ware, V.C., Renkawitz, R. y Gerbi, S.A. (1985). rRNA processing: - removal of only 19 bases at the gap between 28S α and 28S β rRNAs in Sciara coprophila. *Nucleic Acids Res.* 13: 3581-3597.
34. Leipoldt, M. y Engel, W. (1983). Hidden breaks in ribosomal RNA of phylogenetically tetraploid fish and their possible role in the - diploidization process. *Biochem. Genet.* 21: 819-841.
35. Gonzalez, I.L. Silvester, J.E. y Schmickel, R.D. (1988). Human 28S ribosomal RNA sequence heterogeneity. *Nucleic Acids Res.* 16: 10213-10224.
36. Clark, C.G., Tague, B.W. Ware, V.C. y Gerbi, S.A. (1984). Xenopus laevis 28S ribosomal RNA: a secondary structure model and its evolutionary and functional implications. *Nucleic Acids Res.* 12: 6197-6220.

1984 12 12
 BIBLIOTECA

37. Gunderson, J.H. y Sogin, M.L. (1986). Length variation in eukaryotic rRNAs: small subunit rRNAs from the protists Acanthamoeba castellanii and Euglena gracilis. Gene, 44: 63-70.
38. Cox, R.A. y Kelly, J.M. (1981). Mature 23S rRNA of prokaryotes --- appears homologous with the precursor of 25-28S rRNA of eukaryotes. FEBS Letters, 130: 1-6.
39. Schnare, M.N., Heinonen, T.Y.K., Young, P.G. y Gray, M.W. (1986). A discontinuous small subunit ribosomal RNA in Tetrahymena pyriformis mitochondria. J. Biol. Chem. 261: 5187-5193.