



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

CARACTERIZACIÓN DE LOS RNAr 5S Y 5.8S DE
Trichomonas vaginalis

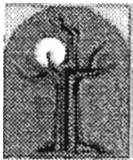
T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
LICENCIADO EN INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA BÁSICA

PRESENTA:

ANA LILIA TORRES MACHORRO

Asesor: Dra. Imelda López Villaseñor



MÉXICO, D.F.

2005

m. 349374



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 esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

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

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: Ana Lilia Torres Mochero

FECHA: 05.10.05

FIRMA: [Firma]

Dedicatorias

A Dios, por este camino maravilloso que le ha dado respuestas a varias de mis preguntas.

A Ma y a Pepe, por hacer de mi vida un viaje intenso y prometedor, por darme todo para llegar hasta donde yo quiera, por sus enseñanzas, consejos, comprensión y apoyo, pero sobre todo, por su amor. Por enseñarme a no conformarme, por estar conmigo siempre, por todo, los quiero muchísimo. Esto es por ustedes y para ustedes. ¡Gracias por formar parte de mí!

A Ado, alias la Torpe. Por estar conmigo siempre, por las desveladas y por tu apoyo, te quiero mucho hermana.

A Alejo, porque me enseñaste lo que es una verdadera pareja, por tu apoyo y amor incondicional. JTA.

A mis abuelitas, Nidia y Che, pues ustedes empezaron esta cadena... ¡las adoro!

A Toda mi familia, por hacer mis fines de semana diferentes y envidiables. A Tere, porque tu eres una tía para mí, TQM.

A la Dra. Imelda, por enseñarme el verdadero significado de la ciencia, por hacerme sentirla y disfrutarla como nunca.

A Lorena, por tu apoyo, cariño y comprensión en estos dos años.

A mis amigos del lab: Imelda, Lore, Lupis, Vanessa, Pablo y Olivia; y del otro lab: al Dr. Roberto, Momis, Dra. Ana María, Juliana, Elisa, Mariana y Yayoi. A la Sra. Tere.

A mis otros Amigos: Rosalía, Tonyo, Clau, Caty, Tony, Ritus, Lucciana, Fer, George, Peque, Güerito, Margaró, Chinchí, Yeyazo, Pao, Dani, Valeria, José, Marco, René, Genaro, Sofía, Wendoline, y demás personas que hicieron de mi licenciatura 4 años inolvidables.

A quienes me guiaron a lo largo de mi carrera: Maricha, George, Paty, Dr. Marco José, Julieta, Clemen, Dr. Rafael Camacho, Doc Ortega, Clau Garay, Dra. Isabel Soto, Dra. Armida, Dra. Imelda, Lore, Dr. Roberto, Dra. Ana, Dra. Rosalía, Dr. Jorge Membrillo, Dr. Joaquín Sánchez, Dr. Félix Recillas y Dra. Rossana Arroyo.

Agradecimientos

A la Universidad Nacional Autónoma de México y en especial al Instituto de Investigaciones Biomédicas por permitirme estudiar esta maravillosa carrera.

A la Dra. Imelda López Villaseñor por ser una excelente tutora y mejor amiga.

Al Dr. Roberto Hernández, a la Dra. Ana María Cevallos y al Dr. Joaquín Sánchez por sus consejos y comentarios.

Al jurado, integrado por el Dr. Félix Recillas Targa, Dra. Imelda López Villaseñor, Dr. Luis Felipe Jiménez García, Dra. Yolanda López Vidal y Dr. Roberto Hernández Fernández, por el tiempo y esfuerzo invertidos en mi formación académica y revisión de tesis.

A la bióloga Lorena López Griego, por su apoyo técnico y amistad durante el desarrollo de esta tesis.

A la Maestra Ada Méndez y al Dr. Edmundo Lamoyi por su apoyo en la realización de todos los trámites de licenciatura y titulación.

Al PAPIIT, proyecto IN209302-3, por el apoyo económico proporcionado durante mi licenciatura.

JURADO ASIGNADO

Presidente	Dr. Félix Recillas Targa
Vocal	Dra. María Imelda López Villaseñor
Secretario	Dr. Luis Felipe Jiménez García
Suplente	Dra. Yolanda López Vidal
Suplente	Dr. Roberto José Rafael Hernández Fernández

ASESOR: Dra. Imelda López Villaseñor

SUPERVISOR TÉCNICO: Biol. Lorena López Griego

SUSTENTANTE: Ana Lilia Torres Machorro

Abreviaturas

- *5.8S – RNAr 5.8S marcado radiactivamente en su extremo 5'.
- *58S-2 – Oligonucleótido de alineamiento específico al extremo 3' del RNAr 5.8S marcado radiactivamente.
- A – Adenina.
- C – Citosina.
- cDNA – cadena de DNA complementaria al RNA.
- CIAP – Fosfatasa Alcalina Intestinal de Becerro (Calf Intestinal Alkaline Phosphatase).
- cpm– Cuentas por minuto.
- CR – Cistrón Ribosomal.
- DEPC – Dietilpirocarbonato (inhibidor de RNAsas).
- DNA – Ácido desoxiribonucleico.
- DNAr – DNA ribosomal, codificante para el RNAr
- G – Guanina.
- GTP- Guanina trifosfato.
- h – hora.
- ICR – Región de Control Interna (Internal Control Region).
- kb– kilobases.
- OD – Densidad óptica.
- o/n – Toda la noche (over night).
- M – molar.
- ml – mililitros.
- NTS- espaciadores no transcritos (non-transcribed spacers).
- oligo – oligonucleótido.
- PCR – Reacción en cadena de la polimerasa.
- pH – potencial de hidrogeniones.
- pol I – RNA polimerasa I.
- pol II – RNA polimerasa II.
- pol III – RNA polimerasa III.
- RNA – Ácido ribonucleico.
- RPA- Ensayo de Protección a Ribonucleasas.
- rpm- revoluciones por minuto.
- RNAr – RNA ribosomal.
- RNAr – RNA de transferencia.
- RT-PCR – Reacción en cadena de la polimerasa utilizando como templado cDNA obtenido por transcripción reversa.
- S- Svedvergs, coeficiente de sedimentación.
- SDS – Dodecil Sulfato de Sodio.
- snoRNA – RNAs pequeños nucleolares.
- snoRNP – ribonucleoproteínas pequeñas nucleolares.
- T – Timina.
- Tv - *Trichomonas vaginalis*.
- U – Uracilo.
- u - unidades
- upe – elemento promotor río arriba (upstream promoter element).
- UV – Ultra Violeta.
- V – volts.
- VIH- Virus de la inmunodeficiencia humana.

Índice:

1. Resumen
2. Introducción
- 2.1 *Trichomonas vaginalis*: Biología y Fisiología
- 2.1.1 *Trichomonas vaginalis*: Biología Molecular
- 2.2 Ribosomas
- 2.2.1 Síntesis de proteínas
- 2.3 Genes ribosomales
- 2.3.1 Unidad transcripcional mayor del RNAr
- 2.3.1.1 Promotores del rDNA
- 2.3.1.2 Ensamblaje del complejo de transcripción de RNA polimerasa I
- 2.3.1.3 Terminación de la transcripción por RNA polimerasa I
- 2.3.1.4 Maduración del pre-RNAr
- 2.3.1.5 RNAr 5.8S
- 2.3.2 RNAr 5S
- 2.3.2.1 Promotores de RNA polimerasa III
- 2.3.2.2 Interacciones proteicas
3. Antecedentes
4. Hipótesis
5. Objetivos
- 5.1 Objetivos particulares
6. **Capítulo I: Caracterización del RNAr 5S de *Trichomonas vaginalis***
- 6.1 Introducción
- 6.2 "The 5S ribosomal RNA gene from the early diverging protozoa *Trichomonas vaginalis*"
7. **Capítulo II: Caracterización del RNAr 5.8S de *Trichomonas vaginalis***
- 7.1 Introducción
- 7.2 Metodología y resultados
- 7.2.1 Secuenciación directa del RNAr 5.8S de *T. vaginalis*
- 7.2.2 Identificación del extremo 5' del RNAr 5.8S maduro
- 7.2.3 Conformaciones alternativas del RNAr 5.8S de *T. vaginalis*
- 7.2.4 Estructura secundaria del RNAr 5.8S
- 7.2.5 Determinación del número de copias del Cistrón ribosomal
8. **Capítulo III: Caracterización de dos especies putativas del RNAr 5.8S de *T. vaginalis***
- 8.1 Introducción
- 8.2 Metodología y resultados
- 8.2.1 Ensayo de protección a RNAsas
- 8.2.2 "Primer extension"
- 8.2.3 RT-PCR
9. Discusión
10. Conclusiones
11. Metodología
- A) Extracción de RNA total de *T. vaginalis*
- B) Purificación de las bandas de RNAr de geles de acrilamida
- C) Desfosforilación del extremo 5' de las moléculas de RNA
- D) Fosforilación de los extremos 5' con γ -P³² ATP
- E) Secuenciación directa del RNA
- F) Preparación de Geles de secuencia
- G) "Primer extension"
- H) Secuenciación del plásmido p921
- I) Geles nativos de acrilamida
- J) Extracción de DNA genómico de *T. vaginalis*
- K) Southern blot genómico

- L) Purificación de bandas de DNA en geles de agarosa
 - M) Obtención de sonda radiactiva
 - N) PCR para obtener templado de transcripción *in vitro*
 - O) Ensayo de Transcripción *in vitro*
 - P) Ensayo de protección a ribonucleasas
 - Q) RT-PCR
 - R) Extracción de plásmidos
 - S) Cultivo de *T. vaginalis*
 - T) Análisis del DNA en geles de agarosa
 - U) Obtención de estructuras secundarias putativas en el programa *Mfold* de Zuker
12. Referencias
 13. Apéndice de Soluciones
 14. Apéndice de oligonucleótidos

1. Resumen

Trichomonas vaginalis es un parásito protozooario anaerobio, agente etiológico de la trichomonosis humana. Diversos análisis filogenéticos basados en RNAr y actina colocan a este organismo en una de las ramas eucariotes más tempranas.

El ribosoma eucariote típico se compone de los RNA ribosomales (RNAr) 18S, 5.8S, 28S y 5S. Los tres primeros generalmente se codifican en una unidad de transcripción ribosomal principal (cistrón ribosomal) y se transcriben por la RNA polimerasa I. En contraste, el gen del RNAr 5S se transcribe por la RNA polimerasa III y usualmente no se encuentra ligado a la unidad del cistrón ribosomal. El RNAr 5S se encuentra en todos los ribosomas eucariotes, desempeñando papeles importantes en la biogénesis ribosomal, la actividad peptidil transferasa, la fidelidad traduccional y la estabilidad de la subunidad mayor.

En este trabajo se identificó y caracterizó el gen del RNAr 5S de *Trichomonas vaginalis*, así como a su promotor putativo de RNA polimerasa III. También se determinó su relación en secuencia nucleotídica y estructura secundaria potencial con los RNAr 5S eucariotes y bacterianos.

Cuando el RNA total de *T. vaginalis* se separa en un gel desnaturizante de acrilamida al 4% se observan tres bandas principales que corresponden a los tamaños de ~160b, ~120b y ~70b (Fig. 4). La banda de ~160 b corresponde al RNAr 5.8S. Las bandas de ~120 y ~70b se asumieron, por su tamaño, como correspondientes al RNAr 5S y a los RNAt, respectivamente.

Los primeros intentos por identificar al RNAr 5S de *T. vaginalis* con herramientas bioquímicas y moleculares daban resultados confusos. Se encontró que la población de RNA de la banda de ~120b (que se asumía como el RNAr 5S) estaba relacionada con el RNAr 5.8S que se encuentra

en la banda de ~ 160 b. Por lo tanto, se planteó como hipótesis que *T. vaginalis* carece de un RNAr 5S canónico.

Para comprobar la hipótesis realicé ensayos de secuenciación directa del RNA, ensayos de protección a RNasas, “primer extension” y RT-PCR. Los datos confirmaban la presencia del RNAr 5.8S en la banda de ~ 120 . Se identificaron tres conformaciones alternativas de la molécula: una que migra en la banda de ~ 120 b, de manera conjunta con el RNAr 5S (que se identificó posteriormente) y dos que migran en la banda de ~ 160 b. Determinamos la estructura secundaria putativa del RNAr 5.8S de *T. vaginalis* con base en el modelo universal de la molécula, así como el número de copias del cistrón ribosomal (~ 8).

Durante el desarrollo del proyecto se liberó la base de datos, sin ensamblar, del proyecto de secuenciación del genoma de *T. vaginalis*. Mediante una búsqueda *in silico* se obtuvo una secuencia que se determinó como el gen que codifica al RNAr 5S de *T. vaginalis*. La región codificadora putativa tiene una longitud de 118b y contiene los elementos promotores típicos de RNA polimerasa III (región de control interna), internos a la región codificadora, como son las secuencias de la Caja A, el Elemento Intermedio y la Caja C. Además identificamos otros elementos reguladores putativos como una caja “TATA-like” (río arriba de la región codificadora) y un tallo-asa novedoso, río abajo de las secuencias de terminación de la transcripción. Se obtuvo también la estructura secundaria putativa del RNAr 5S y el número de copias de sus genes (~ 200). La caracterización anterior es de interés particular ya que los promotores de pol I y pol II para *T. vaginalis* han sido estudiados, mientras que ningún promotor para pol III se había identificado previamente. Este trabajo, enviado para su publicación en *Molecular and Biochemical Parasitology*, ha sido condicionalmente aceptado (Capítulo I).

2. Introducción

En este trabajo se caracterizó el gen del RNAr 5S de *Trichomonas vaginalis*. Para introducirnos en el tema, comienzo con la biología del organismo de estudio.

Los ribosomas de este organismo de evolución temprana son de particular interés debido a que esta maquinaria molecular se regula de manera compleja, tiene características moleculares inusuales a comparación con la mayoría de los organismos eucariontes y contiene información evolutiva. Conocimientos generales sobre los ribosomas y algunos componentes ribosomales, como los RNAr y sus genes, se analizan en la introducción.

Todos los organismos vivos se pueden clasificar en dos grupos: eucariontes y procariontes. Los organismos eucariontes se distinguen de los procariontes por su DNA nuclear, separado del citoplasma y por la repartición de funciones en organelos delimitados por membranas, entre otras características (Vilée, 1996).

Dentro de los organismos eucariontes se encuentra la rama de los protozoarios. Estos organismos abundan en océanos, tierra y en el cuerpo de otros organismos en forma de parásitos. Generalmente son microscópicos, formados de una sola célula, con uno o varios núcleos. Su estructura y fisiología son complejas, muchas veces presentando características “inusuales” de regulación a comparación de los organismos eucariontes de mayor escala evolutiva como los metazoarios.

2.1 *Trichomonas vaginalis*: Biología y Fisiología.

Dentro de los protozoarios se encuentra la familia Trichomonadidae, compuesta de organismos que se caracterizan por la presencia de varios flagelos anteriores, una membrana ondulante, una

pelta, que se encuentra en el margen anterior del cuerpo; una costa, que se extiende a lo largo de la base de la membrana ondulante; un axostilo y un solo núcleo (Levine, 1985).

El nombre de *Trichomonas* se dio a un género que se creía poseía tres flagelos anteriores, más adelante se demostró que tiene cuatro, sin embargo el nombre de *Trichomonas* se conservó. Posteriormente se encontraron otras especies que presentaban variabilidad en el número de flagelos, por lo que el resto de los géneros se reconocen como: *Tritrichomonas*, con 3 flagelos anteriores; *Trichomonas* con 4 flagelos anteriores; y *Pentatrichomonas*, con 5 flagelos anteriores (Noble et al., 1989).

Trichomonas vaginalis mide en promedio 13µm de largo. Es el agente causal de la trichomonosis (antes trichomoniasis) humana, la enfermedad de transmisión sexual no viral más común a nivel mundial (WHO 2001). El parásito no invade tejidos y puede vivir en el huésped por años sin manifestarse. En las mujeres las manifestaciones clínicas más comunes son las descargas vaginales pronunciadas, además de que puede ocurrir una severa erosión de la mucosa vaginal. En los hombres, una ligera descarga uretral es característica de la infección (Wolner-Hanssen, 1989).

Las mujeres infectadas con *T. vaginalis* tiene mayor riesgo de infección por VIH y de desarrollo de cáncer cervicouterino; en las mujeres embarazadas, de presentar partos prematuros y al nacimiento de infantes con bajo peso (Meysick et al., 1995).

Estos parásitos son capaces de contrarrestar la fuerza del fluido vaginal por su unión a la mucina del moco vaginal (Lehker y Sweeney, 1999). La respuesta inmune del huésped es neutralizada gracias a la síntesis de numerosas enzimas proteolíticas y a la variación fenotípica de las *Trichomonas* infectadas por un virus de RNA de doble cadena (Alderete et al., 1986). *T. vaginalis* provoca la disminución de los niveles celulares de *Lactobacilli*, un microorganismo de la flora vaginal normal que mantiene el pH ácido vaginal (Luna y Orozco, 2004).

Los trichomonatideos son organismos de metabolismo anaerobio, pues carecen de mitocondria, citocromos y un ciclo funcional de los ácidos tricarbóxicos (Noble et al., 1989). En el citoplasma la energía metabólica se deriva del catabolismo de la glucosa a piruvato o succinato a través de la vía glicolítica. Se puede generar energía adicional cuando el piruvato se convierte a acetato como resultado de una reacción ligada a la Coenzima A; esto ocurre en un organelo conocido como hidrogenosoma (su nombre se debe a que su principal producto de desecho es el hidrógeno molecular), que contiene a las enzimas responsables del metabolismo del piruvato (Lindmark y Muller, 1973).

El metabolismo de ácidos nucleicos de estos organismos es interesante, pues al parecer hay poca o nula capacidad de síntesis de purinas *de novo*, y por lo tanto, los parásitos dependen del reciclaje de purinas y nucleósidos liberados al medio por el huésped. Debido a la carencia de algunas vías biosintéticas de moléculas esenciales (ácidos grasos, colesterol y ácidos nucleicos), la adquisición de nutrientes provenientes del huésped es indispensable para la supervivencia del protozoario (Luna y Orozco, 2004).

2.1.1 *Trichomonas vaginalis*: Biología molecular

T. vaginalis existe únicamente como trofozoito flagelado y se divide de forma asexual por fisión binaria (Vanacova et al., 2003). El tamaño del genoma de *T. vaginalis* se estimó, mediante ensayos de cinética de reasociación, como un genoma de 2.5×10^7 pb (Wang y Wang, 1985). Su contenido genómico de G + C es de ~ 36% y tiene seis cromosomas monocéntricos que parecen ser haploides (Drmota y Kral, 1997). El proyecto de secuenciación del genoma de *T. vaginalis*, trabajo que se encuentra en su etapa final, estima el tamaño del genoma de *T. vaginalis* entre 155 y 177 Mb (www.tigr.org); esta valoración está en desacuerdo con la propuesta original de Wang en 1985.

La síntesis de RNA en los organismos eucariontes se lleva a cabo por tres RNA polimerasas diferentes: La RNA polimerasa I (pol I) es la encargada de transcribir a los genes ribosomales (cistrón ribosomal), la RNA polimerasa II (pol II) sintetiza los RNA mensajeros (RNAm), que son los que codifican a las proteínas celulares; finalmente, la RNA polimerasa III (pol III) sintetiza a los RNAs pequeños, como el RNAr 5S y los RNAs de transferencia (RNAt).

En los metazoarios, pol I es resistente a altas concentraciones de α -amanitina ($> 1\text{mg/ml}$), mientras que pol III es moderadamente sensible, con un 50% de inhibición con $50\text{-}150\mu\text{g/ml}$ de α -amanitina; pol II es la más sensible, pues se inhibe al 50% con $2\text{-}20\mu\text{g/ml}$ de la droga (Lindell et al., 1970). De forma sorprendente, la transcripción de los RNAm de *T. vaginalis* es resistente a altos niveles de α -amanitina ($250\mu\text{g/ml}$), esto parece ser resultado de una baja conservación de la región de la RNA polimerasa II que interactúa con esta droga (Vanacova et al., 2001).

Los promotores para pol II en *T. vaginalis* tienen una estructura bipartita con un elemento promotor central conservado y algunos elementos reguladores localizados río arriba del sitio de inicio de la transcripción. Lo anterior está de acuerdo con los promotores de pol II en otros organismos eucariontes (Vanacova et al., 2003). El elemento promotor conservado, el iniciador, se ha identificado rodeando el sitio de inicio de la transcripción de cada uno de los genes codificadores para proteínas de *T. vaginalis* reconocidos hasta hoy. La proteína de unión a esta secuencia, IBP39, también se ha caracterizado (Liston et al., 2001).

Los transcritos de *T. vaginalis* sufren los procesamientos típicos de los RNAm eucariontes: capping (Vanacova et al., 2003), poliadenilación y splicing (Vanacova et al., 2005). Sin embargo, en nuestro laboratorio se ha propuesto que el procesamiento del extremo 3' de los transcritos de *T. vaginalis* tiene características inusuales: el codón de término de la traducción acoplado a la señal de poliadenilación, así como una secuencia definida para el sitio de corte de los transcritos, característica no descrita para otros eucariontes (Espinosa et al., 2002).

Como podemos observar, los mecanismos reguladores de la transcripción más estudiados en *T. vaginalis* se enfocan a la RNA polimerasa II (pol II) y a sus productos (RNAm). Por otra parte, en nuestro laboratorio se han hecho los primeros intentos para caracterizar al promotor de pol I de *T. vaginalis* al identificar su sitio de inicio de la transcripción (López-Villaseñor et al., 2004). En contraste, la transcripción por pol III en *T. vaginalis* no había sido estudiada hasta el presente trabajo (Torres-Machorro et al. 2005).

Trichomonas vaginalis es una entidad modelo de estudio por ser un organismo eucarionte con características reguladoras primitivas. En los últimos años, el estudio de su biología molecular ha avanzado considerablemente: se ha logrado su transformación transitoria y seleccionable (Delgadillo et al., 1997), la expresión genética inducible (Ortiz y Jhonson, 2003), así como el “knock-out” de algunos de sus genes (Land et al., 2004).

2.2 Ribosomas

La síntesis de proteínas codificadas en los RNA mensajeros se lleva a cabo en la maquinaria de traducción celular, el ribosoma. Los ribosomas de *T. vaginalis* exhiben ciertas características reminiscentes de ribosomas eubacterianos (Champney et al., 1992) con un coeficiente de sedimentación de 70S, mientras que los ribosomas de los metazoarios sedimentan a 80 Svedbergs. Lo anterior invita a un estudio más detallado de los ribosomas de *T. vaginalis*, como se hace en este trabajo al estudiar uno de sus componentes, el RNAr 5S. En esta sección se resumen algunas generalidades de los ribosomas.

El papel ribosomal es el de proveer un ambiente apropiado para el correcto posicionamiento del RNAm, el RNAt y factores de traducción durante el proceso de decodificación, así como catalizar la actividad peptidil-transferasa para la formación de enlaces peptídicos entre los aminoácidos codificados. Los ribosomas eucariontes tienen un coeficiente de sedimentación de 80S y se componen de una subunidad mayor (60S) y una subunidad menor (40S). compuestas a

su vez de proteínas (~70) y RNAs ribosomales (RNAr). Los RNAr en la mayoría de los organismos eucariontes son 18S (componente de la subunidad menor); 28S, 5.8S y 5S (componentes de la subunidad mayor). En bacterias, la subunidad mayor ribosomal (50S) se compone de dos moléculas de RNAr (5S y 23S) y ~34 proteínas; la subunidad menor (30S) está conformada por el RNAr 16S y ~21 proteínas (Hill et al., 1990; Garret, 1999).

La subunidad ribosomal pequeña es responsable de la decodificación del RNAm, mientras que la subunidad mayor lleva a cabo las funciones catalíticas (Hill et al., 1990).

2.2.1 Síntesis de proteínas

Se han identificado tres etapas durante la síntesis de proteínas ó traducción (Nelson y Cox, 2005):

- 1) **Iniciación:** El RNAm que codifica para los polipéptidos se une a la subunidad ribosomal pequeña y al aminoacil-tRNA iniciador. La subunidad mayor ribosomal se une después para formar el complejo de iniciación. El aminoacil-tRNA iniciador se acopla con el codón del RNAm AUG, que indica el inicio del polipéptido (esto en el sitio P del ribosoma). Este proceso requiere GTP y se promueve por las proteínas citosólicas llamadas factores de iniciación.
- 2) **Elongación:** El polipéptido naciente se sintetiza por la unión covalente de aminoácidos sucesivos, cada uno colocado en la posición correcta del ribosoma por su RNAt, que se aparea con el codón correspondiente en el RNAm. La elongación requiere de proteínas citosólicas conocidas como factores de elongación. La unión de cada aminoacil-tRNA y el movimiento del ribosoma a lo largo del RNAm se facilita por la hidrólisis de GTP. La elongación a su vez se puede dividir en tres pasos:

- a) Unión del aminoacil-tRNA siguiente: el aminoacil-tRNA apropiado (formando un complejo con una proteína de elongación acoplada a GTP) se une al sitio A del complejo de iniciación y a continuación se hidroliza el GTP.
 - b) Formación del enlace peptídico: Se forma un enlace peptídico entre los dos aminoácidos unidos por su tRNA a los sitios A y P del ribosoma. Esta reacción enzimática conocida como "peptidil-transferasa" produce un RNAt-dipeptídico en el sitio A y un RNAt descargado (sin aminoácido) en el sitio P.
 - c) Translocación: En este paso el ribosoma se desplaza un codón hacia el extremo 3' del RNAm. Este movimiento lleva al anticodón del RNAt-dipeptídico (que continúa unido al segundo codón del RNAm) del sitio A del ribosoma al P, mientras que el RNAt descargado se mueve del sitio P al E (sito a partir del cual se libera al citosol). El tercer codón del RNAm ahora está en el sitio A, mientras que el segundo está en el P. El ribosoma está listo para el siguiente ciclo de elongación. La actividad anterior involucra un cambio en la conformación tridimensional del ribosoma que resulta en su movimiento a lo largo del RNAm.
- 3) Terminación y liberación: El término de la cadena polipeptídica se señala por un codón de terminación en el RNAm; entonces, se libera el nuevo polipéptido sintetizado por el ribosoma con ayuda de factores de liberación.

La traducción se esquematiza en la figura 1:

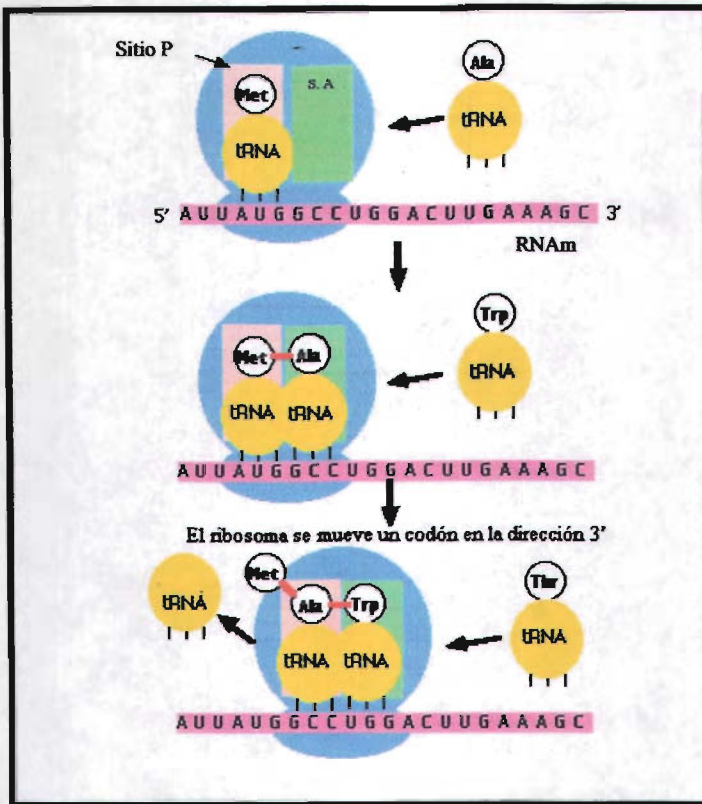


Figura 1. Esquema de la síntesis de proteínas en los ribosomas ó traducción. Figura obtenida de la página web: <http://users.rcn.com/jkimball.ma.ultranet/BiologyPages/T/Translation.html> En azul se muestra el ribosoma. S.A: sitio A.

2.3 Genes Ribosomales

Los genes que codifican a los RNAr, componentes esenciales de los ribosomas, están física y transcripcionalmente ligados, característica que podría garantizar una síntesis coordinada de los RNAr y localizar el sitio de ensamblaje de los ribosomas en la célula. Sin embargo, no hay evidencia de que esta ligación de genes de RNAr tenga algún papel celular en bacterias o en eucariontes, de hecho, es común la ocurrencia de interrupciones de estas ligaciones a lo largo de la evolución. En bacterias los tres RNAr canónicos (16S, 23S y 5S) se co-transcriben a partir de un operón. En contraste, en eucariontes los RNAr 18S, 5.8S v 28S se codifican v co-transcriben

en una unidad génica conocida como cistrón ribosomal (transcrita por pol I), mientras que el RNAr 5S generalmente se localiza en un locus separado y se transcribe por una RNA polimerasa distinta: RNA polimerasa III (Mandal, 1984; Figura 2).

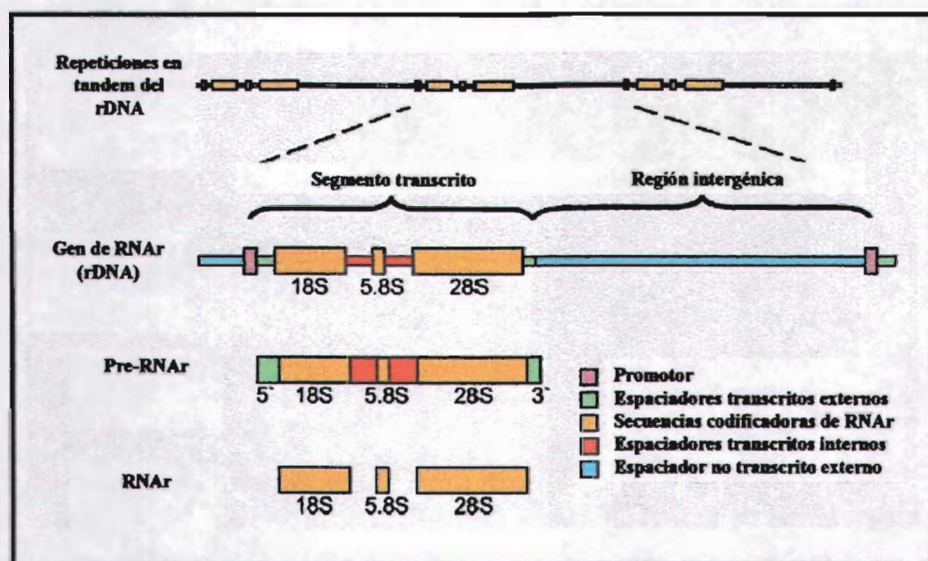


Figura 2. Esquema general del cistrón ribosomal eucariote y sus transcritos. Este locus se transcribe por RNA polimerasa I para sintetizar una sola molécula de RNA (pre-RNAr) que será procesada y modificada para dar origen a los RNAr maduros. El RNAr 5S se codifica en otro locus y se transcribe por pol III. Figura obtenida de Raska et al., 2004.

2.3.1 Unidad transcripcional mayor del RNAr (Cistrón ribosomal ó DNAr)

Los genes de RNAr (rDNA) tienen una organización repetida en tandem (cabeza-cola) de unidades transcripcionales de pre-RNAr separadas por espaciadores no transcritos (NTS). La unidad de pre-RNAr (**cistrón** ribosomal) contiene las secuencias codificadoras correspondientes a las moléculas maduras de 18S, 5.8S y 28S (o sus equivalentes), además de las secuencias de los espaciadores transcritos externos e internos que se transcriben como parte de la molécula de pre-RNAr, pero que se pierden durante la maduración. Una unidad transcripcional con su NTS adyacente constituyen una unidad repetida de DNAr (Mandal, 1984). La longitud de esta

unidad varia de ~10kb en levadura (Klootwijk et al., 1978) hasta ~40kb en mamíferos (Wellauer y David, 1973).

La transcripción del rDNA se lleva a cabo por la RNA polimerasa I en un sitio discreto del núcleo (el nucleolo), donde también se llevan a cabo la maduración de los RNAr y la biogénesis ribosomal (Raska et al., 2004).

Los cistrones ribosomales están reiterados en el genoma de todos los organismos eucariontes. Existen grandes variaciones en el número de genes de RNAr entre especies lejanas, pero también entre especies relacionadas e incluso entre diferentes cepas de la misma especie (ver Discusión).

En la mayoría de los eucariontes la agrupación de genes de RNAr se localiza en sitios específicos en uno o varios cromosomas: en levadura, la mayoría de los genes ribosomales se agrupan en un solo cromosoma; en *Drosophila*, se encuentran en los dos cromosomas sexuales (Ashburner y Novitsky, 1976), mientras que en el hombre se distribuyen en 5 cromosomas (Henderson et al., 1972). Por lo tanto, existe una enorme variación en la localización y el número de sitios cromosomales de los genes de RNAr a través de la evolución.

En algunos organismos, existen copias extra-cromosomales de DNAr. Se han documentado grandes cantidades de DNAr extra-cromosomal en los ovocitos de anfibios, peces e insectos; algunos eucariontes unicelulares también poseen esta característica, como por ejemplo, *Dictyostelium discoideum* (Cockburn et al., 1978) y *Tetrahymena* (Karrer y Gall, 1976). La producción de copias extra de DNAr es resultado de la replicación diferencial de estos genes en demanda de una alta producción de ribosomas.

2.3.1.1 Promotores del DNAr

La transcripción por RNA polimerasa I exhibe una actividad especie-específica, aunque esta característica no es absoluta. El promotor se localiza casi completamente en la región espaciadora no transcrita (NTS) entre las unidades transcritas. En la región de 50pb río arriba del sitio de iniciación (+1) habitualmente se encuentra el promotor central, necesario y suficiente para la iniciación de la transcripción basal de la mayoría de los organismos (Paule y White, 2000).

Generalmente, elementos y factores adicionales ayudan a ensamblar y a estabilizar al complejo formado en el promotor central. Un elemento clave es el elemento promotor río arriba (UPE), que se extiende entre 150-200 pb río arriba de +1 (Reeder, 1984). También existe un terminador de la transcripción proximal (río arriba del UPE) que protege al promotor de polimerasas “paseantes” (Bateman y Paule, 1988) y promueve la remodelación de la cromatina (Langst et al., 1998). El resto del NTS contiene elementos que incrementan la eficiencia de transcripción: enhancers y promotores espaciadores (Paule y White, 2000).

2.3.1.2 Ensamblaje del complejo de transcripción de RNA polimerasa I

En la mayoría de los organismos, sólo pol I (posiblemente con uno o dos factores fuertemente asociados) más un solo factor de unión al elemento promotor central son requeridos y suficientes para iniciar la transcripción. También puede haber interacción con factores de unión al UPE (Paule y White, 2000).

2.3.1.3 Terminación de la transcripción por RNA polimerasa I

Era generalmente asumido que el sitio de terminación de la transcripción por pol I se encuentra cercano a (ó dentro de) un grupo de residuos de Ts precedidos por una región de secuencia simétrica (palindrónica), esto en analogía con los sitios de terminación de genes procariontes y genes eucariontes transcritos por pol III (Mandal, 1988). Sin embargo se ha encontrado que la

corrida de Ts por si sola no es suficiente para la terminación de la transcripción por pol I, ya que algunos factores de terminación y/o las estructuras secundarias y terciarias del DNA alrededor de la región de terminación también son importantes para este proceso. Es de particular relevancia la proteína de unión a DNA TTF-I (en ratón; Reeder y Lang, 1997) y Reb1p (en levadura; Ju et al., 1990), quien se encarga de reclutar al factor liberador que cataliza la formación del extremo 3' del transcrito.

La región de secuencia simétrica (que consiste de cuatro a seis pb) antes mencionada, puede formar una estructura de tallo-asa justo antes del sitio de terminación. Este tipo de simetría está presente en varios organismos, como *Xenopus* (Sollner-Webb y Reeder, 1979) y *Drosophila* (Mandal y Dawid, 1981).

2.3.1.4 Maduración del pre-RNA_r

En el transcrito primario de pre-RNA_r se llevan a cabo una sucesión de modificaciones y reacciones de procesamiento que finalmente producen las especies maduras de RNA_r 18S, 5.8S y 28S. El transcrito inmaduro sufre una serie de cortes endo y exo-nucleolíticos dirigidos a regiones específicas del pre-RNA_r por estructuras secundarias, secuencias y/o proteínas unidas al mismo (Kressler et al., 1999).

El RNA ribosomal contiene las modificaciones de 2'-*O*-metilribosa y pseudouridina. Estas modificaciones poseen un patrón preciso en las especies maduras de RNA_r que se deben a la alta especificidad de las enzimas modificadoras de RNA dirigidas por snoRNAs (snoRNPs; Kressler et al., 1999).

2.3.1.5 RNA_r 5.8S

Uno de los productos del procesamiento del transcrito primario de pol I es una molécula de RNAr de ~160b con una estructura secundaria altamente apareada, el RNAr 5.8S (Hill et al., 1990).

Estudios de comparación de secuencias del RNAr 23S de *E. coli* y el RNAr 26S de levadura muestran 16 regiones de alta homología. Esta comparación también revela que el RNAr 5.8S eucarionte es la contraparte de la región 5' terminal del RNAr 23S de *E. coli* (Otsuka et al., 1983).

Existe evidencia directa de un papel funcional del RNAr 5.8S en la síntesis de proteínas: levaduras mutantes en esta molécula no tienen efecto en la iniciación, pero proveen evidencia de un papel en la elongación o terminación de la traducción. Las mutantes se caracterizaron por un incremento consistente del tamaño de los poli-ribosomas, así como niveles elevados de RNAr asociado a ribosomas (Abou Elela et al., 1994). En otro estudio con mutantes del RNAr 5.8S, se confirmó un defecto en el ciclo de elongación y se sugirió que el RNAr 5.8S tiene una participación directa en la translocación ribosomal (Abou Elela y Nazar, 1997).

2.3.2 RNAr 5S

El RNAr 5S se encuentra virtualmente en todos los ribosomas con excepción de las mitocondrias de algunos hongos, protistas y vertebrados (Gray et al., 1999). Su codificación genómica generalmente es en un locus diferente al cistron ribosomal y transcrito por la RNA polimerasa III. Tiene una longitud de ~120b. Su papel preciso en la función ribosomal no es totalmente entendido, aunque se ha sugerido que podría funcionar como transductor de señales entre el centro peptidil-transferasa y el dominio II ribosomal, responsable de la translocación (Dokudovskaya et al., 1996). También se ha propuesto como determinante de la estabilidad de la subunidad mayor (Khaitovich et al., 1999), además de participar en la fidelidad traduccional

(Smith et al., 2001) y en la biogénesis ribosomal (Ammons et al., 1999), especialmente durante los pasos finales del ensamblaje (Khaitovich y Mankin, 1999).

Todos los RNAr 5S conocidos, derivados de eubacterias, arqueas, eucariontes y organelos, se ajustan a una estructura universal, la cual puede doblarse en una estructura en forma de Y (Wildeman y Nazar, 1982) que consiste de 5 hélices (I-V), dos asas de estructuras tallo-asa (C y E), dos asas internas (B y D) y una región bisagra (A) (Szymanski et al., 2003. Fig. 3).

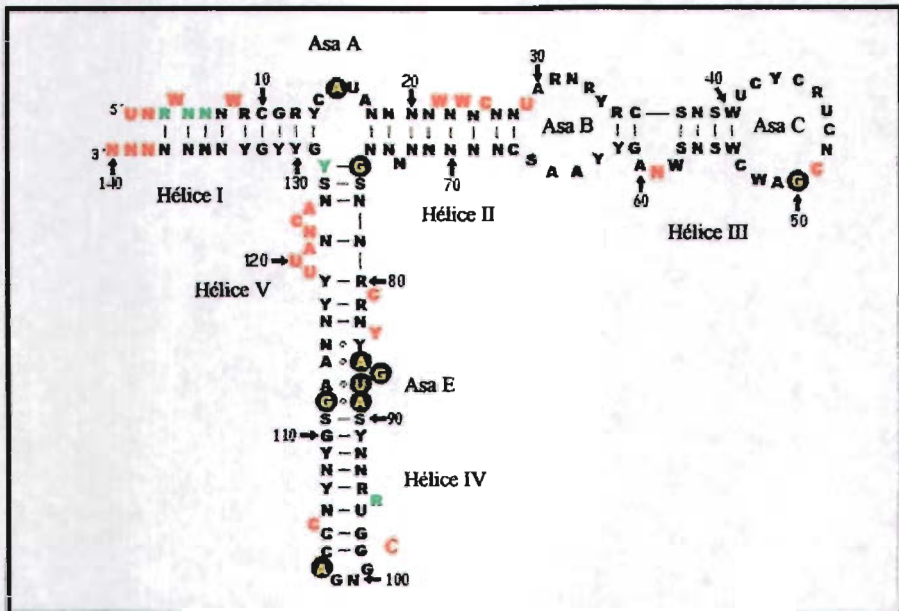


Figura 3: Estructura secundaria general del RNAr 5S de los organismos eucariontes. En verde se representan las posiciones donde puede haber deleciones; en rojo, donde puede haber inserciones. Las posiciones totalmente conservadas se muestran en círculos negros con letras amarillas. A= adenina, G= Guanina, C= Citosina, U= Uracilo, R= Purina, Y= Pirimidina, W= A ó U, S= G ó C, N= G, A, U ó C. Figura obtenida de la página web: www.man.poznan.pl/SSData/

La diferencia más notable entre el RNAr 5S bacteriano y el eucarionte es la estructura del asa interna E. En ambos casos, las regiones 5' y 3' de cadena sencilla (nominales) del asa, se aparean entre si formando una estructura tridimensional bien definida compuesta de apareamientos no canónicos. En eubacterias ambos lados del asa son iguales en longitud, mientras que en arquea y eucariontes la porción 5' es un nucleótido más larga que la 3', lo que

resulta en la asimetría de un solo nucleótido (Szymansky et al., 2003). El asa E es la única región que hace contacto significativo RNA-RNA con la hélice 38 del RNAr 23S (Nissen et al., 2001).

En la hélice I existen algunos apareamientos no canónicos G-U estabilizados por tres moléculas de agua (Betz et al., 1994). La hélice IV también presenta este tipo de apareamientos, de manera conjunta con una concentración de apareamientos G-C (Szymansky et al., 2003). La acumulación de apareamientos G-C y G-U en estas regiones de doble hélice puede relacionarse con el requerimiento de estabilidad y flexibilidad en la estructura del RNAr 5S (Delihias et al., 1984).

2.3.2.1 Promotores y transcripción por la RNA polimerasa III

La RNA polimerasa III se encarga de la transcripción de RNAs estructurales o catalíticos, que como regla, son de longitud menor a 400pb. Este límite de longitud está de acuerdo con las propiedades de la elongación de RNA polimerasa III que reconoce una simple corrida de Ts como señal de terminación (Schramm y Hernández, 2002).

Existen 3 tipos de promotores para pol III: dos que son internos a la región codificadora y generalmente son carentes de caja TATA (tipo I y II) y uno que es externo al gen y contiene una caja TATA (tipo III). Los genes 5S tienen promotores tipo I, los RNAt tienen promotores tipo II, mientras que algunos RNAs pequeños poseen promotores tipo III (Schramm y Hernández, 2002).

Los promotores de los genes del RNAr 5S, internos a la región codificadora, generalmente consisten de una caja A, un elemento intermedio (IE) y una caja C. Los tres elementos anteriores constituyen al promotor interno o región de control interna (ICR), reconocida por el factor de transcripción TFIIIA (Pieler et al., 1987; Lee et al., 1995). TFIIIA es capaz de reclutar

al factor de transcripción TFIIC. TFIIC recluta a TFIIB, quien finalmente coloca a pol III en el sitio de inicio de la transcripción (Schranun y Hernández, 2002). La transcripción del RNAr 5S se lleva a cabo en un sitio nuclear discreto, generalmente fuera del nucleolo (Carmo-Fonseca et al., 2000) pero cercano a los sub-compartimentos nucleares de almacenamiento de factores de transcripción conocidos como Cuerpos de Cajal (Murphy et al., 2002).

El extremo 5' del RNAr 5S maduro corresponde al del transcrito primario, mientras que 7 a 13 nucleótidos del extremo 3' son procesados por medio de una exonucleasa (Kressler et al., 1999). El procesamiento podría delimitarse por la estructura secundaria de la molécula del RNAr 5S, en especial por la hélice I (Lee y Nazar, 1997).

2.3.2.2 Interacciones proteicas del RNAr 5S

El RNAr 5S de eubacterias se asocia con tres proteínas ribosomales: L5, L18 y L25. Los ribosomas eucariontes presentan a un RNAr 5S asociado con una proteína: L3 en *Xenopus* y *Saccharomyces*, ó L5 en rata. Así se forma la partícula ribonucleoproteica 5S-RNP. La asociación del RNAr 5S con proteínas puede promover cambios conformacionales del RNAr 5S (Delihis et al., 1984 y Barciszewska et al., 2001).

Después de la transcripción, el RNAr 5S se exporta al citoplasma formando un complejo con TFIIA (7S-RNP), luego reingresa al núcleo en asociación con la proteína ribosomal L5. El RNAr 5S sólo puede importarse al núcleo en un complejo con L5, lo que asegura una estequiometría correcta entre el RNA y esta proteína ribosomal. La hélice III y el asa C del RNAr 5S son los blancos de unión de la proteína L5 (Szymansky et al., 2003).

En los eucariontes, la biosíntesis del RNAr 5S depende de la unión del factor de transcripción TFIIA a la región de control interno del gen del RNAr 5S. En los ovocitos de *Xenopus*, TFIIA se encuentra en un complejo con el RNAr 5S (7S-RNP) y sirve como partícula de

almacenamiento del RNAr 5S (Barciszewska et al., 2001). Una característica única de TFIIIA es su habilidad para reconocer específicamente al promotor del gen del RNAr 5S así como a su producto de transcripción, el RNAr 5S maduro (Cassiday y Maher, 2002). El factor de transcripción TFIIIA se compone de 9 dedos de zinc que son los encargados de la unión a DNA y a RNAr (Lu et al., 2003). Los primeros tres dedos (1-3) se encargan de la unión al DNA (Nolte et al., 1998), mientras que los dedos centrales (4-7) son responsables de la unión al RNAr 5S (Clemens et al., 1993).

En *Xenopus*, aproximadamente la mitad del RNAr 5S del ovocito está asociado con TFIIIA. La otra mitad está presente en la forma de 42S RNP (ó tesarisomas) que es una forma de almacenamiento masivo del RNAr 5S. Los tesarisomas consisten de dos proteínas: p50 (tesaurina) y p43 (tesaruina b) (Szymansky et al., 2003).

3. Antecedentes

En nuestro laboratorio se ha trabajado con genes ribosomales y se han estudiado algunas características del Cistrón Ribosomal (CR) de *Trichomonas vaginalis*, en el cual se codifican los RNAr 16S-like (título debido a su similitud con el RNAr 16S de *E. coli*), 5.8S (RNAr pequeño) y 28S. Otro RNAr pequeño que no se codifica en el CR es el RNAr 5S, el cual no se había estudiado en este organismo.

Los primeros intentos realizados en nuestro laboratorio para identificar al RNAr 5S de *T. vaginalis* fueron utilizando metodologías básicas de biología molecular: un ensayo de Southern blot genómico de *Trichomonas vaginalis* utilizando una sonda heteróloga (gen del RNAr 5S de *Trypanosoma cruzi*) no presentó señal. Otros intentos exhibieron resultados inesperados: cuando se separan las moléculas de RNA en un gel de acrilamida al 4%/Urea 7M se observan 3 bandas bien definidas (Fig. 4): una de ~160b, otra de ~120b y una de ~70b (en donde migran las

moléculas de RNA_t). Por su tamaño y alta concentración, se asumió que la banda de ~160b correspondía al RNA_r 5.8S, mientras que la de ~120b correspondía al RNA_r 5S. Para comprobar esto y estudiar al RNA_r 5S, estas moléculas se purificaron del gel por medio de elusión y se utilizaron en diversos ensayos.

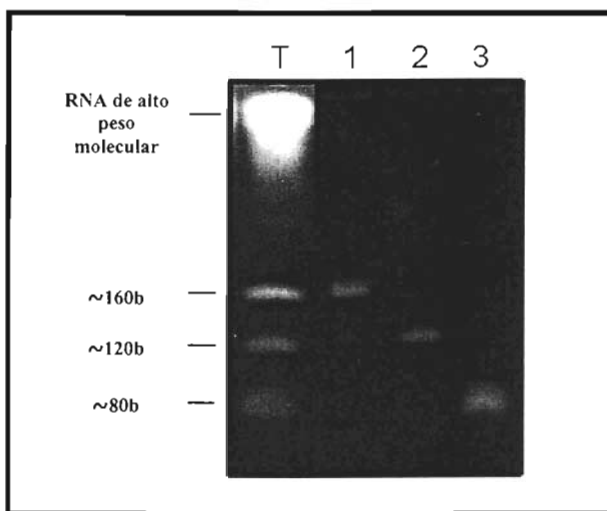


Figura 4. RNA de *T. vaginalis* separado en un gel de acrilamida 4%/Urea 7M que separa las moléculas pequeñas de RNA, teñido con bromuro de etidio. T: RNA total de *T. vaginalis*, se observan tres bandas de ~160, ~120 y ~80b. Las bandas anteriores se purificaron (por elusión) y se corrieron por separado en el gel. Carril 1: Banda de ~160b (RNA_r 5.8S), 2: Banda de ~120b y 3: Banda de ~70b (RNA_t).

Se comenzó por obtener cDNA a partir de la banda de ~120b purificada del gel de acrilamida, utilizando oligonucleótidos aleatorios (random primer). Este cDNA se utilizó directamente como sonda (homóloga) en un Southern blot genómico de *Trichomonas vaginalis*; en dicho ensayo se obtuvo señal a la altura de 6 kb. El fragmento de 6kb se clonó y secuenció, encontrando que correspondía al cistron ribosomal de *T. vaginalis*. La misma sonda (cDNA de la banda de ~120b) se utilizó en ensayos de "Dot blot" con las bandas del RNA_r de ~120 y

~160b purificadas de geles de acrilamida y fijadas en membranas de nylon; en estos ensayos se obtuvo hibridación para las dos bandas. Todos los ensayos se repitieron con una sonda de cDNA obtenida a partir de la banda de ~160b purificada del gel de acrilamida (RNAr 5.8S), obteniendo los mismos resultados que con la primera sonda.

Los resultados de los experimentos anteriores (realizados por la Dra. Ma. Elizabeth Álvarez Sánchez) indicaban la presencia de una molécula de secuencia similar o igual al RNAr 5.8S en las bandas de ~120 y ~160b del RNA total de *T. vaginalis*, mientras que con esta metodología no se encontraron indicios sobre la presencia de un RNAr 5S típico en *T. vaginalis*.

Mi trabajo de licenciatura abordó este problema con la siguiente hipótesis:

4. Hipótesis:

* *Trichomonas vaginalis* carece de un RNAr 5S típico y posee dos tipos de RNAr 5.8S que migran a la altura de ~160 y ~120b en geles desnaturalizantes de acrilamida.

5. Objetivos

Confirmar la presencia del RNAr 5.8S en la banda de ~120b del RNA total de *T. vaginalis* y la ausencia de un RNAr 5S canónico en este organismo. Sugerir las posibles implicaciones de lo anterior.

5.1 Objetivos particulares

1. Confirmar la presencia del RNAr 5.8S en la banda de ~120b por ensayos de secuenciación directa del RNA, RPA, "Primer extension" y RT-PCR.

2. Definir si el RNAr 5.8S que migra en la banda de $\sim 120\text{b}$ es corto en relación con el RNAr 5.8S que migra en la banda de $\sim 160\text{b}$, por ensayos de RPA y “Primer extension”.
3. Utilizar herramientas informáticas para evaluar la presencia del gen del RNAr 5S canónico en el genoma de *T. vaginalis*.
4. En caso de identificar una secuencia con similitud al RNAr 5S canónico de *T. vaginalis*, analizarla por métodos informáticos para identificar posibles regiones reguladoras de la transcripción. Realizar los experimentos adecuados para confirmar su expresión y características moleculares.

6. CAPÍTULO I. CARACTERIZACIÓN DEL RNAr 5S DE *Trichomonas vaginalis*.

6.1 Introducción:

En este capítulo se caracterizó el gen que codifica al RNAr 5S de *T. vaginalis*. Su identificación fue un trabajo difícil, pues los resultados preliminares de mi trabajo confirmaban lo observado por la Dra. Álvarez durante el trabajo previo (ver Antecedentes).

Se comenzó con ensayos de protección a RNAsas, “primer extension” y RT-PCR. Los resultados de los experimentos anteriores confirmaron la presencia de una molécula de secuencia similar o igual al RNAr 5.8S en la población molecular de la banda de ~120b (Capítulos II y III). Ante la incapacidad de identificar experimentalmente al RNAr 5S canónico de *T. vaginalis*, llegamos a pensar que no estaba presente en este organismo. De este modo, estudiamos más a fondo al RNAr 5.8S de *T. vaginalis*, pues muchas veces se utilizó como control en los experimentos para identificar al RNAr 5S, además de que era un buen candidato para sustituir la función molecular del RNAr 5S. Lo anterior nos llevó a identificar tres posibles conformaciones de la molécula además de otras características que se presentan en los Capítulos II y III.

Sin embargo, con una búsqueda *in silico* en la base de datos recién liberada del proyecto de secuenciación del genoma de *T. vaginalis*, se identificó una secuencia con las características propias de los genes 5S eucariontes. Esta secuencia se analizó detalladamente con métodos informáticos y se pudo identificar un posible promotor interno para RNA polimerasa III tipo I típico, junto con algunos elementos reguladores putativos río arriba y río abajo de la región codificadora. Lo anterior es uno de los datos más interesantes del trabajo, pues este tipo de promotores no se había estudiado en Trichomonatideos, mientras que los promotores para pol I y pol II ya se han reportado para estos organismos. Los promotores de pol III son secuencias

internas a la región codificadora de 5S, conocidas como Regiones de Control Internas ó ICR, que se componen a su vez de secuencias descritas como Caja A, Elemento Intermedio y Caja C.

Posteriormente se determinó que el RNAr 5S codificado en el gen recién identificado se expresa y migra a la altura de ~ 120 b en geles de RNA total de *T. vaginalis* (y por lo tanto co-migra con una molécula de secuencia similar o igual al RNAr 5.8S – ver Capítulo III). También se determinó la estructura secundaria putativa de la molécula con base en el modelo universal del RNAr 5S, así como el número de copias de sus genes, que se estimó en ~ 200 copias por célula.

Este trabajo está condicionalmente aceptado para su publicación a la revista “Molecular and Biochemical Parasitology”. Consideramos que constituye una contribución relevante a la comunidad científica por la identificación y caracterización del gen del RNAr 5S de *T. vaginalis*, así como la del primer promotor de RNA polimerasa III en Trichomonatideos. A continuación se presenta como tal:

THE 5S RIBOSOMAL RNA GENE IN THE EARLY DIVERGING PROTOZOA

Trichomonas vaginalis.

(El gen del RNAr 5S en el protozoario de evolución temprana *Trichomonas vaginalis*).

Autores: Ana Lilia Torres-Machorro, Roberto Hernández, Joaquín Sánchez, Imelda López-Villaseñor.

6.2

The 5S ribosomal RNA gene from the early diverging protozoa *Trichomonas vaginalis*.

Authors: Ana Lilia Torres-Machorro¹, Roberto Hernández¹, Joaquín Sánchez², Imelda López-Villaseñor^{1*}

Affiliation:

1: Departamento de Biología Molecular y Biotecnología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México. Apartado Postal 70-228, C.P. 04510, México D.F., México.

2: Facultad de Medicina, Universidad Autónoma del Estado de Morelos. Avenida Universidad 1001, Cuernavaca Morelos, C.P. 62210, México.

*Corresponding autor: Tel: +52-55-56223366; fax: +52-55-55500048. e-mail: imelda@biomedicas.unam.mx (I. López-Villaseñor).

Abbreviations: rDNA: ribosomal DNA; rRNA: ribosomal RNA; LSU: ribosomal Large Subunit; S: Svedberg sedimentation units; b: base; bp: base pairs; ICR: Internal Control Region; sse: start site element; upe: upstream promoter element.

Keywords: ribosome, RNA polymerase III, 5S rRNA, transcription termination, hairpin, protozoa, parasite.

Nucleotide sequence data reported in this paper is available in the GenBank™ database under the accession number DQ029070.

Trichomonas vaginalis is a parasitic amitochondriate protozoa, etiologic agent of human trichomonosis. Phylogenetic analyses based on rRNA and actin sequences place this organism among the earlier eukaryotic branches (1-3). This proposal is consistent with other trichomonad ribosomal features that are reminiscent of prokaryotes (4, 5).

The typical eukaryotic ribosome is composed of ribosomal RNA (rRNA) and proteins, organized into a large subunit (LSU, 60S) and a small subunit (SSU, 40S). The rRNA in the SSU is 18S, while the LSU contains the 28S, 5.8S and 5S type rRNAs. The 18S, 5.8S and 28S rRNAs are generally all encoded in a ribosomal main transcription unit and are transcribed by RNA polymerase I. In contrast, the 5S rRNA is transcribed by RNA polymerase III and is not generally linked to the rDNA unit (6). The 5S rRNA is found in almost every organism with the exception of some plant, fungi and protist mitochondria (7). The function of the 5S rRNA has not been entirely elucidated but it has important roles in translational fidelity (8), ribosome biogenesis (9), peptidyl-transferase activity and LSU stability (10).

In trichomonads the sedimentation coefficient of ribosomes is 70S (4) and the ribosomal SSU and 5.8S RNAs are smaller than in a typical eukaryote, thus trichomonads ribosomes have features of eubacterial ribosomes (5). How far this eubacteria-like nature of trichomonads ribosomes extends is not yet known. The most recent studies on the trichomonad ribosome have focused on the rDNA unit (5, 11) and little is known about structural similarity of the various rRNAs or their transcriptional signals. Of especial interest is the analysis of the genomic

organization and type of RNA polymerase involved in transcription of each of the rRNA species.

The aim of this work was to characterize the *T. vaginalis* 5S rRNA gene to determine its relatedness, in nucleotide sequence and in potential folding, to eukaryotic and bacterial 5S rRNAs. We also aimed at finding whether the 5S rRNA gene possessed a potential RNA polymerase III promoter. The latter was of particular interest because although RNA polymerase I and RNA polymerase II promoters for *T. vaginalis* have been documented (11, 12), no RNA polymerase III promoter has yet been identified in this early diverging organism.

Our initial but unsuccessful approach to identify the 5S rRNA gene in *T. vaginalis* involved biochemical and molecular biology techniques (13). During this time the partially assembled sequence for the *T. vaginalis* genome became accessible at *The T. vaginalis genome sequence project* (The Institute for Genomic Research, www.tigr.org/tdb/e2k1/tvg). An *in silico* search for the 5S rRNA gene was then carried out using the Blast program incorporated in the web page. Various 5S rRNA sequences from prokaryotic and eukaryotic organisms were used as probes (14). Blast search parameters were modified to reduce stringency. In this way about 30 contigs of the *T. vaginalis* genome were identified which contained potential 5S rRNA related sequences. Among these, two different repeated sequences (of 334 and 335 bases each) were identified and selected for further *in silico* analysis. In each repeat sequence a putative 5S rRNA coding region of 118 bp within a conserved region of 234 bp was found. The remaining intergenic region (101 bases) varied 39% between the two repeats (see Fig. 1A). The putative 5' and 3' ends of the mature *T. vaginalis* 5S rRNA molecule were *in silico*

assigned by alignment with 5S rRNA sequences and secondary structures from organisms of different phylogenetic groups (not shown). The rRNA gene sequence was experimentally confirmed in our laboratory by PCR amplification and sequencing of the cloned fragments (GenBank DQ029070) (see figure legend of Figure 2).

A further *in silico* analysis revealed a potential RNA polymerase III type I promoter within the *T. vaginalis* 5S rRNA gene (Fig. 1A). In this sequence, several putative promoter elements were identified; of special relevance was the presence of homologues to the Intermediate Element [IE: 5'-(C/G)NN(G/A)(G/A)N-3'] and to the Box A [5'-N(G/C)(C/T)(C/T)AANCNNNNNNN-3'] and Box C [5'-NNG(G/A)TGGGNG(T/A)CCN(C/T)NNG-3'] of the Internal Control Region (ICR) (15). The ICR has been identified as the binding site for transcription factor TFIIIA (16). In addition, we identified putative upstream regulatory elements similar to the start site element (sse: 5'-AAACTATC-3') and the upstream promoter element (upe: 5'-TGCG-3') from *Saccharomyces cerevisiae*. These motifs are involved in gene expression efficiency and have been shown to interact with transcription factor TFIIIB (17). Other sequence features found in the 5S rRNA gene from *T. vaginalis* which appear to be phylogenetically conserved among species include an A+T rich region at nucleotide -32 (TATA-like sequence), a G+C rich region centered at nucleotide -13 and a cytidylic acid residue at position -1 (17) (Fig 1A).

RNA polymerase III efficient transcription is highly dependent on proper termination (18). A four or more T residues cluster surrounded by GC-rich

sequences has been described as a signal to terminate transcription by RNA polymerase III (19). This run of Ts can contribute to initiation and reinitiation efficiency and may play a role in RNA polymerase recycling. In higher eukaryotes some protein factors, such as NF1, have been implicated in accurate termination and RNA polymerase III recycling (20). In this context the *T. vaginalis* 5S rRNA gene possesses two contiguous runs of 5 Ts (positions +119 and +126, immediately downstream from the last proposed coded base) that could function as termination elements (Fig. 1A). Furthermore, we noted a palindromic sequence at position +135 which can be *in silico* folded into a 10nt hairpin structure of high thermodynamic stability ($dG = -13.0$ kcal/mol) (Fig. 1A and 1C). Within this palindromic sequence we distinguished a sequence that resembles a NF1 binding site [5'-YTGGCANNNTGCCAR-3'] (20). The functionality of the putative regulatory elements mentioned above remains to be determined and is a current topic of study in our laboratory.

In most cases the 5S rRNA molecule has a well-conserved sequence and secondary structure. Regardless of its origin, this molecule can be folded into a Y shaped structure (21) consisting of five helices (I-V), two hairpin loops (C and E), two internal loops (B and D) and a hinge region (A), organized in a three helix junction (10). The 5' end of the mature 5S rRNA corresponds to that of the primary transcript (see 22 for review) while the 3' end undergoes a maturation process driven by an exonuclease trimming and controlled by the structure of helix I. This process can remove up to 13 extra nucleotides (23). Using Zuker's *mfold* software for prediction of RNA secondary structure (<http://www.bioinfo.rpi.edu/applications/mfold/old/rna>) (24, 25) the proposed *T. vaginalis* mature 5S rRNA was folded in accordance with the current

structure and maturation models just described (Fig. 1B). In this representation two important eukaryotic domains were noted: the stretches of conserved sequence -A-G-U-A-78, and -G-A-A-102 (21). Both domains are the most important Loop E constituents (characteristic of eukaryotic 5S rRNAs) involved in non-canonical base pairing (26) and RNA-RNA contact with the LSU rRNA (10). Therefore the *T. vaginalis* hypothetical 5S rRNA model fits well with existing structural models. It is worth to point out the remarkable amount of information contained in the 5S rRNA sequence that operates at two levels: a) 5S rRNA gene transcription regulation by RNA polymerase III and b) biological function of the transcribed sequence during ribosome biogenesis and the translation process.

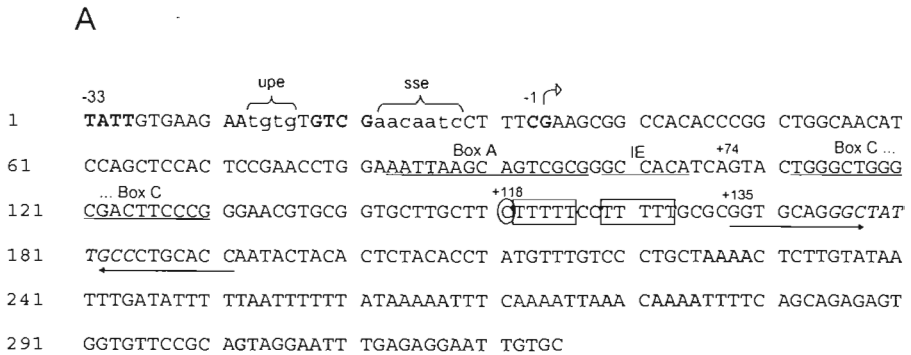
In order to relate the 5S rRNA gene to its transcribed product, total *T. vaginalis* RNA was electrophoresed in 7M urea 4% acrylamide gels. Three well defined bands of about 160, 120 and 80 bases were resolved which can be presumed to be the 5.8S rRNA (~160 b), the 5S rRNA (~120 b) and the tRNA population (~80 b) (Fig. 2A). A dot blot hybridization with RNA purified from the ~160b, ~120b and ~80b bands clearly established that the ~120b RNA band contains the 5S rRNA sequence (Fig. 2B).

The gene copy number of the 5S rRNA may vary widely in eukaryotes. It has been reported that this gene is often encoded in tandem arrays of about 250 copies in *C. fasciculata* (27), about 1600 copies in *Trypanosoma cruzi* (13) and about 20 000 copies in the *Xenopus* oocyte (28). The genomic organization of the *T. vaginalis* 5S rRNA gene was analyzed by Southern blot of *T. vaginalis* DNA partially digested with *Sma* I, (which cuts once in the 5S rRNA gene) and a 5S

rRNA RT-PCR fragment as probe (Fig. 2C). The ladder-like bands of hybridization evidence a tandem array of the 5S rRNA gene, encoded in repeats of about 335 bp. In order to estimate the gene copy number of the 5S rRNA a comparative quantitative hybridization assay was performed (Fig. 2C), which indicated about 200 copies of the 5S rRNA gene. This result was further validated by slot blot hybridization, which rendered very similar values (data not shown).

In conclusion, we have identified and characterized the 5S rRNA gene from *T. vaginalis* and shown that it resembles other eukaryotic 5S rRNAs, both in sequence and in the predicted secondary structure of the mature 5S rRNA molecule. The proposed regulatory elements for this sequence include an RNA polymerase III internal promoter and transcription termination motifs. To our knowledge this is the first potential RNA polymerase III promoter identified in trichomonatids.

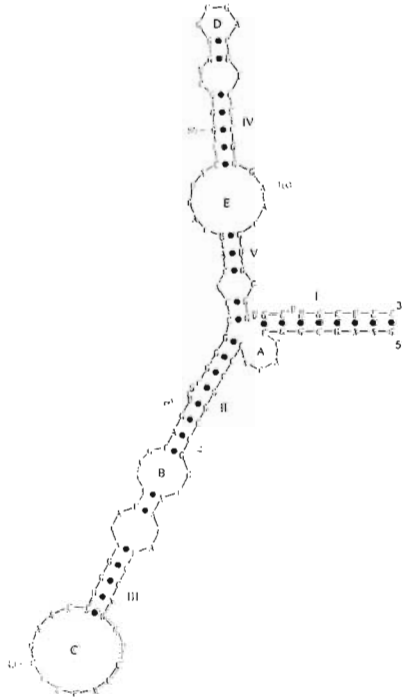
Figure 1A



A. *T. vaginalis* 5S rRNA gene and putative RNA polymerase III promoter elements within the coding region. The non-template chain is shown. The three conserved upstream regions of 5S rRNA genes are denoted in bold (an A+T rich element at position -32, G+C rich region at -13 and a C at -1) (17). The proposed first transcribed base (G) is marked with an empty-head arrow and the putative last nucleotide of the mature molecule is shown circled (C in position +118) (17). Small caps correspond to sequences similar to the *Saccharomyces cerevisiae* upstream promoter element (upe: 5'-TGCG-3') and start site element (sse: 5'-AACTATC-3') (17). Underlined sequences correspond to the putative RNA polymerase III type I internal control region (ICR): Box A [5'-N(G/C)(C/T)(C/T)AANCNNNNNNN-3'], intermediate element [IE: 5'-(C/G)NN(G/A)(G/A)N-3'] and Box C [5'-NNG(G/A)TGGGNG(T/A)CCN(C/T)NNG-3'] (15). The -AGUA- motif characteristic of eukaryotic 5S rRNA corresponds to positions +74 to +77. Empty boxes reckon T-runs as putative termination sequences (19). Black-head arrows indicate a palindromic sequence and, within this and in italics, a sequence similar to the nuclear factor 1 (NF1) binding site (5'-YTGGCANNNTGCCAR-3') (20).

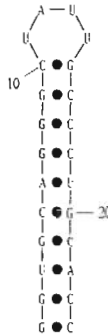
The first 234 bases were conserved between the two *T. vaginalis* 5S rRNA genes identified, while the remaining 101 bases varied 39% (not shown).

Figure 1B



B. Predicted mature *T. vaginalis* 5S rRNA secondary structure. Helices are denoted by roman numerals and loops are named by capital letters. ΔG of the secondary structure = -33.1 kcal/mol.

Figure 1C.



C. Predicted secondary structure of the hairpin formed with the palindromic sequence (positions +135 to +158) present in the *T. vaginalis* 5S rRNA gene. $\Delta G = -13.0$ kcal/mol. The sequences were folded with Zuker's *mfold* software (<http://www.bioinfo.rpi.edu/applications/mfold/old/rna>).

Figure 2

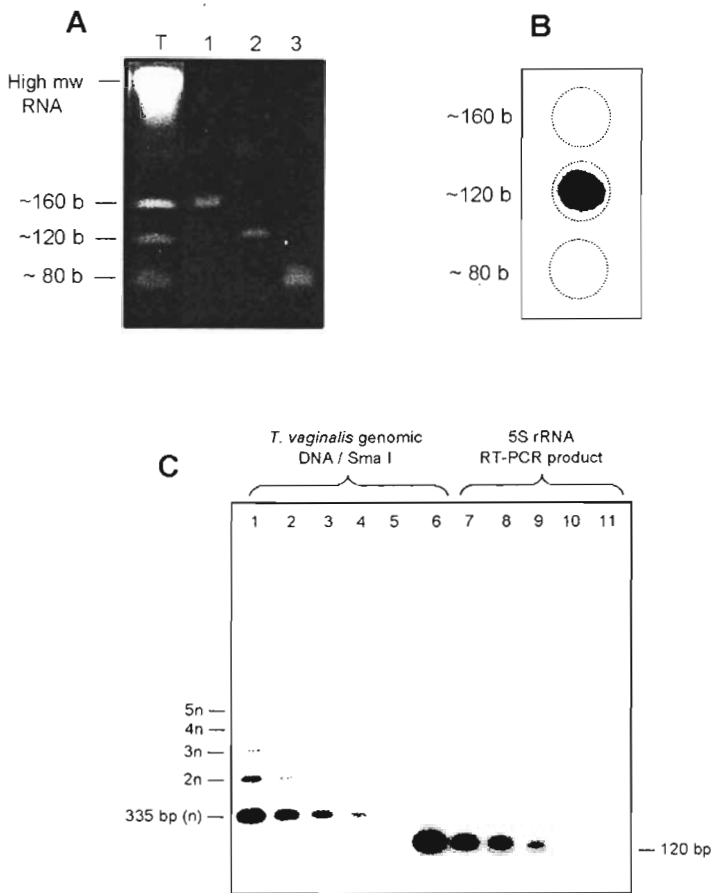


Figure 2. Genomic organization of the *T. vaginalis* 5S rRNA gene and its relation with a transcribed molecule.

A. Total RNA was extracted from *T. vaginalis* strain CNCD 147 as previously reported (29) and was electrophoresed in a 4% polyacrilamide 7M urea gel. Three small-size RNA fragments of about 160, 120 and 80 bases were clearly separated (lane T). These individual bands were cut and the RNA was eluted in

0.3% SDS, 0.14M NaCl, 0.05 M sodium acetate pH=5.2, during 4 hours at 37°C. The recovered material was electrophoresed to verify pureness (lane 1: ~160b RNA; lane 2: ~120b RNA; lane 3: ~80b RNA). *Trypanosoma cruzi* small rRNAs were used as molecular weight markers (30).

B. Dot-blot hybridization of the *T. vaginalis* small RNA molecules. 2 µg of the purified *T. vaginalis* small-size RNAs were spotted on a nylon membrane and hybridized with a 5S rRNA specific probe. The hybridization signal shows that the ~120b RNA fragment is related to the 5S rRNA sequence. The 5S rRNA specific probe was generated as follows: a 215 bp PCR fragment was amplified from *T. vaginalis* DNA using the following oligonucleotides: 5S-1: 5'CGAACAAATCCITTCGAAGCG3' and 5S-2: 5'AAGAGTTTTAGCAGGGACAA3'. The 215 bp PCR product was cloned and sequenced. As a control, a northern blot was performed using total *T. vaginalis* RNA separated in an agarose gel, as previously reported (29). The only hybridization signal obtained with the 5S probe was with a band of about 120 bases among the small RNA species (data not shown).

C. 5S gene organization and reiteration. This approach was performed as previously described (5) with slight modifications. Briefly, genomic DNA from *T. vaginalis* partially digested with *Sma*I (which cuts only once per 5S repeat) was separated on a 0.8% agarose gel (lanes 1-5: 750, 375, 200, 100 and 50 ng respectively). Decreasing amounts of a 5S rRNA RT-PCR product were loaded on the same gel (lanes 6-11: 0.37, 0.186, 0.046, 0.0232 and 0.0116ng). This 116b 5S rRNA RT-PCR product represents one 5S rRNA copy and was obtained with oligonucleotides 5S-F: 5'AAGCGGCCACACCCGGCTGG3' and 5S-R:

5' AAGCAAGCACCGCACGTTCC3 using the TernoScript Reverse Transcriptase (Invitrogene) for the synthesis of the cDNA strand and the purified 5S rRNA molecule as the template. The PCR amplified product was cloned and sequenced. A Southern assay was performed as described (31) using ammonium acetate as transfer buffer (32). The 5S rRNA RT-PCR fragment was radioactively labeled and used as probe. The hybridized blot was scanned with the Molecular Imager FX system/Quantity One software (Bio Rad). A lineal correlation was obtained between the DNA concentration and the radioactive counts for each band: for example, the hybridization signal in 87.9 ng of total DNA is the same as in 0.059 ng of the single copy 5S RT-PCR fragment (data not shown). These data indicate that the 5S rRNA gene is present in about 200 copies in the *T. vaginalis* genome, if a value of 2.5×10^7 bp is assumed as the size of the *T. vaginalis* genome (33).

Acknowledgements

The authors thank Ana María Cevallos for helpful discussions; Lorena López-Griego, Juliana Herrera and Patricia de la Torre for technical support. This work was supported by grants P45037-Q from CONACYT and IN209302 from PAPIIT, UNAM. Preliminary sequence data was obtained from The Institute for Genomic Research through the website at <http://www.tigr.org> where sequencing of the genome of *T. vaginalis* was accomplished with support from A Co-Operative Agreement Award (U01AI050913).

References:

1. Sogin ML. Early evolution and the origin of eukaryotes. *Curr Opin Genet Dev* 1991;1:457-63.
2. Gunderson J, Hinkle G, Leipe D, et al. Phylogeny of trichomonads inferred from small-subunit rRNA sequences. *J Eukaryot Microbiol* 1995;42:411-5.
3. Bricheux G, Brugerolle G. Molecular cloning of actin genes in *Trichomonas vaginalis* and phylogeny inferred from actin sequences. *FEMS Microbiol Lett* 1997;153:205-13.
4. Champney WS, Chittum HS, Samuels R. Ribosomes from trichomonad protozoa have prokaryotic characteristics. *Int J Biochem* 1992;24:1125-33.
5. Chakrabarti D, Dame JB, Gutell RR, Yowell CA. Characterization of the rDNA unit and sequence analysis of the small subunit rRNA and 5.8S rRNA genes from *Tritrichomonas foetus*. *Mol Biochem Parasitol* 1992;52:75-83.
6. Drouin G, Moniz de Sa M. The concerted evolution of 5S ribosomal genes linked to the repeat units of other multigene families. *Mol Biol Evol* 1995;12:481-93.
7. Gray MW, Burger G, Lang BF. Mitochondrial Evolution. *Science* 1999;283:1476-81.
8. Smith MW, Meskauskas A, Wang P, Sergiev PV, Dinman JD. Saturation mutagenesis of 5S rRNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 2001;21:8264-75.
9. Khaitovich P, Mankin A. Effect of antibiotics on large ribosomal subunit assembly reveals possible function of 5S rRNA. *J Mol Biol* 1999;291:1025-34.
10. Szymanski M, Barciszewska MZ, Erdmann VA, Barciszewski J. 5S rRNA: structure and interactions. *Biochem J* 2003;371:641-51.
11. López-Villaseñor I, Contreras AP, López-Griego L, Álvarez-Sánchez E, Hernández R. *Trichomonas vaginalis* ribosomal RNA: analysis of the intergenic region and mapping of the transcription start point. *Mol Biochem Parasitol* 2004;137:175-9.
12. Vanacova S, Liston Dr, Tachezy J, Johnson P. Molecular biology of the amitochondriate parasites, *Giardia intestinalis*, *Eutamoeba histolytica* and *Trichomonas vaginalis*. *Int J Parasitol* 2003; 33:235-55.
13. Hernández-Rivas R, Martínez-Calvillo S, Romero M, Hernández R. *Trypanosoma cruzi* 5S rRNA genes: molecular cloning, structure and chromosomal organization. *FEMS Microbiol Lett* 1992;92:63-8.
14. Szymanski M, Barciszewska MZ, Erdmann VA and Barciszewski J. 5S ribosomal RNA Database. *Nucleic Acids Res* 2002;30:176-8.

15. Pieler T, Hamm J, Roeder RG. The 5S gene internal control region is composed of three distinct sequence elements, organized as two functional domains with variable spacing. *Cell* 1987;48:91-100.
16. Schramm L, Hernandez N. Recruitment of RNA polymerase III to its target promoters. *Genes Dev* 2002;16:2593-620.
17. Lee Y, Wong WM, Guyer D, Erkin A, Nazar RN. *In vivo* analysis of upstream promoter sequence elements in the 5S rRNA gene from *Saccharomyces cerevisiae*. *J Mol Biol* 1997;269:676-83.
18. Lee Y, Melekhovets YF, Nazar RN. Termination as a factor in "quality control" during ribosome biogenesis. *J Biol Chem* 1995; 270:28003-5.
19. Cozzarelli NR, Gerrard SP, Schlüssel M, Brown DD, Bogenhagen DF. Purified RNA polymerase III accurately and efficiently terminates transcription of 5S rRNA genes. *Cell* 1983;34:829-35.
20. Wang Z, Bai L, Hsieh Y, Roeder RG. Nuclear factor 1 (NF1) affects accurate termination and multiple-round transcription by human RNA polymerase III. *EMBO J* 2000;19:6823-32.
21. Wildeman AG, Nazar RN. Structural studies of 5S ribosomal RNAs from a thermophilic fungus, *Thermomyces lanuginosus*. *J Biol Chem* 1982;257:11395-404.
22. Kressler D, Linder P, De la Cruz J. Protein *trans*-acting factors involved in ribosome biogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 1999;19:7897-912.
23. Lee Y, Nazar RN. Ribosomal 5S rRNA maturation in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 1997;272:15206-12.
24. Zuker M. *Mfold* web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic Acids Res* 2003;31:2406-15.
25. Mathews DH, Sabina J, Zuker M, Turner DH. Expanded sequence dependence of thermodynamic parameters improves prediction of RNA secondary structure. *J Mol Biol* 1999; 288:911-40.
26. Wimberly B, Varani G, Tinoco IJ. The conformation of loop E of eukaryotic 5S ribosomal RNA. *Biochemistry* 1993;32:1078-87.
27. Kock J, Cornelissen AWMA. The 5S ribosomal RNA of *Crithidia fasciculata*. *Mol Biochem Parasitol* 1990;38:295-98.
28. Wolffe AP. The role of transcription factors, chromatin structure and DNA replication in 5S rRNA gene regulation. *J Cell Sci* 1994;107:2055-63.
29. Espinosa N, Hernández R, López-Griego L, López-Villaseñor I. Separable putative polyadenylation and cleavage motifs in *Trichomonas vaginalis* mRNAs. *Gene* 2002;289:81-6.

30. Galvan SC, Castro C, Segura E, Casas L, Castaneda M. Nucleotide sequences of the six very small molecules of *Trypanosoma cruzi* ribosomal RNA. *Nucleic Acids Res* 1991;19:2496.
31. Southern EM. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol* 1975;98:503-17.
32. Rigaud GF, Grange T, Pietet R. The use of NaOH as transfer solution of DNA onto nylon membrane decreases hybridization efficiency. *Nucleic Acids Res* 1987;15:857.
33. Wang AL, Wang CC. Isolation and characterization of DNA from *Tritrichomonas foetus* and *Trichomonas vaginalis*. *Mol Biochem Parasitol* 1985; 14:323-35

7. CAPÍTULO II. CARACTERIZACIÓN DEL RNAr 5.8S DE *Trichomonas vaginalis*

7. 1 Introducción:

Como se indica en el capítulo I, los primeros experimentos dirigidos a la identificación del RNAr 5S de *T. vaginalis* indicaban la presencia de una molécula similar o igual al RNAr 5.8S en la banda de RNA de ~120b, sin rastro del RNAr 5S que se buscaba. Los ensayos de secuenciación directa del RNA y de “primer extension” estaban dirigidos al estudio del RNAr 5S, mientras que el RNAr 5.8S sólo se utilizaba como control. Los resultados no presentaban señal de un RNAr 5S típico, mientras que eran claros para el RNAr 5.8S control, confirmando algunas características ya descritas para dicha molécula en la banda de ~160b. En este capítulo se presentan los datos que se obtuvieron para el RNAr 5.8S mientras se intentaba caracterizar al RNAr 5S, además se describen otras características que se estudiaron de manera particular para el RNAr 5.8S (estructura secundaria, conformaciones estructurales alternativas y número de copias génicas) para así tener una noción más actual de la composición ribosomal del organismo de escala evolutiva temprana *T. vaginalis*.

En nuestro laboratorio se clonó y secuenció una copia del Cistrón Ribosomal (CR) de *Trichomonas vaginalis* (clona p921). El Cistrón Ribosomal codifica a las moléculas de RNAr 16S-like, 5.8S y 28S de *T. vaginalis*; estas se sintetizan en un solo transcrito mediante la RNA polimerasa I (Mandal, 1984). Dicho producto de la transcripción se procesa por cortes endo y exo-nucleolíticos, se modifica por metilación y pseudo-uridilación para dar origen a los RNAr maduros: 16S, 5.8S y 28S (Kressler et al., 1999).

El RNAr 5.8S es una molécula de estructura secundaria compleja, con ~160 nt de longitud, que forma parte de la subunidad mayor ribosomal eucarionte (Hill et al., 1990). Su función principal parece ser la translocación ribosomal durante la traducción (Abou Elela y Nazar, 1997): este proceso involucra un cambio en la conformación tridimensional del ribosoma que

resulta en su movimiento a lo largo del RNAm después de la formación de cada enlace peptídico (Nelson y Cox, 2005).

7.2 Metodología y resultados:

7.2.1 Secuenciación directa del RNAr 5.8S

La secuenciación directa de las bandas de RNAr de ~ 120 y ~ 160 b fue la primera estrategia para tratar de identificar al RNAr 5S de *T. vaginalis*, molécula que no se había podido identificar en ensayos previos (ver Antecedentes).

Esta metodología se basa en la digestión parcial de las moléculas de RNAr (purificadas y marcadas radiactivamente en su extremo 5') con la RNasa específica: RNasa T1 que corta antes de Guanina (G). La separación de esta digestión parcial en un gel de secuencia indica la secuencia de Gs de la molécula marcada.

La metodología anterior se aplicó a las moléculas de RNAr que migran a la altura de ~ 120 y ~ 160 b en geles desnaturizantes de acrilamida, esperando obtener la secuencia de Gs del RNAr 5.8S en la banda de ~ 160 b y del RNAr 5S en la banda de ~ 120 b. Lo anterior no resultó como se esperaba, pues aunque con la banda de ~ 160 b se obtuvo la secuencia del RNAr 5.8S, con la banda de 120b no se obtuvo ninguna señal (razón por la cual este dato no se muestra, ver Discusión). A continuación se muestra la obtención de la secuencia de Gs del RNAr 5.8S de *T. vaginalis*, resultado que confirma la reportada por secuenciación del cistrón ribosomal de *T. vaginalis*.

Para esta metodología se extrajo RNA total de *Trichomonas vaginalis* (Ver sección 11, Protocolo A) y se separó en un gel preparativo de acrilamida 4%/Urea 7M. Se cortaron las

bandas de RNAr de ~ 160 b y de ~ 120 b, se eluyeron y se precipitaron (Protocolo B). Se comprobaron su pureza y concentración en un gel de acrilamida (Fig. 5) y por absorbancia a 260/280 nm (Tabla I. Protocolo B, paso 11).

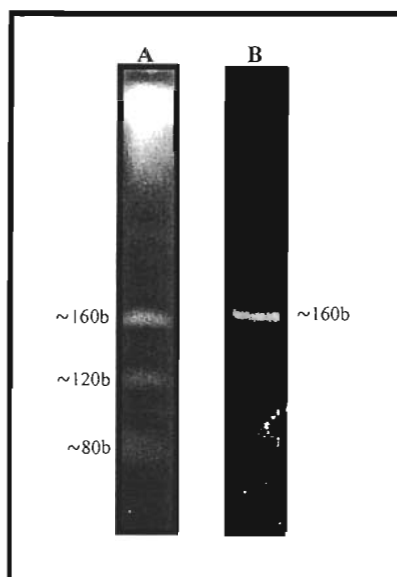


Figura 5. RNA total de *T. vaginalis* y purificación de la banda de ~ 160 b. A: RNA Total de *T. vaginalis* separado en gel de acrilamida 4%/Urea 7M, teñido con Bromuro de Etidio-DEPC. B: Banda de ~ 160 b purificada por elución del gel (A) y separada en un gel de iguales condiciones que el anterior.

Muestra	Abs 260	Abs 280	260/280	concentración
5.8S 25.11.03	0.073	0.059	1.3	1.46 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$

Tabla I. Determinación de la concentración y pureza del RNAr 5.8S (purificado) con base en su absorbancia a 260/280nm. El valor de la absorbancia a 260nm multiplicado por 40 y dividido entre 2 (número de μl cuantificados) corresponde a la concentración de la muestra en $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. La tasa de absorbancias 260/280 corresponde al valor de pureza de la muestra, que es más pura entre más se acerque a 1.6.

Una vez que se purificó el RNAr 5.8S, se desfosforilaron 250 pmoles de extremos 5' del RNAr 5.8S utilizando la fosfatasa alcalina de becerro CIAP (Protocolo C). El RNA desfosforilado se fosforiló con P^{32} en el extremo 5' utilizando el kit "RTS T4 Kinase Labeling System" (Protocolo D), el cual utiliza a la cinasa T4 para transferir el fósforo γ del $\gamma\text{-P}^{32}$ ATP al extremo 5' desfosforilado de las moléculas de RNAr. Se utilizaron 25 pmoles de $\gamma\text{-P}^{32}$ ATP para fosforilar 250 pmoles de extremos 5' del RNAr 5.8S.

El RNAr 5.8S marcado radiactivamente en su extremo 5' (*5.8S) y desnaturalizado por temperatura (50°C) se sometió a una reacción de digestión parcial con la RNasa T1 del kit de secuenciación de RNA Ambion (Protocolo E), la cual corta específicamente RNA de cadena sencilla antes de Guaninas (Gs). Las reacciones llevadas a cabo fueron las siguientes:

- a) Control : Reacción de secuenciación de 200 ng de *5.8S sin RNasa T1
- b) T1 1u: Reacción de secuenciación de 200 ng de *5.8S con 1u de RNasa T1
- c) T1 0.1u: Reacción de secuenciación de 200 ng de 5.8S con 0.1 u de RNasa T1
- d) Hidrólisis alcalina: Digestión parcial inespecífica del *5.8S utilizando un buffer alcalino a alta temperatura (95°C durante 2-8 minutos) para obtener una escalera de bandas como referencia para identificar las posiciones relativas de las Gs en el 5.8S.

Los productos de las reacciones anteriores se separaron en un gel de secuencia (acrilamida 10%/Urea 7M- Protocolo F). Posteriormente el gel se expuso a una placa de rayos X por 2 días y se reveló. (Fig. 6)

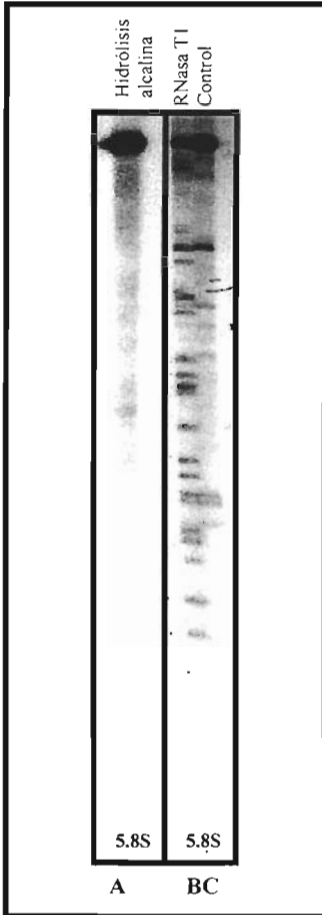


Figura 6. Secuencia directa del RNAr 5.8S de *Trichomonas vaginalis*. Las digestiones se separaron en un gel de acrilamida 10%/Urea 7M (Protocolo F). A: Hidrólisis alcalina del RNAr *5.8S. B: Digestión T1 0.1u del RNAr *5.8S (La digestión T1 1u no se muestra porque no se observó señal debido a la digestión completa de la molécula). C: Control del RNAr *5.8S sin RNasa T1.

Con este experimento se obtuvo una secuencia parcial de Gs del RNAr 5.8S, esto debido a que los extremos de la molécula no pudieron resolverse en el gel de secuencia. Esta secuencia se comparó con la secuencia del RNAr 5.8S de *T. vaginalis* obtenida en nuestro grupo a partir de una clona genómica del CR. Se obtuvo un alineamiento perfecto del nucleótido 16 al 153 (Fig. 7) con base en los extremos putativos del RNAr 5.8S maduro.

capítulo III sección 8.2.2. Ítem el extremo 5' del RNAr 5.8S se había descrito de forma teórica mediante la comparación de secuencias, mientras que aquí se demuestra de forma experimental.

El “primer extension” se basa en el alineamiento de un oligonucleótido (marcado radiactivamente en su extremo 5') con el extremo 3' del RNAr purificado de la banda de ~120 ó ~160b, y su extensión con transcriptasa reversa. El producto de extensión marcado se separa en un gel de secuencia de manera conjunta con la secuencia génica del 5.8S para identificar la primera base del RNAr 5.8S maduro (banda de ~160b) y de la molécula de ~120b (Fig. 8, Protocolo G).

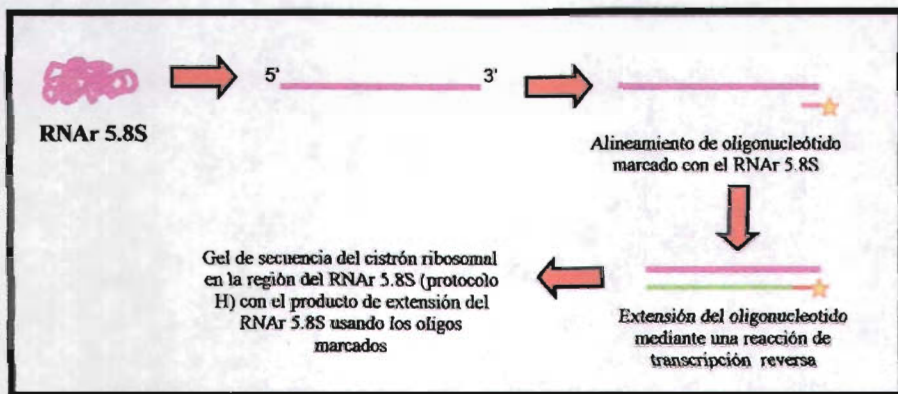


Figura 8. Metodología de extensión del oligonucleótido para determinar la primera base del RNAr 5.8S maduro.

El oligonucleótido utilizado se obtuvo a partir de la secuencia del CR obtenida en el laboratorio, el cual alinea con el extremo 3' putativo del RNAr 5.8S. Dicho oligo se llama 58S-2 y tiene la secuencia: 5'GATGTAGTACTGTACAC3'. 200ng de este oligonucleótido se marcaron radiactivamente en su extremo 5' (*58S-2) según el protocolo de fosforilación antes mencionado (Protocolo D). *58S-2 se alineó con el RNAr 5.8S purificado (o con el RNAr de la banda de ~120b) y se extendió utilizando la transcriptasa reversa SuperScript II (Protocolo B), hasta la caída de la misma (que es cuando se termina el templado, es decir, en el extremo 5' del RNAr 5.8S).

El producto de extensión se separó en un gel de secuencia (Protocolo F) de manera conjunta con la reacción de secuencia tipo “Sanger” de la clona del CR, utilizando el mismo oligonucleótido del “primer extensión”, 58S-2 (Figura 9. Protocolo H).

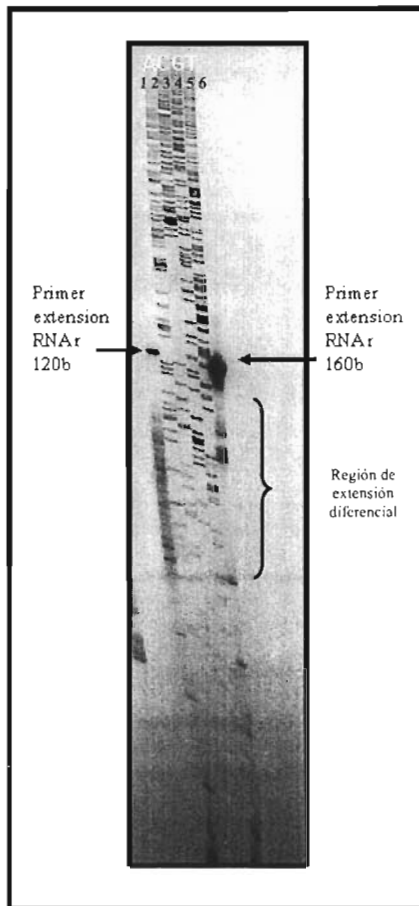


Figura 9. Ensayo de “primer extension” del RNAr 5.8S y del RNAr que migra a la altura de ~120b utilizando el oligonucleótido *58S-2. Ambos ensayos se corrieron de manera conjunta con la secuencia de DNA del gen del RNAr 5.8S. 1: se observa la extensión de la molécula de RNAr de la banda de ~120b; los carriles A (2), C (3), G(4) y T(5) corresponden a la secuencia del DNAr 5.8S. 6: extensión del RNAr 5.8S. El primer carril (1) se explica a detalle en el capítulo III.

En la figura 9 se observan varios paros en la extensión de la cadena de DNA complementaria al RNAr 5.8S, posiblemente por la estructura secundaria compleja del templado (RNAr 5.8S). Sin embargo, se observa un producto de extensión predominante (flecha) que corresponde al extremo 5' de la molécula. Al comparar la posición de dicha banda con la secuencia del CR en la región del RNAr 5.8S se observó que el extremo 5' del RNAr 5.8S corresponde a una Adenina (A), base que se había reportado por homología como el extremo 5' de la molécula (Figura 7; Katiyar et al., 1995).

7.2.3 Conformaciones alternativas del RNAr 5.8S de *T. vaginalis*

Este ensayo y los dos consecutivos se enfocaron a la caracterización del RNAr 5.8S por sí mismo, sin ser control para la caracterización del RNAr 5S.

En el ratón se identificaron dos tipos de RNAr 5.8S al separar esta molécula en geles desnaturalizantes de acrilamida (Lo et al., 1984). Estas especies se componen a su vez de 3 conformaciones que se pueden observar bajo condiciones electroforéticas cuidadosas (15V por 20h) en geles nativos de acrilamida al 15% (Smith et al., 1984). Las últimas resultan de la metilación diferencial de las moléculas de RNAr 5.8S de *mus musculus*. Las dos primeras especies sugieren la presencia de genes heterogéneos del 5.8S. Esta diversidad de moléculas ribosomales con la misma secuencia podría tener implicaciones en la regulación de la síntesis de proteínas (ver Discusión).

Al observar los geles desnaturalizantes de RNA total de *T. vaginalis*, a simple vista, no se distinguen dos tipos de RNAr 5.8S como ocurre en ratón (Esto se discute en el Capítulo III). Sin embargo, el análisis del RNAr 5.8S en geles nativos de acrilamida, revela que la banda de RNAr de ~160b (purificada de geles desnaturalizantes de acrilamida) se compone de otras dos conformaciones del RNAr 5.8S.

Para observar ambas conformaciones, el RNAr 5.8S se purificó de la banda de ~160b de un gel desnaturalizante de acrilamida (Fig. 5. Protocolo B). La población de RNAr 5.8S purificado se separó en un gel nativo de acrilamida al 15% (Protocolo I), a 15V por 32h (Fig. 10), condiciones que pueden separar conformaciones estructurales de las moléculas.

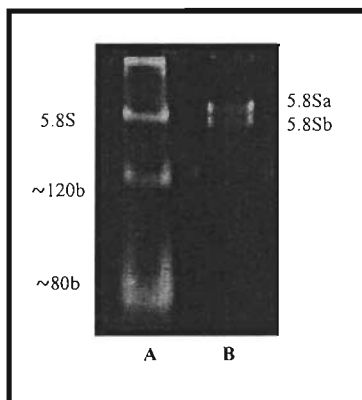


Figura 10. Conformaciones alternativas del RNAr 5.8S de *T. vaginalis*. Gel nativo de acrilamida 15% teñido con Bromuro de etidio. A: RNA total de *T. vaginalis*. B: RNAr 5.8S purificado de un gel desnaturalizante; se pueden observar las dos conformaciones del 5.8S: a y b.

En la figura 10 se observan dos conformaciones del RNAr 5.8S: 5.8Sa y 5.8Sb; las cuales podrían deberse a diferentes patrones de metilación, como ocurre en ratones, o bien al cambio de una o más bases en la región codificadora del gen. La presencia de dos secuencias diferentes del RNAr 5.8S podría promover interacciones terciarias alternativas y por lo tanto, variabilidad en las conformaciones tridimensionales de las moléculas.

Se utilizó el programa BLAST para identificar secuencias relacionadas con el CR en el proyecto de secuenciación del genoma de *T. vaginalis* (www.tigr.org/db/c2kl/tvg). Con el programa DNAMAN se analizaron dichas secuencias del cistrón ribosomal (no ensambladas), identificando una sola variación entre las copias del gen del RNAr 5.8S: en algunas copias, en la

posición 124, la G se sustituye por T (Fig. 7). Como se observa en la siguiente sección (7.2.4), la variación en la región codificadora del RNAr 5.8S (Fig. 7) se encuentra en el tallo F de la estructura secundaria putativa de la molécula (Fig. 11). Esta variación provocaría la pérdida de la interacción G-C del tallo F (flecha en Fig. 11), lo que a su vez desestabilizaría a la molécula, o bien, provocaría otro tipo de interacción intramolecular tridimensional que alteraría su estructura y por lo tanto su migración en geles nativos de acrilamida.

7.2.4 Estructura secundaria del RNAr 5.8S

La identidad de la estructura secundaria de las moléculas de RNAr sugiere fuertemente que llevan a cabo funciones equivalentes en ribosomas eucariontes y procariontes. La obtención de la estructura secundaria de nuestra molécula de estudio, de acuerdo con un modelo universal de la misma, puede distinguirla de pseudogenes, normalmente presentes en los genomas de organismos eucariontes.

Se han propuesto varios modelos generales para la estructura secundaria del RNAr 5.8S de organismos eucariontes (Nazar et al., 1975; Luoma y Marshall, 1978 y Ursi et al., 1983), sin embargo, el modelo “universal” que abarca el nivel procarionte y eucarionte, se logró en 1984 por Vaughn y colaboradores (Vaughn et al., 1984). Dicho modelo se basa en la construcción de una estructura secundaria “probada filogenéticamente”, esto es, para que una hélice se “compruebe” debe de contener un número determinado de cambios compensatorios en las bases del tallo cuando se comparan diferentes especies (Noller et al., 1981). Además, este modelo toma en cuenta las interacciones del RNAr 5.8S con el RNAr 28S durante la función ribosomal.

Con base en el modelo anterior se propone una estructura secundaria para el RNAr 5.8S de *Trichomonas vaginalis* (Protocolo U; Fig. 11).

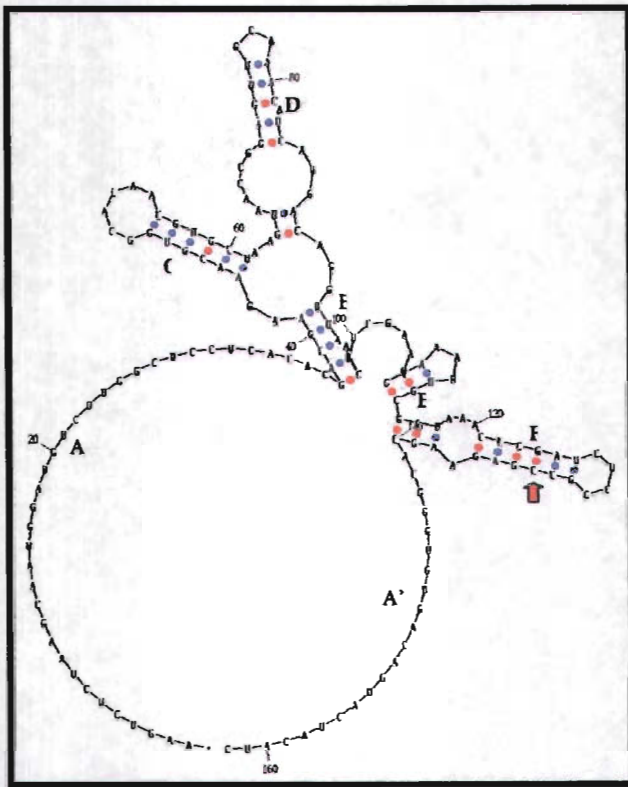


Figura 11: Estructura secundaria propuesta para el RNAr 5.8S de *Trichomonas vaginalis*. Este modelo se obtuvo utilizando el programa *Mfold* de Zuker (Mathews et al., 1999 y Zuker, 2003) y el modelo universal del RNAr 5.8S de Vaughn y colaboradores. B-C representan los tallos conservados de la molécula. A y A' son las regiones de interacción con el RNAr 28S. En general, a región A' interactúa con el extremo 5' del 28S, mientras que la región A interactúa con una porción más interna del extremo 5' del RNAr 28S; por lo anterior, estas regiones se muestran desapareadas en el modelo universal. La energía libre de esta estructura es de $\Delta G = -6.18$ kcal/mol. La flecha indica la posición de la región codificadora donde puede ser identificada la variación entre las copias del RNAr 5.8S y por lo tanto en las interacciones secundarias y terciarias de la molécula (G 124).

Con la secuencia primaria del RNAr 5.8S de *T. vaginalis* se pudo obtener la estructura secundaria putativa, lo que confirma su identidad y conservación evolutiva. La energía libre de esta molécula es de $\Delta G = -6.18$ kcal/mol, este valor se encuentra dentro del rango reportado para estructuras secundarias del RNAr 5.8S (Vaughn et al., 1984), sin embargo, estos valores podrían tener una relevancia limitada debido a que la estabilidad de las hélices dentro del ribosoma se afecta por interacciones con proteínas y otros RNAr.

El hecho de que la estructura secundaria del RNAr 5.8S de *T. vaginalis* se ajuste al modelo “universal” apoya la idea de que regiones moleculares de estructura similar o idéntica se utilizan universalmente en interacciones intermoleculares (Vaughn et al., 1984).

A) Determinación del número de copias del Cistrón Ribosomal

La redundancia genética es una característica propia de los genes ribosomales implicada en su regulación (Mandal, 1984), por lo que la determinación del número de copias del CR, y por lo tanto del RNAr 5.8S es importante para la caracterización del mismo. Esta determinación se puede relacionar con el número de copias del gen del RNAr 5S (ver Capítulo I), lo que podría estar implicado en el mantenimiento de los niveles equimolares nucleares de RNAr, necesarios para una síntesis de ribosomas que esté de acuerdo con las necesidades fisiológicas de la célula (ver Discusión).

Para determinar la reiteración genética del CR, se utilizó un ensayo que se basa en estimar el porcentaje del genoma de *T. vaginalis* que corresponde a las secuencias del CR (Chakrabarti et al., 1992). Para esto, se hizo un Southern blot genómico de *T. vaginalis* (Protocolo K) en donde se utilizaron varias concentraciones de DNA genómico de *T. vaginalis* (Protocolo J) digerido totalmente con EcoRI (enzima que corta sólo una vez por copia del CR). Se incluyeron en el gel muestras con concentraciones variables de 1 sola copia del CR (plásmido p921 digerido con EcoRI para observar el inserto de 6331 kb que corresponde al CR completo). Posteriormente, el DNA se transfirió a una membrana de Nylon y se fijó con luz UV (Protocolo J).

Para el Southern se utilizó como sonda una copia completa del CR de *T. vaginalis* (Protocolo L). Este fragmento se marcó radiactivamente con α -P³² dCTP utilizando el kit Rediprime (protocolo M). Se utilizaron 625 000 cpm de la sonda del CR para hibridar al DNA de la membrana antes

mencionada. La membrana se lavó y se expuso a una placa de FX. Las bandas obtenidas se cuantificaron con el software “Quantity One – Biorad” (Fig. 12 y Tabla II).

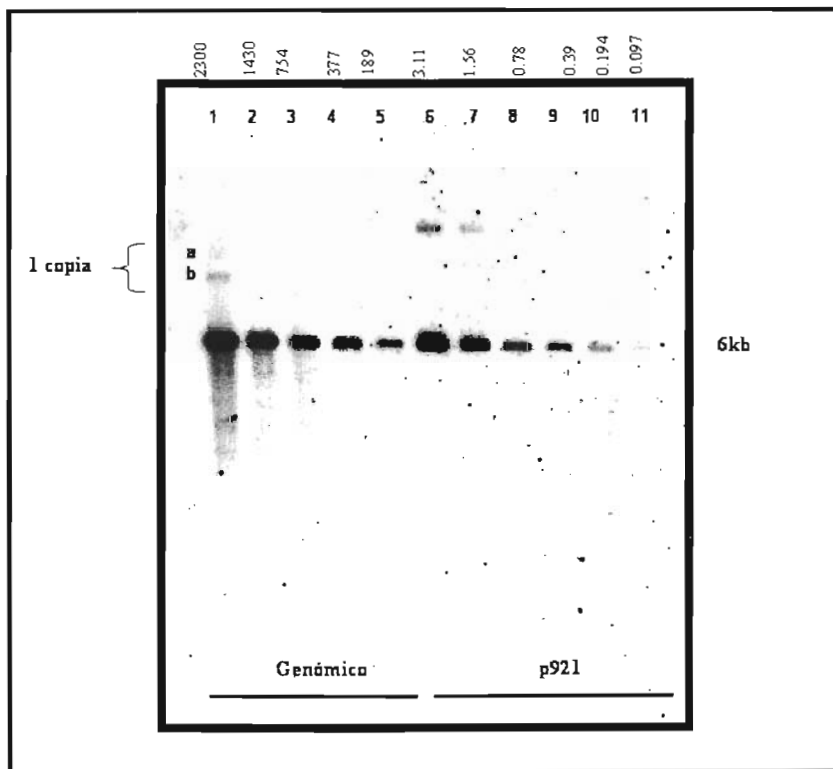


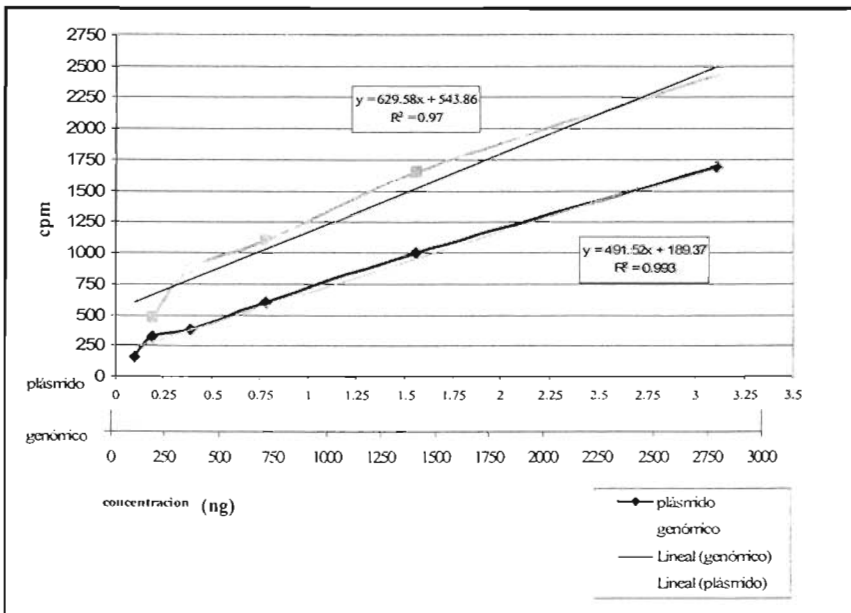
Figura 12. Southern blot para determinar el número de copias del Cistrón Ribosomal de *Trichomonas vaginalis*. La sonda utilizada fue la secuencia completa del cistrón ribosomal de *T. vaginalis* (6331pb). Los carriles 1-5 son varias concentraciones de DNA genómico de *Tv* (la concentración se indica en ng en la porción superior de la figura) digerido completamente con *EcoRI*. Los carriles 6-11 corresponden al plásmido p921 digerido con *EcoRI* para obtener el inserto que corresponde a una copia del cistrón ribosomal; las concentraciones que se indican arriba son los ng de inserto cargado. Las bandas “a” y “b” corresponden a los extremos de las repeticiones en tandem del cistrón ribosomal, cuya densidad óptica en conjunto representa el valor de una copia del CR.

DNA genómico(ng)	cpm	Banda "a"	Banda "b"	cpm totales
2872	2147.92	100.91	176.76	2425.59
1432	1463.80	69.40	118.31	1651.51
754	982.99	41.93	68.91	1093.82
377	801.71	26.72	44.97	873.39
189	473.89	0.00	0.00	473.89

Plásmido p921 (ng)	cpm
3.11	1687.87
1.56	1001.95
0.78	602.55
0.39	381.65
0.194	318.28
0.097	157.45

Tabla II: Cuantificación de las bandas del Southern blot de la figura 12 en el programa QuantityOne-Biorad. Los valores se expresan en cpm.

Los datos obtenidos (Tabla II) se graficaron para obtener dos ecuaciones de la línea recta correspondientes a los valores del DNA genómico y a 1 copia del CR (Gráfica I).



Gráfica I. Gráfica de la concentración (ng) vs cpm de la Tabla II. Se presentan la ecuación de la línea recta para los datos del DNA genómico y del plásmido. Se observan dos ejes de las "x" correspondiente a cada una de las funciones (DNA genómico o del plásmido), pues comparten valores en el eje "y" mas no en el "x".

Con los valores anteriores y las ecuaciones de la línea se obtuvo una equivalencia entre la señal del DNA genómico y la de 1 copia del CR: por ejemplo: 1100 cpm corresponden a 1.85 ng de plásmido y a 883 ng de DNA genómico. La tasa $1.85/883 = 0.002098$ representa la proporción del genoma que corresponde al Cistrón ribosomal de *T. vaginalis*. De este modo, si el genoma de *T. vaginalis* se ha estimado en 2.5×10^7 pb (Wang y Wang, 1985), concluimos que 52450 pb están relacionadas al cistrón ribosomal. Si el Cistrón ribosomal mide 6331 pb, el número de copias de este gen es: $52450/6331 = 8.28$. Este análisis se repitió con varias equivalencias desde 1650 cpm hasta 900 cpm y los resultados confirman lo anterior: el genoma de *T. vaginalis* posee una reiteración genética del CR de ~ 8 .

Por otro lado, observamos un par de bandas extra a la banda predominante en la digestión completa del DNA genómico con EcoRI (bandas a y b en Fig. 12). Debido a la naturaleza del corte de EcoRI (1 vez por repetición) se asumió que estas dos bandas corresponden a los extremos de las repeticiones en tandem, en una de las cuales se codifica 60% del CR de la primera repetición, y en la otra el 40% de la última. Estas 2 bandas también se cuantificaron y la suma de los dos valores se asumió como 1 copia del CR. Este control interno de una copia se comparó con el valor total de la banda de 6kb (+ 1 copia, la de la orilla) para obtener un estimado de las copias genómicas del CR:

Al observar la Tabla II vemos que la suma de las cpm de la banda a + banda b (con 2872ng de DNA genómico): $100.91+176.76 = 277.67$ corresponde al valor de 1 copia del CR. Las cpm de todas las copias genómicas del CR son: $2147.92+277.67 = 2425.59$. Entonces, si una copia vale 277.67 cpm, y todas las copias valen 2425.59, ¿Cuánto valen todas las copias? La respuesta es: $2425.59/277.67 = 8.7$. Con base en este resultado, que no requiere el conocimiento del tamaño del genoma de *T. vaginalis*, y al anterior, proponemos que las copias génicas del CR de este protozooario son alrededor de 8 por célula.

Cabe resaltar que el proyecto de secuenciación del genoma de *T. vaginalis* se encuentra en su etapa final, sin embargo, el tamaño del genoma aún no se ha definido. Wang, en 1985, propuso un tamaño aproximado de 2.5×10^7 pb (Wang y Wang, 1985), mientras que los últimos reportes de la página web www.tigr.org proponen un tamaño de 1.6×10^8 pb, tamaño que parece exagerado tomando en cuenta el nivel evolutivo del parásito. En cambio, el reporte de Wang concuerda con nuestros resultados sobre el número de copias del CR. Con base en el control interno del experimento anterior obtenemos un tamaño del genoma de *T. vaginalis* equivalente al que se obtiene con el ensayo de porcentaje del genoma utilizando 2.5×10^7 pb. Si utilizáramos el tamaño del genoma propuesto por el proyecto de secuenciación, las repeticiones se aproximarían a 60, resultado que no es consistente con nuestros datos.

8. CAPÍTULO III: IDENTIFICACIÓN DE DOS ESPECIES PUTATIVAS DE RNAr 5.8S

EN *T. vaginalis*.

8.1 Introducción:

Durante los primeros intentos por identificar al RNAr 5S de *T. vaginalis* (ver Antecedentes) sólo se pudo reconocer una molécula de secuencia similar o igual al RNAr 5.8S que migraba en la banda de ~120b (banda correspondiente al RNAr 5S, ver Capítulo I). El RNAr 5S permaneció sin identificarse por un tiempo, pues la señal del RNAr 5.8S en la banda de ~120b desvió nuestra atención hacia su caracterización. Finalmente se identificó y caracterizó el RNAr 5S (capítulo I), y se determinó que la banda de ~120b se compone de una población mixta de RNAr (este capítulo).

Para tratar caracterizar al RNAr 5.8S presente en la banda de ~120b se utilizaron diversos enfoques:

- A) Ensayo de Protección a Ribonucleasas (RPA)
- B) Primer extension
- C) RT-PCR

Los resultados de los ensayos anteriores y de los dos capítulos anteriores, nos llevaron a la conclusión de que la banda de ~120b del RNAr total de *T. vaginalis* se constituye de una población mixta de RNAr formada por el RNAr 5S canónico y una molécula de secuencia similar o igual al RNAr 5.8S. Esto querría decir que *T. vaginalis* posee varias especies de RNAr 5.8S: las dos conformaciones estructurales mencionadas en el capítulo II; y otra especie más que co-migra con el RNAr 5S a la altura de ~120b, especie que se analiza en este capítulo.

8.2 Metodología y resultados:

8.2.1 Ensayo de protección a RNAsas

La identificación de una molécula de secuencia similar al RNAr 5.8S (además del RNAr 5S canónico) en la banda de ~120b nos llevó a pensar que podría ser una molécula de RNAr 5.8S corta en relación a la molécula predominante de la banda de RNAr de ~160b. Para comprobar esto se hizo un ensayo de protección a RNAsas que nos permite distinguir ligeras diferencias de tamaño entre las moléculas analizadas utilizando sondas de secuencia específica.

Brevemente, el ensayo consiste en sintetizar una sonda de RNA radiactiva de secuencia complementaria a la molécula que se quiere estudiar, en este caso el RNAr 5.8S. Si la molécula a estudiar hibrida con la sonda, entonces la sonda será protegida de la degradación por RNAsas específicas de RNA de cadena sencilla, es decir, se degradará la región de la sonda que no hibride con el RNA muestra.

Este ensayo se llevó a cabo utilizando el Kit de RPA de Ambion que se describe en el Protocolo P. El ensayo de RPA consta de tres pasos: 1) Transcripción *in vitro* de la sonda (Protocolo O) 2) Hibridación de la sonda con el RNAr blanco 3) Digestión del RNA de cadena sencilla (Protocolo P).

La sonda anti-sentido para analizar el RNAr 5.8S de *Trichomonas vaginalis* consiste de una molécula de RNA que codifica a una región del Cistrón ribosomal que inicia en el nucleótido 1444 de la región codificadora del 16S y termina en el extremo 3' del RNAr 5.8S (Fig. 13). Este RNA sonda anti-sentido se sintetiza a partir de un templado de PCR que contiene al promotor de la RNA polimerasa del fago T7 (azul claro, Fig. 13).

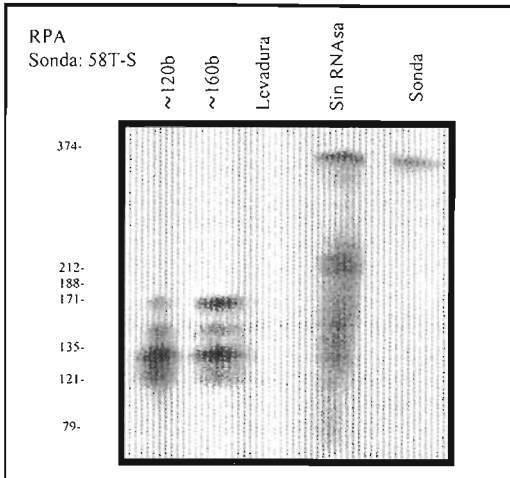


Figura 14: Ensayo de protección a RNAsas. Los RNAr purificados de las bandas de 120 y 160b (58S) del RNA total de *T. vaginalis* se hibridaron con la sonda radiactiva anti-sentido, 58T-S, que abarca la secuencia del cistron ribosomal desde extremo 3' del RNAr 16S-like hasta el extremo 3' del RNAr 5.8S. Los productos de hibridación se digirieron con RNasas y se separaron en un gel de acrilamida al 4%/Urea 7M. Los productos de protección de ambos RNAs muestra fueron de ~160b, mientras que la sonda sin digerir media 374pb (carril sonda). El carril de Levadura se refiere al ensayo del RPA con RNAt de levadura como RNA muestra (control negativo de hibridación, y por lo tanto, positivo de digestión con las RNasas). El carril "sin RNasa" indica el tratamiento completo del RPA sin digestión con RNasas.

Como se observa en la figura 14, la sonda 58T-S se protegió de igual forma con el RNAr purificado de las bandas de ~160 y ~120b. El RPA es un ensayo muy eficaz para analizar sutiles diferencias de secuencia; el patrón de protección para ambos RNAr muestra, utilizando la misma sonda secuencia-específica, es igual; lo que significa que en la banda de ~120b existe una molécula de secuencia similar o igual al RNAr 5.8S. Del mismo modo, el máximo tamaño de protección para ambos RNAr muestra fue el mismo: ~160b, lo que sugiere que en la banda de ~120b migra una molécula de secuencia similar o igual al RNAr 5.8S que podría tener una estructura tridimensional tal que provoque su migración a la altura de ~120b en geles desnaturalizantes (tal vez por modificaciones covalentes de la misma), separándose de la población predominante de RNAr 5.8S en la banda de ~160b.

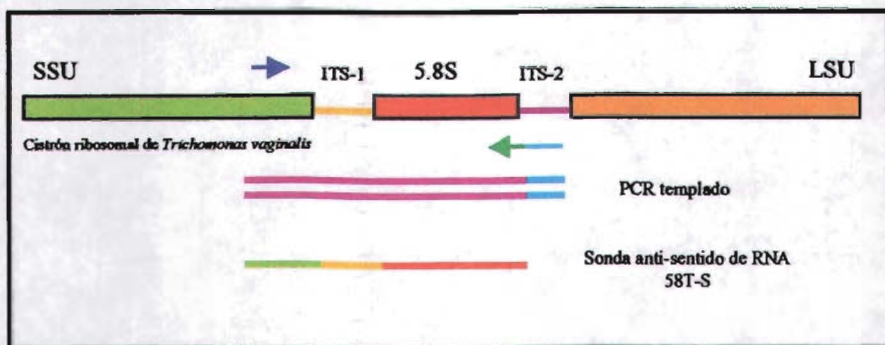


Figura 13. Diagrama de la obtención del molde de PCR para la transcripción *in vitro* de la sonda anti-sentido utilizada en el ensayo de protección a ribonucleasas. El oligonucleótido reverse complementario utilizado para la síntesis del molde de PCR, que será el molde del ensayo de transcripción *in vitro*, contiene al promotor de la RNA polimerasa del fago T7 (20pb en azul claro) además de la secuencia reversa complementaria del extremo 3' del gen del RNAr 5.8S (flecha verde oscuro; oligo 58S-T7). Dicho promotor servirá para la síntesis *in vitro* de un RNA de secuencia complementaria al RNAr 5.8S estudiado (sintetizado *in vivo*). El oligo directo alinea con una región 133 pb río arriba del extremo 3' del RNAr 16S-like (azul oscuro; oligo SSU-1). Por lo tanto, el molde para la síntesis de RNA *in vitro*, obtenido por PCR, de 394pb (rosa con promotor T7 azul-Protocolo N) codifica para una molécula de RNA antisentido de 374pb (verde-amarillo-rojo). Este diagrama no está a escala.

La transcripción *in vitro* se hizo utilizando el molde de PCR arriba mencionado y el kit de transcripción *in vitro* MaxiScript de Ambion (Protocolo O). Se sintetizó una sonda de RNA radiactiva de 374b (Sonda Fig. 13), la cual se hibridó con el RNAr purificado de la banda de ~160b (5.8S; como control positivo) y con el RNAr aislado de la banda de ~120b. Se utilizó RNA total de levadura como control negativo de protección (Protocolo P). Los productos de hibridación se digirieron con una mezcla de RNAsas A y T1 para degradar el RNA de cadena sencilla. Los productos protegidos se separaron en un gel de acrilamida al 4%/Urea 7M (Fig. 14).

8.2.2 “Primer extension”

Para confirmar que la molécula de secuencia similar o igual al RNAr 5.8S que migra en la banda de $\sim 120\text{b}$ tiene el mismo tamaño que el RNAr 5.8S que migra en la banda de $\sim 160\text{b}$, se realizó un ensayo de “Primer extension” utilizando el mismo oligonucleótido específico del extremo 3' del RNAr 5.8S para realizar la extensión.

El mismo ensayo que se realizó para determinar la primera base del RNAr 5.8S maduro del capítulo II (Fig. 9) se hizo utilizando como templado para la extensión el RNAr purificado de la banda de $\sim 120\text{b}$. Como se observa en la Figura 9 del capítulo II, el mismo oligonucleótido que extiende al RNAr 5.8S, extiende a una molécula de la población que migra a la altura de $\sim 120\text{b}$ (Ver Fig. 9 del capítulo II. El primer carril (1) del ensayo es la extensión de la molécula purificada de la banda de $\sim 120\text{b}$ del RNA total de *T. vaginalis*). El punto máximo de extensión para las dos moléculas es el mismo, lo que sugiere que la población de RNA que migra a la altura de ~ 120 y $\sim 160\text{b}$ (5.8S) en un gel de acrilamida es del mismo tamaño y contiene moléculas que comparten secuencia en su extremo 3', pues pueden ser extendidas por el mismo oligonucleótido específico del RNAr 5.8S.

Este resultado podría sugerir contaminación del RNAr 5.8S en la banda de $\sim 120\text{b}$, sin embargo, se observa un patrón de extensión diferencial en la región inferior a la máxima extensión del ensayo para ambos RNAr muestra (Fig. 9). Esto es, el bandeo correspondiente a la extensión de los RNAr muestra (~ 120 y $\sim 160\text{b}$), es diferente entre la molécula que se extiende del RNAr 5.8S contra la que se extiende de la población que co-migra con el RNAr 5S. Este resultado nos lleva a proponer una conformación alternativa del RNAr 5.8S: una molécula de estructura terciaria diferente a la población mayor del RNAr 5.8S, tal vez por modificaciones covalentes, cuya estructura tridimensional provoca su migración anómala de manera conjunta con el RNAr 5S, aún siendo de $\sim 160\text{b}$.

El bandeo diferencial entre los dos RNAr estudiados puede deberse a que la estructura tridimensional de las dos moléculas es diferente, es decir, que algunas regiones de interacciones secundarias o terciarias de la molécula pueden provocar diferentes tipos de restricciones al avance de la transcriptasa reversa durante la extensión del oligonucleótido. Lo anterior provocaría diversos paros en la síntesis del cDNA, lo que a su vez se observaría en bandas de extensión más pequeñas a la extensión total.

8.2.3 RT-PCR

Para complementar los datos anteriores, se hizo RT-PCR (ensayo de amplificación por reacción en cadena de la polimerasa utilizando un templado obtenido por transcripción reversa) utilizando como templado el RNA purificado de las bandas de ~ 120 y ~ 160 b, y oligonucleótidos específicos del RNAr 5.8S.

El ensayo de RT-PCR consiste en obtener una cadena de DNA complementaria al RNA estudiado (cDNA) utilizando un oligonucleótido de secuencia reversa complementaria al extremo 3' del RNA a estudiar, en este caso, el RNAr 5.8S de *T. vaginalis*. El cDNA se obtiene por una reacción de transcripción reversa utilizando la transcriptasa reversa "TermoScript", que es una enzima resistente a altas temperaturas, lo que le permite sintetizar el cDNA a partir de RNAs con estructura secundaria compleja, como los son los RNAr. El cDNA que se obtiene se utiliza como templado para una reacción de PCR (Protocolo Q). En este caso se utilizaron los oligonucleótidos que alinean con los extremos de la molécula madura del RNAr 5.8S.

La primera cadena (cDNA) se obtuvo con el oligonucleótido 58S-2 (alineado con el extremo 3' del RNAr 5.8S), para después hacer el PCR con 58S-1 (alineado con el extremo 5' del gen del RNAr 5.8S) y 58S-2 (Protocolo Q). El producto de amplificación esperado, de 160b, se observó para

ambos templados. Estos resultados confirman la presencia de una molécula de secuencia similar o igual al RNAr 5.8S en la banda de 120b (Fig. 15).

Como controles negativos para el ensayo de RT-PCR se utilizaron las moléculas de RNAr purificadas S3 y S5 de *Trypanosoma cruzi*. Se obtuvo una señal muy ligera de amplificación para la molécula S3, que es la homóloga al RNAr 5.8S en *T. cruzi*, mientras que con S5 (homóloga al RNAr 5S) no se obtuvo ninguna banda (Fig. 15).



Figura 15. Ensayo de RT-PCR para las moléculas de RNAr de ~ 120 y ~ 160 b con secuencia similar o igual al RNAr 5.8S de *T. vaginalis*. Para todos los ensayos se utilizaron los mismos oligonucleótidos (58S-2 y 58S-1) y las mismas condiciones de PCR. Los RT-PCR de la figura utilizaron como tempado a: 1: RNAr de la banda de ~ 120 b de *T. vaginalis*. 2: RNAr 5.8S de *T. vaginalis* (control positivo, banda de ~ 160 b). 3: RNAr S3 de *Trypanosoma cruzi*. 4: RNAr S5 de *T. cruzi* (control negativo). 5: Marcador de peso molecular: λ -Hind III .

Con este ensayo confirmamos los resultados anteriores, es decir, en la banda de RNA de ~ 120 b migra una molécula de secuencia similar o igual al RNAr 5.8S predominante de *T. vaginalis* (confirmado por ensayos de Dot blot, datos no mostrados). La molécula de RNAr S3 de *Trypanosoma cruzi* dio una ligera señal, lo que no es extraño, pues es el homólogo del RNAr 5.8S de *Trichomonas vaginalis*. S5 de *T. cruzi* no tuvo amplificación, pues es una molécula que no tiene relación en secuencia con el RNAr 5.8S.

9. Discusión:

La hipótesis de este trabajo es que *T. vaginalis* es un organismo carente de un RNAr 5S típico y que posee dos especies moleculares relacionadas al RNAr 5.8S que migran a la altura de ~160 y ~120b en geles desnaturalizantes de acrilamida. Los resultados mostrados indican que el primer postulado es incorrecto, ya que se logró la identificación tanto del gen como de la molécula de RNAr 5S. Sin embargo, el segundo postulado de la hipótesis se cumple, esto es, que en la banda de ~120b migra una molécula de secuencia similar o igual al RNAr 5.8S de *T. vaginalis*. Hay que aclarar que en la banda de ~120b del RNA total de *T. vaginalis* co-migran una molécula de secuencia similar o igual al RNAr 5.8S y el RNAr 5S típico de *Trichomonas vaginalis*.

En este trabajo se logró identificar al gen que codifica al RNAr 5S de *Trichomonas vaginalis*. Mediante un análisis *in silico* de la secuencia de dicho gen se identificó un promotor putativo de RNA polimerasa III. Este promotor, interno a la región codificadora del gen del RNAr 5S, se compone de elementos típicos de los promotores tipo I para pol III: una Caja A, un Elemento Intermedio y una Caja C. Este dato es de relevancia, pues se han descrito promotores para pol I y pol II en Trichomonatideos, mientras que ésta es la primera descripción de un promotor putativo de RNA polimerasa III en estos organismos. Además del promotor para pol III, se identificaron otros elementos reguladores putativos interesantes: i) Una caja TATA-like, río arriba de la región codificadora, la cual no es totalmente necesaria para la síntesis del RNAr 5S en *S. cerevisiae* (Braun et al., 1992), pero que puede funcionar incrementando la eficiencia de transcripción en algunos organismos (Schramm y Hernández., 2002). ii) Los elementos reguladores sse y upe, río arriba al ICR, cuyas secuencias son semejantes a las encontradas en *S. cerevisiae*. Estos elementos de regulación afectan dramáticamente la expresión del RNAr 5S en levadura (Lee et al., 1997). iii) Dos corridas de 5 Ts (separadas por dos bases) en la región terminadora. Este es un dato interesante pues generalmente sólo existe una corrida de Ts como señal de terminación de la transcripción (Cozzarelli et al., 1983). La presencia de dos corridas

de 5 Ts en la región terminadora sugiere una terminación eficiente de la transcripción, lo que a su vez puede repercutir en una correcta reiniciación de la transcripción. iv) Una región palindrómica con capacidad para estructurar un tallo-asa de alta energía (-13 kcal/mol) y que se encuentra 4pb río abajo de la región terminadora de Ts. Esta estructura no se ha descrito como tal en otros organismos, aunque como parte de este trabajo, en el gen del RNAr 5S somático de *Xenopus* se identificó una región palindrómica localizada río abajo de las secuencias terminadoras de la transcripción que tiene una secuencia similar a la del palíndromo de *T. vaginalis* (aunque con una energía de estructuración potencial menor) y que forma parte de la secuencia de unión de una proteína con actividad de enhancer llamada EP3 (Sturges et al., 1999). Lo anterior podría dirigir el análisis de esta región hacia demostrar que este elemento tiene actividad de enhancer. Sin embargo, no se puede descartar una función durante la terminación, pues dentro de esta secuencia se encontró una región similar a la secuencia de unión del Factor Nuclear 1 (NF1) en la región de terminación de la transcripción del gen de adenovirus VA1 (Wang et al., 2000), transcrito por pol III en humano. NF1 afecta la terminación y el reciclaje de pol III. El análisis experimental de las regiones putativas de regulación de este gen es una de las perspectivas de este trabajo.

Los RNAr 18S, 5.8S, 28S y 5S deben de encontrarse en cantidades equimolares dentro del núcleo celular para lograr un ensamblaje preciso de los ribosomas, esto es, se requiere una molécula de cada uno de los RNAr para ensamblar un ribosoma (sin olvidar a las proteínas, cuya síntesis también deben de regularse de forma precisa). El mantenimiento de dichos niveles de RNAr, así como la biogénesis ribosomal, involucran la interacción de varios mecanismos de regulación a nivel transcripcional, post-transcripcional y post-traducciona. El análisis del gen y del RNAr 5S de *T. vaginalis* muestra algunas características que podrían representar elementos de regulación propios del protozoario; la región palindrómica mencionada en el párrafo anterior podría estar involucrada en esto, razón por la cual continuaremos con su estudio a detalle.

Como parte de la caracterización del RNAr 5S se obtuvo la estructura secundaria putativa de la molécula, la cual conserva regiones y bases importantes para su función; entre estas se encuentra el asa interna E, involucrada en la interacción con el RNAr de la subunidad mayor ribosomal. De este modo, el modelo hipotético del RNAr 5S de *T. vaginalis* se ajusta a los modelos estructurales actuales.

Una cuestión que quedaba sin resolver era ¿por qué no se pudo identificar el RNAr 5S por métodos básicos de biología molecular? Durante el trabajo previo, el Southern blot de *T. vaginalis* utilizando una sonda heteróloga (gen del RNAr 5S de *Trypanosoma cruzi*), pudo haber fallado por la homología del 65% entre la sonda de *T. cruzi* y el gen del RNAr 5S de *T. vaginalis*.

El Southern blot realizado con una sonda de cDNA de la banda de ~120b del RNA total de *T. vaginalis* (obtenido de la banda purificada y amplificada por random primer), dio señal a la altura de 6kb (punto determinado como el CR por análisis posteriores). Al parecer la molécula de RNAr 5.8S que co-migra con el RNAr 5S en la banda de ~120b, tiene una estructura secundaria menos compleja que el RNAr 5S, lo que seguramente permitió la síntesis de su cDNA con la transcriptasa reversa y oligos aleatorios. Así se pudo obtener una sonda que hibridó con el cistrón ribosomal debido a que el 5.8S se codifica en este gen. En cambio, el RNAr 5S podría tener una estructura secundaria más compleja, la cual no pudo desdoblarse con una transcriptasa reversa tradicional funcionando a 42°C, lo que impidió la obtención de una sonda de cDNA. Debemos de recordar que el cDNA del RNAr 5S se pudo obtener finalmente con una transcriptasa reversa resistente a alta temperatura (65°C) y con un protocolo de aumento de temperatura gradual para que la transcriptasa reversa pudiera desdoblarse poco a poco la estructura compleja de la molécula (Protocolo Q).

Los ensayos posteriores, realizados en este trabajo, fueron la secuenciación directa del RNA, el RPA, el "primer extension" y el RT-PCR. Al analizar estas metodologías podemos notar que la

única dirigida a la identificación del RNAr 5S fue la secuenciación directa del RNA, pues el resto de las metodologías se enfocaron a confirmar la presencia de una molécula de secuencia similar o igual al RNAr 5.8S en la banda de ~120b. En el ensayo de secuenciación no se obtuvo señal con el RNAr purificado de la banda de ~120b, mientras que la secuencia del RNAr 5.8S fue muy clara. Esto podría deberse a la imposibilidad de marcar radiativamente a la molécula de RNAr 5S en su extremo 5' con la cinasa, tal vez por su estructura secundaria compleja. La presencia de una molécula de secuencia similar o igual al 5.8S en la banda de ~120b se observa con un ligero fondo en el intento de secuenciación del RNAr 5S, resultado que también indica la baja concentración de la molécula de secuencia similar al RNAr 5.8S en la banda de ~120b. Un dato intrigante es que el RNAr 5.8S que se observa en la banda de ~120b tiene el mismo tamaño que el RNAr 5.8S de la banda de ~160b. Sin embargo, estos dos tipos de 5.8S se encuentran separados en geles desnaturalizantes de acrilamida. Este dato es extraño pues los geles desnaturalizantes se utilizan para desdoblar la estructura secundaria de las moléculas y separarlas únicamente por tamaño. Entonces, ¿cómo logran dos moléculas del mismo tamaño separarse en geles desnaturalizantes de acrilamida? La anterior es una pregunta difícil de responder, ante la cual sólo podemos sugerir interacciones tridimensionales covalentes resistentes a condiciones desnaturalizantes, u otro tipo de modificación por nosotros desconocida.

Con los otros ensayos (RPA, "primer extension" y RT-PCR) se confirmó la presencia de una molécula de secuencia similar o igual al RNAr 5.8S de *T. vaginalis* en la banda de ~120b. Como se menciona en el capítulo III, no hemos podido determinar si la presencia del RNAr 5.8S en la banda de ~120b se debe a contaminación. Sin embargo, el ensayo de "primer extension" sugiere que se trata de otra molécula de secuencia similar al 5.8S pero con una estructura secundaria diferente a la población predominante de RNAr 5.8S de la banda de ~160b. Esto se propone por el patrón de extensión diferencial de las moléculas (RNAr de la banda de ~120b vs. RNAr 5.8S), lo que se debe a paros de la transcriptasa reversa durante la extensión debido a regiones moleculares más estructuradas. Debo de resaltar que el RNAr de la banda de ~120b utilizado en

este ensayo es una molécula que se purificó y re-purificó bajo condiciones minuciosas de trabajo.

La hipótesis inicial sobre la presencia del RNAr 5.8S en la banda de ~120b llevó a una caracterización más profunda de esta molécula. Por una parte se determinó *in silico* su estructura secundaria potencial de acuerdo al modelo universal de la molécula, y por otra parte se identificaron dos conformaciones alternativas de la misma en la banda de ~160b. Ante lo anterior, se sugiere que la población de RNAr 5.8S de *T. vaginalis* se compone de 3 conformaciones: dos que migran en la banda de ~160b en geles desnaturizantes de acrilamida, pero que se separan en geles nativos al 15%, y una que co-migra con el RNAr 5S en la banda de ~120b. Las dos primeras conformaciones podrían deberse a una patrón de metilación diferencial (lo que alteraría ligeramente la estructura de la molécula), como ocurre con las conformaciones alternativas del RNAr 5.8S de ratón (Smith et al., 1984 y Lo et al., 1984), o a la variación en la región codificadora del gen del RNAr 5.8S; mientras que la población que co-migra con el RNAr 5S podría deberse también a la variación en la región codificadora de los genes del RNAr 5.8S (Fig. 7 y 11) y /o a modificaciones covalentes de la molécula. En realidad la razón de esta migración anómala es una incógnita para nosotros, por lo que su naturaleza deberá determinarse experimentalmente. En ratón se sugiere que genes alternativos promueven la síntesis de RNAs ribosomales 5.8S con algunas variaciones nucleotídicas que producen a su vez procesamientos alternativos que llevan a la presencia de RNAs 5.8S de diferente tamaño y por lo tanto con migración diferencial en geles desnaturizantes. Sin embargo, en *T. vaginalis* los dos 5.8S que migran distinto en geles desnaturizantes (en las bandas de ~120 y ~160b) parecen tener el mismo tamaño.

Las diversas conformaciones del RNAr 5.8S podrían estar presentes a diferentes niveles durante la curva de crecimiento del parásito o bajo ciertas condiciones de estrés. Las distintas poblaciones del RNAr 5.8S podrían relacionarse con la eficiencia de translocación ribosomal,

capacidad de síntesis proteica, de velocidad o de reconocimiento de RNAs de transferencia particulares.

Un dato interesante es que al separar las moléculas de RNAr pequeño de *Tritrichomonas foetus*, organismo de evolución temprana y paralela a *T. vaginalis*, sólo observamos una banda de RNAr pequeño, que otros autores refieren como el RNAr 5S de este protozoario (Vanacova et al., 2001). En *T. vaginalis*, observamos dos bandas de RNAr pequeño, la de ~160b donde migra el RNAr 5.8S y la de ~120b, en donde identificamos a un RNAr 5.8S que co-migra con el RNAr 5S, lo que podría sugerirnos que en *T. foetus* existe una conformación del RNAr 5.8S similar a la que encontramos en *T. vaginalis*, pero que en *T. foetus* es la conformación predominante de la molécula (pues no se observa otra banda). Se requerirá analizar la población de RNAr de *Tritrichomonas foetus* para confirmar este supuesto.

Los genes ribosomales se localizan en el genoma eucarionte en forma de varias copias en tandem. Por su parte, el cistrón ribosomal, que codifica a los RNAr 18S, 5.8S y 28S, se transcribe por RNA polimerasa I. En un locus distinto, y muchas veces en otro cromosoma, se codifica el RNAr 5S que se transcribe por la RNA polimerasa III. En *Saccharomyces cerevisiae* existen alrededor de 200 copias del CR y un número similar de copias del gen 5S (Kobayashi et al., 1998); esto está de acuerdo con la necesidad de cantidades nucleares equimolares de todas las moléculas de RNAr. Sin embargo, esta equivalencia en el número de copias del CR vs 5S ($CR/5S = 1$) no se mantiene en todas las especies, por ejemplo en *Euglena* hay ~4000 copias del CR (Ravel-Capuis P, 1988) y ~300 del gen 5S ($CR/5S=13.3$) (Keller et al., 1992). mientras que en humanos hay ~300 copias del CR (Worton et al., 1988) y ~2000 del gen 5S ($CR/5S=0.15$) (Sorensen y Frederiksen, 1991). Esta gran diversidad de copias en los genes ribosomales sugiere una regulación diferencial y características particulares de la expresión de los mismos entre diversas especies, lo que a su vez alude a elementos de regulación ribosomales propios de cada organismo.

La tasa de genes ribosomales en *T. vaginalis* es de 0.04, pues hemos estimado que tiene ~8 copias del cistrón ribosomal y ~200 del gen del RNAr 5S. Esta tasa se acerca al valor obtenido para *Trypanosoma cruzi*, que es de 0.062, y que corresponde a ~100 copias del CR (Castro et al., 1981) y ~1600 del gen 5S (Hernández-Rivas et al., 1992). Sin embargo, otro protozoario de evolución temprana, *Euglena*, presenta una tasa de genes ribosomales totalmente diferente a *Trichomonas* y a *Trypanosoma*: $CR/5S = 13.3$. Este resultado no es totalmente sorprendente, pues los protozoarios se caracterizan por tener estrategias de regulación particulares, y muchas veces atípicas en comparación con organismos metazoarios e incluso con otros protozoarios.

El proyecto de secuenciación del genoma de *T. vaginalis* se encuentra en su etapa final, sin embargo, el tamaño del genoma aún no se ha definido. Wang, en 1985, propuso un tamaño aproximado de 2.5×10^7 pb (Wang y Wang, 1985) con base en ensayos de renaturalización del DNA. Los últimos reportes de la página web www.tigr.org proponen un tamaño de 1.6×10^8 pb, tamaño que parece exagerado tomando en cuenta el nivel evolutivo del parásito. En el experimento para determinar el número de copias del cistrón ribosomal, identificamos un posible control para la determinación del tamaño del genoma de *T. vaginalis* (Capítulo II). Este control interno de una copia del cistrón ribosomal no requiere del conocimiento del tamaño del genoma, pero indica el número de genes del CR y por lo tanto, el número de nucleótidos que componen a dicho gen. Con base en el número de genes y en el porcentaje del genoma correspondiente al CR, y utilizando cálculos aritméticos sencillos, podemos calcular el tamaño del genoma de *T. vaginalis*. Nuestros resultados concuerdan con la propuesta original de Wang: $\sim 2.5 \times 10^7$ pb.

10. Conclusiones

- Se identificó el gen que codifica al RNAr 5S de *T. vaginalis*. Este gen tiene un promotor putativo típico de RNA polimerasa III tipo I, el cual es el primero en identificarse en Trichomonatidos. Este promotor interno a la región codificadora de 5S se compone de una Caja A, un Elemento Intermedio y una Caja C.
- El gen del RNAr 5S también posee un probable elemento de regulación novedoso río abajo de la región codificadora: una región palindrómica que podría estructurar un tallo-asa de alta energía en la región terminadora del gen. Esta estructura podría participar en la eficiencia de transcripción ó en la terminación de la transcripción.
- La estructura secundaria propuesta para el RNAr 5S maduro coincide con el modelo consenso eucarionte sugiriendo que cada una de las sub-estructuras (tallos-asa y asas) cumple con las funciones generalizadas para cada uno de estos motivos.
- Existen ~200 copias genómicas del gen del RNAr 5S de *T. vaginalis*, una de las reiteraciones genómicas más bajas a lo largo de la evolución para el gen del RNAr 5S.
- El RNAr 5.8S de *T. vaginalis* posee tres conformaciones estructurales: 2 que difieren de forma mínima, y por lo tanto, migran a la misma altura (~160b) en geles desnaturalizantes de acrilamida (se separan en geles nativos al 15%); y otra que comigra con el RNAr 5S en geles de acrilamida 4%/Urea 7M. La naturaleza de estas conformaciones queda por aclararse de forma experimental.
- El RNAr 5.8S de *T. vaginalis* tiene la capacidad de doblarse conforme a la estructura secundaria universal propuesta para dicha molécula.
- El gen del RNAr 5.8S tiene ~8 copias genómicas en tandem como parte del cistrón ribosomal, y por lo tanto, la tasa de genes ribosomales de este organismo es de ~0.04, cercana a *Trypanosoma cruzi* con 0.0625.

11. Metodología

A) Extracción de RNA Total de *Trichomonas vaginalis*

1. Se cultivan o/n $\sim 13 \times 10^6$ células *Trichomonas vaginalis* en 50ml de medio Tym (Suero de caballo 10%) a 37° C. (protocolo T).
2. Al día siguiente las células se encuentran a $\sim 30 \times 10^5$ cel/ml (fase logarítmica). Para hacer una extracción se toman 8.5×10^6 células, es decir ~ 3 ml. Se pueden hacer varias extracciones al mismo tiempo.
3. Cada extracción se lava con 1 ml de PBS/DEPC. Se desecha la solución de lavado. El botón de células se resuspende en el volumen restante de PBS y luego en 1ml de TRIzol® Reagent (Gibco BRL Life Technologies) por pipeteo repetitivo para lisar a las células.
4. La muestra se incuba 5 minutos a temperatura ambiente para disociar completamente los complejos núcleo-proteicos. Posteriormente se agregan 0.2ml de cloroformio y se mezcla por medio de inversión durante 15 segundos.
5. Nuevamente se incuba la muestra durante 3 minutos, y luego se centrifuga a 14000 rpm, 15 minutos a 4° C.
6. La fase acuosa, donde se encuentra el RNA, se precipita con 0.5 ml de alcohol isopropílico durante 10 minutos a temperatura ambiente.
7. El RNA precipitado se centrifuga a 14000 rpm 15 minutos a 4° C. Se retira el sobrenadante.
8. Se agrega y retira rápidamente 1 ml de etanol 75%/DEPC para lavar el botón.
9. El botón de RNA se deja secar y se disuelve en 10 μ l de agua DEPC. Si no se puede resuspender, se agrega más agua DEPC.
10. El RNA Total purificado se almacena a -70° C.

Nota: Todo el material utilizado para el tratamiento del RNA es previamente esterilizado. De no ser posible, se trata con alcohol 70% por media hora y luego se enjuaga en agua DEPC.

11. La integridad del RNA total purificado se revisa en un gel de agarosa 0.8%/TBE DEPC a 80V ~ 1 h. Se carga 1 μ l de muestra + 2 μ l de buffer de carga de RNA 6X + 4 μ l de agua DEPC. Una vez que corrió el gel, se tiñe en Bromuro de etidio/ DEPC por 5 minutos. Se destiñe 10 minutos en agua DEPC y se observa en el transiluminador.

B) Purificación de las bandas de RNAr de geles de acrilamida

1. Se prepara un gel preparativo de acrilamida al 4%/Urea 7M (TBE 1X) a partir de un stock de acrilamida/bis acrilamida 40%.
2. El gel se deja pre-corriendo desde 30 minutos hasta toda la noche a 20 V.
3. Se carga una extracción de RNA ($\sim 10\mu$ l) + 20 μ l de buffer de carga de RNA 6X, y se corre a 40 V por 3 horas a temperatura ambiente.
4. El gel se tiñe durante 3 minutos en Bromuro de etidio/DEPC. Posteriormente se coloca en el transiluminador (cubierto con plástico autoadherible nuevo) a potencia muy baja para cortar las bandas correspondientes a ~ 160 y ~ 120 b.
5. Cada una de las bandas se divide en dos y se coloca en 2 tubos de 1.5 ml con 400 μ l de buffer de elusión (SDS 0.3%, NaCl 0.14M, Acetato de Sodio 0.05M pH = 5.2). Se incuban a 37° C por 4 horas.
6. Se recupera el sobrenadante en otro tubo de 1.5ml y se coloca en hielo/agua durante 30 minutos. Se centrifugan a 14000 rpm, por 20 minutos a 4° C, para eliminar el SDS.
7. Se precipita el sobrenadante en 1ml de etanol 100% o/n.
8. La muestra se centrifuga a 14000 rpm, por 30 minutos a 4° C. Se retira el sobrenadante. El botón se resuspende en 200 μ l de agua DEPC + 20 μ l de acetato de sodio + 500 μ l de alcohol absoluto. Se precipita 1 hora a -70° C.

9. Se centrifuga a 14000rpm, 15 minutos a 4° C. Se retira el sobrenadante. El botón se resuspende en 10µl de agua DEPC.
10. La integridad de las moléculas se revisa en un gel de acrilamida 4%/Urea 7M.
11. La concentración y pureza de las moléculas eludías se determina espectrofotométricamente:
 - 1µl de muestra de RNA purificado se diluye en 999µl de agua DEPC en una celdilla de cuarzo. En un espectrofotómetro de luz UV a 260 nm se determina la absorbancia de la muestra, que multiplicada por 40 corresponde a la concentración, en µg/ml, de RNA de la muestra. La tasa de absorbancia a 260/280 corresponde a la pureza de la muestra. La máxima pureza tiene un valor cercano a 1.6 = OD 260/280 cuando la muestra se encuentra en agua DEPC (Wilfinger et al., 1997).

C) Desfosforilación del extremo 5' de moléculas de RNA usando la fosfatasa alcalina de intestino de becerro CIAP (Gibco BRL)

1. 1.5µg (1µl) de RNAr 5.8S purificado (27.5 pmoles de extremos 5') se desfosforilan con 0.6 u de CIAP (2.5 µl CIAP 0.228 u/µl).
2. Se desnaturaliza 1µl de RNAr 5.8S + 19µl de agua DEPC a 75° C por 5 minutos. Inmediatamente se transfiere a hielo/agua, y ahí se mantiene por 5 minutos.
3. Posteriormente se agregan 2.5µl de buffer CIAP 10X + 2.5µl de CIAP para tener una reacción 25µl en total. Esta se incuba a 50° C por 1h.
4. La fosfatasa se inactiva a 75° C por 10 minutos.
5. Se extrae el RNA:
 - a) Se agregan 125µl de agua DEPC + 15µl de Acetato de sodio 3M y 150µl de Fenol.
 - b) Se agita 2 minutos y se centrifuga 10 minutos a 14000 rpm a 4° C.
 - c) Se recupera el sobrenadante y se agregan 150 µl de Fenol + 150 µl de cloroformo y se agita 2 minutos.
 - d) Se centrifuga a 14000 rpm, se recupera el sobrenadante y agregan 150µl de cloroformo, para después agitar y centrifugar 5 minutos a 14000 rpm.
 - e) El sobrenadante se precipita con 450 µl de etanol al 100%, a -70° C o/n.
 - f) Se centrifuga a 14000 rpm 15 minutos a 4° C. El botón se resuspende en 7.5µl de agua DEPC.

D) Fosforilación de los extremos 5' con γ-P32 ATP (Kit RTS T4 ligase labeling system – Gibco BRL)

1. Se utilizan 25 pmoles de γ-P³² ATP (Redivue adenosine 5' (γ-³²P) triphosphate, triethylammonium salt, 9.25 Mbq, 250µCi – Amersham biosciences) para fosforilar 27 pmoles de extremos 5' del RNAr 5.8S (ó 200ng del oligonucleotido 58S-2).
2. Los 10µl de RNAr 5.8S desfosforilado se desnaturalizan a 75° C por 10 minutos y luego se mantienen en hielo 5 minutos.
3. En el tubo de reacción del kit se colocan los 7.5µl de RNAr 5.8S desnaturalizado (ó 1µl de oligonucleotido 58S-2 a 200 ng/µl + 6.5µl de agua DEPC) + 12.5µl de γ-P³² ATP. Se incuba a 37° C por 30 minutos.
4. La enzima polinucleotido cinasa T4 se inactiva a 55° C por 5 minutos.
5. Posteriormente se agregan 180µl de agua DEPC + 10µg (1µl) de RNA acarreador de levadura + 20µl de acetato de sodio 3M y 500µl de etanol 100%.
6. Se precipita a -70° C por 2.5h.
7. Se centrifuga a 14000 rpm 15 minutos y se desecha el sobrenadante. El botón se deja secar 5 minutos y se resuspende en 15µl de agua DEPC. (El oligo 58S-2 se resuspendió en 100µl de agua DEPC).

Nota: Todo el trabajo con radiactividad se hace detrás de la mampara resistente a las emisiones β del fósforo radiactivo.

E) Secuenciación directa del RNA con el kit "RNase T1 Biochemistry grade – Ambion"

1. Se preparan 4 tubos de 1.5 ml marcados de la siguiente forma:
 - a) T1
 - b) # 1 T1 (control negativo)
 - c) # 2 T1 (1u RNasa T1)
 - d) # 3 T1 (0.1u RNasa T1)
2. En el tubo T1 se colocan 4 μ l del RNAr 5.8S marcado + 23 μ l del buffer de secuenciación 1X.
3. Los 27 μ l del tubo T1 se dividen en tres: 9 μ l en cada uno de los tubos #1-#3.
4. Todos los tubos se calientan a 50° C 5 minutos. Se dejan enfriar 3 minutos a temperatura ambiente.
5. Se adiciona 1 μ l de RNasa T1 al tubo #2 y se mezcla con pipeta.
6. Se transfiere 1 μ l del tubo #2 al #3 y se mezcla con pipeta.
7. Las reacciones se incuban 15 minutos a temperatura ambiente.
8. Se agregan 20 μ l de buffer de inactivación/ precipitación, y se precipita o/n a -20° C.
9. Las muestras precipitadas se centrifugan a 14000 rpm por 15 minutos. Se desecha el sobrenadante.
10. Se deja secar el botón por 2 minutos y se agregan 8 μ l de buffer de carga II.
11. El RNA se desnaturaliza por calor a 95° C por 5 minutos y se coloca en hielo hasta cargarse en el gel de secuencia (Protocolo F).
12. Hidrólisis alcalina (para producir la escalera de bandas del RNAr 5.8S control):
 - a) Se preparan 6 tubos: H, H1-H5.
 - b) En el tubo H se mezclan 20 μ l de buffer de hidrólisis alcalina 1X + 5 μ l de RNAr 5.8S marcado.
 - c) Se alicuotan 5 μ l de la muestra por tubo (1-5) y se calientan a 95° C.
 - d) Después de 30 segundos se pone el tubo #1 en hielo y se agregan 10 μ l de buffer de carga II.
 - e) Después de 1 minuto, el tubo #2 se coloca en hielo + 10 μ l de buffer de carga II.
 - f) Después de 2 minutos, el tubo #3 se coloca en hielo + 10 μ l de buffer de carga II.
 - g) Al minuto 4, el tubo #4 se coloca en hielo + 10 μ l de buffer de carga II.
 - h) Al minuto 8, el tubo # 5 se coloca en hielo + 10 μ l de buffer de carga II.
 - i) Para el control no tratado, el volumen restante del tubo original de fosforilación se mezcla con 8 μ l de buffer de carga II.
 - j) Se almacenan a -20° C, o en hielo hasta que se cargue el gel.

F) Preparación de geles de secuencia

1. Los vidrios de la cámara se lavan con extrán MA01 (Merck) 10% y luego se limpian del lado del contacto con el gel con Acetona.
2. Se arman con los separadores de 0.7mm, se sella la porción inferior de los vidrios con cinta Scotch (Electrical tape 3M) y luego se coloca la camisa de plástico.
3. Se prepara la Acrilamida para polimerizar de la siguiente forma: 60 ml de Acrilamida mix 10% + 0.5ml de Persulfato de Amonio 10% + 25 μ l de TEMED.
4. Con una jeringa se toma el volumen total y se inyecta entre los dos vidrios evitando las burbujas.
5. Se colocan los peines con las puntas hacia fuera y se deja polimerizar 30-60 minutos. Se puede dejar o/n.
6. Se retiran los peines. Los vidrios con el gel se ensamblan en la cámara de electroforesis para geles de secuencia (Model S2, Gibco BRL) (sin la cinta 3M). Se llenan los compartimentos de la cámara con TBE 1X DEPC.

7. Se colocan los peines con las puntas hacia el gel y se presiona ligeramente para formar los pozos. Se lavan los pozos con 500µl del buffer TBE 1X de la cámara.
8. Se cargan 2µl de muestra por pozo.
9. El gel se corre a 2200V, 200mA y 60W por 2 horas.
10. Una vez terminada la corrida se retira uno de los vidrios. Se coloca un papel "wattman" del tamaño del gel sobre el gel pegado al vidrio para desprenderlo. Si esto es posible, se cubre con plástico auto-adherible y se seca en el secador de geles durante 1h a 70° C, para luego ponerse a exponer en una placa de rayos X. Si no es posible despegarlo del vidrio, se cubre con plástico auto-adherible y se expone directamente a la placa de rayos X.

G) "Primer extension"

1. El oligo 58S-2 se marca con el sistema "RTS Kinase labelling system – Gibco BRL" según el protocolo (D).
2. Hibridación: Se preparan 2 tubos: 58E y 5E. 58E: 1µl del oligo 58S-2 marcado + 1µg (1µl) de RNAr 5.8S purificado + 5µl de agua DEPC. 5E: 1µl de oligo 58S-2 marcado + 1µg (1µl) de RNAr de la banda de ~120b purificado + 5µl de agua DEPC.
3. Ambos tubos se calientan a 75° C 5 minutos para desdoblar el RNA. Posteriormente se agregan 0.7µl de Acetato de sodio 3M-DEPC + 17.5µl de etanol 100% para coprecipitar los oligonucleotidos con el RNAr purificado. Esto durante 30 minutos en hielo seco-etanol.
4. Se centrifugan 15 minutos a 14000 rpm a 4° C, se retira el sobrenadante y el botón se deja secar 5 minutos.
5. El botón se resuspende en 30µl de solución de hibridación (800µl de Formamida + 80 µl de NaCl 5M-DEPC + 2µl de EDTA 500mM pH= 8 + 80µl de PIPES 0.5M pH= 6.4 + 38µl agua DEPC), se agita y se incuba a 30 ° C o/n.
6. Primer extension ó Extensión del oligonucleotido: Cada tubo se precipita con 3µl de Acetato de Sodio + 75µl de alcohol 100%, por 2 horas a -70° C.
7. Se centrifugan a 14000 rpm a 4° C por 15 minutos, se retira el sobrenadante y se deja secar el botón 5 minutos.
8. El botón se resuspende en 12µl de agua DEPC + 4µl de "First strand buffer 5X" + 2µl de 0.1M DTT + 1µl de la mezcla de dNTPs 10mM (dNTP mix – Gibco BRL). Esta mezcla se incuba a 42° C 2 minutos, y luego se agrega 1µl de la enzima Superscript II Reverse Transcriptase (Invitrogene life technologies).
9. Se incuba 50 minutos a 42° C. La reacción se detiene con 1µl de EDTA 0.5M pH= 8 + 1µl de RNasa A (1µg/µl).
10. Se incuba a 37° C por 40 minutos y luego se agregan 80µl de acetato de amonio 5M + 20µl de agua DEPC.
11. Se realiza una extracción Fenol-Cloroformo (60µl-60µl). La fracción superior se precipita con 300µl de alcohol 100% a -80° C o/n.
12. Los precipitados se centrifugan a 14000 rpm 15 minutos. El botón se resuspende en 4µl de TE + 4µl de buffer muestra de carga de RNA 6X.
13. Se calientan a 80° C 3 minutos y luego se transfieren a hielo hasta cargar 1.5µl de la reacción en el gel de secuencia.
14. La reacción anterior se corre de manera conjunta con la secuencia del cistrón ribosomal de *Trichomonas vaginalis* en la región que codifica al RNAr 5.8S, esto mediante la utilización del oligonucleotido 58S-2 (ver protocolo H).

H) Secuenciación del plásmido p921 (clona de una copia del cistrón ribosomal de *Trichomonas vaginalis*) utilizando el kit "Sequenase Version 2.0 DNA sequencing kit" (USB- Amersham life sciences)

1. Se extrajo el plásmido p921 (Protocolo R).

2. Desnaturalización: Se incubaron 1.5µg de plásmido p921 (20µl) + 5µl de solución desnaturalizante (449 µl de agua DEPC + 50µl de NaOH 10M + 1µl EDTA 0.5M) a 37° C por 15 minutos.
3. Neutralización: Se prepara un tubo eppendorf de 0.5ml con un pequeño hoyo en el fondo (logrado con un agujero caliente) con una gota de perlas de vidrio en el fondo. Se agregan 0.5ml de CL6B/TE (Sepharosa Pharmacia CL6B) y se centrifuga a 3000 rpm 3 minutos dentro de un tubo eppendorf de 2ml (sin tapa) para eliminar el TE. Posteriormente se agrega el DNA desnaturalizado, reemplazando el tubo de 2ml por uno de 1.5ml. Se centrifuga a 3000 rpm 3 minutos y se recuperan ~17 µl de DNA.
4. Alineamiento: Al recuperado de la neutralización se agregan 10µg del oligonucleotido 58S-2 + 2µl de buffer de reacción 5X. Esto se incuba a 37° C por 15 minutos.
5. Mientras tanto, se colocan 2.5µl de las mezclas de dNTPs A, C, G y T en un plato de micro-pozos previamente incubado a 37° C.
6. Se hace la mezcla de sequenase con: TE 11.2µl + DTT 0.1M 2µl + mezcla de marcaje dGTP 0.9µl + S³⁵ dATP 1µl (Redivue deoxyadenosine 5' (α-³⁵S)-thiotriphosphate triethylammonium salt – Amersham biosciences) + buffer de dilución de enzima 2µl. Se agregan 0.6µl de la enzima Sequenase justo antes de usarse.
7. Reacción de marcaje: Se agregan 8µl de la mezcla de sequenase a la reacción alineada oligonucleotido/DNA, y se incuba a temperatura ambiente 3 minutos.
8. Reacciones de secuencia: Se colocan 4µl de la reacción de marcaje en cada uno de los micro-pozos previamente preparados, y se incuban a 37° C por 3 minutos.
9. Reacción de terminación: Se agregan 4µl de la reacción de paro (azul) a cada pozo, y se almacena en hielo hasta cargar en el gel de secuencia.
10. Antes de cargar las muestras en el gel, se calienta toda la placa a 80° C por 2 minutos y luego se coloca en hielo. Se cargan 2.5µl de cada reacción (A, C, G y T).
11. El ensayo de "primer extension" junto con esta secuencia se corren en un gel de secuencia acrilamida 6%/Urea 7M. El gel se seca y se expone durante 1 día a una placa de rayos X. (protocolo F).

I) Geles nativos de acrilamida (no desnaturalizantes)

1. Se prepara acrilamida 15% utilizando el stock 40%: 11.25ml de stock 40% + 3.3 ml TBE 9X + 15ml agua DEPC. Se utilizan 10 ml para dos geles. Se polimerizan con 125µl de persulfato de amonio al 10% y 7µl de TEMED.
2. Se utiliza TBE 1X –DEPC como buffer de corrida.
3. El buffer muestra se prepara con 2.5ml de Glicerol (50% concentración final) + 2.5ml de TBE 9X + 100µl de agua DEPC (en donde se disolvió un poco de Azul de Bromofenol y Xilen-Cianol).
4. El buffer muestra se coloca 1:1 (volumen: volumen) con la muestra.
5. Para separar conformaciones de RNAr, las muestras deben de ser purificadas de geles desnaturalizantes (protocolo B). La electroforesis se realiza a 15V por 32 horas.

J) Extracción de DNA genómico de *Trichomonas vaginalis*

1. La extracción de DNA se logra con un cultivo de 50 ml de fase logarítmica de *T. vaginalis* (~2.5 x 10⁶ cel/ml).
2. El cultivo se divide en 2 tubos de 50ml (con 25ml), se centrifugan a 3000 rpm 2 minutos y se retira el sobrenadante. El botón se resuspende y lava en 20 ml de PBS centrifugando de la misma forma.
3. El botón se resuspende en 2 ml de PBS para separarlo en 2 tubos eppendorf de 1.5ml (4 tubos en total).
4. Cada tubo eppendorf se centrifuga a 14000 rpm 1 minuto; se decanta el sobrenadante. El botón se resuspende en el PBS restante.

5. Se agregan 300 μ l de buffer de extracción (SDS 2%, NaCl 100mM, EDTA 100 mM y Tris 10mM) + 300 μ l de Fenol. Se agita 30 segundos y se centrifuga a 14000 rpm 3 minutos.
6. Se recupera la fase superior y se agregan 300 μ l de Fenol + 300 μ l de cloroformo, se agita y centrifuga igual que en el paso anterior.
7. La fase superior se mezcla con 500 μ l de cloroformo, se agita y centrifuga.
8. La fase superior se precipita con 1 ml de alcohol 100% + 40 μ l de acetato de sodio 3M. Se incuba a -20° C por 2 horas.
9. Se centrifuga a 14000 rpm 15 minutos.
10. Se retira el sobrenadante y el botón se lava con 1ml de etanol al 70%. El botón se deja secar por 5 minutos.
11. Dicho botón se resuspende en 50 μ l de RNAsa en TE a 3.3mg/ml. Se incuba 30 minutos a 37° C.
12. El DNA se almacena a -20°C.
13. Para revisar la integridad del DNA extraído, se corre en un gel de agarosa al 0.8% (TAE 1X) 1h a 80V. Se utiliza buffer muestra 5X-TAE en proporción 1:2 (DNA-buffer muestra) (Protocolo T).

K) Southern blot genómico

1. Se digirieron 20 μ g de DNA genómico de *Trichomonas vaginalis*: Esta reacción se prepara en un tubo de 1.5ml en el siguiente orden: 115 μ l de agua estéril + 25 μ l de buffer de reacción 10X (# 3 para EcoRI) + 100 μ l de DNA genómico (200 ng/ μ l) + 10 μ l de la enzima de restricción EcoRI (Gibco BRL). Los 250 μ l totales se incuban a 37° C o/n. Al otro día se agregan otros 10 μ l de EcoRI y se incuba por 3 horas más a 37° C.
2. También se digirió 1 μ g de plásmido p921: 7 μ l de agua estéril + 12 μ l de buffer de reacción 10X (#3) + 100 μ l de plásmido p921 (10ng/ μ l) + 1 μ l de EcoRI. Los 120 μ l totales de la reacción se digirieron a 37° C o/n.
3. El DNA genómico y el plasmídico digeridos se extrajeron y precipitaron según el siguiente protocolo: Se agrega una mezcla de Fenol/Cloroformo (50%/50%) en un volumen equivalente al volumen de la muestra a extraer. Esta mezcla se agita y se centrifuga por 3 minutos a 14000rpm. La fase superior se mezcla con un volumen equivalente de Cloroformo, se repite la agitación y la centrifugación. La fase superior se precipita con dos volúmenes y medio de alcohol 100% y 1/10 de Acetato de sodio 3M por 1 h a -70° C. La precipitación se centrifuga a 14000 rpm 15 minutos a 4° C. El botón se resuspende en el volumen deseado, en este caso: El DNA del plásmido se resuspendió en 10 μ l de TE; el genómico en 20 μ l.
4. La concentración de las muestras se determinó por cuantificación de la densidad óptica de las bandas correspondientes a 1 μ l de la muestra correspondiente en geles de agarosa al 0.8% utilizando el hardware/software FX/Quantity one de Biorad (contra la cuantificación de λ -HindIII).
5. Con base en esto se cargaron por orden (cada una con 4 μ l de buffer muestra 5X-TAE) en un gel de agarosa 0.8%(TAE 1X):

1. DNA genómico 2.83 μ g
2. DNA genómico 1.43 μ g
3. DNA genómico 0.754 μ g
4. DNA genómico 0.377 μ g
5. DNA genómico 0.189 μ g
6. DNA p921 3.11 ng
7. DNA p921 1.56 ng
8. DNA p921 0.78 ng
9. DNA p921 0.39 ng
10. DNA p921 0.194 ng
11. DNA p921 0.097 ng

6. El gel se corrió a 80V por 3.5 horas. Posteriormente se tiñó con Bromuro de etidio por 20 minutos, se destiñó en agua destilada 10 minutos, y se incubó en HCL 0.25N durante 7 minutos (dos veces).
7. Posteriormente, el gel se incubó en solución desnaturalizante (43.83g de NaCl + 25 ml de NaOH 10N en 500 ml de volumen final) durante 15 minutos (dos veces).
8. Finalmente se incubó en solución de neutralización (125 ml de Tris/HCl 2M pH =7.5 + 87.66 g de NaCl en 500 ml de volumen final) por 30 minutos. Este paso también se repite.
9. Transferencia del DNA a membrana de Nylon: En la cámara de transferencia (Blot Transfer System 11.14 Gibco BRL) se coloca la solución de transferencia en el recipiente inferior, posteriormente se arma el emparedado:
 - a) El papel Wattman y la membrana se humedecen previamente en la solución de transferencia.
 - b) Sobre la base se coloca un papel wattman de 23 x 11cm, y sobre él, otro de 11 x 14 cm. Encima va el gel (volteado), luego la membrana de Nylon de 11 x 14 cm (Zeta Probe GT Genomic Tested Blotting membranas- BioRad), otro papel wattman de 11 x 14 cm y un monte de sanitas. Sobre las sanitas va una cubierta plástica y una botella llena de agua (peso).
 - c) Se coloca parafilm entre las orillas del gel y el segundo wattman para asegurar la transferencia de la solución a través del gel.
10. La transferencia se deja o/n.
11. Se marcan los pozos. La membrana se deja secar por 1 hora a temperatura ambiente, para luego fijar el DNA a la membrana con la luz UV a 12000 μ J.
12. La membrana se pone a pre-hibridar en solución de hibridación sin sonda por 2 horas a 42° C.
13. Posteriormente se hibrida la membrana con la solución de hibridación + sonda y se deja hibridando 2 Cot $\frac{1}{2}$ a 42° C.
- Cálculo del Cot $\frac{1}{2}$ = 2 (1/X)(Y/5)(Z/10); donde X es el peso de la sonda en μ g (en este caso son 0.050); Y es el tamaño de la sonda en Kb (en este caso son 6), y Z es el volumen de hibridación (que en este caso son 10 ml). Por lo tanto, 2 Cot $\frac{1}{2}$ = 48 horas.
14. Después de la hibridación, la membrana se lava con 2X SSC, 0.5% SDS 15 minutos a temperatura ambiente. De ser necesario, se repite este paso.
15. La membrana se pone a exponer a una placa de rayos X o/n y se revela.

L) Purificación del Inserto de la clona de p921 (cistrón ribosomal de *Trichomonas vaginalis*) para utilizar como sonda en el Southern blot.

1. Después de la digestión del plásmido p921 con EcoRI, se purificó el inserto de 6kb (correspondiente al cistrón ribosomal) del gel utilizando el kit "Matrix gel extraction system – Marligen biosciencie" siguiendo las indicaciones del proveedor.

M) Obtención de sonda radiactiva

1. El inserto purificado quedó a una concentración de 5 ng/ μ l. Se utilizaron 50 ng del inserto para hacer la sonda, es decir, 10 μ l.
2. Se utilizó el kit de marcaje "Rediprime II Random Primer Labelling system – Amersham biosciences".
3. 10 μ l del inserto purificado se mezclaron con 35 μ l de agua estéril.
4. El DNA se desnaturaliza calentándolo a 100° C por 5 minutos. Se agrega el DNA desnaturalizado al tubo del kit "Rediprime II". Posteriormente se agregan 2 μ l de α -P³²dCTP (Redivue deoxycytidine 5'-(α ³²P) triphosphate triethylammonium SALT – Amersham biosciences) y se mezcla por pipeteo.
5. La reacción se incubó a 37°C 15 minutos.
6. Mientras tanto se prepara una columna de Sephadex G-50 para eliminar la marca libre:

- a) En una jeringa de insulina sin aguja se coloca un poco de fibra (para taparla) y Sephadex G-50 (TE) hasta llenarla.
- b) Se centrifuga en tubos de ensayo a 3000 rpm 2 minutos para eliminar el buffer TE.
- c) Así ya está lista la columna para eliminar la marca libre de la sonda.
7. Una vez terminada la incubación de la reacción se agregan 50µl de TE, y se coloca en la columna de Sephadex recién preparada. Esta se centrifuga a 3000 rpm 2 minutos (la sonda se recupera en un tubo de 0.5ml sin tapa).
8. Para desnaturalizar la sonda se agregan 10µl de NaOH 3N y se incuba 5 minutos a temperatura ambiente.
9. Se transfiere a hielo y se agregan 10µl de HCl 3N.
10. Finalmente se agregan 5µl de Tris 1M y se mantiene en hielo, para luego agregar a la solución de hibridación. Dicha solución se pone en contacto con la membrana pre-hibridada.

N) PCR para obtener templado de Transcripción *in vitro*

1. Se amplificó un fragmento que contiene una región del DNAr desde 133pb río arriba del extremo 3' del gen del RNAr 16S-like hasta el final del gen del RNAr 5.8S. Los oligonucleótidos utilizados para lograr esto fueron SSU-1 y 58S-T7 (este oligo es de secuencia reversa complementaria el extremo 3' del gen del RNAr 5.8S + la secuencia del promotor de RNA polimerasa T7).
2. El PCR se preparó de la siguiente forma: En un tubo de PCR de 0.5ml de mezclaron en el siguiente orden: 32.5µl de agua estéril + 5µl del buffer 10X de Altaenzymes + 3µl de dNTPs 10mM + 3µl de Cloruro de Magnesio 25mM + 3µl del oligonucleotido 58S-T7 (200ng/µl) + 3µl del oligonucleotido SSU-1 (200 ng/µl) + 0.5 µl de DNA del plásmido p921 (10 ng/µl) + 0.5µl de la DNA polimerasa recombinante Pfu (Altaenzymes)*.
- * La enzima se agrega hasta el minuto 5 del primer paso del programa detallado en el punto 3.
3. Posteriormente se agregaron 100µl de aceite mineral para evitar la evaporación de la mezcla y se colocó en el termociclador con el siguiente programa:
 - 1) 10' a 92° C, 2) 1' a 92° C, 3) 1' a 42° C, 4) 3' a 72° C, 5) Repetir 30 veces desde el paso 2, 6) 1' a 92° C, 7) 1' a 42° C, 8) 5' a 42 °C, 9) 20h a 4° C.
4. El producto de PCR se extrajo con 200µl de cloroformo y se revisó en un gel de agarosa al 2% (Protocolo T).

O) Ensayo de Transcripción *in vitro* – kit Maxiscript T7 - Ambion

1. En un tubo de 1.5ml de hace la siguiente reacción:
 - a) 2.5µl del templado de PCR de la metodología anterior (58T-S) + 1.5µl de agua DEPC + 1µl de buffer 10X de transcripción + 0.5µl de ATP 10mM + 0.5µl de CTP 10mM + 0.5µl de GTP 10mM + 2.5µl de α P³²-UTP (Uridine 5'-(α-32P) triphosphate triethylammonium salt (SP6/T7 grade) – Amersham biosciences) + 1µl de T7 enzyme mix.
 - b) Los 10µl totales de la reacción se mezclan pipeteando, y se incuban a 37° C por 10 minutos.
2. El templado de DNA se remueve con 1µl de DNasa I, a 37° C 15 minutos.
3. Posteriormente se agregan 12µl de buffer de carga II, y las muestras se calientan a 95° C por 3 minutos.
4. La muestra de 24µl se carga en dos pozos de un gel de acrilamida 4%/Urea 7M. Se corre por 2 horas a 60 V.
5. El gel se cubre con plástico auto-adheribe y se expone a una placa de rayos X por 15 minutos. Dicha placa se revela y se utiliza como molde para cortar la banda correspondiente a la transcripción *in vitro* de mayor tamaño (puede haber varias bandas).

6. La banda cortada se eluye con 300µl del buffer de elusión del kit RPA III y se deja eluyendo o/n a 37° C.
7. El producto de la elusión tenía 3500 cpn/200µl.

P) Ensayo de protección a ribonucleasas – RPA III (Ambion)

1. Hibridación: Se preparan las siguientes mezclas:

#	Nombre *	RNA muestra *	Concentración RNA muestra *	Concentración RNasa **	RNA extra *
1	558	5S	1µl (0.1µg/µl)	1:100	1µl RNA _t Tv
2	558 A	5S	1µl (1µg/µl)	1:100	---
3	5858	5.8S	1µl (0.1µg/µl)	1:100	1µl RNA _t Tv
4	5858 A	5.8S	1µl (1µg/µl)	1:100	---
5	T 58	tRNA Tv	1µl (1µg/µl)	1:100	---
6	L58	RNA levadura	1µl (5µg/µl)	1:100	---
7	58 sonda	RNA levadura	1µl (5µg/µl)	---	---

2. En cada tubo se colocaron los componentes marcados con * y 28µl de la sonda obtenida por Transcripción *in vitro*, 58T-S. La sonda y el RNA muestra se co-precipitan con 3µl de Acetato de amonio 5M + 75µl de etanol 100%, a -70° C por 1 hora.
3. Se centrifugan a 14000 rpm, 15 minutos a 4° C.
4. Se desecha el sobrenadante y el botón se deja secar 10 minutos. Se resuspende en 5µl de buffer de hibridación.
5. Se agitan, se calientan 5 minutos a 95° C.
6. Se incuban a 42° C o/n.
7. Se prepara una dilución de RNasa A/T1 1:100 en buffer de digestión III. Para cada muestra se usan 75µl de esta dilución. La muestra "58 sonda" no lleva RNasa, sólo 75µl de buffer de digestión III (control sin digestión).
8. Se incuban a 37° C 30 minutos.
9. Se agregan 112.5µl de solución de inactivación de RNAsas/precipitación III + 1µl de RNA de levadura como acarreador + 37.5µl de etanol 100%.
10. Se precipitan a -80° C 30 minutos
11. Se centrifugan a 14000 rpm por 15 minutos a 4° C.
12. Se retira el sobrenadante y se deja secar el botón por 10 minutos.
13. Se agregan 5µl de buffer de carga II a cada tubo, se agitan vigorosamente, y se incuban 3 minutos a 95° C.
14. Se almacenan en hielo hasta cargarse.
15. Se prepara RNA de *Trypanosoma cruzi* para usar como marcador de peso molecular: 6µl de RNA + 6µl de buffer de carga tratado de la misma forma que en el paso 13.
16. Las muestras se cargaron por orden (igual que la tabla I) en un gel de acrilamida 4%/urea 7M.
17. Se corre a 60V por 2 horas. Al terminar la corrida se corta el primer carril en donde se cargó el RNA total de *Trypanosoma cruzi* y se tiñe con Bromuro de etidio-DEPC.
18. El resto del gel se pegó en papel watman y se envolvió en papel auto-adherible para exponerse a una placa de rayos X por 1 día a -70°C.
19. Se revela.

Q) RT-PCR

1. Se utilizaron como templado las moléculas de RNAr purificadas de las bandas de 120 y 160b (protocolo B) del RNA total de *T. vaginalis*.
2. Para hacer la primera cadena (cDNA), en un tubo de 0.5ml se colocan 10ng de RNAr purificado de la banda de 120b, ó 10ng del RNAr purificado de la banda de 160b (5.8S) + 100ng del oligonucleotido 58S-2 (0.5 μ l de una concentración de 200ng/ μ l) + 1 μ l de dNTPs 10mM + 3.6 μ l de agua DEPC.
3. Los 6 μ l totales se incuban 10 minutos a 70° C y luego se transfieren a hielo.
4. Mientras tanto, se prepara en un tubo de PCR de 0.5ml: 1 μ l de agua DEPC + 2 μ l de buffer 5X de cDNA + 0.5 μ l DTT 0.1M. Este tubo se coloca en el termociclador a 42° C, luego se agrega el volumen del primer tubo + 0.5 μ l de la transcriptasa reversa resistente a alta temperatura: ThermoScript Reverse Transcriptase (Invitrogene, Life Technologies). Esta mezcla se mantiene a 42° C otros 5 minutos.
5. Posteriormente se sigue el siguiente programa de PCR para obtener la primera cadena de templados altamente estructurados: 1) 5' a 46° C, 2) 5' a 50° C, 3) 5' a 55° C, 4) 5' a 60° C, 5) 30' a 65° C, 6) 5' a 85° C, 7) 30' a 37° C (aquí se agrega 1 μ l de RNasa H/RNasa A (kit)), 8) 30' a 37° C, 9) 20h a 4° C.
6. Al día siguiente se realizó la reacción de PCR: En un tubo de PCR se ensamblan por orden: 30 μ l de agua estéril de PCR + 5 μ l de buffer 10X de PCR + 6 μ l de cloruro de magnesio 25mM + 3 μ l de dNTPs 10mM + 3 μ l del oligonucleotido 58S- 2 (200ng/ μ l) + 3 μ l del oligonucleotido 58S-1 ó 58S-DINT (200ng/ μ l) + 2 μ l de la primera cadena obtenida a partir del RNAr 5.8S, o del RNAr de la banda de 120b.
7. Luego se agregan 100 μ l de aceite mineral. El tubo se coloca en el termociclador con el siguiente programa: 1) 2' a 92° C (al minuto 1 se agrega la Taq polimerasa), 2) 1' a 92° C, 3) 1' a 42° C, 4) 3' a 72° C, 5) Repetir 35 veces al paso 2, 6) 1' a 92° C, 7) 1' a 42° C, 8) 5' a 72° C, 9) 20h a 4° C.
8. Los productos de PCR se extraen con 200 μ l de cloroformo. Se revisan 5 μ l en un gel de agarosa 2% -TAE a 80V, ~1.5h (Protocolo T).

R) Extracción de plásmidos (Mini-Preps)

1. Se crece un cultivo o/n de la clona p921, a 37° C en agitación, en 40ml de LB + 40 μ l de ampicilina (100mg/ml). Las células para el cultivo se tomaron directamente del glicerol de dicha clona.
2. El cultivo era suficiente para hacer 10 mini-preps.
3. Se colocan 1.5ml de cultivo por tubo, y se centrifugan a 12000 rpm 30 segundos. Se retira el sobrenadante y se agregan otros 1.5ml de cultivo por tubo.
4. Se centrifuga a 12000 rpm 30 segundos y se retira el sobrenadante. El agita ligeramente el botón para suavizarlo.
5. Se resuspende el botón en 100 μ l de solución I fría por agitación vigorosa.
6. Se agregan 200 μ l de solución II recién preparada. Se mezcla el contenido por inversión de los tubos y se almacena en hielo.
7. Se agregan 150 μ l de solución III fría, y se agita ligeramente por 10 segundos.
8. Se almacena en hielo por 5 minutos.
9. Se centrifuga a 12000 rpm, 5 minutos. El sobrenadante se extrae de igual forma que en el paso 3 del protocolo K.
10. El botón de DNA plasmídico después de la precipitación se re-disuelve en 50 μ l de TE con RNasa pancreática (20 μ g/ml) por 20 minutos a 37° C.
11. Se agita brevemente y se almacena a -20° C.
12. Se revisan 2 μ l del Mini-prep + 2 μ l de buffer muestra TAE 5X, en un gel de agarosa 0.8% a 80V por 1 hora.

S) Cultivo de *Trichomonas vaginalis*

1. Las *Trichomonas* se cultivan en medio Tym con Suero de caballo al 10%.

2. Se cultivan en tubos de ensayo con 6ml de medio Tym + 0.6ml de Suero de Caballo. Se siembran diluciones de un cultivo anterior de 0.1 – 0.3 ml para que al día siguiente estén en fase logarítmica.
3. Diluciones de 0.1-0.3ml del cultivo anterior se cultivan para que hayan crecido hasta fase logarítmica en dos días.
4. Los tubos se colocan a 37° C inclinados en una gradilla, para que las *Trichomonas* puedan adherirse a la pared del tubo.

T) Análisis de DNA en geles de agarosa

1. La agarosa se prepara en buffer de corrida TAE 1X a una concentración de 0.8 a 2 % dependiendo del tamaño de las moléculas a analizar.
2. La agarosa preparada se calienta en el microondas hasta licuarla, luego se coloca en el recipiente de la cámara diseñado para solidificar los geles, y se deja enfriar ~30 minutos.
3. Siempre se cargan, como marcador de peso molecular, 10µl de λHind III.
4. Las muestras se preparan con 1:1 de muestra: buffer muestra TAE 5X. Se puede agregar agua para obtener un volumen fácil de cargar (~10µl).
5. Estos geles se corren entre 80 y 100 V, por ~1 hora en buffer TAE 1X.
6. Una vez terminada la corrida se tiñen por 5 minutos en Bromuro de etidio-TAE 1X.
7. Se destiñen 15 minutos en agua destilada y se observan en el transiluminador para tomar la foto.

U) Obtención de estructuras secundarias putativas en el programa *Mfold* de Zuker.

1. Ingresar a la página de Internet *Mfold* (RNA folding server): <http://www.bioinfo.rpi.edu/applications/mfold/old/rna/form1.cgi>
2. En la zona de “Quikfold server” se nombra la molécula a doblar y se coloca la secuencia a doblar (en este caso, las 118b del RNAr 5S maduro o las 162b del RNAr 5.8S maduro) en formato lineal.
3. En el punto “constraint information” se pueden forzar apareamientos, o bien, prevenir algunos. Los apareamientos forzados del RNAr 5S ó 5.8S primero se diseñaron a mano con base en los apareamientos “universales” reportados (Vaughn y Sperbeck, 1984 y Wildeman y Nazar, 1982)
4. La orden F a b c, corresponde a forzar hélices o tallos-asa: F representa la orden “Force”; “a” corresponde al número de la primera base de la secuencia que corresponderá a la primera base del tallo; “b” corresponde al número de la última base de la secuencia que se apareará con la primera base “a”; “c” es el número de apareamientos posteriores al primero “a”-“b”.
5. La orden P a 0 b funciona para prohibir apareamientos: P representa la orden “Prohibit”; “a” corresponde a la primera base de la secuencia que se desea permanezca en cadena sencilla en la estructura secundaria final; “b” corresponde al número de bases posteriores a “a” que no estarán apareadas.
6. Los únicos apareamientos no-canónicos permitidos son G-U. El resto deben de evitarse en los apareamientos forzados, de lo contrario el programa indicará “trabajo rechazado por error”.
7. Las órdenes utilizadas para obtener la estructura secundaria del RNAr 5S fueron:
 F 23 53 2 (la base 23 se apareara con la 53, y la 24 con la 52 (tallo de dos pares de bases))
 P 9 0 4 (se prohíbe el apareamiento de las bases 9, 10, 11 y 12 (cuatro bases))

F 13 66 4
 F 28 48 4
 F 67 108 2
 F 70 105 2
 F 78 98 5
 P 33 0 12

8. Las órdenes utilizadas para obtener la estructura secundaria del RNAr 5.8S fueron:

F 37 98 2
F 39 95 3
F 46 59 4
F 71 84 2
F 73 81 3
F 106 114 3
P 101 0 4
P 1 0 30
P 141 0 19

9. El resto de los parámetros del programa se mantienen, y se oprime el botón "Fold RNA".

10. En el "Output" se elige la figura en formato JPEG y se almacena.

12. Referencias

1. Abou Elela S, Good L, Melekhovets YF y Nazar RN. Inhibition of protein synthesis by an efficiently expressed mutation in yeast 5.8S ribosomal RNA. *Nucleic Acids Res* 1994; 22: 686-93.
2. Abou Elela S y Nazar RN. Role of the 5.8S rRNA in ribosome translocation. *Nucleic Acids Res* 1997; 25: 1788-94.
3. Alderete JF, Kasmala L, Metcalfe E y Garza GE. Phenotypic variation and diversity among *Trichomonas vaginalis* isolates and correlation of phenotype with trichomonad virulence determinants. *Infect Immun* 1986; 53: 285-93.
4. Ammons D, Rampersad J y Fox GE. 5S rRNA gene deletion causes an unexpectedly high fitness loss in *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res* 1999; 27: 637-42.
5. Ashburner M y Novitsky E. *The genetics and biology of Drosophila*. Academic Press New York 1976.
6. Barciszewska MZ, Szymanski M, Erdmann V y Barciszewski J. Structure and functions of 5S rRNA. *Acta Biochimica Polonica* 2001; 48: 191-8.
7. Bateman W y Paule MR. Promoter occlusion during ribosomal RNA transcription. *Cell* 1988; 54: 985-92.
8. Betzel C, Lorenz S, Furste JP, Bald R, Zhang M, Schneider TR, Wilson KS y Erdmann VA. Crystal structure of domain A of *Thermus flavus* 5S rRNA and the contribution of water molecules to its structure. *FEBS Lett* 1994; 351: 159-64.
9. Braun BR, Bartholomew B, Kassavetis GA y Geiduschek EP. Topography of transcription factor complexes of the *Saccharomyces cerevisiae* 5S rRNA gene. *J Mol Biol* 1992; 228: 1063-77.
10. Carmo-Fonseca M, Mendes-Soares L y Campos I. To be or not to be in the nucleolus. *Nat Cell Biol* 200; 2: E107-12.
11. Cassidy LA y Maher III LJ. Survey and Summary: Having it both ways: transcription factors that bind DNA and RNA. *Nucleic Acids Res* 2002; 30: 4118-26.
12. Castro C, Hernández R y Castañeda M. Trypanosoma cruzi ribosomal RNA: internal break in the large-molecular-mass species and number of genes. *Mol Biochem Parasitol* 1981; 2: 219-33.
13. Chakrabarti D, Dame JB, Gutell RR y Yowell CA. Characterization of the rDNA unit and sequence analysis of the small subunit rRNA and 5.8S rRNA genes from *Tritrichomonas foetus*. *Mol Biochem Parasitol* 1992; 52: 75-84.
14. Champney WS, Chittum HS y Samuels R. Ribosomes from trichomonad protozoa have prokaryotic characteristics. *Int J Biochem* 1992; 24: 1125-33.
15. Clemens KR, Steven VW, McBryant SJ, Zhang P, Liao X, Wright PE, Gottesfeld JM. Molecular basis for specific recognition of both RNA and DNA by a zinc finger protein. *Science* 1993; 260: 530-3.

16. Cockburn AF, Taylor WC y Firtel RA. *Dictyostelium* rDNA consists of non-chromosomal palindromic dimmers containing 5S and 36S coding region. *Chromosoma* 1978; 70: 19-29.
17. Cozzarelli NR, Gerrard SP, Schlissel M, Brown DD y Bogenhagen DF. Purified RNA polymerase III accurately and efficiently terminates transcription of 5S rRNA genes. *Cell* 1983; 34: 829-35.
18. Delgadillo MG, Liston DR, Niazi K y Jhonson PJ. Transient and selectable transformation of the parasitic protist *Trichomonas vaginalis*. *PNAS* 1997; 94: 4716-20.
19. Delihans N, Andersen J y Singhal RP. Structure, function and evolution of 5-S ribosomal RNAs. *Progress in Nucleic Acid Res Mol Biol* 1984; 31: 161-90.
20. Drmota T y Kral J. Karyotype of *Trichomonas vaginalis*. *Eur J Protistol* 1997; 42: 610-6.
21. Dokudovskaya S, Dontsova O, Shpanchenlo O, Bogdanov A y Brimacombe R. Loop IV of 5S ribosomal RNA has contacts both to domain II and to domain V of the 23S RNA. *RNA* 1996; 2: 146-52.
22. Espinosa N, Hernández R, López-Griego L y López-Villaseñor I. Separable putative polyadenylation and cleavage motifs in *Trichomonas vaginalis* mRNAs. *Gene* 2002; 289: 81-6.
23. French SL, Osheim YN, Cioci F, Nomura M y Beyer A. In exponentially growing *Saccharomyces cerevisiae* cells, rRNA synthesis is determined by the summed RNA polymerase I loading rate rather than by the number of active genes. *Mol Cell Biol* 2003; 23: 1558-68.
24. Garret R. Mechanics of the ribosome. *Nature* 1999; 400: 811-12.
25. Gray MW, Burger G y Lang BF. Mitochondrial Evolution. *Science* 1999; 283:1476-81.
26. Henderson AS, Warburton D y Atwood KC. Location of ribosomal DNA in the human ribosomal complement. *PNAS* 1972; 69:3394-8.
27. Hernández-Rivas R, Martínez-Calvillo S, Romero M y Hernández R. *Trypanosoma cruzi* 5S rRNA genes: molecular cloning, structure and chromosomal organization. *FEMS Microbiol Lett* 1992; 92: 63-8.
28. Hill WE, Dahlberg A, Garret RA, Moore PB, Schlessinger D y Warner J. The ribosome: structure, function and evolution. American Society for Microbiology Washintong, D.C. 1990.
29. Huang S. Building an efficient factory: where is pre-rRNA synthesized in the nucleolus? *J Cell Biol* 2002; 157: 739-41.
30. Ju Q, Morrow BE y Warner JR. REB1, a yeast DNA-binding protein with many targets is essential for growth and bears some resemblance to oncogene myb. *Mol Cell Biol* 1990; 10: 5226-34.
31. Katiyar S, Visvesvara GS y Edlind TD. Comparisons of ribosomal RNA sequences from amitochondrial protozoa: implications for processing, mRNA binding and paromomycin susceptibility. *Gene* 1995; 152: 27-33.

32. Khaitovich P, Mankin A. Effect of antibiotics on large ribosomal subunit assembly reveals possible function of 5S rRNA. *J Mol Biol* 1999; 291:1025-34.
33. Khaitovich P, Tenson T, Kloss P y Mankin AS. Reconstitution of functionally active *Thermus aquaticus* Large Ribosomal Subunits with in Vitro-Transcribed rRNA. *Biochemistry* 1999; 38: 1780-8.
34. Karrer K y Gall JC. The macromolecular ribosomal DNA of *Tetrahymena Pyriformis* is a palindrome. *J Mol Biol* 1976; 104: 421-53.
35. Keller M, Tessier LH, Chan RL, Weil JH e Imbault P. In *Euglena*, spliced-leader RNA (SL-RNA) and 5S rRNA genes are tandemly repeated. *Nucleic Acids Res* 1992; 20: 1711-5.
36. Klootwijk J, Jonge P y Planta RJ. The primary transcript of the ribosomal repeating unit in yeast. *Nucleic Acids Res* 1979; 6: 27-39.
37. Kock J y Cornelissen AWMA. The 5S ribosomal RNA of *Crithidia fasciculata*. *Mol Biochem Parasitol* 1990; 38: 259-98.
38. Kobayashi T, Heck DJ, Nomura M y Horiuchi T. Expansion and contraction of ribosomal DNA repeats in *Saccharomyces cerevisiae*: requirement of replication fork blocking (Fob1) protein and the role of RNA polymerase I. *Genes Dev* 1998; 12:3821-30.
39. Kressler D, Linder P y Cruz Jdl. Protein *trans*-acting factors involved in ribosome biogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 1999; 19: 7897-912.
40. Land KM, Delgadillo-Correa MG, Tachezy J, Vanacova S, Hsieh C, Sutak R y Jhonson PJ. Targeted gene replacement of a ferredoxin gene in *Trichomonas vaginalis* does not lead to metronidazole resistance. *Mol Microbiol* 2004; 51:115-22.
41. Langst G, Becker PB y Grummt I. TTF-I determines the chromatin architecture of the active rDNA promoter. *EMBO J* 1998; 17: 3135-45.
42. Lee Y, Erkin AM, Van Ryk DI y Nazar RN. *In vivo* analyses of the internal control region in the 5S rRNA gene from *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res* 1995; 23: 634-40.
43. Lee Y y Nazar RN. Ribosomal 5S rRNA maturation in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 1997; 272: 15206-12.
44. Lee Y, Wong WM, Guyer D, Erkin AM y Nazar RN. *In vivo* analyses of upstream promoter sequence elements in the 5S rRNA gene from *Saccharomyces cerevisiae*. *J Mol Biol* 1997; 269: 676-83.
45. Lehker MW y Sweeney D. Trichomonad invasion of the mucous layer requires adhesins, mucinases and citoadherence levels in the protozoan *Trichomonas vaginalis*. *Sex Transm Infect* 1999; 174: 311-8.
46. Levine ND. *Veterinary protozoology*. Dubuque, Iowa State University Press. 1985.
47. Lindell TJ, Weinberg F, Morris PW, Roeder RG y Rutter WJ. Specific inhibition of nuclear RNA polimerase II by alpha-amanitin. *Science* 1970; 170: 447-9.

48. Lindmark KG y Muller M. Hydrogenosome, a cytoplasmic organelle of the anaerobic flagellate, *Trichomonas foetus*, and its role in pyruvate metabolism. *J Biol Chem* 1973; 248:7724-8.
49. Liston DR, Lau AO, Ortiz D, Smale ST y Jhonson PJ. Initiator recognition in a primitive eukaryote: IBP39, an initiator-binding protein from *Trichomonas vaginalis*. *Mol Cell Biol* 2001; 21: 7872-82.
50. Lo AC, Liu W y Nazar RN. Alternative conformational states in the ribosome-associated 5.8S RNA. *Eur J Biochem* 1984; 41: 549-53.
51. López-Villaseñor I, Contreras AP, López-Griego L, Álvarez-Sánchez E y Hernández R. *Trichomonas vaginalis* ribosomal DNA: analysis of the intergenic region and mapping of the transcription start point. *Mol Biochem Parasitol* 2004; 137: 175-9.
52. Lu D, Searles MA y Klug A. Crystal structure of a zinc-finger-RNA complex reveals two modes of molecular recognition. *Nature* 2003; 426: 96-100.
53. Luoma GA y Marshall AG. Laser Raman evidence for new coverleaf secondary structures for eukaryotic 5.8S RNA and prokaryotic 5S RNA. *PNAS* 1978; 75:4901-05.
54. Luna JP y Orozco E. La frontera: genética molecular de la enfermedad, Tomo I. IPN 2004. Capítulo 6 por Alderete JF, Crouch ML y Arroyo R.
55. Mandal RK. The organization and transcription of eukaryotic ribosomal RNA genes. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 1984; 31: 115-60.
56. Mandal RK y Dawid IB. The nucleotide sequence at the transcription termination site of ribosomal RNA in *Drosophila melanogaster*. *Nucleic Acids Res* 1981; 9: 1801-11.
57. Mathews DH, Sabina J, Zuker M, Turner DH. Expanded sequence dependence of thermodynamic parameters improves prediction of RNA secondary structure. *J Mol Biol* 1999; 288: 911-40.
58. Meysick K y Garber GE. *Trichomonas vaginalis*. *Curr Opin in Infect Dis* 1995; 8: 22-5.
59. Murphy C, Wang Z, Roeder RG y Gall JG. RNA polymerase III in Cajal Bodies and Lampbrush chromosomes of the *Xenopus* oocyte nucleus. *Mol Biol Cell* 2002; 13: 3466-76.
60. Nazar RN, Sitz TO y Busch H. Structural analyses of mammalian ribosomal ribonucleic acid and its precursors. Nucleotide sequences of ribosomal 5.8S ribonucleic acid. *J Biol Chem* 1975; 250: 8591-97.
61. Nelson DL y Cox MM. *Lehninger Principles of Biochemistry*. Fourth edition. WH Freeman and Company, New York. 2005.
62. Nissen P, Ippolito JA, Ban N, Moore PB y Steitz TA. RNA tertiary interactions in the large ribosomal subunit: The A-minor motif. *PNAS* 2001; 98: 4899-903.
63. Noble E, Noble G, Schad G y MacInnes A. *Parasitology, the biology of animal parasites*. Lea and Febiger. 1989.

64. Noller HF, Kop JA, Wheaton V, Brosius J, Gutell RR, Kopylov AM, Dohme F, Herr W, Stahl DA, Gupta R y Woese CR. Secondary structure model for 23S ribosomal RNA. *Nucleic Acids Res* 1981; 9: 6167-89.
65. Nolte RT, Conlin RM, Harrison SC y Brown RS. Differing roles for zinc fingers in DNA recognition: structure of a six-finger transcription factor IIIA complex. *PNAS* 1998; 95: 2938-43.
66. Ortiz D y Jhonson PJ. Tetracycline-inducible gene expression in *Trichomonas vaginalis*. *Mol Biochem Parasitol* 2003; 128: 43-9.
67. Otsuka T, Nomiyama H, Yoshida H, Kukita T, Kuhara S, y Sakaki Y. Complete nucleotide sequence of 26S rRNA gene of *Physarum polycephalum*: its significance in gene evolution. *PNAS* 1983; 80: 3163- 7.
68. Paule MR y White RJ. Survey and Summary: Transcription by RNA polymerases I and III. *Nucleic Acids Res* 2000; 28: 1283-98.
69. Pieler T, Hamm J, Roeder RG. The 5S gene internal control region is composed of three distinct sequence elements, organized as two functional domains with variable spacing. *Cell* 1987; 48: 91-100.
70. Raska I, Koberna K, Malinsky J, Fidlerova H y Masata M. The nucleolus and transcription of ribosomal genes. *Biol Cell* 2004; 96: 579-94.
71. Ravel-Capuis P. Nuclear rDNA in *Euglena gracilis*: paucity of chromosomal units and replication of extrachromosomal units. *Nucleic Acids Res* 1988; 16: 4801-16.
72. Reeder RH. Enhancers and ribosomal gene spacers. *Cell* 1984; 28: 349-51.
73. Reeder RH y Lang WH. Terminating transcription in eukayotes: lessons learned from RNA polymerase I. *Trends Biochem Sci* 1997; 22: 473-7.
74. Schramm L y Hernández N. Recruitment of RNA polymerase III to its target promoters. *Genes and Dev* 2002; 16: 2593-620.
75. Szymanski M, Barciszewska MZ, Erdmann VA, Barciszewski J. 5S rRNA: structure and interactions. *Biochem J* 2003; 371: 641-51.
76. Smith MW, Meskauskas A, Wang P, Sergiev PV y Dinman JD. Saturation mutagenesis of 5S rRNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 2001; 21: 8264-75.
77. Smith SD, Banerjee N y Sitz TO. Gene Heterogeneity: A basis for alternative 5.8S rRNA processing. *Biochemistry* 1984; 23: 3648-52.
78. Sollner-Webb B y Reeder RH. The nucleotide sequence of the initiation and termination sites for ribosomal RNA transcription in *X. laevis*. *Cell* 1979; 18: 485-99.
79. Sorensen PD y Frederiksen S. Characterization of human 5S rRNA genes. *Nucleic Acids Res* 1991; 19: 4147-51.
80. Sturges MR, Bartilson M y Lawrence JP. Enhancer of RNA polymerase III gene transcription. *Nucleic Acids Res* 1999; 27: 690-4.

81. Szymanski M, Barciszewska MZ, Erdmann VA y Barciszewski J. 5S ribosomal RNA database. *Nucleic Acids Res* 2002; 30: 176-8.
82. Torres-Machorro AL, Hernández R, Sánchez J y López-Villaseñor I. Experimental and *in silico* approaches in the identification and characterization of the 5S ribosomal RNA gene in the early diverging protozoa *Trichomonas vaginalis* 2005. Enviado.
83. Ursi D, Vandenberghe A y De Wachter R. Nucleotide sequences of 5.8S rRNAs of a mollusc and a porifer, and considerations regarding the secondary structure of 5.8S rRNA and its interactions with 28S rRNA. *Nucleic Acids Res* 1983; 11: 8111- 20.
84. Vanacova S, Tachezy J, Ullu E y Tschudi C. Inusual diversity in alpha-amanitin sensitivity of RNA polymerases in trichomonads. *Mol Biochem Parasitol* 2001; 115: 239-47.
85. Vanacova S, Liston D, Tachezy J y Jhonson PJ. Molecular Biology of the amitochondriate parasites, *Giardia intestinalis*, *Entamoeba histolytica* and *Trichomonas vaginalis*. *Int J Parasitol* 2003; 33: 235-55.
86. Vanacova S, Weihong Y, Carlton JM y Jhonson PJ. Spliceosomal introns in the deep-branching eukaryote *Trichomonas vaginalis*. *PNAS* 2005; 102:4430-5.
87. Vaughn JC, Sperbeck SJ, Ramsey WJ y Lawrence CB. A universal model for the secondary structure of 5.8S ribosomal RNA molecules, their contact sites with 28S ribosomal RNAs, and their prokaryotic equivalent. *Nucleic Acids Res* 1984; 12: 7479-502.
88. Vilee CA. *Biología*. Octava edición. Mc Graw Hill 1996.
89. Wang AL y Wang CC. Isolation and characterization of DNA from *Tritrichomonas foetus* and *Trichomonas vaginalis*. *Mol Biochem Parasitol* 1985; 14: 323-35.
90. Wang Z, Bai L, Hsieh Y-J y Roeder RG. Nuclear factor 1 (NF1) affects accurate termination and multiple-round transcription in human RNA polymerase III. *EMBO J* 2000; 19: 6823-32.
91. Wellauer PK y Dawid IB. Secondary structure maps of RNA: processing of HeLa ribosomal RNA. *PNAS* 1973; 70: 2827-31.
92. WHO. Global prevalence and incidence of selected curable sexually transmitted infections. Overview and Estimates. 2001.
93. Wildeman AG y Nazar RN. Structural studies of 5S ribosomal RNAs from a thermophilic fungus, *Thermomyces lanuginosus*. *J Biol Chem* 1982; 257: 11395-404.
94. Wilfinger WW, Mackey K y Chomczynsky P. Effect of pH and ionic strength on the spectrophotometric assessment of nucleic acid purity. *Biotechniques* 1997; 22: 474-81.
95. Wolner-Hanssen P, Krieger JN, Stevens CE, Kiviat NB, Koutsky L, Critchlow C, DeRouen T, Hillier S y Holmes KK. Clinical manifestations of vaginal trichomoniasis. *J Amer Med Assoc* 1989; 261: 571-6.
96. Worton RG, Sutherland J, Sylvester JE, Willard HF, Bodrug S, Dube I, Duff C, Kean V, Ray PN y Schmickel RD. Human ribosomal RNA genes: Orientation of the tandem array and conservation of the 5' end. *Science* 1988; 239: 64-8.

97. Zuker M. *Mfold* web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. Nucleic Acids Res 2003; 31: 2406-15

13. Apéndice de Soluciones más utilizadas

1. Medio Tym
2. Medio LB
3. PBS
4. Acrilamida/bis acrilamida stock 40%
5. Acrilamida mix RNA
6. TBE 5X
7. TAE 50X
8. Buffer de RNA 6X
9. Agua DEPC
10. TE
11. Solución de transferencia de Southern
12. Solución de hibridación
13. Solución I de Mini-preps.
14. Solución II de Mini-preps
15. Solución III de Mini-preps

1. Medio Tym

a) Para preparar 500ml de medio:

Bacto Triptona 10g
Extracto de levadura 5g
Maltosa 2.5g
L-cisteína 0.5g
Ácido ascórbico 0.1g
KH₂PO₄ 0.4g
K₂HPO₄ 0.4g
Agua bi-destilada 450ml

- b) Se ajusta el pH a 6.2 con HCl
- c) Se afora a 500ml
- d) Se esteriliza a 20lb por 20 minutos.

2. Medio LB líquido

a) Para 500ml de medio:

Peptona 5g
NaCl 2.5g
Extracto de levadura 2.5g
NaOH 10M 150μl
Tris 1M pH= 8 5ml

- b) Se afora a 500ml con agua destilada
- c) Se esteriliza a 20lb por 20 minutos.

3. PBS (Solución de sales de fosfato)

a) Para 1L:

NaCl 8g
KCl 0.2g
Na₂HPO₄ 1.44g
KH₂PO₄ 0.2g

b) Se agregan 800ml de agua destilada y se ajusta el pH= 7.4

c) Se afora a 1L y se esteriliza.

4. Acrilamida/Bis acrilamida stock 40%

a) Para 30ml:

Acrilamida 11.4 g
Bis acrilamida 0.6g

b) Se lleva a 30ml con agua DEPC estéril.

c) Se agita hasta que se disuelva y se filtra.

d) Se almacena a 4° C protegido de la luz.

5. Acrilamida Mix 4% , 6% ó 10%

a) Para 50ml:

	4%	6%	10%
Acrilamida stock 40%	5ml	7.5ml	12.5ml
TBE 5X DEPC	10ml	10ml	10ml
Urea 7M	21g	21g	21g

b) Aforar a 50ml con agua DEPC, disolver y almacenar a 4° C.

6. TBE 5X - DEPC

a) Para 200ml:

Tris Base 10.8g
Ácido Bórico 5.48g
EDTA 0.74g

b) Se afora a 200ml con agua DEPC y se esteriliza.

7. TAE 50X

a) Para 50ml:

Tris 121g
Ácido acético glacial 2.85ml
EDTA 0.5M 5ml

b) Se afora a 50ml y se esteriliza.

8. Buffer de carga de RNA 6X

- a) Para 5ml:

Urea 3g
TBE 5X 500 μ l
Azul de Bromofenol
Xilen-Cyanol

- b) Disolver los colorantes en 300 μ l de agua DEPC y mezclar con el resto de los componentes.
c) Aforar a 5ml.

9. Agua DEPC (Agua libre de RNAsas)

- a) Se preparan 4L de agua destilada: se ponen a agitar o/n con 20 gotas de DEPC (5 gotas por litro).
b) Se divide en 5 frascos con 800ml de agua.
c) Se esteriliza antes de usar.

10. TE (Solución de Tris-EDTA)

- a) Para 100ml:

Tris 10mM : 1ml de Tris 1M
EDTA 0.2 mM : 40 μ l de EDTA 0.5M

- b) Se afora a 100ml de agua destilada y se esteriliza

11. Solución de transferencia para Southern blot

- a) Para 1L:

Ácido acético 17.4M 57.5ml
Hidróxido de amonio 7.1M 140.8ml
NaOH 10N 2ml

- b) Aforar a 1L con agua bi-destilada.

12. Solución de hibridación para Southern blot

- a) Para 30 ml:

Tris 1M 3ml
Solución de Denhardt's 100X 1.5ml
Formamida 15ml
SDS 10% 3ml
SSC 20X 7.5ml

13. Solución I para Mini-preps

Glucosa 1M 0.5ml
Tris 1M 0.25ml
EDTA 0.5M 0.2ml

Agua destilada 9.05 ml

14. Solución II para Mini-preps (preparar al momento de hacer el ensayo)

NaOH 5M 0.2ml

SDS 10% 0.5ml

Agua 4.3ml

15. Solución III para Mini-preps

Acetato de potasio 5M 6ml

Ácido acético glacial 1.15ml

Agua destilada 2.85ml

14. Apéndice de oligonucleótidos utilizados en PCR, RT-PCR y “Primer extension”

Nombre	Secuencia	Localización
SSU-1	5'-GTCGCTCCTACCGATTGG-3'	133pb río arriba del extremo 3' del RNAr 16S
58S-1	5'-AGTCTCTAAGCAATGGAT-3'	Extremo 5' del RNAr 5.8S
58S-2	5'-GATGTAGTACTGTCACAC-3'	Extremo 3' del RNAr 5.8S
58S-T7	5'-TAATACGACTCACTATAGGGATGTAGTACTGTCACACCC-3'	Extremo 3' del RNAr 5.8S + Promotor T7