



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS  
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

## Obtención de un sistema de análisis para genes transcritos por RNA polimerasa III en Trichomonádidos. Estudio del gen del RNAr 5S.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
DOCTORA EN CIENCIAS

PRESENTA:

LIBB. ANA LILIA TORRES MACHORRO

Director de Tesis: Dra. Imelda López Villaseñor



MÉXICO, D.F., CIUDAD UNIVERSITARIA, 2010



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.

**Este estudio se realizó bajo la dirección de la Dra. Imelda López Villaseñor en el Departamento de Biología Molecular y Biotecnología del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM.**

**El comité tutorial estuvo integrado por la Dra. Imelda López Villaseñor, la Dra. Rossana Arroyo Verástegui y el Dr. Félix Recillas Targa.**

**El trabajo se financió con los donativos correspondientes a los proyectos P45037-Q y CB - 2007-079983 del CONACyT; e IN214006 del Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT), UNAM.**

**Este estudio doctoral fue apoyado con una beca de tiempo completo del CONACyT.**

## **Agradecimientos**

A la Universidad Nacional Autónoma de México, al Instituto de Investigaciones Biomédicas y al Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas (PDCB) por ofrecer la infraestructura necesaria para realizar mis estudios de posgrado.

A mi tutora, la Dra. Imelda López Villaseñor por ser mi guía y motivación. La formación científica que me diste es única e irremplazable.

A mi comité tutorial, integrado por la Dra. Rossana Arroyo Verástegui, el Dr. Félix Recillas Targa y la Dra. Imelda López Villaseñor por su dedicación, interés y esfuerzo en mi formación científica y personal.

A los integrantes del jurado, la Dra. Carmen Gómez Eichelmann, la Dra. Imelda López Villaseñor, el Dr. Roberto Coria Ortega, el Dr. Ángel Zarain y el Dr. Miguel Ángel Cevallos por sus importantes aportaciones a este trabajo y a mi formación académica.

Al Dr. Roberto Hernández y a la Dra. Ana María Cevallos por sus enseñanzas y apoyo.

Al Dr. John F. Alderete por su calidez y apoyo durante mi visita a su laboratorio.

A Blanca Huerta, Azucena Ayala, al Dr. Rafael Camacho y al Dr. Edmundo Lamoyi por su apoyo en la realización de todos los trámites realizados durante mi doctorado y titulación.

A CONACyT por la beca proporcionada para mis estudios doctorales.

Por estar siempre a mi lado  
A mi licenciado, mi chaparro, mi amor.  
Yo también estaré siempre a tu lado...

## **Dedicatorias**

Dios, gracias por guiarme por este camino.

Ma y Pepe, la educación y el amor que me han dado me ha llevado a cumplir una meta más. Su apoyo incondicional ha sido mi mejor motivación. Los quiero mucho.

Mi Ado, ahora también compartimos título. Ha sido un placer compartir mi vida contigo.

Nidia y Che, mis abuelitas queridas, gracias por todo su amor.

A mi familia, los Torres y los Machorro, por el apoyo y cariño que siempre me dan.

Abuela Hey, Mori y Alejandro, gracias por permitirme formar parte de su familia.

Teresuca, ahí has estado también, muchas gracias por todo.

Imelda, tutora y amiga, excelente tutora, mejor amiga. Gracias por estos 7 maravillosos años.

Amigos: Norma, Karla, Vane, Rosalía, Iván, Fer, Bernardo, Wendy, Lore, Juliana, Evelyn, Pablo, Toño, Clau, Caty, Tony, ValGuz, José, René, Genaro, George, Bertha, Christian V, Christian A, Geo y Lupis. Gracias por su amistad y apoyo.

A todos aquellos que me han guiado en esta carrera científica que comienzo: Imelda, Dr. Félix, Dra. Rossana, Maricha, Dr. Ortega, Dr. Marco José, Dra. Soto, Dr. Roberto, Dra. Ana María, Dr. Joaquín, Dra. Rosalía, Dr. John F. Alderete y Dr. Laclette.

## Índice

- Resumen	- 7
- Introducción	- 9
Capítulo I. Diversidad en la organización de los genes de RNA ribosomal en microbios eucariontes.	- 20
- Antecedentes	- 41
- Justificación	- 42
- Hipótesis	- 42
- Objetivo general	- 42
- Objetivos específicos	- 42
- Resultados	- 43
Capítulo II. Análisis comparativo de los genes de rRNA 5S de <i>Trichomonas vaginalis</i> , <i>Trichomonas tenax</i> y <i>Tritrichomonas foetus</i> .	- 43
Capítulo III. Análisis funcionales del rDNA 5S de <i>T. vaginalis</i> .	- 55
- Consideraciones Finales	- 66
- Metodología	- 68
- Referencias	- 89
- Apéndice I: Descripción de microbios eucariontes pertenecientes a cada uno de los seis super-grupos.	- 97
- Apéndice II: Oligonucleótidos utilizados	- 99
- Apéndice III: Secuencias del rDNA 5S de Trichomonádidos	- 100
- Apéndice IV: Review Article: Ribosomal RNA genes in eukaryotic microorganisms: witnesses of phylogeny?	- 103
- Apéndice V: Research Article: Comparative analyses among the <i>Trichomonas vaginalis</i> , <i>Trichomonas tenax</i> , and <i>Tritrichomonas foetus</i> 5S ribosomal RNA genes.	- 104
- Apéndice VI: Antecedentes: Short Communication: The 5S ribosomal RNA gene from the early diverging protozoa <i>Trichomonas vaginalis</i>	- 105

## Resumen

La maquinaria de síntesis de proteínas, el ribosoma, se compone de RNAs ribosomales y proteínas. Los RNAs ribosomales que componen al ribosoma eucarionte son los rRNA 18S, 5.8S, 28S y 5S. El cistrón ribosomal o rDNA codifica a los rRNA 18S, 5.8S y 28S; por otro lado el rDNA 5S codifica solamente al rRNA 5S.

La organización genómica del rDNA en organismos metazoarios era considerada representativa de organismos eucariontes. En el capítulo I de esta tesis se resalta la gran variabilidad que existe en la estructura de estos genes en microorganismos eucariontes. Lo anterior lleva a cambiar la visión sobre la organización considerada “representativa” de los genes de RNA ribosomal, a una más amplia que incluye la presencia de posibles mecanismos regulatorios variables y novedosos en estos genes, aún considerados por algunos como conservados y relativamente predecibles.

Los organismos Trichomonádidos son parásitos unicelulares flagelados que conservan características regulatorias altamente divergentes, muchas veces consideradas atípicas. En el capítulo II se describe un estudio detallado de la organización genómica de los genes del rRNA 5S en tres organismos Trichomonádidos: *Trichomonas vaginalis*, *Trichomonas tenax* y *Tritrichomonas foetus*. Se resaltan características atípicas encontradas en el rDNA 5S de estos organismos, como son la identificación de dos tipos de rDNA 5S ó la presencia de tallos-asa, secuencias repetidas y un gen de ubiquitina en las regiones intergénicas. En el capítulo III se describen los análisis funcionales que se realizaron en el rDNA 5S de *Trichomonas vaginalis* en donde se comprobó, mediante transcripción *in vitro*, que este gen es transcrito por RNA polimerasa III.



## Summary

The molecular machinery for protein synthesis, the ribosome, is composed of ribosomal RNAs and proteins. The 18S, 5.8S, 28S and 5S rRNAs compose the typical eukaryotic ribosome. The main transcription unit or rDNA codes for the 18S, 5.8S and 28S rRNAs; on the other hand the 5S rDNA codes for the 5S rRNA.

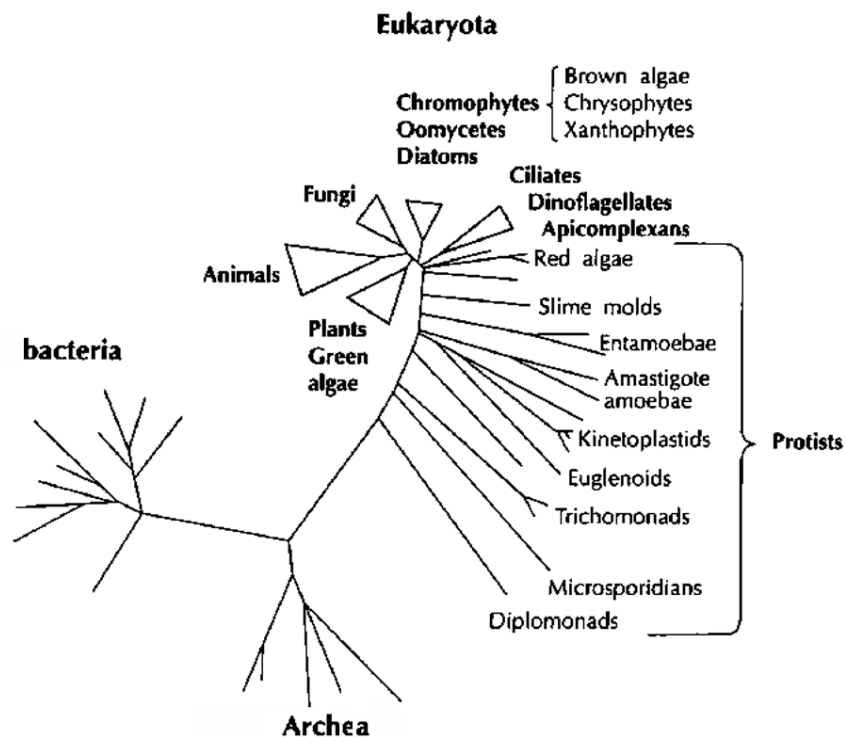
A compilation describing the genomic organization of ribosomal RNA genes in eukaryotic microorganisms is shown in chapter I. This review shows that the ribosomal RNA genes have great structural variations compared to the organization found in metazoan organisms. This variability suggests the presence of contrasting and species-specific regulatory mechanisms for rRNA expression among eukaryotes.

Trichomonads are unicellular parasites with highly divergent regulatory mechanisms. A detailed study of the genomic organization of 5S rDNA in Trichomonads is shown in chapter II. Atypical characteristics found in the 5S rDNA are shown, such as the identification of two types of 5S rDNA and the presence of palindromic and repeated sequences in the intergenic region. Functional analyses made for the 5S rDNA of *Trichomonas vaginalis* are shown in chapter III, where we show, by in vitro transcription analyses, that the RNA pol III transcribes this gene.

## Introducción

Todos los organismos se pueden clasificar en dos grupos: eucariontes y procariontes. Los organismos eucariontes se distinguen de los procariontes por la localización nuclear de su DNA y por la repartición de funciones en organelos delimitados por membranas (Villegas C.A., 1996).

Los organismos eucariontes se han clasificado de distintas formas mediante análisis filogenéticos. En 1991 Sogin utilizó las secuencias del rRNA de la subunidad menor para hacer análisis filogenéticos en organismos eucariontes (Sogin, 1991). De esta forma obtuvo un árbol que localizaba a las plantas y animales en la copa, mientras que la mayoría de los eucariontes unicelulares (protistas) se localizaban en la base del árbol, sin tener una agrupación clara (Fig. 1); esto se planteaba como resultado de la gran diversidad encontrada entre los protistas. La hipótesis también proponía que los protistas son organismos ancestrales que mantienen mecanismos regulatorios primitivos, acorde con su localización basal en el árbol eucarionte y con las características pseudo-bacterianas encontradas en protistas. Entre estas se incluyen el tamaño reducido de sus rRNA y ribosomas, así como la carencia de organelos eucariontes típicos como mitocondrias, peroxisomas y aparato de Golgi (Sogin, 1991).

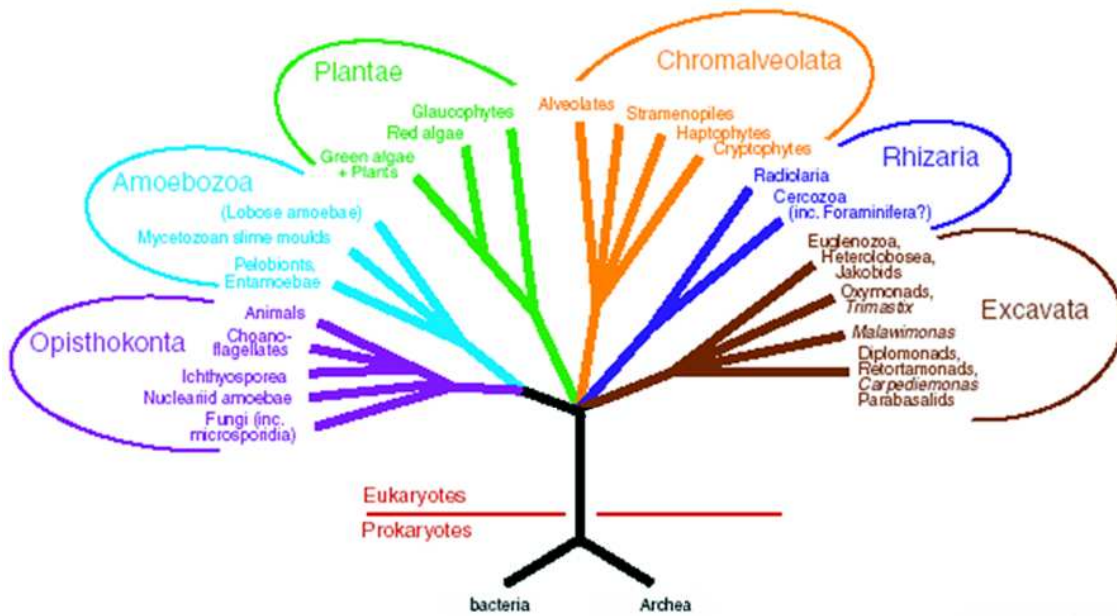


**Fig. 1** Árbol filogenético inferido a partir de las secuencias de rRNA de la subunidad menor ribosomal. Los cinco “principales” ensamblajes eucariontes (negritas) se separan casi simultáneamente y relativamente tarde en la historia de los organismos eucariontes. Los organismos eucariontes amitocondriados (Diplomonadidos, Microsporidia y Trichomonadidos) se encuentran en las ramas más cercanas a los procariontes.

Con el paso del tiempo el modelo anterior se comprobó como falso al observar que la estructura del árbol resultaba de un artefacto metodológico conocido como “Long Branch Attraction” que consiste en la agrupación artefactual de secuencias que son divergentes de la mayoría de los datos, sin importar si la divergencia se debe a una evolución rápida y reciente, o a una acumulación lenta de cambios a lo largo del tiempo (Dacks et al., 2008).

A principios del siglo XXI se hicieron análisis filogenéticos más completos y complejos utilizando diversas fuentes de información, como son las secuencias de DNA de varios genes (no sólo los ribosomales) y características morfológicas y fisiológicas de los organismos. El modelo más aceptado hasta el momento es el de los seis super-grupos, que agrupa a los organismos eucariontes en seis grandes ramas que hasta ahora parecen ser monofiléticas (Dacks et al., 2008; Simpson y Roger, 2004; Adl et al., 2005). Estos seis super-grupos eucariontes son: Amoebozoa, Opisthokonta, Excavata, Chromalveolata, Plantae y Rhizaria (Fig. 2). En el Apéndice I se encuentra una descripción general de los seis super grupos eucariontes y de algunos microorganismos característicos de cada grupo.

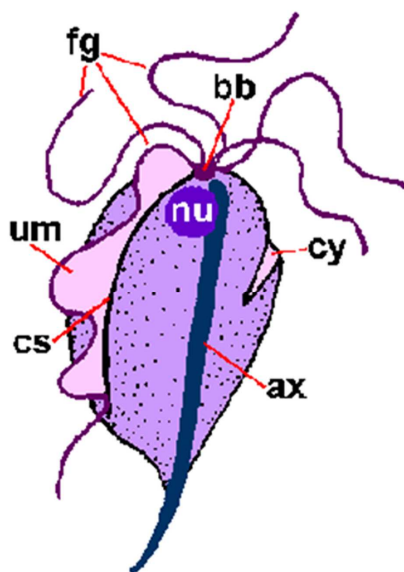
Los microorganismos eucariontes poseen varias características inusuales, por ejemplo el *trans-splicing* y la edición del RNA en trypanosomátidos (Madison-Antenucci et al., 2002; Haile y Papadopoulou, 2007), y el *splicing* de DNA y los rearrreglos en el ciliado *Tetrahymena* (Prescott, 2000). Los Microsporida poseen genomas de tamaños similares a las bacterias (Keeling y Slamovits, 2004), mientras que los genomas de dinoflagelados carecen de genes de histonas, y nucleosomas (Moreno Diaz de la Espina et al., 2005). Algunas algas cryptomonádidas y chlorarachniophytas conservan un núcleo reliquia miniaturizado (nucleomorfo) de una alga endosimbionte (Cavalier-Smith, 2002). Finalmente los apicomplexa como *Plasmodium* tienen organelos especializados para la infección, localizados en el complejo apical; conocidos como roptrias y micronemas (Kats et al., 2006).



**Fig. 2** Árbol diagramático que describe la organización de la mayoría de los eucariontes en seis supergrupos. Aún no se han resuelto las relaciones filogenéticas entre la mayoría de los grupos, ni la posición de la raíz (Current Biology).

### Trichomonádidos

Dentro del grupo Excavata se encuentra la familia Trichomonadidae, compuesta de organismos unicelulares que se caracterizan por la presencia de varios flagelos anteriores, una membrana ondulante, una pelta que se encuentra en el margen anterior del cuerpo, y un solo núcleo (Fig. 3). La costa, que se extiende a lo largo de la base de la membrana ondulante, y el axostilo dan rigidez a la célula (Levine N.D., 1985).



**Fig. 3** *Trichomonas vaginalis*. Este organismo unicelular se caracteriza por la presencia de un axostilo (ax) que se cree que funciona en la unión del parásito a células epiteliales. Tiene 4 flagelos anteriores (fg) y un flagelo recurrente unido al cuerpo del organismo formando una membrana ondulante (um). Otras estructuras en el organismo son los cuerpos basales (bb), la costa (cs, base de la membrana ondulante) y el bolsillo citostoma (cy). (<http://www.tulane.edu/~wiser/protozoology>).

El nombre de *Trichomonas* se dió a un género que se creía que poseía tres flagelos anteriores. Más adelante se demostró que tiene cuatro, sin embargo el nombre de *Trichomonas* se conservó. Otras especies cercanas presentan variabilidad en el número de flagelos, por lo que el resto de los géneros se reconocen como: *Tritrichomonas*, con 3 flagelos anteriores y *Pentatrichomonas*, con 5 flagelos anteriores (Noble et al., 1989).

Los Trichomonádidos son organismos de metabolismo anaerobio, pues carecen de mitocondria, citocromos y un ciclo funcional de los ácidos tricarboxílicos (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 los organelos conocidos como hidrogenosomas (0.5-2 $\mu$ M), cuyo principal producto de desecho es el hidrógeno molecular, lo que les da su nombre (Lindmark y Muller, 1973).

Los Trichomonádidos dependen de la adquisición de algunos nutrientes provenientes del huésped debido a que carecen de algunas vías biosintéticas como las que generan ácidos grasos, colesterol, purinas y pirimidinas (Luna y Orozco, 2004; England PT y Sher A, 1998).

#### *Trichomonas vaginalis*: biología y fisiología.

*Trichomonas vaginalis* es un parásito protozoario que mide en promedio 13 $\mu$ m de largo. Existe únicamente como trofozoito flagelado y se divide de forma asexual por fisión binaria (Vanacova et al., 2003). Infecta el tracto urogenital humano causando la trichomonosis, que es la enfermedad de transmisión sexual no viral más común a nivel mundial. 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 abundantes, además de que puede ocurrir una severa erosión de la mucosa vaginal. En los hombres, una ligera descarga uretral puede ser característica de la infección (Wolner-Hanssen et al., 1989). Las mujeres infectadas con *T. vaginalis* tienen mayor riesgo de infección por VIH y de desarrollar cáncer cervicouterino. Las mujeres embarazadas infectadas pueden presentar partos prematuros y nacimientos de infantes con bajo peso (Luna y Orozco, 2004).

*T. vaginalis* es capaz de contrarrestar la fuerza del fluido vaginal por su unión a la mucina del moco vaginal (Lehker y Sweeney, 1999). El parásito neutraliza la respuesta inmune del huésped 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).

*T. vaginalis* utiliza el metabolismo fermentativo de carbohidratos, y por esto el metronidazol es utilizado para combatir las infecciones causadas por este parásito. Esta droga se administra de forma inactiva, generando su forma citotóxica dentro del organismo; para esto la ferredoxina transfiere un solo electrón al grupo nitro de la droga convirtiéndolo en un radical libre nitroso (Land et al., 2004).

#### *Trichomonas tenax*

*T. tenax* es morfológica y fisiológicamente similar a *T. vaginalis*, con forma ovoide y una longitud de 4-13µm. Tiene 4 flagelos anteriores libres y uno recurrente adosado a una membrana ondulante. Su presencia en la cavidad bucal humana se asocia con una higiene bucal deficiente. Generalmente se considera poco patogénico pues no produce ningún síntoma aparente y desaparece fácilmente si se realiza una higiene bucal adecuada (Noble et al., 1989).

#### *Tritrichomonas foetus*

*Tritrichomonas foetus* (5-25µM), causante de la trichomonosis bovina, tiene 3 flagelos anteriores libres y uno recurrente. *T. foetus* se adhiere a la pared vaginal formando colonias que se expanden al útero y a los oviductos. El útero reacciona a la colonización con una reacción inflamatoria que puede provocar abortos, úteros llenos de pus e infertilidad. *T. foetus* es capaz de formar estructuras resistentes a estrés conocidas como pseudoquistes (Rae and Crews, 2006; Noble et al., 1989).

#### *Trichomonas vaginalis*: biología molecular

En 1985 se estimó el tamaño del genoma de *T. vaginalis* en 25 Mb, mediante cinéticas de re-asociación (Wang y Wang, 1985). Más de veinte años después se liberó la secuencia del genoma de *T. vaginalis* con un tamaño propuesto de 160 Mb (Carlton et al., 2007). Este tamaño no está de acuerdo con la propuesta previa ni con algunos datos experimentales como el tamaño y número de cromosomas del organismo (Lehker y Alderete, 1999). Por otro lado, la secuencia del genoma aún no se ha terminado de ensamblar debido a la presencia de múltiples secuencias repetidas y transponibles. Debido a lo anterior, el tamaño real del genoma de *T. vaginalis* aún está por definirse.

La síntesis de RNA en los organismos eucariontes se lleva a cabo por tres RNA polimerasas diferentes: La RNA polimerasa I (pol I) transcribe a los genes de RNA ribosomal (cistrón ribosomal), la RNA polimerasa II (pol II) sintetiza los RNA mensajeros (mRNA) y la RNA polimerasa III (pol III) sintetiza a los RNAs pequeños, como el rRNA 5S y los RNAs de transferencia (tRNA) (Paule y White, 2000).

Los promotores que reconoce la 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 (Vanacova et al., 2003). La proteína IBP39 reconoce al elemento promotor conservado, el iniciador (Inr), que rodea al sitio de inicio de la transcripción de la mayoría de los genes codificadores para proteínas de *T. vaginalis* (Liston et al., 2001). Por otro lado, los pre-mRNA de *T. vaginalis* sufren los procesamientos post-transcripcionales típicos eucariontes: *capping* (Vanacova et al., 2003), *splicing* y poliadenilación (Vanacova et al., 2005; Espinosa et al., 2002).

Los mecanismos reguladores de la transcripción más estudiados en *T. vaginalis* se enfocan a la RNA polimerasa II (pol II) y a sus productos (mRNA). Por otra parte, en nuestro laboratorio se hizo el primer intento para caracterizar al promotor de pol I de *T. vaginalis*, identificando el sitio de inicio de la transcripción (Lopez-Villasenor et al., 2004), mientras que la transcripción mediada por pol III se comenzó a estudiar en nuestro laboratorio con el gen del rRNA 5S (Torres-Machorro et al., 2006).

En los últimos años, el estudio de la biología molecular de *T. vaginalis* ha avanzado considerablemente: se ha logrado transformar a este organismo de manera transitoria y estable (Delgadillo et al., 1997), así como la expresión genética inducible (Ortiz y Johnson, 2003) y el “*knock-out*” de algunos de sus genes (Land et al., 2004). Los estudios de biología molecular en *T. tenax* y *T. foetus* son aún más escasos que los de *T. vaginalis*, lo que justifica este trabajo.

### Ribosomas

La síntesis de proteínas codificadas en los RNA mensajeros se lleva a cabo en la maquinaria de traducción celular, el ribosoma. El ribosoma promedio eucarionte tiene un coeficiente de sedimentación de 80 Svedbergs (S) y se compone de dos subunidades: la mayor (60S) y la menor (40S) compuestas a su vez de RNAs ribosomales y alrededor de 70 proteínas. El papel del ribosoma es el de proveer un ambiente apropiado para el correcto posicionamiento del mRNA, el tRNA 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 (Hill W.D. et al., 1990; Garrett, 1999). La subunidad ribosomal pequeña es responsable de la decodificación del mRNA, mientras que la subunidad mayor lleva a cabo las funciones catalíticas (Hill W.D. et al., 1990). Los rRNA en la mayoría de los organismos eucariontes son 18S (componente de la subunidad menor, SSU); 28S, 5.8S y 5S (componentes de la subunidad mayor, eLSU).

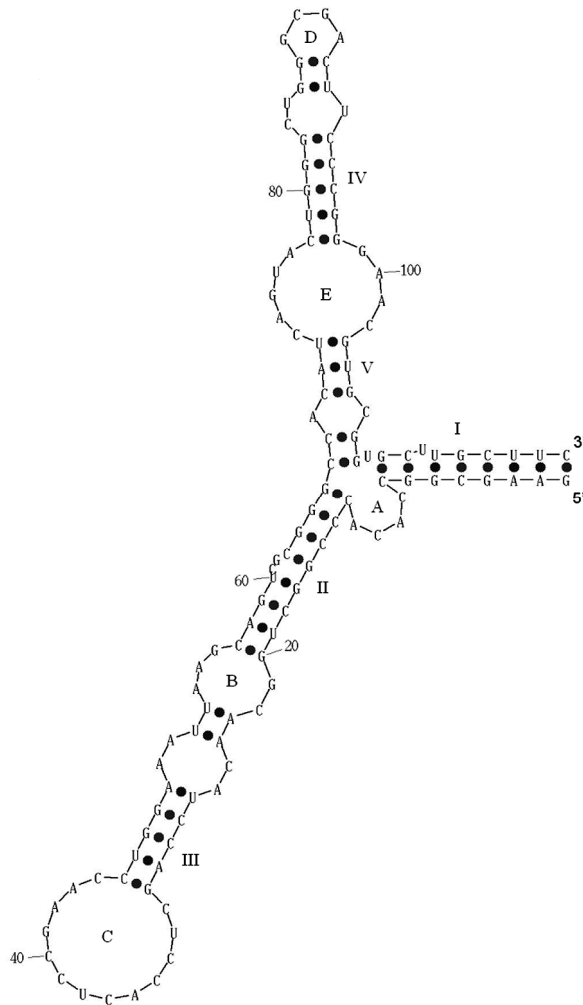
### El rRNA 5S

El rRNA 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 cistrón ribosomal, de una longitud de ~120 pb, y lo transcribe la RNA polimerasa III (Paule y White, 2000). Su papel preciso en la función ribosomal no está bien entendido, aunque se ha sugerido que podría funcionar como transductor de señales en el centro peptidil-transferasa y en la translocación (Dokudovskaya et al., 1996). También se ha propuesto como determinante de la estabilidad de la subunidad mayor (Khaitovich y Mankin, 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.

Todos los rRNA 5S conocidos, derivados de bacterias, de arqueas, de eucariontes y de organelos, se ajustan a una estructura secundaria universal la cual puede doblarse en forma de una 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. 4). Esta estructura incluye varios apareamientos no canónicos G-U.

La diferencia más notable entre el rRNA 5S bacteriano y el eucarionte es la estructura del asa interna E. En bacterias ambos lados del asa son iguales en longitud, mientras que en arqueas y eucariontes la porción 5' es un nucleótido más larga que la 3' (Szymanski et al., 2003). Esta zona es la única región de la molécula que hace un contacto significativo RNA-RNA con la hélice 38 del rRNA 23S (Nissen et al., 2001).





**Fig. 4** Estructura secundaria predicha para rRNA 5S de *T. vaginalis*. Esta estructura concuerda con el modelo universal del rRNA 5S. La estructura del asa E está de acuerdo con el modelo eucarionte. Las hélices están marcadas con números romanos; las asas con letras mayúsculas.

### Genes Ribosomales

En bacterias los tres rRNA canónicos (16S, 23S y 5S) se codifican en un operón. En eucariontes los rRNA 18S, 5.8S y 28S se codifican y co-transcriben en una unidad génica conocida como cistrón ribosomal (transcrita por pol D). Por otro lado, el rRNA 5S generalmente se localiza en un *locus* diferente y se transcribe por una RNA polimerasa distinta: pol III (Mandal, 1984).

### El cistrón ribosomal ó rDNA

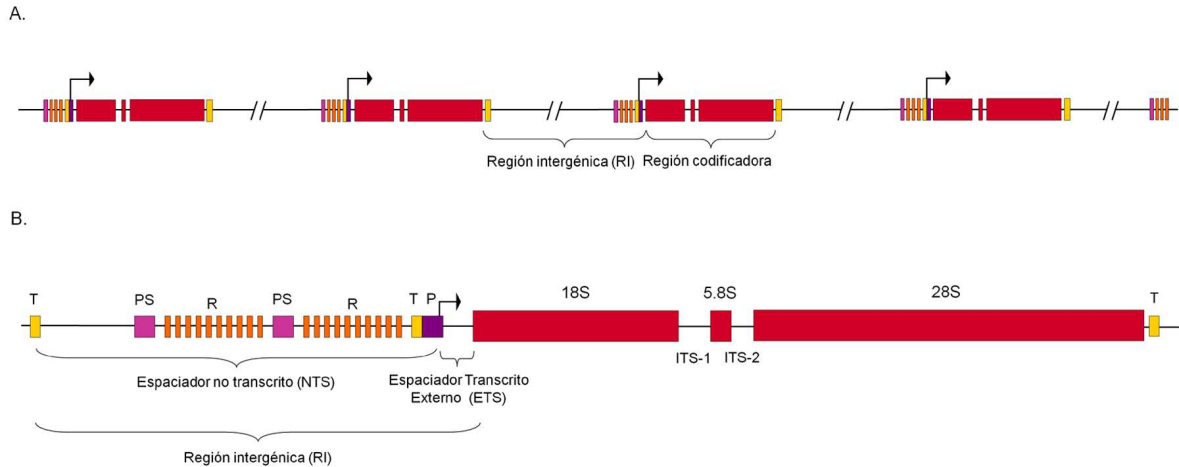
En la mayoría de las especies el rDNA está presente en múltiples copias organizadas en repeticiones en tándem cabeza-cola. La unidad del cistrón ribosomal se compone de una región transcrita y una región intergénica, que consiste a su vez de un espaciador no transcrito (NTS, 2-30kpb) y un espaciador transcrito externo (ETS). El NTS contiene la mayor parte de los elementos regulatorios de la transcripción, mientras que el ETS es parte del transcrito primario o pre-rRNA (7-14kb) (Sollner-Webb y Mougey, 1991).

En la región intergénica se han identificado varios elementos regulatorios: el promotor, reconocido por la maquinaria de transcripción de pol I y que se compone a su vez de un elemento *core* y un elemento de control río arriba (UCE) (Paule y White, 2000). También se han identificado secuencias similares al promotor que se conocen como promotores espaciadores y que parecen funcionar reclutando a la maquinaria de transcripción e incrementando la eficiencia de síntesis del RNA (Grimaldi et al., 1990). Las secuencias repetidas intergénicas funcionan como *enhancers* en algunos organismos eucariontes (Pikaard et al., 1990; Yang et al., 1994). Finalmente, río abajo de la región codificadora, se han identificado secuencias de terminación de la transcripción; estas secuencias también pueden localizarse entre el promotor espaciador y el promotor canónico y se ha propuesto que su papel es el de evitar que polimerasas ensambladas en el promotor espaciador continúen transcribiendo en la región codificadora (Paule y White, 2000). En los mamíferos se ha demostrado que la secuencia de término de la transcripción participa en la regulación epigenética de los genes ribosomales (Grummt y Pikaard, 2003).

La transcripción del rDNA procede desde el promotor a través del 5'ETS, rRNA 18S, espaciador transcrito interno (ITS-1), rRNA 5.8S, ITS-2 y rRNA 28S, hasta que la pol I encuentra una señal de terminación de la transcripción. En la mayoría de los casos el pre-rRNA se procesa post-transcripcionalmente, eliminando los espaciadores transcritos ETS, ITS-1 e ITS-2 para generar tres moléculas maduras de rRNA: 18S, 5.8S y 28S (Long y Dawid, 1980).

En este trabajo introducimos el término eLSU (eukaryotic Large Subunit RNA), que se refiere a los rRNA que componen a la subunidad ribosomal mayor eucarionte: rRNA 5.8S + rRNA 28S. Éste término se utiliza para distinguir al rRNA que estructuran la subunidad mayor eucarionte del rRNA componente de la subunidad mayor procarionte, conocido como únicamente como LSU (Torres-Machorro et al., 2010).

En la figura 5 se representa esquemáticamente al rDNA de *X. laevis* como un ejemplo de la organización del rDNA considerada como típica en los organismos eucariontes.



**Fig. 5** Representación esquemática del cistrón ribosomal (rDNA) de *Xenopus laevis*. **A.** Esta organización se considera el modelo típico eucarionte para el rDNA. En *X. laevis* existen alrededor de 600 copias del cistrón ribosomal, organizadas en repeticiones en tándem cabeza-cola. Cada unidad contiene una región codificadora (roja) y una región intergénica (RI). **B.** Representación de una sola unidad del rDNA. Las moléculas de rRNA 18S, 5.8S y 28S se transcriben como un solo rRNA precursor que se procesa post-transcripcionalmente para producir las moléculas maduras de rRNA. Existen elementos regulatorios de la transcripción por RNA polimerasa I en el espaciador no transcrito (NTS): secuencias repetidas en tándem (R), promotores espaciadores (PS), terminadores de la transcripción (T) y el promotor (P). La región intergénica se compone del NTS y del ETS.

### El rDNA 5S

El rDNA 5S se encuentra repetido y organizado en arreglos en tándem cabeza-cola. Su promotor se encuentra dentro de la región codificadora, río abajo del sitio de inicio de la transcripción y lo reconoce la pol III (Schramm y Hernandez, 2002a) (Fig. 6). Algunos organismos como *S. cerevisiae* requieren de elementos reguladores adicionales, localizados río arriba del sitio de inicio de la transcripción, como serían el *start site element*, *sse* y el *upstream promoter element*, *upe* (Lee et al., 1997).



**Fig. 6** Representación esquemática de la organización típica del rDNA 5S eucarionte. El gen del rRNA 5S se organiza en repeticiones en tándem cabeza-cola que incluyen una región codificadora (verde) y una región intergénica. El promotor del rDNA 5S es interno a la región codificadora (verde claro).

Los promotores de los genes del rRNA 5S, internos a la región codificadora, generalmente consisten de una caja A, un elemento intermedio (IE) y una caja C (Paule y White, 2000). Los tres elementos anteriores constituyen al promotor interno o región de control interna (ICR), reconocida por el factor de transcripción TFIIA (Lee et al., 1995; Pieler et al., 1987). TFIIA 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. La pol III reconoce como señal de terminación de la transcripción a un homopolímero de Ts (o secuencia rica en Ts) (Schramm y Hernandez, 2002).

La transcripción del rRNA 5S se lleva a cabo en un sitio nuclear discreto, generalmente fuera del nucleolo (sitio de síntesis del rDNA) (Carmo-Fonseca et al., 2000) pero cercano a los subcompartimentos nucleares de almacenaje de factores de transcripción conocidos como Cuerpos de Cajal (Murphy et al., 2002).

## Capítulo I

### Diversidad en la organización de los genes de RNA ribosomal en microbios eucariontes

**Torres-Machorro AL, Hernández R, Cevallos AM & López-Villaseñor I. Ribosomal RNA genes in eukaryotic microorganisms, witnesses of phylogeny? FEMS Microbiol Rev 2010; 34: 59-86.**

Mi trabajo de doctorado se enfocó en el estudio de los genes de RNA ribosomal 5S en los microorganismos eucariontes de la familia Trichomonadidae. Durante dicho estudio encontramos que los genes del rRNA 5S de *T. vaginalis* y *T. tenax* mantienen una organización genómica similar a la descrita en los metazoarios, mientras que el rDNA 5S de *T. foetus* se encontró asociado a un gen transcrito por pol II y a secuencias repetidas (Torres-Machorro et al., 2009). Estas características son atípicas en organismos metazoarios, lo que nos llevó a revisar los datos disponibles sobre la organización genómica del rDNA 5S en otros microorganismos eucariontes.

Ante la ausencia de una recopilación similar se decidió hacer una revisión sobre la organización genómica de los dos genes de RNA ribosomal en microorganismos eucariontes. Se encontraron cuantiosos datos sobre la variabilidad en la organización de estos genes en comparación con los datos, ya considerados canónicos, de los genes de RNA ribosomal de metazoarios (Torres-Machorro et al., 2010). Se obtuvo un documento amplio que incluye tablas que contienen comparaciones de alrededor de 100 microorganismos eucariontes. En esta sección describo los principales datos de la revisión, sin ahondar en detalles muy precisos que se encuentran en la publicación (Torres-Machorro et al., 2010).

#### Organización típica de los genes de rRNA

La organización de los genes de RNA ribosomal que se presenta en diversos textos y que se ha considerado típica, corresponde principalmente a la organización del rDNA en organismos vertebrados como *X. laevis* y el ratón. Esta organización se compone de arreglos en tándem cabeza-cola de unidades repetidas del cistrón ribosomal, que se conforman a su vez de una región codificadora (18S, 5.8S y 28S) y una región intergénica. Varios elementos regulatorios como son el promotor reconocido por pol I, el promotor espaciador, las secuencias repetidas y las secuencias terminadoras de la transcripción se encuentran en la región intergénica (Fig. 5). Por otro lado, los genes del rRNA 5S generalmente se encuentran en otro *locus*, también arreglados en repeticiones en tándem cabeza-cola, pero transcritos por pol III mediante el reconocimiento de un promotor interno a la región codificadora (Fig. 6).

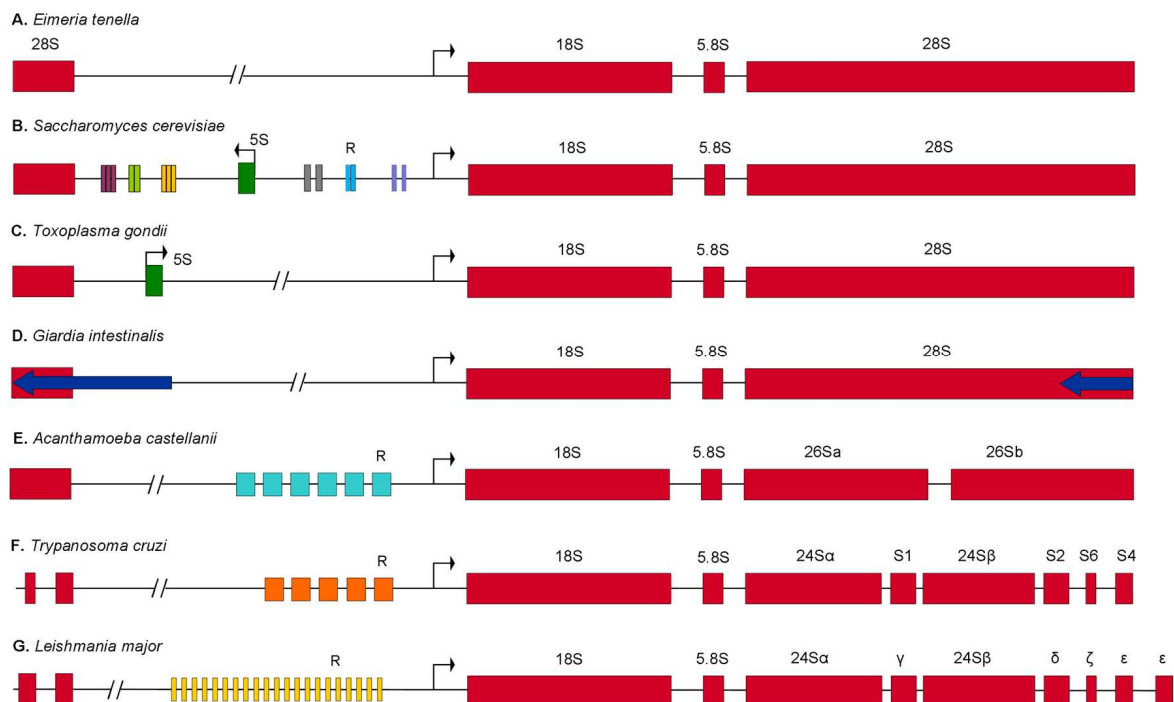
## **El cistrón ribosomal**

### El rDNA en microbios eucariontes

Las unidades repetidas “típicas” del cistrón ribosomal se encuentran distribuidas en los seis super-grupos eucariontes incluyendo los microorganismos indicados en la Fig. 7 y en la Tabla 1. En algunos organismos como *Kluyveromyces lactis* y *Saccharomyces cerevisiae* el rDNA 5S se encuentra ligado al cistrón ribosomal, mientras que en organismos como *Leishmania* spp. y *Acanthamoeba castellanii* la región intergénica del cistrón ribosomal tiene varias secuencias repetidas. En la Tabla 2 se describen algunos motivos repetidos intergénicos, que pueden participar en la regulación del rDNA y/o afectar su longitud. El alga verde *Acetabularia exigua* muestra la organización típica del rDNA, sin embargo, también muestra una organización atípica en tándem en donde se presentan unidades repetidas con organización cola-cola y cabeza-cabeza (Berger et al., 1978; Spring et al., 1978).

### rDNA disperso y heterogéneo

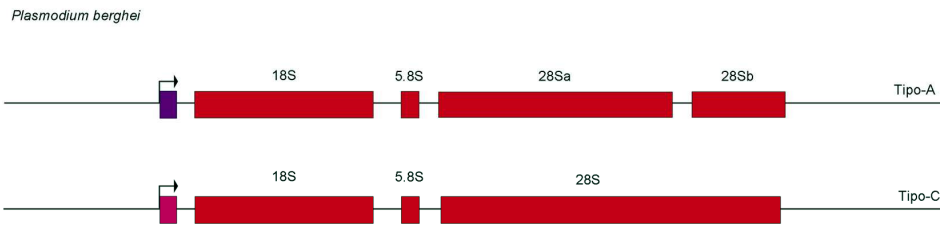
El grupo Apicomplexa (Chromalveolata) se caracteriza por organismos que tienen pocas copias de los genes de rDNA. Estos genes se localizan en distintos *loci*, con regiones codificadoras heterogéneas (Fig. 8), lo que en algunos organismos como *Plasmodium* se ha sugerido que tiene que ver con la síntesis de moléculas de rRNA con funciones distintas (Rogers et al., 1996; Velichutina et al., 1998). Las regiones intergénicas también son heterogéneas e incluyen promotores que se regulan específicamente por las condiciones de temperatura y niveles de glucosa (Mack et al., 1979; Fang y McCutchan, 2002; Fang et al., 2004). *Plasmodium falciparum* tiene dos tipos de unidades de rDNA (A y S); los rRNA tipo A se expresan principalmente en el huésped vertebrado (desarrollo asexual), mientras que el rRNA tipo S se expresa en la fase de infección del mosquito (desarrollo sexual) (Waters, 1994). Otros organismos Apicomplexa con una organización similar se describen en la Tabla 3.



**Fig. 7** Ejemplos de microbios eucariontes con el rDNA organizado en tándem. Por simplicidad sólo se esquematiza una unidad completa del rDNA y un fragmento de una unidad adyacente. **A.** El Apicomplexa *E. tenella* ejemplifica la organización considerada típica del rDNA. **B y C.** Las copias del cistrón ribosomal de *S. cerevisiae* (Ascomycota) y *T. gondii* (Apicomplexa) están ligadas al rDNA 5S (verde) pero en polaridades opuestas. En la región intergénica de *S. cerevisiae* se esquematizan secuencias repetidas de varios tipos (barras de colores, R). **D.** En *G. intestinalis* (Diplomonadida) se codifica una proteína antigénica de 32kDa (azul) en la cadena complementaria del rDNA. **E.** En *A. castellanii* (Acanthamoebidae) el rRNA de la subunidad mayor (eLSU) está fragmentado en tres moléculas: 5.8S, 26Sa (2.4kb) y 26Sb (2kb). La RI contiene seis repetidos de un elemento de 140pb (cajas azul claro, R). **F y G.** En *T. cruzi* y *L. major* el rRNA de la eLSU está fragmentado en 7 moléculas. La RI de *T. cruzi* contiene elementos repetidos de 172pb (naranja). En *Leishmania* spp. la RI se caracteriza por la presencia de múltiples unidades repetidas (amarillo). En *L. major* la región  $\epsilon$  está duplicada una vez. Las figuras no están a escala.

Tabla 1 Organismos con la organización típica del rDNA			
Organismo	Localización	Repetidos intergénicos <sup>a</sup>	Ligación al 5S
<b>Excavata</b>			
<i>Crithidia fasciculata</i>		si	X
<i>Leishmania</i> spp.	1Ch, 1L	si	X
<i>Trypanosoma brucei</i>	4Ch	X	X
<i>Trypanosoma cruzi</i>	$\geq$ 2Ch	si	X
<i>Giardia</i> spp.	6L ( <i>intestinalis</i> )	<i>intestinalis</i> y <i>muris</i>	X
<i>Trichomonas tenax</i>		X	X
<i>Trichomonas vaginalis</i>	1Ch, 1L	X	X
<i>Tritrichomonas foetus</i>	1Ch, 1L	X	X
<b>Chromalveolates</b>			
<i>Eimeria tenella</i>	1Ch, 1L	X	X
<i>Toxoplasma gondii</i>		X	sentido
<b>Amoebozoa</b>			
<i>Acanthamoeba castellanii</i>		si	X
<b>Opisthokonta</b>			
<i>Hansenula polymorpha</i>		X	ligado
<i>Kluyveromyces lactis</i>	1Ch, 1L	X	antisentido
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	1Ch, 1L	si	antisentido
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	1Ch, 2L	X	X
<i>Torulopsis utilis</i>		X	antisentido
<i>Yarrowia lipolytica</i>	7L	si	X
<i>Nosema apis</i>		X	sentido

X - no identificado ó ausente. (a) Ver tabla 2. Ch, cromosoma; L, locus or loci.



**Fig. 8** Organización del rDNA de *P. berghei*. Las cuatro copias dispersas del rDNA de *P. berghei* se codifican en los telómeros. El rDNA Tipo A contiene un rRNA de la eLSU fragmentado en tres moléculas que se expresan durante el estadio asexual del parásito en huéspedes vertebrados. Los rDNA tipo C se expresan durante el desarrollo sexual en mosquitos. La expresión diferencial de los rDNA está regulada por secuencias promotoras específicas (cajas morada y rosa).

### rDNA telomérico

Los telómeros son regiones de secuencias repetidas localizadas al final de los cromosomas; son estructuras ordenadas que participan en la protección de los extremos de los cromosomas y en su estabilidad. Estas regiones tienen gran plasticidad dentro del contexto heterocromático, lo que permite la amplificación o variación en el número de genes teloméricos y secuencias repetidas (Pryde et al., 1997). Algunos microbios eucariontes poseen las copias de su rDNA en las regiones sub-teloméricas. *Encephalitozoon cuniculi* tiene una copia de rDNA en cada uno de los 22 telómeros de sus 11 cromosomas (Brugere et al., 2000). El rDNA se localiza en varios loci subteloméricos en *Candida albicans*, *Yarrowia lipolytica* y *Giardia intestinalis* (Dujon et al., 2004; Le Blancq et al., 1991). La localización sub-telomérica sugiere un papel fisiológico, sin embargo, no se sabe si el rDNA sub-telomérico está involucrado en el mantenimiento de la estructura del telómero, o bien, si el rDNA explota esta estructura particular para regular su expresión y mantener su secuencia y número de copias.



Tabla 2 Secuencias repetidas en la región intergénica del cistron ribosomal				
Organismo	Tamaño de las secuencias repetidas	Número de secuencias repetidas	Función	Tamaño de la región intergénica
<b>Excavata</b>				
<i>Cnithidia fasciculata</i>	19pb	28		
	55pb a	4		3.5kb
<i>Euglena gracilis</i>	14pb, repetido imperfecto	6		
	30pb, palindromos imperfectos	2		
<i>Leishmania major</i>	63pb	16-275		4-12kb
<i>Leishmania amazoniensis</i>	60pb	35-70		
<i>Leishmania chagasi</i>	64pb	9	enhancer-like	
<i>Leishmania infantum</i>	63pb	40		4-12kb
	LiR3 348pb		terminación de la transcripción?	
<i>Leishmania donovani</i>	64pb	39		5.8kb
	63pb	12		4kb
<i>Leishmania hoogstraali</i>	63pb	40		5.5kb
<i>Trypanosoma cruzi</i>	172pb	2-8		
<i>Giardia intestinalis</i>	78pb	2 en cepa GS, 3 en cepa GK	recombinación?	
<i>Giardia muris</i>	73pb	varía, 6 min		
<b>Chromalveolates</b>				
<i>Euplotes crassus</i>	I. ~30pb			
	IV. ~17pb			
<i>Glaucoma chattoni</i>	I. 32pb (5')	3	promotor espaciador?	
	II. 14-24pb (5')	7	enhancer?	
	III. 18pb (5')	1		
	IV. 17pb (3')	9	terminación?	
	V. 130pb (3')	3	empacamiento del gen?	
<i>Tetrahymena thermophila</i>	I. 32pb (5') b	4	promotor espaciador?	1.9kb
	II. 20-21pb (5')	13	enhancer?	
	III. 20pb (5')	7		
	430pb (5')	4 (2 en tandem en cada mitad chr)	Replicación, repetidos I y III	
	IV. 17pb (3')	5	terminación?	
	V. 130pb (3') c	4	empacamiento del gen?	
<i>Tetrahymena pyriformis</i>	I. 33pb (5')	3	promotor espaciador?	
	II. 10-24pb (5')	11	enhancer?	
	III. 14-21pb (5')	5		
	IV. 17pb (3')	ND		
	V. 130pb (3')	ND		
<i>Perkinsus andrewsi</i>	15pb aprox	8		
<i>Pfiesteria piscicida</i>	9pb			
<b>Amoebozoa</b>				
<i>Acanthamoeba castellanii</i>	106 to 174pb	6	unión de UBF	2.33kb
<i>Dictyostelium discoideum</i>	29pb (3')	4		
	5'		d	
<i>Entamoeba histolytica</i>	Dra I 170pb (3')	10	secuencias ARS-like	9.2kb (5')
	Sca I 144pb (3')	7		3.5kb (3')
	Sca I 144pb (5')	6		
	Pvu I 145pb (5')	11	secuencia patógeno-especifica	
	Hinf I 653pb (5') e	2 y 4	recombinación	
	74pb (5')	2		
	Ava II 153pb (5')	5		
	1408pb (5')	2		
<i>Physarum polycephalum</i>	I. 130pb (5')			≥ 22kb
	I'. 130pb (3')			
	II. 50pb (5')	16		
	II'. 52pb (3')	6		
<b>Opisthokonta</b>				
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	1. 6pb (5')	3		1.1kb (5')
	2. 16pb (5')	2		1.25kb (3')
	3. 8pb (5')	3		
	4. 11pb (3')	2		
	5. 9pb (3')	2		
	6. 9pb (3')	2		
<i>Yarrowia lipolytica</i>	140-150pb	varía		
	11pb	14		
<i>Encephalitozoon cuniculi</i>	29pb (5')	2		
	19pb (5')	8		
	51pb (3')			
	43pb (3')			

Las secuencias repetidas pueden no ser idénticas. (a) El repetido de 55pb tiene una secuencia invertida repetida interna; (b) Las repeticiones tipo I y II están dentro de un segmento repetido de 430pb involucrado en la replicación del mini-cromosoma.; (c) repetida invertida; (d) La región transcrita está rodeada de dos bloques de secuencias altamente repetitivas. (e) Locus polimórfico con una secuencia repetida invertida interna de 65pb.

ND, no determinado; UBF, upstream binding factor.

Tabla 3 Organismos con unidades de rDNA dispersas				
Organismo	Número de copias	Localización cromosomal y tipos de rDNA		
<b>Chromalveolates</b>				
<i>Babesia bigemina</i>	3			
<i>Babesia bovis</i>	3	Dos en el chr III y uno en el chr IV		
<i>Babesia canis</i>	4	Dos en un chr y dos en otro chr		
<i>Cryptosporidium parvum</i>	5	3 tandem, 2 solos en diferentes cromosomas		
<i>Theileria parva</i>	2	Las unidades A and B están en cromosomas diferentes		
<i>Plasmodium berghei</i>	4	El tipo A está en chr XII y VII; el tipo C está en chr VI y V		
<i>Plasmodium falciparum</i>	5-8	Subteloméricos: Tipo A en chr V y VII; tipo S en chr XI and XIII.		
<i>Plasmodium lophurae</i>	6 (7-9)			
<i>Plasmodium vivax</i>	7	Tipos A, S y O.		
<b>Plantae</b>				
<i>Cyanidioschyzon merolae</i>	3	En 3 loci diferentes, dos en chr XVII y uno en chr XVIII		
chr - cromosoma				

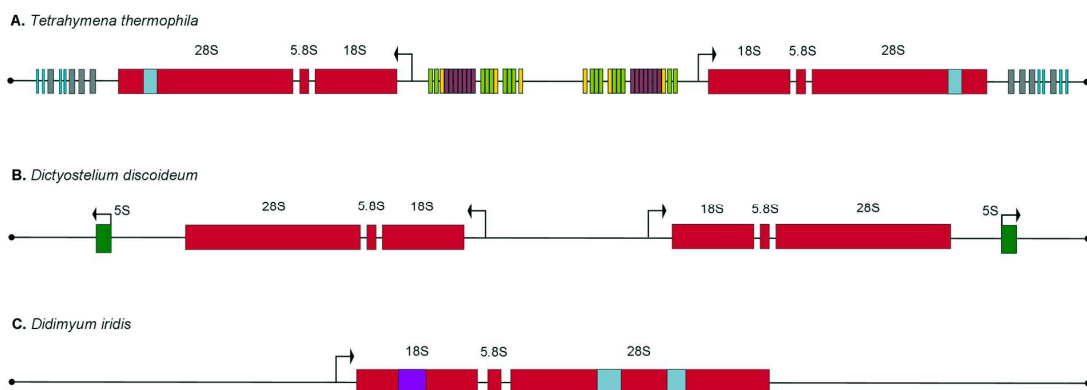
### rDNA extra-cromosomal

El rDNA extra-cromosomal se ha identificado en ciliados, en myxomicetos celulares, en plasmoidiales y en algunas levaduras (Tabla 4).

Los ciliados tienen dos núcleos: el micronúcleo, donde se encuentra toda la información genética y es transcripcionalmente inactivo, y el macronúcleo transcripcionalmente activo y poliploide (Jahn y Klobutcher, 2002). El macronúcleo del ciliado *Tetrahymena thermophila* contiene alrededor de 9000 copias de un mini-cromosoma lineal que codifica para dos unidades palindrómicas del rDNA (Fig. 8). Su región intergénica contiene seis tipos de secuencias repetidas, algunas con funciones asignadas (Fig. 9, tabla 2). El rDNA de *Dictyostelium discoideum* y *Physarum polycephalum* también se codifica en moléculas extracromosomales, palindrómicas y lineales, aunque en *D. discoideum* el rDNA 5S se localiza en el mismo episoma, cerca de los telómeros. *Didymium iridis* y algunos otros ciliados tienen mini-cromosomas lineales con una sola unidad de rDNA (Fig .8).

Tabla 4 Unidades extra-cromosomales del rDNA					
Organismo	Lineal/Circular	Tamaño	Organización	Número de copias	Copias adicionales cromosomales
<b>Excavata</b>					
<i>Euglena gracilis</i>	C	11.5kpb	solo	800-4000	4
<i>Naegleria gruberi</i>	C	14kpb	solo	300-5000	ninguna
<b>Chromalveolates</b>					
<i>Euplotes crassus</i>	L	7kpb	gen solo		MIC
<i>Glaucoma chattoni</i>	L	9.3kpb	gen solo		MIC
<i>Nyctotherus ovalis</i>	L		gen solo		MIC
<i>Oxytricha fallax</i>	L	7.49kpb	gen solo		MIC
<i>Oxytricha nova</i>	L	7.49kpb	gen solo		MIC
<i>Paramecium tetraurelia</i>	C y L	<sup>a</sup>	tandem		MIC
<i>Stylonychia mytilus</i>	L		gen solo		MIC
<i>Tetrahymena pyriformis</i>	L		palindromo	200/MAC haploide	1
<i>Tetrahymena thermophila</i>	L	21kpb	palindromo	9000 MAC	
<b>Amoebozoa</b>					
<i>Dictyostelium discoideum</i>	L	88kpb	palindromo	90	1 palindromo
<i>Didymium iridis</i>	L	20kpb	solo		
<i>Entamoeba histolytica</i> HM-1:IMSS	C	24.5kpb	palindromo	200/halploide	ninguna
<i>Physarum polycephalum</i>	L	>60kpb	palindromo	1 x 10 <sup>11</sup>	
<b>Opisthokonta</b>					
<i>Candida albicans</i>	C y L	1.2Mpb	tándem	100	200

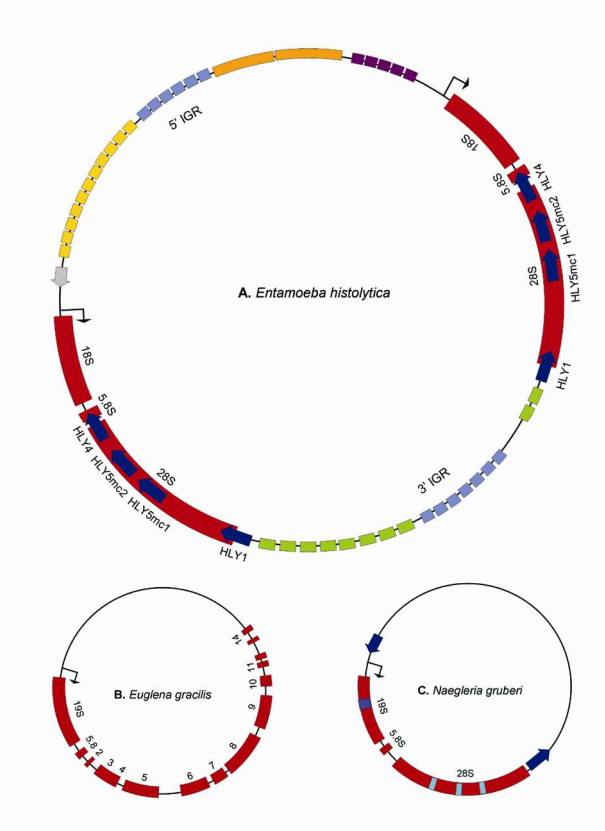
(a) el tamaño depende del número de unidades repetidas del rDNA. MAC, macronúcleo; MIC, micronúcleo.



**Fig. 9** Unidades extracromosomales lineales en eucariontes microbianos. **A.** El rDNA se codifica en palindromos extra-cromosomales lineales en *T. thermophila*. El mini-cromosoma contiene secuencias teloméricas típicas (puntos negros) y regiones intergénicas con varios tipos de secuencias repetidas (barras de colores). Se observa un intrón del grupo I en el rRNA 28S (caja azul). **B.** El rDNA y el rDNA 5S de *D. discoideum* están ligados y codificados en palindromos extra-cromosomales lineales. **C.** El rDNA de *D. iridis* se codifica en un mini-cromosoma lineal con una unidad de rDNA. El rRNA de la SSU contiene un twintron (caja morada). El rRNA de la eLSU contiene dos intrones del grupo I (cajas azules).

Las unidades de rDNA codificadas en plásmidos extracromosomales circulares se pueden encontrar en Amoebozoa (*Entamoeba histolytica*) y Excavata (*Euglena gracilis* y *Naegleria gruberi*) (Fig. 10 y Tabla 4). El aislado más estudiado de *E. histolytica*, HM-1:IMSS tiene alrededor de 200 copias de un mini-cromosoma con dos unidades de rDNA invertidas y secuencias repetidas en la región intergénica Fig. 10. *E. histolytica* y *N. gruberi* no tienen copia cromosomal del rDNA, por lo que mantienen toda la información genética en los episomas (Bagchi et al., 1999; Clark y Cross, 1987). Por otro lado, organismos como *D. discoideum* y la

mayoría de los ciliados mantienen copias cromosomales del rDNA, las cuales se ha sugerido que se mantienen como respaldo Tabla 4. Finalmente, en *Paramecium tetraurelia* se pueden encontrar moléculas extracromosomales lineales y circulares pero que incluyen varias unidades en tándem del rDNA. Se han identificado hasta 13 copias en tándem del rDNA por mini-cromosoma.



**Fig. 10** Unidades de rDNA extracromosomal circular en eucariotes microbianos. **A.** en *E. histolytica* los mini-cromosomas circulares se auto-repican y codifican para dos unidades de rDNA palindrómico. Las RI contienen secuencias repetidas de varios tipos (cuadros de colores). La RI 5' también codifica para un mRNA de 0.7kb (flecha gris). En el aislado HM1 cuatro factores de virulencia (hemolisinas) se encuentran codificados dentro de la región codificadora del rRNA, pero en orientación contraria. **B.** En *E. gracilis* el rDNA se codifica en un plásmido circular. El eLSU se procesa en 14 fragmentos. **C.** El plásmido de rDNA de *N. gruberi* codifica para una unidad de rDNA que contiene intrones del grupo I (azul claro) y un twintron (morado). La RI contiene dos ORFs (flechas azules).

### La región codificadora del cistron ribosomal

Las regiones codificadoras típicas del rDNA se componen de las secuencias que estructurarán a los rRNA 18S, 5.8S y 28S maduros, transcritos en este orden. Los espaciadores transcritos externo e internos se procesan post-transcripcionalmente para generar las moléculas maduras (Mandal, 1984).

La región codificadora del rDNA se compone de segmentos conservados en secuencia, asociados con un grupo de secuencias variables conocidas como segmentos de expansión. Al comparar las secuencias

Tabla 5 rRNA SSU con inserciones	
Organismo	Tamaño SSU
<b>Excavata</b>	
<i>Astasia curvata</i>	2.56kb
<i>Astasia torta</i>	2.9kb
<i>Distigma curvatum</i>	3.4-3.7kb
<i>Distigma elegans</i>	3.9kb
<i>Distigma sennii</i>	4.5kb
<i>Ploeotia costata</i>	2.4kb
<i>Euglena gracilis</i>	2.3kb
<b>Amoebozoa</b>	
<i>Acanthamoeba castellanii</i>	2.3kb
<i>Acanthamoeba griffini</i>	2.9kb
<i>Acanthamoeba lenticulata</i>	3kb
<i>Pelomyxa palustris</i>	3.5kb
<i>Phreatamoeba balamuthi</i>	2.74kb
<i>Entamoeba histolytica</i>	2.3kb
<b>Plantae</b>	
<i>Ankistrodesmus stipitatus</i>	2.2kb
<b>Rhizaria</b>	
<b>Foraminifera</b>	2.3-4kb

codificadoras de organismos de todos los reinos se identificaron 10 y 18 regiones variables en los rRNA de la subunidad menor (SSU) y la subunidad mayor (LSU), respectivamente (Raue et al., 1988). Existen tres tipos de inserciones dentro de las regiones variables del rDNA: 1. Segmentos de expansión: secuencias de RNA que se mantienen en la molécula madura; 2. Espaciadores transcritos: secuencias removidas de la molécula de rRNA madura produciendo RNAs ribosomales fragmentados. 3. Intrones del grupo I: secuencias removidas post-transcripcionalmente del rRNA mediante auto-splicing (Clark et al., 1984).

#### Segmentos de expansión en el rRNA de la SSU

En microorganismos eucariontes el rRNA de la SSU tiene un tamaño promedio de 2kb. Las inserciones de secuencia en regiones variables pueden llevar a la síntesis de moléculas maduras del rRNA de la SSU que van de 2.5 a 4.5kb de longitud. Este tipo de moléculas se ha encontrado en Pelobionta (*Pelomyxa palustris*), Foraminifera (*Hemisphaerammina bradyi*) y Euglenozoa (*Distigma senii*) (Tabla 5).

#### ITSs adicionales generan rRNA de la LSU fragmentados

Como se refirió con anterioridad, la eliminación post-transcripcional de los espaciadores transcritos ETS, ITS-1 e ITS-2 produce las moléculas maduras de rRNA 18S, 5.8S y 28S. Algunos eucariontes microbianos pertenecientes al grupo Euglenozoa procesan el pre-rRNA en más de tres moléculas debido a la presencia de ITSs adicionales. Kinetoplastidos como *Leishmania* spp. y *Trypanosoma* spp. procesan el rRNA de la subunidad mayor en 7 moléculas maduras (Martinez-Calvillo et al., 2001; Hernandez et al., 1988), mientras que *Euglena gracilis* lo procesa en 14 moléculas (Schnare et al., 1990), que resultan de la eliminación de 14 ITSs.

Este tipo de procesamiento del rRNA, que no tiene repercusiones en el ensamblaje del ribosoma funcional, también se ha observado en eucariontes que no pertenecen al grupo Euglenozoa, como son *Plasmodium berguei* (sólo en el gen tipo A) (Dame y McCutchan, 1983) y *Acanthamoeba castellanii* (D'Alessio et al., 1981) (Fig. 7 y 10).

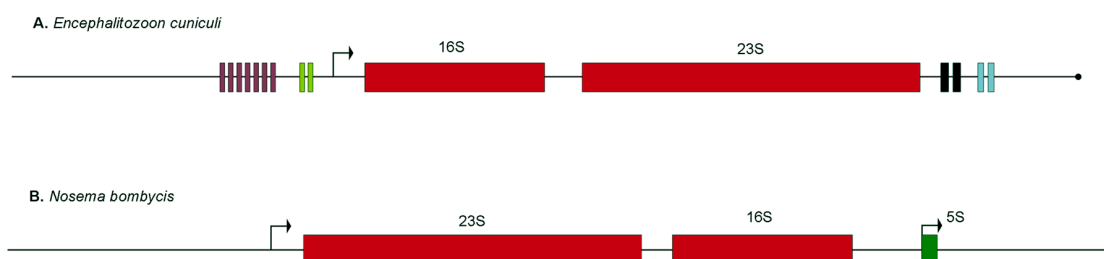
#### Regiones codificadoras para proteínas dentro del rDNA

Dentro del episoma de rDNA de *E. histolytica* se identificaron 4 genes que codifican para factores de virulencia conocidos como hemolisinas (Jansson et al., 1994). Estos genes se sobrelapan con la región codificadora del rRNA, pero en polaridad opuesta (Fig. 10). La virulencia de algunos aislados de *E. histolytica* se relaciona directamente con la secuencia del

mini-cromosoma circular de rDNA (Clark y Diamond, 1991; Zindrou et al., 2001). Por otro lado, en *G. intestinalis* se identificó, sobrelapando la región 3' del rRNA 28S, un gen que codifica para un antígeno de flagelo de 32 kDa (Upcroft et al., 1990) (Fig. 7).

### Regiones codificadoras inusuales

Los organismos del grupo Microsporidia muestran algunas características similares a los procariontes en sus genes de rRNA (Weiss, 2001). Las unidades de rDNA son más pequeñas que el promedio eucarionte y carecen del ITS-2, lo que resulta en la fusión de la secuencia del rRNA 5.8S con la región 5' del rRNA 28S, como se observa en bacterias (Vossbrinck y Woese, 1986). Los Microsporidia, como *E. cuniculi* y *Vairimorpha necatrix*, son los únicos eucariontes conocidos que carecen de una molécula individual del rRNA 5.8S (Peyretailade et al., 1998; Vossbrinck y Woese, 1986). Además de la característica anterior, *Nosema bombycis* y *Nosema spodopterae* tienen una organización inusual de la región codificadora del rDNA (Huang et al., 2004; Iiyama et al., 2004; Tsai et al., 2005): en contraste con el orden casi universal de las regiones codificadoras, el rRNA de la LSU está codificado y transcrito río arriba del rRNA de la SSU (Fig. 11).

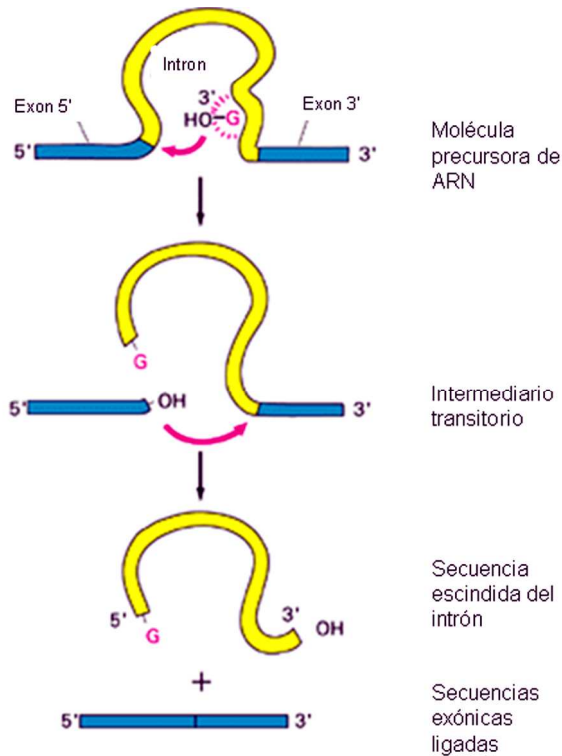


**Fig. 11** Organización inusual del rDNA en Microsporidia. Los Microsporidia carecen de una molécula madura del rRNA 5.8S y por lo tanto la secuencia típica del rRNA 5.8S está fusionada al rRNA 23S. **A.** Las unidades teloméricas sencillas de rDNA en *E. cuniculi* se encuentran rodeadas de secuencias repetidas. El rDNA carece del ITS-2. **B.** Algunas especies de *Nosema* tienen una organización atípica del rDNA, con el rRNA de la LSU codificado río arriba del rRNA 16S. El rDNA 5S está ligado a la unidad de rDNA.

### Intrones del grupo I

Los intrones del grupo I son ribozimas que se remueven de las moléculas maduras de RNA mediante reacciones de *auto-splicing*. La reacción se inicia con un ataque nucleofílico de un co-factor de guanósina en el sitio 5' de *splicing*. Después de dos reacciones secuenciales de transesterificación se remueve el intrón y se ligan los exones (Einvik et al., 1998) (Fig. 12). Los intrones del grupo I están ampliamente distribuidos en la naturaleza y pueden encontrarse en

genomas de bacterias, de mitocondrias y de cloroplastos, así como en el núcleo eucarionte (Johansen et al., 2007). Los intrones del grupo I pueden interrumpir las regiones codificadoras del rDNA y después de ser removidos por *auto-splicing* del rRNA, generar moléculas completamente funcionales para el ribosoma.



**Fig. 12** Mecanismo de auto-splicing de los intrones del grupo I. Se representa en color azul a los exones y en color amarillo a los intrones. El proceso de auto-splicing se describe en el texto (Alberts et al., 2002).

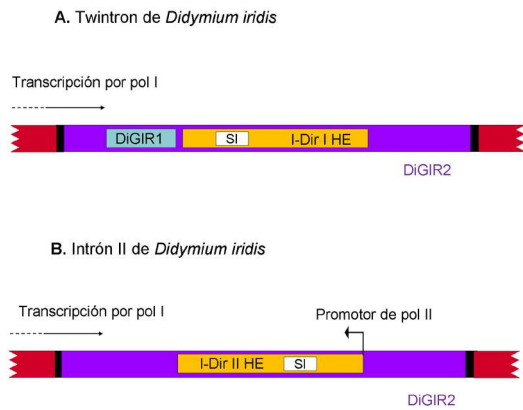
En *Acanthamoeba griffini* y en el alga verde *Characium saccatum* se pueden encontrar intrones que interrumpen al rRNA de la SSU. El rRNA de la eLSU se encuentra interrumpido por estos intrones en algunos aislados de *Tetrahymena*. Finalmente, algunos organismos como *P. carinii* y *D. iridis* tienen ambas moléculas de rRNA (SSU y eLSU) interrumpidas por intrones. La tabla 6 describe algunos de los intrones encontrados en el rDNA de varios eucariontes microbianos.

*D. iridis* y *N. gruberi* tienen inserciones más complejas en el rDNA conocidas como Twintrons (Fig. 13A). Los Twintrons se componen de una pequeña ribozima (GIR1), seguida por un ORF que codifica para una endonucleasa HE. Estos dos elementos se encuentran insertados dentro de una segunda ribozima (GIR2) (Einvik et al., 1998; Johansen et al., 2007). El ORF de HE tiene la misma polaridad que el rRNA, por lo que después de la transcripción por pol I (del rRNA que incluye al Twintron), GIR2 libera al transcrito del pre-mRNA HE por una reacción de *auto-splicing*. Mediante una segunda reacción de auto-splicing la ribozima GIR1 modifica el extremo 5' del pre-mRNA generando un cap 2'5' *lariat* que incrementa la eficiencia traduccional de este mRNA de HE, que también incluye una cola de poli-A y que llevó a cabo la remoción de un intrón típico de spliceosoma (Johansen et al., 2007).

Tabla 6		Intrones del grupo I en el rDNA		
Organismo	Localización	Número de intrones	Tamaño	Gen de Endoncleasa HE
<b>Excavata</b>				
<i>Ploetia costata</i>	rRNA SSU	1	494pb	
<i>Naegleria gruberi</i>	rRNA SSU	1		I-NgrI
	rRNA LSU	3		
<b>Chromalveolates</b>				
<i>Plasmodium falciparum</i>	rRNA LSU	1		<sup>a</sup>
<i>Tetrahymena pigmentosa</i>	rRNA LSU	1	400pb	
<i>Tetrahymena thermophila</i>	rRNA LSU	1	370-410pb	
<b>Amoebozoa</b>				
<i>Acanthamoeba griffini</i>	rRNA SSU	1	519pb	
<i>Acanthamoeba lenticulata</i>	rRNA SSU	1	656pb	
<i>Didymium iridis</i>	rRNA SSU	1	1.43kpb	I-Dirl e I-DirlI <sup>b</sup>
	rRNA LSU	2	688 y 573pb	
<i>Physarum polycephalum</i>	rRNA LSU	3	0.7, 0.6 y 0.94kpb	I-Ppol <sup>c</sup>
<b>Plantae</b>				
<i>Ankistrodesmus stipitatus</i>	rRNA SSU	1	334pb	
<i>Characium saccatum</i>	rRNA SSU	1	477pb	
<i>Chlorella ellipsoidea</i>	rRNA SSU	1	442pb	
	rRNA LSU	1	445pb	
<i>Dunaliella parva</i>	rRNA SSU	2	381 y 419pb	
<i>Dunaliella salina</i>	rRNA SSU	1 <sup>v</sup>	397/8pb	
<b>Opisthokonta</b>				
<i>Candida albicans</i>	rRNA LSU	1	379pb	
<i>Pnemocystis carinii</i>	rRNA SSU	1	390pb	
	rRNA LSU	1		
<i>Histoplasma capsulatum</i>	rRNA SSU	1	403-425pb	
<i>Nosema bombycis</i>	rRNA SSU	1		
(a) Sólo en una de las 8 copias del ADNr; (b) Depende del aislado; (c ) codificado en el intrón de 0.94kpb;				
(d) Puede tener dos tipos de intrones que difieren en secuencia				

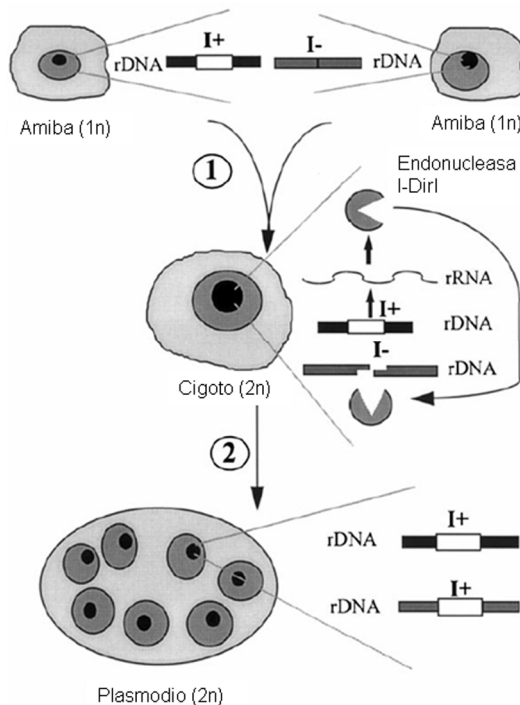
Algunos aislados de *D. iridis* tienen otro tipo de intrón en vez del Twintron (intron II, Fig. 13B), que se caracteriza por tener un gen de HE en polaridad opuesta al rRNA. La transcripción del pre-mRNA de HE es mediada por pol II (Johansen et al., 2006). Ambos transcritos de HE, el del Twintron y el del intron II se poliadenilan y se procesan por el complejo spliceosomal para remover un intrón spliceosomal que se encuentra dentro de la región codificadora de la endonucleasa HE (Vader et al., 1999).





**Fig. 13** Intrones del grupo I que contienen un gen de endonucleasa HE. **A.** Twintron presente en *D. iridis*: El intrón DiGIR2 (morado) está codificado dentro del RNAr de la SSU (rojo) y es transcrito por pol I formando parte del pre-RNAr. DiGIR2 lleva a cabo el auto-splicing para generar el pre-mRNA (los sitios de splicing se indican en negro). Posteriormente, el intrón DiGIR1 (azul) lleva a cabo el auto-splicing y procesa al pre-mRNA de I-DirI HE en el extremo 5', produciendo un cap 2'5'. El pre-mRNA también se procesa por la remoción de un intrón spliceosomal (SI, blanco) y poliadenilación para generar un mRNA I-DirI HE funcional (amarillo). **B.** Intrón II de *D. iridis*: El RNA de I-DirII HE se encuentra dentro del intrón DiGIR2 y se transcribe en orientación antisentido por pol II. El pre-mRNA es procesado por factores asociados a pol II para generar el cap 5' típico y la cola de poli-A 3'. El intrón spliceosomal SI se remueve por la maquinaria típica de splicing.

Cabe mencionar que la endonucleasa producida es capaz de promover la inserción del intrón que incluye a HE en genes del rDNA que carezcan del mismo (Einvik et al., 1998) (Fig. 14).



**Fig. 14** La endonucleasa HE promueve la transferencia del intrón del grupo I a copias del rDNA sin intrón. Si se aparean dos amibas de *D. iridis* con copias del rDNA con (I+) y sin intrón del grupo I (I-), en el cigoto se promueve la síntesis de la endonucleasa I-DirI HE que generará un corte endonucleolítico de doble cadena en los rDNA sin intrón. Este corte se repara utilizando como molde las copias del rDNA que tienen intrón, resultando en un plasmodium (estadio multinucleado) que tiene todas las copias del rDNA con un intron del grupo I (incluyendo al gen HE).

### Variantes en los genes de rDNA dentro de un organismo

Los genes de rRNA de un mismo organismo suelen estar conservados en la región codificadora y tener variaciones ocasionales en la región intergénica. Dichas variantes de secuencia, incluyendo cambios en la composición y número de secuencias repetidas pueden ser resultado de una evolución divergente. La heterogeneidad de las unidades de rDNA pudiera influenciar la expresión de dichos genes, dependiendo del organismo.

La divergencia de secuencia en la región codificadora y/o en la región intergénica dentro del mismo organismo ha llevado a la clasificación de las unidades de rDNA. Por ejemplo, varios tipos de rDNA pueden encontrarse en *Paramecium*, *Y. lipolytica* y en el grupo Apicomplexa. Una descripción detallada de esta variabilidad se incluye en la Tabla 7.

<b>Tabla 7</b>		<b>Variabilidad en el rDNA</b>
Organismo	Tipos de rDNA <sup>a</sup>	Localización de la variabilidad
<b>Chromalveolates</b>		
<i>Babesia bigemina</i>	2	RI y región codificadora de SSU
<i>Babesia bovis</i>	A, B y C	ITS y región codificadora de SSU
<i>Cryptosporidium parvum</i>	Al menos 2	ITS y región codificadora
<i>Plasmodium berghei</i>	A y C	RI, promotor y región codificadora
<i>Plasmodium falciparum</i>	A y S	RI, promotor y región codificadora
<i>Plasmodium vivax</i>	A, S y O	RI, promotor y región codificadora
<i>Theileria parva</i>	2	ITS y región codificadora LSU
<i>Toxoplasma gondii</i>		RI y región codificadora SSU
<i>Oxytricha fallax</i>	2	región codificadora LSU
<i>Paramecium tatraurelia</i>	6 MAC/ 4 MIC	RI
<i>Perkinsus yewsi</i>	A y B	RI y región codificadora
<b>Plantae</b>		
<i>Dunaliella salina</i>	2	Intrones del grupo I
<b>Opisthokonta</b>		
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>		RI
<i>Cyida albicans</i>	2	LSU con o sin intrón
<i>Yarrowia lipolytica</i>	2-5	RI
<i>Nosema apis</i>	Al menos 4	RI
<i>Nosema bombi</i>	Al menos 2	ITS
(a) Se muestran el número o nombres de los tipos de rDNA. RI, región intergénica; ITS, espaciador transcrito interno; MAC, macronúcleo; MIC, micronúcleo.		

## El rDNA 5S

La organización del rDNA 5S es más simple que la descrita para los otros rDNA. La mayoría de los rDNA 5S se encuentran organizados en repeticiones en tándem, cabeza-cola, que consisten de una región codificadora que mide alrededor de 120 pb, y una región intergénica de secuencia y de tamaño variable. Todos los genes del rRNA 5S eucarionte estudiados hasta hoy contienen un promotor interno a la región codificadora, transcrito por pol III (Schramm y Hernandez, 2002).

El rDNA 5S de *T. cruzi*, *Trypanosoma brucei*, *T. vaginalis*, *T. tenax*, *Crithidia fasciculata*, *Eimeria tenella* y *Cryptosporidium parvum* están organizados en unidades repetidas en tándem. Las principales características de los rDNA 5S en tándem se describen en la Tabla 8.

Tabla 8		Organización típica del rDNA 5S	
Organismo	Tipos del rDNA 5S <sup>a</sup>	Localización de la variabilidad	Otros
<b>Excavata</b>			
<i>Trichomonas tenax</i>	A y B	RI y región codificadora	Palíndrome de la RI tipo B
<i>Trichomonas vaginalis</i>	A y B	RI	Palíndrome de 10pb en la RI
<i>Tritrichomonas foetus</i>	A y B	RI, secuencias repetidas vs gen de ubiquitina	
<i>Trypanosoma brucei</i>			
<i>Trypanosoma cruzi</i>			6 sitios de unión a Sp1 en la RI
<b>Chromalveolates</b>			
<i>Cryptosporidium parvum</i>		RI	
<i>Eimeria tenella</i>			
<i>Plasmodium falciparum</i>	3	Longitud de las RI	
<i>Tetrahymena pyriformis</i>		RI	Algunos ligados a genes de ubiquitina
<i>Tetrahymena thermophila</i>		Longitud de las RI	Palíndromos de 12 y 16pb en la RI

(a) Se muestran el número o nombres de los tipos de rDNA 5S para cada especie. RI, región intergénica

El rDNA 5S puede tener una distribución genómica asociada a genes transcritos por cualquiera de las tres RNA polimerasas

El rDNA 5S se ha encontrado ligado al cistrón ribosomal (transcrito por pol I) con una distribución alternada en *Toxoplasma gondii*, *Hansenula polymorpha*, *Perkinsus andrewsi* y varias especies de *Nosema* (Guay et al., 1992; Coss et al., 2001; Huang et al., 2004; Klabunde et al., 2002; Iiyama et al., 2004; Tsai et al., 2005; Liu et al., 2008). Dos genes en tándem del rDNA 5S están ligados a cada repetición del cistrón ribosomal en *Candida glabrata* (Dujon et al., 2004). El rDNA 5S está ligado al rDNA en polaridad opuesta en varias especies de levadura como son *Torulopsis utilis*, *K. lactis* y *S. cerevisiae* (Fig 7B, Tabla 1). Finalmente, una copia del

rDNA 5S está codificada río abajo de cada una de las dos copias palindrómicas del cistrón ribosomal en la molécula extra-cromosomal de *D. discoideum* (Hofmann et al., 1993) (Fig. 9B).

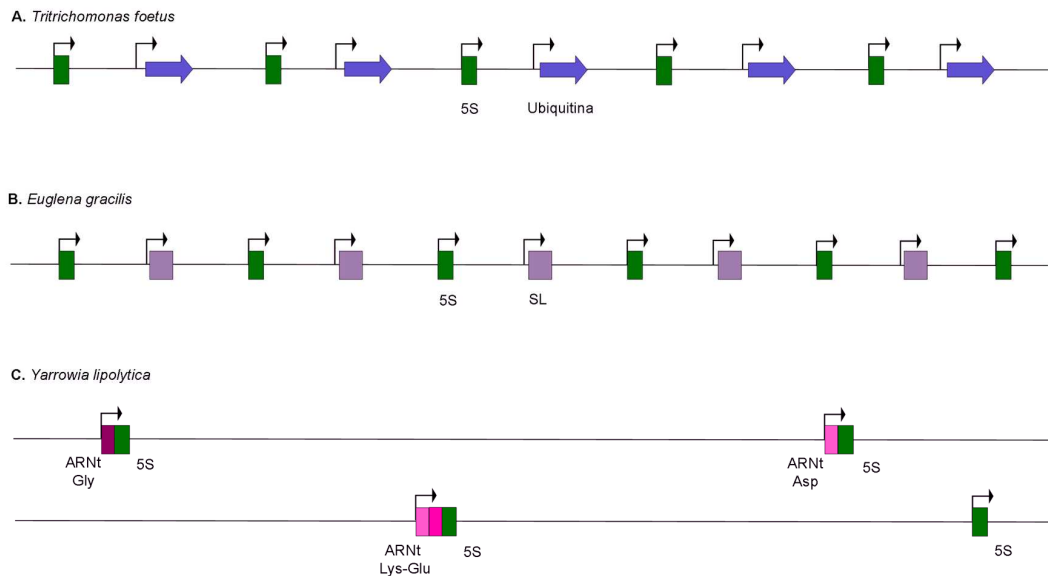
Algunas especies de Kinetoplástidos como *T. vivax* y *T. rangeli* tienen las copias del rDNA 5S ligadas a repeticiones en tándem de genes del *spliced-leader* (SL), transcritos por pol II (Tabla 9 Fig.15A). Una asociación similar se ha encontrado en otros Euglenozoa como *Diplonema papillatum* y *Bodo caudatus* (Tabla 9). El SL es necesario para procesar los mRNA de Kinetoplástidos mediante una reacción de *trans-splicing* (Simpson et al., 2006). Por otro lado, algunas unidades de rDNA en *T. pyriformis* y *T. foetus* se asocian con genes de ubiquitina, también transcritos por pol II (Fig. 15B). La Tabla 9 describe la polaridad relativa de rDNA 5S ligado a genes transcritos por pol II.

Tabla 9 Ligación del rDNA 5S con genes transcritos por pol II		
Organismo	Gen pol II	Orientación
<b>Excavata</b>		
<i>Trypanosoma vivax</i>	spliced leader	sentido
<i>Trypanosoma rangeli</i>	spliced leader	sentido
<i>Bodo saltans</i>	spliced leader	sentido
<i>Bodo caudatus</i>	spliced leader	sentido
<i>Diplonema papillatum</i>	spliced leader	sentido
<i>Herpetomonas</i> spp.	spliced leader	sentido
<i>Trypanoplasma borreli</i>	spliced leader	antisentido
<i>Trypanosoma avium</i>	spliced leader	antisentido
<i>Euglena gracilis</i>	spliced leader	sentido
<i>Tritrichomonas foetus</i>	ubiquitina	sentido
<b>Chromalveolates</b>		
<i>Tetrahymena pyriformis</i>	ubiquitina	sentido

Algunas copias del rDNA 5S de *E. histolytica* y una copia de *Leishmania tarentolae* están ligadas a genes de RNA de transferencia (tRNA), también transcritos por pol III (Shi et al., 1994; Clark et al., 2006). De forma interesante, 48 de las 108 copias del rDNA 5S de *Y. lipolytica* producen transcritos di-cistrónicos de pol III: híbridos tRNA-rRNA 5S (Fig. 15C). La síntesis de este transcrito de alrededor de 200nt se lleva a cabo utilizando al promotor pol III del tRNA, resultando en una transcripción independiente de TFIIIA (factor de transcripción específico para el rDNA 5S). Los transcritos di-cistrónicos ó tri-cistrónico se procesan post-transcripcionalmente para generar las moléculas de RNA maduras: tRNAs y rRNA 5S (Acker et al., 2008).

Finalmente se han encontrado copias dispersas del rDNA 5S en el genoma de *A. castellanii*, *Y. lipolytica* y *Schizosaccharomyces pombe* (Zwick et al., 1991; Tabata, 1981; Dujon et al., 2004). Copias simples del rDNA 5S también puede encontrarse como moléculas extra-cromosomales en organismos ciliados como *Oxitricha fallax* (Rae y Spear, 1978; Roberson et al., 1989). En

*Euplotes eurytostomus*, alrededor de un millón de copias del rDNA 5S se encuentran codificadas en mini-cromosomas lineales flanqueados por telómeros (Roberson et al., 1989).



**Fig. 15** El rDNA 5S puede estar ligado a genes transcritos por pol II ó pol III. **A.** En *T. foetus* el rDNA 5S está ligado a una familia multigénica de ubiquitina (flecha morada). **B.** En *E. gracilis* el rDNA 5S está ligado al gen del spliced leader (SL, caja lila). **C.** En *Y. lipolytica* existen unidades dicistrónicas dispersas en el genoma, que consisten de un gen del tRNA (rosa) y un rDNA 5S (verde). También se identificó un gen tri-cistrónico:tRNA Lys(CTT) –tRNA Glu(CTC) –rDNA 5S. Estos genes se transcriben a partir del promotor de pol III para el tRNA. También se pueden encontrar copias dispersas del rDNA 5S.

### Redundancia de los genes de rRNA y tasa relativa rDNA/rDNA 5S.

Los genes de rRNA están repetidos en prácticamente todos los genomas eucariontes estudiados hasta hoy. En la mayoría de los organismos sólo una fracción de las copias se transcribe, mientras que el resto se encuentra silenciada epigenéticamente (Conconi et al., 1989). En relación a lo anterior, se ha propuesto que el rDNA no sólo es responsable de la síntesis del rRNA, sino que también participa en la estructuración del nucléolo, en la estabilidad del *cluster* ribosomal y en el balance general de los compartimentos de heterocromatina y eucromatina (Oakes et al., 1993; Nogi et al., 1991; Paredes y Maggert, 2009).

Se ha identificado una variación considerable en el número de copias del rDNA y del rDNA 5S. El número de copias del rDNA varía desde una y dos copias en el hongo *Pneumocystis carinii* y el Apicomplexa *Theileria parva*, a 4800 copias en el alga verde *Acetabularia mediterranea* (Tabla 10). Las copias del rDNA 5S varían desde 3 en el alga roja *Cyanidioschyzon merolae* hasta un millón en el ciliado *Euplotes eurytostomus* (Tabla 10). Aunque en *Dictyostelium discoideum* y en *S. cerevisiae* el rDNA y el rDNA 5S contienen la misma cantidad de copias,

esta relación de 1:1 no se mantiene en la mayoría de los organismos. Por ejemplo, *E. gracilis*, tiene 800-4000 copias del rDNA y 300 del rDNA 5S, mientras que en *T. cruzi* el cistrón ribosomal tiene 110 copias y el rDNA 5S 1600. La Tabla 10 muestra una recopilación de datos sobre el número de copias de los genes de rRNA y la tasa de rDNA/rDNA 5S en varios eucariontes microbianos.

### El rDNA y la evolución de los microbios eucariontes

Los rRNA deben de mantener sus motivos estructurales para ser funcionales dentro del ribosoma. Por lo tanto, no es sorprendente que su secuencia esté altamente conservada entre organismos relacionados, y que esta similitud se pierda gradualmente mientras los organismos divergen.

La organización genómica típica del rDNA se propuso más de 30 años atrás, y se basó en el análisis del rDNA de organismos eucariontes metazoarios (Long y Dawid, 1980). La organización en tándem cabeza-cola se ha considerado el estándar para el rDNA eucarionte, pero el análisis de la organización genómica de los genes ribosomales en microorganismos eucariontes demuestra que aún cuando algunos organismos mantienen la organización “típica”, la mayoría revela características inusuales.

*D. discoideum*, *T. gondii* y algunas especies de levadura mantienen un número equivalente de copias del rDNA y del rDNA 5S. Esta organización se consideraba coherente pues la poza de moléculas de rRNA debería de mantener cantidades equimolares de los rRNA maduros 18S, 5.8S, 28S y 5S para la síntesis eficiente de ribosomas. No obstante, al estudiar a los microbios eucariontes notamos que la tasa de rDNA/rDNA 5S varía ampliamente a través de la evolución (Tabla 10); por otra parte, el cistrón ribosomal y el rDNA 5S se transcriben por RNA polimerasas diferentes, tienen tasas de transcripción variables y unidades epigenéticamente heterogéneas. Por lo tanto, la dosis de rDNA/rDNA 5S no se relaciona directamente con la estequiometría de la poza de rRNA, ni con el proceso de expresión. Consecuentemente, el mantenimiento de la poza de moléculas de rRNA en una estequiometría apropiada podría deberse a una compleja red de mecanismos epigenéticos, transcripcionales, post-transcripcionales y estructurales, con potencial de variación de acuerdo a la dosis genómica de rDNA y rDNA 5S. De forma adicional, la localización genómica del rDNA y del rDNA 5S podría estar relacionada con su expresión y su fisiología. El contexto cromosomal, junto con diferentes ambientes epigenéticos, también podrían estar relacionados con el mantenimiento del número de copias genómicas del rDNA, la frecuencia de recombinación, la conservación de secuencia y la regulación de la transcripción.

Algunos organismos tienen la mayoría de sus copias de rDNA en mini-cromosomas, pero mantienen copias adicionales, probablemente como respaldo. De forma interesante, organismos como *E. histolytica* mantienen la totalidad de sus copias del rDNA en moléculas extra-cromosomales. La necesidad de cambios rápidos en el número de copias del rDNA, especialmente bajo condiciones de estrés, podría asociarse con las características funcionales de las moléculas de rDNA extra-cromosomal.

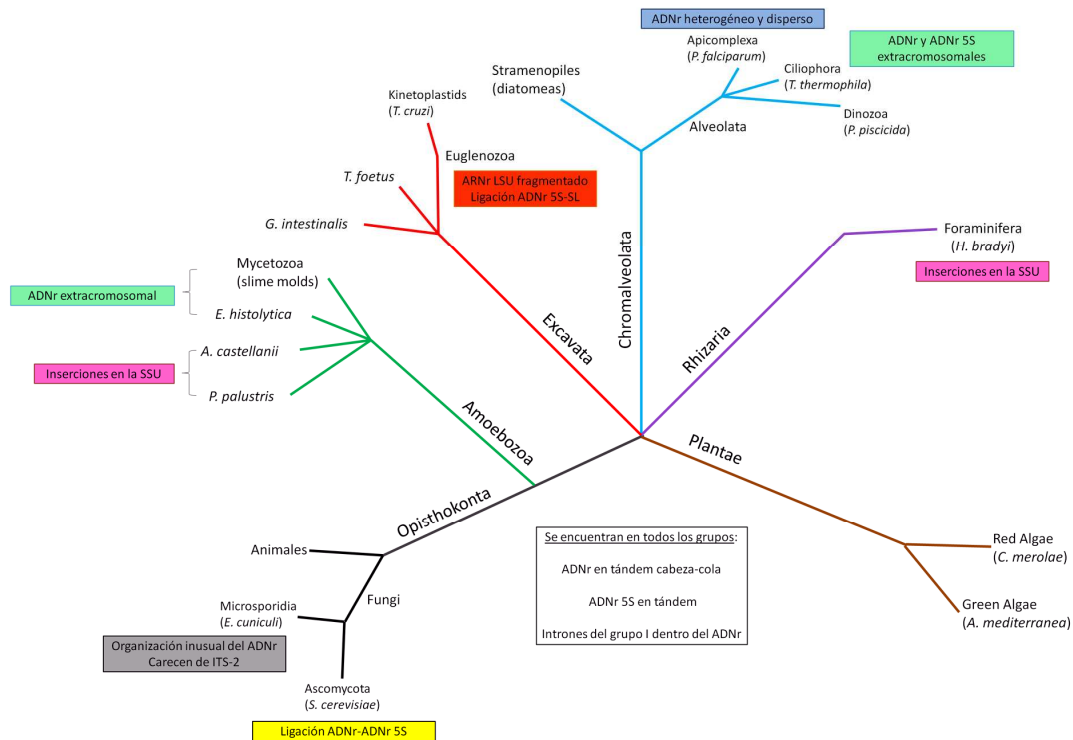
La región codificadora del rRNA de varios eucariontes microbianos está interrumpida por intrones del grupo I. Estos intrones se regulan por diferentes mecanismos transcripcionales y post-transcripcionales que participan en el procesamiento de los intrones mismos y de los transcritos contenidos en ellos (HE). Aún cuando no se ha descrito ninguna función para los intrones del grupo I en la regulación de los genes del RNA ribosomal, los mecanismos de regulación específicos para los intrones, así como su presencia en el rDNA de gran cantidad de microbios eucariontes podría sugerir un papel funcional. *C. albicans*, que tiene poblaciones heterogéneas de rDNA con ó sin intrones, podría ser un buen modelo para estudiar el papel (si existe) de los intrones en la expresión, procesamiento y estabilidad del rRNA.

La importancia de la asociación del rDNA 5S con familias multigénicas y transcritas por las tres RNA polimerasas no se ha estudiado. La regulación transcripcional de los genes adyacentes al rDNA 5S podría alterar el contexto cromatiniano y la disponibilidad de factores en la proximidad. Por otro lado, la presencia de copias dispersas del rDNA 5S sugiere contextos cromosomales distintos para cada unidad del rDNA 5S, sin descartar la posibilidad de que se asocien espacialmente en el núcleo para formar fábricas de transcripción especializadas.

Las características de la organización del rDNA dispersas en todos los super-grupos eucariontes, así como características particulares que predominan en subgrupos, reflejan la complejidad de la evolución (Fig. 16). La organización típica en tándem del rDNA y del rDNA 5S se encuentra en todos los super-grupos eucariontes, sugiriendo que el ancestro común eucarionte mantenía esta organización. Más tarde, el proceso evolutivo llevó a la especialización y divergencia de la estructura del rDNA, resultando en las variantes aquí descritas. Otras características como los intrones del grupo I, están dispersos en todos los eucariontes, por lo que pudieron haber sido adquiridos por transferencia horizontal.

Tabla 10 Genes del RNA ribosomal: número de copias, tamaño y organización					
Organismo	Copias del rDNA	Tamaño del rDNA y organización	Copias del rDNA 5S	Tamaño del rDNA 5S y organización	Tasa rDNA/rDNA 5S
<b>Excavata</b>					
<i>Crithidia fasciculata</i>		11-12kpb (T)	250-300	0.23kpb (T)	
<i>Diplonema papillatum</i>				0.68 and 1.7kpb (T)	
<i>Euglena gracilis</i>	800-4000 (C), 4(chr)	11.5kpb (C)	330	0.6kpb (T)	2.42 to 12-12
<i>Herpetomonas</i>				0.6kpb (T)	
<i>Leishmania donovani</i>	166	12.5kpb (T)			
<i>Leishmania major</i>	63	14kpb (T)			
<i>Trypanosoma brucei</i>	56	(T)	1500	0.75kpb	0.04
<i>Trypanosoma cruzi</i>	110	30kpb (T)	1600	0.48kpb (T)	0.07
<i>Trypanosoma rangeli</i>			330	0.9kpb	
<i>Trypanosoma vivax</i>				0.72kpb	
<i>Naegleria gruberi</i>	3000-5000 (C)	14kpb (C)			
<i>Giardia lamblia</i>	60 (H), 300	5.6kpb (T)			
<i>Trichomonas tenax</i>		(T)	0.01%	0.307 and 0.316kpb (T)	
<i>Trichomonas vaginalis</i>		6kpb (T)	0.10%	0.334 and 0.335kpb (T)	
<i>Tritrichomonas foetus</i>	12	6kpb (T)	0.04%	0.86 and ~1.3kpb (T)	
<i>Trypanoplasma borreli</i>				0.59kpb	
<b>Chromalveolates</b>					
<i>Babesia bigemina</i>	3	10.65, 10.8 y 13.35kpb (U)			
<i>Babesia bovis</i>	3	7kpb			
<i>Babesia canis</i>	4				
<i>Cryptosporidium parvum</i>	5 (H)	6.5kpb (T)	6	0.55 y 0.79kpb, 3 (T), 3(U)	0.83
<i>Eimeria tenella</i>	140	(T)	500	0.73kpb (T)	0.28
<i>Plasmodium berghei</i>	4	(U)	3	(T)	1.33
<i>Plasmodium falciparum</i>	5 a 8	(U)	3		1.67 to 2.67
<i>Plasmodium lophurae</i>	6	(U)			
<i>Plasmodium vivax</i>	7	(U)			
<i>Theileria parva</i>	2	(U)	3		0.67
<i>Toxoplasma gondii</i>	110	7.5kpb (T)	110		1
<i>Perkinsus andrewsi</i>		7.7-7.8kpb			
<i>Euplotes crassus</i>		7kpb (L)			
<i>Euplotes eurytomus</i>			1000000	0.93kpb (L)	
<i>Glaucoma chattoni</i>		9.3kpb (L)			
<i>Oxytricha fallax</i>		7.49kpb (L)		0.69kpb (L)	
<i>Paramecium tetraurelia</i>		9kpb (T,L,C)			
<i>Tetrahymena pyriformis</i>	200 MAC (H), 1 MIC		350 MAC, 350 MIC (H)	0.28kpb	0.29
<i>Tetrahymena thermophila</i>	9000 MAC, 1MIC	21kb (L,P)	150 MAC/150 MIC (H)	0.25-0.29kpb	30
<b>Amoebozoa</b>					
<i>Acanthamoeba castellanii</i>	24(H), 600	12kpb (T)	480	(U)	1.25
<i>Dictyostelium discoideum</i>	180 (L), 1 (chr)	88kpb (L,P)	180	88kpb (L,P)	1
<i>Didymium iridis</i>		20kpb (L)			
<i>Entamoeba histolytica</i> (HM-1:IMSS)	200 (C), 0 (chr)	24.5kpb (C)			
<i>Physarum polycephalum</i>	1 x 10 <sup>11</sup>	>60kpb (L,P)		0.68kpb	
<b>Plantae</b>					
<i>Acetabularia mediterranea</i>	3500-4800	(T)			
<i>Cyanidioschyzon merolae</i>	3	(U)	3	(U)	1
<b>Opisthokonta</b>					
<i>Candida albicans</i>	100 (C), 200 (chr)	11.6-12.5 kpb (T)			
<i>Candida glabrata</i>	>115	(T)	>230		0.5
<i>Hansenula polymorpha</i>	50-60	8kpb (T)	50-60		1
<i>Kluyveromyces lactis</i>	60	8.6kpb (T)	60		1
<i>Pneumocystis carinii</i>	1				
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	100-200	9.1kpb (T)	100-200		1
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	100-120	10.4kpb (T)	30	(U)	3.33 to 4
<i>Yarrowia lipolytica</i>	100	7.7 and 8.7kpb (T)	108	(U)	0.93
<i>Encephalitozoon cuniculi</i>	22	8.9kpb (tel)	3	(U)	7.33
<i>Nosema apis</i>		18kpb (T)			
<i>Nosema bombycis</i>		4.3kpb (T)			
Organismo	Copias del rDNA	Tamaño del rDNA y organización	Copias del rDNA 5S	Tamaño del rDNA 5S y organización	Tasa rDNA/rDNA 5S
<p>Todos los números de copias son aproximados. Si el ADNr es cromosomal, el tamaño de la unidad corresponde a la unidad completa incluyendo la región codificadora y la intergénica. Si el ADNr es extracromosomal, el tamaño de la unidad corresponde al de todo el mini-cromosoma.</p> <p>(C) Círculo extra-cromosomal; (chr) cromosomal; (H) haploide; (L) molécula extra-cromosomal lineal; MAC macronúcleo; MIC micronúcleo; (P) palíndromo; (T) tandem; (tel) telomérico; (U) disperso.</p>					





**Fig. 16** Árbol filogenético esquemático que describe estructuras características del rDNA para algunos sub-grupos eucariontes. Esta filogenia está basada en la clasificación de los seis super-grupos (apéndice I). Las estructuras de rDNA predominantes en cada sub-grupo se encuentran dentro de cajas de color. Algunas de las características del rDNA pueden compartirse entre un sub-grupos.

Algunas características del rDNA se conservan entre especies relacionadas, sugiriendo que el ancestro común de cada grupo mantuvo estas características antes de la presente especiación (Fig. 16). Encontramos ejemplos en los rDNA dispersos y con expresión diferencial de los Apicomplexa; el rRNA de la SSU extra-largo en Amoebozoa y Foraminífera; el rDNA y el rDNA 5S extra-cromosomal en ciliados y Amoebozoa; la fusión 5.8S-23S en Microsporidia, y ambos, la ligación SL-rDNA 5S y la fragmentación del eLSU en Euglenozoa. Características particulares como la fragmentación de la eLSU pudieron haber aparecido de manera independiente más de una vez, resultando en organismos con rRNA fragmentado que no pertenecen al grupo Euglenozoa, como son *A. castellanii* y *Plasmodium*. Este tipo de características compartidas entre especies sin relación cercana aparente podría representar evidencia filogenética de ligaciones aún no conocidas entre especies y sub-grupos eucariontes. Aún existen muchas preguntas sin respuesta con relación a la regulación de la expresión del rRNA, por ejemplo, los mecanismos que determinan cuáles copias estarán activas transcripcional y/o epigenéticamente; o bien, la relevancia del contexto genómico que rodea a los genes de rRNA. Finalmente se debe enfatizar que la organización del rDNA es sólo un paso fundamental en su regulación, pues su expresión está entrelazada con la mayoría, si no es que con todos, los niveles de regulación de la célula (Paule y White, 2000; Schramm y Hernandez, 2002b; Grummt, 2003)

## Antecedentes: el rDNA 5S de *T. vaginalis*

Durante mi trabajo de tesis de licenciatura caracterizamos al gen del rRNA 5S de *T. vaginalis*, que fue el primer gen transcrito por pol III descrito en Trichomonádidos. Este gen ocupa aproximadamente el 0.1% del genoma de *T. vaginalis* debido a sus unidades repetidas, organizadas en tándem (Torres-Machorro et al., 2006).



**Fig. 17** Elementos reguladores putativos en gen del rRNA 5S de *T. vaginalis*. Se muestra la secuencia completa del gen del rRNA 5S de *T. vaginalis* (Tipo B). En negritas se muestran tres elementos regulatorios putativos (elemento rico en A+T en posición -32, región rica en G+C en -13 y una C en posición -1). La primera base transcrita propuesta es una G marcada por una flecha con cabeza vacía. El último nucleótido de la molécula madura es una C dentro de un círculo (+118). Río arriba del +1 se identificaron dos motivos regulatorios descritos en *S. cerevisiae*, el upe y el sse. Las secuencias subrayadas corresponden al promotor putativo para pol III (ICR) compuesto de una caja A, un elemento intermedio (IE) y una caja C. Las corridas de Ts, consideradas la señal de término de la transcripción para pol III, se resaltan en rectángulos. Las flechas de cabeza negra localizan a la secuencia palindrómica; dentro de ésta se remarca en cursivas una secuencia similar al sitio de unión al factor nuclear NF1.

Al comparar la secuencia del rDNA 5S de *T. vaginalis* con la secuencia del rDNA 5S de otros organismos eucariontes, encontramos distintos elementos conservados en la secuencia que propusimos como posibles reguladores del gen. Se identificó una región codificadora de 118b con promotor para pol III, compuesto de una caja A y una caja C. Río arriba del sitio de inicio de la transcripción (+1) se encontraron motivos activadores de la transcripción, característicos de levadura (el *start site element*, *sse* y el *upstream promoter element*, *upe*) y una región rica en AT en la posición -32 (secuencia “TATA-like”). Río abajo de la región codificadora se hallaron dos corridas de 5 Ts, que en otros organismos se han demostrado como la señal de término de la transcripción. En la posición +135 encontramos una secuencia palindrómica que puede estructurar in silico un tallo-asa con alta estabilidad termodinámica ( $dG=-13\text{kcal/mol}$ ). Este tipo de palíndromo no se ha identificado en otros rDNA 5S (Fig. 17).

Finalmente, mediante métodos bioinformáticos, propusimos un modelo para la estructura secundaria del rRNA 5S de *T. vaginalis* (Fig. 4). Este modelo mantiene la estructura eucarionte canónica de los rRNA 5S funcionales, en especial el asa E ó “loop E” que se involucra en los apareamientos no canónicos RNA-RNA con el rRNA de la subunidad mayor ribosomal.

## **Justificación**

Ya que el gen del rDNA 5S de *Trichomonas vaginalis* muestra algunas características atípicas eucariontes es relevante comprobar la funcionalidad de los motivos reguladores propuestos y estudiar la organización de estos genes en organismos cercanos evolutivamente, como serían *Trichomonas tenax* y *Tritrichomonas foetus*.

## **Hipótesis**

Los motivos regulatorios probables del rDNA 5S de *T. vaginalis* tendrán funciones acorde a las propuestas y se encontrarán organizados de forma similar en el rDNA 5S de otros Trichomonádidos.

## **Objetivo general**

Realizar análisis comparativos y funcionales de los genes del rRNA 5S en Trichomonádidos.

## **Objetivos específicos**

1. Identificar y caracterizar los genes del rRNA 5S de *Trichomonas tenax* y *Tritrichomonas foetus*.
2. Hacer un análisis comparativo del rDNA 5S de *T. vaginalis*, *T. tenax* y *T. foetus* en cuanto a:
  - La secuencia y la longitud de los genes
  - Los motivos reguladores putativos
  - El número de copias
  - La localización cromosomal
3. Montar un sistema de análisis funcional para el rDNA 5S de *T. vaginalis* basado en:
  - Ensayos *in vivo*
  - Geles de retardo (EMSA)
  - Transcripción *in vitro*

## Resultados

### Capítulo II

#### Análisis comparativo de los genes del rRNA 5S de *T. vaginalis*, *T. tenax* y *T. foetus*.

Torres-Machorro AL, Hernández R, Alderete JF & López-Villaseñor I. Comparative analyses among the *Trichomonas vaginalis*, *Trichomonas tenax*, and *Tritrichomonas foetus* 5S ribosomal RNA genes. *Curr Genet* 2009; 55: 199-210.

Los ribosomas de los Trichomonádidos poseen características evocativas de los organismos procariontes (Chakrabarti et al., 1992), por lo que el estudio de sus genes de rRNA podría llevar a la identificación de algunos procesos regulatorios divergentes y/o específicos de especie. Por otro lado, en el rDNA 5S de *T. vaginalis* se identificaron algunos motivos reguladores putativos poco conservados (Torres-Machorro et al., 2006), lo que sugiere que el estudio de este gen en organismos cercanos evolutivamente a *T. vaginalis* podría dar más información sobre la regulación de estos genes en organismos eucariontes divergentes.

Para este estudio nos basamos en la secuencia reportada para el rDNA 5S de *T. vaginalis*. Obtuvimos las secuencias del rDNA 5S de *T. tenax* y *T. foetus*, y complementamos la caracterización previa del rDNA 5S de *T. vaginalis*. En las tres especies de Trichomonádidos comparamos la secuencia y motivos de los rDNA 5S, su organización genómica, la presencia de motivos intergénicos y su localización cromosomal.

#### Clonación y secuenciación del rDNA 5S en Trichomonádidos

Utilizando la secuencia del rDNA 5S de *T. vaginalis* se diseñaron dos oligonucleótidos que se anclan en la región codificadora y aprovechan la organización en tándem del gen para amplificar la región intergénica (Fig. 18). También se utilizaron oligonucleótidos que se anclan en las orillas de la región codificadora para amplificar la secuencia faltante (que se sobrelapa en 90 pb con la anterior) y ensamblar ambas secuencias (Fig. 18). Los PCRs genómicos<sup>1</sup> de los tres organismos se clonaron en Zero Blunt TOPO (Invitrogen), se secuenciaron y se ensamblaron.

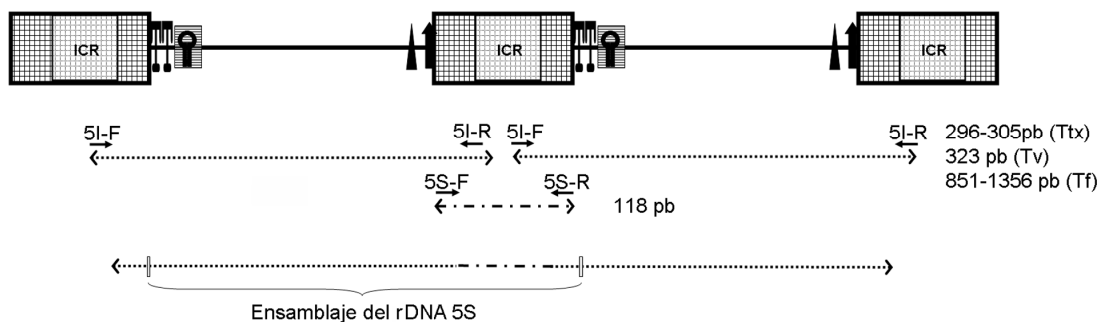
El trabajo previo con el rDNA 5S se basa en dos aislados de *T. vaginalis*, el de genoma secuenciado (G3) y el del aislado utilizado en el laboratorio (CNCD147). En el aislado G3 se identificaron dos tipos de regiones intergénicas por métodos bioinformáticos (A y B), mientras

---

<sup>1</sup> Debido a la alta identidad de secuencia de las regiones codificadoras del rDNA 5S de los tres organismos (~95%) se utilizaron los mismos oligonucleótidos para amplificar el rDNA 5S (5S-F, 5S-R, 5I-F y 5I-R; Apéndice II). Para los PCRs de la región intergénica se obtuvieron productos de ~300 pb para *T. vaginalis*, de ~300, ~600 y ~800 pb para *T. tenax*; y de ~850 y ~1300 pb para *T. foetus*. Para los PCRs de la región codificadora los productos obtenidos fueron de ~115 pb para los tres Trichomonádidos.

que en el aislado CNCD147 sólo logramos identificar experimentalmente al rDNA 5S tipo A. Se utilizó la estrategia referida en el párrafo anterior para verificar experimentalmente la ausencia ó escasa representación del rDNA 5S tipo B en el aislado CNCD147. Después de secuenciar 18 clonas de la región intergénica de dicho aislado, no se obtuvo ninguna con la secuencia tipo B del rDNA 5S, por lo que se utilizó un oligonucleótido específico de la región intergénica tipo B (RI335, Apéndice II)<sup>2</sup> para amplificar el rDNA 5S del aislado CNCD147. Se secuenciaron cuatro clonas que contenían al rDNA 5S tipo B de *T. vaginalis*, confirmando la presencia de dos tipos de rDNA 5S (A y B) en dos aislados diferentes de *T. vaginalis* (G3 y CNCD147).

Por otro lado, se secuenciaron 11 y 9 clonas de la región intergénica de *T. tenax* y *T. foetus*, respectivamente. Al menos tres clonas independientes de la región codificadora se secuenciaron para cada Trichomonádido.



**Fig. 18** Amplificación, clonación y secuenciación del rDNA 5S de Trichomonádidos. Diagrama de la organización en tándem del rDNA 5S. Los rectángulos cuadriculados representan la región codificadora del rDNA 5S mientras que la línea continua representa las regiones intergénicas. Se indican con flechas las regiones de alineamiento de los oligonucleótidos utilizados para amplificar las regiones intergénicas (5I-F y 5I-R) y codificadoras (5S-F y 5S-R). Los productos de amplificación se muestran con diferentes estilos de líneas. También se muestra la estrategia de ensamblaje.

### El rDNA 5S en Trichomonádidos

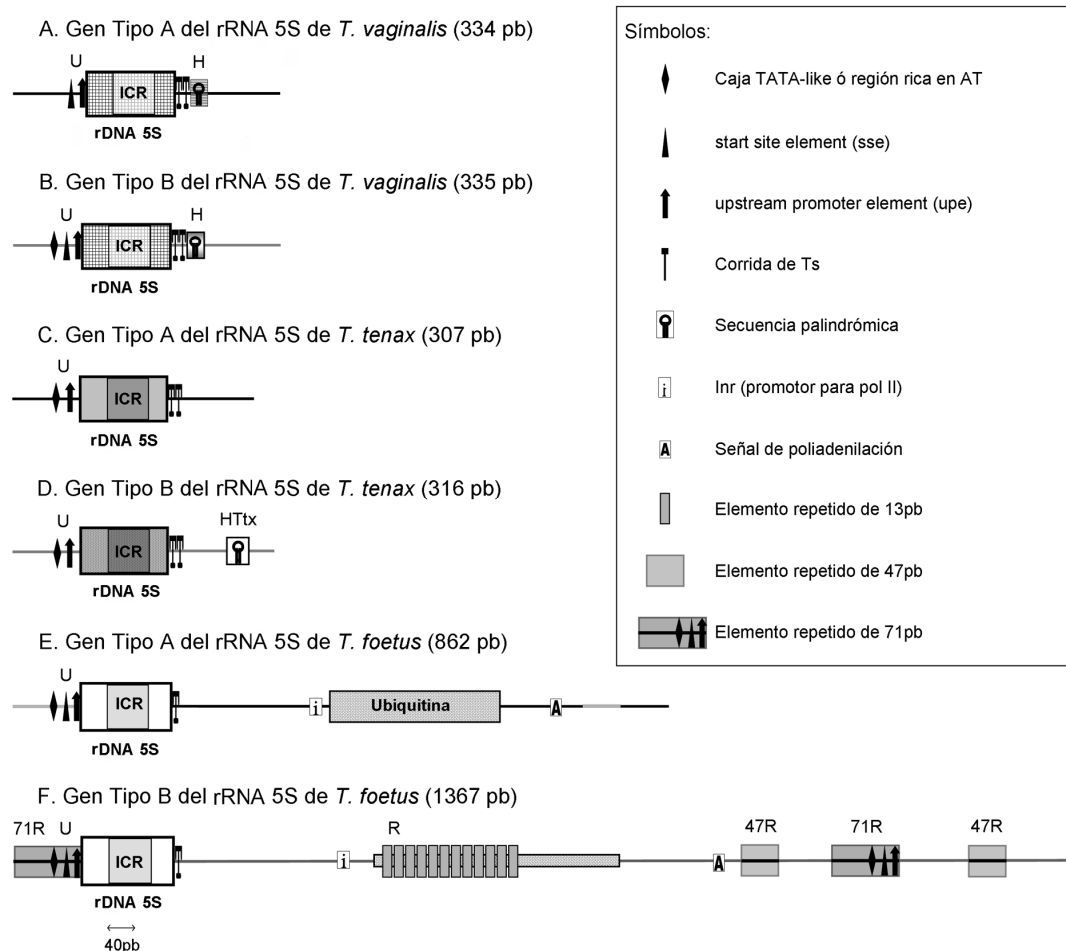
Nombramos a las variantes del rDNA 5S del aislado CNCD147 de *T. vaginalis* Tipo A-Tv y Tipo B-Tv (Fig. 19, Apéndice III). Estas variantes tienen secuencias codificadoras idénticas; pero difieren en el tamaño y en la secuencia en sus regiones intergénicas (Tabla 11). La caja “TATA-like”, un motivo regulador putativo río arriba del gen, sólo se pudo identificar en el gen

<sup>2</sup> El oligonucleótido RI335 se ancla en la posición +238 de la región intergénica del rDNA 5S. Como oligonucleótido reversa se utilizó el oligo 5S-R (Fig. 18, Apéndice II). El producto de la amplificación genómica fue de 211pb.

tipo B (Fig. 19), lo que sugiere un posible mecanismo de regulación diferencial entre estos genes.

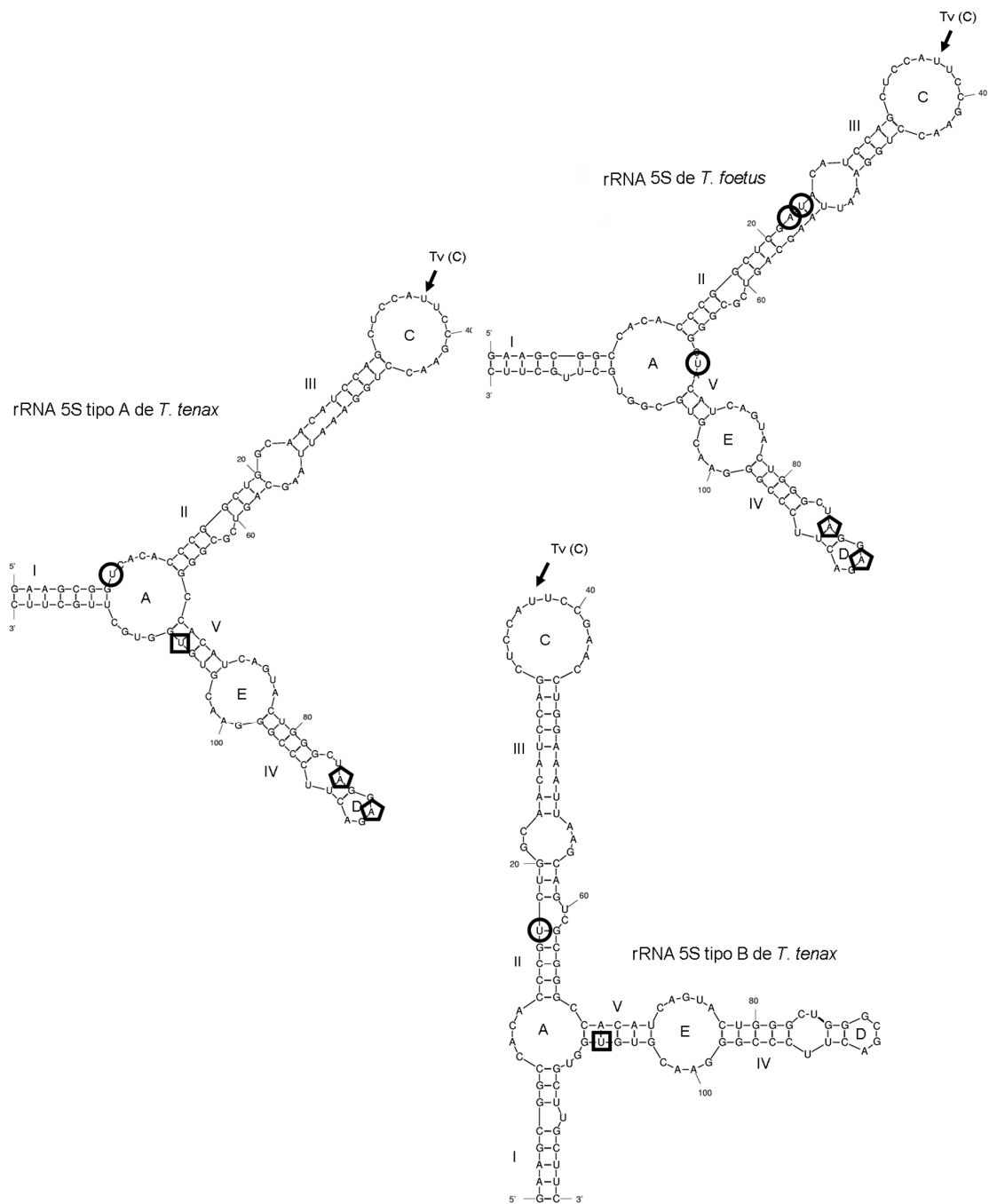
Gracias a la obtención de clonas con dos y tres copias en tándem del rDNA 5S, logramos describir dos tipos de rDNA 5S en *T. tenax*, que miden 307pb (Tipo A-Ttx) y 316pb (Tipo B-Ttx) (Apéndice III). Utilizando alineamientos con el rDNA 5S de *T. vaginalis* identificamos en ambos tipos de gen, algunos motivos reguladores putativos como el promotor interno a la región codificadora. Río arriba del sitio de inicio de la transcripción, se localizó un *sse*, una región rica en GC y una caja TATA-like. De los tres Trichomonádidos, sólo *T. tenax* mostró dos tipos de regiones codificadoras para el rDNA 5S, las cuales tienen una identidad del 97%. Al observar dichos cambios en la estructura secundaria de los rRNA 5S de *T. tenax*, observamos que dos cambios se localizan en regiones apareadas (tallos) y dos en asas (loop A y loop D). Estos cambios no repercuten en la estructura secundaria de la molécula pues los apareamientos G-C y A-U se mantienen mediante la utilización apareamientos no-canónicos G-U (Fig.20).

*T. foetus* tiene al menos dos tipos de rDNA 5S (Apéndice III). Estos genes son idénticos en la región codificadora, pero difieren en la secuencia de la región intergénica (Fig.19, Tabla 11). Llamamos a estos genes Tipo A-Tf (862 pb) y Tipo B-Tf (~1300 pb). La región codificadora del rRNA 5S de *T. foetus* (118pb) conserva la secuencia del promotor putativo de pol III y la estructura secundaria descrita para el rRNA 5S de *T. vaginalis* (Fig. 20). La región reguladora río arriba en ambos tipos de genes se compone de un “sse”, un “upe” y una región rica en AT. Finalmente, la señal típica de terminación de la transcripción de pol III, una corrida de Ts, se encontró río abajo de la región codificadora en los tres Trichomonádidos (Fig. 19).



**Fig. 19** Organización del gen del rRNA 5S en Trichomonádidos. Representación gráfica de los dos tipos de rDNA 5S para cada Trichomonádido estudiado. Aún cuando el rDNA 5S tiene copias repetidas en tándem en el genoma, por simplicidad sólo se muestra una sola copia de cada variante. Las regiones codificadoras del rRNA 5S se muestran como cajas. El promotor de pol III (ICR) es interno a la región codificadora. La región reguladora río arriba (U) puede tener un “upstream promoter element, upe” (triángulo), un “start site element, sse” (flecha) y una región rica en AT (rombo). Después de la región codificadora hay una corrida de Ts que actúa como señal de terminación de la transcripción. En *T. vaginalis* los dos tipos de rDNA 5S tienen una secuencia palindrómica (H) que puede tener pequeñas variaciones de secuencia. El rDNA 5S Tipo B de *T. tenax* tiene una secuencia palindrómica única (HTx) en la mitad de la región intergénica. En *T. foetus* el rDNA 5S Tipo A-Tf se caracteriza por la presencia de un ORF de ubiquitina en la región intergénica, con elementos reguladores de su transcripción por pol II: el promotor (Inr, i) y a secuencia de poliadenilación (A). El gen Tipo B de *T. foetus* se caracteriza por la presencia de un gen interrumpido de ubiquitina y secuencias repetidas (R) de tamaño variable.

La región codificadora del rDNA 5S se comparó entre los tres Trichomonádidos y se encontró una alta similitud entre los tres, con identidades que van del 94 al 97% (Tabla 11). También se determinó que cada Trichomonádido tiene variaciones de nucleótidos dentro de la región codificadora del rRNA 5S que son específicas de especie, lo que permitiría usar al rDNA 5S para distinguir entre Trichomonádidos (Fig. 21)



**Fig. 20** Estructura secundaria predicha para los rRNA 5S de *T. tenax* (Tipo A y B) y *T. foetus*. Las hélices se nombran con números romanos y las asas con letras mayúsculas. Los círculos muestran a los nucleótidos específicos para cada tipo de rRNA 5S. Los cuadrados remarcan a los nucleótidos específicos del rRNA 5S de *T. tenax*. Los pentágonos señalan a los nucleótidos compartidos entre los rRNA 5S de *T. tenax* y *T. foetus*. Finalmente, Tv(C) indica la localización del nucleótido específico de *T. vaginalis*. Las secuencias se doblaron utilizando el software mfold de Zuker (<http://mfold.bioinfo.rpi.edu>).



	<i>Trichomonas vaginalis</i>		<i>Trichomonas tenax</i>		<i>Trichomonas foetus</i>		
	Tv		Ttx A	Ttx B			
Identidad de la región codificadora	Tv	100%	96%	97%		95%	
	Ttx A		100%	97%		94%	
	Ttx B			100%		96%	
		A-Tv (334pb) B-Tv (335pb)	A-Ttx (307pb) B-Ttx (316pb)		A-Tf (862pb) B-Tf (1367pb)		
	A-Tv (334bp)	100%	84%	49%	55%	42%	34%
Identidad de la región intergénica	B-Tv (335bp)		100%	43%	43%	36%	43%
	A-Ttx (307bp)			100%	57%	47%	46%
	B-Ttx (316bp)				100%	38%	35%
	A-Tf (862bp)					100%	87%
Porcentaje del genoma para el 5S		0.10%		0.01%		0.04%	

				Caja A	
5STv	GAAGCGGCCACACCCGGCTGGCAACATCCAGCTCCA	<b>CTCCGAACCTGGA</b>	<b>AATTAAGCAGT</b>		60
5STtxA	----- <b>t</b> -----				60
5STtxB	----- <b>t</b> -----				60
5STf	----- <b>at</b> -----				60
	Caja A	IE	Caja C		
5STv	<b>CGCGG</b> <b>GCCACA</b> T	CAGTAC	<b>TGGGCTGGGCGACTTCCCG</b>	GGAACGTGCGGTGCTTGCTTC	118
5STtxA	-----		a--a-----	t-----	118
5STtxB	-----			t-----	118
5STf	----- <b>t</b> -----		a--a-----		118

**Fig. 21** Comparación de secuencia de la región codificadora del rRNA 5S de los tres Trichomonádidos. El ICR ó promotor de pol III se compone de una caja A, un elemento intermedio (IE) y una caja C. *T. tenax* tiene dos tipos de secuencia codificadora para el rRNA 5S, llamadas 5STtxA y 5STtxB; mientras que sólo se identificó un tipo de secuencia codificadora para *T. vaginalis* (5STv) y *T. foetus* (5STf). Las variaciones de secuencia específicas de especie se resaltan con negritas.

### La región intergénica del rDNA 5S en Trichomonádidos

Los aislados G3 y CNCD147 de *T. vaginalis* tienen dos tipos de regiones intergénicas: tipo A y tipo B, que tienen una identidad del 84% y que difieren en tamaño por un nucleótido (334 y 335pb). En ambos tipos de regiones intergénicas se identificó una secuencia palindrómica, en la que se observaron ocho variaciones de secuencia que generan *in silico* diferentes tipos de estructuras del tallo-asa (Fig. 22).

*T. tenax* tiene al menos dos tipos de rDNA 5S, con 307 (Tipo A) y 316 pb (Tipo B) de longitud. Las regiones intergénicas del rDNA 5S de *T. tenax* tienen sólo un 59% de identidad y difieren en la presencia de un tallo-asa putativo de alta energía (-9.6 kcal/mol) localizado en la posición -

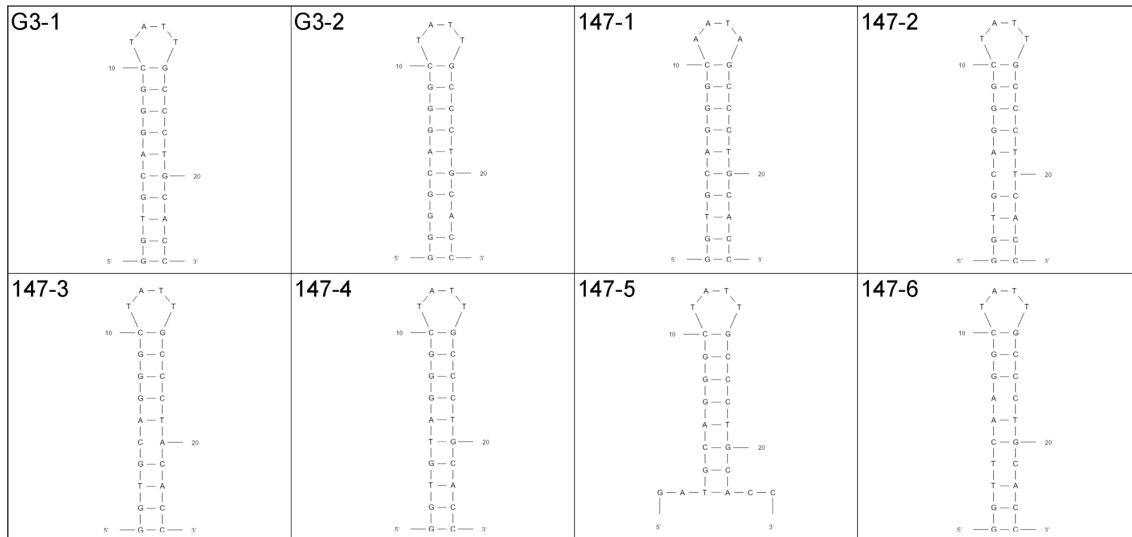
118 de la región intergénica del gen Tipo B-Ttx (Fig. 19). Este tallo-asa no tiene similitud de secuencia ni de posición con el encontrado en el rDNA 5S de *T. vaginalis*.

*T. foetus* tiene al menos dos tipos de rDNA 5S con 862 y 1262-1367pb de longitud. La región intergénica Tipo A-Tf (744pb) contiene un ORF completo de ubiquitina con su correspondiente promotor tipo pol II (Fig. 19), idéntico al descrito en *T. vaginalis* (Inr) (Liston y Johnson, 1999). En la región 3' del gen de ubiquitina se encuentra una secuencia equivalente a señal de poliadenilación del mRNA descrita en *T. vaginalis* (Espinosa et al., 2002). La región intergénica Tipo B-Tf puede variar en tamaño desde 1144pb hasta 1249pb, dependiendo del número de copias del elemento repetido de 13pb<sup>3</sup>. La región intergénica se caracteriza por la presencia de dos zonas de secuencias repetidas: la primera se compone de 5 a 12 repeticiones del motivo de 13pb de longitud, el cual interrumpe la región codificadora de ubiquitina. El segundo bloque de secuencias repetidas se compone de dos secuencias de 47 y 71pb, cada una repetida una vez. La secuencia de 47pb se localiza en las posiciones -233 y -516 considerando el sitio de inicio de la transcripción como +1. La secuencia de 71pb se localiza en las posiciones -76 y -408, e incluye las secuencias reguladoras putativas localizadas río arriba del sitio de inicio de la transcripción del rDNA 5S. Los dos tipos de región intergénica de *T. foetus* son muy similares en secuencia (87% de identidad, Tabla 11), aun cuando difieren en tamaño por 450pb. Esta variación en tamaño se debe principalmente a la naturaleza repetitiva de la región intergénica Tipo B-Tf.

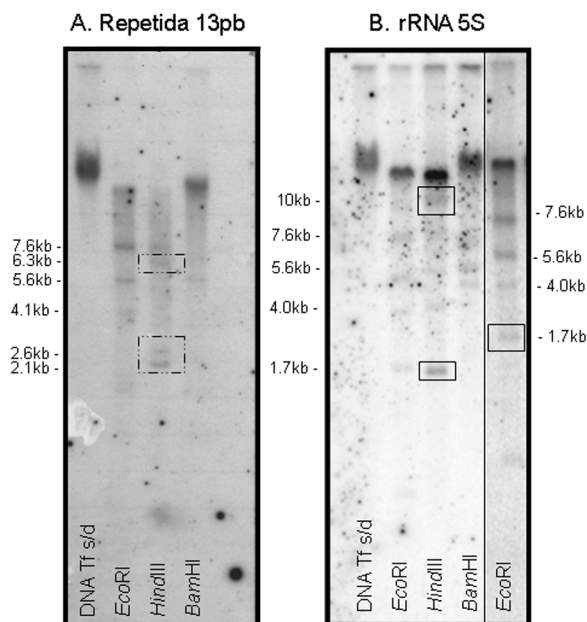
---

<sup>3</sup> Este elemento se localizó en un Southern blot genómico utilizando como sonda un oligonucleótido que incluye la secuencia de 13pb (RI13R, Apéndice II). Dicho Southern blot se comparó con otro hibridado con una sonda del rDNA 5S. Como se observa en la figura 22, el elemento de 13pb se localiza en loci distintos al rDNA 5S de *T. foetus* (Fig.23).

Nombre	Secuencia	dG (kcal/mol)
G3-1	GGTGCAGGGCTATTGCCCTGCACC	-13.02
G3-2	--g-----	-10.62
147-1	-----a--a-----	-13.12
147-2	-----t---	-7.96
147-3	-----a---	-7.94
147-4	---t-----	-9.49
147-5	-a-----	-10.19
147-6	---t--a-----	-3.17



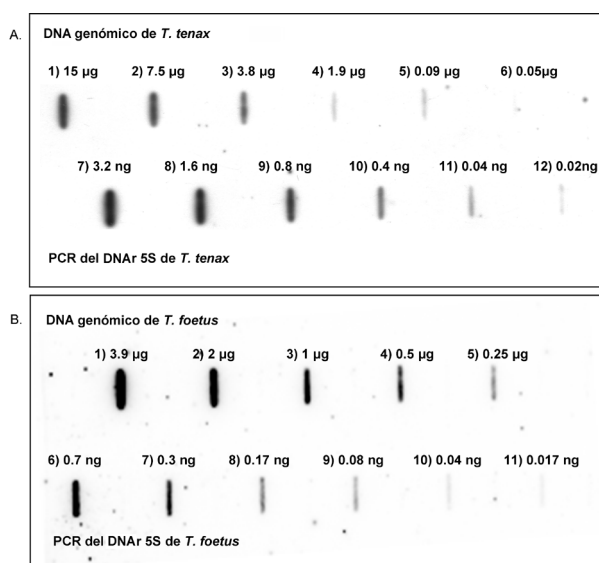
**Fig. 22** Variantes de la secuencia palindrónica localizada en la región intergénica del rDNA 5S de *T. vaginalis* (aislados G3 y CNCD147). Todas las variaciones de secuencia, menos la G3-2, se identificaron en el aislado CNCD147 de *T. vaginalis*. Las primeras dos líneas corresponden a variantes del palíndromo encontradas en el aislado G3. Las secuencias putativas del tallo-asa se obtuvieron utilizando el programa Mfold de Zuker.



**Fig. 23** El elemento repetido de 13pb de la región intergénica del rDNA 5S de *T. foetus* no es específico del rDNA 5S. Se compararon dos Southern blot genómicos de *T. foetus* en donde se localizaron la secuencia repetida de 13pb (A. oligo RI13R marcado) y la región codificadora del rDNA 5S (B. PCR marcado). Se observan bandas compartidas entre los dos experimentos que corresponden a las copias del rDNA 5S que incluyen a la secuencia repetida. También se obtuvieron bandas específicas para cada sonda (rectángulos) que sugieren la localización del elemento de 13pb en loci distintos al rDNA 5S. Por otro lado, se confirmó que no todas las copias del rDNA 5S se asocian con dicha secuencia repetida.

## El número de copias y la localización del rDNA 5S en Trichomonádidos

Para determinar el número aproximado de copias genómicas del rDNA 5S de *T. tenax* y *T. foetus* se realizaron ensayos cuantitativos comparativos de hibridación (Fig. 24). Se estimó el porcentaje del genoma que corresponde a la región codificadora del rRNA 5S para cada Trichomonádido. La región codificadora del rRNA 5S corresponde a 0.1% del genoma de *T. vaginalis* y al 0.04% del genoma de *T. foetus*, mientras que en *T. tenax* este valor corresponde a un décimo del de *T. vaginalis* (0.01%).



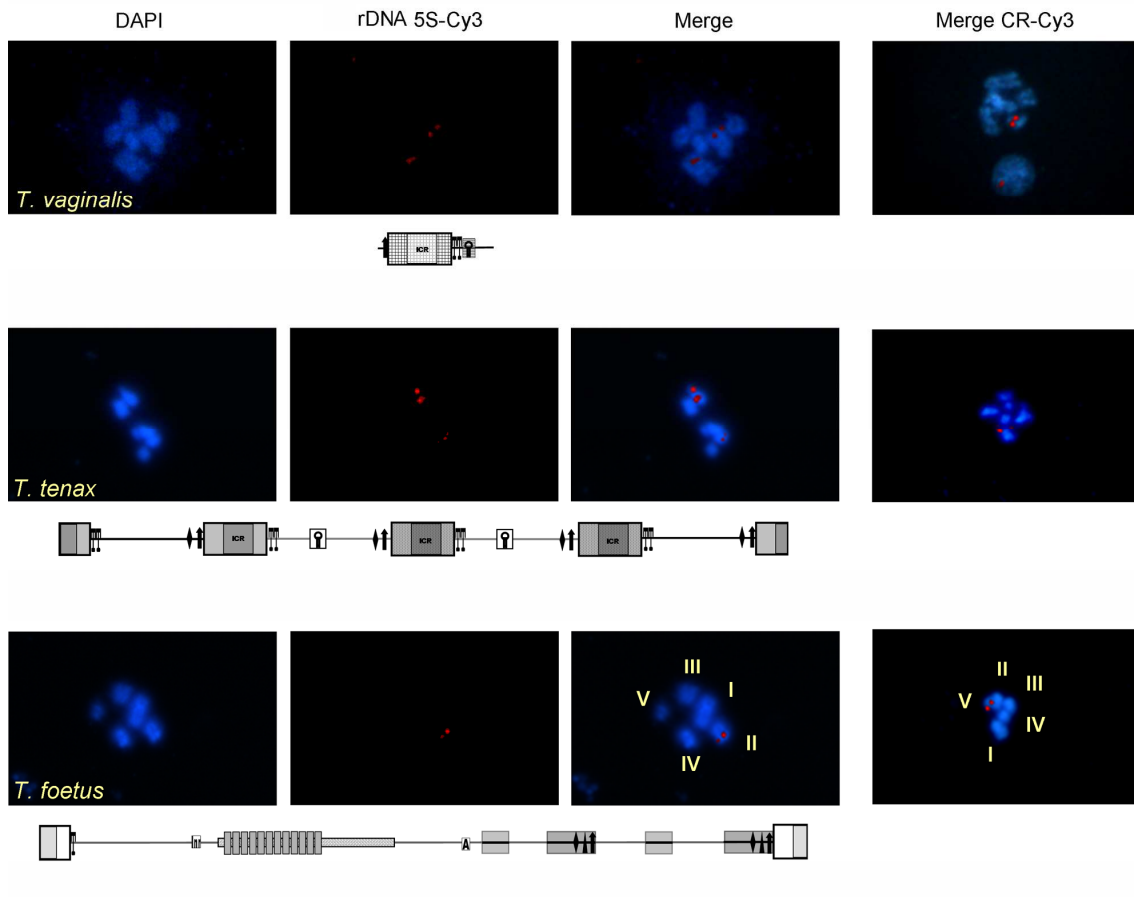
**Fig. 24** Estimación del número de copias del rDNA 5S de *T. tenax* (A) y *T. foetus* (B). Se realizaron ensayos de hibridación cuantitativa comparativa. El ensayo consiste en cargar un slot blot con cantidades decrecientes de DNA genómico; junto con cantidades decrecientes de la región codificadora del rDNA 5S (PCR), que representan una sola copia del gen. Este mismo fragmento de PCR se marca radiactivamente y se utiliza como sonda. Se cuantifican las bandas obtenidas y se compara la intensidad de señal del rDNA 5S genómico contra la intensidad de señal de cantidades conocidas de una sola copia del gen (PCR rDNA 5S). Nótese que fue necesario utilizar casi cuatro veces más DNA genómico para cuantificar las copias del rDNA 5S de *T. tenax*, lo que confirma que *T. tenax* tiene menor número de copias del rDNA 5S que *T. foetus*.

La localización cromosomal del rDNA 5S en Trichomonádidos se determinó por ensayos de hibridación *in situ* (FISH), utilizando a los genes del rDNA como control. Se ha reportado que *T. vaginalis* y *T. tenax* tienen 6 cromosomas (Zubacova et al., 2008; Lehker y Alderete, 1999), mientras que *T. foetus* sólo tiene 5 (Xu et al., 1998). Como se muestra en la Fig. 25 el rDNA 5S se localiza en dos cromosomas en *T. vaginalis* y *T. tenax*, y en uno solo en *T. foetus*<sup>4</sup>.

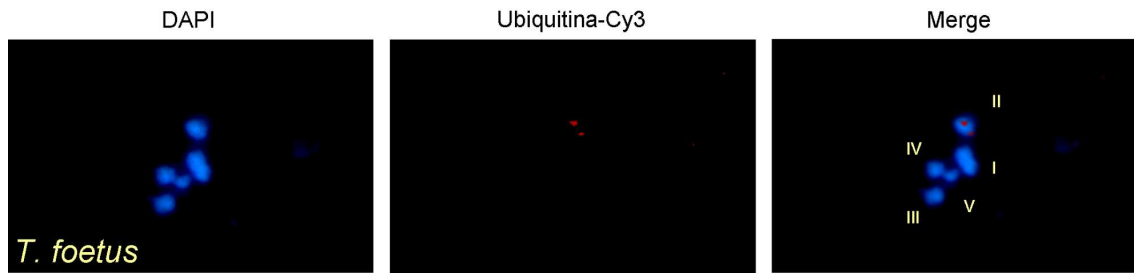
Los cromosomas de *T. vaginalis* (y *T. tenax*) nos se pudieron clasificar o nombrar utilizando imágenes de microscopía. Los cromosomas de *T. vaginalis* se han definido como tres grandes, dos intermedios y un mini-cromosoma (Lehker y Alderete, 1999). Para *T. tenax* definimos dos grandes y cuatro pequeños. Por otro lado, los cromosomas de *T. foetus* fueron más fáciles de distinguir por tamaño por lo que fuimos capaces de identificarlos y nombrarlos (I-V). En *T.*

<sup>4</sup> Como control se realizó un FISH para localizar al gen de ubiquitina en los cromosomas de *T. foetus*. Dicho gen se localizó en el cromosoma II, en la misma posición que el rDNA 5S; lo que se sugiere que la mayoría de los genes de ubiquitina, si no es que todos, se localizan en el locus correspondiente al rDNA 5S de *T. foetus* (Fig. 26)

*vaginalis* el rDNA 5S se localiza en dos de los tres cromosomas grandes, mientras que el gen del rDNA se localiza en el mini-cromosoma; en *T. tenax* el rDNA 5S se localiza en un cromosoma grande y uno chico. En *T. foetus* el rDNA 5S se encuentra en un solo cromosoma (II), mientras que el rDNA se localiza en el cromosoma más pequeño (V) (Fig. 25).



**Fig. 25** Localización cromosomal del rDNA 5S en Trichomonádidos. El rDNA 5S se localizó en metafases mediante hibridación in situ (FISH). Se marcaron las sondas del rDNA 5S de cada Trichomonádido (representadas debajo de las hibridaciones) con Cy3 utilizando la técnica de “nick-translation”. La sonda para *T. vaginalis* fue el gen Tipo A del rDNA 5S de la posición -11 a +94. Incluye toda la región codificadora y 87pb de región intergénica. La sonda para *T. tenax* (1235pb) contiene dos genes completos del Tipo A y dos del Tipo B (rDNA 5S). La sonda del rDNA 5S de *T. foetus* contiene 94% de la región codificadora y la región intergénica Tipo B completa (1356pb). En la columna Merge CR-Cy3 se incluye el sobrelape de la hibridación control con el cistrón ribosomal. Se utilizaron sondas homólogas para cada organismo. La sonda del rDNA de *T. vaginalis* corresponde a la unidad completa de 6kb. Las sondas del rDNA para *T. tenax* y *T. foetus* corresponden a un fragmento de 1849pb de la región codificadora (16S+5.8S). Se indica el nombre de los cromosomas de *T. foetus*.



**Fig. 26** Localización cromosomal del gen de ubiquitina de *T. foetus*. La sonda utilizada en el FISH corresponde a la región codificadora completa del gen de ubiquitina de *T. foetus*. La ubiquitina se localiza en el cromosoma II.

### Discusión

La alta identidad de secuencia de la región codificadora del rRNA 5S de los tres Trichomonádidos confirma una relación filogenética cercana entre ellos. Encontramos dos variantes de la secuencia codificadora para el rRNA 5S de *T. tenax*, que incluyen variación en la región promotora. Esta variación podría participar en una regulación transcripcional diferencial, como se observa en los genes de rDNA de *Plasmodium* (Waters, 1994). Por otro lado, las variaciones en la secuencia codificadora podrían resultar en la síntesis de dos tipos de rRNA 5S maduros, merecedores de análisis experimentales futuros.

Las regiones reguladoras putativas localizadas río arriba del sitio de inicio de la transcripción, que incluyen al *start site element*, al *upstream promoter element* y a una región rica en AT, están relativamente bien conservadas entre las tres especies de Trichomonádidos, lo que sugiere un papel funcional en estos organismos como se observa en levadura (Lee et al., 1997).

En contraste con la alta identidad de secuencia de la región codificadora del rDNA 5S en Trichomonádidos, se observó gran variabilidad en la región intergénica de dichos organismos, lo que podría reflejar una rápida tasa de evolución en las secuencias intergénicas. La recombinación de secuencias repetidas también podría llevar a dicha variabilidad. Cada Trichomonádido estudiado tiene motivos específicos en la región intergénica del rDNA 5S, como la secuencia palindrómica en *T. vaginalis*, el palíndrome específico del gen Tipo B en *T. tenax*, y el ORF de ubiquitina y las secuencias repetidas en *T. foetus*. La variabilidad de secuencia en la región intergénica, incluyendo pequeñas variaciones como las del palíndromo de *T. vaginalis*, podrían relacionarse con la regulación de la expresión de estos genes, lo que resalta la importancia de estudios funcionales de estas variantes. Por otro lado, la ligación del gen de ubiquitina con el rDNA 5S se ha observado en una especie no relacionada con *T. foetus* que es

*Tetrahymena pyriformis* (ciliado)(Guerreiro et al., 1993), lo que hace interesante el estudio de la relevancia funcional de este tipo de asociaciones de familias multigénicas y motivos específicos.

La organización de las secuencias repetidas intergénicas del rDNA 5S en *T. foetus* es similar a la organización de la región intergénica del rDNA en metazoarios, en donde el promotor espaciador (secuencia similar al promotor, repetida dentro de la región intergénica) se ha propuesto como reclutador de la maquinaria de transcripción por pol I incrementando la eficiencia transcripcional (Paule y White, 2000). El papel de las secuencias repetidas en el rDNA 5S de *T. foetus* queda por estudiarse.

En *T. tenax* y *T. vaginalis* el rDNA 5S se localiza en al menos dos *loci*, en dos cromosomas diferentes. La localización del rDNA 5S en distintos cromosomas podría asociarse con contextos cromosomales diferentes y tal vez con una regulación de la expresión contrastante entre los dos loci. Por otro lado, se debe de resaltar que la localización del rDNA en cromosomas diferentes no asegura la presencia de procesos regulatorios heterogéneos, pues los genes de rDNA 5S de distintos cromosomas podrían co-regularse a nivel nuclear al asociarse en sitios especializados de transcripción, como podrían ser los cuerpos de Cajal (Murphy et al., 2002).

A diferencia de *T. vaginalis* y *T. tenax*, el rDNA 5S de *T. foetus* parece estar localizado en un solo cromosoma. El hecho de que *T. foetus* tenga un locus del rDNA 5S y un cromosoma menos que *T. tenax* y *T. vaginalis* hace el análisis de los cariotipos de estos organismos un atractivo tema de investigación, pues no se sabe si los genes del sexto cromosoma de *T. vaginalis* y *T. tenax* fueron reorganizados, compactados o perdidos en *T. foetus*. O bien, si el sexto cromosoma resultó de una duplicación en *T. vaginalis* y *T. tenax*.

El rDNA se localiza en un solo cromosoma en los tres Trichomonádidos, lo que podría estar relacionado con el bajo número de copias del rDNA de estos organismos. Ya que el rDNA y el rDNA 5S tienen una localización cromosomal bien definida en Trichomonádidos, proponemos a estos genes como los primeros marcadores cromosomales para estos organismos.

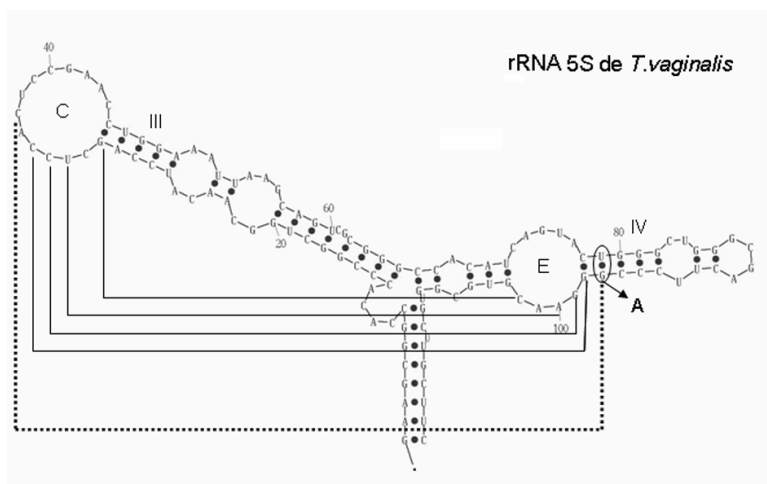
### Capítulo III

#### Análisis funcional del rDNA 5S en *T. vaginalis*

##### Introducción

El plantamiento original de mi trabajo de doctorado fue establecer un sistema de análisis *in vivo* para el gen del rRNA 5S de *T. vaginalis*. El planeamiento experimental se basaba en construir un gen reportero estructural del rRNA 5S de *T. vaginalis*. Este reportero se transfectaría de forma estable en células de *T. vaginalis* para comparar los niveles de transcripción del templado silvestre contra los de los templados con mutaciones en los motivos regulatorios putativos del rDNA 5S.

El reportero estructural del rRNA 5S se obtendría con una sola mutación en la región codificadora del gen, que no afecta los motivos reguladores putativos. Esta mutación se determinó estudiando la estructura secundaria de la molécula y las posibles interacciones tridimensionales de la misma (Fig. 27). Se cambiaría una base que podría estar involucrada en la estructuración tridimensional de la molécula, lo que llevaría a un cambio de conformación y por lo tanto un cambio en la migración del rRNA 5S reportero en geles nativos de acrilamida. Lo anterior permitiría distinguir al rRNA 5S reportero del rRNA 5S silvestre. Por otro lado, reportes previos habían demostrado que el rRNA 5.8S de algunos organismos tiene dos conformaciones tridimensionales que se pueden separar en geles nativos de acrilamida (Smith et al., 1984; Lo et al., 1984).

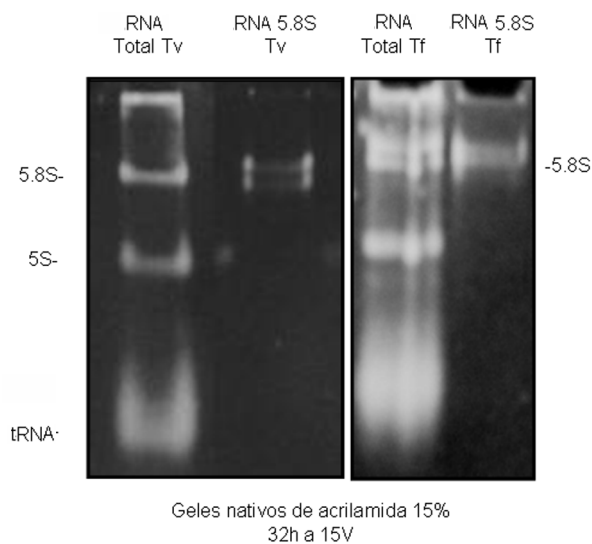


**Fig. 27** Reportero estructural putativo para el rRNA 5S de *T. vaginalis*. Se utilizan líneas para representar las posibles interacciones tridimensionales de la molécula. La línea punteada representa la interacción tridimensional que se perdería si se mutara la G encerrada en un óvalo por una A. Esta mutación resultaría en un cambio conformacional que llevaría a la generación de una molécula de rRNA 5S con migración electroforética diferente a la silvestre.

En el comienzo de mi proyecto de doctorado decidí revisar si los rRNA 5.8S de *T. vaginalis* y de *T. foetus* tenían más de una conformación; y al mismo tiempo probar las condiciones electroforéticas necesarias para separar conformaciones de moléculas de rRNA en geles nativos de acrilamida. Se lograron separar dos conformaciones del rRNA 5.8S de los dos Trichomonádidos estudiados (Fig. 28). Desafortunadamente noté que el proceso resultaba largo



y complejo. La molécula de rRNA a estudiar se debe de purificar de un gel desnaturalizante de acrilamida mediante elusión, para después correrse durante 32h a 15V en un gel nativo de acrilamida al 15%. En la figura 28 se muestra la mejor separación obtenida para el rRNA 5.8S de *T. vaginalis*. Esta separación se observa claramente, sin embargo el ancho de las bandas podría resultar problemático para la cuantificación de las mismas. También se muestra la mejor separación obtenida para el rRNA 5.8S de *T. foetus*, donde no se logran distinguir bandas claras aún siguiendo el mismo procedimiento utilizado para *T. vaginalis*. Con lo anterior consideramos que el procedimiento propuesto para distinguir diferentes conformaciones de una misma molécula de rRNA no es adecuada para los análisis planteados para estudiar al rRNA 5S de *T. vaginalis*. Se decidió entonces cambiar la aproximación experimental para determinar la funcionalidad de los elementos descritos en el rDNA 5S. Tratamos de identificar interacciones rDNA 5S-proteínas mediante ensayos de retardo (EMSA), y la síntesis del rRNA 5S mediante ensayos de transcripción *in vitro*.



**Fig. 28** Separación de conformaciones del rRNA 5.8S de *T. vaginalis* y *T. foetus* en geles nativos de acrilamida. Se corrió RNA total de los dos organismos y la molécula purificada del rRNA 5.8S (de geles desnaturalizantes) de los dos Trichomonádidos.

### Análisis de la interacción de factores protéicos con el rDNA 5S mediante geles de retardo (EMSA)

Los geles de retardo permiten identificar interacciones DNA-proteína. Como sonda se utiliza un fragmento de DNA de doble cadena (oligonucleótidos alineados ó insertos purificados de plásmidos marcados radiactivamente) que contenga motivos putativos de interacción con proteínas. Cuando la sonda interacciona con factores proteicos migra más lento que la sonda sola en geles nativos de acrilamida.

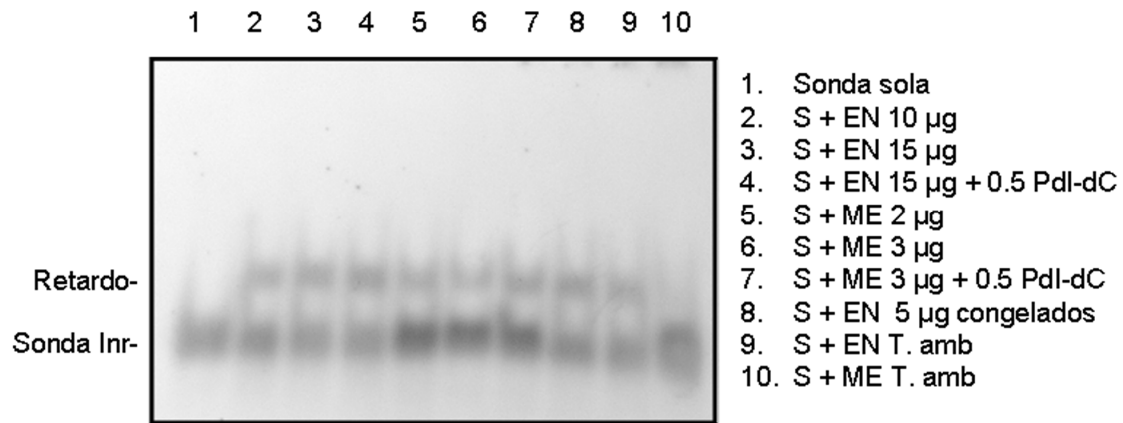
Se montó la metodología en el laboratorio. Como control se utilizó una sonda de oligonucleótidos alineados (a-scsInr-A y a-scsInrB, Apéndice II) que corresponde al promotor

del gen de la alfa-succinil coenzima A sintetasa (a-scs), transcrito por pol II. Este fragmento contiene dos motivos sobrelapados del promotor más estudiado para *T. vaginalis*, el Inr (Liston et al., 2001) reconocido por la proteína IBP39. En este ensayo control se obtuvieron los retardos esperados utilizando extractos nucleares de *T. vaginalis* y la sonda de a-scs (Fig. 29).

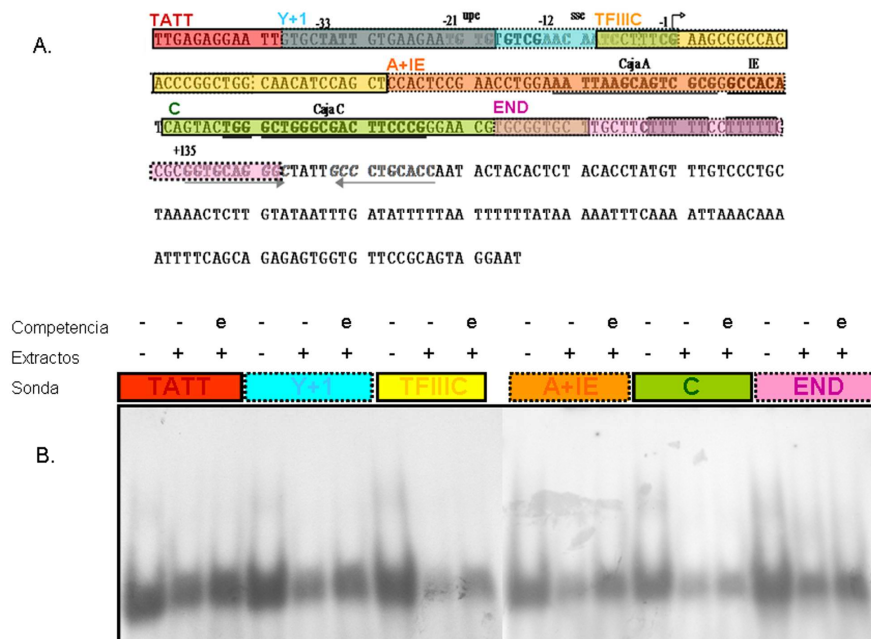
Utilizando las condiciones descritas en la sección XXII de la Metodología se realizaron los ensayos de retardo para el rDNA 5S. Se probaron como sondas oligonucleótidos alineados de 40pb correspondientes a cada uno de los motivos reguladores putativos (Fig. 30), pero no se obtuvieron retardos. Se probó entonces una sonda más grande que incluía la región codificadora completa y a la región reguladora río arriba del sitio de inicio de la transcripción del rRNA 5S (200pb). Tampoco se obtuvieron retardos (Fig. 31).

En estos ensayos de retardo se probaron varios extractos de proteínas de *T. vaginalis*: extractos nucleares “rápidos” ó “mini-extractos”, extractos nucleares, extractos citoplásmicos, extractos nucleares obtenidos con tres concentraciones diferentes de sales (1, 1.2 y 1.4M) y extractos totales (ver Metodología, secciones XX, XXI y XXIII). Se probaron también varios tipos de buffer de interacción, variando las concentraciones de Tris ó HEPES-KOH, KCl, MgCl<sub>2</sub>, Glicerol, BSA, DTT y ZnCl<sub>2</sub> (por la probable participación del Zinc en la estructuración de los dedos de Zinc del factor de transcripción TFIIIA) (Fig. 30 y 31). Se probaron condiciones de corrida del gel, incluyendo corridas en frío y geles de acrilamida más grandes, pensando que algunas interacciones DNA-proteínas podrían ser inestables o generar retardos muy pequeños que no se distinguieran en geles pequeños de acrilamida. Sin embargo, no se obtuvieron retardos claros para ninguna de las condiciones probadas.

Al mismo tiempo que se trabajó con los ensayos de EMSA, se probaron las condiciones necesarias para implementar un sistema de transcripción *in vitro*. Al obtener resultados iniciales positivos en los ensayos de transcripción y resultados negativos con los geles de retardo, los esfuerzos se enfocaron en los ensayos de transcripción.

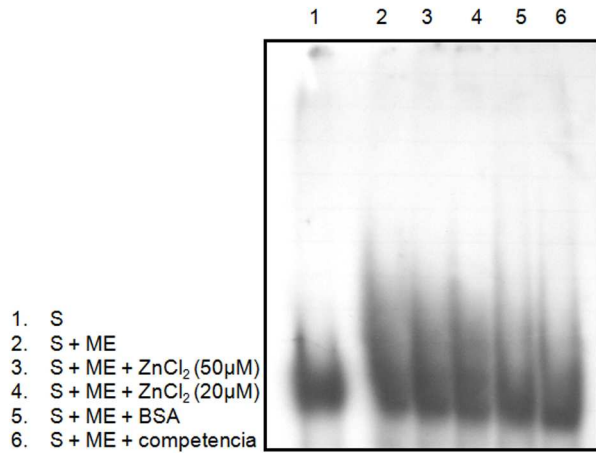


**Fig. 29** Ensayo de gels de retardo para el DNA control (Inr). Se utilizó una sonda de oligonucleótidos alineados del promotor para pol II en *T. vaginalis* (Inr). Los oligonucleótidos alineados y marcados por fosforilación con  $\gamma$ -[ $^{32}$ P]-ATP (Sonda, S) se corrieron en el carril 1 (sonda sola). Se probaron varias concentraciones de extractos nucleares de *T. vaginalis* (EN) y de “mini-extractos” de *T. vaginalis* (ME, que corresponden a una extracción rápida de proteínas nucleares). También se probó el efecto de poli dI-dC (Pdl-dC). Las interacciones se hicieron a 4°C, excepto para los carriles 9 y 10 (T. ambiente, ver Metodología, sección XXII). Carril 8: Extractos nucleares congelados y descongelados funcionan para los retardos. Carriles 9 y 10: Los EN son adecuados para interacciones a temperatura ambiente, mientras que lo ME no. S= sonda; EN= Extractos nucleares; ME= Mini-extractos.



**Fig. 30** Ensayos de gels de retardo con sondas del rDNA 5S de *T. vaginalis*. En el panel A se muestra la secuencia y localización de las sondas de oligonucleótidos alineados utilizadas para los ensayos. Las sondas TATT (región rica en AT), Y+1 (regiones reguladoras de levadura y sitio de inicio de la transcripción), TFIIC (sitio de unión a TFIIC), A+IE (Caja A y elemento intermedio), C (Caja C) y END (secuencias de terminación de la transcripción) se resaltan con distintos colores. **B.** Gels de retardo en donde se corrieron las interacciones de las seis sondas indicadas en el panel A. Extractos: extractos nucleares de *T. vaginalis*. Competencia específica no radiactiva (“fría”). Las interacciones se hicieron en Buffer F y se corrieron en un gel de agarosa 0.8%/0.5X TBE (Metodología). No se obtuvieron retardos.

**Fig. 31** Ensayo de geles de retardo con sonda de la región codificadora completa del rDNA 5S de *T. vaginalis*. Para este ensayo se utilizó como sonda un producto de PCR (200pb) marcado radiativamente con  $\alpha$ -[ $^{32}$ P]-dCTP utilizando los oligonucleótidos TATT-A y END-B (Apéndice II). La sonda se puso a interaccionar con ME de *T. vaginalis*. Se agregaron dos concentraciones de ZnCl<sub>2</sub> (carriles 3 y 4), BSA y una competencia específica (el mismo PCR sonda, pero sin marcar radiativamente). Se utilizó el buffer de interacción F (Metodología). El gel de acrilamida 5%/TBE 0.25X se corrió a 90V por 16h a 4°C. No se obtuvieron retardos claros. S= sonda, ME= Mini-extractos, BSA= Albúmina.



### Transcripción *in vitro* con extractos proteicos de *T. vaginalis*

Prácticamente todos los análisis funcionales reportados para genes transcritos por pol II en *T. vaginalis* se han hecho utilizando transfecciones transitorias de genes reporteros protéicos (Delgadillo et al., 1997). El promotor a estudiar se coloca río arriba de un gen que codifique para una proteína reportera de fácil análisis, como pueden ser la cloranfenicol acetil transferasa (cat), la proteína verde fluorescente (GFP) o la luciferasa (luc). Para que los genes reporteros sean correctamente traducidos, el pre-mRNA debe de llevar a cabo los procesamientos post-transcripcionales típicos para eucariontes (*capping*, poliadenilación y *splicing*) (Alberts et al., 2002), en donde la pol II tiene un papel importante, pues acarrea en su cola carboxilo-terminal, a varios de los factores involucrados en dicho procesamiento (Orphanides y Reinberg, 2002).

El rDNA 5S se transcribe por otra polimerasa, pol III, que reconoce un promotor interno a la región codificadora. Pol III sintetiza RNAs pequeños catalíticos que no se procesan post-transcripcionalmente como los pre-mRNA y por lo tanto no se traducen para sintetizar proteínas. Debido a lo anterior no es posible utilizar un reportero protéico para analizar los motivos reguladores putativos del rDNA 5S. La primera aproximación experimental propuesta para el estudio del rDNA 5S fue la utilización de moléculas reporteras estructurales; esta opción se descartó desde el principio, como se mencionó en la introducción de este capítulo. Otra opción fue la utilización ensayos de transcripción *in vitro* con extractos protéicos del mismo organismo: estrategia que se abordó durante mi proyecto de doctorado y que se describe a continuación.

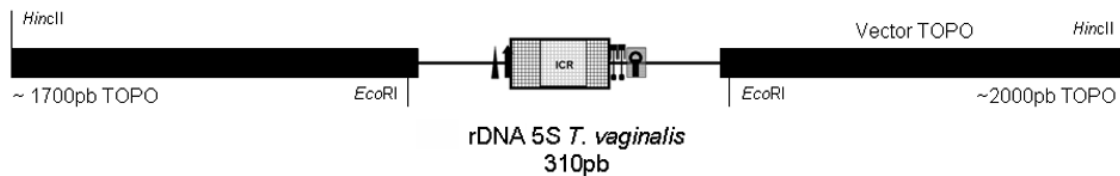
Para estudiar motivos regulatorios de ciertos genes mediante ensayos transcripción *in vitro* se pueden utilizar extractos protéicos homólogos ó heterólogos. En el caso del promotor para pol II de *T. vaginalis* (Inr) se utilizó un ensayo de transcripción *in vitro* con extractos de células HeLa para comprobar su funcionalidad (Quon et al., 1994). El anterior, es el único ensayo de transcripción *in vitro* reportado para genes de *T. vaginalis*. Para estudiar al gen del rDNA 5S de *T. vaginalis* decidimos utilizar extractos protéicos del mismo organismo (homólogos), pues en el rDNA 5S se identificaron motivos regulatorios putativos poco comunes (elementos reguladores río arriba del sitio de inicio de la transcripción) y un elemento que no se había descrito en este tipo de genes (secuencia palindrómica). Los motivos previos podrían funcionar a través de interacciones directas o indirectas con factores protéicos especie-específicos, que deberían de encontrarse en los extractos proteicos de *T. vaginalis*.

Aún no se han reportado sistemas de transcripción *in vitro* utilizando extractos protéicos de *T. vaginalis*, lo que sugiere que estos ensayos podrían ser difíciles de montar, posiblemente por la variedad de problemas metodológicos encontrados para trabajar con este organismo, incluyendo la presencia de grandes cantidades de proteasas y nucleasas citoplasmáticas.

Para montar un sistema de transcripción *in vitro* con extractos protéicos de *T. vaginalis* comenzamos con la obtención de extractos nucleares, utilizando una adecuación de la técnica publicada por Dignam de 1983 (Dignam et al., 1983; Liston y Johnson, 1999). Se probaron varias condiciones, pero no se obtuvieron los transcritos esperados. Bajo la premisa de que TFIIIA, factor de transcripción esencial para la síntesis del rRNA 5S, se encuentra principalmente en el citoplasma, se hicieron sin éxito ensayos de transcripción mezclando extractos nucleares y citoplásmicos (Dignam et al., 1983) y <http://labs.fhcrc.org/hahn/>). Ante el fracaso de la estrategia anterior, se prepararon extractos totales de *T. vaginalis* (Manley et al., 1980; Manley et al., 1983) que sólo funcionaron cuando se precipitaron con sulfato de amonio para concentrarlos al 60 y 80% de saturación de sal (Lovrien y Matulis, 1997).

La mezcla base para la reacción de transcripción se compone de HEPES 25mM, KCl 60mM, MgCl<sub>2</sub> 7mM, EDTA 0.1mM, DTT 1mM, glicerol 5% y 30u de inhibidor de RNasas (Rnaguard, Amersham) (<http://labs.fhcrc.org/hahn/>). Para obtener transcritos marcados radiactivamente se utilizaron 10µCi de α-[<sup>32</sup>P]-UTP y 25µM de UTP. El resto de los NTPs (ATP, GTP y CTP) se utilizaron a una concentración final de 250µM. Después de algunas pruebas fallidas agregamos a la mezcla base de reacción creatin cinasa (2u/30µl de reacción) y fosfocreatina (10mM); esto con el fin de mantener niveles constantes de NTPs. Con esta modificación se obtuvieron transcritos, como se observa más adelante.

Como templado se utilizaron ~2 µg del rDNA 5S de *T. vaginalis* clonado en el vector Zero Blunt TOPO (Invitrogen). La región codificadora del rDNA 5S clonado se encuentra flanqueada por 97 pb de región intergénica 5' (incluyendo la región rica en AT y las secuencias reguladoras de levadura) y 95 pb de región intergénica 3' (incluyendo las corridas de Ts y la secuencia palindrómica) (Fig. 32). Probamos este templado con distintas conformaciones: el plásmido super-enrollado, el plásmido linearizado con la enzima de restricción *Hinc* II y el inserto del rDNA 5S obtenido por digestión con *Eco*RI y purificación del gel. Como se observa en el ensayo de la figura 33, la utilización de templados lineales, sea el plásmido linearizado o el inserto purificado del plásmido, resultan en mayor eficiencia de síntesis del rRNA. Debido a su fácil purificación y concentración, se decidió utilizar el plásmido linearizado para los ensayos posteriores.



**Fig. 32** Templado del rDNA 5S de *T. vaginalis* utilizado para los ensayos de transcripción in vitro. Este templado se amplificó mediante PCR con DNA genómico utilizando los oligos 5S-FA y PEX-2 (Apéndice II). El producto de 310pb se clonó en el vector TOPO y se secuenció. Se observa que la región codificadora está flanqueada por ~95pb de región intergénica de cada lado. El producto de 310pb se puede liberar mediante digestión con la enzima de restricción *Eco*RI. El plásmido se puede linearizar con el rDNA 5S relativamente centrado utilizando las enzimas *Hinc*II ó *Nco*I.

Se utilizaron ~100µg de extracto protéico por reacción. Debido a que los extractos nucleares y/o citoplásmicos no funcionaron para los ensayos de transcripción, probamos los extractos totales precipitados al 60 (ET60) y 80% (ET80) de saturación con sulfato de amonio. Se probaron ambas preparaciones de proteínas por separado, así como mezclas de las fracciones precipitadas (ver Metodología, sección XXIV). Como se observa en la Fig. 33, cuando se utilizó una mezcla con partes iguales de las fracciones ET60 y ET80 se obtuvieron transcritos de ~50 y 100nt de longitud.

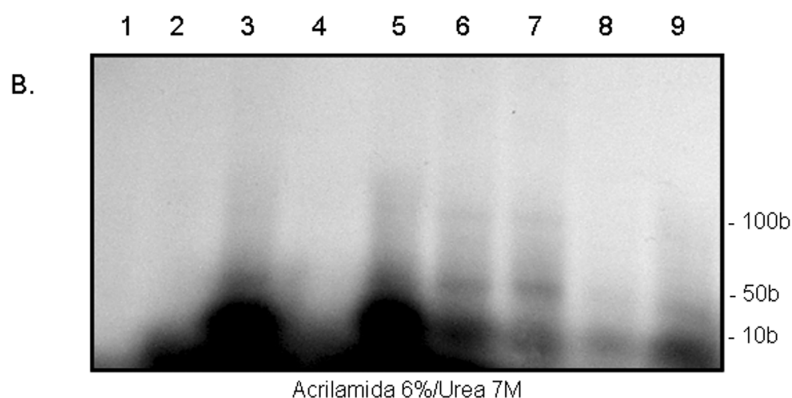
En este ensayo los transcritos obtenidos se observaban en el gel (Fig. 33), pero poco concentrados. Tratamos de optimizar el sistema utilizando UTP frío (250µM) y 15µCi de α-<sup>32</sup>P]-UTP por mezcla de reacción. También se probaron diferentes proporciones de los ET 60 y 80%. Nuevamente se obtuvieron transcritos de ~100nt de tamaño, pero como bandas mucho más definidas, adecuadas para utilizarse en los ensayos funcionales para el rDNA 5S (Fig. 34). Durante el ensayo de optimización del sistema también probamos el uso de Poly dI-dC para aumentar la concentración de DNA en los ensayos. Sin embargo, no se obtuvieron resultados

satisfactorios con este componente, por lo que se eliminó posteriormente de la mezcla de reacción.

Con base en los resultados anteriores, se propone que las condiciones óptimas de mezcla de reacción para la transcripción *in vitro* incluyen HEPES-KOH 25mM, KCl 60mM, MgCl<sub>2</sub> 7mM, EDTA 0.1mM, glicerol 5%, 2µg de DNA templado (5S TOPO linearizado con Hinc II), NTPs 250µM, 15µCi por reacción de α-[<sup>32</sup>P]-UTP, 1u/µl de reacción de inhibidor de RNasas, ~120µg de extracto total *T. vaginalis* (75% ET60 + 25% ET80), creatin cinasa 2u y fosfocreatina 0.6M (ver Metodología, sección XXIV).

A.

	Agua	B 5X	Templado	Inh Rnasa	DTT 0.1M	Extracto 60	Extracto 80	NTPs	UTP-32P	CK	Pcreatina	Total
1. control	3.4	6	x	0.3	0.3	8	8	3	1	x	x	30
2. 80-se	1.4	6	2-se	0.3	0.3	x	16	3	1	x	x	30
3. 80-se-ck	0.4	6	2-se	0.3	0.3	x	16	3	1	0.5	0.5	30
4. 60/80-se	1.4	6	2-se	0.3	0.3	8	8	3	1	x	x	30
5. 60/80-se-ck	0.4	6	2-se	0.3	0.3	8	8	3	1	0.5	0.5	30
6. 60/80-l-ck	0.4	6	2-lineal	0.3	0.3	8	8	3	1	0.5	0.5	30
7. 60/80-c-ck	0.4	6	2-corto	0.3	0.3	8	8	3	1	0.5	0.5	30
8. 60/80-se-ck1	0.4	6	2-se	0.3	0.3	8	8	3	1	0.5	0.5	30
9. 60-se-ck	0.4	6	2-se	0.3	0.3	16	x	3	1	0.5	0.5	30

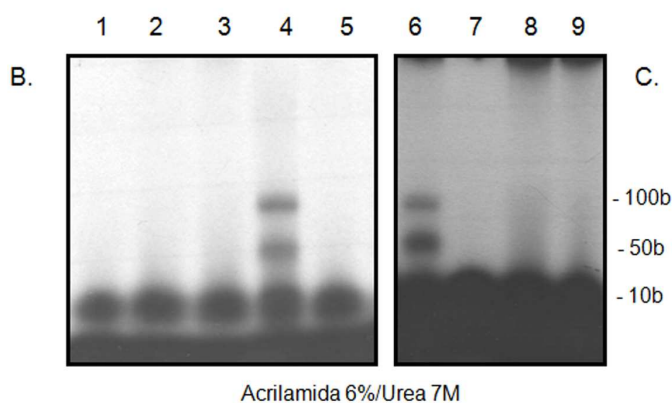


**Fig. 33** Ensayo de transcripción *in vitro* para el rDNA 5S de *T. vaginalis*. En este ensayo se probaron los extractos precipitados al 60 y 80% de saturación con sulfato de amonio, así como los templados lineales o circulares. En el panel A se muestran los componentes de cada una de las mezclas de reacción. Los números 60 y 80 corresponden a la fracción de extractos proteicos utilizados; si se hizo una mezcla mitad ET60% y mitad ET80% la reacción se llama 60/80. En el nombre de la reacción también se indica el tipo de templado utilizado: se, super-enrollado; l, lineal; ó c, corto (inserto purificado de digestión con *EcoRI*). ck indica la presencia de creatin cinasa y fosfocreatina en la mezcla de reacción. Los números dentro de la tabla indica el volumen (µl) agregado de cada uno de los componentes. Los extractos utilizados tenían una concentración de proteínas de 8.5µg/µl. El ATP, GTP y CTP se utilizaron a una concentración de 250µM, mientras que el UTP se utilizó a una concentración de 25 µM. Se agregaron 10 µCi de α-[<sup>32</sup>P]-UTP por reacción. Se utilizaron stocks de creatin cinasa 4u/µl y fosfocreatina 0.6M. La reacción de 30 µl se incubó a 30°C por 1h. Se extrajeron las proteínas con fenol-cloroformo y se precipitó el RNA con etanol 100%. **B.** Los productos de las reacciones de transcripción indicadas en el panel A se analizaron en un gel desnaturante dea acrilamida 6%. El gel se corrió a 60V 1.5h. El gel se secó en un secador de geles y se puso a exponer con placas de autorradiografía (Amersham Hyperfilm MP). El número de reacción corresponde al carril del gel. Sólo se observan transcritos de 50 y 100b cuando se utiliza la mezcla de los ET60 y 80%, con templados lineales y con creatin cinasa y fosfocreatina.

Se ha reportado que a pol III de *T. vaginalis* tiene un comportamiento inusual en comparación con la pol III de metazoarios, la cual se inhibe al 50% con 50-150 ng/μl de alfa-amanitina. En cambio, la pol III de *T. vaginalis* se inhibe con concentraciones de 30-50ng/μl de alfa-amanitina (Vanacova et al., 2001). Para verificar que el transcrito obtenido lo sintetiza la pol III agregamos 30 y 50ng/μl de alfa-amanitina a reacciones de transcripción control. El resultado fue la inhibición de la síntesis de los transcritos (Fig. 34C). Este ensayo entonces sugiere que la pol III de *T. vaginalis* está involucrada en la síntesis del rRNA 5S.

A.

	Agua	B SX	Templado	Inh Rnasa	DTT 0.1M	Extracto 60	Extracto 80	NTPs	UTP-32P	CK	Pcreatina	PdI-dC	α-amanitina	Total
1. 50/50 sin ADN	2.4	6	x	0.3	0.3	8	8	3	1	0.5	0.5	x	x	30
2. 50/50	0.4	6	1.5	0.3	0.3	8	8	3	1	0.5	0.5	0.5	x	30
3. 25/75	0.4	6	1.5	0.3	0.3	4	12	3	1	0.5	0.5	0.5	x	30
4. 75/25	0.4	6	1.5	0.3	0.3	12	4	3	1	0.5	0.5	0.5	x	30
5. 50/50	0.4	6	1.5	0.3	0.3	8	8	3	1	0.5	0.5	0.5	x	30
6. 50/50 s/pdIdC	1	6	1.5	0.3	0.3	8	8	3	1	0.5	0.5	x	x	30.1
7. 50/50 NcoI	0.4	6	1.5	0.3	0.3	8	8	3	1	0.5	0.5	0.5	x	30
8. 50/50 alfa30	x	6	1.5	0.3	0.3	8	8	3	1	0.5	0.5	x	0.9	30
9. 50/50 alfa50	x	6	1.5	0.3	0.3	8	8	3	1	0.5	0.5	x	1.5	30.6



**Fig. 34** Optimización del sistema de transcripción in vitro para el rDNA 5S de *T. vaginalis*. **A.** En este ensayo se probaron distintas proporciones de los extractos proteicos precipitados al 60 y 80% de sulfato de amonio, como se describió en el pie de de la Figura 32: 50/50: [50% ET60 + 50% ET80]; 25/75: [25% ET60 + 75% ET80]; 75/25: [75% ET60 + 25% ET 80]. Todas las reacciones incluyen NTPs 250μM y 15μCi de α-[<sup>32</sup>P]-UTP. Todas las reacciones se realizaron con el templado del rDNA 5S linearizado con *HincII*, excepto la reacción del carril 7 que incluye al mismo templado, pero linearizado con *NcoI*. En este ensayo se probó el uso de polydI-dC, por lo que todos los carriles, menos el 6, 8 y 9 lo incluyen. En el panel **B** se observa que sólo se obtuvieron transcritos con la mezcla de reacción 75/25 (carril 4). El polydI-dC parece afectar la eficiencia de transcripción, pues cuando se agregó a la mezcla de reacción que había funcionado en un principio (carril 5 y Fig. 32) no se obtuvieron transcritos. En el panel **C** se probó si la transcripción era mediada por pol III, pues esta polimerasa es sensible a concentraciones de 30-50ng/μl de α-amanitina. El carril 6 corresponde a la síntesis del RNAr 5S en condiciones óptimas (sin polydI-dC). En los carriles 8 y 9 se agregaron 30 y 50 ng/μl de α-amanitina respectivamente. Con dichas concentraciones de α-amanitina se inhibió la transcripción.

Se procedió a hacer las mutantes de algunos de los motivos regulatorios putativos utilizando el kit de mutagénesis dirigida de Stratagene (Metodología, sección XXV). Las mutantes se diseñaron con base en datos publicados para el rRNA 5S de levadura, en donde ciertas mutaciones resultaban en la pérdida de la actividad transcripcional del promotor (Lee et al.,



1995; Smith et al., 2001). Se mutaron la caja A, la caja C, las cajas A y C juntas, la corrida de Ts y la secuencia palindrómica, como se indica en la Tabla 12. Se procedió a probar los templados de las mutantes en los ensayos de transcripción *in vitro* ya montados. Lamentablemente tuvimos problemas para reproducir los ensayos previos.

Mutagénesis dirigida de motivos regulatorios putativos		
Motivo	Secuencia original	Secuencia mutada
Caja A	AATTAAGCAGTCGCG	AATGACTCATTCGAG
Caja C	TGGGCTGGGCGACTTCCCG	TGGGACGTCGTGCTTCCCG
Corrida de Ts	TTTTTCCTTTTT	TGTGTCCTGTGT
Palíndromo	GGTGCAGGGCTATTGCCCTGCACC	GGTGCAGGGCTATTCACATTCAA

**Tabla 12** Mutagénesis de motivos regulatorios putativos en el rDNA 5S de *T. vaginalis*. Se muestran en negrita los nucleótidos modificados mediante mutagénesis dirigida.

Justo después de que se obtuvieron los ensayos optimizados para la transcripción, GE Healthcare, nuestro proveedor de  $\alpha$ -[<sup>32</sup>P]-UTP, dejó de producir nucleótidos marcados radiactivamente. Entonces tuvimos que cambiar de proveedor a Izotop y más tarde a Perkin Elmer. Los ensayos de transcripción realizados con la marca radiactiva Izotop no presentaron transcritos. Cuando cambiamos a la marca radiactiva Perkin Elmer tampoco se obtuvieron los resultados esperados.

Pensando que las marcas radiactivas utilizadas estaban inhibiendo la reacción se probó la utilización de menor cantidad de marca radiactiva por reacción. También se probó la utilización de [<sup>35</sup>S]-UTP en vez de [<sup>32</sup>P]-UTP. No se obtuvieron transcritos claros con ninguna de las dos alternativas.

Continuando con la hipótesis de que la marca radiactiva utilizada está inhibiendo la reacción de transcripción queda como perspectiva probar la presencia de transcritos en los ensayos de transcripción *in vitro* con ensayos de “primer extension”. Para esto se haría la transcripción *in vitro* con UTP frío. Después se identificaría la presencia del transcrito rRNA 5S mediante ensayos de “primer extension”. El único problema es que el rRNA 5S endógeno (presente en los extractos totales de *T. vaginalis*) podría ser reconocido por el oligonucleótido específico del rRNA 5S utilizado en ensayo de “primer extension”. Para resolver dicho problema se debe de generar un templado del rRNA 5S de *T. vaginalis* distinguible del rRNA 5S endógeno. Para esto se reemplazarían algunos nucleótidos (localizados fuera de los motivos reguladores putativos) en el rDNA 5S templado, lo que generaría un rDNA 5S con una especie de “tag”. Un oligonucleótido que sólo reconociera al rRNA 5S sintetizado a partir del templado con “tag” permitiría analizar los transcritos generados *in vitro* mediante “primer extension”.

## Discusión

Los ensayos funcionales para el rDNA 5S de *T. vaginalis* resultaron complicados. Para comenzar no se pudieron obtener retardos claros con sondas de motivos y del gen completo del rDNA 5S de *T. vaginalis*. Estos ensayos se descartaron por la obtención de resultados positivos en la transcripción *in vitro*. Sin embargo, quedaron pruebas por hacer como es el entrecruzamiento de las interacciones DNA-proteína

Desconocemos la razón por la que obtuvimos resultados negativos en los ensayos de retardo, pero suponemos que se debe a que no logramos obtener condiciones idóneas de interacción del rDNA 5S con sus proteínas reguladoras. Por otro lado, con los resultados positivos preliminares de la transcripción *in vitro*, se puede suponer que existe interacción de proteínas con el rDNA 5S para promover la síntesis del rRNA 5S.

Los primeros ensayos de transcripción, en donde se obtuvieron transcritos a partir de un único templado que es el rDNA 5S, podemos sugerir que este gen es funcional y capaz de promover la síntesis de una moléculas de RNA *in vitro*. Ya que la síntesis es sensible a concentraciones de 30-50ng/ $\mu$ l de alfa-amanitina, se sugiere que la síntesis de la molécula de RNA proveniente del templado del rDNA 5S es dependiente de RNA polimerasa III.

Los problemas metodológicos que enfrentamos durante el trabajo con la transcripción *in vitro* con extractos totales de *T. vaginalis* confirma las sospechas iniciales en cuanto a la dificultad para obtener un protocolo de transcripción funcional y reproducible. En este trabajo también nos enfrentamos el cambio forzoso del nucleótido marcado radiactivamente. Ante la posible inhibición de la transcripción *in vitro* por algún compuesto presente en la marca radiactiva proponemos la realización de los ensayos de transcripción utilizando un templado del rDNA 5S que incluya un “tag”. El transcrito generado a partir de dicho templado será reconocido por un oligonucleótido específico que permita evaluar los ensayos de transcripción mediante “primer-extension”.

## Consideraciones Finales

- La organización del rDNA y del rDNA 5S en microorganismos eucariontes difiere de la organización “típica” (descrita en vertebrados) y muestra gran variabilidad entre microorganismos eucariontes.
- La variabilidad en la organización de los genes de RNA ribosomal en microbios eucariontes sugiere la presencia de mecanismos regulatorios especie-específicos y/o divergentes, adecuados a la fisiología de cada organismo.
- Algunas características sobre la organización y estructura del rDNA podrían dar datos sobre la evolución de microorganismos eucariontes.
- La organización genómica de los genes de RNA ribosomal debe de considerarse como uno de los mecanismos implicados en la regulación de la expresión de estos genes; esto es, dentro de una compleja red de regulación que incluye mecanismos epigenéticos, transcripcionales, post-transcripcionales y estructurales.
  
- *T. vaginalis* tiene al menos dos tipos de rDNA 5S (Tipo A-Tv y Tipo B-Tv) que difieren en la secuencia de la región intergénica.
- La región intergénica del rDNA 5S de *T. vaginalis* incluye una secuencia palindrómica con variaciones en secuencia entre distintas copias del gen, lo que podría estar implicado en la regulación de la expresión de las unidades de rDNA 5S.
  
- *T. tenax* tiene al menos dos tipos de rDNA 5S (Tipo A-Ttx y Tipo B-Ttx) que difieren en secuencia en la región codificadora y en la región intergénica.
- Las diferencias de secuencia en la región codificadora del rDNA 5S de *T. tenax* podrían tener implicaciones en la regulación transcripcional y en la estructura tridimensional de las moléculas de rRNA.
- La región intergénica del rDNA 5S Tipo B-Ttx difiere de la Tipo A-Ttx por la presencia de una secuencia palindrómica de función desconocida.
  
- *T. foetus* tiene al menos dos tipos de rDNA 5S (Tipo A-Tf y Tipo B-Tf) que difieren en la secuencia de la región intergénica.
- La región intergénica del rDNA 5S Tipo A-Tf se caracteriza por la presencia de un gen de ubiquitina que incluye los elementos reguladores típicos para pol II.
- La región intergénica del rDNA 5S Tipo B-Tf se caracteriza por la presencia de tres tipos de secuencias repetidas, sin función asignada.

- Los genes del rDNA 5S de Trichomonádidos son muy parecidos en secuencia en la región codificadora, pero difieren en la secuencia de la región intergénica, lo que sugiere una rápida evolución en estas regiones.
- Los genes del rDNA 5S de los tres Trichomonádidos estudiados contienen las secuencias putativas del promotor interno a la región codificadora para pol III y también a la región reguladora río arriba del sitio de inicio de la transcripción.
- La conservación de las secuencias probables de regulación localizadas río arriba del +1 del rDNA 5S sugieren un papel regulatorio de esta región en la expresión del rDNA 5S de Trichomonádidos.
  
- La secuencia del rDNA 5S de *T. vaginalis* tiene capacidad promotora, pues funcionó en ensayos de transcripción in vitro bajo condiciones metodológicas muy estrictas.
- La síntesis del transcrito obtenido en los ensayos de transcripción in vitro se inhibe con concentraciones de 30 y 50ng/μl de alfa-amanitina, lo que sugiere que la RNA polimerasa III de *T. vaginalis* es la encargada de sintetizar el rRNA 5S.

## Metodología

- I. Cultivo de *Trichomonas vaginalis*
- II. Cultivo de *Tritrichomonas foetus*
- III. Congelación y descongelación de cultivos de Trichomonádidos
- IV. Extracción de RNA total de Trichomonádidos
- V. Purificación de las bandas del rRNA
- VI. Geles nativos de acrilamida
- VII. Extracción de DNA enómico de *Trichomonas vaginalis*
- VIII. Extracción de plásmidos (Mini-preps)
- IX. Análisis de DNA en geles de agarosa
- X. *Southern blot*
- XI. Purificación de insertos de DNA
- XII. Obtención de sondas marcadas radiactivamente
- XIII. RT-PCR y PCR
- XIV. Conación con el kit Zero Blunt TOPO PCR cloning kit (Invitrogen)
- XV. *Slot blot* para cuantificar el número de copias de los genes
- XVI. Obtención de estructuras secundarias putativas con el programa mfold de Zuker
- XVII. Marcaje de sodas fluorescentes para FISH
- XVIII. Preparación de especímenes citogenéticos para FISH
- XIX. Hibridación FISH, lavados y microscopía
- XX. Obtención de mini-extractos nucleares de *T. vaginalis*
- XXI. Obtención de extractos nucleares y citoplásmicos de *T. vaginalis*
- XXII. Geles de retardo (EMSA)
- XXIII. Obtención de extractos totales de *T. vaginalis*
- XXIV. Transcripción *in vitro*
- XXV. Mutagénesis dirigida utilizando el kit “Quick change site directed mutagenesis kit” de Stratagene
- XXVI. Soluciones más utilizadas

### I. Cultivo de *Trichomonas vaginalis*

1. *Trichomonas vaginalis* se cultiva en medio Tym con suero de caballo al 10%.
2. Se cultiva en tubos de ensayo de 15ml 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 se encuentren en fase logarítmica.
3. Los tubos se colocan inclinados en una gradilla (37° C) para que las células puedan adherirse a la pared del tubo.

### II. Cultivo de *Tritrichomonas foetus*

1. Se cultiva de igual forma que *T. vaginalis* pero en tubos de 8ml con 5ml de medio Tym, 0.5ml de suero de caballo y diluciones de células de 0.1 a 0.7ml.

### III. Congelación y descongelación de cultivos de Trichomonádidos

1. Se colocan 900µl de cultivo de *T. vaginalis* o *T. foetus* y 100µl de DMSO concentrado en un tubo de 1.5ml. Este tubo se coloca a 4°C 20 minutos y luego se transfiere al ultracongelador. Se recomienda congelar 5-10 tubos.

2. Para descongelar los cultivos se colocan a 37°C durante 2 minutos, después se centrifugan a 1500 xg 3 minutos. Se retira el sobrenadante y las células se resuspenden en 1.2ml de suero de caballo. Se transfieren a un tubo con 6ml de medio Tym tibio y se incuban a 37°C por uno o dos días hasta que se observe un tapete celular.

#### IV. Extracción de RNA Total de Trichomonádidos

1. Se utilizan ~13 x10<sup>6</sup> células *Trichomonas vaginalis* (~7 ml de cultivo).
2. Se bajan las células por centrifugación (1500 x g 10 minutos a 4°C) y se lavan con 1 ml de PBS/DEPC. Se desecha la solución de lavado y el botón de células se resuspende en el volumen restante de PBS.
3. Se agrega 1ml de Trizol<sup>®</sup> Reagent (Gibco BRL Life Technologies) y se lisan las células por pipeteo repetitivo.
4. La muestra se incuba 5 minutos a temperatura ambiente para disociar completamente los complejos núcleo-proteicos. Posteriormente se agregan 0.2ml de cloroformo. Se mezcla por inversión durante 15 segundos.
5. Se centrifuga a 14000 rpm 15 minutos a 4° C.
6. Se recupera la fase acuosa y 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 lava el botón agregado y retirando rápidamente 1 ml de etanol 75%/DEPC.
9. Se deja secar el botón de RNA y se disuelve en 10µl de agua DEPC.
10. El RNA total purificado se almacena a -70° C.
11. La integridad del RNA total purificado se revisa en un gel de agarosa 0.8%/TBE DEPC a 80V ~1h. Se carga 1µl de muestra + 2µl de buffer de carga de RNA 6X + 4µl 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 trans-iluminador.

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.

#### V. Purificación de las bandas de rRNA

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 pre-corre desde 30 minutos hasta toda la noche a 20 V.
3. Se carga una extracción de RNA (~10µl) + 20 µl 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 trans-iluminador (cubierto con plástico auto-adherible nuevo) a potencia muy baja para cortar las bandas correspondientes a 160 y 120b.
5. Cada una de las bandas se divide en dos y se coloca en 2 tubos de 1.5 ml con 400 µl de buffer de elusión (SDS 0.3%, NaCl 0.14M y 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 200µl de agua DEPC + 20 µl de acetato de sodio + 500µl de alcohol absoluto. Se precipita 1 hora a -70° C.
9. Se centrifuga a 14000rpm, 15 minutos a 4° C. Se retira el sobrenadante y el botón se resuspende en 10µl de agua DEPC.
10. La integridad y pureza de las moléculas se revisa en un gel de acrilamida 4%/Urea 7M por 2h a 60V.

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 de RNA en µg/ml. La tasa de absorbancia a 260/280 corresponde a la pureza de la muestra. La máxima pureza tiene un valor cercano a 1.8 = OD 260/280 cuando la muestra se encuentra en agua DEPC.

#### VI. 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% (fresco) 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 mezcla 1:1 con la muestra.
5. Para separar conformaciones de rRNA, las muestras deben de ser purificadas de geles desnaturalizantes. La electroforesis se realiza a 15V por 32 horas.

#### VII. Extracción de DNA genómico de *Trichomonas vaginalis*

1. Se utiliza un cultivo de 50 ml de fase logarítmica de *T. vaginalis* ( $1.5-2.5 \times 10^6$  cel/ml)
2. El cultivo se divide en 2 tubos de 50ml (con 25ml), se centrifugan a 3000 rpm 10 minutos y se retira el sobrenadante. El botón se resuspende y se 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 y el botón se resuspende en el PBS restante.
5. Se agregan 300 µl de buffer de extracción (SDS 2%, NaCl 100mM, EDTA 100 mM y Tris 10mM) + 300 µl de Fenol. Se agita 30 segundos en el vortex y se centrifuga a 14000 rpm 3 minutos
6. Se recupera la fase superior y se agregan 300µl de Fenol + 300µl de cloroformo, se agita y centrifuga igual que en el paso anterior.
7. La fase superior se mezcla con 500µl de cloroformo, se agita y centrifuga.
8. La fase superior se precipita con 1 ml de alcohol 100% + 40 µl 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 µl de TE con 0.5µl de RNAsa 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).

### VIII. Extracción de plásmidos (Mini-preps)

1. Se crece un cultivo o/n de la clona deseada a 37° C en agitación. Se usan 40ml de LB + 40µl de ampicilina (100mg/ml). Las células para el cultivo se tomaron directamente del glicerol de dicha clona.
2. También se pueden poner o/n de 5ml de clonas picadas (palillos estériles). Si la resistencia es a kanamicina se prepara a 50mg/ml y se usa igual que la ampicilina: 1:1000.
3. Para preparar gliceroles se usan tubos estériles de 1.5ml con 250µl de Glicerol al 50% estéril y 750µl del cultivo correspondiente. Se incuban 20 minutos en hielo y luego se pasan al ultra-congelador.
4. Se usan 3ml por mini-prep.
5. Se colocan 1.5ml de cultivo por tubo, y se centrifugan a 12000rpm 30 segundos. Se retira el sobrenadante y se agregan otros 1.5ml de cultivo por tubo.
6. Se centrifuga a 12000 rpm 30 segundos y se retira el sobrenadante. El agita ligeramente el botón para suavizarlo
7. Se resuspende el botón en 100µl de solución I fría por agitación vigorosa.
8. Se agregan 200µl de solución II recién preparada. Se mezcla el contenido por inversión de los tubos y se almacena en hielo.
9. Se agregan 150µl de solución III fría, y se agita ligeramente por 10 segundos.
10. Se almacena en hielo por 5 minutos.
11. Se centrifuga a 12000 rpm, 5 minutos. El sobrenadante se extrae y se precipita usando un volumen inicial de 400µl (1ml).
12. Después de la precipitación el botón de DNA plasmídico se disuelve en 50µl de TE con RNasa pancreática (20µg/ml) por 20 minutos a 37°C.
13. Se agita brevemente y se almacena a -20°C.
14. Se revisan 2µl del Mini-prep + 2µl de buffer muestra TAE 5X, en un gel de agarosa 0.8% a 80V por 1 hora.

### IX. 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  $\lambda$ -HindIII.
4. Las muestras se preparan 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 trans-iluminador para tomar la foto.

### X. Southern blot

1. Se digieren 20µg de DNA genómico de *Trichomonas vaginalis*: Esta reacción se prepara en un tubo de 1.5ml en el siguiente orden: 115µl de agua estéril + 25µl de buffer de reacción 10X (# 3 para *EcoRI*) + 100µl de DNA genómico (200 ng/µl) + 10µl de la enzima de restricción *EcoRI* (ó la enzima deseada). Los 250µl totales se incuban a 37°C o/n. Al otro día se agregan otros 10µl de *EcoRI* y se incuba por 3 horas más a 37° C.
2. Se digirió 1µg de plásmido p921: 7µl de agua estéril + 12µl de buffer de reacción 10X (#3) + 100µl de plásmido p921(10ng/µl) + 1µl de *EcoRI*. Los 120µl totales de la reacción se digirieron a 37° C o/n.



3. El DNA genómico y el plásmido 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 10µl de TE; el genómico en 20µl.
4. Se determina la concentración de las muestras mediante absorbancia a 260nm.
5. Se carga el DNA genómico (0.1-3ug) y el plásmido (0.1-3ng) en un gel de agarosa 0.8%(TAE 1X)
6. El gel se corre a 80V por 3.5 horas. Se tiñe con Bromuro de etidio por 20 minutos, se destiñe en agua destilada 10 minutos y se le toma la foto.
7. Se incuba en HCl 0.25N durante 7 minutos (dos veces).
8. Posteriormente, el gel se incuba en solución desnaturizante (43.83g de NaCl + 25 ml de NaOH 10N en 500 ml de volumen final) durante 15 minutos (dos veces).
9. Finalmente se incuba 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.
10. 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.
11. La transferencia se deja o/n.
12. 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 µJ.
13. La membrana se pone a pre-hibridar en solución de hibridación sin sonda por 2 horas a 42° C, posteriormente se hibrida con la solución de hibridación + la sonda y se deja hibridando 2 Cot<sup>1/2</sup> a 42° C.
  - Cálculo del Cot<sup>1/2</sup> = 2 (1/X)(Y/5)(Z/10); donde X es el peso de la sonda en µg; Y es el tamaño de la sonda en Kb, y Z es el volumen de hibridación.
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.

#### XI. Purificación de insertos de DNA

1. Después de la digestión del plásmido correspondiente (~80µg/~5MP), se extrae el DNA.
2. Se corre en un gel preparativo (agarosa 0.8%) 1h a 80V. Se corta la banda deseada y se siguen las instrucciones del kit “Matrix gel extraction system – Marligen biosciencie”. Si el inserto es pequeño (menos de 0.5kb) se puede usar agarosa de bajo punto de fusión (LMP).

## XII. Obtención de sondas marcadas radiactivamente

1. Se utilizan 50 ng del inserto purificado para hacer la sonda.
2. Se utiliza el kit de marcaje “Rediprime II Random Primer Labelling system – Amersham biosciences”
3. 50ng del inserto purificado se mezclaron con agua estéril a un volumen final de 45µl.
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 2µl de  $\alpha$ -<sup>32</sup>P-dCTP (*Redivue deoxycytidine 5'-( $\alpha$ <sup>32</sup>P) triphosphate triethylammonium salt*) y se mezcla por pipeteo.
5. La reacción se incuba a 37°C 15 minutos (si el kit está viejo se utilizan hasta 2 horas de marcaje)
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 tapanla) y Sephadex G-50 (TE) hasta llenarla.
  - b) Se centrifuga en tubos de ensaye a 3000 rpm 2 minutos para eliminar el buffer TE (Sorvall, rotor HB4)
7. Una vez terminada la incubación 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. De forma alternativa se puede precipitar la sonda con alcohol absoluto (2.5 vol) y acetato de sodio 3M (1/10) durante 2h a -20°C. Se utiliza glicógeno como acarreador.
9. Para desnaturalizar la sonda se agregan 10µl de NaOH 3N y se incuba 5 minutos a temperatura ambiente.
10. Se transfiere a hielo y se agregan 10µl de HCl 3N
11. 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.

## XIII. RT-PCR y PCR

1. Para sintetizar la primera cadena de DNA, en un tubo de 0.5ml se colocan 10ng de RNA purificado + 100ng del oligonucleotido reversa (0.5µl de una concentración de 200ng/µl) + 1µl de dNTPs 10mM + 3.6µl de agua DEPC.
2. Los 6µl totales se incuban 10 minutos a 70° C y luego se transfieren a hielo.
3. Mientras tanto, se prepara en un tubo de PCR de 0.5ml: 1µl de agua DEPC + 2µl de buffer 5X de cDNA + 0.5µl DTT 0.1M. Este tubo se coloca en el termociclador a 42°C, luego se agrega el volumen del primer tubo + 0.5µl de la transcriptasa reversa resistente a alta temperatura (TermoScript Reverse Transcriptase, Invitrogen). Esta mezcla se mantiene a 42°C otros 5 minutos.
4. 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 1µl de RNasa H/RNasa A (kit)), 8) 30' a 37° C, 9) 20h a 4° C.
5. Al día siguiente se realizó la reacción de PCR: En un tubo de PCR se ensamblan por orden: 30µl (vol final) de agua estéril de PCR + 5µl de buffer 10X de PCR + 6µl de cloruro de magnesio 25mM (3mM) + 3µl de dNTPs 10mM + 3µl del oligonucleótido Forward (200ng/µl) + 3µl del oligonucleótido Reverse (200ng/µl) + 2µl de la primera cadena.
6. Si es un PCR genómico se utilizan 0.5ul de DNA genómico que son ~150ng de DNA.
7. Luego se agregan 100µl de aceite mineral. El tubo se coloca en el termociclador con el siguiente programa: 1) 10' a 92° C (al minuto 5 se agrega la Taq polimerasa), 2) 1' a 92° C, 3) 1' a 42° C (la temperatura de alineación depende de los oligos utilizados), 4) 3' a 72° C, 5) Repetir 30 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 200µl de cloroformo. Se revisan 5µl en un gel de agarosa 0.8-2% -TAE.

#### XIV. Clonación con el kit Zero Blunt TOPO PCR cloning kit (Invitrogen)

1. Ligación: En un tubo de 0.5ml estéril se colocan 2µl de la reacción de PCR a clonar, 0.5ml de la solución de sal 1:4 y 0.5ml del vector PCR-II blunt TOPO.
2. Esta reacción se incuba 15 minutos a temperatura ambiente y luego se pasa a hielo.
3. Se descongela el medio SOC a temperatura ambiente y un tubo de células electrocompetentes del kit (*E. coli*) en hielo.
4. Se colocan las celdas de electroporación y la base de electroporación llena de agua bidestilada en hielo.
5. Se prepara el electroporador (*Gibco BRL Electroporation apparatus*) en *medium* y se carga.
6. Se agregan 2µl de la reacción de ligación a un vial de células electrocompetentes, se mezcla suavemente y se transfieren las células al chupón de la celda. Se cierra bien y se coloca en el recipiente de electroporación. Se aplica la descarga (trigger) de 2.46 keV.
7. Se agregan inmediatamente 250µl de medio SOC y se transfieren a un tubo falcon de 15ml. Se incuban en agitación 1h a 37°C.
8. Se platan 30µl + 70µl de medio SOC (1/10) y 9/10 de las células en dos caja de LB-Kanamicina pre-calentadas. Se incuban a 37°C o/n.
9. Al día siguiente se pican las colonias y se hacen minipreps.
10. Se digieren con *EcoRI* para ver si se obtuvo el inserto esperado.

#### XV. Slot blot para cuantificar el número de copias de los genes.

1. Las muestras de DNA deben de encontrarse a una concentración final de 0.4M de NaOH y 10mM de EDTA. El volumen final de las muestras debe de ser de 250µl.
2. Se utiliza 10µl de NaOH 10M y 5µl de EDTA 0.5M por reacción.
3. Se preparan muestras de DNA genómico en cantidades decrecientes de 1.5µg a 0.1µg.
4. Por otro lado se preparan muestras del DNA control, en este caso de PCR genómico del rDNA 5S extraído, con cantidades decrecientes de 3.2ng a 0.2ng.
5. Todas las muestras se calientan a 100°C 10 minutos, se colocan en hielo y se bajan por centrifugación.
6. Se humedece la membrana de nylon del tamaño del molde con agua destilada, al igual que el papel Watmman.
7. Se ensambla el aparato de microfiltración con la membrana y el Watmman pre-humedecidos
8. Se lavan los pozos con 500ul de agua y se aplica vacío hasta que los pozos estén vacíos, más no secos.
9. Se apaga el vacío y se cargan las muestras.
10. Se prende el vacío hasta que los pozos estén secos. Si algún pozo se atora es por la presencia de burbujas que habrá que sacar. Por eso es necesario agregar lentamente la muestra y por las orillas del pozo.
11. Se lavan los pozos con 0.5ml de NaOH 0.4M y se aplica vacío hasta que se sequen.
12. Se desensambla el aparato sin desconectar el vacío y se remueve la membrana.
13. Se lava la membrana con 2X SSC y se deja secar 1h.
14. Se entrecruza el DNA con luz uv 12000µJ y se pone a prehibridar normalmente.
15. La sonda utilizada es igual al DNA control, que en este caso era el PCR genómico del rDNA 5S extraído.

#### XVI. Obtención de estructuras secundarias putativas con el programa mfold de Zuker.

1. Ingresar a la página de internet mfold: <http://mfold.bioinfo.rpi.edu/> y entrar al servidor de doblamiento de RNA.
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 rRNA 5S) en formato lineal.
3. En el punto *constraint information* se pueden forzar apareamientos, o bien, prevenir algunos. Los apareamientos forzados del rRNA 5S primero se diseñaron a mano con base en los apareamientos “universales” reportados.
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 en la secuencia que formará un 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 rRNA 5S fueron: F 23 53 2; P 9 0 4; 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. El resto de los parámetros del programa se mantienen y se oprime el botón “Fold RNA”.
9. En el *Output* se elige la figura en formato JPEG de alta resolución y se almacena.

#### XVII. Marcaje de sondas fluorescentes para FISH

1. Se utiliza el kit de *Nick translation* de Invitrogen. Para esto se colocan los siguientes componentes en un tubo de 0.6ml en hielo: 5µl del mix dNTPs sin dCTP + 1 µg del inserto purificado + 1µl de dCTP-Cy3 + agua a 45 µl de volumen final.
2. Se agregan 5 µl de la mezcla pol I/Dnasa I del kit, se mezcla bien. Se incuba a 15°C por 1 hora y se pasa a hielo.
3. Se agregan 5 µl del buffer stop del kit + 2µl de DNA de esperma de salmón (acarreador) + 5 µl de acetato de sodio 3M y 150 µl de etanol absoluto. Se deja precipitando toda la noche.
4. Centrifugar a 14000rpm 30 minutos a 4°C. Lavar el botón con etanol 70%. Y permitir el secado completo del botón.
5. Resuspender en 10ul de agua miliQ estéril (La sonda queda a ~100ng/µl). Si no se disuelve se puede incubar a 37°C 20', agitando de vez en cuando en el vortex.
6. Almacenar a -20°C hasta su uso.
7. Antes de usar la sonda, diluirla 1:10 en solución de hibridación para que quede a 10ng/µl para cada laminilla: 2µl de sonda + 20µl de solución de hibridación para cada laminilla.
8. Desnaturalizar la sonda a 75°C 5'. Después pasar a hielo al menos 2' y agregar a las laminillas tratadas para FISH.

#### XVIII. Preparación de especímenes citogenéticos para FISH

1. Envejecer las laminillas al menos 3 días en el congelador (-20°C). Dentro de una caja oscura que a su vez está dentro de una bolsa re-sellable llena de nitrógeno (gas).
2. Colocar las laminillas en paraformaldehído 1% (en SSC 2X) (4°C; coplin jar en hielo) por 30 segundos [40ml: 0.4g paraformaldehído + 4ml SSC 20X + ~120µl NaOH 1M en 40ml de agua; se requiere calentar a <65°C para disolver]

3. Enjuagar inmediatamente en 2X SSC por 30 segundos dos veces (temperatura ambiente).
4. Secar las laminillas por 5' minutos inclinadas y paradas, que queden sin gotas.
5. Tratamiento con RNasa: (100µl/laminilla): Incubar 1h a 37°C en cámara húmeda con RNasa 10µg/ml en 2X SSC [500µl: 1.5µl RNasa 3.3mg/ml + 50µl SSC 20X+ 448.5µl agua]
6. Hacer 3 lavados de 4 minutos en 2X SSC.
7. Preparar una solución fresca de formamida 70%/2X SSC [28ml formamida + 4ml 20XSSC + 8ml agua] y equilibrar en un baño a 75°C. Solo se desnaturalizan dos laminillas a la vez, de espaldas por 2' exactamente.
8. Colocar inmediatamente en etanol al 70% por 2 minutos a temperatura ambiente [80ml: 56ml EtOH +24ml agua; 40ml: 28ml EtOH + 12ml agua]
9. Pasar las laminillas a 85% etanol 2 minutos [40ml: 34ml EtOH + 6ml agua]
10. Pasar las laminillas a 100% etanol por 2 minutos o hasta que estén listas las sondas.
11. Dejar que se sequen las laminillas (~10 minutos).
12. Se colocan las laminillas en 5µg/ml de proteinasa K en 2X SSC pH = 7 (fresca de stock [10µl de stock 10mg/ml en 20ml de SSC 2X pH=7]) por ~13 minutos usando coplin jars de 15ml. Este paso puede o no hacerse. Si no se hace, el protocolo termina en el paso 11.
13. Lavar en 2X SSC 5 minutos.
14. Pasar la laminilla por series de deshidratación de 1 minuto en cada concentración de etanol. En este paso el alcohol 70% debe prepararse nuevo, el 85% y el 100% no. Las laminillas se pueden quedar el alcohol 100% el tiempo que sea necesario mientras se prepara la sonda.
15. Se permite el secado de las laminillas (10 minutos).

#### XIX. Hibridación FISH, lavados y microscopía.

1. Se agregan 20 µl de sonda desnaturalizada a la laminilla pre-tratada. Colocar el cubreobjetos (parafilm del tamaño de la laminilla) y encerrar el perímetro de hibridación con cemento de goma utilizando una jeringa.
2. Colocar la laminilla en una caja de hibridación ligeramente húmeda e incubar o/n a 37°C.
3. Se lavan las laminillas a temperatura ambiente con formamida 50%/2XSSC [40ml: 20ml formamida + 4ml SSC 20X + 16ml agua]. Después se lava con 2X SSC a con agitación ocasional (de preferencia constante). El lavado final es con 4X SSC a temperatura ambiente [80ml: 16ml SSC 20X+64ml agua]. Mantener las laminillas en esta solución hasta la detección.
4. La laminilla se tiñe con DAPI 1:40 [3ul DAPI +117 µl PBS] durante 1 minuto. Se usan 30ul por laminilla. Después se enjuaga con PBS pH=7.4.
5. Se monta la laminilla con Vectashield (25 µl) y se observa en el microscopio de epifluorescencia con filtros adecuados. En este caso, el Cy3 se observa con el filtro verde y el DAPI con el filtro UV.

#### XX. Obtención de mini-extractos nucleares de *T. vaginalis*

1. 10<sup>7</sup> (~5ml de cultivo logarítmico) células de *T. vaginalis* se centrifugan a 3000 rpm 5 minutos a 4°C y se lavan con 1ml de PBS.
2. Se centrifugan a 14000 rpm 15 segundos y se elimina el PBS
3. La pastilla celular se resuspende en 400µl de buffer A frío por pipeteo suave.
4. Las células se hinchan en hielo por 15 minutos.
5. Se agregan 15µl de Nonidet NP-40 10% y se agita vigorosamente por 10 segundos.
6. El homogenado se centrifuga a velocidad máxima 30 segundos.
7. La pastilla se resuspende en 50µl de Buffer C frío, y el tubo se agita a 4°C por 15 minutos en una plataforma de agitación.

8. El extracto nuclear se centrifuga 5 minutos a 8000rpm a 4°C.
9. El sobrenadante se utiliza inmediatamente (mini-extractos)
10. Se usan 2-6µg de este extracto para los geles de retardo. Se puede usar de 1-20µg.

#### XXI. Obtención de extractos nucleares y citoplásmicos de *T. vaginalis*

1. Todas las soluciones se utilizan frías. Se deben de pre-incubar las puntas, tubos, rotores y soluciones en el cuarto frío.
2. Antes de comenzar el protocolo se pre-enfrían las centrifugas y se preparan los inhibidores de proteasas para agregarlos a las soluciones.
3. De un cultivo estable de *T. vaginalis* (2 semanas de crecimiento constante, pasándolas de concentraciones de 1.5-1.7 x 10<sup>6</sup> cel/ml) se ponen 250ml de cultivo a ~0.085 x10<sup>6</sup> cel/ml, si hace calor, y con 0.15 x 10<sup>6</sup> cel/ml si hace frío (en un frasco de 250ml).
4. A partir del frasco anterior (que debe de estar entre 1.7 y 2x10<sup>6</sup> cel/ml) se ponen 2 litros de cultivo para obtener ~ 4 x 10<sup>9</sup> células: en dos frascos de 1L (inoculo igual al primer frasco).
5. Obtener 4-6 x 10<sup>9</sup> células y bajarlas en la centrifuga Sorvall con el rotor GSA a 3000rpm (1462 x g) 10 minutos a 4°C. Las células se resuspenden en PBS (40ml), y se transfieren a un tubo de 50ml.
6. Se centrifuga a 3000rpm (1500 x g) 10 minutos en la centrifuga Beckman Allegra 2IR (3400rpm en eppendorf 5804R), se lavan con 20ml PBS y se centrifugan nuevamente. Se determina el volumen celular empacado (~1.5ml).
7. Las células se resuspenden en 5 volúmenes del pellet empacado de buffer A (7.5ml, T=~9ml).
8. Las células se recolectan por centrifugación (3000 rpm 5 minutos en Beckman Allegra, 3400rpm en eppendorf) y se resuspenden en 2 volúmenes empacados de buffer A (3ml, T= ~5ml) (Volumen empacado final x3 aprox.).
9. Se incuba 5 minutos a 4°C
10. Las células se transfieren a un homogenizador de vidrio Dounce y se lisan con 14 golpes del pistón tipo A (Tight).
11. El homogenizado se centrifuga a 3000 x g (8000 rpm en microfuga de 5cm de diámetro, 4830rpm en eppendorf 5804R) 10 minutos a 4°C.
12. Extracto citoplásmico, fracción S100: El sobrenadante del paso 10 se mezcla con 0.11 volúmenes de Buffer B (~165µl) y se centrifuga a 100 000 x g 1h (en la ultracentrífuga L80 al mismo tiempo que los extractos nucleares). Posteriormente se trata como los extractos nucleares.
13. Se determina el volumen de Buffer C de alta sal que se utilizará en el siguiente paso: Volumen de Buffer C de alta sal = ((0.410M)\*(volumen celular empacado \* 4))/1.2M. En este caso serían 2.05ml de buffer C de alta sal + 3.95ml de buffer C de baja sal.
14. El botón nuclear se resuspende en: 4 volúmenes de buffer C de baja sal menos el volumen a utilizarse del buffer C de alta sal (3.95ml), y se transfiere a un mini-vaso de precipitados, el cual se pone en agitación con una mini-mosca de cruz. (T=~4.5ml)
15. Se agrega el volumen de buffer C de alta sal que se determinó en el paso 14 (2.05ml). Se agregan muy lentamente 10 volúmenes de 205µl. La viscosidad en la preparación es mala señal. Se incuba a 4°C en agitación por 30 minutos. (T=~6.5ml).
16. El extracto se centrifuga a 100 000 x g 1 h a 4°C (a 32700 rpm con el rotor SW 50.1 en la ultracentrífuga L-80 (T=~6.5ml, se dividió en cuatro tubos de ultracentrífuga con ~1.5ml c/u) y se dializa contra 1L de buffer D o/n.
19. El dializado se centrifuga a 25 000 x g 20 minutos y se descarta el precipitado. (16350 rpm en el rotro SW50.1 en la ultracentrífuga L80). Preparar hielo seco para congelar rápidamente las muestras.
20. El sobrenadante se congela en alícuotas (con hielo seco-etanol) y se almacena a -80°C.

## XXII. Geles de Retardo (EMSA)

1. Cuantificar los oligonucleótidos complementarios que se usarán como sonda por absorbancia a 260nm.
2. Una vez cuantificados los oligos marcar 2.5 pmoles de cada uno de los oligonucleótidos complementarios en media reacción con la enzima T4 de invitrogen. Seguir las instrucciones del kit.
3. Los 2 oligonucleótidos marcados radiactivamente (volumen total de la reacción) se alinean en un volumen equivalente de "annealing buffer" [20mM Tris-HCl pH=8, 100mM NaCl y 1mM EDTA) (25µl de oligos + 25µl buffer) en el termociclador con el programa para alinear oligos con Tm~80°C.

- |                         |
|-------------------------|
| 1. 95°C 5'              |
| 2. -1°C 1' (hasta 86°C) |
| 3. 85°C 15'             |
| 4. -3°C 1' (hasta 10°C) |
| 5. 4°C hold             |

4. Una vez alineados los oligos, se corren en un gel preparativo de acrilamida 8%/Urea 8%/TBE 0.25Xpre-corrído o/n. Se corre 50 minutos a 150V.
5. Se cortan las bandas correspondientes a oligonucleótidos de doble cadena y se dejan eluyendo en 400µl de buffer de elusión (15ml: 7.5ml Acetato de amonio 1M, 0.3ml Acetato de magnesio 0.5M, 30µl EDTA 0.5M, 150µl SDS)) o/n a 37°C.
6. El eluido se precipita por lo menos 1h a -20°C con 1ml de Et-OH + 40µl de Acetato de sodio 3M y 1µl de glicógeno como acarreador.
7. Se centrifuga a 14000rpm 15 minutos y el botón se resuspende en 20-40µl de agua (40µl si es nueva la radiactividad).
8. Si se utilizan fragmentos de plásmido como sondas: Se purifica el inserto del vector TOPO en donde se encuentra clonado el rDNA 5S de *T. vaginalis* (Clona 5Sag2) digerido con las enzimas SmaI-EcoRI (116pb) ó HhaI-EcoRI (80nt). Se marcan 1-20 pmoles de extremos 5' con la reacción de "exchange" de la cinasa T4, siguiendo las indicaciones del proveedor.
9. Se prepara la reacción de interacción DNA-Proteína (30µl): con el buffer de elección (que puede ser el F, el T ó el L), 0.5-3mM DTT, 0.5-2µg pdI-dC, 5-20µg extracto nuclear (y/o citoplásmico) y competidor (200X exceso molar).

### Buffer F + Zn

[ ] Final rxn	FZn 5X	1ml Buffer FZn 5X
Hepes-KOH 20mM	Hepes-KOH 100mM	Hepes-KOH 1M 100µl
KCl 50mM	KCl 250mM	KCl 1M 250µl
MgCl2 50mM	MgCl2 250mM	MgCl2 1M 250µl
Glicerol 5%	Glicerol 25%	Glicerol 250µl
ZnCl2 50µM	ZnCl2 250µM	ZnCl2 10mM 25µl
DTT 0.5mM	DTT 2.5mM	DTT 10mM 1.5µl/rxn
		Agua 125µl

### Buffer T

[ ] Final rxn	T 4X (no se puede 5X)	1ml Buffer T 4X
Tris pH=7.4 50mM	Tris pH=7.4 200mM	Tris 1M pH=7.4 200µl
KCl 50mM	KCl 200mM	KCl 1M 200µl
EDTA 1mM	EDTA 4mM	EDTA 0.5M 8µl
Glicerol 10%	Glicerol 40%	Glicerol 400
BSA 0.1mg/ml	BSA 0.4mg/ml	BSA 10mg/ml 40µl
DTT 1mM	DTT 4mM	DTT 10mM 3µl/rxn
		Agua 152µl

### Buffer L

[ ] Final rxn	L 5X	1ml L 5X
Hepes-KOH 30mM	Hepes-KOH 150mM	Hepes-KOH 1M 150µl
KCl 50mM	KCl 250mM	KCl 1M 250µl
MgCl <sub>2</sub> 7.5mM	MgCl <sub>2</sub> 37.5mM	MgCl <sub>2</sub> 1M 37.5µl
Glicerol 5%	Glicerol 25%	Glicerol 250µl
BSA 2µg	BSA 10µg	BSA 10mg/ml 1µl
ZnCl <sub>2</sub> 50µM	ZnCl <sub>2</sub> 250µM	ZnCl <sub>2</sub> 10mM 25µl
DTT 3mM	DTT 15mM	DTT 0.1M 0.9µl/rxn
		Agua 286.5µl

- Si se usa competidor, todas las reacciones se incuban sin sonda, con competidor, 15' en hielo y 15' a T. ambiente. Posteriormente se agrega la sonda (10000-20000 cpm) y se incuban de igual forma.
- Las muestras se cargan en un gel nativo de acrilamida 5%/TBE 0.25X y se corren a 150V entre 45' y una hora. La corrida del gel en el cuarto frío puede incrementar la eficiencia de las interacciones y la definición del gel.
- El gel se expone a una placa fotográfica.

### XXIII. Obtención de extractos totales de *T. vaginalis*.

#### Preparativos:

- Todo el protocolo se realiza en el cuarto frío.
- Pre-enfriar rotores (Sorvall y sw50.1) y material (PBS, 2 falcon 50ml (5ml marcados en uno), puntas de 1ml y 200ul, 2 vasos de 100ml, 4 vasos de 50ml (los vasos con una mosca), camisas de SW50.1 y sus tubos, homogenizador Dounce y NaOH 1N.
- Todo el material debe de ser tratado con Et-OH 70% y enjuagado con agua DEPC antes de esterilizarse. El homogenizador y los tubos de ultracentrífuga sólo se tratan con Et-OH y agua DEPC.
- Preparar sulfato de amonio pH=7.9 4M nuevo (15.8g en 30ml, se requiere calor para disolver). Pre-enfriar.
- El cultivo de *T. vaginalis* debe de estar en crecimiento constante, después de ~15 días de crecimiento y cultivo diario. Todo el proceso se lleva a cabo con medio Tym recién preparado y 10% de SC.
- Se comienza con un frasco con 250ml (0.1 x10<sup>6</sup> cel/ml de concentración, a partir de un cultivo a 1.8 x10<sup>6</sup> cel/ml (4 tubos aproximadamente)). El cultivo de 250ml (2.5 x10<sup>6</sup> cel/ml) se divide en dos frascos de 1L c/u con 0.085 x10<sup>6</sup> cel/ml.
- Preparar el buffer hipotónico, el buffer de lisis, el sulfato de amonio y los buffers de diálisis sin inhibidores. Pesar los inhibidores y dejarlos a -20°C listos para resuspenderse.

#### Protocolo:

- Crece de 2 litros de *T. vaginalis* a 2 - 3.5 x 10<sup>6</sup> cel/ml (4-8 x 10<sup>9</sup> cel).
- Centrifugar las células en la centrífuga Sorvall con el rotor GSA a 3000rpm (1500 x g) 10 minutos a 4°C. Colocando en cada tubo para GSA ~200 ml de cultivo. Se utilizaron dos centrifugaciones para bajar los 2 litros de células (este paso lleva alrededor de 1h).
- Las células se resuspenden en 40 ml de PBS (DEPC) y se transfieren a un tubo falcon de 50ml (las células que se quedaron en los tubos de GSA se lavan con 3ml más de PBS



- y se transfieren al falcon). Se centrifugan a 1500 x g 10 min (En la centrífuga eppendorf 5804R con el rotor F-34-6-38 a 3400rpm).
4. El botón se lava nuevamente con 10ml de PBS, se centrifuga de igual forma que en el paso anterior y se determina el volumen celular empacado (PCV). El volumen empacado es de ~2.25 ml.
  5. El botón se resuspende en 4 PCV de buffer hipotónico y se incuba en hielo por 20 minutos. En esta ocasión se utilizaron 9ml de buffer hipotónico para tener un volumen total de 11.25ml (T = 11.25ml).
  6. Se lisan las células con el homogenizador Dounce usando 20 golpes con el pistón Tight. La homogenización es lenta y suave sin hacer burbujas.
  7. Se agregan 4 PCV de buffer de lisis (9ml, T= 19.25ml). Se mezcla suavemente la suspensión y se pone a agitar lentamente, entonces se agrega 1 PCV de sulfato de amonio 4M de forma muy lenta (gotas de 11 fracciones de 200 $\mu$ l y una de 50 $\mu$ l) y se deja agitando 30 minutos (T= 21.5ml) (la concentración final de sulfato de amonio es 0.4M).
  8. El extracto se centrifuga a 45000 rpm (190 000 x g) en un rotor Beckman SW 50.1 por 3 horas. Se utilizaron las 6 camisas del rotor con 3.5ml de muestra en cada una.
  9. Se recupera el sobrenadante en falcon de 50ml y se determina su volumen (en esta ocasión fueron ~18ml). Se precipitan las proteínas agregando sulfato de amonio sólido (0.33g por ml de solución= 60% saturación (esta ocasión fueron 5.94g).
  10. Después de la solubilización del sulfato de amonio (que tardó ~25 minutos), se agrega 1N de NaOH (0.1ml/10g de sulfato de amonio sólido, esta ocasión fueron 59.4 $\mu$ l de NaOH 1N), y se agita la suspensión por 30 minutos adicionales. Este paso neutraliza la acidez del sulfato de amonio. Agitar lentamente y sin formar espuma. Pre-enfriar la centrífuga eppendorf nuevamente.
  11. Se colecta el precipitado (en falcon de 50ml) centrifugando a 10 000 x g (8800 rpm en eppendorf 5804R) 20 minutos. Se retira completamente el sobrenadante (y se almacena para precipitarse a saturación del 85% de sulfato de amonio). El botón se disuelve en 5% del volumen original del sobrenadante de alta velocidad (esta ocasión fueron 500 $\mu$ l) con buffer de resuspensión (evitar la formación de espuma). Almacenar en hielo mientras se termina la siguiente precipitación.
  12. Tratar las membranas de diálisis de 6-8kDa que se utilizarán (~8 cm c/u), hirviéndolas 5 minutos en EDTA 25mM DEPC (5.2g EDTA en 500ml agua DEPC). Lavarlas con Agua DEPC y enfriarlas en un frasco con agua DEPC, en hielo en el cuarto frío.
  13. El sobrenadante se precipita con 0.14g/ml sobrenadante (80% saturación, que en este caso fueron 2.52g), se trata con NaOH 1N (25.2 $\mu$ l) y se procesa como en el paso 11.
  14. Se dializan escalonadamente los extractos 60 y 80%, utilizando dos cambios de 100 (40ml) volúmenes del buffer de resuspensión (se comenzó la diálisis con el buffer de resuspensión 40 o 50%, después de 2h se cambió al buffer 20% y se dejó dializando toda la noche; por la mañana se cambió el buffer a 0% de sulfato de amonio y se dejó 3h más dializando). La diálisis se realizó en vasos de precipitados diferentes: para el precipitado 60% se dializó contra el buffer de resuspensión con 40% de sulfato de amonio (SA), se cambió el buffer por 20% sulfato de amonio y finalmente 0% de SA. El precipitado 80% se dializó contra 50% SA, 20% SA y 0% SA. Dejar espacio suficiente en la membrana, pues el volumen de la solución incrementa un 30-45% durante la diálisis.
  15. Se centrifuga el dializado a 10 000 x g 10 minutos para remover los materiales insolubles.
  16. Se recupera el sobrenadante y se preparan alícuotas del extracto.
  17. Revisar las proteínas en un gel de acrilamida y cuantificarlas por Bradford. Congelar rápidamente alícuotas de ~150 $\mu$ l en hielo seco-alcohol. Almacenar a -70°C.

#### XXIV. Transcripción *in vitro*

1. La concentración final de la reacción debe ser:  
25mM HEPES-KOH pH=7.9\*  
60mM KCl \*  
7mM MgCl<sub>2</sub> \*  
0.1mM EDTA\*  
1mM DTT (Preparado al momento: 2ul DTT 1M+18ul Agua = DTT 0.1M)  
5% glicerol \*  
1µg DNA templado (1-2.5ug: 5S AG2 linearizado con HincII y purificado)  
250µM ATP, GTP y CTP  
250µM UTP  
15µCi UTP-<sup>32</sup>P (1.5ul /rxn NUEVA)  
100µg de extracto total  
1µ/µl de reacción total de RNasin  
2u Creatin cinasa (Stock a 4u/µl)  
10mM Fosfocreatina (0.5µl de Fosfocreatina 0.6M)  
Opcional: α-amanitina a 1mg/ml
2. Preparar buffer 5X de transcripción para pol III: \* (1ml: 125µl HEPES 1M, 300µl KCl 1M, 35µl MgCl<sub>2</sub> 1M, 1µl EDTA 0.5M + 250µl glicerol + 289µl agua).
3. Preparar NTP mix: NTP stock A: 20µl stock ATP 10mM+ 20µl stock CTP 10mM; y NTP stock B: 20 µl stock GTP 10mM + 20µl stock UTP 10mM
4. Preparar una mezcla (Mix 1) de buffer 5X (6µl/rxn), inhibidor de RNAsas (0.3µl/rxn), DTT (0.3µl DTT 0.1M/rxn), creatin cinasa (0.5µl/rxn), fosfocreatina (0.5µl/rxn) y agua (vol mínimo) para agregar a todas las reacciones, incluso al control.
5. Se mezcla el Mix 1 con el templado (2µg), el extracto total y el agua faltante (volumen final 30µl incluyendo al Mix 2) y se incuban en hielo por 30' (para que se ensamble el complejo transcripcional en el DNA).
6. Se prepara el Mix 2: 1.5µl NTP mix A + 1.5µl NTP mix B + 1.5µl UTP <sup>32</sup>P, por cada reacción (4.5µl por reacción).
7. Se agrega el Mix 2 y se incuba a 30°C 60' en el termociclador.
8. Se para la reacción con solución de stop (270µl).
9. Se hace una extracción fenol-cloroformo, cloroformo, y precipitación con Et-OH y acetato de sodio (1-2h o/n).
10. Se centrifuga a 14000rpm 15', se remueve el sobrenadante y se deja secar el botón.
11. El botón se resuspende en buffer de carga de RNA (kit, 3µl), se calienta 1' a 90°C y se mantiene en hielo.
12. Las muestras se cargan en un gel de acrilamida 6% urea 7M y se corre a 60V 1.10h. Se carga RNA total de *T. cruzi* (5µl), se cortan esos carriles, se tiñen y se utilizan para determinar el peso molecular del RNA obtenido.
13. Se seca el gel (1h a 70°C) y se expone.

#### XXV. Mutagénesis dirigida utilizando el kit "Quik change site directed mutagenesis kit" de Stratagene.

1. Diseño de oligos:
  - a) Los dos oligos deben de alinear con la misma secuencia en cadenas contrarias del plásmido.
  - b) Deben de medir entre 25 y 45b con una Tm mayor o igual a 78°C
  - c) La mutación debe de estar a la mitad del oligo con 10-15b de secuencia correcta en ambos lados.
  - d) Debe de tener un contenido mínimo de 40% de GC y debe de terminar en 1 o más G ó C.

2. Para preparar la reacción muestra (media reacción):
  - 2.5µl de buffer de reacción 10x
  - 25ng (2.5-25ng) de templado de DNA de doble cadena
  - 63ng de oligo 1
  - 63ng de oligo 2
  - 0.5 µl de mix dNTP
  - Agua a 25µl de volumen final
3. Después se agregan 0.5µl de la DNA polimerasa Pfu turbo (2.5U/µl) y 20µl de aceite mineral.
4. Se coloca el tubo en el termociclador con el siguiente programa:
  1. 1 ciclo a 95°C 30 seg.
  2. 18 ciclos (para 5 mutaciones juntas) de:
    - 95°C 30 seg
    - 55°C 1 minuto
    - 68°C 7 minutos (3.5kb del plásmido)
5. Se coloca la reacción en hielo por 2 minutos.
6. Se agregan 0.5µl de la enzima Dpn I (10u/µl) directamente a la reacción de amplificación debajo del aceite mineral.
7. Mezclar por pipeteo e incubar 1 hora a 37°C (multiblock) para digerir el DNA parental.
8. Descongelar las células supercompetentes XL1-Blue en hielo (Si no están alicuotadas, alicuotar 25µl por tubo eppendorf pre-enfriado).
9. Transferir 0.5µl de DNA tratado con Dpn I a las células (evitar llevarse aceite mineral).
10. Mezclar la reacción con ligeros golpes e incubar en hielo 30 minutos.
11. Dar un pulso a la reacción de transformación durante 45 segundos a 42°C (multiblock) y luego colocar la reacción en hielo por 2 minutos.
12. Se agregan 0.25 ml de NZY+ broth precalentado a 42°C, e incubar las reacciones de transformación a 37°C por 1h con agitación a 225-250rpm.
13. Platear 250µl en 1 plato de agar con kanamicina (TOPO).
14. Incubar los platos a 37°C por más de 16 horas.
15. El número de colonias esperado es entre 100 y 1000.
16. Se pican de 6 a 10 colonias, se hacen minipreps y se manda secuenciar una clona.
- 17.

## XXVI. Soluciones más utilizadas

### Medio Tym

Para preparar 500ml de medio:

Bacto Triptona 10g  
 Extracto de levadura 5g  
 Maltosa 2.5g  
 L-cisteína 0.5g  
 Ácido ascórbico 0.1g  
 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.4g  
 K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.4g  
 Agua bi-destilada 450ml  
 Se ajusta el pH a 6.2 con HCl y se esteriliza a 20lb por 20 minutos.

### Medio LB líquido

Para 500ml de medio:

Peptona 5g  
NaCl 2.5g  
Extracto de levadura 2.5g  
NaOH 10M 150µl  
Tris 1M pH=8 5ml  
Se esteriliza a 20lb por 20 minutos.

### PBS (Solución de sales de fosfato)

Para 1L:  
NaCl 8g  
KCl 0.2g  
Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1.44g  
KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.2g  
Se ajusta el pH= 7.4, se afora a 1L y se esteriliza.

### Acrilamida/Bis acrilamida stock 40%

Para 30ml:

Acrilamida 11.4 g  
Bis acrilamida 0.6g  
Se lleva a 30ml con agua DEPC estéril, se agita hasta que se disuelva y se filtra.  
Se almacena a 4° C protegido de la luz.

### Acrilamida Mix 4%, 6% ó 10%

Para 50ml:

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

Aforar a 50ml, disolver y almacenar a 4° C.

### TBE 5X - DEPC

Para 200ml:

Tris Base 10.8g  
Ácido Bórico 5.48g  
EDTA 0.74g  
Se afora a 200ml con agua DEPC y se esteriliza.

### TAE 50X

Para 50ml:

Tris 121g  
Ácido acético glacial 2.85ml  
EDTA 0.5M 5ml  
Se afora a 50ml y se esteriliza.

### Buffer de carga de RNA 6X

Para 5ml:

Urea 3g  
TBE 5X 500µl  
Azul de Bromofenol  
Xilen-Cyanol  
Disolver los colorantes en 300µl de agua DEPC y mezclar con el resto de los componentes.  
Aforar a 5ml.

### Agua DEPC (Agua libre de RNAsas)

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

### TE (Solución de Tris-EDTA)

Para 100ml:

Tris 10mM : 1ml de Tris 1M  
EDTA 0.2mM : 40µl de EDTA 0.5M  
Se afora a 100ml de agua destilada y se esteriliza

### Solución de transferencia para Southern blot

Para 1L:

Ácido acético 17.4M 57.5ml  
Hidróxido de amonio 7.1M 140.8ml  
NaOH 10N 2ml  
Aforar a 1L con agua bi-destilada.

### Solución de hibridación para Southern blot

Para 30 ml:

Tris 1M 3ml  
Solución de Denhardt's 100X 1.5ml  
Formamida 15ml

SDS 10% 3ml  
SSC 20X 7.5ml

Solución I para Mini-preps

Glucosa 1M 0.5ml  
Tris 1M 0.25ml  
EDTA 0.5M 0.2ml  
Agua destilada 9.05 ml

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

NaOH 5M 0.2ml  
SDS 10% 0.5ml  
Agua 4.3ml

Solución III para Mini-preps

Acetato de potasio 5M 6ml  
Ácido acético glacial 1.15ml  
Agua destilada 2.85ml

Soluciones para mini-extractos nucleares

Buffer A 5ml

Hepes pH=7.9 10mM  
KCl 10mM  
EDTA 0.1 mM  
EGTA 0.1 mM  
DTT 1mM  
Leupeptina 10µg/ml  
TLCK 50µg/ml  
PMSF 1mM

50µl HEPES 1M 50µl KCl 1M 1µl EDTA 0.5M 1µl EGTA 0.5M 5µl DTT 1M 10.5µl Stock 4750 µg/ml 5µl Stock 50000µg/ml 50µl Stock 100mM 4.83 ml Agua
---

Buffer C 1.5ml

Hepes pH=7.9 20mM  
NaCl 0.4M  
EDTA 1 mM  
EGTA 1 mM  
DTT 1mM  
PMSF 1 mM  
Leupeptina 10µg/ml  
TLCK 50µg/ml  
PMSF 1mM

30µl HEPES 1M 120µl NaCl 5M 3µl EDTA 0.5M 3µl EGTA 0.5M 1.5µl DTT 1M 3.15µl Stock 4750 µg/ml 1.5µl Stock 50000µg/ml 15µl Stock 100mM 1.32ml Agua
--

## Soluciones para extractos nucleares

### Buffer A 50ml

HEPES-KOH 20mM pH=7.9  
KCl 10mM  
MgCl<sub>2</sub> 1.5mM  
EDTA 0.1 mM  
Nonidet P-40 0.25%  
DTT 1mM  
Leupeptina 10µg/ml  
TLCK 50µg/ml  
PMSF\* 1mM

1ml HEPES 1M  
0.5 ml KCl 1M  
75µl MgCl<sub>2</sub> 1M  
10µl EDTA 0.5M  
125 µl Nonidet P-40  
50µl DTT 1M  
105 µl Stock 4750µg/ml  
50 µl Stock 50000µg/ml  
500 µl Stock 100mM  
Vol final: 2.41ml + 47.58ml Agua

### Buffer C de baja sal (50ml)

HEPES-KOH 20mM pH=7.9  
KCl 10 mM  
MgCl<sub>2</sub> 1.5 mM  
EDTA 0.1mM  
Glicerol 20%  
DTT 1mM  
Leupeptina  
TLCK  
PMSF

1ml HEPES 1M  
0.5ml KCl 1M  
75µl MgCl<sub>2</sub> 1M  
10µl EDTA 0.5M  
10ml Glicerol  
50µl DTT 1M  
105 µl Stock 4750 µg/ml  
50 µl Stock 50000µg/ml  
500 µl Stock 100mM  
Vol final: 12.29ml + 37.71ml Agua

### Buffer C de alta sal (50ml)

HEPES-KOH 20mM pH=7.6  
KCl 1.2M  
MgCl<sub>2</sub> 1.5 mM  
EDTA 0.1mM  
Glicerol 20%  
DTT 1mM  
Leupeptina  
TLCK  
PMSF

1ml HEPES 1M  
4.47g de KCl  
75µl MgCl<sub>2</sub> 1M  
10µl EDTA 0.5M  
10ml Glicerol  
50µl DTT 1M  
105 µl Stock 4750 µg/ml  
50 µl Stock 50000µg/ml  
500 µl Stock 100mM  
Vol final: 11.79ml + ~38.2ml Agua

### Buffer D 1L

HEPES-KOH 20mM pH= 7.6  
KCl 100 mM  
MgCl<sub>2</sub> 1.5 mM  
EDTA 0.1mM  
Glicerol 20%  
DTT 1mM  
Leupeptina  
TLCK  
PMSF

20ml HEPES 1M  
100ml KCl 1M  
1.5ml MgCl<sub>2</sub> 1M  
200µl EDTA 0.5M  
200ml Glicerol  
1ml DTT 1M  
2.1ml Stock 4750µg/ml  
1ml Stock 50000µg/ml  
10 ml Stock 100mM  
Vol final: 335.8ml + 664.2 ml Agua

### Buffer B 10ml

HEPES-KOH 0.3M  
KCl 1.4M  
MgCl<sub>2</sub> 0.03M  
Leupeptina  
TLCK  
PMSF

3ml HEPES 1M 1.043g KCl 0.3ml MgCl <sub>2</sub> 1M 21µl Stock 4750µg/ml 10µl Stock 50000µg/ml 100µl Stock 100mM Vol final: ~3.43 ml + 6.5 ml Agua
---

### Inhibidores de proteasas

PMSF 100mM en Isopropanol. Almacenar a -20°C. (0.035g en 2ml de Isopropanol)  
TLCK 50mg/ml en Agua (Almacenar a -20°C) (0.01g en 200µl de Agua)  
Leupeptina 10mM en Etanol (Se almacena a -70°C) (0.0023g en 500µl).

### Soluciones para extractos totales

#### Buffer hipotónico 9ml

10mM HEPES-KOH (pH 7.9) [90ul HEPES 1M]  
1mM EDTA [18ul EDTA 0.5M]  
5mM DTT [45ul DTT 1M]  
Leupeptina 10ug/ml [19ul stock 10mM]  
TLCK 50 ug/ml (0.2mM) [12.8ul stock 50mg/ml]  
EGTA 1mM [18 ul EGTA 0.5M]  
Pefabloc 1mM [90ul stock 100mM]  
Agua DEPC [8.71ml]

#### Buffer de lisis 9ml

50mM HEPES-KOH (pH 7.9) [450ul HEPES 1M]  
10mM MgCl<sub>2</sub> [90ul MgCl<sub>2</sub> 1M]  
2mM DTT [18ul DTT 1M]  
25% sucrosa [2.25g]  
50% glicerol [4.5ml]  
Leupeptina 10ug/ml [19ul stock 10mM]  
TLCK 50 ug/ml [12.8ul stock 50mg/ml]  
Pefabloc 1mM [90ul stock 100mM]  
Agua DEPC [~2.40ml]

### Inhibidores de proteasas

1. Leupeptina 10mM: 0.0035g en 700ul agua
2. TLCK 140mM: 0.0206g en 400ul agua
3. Pefabloc 100mM: 0.065g en 2.7ml agua
4. DTT 1M: 0.1 g en 650ul agua.



### Buffer de resuspensión y diálisis

40ml x 2 (40% y 50%)

25mM HEPES-KOH (pH 7.9) [1ml HEPES 1M]  
75mM KCl =50-100= [3ml KCl 1M]  
12mM MgCl<sub>2</sub> [0.48ml MgCl<sub>2</sub> 1M]  
0.25mM EDTA =0.1-0.5mM= [20ul EDTA 0.5M]  
2.5mM DTT =1-5mM= [100ul DTT 1M]  
10% glycerol =10-20%= [4ml]  
Leupeptina 10ug/ml [84ul Stock 10mM]  
TLCK 50 ug/ml [57ul stock 50mg/ml]  
EGTA 0.2mM [16ul EGTA 0.5M]  
Pefabloc 1mM [0.4ml stock 100mM]  
Sulfato de amonio [9.6g (40%) y 12.4g (50%)]  
NaOH [96ul (40%) y 124ul (50%) NaOH 1N]  
Agua DEPC [Aforado a 40ml]

80ml x2 (0 y 20%)

2ml HEPES
6ml KCl
0.96ml MgCl
40ul EDTA
200ul DTT
8ml Glicerol
168ul Leupeptina
114ul TLCK
32ul EGTA
0.8ml Pefabloc
0 (0%) y 8.8g (20%)
0 (0%) y 88ul NAOH
Aforado a 80ml

### Solución stop transcripción *in vitro* 2ml

0.1M NaOAC (60ul NaOAC 3M)  
10mM EDTA (40ul EDTA 0.5M)  
Agua DEPC a volumen de 2ml final  
0.5% SDS (100ul SDS 10%)  
10ug/ml tRNA (2ul stock 10ug/ul)

### Buffer de hibridación FISH

250ul de formamida (50% volumen final)  
50ul 20X SSC (2x final)  
0.05g dextran sulfato (10% final)  
200ul agua

## Referencias

- Acker, J., Ozanne, C., Kachouri-Lafond, R., Gaillardin, C., Neuveglise, C., y Marck, C. (2008). Dicistronic tRNA-5S rRNA genes in *Yarrowia lipolytica*: an alternative TFIIIA-independent way for expression of 5S rRNA genes. *Nucleic Acids Res.* 36, 5832-5844.
- Adl, S.M., Simpson, A.G., Farmer, M.A., Andersen, R.A., Anderson, O.R., Barta, J.R., Bowser, S.S., Brugerolle, G., Fensome, R.A., Fredericq, S., James, T.Y., Karpov, S., Kugrens, P., Krug, J., Lane, C.E., Lewis, L.A., Lodge, J., Lynn, D.H., Mann, D.G., McCourt, R.M., Mendoza, L., Moestrup, O., Mozley-Standridge, S.E., Nerad, T.A., Shearer, C.A., Smirnov, A.V., Spiegel, F.W., y Taylor, M.F. (2005). The new higher level classification of eukaryotes with emphasis on the taxonomy of protists. *J. Eukaryot. Microbiol.* 52, 399-451.
- Alberts, Johnson, Lewis, Raff, Roberts, y Walter (2002). *Molecular Biology of the Cell*. (New York: Garland Science).
- Alderete, J.F., Kasmala, L., Metcalfe, E., y Garza, G.E. (1986). Phenotypic variation and diversity among *Trichomonas vaginalis* isolates and correlation of phenotype with trichomonal virulence determinants. *Infect. Immun.* 53, 285-293.
- Ammons, D., Rampersad, J., y Fox, G.E. (1999). 5S rRNA gene deletions cause an unexpectedly high fitness loss in *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res.* 27, 637-642.
- Bagchi, A., Bhattacharya, A., y Bhattacharya, S. (1999). Lack of a chromosomal copy of the circular rDNA plasmid of *Entamoeba histolytica*. *Int. J. Parasitol.* 29, 1775-1783.
- Berger, S., Zellmer, D.M., Kloppstech, K., Richter, G., Dillard, W.L., y Schweiger, H.G. (1978). Alternating polarity in rRNA genes. *Cell Biol. Int. Rep.* 2, 41-50.
- Brugere, J.F., Cornillot, E., Metenier, G., Bensimon, A., y Vivares, C.P. (2000). *Encephalitozoon cuniculi* (Microspora) genome: physical map and evidence for telomere-associated rDNA units on all chromosomes. *Nucleic Acids Res.* 28, 2026-2033.
- Carlton, J.M., Hirt, R.P., Silva, J.C., Delcher, A.L., Schatz, M., Zhao, Q., Wortman, J.R., Bidwell, S.L., Alsmark, U.C., Besteiro, S., Sicheritz-Ponten, T., Noel, C.J., Dacks, J.B., Foster, P.G., Simillion, C., Van de, P.Y., Miranda-Saavedra, D., Barton, G.J., Westrop, G.D., Muller, S., Dessi, D., Fiori, P.L., Ren, Q., Paulsen, I., Zhang, H., Bastida-Corcuera, F.D., Simoes-Barbosa, A., Brown, M.T., Hayes, R.D., Mukherjee, M., Okumura, C.Y., Schneider, R., Smith, A.J., Vanacova, S., Villalvazo, M., Haas, B.J., Perte, M., Feldblyum, T.V., Utterback, T.R., Shu, C.L., Osoegawa, K., de Jong, P.J., Hrdy, I., Horvathova, L., Zubacova, Z., Dolezal, P., Malik, S.B., Logsdon, J.M., Jr., Henze, K., Gupta, A., Wang, C.C., Dunne, R.L., Upcroft, J.A., Upcroft, P., White, O., Salzberg, S.L., Tang, P., Chiu, C.H., Lee, Y.S., Embley, T.M., Coombs, G.H., Mottram, J.C., Tachezy, J., Fraser-Liggett, C.M., y Johnson, P.J. (2007). Draft genome sequence of the sexually transmitted pathogen *Trichomonas vaginalis*. *Science* 315, 207-212.
- Carmo-Fonseca, M., Mendes-Soares, L., y Campos, I. (2000). To be or not to be in the nucleolus. *Nat. Cell Biol.* 2, E107-E112.
- Cavalier-Smith, T. (2002). Nucleomorphs: enslaved algal nuclei. *Curr. Opin. Microbiol.* 5, 612-619.
- Chakrabarti, D., Dame, J.B., Gutell, R.R., y Yowell, C.A. (1992). Characterization of the rDNA unit and sequence analysis of the small subunit rRNA and 5.8S rRNA genes from *Trichomonas foetus*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 52, 75-83.

Clark,C.G., Ali,I.K., Zaki,M., Loftus,B.J., y Hall,N. (2006). Unique organisation of tRNA genes in *Entamoeba histolytica*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 146, 24-29.

Clark,C.G. y Cross,G.A. (1987). rRNA genes of *Naegleria gruberi* are carried exclusively on a 14-kilobase-pair plasmid. *Mol. Cell Biol.* 7, 3027-3031.

Clark,C.G. y Diamond,L.S. (1991). Ribosomal RNA genes of 'pathogenic' and 'nonpathogenic' *Entamoeba histolytica* are distinct. *Mol. Biochem. Parasitol.* 49, 297-302.

Clark,C.G., Tague,B.W., Ware,V.C., y Gerbi,S.A. (1984). *Xenopus laevis* 28S ribosomal RNA: a secondary structure model and its evolutionary and functional implications. *Nucleic Acids Res.* 12, 6197-6220.

Conconi,A., Widmer,R.M., Koller,T., y Sogo,J.M. (1989). Two different chromatin structures coexist in ribosomal RNA genes throughout the cell cycle. *Cell* 57, 753-761.

Coss,C.A., Robledo,J.A., Ruiz,G.M., y Vasta,G.R. (2001). Description of *Perkinsus andrewsi* n. sp. isolated from the Baltic clam (*Macoma balthica*) by characterization of the ribosomal RNA locus, and development of a species-specific PCR-based diagnostic assay. *J. Eukaryot. Microbiol.* 48, 52-61.

D'Alessio,J.M., Harris,G.H., Perna,P.J., y Paule,M.R. (1981). Ribosomal ribonucleic acid repeat unit of *Acanthamoeba castellanii*: cloning and restriction endonuclease map. *Biochemistry* 20, 3822-3827.

Dacks,J.B., Walker,G., y Field,M.C. (2008). Implications of the new eukaryotic systematics for parasitologists. *Parasitol. Int.* 57, 97-104.

Dame,J.B. y McCutchan,T.F. (1983). The four ribosomal DNA units of the malaria parasite *Plasmodium berghei*. Identification, restriction map, and copy number analysis. *J. Biol. Chem.* 258, 6984-6990.

Delgadillo,M.G., Liston,D.R., Niazi,K., y Johnson,P.J. (1997). Transient and selectable transformation of the parasitic protist *Trichomonas vaginalis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 94, 4716-4720.

Dignam,J.D., Lebovitz,R.M., y Roeder,R.G. (1983). Accurate transcription initiation by RNA polymerase II in a soluble extract from isolated mammalian nuclei. *Nucleic Acids Res.* 11, 1475-1489.

Dokudovskaya,S., Dontsova,O., Shpanchenko,O., Bogdanov,A., y Brimacombe,R. (1996). Loop IV of 5S ribosomal RNA has contacts both to domain II and to domain V of the 23S RNA. *RNA.* 2, 146-152.

Dujon,B., Sherman,D., Fischer,G., Durrens,P., Casaregola,S., Lafontaine,I., De,M.J., Marck,C., Neugeglise,C., Talla,E., Goffard,N., Frangeul,L., Aigle,M., Anthouard,V., Babour,A., Barbe,V., Barnay,S., Blanchin,S., Beckerich,J.M., Beyne,E., Bleykasten,C., Boisrame,A., Boyer,J., Cattolico,L., Confanioleri,F., De,D.A., Despons,L., Fabre,E., Fairhead,C., Ferry-Dumazet,H., Groppi,A., Hantraye,F., Hennequin,C., Jauniaux,N., Joyet,P., Kachouri,R., Kerrest,A., Koszul,R., Lemaire,M., Lesur,I., Ma,L., Muller,H., Nicaud,J.M., Nikolski,M., Oztas,S., Ozier-Kalogeropoulos,O., Pellenz,S., Potier,S., Richard,G.F., Straub,M.L., Suleau,A., Swennen,D., Tekaiia,F., Wesolowski-Louvel,M., Westhof,E., Wirth,B., Zeniou-Meyer,M., Zivanovic,I., Bolotin-Fukuhara,M., Thierry,A., Bouchier,C., Caudron,B., Scarpelli,C., Gaillardin,C., Weissenbach,J., Wincker,P., y Souciet,J.L. (2004). Genome evolution in yeasts. *Nature* 430, 35-44.

- Einvik,C., Elde,M., y Johansen,S. (1998). Group I twintrons: genetic elements in myxomycete and schizopyrenid amoeboflagellate ribosomal DNAs. *J. Biotechnol.* *64*, 63-74.
- England PT y Sher A (1998). *The biology of parasitism.* (New York: Alan R. Liss, Inc.).
- Espinosa,N., Hernandez,R., Lopez-Griego,L., y Lopez-Villasenor,I. (2002). Separable putative polyadenylation and cleavage motifs in *Trichomonas vaginalis* mRNAs. *Gene* *289*, 81-86.
- Fang,J. y McCutchan,T.F. (2002). Thermoregulation in a parasite's life cycle. *Nature* *418*, 742.
- Fang,J., Sullivan,M., y McCutchan,T.F. (2004). The effects of glucose concentration on the reciprocal regulation of rRNA promoters in *Plasmodium falciparum*. *J. Biol. Chem.* *279*, 720-725.
- Garrett,R. (1999). Mechanics of the ribosome. *Nature* *400*, 811-812.
- Gray,M.W., Burger,G., y Lang,B.F. (1999). Mitochondrial evolution. *Science* *283*, 1476-1481.
- Grimaldi,G., Fiorentini,P., y Di Nocera,P.P. (1990). Spacer promoters are orientation-dependent activators of pre-rRNA transcription in *Drosophila melanogaster*. *Mol. Cell Biol.* *10*, 4667-4677.
- Grummt,I. (2003). Life on a planet of its own: regulation of RNA polymerase I transcription in the nucleolus. *Genes Dev.* *17*, 1691-1702.
- Grummt,I. y Pikaard,C.S. (2003). Epigenetic silencing of RNA polymerase I transcription. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *4*, 641-649.
- Guay,J.M., Huot,A., Gagnon,S., Tremblay,A., y Levesque,R.C. (1992). Physical and genetic mapping of cloned ribosomal DNA from *Toxoplasma gondii*: primary and secondary structure of the 5S gene. *Gene* *114*, 165-171.
- Guerreiro,P., Neves,A., y Rodrigues-Pousada,C. (1993). Clusters of 5S rRNAs in the intergenic region of ubiquitin genes in *Tetrahymena pyriformis*. *Biochim. Biophys. Acta* *1216*, 137-139.
- Haile,S. y Papadopoulou,B. (2007). Developmental regulation of gene expression in trypanosomatid parasitic protozoa. *Curr. Opin. Microbiol.* *10*, 569-577.
- Hernandez,R. y Castaneda,M. (1988). Molecular cloning and partial characterization of ribosomal RNA genes from *Trypanosoma cruzi*. *Mol. Biochem. Parasitol.* *27*, 275-279.
- Hill W.D., Dahlberg A., Garret RA, Moore P.B., Schlessinger D., y Warner J. (1990). *The ribosome: structure, function and evolution.* (Washington D.C.: American Society for Microbiology).
- Hofmann,J., Winckler,T., Hanenkamp,A., Bukenberger,M., Schumann,G., Marschalek,R., y Dingermann,T. (1993). The *Dictyostelium discoideum* 5S rDNA is organized in the same transcriptional orientation as the other rDNAs. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *191*, 558-564.
- Huang,W.F., Tsai,S.J., Lo,C.F., Soichi,Y., y Wang,C.H. (2004). The novel organization and complete sequence of the ribosomal RNA gene of *Nosema bombycis*. *Fungal. Genet. Biol.* *41*, 473-481.
- Iiyama,K., Chieda,Y., Yasunaga-Aoki,C., Hayasaka,S., y Shimizu,S. (2004). Analyses of the ribosomal DNA region in *Nosema bombycis* NIS 001. *J. Eukaryot. Microbiol.* *51*, 598-604.

- Jahn,C.L. y Klobutcher,L.A. (2002). Genome remodeling in ciliated protozoa. *Annu. Rev. Microbiol.* 56, 489-520.
- Jansson,A., Gillin,F., Kagardt,U., y Hagblom,P. (1994). Coding of hemolysins within the ribosomal RNA repeat on a plasmid in *Entamoeba histolytica*. *Science* 263, 1440-1443.
- Johansen,S.D., Haugen,P., y Nielsen,H. (2007). Expression of protein-coding genes embedded in ribosomal DNA. *Biol. Chem.* 388, 679-686.
- Johansen,S.D., Vader,A., Sjøttem,E., y Nielsen,H. (2006). In vivo expression of a group I intron HEG from the antisense strand of *Didymium* ribosomal DNA. *RNA. Biol.* 3, 157-162.
- Kats,L.M., Black,C.G., Proellocks,N.I., y Coppel,R.L. (2006). *Plasmodium* rhoptries: how things went pear-shaped. *Trends Parasitol.* 22, 269-276.
- Keeling,P.J. y Slamovits,C.H. (2004). Simplicity and complexity of microsporidian genomes. *Eukaryot. Cell* 3, 1363-1369.
- Khaitovich,P. y Mankin,A.S. (1999). Effect of antibiotics on large ribosomal subunit assembly reveals possible function of 5 S rRNA. *J. Mol. Biol.* 291, 1025-1034.
- Klabunde,J., Diesel,A., Waschke,D., Gellissen,G., Hollenberg,C.P., y Suckow,M. (2002). Single-step co-integration of multiple expressible heterologous genes into the ribosomal DNA of the methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 58, 797-805.
- Land,K.M., Delgadillo-Correa,M.G., Tachezy,J., Vanacova,S., Hsieh,C.L., Sutak,R., y Johnson,P.J. (2004). Targeted gene replacement of a ferredoxin gene in *Trichomonas vaginalis* does not lead to metronidazole resistance. *Mol. Microbiol.* 51, 115-122.
- Le Blancq,S.M., Korman,S.H., y Van der Ploeg,L.H. (1991). Frequent rearrangements of rRNA-encoding chromosomes in *Giardia lamblia*. *Nucleic Acids Res.* 19, 4405-4412.
- Lee,Y., Erkin,A.M., Van Ryk,D.I., y Nazar,R.N. (1995). In vivo analyses of the internal control region in the 5S rRNA gene from *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res.* 23, 634-640.
- Lee,Y., Wong,W.M., Guyer,D., Erkin,A.M., y Nazar,R.N. (1997). In vivo analyses of upstream promoter sequence elements in the 5 S rRNA gene from *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Mol. Biol.* 269, 676-683.
- Lehker,M.W. y Alderete,J.F. (1999). Resolution of six chromosomes of *Trichomonas vaginalis* and conservation of size and number among isolates. *J. Parasitol.* 85, 976-979.
- Lehker,M.W. y Sweeney,D. (1999). Trichomonad invasion of the mucous layer requires adhesins, mucinases, and motility. *Sex Transm. Infect.* 75, 231-238.
- Levine N.D. (1985). *Veterinary protozoology*. (Dubuque USA: Iowa State University Press).
- Lindmark,D.G. y Muller,M. (1973). Hydrogenosome, a cytoplasmic organelle of the anaerobic flagellate *Tritrichomonas foetus*, and its role in pyruvate metabolism. *J. Biol. Chem.* 248, 7724-7728.
- Liston,D.R. y Johnson,P.J. (1999). Analysis of a ubiquitous promoter element in a primitive eukaryote: early evolution of the initiator element. *Mol. Cell Biol.* 19, 2380-2388.

- Liston,D.R., Lau,A.O., Ortiz,D., Smale,S.T., y Johnson,P.J. (2001). Initiator recognition in a primitive eukaryote: IBP39, an initiator-binding protein from *Trichomonas vaginalis*. *Mol. Cell Biol.* *21*, 7872-7882.
- Liu,H., Pan,G., Song,S., Xu,J., Li,T., Deng,Y., y Zhou,Z. (2008). Multiple rDNA units distributed on all chromosomes of *Nosema bombycis*. *J. Invertebr. Pathol.* *99*, 235-238.
- Lo,A.C., Liu,W., y Nazar,R.N. (1984). Alternative conformational states in the ribosome-associated 5.8S RNA. *Eur. J. Biochem.* *141*, 549-553.
- Long,E.O. y Dawid,I.B. (1980). Repeated genes in eukaryotes. *Annu. Rev. Biochem.* *49*, 727-764.
- Lopez-Villasenor,I., Contreras,A.P., Lopez-Griego,L., Alvarez-Sanchez,E., y Hernandez,R. (2004). *Trichomonas vaginalis* ribosomal DNA: analysis of the intergenic region and mapping of the transcription start point. *Mol. Biochem. Parasitol.* *137*, 175-179.
- Lovrien RE y Matulis D (1997). Selective Precipitation of Proteins. In *Current Protocols in Protein Science*, John Wiley and Sons, Inc.), p. 4.5.1-4.6.6.
- Luna,J. y Orozco E (2004). La frontera: genética molecular de la enfermedad. Tomo I. (Mexico: IPN).
- Mack,S.R., Samuels,S., y Vanderberg,J.P. (1979). Hemolymph of *Anopheles stephensi* from noninfected and *Plasmodium berghei*-infected mosquitoes. 3. Carbohydrates. *J. Parasitol.* *65*, 217-221.
- Madison-Antenucci,S., Grams,J., y Hajduk,S.L. (2002). Editing machines: the complexities of *trypanosome* RNA editing. *Cell* *108*, 435-438.
- Mandal,R.K. (1984). The organization and transcription of eukaryotic ribosomal RNA genes. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* *31*, 115-160.
- Manley,J.L., Fire,A., Cano,A., Sharp,P.A., y Gefter,M.L. (1980). DNA-dependent transcription of adenovirus genes in a soluble whole-cell extract. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *77*, 3855-3859.
- Manley,J.L., Fire,A., Samuels,M., y Sharp,P.A. (1983). In vitro transcription: whole-cell extract. *Methods Enzymol.* *101*, 568-582.
- Martinez-Calvillo,S., Sunkin,S.M., Yan,S., Fox,M., Stuart,K., y Myler,P.J. (2001). Genomic organization and functional characterization of the *Leishmania major* Friedlin ribosomal RNA gene locus. *Mol. Biochem. Parasitol.* *116*, 147-157.
- Moreno Diaz de la Espina, Alverca,E., Cuadrado,A., y Franca,S. (2005). Organization of the genome and gene expression in a nuclear environment lacking histones and nucleosomes: the amazing dinoflagellates. *Eur. J. Cell Biol.* *84*, 137-149.
- Murphy,C., Wang,Z., Roeder,R.G., y Gall,J.G. (2002). RNA polymerase III in Cajal bodies and lampbrush chromosomes of the *Xenopus* oocyte nucleus. *Mol. Biol. Cell* *13*, 3466-3476.
- Nissen,P., Ippolito,J.A., Ban,N., Moore,P.B., y Steitz,T.A. (2001). RNA tertiary interactions in the large ribosomal subunit: the A-minor motif. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *98*, 4899-4903.
- Noble E, Noble G, Schad G, y McInnes A (1989). *Parasitology, the biology of animal parasites*. Lea and Febiger.

- Nogi,Y., Yano,R., y Nomura,M. (1991). Synthesis of large rRNAs by RNA polymerase II in mutants of *Saccharomyces cerevisiae* defective in RNA polymerase I. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 88, 3962-3966.
- Oakes,M., Nogi,Y., Clark,M.W., y Nomura,M. (1993). Structural alterations of the nucleolus in mutants of *Saccharomyces cerevisiae* defective in RNA polymerase I. *Mol. Cell Biol.* 13, 2441-2455.
- Orphanides,G. y Reinberg,D. (2002). A unified theory of gene expression. *Cell* 108, 439-451.
- Ortiz,D. y Johnson,P.J. (2003). Tetracycline-inducible gene expression in *Trichomonas vaginalis*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 128, 43-49.
- Paredes,S. y Maggert,K.A. (2009). Ribosomal DNA contributes to global chromatin regulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 106, 17829-17834.
- Paule,M.R. y White,R.J. (2000). Survey and summary: transcription by RNA polymerases I and III. *Nucleic Acids Res.* 28, 1283-1298.
- Peyretailade,E., Biderre,C., Peyret,P., Duffieux,F., Metenier,G., Gouy,M., Michot,B., y Vivares,C.P. (1998). Microsporidian *Encephalitozoon cuniculi*, a unicellular eukaryote with an unusual chromosomal dispersion of ribosomal genes and a LSU rRNA reduced to the universal core. *Nucleic Acids Res.* 26, 3513-3520.
- Pieler,T., Hamm,J., y Roeder,R.G. (1987). The 5S gene internal control region is composed of three distinct sequence elements, organized as two functional domains with variable spacing. *Cell* 48, 91-100.
- Pikaard,C.S., Pape,L.K., Henderson,S.L., Ryan,K., Paalman,M.H., Lopata,M.A., Reeder,R.H., y Sollner-Webb,B. (1990). Enhancers for RNA polymerase I in mouse ribosomal DNA. *Mol. Cell Biol.* 10, 4816-4825.
- Prescott,D.M. (2000). Genome gymnastics: unique modes of DNA evolution and processing in ciliates. *Nat. Rev. Genet.* 1, 191-198.
- Pryde,F.E., Gorham,H.C., y Louis,E.J. (1997). Chromosome ends: all the same under their caps. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 7, 822-828.
- Quon,D.V., Delgadillo,M.G., Khachi,A., Smale,S.T., y Johnson,P.J. (1994). Similarity between a ubiquitous promoter element in an ancient eukaryote and mammalian initiator elements. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 91, 4579-4583.
- Rae,D.O. y Crews,J.E. (2006). *Tritrichomonas foetus*. *Vet. Clin. North Am. Food Anim Pract.* 22, 595-611.
- Rae,P.M. y Spear,B.B. (1978). Macronuclear DNA of the hypotrichous ciliate *Oxytricha fallax*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 75, 4992-4996.
- Raue,H.A., Klootwijk,J., y Musters,W. (1988). Evolutionary conservation of structure and function of high molecular weight ribosomal RNA. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 51, 77-129.
- Roberson,A.E., Wolffe,A.P., Hauser,L.J., y Olins,D.E. (1989). The 5S RNA gene minichromosome of *Euplotes*. *Nucleic Acids Res.* 17, 4699-4712.
- Rogers,M.J., Gutell,R.R., Damberger,S.H., Li,J., McConkey,G.A., Waters,A.P., y McCutchan,T.F. (1996). Structural features of the large subunit rRNA expressed in *Plasmodium*

- falciparum* sporozoites that distinguish it from the asexually expressed subunit rRNA. *RNA*. 2, 134-145.
- Schnare,M.N., Cook,J.R., y Gray,M.W. (1990). Fourteen internal transcribed spacers in the circular ribosomal DNA of *Euglena gracilis*. *J. Mol. Biol.* 215, 85-91.
- Schramm,L. y Hernandez,N. (2002a). Recruitment of RNA polymerase III to its target promoters. *Genes Dev.* 16, 2593-2620.
- Shi,X., Chen,D.H., y Suyama,Y. (1994). A nuclear tRNA gene cluster in the protozoan *Leishmania tarentolae* and differential distribution of nuclear-encoded tRNAs between the cytosol and mitochondria. *Mol. Biochem. Parasitol.* 65, 23-37.
- Simpson,A.G. y Roger,A.J. (2004). The real 'kingdoms' of eukaryotes. *Curr. Biol.* 14, R693-R696.
- Simpson,A.G., Stevens,J.R., y Lukes,J. (2006). The evolution and diversity of kinetoplastid flagellates. *Trends Parasitol.* 22, 168-174.
- Smith,M.W., Meskauskas,A., Wang,P., Sergiev,P.V., y Dinman,J.D. (2001). Saturation mutagenesis of 5S rRNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell Biol.* 21, 8264-8275.
- Smith,S.D., Banerjee,N., y Sitz,T.O. (1984). Gene heterogeneity: a basis for alternative 5.8S rRNA processing. *Biochemistry* 23, 3648-3652.
- Sogin,M.L. (1991). Early evolution and the origin of eukaryotes. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 1, 457-463.
- Sollner-Webb,B. y Mougey,E.B. (1991). News from the nucleolus: rRNA gene expression. *Trends Biochem. Sci.* 16, 58-62.
- Spring,H., Grierson,D., Hemleben,V., Stohr,M., Krohne,G., Stadler,J., y Franke,W.W. (1978). DNA contents and numbers of nucleoli and pre-rRNA-genes in nuclei of gametes and vegetative cells of *Acetabularia mediterranea*. *Exp. Cell Res.* 114, 203-215.
- Szymanski,M., Barciszewska,M.Z., Erdmann,V.A., y Barciszewski,J. (2003). 5 S rRNA: structure and interactions. *Biochem. J.* 371, 641-651.
- Tabata,S. (1981). Nucleotide sequences of the 5S ribosomal RNA genes and their adjacent regions in *Schizosaccharomyces pombe*. *Nucleic Acids Res.* 9, 6429-6437.
- Torres-Machorro,A.L., Hernandez,R., Alderete J.F., y Lopez-Villasenor,I. (2009). Comparative analyses among the *Trichomonas vaginalis*, *Trichomonas tenax*, and *Tritrichomonas foetus* 5S ribosomal RNA genes. *Curr. Genet.* 55, 199-210.
- Torres-Machorro,A.L., Hernandez,R., Cevallos,A.M., y Lopez-Villasenor,I. (2010). Ribosomal RNA genes in eukaryotic microorganisms: witnesses of phylogeny? *FEMS Microbiol. Rev.* 34, 59-86.
- Torres-Machorro,A.L., Hernandez,R., Sanchez,J., y Lopez-Villasenor,I. (2006). The 5S ribosomal RNA gene from the early diverging protozoa *Trichomonas vaginalis*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 145, 269-273.
- Tsai,S.J., Huang,W.F., y Wang,C.H. (2005). Complete sequence and gene organization of the *Nosema spodopterae* rRNA gene. *J. Eukaryot. Microbiol.* 52, 52-54.



- Upcroft,J.A., Healey,A., Mitchell,R., Boreham,P.F., y Upcroft,P. (1990). Antigen expression from the ribosomal DNA repeat unit of *Giardia intestinalis*. *Nucleic Acids Res.* *18*, 7077-7081.
- Vader,A., Nielsen,H., y Johansen,S. (1999). In vivo expression of the nucleolar group I intron-encoded I-dirI homing endonuclease involves the removal of a spliceosomal intron. *EMBO J.* *18*, 1003-1013.
- Vanacova,S., Liston,D.R., Tachezy,J., y Johnson,P.J. (2003). Molecular biology of the amitochondriate parasites, *Giardia intestinalis*, *Entamoeba histolytica* and *Trichomonas vaginalis*. *Int. J. Parasitol.* *33*, 235-255.
- Vanacova,S., Tachezy,J., Ullu,E., y Tschudi,C. (2001). Unusual diversity in alpha-amanitin sensitivity of RNA polymerases in trichomonads. *Mol. Biochem. Parasitol.* *115*, 239-247.
- Vanacova,S., Yan,W., Carlton,J.M., y Johnson,P.J. (2005). Spliceosomal introns in the deep-branching eukaryote *Trichomonas vaginalis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *102*, 4430-4435.
- Velichutina,I.V., Rogers,M.J., McCutchan,T.F., y Liebman,S.W. (1998). Chimeric rRNAs containing the GTPase centers of the developmentally regulated ribosomal rRNAs of *Plasmodium falciparum* are functionally distinct. *RNA.* *4*, 594-602.
- Villee C.A. (1996). *Biologia*. Mc Graw Hill.
- Vossbrinck,C.R. y Woese,C.R. (1986). Eukaryotic ribosomes that lack a 5.8S RNA. *Nature* *320*, 287-288.
- Wang,A.L. y Wang,C.C. (1985). Isolation and characterization of DNA from *Tritrichomonas foetus* and *Trichomonas vaginalis*. *Mol. Biochem. Parasitol.* *14*, 323-335.
- Waters,A.P. (1994). The ribosomal RNA genes of *Plasmodium*. *Adv. Parasitol.* *34*, 33-79.
- Weiss,L.M. (2001). Microsporidia: emerging pathogenic protists. *Acta Trop.* *78*, 89-102.
- Wildeman,A.G. y Nazar,R.N. (1982). Structural studies of 5 S ribosomal RNAs from a thermophilic fungus, *Thermomyces lanuginosus*. A comparison of generalized models for eukaryotic 5 S RNAs. *J. Biol. Chem.* *257*, 11395-11404.
- Wolner-Hanssen,P., Krieger,J.N., Stevens,C.E., Kiviat,N.B., Koutsky,L., Critchlow,C., DeRouen,T., Hillier,S., y Holmes,K.K. (1989). Clinical manifestations of vaginal trichomoniasis. *JAMA* *261*, 571-576.
- Xu,W.D., Lun,Z.R., y Gajadhar,A. (1998). Chromosome numbers of *Tritrichomonas foetus* and *Tritrichomonas suis*. *Vet. Parasitol.* *78*, 247-251.
- Yang,Q., Zwick,M.G., y Paule,M.R. (1994). Sequence organization of the *Acanthamoeba* rRNA intergenic spacer: identification of transcriptional enhancers. *Nucleic Acids Res.* *22*, 4798-4805.
- Zindrou,S., Orozco,E., Linder,E., Tellez,A., y Bjorkman,A. (2001). Specific detection of *Entamoeba histolytica* DNA by hemolysin gene targeted PCR. *Acta Trop.* *78*, 117-125.
- Zubacova,Z., Cimburek,Z., y Tachezy,J. (2008). Comparative analysis of trichomonad genome sizes and karyotypes. *Mol. Biochem. Parasitol.* *161*, 49-54.
- Zwick,M.G., Wiggs,M., y Paule,M.R. (1991). Sequence and organization of 5S RNA genes from the eukaryotic protist *Acanthamoeba castellanii*. *Gene* *101*, 153-157.

## Apéndice I

### Descripción de microbios eucariontes pertenecientes a cada uno de los seis super-grupos

Se utilizó la clasificación más reciente de los organismos eucariontes, basada en filogenias moleculares que incluyen varios genes y análisis estructurales.

#### 1. AMOEBOZOA: Organismos con locomoción ameboide.

*Pelomyxa palustris*: Amibas anaerobias gigantes que contienen tres tipos de endosimbiontes bacterianos que reemplazan las funciones de organelos ausentes, como la mitocondria.

*Acanthamoeba castellanii* (Acanthamoebidae): Amiba de vida libre.

*Entamoeba histolytica* (Entamoebida): Amiba amitochondriada que infecta el intestino de los animales causando amibiasis.

*Physarum polycephalum* (Eumycetozoa, Myxogastria): Células ameboides que pueden diferenciarse para formar estructuras reproductivas similares a las de los hongos. Durante su ciclo celular el cigoto diploide se divide repetidamente para formar una masa citoplasmática multinucleada conocida como plasmodio. Bajo condiciones secas, el plasmodio puede madurar a órganos productores de esporas.

*Didymium iridis* (Eumycetozoa, Myxogastria): Myxomiceto plasmodial.

*Dictyostelium discoideum* (Eumycetozoa, Dictyostelia): Myxomiceto celular. Amibas independientes se pueden agregar para formar una masa viscosa que puede transformarse en una estructura productora de esporas.

#### 2. OPISTHOKONTA: Organismos con un solo flagelo posterior en al menos un estadio de su ciclo de vida.

Fungi: Osmotrofos dominantes con un papel importante en la descomposición. Pueden ser de vida libre, parásitos o simbioses.

Ascomycota: Mantienen una estructura microscópica de reproducción llamada asca.

*Pneumocystis carinii* (Ascomycota, Taphrinomycotina): Puede causar neumonía en humanos inmunodeprimidos.

*Schizosaccharomyces pombe* (Ascomycota, Taphrinomycotina, Schizosaccharomycetes): Levadura de fisión.

*Saccharomyces cereviae* (Ascomycota, Saccharomycetes): Levadura de gemación que fermenta azúcares a etil-alcohol.

*Candida albicans* (Ascomycota, Saccharomycetes): Causa infecciones en humanos.

Microsporidia: Parásitos intracelulares asexuales que carecen de mitocondria. El estado infectivo de los microsporidia son esporas de quitina que contienen un filamento polar.

*Encephalitozoon cuniculi*: Parásitos de vertebrados de sangre caliente. Contienen al genoma eucarionte más chico descrito hasta ahora (2.9Mb).

*Nosema bombycis*: Causa enfermedades en insectos.

#### 3. RHIZARIA: Organismos con pseudopodos de varios tipos.

Foraminifera: Organismos planctónicos de vida libre que estructuran conchas con poros.

Muestran dimorfismo nuclear y ciclos de vida complejos.

#### 4. PLANTAE (ARCHAEPLASTIDA): Organismos que contienen un plástido fotosintético derivado de una endosimbiosis primaria con una cianobacteria.

Rhodophyceae (Algas rojas): Organismos principalmente marinos, que contienen rodoplastos (plástidos rojos).

*Cyanidoschyzon merolae*: Organismos unicelulares que habitan aguas termales ricas en sulfato.

Chloroplastida: Organismos con cloroplastos verdes.

*Acetabularia mediterranea* (Chlorophyta, Ulvophyceae): Alga verde sincicial.

*Chlorella* (Chlorophyta, Trebouxiophyceae).

*Chlamydomonas* (Chlorophyta, Chlorophyceae).

5. CHROMALVEOLATA: Organismos que contienen un plástido que proviene de una endosimbiosis secundaria con archaoplástido ancestral.

Bacillariophyta (Stramenopiles): Organismos unicelulares o colonias, cubiertos con una concha con dos partes simétricas.

Alveolata:

Dinoflagellata (Dinozoa): Plancton unicelular marino con dos flagelos y paredes rígidas complejas. Algunas especies producen toxinas.

*Pfiesteria piscicida* (Dinophyceae, Peridinophyceae)

Ciliophora: Organismos unicelulares cubiertos de cilios. Tienen dos tipos de núcleo: un micronúcleo genético (MIC, con cromosomas estándar) y un macronúcleo transcripcionalmente activo y más grande que el MIC (MAC, se desarrolla a partir del MIC).

*Euplotes*: (Intramacronucleata, Spirotrichea, Hypotrichia).

*Paramecium* (Intramacronucleata, Oligohymenophorea, Peniculia).

*Tetrahymena* (Intramacronucleata, Oligohymenophorea, Hymenostomatia).

Apicomplexa: Organismos intracelulares obligados que reciben su nombre por el “complejo apical” que sostiene a la maquinaria especializada de invasión, las roptrias y los micronemas.

*Plasmodium* (Aconoidasida, Haemosporida): El agente causal de la malaria existe en asociación con huéspedes invertebrados (estadio sexual en el mosquito) y con huéspedes vertebrados (estadio asexual). *P. falciparum* y *P. vivax* infectan a los eritrocitos humanos, mientras que *P. berghei* infecta roedores.

*Babesia bovis* (Aconoidasida, Piroplasmorida)

*Theileria parva* (Aconoidasida, Piroplasmorida)

*Cryptosporidium* (Conoidasida, Coccidiasina)

*Eimeria* (Conoidasida, Coccidiasina).

6. EXCAVATA: Organismos que suelen tener un surco de alimentación y flagelos.

*Giardia intestinales* (Fornicata, Eopharyngia, Diplomonadida, Giardiae): Parásito del intestino delgado de vertebrados. Tiene dos karyomastigotes (núcleos unidos los flagelos mediante fibras delgadas) transcripcionalmente activos, carece de mitocondria y aparato de Golgi.

*Trichomonas vaginalis* (Parabasalia, Trichomonadida): Parásito amitocondriado, agente causal de la trichomonosis humana. Los organelos conocidos como cuerpos parabasales se involucran en la síntesis, almacenaje y transporte de proteínas.

*Trichomonas tenax* (Parabasalia, Trichomonadida): Infecta la boca humana

*Tritrichomonas foetus* (Parabasalia, Trichomonadida): Infecta el tracto urogenital bovino.

*Naegleria gruberi* (Heterolobosea, Vahlkampfiidae): Amiba de vida libre que vive en tierra o en agua fresca. Puede transformarse a células con flagelo.

*Euglena gracilis* (Euglenozoa, Euglenida, Euglenea): Organismos unicelulares que vive en agua estancada. Se puede encontrar con y sin cloroplastos.

Kinetoplastea (Euglenozoa): Contienen una mitocondria grande conocida como kinetoplasto.

*Trypanosoma* (Metakinetoplastina, Trypanosomatida): El cambio de huésped y algunos pasos de diferenciación se asocian con movimientos característicos del kinetoplasto a lo largo de la célula. La infección con *Trypanosoma brucei* (transmitida a los humanos por la picadura de mosquitos tsetse infectados) causa la enfermedad del sueño, mientras que la infección con *Trypanosoma cruzi* (transmitida a través de la mordida de chinches (reduviidae) infectadas) lleva a la enfermedad de Chagas en humanos.

*Leishmania* (Metakinetoplastina, Trypanosomatida): Parásito responsable de la leishmaniasis. Se multiplica dentro de los lisosomas de macrófagos vertebrados y dentro del sistema digestivo del mosquito flebotomo ó “sand fly”.

*Crithidia* (Metakinetoplastina, Trypanosomatida).

*Bodo saltans* (Metakinetoplastina, Eubodonida): Células de vida libre con dos flagelos.

*Trypanoplasma* (Metakinetoplastina, Parabodonia).

**Apéndice II**  
**Oligonucleótidos utilizados**

Nombre	Secuencia			
5I-F	TACTGGGCTAGGAGACTT			
5S-FA	GAATTCGCCCTTAATTTTCA			
5I-R	CGCGACTGCTTAATTTCCA			
5S-F	AAGCGGCCACACCCCGGCTGG			
5SmutA-F	CACTCCGAACCTGGAAATGACTCATTTCGAGGGCCACATCAGTACTG			
5SmutA-R	CAGTACTGATGTGGCCCTCGAATGAGTCATTTCCAGGTTCCGGAGTG			
5SmutC-F	CATCAGTACTGGGACGTGCTGCTTCCCGGGAACGTG			
5SmutC-R	CACGTTCCCGGGAAGCAGCACGTCCCAGTACTGATG			
5S-MutP-F	GCGCGGTGCAGGGCTATTCACATTCAACAATACTACACTCTACACC			
5S-MutP-R	GGTGTAGAGTGTAGTATTGTTGAATGTGAATAGCCCTGCACCCGCGC			
5S-MutT-F	GCGGTGCTTGCTTCTGTGTCTGTGTGCGCGGTGCAGGGC			
5S-MutT-R	GCCCTGCACCCGCGCACACAGGACACAGAAGCAAGCACCCGC			
5S-R	AAGCAAGCACCCGACGTTCC			
5TvAIE-A	CCACTCCGAACCTGGAAATTAAGCAGTCGCGGGCCACATC			
5TvAIE-B	GATGTGGCCCGCGACTGCTTAATTTCCAGGTTCCGGAGTGG			
5TvC-A	AGTACTGGGCTGGGCGACTTCCCGGGAACGTGCGGTGCTT			
5TvC-B	AAGCACCGCACGTTCCCGGGAAGTCGCCAGCCAGCCAGTACT			
5Tvend-A	TGCGGTGCTTGCTTCTTTTTCCTTTTTGCGCGATGCAGGG			
5Tvend-B	CCCTGCATCGCGCAAAAAGGAAAAAGAAGCAAGCACCCGCA			
5TvIIIC-A	TCCTTTCGAAGCGGCCACACCCGGCTGGCAACATCCAGCT			
5TvIIIC-B	AGCTGGATGTTGCCAGCCGGGTGTGGCCGCTTCGAAAGGA			
5TvTATT-A	GTAGGAATTTGAGAGGAATTTGTGCTATTGTGAAGAATGTG			
5TvTATT-B	CACATTCTTCACAATAGCACAAATTCCTCTCAAATTCCTAC			
5Tvy+1-A	GTGCTATTGTGAAGAATGTGTGTCGAACAATCCTTTCGAA			
5Tvy+1-B	TTCGAAAGGATTGTTTCGACACACATTCTTCACAATAGCAC			
a-scsInr-A	CTAAAATGGCTTTGTTCACTTCACATTAATGCTCTCT			
a-scsInr-B	AGAGAGCATTAAATGTGAAGTGAACAAAGCCATTTTAG			
Hairpin-A	TGCGCGGTGCAGGGCTATTGCCCTGCACCAATAC			
Hairpin-B	GTATTGGTGCAGGGCAATAGCCCTGCACCCGCGCA			
PEX1	CGAACAATCCTTTCGAAGCG			
PEX2	AAGAGTTTTAGCAGGGACAA			
RI13R	CTCTTTGTAAAACTCTTTGTAAAACTCTTTGTAAAAAC			
RI335	CAAAATTAACAAAATTTTCAGCAGAGAGTGGTGT			
UbiqTf-F	TCAAATATAAGAGAATGAAC			
UbiqTf-R	AAGGATAAAACATAAGTAATT			

### Apéndice III

#### Secuencias del rDNA 5S de Trichomonádidos accedidas a Genbank.

LOCUS FJ492751 334 bp DNA linear INV 12-MAY-2009  
DEFINITION **Trichomonas vaginalis 5S ribosomal RNA gene, complete sequence; and 5S ribosomal RNA intergenic spacer, partial sequence.**  
ACCESSION FJ492751  
VERSION FJ492751.1 GI:229561958  
KEYWORDS .  
SOURCE Trichomonas vaginalis  
ORGANISM Trichomonas vaginalis  
Eukaryota; Parabasalidea; Trichomonada; Trichomonadida;  
Trichomonadidae; Trichomonadinae; Trichomonas.  
REFERENCE 1 (bases 1 to 334)  
AUTHORS Torres-Machorro,A.L., Hernandez,R., Alderete,J.F. and Lopez-Villasenor,I.  
TITLE Comparative analyses among the Trichomonas vaginalis, Trichomonas tenax, and Tritrichomonas foetus 5S ribosomal RNA genes  
JOURNAL Curr. Genet. 55 (2), 199-210 (2009)  
PUBMED 19290527  
REFERENCE 2 (bases 1 to 334)  
AUTHORS Torres-Machorro,A.L., Hernandez,R., Alderete,J.F. and Lopez-Villasenor,I.  
TITLE Direct Submission  
JOURNAL Submitted (27-NOV-2008) Biología Molecular, Instituto de Investigaciones Biomedicas, UNAM, Ciudad Universitaria, Mexico City, DF 04510, Mexico  
FEATURES Location/Qualifiers  
source 1..334  
/organism="Trichomonas vaginalis"  
/mol\_type="genomic DNA"  
/isolate="CNCD 147"  
/db\_xref="taxon:5722"  
rRNA 1..118  
/product="5S ribosomal RNA"  
misc\_feature 119..>334  
/note="5S ribosomal RNA intergenic spacer"  
stem\_loop 135..158  
ORIGIN  
1 gaagcggcca caccgggctg gcaacatcca gtcocactcc gaacctggaa attaacgagt  
61 cgcggggccac atcagctactg ggctgggcca cttcccggga acgtgcggtg cttgcttctt  
121 tttccttttt gcgcgggtgca ggcctattgc cctgcaccaa tactacactc tacacctatg  
181 tttgtccctg ctaaaactct tatatggtga gatattttat aattttatat tttttatata  
241 aaaatgaaaa tttttcataa gcgagactcc ctcgcgtgga ggaaattgag agtgggtaatg  
301 gtagtgtgaa tagtgtgtga cgaacaatcc tttc

LOCUS FJ492747 307 bp DNA linear INV 12-MAY-2009  
DEFINITION **Trichomonas tenax 5S ribosomal RNA type A gene, complete sequence; and 5S ribosomal RNA intergenic spacer, partial sequence.**  
ACCESSION FJ492747  
VERSION FJ492747.1 GI:229620021  
KEYWORDS .  
SOURCE Trichomonas tenax  
ORGANISM Trichomonas tenax  
Eukaryota; Parabasalidea; Trichomonada; Trichomonadida;  
Trichomonadidae; Trichomonadinae; Trichomonas.  
REFERENCE 1 (bases 1 to 307)  
AUTHORS Torres-Machorro,A.L., Hernandez,R., Alderete,J.F. and Lopez-Villasenor,I.  
TITLE Comparative analyses among the Trichomonas vaginalis, Trichomonas tenax, and Tritrichomonas foetus 5S ribosomal RNA genes  
JOURNAL Curr. Genet. 55 (2), 199-210 (2009)  
PUBMED 19290527  
REFERENCE 2 (bases 1 to 307)  
AUTHORS Torres-Machorro,A.L., Hernandez,R., Alderete,J.F. and Lopez-Villasenor,I.  
TITLE Direct Submission  
JOURNAL Submitted (27-NOV-2008) Biología Molecular, Instituto de Investigaciones Biomedicas, UNAM, Ciudad Universitaria, Mexico City, DF 04510, Mexico  
FEATURES Location/Qualifiers  
source 1..307  
/organism="Trichomonas tenax"  
/mol\_type="genomic DNA"  
/db\_xref="taxon:43075"  
/clone="HS-4:NIH"  
rRNA 1..118  
/product="5S ribosomal RNA type A"  
misc\_feature 119..>307  
/note="5S ribosomal RNA intergenic spacer"  
ORIGIN  
1 gaagcgggtca caccgggctg gcaacatcca gtcocattcc gaacctggaa attaacgagt  
61 cgcggggccac atcagctactg ggctaggaga cttcccggga acgtgtggtg cttgcttctt  
121 tttctttttt tgaagctcaa agtacaaggt gtgcagaatt cctctgtgat gctcacacat  
181 atgatgaatg tgcatttagt gcgatatttt tgaagtttct tcgctctttt ttgctcgttc  
241 agcatatgtg tcagcaaatt gagagaatat atgctagtgt tatatgtttc cgtcaaacat  
301 atctttc

LOCUS FJ492748 316 bp DNA linear INV 12-MAY-2009  
 DEFINITION **Trichomonas tenax 5S ribosomal RNA type B gene, complete sequence; and 5S ribosomal RNA intergenic spacer, partial sequence.**  
 ACCESSION FJ492748  
 VERSION FJ492748.1 GI:229561954  
 KEYWORDS .  
 SOURCE Trichomonas tenax  
 ORGANISM Trichomonas tenax  
 Eukaryota; Parabasalidea; Trichomonada; Trichomonadida;  
 Trichomonadidae; Trichomonadinae; Trichomonas.  
 REFERENCE 1 (bases 1 to 316)  
 AUTHORS Torres-Machorro,A.L., Hernandez,R., Alderete,J.F. and Lopez-Villasenor,I.  
 TITLE Comparative analyses among the Trichomonas vaginalis, Trichomonas tenax, and Tritrichomonas foetus 5S ribosomal RNA genes  
 JOURNAL Curr. Genet. 55 (2), 199-210 (2009)  
 PUBMED 19290527  
 REFERENCE 2 (bases 1 to 316)  
 AUTHORS Torres-Machorro,A.L., Hernandez,R., Alderete,J.F. and Lopez-Villasenor,I.  
 TITLE Direct Submission  
 JOURNAL Submitted (27-NOV-2008) Biologia Molecular, Instituto de Investigaciones Biomedicas, UNAM, Ciudad Universitaria, Mexico City, DF 04510, Mexico  
 FEATURES Location/Qualifiers  
 source 1..316  
 /organism="Trichomonas tenax"  
 /mol\_type="genomic DNA"  
 /db\_xref="taxon:43075"  
 /clone="HS-4:NIH"  
 rRNA 1..118  
 /product="5S ribosomal RNA type B"  
 misc\_feature 119..>316  
 /note="5S ribosomal RNA intergenic spacer"  
 repeat\_region 199..232  
 /rpt\_type=inverted  
 ORIGIN  
 1 gaagcggcca caccgctctg gcaacatcca gctocattcc gaacctggaa attaagcagt  
 61 cgcggggccac atcagctactg ggctggggcga cttcccggga acgtgtgggt cttgcttctt  
 121 tttctttttt ctcgacagaa gaatcacaat gtgcgagagt cgcgtgcgag tctcacgcat  
 181 gtgatggcga agtggtttaga gtgatatttt tttaaaaaaa aaatatacct catcaacatc  
 241 tctttcatca catgctgtaa aaacaaattg agagaagtca gtttagtggt atatgtttcc  
 301 gtcaaacata cctttc

LOCUS FJ492749 862 bp DNA linear INV 12-MAY-2009  
 DEFINITION **Tritrichomonas foetus 5S ribosomal RNA type A gene, complete sequence; and ubiquitin gene, complete cds.**  
 ACCESSION FJ492749  
 VERSION FJ492749.1 GI:229561955  
 KEYWORDS .  
 SOURCE Tritrichomonas foetus  
 ORGANISM Tritrichomonas foetus  
 Eukaryota; Parabasalidea; Trichomonada; Trichomonadida;  
 Trichomonadidae; Tritrichomonadinae; Tritrichomonas.  
 REFERENCE 1 (bases 1 to 862)  
 AUTHORS Torres-Machorro,A.L., Hernandez,R., Alderete,J.F. and Lopez-Villasenor,I.  
 TITLE Comparative analyses among the Trichomonas vaginalis, Trichomonas tenax, and Tritrichomonas foetus 5S ribosomal RNA genes  
 JOURNAL Curr. Genet. 55 (2), 199-210 (2009)  
 PUBMED 19290527  
 REFERENCE 2 (bases 1 to 862)  
 AUTHORS Torres-Machorro,A.L., Hernandez,R., Alderete,J.F. and Lopez-Villasenor,I.  
 TITLE Direct Submission  
 JOURNAL Submitted (27-NOV-2008) Biologia Molecular, Instituto de Investigaciones Biomedicas, UNAM, Ciudad Universitaria, Mexico City, DF 04510, Mexico  
 FEATURES Location/Qualifiers  
 source 1..862  
 /organism="Tritrichomonas foetus"  
 /mol\_type="genomic DNA"  
 /db\_xref="taxon:5724"  
 rRNA 1..118  
 /product="5S ribosomal RNA type A"  
 promoter 315..318  
 /note="Inr"  
 mRNA <348..>578  
 /product="ubiquitin"  
 CDS 348..578  
 /codon\_start=1  
 /product="ubiquitin"  
 /protein\_id="ACQ78154.1"  
 /db\_xref="GI:229561956"  
 /translation="MQFFVKTLGSKTIAIEADQNDRIEDIKGIQDKEGIPRDQQLRI  
 FAGKQLEDGNRLKDYSIQKDSTLHLVLRGRG"  
 polyA\_signal 620..623  
 polyA\_signal 625..628

ORIGIN

```

1 gaagcggcca taccggctg gatacatcca gtcocattcc gaacctggaa attaagcagt
61 cgcgggctac atcagctactg ggctaggaga cttcccggga acgtgtgggt ctgcttcctt
121 tttatataat ttattatata ctgatattat tttttattat ttggaattat tatatcattt
181 ttgttgatta taataaatat tatgatgata tataacatgt tatattcatt tacattattc
241 aaatataaga gaatgaactt cattcaattt tcattgatat aaaaatttaa taatgattga
301 aatttataat aacttcatta ttttttaag ctagtaagaa ataaaaaatg cagtcttttg
361 ttaaaactct aagtggaaaa actattgcta ttgaagcaga tcaaaatgat agaattgaag
421 acattaaagg aaaaattcaa gataaagaag gaattccaag agatcaacaa cgtttaattt
481 tcgcaggaaa acaattagaa gatggaaaaca gacttaaaga ctattcaatt caaaaagatt
541 caacattaca tttagtttta agacttcgtg gtggatgaaa aagattcttt tataatata
601 agtatatctt gttaatgaat aaagtaaca ttcaaaatc ataatttga aattacttat
661 gttttatcct tttttttca aatgaaatga aagtttcttt ttcataatct gttatttaat
721 caaacttatt aataagaaa tatatcaaat ataaaaata ttaacaaaac aaaagagaaa
781 tttataaaga ataaacaaa aaacagttaa ttctaagtta aataataaat aagtttaaat
841 gtgtaaacag aaacatccta tt

```

LOCUS FJ492750 1367 bp DNA linear INV 12-MAY-2009

DEFINITION **Tritrichomonas foetus 5S ribosomal RNA type B gene, complete sequence.**

ACCESSION FJ492750

VERSION FJ492750.1 GI:229561957

KEYWORDS .

SOURCE Tritrichomonas foetus

ORGANISM Tritrichomonas foetus  
Eukaryota; Parabasaliida; Trichomonada; Trichomonadida;  
Trichomonadidae; Tritrichomonadinae; Tritrichomonas.

REFERENCE 1 (bases 1 to 1367)

AUTHORS Torres-Machorro,A.L., Hernandez,R., Alderete,J.F. and Lopez-Villasenor,I.

TITLE Comparative analyses among the Trichomonas vaginalis, Trichomonas tenax, and Tritrichomonas foetus 5S ribosomal RNA genes

JOURNAL Curr. Genet. 55 (2), 199-210 (2009)

PUBMED 19290527

REFERENCE 2 (bases 1 to 1367)

AUTHORS Torres-Machorro,A.L., Hernandez,R., Alderete,J.F. and Lopez-Villasenor,I.

TITLE Direct Submission

JOURNAL Submitted (27-NOV-2008) Biologia Molecular, Instituto de Investigaciones Biomedicas, UNAM, Ciudad Universitaria, Mexico City, DF 04510, Mexico

FEATURES

source Location/Qualifiers

1..1367

/organism="Tritrichomonas foetus"

/mol\_type="genomic DNA"

/db\_xref="taxon:5724"

rRNA 1..118

/product="5S ribosomal RNA type B"

repeat\_region 386..542

/rpt\_type=tandem

/rpt\_unit\_range=386..398

repeat\_region order(849..895,1143..1189)

repeat\_region order(961..1032,1292..1364)

ORIGIN

```

1 gaagcggcca taccggctg gatacatcca gtcocattcc gaacctggaa attaagcagt
61 cgcgggctac atcagctactg ggctaggaga cttcccggga acgtgtgggt ctgcttcctt
121 tttatataat ttattatata tttttttttt attattatata tttggaatta ttatattcatt
181 tttgttaatt agaaatatta ttatatataa caatgatata tttttacttt ttccaattaa
241 acattttata ttcatttaca ttatttaaat ataagagaat gaacttcaat ccaattttca
301 ttgatataaa aatttaataa taatcaaaat ttataatcat ttcataatatt tttttaaaga
361 taataaaaaa taaaaaatgc agttctttgt aaaaactctt tgtaaaaaact ctttgtaaaa
421 actctttgta aaaaactctt gtaaaaaact tttgtaaaaa ctctttgtaa aaactctttt
481 taaaaactct tttgtaaaaa tctttgtaaa aactctttgt aaaaactctt tttgtaaaaa
541 cttaaagtgt aaaaaactat tggctatttg aaagcagat caaatgata gaatttgaag
601 atattttaaag gaaaaatcca agataaagaa ggaatttcaa gagatcaaca acgtttaaact
661 ttcgcaggaa aacaattaga tgatggaaag caaacttaaa gactactcaa tttaaaaaga
721 ttcaacatta catttagttt taagacttcg ttgtggatga aaaagattct tataatata
781 taattatatt ttgtttatga ataagtaaac atttaaaata cataatttgt aaattcttat
841 gtttattcct tttatttcaa atgaaatgaa agtttctttt tcatattttg ttattcaatc
901 aaatctatta ataaagaaat aatcaaaata taaaaatatt acaaaaaaca aagagaaata
961 aagaataaac aaaaaacagt taattctaag ttaataataa aataaagttt aaatgtgtaa
1021 acagaaacaa tcaagattct tttatatata tatatacata ttatttatct ttgtttatgg
1081 ataagtaaac atgtaaaata cataaattct tatgttaatt cttttgattt taaatttttt
1141 attttttatt tcaaatgaaa tgaagtttc tttttcattt tttgttattg cataaaaaaac
1201 ttatttaaca ttggaatgaa caaacaaggt tccaaatcat caaatatatt aaatttctta
1261 attaacaaggt aatgataaca aaggaataaa gaagaataaa caaaaaaaca gttaattcta
1321 agttaaataa taaataagtt taatgtgtga aacagaaaaa atctattt

```

## Apéndice IV



# Ribosomal RNA genes in eukaryotic microorganisms: witnesses of phylogeny?

Ana Lilia Torres-Machorro, Roberto Hernández, Ana María Cevallos & Imelda López-Villaseñor

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

**Correspondence:** Imelda López-Villaseñor, Departamento de Biología Molecular y Biotecnología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Apartado postal 70-228, 04510 México D.F., Mexico. Tel.: +52 55 5622 8952; fax: +52 55 5622 9212; e-mail: imelda@biomedicas.unam.mx

Received 4 September 2009; revised 25 October 2009; accepted 27 October 2009. Final version published online 23 November 2009.

DOI:10.1111/j.1574-6976.2009.00196.x

Editor: Colin Berry

## Keywords

rRNA; 5S rRNA; unicellular eukaryote; ribosomal cistron organization; extrachromosomal gene; repeated sequence.

## Introduction

The most recent phylogenetic model for relationships among eukaryotes clusters them into six supergroups, probably monophyletic (Simpson & Roger, 2004; Adl *et al.*, 2005). Microbial eukaryotes are found in all six groups and have considerable morphological, ultrastructural and genetic diversity. Several unique features have been described in these organisms, such as trans-splicing and RNA editing in trypanosomatids (Madison-Antenucci *et al.*, 2002; Haile & Papadopolou, 2007) as well as DNA splicing and rearrangements in the ciliate *Tetrahymena* (Prescott, 2000). *Microsporidia* (*Encephalitozoon cuniculi*) possess genomes in the size range of bacteria (Keeling & Slamovits, 2004), while the genomes of dinoflagellates lack histones and nucleosomes (Moreno Díaz de la Espina *et al.*, 2005). Cryptomonad and chlorarachniophyte unicellular algae conserve a relict miniaturized nucleus of a formerly independent alga (nucleomorph) (Cavalier-Smith, 2002) and specialized infection organelles (rhoptries and micronemes) are present in apicomplexans such as

## Abstract

The study of genomic organization and regulatory elements of rRNA genes in metazoan paradigmatic organisms has led to the most accepted model of rRNA gene organization in eukaryotes. Nevertheless, the rRNA genes of microbial eukaryotes have also been studied in considerable detail and their atypical structures have been considered as exceptions. However, it is likely that these organisms have preserved variations in the organization of a versatile gene that may be seen as living records of evolution. Here, we review the organization of the main rRNA transcription unit (rDNA) and the 5S rRNA genes (5S rDNA). These genes are reiterated in the genome of microbial eukaryotes and may be coded alone, in tandem repeats, linked to each other or linked to other genes. They may be found in the chromosome or extrachromosomally in linear or circular units. rDNA coding regions may contain introns, sequence insertions, protein-coding genes or additional spacers. The 5S rDNA can be found in tandem repeats or genetically linked to genes transcribed by RNA polymerases I, II or III. Available information from about a hundred microbial eukaryotes was used to review the unexpected diversity in the genomic organization of rRNA genes.

*Plasmodium* (Kats *et al.*, 2006) and *Toxoplasma* parasites (Boothroyd & Dubremetz, 2008). Unusual characteristics extend to the organization of rRNA genes, which evidence the peculiarities, diversity and divergence of the genome structure in microbial eukaryotes. An overview of the biology of key microbial eukaryotes is given in Box 1.

The typical eukaryotic translation machinery, the ribosome, is composed of two subunits with four rRNA species and > 70 proteins. The large subunit (LSU) contains the 28S, the 5.8S and the 5S rRNAs. The small subunit (SSU) contains the 18S rRNA (SSU rRNA). The four rRNA mature molecules are coded in two rRNA genes transcribed by two different RNA polymerases. The 18S, 5.8S and 28S rRNAs are coded in a single transcription unit called a ribosomal cistron or the main transcription unit, transcribed by RNA polymerase I (pol I). The 5S rRNA gene is not usually linked to the ribosomal cistron and is transcribed by pol III (Mandal, 1984; Paule & White, 2000).

rRNA genes were among the first genes to be studied in detail due to their highly repetitive nature, ease of manipulation and biological importance (Miller & Beatty, 1969;

**Box 1.** Characteristics of some microbial eukaryotes

We used the most recent and accepted classification of eukaryotes, based on multiple gene molecular phylogenies and structural analyses. This system divides eukaryotes into six supergroups: Amoebozoa, Opisthokonta, Rhizaria, Plantae, Chromalveolata and Excavata (Simpson & Roger, 2004; Adl *et al.*, 2005; Dacks *et al.*, 2008). Here, we describe key microorganisms of each supergroup (Margulis & Schwartz, 2000).

## 1. AMOEBOSOA: Organisms that show amoeboid locomotion with pseudopodia.

*Pelomyxa palustris*: Giant anaerobic amoeba that contains three types of bacterial endosymbionts that replace the functions of some lacking organelles such as the mitochondria.

*Acanthamoeba castellanii* (Acanthamoebidae): Freelifing soil amoeba.

*Entamoeba histolytica* (Entamoebida): Uninucleate amitochondriate amoeba that infects the intestine of animals, causing amoebiasis.

*Physarum polycephalum* (Eumycetozoa, Myxogastria): Amoeboid cells that can differentiate into fungus-like reproductive structures. During its life cycle, a diploid zygote divides repeatedly to form a multinucleated cytoplasmic mass called the plasmodium. Under dry conditions, the plasmodium may mature into spore-producing organs.

*Didymium iridis* (Eumycetozoa, Myxogastria): Plasmodial slime mold.

*Dictyostelium discoideum* (Eumycetozoa, Dictyostelia): Land-dwelling cellular slime mold. Independent amoebas may aggregate into a slimy mass (slug) that eventually transforms into a reproductive body that produces spores.

## 2. OPISTHOKONTA: Organisms with a single posterior flagellum in at least one stage of the life cycle.

Fungi: Dominant osmotrophs that play crucial roles as decomposers and as symbionts or parasites.

*Ascomycota*: Hold a microscopic reproductive structure called ascus.

*Pneumocystis carinii* (Ascomycota, Taphrinomycotina): Causes fatal pneumonia in immunocompromised humans.

*Schizosaccharomyces pombe* (Ascomycota, Taphrinomycotina, Schizosaccharomycetes): Fission yeast.

*Saccharomyces cerevisiae* (Ascomycota, Saccharomycetes): Budding yeast that ferments sugars to ethyl alcohol.

*Candida albicans* (Ascomycota, Saccharomycetes): Causes infections in humans.

*Microsporidia*: Intracellular asexual parasites that lack mitochondria. The microsporean resting stages are the chitinous spores, which contain a polar filament and an infective body.

*Encephalitozoon cuniculi*: Parasites of warm-blooded vertebrates, holds one of the smallest known eukaryotic genomes (2.9 Mbp) (Biderre *et al.*, 1997).

*Nosema bombycis*: causes disease in insects.

## 3. RHIZARIA: Organisms with pseudopodia of various types.

*Foraminifera*: Planktonic or benthic free-swimming organisms that have pore-studded shells. They show nuclear dimorphism and complex life cycles.

## 4. PLANTAE (ARCHAEPLASTIDA): Organisms that hold a photosynthetic plastid derived from a primary endosymbiosis with a cyanobacterium.

*Rhodophyceae* (Red algae): Mostly marine organisms that hold rhodoplasts (red plastids).

*Cyanidoschyzon merolae*: Unicellular organisms that inhabit sulfate-rich hot springs.

*Chloroplastida*: Organisms that hold green chloroplasts.

*Acetabularia mediterranea* (Chlorophyta, Ulvophyceae): Syncytial green algae.

*Chlorella* (Chlorophyta, Trebouxiophyceae).

*Chlamydomonas* (Chlorophyta, Chlorophyceae).

## 5. CHROMALVEOLATA: Organisms that contain a plastid that comes from a secondary endosymbiosis with an ancestral archaeplastid.

Bacillariophyta (Stramenopiles): Single cells or colonies covered by an elaborate, symmetrical two-part shell.

Alveolata:

*Dinoflagellata* (Dinozoa): Mostly unicellular marine plankton, holding two undulipodia and complex rigid walls (tests). Some species produce toxins.

*Pfiesteria piscicida* (Dinophyceae, Peridiniophyceae).

*Ciliophora*: Unicellular organisms covered with cilia (short undulipodia). They have two types of nuclei: small genetic micronuclei (MIC, containing standard chromosomes) and large transcriptionally active macronuclei (MAC, it develops from the micronuclei).

*Euplotes* (Intramacronucleata, Spirotrichea, Hypotrichia).

*Paramecium* (Intramacronucleata, Oligohymenophorea, Peniculia).

*Tetrahymena* (Intramacronucleata, Oligohymenophorea, Hymenostomatia).

*Apicomplexa*: Specialized obligate intracellular parasites named for the 'apical complex' that hold structures such as rhoptries and micronemes, the specialized machinery used for invasion (Kats *et al.*, 2006; Boothroyd & Dubremetz, 2008).

*Plasmodium* (Aconoidasida, Haemosporida): The causative agent of malaria exists in association with an invertebrate host (sexual stage in the mosquito) and a vertebrate host (asexual stage). *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* infect human red blood cells, while *Plasmodium berghei* infects rodents.

*Babesia bovis* (Aconoidasida, Piroplasmorida).

*Theileria parva* (Aconoidasida, Piroplasmorida).

*Cryptosporidium* (Conoidasida, Coccidiasina).

*Eimeria* (Conoidasida, Coccidiasina).

## 6. EXCAVATA: Organisms that typically have a suspension-feeding groove and flagella.

*Giardia intestinalis* (Fornicata, Eopharyngia, Diplomonadida, Giardiae): A parasite of the small intestine of vertebrates through infective cysts. It has two transcriptionally active karyomastigonts (nuclei attached to undulipodia by thin fibers), and lacks mitochondria and the Golgi apparatus.

*Trichomonas vaginalis* (Parabasalia, Trichomonadida): Amitochondriate parasite causative of trichomoniasis in humans. The organelles known as parabasal bodies are involved in the synthesis, storage and transport of proteins.

*Trichomonas tenax* (Parabasalia, Trichomonadida): Infects the human mouth.

*Tritrichomonas foetus* (Parabasalia, Trichomonadida): Infects the urogenital tract of cattle.

*Naegleria gruberi*: (Heterolobosea, Vahlkampfiidae) Soil and freshwater freelifing amoeba that transforms into undulipodiated cells.

*Euglena gracilis* (Euglenozoa, Euglenida, Euglenea): Unicellular organism living in stagnant water. It can be found with or without chloroplasts.

*Kinetoplastea* (Euglenozoa): Contain a large mitochondrion called a kinetoplast.

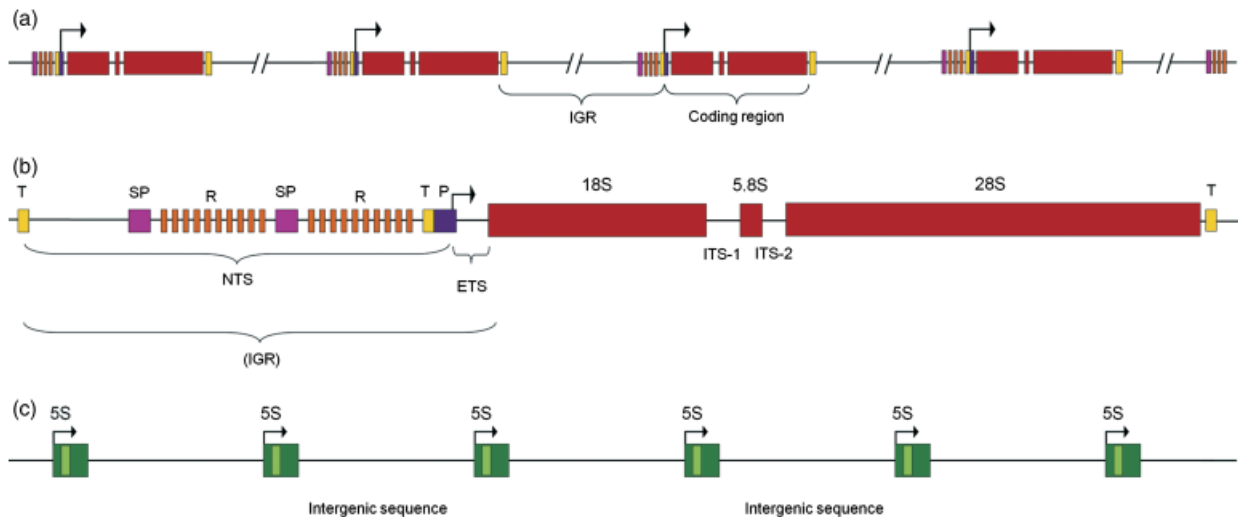
*Trypanosoma* (Metakinetoplastina, Trypanosomatida): The change of host and some differentiation steps are associated with characteristic movements of the kinetoplast along the cell. *Trypanosoma brucei* infection (transmitted to humans through the bite of infected tsetse flies) causes the sleeping sickness, while *Trypanosoma cruzi* infection (transmitted through the bite of infected reduviid bugs) leads to Chagas disease in humans.

*Leishmania* (Metakinetoplastina, Trypanosomatida): Parasite responsible for the leishmaniasis disease. It multiplies within the lysosomes of vertebrate macrophages and within the digestive system of sand-flies.

*Bodo saltans* (Metakinetoplastina, Eubodonida): Freelifing bi-undulipodiated cell.

*Crithidia* (Metakinetoplastina, Trypanosomatida).

*Trypanoplasma* (Metakinetoplastina, Parabodonia).



**Fig. 1.** General organization of the ribosomal main transcription unit (rDNA) and 5S rDNA. (a) Schematic representation of *Xenopus laevis* rDNA. About 600 U of the ribosomal cistron are encoded in the chromosome in head-to-tail tandem repeats. Each unit contains a coding region (red) and an IGR. (b) A single unit of the *X. laevis* rDNA. The 18S, 5.8S and 28S rRNA molecules are transcribed as a single RNA precursor that is post-transcriptionally processed to produce the mature rRNA molecules. Transcription regulatory elements for RNA polymerase I are found in the NTS: tandem-repeated sequences (R), spacer promoters (SP), transcription terminators (T) and the promoter (P). The IGR comprises both the NTS and the ETS. (c) Organization of somatic 5S rDNA in *X. laevis*. The 5S rDNA is organized in tandem head-to-tail repeats that include a coding region (green box) and an intergenic sequence (black line). The 5S rDNA promoter is internal to the coding region (light green box). Arrows represent the transcription start point. ETS, external transcribed spacer.

Long & Dawid, 1980; Sollner-Webb & Mougey, 1991). The thorough study and description of genomic organization and regulatory elements in the rRNA genes of *Xenopus*, *Drosophila* and mouse led to the most accepted model of rRNA gene organization in eukaryotes (Long & Dawid, 1980; Mandal, 1984; Sollner-Webb & Mougey, 1991) (Fig. 1). The rRNA genes of microbial eukaryotes have also been intensively studied, although they were considered to be the exception to the rule, as their organization differs from the general models (Long & Dawid, 1980; Mandal, 1984). Here, we focus on the rRNA gene organization of microbial eukaryotes where many examples of gene diversity can be found. This work also summarizes the variability of motifs present in the rDNA intergenic region (IGR), which may include general and species-specific elements. For simplicity, in this review, the ribosomal cistron is referred to as rDNA and the term 5S rDNA is used for the 5S rRNA gene.

## Overview of the eukaryotic rRNA genes

### The ribosomal cistron (rDNA)

In most species, the rDNA is present in multiple copies organized as tandem head-to-tail repeats. The rDNA unit is composed of a transcribed region and an IGR (also called the intergenic spacer) consisting of a nontranscribed spacer (NTS) 2–30 kbp long and an external transcribed spacer. The NTS contains most of the regulatory elements for

transcription, while the external transcribed spacer is part of the primary transcript (pre-rRNA, 7–14 kb long) (Sollner-Webb & Mougey, 1991) (Fig. 1).

Several regulatory elements may be found in the IGR such as enhancers, spacer promoters, a proximal terminator and the gene promoter. This region may also contain several repetitive sequences that may improve the transcription efficiency, with additive effects (Paule & White, 2000). A schematic representation of the *Xenopus laevis* rDNA is shown in Fig. 1a and b as an example of the 'typical' eukaryotic rDNA organization (Sollner-Webb & Mougey, 1991). The rDNA pol I core promoter and other nonrepeated rDNA regulatory elements have been described and studied in detail in some unicellular eukaryotes such as *Trypanosoma cruzi*, *Acanthamoeba castellanii* and yeast (Kownin *et al.*, 1985; Neigeborn & Warner, 1990; Wai *et al.*, 2000; Figueroa-Angulo *et al.*, 2006).

Transcription of the rDNA proceeds from the promoter through the 5' external transcribed spacer – 18S rRNA – internal transcribed spacer-1 (ITS-1) – 5.8S rRNA – ITS-2 and 28S rRNA, until pol I comes across a transcription termination signal (Long & Dawid, 1980). In most cases, the rDNA primary transcript is post-transcriptionally processed in three rRNA mature molecules: 18S, 5.8S and 28S, resulting from the elimination of the external transcribed spacers ITS-1 and ITS-2 (Fig. 1) (Long & Dawid, 1980). Additional processing of the rRNAs into several smaller molecules has also been described. As most eukaryotic LSU rRNAs (eLSU

rRNAs) are fragmented by removal of ITS-2, the eLSU rRNA should be defined as 5.8S+28S rRNA. Because the term LSU rRNA has been used as equivalent to bacterial 23S rRNA, here we refer to the 5.8S+28S rRNA as eLSU rRNA.

### The 5S rRNA gene (5S rDNA)

The 5S rDNA is reiterated in the eukaryotic genome in tandem head-to-tail arrays (Paule & White, 2000) (Fig. 1c). The 5S rDNA promoter (Internal Control Region) is found downstream of the transcription start point and within the transcribed region. Upstream regulatory elements can also be found in some 5S rDNAs that may be necessary for transcription. The Internal Control Region is sufficient for transcription of 5S rRNA in *Xenopus* (Bogenghagen *et al.*, 1980; Sakonju *et al.*, 1980) whereas in *Saccharomyces cerevisiae* two upstream regulatory elements (start site element and upstream promoter element) are necessary for its efficient transcription *in vivo* (Lee *et al.*, 1997).

### Redundancy and relative ratio of the rRNA genes

rRNA genes are reiterated in almost every eukaryotic genome studied, and the gene copy number is maintained at a characteristic constant level for each organism. In most organisms, not all of the rDNA copies are transcribed (Conconi *et al.*, 1989), suggesting that the total rDNA copy number is not directly related to the synthesis of rRNA (Kobayashi *et al.*, 1998; Grummt, 2003; Raska *et al.*, 2004). It has been proposed that the rDNA may participate in roles other than transcription, such as maintenance of the nucleolar structure and rDNA stability (Nogi *et al.*, 1991; Oakes *et al.*, 1993).

A considerable variation in the rDNA and 5S rDNA gene copy number exists among eukaryotes (Table 1): the rDNA copy number can range from one and two copies in the *Ascomycota Pneumocystis carinii* and the *Apicomplexa Theileria parva* to 4800 copies in the green alga *Acetabularia mediterranea* and 9000 copies in the ciliate *Tetrahymena thermophila*. The 5S rDNA copies can range from three in the red alga *Cyanidioschyzon merolae* to about one million in the ciliate *Euplotes eurystomus*. In the slime mold *Dictyostelium discoideum* and in the yeast *S. cerevisiae*, the rDNA and 5S rDNA genes are present in equal numbers, although a strict relationship between both types of genes is not always observed. For example, *Euglena gracilis* has 800–4000 copies of rDNA and only 300 copies of the 5S rDNA; in contrast, 110 copies of the rDNA are present in the genome of the kinetoplastid *T. cruzi*, while the 5S rDNA is repeated 1600 times. The copy number of rRNA genes in some microbial eukaryotes and the rDNA/5S rDNA ratio are given in Table 1. The considerable variability in this ratio suggests that different species may have particular regulatory mechanisms

to maintain the 18S, 5.8S, 28S and 5S rRNA homeostasis for the efficient synthesis of ribosomes.

## The ribosomal cistron: localization, gene linkage and IGR

### The typical rDNA organization

Chromosomally localized tandem head-to-tail repeats of rDNA units containing a coding region and an IGR represent the typical rDNA organization in eukaryotes. Some microbial organisms of various phylogenetic branches share this general organization, as shown in Fig. 2 and Table 2. Tandem rDNA units may be located in a single chromosome and locus (e.g. *Kluyveromyces lactis* and *Trichomonas vaginalis*), or in various chromosomes and loci (e.g. *T. cruzi*). Atypical tail-to-tail and head-to-head rDNA repeats (interspersed with typical tandem head-to-tail repeats) are observed in *Acetabularia exigua* (Berger *et al.*, 1978; Spring *et al.*, 1978). In various yeast species such as *K. lactis* and *S. cerevisiae*, tandem rDNA units are genetically linked to the 5S rDNA. In these cases, the 5S rDNA can be coded either in a sense or an antisense orientation relative to the rDNA coding strand (Table 2, Fig. 2b and c).

Depending on the species (and isolate) studied, several tandemly repeated sequences may be found in the IGR with variations in size, sequence and number (Table 3). For example, the IGR of *Leishmania* species contain a 60–64 bp repeated element reiterated between 16 and 275 times, causing length variations in the IGR that range from 4 to 12 kbp. The size, number and sequence of these motifs are species- and isolate-specific elements in *Leishmania* spp. (Gay *et al.*, 1996; Uliana *et al.*, 1996; Yan *et al.*, 1999; Martínez-Calvillo *et al.*, 2001; Orlando *et al.*, 2002) (Table 3 and Fig. 2g).

### Unlinked and heterogeneous rDNA

rDNAs with heterogeneous coding and intergenic sequences are characteristic of the *Apicomplexa* group and may be found unlinked (located in nonadjacent loci) and in low copy number (Table 4). For example, *Plasmodium* spp. may have four to eight rDNA copies per haploid genome. *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium berghei* have two types of rDNA units (Waters *et al.*, 1989; Waters, 1994): A-type and S-type (also known as C-type in *P. berghei*) code for different SSU and eLSU rRNAs that correlate with the production of ribosomes with different GTPase activity (Rogers *et al.*, 1996; Velichutina *et al.*, 1998). The expression of rDNA genes is tightly linked to the progression of *Plasmodium* life cycle: the A-type rRNA is expressed predominantly in the vertebrate host (asexual development), whereas the S-type rRNA is expressed in the mosquito stage (sexual development) (Mercereau-Puijalon *et al.*, 2002) (Fig.

**Table 1.** rRNA genes: copy number, unit size and organization

Organism	rDNA copies	rDNA unit size (kbp) and organization	5S rDNA copies	5S rDNA unit size (kbp) and organization	rDNA/5S ratio	References
Excavata						
<i>Crithidia fasciculata</i>		11–12 (T)	250–300	0.23 (T)		Köck & Cornelissen (1990), Schnare <i>et al.</i> (2000)
<i>Diplonema papillatum</i>				0.68 and 1.7 (T)		Sturm <i>et al.</i> (2001)
<i>Euglena gracilis</i>	800–4000 (C), 4(chr)	11.5 (C)	330	0.6 (T)	2.42–12.12	Ravel-Chapuis (1988), Keller <i>et al.</i> (1992)
<i>Herpetomonas</i>				0.6 (T)		Aksoy (1992)
<i>Leishmania donovani</i>	166	12.5 (T)				Yan <i>et al.</i> (1999), León <i>et al.</i> (1978)
<i>Leishmania major</i>	63	14 (T)				Martínez-Calvillo <i>et al.</i> (2001), Ivens <i>et al.</i> (2005)
<i>Trypanosoma brucei</i>	56	(T)	1500	0.75	0.04	Hasan <i>et al.</i> (1984), Berriman <i>et al.</i> (2005)
<i>Trypanosoma cruzi</i>	110	30 (T)	1600	0.48 (T)	0.07	Castro <i>et al.</i> (1981), Hernández-Rivas <i>et al.</i> (1992), Hernández <i>et al.</i> (1993)
<i>Trypanosoma rangeli</i>			330	0.9		Aksoy <i>et al.</i> (1992)
<i>Trypanosoma vivax</i>				0.72		Roditi (1992)
<i>Naegleria gruberi</i>	3000–5000 (C)	14 (C)				Clark & Cross (1988)
<i>Giardia intestinalis</i>	60 (H), 300	5.6 (T)				Le Blancq <i>et al.</i> (1991)
<i>Trichomonas tenax</i>		(T)	0.01% *	0.307 and 0.316 (T)		Torres-Machorro <i>et al.</i> (2009)
<i>Trichomonas vaginalis</i>		6 (T)	0.1% *	0.334 and 0.335 (T)		López-Villaseñor <i>et al.</i> (2004), Torres-Machorro <i>et al.</i> (2006)
<i>Tritrichomonas foetus</i>	12	6 (T)	0.04%*	0.86 and ~1.3 (T)		Chakrabarti <i>et al.</i> (1992), Torres-Machorro <i>et al.</i> (2009)
<i>Trypanoplasma borreli</i>				0.59		Maslov <i>et al.</i> (1993)
Chromalveolates						
<i>Babesia bigemina</i>	3	10.65, 10.8 and 13.35 (U)				Reddy <i>et al.</i> (1991)
<i>Babesia bovis</i>	3	7				Dalrymple (1990)
<i>Babesia canis</i>	4					Dalrymple <i>et al.</i> (1992)
<i>Cryptosporidium parvum</i>	5 (H)	6.5 (T)	6	0.55 and 0.79, 3 (T), 3(U)	0.83	Taghi-Kilani <i>et al.</i> (1994), Le Blancq <i>et al.</i> (1997)
<i>Eimeria tenella</i>	140	(T)	500	0.73 (T)	0.28	Stucki <i>et al.</i> (1993), Shirley (2000)
<i>Plasmodium berghei</i>	4	(U)	3	(T)	1.33	Dame & McCutchan (1983), Waters (1994)
<i>Plasmodium falciparum</i>	5–8	(U)	3		1.67–2.67	Shippen-Lentz & Vezza (1988), Gardner <i>et al.</i> (2002)
<i>Plasmodium lophurae</i>	6	(U)				Unnasch & Wirth (1983)
<i>Plasmodium vivax</i>	7	(U)				Li <i>et al.</i> (1997)
<i>Theileria parva</i>	2	(U)	3		0.67	Kibe <i>et al.</i> (1994), Gardner <i>et al.</i> (2005)
<i>Toxoplasma gondii</i>	110	7.5 (T)	110		1	Guay <i>et al.</i> (1992)
<i>Perkinsus andrewsi</i>		7.7–7.8				Pecher <i>et al.</i> (2004)
<i>Euplotes crassus</i>		7 (L)				Erbezniak <i>et al.</i> (1999)
<i>Euplotes eurytomus</i>			1 000 000	0.93 (L)		Roberson <i>et al.</i> (1989)
<i>Glaucoma chattoni</i>		9.3 (L)				Challoner <i>et al.</i> (1985)
<i>Oxytricha fallax</i>		7.49 (L)		0.69 (L)		Rae & Spear (1978), Swanton <i>et al.</i> (1982)
<i>Paramecium tetraurelia</i>		9 (T,L,C)				Preer <i>et al.</i> (1999)
<i>Tetrahymena pyriformis</i>	200 MAC (H), 1 MIC		350 MAC, 350 MIC (H)	0.28	0.29	Kimmel & Gorovsky (1976), Kimmel & Gorovsky (1978)
<i>Tetrahymena thermophila</i>	9000 MAC, 1MIC	21 (L,P)	150 MAC, 150 MIC (H)	0.25–0.29	30	Yao & Gall (1977), Allen <i>et al.</i> (1984), Eisen <i>et al.</i> (2006)

**Table 1.** Continued.

Organism	rDNA copies	rDNA unit size (kbp) and organization	5S rDNA copies	5S rDNA unit size (kbp) and organization	rDNA/5S rDNA copy ratio	References
<b>Amoebozoa</b>						
<i>Acanthamoeba castellanii</i>	24(H), 600	12 (T)	480	(U)	1.25	Zwick <i>et al.</i> (1991), Yang <i>et al.</i> (1994)
<i>Dictyostelium discoideum</i>	180 (L), 1 (chr)	88 (L,P)	180	88 (L,P)	1	Cockburn <i>et al.</i> (1978), Hofmann <i>et al.</i> (1993)
<i>Didymium iridis</i>		20 (L)				Johansen <i>et al.</i> (1992)
<i>Entamoeba histolytica</i> (HM-1:IMSS)	200 (C), 0 (chr)	24.5 (C)				Huber <i>et al.</i> (1989), Bagchi <i>et al.</i> (1999)
<i>Physarum polycephalum</i>	1 × 10 <sup>11</sup>	> 60 (L,P)		0.68		Campbell <i>et al.</i> (1979)
<b>Plantae</b>						
<i>Acetabularia mediterranea</i>	3500–4800	(T)				Spring <i>et al.</i> (1978)
<i>Cyanidioschyzon merolae</i>	3	(U)	3	(U)	1	Maruyama <i>et al.</i> (2004), Matsuzaki <i>et al.</i> (2004)
<b>Opisthokonta</b>						
<i>Candida albicans</i>	100 (C), 200 (chr)	11.6–12.5 (T)				Huber & Rustchenko (2001)
<i>Candida glabrata</i>	> 115	(T)	> 230		0.5	Maleszka & Clark-Walker (1993), Bergeron & Drouin (2008)
<i>Hansenula polymorpha</i>	50–60	8 (T)	50–60		1	Ramezani-Rad <i>et al.</i> (2003)
<i>Kluyveromyces lactis</i>	60	8.6 (T)	60		1	Verbeet <i>et al.</i> (1984)
<i>Pneumocystis carinii</i>	1					Tang <i>et al.</i> (1998), Fischer <i>et al.</i> (2006)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	100–200	9.1 (T)	100–200		1	Rubin & Sulston (1973), Rustchenko & Sherman (1994)
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	100–120	10.4 (T)	30	(U)	3.33–4	Wood <i>et al.</i> (2002)
<i>Yarrowia lipolytica</i>	100	7.7 and 8.7 (T)	108	(U)	0.93	van Heerikhuizen <i>et al.</i> (1985), Acker <i>et al.</i> (2008)
<i>Encephalitozoon cuniculi</i>	22	8.9 (tel)	3	(U)	7.33	Peyretilade <i>et al.</i> (1998), Katinka <i>et al.</i> (2001)
<i>Nosema apis</i>		18 (T)				Gatehouse & Malone (1998)
<i>Nosema bombycis</i>		4.3 (T)				Huang <i>et al.</i> (2004)

All copy numbers are approximate, mainly based on quantitative hybridization analyses. If the rDNA is chromosomal, the unit size corresponds to the complete unit containing the rDNA coding region and the intergenic spacer.

If the rDNA unit is extrachromosomal, the unit size corresponds to the whole molecule size.

\*In trichomonads the percentage of the genome sequence that corresponds to the 5S rRNA coding region is indicated.

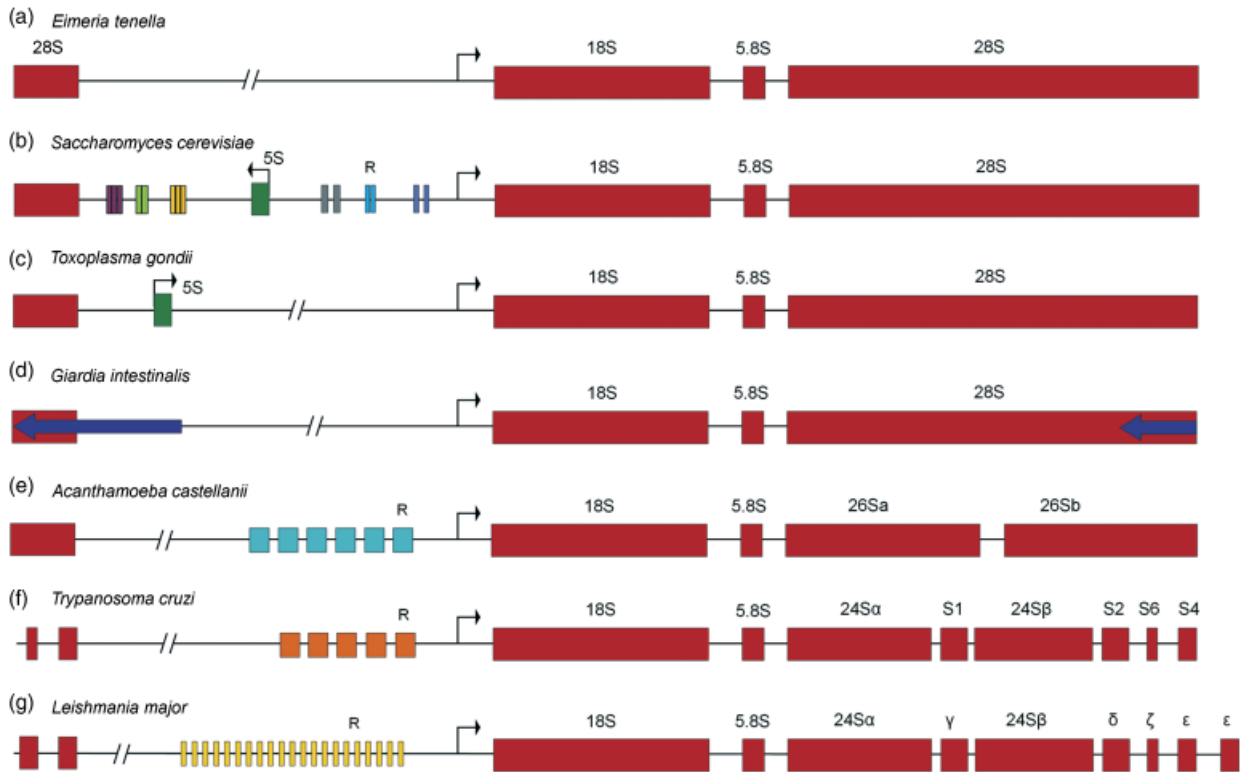
C, extrachromosomal circle; chr, chromosomal; H, haploid; L, extrachromosomal linear molecule; MAC, macronucleus; MIC, micronucleus; P, palindromic; T, tandem; tel, telomeric; U, unlinked and nontandem.

3). During the transfer of *Plasmodium* from the vertebrate host to the mosquito, drastic changes in glucose concentration and temperature are involved in regulating the expression of A- and S-type rDNA genes from different promoter elements (Mack *et al.*, 1979; Fang & McCutchan, 2002; Fang *et al.*, 2004). A third type, the O-type rDNA (oocyst), has been described in the human malaria parasite *Plasmodium vivax*, whose synthesis takes place in ookinetes inside the mosquito's gut (Li *et al.*, 1997). Comprehensive reviews of rRNA genes from *Plasmodium* describe in detail the characteristic organization and function of these genes (Waters, 1994; McCutchan *et al.*, 1995). Other *Apicomplexa* species

with a similar rDNA organization are described in Table 4, as well as the non-*Apicomplexa* red alga *C. merolae*. This organism has only three unlinked rDNA units in two different chromosomes, with similar rRNA coding sequences (Matsuzaki *et al.*, 2004).

### Telomeric rDNA

The microsporidian obligate intracellular parasite *E. cuniculi* has 22 rDNA units located as single copies in all telomeres of its 11 chromosomes (Brugère *et al.*, 2000). *Candida albicans* rDNA is found in two subtelomeric loci (Dujon *et al.*, 2004),



**Fig. 2.** Different organization of tandem head-to-tail rDNA repeats in microbial eukaryotes. (a) *Eimeria tenella* (Apicomplexa) exemplifies microbial eukaryotes with the typical rDNA organization. (b, c) rDNA copies in *Saccharomyces cerevisiae* (Ascomycota) and *Toxoplasma gondii* (Apicomplexa) are linked to the 5S rDNA (green), but in opposite polarities. Intergenic short direct repeats present in *S. cerevisiae* are shown as colored bars (see also Table 3). (d) In *Giardia intestinalis* (Diplomonadida), a 32-kDa antigenic protein (dark blue arrow) is coded in the complementary rDNA strand. (e) In *Acanthamoeba castellanii* (Acanthamoebidae), the mature eLSU rRNA is fragmented into three molecules: 5.8S, 26Sa (2.4 kb) and 26Sb (2 kb); the IGR contains six repeats of a 140-bp element (R, aqua boxes). (f, g) In *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania major* (kinetoplastids), the eLSU rRNA is fragmented into seven molecules. The *T. cruzi* IGR contains a 172-bp repeated sequence (orange boxes). In *Leishmania* spp., the IGR is characterized by the presence of multiple repeated units (yellow). *Leishmania major* Friedlins ε region is duplicated once. Drawings are not to scale. The size of rDNA units is shown in Table 1. Arrows show the polarity of transcription.

while *Yarrowia lipolytica* and *Giardia intestinalis* rDNA units are positioned in seven and six subtelomeric loci, respectively (Le Blancq *et al.*, 1991; Dujon *et al.*, 2004). The *G. intestinalis* chromosome I varies 5–20% in size due to subtelomeric rearrangements including variations in rDNA copy number and size (Hou *et al.*, 1995), while some subtelomeric rDNA copies are linked to transcriptional gene units, including protein-coding genes such as ankyrin. Some of these regions may also hold incomplete rDNA sequences (Upcroft *et al.*, 2005). Interestingly, fragments of the rDNA unit are found in all chromosomal ends in *D. discoideum*. These regions encode complex repeated sequences (transposable elements–rDNA junctions) that generate novel telomeric structures (Eichinger *et al.*, 2005).

The subtelomeric localization of rDNA sequences as those found in *E. cuniculi*, *D. discoideum* and *G. intestinalis* suggests a physiological role for these elements. Telomeres have an ordered structure in the nucleus and can be clustered or associated with the nuclear matrix, at least in

some stage during the life cycle (Pryde *et al.*, 1997). Telomeres are regions of great plasticity within a heterochromatic context, with dynamics that allow for the amplification and/or variation in the number of telomeric genes and repeated sequences. It is not known whether subtelomeric rDNA is involved in the maintenance of the characteristic telomeric structure or whether the rDNA exploits this particular structure to regulate its expression and to maintain the sequence and copy number (Pryde *et al.*, 1997).

### rDNA may be located extrachromosomally

Extrachromosomal rDNA has been found in ciliates, cellular and plasmodial slime molds and in yeasts (Table 5). The polyploid somatic macronucleus of the ciliate *T. thermophila* contains about 9 000 copies of a palindromic self-replicating linear minichromosome, which codes for two rDNA units (Fig. 4a and Table 5). The IGR of this palindrome contains six types of repeated sequences (Fig. 4a and

**Table 2.** Organisms with typical rDNA organization

Organism	Localization	IGS repeated elements	5S linkage	References
<b>Excavata</b>				
<i>Crithidia fasciculata</i>		Yes	X	Schnare et al. (2000)
<i>Leishmania</i> spp.	1Ch, 1L	Yes	X	Uliana et al. (1996), Yan et al. (1999), Martínez-Calvillo et al. (2001), Orlando et al. (2002), de Andrade Stempluk & Floeter-Winter (2002)
<i>Trypanosoma brucei</i>	4Ch	X	X	Hasan et al. (1984), Melville et al. (1998)
<i>Trypanosoma cruzi</i>	≥ 2Ch	Yes	X	Hernández et al. (1993)
<i>Giardia</i> spp.	6L (intestinalis)	intestinalis and muris	X	Edlind & Chakraborty (1987), Boothroyd et al. (1987), van Keulen et al. (1992), Upcroft et al. (1994)
<i>Trichomonas tenax</i>		X	X	Torres-Machorro et al. (2009)
<i>Trichomonas vaginalis</i>	1Ch, 1L	X	X	López-Villaseñor et al. (2004), Torres-Machorro et al. (2009)
<i>Tritrichomonas foetus</i>	1Ch, 1L	X	X	Torres-Machorro et al. (2009)
<b>Chromalveolates</b>				
<i>Eimeria tenella</i>	1Ch, 1L	X	X	Shirley (2000)
<i>Toxoplasma gondii</i>		X	Sense	Guay et al. (1992)
<b>Amoebozoa</b>				
<i>Acanthamoeba castellanii</i>		Yes	X	D'Alessio et al. (1981), Yang et al. (1994)
<b>Opisthokonta</b>				
<i>Hansenula polymorpha</i>		X	Linked	Klabunde et al. (2002)
<i>Kluyveromyces lactis</i>	1Ch, 1L	X	Antisense	Verbeet et al. (1984)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	1Ch, 1L	Yes	Antisense	Rubin & Sulston (1973), Skryabin et al. (1984), Srivastava & Schlessinger (1991), Dujon et al. (2004), Kim et al. (2006)
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	1Ch, 2L	X	X	Schaak et al. (1982), Wood et al. (2002)
<i>Torulopsis utilis</i>		X	Antisense	Tabata (1980)
<i>Yarrowia lipolytica</i>	7L	Yes	X	van Heerikhuizen et al. (1985)
<i>Nosema apis</i>		X	Sense	Gatehouse & Malone (1998), Iiyama et al. (2004)

IGS, intergenic spacer; X, not identified or not present; Ch, chromosome; L, locus or loci.

Table 3). The rDNA organization in *Tetrahymena pyriformis* is similar to the *T. thermophila* rDNA palindrome, with variations in the intergenic repeated motifs (Tables 3 and 5).

*Dictyostelium discoideum* and *Physarum polycephalum* rDNA is also encoded in palindromic extrachromosomal molecules (Fig. 4 and Table 5). Both rDNA minichromosomes contain several repeated sequence elements (Table 3). In the *D. discoideum* rDNA palindrome, two 5S rDNA copies are present near the telomeric ends, in the same polarity as the rDNA unit (Fig. 4b) (Cockburn et al., 1978). Additionally, a single rDNA palindrome is located in chromosome IV (Sucgang et al., 2003). Even though *D. discoideum* has six chromosomes, a seventh 'chromosome' can be observed in some chromosomal spreads. This additional 'chromosome' corresponds to a chromosome-sized cluster of palindromic rDNA minichromosomes (Sucgang et al., 2003), which suggests a physical interaction of the extrachromosomal rDNA. This particular organization may play a role in the expression and segregation of mitotic rDNA.

Extrachromosomal linear molecules containing one rDNA unit are found in *Didymium iridis* (Fig. 4 and Table 5). Ciliates such as *Euplotes crassus* and *Glaucoma chattoni* have extrachromosomal rDNA copies in single gene-

sized linear molecules within the macronucleus with characteristic intergenic repeated elements (Tables 3 and 5). Finally, tandem rDNA genes in *Paramecium tetraurelia* can be found both in circular and in linear extrachromosomal molecules (Table 5), which can contain > 13 rDNA copies.

rDNA units coded in extrachromosomal circular plasmids may be found in Amoebozoa (*Entamoeba histolytica*) and Excavata (*E. gracilis* and *Naegleria gruberi*) (Fig. 5 and Table 5). The most-studied *E. histolytica* isolate HM-1:IMSS lacks an rDNA chromosomal copy (Bagchi et al., 1999) but possesses about 200 copies of an extrachromosomal circular molecule, with two inverted rDNA units and repeated sequences in the IGR (Table 3 and Fig. 5a). This molecule starts replication at multiple sites; the primary replication origins are located near the pol I promoters, but other replication origins found all the way through the circle are activated under stress conditions (Ghosh et al., 2003). Interestingly, a 0.7-kb RNA of unknown function is encoded in the upstream region of one rDNA unit (Bhattacharya et al., 1998) (Fig. 5a). Depending on the isolate, variations are found in the size and organization of the rDNA circular molecules: the 200:NIH *E. histolytica* isolate has a



**Table 3.** Repeated sequences in the ribosomal cistron intergenic spacer

Organism	Size of repeated sequences	Number of repeated sequences	Function	Intergenic region size (kb)	References
<b>Excavata</b>					
<i>Crithidia fasciculata</i>	19 bp	28			Schnare <i>et al.</i> (2000)
	55 bp*	4		3.5	
<i>Euglena gracilis</i>	14 bp, imperfect repeat	6			Greenwood <i>et al.</i> (2001)
	30 bp imperfect palindromes	2			
<i>Leishmania major</i>	63 bp	16–275		4–12	Martinez-Calvillo <i>et al.</i> (2001)
<i>Leishmania amazoniensis</i>	60 bp	35–70			Uliana <i>et al.</i> (1996)
<i>Leishmania chagasi</i>	64 bp	9	Enhancer-like		Gay <i>et al.</i> (1996)
<i>Leishmania infantum</i>	63 bp	40		4–12	Requena <i>et al.</i> (1997)
	LiR3 348 bp		Transcription termination?		
<i>Leishmania donovani</i>	64 bp	39		5.8	Yan <i>et al.</i> (1999)
	63 bp	12		4	
<i>Leishmania hoogstraali</i>	63 bp	40		5.5	Orlando <i>et al.</i> (2002)
<i>Trypanosoma cruzi</i>	172 bp	2–8			Pulido <i>et al.</i> (1996)
<i>Giardia intestinalis</i>	78 bp	2 in GS strain, 3 in GK strain	Recombination?		Upcroft <i>et al.</i> (1994)
<i>Giardia muris</i>	73 bp	Varies, 6 min			van Keulen <i>et al.</i> (1992)
<b>Chromalveolates</b>					
<i>Euplotes crassus</i>	I. ~30 bp IV. ~17 bp				Erbeznik <i>et al.</i> (1999)
<i>Glaucoma chattoni</i>	I. 32 bp (5')	3	Spacer promoter?		Challoner <i>et al.</i> (1985)
	II. 14–24 bp (5')	7	Enhancer?		
	III. 18 bp (5')	1			
	IV. 17 bp (3')	9	Termination?		
	V. 130 bp (3')	3	Gene packing?		
<i>Tetrahymena thermophila</i>	I. 32 bp (5')†	4	Spacer promoter?	1.9	Challoner <i>et al.</i> (1985)
	II. 20–21 bp (5')	13	Enhancer?		
	III. 20 bp (5')	7			
	430 bp (5')	4 (2 tandem in each chromosome half)	Replication, include type I and III repeats		
	IV. 17 bp (3')	5	Termination?		
	V. 130 bp (3')‡	4	Gene packing?		
<i>Tetrahymena pyriformis</i>	I. 33 bp (5')	3	Spacer promoter?		Challoner <i>et al.</i> (1985)
	II. 10–24 bp (5')	11	Enhancer?		
	III. 14–21 bp (5')	5			
	IV. 17 bp (3')	ND			
	V. 130 bp (3')	ND			
<i>Perkinsus andrewsi</i>	15 bp approximately	8			Coss <i>et al.</i> (2001)
<i>Pfiesteria piscicida</i>	9 bp				Saito <i>et al.</i> (2002)
<b>Amoebozoa</b>					
<i>Acanthamoeba castellanii</i>	106–174 bp	6	UBF binding	2.33	Yang <i>et al.</i> (1994)
<i>Dictyostelium discoideum</i>	29 bp (3') 5'	4			Sucgang <i>et al.</i> (2003)
<i>Entamoeba histolytica</i>	Dral 170 bp (3')	10	ARS-like sequences	9.2 (5')	Huber <i>et al.</i> (1989), Mittal <i>et al.</i> (1992), Bhattacharya <i>et al.</i> (1998)
	Scal 144 bp (3')	7		3.5 (3')	
	Scal 144 bp (5')	6			
	Pvul 145 bp (5')	11	Pathogenic-specific sequence		
	Hinfl 653 bp (5')¶	2 and 4	Recombination		
	74 bp (5')	2			
	Avall 153 bp (5')	5			
	1408 bp (5')	2			

**Table 3.** Continued.

Organism	Size of repeated sequences	Number of repeated sequences	Function	Intergenic region size (kb)	References
<i>Physarum polycephalum</i>	I. 130 bp (5')			≥22	Hattori <i>et al.</i> (1984)
	I'. 130 bp (3')				
	II. 50 bp (5')	16			
	II'. 52 bp (3')	6			
Opisthokonta					
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	I. 6 bp (5')	3		1.1 (5')	Skryabin <i>et al.</i> (1984)
	II. 16 bp (5')	2		1.25 (3')	
	III. 8 bp (5')	3			
	IV. 11 bp (3')	2			
	V. 9 bp (3')	2			
	VI. 9 bp (3')	2			
<i>Yarrowia lipolytica</i>	140–150 bp	Varies			van Heerikhuizen <i>et al.</i> (1985), Fournier <i>et al.</i> (1986)
	11 bp	14			
<i>Encephalitozoon cuniculi</i>	29 bp (5')	2			Peyretailade <i>et al.</i> (1998)
	19 bp (5')	8			
	51 bp (3')				
	43 bp (3')				

Repeated sequences may not be identical.

\*The 55-bp repeat has an internal repeated inverted sequence.

†Type I and III repetitions are within a 430-bp repeated segment involved in the replication of the minichromosome.

‡Inverted repeat.

§Two blocks of highly repetitive DNA bracket the transcribed region.

¶Polymorphic locus with a 65-bp internal inverted repeated sequence.

ND, not determined; UBF, upstream binding factor; IGS, intergenic spacer.

**Table 4.** Organisms with unlinked rDNA units

Organism	Copy number	Chromosomal localization and rDNA types	References
Chromalveolates			
<i>Babesia bigemina</i>	3		Reddy <i>et al.</i> (1991)
<i>Babesia bovis</i>	3	Two in chr III and one in chr IV	Dalrymple (1990), Brayton <i>et al.</i> (2007)
<i>Babesia canis</i>	4	Two in one chr and two in the other chr	Dalrymple <i>et al.</i> (1992)
<i>Cryptosporidium parvum</i>	5	3 tandem, 2 alone in different chr	Le Blancq <i>et al.</i> (1997)
<i>Theileria parva</i>	2	A and B units in different chr	Kibe <i>et al.</i> (1994), Bishop <i>et al.</i> (2000)
<i>Plasmodium berghei</i>	4	Type A in chr XII and VII; Type C in chr VI and V	Waters (1994)
<i>Plasmodium falciparum</i>	5–8	Subtelomeric: Type A in chr V and VII; Type S in chr XI and XIII	Langsley <i>et al.</i> (1983), Mercereau-Pujalon <i>et al.</i> (2002), Gardner <i>et al.</i> (2002)
<i>Plasmodium lophurae</i>	6 (7–9)		Unnasch & Wirth (1983)
<i>Plasmodium vivax</i>	7	A, S and O rDNA types	van Spaendonk <i>et al.</i> (2000)
Plantae			
<i>Cyanidioschyzon merolae</i>	3	3 different loci, two in chr XVII and one in chr XVIII	Maruyama <i>et al.</i> (2004)

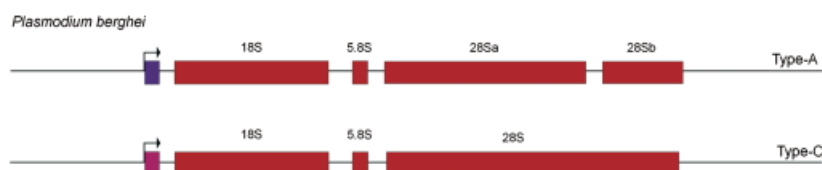
Chr, chromosome.

palindromic circular organization (25.9 kb), while the HK-9 (15.3 kb) and the Rahm (18.3 kb) isolates possess single rDNA units in their circular extrachromosomal molecules (Sehgal *et al.*, 1994; Bhattacharya *et al.*, 1998).

Most *E. gracilis* rDNA is found in extrachromosomal circular molecules that code for a single rDNA unit (Fig. 5b and Table 5). The whole *E. gracilis* rDNA circle is transcribed, suggesting a read-around transcription without the

need for transcriptional terminators (Greenwood *et al.*, 2001). *Naegleria gruberi* rDNA plasmid contains two ORFs: a large one downstream of the 28S rRNA (similar to a homing endonuclease gene, HE gene) and a short one that codes for a hypothetical protein (Maruyama & Nozaki, 2007) (Fig. 5c and Table 5).

The yeast *C. albicans* possesses both chromosomal and extrachromosomal rDNA. About 200 copies in tandem,



**Fig. 3.** rDNA organization in *Plasmodium berghei*. Four unlinked rDNA copies are coded in the telomeres of *P. berghei*. Type-A rDNAs contain a mature eLSU rRNA fragmented into three molecules (5.8S, 28Sa and 28Sb) and are expressed during the asexual stage in vertebrate hosts. Type-C rDNAs (with a nonfragmented 28S rRNA) are expressed during the sexual development in mosquitoes. The differential expression of rDNAs is regulated by specific promoter sequences (purple and pink boxes). Drawings are not to scale. The size of rDNA units is shown in Table 1.

**Table 5.** Extrachromosomal rDNA units

Organism	Lineal/ circular	Size	Organization	Copy number	Additional copies in chromosome	References
<b>Excavata</b>						
<i>Euglena gracilis</i>	C	11.5 kbp	Single	800–4000	4	Ravel-Chapuis (1988), Schnare <i>et al.</i> (1990)
<i>Naegleria gruberi</i>	C	14 kbp	Single	300–5000	None	Clark & Cross (1987)
<b>Chromalveolates</b>						
<i>Euplotes crassus</i>	L	7 kbp	Single gene		MIC	Erbeznik <i>et al.</i> (1999)
<i>Glaucoma chattoni</i>	L	9.3 kbp	Single gene		MIC	Katzen <i>et al.</i> (1981), Challoner <i>et al.</i> (1985)
<i>Nyctotherus ovalis</i>	L		Single gene		MIC	Ricard <i>et al.</i> (2008)
<i>Oxytricha fallax</i>	L	7.49 kbp	Single gene		MIC	Rae & Spear (1978), Swanton <i>et al.</i> (1982)
<i>Oxytricha nova</i>	L	7.49 kbp	Single gene		MIC	Swanton <i>et al.</i> (1982)
<i>Paramecium tetraurelia</i>	C and L	*	Tandem		MIC	Findly & Gall (1978)
<i>Stylonychia mytilus</i>	L		Single gene		MIC	Lipps & Steinbrück (1978)
<i>Tetrahymena pyriformis</i>	L		Palindrome	200/haploid MAC	1	Engberg <i>et al.</i> (1976), Yao & Gall (1977), Niles <i>et al.</i> (1981)
<i>Tetrahymena thermophila</i>	L	21 kbp	Palindrome	9000 MAC		Engberg (1985), Eisen <i>et al.</i> (2006)
<b>Amoebozoa</b>						
<i>Dictyostelium discoideum</i>	L	88 kbp	Palindrome	90	1 Palindrome	Cockburn <i>et al.</i> (1978), Hofmann <i>et al.</i> (1993), Eichinger <i>et al.</i> (2005)
<i>Didymium iridis</i>	L	20 kbp	Single			Johansen <i>et al.</i> (1992)
<i>Entamoeba histolytica</i>	C	24.5 kbp	Palindrome	200/haploid	None	Huber <i>et al.</i> (1989), Bhattacharya <i>et al.</i> (1998), Bagchi <i>et al.</i> (1999)
<i>Physarum polycephalum</i>	L	> 60 kbp	Palindrome	$1 \times 10^{11}$		Vogt & Braun (1976), Campbell <i>et al.</i> (1979)
<b>Opisthokonta</b>						
<i>Candida albicans</i>	C and L	1.2 Mbp	Tandem	100	200	Huber & Rustchenko (2001)

\*The size depends on the number of rDNA repeats.

MAC, macronucleus; MIC micronucleus.

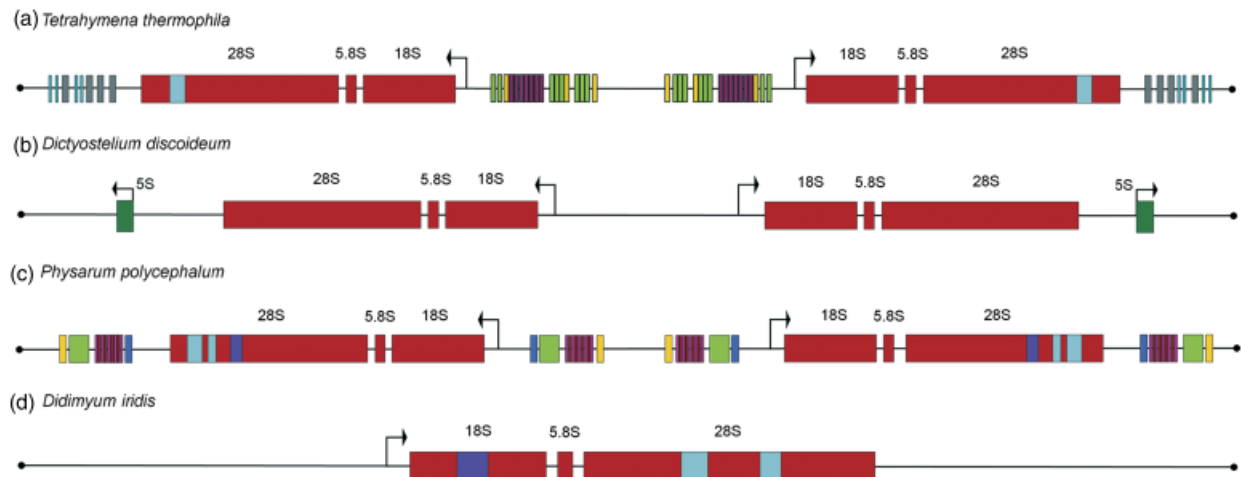
varying in size, are present in chromosome R while roughly 100 copies are found in an ~1.2 Mbp autonomously replicating circle. Some rDNA sequences are also found in 50–150-kbp linear molecules (Huber & Rustchenko, 2001).

rDNA plasmids have only been observed in old *S. cerevisiae* cell cultures. During the aging process, the tandem rDNA copies are excised from the chromosome and replicate autonomously. The accumulation of rDNA circles leads to yeast sterility and shortening of the life span. An association between rDNA locus instability and loss of

epigenetic silencing has also been observed (Sinclair & Guarente, 1997).

### The ribosomal cistron: the coding region

The typical eukaryotic rDNA coding region is composed of the 18S, 5.8S and 28S rRNA coding sequences separated by ITS-1 and ITS-2. The rDNA coding sequence consists of a common core of domains that may be interspersed with a distinct set of variable regions (also called expansion



**Fig. 4.** Linear extrachromosomal rDNA units in microbial eukaryotes. (a) rDNA is coded in extrachromosomal linear palindromes in *Tetrahymena thermophila*. Two head-to-head rDNA units are coded in a macronuclear minichromosome that contains typical telomeric sequences (black dots). Upstream and downstream IGRs contain various types of repeated sequences (colored bars; see also Table 3). A group I intron (blue square) is found within the eLSU rRNA. (b) The rDNA and 5S rDNA in *Dictyostelium discoideum* are linked and coded in extrachromosomal linear palindromes containing telomeres (black dots). (c) rDNA in *Physarum polycephalum* is coded in palindromic head-to-head units in a minichromosome with various repeated sequences both in the 5' and 3' IGRs (see also Table 3). The eLSU rRNA is interrupted by two group I introns (blue squares), and a third group I intron that includes an HE gene (purple square). (d) In *Didymium iridis* the rDNA is coded in linear minichromosomes containing one rDNA unit. The SSU rRNA contains a twintron (purple box) and two group I introns are found within the 28S rRNA (blue boxes). Drawings are not to scale. The size of rDNA units is shown in Table 1. Arrows show the polarity of transcription.

segments; Dover, 1988). Ten and 18 variable regions have been identified in the SSU and LSU rRNAs of all organisms (Raué *et al.*, 1988). Three types of sequence insertions have been found within these variable regions: (1) expansion segments, encoding RNA sequences conserved in the mature molecule; (2) group I introns, located within highly conserved regions and removed after transcription; and (3) transcribed spacers, sequences removed from the mature rRNA, thus producing fragmented eLSU rRNA molecules (Clark *et al.*, 1984). *Babesia bovis* (Dalrymple *et al.*, 1992), *Cryptosporidium parvum* (Le Blancq *et al.*, 1997), *D. discoideum* (Frankel *et al.*, 1977), *E. histolytica* (Huber *et al.*, 1989), *G. intestinalis* (Healey *et al.*, 1990), *K. lactis* (Verbeet *et al.*, 1984), *S. cerevisiae* (Bell *et al.*, 1977), *Toxoplasma gondii* (Gagnon *et al.*, 1996) and *T. vaginalis* (López-Villaseñor *et al.*, 2004) are microbial eukaryotes with the typical rDNA organization of the coding region (Fig. 2a–e).

### Insertions of expansion segments in the SSU

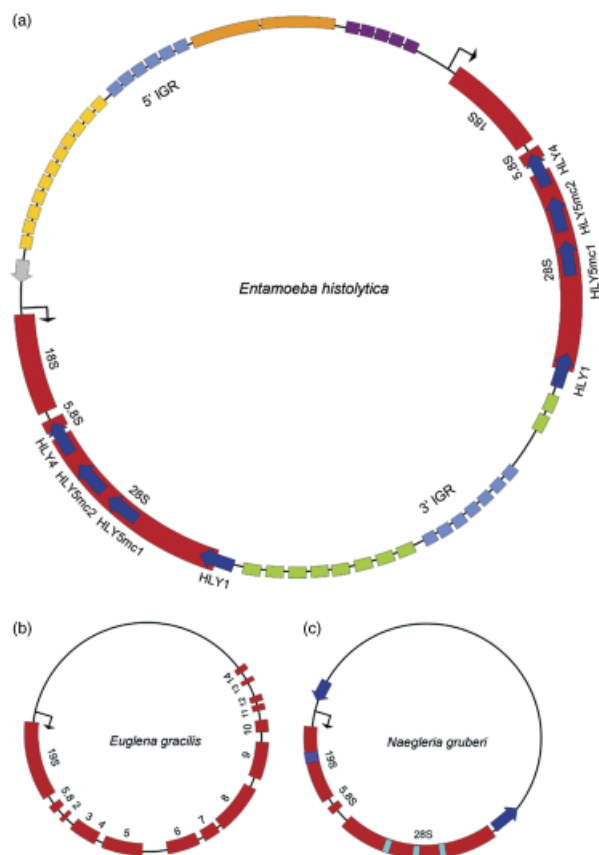
The average length of eukaryotic SSU rRNA is 2 kb. Unusually long SSU rRNAs have been found in *Pelobionta* (*Pelomyxa palustris*), *Foraminifera* (*Hemisphaerammina bradyi*) and *Euglenozoa* (*Distigma sennii*) (Table 6). The longest SSU rRNA known is found in the Euglenid *D. sennii*, comprising > 4.5 kb. In most cases, the insertions are found in the SSU rRNA variable regions V2, V4 and V7. The only exceptions are an extended V5 region in

*A. castellanii* and an expansion in a nonvariable region in *P. palustris* (Gunderson & Sogin, 1986; Milyutina *et al.*, 2001). The rRNA variable regions are located in the mature ribosome surface and their evolutionary implications are unknown (Katz & Bhattacharya, 2006).

### Group I introns and twintrons

Group I introns can be found as insertions in the SSU and eLSU rRNA coding regions that are removed from the mature molecule by means of a self-splicing reaction (Einvik *et al.*, 1998), generating a completely functional rRNA molecule (Mandal, 1984). The ribozymes encoded in group I introns have conserved secondary structures of 10 base-paired segments, as well as some additional paired segments depending on the intron subclass (Michel & Westhof, 1990). The splicing reaction initiates with a nucleophilic attack of a guanosine cofactor at the 5' splice site and, after two sequential transesterification reactions, the exons are ligated and the RNA intron is removed (Einvik *et al.*, 1998).

Group I introns are widely distributed in nature and can be found in bacteria, mitochondrial and chloroplast genomes, and in the eukaryotic nucleus (Johansen *et al.*, 2007). Group I introns may interrupt the SSU rRNA coding sequence in 40 distinct conserved sites of several microbial eukaryotes (Jackson *et al.*, 2002) such as *Acanthamoeba griffini* and the green alga *Characium saccatum*. These introns may also be present in the eLSU rRNA, as is the case



**Fig. 5.** Circular extrachromosomal rDNA units in microbial eukaryotes. (a) In *Entamoeba histolytica* extrachromosomal self-replicating molecules encode two palindromic rDNA units (red). The upstream and downstream IGRs contain several repeated sequences (coloured boxes, detailed in Table 3). The 5' IGR also encodes a 0.7-kb mRNA (grey arrow). In the HM1 strain, four hemolysine virulence proteins (HLYs) are coded within the rRNA coding region, in antisense orientation relative to the rRNA coding strand (navy blue arrows). (b) In *Euglena gracilis* the rDNA is coded in circular plasmids and the eLSU is fragmented in 14 segments. (c) The *Naegleria gruberi* rDNA plasmid encodes one rDNA unit containing one twintron in 18S rRNA (purple box) and three type-I introns in the eLSU rRNA (blue boxes). The IGR contains two ORFs (dark blue arrows). Black arrows show the polarity of transcription.

for *P. falciparum* A-type eLSU rRNA and the 26S rRNA of some *Tetrahymena* isolates (Fig. 4a, Table 7). It is interesting that some organisms may have both the SSU and the eLSU rRNAs interrupted by group I introns (e.g. *P. carinii*, *Chlorella ellipsoidea* and *D. iridis*, Fig. 4d). Table 7 describes some of the introns found in the rDNA of several microbial eukaryotes.

Twintrons are more complex insertions in the rDNA that consist of two group I introns (ribozymes) and an ORF encoding an HE (Einvik *et al.*, 1998; Johansen *et al.*, 2007). The *D. iridis* and *N. gruberi* SSU twintrons contain a small ribozyme (GIR1), followed by the HE ORF inserted into a second ribozyme (GIR2). Two different isolates of *D. iridis*

**Table 6.** Variations in the size of the SSU rRNA due to insertions

Organism	SSU size (kb)	References
Excavata		
<i>Astasia curvata</i>	2.56	Busse & Preisfeld (2002)
<i>Astasia torta</i>	2.9	Busse & Preisfeld (2002)
<i>Distigma curvatum</i>	3.4–3.7	Busse & Preisfeld (2002)
<i>Distigma elegans</i>	3.9	Busse & Preisfeld (2002)
<i>Distigma sennii</i>	4.5	Busse & Preisfeld (2002)
<i>Pleoetia costata</i>	2.4	Busse & Preisfeld (2003)
<i>Euglena gracilis</i>	2.3	Gunderson & Sogin (1986)
Amoebozoa		
<i>Acanthamoeba castellanii</i>	2.3	Gunderson & Sogin (1986)
<i>Acanthamoeba griffini</i>	2.9	Gast <i>et al.</i> (1994)
<i>Acanthamoeba lenticulata</i>	3	Schroeder-Diedrich <i>et al.</i> (1998)
<i>Pelomyxa palustris</i>	3.5	Milyutina <i>et al.</i> (2001)
<i>Phreatamoeba balamuthi</i>	2.74	Hinkle <i>et al.</i> (1994)
<i>Entamoeba histolytica</i>	2.3	Loftus <i>et al.</i> (2005)
Plantae		
<i>Ankistrodesmus stipitatus</i>	2.2	Dávila-Aponte <i>et al.</i> (1991)
Rhizaria		
<i>Foraminifera</i>	2.3–4	Katz & Bhattacharya (2006)

have two types of introns, containing an HE gene in both polarities relative to the SSU rRNA gene (Fig. 6) (Johansen *et al.*, 2007). The twintron contains the HE ORF (I-DirI) in the same polarity as the 18S rRNA coding region. GIR2 is a self-splicing ribozyme that releases the HE transcript. A second intron encoding a ribozyme (GIR1) is also found within the twintron. GIR1 modifies the 5' end of the HE transcript to form a 2'5' cap that increases its translational efficiency (Fig. 6a) (Einvik *et al.*, 1998; Johansen *et al.*, 2007). In contrast, the intron II contains an HE gene (I-DirII) in opposite polarity relative to the SSU rRNA and ribozyme-coding sequences (Johansen *et al.*, 2006). Transcription of I-DirII is established from a pol II-like promoter located immediately upstream of the HE gene (Fig. 6b) (Johansen *et al.*, 2006). Both *D. iridis* HE transcripts are processed through the nuclear spliceosomal complex to remove a 50-nt noncoding spliceosomal intron, found within the HE coding sequences, and are polyadenylated (Vader *et al.*, 1999; Johansen *et al.*, 2007).

*Physarum polycephalum* eLSU rDNA contains an optional group I intron holding an HE gene (Ruoff *et al.*, 1992). The full-length RNA intron can be excised or alternatively processed (immediately downstream of the HE gene) to produce a smaller transcript. Only the full-length RNA intron (lacking a 5' cap and a poly-A tail) is translated into the HE I-PpoI protein (Ruoff *et al.*, 1992). The cleavage of this transcript in the internal processing site seems to downregulate HE I-PpoI expression by decreasing the stability of the transcript in yeast transintegrated introns (Johansen *et al.*, 2007). Table 7 summarizes rDNA group I introns and HE gene insertions.

**Table 7.** Group I rDNA introns

Organism	Location	Number of introns	Size	HE gene	References
<b>Excavata</b>					
<i>Ploeotia costata</i>	SSU rRNA	1	494 bp		Busse & Preisfeld (2003)
<i>Naegleria gruberi</i>	SSU rRNA	1		I-NgrI	Wikmark <i>et al.</i> (2006)
	LSU rRNA	3			Einvik <i>et al.</i> (1998)
<b>Chromalveolates</b>					
<i>Plasmodium falciparum</i>	LSU rRNA	1		*	Langsley <i>et al.</i> (1983)
<i>Tetrahymena pigmentosa</i>	LSU rRNA	1	400 bp		Wild & Gall (1979)
<i>Tetrahymena thermophila</i>	LSU rRNA	1	370–410 bp		Sogin <i>et al.</i> (1986)
<b>Amoebozoa</b>					
<i>Acanthamoeba griffini</i>	SSU rRNA	1	519 bp		Gast <i>et al.</i> (1994)
<i>Acanthamoeba lenticulata</i>	SSU rRNA	1	656 bp		Gast <i>et al.</i> (1994)
<i>Didymium iridis</i>	SSU rRNA	1	1.43 kbp	I-DirI <sup>†</sup>	Johansen & Vogt (1994), Johansen <i>et al.</i> (2006), Johansen <i>et al.</i> (2007)
	LSU rRNA	2	688 and 573 bp		Johansen <i>et al.</i> (1992)
<i>Physarum polycephalum</i>	LSU rRNA	3	0.7, 0.6 and 0.94 kbp	I-Ppol <sup>‡</sup>	Ruoff <i>et al.</i> (1992), Johansen <i>et al.</i> (2007)
<b>Plantae</b>					
<i>Ankistrodesmus stipitatus</i>	SSU rRNA	1	334 bp		Dávila-Aponte <i>et al.</i> (1991)
<i>Characium saccatum</i>	SSU rRNA	1	477 bp		Wilcox <i>et al.</i> (1992)
<i>Chlorella ellipsoidea</i>	SSU rRNA	1	442 bp		Aimi <i>et al.</i> (1994)
	LSU rRNA	1	445 bp		Aimi <i>et al.</i> (1993)
<i>Dunaliella parva</i>	SSU rRNA	2	381 and 419 bp		Van Oppen <i>et al.</i> (1993), Wilcox <i>et al.</i> (1992)
<i>Dunaliella salina</i>	SSU rRNA	1 <sup>§</sup>	397/8 bp		Van Oppen <i>et al.</i> (1993), Wilcox <i>et al.</i> (1992)
<b>Opisthokonta</b>					
<i>Candida albicans</i>	LSU rRNA	1	379 bp		Miletti-González & Leibowitz (2008)
<i>Pneumocystis carinii</i>	SSU rRNA	1	390 bp		Sogin & Edman (1989)
	LSU rRNA	1			Lin <i>et al.</i> (1992), Liu <i>et al.</i> (1992)
<i>Histoplasma capsulatum</i>	SSU rRNA	1	403–425 bp		Okeke <i>et al.</i> (1998), Lasker <i>et al.</i> (1998)
<i>Nosema bombycis</i>	SSU rRNA	1			Iiyama <i>et al.</i> (2004)

\*Only in one of the eight LSU rRNA copies.

<sup>†</sup>Depends on the isolate.

<sup>‡</sup>Coded in the 0.94-kbp intron.

<sup>§</sup>Can have two types of intron differing in sequence.

## The ITS-1 and -2

The rDNA transcript is generally post-transcriptionally processed in three rRNA mature molecules: 18S, 5.8S and 28S rRNAs that result from elimination of ETS, ITS-1 and ITS-2 from the precursor transcript (Fig. 1). In microbial eukaryotes, ITS-1 ranges from 100 to 400 bp, while ITS-2 is 200–500 bp. Unusually long ITSs are found in the red alga *C. merolae* (Maruyama *et al.*, 2004), where ITS-1 and ITS-2 average sizes are 862 and 1738 bp, respectively. *Euglena gracilis* has the largest known ITS-1, 1188 bp in length (Schnare *et al.*, 1990). The dinoflagellate *Cochlodinium polykrikoides* ITS-1 contains a 101-bp sequence in six tandem repeats, resulting in an ITS-1 length of 813 bp (Ki & Han, 2007). *Yarrowia* and *Giardia* have the shortest known ITSs in microbial eukaryotes: the sum of ITS-1 and ITS-2 lengths in *Y. lipolytica* is only 150 bp (van Heerikhui-

zen *et al.*, 1985), while the *G. intestinalis* ITS-1 and ITS-2 are 37 and 52 bp in length, respectively (Boothroyd *et al.*, 1987). Some *Microsporidia* species completely lack the ITS-2 (Fig. 7) (Vossbrinck & Woese, 1986), as discussed below. The biological relevance of the ITSs' length and the presence of internal repeats are currently unknown, although their sequence has been useful in molecular phylogenetic studies of closely related species.

## Additional ITSs generate fragmented eLSU rRNA

Some microbial eukaryotes process the pre-rRNA into more than three mature molecules due to the presence of additional ITSs. Well-known examples of fragmented rRNA are found among kinetoplastids, with the eLSU rRNA fragmented in seven molecules. The nomenclature of these rRNAs varies according to the organism, the size of the rRNA

molecule and the position in the coding region. The eLSU rRNA of *Leishmania* spp. is fragmented into seven elements, which are cotranscribed in the pre-rRNA and processed by exo- and endonucleolytic activities to produce the functional eLSU fragments: 5.8S, LSU $\alpha$ ,  $\gamma$ , LSU $\beta$ ,  $\delta$ ,  $\zeta$  and  $\epsilon$  (Martínez-Calvillo *et al.*, 2001) (Fig. 2g). *Trypanosoma cruzi* and *Crithidia fasciculata* also code for an eLSU rRNA fragmented into seven elements: 5.8S, 24S $\alpha$ , S1, 24S $\beta$ , S2, S6 and S4 in *T. cruzi* (Fig. 2f) (Hernández *et al.*, 1988), and rRNAs 5.8S, c, d, e, f, g and j in *C. fasciculata* (Spencer *et al.*, 1987).

Processing of the eLSU rRNA into several fragments has also been found in nonkinetoplastid eukaryotes (e.g. *P. berghei* and *Plasmodium chabaudi* blood stages and *A. castellanii*) (D'Alessio *et al.*, 1981; da Silveira & Mercereau-Puijalon, 1983; Johansen *et al.*, 1992) (Figs 2e and 3). *Euglena gracilis* has the most fragmented eLSU rRNA currently known with 14 mature molecules that result from

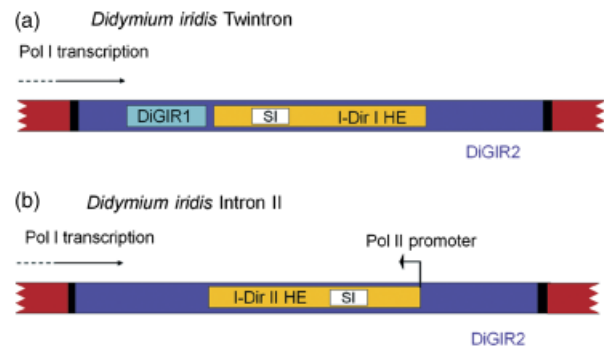
the processing of 14 ITSs (ITS-1 to ITS-14, Fig. 5b) (Schnare *et al.*, 1990).

### Protein-coding regions within the rDNA coding region

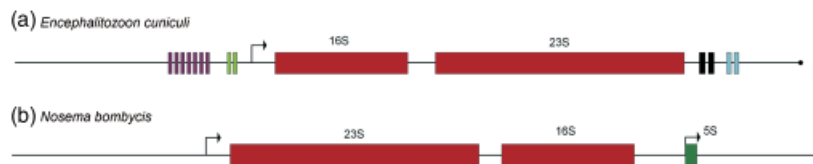
A correlation has been observed between the virulence of *E. histolytica* isolates and the sequence composition of the rDNA circular molecule described above (Clark & Diamond, 1991; Zindrou *et al.*, 2001). Virulence associates with the striking presence of genes encoding hemolysins (proposed as virulence factors) within and overlapping the rRNA coding sequence, but in opposite polarity. Three hemolysins overlap with the eLSU coding region, while the fourth (HLY4) is coded in the ITS-1 between the SSU and 5.8S rRNAs (Jansson *et al.*, 1994) (Fig. 5a). In *G. intestinalis*, a gene coding for a 32-kDa flagellum antigen has been identified in the rDNA IGR that overlaps the 3' region of the 28S rRNA (Fig. 2d). The motif that directs transcription of this gene seems to be a hybrid pol II/pol III promoter (Upcroft *et al.*, 1990).

### Unusual rDNA coding regions

*Microsporidia* are obligate intracellular eukaryotes that possess many prokaryotic characteristics in their rRNA genes (Weiss, 2001). The rDNA units are smaller than the standard eukaryotic size and lack the ITS-2; consequently, the 5.8S rRNA is fused to the 5' region of the 28S rRNA, as is found in bacteria (Vossbrinck & Woese, 1986) (Fig. 7). *Microsporidia* are the only eukaryotes known to lack an individual 5.8S rRNA molecule (e.g. *E. cuniculi* and *Vairimorpha necatrix* (Vossbrinck & Woese, 1986; Peyretailade *et al.*, 1998). The relevance of this eukaryotic 5.8S–28S rRNA fusion is unknown. In addition to these characteristics, *Nosema bombycis* and *Nosema spodopterae* have an unusual rDNA gene organization (Huang *et al.*, 2004; Iiyama *et al.*, 2004; Tsai *et al.*, 2005) because the LSU rRNA is coded and transcribed upstream to the SSU rRNA (Fig. 7b) in contrast to the almost universal order of the rRNA coding regions (Fig. 1).



**Fig. 6.** Group I introns that contain an HE gene. (a) Twintron present in *Didymium iridis*: the DiGIR2 intron (purple) is encoded in the SSU rRNA and transcribed by pol I as part of the pre-rRNA; it self-splices to generate the HE pre-mRNA (splicing sites are represented as black bars). Subsequently, DiGIR1 intron (blue) self-splices and processes the I-Dir I HE pre-mRNA in the 5' side, producing a 2'5'-cap. The I-Dir I HE pre-mRNA is additionally processed by the removal of spliceosomal intron SI (white box) and polyadenylation of the 3' side to generate a functional I-Dir I HE mRNA (yellow region). (b) Intron II present in *D. iridis*: the I-Dir II HE rRNA found within the DiGIR2 intron is coded in antisense orientation and is transcribed from a pol II promoter. The HE pre-mRNA is processed by pol II-associated factors to generate a typical 5'-cap and a 3' polyadenylated tail. The spliceosomal intron SI is removed by the spliceosome machinery.



**Fig. 7.** Unusual rDNA organization in *Microsporidia*. *Microsporidia* lack a 5.8S rRNA mature molecule and the typical 5.8S rRNA sequence is fused to the 23S rRNA. (a) Single telomeric rDNA units are surrounded by different repeated sequences in *Encephalitozoon cuniculi* (see also Table 3) and the rDNA lacks ITS-2. (b) Some *Nosema* species have an atypical rDNA coding organization, with the LSU rRNA coded upstream of the 16S rRNA. The typical 5.8S rRNA sequence is fused to the 23S rRNA and the 5S rDNA is linked to the rDNA unit.

**Table 8.** Variability found in the rDNA

Organism	rDNA types*	Localization of variability	References
<b>Chromalveolates</b>			
<i>Babesia bigemina</i>	2	IGR and SSU coding region	Reddy <i>et al.</i> (1991), Dalrymple <i>et al.</i> (1992)
<i>Babesia bovis</i>	A, B and C	ITS and SSU coding region	Laughery <i>et al.</i> (2009)
<i>Cryptosporidium parvum</i>	At least 2	ITS and coding region	Le Blancq <i>et al.</i> (1997), Spano & Crisanti (2000)
<i>Plasmodium berghei</i>	A and C	IGR, promoter and coding regions	Waters (1994)
<i>Plasmodium falciparum</i>	A and S	IGR, promoter and coding regions	Waters (1994)
<i>Plasmodium vivax</i>	A, S and O	IGR, promoter and coding regions	Li <i>et al.</i> (1997)
<i>Theileria parva</i>	2	ITS and LSU coding region	Bishop <i>et al.</i> (2000)
<i>Toxoplasma gondii</i>		IGR and SSU coding region	Fazaeli <i>et al.</i> (2000)
<i>Oxytricha fallax</i>	2	LSU coding region	Doak <i>et al.</i> (2003)
<i>Paramecium tatraurelia</i>	6 MAC/ 4 MIC	IGR	Preer <i>et al.</i> (1999)
<i>Perkinsus andrewsi</i>	A and B	IGR and coding regions	Pecher <i>et al.</i> (2004)
<b>Plantae</b>			
<i>Dunaliella salina</i>	2	Group I introns	Wilcox <i>et al.</i> (1992)
<b>Opisthokonta</b>			
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>		IGR	Skryabin <i>et al.</i> (1984), Jemtland <i>et al.</i> (1986)
<i>Candida albicans</i>	2	Intron-containing and intronless LSU	Miletti-González & Leibowitz (2008)
<i>Yarrowia lipolytica</i>	2–5	IGR	van Heerikhuizen <i>et al.</i> (1985), Fournier <i>et al.</i> (1986), Clare <i>et al.</i> (1986)
<i>Nosema apis</i>	At least 3	IGR	Gatehouse & Malone (1998)
<i>Nosema bombi</i>	At least 2	ITS	O'Mahony <i>et al.</i> (2007)

\*The number or names of the rDNA types for each species are shown. IGR, intergenic region; MAC, macronucleus; MIC, micronucleus.

### Different rDNA genes may be found within an organism

As has been mentioned, the rRNA genes within one organism are generally conserved in the coding region with an occasional sequence variation in the IGRs and with little variation in the coding sequences. Sequence variability in the IGRs may result from sequence divergence or disparity in the number of repeated sequences, involved in both up- and downregulation of rDNA transcription. Therefore, the heterogeneous composition of rDNA units may influence rDNA expression. Sequence divergence in the coding region and/or IGR within the same organism has led to a classification of rDNA units. For example, different types of rDNA may be found in *Paramecium*, *Y. lipolytica* and the *Apicomplexa* group. A detailed description of this variability is included in Table 8.

### The 5S rDNA

The organization of the 5S rDNA is simpler than that of the rDNA. Most 5S rDNAs are found in tandem head-to-tail repeats consisting of a conserved ~120-bp coding region and an IGR of variable size and sequence. An internal pol III promoter is present in all 5S rDNA studied to date (Schramm & Hernandez, 2002) (Fig. 1c).

### The 5S rDNAs are found as tandem head-to-tail repeats

The 5S rDNA in *T. cruzi*, *Trypanosoma brucei*, *T. vaginalis*, *Trichomonas tenax*, *C. fasciculata*, *Eimeria tenella* and *C. parvum* is typically organized in tandem head-to-tail repeats. *Tritrichomonas foetus* has two types of 5S rDNAs, while *P. falciparum* has only three 5S rDNA copies in tandem, differing in the length of the IGRs. The main characteristics of the 5S rDNA tandem head-to-tail repeats of several organisms are described in Table 9.

### The 5S rDNA may be interspersed with genes transcribed by any of the three RNA polymerases

The 5S rDNA has been found linked to the rDNA (transcribed by pol I) in an alternate distribution in *T. gondii*, *Hansenula polymorpha*, *Perkinsus andrewsi* and various *Nosema* species (Guay *et al.*, 1992; Coss *et al.*, 2001; Klabunde *et al.*, 2002; Huang *et al.*, 2004; Iiyama *et al.*, 2004; Tsai *et al.*, 2005; Liu *et al.*, 2008) (Figs 2c and 7b). Two tandem 5S rDNA copies are linked to each repeated rDNA unit in *Candida glabrata* (Dujon *et al.*, 2004). In contrast, the 5S rDNA is linked to the rDNA in opposite polarity in various yeast species, such as *Torulopsis utilis*, *K. lactis* and *S. cerevisiae* (Fig. 2b, Table 2). Two copies of the 5S rDNA are coded in the extrachromosomal DNA molecule in



**Table 9.** Typical 5S rDNA organization

Organism	5S rDNA types*	Localization of variability	Other	References
<b>Excavata</b>				
<i>Trichomonas tenax</i>	A and B	IGR and coding region	Type B IGR palindrome	Torres-Machorro <i>et al.</i> (2009)
<i>Trichomonas vaginalis</i>	A and B	IGR	IGS 10-bp palindrome	Torres-Machorro <i>et al.</i> (2006)
<i>Tritrichomonas foetus</i>	A and B	IGR, repeated sequences vs. ubiquitin gene		Torres-Machorro <i>et al.</i> (2009)
<i>Trypanosoma brucei</i>				Lenardo <i>et al.</i> (1985)
<i>Trypanosoma cruzi</i>			6 Sp1 binding sites in IGR	Hernández-Rivas <i>et al.</i> (1992)
<b>Chromalveolates</b>				
<i>Cryptosporidium parvum</i>		IGR		Taghi-Kilani <i>et al.</i> (1994)
<i>Eimeria tenella</i>				Stucki <i>et al.</i> (1993)
<i>Plasmodium falciparum</i>	3	IGR lengths		Shippen-Lentz & Vezza (1988)
<i>Tetrahymena pyriformis</i>		IGR	Some linked to ubiquitin genes	Guerreiro <i>et al.</i> (1993)
<i>Tetrahymena thermophila</i>		IGR lengths	IGR 12 and 16-bp palindromes	Allen <i>et al.</i> (1984)

\*The number or names of the 5S rDNA types for each species are shown. IGR, intergenic region.

**Table 10.** 5S rRNA gene linkage to pol II transcribed genes

Organism	Pol II gene	Orientation	References
<b>Excavata</b>			
<i>Trypanosoma vivax</i>	Spliced leader	Sense	Roditi (1992)
<i>Trypanosoma rangeli</i>	Spliced leader	Sense	Aksoy <i>et al.</i> (1992)
<i>Bodo saltans</i>	Spliced leader	Sense	Santana <i>et al.</i> (2001)
<i>Bodo caudatus</i>	Spliced leader	Sense	Campbell (1992)
<i>Diplonema papillatum</i>	Spliced leader	Sense	Sturm <i>et al.</i> (2001)
<i>Herpetomonas</i> spp.	Spliced leader	Sense	Aksoy (1992)
<i>Trypanoplasma borreli</i>	Spliced leader	Antisense	Maslov <i>et al.</i> (1993)
<i>Trypanosoma avium</i>	Spliced leader	Antisense	Santana <i>et al.</i> (2001)
<i>Euglena gracilis</i>	Spliced leader	Sense	Keller <i>et al.</i> (1992)
<i>Tritrichomonas foetus</i>	Ubiquitin	Sense	Torres-Machorro <i>et al.</i> (2009)
<b>Chromalveolates</b>			
<i>Tetrahymena pyriformis</i>	Ubiquitin	Sense	Guerreiro <i>et al.</i> (1993)

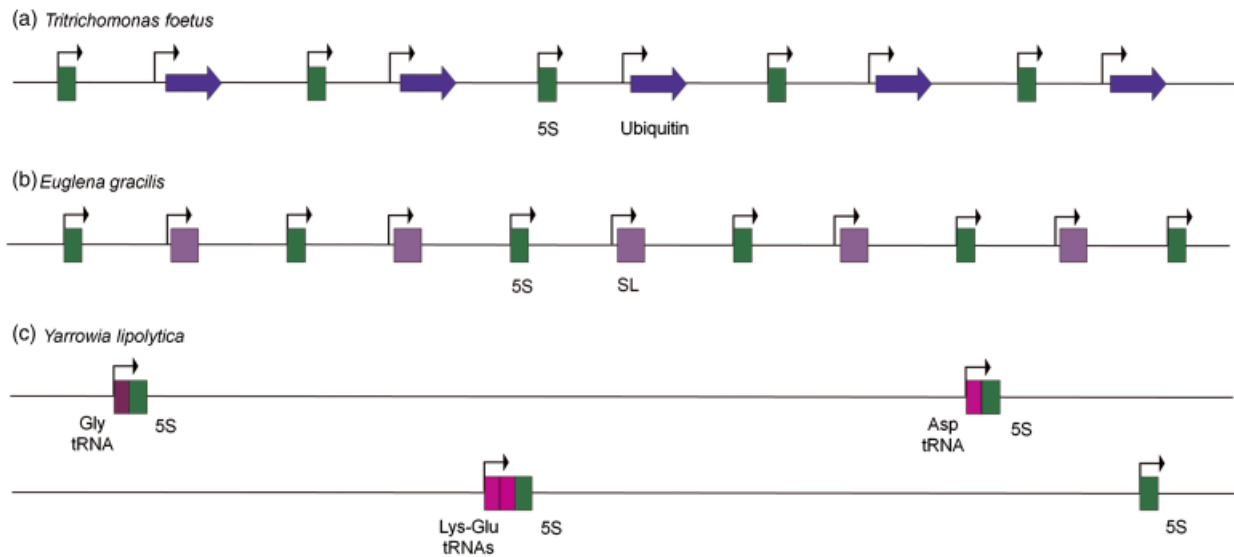
*D. discoideum*, in the same polarity as the two rDNA copies (Hofmann *et al.*, 1993) (Fig. 4b). Finally, a *S. cerevisiae* 5S rDNA variant is found in five repeats of 3.6 kbp, located next to the rDNA tandem cluster locus, in the centromere-distal side (McMahon *et al.*, 1984).

Some *Trypanosoma* species such as *Trypanosoma vivax* and *Trypanosoma rangeli* have the 5S rDNA copies linked to the spliced-leader (SL) tandem repeated genes, transcribed by pol II. SL transcripts are necessary to process the mRNAs in kinetoplasts by a trans-splicing reaction (Simpson *et al.*, 2006). A similar linkage has been found in other *Euglenozoa* such as *Diplonema papillatum* and *Bodo caudatus*. In *Trypanoplasma borreli* and *Trypanosoma avium*, the 5S rDNA is coded in opposite polarity relative to the SL gene (Table 10). Interestingly, the *T. borreli* SL can also be linked to 5S rRNA pseudogenes (with a truncated 5' end) (Maslov *et al.*, 1993). Some 5S rDNA units in *T. pyriformis* and *T. foetus* are associated with ubiquitin genes transcribed by pol II (Fig.

8b). Table 10 describes the relative polarity of the 5S rDNA linked to the genes transcribed by pol II.

Some 5S rDNA copies in *E. histolytica* and one copy in *Leishmania tarentolae* are linked to tRNA genes (Shi *et al.*, 1994; Clark *et al.*, 2006), also transcribed by pol III. Interestingly, 48 of the 108 5S rDNA copies of *Y. lipolytica* produce pol III dicistronic transcripts: tRNA–5S rRNA hybrid molecules. The synthesis of an ~200-nt transcript is driven by the tRNA pol III promoter, resulting in a transcription independent of the 5S rDNA-specific transcription factor, TFIIIA. The dicistronic transcripts, as well as a unique tricistronic transcript [Lys(CTT) tRNA–Glu(CTC) tRNA–5S rDNA] are post-transcriptionally processed to generate the typical mature RNA molecules: tRNAs and 5S rRNA (Acker *et al.*, 2008) (Fig. 8c).

Nontandem 5S rDNA copies are found dispersed throughout the genome of some microbial eukaryotes. Some examples are *A. castellanii* (Zwick *et al.*, 1991),



**Fig. 8.** The 5S rDNA may be linked to pol II or pol III transcribed genes. (a) In *Trichomonas foetus* the 5S rDNA is linked to a multigenic ubiquitin family. (b) In *Euglena gracilis* the 5S rDNA is linked to the SL gene. (c) In *Yarrowia lipolytica* dicistronic genes consisting of a tRNA gene (pink) and a 5S rDNA (green) are dispersed in the genome. One tricistronic gene: Lys(CTT) tRNA–Glu(CTC) tRNA–5S rDNA is also found. These genes are transcribed from the pol III promoter of the tRNA gene. Dispersed, single 5S rDNAs are also found (green).

*Y. lipolytica* and *Schizosaccharomyces pombe* (Tabata, 1981; Dujon *et al.*, 2004). The 5S rDNA may also be found in extrachromosomal DNA. Noteworthy, ciliate organisms such as *Oxytricha fallax* have single 5S rDNA copies coded in macronucleus extrachromosomal molecules (Rae & Spear, 1978; Roberson *et al.*, 1989). Moreover, about one million copies of the 5S rDNA are coded in linear minichromosomes flanked by telomeres in *E. eurystomus* (Roberson *et al.*, 1989).

## Concluding remarks

Ribosomes are complex organelles that require the intricate collaboration of three types of RNAs (rRNA, mRNA and tRNA) and > 70 proteins for the synthesis of proteins. rRNAs must maintain their convoluted structural motifs in order to be functional. It is therefore not surprising that their sequence is highly conserved among related organisms and this similarity is gradually lost as organisms diverge. For this reason, sequence comparison of the SSU rRNA has been widely used in the field of molecular phylogeny (Van de Peer *et al.*, 2000).

The ‘typical’ eukaryotic rDNA genomic organization was proposed > 30 years ago, based on the analysis of the rDNA in higher eukaryotes (Long & Dawid, 1980). The tandemly repeated head-to-tail organization has been considered the standard for eukaryotic rDNA. Surprisingly, analyses of the genomic organization of ribosomal genes in microbial eukaryotes demonstrate that although some organisms do hold the typical rDNA configuration, the majority reveal

unusual characteristics. As shown in this review, the eukaryotic rDNA may be arranged in a wide variety of genomic configurations, suggesting the existence of several regulatory mechanisms (probably species-specific) within a conserved rDNA regulatory context.

Reiteration is one of the most conserved rDNA characteristics. The rDNA copy number is extremely variable and appears to be highly regulated within species. Nevertheless, the total number of rDNA repeats does not always correlate with the rate of rRNA synthesis (French *et al.*, 2003), implying that individual rDNA units may hold different epigenetic marks that result in variable transcriptional rates (Grummt, 2007). rDNA structure and transcription are also important in the establishment of the nucleolar structure, which also plays regulatory roles at the cellular level (Carmo-Fonseca *et al.*, 2000). *Dictyostelium discoideum*, *T. gondii* and some yeast species have equal numbers of rDNA and 5S rDNA copies. This organization was considered coherent, as the pool for rRNA molecules was supposed to hold equimolar amounts of 18S, 5.8S, 28S and 5S rRNA mature molecules for the efficient synthesis of ribosomes (Prokopowich *et al.*, 2003). However, rDNA and 5S rDNA are transcribed by different RNA polymerases with dissimilar transcription rates and number of transcriptionally open rDNA units. Therefore, the rDNA/5S rDNA dosage is not directly related to the stoichiometry of the total rRNA pool and expression process. The rDNA/5S rDNA dosage varies widely throughout evolution. The processes that allow the maintenance of the pool of rRNA mature molecules in appropriate stoichiometry must be a complex network including epigenetic,

transcriptional, post-transcriptional and structural mechanisms that may vary according to the rDNA/5S rDNA dosage. Additionally, the location of the rDNA and 5S rDNA in the genome may be related to its expression and physiology. The chromosomal context, together with different chromatin environments, may be involved in the maintenance of gene copy number, recombination frequency, sequence conservation and transcription regulation of rDNA.

The organization of rDNA in extrachromosomal molecules may be associated with the cellular need for quick changes in the rDNA copy number under stress conditions. Some organisms have most of their rDNA in self-replicating extrachromosomal molecules, but retain additional copies in the chromosome probably as a backup. Interestingly, some organisms hold the totality of their rDNA in extrachromosomal molecules. It has been shown that the accumulation of extrachromosomal rDNA copies in old *S. cerevisiae* cultures affects cells' health. Therefore, cells that hold most or all rDNA copies extrachromosomally may have special mechanisms to allow for the accumulation of large rDNA minichromosomes without affecting the cell fitness. However, it is possible that yeasts lack this mechanism, resulting in cell damage when episomes accumulate.

Post-transcriptional processing of ITS-1 and ITS-2 is observed in almost all eukaryotes. However, some organisms possess additional ITS sequences in the 28S rRNA that generate fragmented rRNA molecules that maintain the core rRNA active elements in the mature ribosome. It has been found that some organisms possess additional sequences in variable regions internal to the SSU rRNA coding sequence that remain in the mature molecule, thus generating unusually large SSU rRNAs. It is interesting to note that the SSU rRNA has not been found as a fragmented molecule in nuclear genomes; in contrast, the fragmented eLSU rRNA could be regarded as 28S molecules that have processed their variable regions. The structure and functionality of these rRNAs in the ribosome may help to understand the importance of variable regions and the differences/restrictions between subunits.

The rDNA coding region of several microbial eukaryotes is interrupted by group I introns. Different transcriptional and post-transcriptional mechanisms are involved in the processing of introns and HE transcripts. Some *C. albicans* strains have heterogeneous rDNA populations with both intron-containing and intron-less rDNA units. Because no function related to rDNA expression has been proposed for group I introns, *C. albicans* may provide a good model to study the role (if any) of these introns in rRNA expression, processing and stability.

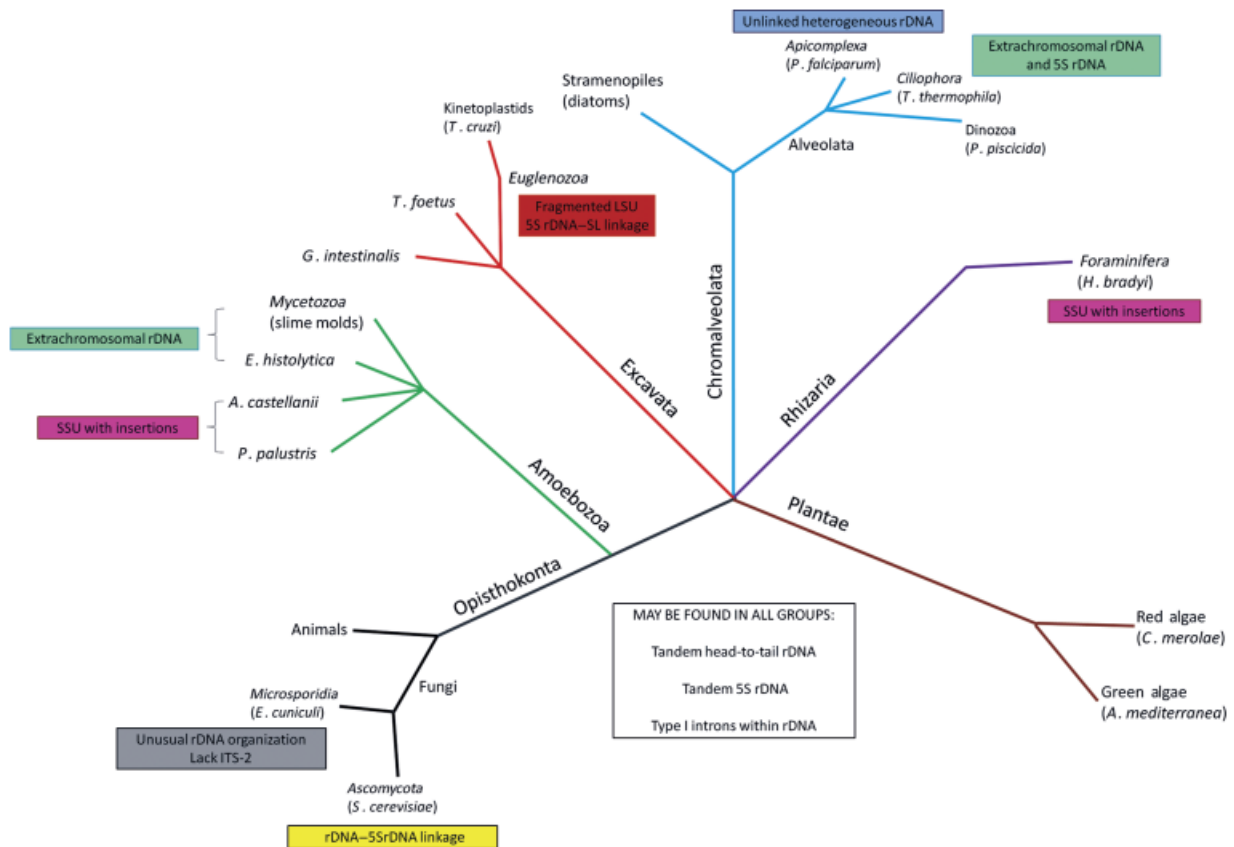
The linkage of 5S rDNA to a variety of tandem repeated families may be the result of homogenizing mechanisms responsible for concerted evolution (Drouin & de Sá, 1995). The finding that the 5S rDNA can be linked to all polymer-

ase transcribed genes, coded alone in different chromosomal loci or coded in extrachromosomal molecules underscores the possibility of various mechanisms acting to regulate the expression of different types of 5S rDNAs. The simultaneous expression of pol I, pol II and pol III transcribed genes in a particular locus may alter the chromatin context as well as the availability of transcription factors in the proximity. Nevertheless, the significance of the linkage between multi-genic families and 5S rDNA has not been studied. The presence of unlinked 5S rDNA copies is also interesting because the chromosomal context for each gene may affect its regulation.

Widespread rDNA characteristics present among eukaryotic supergroups as well as particular features predominating in some eukaryotic subgroups reflect the complexity of evolution. The typical tandem head-to-tail organization of the rDNA and 5S rDNA is found in all eukaryotic supergroups (Fig. 9), suggesting that the eukaryotic common ancestor held this organization. Later on, the evolutionary process probably led to a specialization and divergence of the rDNA structure, resulting in the different variants described here. Other features, such as the group I introns, were acquired by horizontal transfer and are therefore widespread among microbial eukaryotes (Fig. 9) (Sogin *et al.*, 1986; Van Oppen *et al.*, 1993).

Some particular rDNA characteristics are conserved among related species, suggesting that the common ancestor for each group held these traits before current speciation. Examples of this can be found in the unlinked differentially expressed rDNA units in *Apicomplexa*, the extralong SSU rRNAs in Amoebozoa and *Foraminifera*, the extrachromosomal rDNA and 5S rDNA in ciliates and Amoebozoa, the 5.8S–23S rRNA fusion in *Microsporidia* and both the SL–5S rDNA linkage and the eLSU fragmentation in *Euglenozoa*. The 5S rDNA nontandem organization as well as the linkage between 5S rDNA with the ribosomal cistron can also be seen as predominant in the Fungi group (Fig. 9). Particular traits such as the 28S rRNA fragmentation could have appeared more than once and independently, leading to non-*Euglenozoa* organisms containing fragmented rRNAs such as *A. castellanii* and *Plasmodium*. Distinctive characteristics shared among non-closely related species may represent phylogenetic evidence of yet unknown linkages among eukaryotic subgroups and species. Nevertheless, a thorough and integrated comparative characterization of rRNA genes in poorly or nonstudied eukaryotes may help to understand the diversity and relationship among different forms of life.

Many unanswered questions regarding the regulation of rRNA gene expression still remain, for example, the mechanism(s) that determine which rRNA gene copies will be transcriptionally and/or epigenetically active (Lawrence *et al.*, 2004; Grummt, 2007) or the relevance of the genomic context that surrounds the rRNA genes. Finally, it should be



**Fig. 9.** Schematic phylogenetic tree describing the prevailing rDNA structures in subgroups of microbial eukaryotes. Phylogeny of eukaryotes is based on the six supergroup classification (Box 1). Conserved rDNA structures that predominate in eukaryotic subgroups are boxed in color. Some of the described characteristics may be shared by more than one subgroup.

pointed out that the rDNA organization is only one fundamental step in its regulation, because its expression is interrelated with most, if not all, of the cell's regulation levels (Paule & White, 2000; Schramm & Hernandez, 2002; Grummt, 2003).

## Acknowledgements

This work was supported by grants IN214006 from Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT), Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) and P45037-Q from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), Mexico. A.L.T.-M. was supported by a scholarship from CONACYT Mexico.

## References

- Acker J, Ozanne C, Kachouri-Lafond R, Gaillardin C, Neuveglise C & Marck C (2008) Dicistronic tRNA–5S rRNA genes in *Yarrowia lipolytica*: an alternative TFIIIA-independent way for expression of 5S rRNA genes. *Nucleic Acids Res* **36**: 5832–5844.
- Adl SM, Simpson AG, Farmer MA *et al.* (2005) The new higher level classification of eukaryotes with emphasis on the taxonomy of protists. *J Eukaryot Microbiol* **52**: 399–451.
- Aimi T, Yamada T & Murooka Y (1993) Group I self-splicing introns in both large and small subunit rRNA genes of *Chlorella*. *Nucleic Acids Symp Ser* 159–160.
- Aimi T, Yamada T & Murooka Y (1994) A group-I self-splicing intron in the nuclear small subunit rRNA-encoding gene of the green alga, *Chlorella ellipsoidea* C-87. *Gene* **139**: 65–71.
- Aksoy S (1992) Spliced leader RNA and 5S rRNA genes in *Herpetomonas* spp. are genetically linked. *Nucleic Acids Res* **20**: 913.
- Aksoy S, Shay GL, Villanueva MS, Beard CB & Richards FF (1992) Spliced leader RNA sequences of *Trypanosoma rangeli* are organized within the 5S rRNA-encoding genes. *Gene* **113**: 239–243.
- Allen SL, Ervin PR, McLaren NC & Brand RE (1984) The 5S ribosomal RNA gene clusters in *Tetrahymena thermophila*: strain differences, chromosomal localization, and loss during micronuclear ageing. *Mol Gen Genet* **197**: 244–253.

- Bagchi A, Bhattacharya A & Bhattacharya S (1999) Lack of a chromosomal copy of the circular rDNA plasmid of *Entamoeba histolytica*. *Int J Parasitol* **29**: 1775–1783.
- Bell GI, DeGennaro LJ, Gelfand DH, Bishop RJ, Valenzuela P & Rutter WJ (1977) Ribosomal RNA genes of *Saccharomyces cerevisiae*. I. Physical map of the repeating unit and location of the regions coding for 5 S, 5.8 S, 18 S, and 25 S ribosomal RNAs. *J Biol Chem* **252**: 8118–8125.
- Berger S, Zellmer DM, Klopstsch K, Richter G, Dillard WL & Schweiger HG (1978) Alternating polarity in rRNA genes. *Cell Biol Int Rep* **2**: 41–50.
- Bergeron J & Drouin G (2008) The evolution of 5S ribosomal RNA genes linked to the rDNA units of fungal species. *Curr Genet* **54**: 123–131.
- Berriman M, Ghedin E, Hertz-Fowler C *et al.* (2005) The genome of the African trypanosome *Trypanosoma brucei*. *Science* **309**: 416–422.
- Bhattacharya S, Som I & Bhattacharya A (1998) The ribosomal DNA plasmids of *entamoeba*. *Parasitol Today* **14**: 181–185.
- Bidre C, Peyretailade E, Duffieux F, Peyret P, Méténier G & Vivarès C (1997) The rDNA unit of *Encephalitozoon cuniculi* (Microsporidia): complete 23S sequence and copy number. *J Eukaryot Microbiol* **44**: 76S.
- Bishop R, Gobright E, Spooner P, Allsopp B, Sohanpal B & Collins N (2000) Microsequence heterogeneity and expression of the LSU rRNA genes within the two single copy ribosomal transcription units of *Theileria parva*. *Gene* **257**: 299–305.
- Bogenhagen DE, Sakonju S & Brown DD (1980) A control region in the center of the 5S RNA gene directs specific initiation of transcription: II. The 3' border of the region. *Cell* **19**: 27–35.
- Boothroyd JC & Dubremetz JF (2008) Kiss and spit: the dual roles of *Toxoplasma* hoptries. *Nat Rev Microbiol* **6**: 79–88.
- Boothroyd JC, Wang A, Campbell DA & Wang CC (1987) An unusually compact ribosomal DNA repeat in the protozoan *Giardia lamblia*. *Nucleic Acids Res* **15**: 4065–4084.
- Brayton KA, Lau AO, Herndon DR *et al.* (2007) Genome sequence of *Babesia bovis* and comparative analysis of apicomplexan hemoprotozoa. *PLoS Pathog* **3**: 1401–1413.
- Brugère JF, Cornillot E, Méténier G, Bensimon A & Vivarès CP (2000) *Encephalitozoon cuniculi* (Microspora) genome: physical map and evidence for telomere-associated rDNA units on all chromosomes. *Nucleic Acids Res* **28**: 2026–2033.
- Busse I & Preisfeld A (2002) Unusually expanded SSU ribosomal DNA of primary osmotrophic euglenids: molecular evolution and phylogenetic inference. *J Mol Evol* **55**: 757–767.
- Busse I & Preisfeld A (2003) Discovery of a group I intron in the SSU rDNA of *Ploetia costata* (Euglenozoa). *Protist* **154**: 57–69.
- Campbell DA (1992) *Bodo caudatus* medRNA and 5S rRNA genes: tandem arrangement and phylogenetic analyses. *Biochem Biophys Res Commun* **182**: 1053–1058.
- Campbell GR, Littau VC, Melera PW, Allfrey VG & Johnson EM (1979) Unique sequence arrangement of ribosomal genes in the palindromic rDNA molecule of *Physarum polycephalum*. *Nucleic Acids Res* **6**: 1433–1447.
- Carmo-Fonseca M, Mendes-Soares L & Campos I (2000) To be or not to be in the nucleolus. *Nat Cell Biol* **2**: E107–E112.
- Castro C, Hernández R & Castañeda M (1981) *Trypanosoma cruzi* ribosomal RNA: internal break in the large-molecular-mass species and number of genes. *Mol Biochem Parasit* **2**: 219–233.
- Cavalier-Smith T (2002) Nucleomorphs: enslaved algal nuclei. *Curr Opin Microbiol* **5**: 612–619.
- Chakrabarti D, Dame JB, Gutell RR & Yowell CA (1992) Characterization of the rDNA unit and sequence analysis of the small subunit rRNA and 5.8S rRNA genes from *Tritrichomonas foetus*. *Mol Biochem Parasit* **52**: 75–83.
- Challoner PB, Amin AA, Pearlman RE & Blackburn EH (1985) Conserved arrangements of repeated DNA sequences in nontranscribed spacers of ciliate ribosomal RNA genes: evidence for molecular coevolution. *Nucleic Acids Res* **13**: 2661–2680.
- Clare JJ, Davidow LS, Gardner DC & Oliver SG (1986) Cloning and characterisation of the ribosomal RNA genes of the dimorphic yeast, *Yarrowia lipolytica*. *Curr Genet* **10**: 449–452.
- Clark CG & Cross GA (1987) rRNA genes of *Naegleria gruberi* are carried exclusively on a 14-kilobase-pair plasmid. *Mol Cell Biol* **7**: 3027–3031.
- Clark CG & Cross GA (1988) Circular ribosomal RNA genes are a general feature of schizopyrenid amoebae. *J Protozool* **35**: 326–329.
- Clark CG & Diamond LS (1991) Ribosomal RNA genes of 'pathogenic' and 'nonpathogenic' *Entamoeba histolytica* are distinct. *Mol Biochem Parasit* **49**: 297–302.
- Clark CG, Tague BW, Ware VC & Gerbi SA (1984) *Xenopus laevis* 28S ribosomal RNA: a secondary structure model and its evolutionary and functional implications. *Nucleic Acids Res* **12**: 6197–6220.
- Clark CG, Ali IK, Zaki M, Loftus BJ & Hall N (2006) Unique organisation of tRNA genes in *Entamoeba histolytica*. *Mol Biochem Parasit* **146**: 24–29.
- Cockburn AE, Taylor WC & Firtel RA (1978) *Dictyostelium* rDNA consists of non-chromosomal palindromic dimers containing 5S and 36S coding regions. *Chromosoma* **70**: 19–29.
- Conconi A, Widmer RM, Koller T & Sogo JM (1989) Two different chromatin structures coexist in ribosomal RNA genes throughout the cell cycle. *Cell* **57**: 753–761.
- Coss CA, Robledo JA, Ruiz GM & Vasta GR (2001) Description of *Perkinsus andrewni* n. sp. isolated from the Baltic clam (*Macoma balthica*) by characterization of the ribosomal RNA locus, and development of a species-specific PCR-based diagnostic assay. *J Eukaryot Microbiol* **48**: 52–61.
- Dacks JB, Walker G & Field MC (2008) Implications of the new eukaryotic systematics for parasitologists. *Parasitol Int* **57**: 97–104.
- D'Alessio JM, Harris GH, Perna PJ & Paule MR (1981) Ribosomal ribonucleic acid repeat unit of *Acanthamoeba castellanii*: cloning and restriction endonuclease map. *Biochemistry* **20**: 3822–3827.
- Dalrymple BP (1990) Cloning and characterization of the rRNA genes and flanking regions from *Babesia bovis*: use of the genes

- as strain discriminating probes. *Mol Biochem Parasit* **43**: 117–124.
- Dalrymple BP, Dimmock CM, Parrodi F & Wright IG (1992) *Babesia bovis*, *Babesia bigemina*, *Babesia canis*, *Babesia microti* and *Babesia rodhaini*: comparison of ribosomal RNA gene organization. *Int J Parasitol* **22**: 851–855.
- Dame JB & McCutchan TF (1983) The four ribosomal DNA units of the malaria parasite *Plasmodium berghei*. Identification, restriction map, and copy number analysis. *J Biol Chem* **258**: 6984–6990.
- da Silveira JF & Mercereau-Puijalón O (1983) *Plasmodium chabaudi* antigens synthesized in an mRNA-dependent cell-free translation system. *Mol Biochem Parasit* **7**: 159–172.
- Dávila-Aponte JA, Huss VA, Sogin ML & Cech TR (1991) A self-splicing group I intron in the nuclear pre-rRNA of the green alga, *Ankistrodesmus stipitatus*. *Nucleic Acids Res* **19**: 4429–4436.
- de Andrade Stempluk V & Floeter-Winter LM (2002) Functional domains of the rDNA promoter display a differential recognition in *Leishmania*. *Int J Parasitol* **32**: 437–447.
- Doak TG, Cavalcanti AR, Stover NA, Dunn DM, Weiss R, Herrick G & Landweber LF (2003) Sequencing the *Oxytricha trifallax* macronuclear genome: a pilot project. *Trends Genet* **19**: 603–607.
- Dover GA (1988) Molecular evolution. rDNA world falling to pieces. *Nature* **336**: 623–624.
- Drouin G & de Sá MM (1995) The concerted evolution of 5S ribosomal genes linked to the repeat units of other multigene families. *Mol Biol Evol* **12**: 481–493.
- Dujon B, Sherman D, Fischer G et al. (2004) Genome evolution in yeasts. *Nature* **430**: 35–44.
- Edlind TD & Chakraborty PR (1987) Unusual ribosomal RNA of the intestinal parasite *Giardia lamblia*. *Nucleic Acids Res* **15**: 7889–7901.
- Eichinger L, Pachebat JA, Glöckner G et al. (2005) The genome of the social amoeba *Dictyostelium discoideum*. *Nature* **435**: 43–57.
- Einvik C, Elde M & Johansen S (1998) Group I twintrons: genetic elements in myxomycete and schizopyrenid amoebiflagellate ribosomal DNAs. *J Biotechnol* **64**: 63–74.
- Eisen JA, Coyne RS, Wu M et al. (2006) Macronuclear genome sequence of the ciliate *Tetrahymena thermophila*, a model eukaryote. *PLoS Biol* **4**: e286.
- Engberg J (1985) The ribosomal RNA genes of *Tetrahymena*: structure and function. *Eur J Cell Biol* **36**: 133–151.
- Engberg J, Andersson P, Leick V & Collins J (1976) Free ribosomal DNA molecules from *Tetrahymena pyriformis* GL are giant palindromes. *J Mol Biol* **104**: 455–470.
- Erbezniak M, Yao MC & Jahn CL (1999) Characterization of the *Euplotes crassus* macronuclear rDNA and its potential as a DNA transformation vehicle. *J Eukaryot Microbiol* **46**: 206–216.
- Fang J & McCutchan TF (2002) Thermoregulation in a parasite's life cycle. *Nature* **418**: 742.
- Fang J, Sullivan M & McCutchan TF (2004) The effects of glucose concentration on the reciprocal regulation of rRNA promoters in *Plasmodium falciparum*. *J Biol Chem* **279**: 720–725.
- Fazaeli A, Carter PE & Pennington TH (2000) Intergenic spacer (IGS) polymorphism: a new genetic marker for differentiation of *Toxoplasma gondii* strains and *Neospora caninum*. *J Parasitol* **86**: 716–723.
- Figueroa-Angulo E, Cevallos AM, Zentella A, López-Villaseñor I & Hernández R (2006) Potential regulatory elements in the *Trypanosoma cruzi* rRNA gene promoter. *Biochim Biophys Acta* **1759**: 497–501.
- Findly RC & Gall JG (1978) Free ribosomal RNA genes in *Paramecium* are tandemly repeated. *P Natl Acad Sci USA* **75**: 3312–3316.
- Fischer JM, Keely SP & Stringer JR (2006) Evolutionary rate of ribosomal DNA in *Pneumocystis* species is normal despite the extraordinarily low copy-number of rDNA genes. *J Eukaryot Microbiol* **53** (suppl 1): S156–S158.
- Fournier P, Gaillardin C, Persuy MA, Klootwijk J & van Heerikhuizen H (1986) Heterogeneity in the ribosomal family of the yeast *Yarrowia lipolytica*: genomic organization and segregation studies. *Gene* **42**: 273–282.
- Frankel G, Cockburn AF, Kindle KL & Firtel RA (1977) Organization of the ribosomal RNA genes of *Dictyostelium discoideum*. Mapping of the transcribed region. *J Mol Biol* **109**: 539–558.
- French SL, Osheim YN, Cioci F, Nomura M & Beyer AL (2003) 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* **23**: 1558–1568.
- Gagnon S, Bourbeau D & Levesque RC (1996) Secondary structures and features of the 18S, 5.8S and 26S ribosomal RNAs from the Apicomplexan parasite *Toxoplasma gondii*. *Gene* **173**: 129–135.
- Gardner MJ, Hall N, Fung E et al. (2002) Genome sequence of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Nature* **419**: 498–511.
- Gardner MJ, Bishop R, Shah T et al. (2005) Genome sequence of *Theileria parva*, a bovine pathogen that transforms lymphocytes. *Science* **309**: 134–137.
- Gast RJ, Fuerst PA & Byers TJ (1994) Discovery of group I introns in the nuclear small subunit ribosomal RNA genes of *Acanthamoeba*. *Nucleic Acids Res* **22**: 592–596.
- Gatehouse HS & Malone LA (1998) The ribosomal RNA gene region of *Nosema apis* (Microspora): DNA sequence for small and large subunit rRNA genes and evidence of a large tandem repeat unit size. *J Invertebr Pathol* **71**: 97–105.
- Gay LS, Wilson ME & Donelson JE (1996) The promoter for the ribosomal RNA genes of *Leishmania chagasi*. *Mol Biochem Parasit* **77**: 193–200.
- Ghosh S, Satish S, Tyagi S, Bhattacharya A & Bhattacharya S (2003) Differential use of multiple replication origins in the ribosomal DNA episome of the protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. *Nucleic Acids Res* **31**: 2035–2044.

- Greenwood SJ, Schnare MN, Cook JR & Gray MW (2001) Analysis of intergenic spacer transcripts suggests 'read-around' transcription of the extrachromosomal circular rDNA in *Euglena gracilis*. *Nucleic Acids Res* **29**: 2191–2198.
- Grummt I (2003) Life on a planet of its own: regulation of RNA polymerase I transcription in the nucleolus. *Genes Dev* **17**: 1691–1702.
- Grummt I (2007) Different epigenetic layers engage in complex crosstalk to define the epigenetic state of mammalian rRNA genes. *Hum Mol Genet* **16** (Spec No 1): R21–R27.
- Guay JM, Huot A, Gagnon S, Tremblay A & Levesque RC (1992) Physical and genetic mapping of cloned ribosomal DNA from *Toxoplasma gondii*: primary and secondary structure of the 5S gene. *Gene* **114**: 165–171.
- Guerreiro P, Neves A & Rodrigues-Pousada C (1993) Clusters of 5S rRNAs in the intergenic region of ubiquitin genes in *Tetrahymena pyriformis*. *Biochim Biophys Acta* **1216**: 137–139.
- Gunderson JH & Sogin ML (1986) Length variation in eukaryotic rRNAs: small subunit rRNAs from the protists *Acanthamoeba castellanii* and *Euglena gracilis*. *Gene* **44**: 63–70.
- Haile S & Papadopoulou B (2007) Developmental regulation of gene expression in trypanosomatid parasitic protozoa. *Curr Opin Microbiol* **10**: 569–577.
- Hasan G, Turner MJ & Cordingley JS (1984) Ribosomal RNA genes of *Trypanosoma brucei*: mapping the regions specifying the six small ribosomal RNAs. *Gene* **27**: 75–86.
- Hattori M, Ljljana A & Sakaki Y (1984) Direct repeats surrounding the ribosomal RNA genes of *Physarum polycephalum*. *Nucleic Acids Res* **12**: 2047–2053.
- Healey A, Mitchell R, Upcroft JA, Boreham PF & Upcroft P (1990) Complete nucleotide sequence of the ribosomal RNA tandem repeat unit from *Giardia intestinalis*. *Nucleic Acids Res* **18**: 4006.
- Hernández R, Díaz de León F & Castañeda M (1988) Molecular cloning and partial characterization of ribosomal RNA genes from *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasit* **27**: 275–279.
- Hernández R, Martínez-Calvillo S, Hernández-Rivas R & Gómez E (1993) *Trypanosoma cruzi* ribosomal RNA genes: a review. *Biol Res* **26**: 109–114.
- Hernández-Rivas R, Martínez-Calvillo S, Romero M & Hernández R (1992) *Trypanosoma cruzi* 5S rRNA genes: molecular cloning, structure and chromosomal organization. *FEMS Microbiol Lett* **71**: 63–67.
- Hinkle G, Leipe DD, Nerad TA & Sogin ML (1994) The unusually long small subunit ribosomal RNA of *Phreatamoeba balamuthi*. *Nucleic Acids Res* **22**: 465–469.
- Hofmann J, Winckler T, Hanenkamp A, Bukenberger M, Schumann G, Marschalek R & Dingermann T (1993) The *Dictyostelium discoideum* 5S rDNA is organized in the same transcriptional orientation as the other rDNAs. *Biochem Biophys Res Co* **191**: 558–564.
- Hou G, Le Blancq SM, E Y, Zhu H & Lee MG (1995) Structure of a frequently rearranged rRNA-encoding chromosome in *Giardia lamblia*. *Nucleic Acids Res* **23**: 3310–3317.
- Huang WF, Tsai SJ, Lo CF, Soichi Y & Wang CH (2004) The novel organization and complete sequence of the ribosomal RNA gene of *Nosema bombycis*. *Fungal Genet Biol* **41**: 473–481.
- Huber D & Rustchenko E (2001) Large circular and linear rDNA plasmids in *Candida albicans*. *Yeast* **18**: 261–272.
- Huber M, Koller B, Gitler C, Mirelman D, Revel M, Rozenblatt S & Garfinkel L (1989) *Entamoeba histolytica* ribosomal RNA genes are carried on palindromic circular DNA molecules. *Mol Biochem Parasit* **32**: 285–296.
- Iiyama K, Chieda Y, Yasunaga-Aoki C, Hayasaka S & Shimizu S (2004) Analyses of the ribosomal DNA region in *Nosema bombycis* NIS 001. *J Eukaryot Microbiol* **51**: 598–604.
- Ivens AC, Peacock CS, Worthey EA *et al.* (2005) The genome of the kinetoplastid parasite, *Leishmania major*. *Science* **309**: 436–442.
- Jackson S, Cannone J, Lee J, Gutell R & Woodson S (2002) Distribution of rRNA introns in the three-dimensional structure of the ribosome. *J Mol Biol* **323**: 35–52.
- Jansson A, Gillin F, Kagardt U & Hagblom P (1994) Coding of hemolysins within the ribosomal RNA repeat on a plasmid in *Entamoeba histolytica*. *Science* **263**: 1440–1443.
- Jemtland R, Maehlum E, Gabrielsen OS & Oyen TB (1986) Regular distribution of length heterogeneities within non-transcribed spacer regions of cloned and genomic rDNA of *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res* **14**: 5145–5158.
- Johansen S & Vogt VM (1994) An intron in the nuclear ribosomal DNA of *Didymium iridis* codes for a group I ribozyme and a novel ribozyme that cooperate in self-splicing. *Cell* **76**: 725–734.
- Johansen S, Johansen T & Haugli F (1992) Extrachromosomal ribosomal DNA of *Didymium iridis*: sequence analysis of the large subunit ribosomal RNA gene and sub-telomeric region. *Curr Genet* **22**: 305–312.
- Johansen SD, Vader A, Sjøttem E & Nielsen H (2006) *In vivo* expression of a group I intron HEG from the antisense strand of *Didymium* ribosomal DNA. *RNA Biol* **3**: 157–162.
- Johansen SD, Haugen P & Nielsen H (2007) Expression of protein-coding genes embedded in ribosomal DNA. *Biol Chem* **388**: 679–686.
- Katinka MD, Duprat S, Cornillot E *et al.* (2001) Genome sequence and gene compaction of the eukaryote parasite *Encephalitozoon cuniculi*. *Nature* **414**: 450–453.
- Kats LM, Black CG, Proellocks NI & Coppel RL (2006) *Plasmodium* rhoptries: how things went pear-shaped. *Trends Parasitol* **22**: 269–276.
- Katz LA & Bhattacharya D (2006) *Genomics and Evolution of Microbial Eukaryotes*. 1st edn. Oxford University press, New York.
- Katzen AL, Cann GM & Blackburn EH (1981) Sequence-specific fragmentation of macronuclear DNA in a holotrichous ciliate. *Cell* **24**: 313–320.
- Keeling PJ & Slamovits CH (2004) Simplicity and complexity of microsporidian genomes. *Eukaryot Cell* **3**: 1363–1369.

- Keller M, Tessier LH, Chan RL, Weil JH & Imbault P (1992) In *Euglena*, spliced-leader RNA (SL-RNA) and 5S rRNA genes are tandemly repeated. *Nucleic Acids Res* **20**: 1711–1715.
- Ki JS & Han MS (2007) Cryptic long internal repeat sequences in the ribosomal DNA ITS1 gene of the dinoflagellate *Cochlodinium polykrikoides* (dinophyceae): a 101 nucleotide six-repeat track with a palindrome-like structure. *Genes Genet Syst* **82**: 161–166.
- Kibe MK, ole-MoiYoi OK, Nene V, Khan B, Allsopp BA, Collins NE, Morzaria SP, Gobright EI & Bishop RP (1994) Evidence for two single copy units in *Theileria parva* ribosomal RNA genes. *Mol Biochem Parasit* **66**: 249–259.
- Kim YH, Ishikawa D, Ha HP, Sugiyama M, Kaneko Y & Harashima S (2006) Chromosome XII context is important for rDNA function in yeast. *Nucleic Acids Res* **34**: 2914–2924.
- Kimmel AR & Gorovsky MA (1976) Numbers of 5S and tRNA genes in macro- and micronuclei of *Tetrahymena pyriformis*. *Chromosoma* **54**: 327–337.
- Kimmel AR & Gorovsky MA (1978) Organization of the 5S RNA genes in macro- and micronuclei of *Tetrahymena pyriformis*. *Chromosoma* **67**: 1–20.
- Klabunde J, Diesel A, Waschk D, Gellissen G, Hollenberg CP & Suckow M (2002) Single-step co-integration of multiple expressible heterologous genes into the ribosomal DNA of the methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha*. *Appl Microbiol Biot* **58**: 797–805.
- Kobayashi T, Heck DJ, Nomura M & Horiuchi T (1998) 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* **12**: 3821–3830.
- Köck J & Cornelissen AW (1990) The 5S ribosomal RNA genes of *Crithidia fasciculata*. *Mol Biochem Parasit* **38**: 295–298.
- Kownin P, Iida CT, Brown-Shimer S & Paule MR (1985) The ribosomal RNA promoter of *Acanthamoeba castellanii* determined by transcription in a cell-free system. *Nucleic Acids Res* **13**: 6237–6248.
- Langsley G, Hyde JE, Goman M & Scaife JG (1983) Cloning and characterisation of the rRNA genes from the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Nucleic Acids Res* **11**: 8703–8717.
- Lasker BA, Smith GW, Kobayashi GS, Whitney AM & Mayer LW (1998) Characterization of a single group I intron in the 18S rRNA gene of the pathogenic fungus *Histoplasma capsulatum*. *Med Mycol* **36**: 205–212.
- Laughery JM, Lau AO, White SN, Howell JM & Suarez CE (2009) *Babesia bovis*: transcriptional analysis of rRNA gene unit expression. *Exp Parasitol* **123**: 45–50.
- Lawrence RJ, Earley K, Pontes O, Silva M, Chen ZJ, Neves N, Viegas W & Pikaard CS (2004) A concerted DNA methylation/histone methylation switch regulates rRNA gene dosage control and nucleolar dominance. *Mol Cell* **13**: 599–609.
- Le Blancq SM, Korman SH & Van der Ploeg LH (1991) Frequent rearrangements of rRNA-encoding chromosomes in *Giardia lamblia*. *Nucleic Acids Res* **19**: 4405–4412.
- Le Blancq SM, Khramtsov NV, Zamani F, Upton SJ & Wu TW (1997) Ribosomal RNA gene organization in *Cryptosporidium parvum*. *Mol Biochem Parasit* **90**: 463–478.
- Lee Y, Wong WM, Guyer D, Erkin AM & Nazar RN (1997) *In vivo* analyses of upstream promoter sequence elements in the 5S rRNA gene from *Saccharomyces cerevisiae*. *J Mol Biol* **269**: 676–683.
- Lenardo MJ, Dorfman DM, Reddy LV & Donelson JE (1985) Characterization of the *Trypanosoma brucei* 5S ribosomal RNA gene and transcript: the 5S rRNA is a spliced-leader-independent species. *Gene* **35**: 131–141.
- León W, Fouts DL & Manning J (1978) Sequence arrangement of the 16S and 26S rRNA genes in the pathogenic haemoflagellate *Leishmania donovani*. *Nucleic Acids Res* **5**: 491–504.
- Li J, Gutell RR, Damberger SH, Wirtz RA, Kissinger JC, Rogers MJ, Sattabongkot J & McCutchan TF (1997) Regulation and trafficking of three distinct 18 S ribosomal RNAs during development of the malaria parasite. *J Mol Biol* **269**: 203–213.
- Lin H, Niu MT, Yoganathan T & Buck GA (1992) Characterization of the rRNA-encoding genes and transcripts, and a group-I self-splicing intron in *Pneumocystis carinii*. *Gene* **119**: 163–173.
- Lipps HJ & Steinbrück G (1978) Free genes for rRNAs in the macronuclear genome of the ciliate *Stylonychia mytilus*. *Chromosoma* **69**: 21–26.
- Liu H, Pan G, Song S, Xu J, Li T, Deng Y & Zhou Z (2008) Multiple rDNA units distributed on all chromosomes of *Nosema bombycis*. *J Invertebr Pathol* **99**: 235–238.
- Liu Y, Rocourt M, Pan S, Liu C & Leibowitz MJ (1992) Sequence and variability of the 5.8S and 26S rRNA genes of *Pneumocystis carinii*. *Nucleic Acids Res* **20**: 3763–3772.
- Loftus B, Anderson I, Davies R et al. (2005) The genome of the protist parasite *Entamoeba histolytica*. *Nature* **433**: 865–868.
- Long EO & Dawid IB (1980) Repeated genes in eukaryotes. *Annu Rev Biochem* **49**: 727–764.
- López-Villaseñor I, Contreras AP, López-Griego L, Álvarez-Sánchez E & Hernández R (2004) *Trichomonas vaginalis* ribosomal DNA: analysis of the intergenic region and mapping of the transcription start point. *Mol Biochem Parasit* **137**: 175–179.
- Mack SR, Samuels S & Vanderberg JP (1979) Hemolymph of *Anopheles stephensi* from noninfected and *Plasmodium berghei*-infected mosquitoes. 3. Carbohydrates. *J Parasitol* **65**: 217–221.
- Madison-Antenucci S, Grams J & Hajduk SL (2002) Editing machines: the complexities of trypanosome RNA editing. *Cell* **108**: 435–438.
- Maleszka R & Clark-Walker GD (1993) Yeasts have a four-fold variation in ribosomal DNA copy number. *Yeast* **9**: 53–58.
- Mandal RK (1984) The organization and transcription of eukaryotic ribosomal RNA genes. *Prog Nucleic Acid Res* **31**: 115–160.
- Margulis L & Schwartz KV (2000) *Five Kingdoms*. 3rd edn. W.H. Freeman and Company, New York.



- Martínez-Calvillo S, Sunkin SM, Yan S, Fox M, Stuart K & Myler PJ (2001) Genomic organization and functional characterization of the *Leishmania major* Friedlin ribosomal RNA gene locus. *Mol Biochem Parasit* **116**: 147–157.
- Maruyama S & Nozaki H (2007) Sequence and intranuclear location of the extrachromosomal rDNA plasmid of the amoeba-flagellate *Naegleria gruberi*. *J Eukaryot Microbiol* **54**: 333–337.
- Maruyama S, Misumi O, Ishii Y *et al.* (2004) The minimal eukaryotic ribosomal DNA units in the primitive red alga *Cyanidioschyzon merolae*. *DNA Res* **11**: 83–91.
- Maslov DA, Elgort MG, Wong S, Pecková H, Lom J, Simpson L & Campbell DA (1993) Organization of mini-exon and 5S rRNA genes in the kinetoplastid *Trypanoplasma borreli*. *Mol Biochem Parasit* **61**: 127–135.
- Matsuzaki M, Misumi O, Shin I *et al.* (2004) Genome sequence of the ultrasmall unicellular red alga *Cyanidioschyzon merolae* 10D. *Nature* **428**: 653–657.
- McCutchan TF, Li J, McConkey GA, Rogers MJ & Waters AP (1995) The cytoplasmic ribosomal RNAs of *Plasmodium* spp. *Parasitol Today* **11**: 134–138.
- McMahon ME, Stamenkovich D & Petes TD (1984) Tandemly arranged variant 5S ribosomal RNA genes in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res* **12**: 8001–8016.
- Melville SE, Leech V, Gerrard CS, Tait A & Blackwell JM (1998) The molecular karyotype of the megabase chromosomes of *Trypanosoma brucei* and the assignment of chromosome markers. *Mol Biochem Parasit* **94**: 155–173.
- Mercereau-Puijalon O, Barale JC & Bischoff E (2002) Three multigene families in *Plasmodium* parasites: facts and questions. *Int J Parasitol* **32**: 1323–1344.
- Michel F & Westhof E (1990) Modelling of the three-dimensional architecture of group I catalytic introns based on comparative sequence analysis. *J Mol Biol* **216**: 585–610.
- Miletti-González KE & Leibowitz MJ (2008) Molecular characterization of two types of rDNA units in a single strain of *Candida albicans*. *J Eukaryot Microbiol* **55**: 522–529.
- Miller OL Jr & Beatty BR (1969) Visualization of nucleolar genes. *Science* **164**: 955–957.
- Milyutina IA, Aleshin VV, Mikrjukov KA, Kedrova OS & Petrov NB (2001) The unusually long small subunit ribosomal RNA gene found in amitochondriate amoebaflagellate *Pelomyxa palustris*: its rRNA predicted secondary structure and phylogenetic implication. *Gene* **272**: 131–139.
- Mittal V, Sehgal D, Bhattacharya A & Bhattacharya S (1992) A second short repeat sequence detected downstream of rRNA genes in the *Entamoeba histolytica* rDNA episome. *Mol Biochem Parasit* **54**: 97–100.
- Moreno Díaz de la Espina S, Alverca E, Cuadrado A & Franca S (2005) Organization of the genome and gene expression in a nuclear environment lacking histones and nucleosomes: the amazing dinoflagellates. *Eur J Cell Biol* **84**: 137–149.
- Neigeborn L & Warner JR (1990) Expression of yeast 5S RNA is independent of the rDNA enhancer region. *Nucleic Acids Res* **18**: 4179–4184.
- Niles EG, Sutiphong J & Haque S (1981) Structure of the *Tetrahymena pyriformis* rRNA gene. Nucleotide sequence of the transcription initiation region. *J Biol Chem* **256**: 12849–12856.
- Nogi Y, Yano R & Nomura M (1991) Synthesis of large rRNAs by RNA polymerase II in mutants of *Saccharomyces cerevisiae* defective in RNA polymerase I. *P Natl Acad Sci USA* **88**: 3962–3966.
- Oakes M, Nogi Y, Clark MW & Nomura M (1993) Structural alterations of the nucleolus in mutants of *Saccharomyces cerevisiae* defective in RNA polymerase I. *Mol Cell Biol* **13**: 2441–2455.
- Okeke CN, Kappe R, Zakikhani S, Nolte O & Sonntag HG (1998) Ribosomal genes of *Histoplasma capsulatum* var. *duboisii* and var. *farcimosum*. *Mycoses* **41**: 355–362.
- O'Mahony EM, Tay WT & Paxton RJ (2007) Multiple rRNA variants in a single spore of the microsporidian *Nosema bombi*. *J Eukaryot Microbiol* **54**: 103–109.
- Orlando TC, Rubio MA, Sturm NR, Campbell DA & Floeter-Winter LM (2002) Intergenic and external transcribed spacers of ribosomal RNA genes in lizard-infecting *Leishmania*: molecular structure and phylogenetic relationship to mammal-infecting *Leishmania* in the subgenus *Leishmania* (*Leishmania*). *Mem I Oswaldo Cruz* **97**: 695–701.
- Paule MR & White RJ (2000) Survey and summary: transcription by RNA polymerases I and III. *Nucleic Acids Res* **28**: 1283–1298.
- Pecher WT, Robledo JA & Vasta GR (2004) Identification of a second rRNA gene unit in the *Perkinsus andrewsi* genome. *J Eukaryot Microbiol* **51**: 234–245.
- Peyretailade E, Biderre C, Peyret P, Duffieux F, Méténier G, Gouy M, Michot B & Vivarès CP (1998) Microsporidian *Encephalitozoon cuniculi*, a unicellular eukaryote with an unusual chromosomal dispersion of ribosomal genes and a LSU rRNA reduced to the universal core. *Nucleic Acids Res* **26**: 3513–3520.
- Preer LB, Rudman B, Pollack S & Preer JR Jr (1999) Does ribosomal DNA get out of the micronuclear chromosome in *Paramecium tetraurelia* by means of a rolling circle? *Mol Cell Biol* **19**: 7792–7800.
- Prescott DM (2000) Genome gymnastics: unique modes of DNA evolution and processing in ciliates. *Nat Rev Genet* **1**: 191–198.
- Prokopowich CD, Gregory TR & Crease TJ (2003) The correlation between rDNA copy number and genome size in eukaryotes. *Genome* **46**: 48–50.
- Pryde FE, Gorham HC & Louis EJ (1997) Chromosome ends: all the same under their caps. *Curr Opin Genet Dev* **7**: 822–828.
- Pulido M, Martínez-Calvillo S & Hernández R (1996) *Trypanosoma cruzi* rRNA genes: a repeated element from the non-transcribed spacer is locus specific. *Acta Trop* **62**: 163–170.
- Rae PM & Spear BB (1978) Macronuclear DNA of the hypotrichous ciliate *Oxytricha fallax*. *P Natl Acad Sci USA* **75**: 4992–4996.

- Ramezani-Rad M, Hollenberg CP, Lauber J *et al.* (2003) The *Hansenula polymorpha* (strain CBS4732) genome sequencing and analysis. *FEMS Yeast Res* **4**: 207–215.
- Raska I, Koberna K, Malínský J, Fidlerová H & Masata M (2004) The nucleolus and transcription of ribosomal genes. *Biol Cell* **96**: 579–594.
- Raué HA, Klootwijk J & Musters W (1988) Evolutionary conservation of structure and function of high molecular weight ribosomal RNA. *Prog Biophys Mol Bio* **51**: 77–129.
- Ravel-Chapuis P (1988) Nuclear rDNA in *Euglena gracilis*: paucity of chromosomal units and replication of extrachromosomal units. *Nucleic Acids Res* **16**: 4801–4810.
- Reddy GR, Chakrabarti D, Yowell CA & Dame JB (1991) Sequence microheterogeneity of the three small subunit ribosomal RNA genes of *Babesia bigemina*: expression in erythrocyte culture. *Nucleic Acids Res* **19**: 3641–3645.
- Requena JM, Soto M, Quijada L, Carrillo G & Alonso C (1997) A region containing repeated elements is associated with transcriptional termination of *Leishmania infantum* ribosomal RNA genes. *Mol Biochem Parasit* **84**: 101–110.
- Ricard G, de Graaf RM, Dutilh BE *et al.* (2008) Macronuclear genome structure of the ciliate *Nyctotherus ovalis*: single-gene chromosomes and tiny introns. *BMC Genomics* **9**: 587.
- Roberson AE, Wolffe AP, Hauser LJ & Olins DE (1989) The 5S RNA gene minichromosome of *Euplotes*. *Nucleic Acids Res* **17**: 4699–4712.
- Roditi I (1992) *Trypanosoma vivax*: linkage of the mini-exon (spliced leader) and 5S ribosomal RNA genes. *Nucleic Acids Res* **20**: 1995.
- Rogers MJ, Gutell RR, Damberger SH, Li J, McConkey GA, Waters AP & McCutchan TF (1996) Structural features of the large subunit rRNA expressed in *Plasmodium falciparum* sporozoites that distinguish it from the asexually expressed subunit rRNA. *RNA* **2**: 134–145.
- Rubin GM & Sulston JE (1973) Physical linkage of the 5S cistrons to the 18S and 28S ribosomal RNA cistrons in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Mol Biol* **79**: 521–530.
- Ruoff B, Johansen S & Vogt VM (1992) Characterization of the self-splicing products of a mobile intron from the nuclear rDNA of *Physarum polycephalum*. *Nucleic Acids Res* **20**: 5899–5906.
- Rustchenko EP & Sherman F (1994) Physical constitution of ribosomal genes in common strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **10**: 1157–1171.
- Saito K, Drgon T, Robledo JA, Krupatkin DN & Vasta GR (2002) Characterization of the rRNA locus of *Pfiesteria piscicida* and development of standard and quantitative PCR-based detection assays targeted to the nontranscribed spacer. *Appl Environ Microb* **68**: 5394–5407.
- Sakonju S, Bogenhagen DF & Brown DD (1980) A control region in the center of the 5S RNA gene directs specific initiation of transcription: I. The 5' border of the region. *Cell* **19**: 13–25.
- Santana DM, Lukes J, Sturm NR & Campbell DA (2001) Two sequence classes of kinetoplastid 5S ribosomal RNA gene revealed among bodonid spliced leader RNA gene arrays. *FEMS Microbiol Lett* **204**: 233–237.
- Schaak J, Mao J & Söll D (1982) The 5.8S RNA gene sequence and the ribosomal repeat of *Schizosaccharomyces pombe*. *Nucleic Acids Res* **10**: 2851–2864.
- Schnare MN, Cook JR & Gray MW (1990) Fourteen internal transcribed spacers in the circular ribosomal DNA of *Euglena gracilis*. *J Mol Biol* **215**: 85–91.
- Schnare MN, Collings JC, Spencer DF & Gray MW (2000) The 28S–18S rDNA intergenic spacer from *Crithidia fasciculata*: repeated sequences, length heterogeneity, putative processing sites and potential interactions between U3 small nucleolar RNA and the ribosomal RNA precursor. *Nucleic Acids Res* **28**: 3452–3461.
- Schramm L & Hernandez N (2002) Recruitment of RNA polymerase III to its target promoters. *Genes Dev* **16**: 2593–2620.
- Schroeder-Diedrich JM, Fuerst PA & Byers TJ (1998) Group-I introns with unusual sequences occur at three sites in nuclear 18S rRNA genes of *Acanthamoeba lenticulata*. *Curr Genet* **34**: 71–78.
- Sehgal D, Mittal V, Ramachandran S, Dhar SK, Bhattacharya A & Bhattacharya S (1994) Nucleotide sequence organisation and analysis of the nuclear ribosomal DNA circle of the protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. *Mol Biochem Parasit* **67**: 205–214.
- Shi X, Chen DH & Suyama Y (1994) A nuclear tRNA gene cluster in the protozoan *Leishmania tarentolae* and differential distribution of nuclear-encoded tRNAs between the cytosol and mitochondria. *Mol Biochem Parasit* **65**: 23–37.
- Shippen-Lentz DE & Vezza AC (1988) The three 5S rRNA genes from the human malaria parasite *Plasmodium falciparum* are linked. *Mol Biochem Parasit* **27**: 263–273.
- Shirley MW (2000) The genome of *Eimeria* spp., with special reference to *Eimeria tenella*-a coccidium from the chicken. *Int J Parasitol* **30**: 485–493.
- Simpson AG & Roger AJ (2004) The real 'kingdoms' of eukaryotes. *Curr Biol* **14**: R693–R696.
- Simpson AG, Stevens JR & Lukes J (2006) The evolution and diversity of kinetoplastid flagellates. *Trends Parasitol* **22**: 168–174.
- Sinclair DA & Guarente L (1997) Extrachromosomal rDNA circles – a cause of aging in yeast. *Cell* **91**: 1033–1042.
- Skryabin KG, Eldarov MA, Larionov VL, Bayev AA, Klootwijk J, de Regt VC, Veldman GM, Planta RJ, Georgiev OI & Hadjiolov AA (1984) Structure and function of the nontranscribed spacer regions of yeast rDNA. *Nucleic Acids Res* **12**: 2955–2968.
- Sogin ML & Edman JC (1989) A self-splicing intron in the small subunit rRNA gene of *Pneumocystis carinii*. *Nucleic Acids Res* **17**: 5349–5359.
- Sogin ML, Ingold A, Karlok M, Nielsen H & Engberg J (1986) Phylogenetic evidence for the acquisition of ribosomal RNA introns subsequent to the divergence of some of the major *Tetrahymena* groups. *EMBO J* **5**: 3625–3630.

- Sollner-Webb B & Mougey EB (1991) News from the nucleolus: rRNA gene expression. *Trends Biochem Sci* **16**: 58–62.
- Spano F & Crisanti A (2000) *Cryptosporidium parvum*: the many secrets of a small genome. *Int J Parasitol* **30**: 553–565.
- Spencer DF, Collings JC, Schnare MN & Gray MW (1987) Multiple spacer sequences in the nuclear large subunit ribosomal RNA gene of *Crithidia fasciculata*. *EMBO J* **6**: 1063–1071.
- Spring H, Grierson D, Hemleben V, Stöhr M, Krohne G, Stadler J & Franke WW (1978) DNA contents and numbers of nucleoli and pre-rRNA-genes in nuclei of gametes and vegetative cells of *Acetabularia mediterranea*. *Exp Cell Res* **114**: 203–215.
- Srivastava AK & Schlessinger D (1991) Structure and organization of ribosomal DNA. *Biochimie* **73**: 631–638.
- Stucki U, Braun R & Roditi I (1993) *Eimeria tenella*: characterization of a 5S ribosomal RNA repeat unit and its use as a species-specific probe. *Exp Parasitol* **76**: 68–75.
- Sturm NR, Maslov DA, Grisard EC & Campbell DA (2001) *Diplonema* spp. possess spliced leader RNA genes similar to the Kinetoplastida. *J Eukaryot Microbiol* **48**: 325–331.
- Sucgang R, Chen G, Liu W, Lindsay R, Lu J, Muzny D, Shaulsky G, Loomis W, Gibbs R & Kuspa A (2003) Sequence and structure of the extrachromosomal palindrome encoding the ribosomal RNA genes in *Dictyostelium*. *Nucleic Acids Res* **31**: 2361–2368.
- Swanton MT, McCarroll RM & Spear BB (1982) The organization of macronuclear rDNA molecules of four hypotrichous ciliated protozoans. *Chromosoma* **85**: 1–9.
- Tabata S (1980) Structure of the 5-S ribosomal RNA gene and its adjacent regions in *Torulopsis utilis*. *Eur J Biochem* **110**: 107–114.
- Tabata S (1981) Nucleotide sequences of the 5S ribosomal RNA genes and their adjacent regions in *Schizosaccharomyces pombe*. *Nucleic Acids Res* **9**: 6429–6437.
- Taghi-Kilani R, Remacha-Moreno M & Wenman WM (1994) Three tandemly repeated 5S ribosomal RNA-encoding genes identified, cloned and characterized from *Cryptosporidium parvum*. *Gene* **142**: 253–258.
- Tang X, Bartlett MS, Smith JW, Lu JJ & Lee CH (1998) Determination of copy number of rRNA genes in *Pneumocystis carinii* f. sp. hominis. *J Clin Microbiol* **36**: 2491–2494.
- Torres-Machorro AL, Hernández R, Sánchez J & López-Villaseñor I (2006) The 5S ribosomal RNA gene from the early diverging protozoa *Trichomonas vaginalis*. *Mol Biochem Parasit* **145**: 269–273.
- Torres-Machorro AL, Hernández R, Alderete JF & López-Villaseñor I (2009) Comparative analyses among the *Trichomonas vaginalis*, *Trichomonas tenax*, and *Tritrichomonas foetus* 5S ribosomal RNA genes. *Curr Genet* **55**: 199–210.
- Tsai SJ, Huang WF & Wang CH (2005) Complete sequence and gene organization of the *Nosema spodopterae* rRNA gene. *J Eukaryot Microbiol* **52**: 52–54.
- Uliana SR, Fischer W, Stempliuk VA & Floeter-Winter LM (1996) Structural and functional characterization of the *Leishmania amazonensis* ribosomal RNA promoter. *Mol Biochem Parasit* **76**: 245–255.
- Unnasch TR & Wirth DF (1983) The avian malaria *Plasmodium lophurae* has a small number of heterogeneous ribosomal RNA genes. *Nucleic Acids Res* **11**: 8443–8459.
- Upcroft JA, Healey A, Mitchell R, Boreham PF & Upcroft P (1990) Antigen expression from the ribosomal DNA repeat unit of *Giardia intestinalis*. *Nucleic Acids Res* **18**: 7077–7081.
- Upcroft JA, Healey A & Upcroft P (1994) A new rDNA repeat unit in human *Giardia*. *J Eukaryot Microbiol* **41**: 639–642.
- Upcroft JA, Abedinia M & Upcroft P (2005) Rearranged subtelomeric rRNA genes in *Giardia duodenalis*. *Eukaryot Cell* **4**: 484–486.
- Vader A, Nielsen H & Johansen S (1999) *In vivo* expression of the nucleolar group I intron-encoded I-dirI homing endonuclease involves the removal of a spliceosomal intron. *EMBO J* **18**: 1003–1013.
- Van de Peer Y, Baldauf SL, Doolittle WF & Meyer A (2000) An updated and comprehensive rRNA phylogeny of (crown) eukaryotes based on rate-calibrated evolutionary distances. *J Mol Evol* **51**: 565–576.
- van Heerikhuizen H, Ykema A, Klootwijk J, Gaillardin C, Ballas C & Fournier P (1985) Heterogeneity in the ribosomal RNA genes of the yeast *Yarrowia lipolytica*; cloning and analysis of two size classes of repeats. *Gene* **39**: 213–222.
- van Keulen H, Gutell RR, Campbell SR, Erlandsen SL & Jarroll EL (1992) The nucleotide sequence of the entire ribosomal DNA operon and the structure of the large subunit rRNA of *Giardia muris*. *J Mol Evol* **35**: 318–328.
- Van Oppen MJ, Olsen JL & Stam WT (1993) Evidence for independent acquisition of group I introns in green algae. *Mol Biol Evol* **10**: 1317–1326.
- van Spaendonk RM, Ramesar J, Janse CJ & Waters AP (2000) The rodent malaria parasite *Plasmodium berghei* does not contain a typical O-type small subunit ribosomal RNA gene. *Mol Biochem Parasit* **105**: 169–174.
- Velichutina IV, Rogers MJ, McCutchan TF & Liebman SW (1998) Chimeric rRNAs containing the GTPase centers of the developmentally regulated ribosomal rRNAs of *Plasmodium falciparum* are functionally distinct. *RNA* **4**: 594–602.
- Verbeet MP, van Heerikhuizen H, Klootwijk J, Fontijn RD & Planta RJ (1984) Evolution of yeast ribosomal DNA: molecular cloning of the rDNA units of *Kluyveromyces lactis* and *Hansenula wingei* and their comparison with the rDNA units of other Saccharomycetoideae. *Mol Gen Genet* **195**: 116–125.
- Vogt VM & Braun R (1976) Structure of ribosomal DNA in *Physarum polycephalum*. *J Mol Biol* **106**: 567–587.
- Vossbrinck CR & Woese CR (1986) Eukaryotic ribosomes that lack a 5.8S RNA. *Nature* **320**: 287–288.
- Wai HH, Vu L, Oakes M & Nomura M (2000) Complete deletion of yeast chromosomal rDNA repeats and integration of a new rDNA repeat: use of rDNA deletion strains for functional analysis of rDNA promoter elements *in vivo*. *Nucleic Acids Res* **28**: 3524–3534.

- Waters AP (1994) The ribosomal RNA genes of *Plasmodium*. *Adv Parasitol* **34**: 33–79.
- Waters AP, Syin C & McCutchan TF (1989) Developmental regulation of stage-specific ribosome populations in *Plasmodium*. *Nature* **342**: 438–440.
- Weiss LM (2001) Microsporidia: emerging pathogenic protists. *Acta Trop* **78**: 89–102.
- Wikmark OG, Einvik C, De Jonckheere JF & Johansen SD (2006) Short-term sequence evolution and vertical inheritance of the *Naegleria* twin-ribozyme group I intron. *BMC Evol Biol* **6**: 39.
- Wilcox LW, Lewis LA, Fuerst PA & Floyd GL (1992) Group I introns within the nuclear-encoded small-subunit rRNA gene of three green algae. *Mol Biol Evol* **9**: 1103–1118.
- Wild MA & Gall JG (1979) An intervening sequence in the gene coding for 25S ribosomal RNA of *Tetrahymena pigmentosa*. *Cell* **16**: 565–573.
- Wood V, Gwilliam R, Rajandream MA *et al.* (2002) The genome sequence of *Schizosaccharomyces pombe*. *Nature* **415**: 871–880.
- Yan S, Lodes MJ, Fox M, Myler PJ & Stuart K (1999) Characterization of the *Leishmania donovani* ribosomal RNA promoter. *Mol Biochem Parasit* **103**: 197–210.
- Yang Q, Zwick MG & Paule MR (1994) Sequence organization of the *Acanthamoeba* rRNA intergenic spacer: identification of transcriptional enhancers. *Nucleic Acids Res* **22**: 4798–4805.
- Yao MC & Gall JG (1977) A single integrated gene for ribosomal RNA in a eucaryote, *Tetrahymena pyriformis*. *Cell* **12**: 121–132.
- Zindrou S, Orozco E, Linder E, Téllez A & Björkman A (2001) Specific detection of *Entamoeba histolytica* DNA by hemolysin gene targeted PCR. *Acta Trop* **78**: 117–125.
- Zwick MG, Wiggs M & Paule MR (1991) Sequence and organization of 5S RNA genes from the eukaryotic protist *Acanthamoeba castellanii*. *Gene* **101**: 153–157.

## Apéndice V

# Comparative analyses among the *Trichomonas vaginalis*, *Trichomonas tenax*, and *Tritrichomonas foetus* 5S ribosomal RNA genes

Ana Lilia Torres-Machorro · Roberto Hernández ·  
John F. Alderete · Imelda López-Villaseñor

Received: 4 December 2008 / Revised: 23 February 2009 / Accepted: 28 February 2009 / Published online: 17 March 2009  
© Springer-Verlag 2009

**Abstract** The 5S ribosomal RNA (5S rRNA) is an essential component of ribosomes. Throughout evolution, variation is found among 5S rRNA genes regarding their chromosomal localization, copy number, and intergenic regions. In this report, we describe and compare the gene sequences, motifs, genomic copy number, and chromosomal localization of the *Trichomonas vaginalis*, *Trichomonas tenax*, and *Tritrichomonas foetus* 5S rRNA genes. *T. vaginalis* and *T. foetus* have a single type of 5S rRNA-coding region, whereas two types were found in *T. tenax*. The sequence identities among the three organisms are between 94 and 97%. The intergenic regions are more divergent in sequence and size with characteristic species-specific motifs. The *T. foetus* 5S rRNA gene has larger and more complex intergenic regions, which contain either an ubiquitin gene or repeated sequences. The 5S rRNA genes were located in Trichomonads chromosomes by fluorescent in situ hybridization.

**Keywords** Ribosome · Intergenic region · RNA polymerase III · Ubiquitin · Repeated sequences · Chromosome

## Introduction

*Trichomonas vaginalis*, *T. tenax*, and *T. foetus* are parasitic amitochondriate protozoa that inhabit the urogenital tract of humans, the oral cavity of humans, and the urogenital tract of cattle, respectively. Phylogenetic analyses based on the 16S ribosomal RNA (rRNA) gene place these organisms near the base of the eukaryotic tree (Sogin 1991). This characteristic, along with their amitochondriate nature and prokaryotic-like ribosomes, suggest that Trichomonads are ancestral eukaryotic organisms that conserve early regulatory mechanisms (Sogin 1991). Recently, the egalitarian model of evolution (Dacks et al. 2008) has challenged the previous proposal: it divides eukaryotes into six major super-groups, although the relationship among them and the order of branching remain unknown. This new eukaryotic phylogeny emphasizes that organisms like Trichomonads are not primitive, but instead highly evolved parasites specialized for their specific environments. Today, the controversy continues and the phylogenetic location of Trichomonads remains unclear.

Since ribosomes from Trichomonads have characteristics evocative of prokaryotes (Chakrabarti et al. 1992); the study of their rRNA genes may lead to the identification of some eukaryotic divergent and/or specific regulatory processes. The typical eukaryotic ribosome is composed of four rRNAs and multiple proteins. Three of the rRNA molecules (18S, 5.8S, and 28S) are encoded in the rRNA gene (rDNA) and are co-transcribed by RNA polymerase I (pol I). The fourth rRNA component, the 5S rRNA, is transcribed by

---

Communicated by S. Hohmann.

---

Nucleotide sequence data reported are available in the DDBJ/EMBL/GenBank databases under the accession numbers FJ492747, FJ492748, FJ492749, FJ492750, and FJ492751.

---

A. L. Torres-Machorro · R. Hernández · I. López-Villaseñor (✉)  
Departamento de Biología Molecular y Biotecnología,  
Instituto de Investigaciones Biomédicas,  
Universidad Nacional Autónoma de México,  
Apartado Postal 70-228, CP 04510 Mexico D.F., Mexico  
e-mail: imelda@biomedicas.unam.mx

J. F. Alderete  
School of Molecular Biosciences,  
Washington State University, Pullman, WA, USA

RNA polymerase III (pol III) and the genes are not generally linked to the rDNA unit (Paule and White 2000).

The 5S rRNA gene is generally reiterated in the genome and organized in tandem in head-to-tail repeats, which can be encoded in one or in multiple gene clusters (Long and Dawid 1980). Great variation is found in the localization and number of chromosomal sites of the 5S rRNA genes throughout evolution. Depending on the species, the gene copy number per genome can range from 3 copies in *Plasmodium falciparum* (Shippen-Lentz and Vezza 1988) to about  $10^6$  copies in *Euplotes carassus* (Roberson et al. 1989). These genes can be localized in a single or in multiple chromosomes or chromosome loci. In general, all the copies of the 5S rRNA gene are considered identical in a particular organism. However, some eukaryotes such as *P. falciparum* (Shippen-Lentz and Vezza 1988), *Cryptosporidium parvum* (Taghi-Kilani et al. 1994), *Neurospora crassa* (Selker et al. 1981), and mouse and human (Hallenberg et al. 1994) have sequence and length variation in the 5S rRNA intergenic region and eventually in the 5S rRNA-coding region. It has been reported that the tandem repeats of the 5S rRNA genes can be linked to different multigene families. Among these are the rDNA in *Dictyostelium discoideum* (Cockburn et al. 1978), some tRNA genes in *Entamoeba histolytica* (Clark et al. 2006), the spliced leader gene in *Trypanosoma vivax* (Roditi 1992), the histone gene cluster in crustaceans (Pelliccia et al. 2001), and the ubiquitin genes in *Tetrahymena pyriformis* (Guerreiro et al. 1993).

The 5S rRNA genes are transcribed by pol III. In contrast to pol I and pol II promoters, the pol III promoter of this gene is internal to the rRNA-coding region (internal control region, ICR) (Schramm and Hernandez 2002). In some organisms, the ICR alone is sufficient to direct pol III transcription, but in others such as yeast, the 5S rRNA gene transcription may also be regulated by upstream regulatory sequences, such as an upstream promoter element (upe) and a start site element (sse) (Lee et al. 1997).

In a previous work, we reported the sequence of the *T. vaginalis* 5S rRNA gene and identified putative pol III regulatory elements such as an internal promoter, upstream regulatory sequences, and a palindromic sequence within the intergenic region that may indicate a high-energy hairpin structure (Torres-Machorro et al. 2006). In this study, we compare the 5S rRNA gene sequence, genomic organization, and chromosome localization among three Trichomonad species. We found at least two types of 5S rRNA genes in each of the three species, although most of the sequence variation, within and between species, was found in the 5S rRNA intergenic region. *T. vaginalis* and *T. tenax* are more similar in the 5S rRNA gene sequence, organization, size, and chromosomal localization, while *T. foetus*

has larger intergenic regions with particular species-specific motifs, such as an ubiquitin open reading frame (ORF) and repeated sequences.

## Materials and methods

### Trichomonads and culture conditions

*Trichomonas vaginalis* CNC147 isolate (Alvarez-Sanchez et al. 2000) and *T. foetus* (02-97) were grown as previously described (Espinosa et al. 2002). The *T. tenax* Hs-4:NIH was grown in LYI *Entamoeba* medium supplemented with 10% fetal bovine serum as recommended by ATCC.

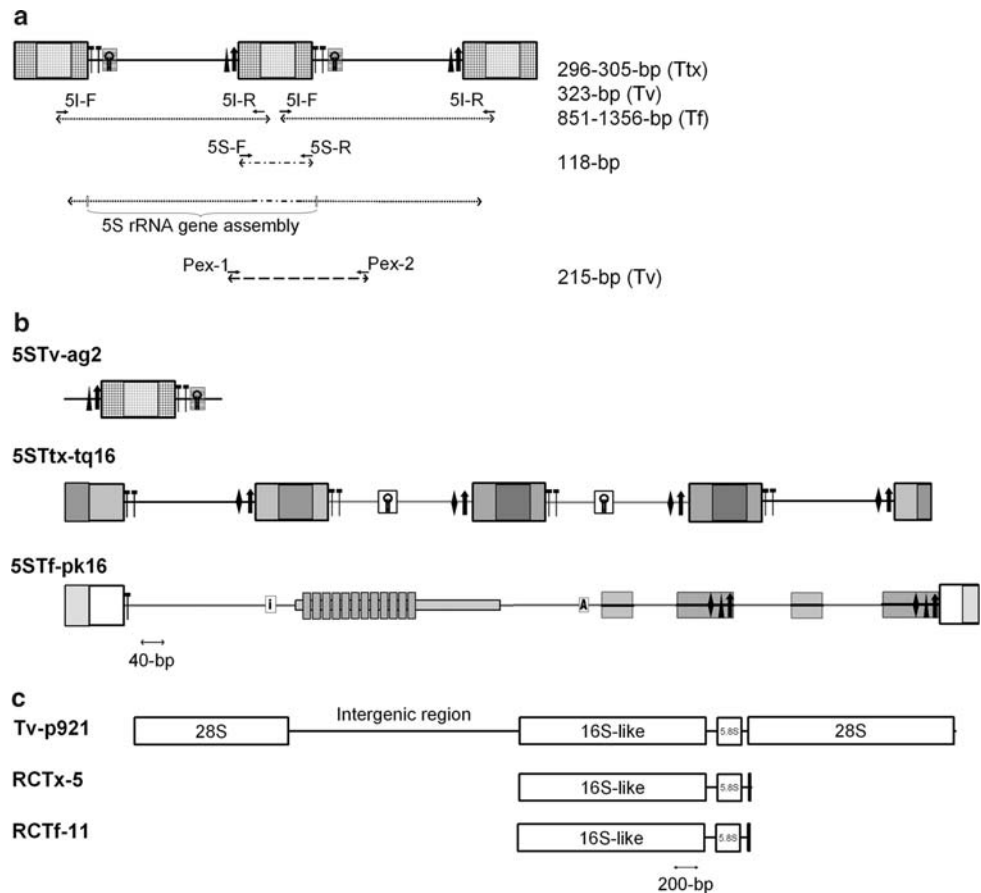
### Trichomonads 5S rRNA gene cloning and sequencing

To clone the 5S rRNA intergenic regions of the three Trichomonads, we took advantage of the tandem organization of these genes and of their sequence conservation (Torres-Machorro et al. 2006). Two independent PCR amplifications were made with genomic DNA (prepared as described by Espinosa et al. 2002) and the 5I-F (5'-TACTGGGCTAGGAGACTT-3') and 5I-R (5'-CGCGACTGCTTAA TTTCCA-3') oligonucleotides (oligos), which align within the 5S rRNA gene-coding region and extend toward the intergenic region (Fig. 1a). The amplification reactions consisted of 30 cycles of 92°C denaturing for 1 min, 46°C annealing for 1 min, and 72°C extension for 3 min, with *Taq* DNA polymerase (recombinant, Invitrogen). The PCR products were cloned using the Zero Blunt® TOPO® PCR cloning kit (Invitrogen). Eighteen clones from *T. vaginalis*, 11 from *T. tenax*, and 9 from *T. foetus* were sequenced.

To clone the Type B-Tv 5S rRNA intergenic region of the *T. vaginalis* CNC147 isolate, a genomic PCR was made using the Type B-Tv specific oligonucleotide RI335 (5'-CAAATTAACAAAATTTTCAGCAGAGAGTGGTGT-3') and the 5S-R (5'-AAGCAAGCACCGCACGTTCC-3') oligo. The annealing temperature was 54°C. The PCR product was cloned using the Zero Blunt TOPO PCR cloning kit (Invitrogen) and four clones were sequenced.

To clone the 5S rRNA gene-coding region, PCR amplifications were made using genomic DNA and the 5S-F (5'-AAGCGGCCACACCCGGCTGG-3') and 5S-R oligos (Fig. 1a). The PCR amplification conditions used were the same as described for the intergenic region except for changing the annealing temperature to 53°C. For each of the three organisms, at least three independent clones of the coding region were sequenced. These 5S gene PCR products were also used to estimate the gene copy number. To obtain the complete 5S rRNA gene sequence, intergenic and coding region sequences were assembled as shown in

**Fig. 1** Trichomonads 5S rRNA gene cloning and sequencing. **a** Schematic diagram of the tandem organization of the 5S rRNA genes. The regions where oligonucleotides anneal in the 5S rRNA genes are shown with arrows. The PCR amplification products are shown with different line styles. The assembly strategy is also shown. **b** Trichomonads 5S rRNA gene fragments (obtained from TOPO clones) used for the synthesis of probes. **c** Trichomonads rDNA fragments used as probes for the FISH assays. The *T. vaginalis* Tv-p921 clone is a genomic clone. RcTx-5 and RcTf-11 are clones obtained by PCR amplification and cloning of *T. tenax* and *T. foetus* rDNA



**Fig. 1a.** Two clones were obtained containing several linked 5S gene copies (see clone 5STtx-tq16, Fig. 1b), which allowed us to discriminate between the two types of coding regions in *T. tenax*.

5S rRNA gene copy number in *Trichomonas tenax* and *Tritrichomonas foetus*

The 5S rRNA gene copy number was estimated by a comparative quantitative hybridization approach essentially as described (Torres-Machorro et al. 2006; Chakrabarti et al. 1992), except for the use of a slot blot instead of a Southern blot approach. Briefly, genomic DNA from *T. tenax* and *T. foetus* was digested with *Hind*III, phenol extracted, ethanol precipitated, and resuspended in 0.4 M NaOH/10 mM EDTA solution. Decreasing amounts of this DNA were loaded in a slot blot apparatus (Hoefer Scientific) alongside decreasing amounts of the corresponding 5S rRNA-coding region. This 116 bp 5S rRNA gene PCR product represents one gene copy. Additionally, the same 5S gene-coding region PCR fragment was radioactively labeled (Rediprime II, GE Healthcare) and used as a probe. The conditions used for hybridization were as described (Espinoza et al. 2002).

Fluorescence in situ hybridization

*Trichomonas vaginalis*, *T. foetus*, and *T. tenax* cells were prepared for in situ hybridization using the hypotonic swelling technique (Xu et al. 1998) with the following modifications. Cells grown in TYM medium with 10% horse serum were not treated with colchicine. Cells were grown to a density of  $2 \times 10^6$  cells/ml, diluted to  $1 \times 10^6$  cells/ml in the same medium, grown further for 3 h at 37°C, and harvested. With this modification, cells with nuclei in multiple states of chromosome condensation were obtained. After centrifugation, cells were resuspended in 10 ml of 10 mM KCl and incubated at 37°C for 5 min, followed by the addition of 2 ml of fixative solution (chilled methanol acetic acid 3:1) as an important pre-fixing step. The nuclei were then centrifuged at  $200 \times g$  for 10 min at room temperature, the supernatant was removed and the nuclei pellet was resuspended in 10 ml of ice-cold fixative solution. This last step was repeated two more times. Finally, nuclei were resuspended in a final volume of 500  $\mu$ l. As much as 60  $\mu$ l of the nuclei suspension was dropped from a 1.3 m height onto clean, grease-free slides. The smears on the slides were heat-dried. The slides were aged in a nitrogen atmosphere for 3 days. Nuclei were fixed by immersion of the



slides in 1% paraformaldehyde in 2X SSC (pH = 7.4) for 30 s, washed twice in 2X SSC (pH = 7.4), and air dried. The slides were then treated with 100 µg/ml ribonuclease A (Sigma) in 2X SSC at 37°C for 1 h. After three washes in 2X SSC, the DNA on the slides was denatured in 70% formamide/2X SSC (pH = 7.4) at 75°C for 2 min. They were immediately placed in 70% ethanol for 2 min, passed through dehydration series of 80 and 100% ethanol for 2 min each, and allowed to air dry. As much as 20 µl of the heat-denatured probe (10 ng/µl) in hybridization solution [50% formamide, 10% dextran sulfate (Sigma), 2X SSC] was added to each slide, covered with a plastic coverslip and incubated overnight in a slightly dampened hybridization box at 37°C. The slides were washed with 50% formamide/2X SSC for 5 min at 37°C, then in 2X SSC and 4X SSC at room temperature for 5 min. Spreads were stained with 0.125 µg/µl DAPI (Sigma) for 1 min, washed with PBS pH = 7.4, and mounted in Vectashield (Vector Laboratories). Samples were visualized with an epifluorescence microscope (BX5I Olympus) using objective Uplan Fl 100X/1.30 Oil ∞/0.17. Images were acquired with an Evolution VF color digital camera (Media Cybernetics) and were analyzed with the Adobe Photoshop software.

#### Preparation of probes for FISH assays

The *T. vaginalis* 5S gene probe corresponds to the Type A-Tv 5S rRNA gene from position –11 to +194 considering the transcription start point as +1 (Fig. 1b). It includes the whole 5S rRNA-coding region (118 bp) and 87 bp of the intergenic region. The probe was directly labeled with Cy<sup>TM</sup>3-dCTP (GE Healthcare) by PCR amplification of the *T. vaginalis* 5S rRNA gene clone 5STv-ag2 (Fig. 1b) with 300 ng of each Pex1 (5'-CGAACAATCCTTTTCGAAGCG-3') and Pex2 (5'-AAGAGTTTTAGCAGGGACAA-3') oligos (Fig. 1a). The PCR conditions were as described for the amplification of the 5S rRNA intergenic region, replacing the dCTP with Cy3-dCTP. Salmon sperm DNA (20 µg; Invitrogen) was added to the PCR final product, which was precipitated with ethanol. After centrifugation, the pellet was dissolved in distilled water to a final concentration of ~100 ng/µl. Before use, the probe was diluted (1:10) in hybridization solution. All probes were treated in a similar way before use. The *T. tenax* 5S gene probe contains two complete Type A-Ttx 5S rRNA gene-coding and intergenic regions and two complete Type B-Ttx 5S rRNA gene-coding and intergenic regions (1,235 bp insert in clone 5STx-Tq16, Fig. 1b). The *T. foetus* 5S gene probe contains 94% of the 5S rRNA-coding region and the complete Type B-Tf 5S rRNA intergenic region (1,356 bp insert in clone 5STf-pk16, Fig. 1b). The probes were labeled with Cy3-dCTP using a Nick Translation System (Invitrogen).

The *T. vaginalis* rRNA gene probe contained the complete 6 kb rDNA unit of *T. vaginalis* (16S-like rRNA, 5.8S rRNA, 28S rRNA, and intergenic region). The Tv-p921 genomic clone insert (Fig. 1c) was labeled by nick-translation with Cy3-dCTP. The *T. tenax* and *T. foetus* rRNA gene probes correspond to a 1,894 bp fragment of the rDNA coding region, which includes the complete 16S and 5.8S rRNA-coding sequences, and 29 bp of the 28S rRNA (Fig. 1c). The inserts of clones RCTx-5 and RCTf-11 (Fig. 1c) were labeled with Cy3-dCTP using the Nick Translation System (Invitrogen).

## Results

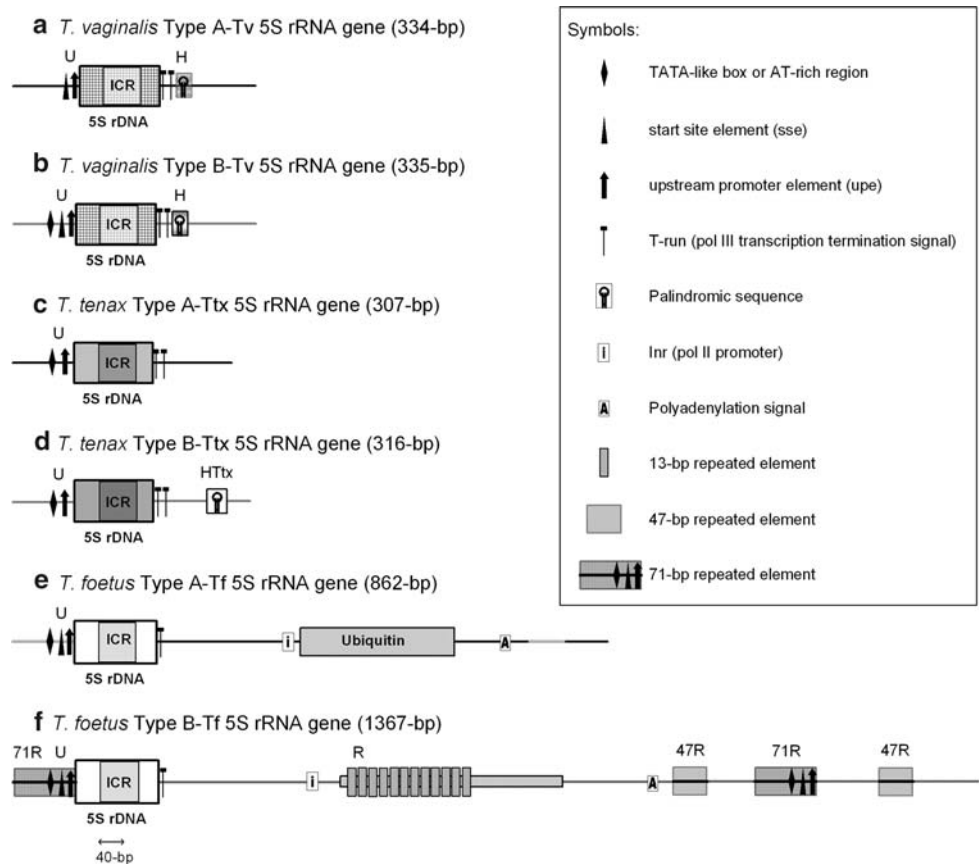
### Trichomonads 5S rRNA gene cloning, sequencing, and assembly

A *T. vaginalis* 5S rRNA gene clone was previously obtained using a PCR approach (Torres-Machorro et al. 2006). The same approach was used for the amplification, cloning, and sequencing of the 5S rRNA genes of *T. tenax* and *T. foetus*, and to extend the *T. vaginalis* 5S rRNA gene analysis. For each organism, two different genomic PCRs were made: one to amplify the 5S rRNA-coding region and a second to amplify the 5S rRNA intergenic region. Both PCR products, which overlap in a 90 bp region, were cloned, sequenced, and assembled (Fig. 1a). Clones containing one or several tandem 5S rRNA genes were obtained.

### The 5S rRNA gene in Trichomonads

In a previous report, only one type of 5S rRNA gene and intergenic region was experimentally found in the *T. vaginalis* CNCD147 isolate (Torres-Machorro et al. 2006). In contrast, in an in silico analysis of the *T. vaginalis* G3 strain, whose complete genome has been sequenced (Carlton et al. 2007), two types of *T. vaginalis* 5S rRNA genes could be identified. These 5S rRNA gene variants, named here by us as Type A-Tv and Type B-Tv 5S rRNA genes, have identical coding sequences and a similar gene copy number. Their intergenic regions differ in size by one nucleotide and have a sequence identity of 84%. The Type B-Tv 5S rRNA gene has a TATA-like box located in the putative upstream regulatory region, which is not present in the Type A-Tv 5S rRNA gene (Fig. 2a, b; Table 1). The G3 isolate Type A-Tv 5S rRNA gene is identical in sequence to the one previously found in the CNCD147 isolate.

*Trichomonas tenax* has at least two types of 5S rRNA genes, which measure 307 bp (Type A-Ttx 5S gene) and 316 bp (Type B-Ttx 5S gene) (Fig. 2c, d). The coding regions were assigned by alignment with the published

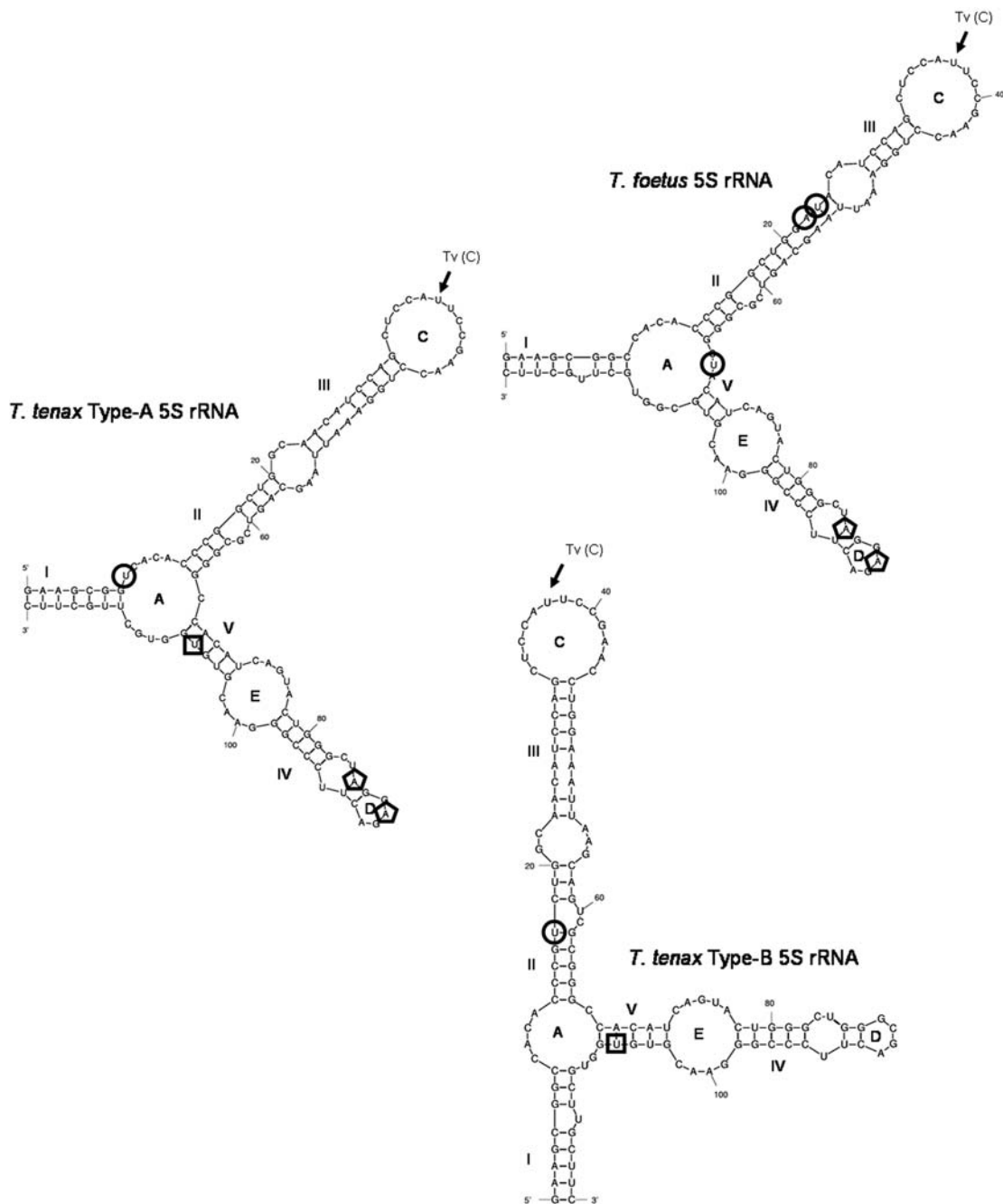


**Fig. 2** The 5S rRNA gene organization in Trichomonads. Graphical representation of the two types of 5S rRNA gene organization in the three studied Trichomonads. A single copy of each variant is depicted, although the genes are found as tandem repeats in the genome. The 5S rRNA-coding regions (118 bp) are shown as boxes. The pol III promoter (ICR, internal control region) is internal to the coding region. The 5S rRNA upstream regulatory region (U) can have an upstream promoter element (upe, triangle), a start site element (sse, arrow), and an AT-rich region or TATA-like box (diamond), and its composition varies depending on the 5S rRNA gene type. The coding region is followed by runs of Ts (T) of different lengths, which act as the pol III

transcription termination signal. In *T. vaginalis*, the two types of 5S rRNA genes have a palindromic sequence (H) that can have slight sequence variations. The *T. tenax* 5S rRNA gene has two types of coding and intergenic regions. The Type B-Ttx 5S gene has a unique palindromic region (HTx) in the middle of the intergenic region. In *T. foetus*, the Type A-Tf 5S gene is characterized by the presence of an ubiquitin ORF (in the intergenic region) with elements for transcription by pol II: the promoter (Inr, i) and the polyadenylation signal (A). The Type B-Tf 5S gene is characterized by the presence of an interrupted ubiquitin ORF and repeated sequences (R) of variable lengths in the intergenic region

**Table 1** Comparison of the 5S rRNA gene sequences and copy number in Trichomonads

	<i>Trichomonas vaginalis</i> (%)	<i>Trichomonas tenax</i>		<i>Trichomonas foetus</i> (%)			
		Ttx A (%)	Ttx B (%)	A-Tf (%)	B-Tf (%)		
<b>Coding region identity</b>							
Tv	100	96	97		95		
Ttx A		100	97		94		
Ttx B			100		96		
		A-Tv (%)	B-Tv (%)	A-Ttx (%)	B-Ttx (%)	A-Tf (%)	B-Tf (%)
<b>Intergenic region identity</b>							
A-Tv (334 bp)	100	84	49	55	42	34	
B-Tv (335 bp)		100	43	43	36	43	
A-Ttx (307 bp)			100	57	47	46	
B-Ttx (316 bp)				100	38	35	
A-Tf (862 bp)					100	87	
5S gene genome percentage (%)	0.10		0.01		0.04		

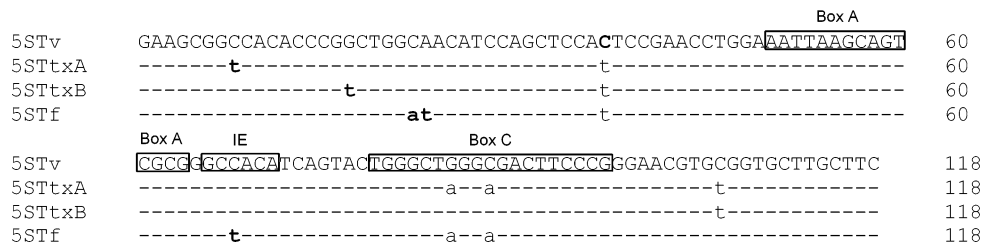


**Fig. 3** Predicted secondary structure for the *T. tenax* (Type A and B) and *T. foetus* 5S rRNAs. Helices are denoted by *roman numerals* and loops by *capital letters*. Sequences were folded with Zuker's mfold software (<http://mfold.bioinfo.rpi.edu/cgi-bin/ma-form1.cgi>). *Circles*

depict nucleotides specific of each type of 5S rRNA species. *Squares* highlight *T. tenax* 5S rRNA specific nucleotides. *Pentagons* show *T. tenax* and *T. foetus* Type B 5S rRNA shared nucleotides. Tv(C) indicates the localization of the *T. vaginalis* 5S rRNA-specific nucleotide

*T. vaginalis* sequence. Both variants contain the putative internal pol III promoter. The 5S rRNA putative upstream regulatory region of both types of *T. tenax* genes is composed of a start site element, a GC-rich region, and a TATA-like box (Fig. 2c, d). The two types of 5S rRNA gene-coding regions (118 bp) are 97% identical in sequence, differing only in four nucleotides (Fig. 2;

Table 1). The *T. tenax* 5S rRNA predicted secondary structures have two nucleotide changes in paired regions (stems) and two changes in the A and D loops (Fig. 3). The secondary structure of the paired regions is conserved in both types of molecules, changing only the pairing between G-C and A-U to the non-canonical pairing G-U (Fig. 3).



**Fig. 4** Sequence comparison of the three *Trichomonads* 5S rRNA-coding region. Alignment of the 5S rRNA-coding sequences found in *Trichomonads*. The pol III promoter (ICR) is composed of a *box A*, an intermediate element (IE) and a *box C*. *T. tenax* has two types of 5S

rRNA-coding sequences, named 5STtxA and 5STtxB, while a single coding sequence was found in *T. vaginalis* and in *T. foetus*. The species-specific sequence variations are denoted in *black fonts*

*Tritrichomonas foetus* has at least two types of 5S rRNA genes. These genes are identical in the coding region, but differ in the intergenic region sequence. We named these genes as Type A-Tf 5S rRNA gene (862 bp) and Type B-Tf 5S rRNA gene (~ 1,300 bp) (Fig. 2e, f). The *T. foetus* 5S rRNA-coding region (118 bp) conserves the putative pol III promoter sequence and secondary structure described in the *T. vaginalis* 5S rRNA gene (Fig. 3). Compared to the *T. vaginalis* 5S rRNA gene-coding region, it has three nucleotide variations (Fig. 4). The putative upstream regulatory region in both types of 5S rRNA gene are composed of a start site element, an upstream promoter element, and an AT-rich region (Fig. 2e, f). The typical transcription termination signal for pol III, a run of Ts, was found in the 3'-side of the 5S rRNA-coding region of the three *Trichomonads* (Fig. 2).

The 5S rRNA gene-coding region sequence was compared among the three *Trichomonads*, and a very high similarity was found among the three with a sequence identity ranging from 94 to 97% (Table 1). The Type B-Ttx and the *T. vaginalis* 5S rRNA gene-coding sequences are the most related pair with 97% sequence identity. We found that each *Trichomonad* has specific nucleotide variations within the 5S rRNA-coding region, and these are “species-specific” (Fig. 4) and useful for the delineation among the *Trichomonad* species. It is noteworthy that the expression of both types of 5S rRNA genes in *T. tenax* and *T. foetus* was experimentally confirmed by RT-PCR (data not shown).

The 5S rRNA intergenic region motifs in *Trichomonads*

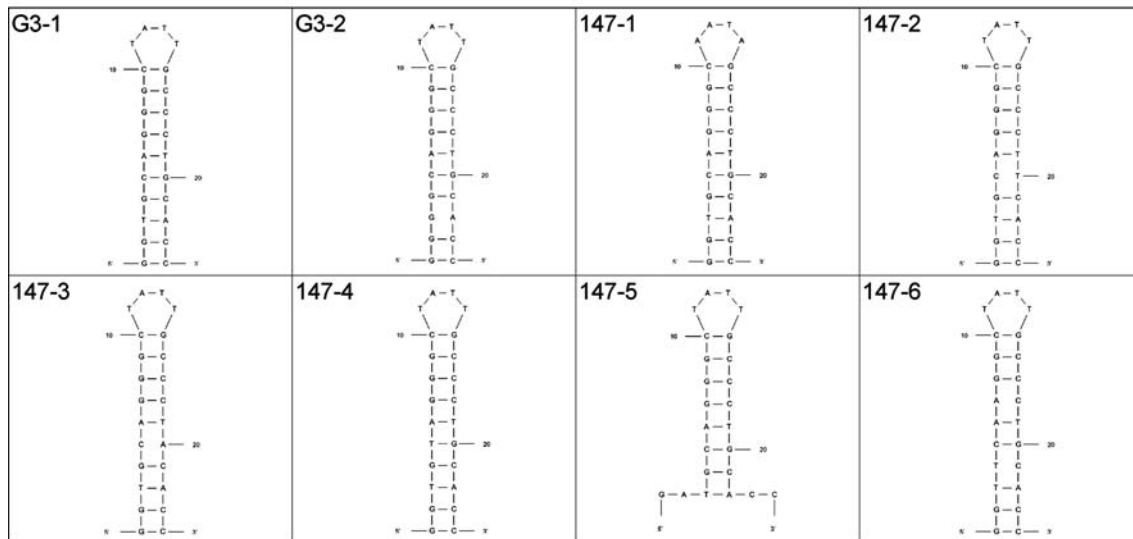
Two different 5S rRNA intergenic regions were identified in silico in the genome of the *T. vaginalis* G3 isolate, which differ in size by one nucleotide and have a sequence identity of 84%. Since a single 5S gene sequence was previously found in the *T. vaginalis* CNC147 isolate (Torres-Machorro et al. 2006), we experimentally searched for the second type of 5S rRNA intergenic region in this isolate. Type B-Tv 5S gene could only be identified by PCR amplification

using Type B-Tv 5S gene-specific oligonucleotides. With this approach, eight sequence variants in the palindromic region were also identified (Fig. 5). Nevertheless, sequence variation in the hairpin region was also found in an in silico analysis of the 5S rRNA gene in the *T. vaginalis* G3 isolate (Fig. 5).

*Trichomonas tenax* has at least two types of 5S rRNA gene, with 307 and 316 bp in length (Fig. 2c, d). The *T. tenax* 5S rRNA intergenic regions are only 59% identical in sequence (Table 1) and differ by the presence of a putative high-energy hairpin (−9.6 kcal/mol) located in position −118 of Type B-Ttx 5S gene intergenic region (Fig. 2d). This hairpin shares no sequence or position similarity with the one found in the *T. vaginalis* 5S rRNA gene. Six Type A and five Type B clones were identified by sequence, suggesting a similar number of 5S rRNA genes from each type.

*Trichomonas foetus* has at least two types of 5S rRNA genes with 862 and 1,262–1,367 bp in length. The Type A-Tf 5S rRNA intergenic region (744 bp) contains a complete ORF for ubiquitin (Fig. 2e) and a typical pol II promoter, which is identical to the Inr previously described in *T. vaginalis* (Liston and Johnson 1999). In the 3'-end of the ubiquitin gene the mRNA polyadenylation signal for *T. vaginalis* was found (Espinosa et al. 2002). The Type B-Tf 5S gene intergenic region can vary in size from 1,144 to 1,249 bp, depending on the number of repetitions of a 13 bp repeated element. The intergenic region is characterized by the presence of two blocks of repeated sequences: the first block is composed of between 5 and 12 tandem repeated motifs (13 bp long), which were found to interrupt the ubiquitin-coding region. The second block is composed of two sequences of 47 and 71 bp, with each sequence repeated once. The 47 bp repeated sequences are located in positions −233 and −516 considering the tsp as +1 (Fig. 2f). Interestingly, the 71 bp block contains the putative 5S gene upstream regulatory region (positions −76 and −408). Remarkably, the two types of 5S rRNA intergenic regions in *T. foetus* are very similar in sequence (87% of identity, Table 1) even though they differ in size by about 450 bp. This variation in size is mainly due to the repetitive nature

Name	Sequence	dG (kcal/mol)
G3-1	GGTGCAGGGCTATTGCCCTGCACC	-13.02
G3-2	--g-----	-10.62
147-1	-----a--a-----	-13.12
147-2	-----t-----	-7.96
147-3	-----a-----	-7.94
147-4	---t-----	-9.49
147-5	-a-----	-10.19
147-6	---t--a-----	-3.17



**Fig. 5** Variation in the palindromic sequence found in the 5S rRNA intergenic region of the *T. vaginalis* G3 strain and CNC147 isolate. All the hairpin sequence variations, except G3-2, correspond to sequenced palindromic region variants found in the 5S rRNA gene inter-

genic region of the CNC147 isolate. The first two lines correspond to the hairpin variants found in the G3 isolate. The putative hairpin structures were obtained using the software Mfold (Zuker 2000)

of the Type B-Tf intergenic region (Fig. 2f). Three Type A-Tf and six Type B-Tf clones were obtained, suggesting the presence of more Type B-Tf gene copies in the *T. foetus* genome.

#### 5S rRNA gene copy number and chromosomal localization in Trichomonads

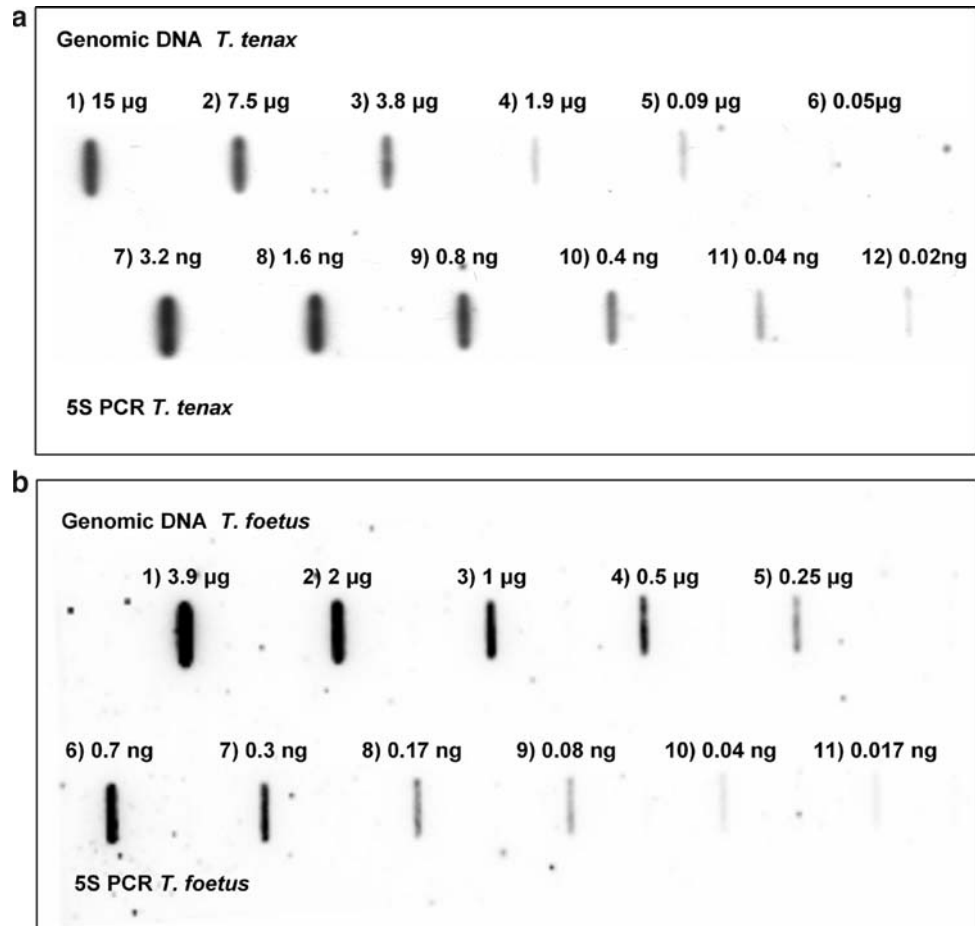
To find out the approximate genomic copy number of the 5S rRNA gene in *T. tenax* and *T. foetus*, a quantitative–qualitative hybridization analysis was used (Fig. 6). This type of quantification is based on the known genome size of a given organism. The genome size of *T. vaginalis* is controversial, ranging in proposed sizes from  $2.5 \times 10^7$  to  $17.6 \times 10^7$  bp (Wang and Wang 1985; Carlton et al. 2007). On the other hand, the size of *T. tenax* and *T. foetus* genomes are also unclear, since their size determination was based on the *T. vaginalis* genome (Zubacova et al. 2008). Nevertheless, it is apparent that the genome size is similar among the three species (Zubacova et al. 2008). Therefore, due to the difficulty in defining a reliable 5S

rRNA gene copy number, we estimated the percentage of the genome sequence that corresponds to the 5S rRNA gene-coding region in each Trichomonad genome (Table 1). The 5S rRNA genes coding region correspond to 0.10% of the genome in *T. vaginalis* and 0.04% of the genome in *T. foetus*, whereas in *T. tenax* this value is about one-tenth of the *T. vaginalis* (0.01% of the genome).

The chromosomal localization of the 5S rRNA genes in Trichomonads was determined by a fluorescent in situ hybridization (FISH) procedure. The chromosomal localization of the rDNA genes was also determined as a control. It has been reported that *T. vaginalis* and *T. tenax* have six chromosomes (Lehker and Alderete 1999; Zubacova et al. 2008), while five chromosomes have been identified in *T. foetus* (Xu et al. 1998). As shown in Fig. 7, the 5S rRNA gene is located in two chromosomes in *T. vaginalis* and in *T. tenax*, whereas this gene is found in a single chromosome in *T. foetus* (Fig. 7a).

Due to the similar size of some of the *T. vaginalis* and *T. tenax* chromosomes, it was difficult to classify and/or name them using our microscopy images. The *T. vaginalis*

**Fig. 6** 5S rRNA gene copy number estimation in *T. tenax* and *T. foetus*. A comparative quantitative hybridization was performed to estimate the 5S rRNA gene copy number in *T. tenax* (a) and *T. foetus* (b). The amount of DNA loaded in each well is indicated. The probes correspond to the complete 5S rRNA-coding region of each organism, labeled with  $^{32}\text{P}$ -dCTP by the random primer technique



chromosomes have been defined as three big, two intermediate sized, and one mini-chromosome (Lehker and Alderete 1999). For *T. tenax*, we identified two large and four small chromosomes. On the other hand, the *T. foetus* chromosomes were easily distinguished due to their clear size variation. We were able to identify all *T. foetus* chromosomes (I–V) according to their size (Fig. 7). In *T. vaginalis*, the 5S rRNA genes are localized in two of its three large chromosomes, while the rDNA gene is localized in the mini-chromosome (Fig. 7). In *T. tenax*, the 5S rRNA genes are localized in one large and one small chromosome, while the rDNA genes are localized in one of the large chromosomes (Fig. 7). In contrast, the *T. foetus* 5S rRNA genes are found in a single chromosome (II), whereas the rDNA genes are localized in the smallest chromosome (V) (Fig. 7).

## Discussion

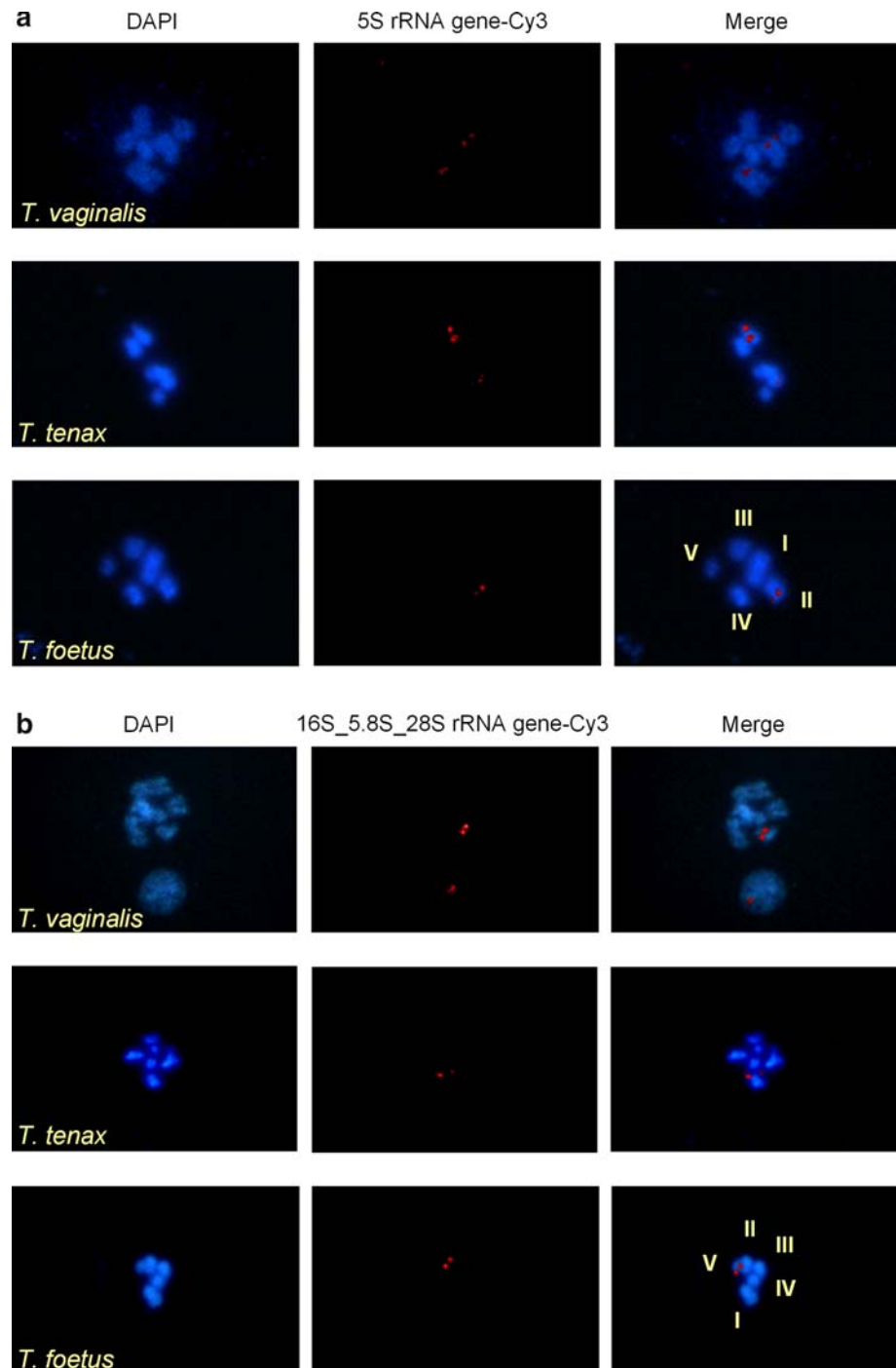
The high sequence identity in the 5S rRNA gene-coding regions of the three Trichomonad species affirms a close phylogenetic relationship among them (Felleisen 1997). Likewise, our data show a conservation of the pol III promoter. Interestingly, we found two 5S rRNA-coding

sequence variants in *T. tenax*, which include variation of the promoter region. This variation within the promoter region may result in putative differential transcriptional regulation as seen in the *Plasmodium* rDNA genes (Waters 1994). On the other hand, the variation in the coding sequence may result in the synthesis of two types of 5S rRNA mature molecules worthy of future experimental analyses to understand the functional implications, if any.

The putative 5S rRNA upstream regulatory region, which includes the start site element, the upstream promoter element, and sometimes a TATA-like box or an AT-rich region is relatively well conserved among the three Trichomonad species. These kinds of elements have been confirmed as important transcriptional regulatory motifs in yeast (Lee et al. 1997). Interestingly, the 5S rRNA gene variants in the *T. vaginalis* G3 isolate have a differential TATA-like motif in the 5S rRNA upstream regulatory region whose potential role in transcription is a working hypothesis in our laboratory.

Since a very high sequence identity was found in the 5S rRNA gene-coding region among the three species, we also expected a relatively high similarity in the sequence and motifs of their intergenic regions. However, we found interesting differences in the intergenic regions of the Trichomo-

**Fig. 7** Chromosomal localization of ribosomal RNA genes in Trichomonads. The 5S rRNA genes (*panel a*) and the rDNA genes (16S\_5.8S\_28S rRNA) (*panel b*) were localized in Trichomonads metaphases by fluorescent in situ hybridization (FISH). The numbers of the *T. foetus* chromosomes are indicated. The rRNA genes probes were labeled with Cy3 (red), and chromosomes were visualized with DAPI (blue)



nads that may reflect the fast evolutionary rate of intergenic sequences in ribosomal genes. The intergenic region sequence and motifs variation in the rRNA genes are found throughout evolution and have been studied more in the rRNA genes (rDNA). The possible involvement of the ribosomal gene sequence variants in transcriptional and epigenetic regulation of the different rDNA gene copies has not been studied in detail in most organisms. *P. falciparum* (and other Apicomplexa) are the only organisms in which

the rDNA gene variants have been confirmed to be involved in a differential transcriptional regulation of the rRNA genes (Waters 1994).

Each of the Trichomonad organisms studied has characteristic species-specific 5S rRNA intergenic region motifs, such as a sequence that could structure a high-energy hairpin in *T. vaginalis*, a Type B-Ttx 5S rRNA-specific high-energy hairpin in *T. tenax* and an ubiquitin ORF and repeated sequences in *T. foetus*. It is reasonable to hypothe-

size that the role of these motifs is for the regulation of 5S rRNA expression. The ubiquitin gene linkage to the 5S rRNA gene has also been observed in an unrelated species, *Tetrahymena pyriformis* (Guerreiro et al. 1993), making interesting the study of the functional relevance of this type of multigenic families' genomic linkage.

It is interesting to note that the organization of the *T. foetus* 5S rRNA gene-repeated sequences is similar to the organization of the rDNA main transcription unit in metazoans. In the rDNA, the “spacer promoter” (a sequence similar to the ribosomal promoter, which is repeated within the intergenic region) has been proposed to have a role in recruiting the pol I transcription machinery as a mechanism to enhance the rDNA transcriptional efficiency (Paule and White 2000). Whether the repeated sequences have a role in regulating the 5S rRNA gene expression requires experimental verification in the future.

We have shown that the 5S rRNA gene copies are located in at least two unlinked clusters of two different chromosomes in *T. tenax* and *T. vaginalis*. In contrast, the 5S rRNA genes in *T. foetus* seem to be located in a single cluster in one chromosome only. The fact that *T. foetus* has one 5S rRNA cluster and one chromosome less than *T. tenax* and *T. vaginalis* makes the analysis of karyotypes in these organisms an interesting topic of research. Whether the genes from the sixth chromosome of *T. tenax* and *T. vaginalis* were reorganized, compacted or lost in the *T. foetus* genome, are questions with interesting implications in evolution.

The rDNA genes are localized in a single chromosome in the three Trichomonad species, and this may be related to the small rDNA copy number in these organisms (Chakrabarti et al. 1992). In *T. vaginalis* and *T. foetus*, the rDNA is found in the smallest chromosome, meaning that the rDNA is not linked to the 5S rRNA gene in these organisms. In contrast, in *T. tenax* the 5S rRNA is located in one of the large chromosomes. Therefore, even though *T. tenax* and *T. vaginalis* are two closely related species, their genomic organization does not seem to be completely conserved. Few karyotyping analyses have been done in Trichomonads (Lehker and Alderete 1999; Zubacova et al. 2008) and no chromosomal markers have been assigned to date. As we have shown, the 5S rRNA genes and the rDNA genes have a well-defined chromosomal localization in Trichomonads. We, therefore, propose these genes as good chromosomal markers for these organisms.

**Acknowledgments** This work was supported by grants P45037-Q and CB-2007-079983 from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) México, and IN214006 from Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT), Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). A scholarship from CONACYT to A.L. Torres-Machorro is acknowledged. The authors thank Karla López Pacheco for cloning the *T. tenax* and *T. foetus*

rDNA fragments, and Ashwini Kucknoor for help with the *T. tenax* cultures. Useful information for the FISH assay was kindly shared by M.E. Gonsebatt's and F. Recillas-Targa's laboratories (UNAM).

**Conflict of interest statement** The authors declare that they have no conflict of interest.

## References

- Alvarez-Sanchez ME, Avila-Gonzalez L, Becerril-Garcia C, Fattel-Facenda LV, Ortega-Lopez J, Arroyo R (2000) A novel cysteine proteinase (CP65) of *Trichomonas vaginalis* involved in cytotoxicity. *Microb Pathog* 28:193–202
- Carlton JM, Hirt RP, Silva JC, Delcher AL, Schatz M, Zhao Q, Wortman JR, Bidwell SL, Alsmark UC, Besteiro S, Sicheritz-Ponten T, Noel CJ, Dacks JB, Foster PG, Simillion C, Van de PY, Miranda-Saavedra D, Barton GJ, Westrop GD, Muller S, Dessi D, Fiori PL, Ren Q, Paulsen I, Zhang H, Bastida-Corcuera FD, Simoes-Barbosa A, Brown MT, Hayes RD, Mukherjee M, Okumura CY, Schneider R, Smith AJ, Vanacova S, Villalvazo M, Haas BJ, Perteu M, Feldblyum TV, Utterback TR, Shu CL, Osoegawa K, de Jong PJ, Hrdy I, Horvathova L, Zubacova Z, Dolezal P, Malik SB, Logsdon JM Jr, Henze K, Gupta A, Wang CC, Dunne RL, Upcroft JA, Upcroft P, White O, Salzberg SL, Tang P, Chiu CH, Lee YS, Embley TM, Coombs GH, Mottram JC, Tachezy J, Fraser-Liggett CM, Johnson PJ (2007) Draft genome sequence of the sexually transmitted pathogen *Trichomonas vaginalis*. *Science* 315:207–212
- Chakrabarti D, Dame JB, Gutell RR, Yowell CA (1992) Characterization of the rDNA unit and sequence analysis of the small subunit rRNA and 5.8S rRNA genes from *Tritrichomonas foetus*. *Mol Biochem Parasitol* 52:75–83
- Clark CG, Ali IK, Zaki M, Loftus BJ, Hall N (2006) Unique organization of tRNA genes in *Entamoeba histolytica*. *Mol Biochem Parasitol* 146:24–29
- Cockburn AF, Taylor WC, Firtel RA (1978) *Dictyostelium* rDNA consists of non-chromosomal palindromic dimers containing 5S and 36S coding regions. *Chromosoma* 70:19–29
- Dacks JB, Walker G, Field MC (2008) Implications of the new eukaryotic systematics for parasitologists. *Parasitol Int* 57:97–104
- Espinosa N, Hernandez R, Lopez-Griego L, Lopez-Villasenor I (2002) Separable putative polyadenylation and cleavage motifs in *Trichomonas vaginalis* mRNAs. *Gene* 289:81–86
- Felleisen RS (1997) Comparative sequence analysis of 5.8S rRNA genes and internal transcribed spacer (ITS) regions of trichomonadid protozoa. *Parasitology* 115:111–119
- Guerreiro P, Neves A, Rodrigues-Pousada C (1993) Clusters of 5S rRNAs in the intergenic region of ubiquitin genes in *Tetrahymena pyriformis*. *Biochim Biophys Acta* 1216:137–139
- Hallenberg C, Nederby NJ, Frederiksen S (1994) Characterization of 5S rRNA genes from mouse. *Gene* 142:291–295
- Lee Y, Wong WM, Guyer D, Erkinde AM, Nazar RN (1997) In vivo analyses of upstream promoter sequence elements in the 5S rRNA gene from *Saccharomyces cerevisiae*. *J Mol Biol* 269:676–683
- Lehker MW, Alderete JF (1999) Resolution of six chromosomes of *Trichomonas vaginalis* and conservation of size and number among isolates. *J Parasitol* 85:976–979
- Liston DR, Johnson PJ (1999) Analysis of a ubiquitous promoter element in a primitive eukaryote: early evolution of the initiator element. *Mol Cell Biol* 19:2380–2388
- Long EO, Dawid IB (1980) Repeated genes in eukaryotes. *Annu Rev Biochem* 49:727–764



- Paule MR, White RJ (2000) Survey and summary: transcription by RNA polymerases I and III. *Nucleic Acids Res* 28:1283–1298
- Pelliccia F, Barzotti R, Bucciarelli E, Rocchi A (2001) 5S ribosomal and U1 small nuclear RNA genes: a new linkage type in the genome of a crustacean that has three different tandemly repeated units containing 5S ribosomal DNA sequences. *Genome* 44:331–335
- Roberson AE, Wolfe AP, Hauser LJ, Olins DE (1989) The 5S RNA gene minichromosome of *Euplotes*. *Nucleic Acids Res* 17:4699–4712
- Roditi I (1992) *Trypanosoma vivax*: linkage of the mini-exon (spliced leader) and 5S ribosomal RNA genes. *Nucleic Acids Res* 20:1995
- Schramm L, Hernandez N (2002) Recruitment of RNA polymerase III to its target promoters. *Genes Dev* 16:2593–2620
- Selker EU, Yanofsky C, Driftmier K, Metznerberg RL, Alzner-DeWeerd B, RajBhandary UL (1981) Dispersed 5S RNA genes in *N. crassa*: structure, expression and evolution. *Cell* 24:819–828
- Shippen-Lentz DE, Vezza AC (1988) The three 5S rRNA genes from the human malaria parasite *Plasmodium falciparum* are linked. *Mol Biochem Parasitol* 27:263–273
- Sogin ML (1991) Early evolution and the origin of eukaryotes. *Curr Opin Genet Dev* 1:457–463
- Taghi-Kilani R, Remacha-Moreno M, Wenman WM (1994) Three tandemly repeated 5S ribosomal RNA-encoding genes identified, cloned and characterized from *Cryptosporidium parvum*. *Gene* 142:253–258
- Torres-Machorro AL, Hernandez R, Sanchez J, Lopez-Villasenor I (2006) The 5S ribosomal RNA gene from the early diverging protozoa *Trichomonas vaginalis*. *Mol Biochem Parasitol* 145:269–273
- Wang AL, Wang CC (1985) Isolation and characterization of DNA from *Tritrichomonas foetus* and *Trichomonas vaginalis*. *Mol Biochem Parasitol* 14:323–335
- Waters AP (1994) The ribosomal RNA genes of *Plasmodium*. *Adv Parasitol* 34:33–79
- Xu WD, Lun ZR, Gajadhar A (1998) Chromosome numbers of *Tritrichomonas foetus* and *Tritrichomonas suis*. *Vet Parasitol* 78:247–251
- Zubacova Z, Cimburek Z, Tachezy J (2008) Comparative analysis of trichomonad genome sizes and karyotypes. *Mol Biochem Parasitol* 161:49–54
- Zuker M (2000) Calculating nucleic acid secondary structure. *Curr Opin Struct Biol* 10:303–310

## **Apéndice VI**

Antecedentes: publicado previamente como resultado del trabajo de licenciatura.

Short communication

## The 5S ribosomal RNA gene from the early diverging protozoa *Trichomonas vaginalis*<sup>☆</sup>

Ana Lilia Torres-Machorro<sup>a</sup>, Roberto Hernández<sup>a</sup>,  
Joaquín Sánchez<sup>b</sup>, Imelda López-Villaseñor<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> 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., Mexico

<sup>b</sup> Facultad de Medicina, Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Avenida Universidad 1001, Cuernavaca Morelos, C.P. 62210, Mexico

Received 25 May 2005; received in revised form 12 October 2005; accepted 12 October 2005

Available online 4 November 2005

**Keywords:** Ribosome; RNA polymerase III; 5S rRNA; Transcription termination; Hairpin; Protozoa; Parasite

*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 [1,2]. This proposal is consistent with other trichomonad ribosomal features that are reminiscent of prokaryotes [3].

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. The 5S rRNA is found in almost every organism with the exception of some plant, fungi and protist mitochondria [4]. The function of the 5S rRNA has not been entirely elucidated but it has important roles in translational fidelity, ribosome biogenesis, peptidyl-transferase activity and LSU stability [5].

In trichomonads, the sedimentation coefficient of ribosomes is 70S and the ribosomal SSU and 5.8S RNAs are smaller than in a typical eukaryote, thus trichomonads ribosomes have features of eubacterial ribosomes [3]. 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 [3,6] and little is known about structural similarity of the various rRNAs or their transcriptional signals. Of special 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 [6,7], 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 [8]. 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](http://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 [9]. 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

**Abbreviations:** b, base; bp, base pairs; ICR, internal control region; LSU, ribosomal large subunit; rDNA, ribosomal DNA; rRNA, ribosomal RNA; S, Svedberg sedimentation units; sse, start site element; upe, upstream promoter element

<sup>☆</sup> Note: Nucleotide sequence data reported in this paper are available in the GenBank™ database under the accession number DQ029070.

\* Corresponding author. Tel.: +52 55 56223366; fax: +52 55 55500048.

E-mail address: [imelda@biomedicas.unam.mx](mailto:imelda@biomedicas.unam.mx) (I. López-Villaseñor).

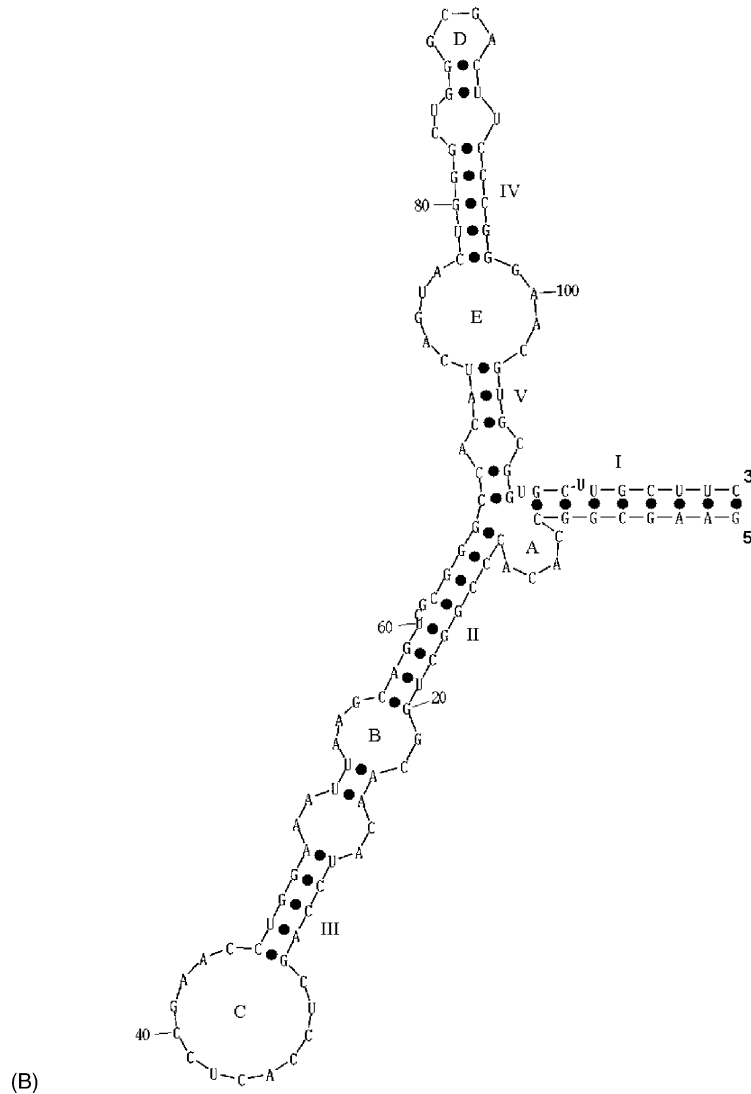
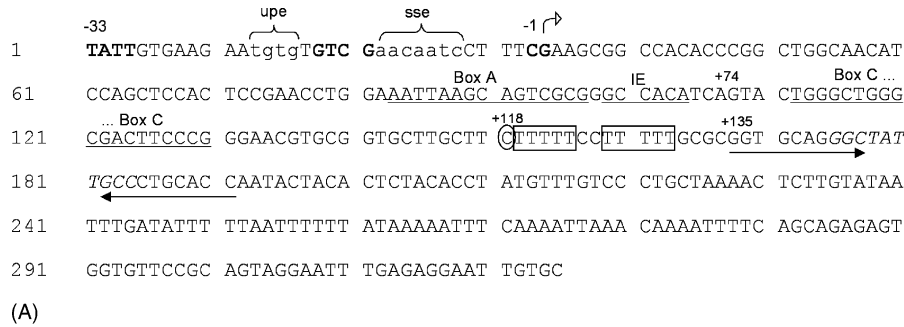


Fig. 1. (A) *T. vaginalis* 5S rRNA gene and putative RNA polymerase III promoter elements within the coding region. The non-template chain is shown. The three conserved upstream regions of 5S rRNA genes are denoted in bold (an A + T rich element at position -32, G + C rich region at -13 and a C at -1). The proposed first transcribed base (G) is marked with an empty-headed arrow and the putative last nucleotide of the mature molecule is shown circled (C in position +118). 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') [11]. 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)TGGNG(T/A)CCN(C/T)NNG-3']. The -AGUA- motif characteristic of eukaryotic 5S rRNA corresponds to positions +74 to +77. Empty boxes reckon T-runs as putative termination sequences. Black-headed 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') [10]. The first 234 bases were conserved between the two *T. vaginalis* 5S rRNA genes identified, while the remaining 101 bases were minimally 61% identical (not shown). (B) Predicted mature *T. vaginalis* 5S rRNA secondary structure. Helices are denoted by roman numerals and loops are named by capital letters.  $\Delta G$  of the secondary structure = -33.1 kcal/mol. The sequence was folded with Zuker's *mfold* software (<http://www.bioinfo.rpi.edu/applications/mfold/old/rna>).

was found. The remaining intergenic region (101 bases) had an identity of 61% between the two repeats (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 (supplementary material at journal website). 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 Fig. 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)AANCNNNN-

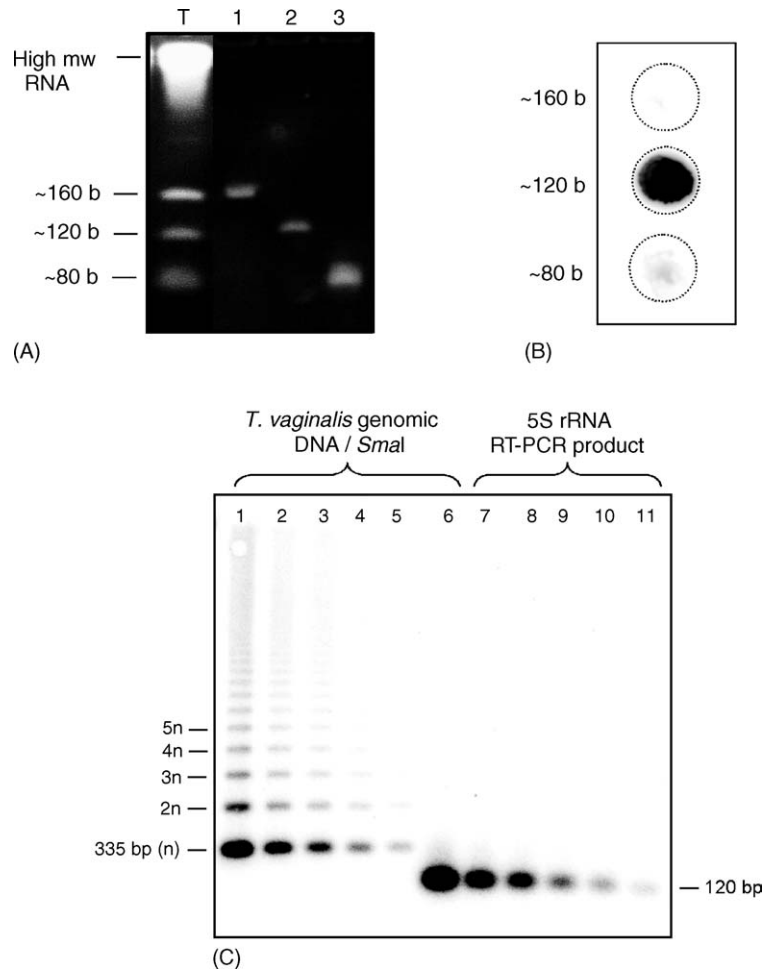


Fig. 2. Genomic organization of the *T. vaginalis* 5S rRNA gene and its relation with a transcribed molecule. (A) Total RNA was extracted from *T. vaginalis* strain CNC 147 as previously reported [17] and was electrophoresed in a 4% polyacrylamide 7M urea gel. Three small-size RNA fragments of about 160, 120 and 80 bases were clearly separated (lane T). These individual bands were cut and the RNA was eluted in 0.3% SDS, 0.14 M NaCl and 0.05 M sodium acetate, pH 5.2, during 4 h at 37 °C. The recovered material was electrophoresed to verify pureness (lane 1: ~160 b RNA; lane 2: ~120 b RNA; lane 3: ~80 b RNA). *Trypanosoma cruzi* small rRNAs were used as molecular weight markers [18]. (B) Dot-blot hybridization of the *T. vaginalis* small RNA molecules. Two micrograms of the purified *T. vaginalis* small-size RNAs was spotted on a nylon membrane and hybridized with a 5S rRNA specific probe. The hybridization signal shows that the ~120 b 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'-CGAACAATCCTTTTCGAAGCG-3' and 5S-2: 5'-AAGAGTTTTCAGCAGGGACAA-3'. 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 [17]. 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 *SmaI* (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 0.0116 ng). This 116 b 5S rRNA RT-PCR product represents one 5S rRNA copy and was obtained with oligonucleotides 5S-F: 5'-AAGCGGCCACACCCGGCTGG-3' and 5S-R: 5'-AAGCAAGCACCGCACGTTCC-3' using the ThermoScript Reverse Transcriptase (Invitrogen) 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 using ammonium acetate as transfer buffer [17]. 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  $2.5 \times 10^7$  bp is assumed as the size of the *T. vaginalis* genome [19].

NNN-3'] and Box C [5'-NNG(G/A)TGGGNG(T/A)CCN(C/T)NNG-3'] of the internal control region (ICR). The ICR has been identified as the binding site for transcription factor TFIIB [10]. 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 TFIIB [11]. 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 [11] (Fig. 1A).

Efficient RNA polymerase III transcription is highly dependent on proper termination [10]. A cluster of four or more T residues surrounded by GC rich sequences has been described as a signal to terminate transcription by RNA polymerase III. 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 nuclear factor 1 (NF1), have been implicated in accurate termination and RNA polymerase III recycling [10]. In this context, the *T. vaginalis* 5S rRNA gene possess two contiguous runs of five 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 10 nt hairpin structure of high thermodynamic stability ( $dG = -13.0$  kcal/mol) (Fig. 1A). Within this palindromic sequence we distinguished a sequence that resembles a NF1 binding site [5'-YTGGCANNNTGCCAR-3'] [10]. 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, 5S rRNA can be folded into a Y shaped structure 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 [5]. The 5' end of the mature 5S rRNA corresponds to that of the primary transcript 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 (see [12] for review). Using Zuker's *mfold* software for prediction of RNA secondary structure (<http://www.bioinfo.rpi.edu/applications/mfold/old/rna>) [13,14] 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 [5]. Both domains are the most important loop E constituents (characteristic of eukaryotic 5S rRNAs) involved in non-canonical base pairing and RNA–RNA contact with the LSU rRNA [5]. Therefore, the *T. vaginalis* hypothetical 5S rRNA model fits well with existing structural models, although this structure remains

to be confirmed by crystallography and/or RNA sequence analysis. 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 fractionated by electrophoresis in 7 M 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 ~160, ~120 and ~80 b bands clearly established that the ~120 b 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* [15], about 1600 copies in *Trypanosoma cruzi* [8] and about 20,000 copies in the *Xenopus* oocyte [16]. 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 trichomonads.

## 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).

## Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.molbiopara.2005.10.009.

## References

- [1] Sogin ML. Early evolution and the origin of eukaryotes. *Curr Opin Genet Dev* 1991;1:457–63.
- [2] 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.
- [3] 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.
- [4] Gray MW, Burger G, Lang BF. Mitochondrial evolution. *Science* 1999;283:1476–81.
- [5] Szymanski M, Barciszewska MZ, Erdmann VA, Barciszewski J. 5S rRNA: structure and interactions. *Biochem J* 2003;371:641–51.
- [6] 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.
- [7] Vanacova S, Liston DR, Tachezy J, Johnson P. Molecular biology of the amitochondriate parasites, *Giardia intestinalis*, *Entamoeba histolytica* and *Trichomonas vaginalis*. *Int J Parasitol* 2003;33:235–55.
- [8] 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.
- [9] Szymanski M, Barciszewska MZ, Erdmann VA, Barciszewski J. 5S ribosomal RNA database. *Nucleic Acids Res* 2002;30:176–8.
- [10] Schramm L, Hernandez N. Recruitment of RNA polymerase III to its target promoters. *Genes Dev* 2002;16:2593–620.
- [11] 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.
- [12] 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.
- [13] Zuker M. *Mfold* web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic Acids Res* 2003;31:2406–15.
- [14] 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.
- [15] Kock J, Cornelissen AWMA. The 5S ribosomal RNA of *Crithidia fasciculata*. *Mol Biochem Parasitol* 1990;38:295–8.
- [16] Wolffe AP. The role of transcription factors, chromatin structure and DNA replication in 5S rRNA gene regulation. *J Cell Sci* 1994;107:2055–63.
- [17] 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.
- [18] 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.
- [19] Wang AL, Wang CC. Isolation and characterization of DNA from *Tritrichomonas foetus* and *Trichomonas vaginalis*. *Mol Biochem Parasitol* 1985;14:323–35.