

4  
24

03062

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

Unidad Académica de los Ciclos Profesional y de Postgrado  
del Colegio de Ciencias y Humanidades

Instituto de Investigaciones Biomédicas

Estructura del ARN de la subunidad mayor ribosomal de Trypanosoma cruzi

Tesis que para obtener el grado de  
MAESTRIA EN INVESTIGACION BIOMEDICA BASICA  
Presenta  
Erika Olivia Gómez González.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

México, D. F., 1993



## **UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso**

### **DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

## INTRODUCCION

### Trypanosoma cruzi

Trypanosoma cruzi es un parásito flagelado, perteneciente al Phylum Protozoa, subphylum Sarcomastigophora, superclase Mastigophora, clase Zoomastigophora, orden Kinetoplastida, suborden Trypanosomatina, familia Trypanosomatidae, género Trypanosoma, sección Stercoralia (1).

### Ciclo de vida

T. cruzi presenta tres estadios en su ciclo biológico: tripomastigote, amastigote y epimastigote. Este ciclo involucra vertebrados mamíferos que fungen como hospederos y reservorios, y un vector triatómino hematófago que en México es comúnmente la llamada chinche hocicona.

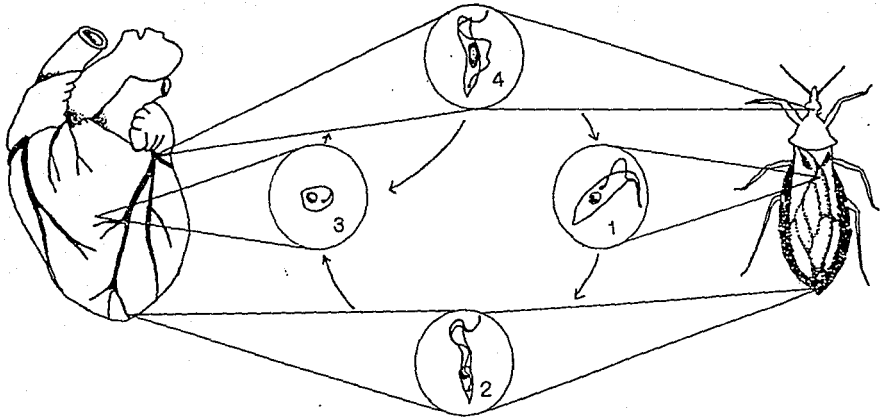
El ciclo vital comienza con la fase de tripomastigote metacíclico, forma contenida en la materia fecal del triatómino y que infecta al hospedero vertebrado penetrando por la picadura del insecto o por las mucosas. Dentro de las células del mamífero se convierte en amastigote, célula redondeada de 2 a 7  $\mu\text{m}$  de diámetro con un gran núcleo excéntrico, que se reproduce rápidamente y al parecer altera la homeostasis de la célula hospedera comprometiendo su función. Poco después, estas células se diferencian en tripomastigotes que inmediatamente son liberados al torrente sanguíneo por lisis celular. Las células de este estadio miden 15 a

20  $\mu\text{m}$ , su cinetoplasto es posteronuclear y poseen una membrana ondulante que en el extremo de la célula se convierte en flagelo. Al ser ingeridos por el triatómino, los tripomastigotes sanguíneos sufren cambios estructurales en el tubo digestivo que los transforman en epimastigotes, estas formas, cuyo cinetoplasto se localiza en el polo anterior de la célula, pueden identificarse desde el estómago hasta el recto del transmisor. Al finalizar el ciclo, el epimastigote se convierte en tripomastigote metacíclico (Figura 1).

#### Enfermedad de Chagas

En el hombre, T. cruzi ataca particularmente el miocardio, esófago y colon causando la enfermedad de Chagas o tripanosomiasis americana (1,2); ésta es la causa más importante de afecciones cardíacas en muchas áreas de centro y sudamérica.

El padecimiento pasa por tres etapas: aguda, de latencia o indeterminada y crónica. La fase aguda, cuando es sintomática se caracteriza por fiebre elevada intermitente, miocarditis y comúnmente por chagoma, hepatoesplenomegalia y linfadenopatías. En la fase indeterminada (10-20 años) la enfermedad desaparece aparentemente para conducir posteriormente en el 30-40% de los casos a la fase crónica, que se caracteriza por miocarditis, insuficiencia cardíaca progresiva, megas viscerales y muerte súbita (1).



- 1 Epimastigote
- 2 Tripomastigote metacíclico
- 3 Amastigote
- 4 Tripomastigote procíclico

Figura 1. Ciclo de vida de *Trypanosoma cruzi*.

En el laboratorio del Dr. Roberto Hernández utilizamos este sistema biológico para conocer procesos básicos de la célula como el procesamiento, estructura y ensamblaje de los componentes ribosomales.

### Ribosomas y ARN ribosomal

Actualmente la evidencia indica que el ARN ribosomal (ARNr) juega un papel funcional primario en todos los pasos de la síntesis de proteínas; por esta razón, los estudios sobre ARNr son de importancia fundamental para entender la topología y función del ribosoma.

En los ribosomas, la mayor parte del ARN consiste de dos moléculas grandes, una en cada subunidad ribosomal. Las moléculas de ARNr mitocondrial son las más variables en longitud, mientras que las de cloroplastos y procariotes son relativamente constantes (16S y 23S en la subunidad pequeña y grande respectivamente), como también lo son las moléculas de ribosomas citoplásmicos de eucariotes (17-18S y 25-28S respectivamente). Prácticamente todas las subunidades ribosomales grandes contienen además un ARNr 5S.

Estos ARNs ribosomales se encuentran asociados a proteínas que contribuyen a estabilizar la conformación de sus sitios funcionales.

## Genes y transcripción del ARNr

En la mayoría de las células de procariotes, el ARNr es típicamente transcrito de un operón u operones como un precursor que es procesado por varias RNasas para dar lugar a los componentes maduros 16, 23 y 5S (3) (Figura 2).

En eucariotes, los genes que codifican para todas las moléculas de ARNr, excepto 5S, son transcritos por la ARN polimerasa I, generándose un transcrito primario que es procesado en el nucleolo. Este procesamiento, además de eliminar distintas regiones variables que dan origen a espaciadores transcritos internos (ETIs), resulta en la remoción, como en procariotes, del ETI que separa 18S del ARNr de la subunidad mayor y de los espaciadores transcritos externos (ETEs), que unidos al espaciador no transcrito separan las múltiples copias de genes ribosomales arregladas generalmente en tandem (4) (Figura 2).

La estructura primaria de todos los ARNs ribosomales muestra regiones de secuencia muy conservada a lo largo de la evolución. Estos módulos conservados se encuentran separados entre sí por regiones de tamaño y secuencia muy variable (5).

## Procesamiento en el ARNr mayor

En una gran variedad de phyla, y tanto en el núcleo como en organelos, la molécula de ARNr mayor (23S en Escherichia coli) se encuentra fragmentada, ya que una o varias de estas secuencias di-

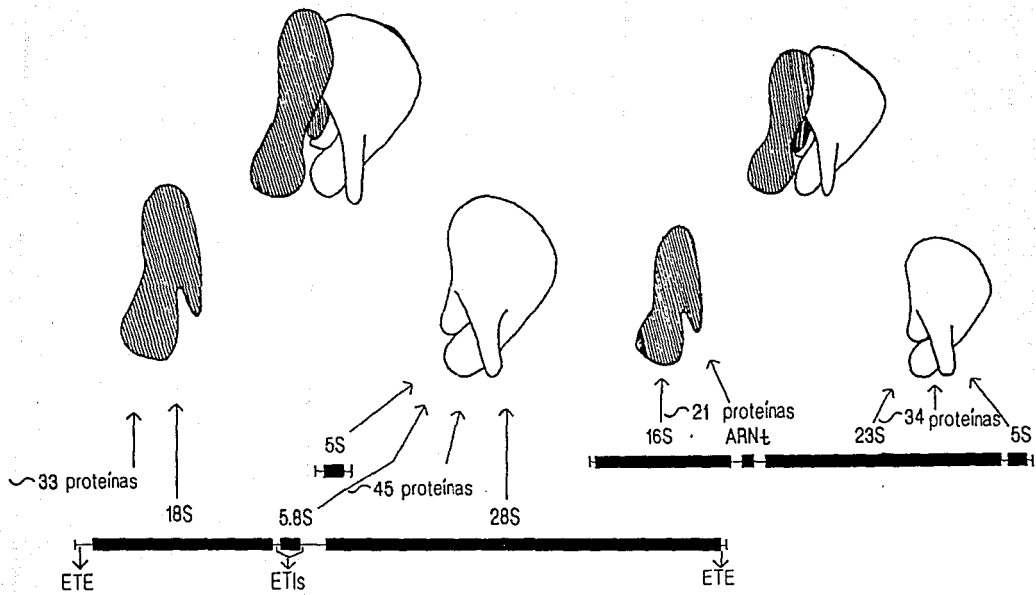


Figura 2. Estructura de los ribosomas eucariotes y procariotes.



vergentes son removidas por procesamiento postranscripcional, sin ligación posterior. De esta manera, la subunidad mayor del ribosoma maduro está integrada por la molécula 5S y dos o más moléculas que corresponden al 23S (Figura 3).

El procesamiento más común de esta molécula da origen, en prácticamente todos los eucariotes (6), a las moléculas 5.8S (que corresponde al extremo 5' de 23S) y 25-28S. El caso con mayor número de procesamientos hasta ahora reportado es el ribosoma de Euglena gracilis, cuya subunidad grande contiene 14 ARNs además del 5S (7).

En los protozoarios de la familia de los tripanosomátidos el procesamiento del ARNr mayor citoplásmico genera siete moléculas: S3, 24S $\alpha$ , S1, 24S $\beta$ , S2, S6 y S4 (8-10) (Figura 4).

En muchas especies los sitios finales de procesamiento están bien definidos, sin embargo el mecanismo de los diferentes eventos de procesamiento y la identidad de los componentes celulares que median estas reacciones han sido más elusivos. Al parecer el primer paso en la maduración del ARNr precursor (procesamiento primario) ocurre dentro del ETE del extremo 5' (11-13), en el caso del ratón se requiere un complejo formado por varios componentes entre los que se encuentran U3 (una pequeña partícula ribonucleoproteica nuclear) (14), nucleolina (15) y al menos cinco polipéptidos más (16). Este evento requiere de estructuras primarias específicas muy conservadas entre mamíferos. Los procesamientos

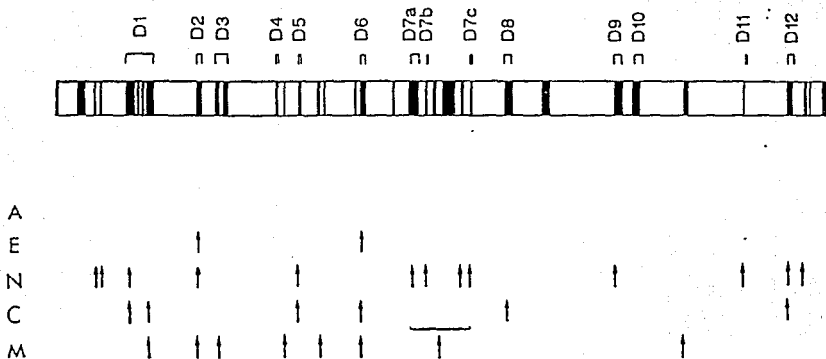


Figura 3. Distribución de regiones conservadas (□) y variables (■) entre la molécula 23S de *E. coli* y las secuencias de las correspondientes moléculas eucariotes conocidas hasta ahora. Las flechas indican la localización de discontinuidades en diferentes linajes evolutivos: A, arqueobacteria; E, eubacteria; M, mitochondria; C, cloroplasto y N, núcleo. D1, D2, etc., se refieren a las regiones divergentes identificadas por Nichol et al. (23).

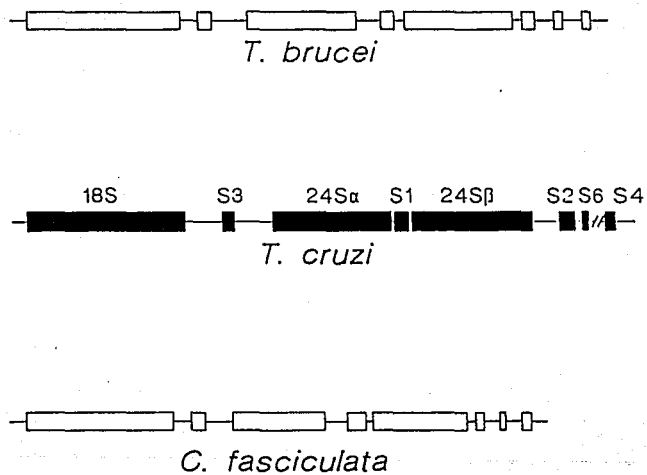


Figura 4. Estructura del cistrón ribosomal en tripanosomátidos.

en 3' de la molécula 18S y en 5' de la 5.8S requieren componentes diferentes que el procesamiento primario. En tripanosomátidos (17) parece ser que diferentes ETIs en la misma molécula son removidos por vías distintas ya que se han observado diferencias en la naturaleza de los extremos (5'-P ó 5'-OH).

En levadura, se ha implicado en la biogénesis del ribosoma a nueve ARNs nucleares pequeños (18-20); hasta ahora se ha demostrado que dos de ellos (snR12B, llamado también U14, y snR10) están involucrados en la maduración del precursor 35S.

Entre especies no relacionadas no se han identificado secuencias conservadas, lo que hace pensar en un probable papel de la estructura secundaria del ARNr precursor. Esta posibilidad unida a la imprescindible relación de la estructura con la función ha dirigido los esfuerzos de varios grupos de investigación hacia la elucidación de las estructuras secundarias de los ARNs ribosomales de muchas especies.

#### **Estructura secundaria del ARNr mayor**

Las moléculas grandes de ARNr tienen estructuras secundarias bien definidas que han sido fuertemente conservadas a través del espectro evolutivo, y en todos los casos reportados hasta ahora la estructura secundaria predicha para las regiones que son procesadas no afecta al resto de la molécula.

Los modelos de estructura secundaria del ARNr mayor se derivaron de los datos experimentales obtenidos de E. coli y de comparaciones filogenéticas con secuencias de otros organismos. En eucariotes no se ha probado directamente la estructura secundaria excepto para algunas regiones (21,22) y la aproximación comparativa se complica por la presencia de las extensas regiones variables.

Sin embargo, se han realizado serios esfuerzos para inferir la estructura de los ARNs ribosomales eucariotes (5,23-25), incluyendo las regiones variables y los espaciadores transcritos (26-28).

#### Consideraciones particulares

En cuanto a los tripanosomátidos, no se ha establecido con claridad el mecanismo de reconocimiento para los cortes específicos que generan las siete moléculas a partir del procesamiento de la molécula mayor de ARNr, ya que no existen secuencias consenso a nivel de estructura primaria (17, 51, este trabajo). Por otro lado, no se han identificado la mayoría de los sitios involucrados en traducción dentro de estas moléculas, y es importante disponer de una hipótesis estructural para la inhibición selectiva y dirigida de los ribosomas de estos parásitos en general, y de T. cruzi en particular.

En el laboratorio se dispone de clonas genómicas que obtuvo y

caracterizó el Dr. Roberto Hernández, que incluyen las regiones codificadoras de S3, 24S $\alpha$ , S1, 24S $\beta$ , S2 y S6 (29). En un trabajo previo se secuenció el ADN que codifica para las moléculas S1 y S3 completas (30).

#### OBJETIVOS ESPECIFICOS

Tomando en consideración todo lo anterior, los objetivos de este trabajo son los siguientes:

- Elucidar la estructura primaria del DNAr de T. cruzi que codifica para las moléculas 24S $\alpha$ , 24S $\beta$ , S2, S6 y S4, y la de los espaciadores transcritos que las separan en la unidad de transcripción.
- Generar una estructura secundaria probable, tomando en cuenta consideraciones de tipo energético y de conservación de la estructura en procariotes y eucariotes.

## MATERIALES Y METODOS

La cepa de I. cruzi utilizada fue aislada en La Cruz, Jalisco por el grupo del Dr. Jorge Tay, Departamento de Ecología Humana, Facultad de Medicina, UNAM.

Las bacterias empleadas para los métodos de clonación fueron las cepas MC1061 y JM101 de la especie E. coli.

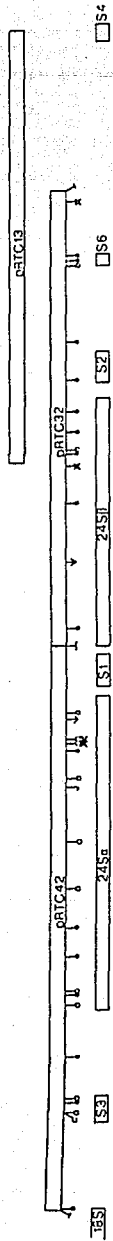
Para este trabajo se utilizaron las clonas genómicas pRTC42, pRTC32, (29) y pRTC13 (Figura 5), que contienen la secuencia codificadora de los ARNs ribosomales 24S $\alpha$ , 24S $\beta$ , S1-S3 y S6, y parte de la secuencia de la molécula S4.

El pUC18 (31) fue utilizado como vehículo molecular para subclonar algunos de los fragmentos que interesaba secuenciar.

La subclonación para secuenciar se llevó a cabo en los derivados del fago M13: M13mp18 y M13mp19 (31).

### Recuperación de ADN a partir de un gel de agarosa de bajo punto de fusión

El ADN digerido fue sometido a electroforesis en un gel de agarosa de bajo punto de fusión. Se visualizó la banda de interés con luz ultravioleta y se cortó el fragmento. El trozo de gel se colocó en un eppendorf estéril y se le añadió 1 volumen de TNE 2X (20 mM de Tris pH 7.5-8.0, 200 mM de cloruro de sodio y 2 mM de EDTA pH 8.0). Se fundió a 65°C 5 min y se extrajo con fenol-Tris dos veces; para eliminar el fenol se extrajo dos veces con éter. El ADN se precipitó con etanol y se resuspendió en 20  $\mu$ l de 6 mM



- ↑ Pst I
- ↓ Sma3AI
- ↓ Hinf I
- ↓ Acl I
- ↓ Nco I
- ↓ Sma3AI/Bgl II
- ↓ Hinc II
- ↓ Sst I

Figura 5. Mapa del cistrón de ARNr en *L. Guzi*. Se indican como pUC13, pUC32 y pUC42 los insertos de las respectivas clonas en pUC18.



de Tris (pH 7.4), 0.2 mM de EDTA (pH 7.2) y 6 mM de cloruro de sodio (6, 6, 0.2).

#### **Electroelución de ADN a partir de un gel de agarosa**

En algunos casos el ADN digerido se sometió a electroforesis en un gel de agarosa, se cortó el fragmento de interés y se colocó en una bolsa de diálisis con TBE 1X (88 mM de Tris-base, 88 mM de ácido bórico y 2.4 mM de EDTA), se sometió a electroforesis en una cámara horizontal durante 2 h a 100 V, al término de las cuales se invirtieron los polos durante 2 min y después se volvieron a invertir durante 15 seg. Se recuperó el contenido de la bolsa de diálisis y se enjuagó ésta con 5 ml de TBE 1X. El volumen total fue pasado por una columna de BND-celulosa.

#### **Purificación de ADN a través de una columna de BND-celulosa**

La BND-celulosa fue macerada hasta polvo y equilibrada en TBE 1X. La columna fue montada en una pipeta estéril de 10 ml, sellada en la punta con fibra de vidrio, con 250  $\mu$ l de BND-celulosa. Se añadieron 3 ml de TBE 1X y posteriormente el ADN a purificar fue pasado por la columna 3 veces. Luego, la columna con el ADN fue lavada con 4 ml de la siguiente solución: 0.1 M de LiCl, 10 mM de Tris (pH 7.4), 1 mM de EDTA (pH 7.4). Posteriormente el DNA fue eluido con 200  $\mu$ l de esta solución: 1 M de LiCl, 10 mM de Tris (pH 7.4), 1 mM de EDTA (pH 7.4) y 20% de etanol. El eluido fue re-

cogido en un tubo eppendorf, se añadieron 600  $\mu$ l más de la solución de elución a la columna y se recogieron en el mismo tubo mezclando bien. El material se precipitó con etanol, resuspendiendo el precipitado final en 6, 6, 0.2.

#### Desfosforilación del vector

En los casos que el vector se digirió con una sola enzima, éste se desfosforiló con 0.5 U de fosfatasa alcalina en 250  $\mu$ l de Tris 100 mM (pH 8.4) a 37°C durante 3 h, después de lo cual se realizó una incubación de 25 min a 55°C. Se añadieron 0.25 U más de enzima, se incubó a 37°C por 2 h y 5 min más a 55°C. La enzima fue extraída con fenol-Tris y cloroformo. El ADN plasmídico fue precipitado con etanol y resuspendido en 6, 6, 0.2.

#### Ligaciones en pUC18 y en los vectores derivados de M13

Las condiciones de ligación fueron las siguientes: 0.1  $\mu$ g de vector, 0.1  $\mu$ g de inserto (ADN de *T. cruzi*), 0.7  $\mu$ l de ligasa (10 U), 4  $\mu$ l de amortiguador de ligación 5X y 1  $\mu$ l de ATP 10 mM en un volumen de 20  $\mu$ l ajustado con agua destilada.

La composición del amortiguador de ligación 5X fue la siguiente: 0.33 M de Tris (pH 7.5), 0.033 M de cloruro de magnesio y 0.05 M de Ditiotreitól. La ligación se realizó a 14°C durante 18 h.

### Preparación de las bacterias para la transformación

El precipitado de un cultivo (50 ml) de bacterias de la cepa K-12 MC1061 (32) crecido en medio LB (10 g de peptona, 5 g de extracto de levadura y 10 g de cloruro de sodio, en un litro de 10 mM Tris pH 7.5-8.4) fue resuspendido en 12.5 ml de 0.1 M de cloruro de calcio a 4°C. Esta suspensión se mantuvo a 4°C 30 min, posteriormente fue centrifugada y nuevamente resuspendida en 2.5 ml de 0.1 M de cloruro de calcio a 4°C. Las células se mantuvieron a 4°C por lo menos 3 h antes de utilizarlas.

### Transformación

La transformación fue realizada tomando 100 µl de la suspensión de bacterias competentes a las cuales se les añadió la mezcla de ligación y se dejó reposar 30 min en hielo, realizando después un choque térmico a 42°C durante 90 seg. Después de 10 min a temperatura ambiente se les añadió 2.5 ml de medio LB y se pusieron en agitación 50 min a 37°C. 50 µl de bacterias transformantes se sembraron en placas de medio LB sólido con ampicilina a 50 µg/µl (el LB tanto sólido como líquido siempre se utilizó con esta concentración de ampicilina).

### Purificación del ADN plasmídico por método rápido a gran escala

Se realizó un cultivo de la colonia bacteriana con el plásmido de interés en 100 ml de medio LB con ampicilina durante toda la

noche. El cultivo fue centrifugado y el precipitado bacteriano fue resuspendido en 12 ml de una solución compuesta por 20 mM de Tris (pH 8.0), 10 mM de EDTA (pH 7.2) y 50 mM de glucosa. Se añadió lisozima a una concentración final de 2 mg/ml y se dejó 30 min en hielo. Posteriormente se añadieron 25 ml de 0.2 N de NaOH en 1% de SDS, se mezcló bien por inversión y se dejó 5 min en hielo. Se añadieron 19 ml de una solución de acetato de sodio 3 M (pH 4.5-5.0) y se mezcló bien hasta homogenizar. Se dejó 1 h en hielo y se centrifugó, se precipitó con dos volúmenes de etanol y el precipitado se resuspendió en 4 ml de 6, 6, 0.2. Finalmente se trató con ARNasa, se extrajo con fenol y cloroformo y se precipitó con etanol resuspendiendo el precipitado en 400  $\mu$ l de 6, 6, 0.2.

#### Quantificación del ADN y determinación espectrofotométrica de su pureza

El ADN purificado con el método anterior se leyó en un espectrofotómetro a 260 nm (1 D.O.=50  $\mu$ g/ml). La pureza se determinó leyendo además a 280 nm y calculando el cociente 260/280.

#### Preparación de las células competentes, transformación y selección de los recombinantes de M13 con los fragmentos heterólogos

El ADN clonado en los vectores derivados de M13 fue introducido en E. coli K-12 JM101 (31) por transformación.

En el caso de esta cepa, para obtener células competentes, un

cultivo (50 ml) crecido en medio YT (8 g de peptona, 5 g de extracto de levadura y 5 g de cloruro de sodio para 1 litro) fue mantenido en hielo 30 min y después centrifugado, el precipitado fue resuspendido en 12.5 ml de 0.1 M de cloruro de calcio a 4°C y se mantuvo 1 h en hielo. Esta suspensión fue centrifugada y nuevamente resuspendida en 2.5 ml de cloruro de calcio a 4°C. Las células se mantuvieron a 4°C por lo menos 1 h antes de utilizarlas.

A 0.3 ml de células competentes se le añadieron 5 µl de la mezcla de ligación y se dejó reposar 40 min en hielo dando después un choque térmico a 42°C durante 2 min. Posteriormente se les añadió una mezcla que contenía 10 µl de IPTG 100 mM, 100 µl de Blue-Gal al 2% en dimetilformamida, 200 µl de células frescas y 3 ml de agar suave (YT con 6 g/l de agar).

Las bacterias fueron sembradas sobre cajas de medio YT. Las bacterias infectadas por M13 se identificaron por las placas de crecimiento lento y entre éstas, las que poseían el inserto por ser translúcidas y no azules como las que presentaba M13 sin inserto.

#### **Purificación de ADN de cadena sencilla a partir de las partículas virales de M13 recombinantes**

Un cultivo de noche de la cepa JM101 fue diluido 1:100 en medio YT fresco, 3 ml de esta dilución fueron inoculados con bacterias infectadas por el fago M13 recombinante de interés. Este cul

tivo se incubó a 37°C con agitación durante 4 a 5 h. Posteriormente 1.4 ml del cultivo fueron centrifugados a 16,000 G durante 5 min y los fagos, presentes en el sobrenadante, fueron precipitados con 4% de polietilenglicol (PEG) y 500 mM de cloruro de sodio, dejando reposar esta suspensión (después de mezclar bien) a 4°C durante 15 min y centrifugándola después a 16,000 G durante 10 min. El precipitado obtenido fue resuspendido en 100 µl de TE (10 mM de Tris pH 8.0 y 1 mM de EDTA). Las proteínas virales fueron extraídas con fenol-Tris y cloroformo y el exceso de éstos fue extraído a su vez con éter. El ADN viral fue finalmente precipitado con etanol y resuspendido en 20 µl de TE.

#### Purificación de ADN plasmídico por un método rápido (miniprep)

En los casos en que la mezcla de ligación contenía varios insertos se requirió de minipreps y digestiones para verificar el tamaño del inserto.

1.5 ml del cultivo infectado con M13 recombinantes, incubado más de 5 h se centrifugó a 16,000 G durante 30 a 45 seg. El precipitado bacteriano fue resuspendido en 100 µl de una solución a 4°C compuesta por 2 mg/ml de lisozima, 25 mM de Tris (pH 8.0), 1 mM de EDTA (pH 7.2) y 50 mM de glucosa y se dejó 30 min a 4°C. Posteriormente se añadieron 200 µl de 0.2 NaOH en 1% de SDS, se mezcló bien y se dejó 5 min a 4°C. Se añadieron 150 µl de una solución de acetato de sodio 3 M (pH 4.7-5.0) fría y se mezcló muy bien.

Se mantuvo 15 min a 4°C y se centrifugó 8 min a 16,000 G. Se guardó el sobrenadante y se añadieron más de dos volúmenes de etanol frío, se dejó precipitar y se resuspendió el precipitado en 50  $\mu$ l de 6, 6, 0.2.

### Secuenciación de ADN por el método de Banger (33)

La secuencia de ADN fue realizada utilizando el kit de Sequenase (United States Biochemical Corporation).

La hibridación del primero al templado fue realizada incubando 1 a 2  $\mu$ l del ADN templado de una sola cadena con 0.5 pmol de primero universal en 10  $\mu$ l de 20 mM de cloruro de magnesio, 50 mM de cloruro de sodio y 10 mM de Tris (pH 7.5), a 65°C durante 2 min y dejando enfriar la mezcla, hasta una temperatura menor de 35°C durante un tiempo mínimo de 1 h.

La reacción de marcado se llevó a cabo durante 5 a 10 min a temperatura ambiente, añadiendo al ADN los siguientes reactivos: 2  $\mu$ l de una solución 1.5  $\mu$ M de dGTP, 1.5  $\mu$ M de dCTP y 1.5  $\mu$ M de dTTP; 1  $\mu$ l de 0.1 M de ditiotreitól; 1  $\mu$ l de 10  $\mu$ M de dATP 5'-( $\alpha$ -<sup>32</sup>P) a 5  $\mu$ Ci/ $\mu$ l; 2  $\mu$ l de sequenase diluida 1:8 en TE.

Separadamente y en tubos rotulados se colocaron:

- En el primer tubo, 2.5  $\mu$ l de "ddA Termination Mix" compuesto por: dGTP 80  $\mu$ M, dCTP 80  $\mu$ M, dTTP 80  $\mu$ M, dATP 80  $\mu$ M, ddATP 8  $\mu$ M y cloruro de sodio 50 mM.

- En el segundo, 2.5  $\mu$ l de "ddC Termination Mix" compuesto

por: dGTP 80  $\mu$ M, dCTP 80  $\mu$ M, dTTP 80  $\mu$ M, dATP 80  $\mu$ M, ddCTP 8  $\mu$ M y cloruro de sodio 50 mM.

- En el tercero, 2.5  $\mu$ l de "ddG Termination Mix" compuesto por: dGTP 80  $\mu$ M, dCTP 80  $\mu$ M, dTTP 80  $\mu$ M, dATP 80  $\mu$ M, ddGTP 8  $\mu$ M y cloruro de sodio 50 mM.

- En el cuarto, 2.5  $\mu$ l de "ddT Termination Mix" compuesto por: dGTP 80  $\mu$ M, dCTP 80  $\mu$ M, dTTP 80  $\mu$ M, dATP 80  $\mu$ M, ddTTP 8  $\mu$ M y cloruro de sodio 50 mM.

Se precalentaron los cuatro tubos a 37°C durante al menos 1 min, justo antes de que finalizara la reacción de marcado.

Al concluir la reacción de marcado, 3.5  $\mu$ l de ésta se colocaron en el primer tubo y la mezcla resultante se reincubó a 37°C durante un tiempo de 5 a 30 min. Este paso se repitió con cada tubo.

La reacción fue detenida con 4  $\mu$ l de una solución compuesta por: 95% de formamida, 20 mM de EDTA, 0.05% de xilén cianol y 0.05% de azul de bromofenol, y se mantuvo en hielo hasta realizar la electroforesis de secuencia.

#### Electroforesis de un gel de secuencia de ADN

Las muestras previamente calentadas a 80°C durante 2 min, fueron cargadas en un gel de 0.4 mm de grosor compuesto por 7.6% de acrilamida, 0.4% de bis acrilamida y 50% de urea ultrapura en TBE



1X.

Antes de colocar las muestras, una precorrida de 1 h fue efectuada en TBE bajo un voltaje de 1,400 a 2,000 V. Dos corridas por muestra fueron realizadas bajo las mismas condiciones: una durante un tiempo de 2-2.5 h y otra de 4.5-5 h.

#### Purificación de las moléculas de ARNr

Se llevó a cabo en un gel de acrilamida al 3.5% en TBE/Urea 7 M. La muestra, que contenía ARN ribosomal total, disuelta en TBE 0.5X, Urea 10 M, azul de bromofenol al 0.03% y xilén cianol al 0.03% fue calentada a 65°C durante 3 min antes de su aplicación. El gel fue precorrido 2 h a 200 V y la electroforesis se llevó a cabo a 40 V durante 8 h a temperatura ambiente. El material se visualizó mediante la transluminación con luz ultravioleta del gel previamente teñido en bromuro de etidio (3 µg/µl). La banda de interés fue recortada.

#### Elución del ARN

El ARN fue eluido en un amortiguador que contenía SDS al 0.3%, cloruro de sodio 0.14 M y acetato de sodio 0.05 M (pH 5.1), a 37°C durante toda la noche. Se recuperó el sobrenadante y se dejó 30 min en hielo-sal, posteriormente se centrifugó y el sobrenadante se precipitó dos veces con etanol. El precipitado final fue resuspendido en agua (el agua que se utilizó en todos los experimen-

tos con ARN fue tratada con dietil pirocarbonato).

#### Fosforilación del ARN

El ARN fue fosforilado in vitro (34), mediante la enzima cinasa del fago T4 que transfiere el fosfato gamma del ATP (en este caso  $^{32}\text{P}$ ) a los extremos 5' hidroxilos del ARN. Con el objeto de generar extremos 5'OH, las moléculas de ARN fueron desfosfatadas utilizando la enzima fosfatasa alcalina en Tris 20 mM (pH 8.4) durante 1 1/2 h a 37°C y posteriormente fue extraída con fenol-cloroformo (1:1). La reacción de fosforilación se llevó a cabo con 1.0 µg de ARN, 10 U de cinasa y 600 µCi de  $^{32}\text{P}$ -gammaATP (7000 Ci/mmol) en 25 µl de Tris 50 mM (pH 7.6), ditioneitol 5 mM, cloruro de magnesio 10 mM, espermidina 0.1 mM y EDTA 0.1 mM. Después de 30 min a 37°C la reacción fue detenida en acetato de amonio 4 M y el ARN se precipitó dos veces con etanol frío. El precipitado fue resuspendido en 10 µl de Urea 7 M/EDTA 1 mM/xilén cianol y azul de bromofenol al 0.05% cada uno.

El  $^{32}\text{P}$ -ARN fue sometido a electroforesis en un gel de características similares al que se utilizó para la purificación de las moléculas a partir de ARNr total, con el fin de eliminar marca libre y productos de degradación. Al término de la electroforesis el gel se expuso a un film de rayos X durante 7.5 min y se utilizó la autoradiografía como guía para cortar las bandas correspon-

dientes. La banda se eluyó bajo las condiciones que se mencionaron anteriormente.

Antes de resuspender el último precipitado se contó la radioactividad obtenida, que fue de  $10^7$  dpm y el ARN se resuspendió en agua a una concentración de  $5 \times 10^5$  dpm/3  $\mu$ l.

### Secuenciación del ARN (35)

La secuencia del extremo 5' de las moléculas S1, S3 y S4 fue realizada utilizando el sistema de secuenciación de ARN de BRL (Bethesda Research Laboratories).

La hidrólisis alcalina fue realizada incubando el  $^{32}\text{P}$ -ARN ( $7.3 \times 10^5$  dpm) en 10  $\mu$ l de 50 mM de bicarbonato/carbonato de sodio (pH 9.2), a 90°C durante 7 min. La reacción se detuvo en hielo y se le añadieron a la mezcla 10  $\mu$ l de Urea 7 M/EDTA 1 mM/xilén cianol y azul de bromofenol al 0.05% cada uno (amortiguador de muestra).

Las mezclas de digestión se realizaron como sigue:

- En el primer tubo se colocó, 2  $\mu$ l de citrato de sodio 0.25 M (pH 5.0), 14  $\mu$ l de amortiguador de muestra, 1  $\mu$ l de ARNt (5  $\mu$ g/ $\mu$ l) y 3  $\mu$ l de  $^{32}\text{P}$ -ARN.

- En el segundo, 2  $\mu$ l de citrato de sodio 0.25 M (pH 3.5), 14  $\mu$ l de amortiguador de muestra, 1  $\mu$ l de ARNt y 3  $\mu$ l de  $^{32}\text{P}$ -ARN.

- En el tercero, 2  $\mu$ l de 0.1 M  $\text{Na}_3\text{PO}_4$ /0.1 mM EDTA, 2  $\mu$ l de ARNt, 11  $\mu$ l de agua y 6  $\mu$ l de  $^{32}\text{P}$ -ARN.

- En el cuarto, 2  $\mu$ l de citrato de sodio 0.25 M (pH 5.0), 1  $\mu$ l de ARnt, 11  $\mu$ l de agua y 6  $\mu$ l de  $^{32}$ P-ARN.

Para las reacciones enzimáticas se tomaron 4  $\mu$ l de las mezclas de digestión más 1  $\mu$ l de la enzima correspondiente (2 U/ $\mu$ l).

Tubo 1: ARNasas Phy M y T1

Tubo 2: ARNasa U2

Tubo 3: ARNasa CL3

Tubo 4: ARNasa B. cereus

También se colocó un control con 4  $\mu$ l de cualquiera de las mezclas sin enzima.

Las mezclas con las ARNasas T1, Phy M, U2 y B. cereus se incubaron 15 min a 55°C y la que contenía la ARNasa CL3 se incubó a 37°C también 15 min. Al término de ese tiempo se añadió a las mezclas de CL3 y B. cereus 5  $\mu$ l de amortiguador de muestra. Todas las reacciones fueron congeladas en hielo seco y posteriormente mantenidas a -20°C hasta realizar la electroforesis.

#### Electroforesis de un gel de secuencia de ARN

El gel utilizado fue de 0.4 mm de grosor, compuesto por 19% de acrilamida, 1% de bis acrilamida y 50% de Urea en TBE. Antes de colocar las muestras, se efectuó una precorrida de 3 h bajo un voltaje de 1000 a 1500 V. Las muestras se calentaron 30 seg a 90°C y se cargaron 5  $\mu$ l de cada reacción. La corrida fue realizada durante un tiempo de 4 h a 1500-2000 V.

#### Secuencia de la molécula 84

Parte de la secuencia de este ARNr se realizó en el laboratorio con la metodología descrita y fue completada con el reporte de Galván y colaboradores (36).

#### Generación de estructuras secundarias del ARN

Para obtener las estructuras se aplicaron algunas reglas básicas: a) los apareamientos que se consideraron fueron G-C, A-U y G-U, b) las hélices se formaron con un mínimo de tres pares de bases y c) los "loops" terminales se formaron con al menos tres nucleótidos.

La estructura secundaria de las regiones constantes se llevó a cabo siguiendo los modelos universales ya reportados (24,25), ya que la aproximación comparativa, a través de la prueba de los cambios compensatorios aplicada a secuencias homólogas, es el instrumento más potente para el establecimiento de una estructura secundaria.

En cuanto a los espaciadores y las regiones variables de mayor tamaño, la estructura secundaria se obtuvo con la ayuda de un programa de Zuker (37) que utiliza las tablas de energía de Ninio (38).

## RESULTADOS Y DISCUSION

### Secuencia primaria

Se secuenciaron 6362 nucleótidos siguiendo la estrategia indicada en la figura 6, de los cuales el 66% corresponde a moléculas maduras y el resto a espaciadores transcritos (Figura 7). El contenido de A+T de la secuencia total es de 55%, siendo un poco mayor en las secuencias no codificadoras.

El alineamiento de las secuencias con otras ya reportadas, permitió localizar las 13 regiones divergentes identificadas por Michot (23), distribuidas como indica la figura 7. Cabe recalcar que algunas de estas secuencias se procesan en tripanosomátidos, y por tanto son espaciadores transcritos internos (ETIs); éste es el caso, de acuerdo con la nomenclatura de Michot et al. (23), de las regiones D7b1 (ETI 3), D7c (ETI 4), parte de D11 (ETI 5) y parte de D12 (ETI 6 y ETI 7) (Figura 7).

Vieira de Arruda y colaboradores (39) publicaron la secuencia de la molécula 24S $\alpha$  de una cepa diferente de T. cruzi; al comparar con nuestros datos observamos muy pocos cambios en las regiones constantes, no así en las variables. Sin embargo estas últimas se pueden doblar de manera muy similar en las dos cepas.

La secuencia de las regiones constantes, incluida la molécula S4, mostró una homología del 97% con la reportada para Crithidia fasciculata (17).

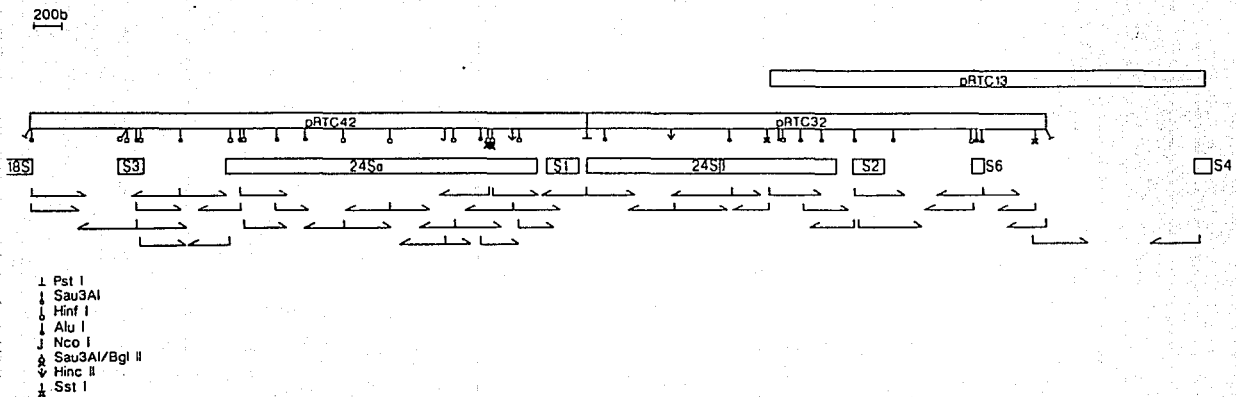


Figura 6. Estrategia de secuenciación. Se indican como pRTC42, pRTC32 y pRTC13 los insertos de las respectivas clonas en pUC18.

Figura 7. Secuencia de las clonas pRTC42 y pRTC32. Las regiones codificadoras se indican encuadradas; las secuencias subrayadas también fueron determinadas por secuencia directa de ARN. Se indican en letra más oscura las regiones divergentes localizadas dentro de las secuencias codificadoras.



1	CCGATGATT	GTTACATATA	TATATATATA	TAATATATAT	ACGGTGTGT	GTGTATAATA
61	TATGTTGTAC	ACACACAATC	AGGCAACAAA	ACTCTGGCGT	GTATATATAT	TACTACTATG
121	CTACTAATAT	ATATACTCTG	TGCTGTGTGT	GTGTGTGTGT	CCGGCCGGGA	GAGGATATAT
181	ATATATACAA	ATATATATAT	ATATACATGT	GTACACGCTA	TTATATATGA	CTATATGTAG
241	TATATATATA	TGTGTGTGTG	TGCTGTGCTG	CTGGCTTCTC	TTCCGACTGA	TACATATATC
301	CACACTGTAC	ATATATATAA	TGTATATAAT	ATATAATATA	CACITGCACG	CGTACAGT
361	GTGTTGGAIG	TGTAGAAAAA	TGTAATTGCG	GCTTGACTTC	CGGIGTGCAC	ATATATAATA
421	TGGCGATATT	TGCTCGTGTG	GTTTATATAT	ATATAATATA	TATTTATTCG	CACGCTTTGT
481	GTGTGTGTGT	TGTTTTTTGT	GCGCGCGTGT	AAAGCACGGC	CCAAACAAAC	TGTCGGGATG
541	GATGACTTGG	CTTCTTATTT	CGTTGAAGAA	CGCAGCAAAG	TGCGATAAGT	GGTATCAATT
601	GCAGAAATCAT	TCAATTACCG	AATCTTTGAA	CGCAAACGGC	GCATGGGAGA	AGCTCCTCAG
661	AGTACTCCCC	GTGCATGCCA	TATTTCTCAG	TGTCGAACAA	AAAAATTAACC	TCCACTCAAC
721	CTGCTCTCTC	TCTATACAAA	CGCATGCATT	CTTGTGTGTG	TGTGTGGGGA	GAGAGGAGG
781	GAGGGGGAAA	ATGCAAAACG	AAAAAAGAGA	GCCCTTGGGG	AGAGACATAT	TACGGATGAA
841	CGCGGGCTCC	CGCCCATCTG	CGGTATATAT	ATATATTTAT	ATATTTATG	TGACTGTGGT
901	TGTGTGTCTT	CTGGTGGTGT	GGTGCATGAT	CCGCCCCGGC	CTTGTGTGTG	TGTTTTGTACA
961	CATAACATAT	GTGCATCTCT	GTGTGTAATG	TGTGTGTGTG	TGTGCAACAA	CAACCAACAC
1021	AAACTACAAA	ACTCGCAAGG	AATTA AAAAG	AATAAAAAAG	AAAAAAAAGT	GGCGTGGAGG
1081	TGTAGTGTGT	GGTGTGTGTG	GTGTGTGTAT	GGTGTTCGGC	TGTTGTCCAC	ACCATATATC
1141	ACATATCATA	CATATATATA	TCACGTAAAA	CGCTCACCGT	TATTTTTTIT	TCTTCTTCTT
1201	TTTTTTTACA	GACCTGAGTG	TGGCAGGACT	ACCCCGCGAA	CTTAAGCATA	TTACTAAGCC
1261	GAGGA AAGA	AAACAACCGT	GATCTCTCA	GTACAGCGGG	AGCGAAGAGG	GATCCAACCT
1321	GTTGCCGAAT	CGGTTCTTAT	AGGAACTTGA	GTTGTGGCAA	GAAAGCGTGC	CTTCGGAGGC
1381	TGGTGCAGGA	ATGTTGAAAT	TCAATTGCAA	AGCAAACCCG	CGTGTGAFTA	CAACCTTCCA
1441	TGTGAGTATT	GAGCCAAGA	AGGTGTTAGC	CCATTGAGCC	ATGAACCTAA	GCGCCTCCTT
1501	AAGCGAACCA	AGAGAGTAGC	ACTGCTTGGG	AGTGCAGTGT	CAAGCTGGCA	GGTATGTTCT
1561	TGCCAAAAGTT	TCAATACAGG	TAGGAAGACC	GATAGCGAAC	AGATGCGTGT	AGCGAAAAGT
1621	TGAAAAAGCAC	TTTGAAAAGA	GAGTGACATA	GAACTCTGAA	TCGTGCAAT	GACAAATGGAA
1681	GTACCTCCAT	TTCAACGGCC	AAAACCAGCC	TCTTTTTTIT	TATAGCCAGC	TTATCCGCTG
1741	GGGTTCAAAA	TCCAGTGGGG	GTAACCCCTT	AAAAAAGCAA	GAAACGAGTC	ATGGGTGATA
1801	AAATGTTGTTG	TGTAAGCGGA	GAGTAAGAGG	GAGCGTGGTT	TCATTGTCTC	CTCTCTTTTC
1861	CTTTTCTCTT	CGGCGGGGAA	GAGGGGGAGG	AGGAGGGACA	AAGCGCTCCT	TCTTCTTGTT
1921	GTGGTCTCAT	ATTTGGCGAA	GGAATGGTGT	CCCCACCCTG	CTTTGAAACA	GCGACCAAGG
1981	AGTCAAACAG	ACGCGCAAG	GAGAAGATAT	CGTGTCCAGT	ACTTCTCTCG	TACTGAAAGG
2041	GAGATGCGAA	ATGCATCTGT	GGTGTGCACA	CTTTTCAATT	TTTGTGTTGT	CCAACACCGA
2101	CGGCCCCCTC	TGGGTTGAG	TTGGAGTGTG	CCTGTTTGGAA	CCCGAAAAGT	GGTGAACAT
2161	GCCTGAACAA	GGTGAAGCCC	GGGGAAACTC	GGGTGGAGCC	CTGTAGCCAT	GCTGACGTTG
2221	AAATCGCTCG	CATGATTTGG	GTATCGGAGC	GAAAGACTCA	TCGAAACCAC	TAGTAGCTGG
2281	TTCACATCGA	AGTITCCCTC	AGGATAGCTG	GTGCTTGTIT	GAAAAAGTAT	TGTGCGGTAA
2341	AGCAAAATGAT	TAGAGGCATT	GGTGTCTTA	GAATATCGAT	CTATTCTCAA	ACTTTAAATG
2401	TGCAAAACAAA	CGGCGCCTTA	GCCAAAATTT	TTTTAGCAAG	CGCGGACAGA	CAAGATTTAA
2461	GGCACCAAGT	CGGCTTCTTT	CGGTAAAGCG	AGCAGGCGGA	GCGGATGAA	CGGCTTAGGA
2521	TATGTGGCGT	CAAAACTTAT	GGGCTCATT	TCGATACGTG	AAHAGGTTGT	TGGTGGATAG
2581	GGACAGTTGG	ACGGTGGCCA	TGGAAGTCGG	CATCCGCTAA	GGACTGTGTA	ACAACCTACC
2641	AACCGAATCC	ACCGCCCCCG	AAAAAGGATG	ACGCTCAAAG	CCAATTAGTG	ATTGCCCAAT
2701	ATTCCTTTGG	TAAGGGCGGG	AAAAGGCAAC	TTTTGTGCGT	GAGAAAGTGT	AGCCCTTCGG
2761	ATGTAGATGT	GGCGTGGAGG	TAAGACGCAA	CTTGATGGCG	GCGGCTCAG	ATTGGACCAG
2821	CTCTAGTGCA	GATCTTGGTT	GGCGTAGCAA	AGATCTAACG	GAAAACTAAT	TAACTGTCAA
2881	CGTGGATGAC	TGGACCGGGG	AAGGATTTCC	TGCCAACCCG	CGCTGTACAC	GAGTGTTCG
2941	GATACTGACG	ACAACGTTAC	ACCGTTTTGT	TAGGAAAATG	AAGGTGGCTC	GACAGTGTGT
3001	GGGAGTCTCT	TCTTCTTTTC	CCCCCTCTCT	CCTTTTGGTG	TGGAGGGGTT	TGGGAGGAAG
3061	AAGCCCCCTA	CTGTTCCGGC	ATTCTGAAAA	GGGGCAACAG	AGAACCCTGG	ATTATATCC
3121	AAAAAGAAT	TGCATGTGGG	AAAAAAAAT	AAATACAATA	TATATAATAT	ATATATATAT

3181	ATATACATTT	TTTGTGGGA	AATGCGAACC	ACTTGCCAGG	TGACCAATCA	ATCCTCCAC
3241	GGTGAGCTTT	CTTTTCACCA	TAATCCACAT	CTCCGGCTTT	GCTGGGGCTT	GGGCTTTCT
3301	ACTTCTCGCG	TTGTTCCGAG	CGGGGGCTCA	AGATTGAAA	ATGCAGCTCA	CCCTACGTAC
3361	TGTCATTGTT	GTGAGTTCTG	CGCATTAAGG	CAAAAACCTG	GGGTGTTATT	GGAAAACAAA
3421	CAACAAACA	AGCAAAACAA	CCAAATCCCA	ACTGCAGACC	GTACTCATCA	CCGATCATGG
3481	TCCCAAAGCA	TAGATTGCTC	TGGTACATAG	AGAAAAGTCA	ACTCAGGGAA	GTCGGCAAAA
3541	TGATGCGTA	ACTTCCGAAG	AAGCATTTGG	CTTGAGGGCA	AGCGAGAAGC	AACCAGGAAGA
3601	TCAGTGTCCT	TCGCGTTCCG	CCGTTTTTCA	GTAGTTGTTT	CGGTGGATCT	GTTACCTTAG
3661	CACGCTGATG	CGCACCGCTT	CGTCGTCTGT	GAAGGCTTACC	TTCCCGGATC	GTCACCTTAT
3721	CGTGTGTCG	CTTTTCACTT	CTGCACGGTT	CGCGTATATC	TGTGGCTCAT	TCTTTCTCTT
3781	CTCTTTTTTT	CGTTTTTGTT	CTTTCTCTTT	TTTTACATTC	TCGGGAAATT	AAAAGAGAGA
3841	CTCAACAAA	AAAAAAAGG	GAAGTACAGG	GAGAAGGAGG	GACCCGTTTC	CACAAATTCG
3901	CAACTCAGA	CTGCTTACGG	CGGGGAATCC	AACTGTATAA	TTAAAACATA	GTTTTGTGAT
3961	GCATCCAAGT	GGTGTATGTC	GCAAATGAT	TTCTGCCAG	TGCTCTGAAT	GTCACGTTGA
4021	CGAGATTCC	CGACGCGCGG	GTAACGGCGG	GGAGTAACTA	TGACTCTCTT	AAGTAGGCA
4081	AATGCCCTCGT	TTCCCAATTA	GAGACGCGCA	TGAATGGATT	AATGAGATTG	CCCTCTGCC
4141	GAGTACTACT	CTAGCGAAAC	GACAGTCAAG	GGAACGGACT	TGAAGGGGTA	AGCGGGGAAA
4201	GAGAACCTG	TTGAGTTTGA	CTCCAGTCTG	GCTCTGTGGG	GGCACATCTG	AGGTTGATA
4261	TAGGTGGAAG	CCAAGCACA	AATGAAATAC	CACCACITAG	AAGTGTGCTT	CACCTATCGA
4321	ATGAAGAGAC	CGATGGTTTT	CGCGTAGTCT	GTGGGCTATG	CACCGTTCAT	GTTTTGGATC
4381	TTTTATGGCG	CGACCCCGT	CTCCACGGGG	AGGTTGTGTA	TATATAATAT	ATACACAACC
4441	GCATTTTTTA	CCATCCCCAC	ATATTTATAT	ATGTGAGGA	TGTCGGCTGG	GCACCAACC
4501	GTGCTGACAA	ACTGAACCAA	CGGGGTTGCT	TCGGCAGCTT	CGGAGTCTTG	TTTTGAGACA
4561	TCTGCCAGAT	GGGAGTTTTG	GCTGGGGCGG	CATATCTGTT	ACACGACAC	CGAGGTGTCC
4621	TAAGGCCAGC	TCAGTGGGAA	CAGAAATCTC	ACGTAGAACA	CAACGGTAAA	AGCTTGGTTG
4681	ATTAACGATT	TCCAGTACGA	ATCCAGACTG	CGAAAGCAAG	CGCAGCCACT	CTTTGCGAAA
4741	TATAGGAAAT	ATGAACAAAT	CATACCAGAG	GTGTCAAGAT	AATTAACACA	GGGATAACTG
4801	GCTTGTGGCG	GCCAAgcqTT	CATAGCGAGC	TCGGTTTTTG	ATCCTTCTGAT	GTCGGCTCTT
4861	CCTAACCTAG	CGCCGCAGAA	GACGCTAAGG	GTTGGATTGT	TCACCCACTT	ACAGGGAACG
4921	TGAGCTGGGT	TTAGACCGTC	GTGAGACAGG	TTGGTTTTAC	CCTACTTAGC	TGGAATATGC
4981	GAGAAAAGA	TTATCCCGCC	AAAGCGGAAG	CCGGTCGTTT	CTGGCTTGGC	TCGTCGGTGG
5041	CATGTGTA	TGGTACGGTC	ACCACTTTTG	TTTTGTTTTG	TTTTTTTTTC	TGTAAGAAA
5101	AAGGAATATA	AAAAAATAC	ATAATATATA	TTATGTGTGA	GATTGTGAAG	GGATCTCGCA
5161	GGTATCGTGA	GGGAAGTATG	GGGTAGTACG	AGAGGAATC	CCATGCCGTG	CCCTCTGGTT
5221	CTGGAGTTTG	TGAAACGGCA	AGTGCTCCGA	CGCTATCGCA	CGGTGGTTCT	CGGCTGAAGC
5281	CTCTAAGCC	AGAAGCCAAT	CCCAAGACCA	GATGCCCACT	CAACACAAA	ACCGCGGTGT
5341	ATGTATATAT	TTTTGTGTGT	TGTTGTTGTT	TTGTGCTTGC	TTTTGAGTAT	ATATGTGCGT
5401	GTATGCGCAG	CTGTCTTTTT	TGGGAAAAGT	AGAGAATAGA	GGTTAGAATA	GCATATATAT
5461	ATATATATGT	ATATGTATAT	ATATGTGTTA	TTGTGTATAT	ACTTCAAGCC	GGTGGGGAGG
5521	AAAGCAGCTAC	ACGCACGTGG	TGGGGTGTTT	TCTCTATAT	GTGAGTGTGT	CTGTGTGTAA
5581	TGTGTATATG	TATGTATATA	TGTTACGCAT	TTCTCTCGC	TTCTCAAGGT	GTGTGCCACC
5641	TTGAGGGCTT	CTTTTCCGTT	TCTTCCGTCC	TCACCGIATG	TGTGTGTGTA	TTATTTGTGT
5701	TGTTATTTGT	TGTTAGTGTG	TGTTATGTG	CATATGCAAT	TGTGGCATAT	ATATATATAT
5761	ATGCTCTGCT	GCCAAATGCA	ATGATGATAA	TAATGACGTG	TGATATGTAT	GTCCACAAA
5821	ACACCCCTGG	AGACGGGGAAG	AGAGAAGAGG	TTTTTATATA	ATGTGCCGTG	TTCTCAATTT
5881	TTTTCAAAA	ATATATAATA	TACATATCGA	ATCCCAATCC	AAATCACTG	GTAGCTCTGC
5941	CTGCCCTCGA	AGTGGCCAAAG	TATCTCCATG	ATCACAAGAC	TTTTTTTTTT	GAACCAAGAG
6001	AAAAAATAAA	TAGGCCAGTG	ATAAATATAT	ATATATACAT	AAACATGCAT	ATACATATGG
6061	TGTTGTGTG	TTTTGTTGTT	GTGTTGTCTC	TGCCCATAT	ATATTTATA	GACACCTCT
6121	CTCCGACTGT	GTGTATGTTG	TTGTTGTTGT	TGTTGTGTTG	TGTCGGTGTG	GTGTGTGTGT
6181	TGTTGTGTGT	TGTTGTGTGT	TGTTGTGTGT	TGTTGTGTGT	GACACACCA	CATTCACGTC
6241	TATATTACAC	ACCATCATAC	ATCACAATATA	TCACATAATA	TAAATAATA	CAATAATATA
6301	TGTTGTGCAG	TGAGCTCCAC	GGAAAGGCAT	CCCAACCGG	GGGAGAAGCG	GCCTTCTCG
6361	AG					

## Estructura secundaria

Para facilitar el estudio de este aspecto del ARNr se suele dividir a la molécula mayor en siete dominios estructuralmente relacionados.

La mayoría de los dominios se doblaron siguiendo un modelo ya reportado para *Xenopus* (5); entre los ajustes que se hicieron destaca el dominio IV íntegro, cuya estructura secundaria se basó en el modelo universal para esta región de de Lanversin (24).

### a) Dominio I

En el dominio I se localizan las siete primeras regiones variables indicadas en la figura 3. La tercera de ellas se procesa como en casi todos los eucariotes, de tal manera que este dominio está integrado por la molécula 5.8S (S3 en *I. cruzi*) y el extremo 5' del ARNr 24S $\alpha$  (Figura 8). En el caso de la molécula S3 existe una región, la llamada hélice F, rica en G+C (40) que varía entre especies relacionadas (segunda región variable en la figura 3) y contiene una inserción en tripanosomátidos y dípteros. Esta secuencia es eliminada en *Drosophila*, *Sciara* y otros dípteros, de tal manera que su ARNr 5.8S maduro se encuentra en dos fragmentos (5.8S y 2S); en tanto que en tripanosomátidos la inserción se encuentra en la molécula madura, lo que hace que el ARNr 5.8S de esta familia sea el de mayor tamaño reportado hasta ahora.

Los datos bioquímicos obtenidos en el laboratorio indican una

NO EXISTE

PAGINA

interacción por puentes de hidrógeno entre las moléculas 5.8S y 24S $\alpha$ , esto concuerda con el modelo de estructura de esta región, en el que tanto el extremo 5' como el 3' del ARNr 5.8S están unidos a la molécula 24S $\alpha$ .

Las cuatro últimas regiones variables de este dominio se localizan ya en 24S $\alpha$  y corresponden a la región identificada como D1, donde ocurre un procesamiento en el protozoario E. gracilis.

#### b) Dominio II

El dominio II ocupa una porción interna de 24S $\alpha$  (Figura 9) y en él están incluidas las tres siguientes regiones variables, la primera de ellas ha sido identificada como D2, sitio de un procesamiento en E. gracilis y Prorocentrum micans (41), y es muy compleja en eucariotes superiores (26); las otras dos corresponden a D3.

#### c) Dominio III

Las siguientes siete regiones variables se encuentran en el tercer dominio, tres de ellas corresponden a las secuencias divergentes D4, D5 y D6; uno de los sitios de procesamiento en E. gracilis se localiza en D5.

También en este dominio se haya el sitio de interacción del antibiótico tiostreptona que bloquea la asociación de EF-2 al ribosoma (Figura 10).

Figura 9.

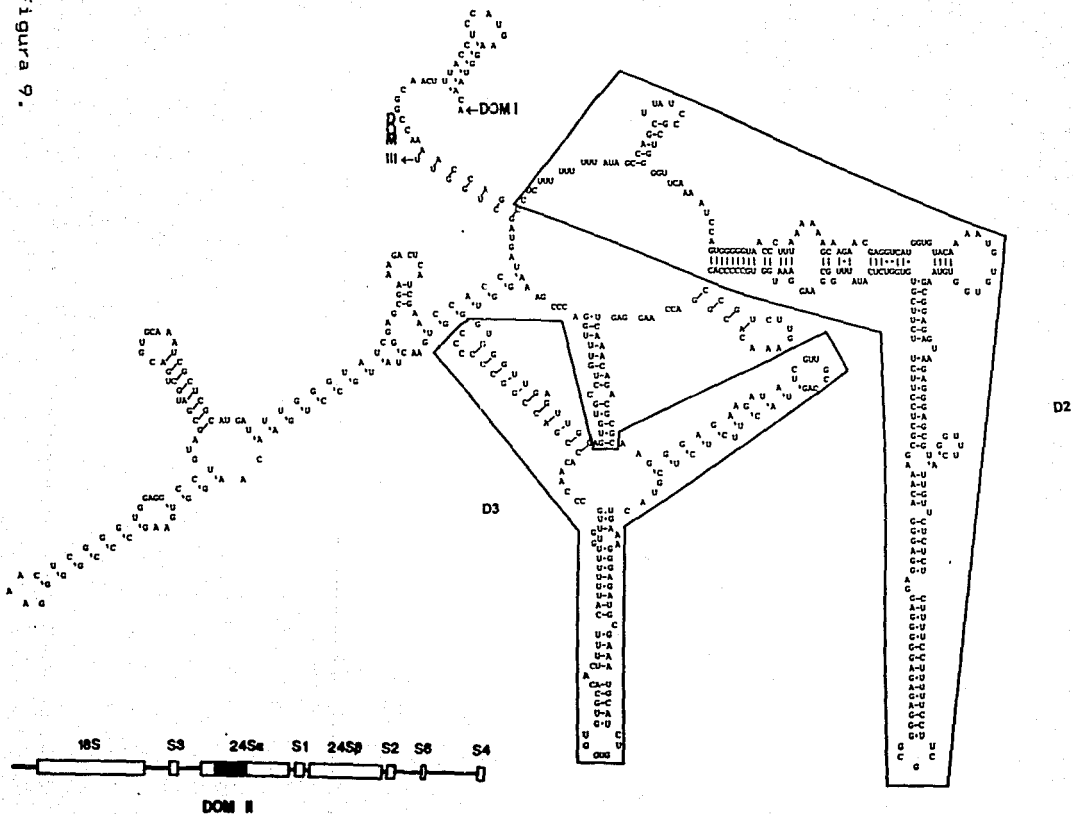
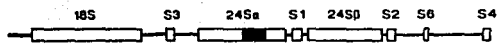
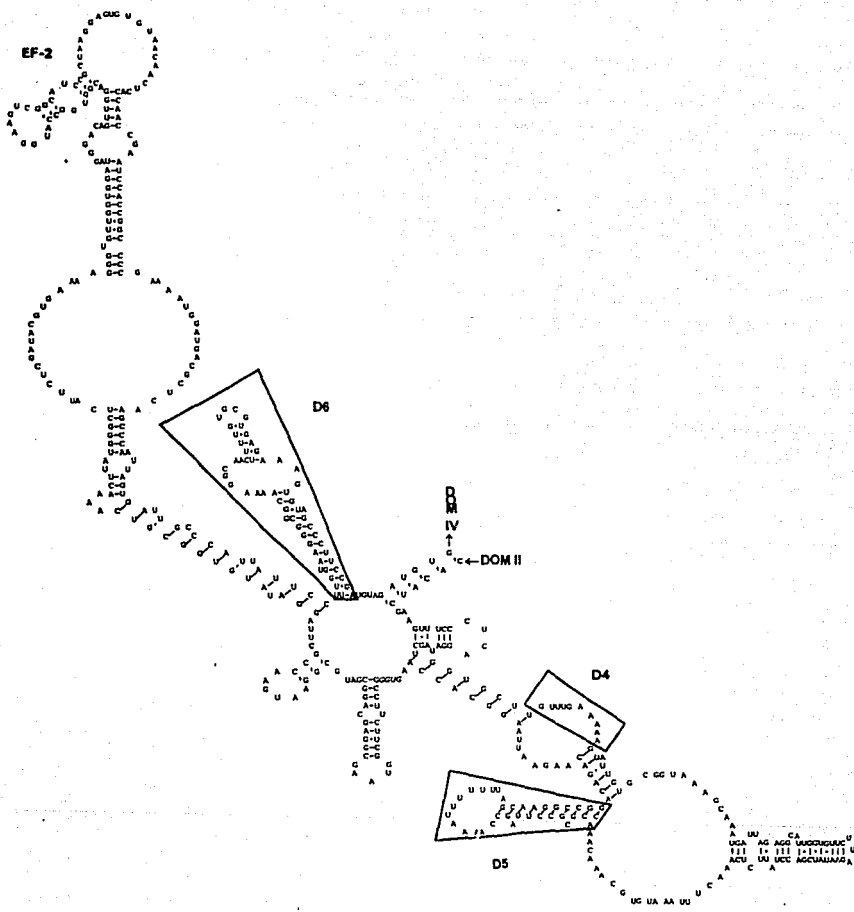


Figura 10.



**DOM III**

d) Dominio IV

El dominio IV o central está integrado por el extremo 3' de 24S $\alpha$ , la molécula S1 completa y el extremo 5' de 24S $\beta$ , la interacción entre los ARNs ribosomales 24S $\alpha$  y 24S $\beta$  (Figura 11) es apoyada por datos experimentales. Este dominio muestra siete regiones variables, la segunda coincide con D7a, sitio de procesamiento en artrópodos y en Euglena. En tripanosomátidos se elimina parte de D7b y la región D7c completa (ETIs 3 y 4) generándose el ARNr S1, que a su vez contiene tres regiones variables, en una de las cuales existe una discontinuidad en Euglena.

e) Dominio V

En el dominio V se localizan sólo dos regiones variables, aunque una de ellas, D8, es muy extensa y compleja en eucariotes superiores (26). También aquí se localiza una región que, por evidencia en otras especies, se sabe que se asocia por puentes de hidrógeno con la molécula 5S (Figura 12). En T. cruzi existe por lo menos una región de quince nucleótidos del extremo 3' del ARNr 5S (42) complementarios a la zona indicada en la figura.

f) Dominio VI

El dominio VI ocupa una porción interna de 24S $\beta$  (Figura 13) y en él están incluidas las tres siguientes regiones variables; la primera de ellas ha sido identificada como D9, sitio de un proce-



Figura 11.

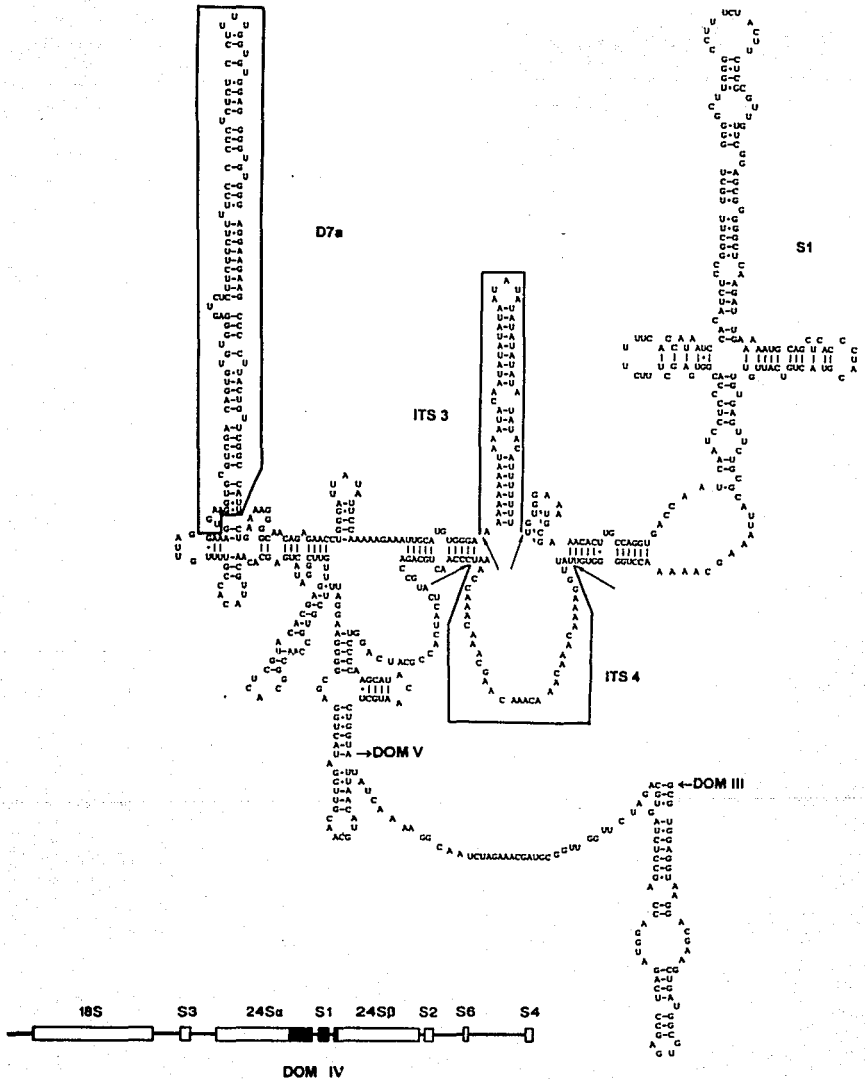


Figura 12.

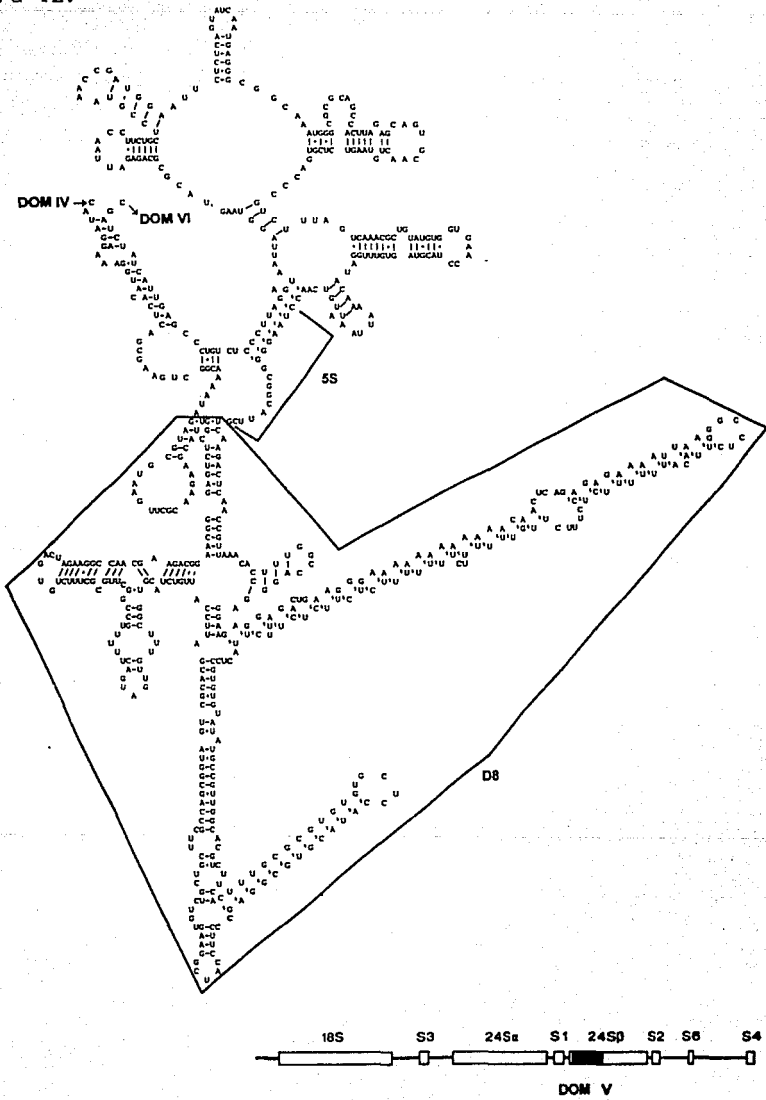
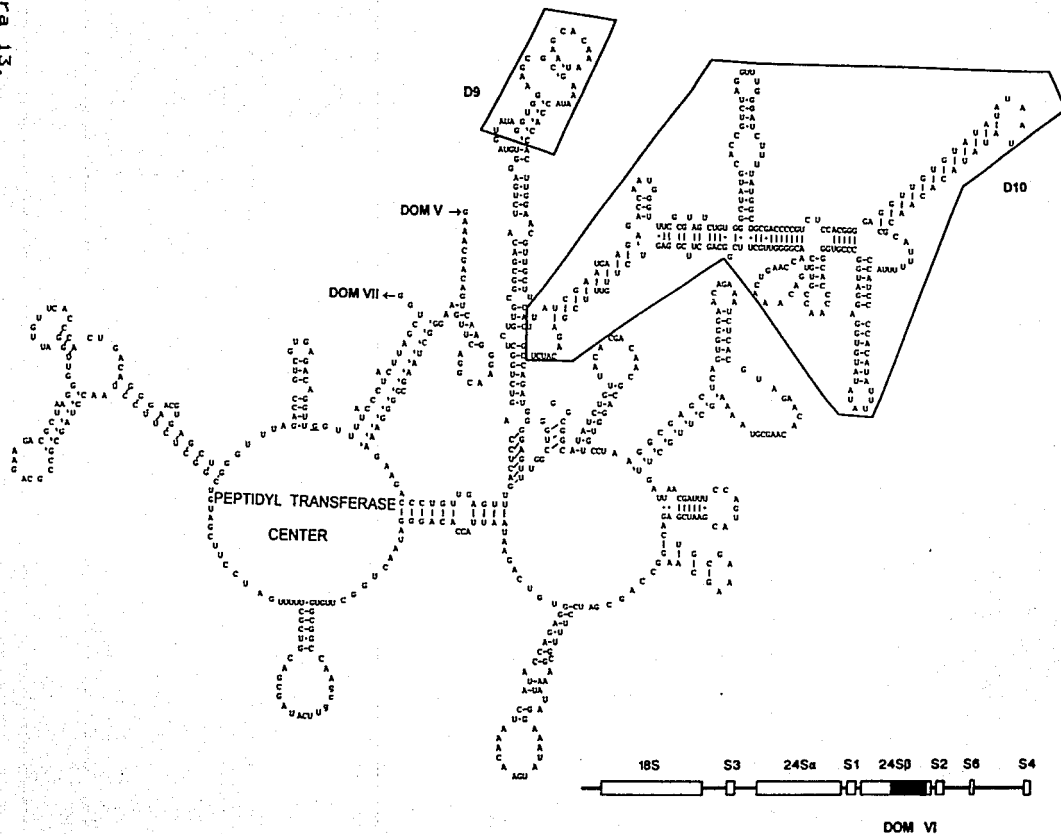


Figura 13.



samiento en E. gracilis, y la segunda corresponde a D10. También en este dominio se haya el sitio de la peptidil transferasa, donde se forma el enlace peptídico.

g) Dominio VII

Las siguientes cuatro regiones variables se encuentran en el último dominio, dos de ellas corresponden a las secuencias divergentes D11 y D12. En éstas se localizan sitios de corte en tripanosomátidos y Euglena; para este último protozoario existe otro procesamiento dentro del dominio VII. En la molécula S2 se sitúa un segmento de 14 nt que es casi universal, esta región es el sitio de acción de dos toxinas que inhiben la síntesis de proteínas ( $\alpha$ -sarcina y ricina) probablemente bloqueando la acción de los factores de elongación EF-Tu y EF-G en procariotes y EF-1 y 2 en eucariotes (Figura 14).

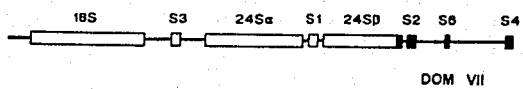
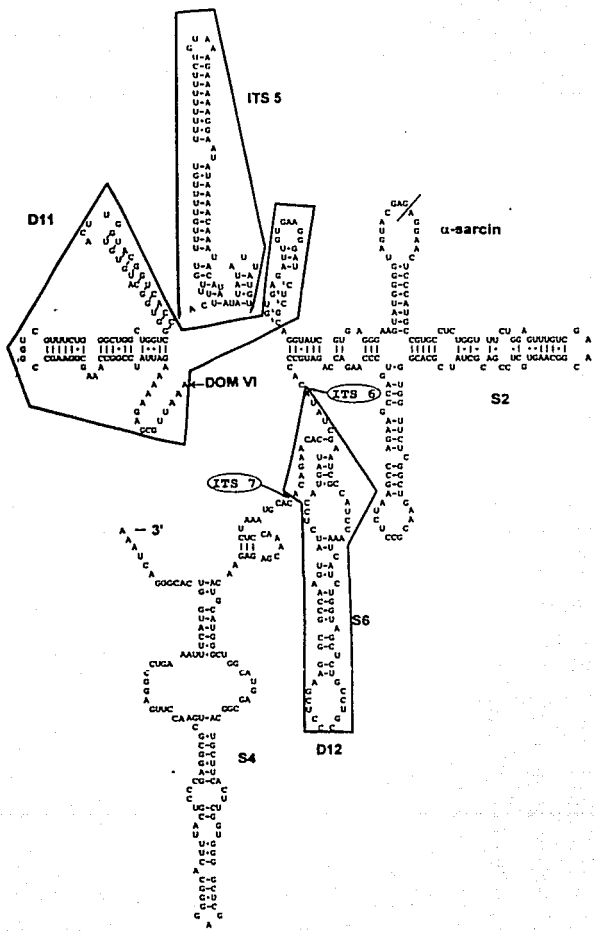
La única interacción entre dominios que parece probable es la que hay entre el II y el IV.

**Regiones variables y procesamiento**

Al analizar en su conjunto la molécula mayor ribosomal, es de notar que todas las regiones variables se encuentran aisladas dentro de la estructura secundaria y en general forman hélices independientes.

Además de los conceptos divergente y variable, se ha utilizado

Figura 14.



otro que por su significado tiende a desaparecer: segmento de expansión. Los así llamados se definieron como secuencias mayores de veinte nucleótidos que se encuentran únicamente en eucariotes (5). Lo impráctico del término resulta obvio ya que, por un lado existen regiones variables en procariotes y por otro, hay secuencias particulares de eucariotes de menos de veinte nucleótidos que quedan excluidas. El uso de los términos globales, región divergente o variable, es mucho más adecuado.

Ahora bien, siendo que los diferentes ARNs ribosomales son un mosaico de secuencias con diversos grados de variabilidad, y que por otro lado, todos sus sitios funcionales han sido localizados en las regiones constantes, cabe preguntarse por el origen y la función de los segmentos divergentes.

¿Se han encontrado siempre las secuencias divergentes en el ARNr? ¿Tienen alguna función? A este respecto, las opiniones son encontradas, una de ellas se inclina a explicar las características de estas regiones pensando en una función especie específica (26). Por el contrario, Clark es de la opinión (43) de que actualmente estas regiones no tienen ninguna función en el ribosoma maduro y son remanentes de secuencias que en un principio mantenían unidas las porciones funcionales de ARN en el ribosoma.

Una conclusión las regiones variables son dispensables al menos en lo que toca a la función ribosomal básica y las restricciones

funcionales sobre la estructura primaria son mínimas, lo que permite tanto una gran diversidad como su eliminación.

El patrón de interdispersión de los dominios conservados y variables sugiere que las moléculas de ARNr están construídas en una manera modular. Esta impresión se refuerza por la existencia de los ETIs, cuya eliminación genera dominios estructurales individuales y por los rearrreglos genómicos de dominios individuales del ARNr (44, 45).

¿Cuál fue el origen de los ETIs? Un punto de vista es que fueron adquiridos por los genes de ARNr que eran originalmente contínuos, y fueron tolerados por las reducidas restricciones funcionales que existen en los sitios de introducción. Otra postura que no excluye a la anterior, es que los ETIs son reliquias evolutivas de una organización modular de los genes ribosomales primordiales; esta opinión es atractiva porque provee una explicación para dos características únicas de las moléculas ribosomales: a) su gran tamaño y b) la interdispersión de regiones variables y conservadas.

#### **Estructura tridimensional y sitios funcionales**

La subunidad grande muestra varias características morfológicas bien establecidas tales como la protuberancia central y dos protusiones.

La comparación de secuencias de los ARNs ribosomales a través de un amplio espectro filogenético reveló varias secuencias de 10

a 20 nucleótidos esencialmente invariables; este grado de conservación es esperado para moléculas que llevan a cabo alguna función crucial, y el que se encuentren sobre la superficie del ribosoma es consistente con su participación en la función ribosomal. Aún más notable es la similaridad entre las estructuras secundarias, lo que implica un alto grado de conservación en la estructura tridimensional del ARNr.

La idea de que el ARNr es simplemente un andamiaje para el ensamblaje de las proteínas ribosomales se ha modificado, ya que hay amplia evidencia bioquímica, genética y filogenética que apoya el punto de vista opuesto: es el ARNr, más que las proteínas, el que define la función ribosomal. El efecto de las proteínas ribosomales es importante pero indirecto, probablemente sobre el doblado y conformación del ARNr en regiones funcionalmente implicadas (46).

En su forma conceptual más simple, el mecanismo de traducción debe contener tres eventos fundamentales llevados a cabo a partir de interacciones entre ARNm, ARNt y ARNr: reconocimiento codón-anticodón, formación del enlace peptídico y movimiento del ARNt y ARNm en relación al ribosoma. Un mecanismo tal es consistente con la idea de que la traducción evolucionó a partir de sistemas pre-existentes basados en ARN.

Mientras que la decodificación del ARNm tiene lugar principal-



mente en la subunidad menor, la función central del ribosoma, es decir, la formación del enlace peptídico ocurre en la otra subunidad.

a) Interacción codón-anticodón

Los resultados experimentales indican que la unión del aminoacil-ARNt ocurre en dos pasos: durante el primer paso, el anticodón interactúa con el ARNm y el sitio A de la subunidad pequeña, mientras el EF-Tu, que forma un complejo ternario con GTP y el aminoacil-ARNt en procariotes, interactúa con el ARNr de la subunidad grande (estado A/T). Sólo después de la hidrólisis del GTP, cuando se libera EF-Tu.GDP, la unión del aminoacil ARNt se completa y su extremo aminoacil interactúa con el ARNr mayor en la región de la peptidil transferasa (47).

Los factores de elongación EF-Tu y EF-G compiten uno con otro para unirse a los ribosomas. EF-G protege algunas bases (G<sub>2655</sub>, A<sub>2660</sub> y G<sub>2661</sub>) en el loop muy conservado del dominio VII que contiene el sitio de acción de las citotoxinas  $\alpha$ -sarcina y ricina, esta protección se sobrelapa con la detectada para EF-Tu, que además protege a A<sub>2665</sub> en el mismo dominio (47). Ya que ambos factores están involucrados en eventos relacionados con la GTPasa ribosomal, es probable que el loop de la  $\alpha$ -sarcina quizá esté involucrado en esta función.

b) Peptidil transferasa

Hasta ahora los experimentos no han podido demostrar una asociación específica entre proteínas ribosomales y peptidil transferasa (48). Por otro lado, una vez que se reconoció que el ARN podía funcionar catalíticamente y que el proceso de transpeptidación era similar a la transesterificación, fue lógico pensar en un papel catalítico para el ARNr en la formación del enlace peptídico. Por lo tanto, la investigación se ha enfocado en la identificación del centro de la peptidil transferasa en el ARNr, en la esperanza de entender su estructura, y conocer el mecanismo por el que se forma el enlace peptídico.

Se han identificado en el centro del dominio VI (Figura 13) mutaciones en una sola base que confieren resistencia a cloranfenicol y anisomicina, inhibidores específicos de la peptidil transferasa (49). La evidencia de que el ARNr está interactuando con esta región vía su extremo CCA (50) refuerza la idea de que el dominio VI es una parte importante del sitio de la peptidil transferasa.

La región implicada contiene varios nucleótidos conservados universalmente y las mutaciones en E. coli A2060→C y A2450→C son letales; se ha sugerido que los defectos ocurren en el sitio de interacción con la subunidad pequeña y que el sitio de la peptidil transferasa se encuentra en la interfase. Vernamicina B

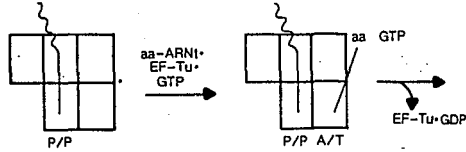
también protege A<sub>752</sub> en el dominio II, implicando que esta región está muy cerca del loop central del dominio VI, lo cual se ha confirmado por cross-linking directo. Si se mira el ribosoma del lado de la subunidad pequeña, la región de la peptidil transferasa se encuentra en la mitad superior y a la izquierda de la protuberancia central (Figura 15) y a una distancia de aproximadamente 70 Å (dimensión del ARNt) del sitio de decodificación.

### c) Translocación

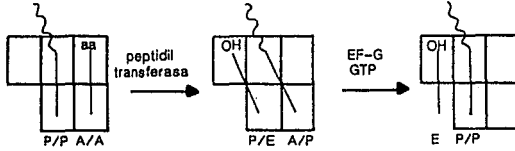
Después de la reacción catalizada por la peptidil transferasa el ARNt desacilado se une a diferentes sitios en las dos subunidades: permanece en el sitio P en la subunidad pequeña pero ha migrado al sitio E en la grande (estado P/E de unión), mientras el ARNt aceptor ocupa el sitio A en el ARNr 23S (estado A/P). Este paso ocurre espontáneamente y es independiente de factores o GTP. En el segundo paso, los peptidil ARNs de transferencia y el ARNm asociado se mueven con respecto a la subunidad pequeña (estado P/P); al mismo tiempo, el ARNt desacilado pasa del estado P/E al estado E sin salir del ribosoma. EF-G y GTP catalizan el movimiento de ambos ARNs de transferencia con respecto a la subunidad pequeña. Por experimentos de protección se ha determinado que el sitio de interacción de EF-G con el ARNr 23S de E. coli es alrededor de las posiciones A<sub>1067</sub> y A<sub>1069</sub> (dominio III) (49). Además la tiorstreptona interacciona con la región 1067 (dominio III) e

A.

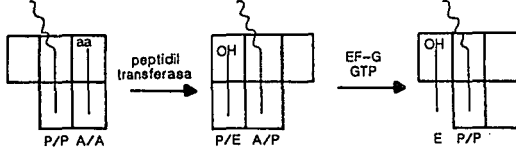
E P A



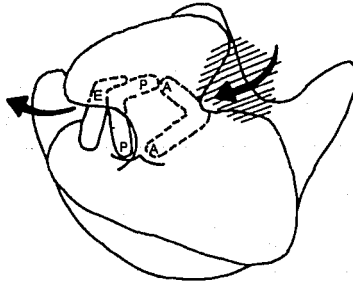
a)



b)



B.



gura 15. A. Modelos para el movimiento del ARNt durante la traducción: a) Modelo del sitio híbrido y b) Modelo alternativo en el que hay cambio en la interacción entre las subunidades.

B. Localización aproximada de los sitios A, P, y E en el ribosoma, vista desde la subunidad pequeña. El área sombreada muestra el sitio aproximado de interacción de EF-Tu.

inhibe la síntesis de proteínas interfiriendo con la formación del complejo EF-G.GTP.ribosoma.

En conclusión, parece haber al menos seis estados de unión para el ARNt: A/T, A/A, A/P, P/P, P/E y E, y debido a la naturaleza del proceso de traducción, el ARNm y el ARNt deben moverse en relación al ribosoma. Ahora bien, este movimiento puede ser de varias formas, el ARNt quizá se flexione, tal vez alguna región de las subunidades ribosomales se mueva o quizá la interacción entre las dos subunidades cambie.

Este mecanismo lleva a la posibilidad de que la translocación quizá involucre movimiento relativo de las subunidades, explicando la arquitectura de dos subunidades de todos los ribosomas (Figura 15).

## BIBLIOGRAFIA

1. Velasco C., O. La Enfermedad de Chagas. Una revisión histórica suscita y parcial de lo que ocurre en México y en el mundo. SSA. México, D. F., 1991.
2. Nogueira, N. American Trypanosomiasis: Antigens and Host-Parasite Interactions. En Parasite Antigens: Toward New Strategies for Vaccines (Pearson, T. W., ed.). Dekker, New York, 1986.
3. King, T. C., Sirdeskmuks, R. and Schlessinger, D. (1986) Nucleolytic Processing of Ribonucleic Acid Transcripts in Prokaryotes. Microbiol. Rev. 50, 428-451.
4. Long, E. O. and Dawid, I. B. (1980) Repeated genes in eucaryotes. Ann. Rev. Biochem. 49, 727-764.
5. Clark, C. G., Tague, B. W., Ware, V. C. and 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.
6. Vossbrinck, C. R., Maddox, J. M., Friedman, S., Debrunner-Vossbrinck, B. A. and Woese, C. R. (1987) Ribosomal RNA sequence suggests microsporidia are extremely ancient eukaryotes. Nature (London) 326, 411-414.
7. Schnare, M. N., Cook, J. R. and Gray, M. W. (1990) Fourteen Internal Transcribed Spacers in the Circular Ribosomal DNA of Euglena gracilis. J. Mol. Biol. 215, 85-91.
8. Gray, M. W. (1981) Unusual Pattern of Ribonucleic Acid Components in the Ribosome of Crithidia fasciculata, a Trypanosomatid Protozoan. Mol. Cell. Biol. 1, 347-357.
9. Hernández, R., Nava, G. and Castañeda, M. (1983) Small-size ribosomal RNA species in Trypanosoma cruzi. Mol. Biochem. Parasitol. 8, 297-304.
10. Spencer, R. and Cross, G. A. M. (1976) Lability of RNA from the large cytoplasmic ribosomal subunit of the protozoan Crithidia oncopelti. J. Gen Microbiol. 93, 82-88.
11. Miller, K. G. and Sollner-Webb, B. (1987) Transcription of mouse rRNA genes by RNA polymerase I: in vitro and in vivo initiation and processing sites. Cell 27, 165-174.
12. Kass, S., Craig, N. and Sollner-Webb, B. (1987) Primary processing of mammalian rRNA involves two adjacent cleavages and is not species specific. Mol. Cell. Biol. 7, 2891-2898.
13. Stroke, I. L. and Weiner, A. M. (1989) The 5' end of U3 snRNA can be crosslinked in vivo to the external transcribed spacer of rat ribosomal RNA precursors. J. Mol. Biol. 210, 497-512.
14. Kass, S., Tyc, K., Steitz, J. A. and Sollner-Webb, B. (1990) The U3 Small Nucleolar Ribonucleoprotein Functions in the First Step of Preribosomal RNA Processing. Cell 60, 897-908.

15. Lapyre, B., Bourbon, H. and Amalric, F. (1987) Nucleolin, the major nucleolar protein of growing eucaryotic cells: an unusual protein structure revealed by the nucleotide sequence. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84, 1472-1476.
16. Kass, S. and Sollner-Webb, B. (1990) The First Pre-rRNA Processing Event Occurs in a Large Complex: Analysis by Gel Retardation, Sedimentation, and UV Cross-Linking. *Mol. Cell Biol.* 10, 4920-4931.
17. Spencer, D. F., Collings, J. C., Schnare, M. N. and Gray, M. W. (1987) Multiple spacer sequence in the nuclear large subunit ribosomal RNA gene of Crithidia fasciculata. *EMBO J.* 6, 1063-1071.
18. Tollervey, D. (1987) A yeast small nuclear RNA is required for normal processing of pre-ribosomal RNA. *EMBO J.* 6, 4169-4175.
19. Zagorski, J., Tollervey, D. and Fournier, M. J. (1988) Characterization of an SNR gene locus in Saccharomyces cerevisiae that specifies both dispensible and essential small nuclear RNAs. *Mol. Cell. Biol.* 8, 3282-3290.
20. Li, H. V., Zagorski, J. and Fournier, M. J. (1990) Depletion of U14 Small Nuclear RNA (snR128) Disrupts Production of 18S rRNA in Saccharomyces cerevisiae. *Mol. Cell. Biol.* 10, 1145-1152.
21. Walker, T. A., Johnson, K. D., Olsen, G. J., Peters, M. A. and Pace, N. R. (1982) Enzymatic and chemical structure mapping of mouse 28S ribosomal ribonucleic acid contacts in 5.8S ribosomal ribonucleic acid. *Biochem.* 21, 2320-2329.
22. El-Baradi, T. T. A. L., Raué, H. A., de Regt, V. C. H. F., Verbree, E. C. and Planta, R. J. (1985) Yeast ribosomal protein L25 bind to an evolutionary conserved site on yeast 26S and E. coli 23S rRNA. *EMBO J.* 4, 2101-2107.
23. Michot, B., Hassouna, N. and Bachellerie, J. P. (1984) Secondary structure of mouse 28S rRNA and general model for the folding of the large rRNA in eukaryotes. *Nucleic Acids Res.* 12, 4259-4279.
24. Lanversin, G. de and Jacq, B. (1989) Sequence and Secondary Structure of the Central Domain of *Drosophila* 26S rRNA: A Universal Model for the Central Domain of the Large rRNA Containing the Region in which the Central Break May Happen. *J. Mol. Evol.* 28, 403-417.
25. Gutell, R. R. and Fox, G. E. (1988) A compilation of large subunit RNA sequences presented in a structural format. *Nucleic Acids Res.* 16, r175-r269.

26. Michot, B. and Bachellerie, J. P. (1987) Comparisons of large subunit rRNAs reveal some eukaryote-specific elements of secondary structure. *Biochimie* **69**, 11-23.
27. Yeh, L. C. C., Thweatt, R. and Lee, J. C. (1990) Internal Transcribed Spacer 1 of the Yeast Precursor Ribosomal RNA. Higher Order Structure and Common Structural Motifs. *Biochem.* **29**, 5911-5918.
28. González, I. L., Chambers, C., Gorski, J. L., Stambolian, D., Schmickel, R. D. and Sylvester, E. (1990) Sequence and Structure Correlation of Human Ribosomal Transcribed Spacers. *J. Mol. Biol.* **212**, 27-35.
29. Hernández, R., Diaz de León, F. and Castañeda, M. (1988) Molecular cloning and partial characterization of ribosomal RNA genes from *Trypanosoma cruzi*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **27**, 275-280.
30. Gómez, E., Valdés, A. M., Piñero, D. and Hernández, R. (1991) What Is a Genus in the Trypanosomatidae Family? Phylogenetic analysis of Two Small rRNA Sequences. *Mol. Biol. Evol.* **8**, 254-259.
31. Yanisch Perron, C., Vieira, J. and Messing, J. (1985) Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* **33**, 103-119.
32. Casadaban, M.J. and Cohen, S. N. (1980) Analysis of Gene Control Signals by DNA Fusion and Cloning in *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* **138**, 179-207.
33. Sanger, F., Coulson, A. F., Barrel, B. G., Smith, A. J. H. and Roe, B. A. (1980) Cloning in Single-stranded Bacteriophage as an Aid to Rapid DNA Sequencing. *J. Mol. Biol.* **143**, 161-178.
34. Maizels, N. (1976) *Dictyostelium* 17S, 25S and 5S rDNAs lie within a 38,000 base pair repeated unit. *Cell* **9**, 431-438.
35. Peattie, D. A. (1979) Direct chemical method for sequencing RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**, 1760-1764.
36. Galván, S. C., Castro, C., Segura, E., Casas, L. and Castañeda, M. (1991) Nucleotide sequences of the six very small molecules of *Trypanosoma cruzi* ribosomal RNA. *Nucleic Acids Res.* **19**, 2496.
37. Zuker, M. and Stiegler, P. (1981) Optimal computer folding of large RNA sequences using thermodynamics and auxiliary information. *Nucleic Acids Res.* **9**, 133-148.
38. Ninio, J. (1979) Prediction of pairing schemes in RNA molecules-loop contributions and energy of wobble and non-wobble pairs. *Biochimie* **61**, 1133-1150.



39. Vieira de Arruda, M., Reinach, F. C., Colli, W. and Zingales, B. (1990) Sequence of the 24S $\alpha$  ribosomal RNA gene and characterization of a corresponding pseudogene from Trypanosoma cruzi. Mol. Biochem. Parasitol. 40, 35-42.
40. Vaughn, J. C. and Sperbeck, S. J. (1984) A universal model for the secondary structure of 5.8S ribosomal RNA molecules, their contact sites with 28S ribosomal RNAs, and their prokaryotic equivalent. Nucleic Acids Res. 12, 7479-7502.
41. Lenaers, G., Maroteaux, L., Michot, B. and Herzog, M. (1989) Dinoflagellates in Evolution. A Molecular Phylogenetic Analysis of Large Subunit Ribosomal RNA. J. Mol. Evol. 29, 40-51.
42. Hernández-Rivas, R., Martínez-Calvillo, S., Romero, M. and Hernández, R. (1992) Trypanosoma cruzi 5S rRNA genes: molecular cloning, structure and chromosomal organization. FEMS Microbiol. Lett. 92, 63-68.
43. Clark, C. G. (1987) On the evolution of ribosomal RNA. J. Mol. Evol. 25, 343-350.
44. Heinanen, T. Y. K., Schnare, M. N., Young, P. G. and Gray, M. W. (1987) Rearranged coding segments, separated by a transfer RNA gene, specify the two parts of a discontinuous large subunit ribosomal RNA in Tetrahymena pyriformis mitochondria. J. Biol. Chem. 262, 2879-2887.
45. Boer, P. H. and Gray, M. W. (1988) Scrambled ribosomal RNA gene pieces in Chlamydomonas reinhardtii mitochondrial DNA. Cell 55, 399-411.
46. Nomura, M. (1987) A Review of Early Reconstitution Studies and Prospects for Future Studies. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 52, 653-663.
47. Moazed, D., Robertson, J. M. and Noller, H. F. (1988) Interaction of elongation factors EF-G and EF-Tu with a conserved loop in 23S RNA. Nature 334, 362-364.
48. Dahlberg, A. E. (1989) The Functional Role of Ribosomal RNA in Protein Synthesis. Cell 57, 525-529.
49. Barta, A., Steiner, G., Brosius, J., Noller, H. F. and Kuechler, E. (1984) Identification of a site on 23S ribosomal RNA located at the peptidyl transferase center. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81, 3607-3611.
50. Moazed, D. and Noller, H. F. (1989) Interaction of tRNA with 23S RNA in the Ribosomal A, P and E sites. Cell 57, 585-597.
51. Campbell, D. A., Kubo, K., Clark, C. G. and Boothroyd, J. C. (1987) Precise Identification of Cleavage Sites Involved in the Unusual Processing of Trypanosome Ribosomal RNA. J. Mol. Biol. 196, 113-123.