

03062

leg. 2

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

UNIDAD ACADEMICA DE LOS CICLOS PROFESIONALES Y DE POSGRADO DEL C.C.H.

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMEDICAS

LA ORGANIZACION GENOMICA Y LA PLOIDIA DE

TRYPANOSOMA CRUZI

Tesis para optar por el titulo de
Maestra en " Investigación Biomédica Básica "
que presenta

CLEMENTINA CASTRO HERNANDEZ

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

México D.F., 1982.



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

INTRODUCCION

La generalidad de los organismos vivientes mantienen su información genética en las secuencias del ácido desoxiribonucleico. En el genoma de procariotes la mayoría de las secuencias se encuentran representadas una sola vez, únicamente algunos genes como los que codifican para tRNA, rRNA y secuencias de inserción se han encontrado en copia múltiple. Sin embargo, los organismos eucariotes que tienen genomas mayores poseen secuencias nucleotídicas en diferentes niveles de multiplicidad y por supuesto algunas que sólo se encuentran una vez en el genoma haploide (1). La cantidad de DNA copia múltiple varía en los diferentes grupos, por ejemplo: el genoma de la mayor parte de los hongos primitivos (2,3) y de algunas algas (4) está formado básicamente de secuencias únicas y sólo del 2 al 18% está formado de secuencias repetidas. En el DNA nuclear de organismos de un orden taxonómico más alto, ya sea en plantas o en animales, el porcentaje de DNA repetido es mayor, por ejemplo en las angiospermas es del 40 al 85% y en vertebrados e invertebrados superiores del 25 al 60% (5-8).

La presencia de las secuencias repetidas en el DNA se demostró al reasociar las hélices sencillas (1,9). Comúnmen-

te el avance del proceso de reasociación es graficado contra el producto de la concentración del DNA y el tiempo en el -- cual se realizó la reacción (se abrevia Cot). La reasocia -- ción total del DNA bacteriano se lleva al cabo en 2 órdenes - de magnitud del Cot; la interpretación de esta observación es que la mayoría de las secuencias de dicho DNA reasocian a una velocidad común y de segundo orden, determinada únicamente -- por la concentración (ésto mismo sucede con los polinucleóti- dos sintéticos) de todas las secuencias que se encuentran en un número unitario de copias en el genoma. Sin embargo, al - renaturalizar el DNA de becerro o el de salmón se distinguie- ron 2 fases separadas por una fase "lag" durante la cual casi no hay reacción (1) (gráfica A). Esto demostró que en euca- riptes, algunas secuencias, se encuentran en mayor concentra- ción que otras, y debido a esto se aumenta la probabilidad de que se encuentren las cadenas complementarias. Sin embargo, con frecuencia, las copias múltiples de una secuencia no son idénticas, y ésto da origen a las "familias" o secuencias si- milares en los genomas de eucariotes.

El proceso de la "renaturalización del DNA"

La renaturalización del DNA puede seguirse de diferen- tes formas, una de las usadas desde los inicios es espectro- fortométricamente, o sea midiendo la disminución de la absor-

ción óptica (a 260 nm) del DNA desnaturalizado a medida que se forma la doble hélice. El DNA desnaturalizado presenta una mayor exposición de sus bases nitrogenadas, y por la tanto muestra una mayor absorción óptica, (hipercromicidad), al formarse los dobletes, la absorción óptica disminuye y es por esto que la reacción puede seguirse. Debido a su sensibilidad este método es de gran utilidad para identificar las secuencias repetidas. Otro método usado es el de la hidroxiapatita (HAPA). La hidroxiapatita es una forma cristalina del fosfato de calcio que une preferencialmente DNA doble hélice en determinadas concentraciones de amortiguador de fosfatos. El DNA unido puede ser eluido con amortiguador de fosfatos pero en diferentes concentraciones. La especificidad de algunas nucleasas (como S_1) sobre el DNA de una hélice también ha sido usada, por supuesto posteriormente deben unirse los duplex resistentes a hidroxiapatita ó a filtros de DEAE ó precipitarse con TCA.

En algunos casos, un DNA marcado radiactivamente "el trazador de la reacción" se pone a reasociar con un exceso de DNA sin marca "el conductor de la reacción", la marca radioactiva facilita el seguir la reacción con cualquiera de los métodos anteriores.

La reacción de reasociación del DNA es bimolecular y de

forma ideal sigue cercanamente una cinética de segundo orden. Por lo que la reacción puede ser descrita con la siguiente ecuación:

$$-\frac{dC}{dt} = kC^2 \quad (1)$$

integrado entre los límites C_0 en $T=0$ y C en un tiempo t

$$C/C_0 = (1 + k \cdot C_0 t)^{-1} \quad (2)$$

En donde C es la concentración de DNA que permanece como hélice sencilla en el tiempo t .

C_0 es la concentración total de DNA.

$C_0 t$ es el producto del total de la concentración del DNA (en moles de nucleótidos por litro) y tiempo (en segundos).

y k es la constante de la velocidad para la reacción --
(10).

Desde hace varios años se conoce que la velocidad de reasociación de las hélices complementarias del DNA depende de varias condiciones experimentales, por ejemplo la temperatura de incubación, que produce un máximo de velocidad a 20°C por abajo del punto de fusión del DNA (11,12). El aumento de longitud de las moléculas de DNA acelera la reacción en proporción a la raíz cuadrada de la longitud del DNA (11). En reacciones

"Trazador-conductor" se han visto efectos similares para reacciones de DNAs homólogos con tamaños iguales en el "Trazador" y el "conductor" (13,14). En reacciones de "Trazadores" largos y "conductores" pequeños, la velocidad de reacción es directamente proporcional a la longitud del "conductor" (13,14). En algunos casos de reacciones con "conductores" largos, Chamberlin y Col. (14) encontraron un retraso en la velocidad de reacción. El aumento en la concentración de sales aumenta la velocidad de reasociación con un máximo en aproximadamente de 0.6 M de NaCl, (10,11). Un aumento en la viscosidad del solvente disminuye también la velocidad de reacción (11).

Complejidad del DNA.

La complejidad de un DNA se define como la cantidad total de pares de nucleótidos en secuencias distintas que contiene el DNA. Por lo tanto para ácidos desoxiribonucleicos bacterianos donde todas las secuencias se presentan una sola vez en el genoma, la complejidad es igual al tamaño del genoma en pares de nucleótidos. Para secuencias repetidas, la complejidad es la suma de los pares de nucleotidos en una copia de cada una de las diferentes secuencias repetidas. La constante de la reasociación del DNA, cuando todos los parámetros experimentales están fijos, es proporcional a la complejidad del DNA. Se

ha demostrado que esta relación es cierta en un gran rango de complejidades, desde poli dA-dT hasta secuencias únicas de DNAs de memíferos (1).

Por lo tanto, este método puede usarse para estimar la complejidad desconocida de una muestra de DNA comparando su constante de velocidad de reasociación con la complejidad de un DNA conocido como el de Escherichia coli.

La forma común de graficar la renaturalización del DNA, es usando la fracción que se encuentra sin reaccionar (fsr) contra el logaritmo del C_0t dando como resultado una curva sigmoidal (1). (Gráfica B). El valor del C_0t cuando la fsr = 0.5 se llama C_0t 1/2 y es el inverso de la constante de la velocidad de reacción. Substituyendo en la ecuación 2

$$\frac{C}{C_0} = \frac{1}{2} = \frac{1}{1 + k C_0 t}$$

$$t \text{ 1/2} = \frac{1}{k C_0}$$

$$\text{así que } C_0 t \text{ 1/2} = \frac{1}{k} \quad (3)$$

Cuando un genoma contiene secuencias que caen en más de un rango de repetición, cada grupo de secuencias con repeticiones similares se define como un componente cinético. Cada com-

ponente tiene una constante de velocidad particular (k) en la renaturalización del DNA total. Como cada componente cinético se diluye con el resto de las secuencias del genoma, la constante de reacción no da directamente su complejidad; por lo que k debe ser dividida por la fracción que representa éste componente en el genoma. Esta segunda constante es, ahora proporcional a la complejidad del componente. La complejidad de las secuencias únicas es igual a la masa del genoma haploide. La k de las secuencias únicas es modificada en proporción de su fracción en el DNA total. Por lo tanto el C_0t 1/2 de las secuencias únicas dentro de la reacción del DNA total da solo una estimación del tamaño del genoma haploide y no la complejidad del componente de secuencias únicas (1,15). El índice, de la constante de velocidad del componente repetido en la reacción del DNA total y de la constante para el componente único en la misma reacción, da la frecuencia de reiteración del componente repetido en el genoma.

La velocidad de renaturalización del DNA se modifica, si se produce un mal apareamiento de las bases, al formarse los híbridos de la doble hélice. Este efecto ha sido examinado en detalle por Bonner y Col. (12). Se ha demostrado que la constante se reduce 2 veces por cada 10% de mal apareamiento de las bases. Esta corrección es especialmente importante cuando se es-

tima la complejidad de secuencias repetidas en genomas de eucariotes, puesto que las copias multiples de estas secuencias frecuentemente no son idénticas y contienen cierto grado de substitución de nucleótidos en varios miembros, de cada familia. Se ha reportado que con un "mal apareamiento" del 1 al 15% decae el punto de fusión 1°C.

Muchas de las condiciones experimentales usadas durante la reasociación, afectan las propiedades de los dobletes producidos. McCarthy y McConanghy (16) demostraron que cuando los DNAs de mamíferos se reasocian a bajas temperaturas se forman dobletes muy inestables. Esto ocurre porque muchas copias desiguales de las secuencias repetidas pueden reasociarse. A temperaturas de incubación mas altas (condiciones mas restringidas), solo las moléculas muy similares pueden reaccionar, y por lo tanto el "mal apareamiento" es menor. La restricción del criterio se define como la diferencia entre el punto de fusión del doblete nativo y la temperatura de incubación durante la reasociación.

El método usado en el ensayo de la renaturalización del DNA puede afectar la cinética de la reacción. Por ejemplo la digestión con la nucleasa S1 rompe las hélices sencillas que se

encuentran sin reaccionar y por lo tanto se mide únicamente la fracción de los dobletes. Para éste método, la reacción de velocidad de la reasociación del DNA se modifica. Smith y Col. (17) han demostrado que la reacción no puede ser descrita siguiendo un segundo orden sino de la siguiente manera:

$$S/C_0 = \{1/(1+C_0t)\}^n$$

$$n = 0.45$$

En donde S es la concentración de DNA sensible a nucleasa S₁.

Esta explicación por supuesto se convierte en la ecuación 2 cuando n = 1.

Para el ensayo con hidroxapatita, el exponente en la ecuación se ha demostrado que es igual a 10 (17).

Tipos de secuencias repetidas.

Las secuencias repetidas se han clasificado de acuerdo con su frecuencia de reiteración. Se han encontrado secuencias con 10⁵ a 10⁶ copias por genoma haploide, estas se denominaron

secuencias altamente repetidas y se encuentran en gran variedad de vertebrados e invertebrados. Las unidades básicas de estas secuencias se repiten en tandem, de manera que se forman grandes bloques de secuencias. En algunos casos, estos bloques pueden separarse del total del DNA en gradientes de densidad como CsCl o Cs₂SO₄ debido a que su composición de bases es substancialmente diferente.

Estos fragmentos de DNA con diferente densidad se han denominado satélites. En algunos DNAs satélites de humano (22), de la mosca de la fruta (18), de rata (19) y de rata canguro (20), se han encontrado unidades repetidas de secuencias muy cortas entre 6 y 20 pares de bases de longitud. En otros casos de bloques de secuencias altamente repetidas, como en el del mono verde africano (23), en el de humanos (22), en el de ternera (21) y el de mosca de la fruta (24), la unidad de repetición tiene una mayor complejidad de secuencia, (150 - 300 pares de bases).

Mediante hibridaciones in situ de cromosomas en metafase se han localizado bloques de secuencias altamente repetidas en heterocromatina centromérica (25,26), en regiones organizadoras del nucléolo (26,27), en el cromosoma Y (27), y en eucromatina

(26). La función de este DNA se desconoce, sin embargo se propone que puede ser un instrumento en la unión de las fibras del huso (28) o en el apareamiento meiótico. No se conocen regiones que codifiquen los satélites y su baja complejidad ha dificultado la especulación sobre su función.

Los genes para el 5S RNA se encuentran en varias especies en más de 24,000 copias (29) mientras que las que codifican para rRNAs están presentes en varios cientos de veces (30). Estas secuencias, interdispersas con secuencias espaciadoras que no codifican, también están organizadas en bloques.

Muchas de las especies de eucariotes estudiadas, también contienen una variedad de secuencias que se repiten entre 10 y 10,000 (secuencias medianamente repetidas).

Otra clase de secuencias repetidas son las palindrómicas que están compuestas de secuencias repetidas invertidas en la misma cadena y no pueden ser separadas al desnaturalizar el DNA. Los sitios de palíndromo en los genomas haploides de plantas y animales están en el rango de 10^5 a 10^6 (32-35). Se ha demostrado que estas secuencias se encuentran entre las se-

cuencias únicas de Xenopus y se ha sugerido que pueden ser - translocadas en una frecuencia muy alta a varios sitios en el genoma. Esta movilidad de secuencias se había demostrado anteriormente en los genomas de plantas y bacterias (36).

Arreglo de las secuencias repetidas en el genoma.

Los primeros trabajos con respecto a la localización de las secuencias repetidas en el genoma, fueron realizadas por Davidson y Col. (37), en el anfibio Xenopus y se descubrió que el DNA repetido tenía una longitud de 200 a 400 nucleótidos y se encontraba interdisperso entre las secuencias únicas que tienen una longitud de 1,000 a 2,000 nucleótidos. Este patrón se ha encontrado en la mayoría de los genomas de eucariotes, en crustáceos (31), moluscos (38,39), algunos insectos (40,41), -- vertebrados(42) y varias angiospermas (5,6). Este arreglo se ha denominado como "periodo corto de interdispersión", y subsecuente^{mente} se confirmó por microscopía electrónica (42-44). En contraste, al examinar algunas especies muestran un patrón cuantitativamente diferente en donde las secuencias únicas y las repetidas tienen muchos miles de nucleotidos en longitud y raramente se encuentran en el mismo fragmento. Este último patrón se llamó " el periodo largo de interdispersión " y se ha demostrado en algunos insectos, como Drosophila (45), Chironomus (46) y

Apis (40), en un nemátodo (47) en un hongo de agua (3) y en el Hámster sirio (48).

En organismos que poseen el período corto de interdispersión, se han encontrado también, fragmentos largos de DNA repetido y se les ha denominado "repetidos largos" (49). Los fragmentos interdispersos largos y cortos pueden separarse por cromatografía de las secuencias repetidas purificadas en geles de agarosa. El tamaño promedio de las secuencias cortas y largas es de 300³ y 1,500 nucleótidos respectivamente (49,50).

En estudios realizados para la caracterización del DNA repetido largo, se ha encontrado que los dobletes de este DNA en el genoma de Xenopus tienen mayor estabilidad térmica (y por lo tanto escaso mal apareamiento), que los dobletes repetidos cortos provienen de familias con miembros no idénticos, y que poseen diferencias que originan híbridos con malos apareamientos después de la reasociación.

Efectuando una caracterización más detallada de estos dos tipos de secuencias repetidas en erizo de mar, se concluyó que los repetidos largos forman aproximadamente un tercio del total de DNA repetido y que existen secuencias que se sobreponen entre los 2 tipos de secuencias repetidas (50).

Organización génica en T. cruzi.

Trypanosoma cruzi, y en general los parásitos intracelulares han sido un modelo difícil de estudiar, debido a que hasta recientemente ha sido posible crecer algunos de ellos en medios de cultivo, y con esto obtener mayor cantidad de células. En nuestro laboratorio podemos crecer a T. cruzi en un medio libre de células y tenemos en fase logarítmica unos 60 millones de epimastigotes (forma de diferenciación de T. cruzi casi exclusiva en estas condiciones) por mililitro. Esto nos ha permitido aislar suficiente DNA para realizar los estudios sobre la organización del genoma. Este estudio resulta de gran interés en T. cruzi debido a que actualmente, su mecanismo de división, solo se describe con el término de "fisión binaria", sin que se conozca ningún mecanismo por el que las células hijas conservan cantidades equitativas de material génico. No se ha demostrado tampoco la existencia de cromosomas, no se conoce su ploidía y únicamente por estudios realizados por nuestro grupo (51) (y otro parcial en Brasil) (52) se han identificado histonas y nucleosomas.

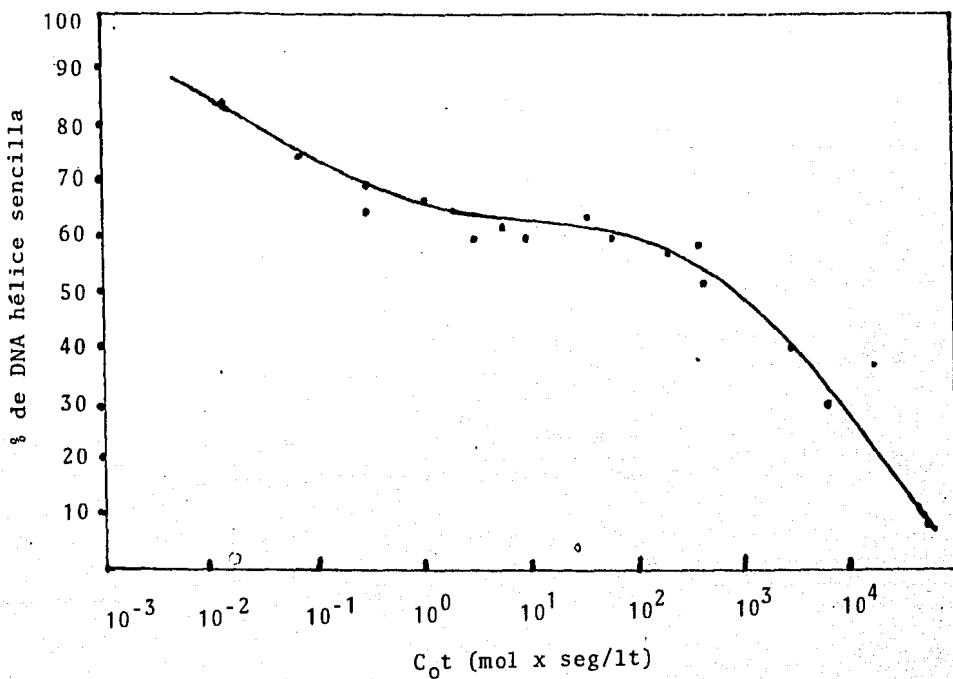
Por otro lado debido a que T. cruzi presenta características tan especiales como ser un parásito intracelular y tener varios estadios de diferenciación, resulta importante el conocer

la complejidad cinética del genoma y la regulación de la expresión génica.

La renaturalización de las hélices sencillas del DNA es una metodología que nos da una muy buena visión general del genoma pues nos permite conocer:

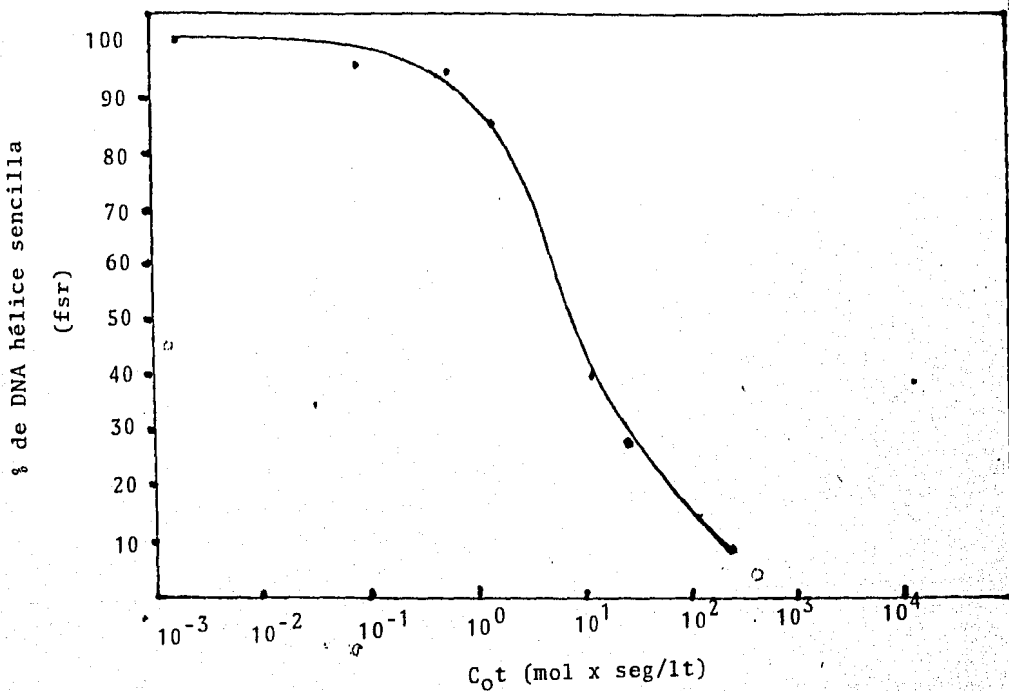
- (a) La presencia de secuencias repetidas y el porcentaje del DNA total que éstas forman.
- (b) La complejidad cinética del genoma, por medio de la cual y teniendo un estándar conocido, es posible determinar el tamaño del genoma haploide del organismo y por lo tanto inferir su ploidía.
- (c) El arreglo de las secuencias repetidas (si existen), tomando como modelo el patrón común de secuencias interdispersas de 300 pares de bases (tipo Xenopus) o el arreglo en grupo (tipo Drosophila).

Este tipo de datos serán discutidos en el presente trabajo.



Gráfica A.- Cinética de reasociación de DNA de timo de ternera. Reacción medida con HAPA.

- Pueden verse las 2 poblaciones de DNA, claramente separadas por una fase en la que no hay renaturalización.
- Los datos fueron tomados de Britten y Col. (1).



Gráfica B.- Curva sigmoide que muestra la cinética de Reasociación de *E. coli*. Reacción medida con HAPA. Los datos fueron tomados de Bridten y Col. (1).

Genome Organization and Ploidy Number in
Trypanosoma cruzi

Clementina Castro*, Sydney P. Craig⁺ & Mario Castañeda*[‡]

* Department of Developmental Biology,
Instituto de Investigaciones Biomédicas,
Universidad Nacional Autónoma de México,
Apartado Postal 70228,
México 20, D.F., México

⁺ Department of Biology,
University of Southwestern Louisiana, Box 42451,
Lafayette, Louisiana 70504, USA

[‡] To whom all correspondence should be addressed.
Telephone: (905)550-5215, ext. 3586

S U M M A R Y

Trypanosoma cruzi total DNA was analyzed by DNA:DNA reassociation kinetics. The nonlinear least-squares computer solution could reasonably be fitted to three second-order kinetic components. The highly repetitive, middle repetitive, and single copy components comprised 9, 35, and 49% of the genome, respectively. The single copy sequences showed a kinetic complexity of approximately 4 times that of Escherichia coli and of some 11 000 average-sized structural genes. The repetitive sequences presented the long-period pattern of interspersions with a modal single stranded length of 7 800 bases in an amount of some 6 900 repetitive sequences. The kinetic complexity of total DNA was compatible with a value of at least a diploid genome per cell.

KEY WORDS

Trypanosoma cruzi DNA, Kinetic complexity, Long period interspersions, Ploidy number.

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

Trypanosomes do not form discrete chromosomes and chromatin as a whole becomes more disperse during nuclear division [1]. Recently, the chromatin of two isolates of Trypanosoma cruzi has been found to be arranged in a subunit structure [2, 3]. The nuclear genomes of two species of Leishmania and that of Trypanosoma brucei have been shown to contain repetitive and single copy DNA components [4-6]. Other intracellular parasites also show these two components [7]. Nevertheless, information on specific sequence organization is lacking. We have continued our work on T. cruzi nuclear DNA and have analyzed its sequence complexity and component organization by reassociation kinetics. The results of this study, reported here, show that T. cruzi nuclear DNA presents the long-period pattern of repetitive sequence DNA interspersion and that the value for the total kinetic complexity amply allows a diploid genome.

Abbreviations: C_0t , initial DNA concentration (mol/liter) x time (s); K , reassociation second-order rate constant ($M^{-1} s^{-1}$); NPB, neutral phosphate buffer.

MATERIALS AND METHODS

Growth of cells and isolation of DNA

The T. cruzi isolate, the culture of T. cruzi and Escherichia coli cells, and the preparation of total DNA have been described earlier [9]. Briefly, T. cruzi isolated in La Cruz, Jalisco, Mexico, was grown at 28 °C with agitation in roller bottles containing liver infusion/tryptose liquid medium supplemented with 10% heat-inactivated fetal calf serum. The cells were collected by centrifugation at about the mid-log phase of growth (~ 99% epimastigote forms). The DNA was prepared using pronase, pancreatic ribonuclease, and chloroform/isoamyl alcohol. T. cruzi total DNA was labelled in vivo by growing 200 ml cultures for 84 h with 1.4 mCi of ^3H thymidine (New England Nuclear). The specific activity of the isolated DNA was approximately 90 000 cpm/ μg .

Escherichia coli B DNA (Sigma Chemical Co.) was used as the kinetic standard for the optical reassociation experiments. E. coli cells, American Type Culture Collection 25922, were grown in rich medium containing 10 μCi of ^3H thymidine for one duplication time (~ 50 min). This DNA, about 16 000 cpm/ μg , was the standard utilized for the tracer-driver analyses on hydroxyapatite.

Shearing and sizing of DNA

The preparations of DNA were sheared in a Virtis 60 K homogenizer to various fragment lengths and the DNA fragments were further purified by binding to hydroxyapatite, washed according to the 'perchlorate/urea/phosphate' procedure, eluted, dialyzed, and ethanol-precipitated as described elsewhere [10]. Purified DNA showed the following characteristics: $A_{260/280} = 1.8$, $A_{260/230} = 2.3$, melting point = 86.4 °C in 0.12 M NPB, and 27% hyperchromicity as percentage of final absorbance. The single-stranded length of DNA was determined on denaturing slab gels containing 1% agarose/30 mM NaOH/2 mM EDTA. Electrophoresis was carried out at 1.5 V/cm for 20 h at 4 °C. HindIII digests of λ DNA were used as markers. Slab gels were stained in the dark with 0.005% 'stainsall' (Eastman)/50% formamide. The fractionated DNA in each individual track was then scanned with an Instrument Specialties Co. UA-5 monitor equipped with an optical unit type 6. The estimates for the average fragment size are given in the various experiments.

Reassociation analysis

DNA:DNA reassociation experiments were run at criterion conditions 25 °C below melting point adjusted for salt

concentration. Those experiments involving total DNA were analyzed by optical absorption. Samples were melted in a jacketed quartz cuvette and reassociation at 65 °C in 0.41 M NPB was followed by changes in A_{260} with a Beckman Acta II spectrophotometer [11]. The reactions of radiolabelled repetitive and single copy tracers with total DNA were assayed by binding duplexes to hydroxyapatite [10]. DNA fragments were reassociated with driver quantities (1:500) of unlabelled total DNA to the desired $C_0 t$. In all cases, equivalent $C_0 t$ values were calculated to standard salt conditions of 0.12 M phosphate buffer. The curve fits to the data and the rate parameter values were calculated using a nonlinear least-squares computer program obtained from W.R. Pearson. The half-time equation for a second-order reaction, $t_{1/2} = 1/KC_0$, was used to calculate $C_0 t_{1/2}$. $C_0 t_{1/2}$ of pure component is $C_0 t_{1/2}$ times the component-corrected fraction, and the reiteration frequency is $C_0 t_{1/2}$ of single copy component divided by $C_0 t_{1/2}$ of repetitive component (see Table I).

Renaturation and digestion with S1 nuclease

DNA samples to be treated with single-strand specific S1 nuclease (Sigma Chem. Co.) were dissolved, melted, reassociated, and digested to an estimate of approximately 0.99 as described elsewhere [11]. After digestion, the samples were washed with

0.12 M NPB on hydroxyapatite at 60 °C and eluted with 0.41 M NPB. The gross size distribution of the resistant duplexes was analyzed on a column (100 x 2.6 cm) of agarose A-50 (Bio-Rad). The gel bed was poured on siliconized glass beads, and the material was eluted and collected in fractions of 5 ml. This column was previously calibrated with long and short repetitive DNA sequences from sea urchin sperm [11].

R E S U L T S

Total cellular DNA from T. cruzi epimastigotes, sheared to fragments 380 base pairs in length, was subjected to C_0t analysis. A representative optical reassociation curve with the best least-squares computer solution for the data is shown in Fig. 1a. The analysis revealed that the genome can be described by three second-order kinetic components which we refer to as the highly repetitive, middle repetitive and single copy DNA sequences (the computer tracings for only the last two components are depicted for graphic clarity). Additional experiments were performed with highly enriched single copy and repetitive sequence DNA fractions isolated by reassociation of radiolabelled sheared total DNA to appropriate C_0t values (see legend to Fig. 1), followed by fractionation on hydroxyapatite. These two isolated kinetic components were then reassociated with a 500-fold excess of unlabelled sheared total DNA, and hybrids were identified by binding to hydroxyapatite. Both tracer fractions reassociated as single second-order components (Fig. 1b).

The analysis of data from the experiments shown in Fig. 1 is summarized in Table I. The low recovery of duplexes (0.591 and 0.593) in the tracer fractions may be due in part to the

fact that duplexes shorter than 100 base pairs have a decreased affinity for hydroxyapatite. The calculated value for the total genome size of T. cruzi is $3.21 - 3.87 \times 10^7$ base pairs, using the reassociation of E. coli DNA as a kinetic standard, with a complexity of 4.2×10^6 base pairs [12]. Thus, T. cruzi possesses a complexity 8 - 9 times greater than that of E. coli, although, as shown in Table I, the single copy component would be only 4 times that of E. coli. This figure indicates an upper limit in the coding capacity of about 11 000 average-sized (1 500 base pairs) structural genes. The values reported for the percentages of the kinetic components, the reiteration frequency of middle repetitive DNA, and the complexity of single copy DNA in T. brucei [7] are similar to our data for T. cruzi. Since T. cruzi kinetoplastic DNA, which has been shown to reassociate before $C_0t 10^{-1}$ [13], was not removed from the repetitive tracer fraction, the sequences that reassociated before this C_0t value probably represent kinetoplastic DNA and perhaps other highly repetitive sequences as well (Fig. 1b, lower curve). Ribosomal RNA genes constitute less than 1% of T. cruzi DNA [9] and thus comprise a minor fraction of the middle repetitive sequence DNA.

T. cruzi DNA was then analyzed in regard to the length and organization of the repetitive sequences. For this purpose total DNA was sheared to an average of 13 500 base pairs, and the

fragments were melted and reassociated to C_0t 2.5. Under these conditions, 97% of the repetitive DNA would be expected to have reassociated with about 22% contamination by single copy sequences (see legend to Fig. 2). The samples were subsequently treated with S1 nuclease, specific for single-stranded DNA, to a digestion estimate of approximately 0.99²¹ |11|. The resistant duplexes were isolated by binding to hydroxyapatite and fractionated according to size by chromatography on agarose A-50. As Fig. 2 shows, the S1-resistant repetitive duplexes eluted as a single peak with the excluded volume of the agarose column, corresponding to sizes of >1 000 base pairs. Duplex material with a length of about 300 base pairs, characteristic of short-period interspersed repetitive DNA, was not detected. In comparison, sea urchin sperm DNA, used as a size standard, has been resolved by the agarose column into these two sizes |11|. The single-stranded length of the T. cruzi DNA in the repetitive duplexes recovered from the agarose column was determined by electrophoresis on denaturing agarose gels. Agarose column fractions 8 and 9 (~ 80% of the total DNA) and fractions 10 to 12 (~ 20% of the total) were concentrated by ethanol precipitation, redissolved, and applied to agarose gels (Fig. 2, Inset b and c). The majority of the repetitive sequences (fractions 8 and 9) migrated as a class of fragments with a modal single-stranded length of 7 800

bases (Inset, b). The trailing one-fifth of the agarose column peak (fractions 10-12) displayed a smear of a wide range of lengths, from about 9 000 to 230 bases (Inset, c). The short fragments are probably due to fragment overlap which results from the reassociation of randomly-sheared fragments rather than to the reassociation of repetitive sequences with an actual length of about 300 bases. The trailing fraction also contained three conspicuous bands (the first two in a doublet) with lengths of 1 400 - 1 000 bases. The band of greatest length may correspond to kinetoplastic DNA [13] and the others to 'restriction satellites' of extrachromosomal DNA with high AT content since similar bands are seen in electrophoresis of total DNA restricted and unrestricted with endonucleases with GC recognition sites (unpublished data).

Repetitive sequence DNA, in fragments of 380 base pairs, was almost completely reassociated by C_0t 2.5 (Fig. 1). When large fragments of radiolabelled total DNA, 13 500 base pairs long, were reassociated with a 100-fold excess of repetitive sequence DNA, 380 base pairs long, to C_0t 2.5, as much as half of the long radiolabelled fragments remained single stranded (data not shown). This indicates that about 50% of the single copy sequences are not within 13 500 base pairs of a repetitive sequence. The average expected quantity of single copy sequence

linked to repetitive sequences was calculated from the relationship $Y = LN/G$, where Y = fraction of the genome in single copy sequences linked to repetitive sequences, L = fragment length, N = total number of interspersed sequences, and G = genome size in base pairs [15]. By subtracting our reported value of 15% for kinetoplasmic DNA [9] from the chemical estimate for total DNA, we derived a value of about 15.37×10^7 base pairs for the nuclear genome. The value for the fraction of middle repetitive DNA (0.35, see Table I) indicates that there would be about 6 900 repetitive sequences with an average length of 7 800 bases. Assuming that all of these are interspersed with long single copy sequences, 4.5% of the genome (6.9×10^6 bases) would be composed of fragments 1 000 bases in length containing middle repetitive sequences linked to single copy DNA ($1\ 000 \times 6\ 900 / 15.37 \times 10^7 = 0.0448$). In turn, 11% ($6.9 \times 10^6 / 6.9 \times 10^6 + 53.7 \times 10^6$) of the middle repetitive DNA, 1 000 bases long, would consist of single copy DNA.

DISCUSSION

The above data indicate that short repetitive sequences are virtually absent in T. cruzi DNA, and that the repetitive sequence DNA is arranged in clusters of very large sizes. This protozoan can therefore be added to a lengthening list of examples of living entities having a long-period interspersion pattern of repetitive DNA, although there are quantitative differences in the specific sequence lengths: Drosophila melanogaster |16|, Apis mellifera |17|, Chironomus tentans |18|, Achlya bisexualis |19|, Aspergillus nidulans |20|, Neurospora crassa |21|, Schizophyllum commune |22|, Gallus gallus |23|, Caenorhabditis elegans |24|, Syrian hamster |25|, and flax |26|. This increasing number of organisms with an undetectable amount of short-period interspersion of repetitive DNA is important in view of the role attributed to this kind of DNA in the regulation of transcription |27|.

The computer fits given in Fig. 1 permit the estimation of the genome ploidy number of T. cruzi. The chemical quantity of total DNA per cell, 18.2×10^7 base pairs |9|, divided by the kinetic complexity of total DNA ($3.2 - 3.9 \times 10^7$ base pairs, see Table I), gives a value of 4.7 - 5.6 copies of the genome per cell. Nevertheless, in all these experiments the trypanosome

cells have been harvested from the mid-log phase of an actively dividing asynchronous population. Although we lack information on the length of the phases of cell division, this type of population could be expected to possess an average of 1.5 times the amount of DNA as is present in cells traversing G_1 . Consequently, the chemical amount of DNA per cell, when corrected by this factor, gives an estimated ploidy number of 3.1 - 3.8. Solari [28] has reported the existence of ten dense plaques in dividing nuclei of T. cruzi. If these plaques represent kinetochores, the presence of ten chromosomes would restrict the ploidy number to 1, 2, 5, or 10. It follows that our calculated figure of 3¹⁰-44 is compatible with the diploid and pentaploid possibilities. A recent study by Tait [29] on polymorphic isozymes and genotype frequencies in T. brucei indicates that this species also contains at least one diploid set of chromosomes. Since the kinetic data tend to underestimate the single copy fraction, we think that trypanosomes are likely to be diploid, although more direct evidence must be offered, and that the mechanism for chromatin distribution to daughter cells in the absence of a high ploidy number remains an interesting subject.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank W. R. Pearson for providing the computer program for the analysis of the reassociation kinetic data, R. Sánchez for assistance in the preparation of T. cruzi DNA, and M. Vogt for help in the preparation of the manuscript.

R E F E R E N C E S

- [1] Vickerman, K. and Preston, T.M. (1970) Spindle microtubules in the dividing nuclei of trypanosomes. *J. Cell Sci.* 6, 365-383.
- [2] Astolfi Filho, S., Martins de Sá, C. and Gander, E.S. (1980) On the chromatin structure of Trypanosoma cruzi. *Mol. Biochem. Parasitol.* 1, 43-53.
- [3] Rubio, J., Rosado, Y. and Castañeda, M. (1980) Subunit structure of Trypanosoma cruzi chromatin. *Can. J. Biochem.* 58, 1247-1251.
- [4] Belnat, P., Paoletti, J. and Riou, G. (1981) Subunit organization of chromatin from Trypanosoma cruzi sensitive and resistant to ethidium bromide. *Mol. Biochem. Parasitol.* 2, 167-176.
- [5] Wesley, R.D. and Simpson, L. (1973) Studies on kinetoplast DNA. III. Kinetic complexity of kinetoplast and nuclear DNA from Leishmania tarentolae. *Biochim. Biophys. Acta* 319, 267-280.
- [6] Leon, W., Fouts, D.L. and Manning, J. (1978) Sequence arrangement of the 16S and 26S rRNA genes in the pathogenic haemoflagellate Leishmania donovani. *Nucleic Acids Res.* 5, 491-504.
- [7] Borst, P., Fase-Fowler, F., Frasch, A.C.C., Hoeijmakers, J.H.J. and Weijers, P.J. (1980) Characterization of DNA from Trypanosoma brucei and related trypanosomes by restriction endonuclease digestion. *Mol. Biochem. Parasitol.* 1, 221-246.

- [8] Dore, E., Birago, C., Frontali, C. and Battaglia, P.A. (1980) Kinetic complexity and repetitivity of Plasmodium berghei DNA. *Mol. Biochem. Parasitol.* 1, 199-208.
- [9] Castro, C., Hernández, R. and Castañeda, M. (1981) Trypanosoma cruzi ribosomal RNA: internal break in the large-molecular-mass species and number of genes. *Mol. Biochem. Parasitol.* 2, 219-233.
- [10] Chaudhari, N. and Craig, S.P. (1979) The evolution of the long and short repetitive DNA sequences in sea urchins. *Biochim. Biophys. Acta* 562, 438-452.
- [11] Craig, S.P., Chaudhari, N. and Steinert, M. (1979) Characterization of long and short repetitive sequences in the sea urchin genome. *Biochim. Biophys. Acta* 565, 33-50.
- [12] Lewin, B. (1980) *Gene Expression*, 2nd Ed., John Wiley and Sons, New York.
- [13] Riou, G.F. and Yot, P. (1977) Heterogeneity of the kinetoplast DNA molecules of Trypanosoma cruzi. *Biochemistry* 16, 2390-2396.
- [14] Wetmur, J.G. and Davidson, N.J. (1968) Kinetics of renaturation of DNA. *J. Mol. Biol.* 31, 349-370.
- [15] Crain, W.R., Eden, F.C., Pearson, W.R., Davidson, E. H. and Britten, R.J. (1975) Absence of short-period interspersions of repetitive and nonrepetitive sequences in the DNA of Drosophila melanogaster. *Carnegie Inst. of Wash. Year Book* 75, 870-883

- [16] Manning, J.E., Schmid, C.W. and Davidson, N. (1975) Interspersion of repetitive and non-repetitive DNA sequences in the Drosophila melanogaster genome. Cell 4, 141-155.
- [17] Crain, W.R., Davidson, E.H. and Britten, R.J. (1976) Contrasting patterns of DNA sequence arrangement in Apis mellifera (honeybee) and Musca domestica (housefly). Chromosoma 59, 1-12.
- [18] Wells, R., Royer, H.D. and Hollenberg, C.P. (1976) Non Xenopus-like DNA sequence organization in the Chironomus tentans genome. Mol. Gen. Genet. 147, 45-51.
- [19] Hudspeth, M.E.S., Timberlake, W.E. and Goldberg, R.B. (1977) DNA sequence organization in the water mold Achlya. Proc. Natl. Acad. Sci. 74, 4332-4336.
- [20] Timberlake, W.E. (1978) Low repetitive DNA content in Aspergillus nidulans. Science 202, 973-975.
- [21] Krumlauf, R. and Marzluf, G.A. (1979) Characterization of the sequence complexity and organization of the Neurospora crassa genome. Biochemistry 18, 3705-3713.
- [22] Ullrich, R.C., Kohorn, B.D. and Specht, C. A. (1980) Absence of short-period repetitive-sequence interspersion in the Basidiomycete Schizophyllum commune. Chromosoma 81, 371-378.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

- |23| Eden, F.C. and Hendrick, J.P. (1978) Unusual organization of DNA sequences in the chicken. *Biochemistry* 17, 5838-5844.
- |24| Schachat, F., O'Connor, D.J. and Epstein, H.F. (1978) The moderately repetitive DNA sequences of Caenorhabditis elegans do not show short-period interspersion. *Biochim. Biophys. Acta* 520, 688-692.
- |25| Moyzis, R., Bonnet, J. and Ts'o, P.O.P. (1977) DNA sequence organization of the Syrian hamster. *J. Cell Biol.* 75, 130a.
- |26| Cullis, C.A. (1981) DNA sequence organisation in the flax genome. *Biochim. Biophys. Acta* 652, 1-15.
- |27| Davidson, E.H. and Britten, R.J. (1979) Regulation of gene expression: possible role of repetitive sequences. *Science* 204, 1052-1059.
- |28| Solari, A.J. (1980) The 3-dimensional fine structure of the mitotic spindle in Trypanosoma cruzi. *Chromosoma* 78, 239-255
- |29| Tait, A. (1980) Evidence for diploidy and mating in trypanosomes. *Nature* 287, 536-538.

Kinetic analysis of *T. cruzi* DNA reassociation

DNA reacted	Components	Fraction	Corrected fraction ^a	K	$C_{ot}^{1/2}$	$C_{ot}^{1/2}$ of pure component	Component complexity ^b	Total complexity ^c	Reiteration frequency	
Total	x total	Highly repetitive	0.180	0.089	>62.08	<0.016	-	-	>2 500	
Total	x total	Middle repetitive	0.315	0.350	0.6224	1.6	0.564	4.37×10^5	26	
Total	x total	Single copy	0.442	0.491	0.0241	41.4	20.33	1.58×10^7	3.21×10^7	1
Repetitive	x total	Middle repetitive	0.591	-	0.4381	2.3	-	-	15	
Single copy	x total	Single copy	0.593	-	0.0302	33.1	-	3.87×10^7	1	

^a In optical reassociations there is a decrease in UV absorbance that is due to the reduction in temperature to obtain conditions favorable for reassociation. This is referred to as hyperchromic collapse and does not reflect the formation of stable DNA:DNA duplexes. Reassociations of *T. cruzi* repetitive DNA, free of contamination with kinetoplastic DNA (fractions 8 and 9 of Fig. 2), show that hyperchromic collapse accounts for approximately 10% of the total change in A_{260} that is produced during reassociation of these samples. Thus, the fractions were corrected by subtracting 0.1 from the highly repetitive component and dividing all fractions by 0.9. The fraction of DNA in the first component (including the highly repetitive DNA) was fixed at 0.180 for the computer program since the program does not recognize the kinetics for hyperchromic collapse.

^b Optical reassociation of *E. coli* DNA was used as a kinetic standard and yielded a $C_{ot}^{1/2}$ of 5.02 (root mean square of 0.47%). The component complexity refers to the total length in base pairs of different nucleotide sequences contained in a specific component within the genome.

^c For optical reassociations, the total genomic complexity was calculated as above except that the $C_{ot}^{1/2}$ for single copy component DNA driven by total DNA was utilized, rather than the $C_{ot}^{1/2}$ for the pure component. *E. coli* DNA reassociation was also tested via tracer-driver hybridization followed by analysis on hydroxyapatite, yielding a $C_{ot}^{1/2}$ of 3.59 (root mean square of 4.08%).

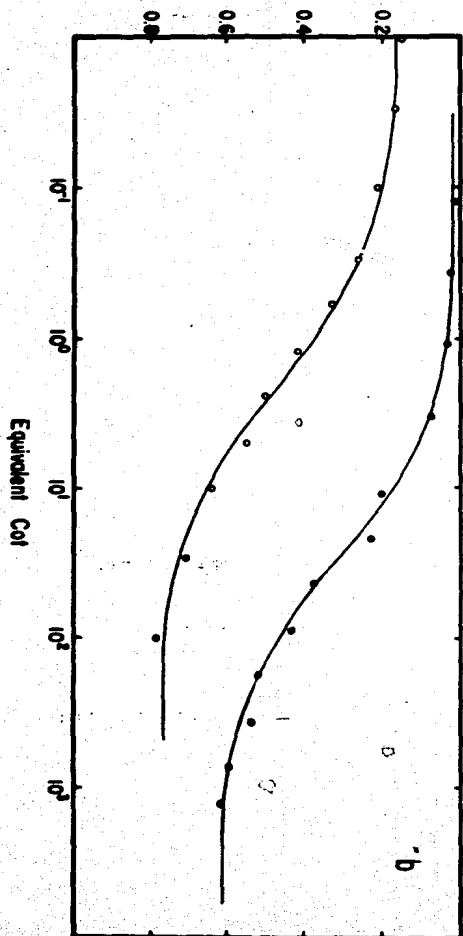
FIGURE LEGENDS

Fig. 1. Reassociation kinetics of T. cruzi DNA sheared to 380 base pairs modal fragment length. (a) Reassociation of total DNA followed by changes in the absorbance at a wavelength of 260 nm. The solid line represents a best least-squares computer solution (root mean square of 0.66%) to the data points (●) with three second-order components. The two dashed lines represent the single copy and middle repetitive components. (b) Radiolabelled single copy (sequences remaining single-stranded at C_0t 8 in reassociations of total DNA) and repetitive sequence (sequences reassociated by C_0t 2) DNA fragments reassociated with driver quantities (1:500) of unlabelled total DNA were assayed on hydroxyapatite. ●, single copy tracer (root mean square of 1.76% for computer fit to a single component); ○, repetitive tracer (root mean square of 2.87% for a fit to 3 single component).

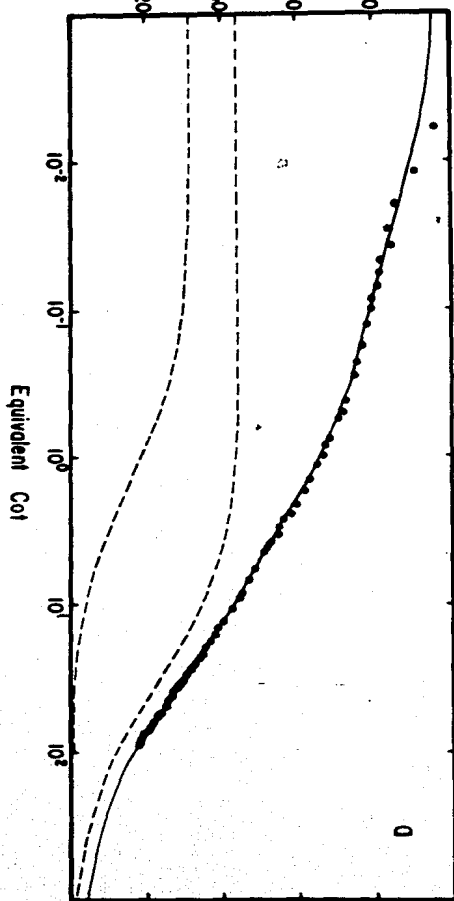
Fig. 2. Profiles of T. cruzi repetitive DNA duplexes resistant to S1 nuclease. Fragments, 13 500 base pairs long, were melted and reassociated to C_0t 2.5. After adjustment for rate enhancement due to fragment length [14], this C_0t value is corrected to approximately 14.9 for fragments

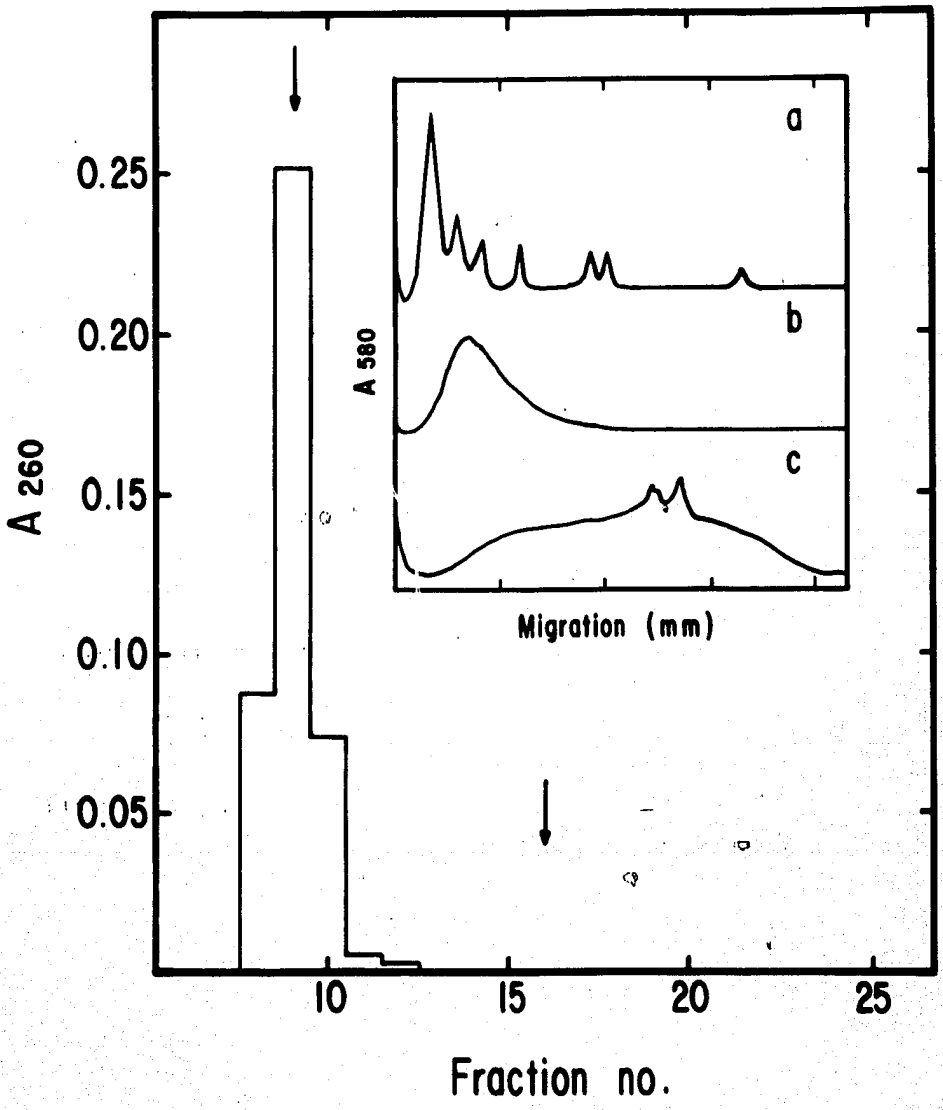
which average 380 base pairs. From data of Fig. 1a and Table I, approximately 97% of repetitive and 28.7% of single copy sequences may have reassociated by C_0t 14.9 and therefore approximately 22% of this repetitive sequence preparation actually represents single copy sequences. After reassociation, the preparation was digested with S1 nuclease, washed on hydroxyapatite, and chromatographed on agarose A-50 as described under Materials and Methods. The fractions collected from the column were read at 260 nm. The arrows indicate the elution positions of long and short repetitive DNA from sea urchin sperm. Inset: composite scan of DNA fragment sizes present in T. cruzi repetitive duplexes resistant to S1 nuclease. The single-stranded length of DNA was determined by electrophoresis on denaturing agarose gels (Materials and Methods). (a) Bacteriophage λ DNA digested with HindIII used as size standard; the fragment lengths are 22.2, 9.3, 6.2, 4.3, 2.2, 1.9, and 0.65 kilobases. (b) T. cruzi DNA ($\sim 5 \mu\text{g}$) from pooled fractions 8 and 9 of the agarose A-50 column. (c) T. cruzi DNA ($\sim 10 \mu\text{g}$) from pooled fractions 10-12 of the same column.

Fraction bound



A at each point - A prior to melting X 100
A at 100 °C - A prior to melting





D I S C U S I O N

Los resultados obtenidos, en este estudio de T. cruzi pueden resumirse en dos. El primero, es la complejidad del genoma de este organismo; por medio de la cual fue posible inferir su ploidia. Como muestran los resultados, y aunque estos datos no son precisos, (ver discusión del artículo) es indudable que por lo menos, nos encontramos con un organismo diploide, y esto nos abre nuevas posibilidades respecto a su recombinación génica. El segundo fue el arreglo de las secuencias repetidas, que resultaron estar agrupadas en regiones con un promedio de 7,800 pares de bases, lo que sitúa a T. cruzi en el grupo de organismos que carecen de DNA repetido corto. Con respecto a esto es importante decir que este grupo de organismos no estarían incluidos en el modelo de regulación para eucariotes, propuesto inicialmente en 1969 por Britten y Davidson, y en el que se sugiere que unas regiones del DNA sensibles al control por señales externas podrían actuar como promotores de la transcripción de genes integradores. Estos serían elementos de control positivo y permitirían la expresión de varios genes estructurales en grupo. Este modelo se basa en la redundancia de los genes integradores o receptores o ambos (53). Los modelos se han modificado mucho hasta la fecha y tienen gran cantidad -

de datos que los apoyan; sin embargo la ausencia de las secuencias únicas, en algunas especies ha sido utilizada como un argumento en contra de su papel en la regulación génica por lo menos en esos casos específicos (54).

El manejo de esta metodología nos abre nuevas posibilidades pues la renaturalización puede también ser usada en la comparación de secuencias del DNA para conocer la divergencia evolutiva entre los organismos. Esto resulta de especial interés en T. cruzi, debido a que los aislados de diferentes regiones de América presentan diferencias en patogenicidad, características de infección y patrones de isoenzimas lo que nos permite pensar en la existencia de subespecies. Como puede verse las características conocidas son fenotípicas y los resultados que se obtendrían con el estudio del DNA serán referentes al genotipo. La posibilidad de clonar secuencias de un aislado y renaturalizarlas con DNAs de otros aislados nos permitiría tener, un mecanismo de comparación de secuencias específicas identificando aquellas que comparten y las que no son comunes.

BIBLIOGRAFIA

1. Britten, R.J. and Kohne, D.E. 1968. Repeated sequences in DNA
Science 161. 529-540.
2. Timberlake, W.E. 1978. Low Repetitive DNA Content in
Aspergillus nidulans. Science 202. 973-975.
3. Hudspeth, M.E.S., Timberlake, W.E. and Goldberg, R.B. 1977.
DNA sequences in the water mold, Achlya. Proc. Natl. Acad.
Sci. USA. 74. 4332-4336.
4. Roberts. T.M., Klotz, L.C. and Loeblich, A.R. 1977.
Characterization of a blue-green algal genome. J. Mol.
Biol. 110. 341-361.
5. Goldberg, R.B. 1978. DNA sequence organization in the Soybean
plant. Biochem. Gen. 16. 45-68.
6. Zimmerman, L. and Goldberg, R.B. 1977. DNA sequence organiza-
tion in the genome of Nicotiana tabacum. Chromosoma. 59.
227-252.

7. Murray, M.G., Cuellar, R.E. and Thompson, W.F. (1978). DNA sequence organization in the pea genome. *Biochemistry* 17. 5781-5790.
8. Davidson, E.H., Galau, G.A., Angerer, R.C. and Britten, R.J. 1975. Comparative aspects of DNA organization in metazoa. *Chromosoma (Berl.)* 51. 253-259.
9. Britten, R.J. and Kohne, D.E. 1967. Nucleotide sequence repetition in DNA. *Carnegie Inst. Washington, Yearb.* 65. 78-86.
10. Britten, R.J., Graham, D.E. and Neufeld, B.R. 1974. Analysis of repeating DNA sequences by reassociation. In 'Methods in Enzymology' (L. Grossman and K. Moldave, eds.), Vol. 29, Part E, pp 363-418.
11. Wetmur, J.G. and Davidson, N. 1968. Kinetics of Renaturation of DNA. *J. Mol. Biol.* 31. 349-370.
12. Bonner, T.I., Brenner, D., Neufeld, B.R. and Britten, R.J. 1973. Reduction in the rate of DNA reassociation by sequence divergence. *J. Mol. Biol.* 81. 123-135.

13. Hinnebusch, A.G., Clark, V.E. and Klotz, L.C. 1978. Length Dependence in reassociation kinetics of radioactive tracer DNA. *Biochem.* 17. 1521-1529.
14. Chamberlin, M.E., Galau, G.A. Britten, R.J. and Davidson, E.H. 1978. Studies on nucleic acid reassociation kinetics: Effects of disparity in tracer and driver fragment lengths. *Nuc. Acids Res.* 5. 2073-2094.
15. Davidson, E.H. 1976. Gene activity in Early Development. Academic Press, New York. pp. 189-200.
16. McCarthy, B.J. and McConaughy, B.L. 1968. Related base sequence in the DNA of simple and complex organism. I. DNA/DNA duplex formation and the incidence of partially related base sequences in DNA. *Biochem. Genet.* 2. 37-53.
17. Smith, M.J., Britten, R.J. and Davidson, E.H. 1976. Studies on nucleic acid reassociation kinetics: Reactivity of single-stranded tails in DNA-DNA renaturation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 72. 4805-4809.
18. Endow, S.A., Polan, M.L. and Gall, J.G. 1974. Satellite DNAs in Drosophila melanogaster. *J. Mol. Biol.* 96. 665-692.

19. Biro, P.A., Carr-Brown, A., Southern, E.M. and Walker, P.M.B. 1975. Partial sequence analysis of mouse satellite DNA. J. Mol. Biol. 94. 71-86.
20. Salser, W., Bowen, S., Browne, D., El Adli, F., Federoff, N., Fry, K., Heindell, H., Paddock, G., Poon, R., Wallace, B. and Whitcombe, P. 1976. Investigation of the organization of mammalian chromosomes at the DNA level. Fed. Proc. 35. 23-35.
21. Segal, S., Garner, M., Singer, M. and Rosenberg, M. 1976. In situ hybridization of repetitive monkey genome sequences isolated from defective simian virus 40 DNA. Cell 9. 247-257.
22. Manuelidis, L. 1978. Complex and simple sequences in human repeated DNAs. Chromosoma (Berl.) 66. 1-21.
23. Rosenberg, M. 1978. Science 200. 394-401.
24. Carlson, M. and Brutlag, D. 1977. Cloning and characterization of a complex satellite DNA from *Drosophila melanogaster*. Cell 11. 371-381.

25. Schachat, F.H. and Hogness, D.S. 1974. Repetitive sequences in isolated Thomas circles from Drosophila melanogaster. Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology. 38. 371-381.
26. Kurnitt, D.M. and Maio, J.J. 1975. African green monkey satellite DNAs. Chromosoma (Berl.) 42. 23-36.
27. Manuelidis, L. 1978. Chromosomal localization of complex and simple repeated human DNAs. Chromosoma (Berl.) 66. 23-32.
28. Wiche, G., Corces, V.G. and Avila, J. 1978. Preferential binding of hog brain microtubule-associated proteins to mouse satellite versus bulk DNA preparations. Nature 273. 403-405.
29. Brown, D.D., Wensink, P.C. and Jordan, E. 1971. 5S RNA genes in Drosophila. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 68. 3175-3179.
30. Birnstiel, M.L., Chipchase, M. and Spiers, J. 1971. Satellite DNA evolution. Proc. Nuc. Acid Res. Mol. Biol. 11. 351-366.

31. Holland, C.A. and Skinner, D.M. 1977. The organisation of the main component DNA of a crustacean genome with a paucity of middle repetitive sequences. *Chromosoma (Berl.)* 63. 223-240.
32. Perlman, S., Phillips, C. and Bishop, J.O. 1976. A study of foldback DNA. *Cell* 8. 33-42.
33. Bazetoux, S., Jouanin, L. and Huguet, T. 1978. Characterization of inverted repeatde sequences in wheat nuclear DNA. *Nuc. Acids Res.* 5. 751-769.
34. Jelinek, W. 1978. Inverted repeated DNA from Chinese hamster ovary cells studied with cloned DNA fragments. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 75. 2679-2683.
35. Jelinek, W.R., Evans, R.E., Wilson, M., Salditt-Georgiev, M. and Darnell, J.E. 1978. Oligonucleotides in heterogeneous nuclear RNA: Similarity of inverted repeats and RNA from repetitious DNA sites. *Biochem.* 17. 2776-2783.
36. McClintock, B. 1956. Controlling elements and the gene. *Cold Spring Harbout Symposia on Quantitative Biology* 21. 197-216.

37. Davidson, E.H., Hough, B.R., Amenson, C.S. and Britten, R.J. 1973. General interspersion of repetitive with non-repetitive sequence elements in the DNA of Xenopus. J. Mol. Biol. 77. 1-23.
38. Angerer, R.C., Davidson, E.H. and Britten, R.J. 1975. DNA sequence organization in the mollusc, Aplysia californica. Cell 6. 29-39.
39. Goldberg, R.B., Crain, W.R., Ruderman, J.V., Moore, G.P., Barnett, T.R., Higgins, R.C., Gelfand, R.A., Galau, G.A., Britten, R.J. and Davidson, E.H. 1975. DNA sequence organization in the genomes of five marine invertebrates. Chromosoma (Berl.) 51. 225-231.
40. Crain, W.R., Davidson, E.H. and Britten, R.J. 1976. Contrasting patterns of DNA sequence arrangement in Apis mellifera (honeybee) and in Musca domestica (housefly). Chromosoma (Berl.) 59. 1-12.
41. Efstratiadis, A., Crain, W.R., Britten, R.J., Davidson, E.J. and Kafatos, F.C. 1976. DNA sequence organization in the lepidopteran Antheraea pernyi. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 73. 2289-2293.

42. Deininger, P.L. and Schmid, C.W. 1976. An electron microscope study of the human genome. *J. Mol. Biol.* 106. 773-790.
43. Lee, A.S., Britten, R.J. and Davidson, E.H. 1978. Short-period interspersion in cloned fragments of sea urchin DNA. *Cold Spring Harbour Symposia on Quantitative Biology.* 42. 1065-1076.
44. Wilkes, M.M., Pearson, W.R., Wu, J.R., and Bonner, J. 1978. Sequence organization of the rat genome by electron microscopy. *Biochem.* 17. 60-69.
45. Manning, J.E., Schmid, C.W. and Davidson, N. 1975. Interspersion of repetitive and non-repetitive DNA sequences in the Drosophila melanogaster genome. *Cell* 4. 141-155.
46. Wells, R., Royer, H.D. and Hollenberg, C.P. 1976. Non Xenopus-like DNA sequence organization in the Chironomus tentans genome. *Molec. Gen. Genet.* 147. 45-51.
47. Beauchamp, R., Pasternak, J. and Strauss, N.A. 1979. Characterization of the genome of the free-living nematode Panagrellus silusiae: Absence of short period Interspersion. *Biochem.* 18. 245-251.

48. Moizis, T. Bonnet, R.A. and Ts'o. 1977. DNA sequence organization in the Syrian hamster. *J. Cell Biol.* 75. 130a.
49. Davidson, E.H., Graham, D.E., Neufeld, B.R., Chamberlin, M.E., Amenson, C.S., Hough, B.R. and Britten, R.J. 1974. Arrangement and characterization of repetitive sequence elements in animal DNAs Cold Spring Harbour Symposia on Quantitative Biology 38. 295-301.
50. Craig, S.P., Chaudhari, N. and Steinert, M. 1979. Characterization of long and short repetitive sequences in the sea urchin genome. *Biochim. Biophys. Acta.* 565. 33-50.
51. Rubio, J., Rosado, Y. and Castañeda M. 1980. Subunit structure of Trypanosoma cruzi chromatin. *Can. J. Biochem.* 58, 1247-1251
52. Astolfi Filho, S., Martins de Sá, C. and Gander, E.S. 1980. On the chromatin structure of Trypanosoma cruzi. *Mol. Biochem. Parasitol.* 1, 43-53.

53. Davidson, E. H. and Britten, R.J. 1973. Organization,
Transcription and regulation in the animal genome.
G. Rev. Biol. 48, 563-613.

54. Galau, G.A., Chamberlin, M.E., Hough, B.R., Britten, R.J.
and Davidson, E.H. 1976. Evolution of repetitive and
non-repetitive DNA in " Molecular Evolution " (F.J. A-
yala, ed.). Sinauer Press, Sunderland, Mass.p.p. 220-224.