



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

Análisis molecular del gen de la
subunidad C128 de la RNA Polimerasa III
de *Leishmania major*

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

B I Ó L O G O

Presenta:

CLAUDIA MARISOL GOMEZ HURTADO

Director de Tesis: Dr. Santiago Martínez Calvillo

Enero, 2008





Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Con todo mi amor para mis padres:
Elizabeth Hurtado Terrón y Noe Gómez García

Y para mi hermano:
José Gómez Hurtado

AGRADECIMIENTOS

Muy en especial al Dr. Santiago Martínez Calvillo, por que además de consolidar mi formación en el mundo de la Biología Molecular, ha dejado importantes huellas humanas en mi vida.

Al Biol. Luis Enrique Florencio Martínez, por su significativo apoyo y consejos durante la experimentación.

A todas las personas que formaron parte de la Comisión Dictaminadora de este trabajo:

Dr. Sergio Vaca Pacheco

M en C María de Jesús Laura Castañeda Partida

M en C Arturo Calderón Vega

Dra. Emma Berta Gutierrez-Cirlos Madrid

Finalmente, aprovecho para expresar mi infinito agradecimiento al resto de mi familia (que sería otra tesis nombrarlos a todos), así como a mis amigas y compañeros. A todos los quiero mucho.

Gracias, totales.

CONTENIDO

	Página
ABREVIATURAS	1
RESUMEN	3
INTRODUCCIÓN	5
1. <i>Leishmania</i> y la leishmaniasis	5
2. Transcripción	13
ANTECEDENTES	24
OBJETIVOS	26
MATERIALES Y MÉTODOS	27
1. Cultivo de promastigotes de <i>Leishmania major</i>	27
2. Alineamientos y comparaciones de secuencias	27
3. Aislamiento de ácidos nucleicos	27
4. Ensayos de RT-PCR	29
5. Recuperación de DNA de geles de agarosa	31
6. Ligaciones	31
7. Preparación y transformación de células competentes de la cepa JM109 de <i>E. coli</i>	32
8. Purificación de plásmidos en pequeña escala	33
9. Experimento tipo Southern	34
10. Experimento tipo Northern	37

RESULTADOS	39
1. Comparaciones de las secuencias de C128 en diferentes especies	39
2. Caracterización de los sitios de procesamiento del mRNA de C128	44
3. Experimento tipo Southern-blot	54
4. Experimento tipo Northern-blot	60
DISCUSIÓN	62
CONCLUSIONES	70
REFERENCIAS	71

ABREVIATURAS

aa	Aminoácido
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementario
Ci	Curie
cpm	Cuentas por minuto
dCTP	Desoxicitidina trifosfato
DEPC	Dietilpirocarbonato
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNasa	Desoxirribonucleasa
DSE	Dominio distal
EDTA	Acido etilendiamino tetracético
EI	Elemento Intermedio
GLB	Amortiguador de carga para gel
gRNA	RNA guía
IPTG	Isopropiltio- β -D-galactósido
kb	Kilobases
kDa	Kilodaltones
LB	Luria Bertani
Mb	Megabases
ME	Miniexón
mRNA	Ácido ribonucleico mensajero
pb	Pares de bases

PCR	Reacción en cadena de la Polimerasa
Poli-A	Cola de poli-Adeninas
PSE	Dominio proximal
RNA	Ácido ribonucleico
rRNA	Ácido ribonucleico ribosomal
RT-PCR	Transcripción reversa asociada a PCR
SIT	Sitio de inicio de la transcripción
SL	Spliced-leader
snRNA	Ácido ribonucleico ribosomal pequeño nuclear
TBE	Tris Borato EDTA
TFs	Factores de Transcripción
tRNA	Ácido ribonucleico de transferencia
UTR	Región no traducida
VSG	Antígenos Variables de Superficie

RESUMEN

Leishmania es un protozoo flagelado perteneciente a la familia Trypanosomatidae. Diversas especies de este género producen un grupo de enfermedades denominadas leishmaniasis, que pueden producir desde lesiones leves en la piel hasta daño muy grave a órganos como bazo e hígado. Estos organismos poseen mecanismos de expresión genética atípicos, tales como la transcripción policistrónica y el *trans*-splicing. En nuestro grupo de trabajo estamos interesados en estudiar los procesos transcripcionales en *Leishmania major* Friedlin, cepa de referencia del proyecto del genoma de *Leishmania*. En particular, estamos interesados en entender la transcripción de la RNA Polimerasa III (Pol III), enzima responsable de sintetizar RNA de transferencia (tRNA), RNA ribosomal (rRNA) 5S y algunos RNAs pequeños nucleares (snRNAs), moléculas esenciales para el crecimiento celular. Un primer paso en el análisis del proceso transcripcional es identificar y caracterizar las subunidades que forman parte de Pol III en *L. major*. En este sentido, Pol III está formada por 17 subunidades en levadura, siendo C128 la segunda subunidad más grande; esta subunidad contiene parte del centro catalítico para polimerizar el RNA. Dado el papel esencial de C128 en la transcripción de Pol III, nuestro interés está dirigido hacia la caracterización de esta subunidad. Asimismo, buscamos lograr un mejor entendimiento de los procesos transcripcionales generales en tripanosomátidos. Para localizar regiones funcionalmente importantes, realizamos una búsqueda exhaustiva de la secuencia de aminoácidos de la segunda subunidad mayor de Pol III en *L. major* y otros organismos. En total, identificamos nueve regiones altamente conservadas en los tripanosomátidos, que corresponden a las regiones previamente reportadas. Las especies que presentan mayor similitud con *L. major* son *T. cruzi* y *T. brucei* (promedio de 89 y 87% de identidad, respectivamente) y la especie con menor similitud es *G. lamblia* (54%). En cuanto a los dominios, el más conservado es el E (76% de identidad) y el menos conservado es el dominio G (39% de identidad). En este trabajo se discute la probable función de los dominios conservados de C128. Las regiones de procesamiento (sitio aceptor del miniexón y región de poliadenilación) del mRNA de C128 fueron localizadas mediante ensayos de RT-PCR. El análisis de tres clonas permitió mapear el sitio aceptor del miniexón (secuencia AG) a 38 bases del codón de inicio del gen. Al comparar la secuencia que flanquea el AG (desde la posición -12 a +5) con una secuencia consenso reportada previamente, se encontró poca similitud. Una región con 13 pirimidinas, presumiblemente necesaria para el *trans*-splicing,

se localizó 46 bases río arriba del sitio aceptor del miniexón. Por otro lado, encontramos que la poliadenilación del RNAm de C128 se da en una región que va de 46 a 136 bases río abajo del codón de término del gen. Adicionalmente, encontramos una región de polipirimidinas (con 13) a 52 bases río arriba del sitio aceptor del miniexón. Para determinar el número de copias del gen de C128 en *L. major* y *L. mexicana*, se llevaron a cabo experimentos tipo Southern-blot. Nuestros resultados mostraron las bandas esperadas, con el tamaño esperado, lo cual corroboró que en el genoma de *L. major* sólo existe una copia del gen de C128. Resultados similares encontramos para *L. mexicana*, aunque el genoma de este parásito aún no ha sido secuenciado en su totalidad, por lo que se desconocía el número de copias de C128 en esta especie. El tamaño y la abundancia del mRNA de C128 de *L. major* y *L. mexicana* fue analizado mediante ensayos tipo Northern-blot en promastigotes en fase de crecimiento media logarítmica y en fase estacionaria. Se determinó que, en ambas especies de *Leishmania*, el mRNA del gen tiene un tamaño de 3.8 kb. Asimismo, no encontramos diferencias significativas en la abundancia relativa del mRNA entre los promastigotes de fase logarítmica y los de fase estacionaria.

INTRODUCCIÓN

1. *Leishmania* y la leishmaniasis

Numerosas especies del género *Leishmania* causan un espectro de enfermedades, conocidas como leishmaniasis, de importancia global debido a su alta mortalidad y a la substancial pérdida económica que producen (Myler *et al.*, 2000). El parásito fue descrito por Cunningham en 1885 y subsecuentemente por Leishman en 1900 y Donovan en 1903 (Handman, 2000). Estos organismos tienen el cuerpo semejante a una hoja, miden de 2 a 5 μm de diámetro, tienen un núcleo, una sola mitocondria (kinetoplasto) y un flagelo, entre otros accesorios y organelos (Kudo y Richard, 1980) (Fig. 1). Estos organismos unicelulares representan una rama temprana en la evolución de los eucariontes (Campbell *et al.*, 2003).

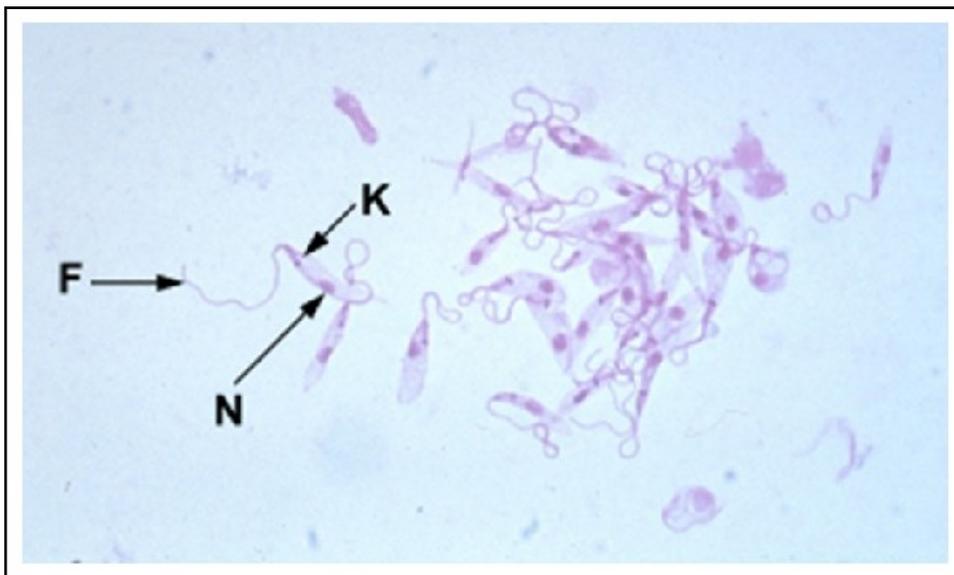


Figura 1. *Leishmania sp.* La fotografía muestra al parásito en forma promastigote. El núcleo (N), flagelo (F) y kinetoplasto (K) se indican con las flechas (TDR, 2004).

Las primeras clasificaciones de *Leishmania* se basaron en diferentes criterios (patrón clínico, distribución y especies de reservorios, entre otros). El desarrollo de técnicas moleculares, bioquímicas e inmunológicas ha conducido a la clasificación precisa de diversas especies y subespecies de *Leishmania*. Sistemáticamente *Leishmania* es un protozoario del Orden Kinetoplastida y de la Familia Trypanosomatidae; en esta última se incluyen nueve géneros, entre los que se incluyen *Trypanosoma*, *Crithidia* y *Leptomonas*. Se han aceptado dos

subgéneros (*Leishmania* y *Viannia*), apoyados por resultados bioquímicos y moleculares. La Figura 2 resume la posición sistemática del parásito. El concepto de “Complejo” no tiene categoría taxonómica, y se usa informalmente para relacionar a los subgéneros (Simpson *et al.*, 2006).

Reino	Protista Haeckel, 1886			
SubReino	Protozoa Golfuss, 1817			
Phylum	Sarcomastigophora Honigberg & Balamuth, 1963			
SubPhylum	Mastogophora Deising, 1866			
Clase	Zoomastigophorea Calkins, 1909			
Orden	Kinetoplastida Honigberg, 1963 emend Vickeman, 1976			
SubOrden	Trypanosomatina Kent, 1880			
Familia	Trypanosomatidae Doflein, 1901, emend Grobden, 1905			
Género	<i>Crithidia</i> <i>Herpetomonas</i> <i>Saureoleishmania</i> <i>Trypanosoma</i> <i>Endotrypanus</i> <i>Leptomonas</i> <u><i>Leishmania</i></u> <i>Phytomonas</i>			
Subgénero	<i>Leishmania</i> (L)		<i>Viannia</i> (V)	
Complejos				
<i>donovani</i>	<i>tropica</i>	<i>mexicana</i>	<i>hertigi</i>	<i>braziliensis</i>
Especies				
<i>L. (L) donovani</i>	<i>L. (L) tropica</i>	<i>L. (L) mexicana</i>	<i>L. (L) hertigi</i>	<i>L. (V) braziliensis</i>
<i>L. (L) infantum</i>	<i>L. (L) aethiopica</i>	<i>L. (L) amazonensis</i>	<i>L. (L) deanei</i>	<i>L. (V) peruviana</i>
<i>L. (L) chagasi</i>	<i>L. (L) major</i>	<i>L. (L) pifanoi</i>		<i>L. (V) panamensis</i>
<i>L. (L) archibaldi</i>	<i>L. (L) gerbilli</i>	<i>L. (L) garhami</i>		<i>L. (V) guyanensis</i>
<i>L. (L) venezuelensis</i>		<i>L. (L) venezuelensis</i>		<i>L. (V) lainsoni</i>
		<i>L. (L) aristedesii</i>		<i>L. (V) shawi</i>
		<i>L. (L) enriettii</i>		<i>L. (V) equatorensis</i>
				<i>L. (V) colombiensis</i>

Figura 2. **Clasificación sistemática del parásito *Leishmania***. El uso del nombre de subgénero no es obligatorio. El término complejo no tiene categoría taxonómica, se usa para mostrar las relaciones a nivel de subgéneros (Gállego, 2004).

1.1 Ciclo Bio-epidemiológico

Todas las especies de *Leishmania* poseen un ciclo de vida similar (Fig. 3), y son transmitidas al hombre por moscas de la arena (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae) (Bates, 2007). En el viejo mundo (África, Asia y Europa) pertenecen al género *Phlebotomus* y en el nuevo mundo (América) a *Lutzomia* (Harwood y James, 1987; Gállego, 2004). De las más de 700

especies descritas de flebotomos (pequeños dípteros de 2 a 3 mm con alas peludas y puntiagudas), alrededor de treinta especies se han inculcado en la transmisión de la enfermedad (TDR, 2004). Ocasionalmente, los mosquitos no están involucrados en la transmisión de la enfermedad, pues puede transmitirse directamente por compartir jeringas, por transfusión sanguínea o por trasplante de órganos infectados.

A lo largo de su ciclo de vida *Leishmania* presenta tres estadios de desarrollo: el amastigote, el promastigote procíclico y el promastigote metacíclico. El paso del parásito al vector tiene lugar cuando las hembras de los flebotomos buscan su alimento: sangre de mamíferos para alimentarse y poder desarrollar sus huevos. Entre los reservorios principales se incluye a los roedores, marsupiales, cánidos y primates (incluido el humano) (Bates, 2007). Los mosquitos se infectan con amastigotes si la víctima es un humano (antroposis) o cualquier otro mamífero (zoonosis) con leishmaniasis. En el tubo digestivo del insecto, los amastigotes se alargan y desarrollan rápidamente el flagelo, constituyendo las formas móviles conocidas como promastigotes procíclicos. Después de sucesivas divisiones binarias, los parásitos migran a la proboscis del insecto, donde se transforman en promastigotes infectantes o metacíclicos (Handman, 2000 ; Murray *et al.*, 2005). Al picar a algún mamífero, el insecto le transmite los promastigotes metacíclicos, los cuales son fagocitados por macrófagos; dentro de éstos, son alojados en fagolisosomas, donde se diferencian a amastigotes. Después de repetidas divisiones, los amastigotes lisan el macrófago, pudiendo entonces infectar otras células (Fig. 3).

1.2 Manifestaciones Clínicas

La Organización Mundial de la Salud (OMS) ha identificado a la leishmaniasis como una enfermedad de categoría 1, es decir, una enfermedad que surge continuamente de manera incontrolada (Murray *et al.*, 2005). En el humano, la leishmaniasis ocurren en tres formas principales: visceral, cutánea y mucocutánea.

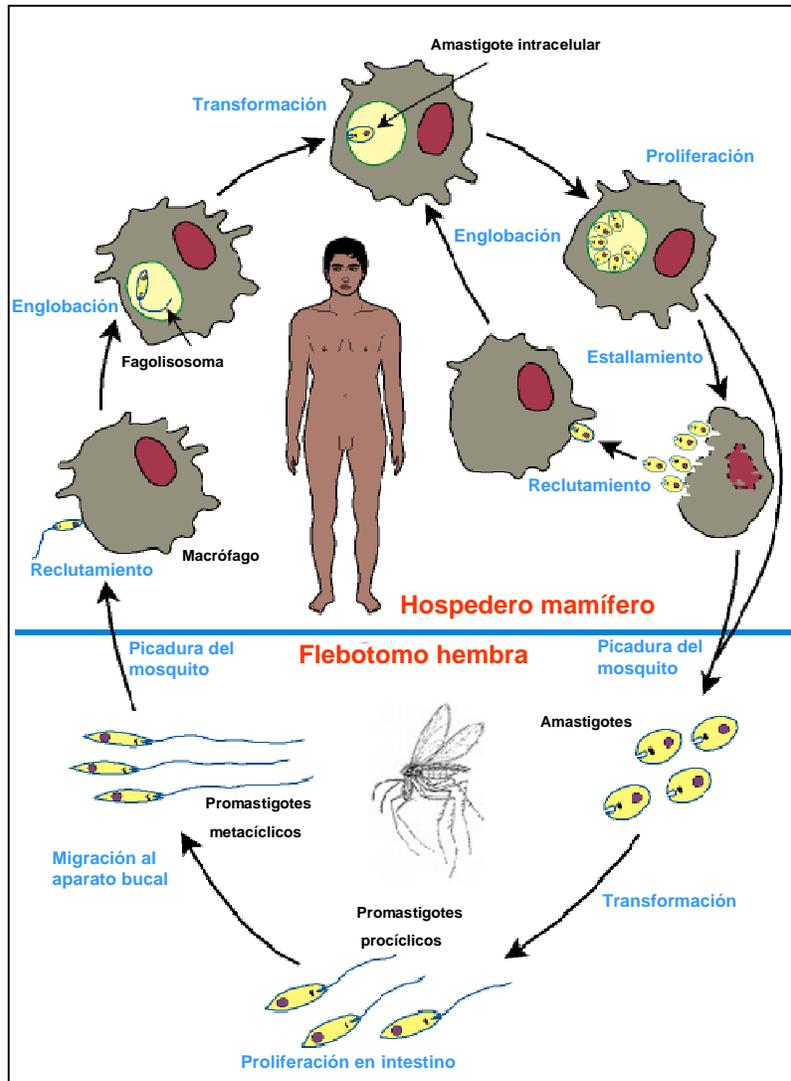


Figura 3. **Ciclo de vida de *Leishmania***. Se indican los tres estadios del parásito y su desarrollo en el hospedero mamífero y el vector (Handman, 2000).

1.2.1 Leishmaniasis visceral

La leishmaniasis visceral, también conocida como Kala-azar, es una enfermedad sistémica y fatal si no es tratada. En ella, el parásito invade los macrófagos de todos los tejidos linfoides del cuerpo, particularmente en la médula ósea. Los órganos más afectados son el hígado y bazo, donde la infección de los macrófagos viene acompañada de un infiltrado de linfocitos y de necrosis. La hepatomegalia y la esplenomegalia son características de la leishmaniasis visceral. Este tipo de leishmaniasis es causada por *L. donovani* en el subcontinente Indio, Asia y África (en adultos y niños) y por *L. infantum* o *L. chagasi* en

regiones del mediterráneo, suroeste y centro de Asia, y sur de América; otras especies (como *L. tropica* en el Medio Oriente, *L. amazonensis* en sur América) son ocasionalmente viscerotrópicas (Zijlstra *et al.*, 2003). La enfermedad visceral particularmente prevalece en Bangladesh, India, Nepal, Sudan y Brasil. Estos países juntos suman un 90% de la leishmaniasis visceral global (TDR, 2004; Desjeux, 2004) (Fig.4 C).

1.2.2 Leishmaniasis cutánea

La forma cutánea es la más común, causando del 50-75% de todos los nuevos casos en pacientes con leishmaniasis (Murray *et al.*, 2005). Presenta un espectro de manifestaciones clínicas caracterizadas por úlceras cutáneas bien definidas o difundidas (según la respuesta inmune del enfermo), en el sitio donde pica el mosquito transmisor y pueden tardar varios meses en cicatrizar. En el viejo mundo la leishmaniasis cutánea generalmente se caracteriza por pápulas y nódulos, mientras que en el nuevo mundo es más común que se presenten úlceras. Más del 90% de los casos de leishmaniasis cutánea ocurren en Afganistán, Argelia, Siria, Arabia Saudita, Brasil, Perú, India y Sudán (juntos suman el 90% de la leishmaniasis cutánea mundial) (Desjeux, 2004). Aunque lejos de ser mortales, las epidemias de la forma cutánea son de difícil control. Se ha asociado principalmente a *L. major*, *L. tropica*, y *L. aethiopica* (en el viejo mundo); *L. infantum* y *L. chagasi* (en el Mediterráneo y regiones del mar Caspio); así como *L. mexicana*, *L. amazonensis*, *L. braziliensis* y *L. peruviana* (en el nuevo mundo) (TDR, 2004; Murray *et al.*, 2005) (Fig. 4 A y B).

1.2.3 Leishmaniasis mucocutánea

Los pacientes con leishmaniasis mucocutánea (puede presentarse seguida de la leishmaniasis cutánea) presentan extensas destrucciones de las membranas mucosas de la cavidad oral, nasal y/o faríngea. Luego de meses o años se observa que las úlceras aparentemente cicatrizan, pero después vuelven a aparecer (Flores *et al.*, 2004; Simpson *et al.*, 2006; Alvar *et al.*, 2006). En el enfermo, las desfiguraciones y mutilaciones producidas en el rostro causan gran sufrimiento de por vida. En el nuevo mundo, las especies responsables de la leishmaniasis mucocutánea son *L. braziliensis*, *L. panamensis* y *L. guyanensis*.

Ocasionalmente, esta enfermedad ha sido reportada en lugares ajenos a México, Centro y Sur de América, generalmente son viajeros y turistas los que llegan a infectarse (Murray *et al.*, 2005) (Fig. 4 D y E).



Figura 4. **Manifestaciones Clínicas de la leishmaniasis.** Se ejemplifican las tres principales enfermedades causadas por el parásito: A y B casos de leishmaniasis cutánea; C leishmaniasis visceral; D y E pacientes con leishmaniasis mucocutánea (Murray *et al.*, 2005).

1.3 Factores de riesgo

Se ha establecido una relación intrínseca entre las manifestaciones clínicas de la enfermedad con diversas propiedades del parásito (expresión de la enfermedad, modo de transmisión –zoonosis o antroponosis- y carga parasitaria), del hospedero (edad, nutrición, respuesta inmunitaria y respuesta a los fármacos) así como propiedades biológicas del vector (Murray *et al.*, 2005). El impacto humano en el ambiente (reducción de la capa de ozono, deforestación, migración masiva de áreas rurales a urbanas y la urbanización), aumenta los riesgos de contraer la leishmaniasis. Estos cambios afectan directamente la composición de las poblaciones de mamíferos y del mosquito. Con la destrucción masiva de

los hábitats, algunas especies de flebotomos se han adaptado a ambientes periodomiciliarios e intradomiciliarios (Bates, 2007; Desjeux, 2001).

En términos generales, se considera que las leishmaniasis son enfermedades endémicas de las regiones tropicales y subtropicales (en América Latina, África, el subcontinente Índico, en algunas áreas alrededor del mar Mediterráneo y en el sur-oeste de Asia) (Fig. 5) (Gállego, 2004; Drummelsmith *et al.*, 2003). Sin embargo, reportes recientes han confirmado la presencia de leishmaniasis visceral en perros en 21 estados en Estados Unidos y en Canadá. En relación a la distribución geográfica de la enfermedad, se asume que existe una íntima relación de la leishmaniasis con la pobreza (excepto por las regiones afectadas de Europa y Norteamérica), pues generalmente sus víctimas están entre las más pobres (Alvar *et al.*, 2006). La malnutrición es un importante factor de riesgo en el desarrollo de la leishmaniasis, además las epidemias prosperan en condiciones de hambre, complejos de emergencia y movimiento de las poblaciones (TDR, 2004). En la India, existe un estigma social asociado con las deformaciones y cicatrices causadas por alguna forma de leishmaniasis, la cual obstaculiza la productividad y desarrollo socioeconómico (Murray *et al.*, 2005).

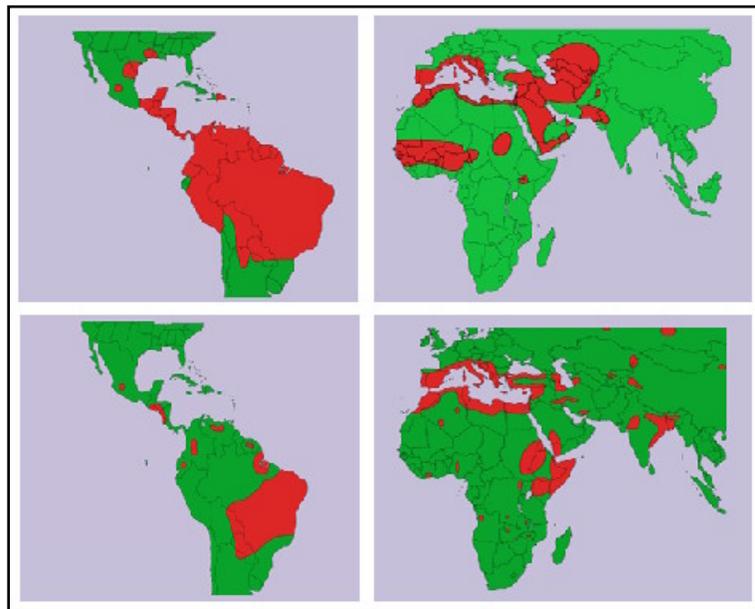


Figura 5. **Distribución geográfica de las leishmaniasis.** Se resaltan en rojo las áreas endémicas de la forma cutánea (paneles superiores) y visceral (paneles inferiores) (<http://www.who.int>).

1.4 Leishmaniasis en cifras

La Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que actualmente hay en el mundo más de 12 millones de niños y adultos que desarrollan los síntomas de la enfermedad en 88 países del mundo, de los cuales 66 se encuentran en el viejo mundo y 22 en el nuevo mundo. Además, se estima que 350 millones de personas están en riesgo de contraer la enfermedad (Desjeux, 2001), y que anualmente dos millones de personas son infectadas (1.5 millones corresponden a la forma cutánea y 0.5 millones a la visceral). Aunque la declaración de la enfermedad es obligatoria solamente en 32 países, existe un substancial número de casos que nunca se registra (TDR, 2004). La leishmaniasis se asocia con 70,000 muertes al año (Murray *et al.*, 2005).

1.5 Avances en leishmaniasis

En los últimos años se han visto progresivos avances en la diagnosis y tratamiento de la enfermedad así como en el control del vector, una clara muestra es la reciente secuenciación del genoma de *Leishmania major* y del mosquito vector *Lutzomyia longipalpis* (Murray *et al.*, 2005). En 1994 la Red del Genoma de *Leishmania*, auspiciada por la OMS, inició el Proyecto del Genoma *Leishmania*, en el que la especie *L. major* MHOM/IL/81/Friedlin (LmjF) fue seleccionada como la cepa de referencia (Myler *et al.*, 2000). El análisis de la secuencia del genoma de *L. major* permitió iniciar nuevos proyectos de investigación.

En nuestro laboratorio estamos interesados en estudiar los mecanismos de expresión genética en este parásito, en particular, nuestro interés está enfocado en el análisis de la transcripción de la RNA polimerasa III (Pol III), la cual sintetiza moléculas de RNA pequeñas que son esenciales para el crecimiento celular (Campbell *et al.*, 2003; Vanhamme y Pays, 1995).

2. Transcripción

2.1 Mecanismo y control de la transcripción

La transcripción es el proceso encargado de la síntesis de una molécula de RNA a partir de la información genética contenida en la cadena codificante de una molécula de DNA. Es decir, da lugar a una copia de RNA a partir de una secuencia molde de una de las hebras del DNA. Este proceso constituye el segundo paso del esquema clásico de transmisión de la información genética.

Se trata de un proceso enzimático catalizado en todos los organismos por una enzima llamada RNA polimerasa. Los organismos eucariontes presentan tres clases de RNA polimerasas, cada una difiere en su localización nuclear, composición de subunidades y sensibilidad a la α -amanitina, pero la diferencia más importante es que cada una de ellas sintetiza distintos tipos de RNA (Lorenzen *et al.*, 2007). La RNA polimerasa I (Pol I) se caracteriza por transcribir el pre-RNA ribosomal (pre-rRNA) 28 S, 18 S y 5.8 S. Por otra parte, la RNA polimerasa II (Pol II) sintetiza productos como RNA mensajeros (mRNA) y la mayoría de los RNA pequeños nucleares (snRNA). Finalmente, la RNA polimerasa III (Pol III) transcribe RNA de transferencia (tRNA), RNA ribosomal 5 S (rRNA 5 S), el RNA 7SL, y el U6 snRNA. La actividad de Pol III (en conjunto con Pol I) se considera fundamental en la transcripción celular; en términos generales, ambas enzimas exceden el 80% de la síntesis total de RNA durante el crecimiento celular (Lee y Van, 1997). Se sabe que la transcripción de Pol I se encuentra localizada en el nucleolo, en cambio, la transcripción de Pol II y Pol III ocurre en el nucleoplasma (Marvin y White, 2000).

2.2 Aparatos de transcripción de la RNA Polimerasa

Además de que cada RNA polimerasa sintetiza diferentes tipos de RNA, emplean distintos complejos transcripcionales específicos para iniciar la transcripción; éstos a su vez reconocen secuencias particulares de DNA, llamadas regiones promotoras (Willis, 1993). Los promotores son regiones del DNA que regulan el inicio de la transcripción de un gen. Existen numerosos tipos de promotores, diferentes para cada clase de genes. En el caso de

Pol III se definen tres clases de promotores (Fig. 6), los cuales se caracterizan porque la mayoría de ellos contienen secuencias localizadas río abajo del sitio de inicio de la transcripción (SIT), dentro del gen mismo. En este sentido, los promotores tipo I están presentes únicamente en los genes del rRNA 5S (Marvin y White, 2000). Este tipo de promotores se caracteriza por contener tres elementos intragénicos, los cuales consisten en una caja A, un Elemento Intermedio y una caja C. Estos elementos abarcan una región de aproximadamente 50 pares de bases (pb) a partir del SIT. Los promotores tipo II generalmente corresponden a los genes de tRNA. Los dominios característicos de este tipo de promotor son la caja A y la caja B (Marvin y White, 2000). La posición de la caja A es generalmente de 10 a 20 pb río abajo del SIT, mientras que la caja B se localiza entre 30 a 60pb río abajo de la caja A. Por último, los promotores tipo III, se caracterizan por que sus dominios residen exclusivamente río arriba del SIT. Este tipo de promotores generalmente se encuentra en el snRNA U6 (Geiduscheck y Kassavetis, 2001) y se distinguen por presentar una caja TATA cerca de la posición -25 y -30, además de un dominio proximal (PSE) de aproximadamente 15 pb, localizado alrededor de la posición -60. Estos dos elementos constituyen un promotor basal que está sujeto a la activación de factores que se unen al dominio distal (DSE) (Willis, 1993; Lewin, 2004) (Fig. 6).

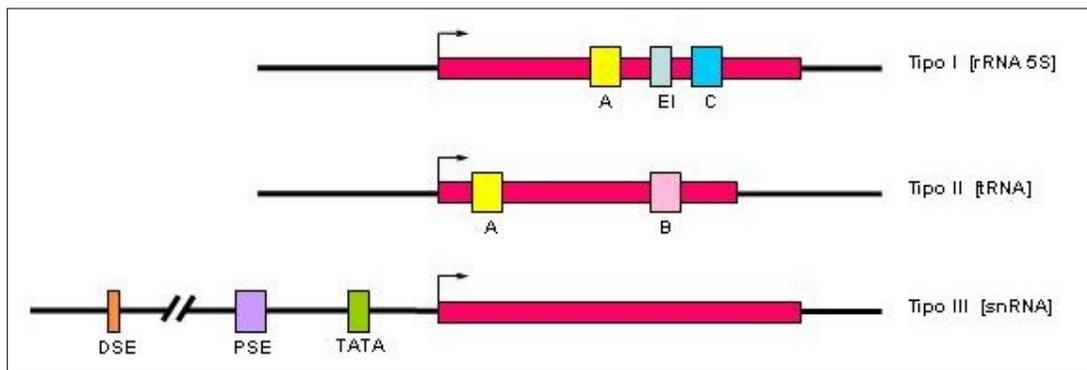


Figura 6. **Organización general de los tres tipos de promotores usados por Pol III.** La figura representa los tres tipos de promotores y a qué tipo de genes corresponden (dentro de los corchetes). Se incluyen los diferentes elementos de cada promotor: las cajas A, B y C; el Elemento Intermedio (EI), el Dominio Proximal (PSE) y el Dominio Distal (DSE). También se indica el SIT (flecha inclinada), así como las regiones que abarcan los genes hasta el sitio de término (banda roja).

Una característica de la transcripción eucariótica es que su regulación se debe a la afinidad específica por los promotores de ciertas proteínas denominadas factores de transcripción

(TF). A cada promotor se puede unir un número variable de factores de transcripción, que actúan favoreciendo o dificultando la unión y la actividad de la RNA Polimerasa, o de otros factores de transcripción. En consecuencia, esto determina la posición y la eficacia del inicio de la transcripción, por tanto, los TFs se encargan de la regulación de la transcripción. Su diversidad es aún mayor que la de los promotores, lo que permite la gran flexibilidad existente en el control de la expresión de los genes. Los factores generales de la transcripción junto con la Polimerasa forman un complejo de preiniciación. En principio, este complejo está involucrado con los tres tipos de Polimerasas (Burley y Kamada, 2002). Los TFs de Pol II son los que han sido más estudiados (Ferrari *et al.*, 2004). En total, son seis TFs generales de Pol II: TFIIA, TFIIB, TFIID (el cual contiene a la proteína que se une a la caja TATA, o TBP), TFIIE, TFIIIF y TFIIH. En el caso de los promotores de Pol I, se requieren principalmente dos TFs: SL1 y UBF (Marvin y White, 2000).

En el caso de Pol III, se han descrito tres factores de transcripción: TFIIB, TFIIC y TFIID. TFIIB se considera como el factor general para la iniciación de la transcripción, pues es requerido por los tres tipos de promotores de Pol III. Cabe mencionar que en la transcripción de tRNA y rRNA 5S, este factor es suficiente para activar el funcionamiento de Pol III (Willis, 1993; Huang y Maraia, 2001), asimismo, para estas dos clases de genes, TFIIB confiere especificidad a la Polimerasa. Estudios realizados en levadura mostraron que este factor consiste en un complejo de tres subunidades: la subunidad B', Brf y TBP (la misma subunidad presente en TFIID y en SL1) (Willis, 1993); TFIIB es un factor específico de los promotores tipo I (del rRNA 5S). En levadura, este factor está constituido por un solo péptido (de 50 kDa) que contiene nueve dedos de zinc organizados en tándem (Marvin y White, 2000). Por último, TFIIC es un factor que es requerido por promotores tipo 1 y tipo 2; en el caso de los tipo 2, TFIIC reconoce directamente las cajas A y B del promotor. Se sabe que este factor es uno de los más grandes y complejos. En levadura TFIIC consiste de seis subunidades (TFC1, 3, 4, 6, 7 y 8) que en conjunto forman un agregado de 520 kDa (Huang y Maraia, 2001).

2.3 RNA polimerasa III

Las RNA polimerasas son moléculas complejas formadas por al menos 12 subunidades; muchas de éstas se comparten entre las tres polimerasas, mientras que otras son exclusivas para cada tipo. Varias de las subunidades son homólogas a las subunidades de las RNA polimerasas de bacterias y arqueobacterias.

Pol III es la más compleja de las RNA polimerasas, pues contiene el mayor número de subunidades: 17 en levadura, comparando con 12 subunidades de Pol II y 14 subunidades de Pol I. Cinco de las 17 subunidades son compartidas con las tres Pols (ABC27, ABC23, ABC14.5, ABC10 α y ABC10 β) (Marvin y White, 2000), dos son compartidas con Pol I (AC19 y AC40) y diez son exclusivas de Pol III (C160, C128, C82, C53, C37, C34, C31, C25, C17 y C11), aunque varias de ellas son homólogas de subunidades de otras polimerasas (Huang y Maraia, 2001). Para Pol III se han definido cinco subunidades primordiales (o “core subunits”): C160, C128, AC40, AC19 y ABC23; éstas son homólogas de las cinco subunidades de la RNA polimerasa de *E. coli*. C160 es la subunidad mayor de Pol III y evolutivamente está relacionada con la subunidad mayor de Pol I y II (A190 y B220, respectivamente). En el caso de las arqueobacterias (Archea) y Bacteria, corresponde con las subunidades mayores α y β' , respectivamente. C128 es la segunda subunidad más grande de Pol III, y se encuentra relacionada con A135 (segunda subunidad de Pol I) y B150 (segunda subunidad de Pol II), así como con B y β en Archea y Bacteria, respectivamente. La tercera subunidad primordial es AC40, relacionada evolutivamente con RPB3 (de Pol II), la subunidad α de bacterias y la subunidad D de Archea. La cuarta subunidad corresponde a AC19, relacionada con RPB11 de Pol II, α de Bacteria y la subunidad L de Archea. Por último, ABC23 está relacionada con ω de Bacteria y la subunidad K de Archea (Geiduscheck y Kassavetis, 2001).

Se entiende que las subunidades exclusivas de Pol III permiten que las propiedades de esta enzima sean específicas, lo que incluye su localización nuclear, la interacción con sus propios aparatos de transcripción, la elongación, terminación y la interacción con las enzimas de procesamiento de RNA (Geiduscheck y Kassavetis, 2001).

Las subunidades de Pol III interactúan como un complejo durante la transcripción. Diversos estudios se han realizado para mapear y analizar los sitios específicos de dichas interacciones. La figura 7 muestra cómo están sobrepuestas las subunidades de Pol III.

La amplia conservación observada entre las secuencias de las dos subunidades mayores de las Polimerasas en Procariontes y Eucariontes está probablemente asociada a la conservación de sus funciones. Experimentos bioquímicos sugieren que estas dos subunidades conforman el centro catalítico de la enzima. Además, la segunda subunidad mayor está probablemente involucrada en la unión al sustrato nucleotídico (Archambault y Friesen, 1993).

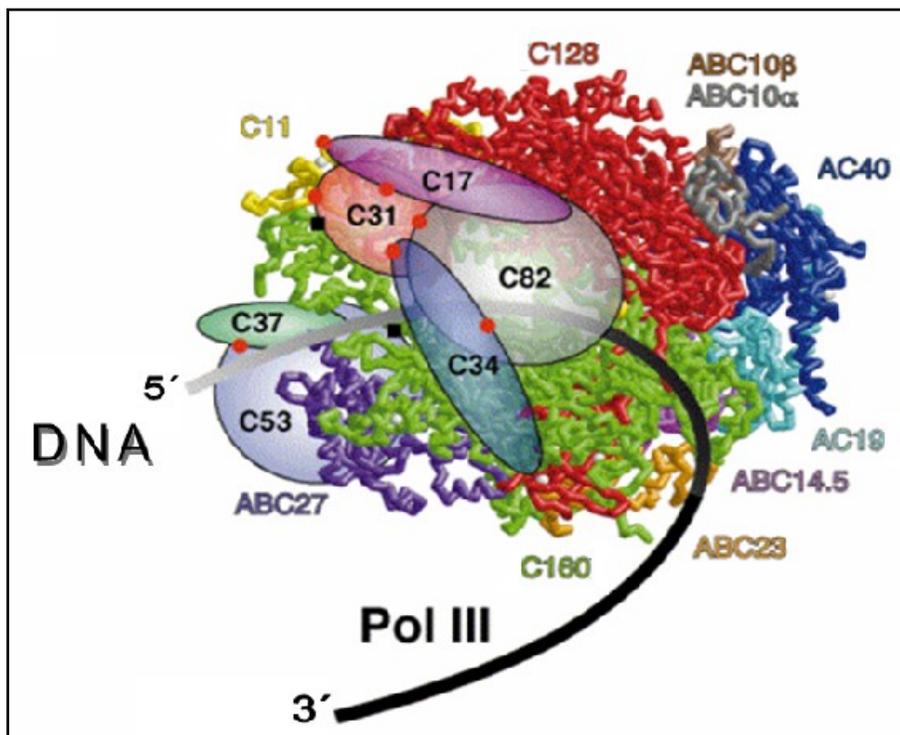


Figura 7. **Modelo de las interacciones entre las subunidades de Pol III en *Saccharomyces cerevisiae*** (adaptado de Geiduschek y Kassavetis, 2001). Se muestran todas las subunidades de Pol III así como también se indica la trayectoria del DNA, río abajo del sitio de unión del complejo de Pol III. El complejo C82, C34, C31 y C17 se recuesta por encima de la polimerasa; C53 y C37 se mantienen recostados detrás de C160 y de C27. Por otro lado C34 y C128 se encuentran unidas, de manera que cruzan el DNA río arriba del promotor. Los puntos rojos y los cuadros negros marcan las interacciones de las subunidades.

2.4 Organización del genoma en *Leishmania*

Leishmania es un organismo diploide y funcionalmente asexual. Sus cromosomas, como en muchos otros protozoarios, no experimentan una condensación detectable durante el ciclo celular. *L. major* tiene un genoma de 34 Mb, organizado en 36 cromosomas. El cromosoma 1 fue el primer cromosoma del parásito secuenciado en su totalidad. El análisis de la secuencia reveló un arreglo sorprendente de los genes: los primeros 29 se localizan en la cadena de abajo (“bottom strand”), mientras que los restantes 50 se localizan en la cadena de arriba (“top strand”) (Myler *et al.*, 2001) (Fig. 8); es decir, los 79 genes del cromosoma se encuentran organizados en dos unidades policistrónicas largas. La región entre los genes 29 y 30 contiene un promotor bi-direccional débil que dirige la transcripción de todo el cromosoma; se ha propuesto que dicha región podría contener también un origen de replicación y/o un centrómero. La posterior secuenciación del cromosoma 3 de *L. major* mostró la presencia de 95 genes organizados en dos unidades policistrónicas. En este caso, las unidades policistrónicas son convergentes, a diferencia de las presentes en el cromosoma 1, que son divergentes.

En el 2005 se finalizó la secuencia del genoma de *L. major*, revelando que la gran mayoría de los 8300 genes identificados se encuentran organizados en unidades policistrónicas en los 36 cromosomas (Fig. 8). Las unidades policistrónicas pueden contener hasta 318 genes (cromosoma 31). Estos grupos pueden tener una organización transcripcional convergente (como es el caso del cromosoma 1), o divergente (en el caso del cromosoma 3). La mayoría de los genes de *L. major* no tiene similitud con genes de otros organismos (excepto otros tripanosomátidos). Es probable que muchos de sus genes tengan funciones parásito-específicas (Myler *et al.*, 1999; Worthey *et al.*, 2003). El contenido de G+C en el genoma de *L. major* es muy alto, cercano al 60%. El cariotipo de *Leishmania* es conservado entre varias especies; las especies del viejo mundo (incluyendo *L. major* y *L. donovani*) tienen 36 cromosomas y las especies del nuevo mundo reportan 35 (*L. braziliensis*) y 34 cromosomas (*L. mexicana*).

Además del DNA nuclear, los tripanosomátidos presentan un DNA mitocondrial muy particular, denominado kinetoplasto (Campbell *et al.*, 2003). Este DNA se encuentra formado por moléculas circulares concatenadas, que forman una compleja red. Las moléculas

pueden ser grandes (maxicírculos, de cerca de 50 kb) o pequeñas (minicírculos, de alrededor de 1 kb). Actualmente se sabe que los minicírculos codifican RNAs pequeños (RNA guía, o gRNA) que participan en el procesamiento o edición de los mRNA mitocondriales. Por otra parte, los maxicírculos codifican RNA que se traduce en proteínas y rRNA. Una propiedad muy inusual de los maxicírculos es que varios de sus genes están aparentemente incompletos, y sus transcritos tienen que sufrir la adición o deleción de uridinas (edición del RNA) para producir mRNA maduros y funcionales (Stuart *et al.*, 2005)

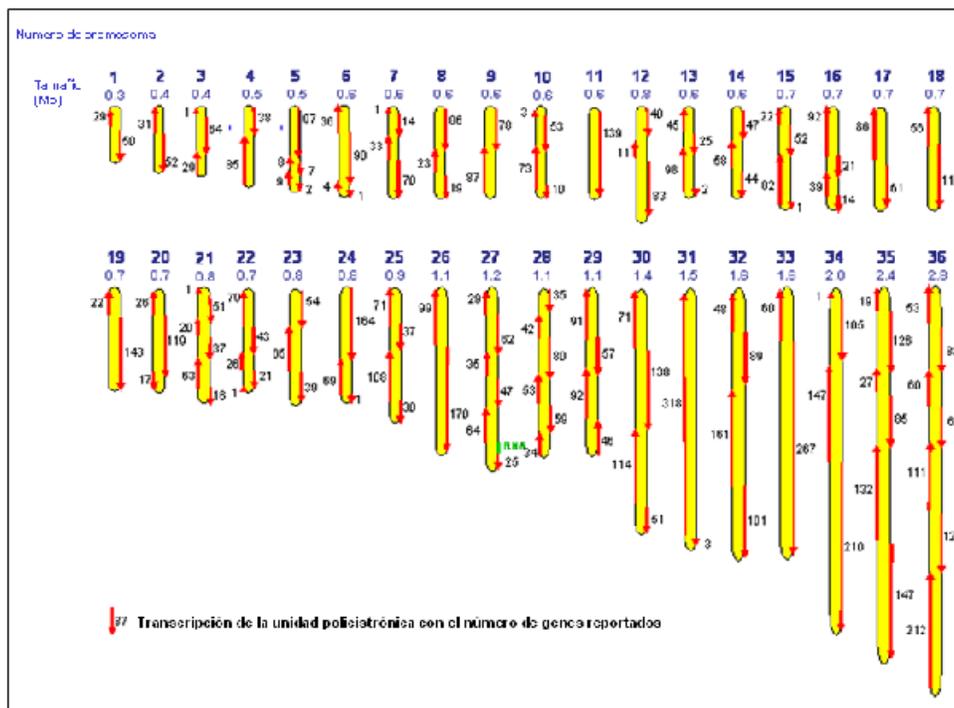


Figura 8. **Los genes de *Leishmania* están organizados en unidades policistrónicas.** Se ejemplifica la interesante organización de los genes en *L. major*. En el cromosoma 1, dos grupos de genes inician la transcripción hacia los telómeros; en el cromosoma 3 la transcripción es divergente. Las flechas indican la dirección de la transcripción y la cantidad de genes de la unidad. (<http://www.tigr.org/>).

2.5 Procesamiento de los mRNA

Leishmania y otros Tripanosomátidos se caracterizan por presentar mecanismos de expresión genética muy poco comunes, entre los cuales se incluyen la transcripción policistrónica y la edición de los transcritos mitocondriales (Fig. 9) (Clayton, 2002; Stuart *et al.*, 1997; Vanhamme y Pays, 1995). Los mRNA maduros son generados, a partir de los

transcritos policistrónicos, por medio del *trans*-splicing y de la poliadenilación (Requena *et al.*, 2003). El *trans*-splicing, o splicing entre dos moléculas, es un evento de procesamiento de RNAs donde participan dos moléculas precursoras independientes (Benz *et al.*, 2005). Hasta la fecha no se han descubierto intrones en los genes que codifican proteínas, aunque el reciente descubrimiento del *cis*-splicing en otros *Trypanosoma brucei* sugiere que también puede ocurrir en los genes de *Leishmania* (Myler *et al.*, 2000). El *trans*-splicing fue descrito originalmente en tripanosomátidos, y después fue encontrado también en nemátodos, tremátodos y *Euglena* (Requena *et al.*, 2003). En estos organismos la reacción intermolecular da como resultado un exón no codificante comúnmente conocido como miniexón (o spliced-leader), secuencia de 39 nt (Parsons *et al.*, 1984) que es específico de cada especie (Goncharov *et al.*, 1998) y altamente conservada en *Leishmania*. En *Leishmania*, los genes del miniexón presentan un arreglo en tándem de aproximadamente 150 copias. La presencia de un cap es requerida en los transcritos maduros en *Leishmania* (como ocurre en los mRNA de otros eucariontes); el cap es proporcionado por el miniexón, al cual es adicionado al ser transcrito dicho RNA. La función precisa del cap en *Leishmania* es aún desconocida, aunque algunos estudios han propuesto que éste le proporciona estabilidad al mRNA durante su exportación para la traducción. El mecanismo del *trans*-splicing comparte diversas características con el *cis*-splicing; la diferencia fundamental es el hecho de que el primero une dos transcritos independientes de RNA, mientras que en el *cis*-splicing se remueven intrones que separan regiones codificadoras presentes en un solo transcrito precursor. Ambos mecanismos de splicing se dan por eventos similares catalizados en un complejo molecular, el esplisosoma. De igual manera, algunas de las secuencias reconocidas en ambos procesos son idénticas entre sí. La localización de los sitios de corte y de unión está determinada por secuencias del mRNA precursor. Aunque estas secuencias no se han analizado de forma exhaustiva, algunos elementos han sido identificados como participantes en el reconocimiento. En *T. brucei*, el control del *trans*-splicing reside en las regiones 5' no traducidas (UTR 5'). Un dinucleótido AG, localizado río arriba del ATG, funciona como sitio aceptor del miniexón. Además, una región rica en pirimidinas, localizada río arriba del dinucleótido AG, juega un papel muy importante en el proceso. En cuanto a la poliadenilación, no se han reportado secuencias consenso. Sin embargo, se sabe que regiones ricas en pirimidinas, localizadas río abajo del sitio de poliadenilación, son necesarias para que se lleve a cabo el procesamiento. Se ha propuesto que los procesos de

trans-splicing y poliadenilación están acoplados, y que una misma región de pirimidinas regula ambos procesos (Palenchar y Bellofatto, 2006).

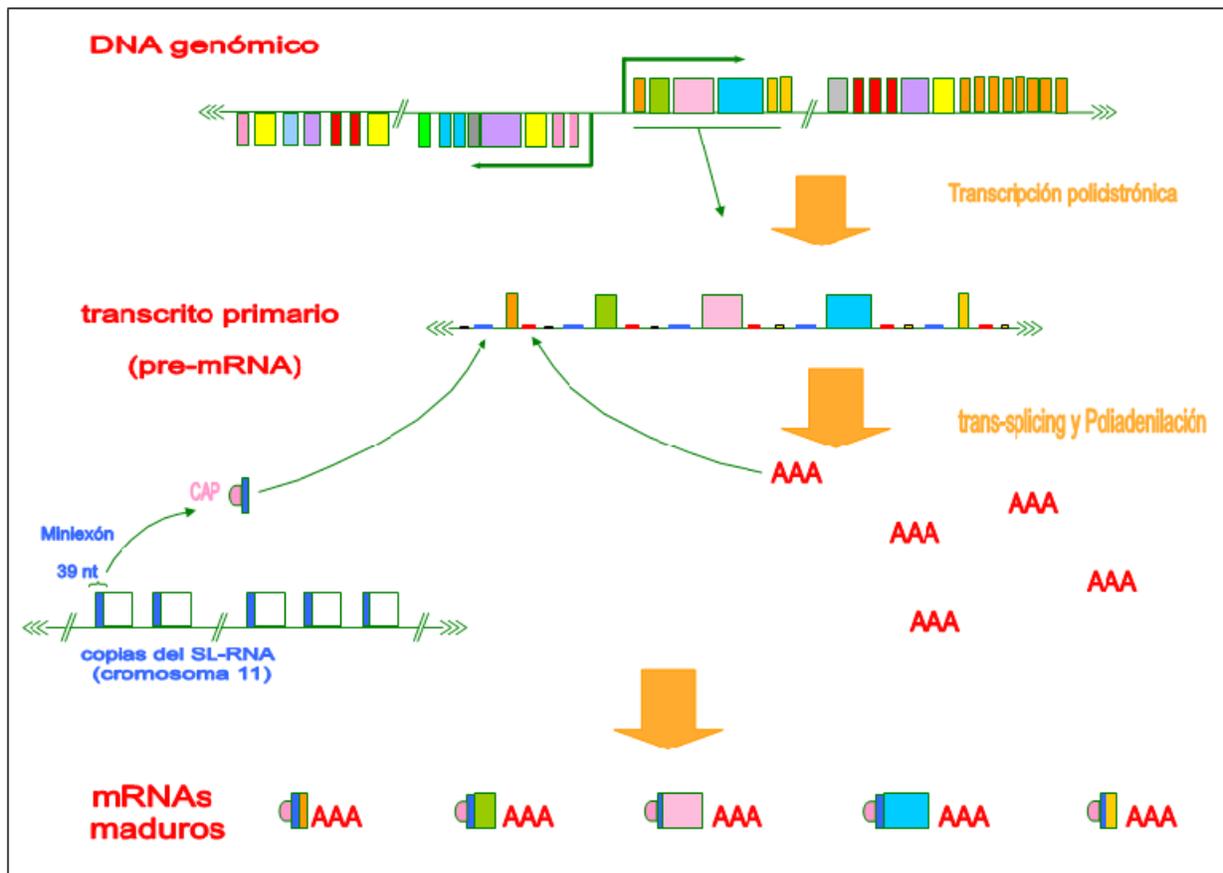


Figura 9. **Procesamiento de los mRNAs en tripanosomátidos.** La figura muestra los genes organizados policistrónicamente. En el transcrito primario se indica el sitio aceptor del Miniexón (secuencia en azul), el sitio de adición de la cola de Poli-A (secuencia en rojo) y el tracto de Polipirimidinas (secuencia en amarillo) dentro de las regiones intergénicas. El producto final son unidades monocistrónicas.

2.6 Promotores en Tripanosomátidos

Muy poco se sabe en los tripanosomátidos acerca de las secuencias que regulan la expresión de los genes. Los únicos promotores que han sido ampliamente caracterizados son los del gen del RNA miniexón (transcrito por Pol II) y los de la unidad del rRNA (transcrito por Pol I). *Leishmania* presenta alrededor de 200 copias del gen del miniexón, organizadas en tándem en una o dos regiones del genoma. Cada gen contiene su propia región promotora, río arriba del gen, y una región de término (justo después del gen). Los

promotores consisten en un elemento bipartito (con un dominio alrededor de la base -60, y otro cerca de la base -30) y un dominio localizado cerca de la región de inicio de la transcripción. Todos los genes del RNA miniexón poseen un tracto de varias Ts río abajo de la región codificadora, que funciona como señal de término de la transcripción (Campbell *et al.*, 2003).

En varias especies de tripanosomátidos ha sido caracterizado el promotor de los genes del rRNA. Los tripanosomátidos presentan una unidad de rRNA muy compleja, en la que el rRNA 28S es procesado extensivamente para generar seis moléculas de rRNA independientes: 24S α , 24S β , S1, S2, S4 y S6. Como en otros eucariontes, el promotor de la unidad de rRNA de *T. brucei* está formado por cuatro dominios. Sin embargo, en varias especies de *Leishmania* que han sido analizadas, el promotor del rRNA es mucho más pequeño y está formado por menos dominios. En *L. donovani*, tres regiones con importancia funcional fueron identificadas: de -69 a -57, de -46 a -27, y de -6 a +4. En *T. brucei*, Pol I no sólo sintetiza el rRNA, sino que tiene la sorprendente capacidad de sintetizar también el mRNA de dos de las proteínas más abundantes del parásito, los antígenos variable de superficie (VSG) y la prociclina (EP/GPEET); estas proteínas cubren la superficie del parásito y son esenciales para el desarrollo en la forma sanguínea y procíclica del parásito, respectivamente (Günzl *et al.*, 2008; Palenchar y Bellofatto, 2006). Los promotores de estos genes han sido muy estudiados. Las regiones promotoras de los genes de prociclinas son muy parecidas a las de los genes del rRNA, pues también están formadas por cuatro dominios. En contraste, los promotores de los genes de VSG consisten de sólo dos elementos que se extienden hasta la posición -67 (Campbell *et al.*, 2003).

En lo que respecta a promotores de genes que codifican proteínas se sabe muy poco. Estudios de run-on nuclear llevados a cabo con fragmentos de DNA de cadena sencilla de prácticamente todo el cromosoma 1 de *L. major* indicaron que la transcripción de todo el cromosoma inicia de manera bidireccional únicamente en la región intergénica que separa las dos unidades policistrónicas (entre los genes 29 y 30) (Martínez-Calvillo *et al.*, 2003). En una región de aproximadamente 100 pb fueron identificados varios sitios de inicio de la transcripción para ambas unidades policistrónicas. Estudios similares llevados a cabo en el cromosoma 3 de *L. major* confirmaron que la transcripción inicia únicamente río arriba del primer gen de una unidad policistrónica (Martínez-Calvillo *et al.*, 2004). Las regiones de

inicio en los cromosomas 1 y 3 de *L. major* no presentan ninguna secuencia común, y carecen de dominios típicos de Pol II, como cajas TATA. Esto sugiere que Pol II en *Leishmania* no requiere reconocer secuencias conservadas para poder iniciar la transcripción.

ANTECEDENTES

1.1 Promotores de Pol III en Tripanosomátidos

En tripanosomátidos, la mayoría de los snRNAs son sintetizados por Pol III, además de los tRNA, el rRNA 5S y el RNA 7SL. En *T. brucei* y *Leptomonas* ya han sido caracterizados los promotores de algunos snRNAs y del RNA 7SL. Estos genes tienen un gen de tRNA contiguo, hacia su extremo 5' y localizado en la cadena opuesta de DNA. Sorprendentemente, las cajas A y B del tRNA vecino son esenciales para la expresión del snRNA y del 7SL RNA. En la mayoría de los casos, se requieren también elementos regulatorios intragénicos del snRNA y del 7SL RNA para lograr un nivel de expresión óptimo. Aunque no es muy claro como las cajas A y B del tRNA promueven la expresión del snRNA, se ha propuesto un modelo de "loop de DNA" en el que los sitios de inicio de la transcripción de los genes de snRNA y del tRNA son aproximados de manera tal que el factor TFIIIB facilita la llegada de Pol III en ambos sitios.

1.2 Subunidades de Pol III en *L. major*

Un estudio *in silico* en *L. major* sugirió que los genes de 11 subunidades de Pol III están presentes en *L. major* (en levadura Pol III tiene 17 subunidades) (Kelly *et al.*, 2005). Posteriormente, la caracterización bioquímica de complejos de Pol III en *L. major*, mediante el método de purificación por afinidad en tándem (TAP-tag), confirmó la presencia de 12 subunidades de Pol III en este organismo. En los complejos purificados se identificaron 12 subunidades de Pol III: C160, C128, C82, C53, C37, C34, C17, AC40, AC19, ABC27, ABC23 y ABC14.5 (Martínez-Calvillo *et al.*, 2007).

1.3 Función de C128 y la importancia de su estudio en *L. major*

De las subunidades de Pol III, C128 es la segunda subunidad más grande. Existe evidencia experimental que indica que C128 y C160 (la subunidad mayor) contienen en conjunto el

centro catalítico para polimerizar RNA, y que están involucradas en inicio, elongación y término de la transcripción; de esta manera Pol III es esencial para el crecimiento celular del parásito (Archambault y Friesen, 1993). Dado el papel esencial de C128 en la transcripción de Pol III, la caracterización del gen de dicha subunidad en *Leishmania* resulta necesaria para tener un mejor entendimiento de los procesos de expresión génica en los protozoarios parásitos de la familia Trypanosomatidae. Este estudio ampliará los conocimientos de la transcripción en este importante organismo patógeno.

OBJETIVOS

1. Objetivo General

Caracterizar molecularmente el gen de la segunda subunidad mayor (C128) de la RNA Polimerasa III del parásito *Leishmania major*.

2. Objetivos Particulares

Buscar probables regiones conservadas en C128 de *L. major* comparando su secuencia nucleotídica y de aminoácidos con secuencias de C128 de otros organismos eucariontes.

Aislar y secuenciar clonas de cDNA para determinar los sitios de procesamiento del mRNA de C128.

Examinar el tamaño y la abundancia de los transcritos de C128 en cultivos de promastigotes de *L. major* y *L. mexicana* en fase media de crecimiento logarítmico y en fase estacionaria.

Confirmar que C128 es un gen de copia única en el genoma de *L. major* y determinar su número de copias en *L. mexicana*.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Cultivo de promastigotes de *Leishmania major*

Promastigotes de *L. major* MHOM/IL/81/Friedlin (LmjF) fueron crecidos a 25°C en medio líquido BM (Infusión de cerebro-corazón 0.25 X, medio M199 0.5X, Hepes 4 mM, Hemina 0.01 mg/ml, Biotina 0.02 %, Biopterina 1.25 µg/ml, Penicilina (100 U/ml)/estreptomicina (1 mg/ml), suplementado con suero bovino fetal al 0.1%, hasta alcanzar la fase media de crecimiento logarítmico.

2. Alineamientos y comparaciones de secuencias

Las secuencias de C128 de *L. major* y de otros organismos (*T. cruzi*, *T. brucei*, *P. falciparum*, *E. histolytica*, *S. cerevisiae*, *H. sapiens*, *G. lamblia*) fueron obtenidas de bases de datos como NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) y GeneDB (<http://www.genedb.org>). Los múltiples alineamientos de las secuencias nucleotídicas y de aminoácidos se llevaron a cabo usando el programa CLUSTALW (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw>). Este programa se basa en la identificación de regiones conservadas en las secuencias. Los resultados obtenidos se procesaron y analizaron en programas del paquete de Microsoft Office.

3. Aislamiento de ácidos nucleicos

3.1 Extracción de RNA total

Se centrifugaron 36.5×10^7 células de promastigotes de *Leishmania* a 2884 x g (centrífuga con refrigerador mod. Z383K, en el rotor 220.78 VO2, Hermle) durante 10 minutos a 4°C (temperatura de todas las centrifugaciones). Posteriormente las células fueron lisadas adicionando 750 µl de reactivo comercial TRIZOL-LS (Invitrogen) pipeteando repetidamente. Las muestras homogenizadas se incubaron durante 5 minutos a temperatura ambiente. Después se adicionaron 1.46 ml de cloroformo y se agitó vigorosamente. La mezcla se

incubó a temperatura ambiente durante 10 minutos para después centrifugarse a 16612 x g durante 15 minutos. Posterior a esta separación (fase acuosa e interfase) el RNA se precipitó con 3.6 ml de alcohol isopropílico para incubarse durante 10 minutos a temperatura ambiente. Este precipitado se centrifugó a 16612 x g, durante 10 minutos y se procedió al lavado del RNA con etanol al 75% (diluido con agua tratada con dietil pirocarbonato -DEPC- al 0.01%, Invitrogen). Por último, el precipitado final se resuspendió en 300 µl de agua libre de RNAsas y se mantuvo a -70°C.

Para determinar la concentración del RNA, se cuantificó en un espectrofotómetro (Life Science Analyser-DNA, Genova) a 260 nm (1 D.O. a 260 nm = 40 µg/ml).

Para eliminar DNA contaminante a las muestras de RNA, se transfirieron 5 µg de RNA total en un tubo eppendorf de 0.6 ml. Se adicionaron 4 µl de buffer 10X de DNasa I, 3 µl de DNasa I (3 Unidades, Invitrogen) y se llevó a un volumen final de 40 µL con agua (tratada con DEPC). Todo se mezcló y se incubó a temperatura ambiente por 15 minutos. Para inactivar a la DNasa I, se adicionaron 2 µl de EDTA 25 mM calentando a 65°C por 10 minutos. Finalmente se precipitó el RNA con 0.1 volúmenes de acetato de sodio 3M, pH 5.0 y 2.5 volúmenes de etanol absoluto, durante toda la noche a -20°C. Al otro día se centrifugó a 19496 x g durante 15 minutos; la pastilla se lavó con 400µl de etanol al 75% y se volvió a centrifugar como el paso anterior. El botón obtenido (RNA total) se resuspendió en 5 µL de agua tratada con DEPC.

3.2 Aislamiento de DNA genómico

Se centrifugaron 3×10^8 células de promastigotes de *Leishmania* a 2884 x g durante 10 minutos a 4°C (temperatura de todas las centrifugaciones), posteriormente la pastilla se resuspendió en una solución de lisis que contiene SSC 0.5 X (NaCl 3 M y citrato de sodio 0.6 M), TNE-Tris (Tris 40 mM, pH 7.6, EDTA 1 mM, pH 8.0 y NaCl 15 M) Sarcosyl 0.5% y 100 µg de proteinasa K. La reacción se mantuvo durante 2 horas a 55°C, posteriormente se adicionaron 0.5 volúmenes de fenol y 0.5 volúmenes de alcohol isoamílico para posteriormente centrifugarse a 1846 x g durante 8 minutos. La fase acuosa se transfirió a

otro tubo falcon de 50 ml, luego se extrajo el DNA con 1 volumen de cloroformo y se agitó vigorosamente en vortex y se centrifugó a 1846 x g durante 8 minutos. Posteriormente se transfirió la fase acuosa a un tubo nuevo y se precipitó con 0.1 volúmenes de acetato de sodio 3 M y 2.5 volúmenes de etanol absoluto a -20°C toda la noche. Al otro día el precipitado se centrifugó a 4153 x g por 15 minutos y se lavó la pastilla con etanol al 70%, para finalmente resuspender el DNA en 400 µl de TE (Tris-HCl 10 mM, pH 7.6 y EDTA 0.2 mM, pH 8.0). La concentración del DNA fue estimada en un espectrofotómetro a 260nm (1 D.O. a 260 nm = 50 µg/ml).

4. Ensayos de RT-PCR

4.1 Síntesis de cDNA

Para sintetizar el cDNA se mezcló en un tubo eppendorf de 1.5 µl lo siguiente: 5 µg de RNA total (tratado con DNasa I, ver sección 3.1), 1 µl de Transcriptasa reversa SuperScript III (200 U/µl, Invitrogen), 1 µl de dNTPs 10 mM, 2 µl de buffer 5X First-Strand, 1 µl de DTT 0.1 M, 1 µl de inhibidor de RNasas (RNasin, Invitrogen), 10 µl de agua DEPC y 1 µl de primer específico 100 mM. Para localizar el sitio aceptor del miniexón se usó el oligonucleótido C128-ME1 (5' -GATGCGAATGTTCTGGTAACG- 3') y para la región de poliadenilación se usó el oligonucleótido Nested(dT) (5' -CCTCTGAAGGTTACGGATCCACATCTAGATTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTNN- 3'). Se mezcló y se incubó durante 45 minutos a 50°C. La reacción se inactivó calentando a 70°C durante 15 minutos.

4.2 Reacción en cadena de la Polimerasa para mapear los sitios de procesamiento

Con el cDNA obtenido para cada región (miniexón y poliadenilación) se realizaron PCRs con oligos específicos. En este sentido, la mezcla de la reacción contenía 2.5 µl de cDNA, 1 µl de dNTPs 10 mM, 3 µl de MgCl₂ 50 mM, 5 µl de buffer 10X, 2.5 µl de REDTaq DNA Polimerasa (1 U/µl, SIGMA), 33.7 µl de agua bidestilada estéril y 1 µl del oligo Miniexón, cuya secuencia

es 5´ -AACGCTATATAAGTATCAGTT- 3´ y 1 µl del oligo C128-ME2 del cual la secuencia es 5´-TTAGCAGAATTCGCTGAAGCT- 3´ (ambos de concentración 10mM). El programa de temperaturas fue de 94°C durante 3 minutos para el primer ciclo; 94°, 54°, y 72°C durante 1 minuto para el segundo ciclo de 33 repeticiones y finalmente a 72°C durante 1 minuto en el termociclador (Palm-Cycler, Corbett Research). Para poliadenilación se realizaron dos reacciones de PCR (reacciones subsecuentes y dependientes una de la otra, pues del primer PCR se obtuvo un segmento que a su vez fue sometido al segundo PCR). Inicialmente, usamos el oligo C128-PA3 (5´ -GATGCTCACTCGCCAGCCAAC- 3´) con el oligo B1 (5´ -CCTCTGAAGGTTACAGAT- 3´). El programa de temperaturas para este primer PCR fue de 94°C durante 3 minutos para el primer ciclo, 94°, 52°, y 72°C durante 1 minutos para el segundo ciclo de 33 repeticiones y finalmente a 72°C durante 1 minuto. En el segundo PCR se usaron los oligos C128-PA1 (5´ -ACTTCTCATCAGCTCCGACAT- 3´) con el oligo B2 (5´ -CACGGATCCACATCTAGAT- 3´). El programa de temperaturas fue de 94°C durante 3 minutos para el primer ciclo, 94°, 50°, y 72°C durante 1 minuto para el segundo ciclo de 33 repeticiones y finalmente a 72°C durante 1 minuto. Para obtener más bandas de distintos tamaños, se realizó otra reacción de PCR con oligonucleótidos diferentes. En el primer PCR se usó el oligo C128-PA3 (5´ -GATGCTCACTCGCCAGCCAAC- 3´) con el oligo B1. El programa de temperaturas fue de 94°C durante 3 minutos para el primer ciclo, 94°, 50°, y 72°C durante 1 minuto para el segundo ciclo de 33 repeticiones y finalmente a 72°C durante 1 minuto. En la segunda reacción se usaron los oligos C128-PA4 (5´ -ATGGAGCGCGACTGCATGGTT- 3´) con el oligo B2, el programa de temperaturas fue de 94°C durante 3 minutos para el primer ciclo, 94°, 52°, y 72°C durante 1 minuto para el segundo ciclo de 33 repeticiones y finalmente a 72°C durante 1 minuto en el termociclador.

4.3 Electroforesis de DNA en gel de agarosa

Para realizar electroforesis de DNA, se prepararon geles de agarosa al 1% (Agarosa D-1 LOE EEO, Pronadisa) en TBE al 1X (Tris base 89 mM, ácido bórico 89 mM y EDTA 2 mM), con bromuro de etidio 0.1 µg/ml. El buffer de corrida también consistió en TBE al 1X. Después de gelificar, se corrieron las muestras de DNA, a las cuales se les adicionó el buffer de muestra (Gel-loading Buffer III 1x, compuesto por azul de bromofenol 0.25%, xileno cyanol

FF 0.25% y Glicerol 30%). El marcador usado fue de 1 kb (1 kb DNA Ladder, de invitrogen). Las corridas se realizaron en una cámara de electroforesis (Gel XL Ultra V-2, Labnet) a 80 volts, hasta que el azul de bromofenol migró tres cuartas partes del gel.

5. Recuperación de DNA de geles de agarosa

5.1 Protocolo para purificar DNA en gel de agarosa usando el kit QIAEX II (QIAGEN).

Con una navaja se cortó el fragmento del gel que contenía la banda de DNA de interés y se colocó en un tubo eppendorf de 1.5 ml. Posteriormente se adicionaron 3 volúmenes de buffer QX1 (remueve agarosa y sales). El QIAEX II (partículas de silica-gel que extraen el DNA) se resuspendió con el agitador eléctrico (Vortex Genie 2, Diagger) y se adicionaron 10 μ l a la muestra, calentando a 50°C durante 10 minutos para disolver la agarosa. La muestra se centrifugó a 15615.6 x g durante 30 segundos en una microcentrífuga (Microcentrífuga 18R, rotor modelo F241.5P, Beckman Coulter) para luego descartar el sobrenadante. La pastilla se resuspendió en 500 μ l buffer QX1 y se centrifugó nuevamente para lavar dos veces con 500 μ l de buffer PE (se usa para remover sales contaminantes). La pastilla se dejó secar y finalmente el DNA se eluyó dos veces con Tris-Cl 10mM, pH 8.5.

6. Ligaciones

Una fracción de los productos de DNA purificado fueron ligados en el vector pGEM-T Easy (de Promega); el mapa del vector y sitios de reconocimiento se muestran en la figura 10. Este vector ha sido utilizado para la clonación directa de productos de PCR y posterior secuenciación; tiene una doble selección de las bacterias transformadas (por la ampicilina y por la incorporación del gen de la β -galactosidasa), lo que permite la selección positiva de las células transformadas. La reacción de ligación incluyó de 2 a 3 μ l de inserto (producto de PCR), 50 ng de vector pGEM-T Easy, 1 μ l de ligasa DNA T4 (3 U/ μ l, Promega) y 5 μ l de buffer Rapid Ligation, en un volumen de 10 μ l ajustando con agua desionizada. Se mezcló

muy bien pipeteando lentamente. Las reacciones se llevaron a cabo a 4°C durante toda la noche.

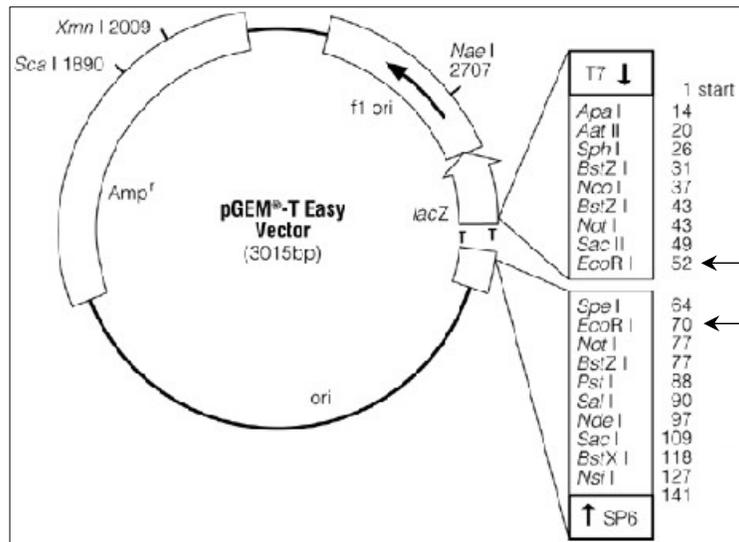


Figura 10. **Mapa del vector pGEM-T Easy.** El vector tiene un tamaño de 3015 pb y el antibiótico de selección la ampicilina. También se indica el sitio de ligación del fragmento (T) y con flechas, los sitios de corte de la enzima *EcoR I*.

7. Preparación y transformación de células competentes de la cepa JM109 de *E. coli*.

La cepa bacteriana *E. coli* JM109 de alta eficiencia ($>10^7$ cfu/mg de DNA, Promega) fue descongelada de -70°C y se transfirieron 50 µl de células a un tubo Falcon de 15 ml con 2 µl de la reacción de ligación. Posteriormente se dio un choque térmico durante 45 segundos en un baño de agua a 42°C, inmediatamente los tubos se mantuvieron en hielo (no más de 2 minutos). Se adicionaron 950 µl de medio SOC (triptona 2%, extracto de levadura 0.5%, NaCl 1%, KCl 2.4 mM, Mg² 1% y Glucosa 2%) y se mantuvo durante una hora y media a 37°C en agitación constante en una incubadora (MaxQ5000, Barnstead Lab-line). De las células crecidas, 1.5 ml fueron centrifugados a 13305 x g por 30 segundos. La pastilla fue resuspendida en 100 µl y sembrada en placas de medio LB (Peptona de caseína 1%, extracto de levadura 0.5% y NaCl 0.5%, ajustando a pH 7.5) con ampicilina (0.01%), IPTG (100mM) y X-Gal (50 mg/ml) usando un asa triangular. Las células se dejaron crecer toda la noche a 37°C.

8. Purificación de plásmidos en pequeña escala

8.1 Protocolo QIAprep spin miniprep (de QIAGEN) para purificar DNA de plásmido de *E. coli* en medio LB

Se seleccionaron las colonias bacterianas transformadas que incorporaron el vector y se inocularon en medio LB con ampicilina, dejando los cultivos toda la noche a 37°C en agitación constante. Al siguiente día se transfirieron 1.5ml del cultivo en un tubo eppendorf de 1.5 ml y se centrifugó a 15615.6 x g durante 30 segundos. Posteriormente, se resuspendió el botón celular en 250 µl de buffer P1, con el fin de lisar las células. Después se adicionaron 250 µl de buffer P2 (buffer de disolución) y se mezcló invirtiendo los tubos. Posterior a la reacción de lisis, se adicionaron 350 µl de buffer N3 (buffer de neutralización) y se mezcló invirtiendo y se centrifugó por 10 minutos a 15615.6 x g. El sobrenadante se decantó en las columnas de centrifugación QIAprep y nuevamente se centrifugó, descartando el sobrenadante. Se realizó un primer lavado con 0.5 ml de buffer PB (remueve eficientemente endonucleasas) y después un segundo lavado con 0.75 ml de buffer PE (para remover sales) centrifugando a máxima velocidad por 30 segundos. Las columnas fueron transferidas a un tubo eppendorf nuevo de 1.5 ml y se eluyó el DNA adicionando 50 µl de buffer EB (10 mM Tris-Cl, pH 8.5) y finalmente se centrifugó durante un minuto. Las preparaciones de plásmido se almacenaron a -20°C.

8.2 Digestión de plásmidos

Para verificar la calidad de los minipreps purificados, se realizaron digestiones con la enzima *EcoR* I (Invitrogen). La reacción incluyó 5 µl de DNA plasmídico, 2µl de buffer React 3 (10X), 1 µl de la enzima *EcoR* I (10 U/µl) llevándose a un volumen final de 10 µl con agua desionizada, se mezcló lentamente y se incubó a 37°C durante 5 horas (los sitios de corte se señalan en la figura 10). Finalmente se corrió un gel de agarosa al 1% (ver condiciones en la sección 4.3) para visualizar las bandas de DNA en el transiluminador de luz ultravioleta (TFX-35, Life Technologies).

9. Experimento tipo Southern

9.1 Síntesis y radiomarcaje de la sonda para los experimentos tipo Southern

9.2 PCR para la síntesis de la sonda radiactiva

Se aisló gDNA de *Leishmania* bajo las mismas condiciones que se indican en la sección 3.2. Se realizó una alícuota de gDNA de concentración final 100 ng en 150 µl de TE. En un tubo de PCR, el DNA se mezcló con 1 µl de dNTPs 10 mM, 3 µl de MgCl₂ 50 mM, 5 µl de buffer 10X, 2.5 µl de REDTaq DNA Polimerasa (1 U/µl, SIGMA), 1 µl del cada oligo usado para amplificar una región específica de la secuencia del gen de C128. En este sentido la secuencia de los oligos fue C128-1-5' (5' -AACAAGCGATTTCGAGACAACCG- 3') y C128-2-3' (5' -ATTTCGATTTCGTTTACGTCCACG- 3'). El programa de temperaturas en el termociclador fue de 94°C durante 3 minutos para el primer ciclo, 94°C, 58°C, y 72°C durante 1 minuto para el segundo ciclo de 30 repeticiones y finalmente a 72°C durante 1 minuto.

9.3 Desalación de DNA en soluciones acuosas

9.3.1 Protocolo para desalar y concentrar fragmentos de DNA en soluciones acuosas usando el kit QIAEX II (de QIAGEN).

En un tubo eppendorf de 1.5 ml se transfirieron 30 µl del producto amplificado por PCR y se adicionaron 3 volúmenes de buffer QX1. Posteriormente se agregaron 10 µl de QIAEX II previamente resuspendido, incubando durante 10 minutos y mezclando vigorosamente por vortex cada 2 minutos. La muestra se centrifugó a 15615.6 x g para después descartar el sobrenadante y adicionar 500 µl de buffer PE, este paso se realizó dos veces. Nuevamente se descartó el sobrenadante y se dejó secar la pastilla para posteriormente eludir dos veces el DNA adicionando 20 µl de Tris-Cl 10mM, pH 8.5 y resuspendiendo vigorosamente. La mezcla se centrifugó a máxima velocidad por 30 segundos y el sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo eppendorf de 1.5 ml. Para visualizar la calidad de la desalación se corrió una fracción del DNA en un gel de agarosa al 1% y se obtuvo la imagen en el fotodocumentador.

9.4 Marcaje radioactivo de DNA

Se adicionaron 25 ng de DNA (miniprep correspondiente a un fragmento de C128) en un tubo eppendorf de 1.5 ml, llevando la mezcla a un volumen final de 11 μ l con agua desionizada. Se desnaturalizó el DNA, calentando a punto de ebullición por 10 minutos y colocando inmediatamente en hielo. Después se adicionaron 4 μ l de High Prime (Roche) y 5 μ l de dCTP (α -³²P), procurando mezclar y centrifugar la muestra brevemente en una microcentrífuga. La mezcla se incubó por 10 minutos a 37°C; para detener la reacción se adicionaron 2 μ l de EDTA 0.2M, pH 8.0.

9.5 Cromatografía con columnas de sefadex G-50

Para remover la radioactividad no incorporada al DNA, se ajustó la mezcla en un volumen de 30 μ l con buffer STE 150 mM, pH 8.0 (NaCl 150mM diluido en 50 ml de TE). Para preparar las micro-columnas ProbeQuant G-50 (ProbeQuant G-50, GE Healthcare), se desprendió el broche inferior de la columna y se colocó en un tubo de microcentrífuga de 1.5 ml. Se centrifugó la columna durante 1 minuto a 735 x g. Posteriormente se transfirieron los 30 μ l de sonda radiactiva y nuevamente se centrifugaron las columnas a 735 x g durante 2 minutos para colectar la muestra en el fondo del tubo. El tubo con la sonda se almacenó a -20° C y se cuantificó 1 μ l de la sonda en un contador de centelleo (Wallac 1450 MicroBeta, Perkin Elmer).

9.6 Transferencia por capilaridad de DNA a los filtros

En principio, 5 μ g de DNA genómico de *L. major* fue digerido con seis enzimas de restricción diferentes: *Apa* I, *Eco* RV, *Hind* III, *Nco* I, *Sac* I y *Spe* I. Los fragmentos obtenidos fueron fraccionados por electroforesis en un gel de agarosa al 0.8% con bromuro de etidio (0.1 μ g/ml) junto con el marcador de peso molecular (marcador 1 kb de Invitrogen) en TBE 1x. Al término de la corrida se fotografió el gel con una regla fosforescente para verificar que la corrida y las digestiones fueran de calidad. Para iniciar la transferencia del DNA fue

necesario enjuagar el gel dos veces con agua desionizada, agitando suavemente. Después se trató el gel con tres soluciones: 10 minutos en una solución despurinizante (HCl 10%), luego 50 minutos en una solución desnaturizadora (NaCl 1.5 M y NaOH 0.5 M). Al término de esta se enjuagó dos veces con agua desionizada. Finalmente el gel se sumergió en una neutralizante (NaCl 1.5 M y Tris Base 0.5 M, pH 7.0) durante 30 minutos. Todas las inmersiones se realizaron con agitación constante y a temperatura ambiente. En un recipiente de cristal se colocó un cristal forrado con dos capas de papel filtro whatman. Se adicionó solución de transferencia (SSC 10 X) para humedecer el papel y colocar sobre este el gel de manera invertida. En la parte superior del gel se colocó una membrana de Hybond-XL (Amersham Hybond-XL, GE Healthcare), procurando cubrir con parafilm el papel whatman que no queda en contacto con el gel. Encima de la membrana se colocaron dos capas de papel whatman, sobre éstas una cama de varios folios de papel secante, otro cristal y el peso. La transferencia de DNA se realizó por capilaridad durante 24 hrs en solución de transferencia SSC 10 X. Después se desmontó la cama y el DNA se fijó con radiación UV mediante el Stratalinker (Stratalinker mod. 1800, STRATAGENE). Para verificar la calidad de la transferencia se sometió el gel en un baño de bromuro de etidio (de concentración 0.5 µg/ml) durante 5 minutos y se fotografió en el analizador de imágenes.

9.7 Prehibridación e hibridación

La membrana se colocó en una botella del horno de hibridación de 16 cm de largo (Hybaid Sake'n'stack, Thermo Electron). Posteriormente se realizó la prehibridación transfiriendo 20 ml de solución de hibridación (Formamida 50%, SSC 5 X, SDS 0.2% y solución Denharts 4 X; esta última consiste de Ficoll 400 0.08%, PVP-40 0.08% y albúmina sérica bovina 0.08%) en la botella durante 2 horas a 42°C en el horno de hibridación. Después se eliminaron 5 ml de la solución de la hibridación y a ésta se adicionó la sonda radioactiva previamente desnaturizada (se colocaron 5×10^6 cpm de la sonda, llevando a un volumen final de 100 µl con TE, se cerró el tubo y se colocó en agua a punto de ebullición durante 10 minutos. Después se colocó inmediatamente en hielo por un par de minutos y se centrifugó brevemente). Se dejó hibridar por 12 a 24 horas a 42°C.

9.8 Lavado de filtros radioactivos

Los filtros se lavaron por 3 minutos a temperatura ambiente en SSC 2X y SDS 0.1%. Después se repitió este lavado durante 30 minutos a 65°C. Dos últimos lavados se realizaron con SSC 0.1 X y SDS 0.1% a 65°C por 30 minutos. Finalmente se secó la membrana sobre papel filtro whatman y se envolvió en plástico adherente transparente.

Para obtener la autorradiografía, los filtros fueron expuestos en una placa de rayos X (BioMax MS, Kodak) durante 24 horas. Posteriormente se retiraron los filtros, las placas se revelaron en 500 ml de líquido revelador (GBX, Kodak), se enjuagaron con agua y se fijaron en 500 ml de líquido fijador (GBX, Kodak). Estos métodos se realizaron en el cuarto oscuro y las placas se almacenaron a -20°C.

10. Experimento tipo Northern.

Inicialmente se extrajo RNA total de *L. major* y *L. mexicana* (en fase de crecimiento media logarítmica y estacionaria) con las mismas condiciones que se indican en el apartado 3.1.1. Después se precipitaron 12 µg de RNA (con acetato de sodio y etanol) y se resuspendió en 2 µl de agua tratada con DEPC.

10.1 Electroforesis de RNA en gel desnaturizante

Inicialmente 12 µg de RNA fueron precipitados (con acetato 0.1 volúmenes de acetato de sodio y 2.5 vol. de etanol absoluto) y resuspendidos en 2 µl de agua tratada con DEPC. Para preparar el gel desnaturizante de agarosa al 1%, fueron disueltos agarosa de rutina (SIGMA), Buffer Mops/EDTA 10 X pH 7.0 (Mops 0.5 M, EDTA 0.01 M), formaldehído al 37% y agua tratada con DEPC. En cuanto al RNA, se le adicionó buffer A (buffer Mops/EDTA 10X pH 7.0 y tratada con DEPC), Formaldehído/Formamida (Formaldehído al 37%, 12.3 M y Formamida desionizada) y Gel Loading Buffer (GLB). El marcador de corrida fue de 10 kb (RNA Ladder 10 kb, de Invitrogen). La corrida se realizó a 80 volts, hasta que el azul de

bromofenol migró tres cuartas partes del gel. Finalmente, el gel se sumergió en una solución de 300 ml de Bromuro de etidio (de SIGMA) con una concentración de 0.5 $\mu\text{g/ml}$ por 5 minutos y se fotografió en un analizador de imágenes (FLA-5000, de FUJIFILM).

10.2 Transferencia por capilaridad de RNA a los filtros

El RNA fue fraccionado por electroforesis en un gel desnaturalizante de agarosa al 1.2%. En cuanto a las condiciones de la corrida, se usó agarosa de rutina (de SIGMA), Buffer Mops/EDTA 10 X, pH 7.0, formaldehído al 37% y agua tratada con DEPC. Al RNA se le adicionaron 4 μl de buffer A (buffer MOPS/EDTA 4.2 X pH 7.0, Formaldehído 10%/Formamida 73%, y 11.6 μl de Gel Loading Buffer (2 μl de formaldehído 37%, 5 μl de formamida y 7 μl de colorantes; para preparar los colorantes se agregaron 400mg de sacarosa, 5 mg de xilen-cianol y 5 mg de azul de bromofenol en 322 μl buffer A). El marcador usado fue de 10 kb y la corrida se realizó a 80 volts en una cámara de electroforesis para RNA (EC250-90, Thermo). Al término de la corrida se separaron los marcadores de RNA para después teñir en bromuro de etidio y fotografiar junto con una regla fosforescente. El resto del gel se trató en solución SSC 10X (Cloruro de sodio y citrato de sodio, pH 7.0) y agua bidestilada estéril. Posteriormente, se montó la cama de transferencia consistente en papel filtro Whatman, la membrana de Hybond, el gel y varios folios de papel secante. La transferencia de RNA (por capilaridad) se realizó por 24 hrs en solución de transferencia SSC 10 X. Después se desmontó la cama y los filtros fueron secados a temperatura ambiente. El RNA se fijó con radiación UV mediante el Stratalinker. Para verificar la calidad de la transferencia se sometió el gel en un baño de Bromuro de etidio (de concentración 0.5 $\mu\text{g/ml}$) por 5 minutos y se fotografió en el analizador de imágenes. La hibridación y lavado de filtros se realizó como se indica en los apartados 9.7 y 9.8. Finalmente se obtuvo la autorradiografía mediante la exposición en placas de rayos X.

RESULTADOS

1. Comparaciones de las secuencias de C128 en diferentes especies

El gen de la subunidad C128 de Pol III en *L. major* está localizado en el cromosoma 20, siendo su nombre oficial LmjF20.0010. El gen tiene un tamaño de 3399 pb, lo que predice una proteína de 1132 aminoácidos (aa) y 126.8 kDa (Fig. 11). Ha sido ya reportada la presencia de regiones conservadas en la secuencia de aa de la subunidad C128 de Pol III entre diferentes especies. Con el objeto de determinar si en la subunidad C128 de *L. major* y en otros tripanosomátidos también se presentan las regiones conservadas, se llevaron a cabo alineamientos con el programa CLUSTAL W. Para ello se realizaron búsquedas, en diferentes bases de datos, de la secuencia de aa de C128 de *T. cruzi*, *T. brucei*, *P. falciparum*, *E. histolitica*, *S. cerevisiae*, *H. sapiens*, *G. lamblia* y *L. major*. El tamaño de la proteína es similar en la mayoría de las especies (entre 1119 y 1149 aa); siendo mayor en *Giardia lamblia* (1238 aa) y en *P. falciparum* (1450 aa).

1	MVTGAHAMSD	FGDEYQRKKL	EMLPALMGMR	GILNHHIASF	DHLIEVELQR	ILLNESNVEI	
121	KSTVDPDFVI	RYQNIRICRP	QEIVGKGHIP	KLVT POECRI	RDMTYRGDMI	VDVQYTSRDR	A
181	SRAMLVEKDV	KIGTIPIMLK	SKCCNLYRKT	REELVNMREC	PLDPPGGYFII	KGVEKVCLVQ	B
241	EQQSKNRVII	EADDEHGNISA	HVQSKTHYSI	SKCAVTFKKG	SIVLTHRSFT	EDIPIIVVLK	
301	ALGLENQHI	TQCIGTLPEF	QKILFPCFEE	ARLLNVVTQN	DALQYIGEKR	KETVWEAEET	
361	QQRQVNRSKA	DKAAEFLANV	LLCHIREAQV	QKDNVFRHKA	FYVCFMVRGM	IEAS FDTSLI	C
421	DERDFYGNKR	F ETTGTLMAL	LFEDLLKQFN	RVVKTAMDQQ	LSRKDSTRPF	NVKQLMESKM	
481	EVIQNGMRMA	ISSGRWDLKR	FNMNROGITQ	VLSRLSYIAS	LGMTRLASS	FEKTRKVSQP	
541	RSLOPSQWGM	VCPCDTPEGE	SCGLVKNFAT	LS QVTLDLND	NYVRAAAHAL	GVEEIDTVTP	D
601	TDFLHYCTVF	LNGTLIGIHR	YPNRLCAGIR	TLRRSGRLHP	HVSISTQPRQ	RTVQIGSDGG	
661	RIVRLIIIVR	DGKPAVTSAH	LDRLRDLCT	HNDFLAEGLT	EYVDVNESND	CLIAVYPADI	
721	GPYTTHEVE	PLS LLGVVAG	IIPYPHHNQS	AR NTFQSAMG	KQALGTVALN	QYIRADTVLL	E
781	LGAYPQRPLC	RTKAMSLTHY	E K LGAGINAM	VCVMSYSGYD	IEDAQVYNKS	SLDRGYGRCV	F
841	VLRKHEVDLE	KYAGGEFDVI	LPPEKNSG TG	KFKALNPDGV	AGKGALVQOY	DVLVNKFTFV	G
901	AGGDPRPAPL	VYKYPQPAVV	DHVIISPFGD	YDRSLDVD QK	IKVVTREVRP	PEPGDKFSSR	H
961	HGQKGVVGLI	VNGVDMPFNE	RGMCPDMIMN	PHGFPSRMTV	GKLLLELVCSK	AAALRG ^{SMGD}	
1021	GTAFFGESAD	SISQQLLSFG	YN YHGKDVFY	SGITGELMQG	YVFFGPIYYQ	RLKHMVTDKM	I
1141	HARSTGPRSM	LTRQPTGRS	RSGGLRVGEM	ERDCMVG YGA	SNLLNERLLI	SSD ^{MFTADIC}	
1201	HVCGNLGYNN	RCTYCKTKGT	TSKVNMPYAF	KLLIQELQGM	GVSLRLTMS	PT	

Figura 11. Secuencia de aminoácidos de la subunidad C128 de Pol III de *L. major*. Las nueve regiones conservadas (A-I) se resaltan en recuadros y con negritas.

Todas estas secuencias fueron comparadas con la de *L. major*, encontrándose las nueve regiones conservadas (A-I) previamente reportadas (Hu *et al*, 2002). Diversos estudios han demostrado que las nueve regiones conservadas en Pol III cumplen funciones importantes para la polimerasa (Sepehri y Hernandez,1997; Cramer *et al*, 2001). En la Fig. 11 se muestran las 9 regiones conservadas en la secuencia de aa de C160 de *L. major*, mientras que en la Fig. 12 se muestra el alineamiento de todas las secuencias. La región conservada más grande corresponde a la región I, la cual está conformada por 92 pb, seguida de la región H con 78 pb. Las regiones B y C son las más cortas, pues tienen un tamaño de sólo 17 pb. El resto de las regiones varían entre 19 y 36 pb.

Obtenidas las comparaciones de las secuencias, se determinó el porcentaje de identidad entre las regiones conservadas de *L. major* y los otros organismos (Tabla 1). Las especies que conservan mayor identidad con *L. major* corresponden a *T. cruzi* y *T. brucei* (88 y 87% en promedio, respectivamente). Esta similitud está asociada a la cercana relación evolutiva entre estas especies. Por otro lado encontramos que la especie con menor similitud es *G. lamblia* (54% de identidad). Esta similitud es incluso menor a la que presentan *H. sapiens* y *S. cerevisiae* con *L. major* (67 y 64% de identidad, respectivamente). En cuanto a los dominios, en promedio el más conservado es el E (84% de identidad) y el menos conservado es el dominio G (43% de identidad).

Tabla 1. **Porcentajes de identidad en la secuencia de aminoácidos de las regiones conservadas de C128 entre *L. major* y otros organismos eucariontes.** La última columna y la última fila presentan los promedios de identidad para cada organismo y para cada región, respectivamente. Los números sombreados corresponden a los de mayor y menor identidad.

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	
<i>T. cruzi</i>	78 %	100%	88 %	93 %	94 %	94 %	67 %	84 %	93 %	88%
<i>T. brucei</i>	75 %	100%	88 %	96 %	94 %	94 %	61 %	87 %	90 %	87%
<i>S. cerevisiae</i>	60 %	76 %	41 %	68 %	78 %	77 %	32 %	66 %	76 %	64%
<i>H. sapiens</i>	56 %	82 %	56 %	78 %	84 %	77 %	35 %	67 %	72 %	67%
<i>P. falciparum</i>	48 %	70 %	41 %	78 %	78 %	72 %	41 %	73 %	66 %	63%
<i>E. histolytica</i>	48 %	76 %	52 %	84 %	84 %	77 %	42 %	70 %	70 %	67%
<i>G. lamblia</i>	37 %	58 %	35 %	56 %	78 %	61 %	25 %	66 %	67 %	54%
	57%	80%	57%	79%	84%	79%	43%	73%	76%	

Figura 12. **Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de C128 entre diferentes organismos.** Las secuencias corresponden a *T. cruzi* (Tc), *T. brucei* (Tb), *P. falciparum* (Pf), *E. histolytica* (Eh), *S. cerevisiae* (Sc), *H. sapiens* (Hs), *G. lamblia* (Gl) y *L. major* (Lm). Los recuadros corresponden a las nueve regiones conservadas (A-I). (*) indica que los aminoácidos son idénticos en todas la secuencias. (:) indica que se han observado sustituciones conservadas. (.) significa que se han observado sustituciones semiconservadas.

Las secuencias nucleotídicas de C128 en los tres Tripanosomátidos (*T. brucei*, *T. cruzi* y *L. major*) y humano fueron alineadas para determinar su grado de conservación. La identidad entre *L. major* y *T. brucei* es del 68%, mientras que entre *L. major* y *T. cruzi* es del 70%. Por otra parte, el porcentaje de identidad entre *L. major* y *H. sapiens* es 54% (Fig. 13). Entre los tripanosomátidos, la similitud en la secuencia se presenta a lo largo de todo el gen, pero es mayor en las regiones conservadas A-H. En la Fig. 13 se muestra el alineamiento de sólo una parte de los genes, en la que están contenidas las regiones conservadas A, B, C y D. El resto del gen presenta una conservación similar (datos no mostrados).

2. Caracterización de los sitios de procesamiento del mRNA de C128

2.1 Extracción del RNA total y cuantificación

Con el objeto de identificar el sitio aceptor del miniexón y la región de poliadenilación de C128 se realizaron ensayos de RT-PCR. Como paso inicial, se extrajo RNA total de promastigotes de *L. major*. El análisis de 3µg del RNA aislado en un gel desnaturizante de agarosa (Fig. 14) indicó que el RNA era de buena calidad, lo cual permitió continuar con los ensayos de RT-PCR.

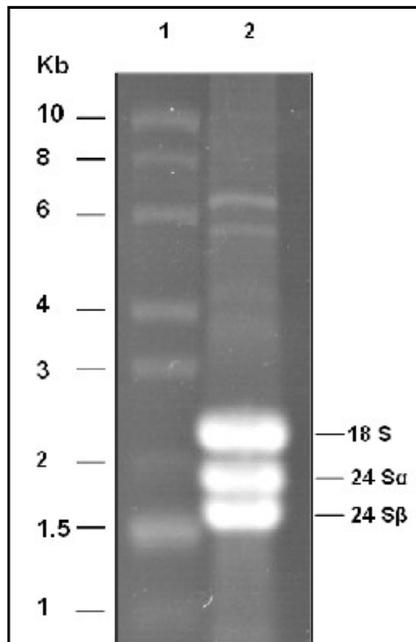


Figura 14. **Perfil electroforético del RNA total de *L. major*.** Se corrieron 3µg de RNA total en un gel desnaturizante de agarosa al 1% (carril 2). Se indican las moléculas grandes de rRNA. El carril 1 corresponde al marcador de peso molecular (escala de RNA de 10 kb).

Figura 13. **Alineamiento de la secuencia nucleotídica de C128 entre *L. major* y otras especies.** La secuencia nucleotídica de una parte del gen de C128 de *L. major*, *T. brucei*, *T. cruzi*, y *H. sapiens* se alineó en CLUSTAL W. Las regiones conservadas A-D se presentan sombreadas en la secuencia de *L. major*.

T.brucei -----ATGACCCCTAGGGGCC---GTGGTTGCGATGAGGGTTACGCCACGCGTAAGTTGGCGTTGCTTCCAGCCCTTATTAATATGAAGGGACTG 87
T.cruzi -----ATGCCTTTGCCCACTCAAGGCAGTGACGATGCCCGGTACAACACGCGGAAATTTGGCGCTCTGCCAGCGCTTATCGGAATGAAGGGACTT 90
L.major -----ATGGTCAAGTGGCGACGCCATGTCCTGACTTTGGTGACGAGTACACCGGAAGGCTTGAGATGCTTCTCGCGCTATGGGCATCGGGGCATT 96
H.sapiens ATGGACGTGTAGCGGAGGAGTTTGGGAACCTGACTCCGGA-GCAGTGGCGGCCCTCCGACTGTAG--AGAAAAATGGAGGCTTCCAGCATTTTAAAGGTGAAGGCCTT 117
* * * * *

T.brucei CTGAACCATCAGTGGCCCTCTTTGATCACTTTATCAATGTGGAGCTGGGGCAATTCTGTTGAATGAGTCAACAGAGAAATTAAGAGCAGCATTGATCCAGATTTTCCATTTCGTAC 207
T.cruzi TTGAACACCACATTCGCTCATTTGACCCTTAATAAAGCTGGAGTTGAAGAGGATCTTTTGAATGAGTCAACAGGAGATTAAGAGCAGCATCGACCCGGACTTCTCCATTTCGATAC 210
L.major CTCAACACCACATCGCCTCTTTGACCCTTGATCGAGTGGAGCTTCAGCGAATTTGCTAAACAGAGTCCAATGTGCAATCAAGAGCACCCTCGACCCGGACTTTGTCATTTCGTAC 216
H.sapiens GTGAACAGCATATAGATTCAATTAATTTTCAATTAATGTAGAGATAAAGAGATAATG-----AAAGCAATGAAAGGTTACAAGTGACGCTGACCTATGTGGTACTTAAATAT 231
* * * * *

T.brucei TCAGGTATTCGCGTTTGGCCGCCCCGGGAGATTTGTGGAAAGGGTCAACTTCCCAAGCTGTGTACCCGATGAGTGGCCACGCGGGACCTCAGTATCGCGCGATATTGTAGTGGAT 327
T.cruzi ACAATATCCGGGTTTGTCAACCAGGGGAGATTTGGGGAAAGGGCAGTTGCCCAAAGCCGTTTCTCCACAGAAATGAGAGCACCCTGCTCACCTATCGTGGGGATGATGTTGGAT 330
L.major CAGAATATTCGCATCTGCCGCCACAGGAGATTTAGGCAAAAGTTCACATACCAAGCTTTGTGACG**CCGAGGAGTGGCTTTCGGCAGATGACGTACCAGGGGACATGATCGTAGA** 336 A
H.sapiens CTTAATATCTATGTTGGGCTTCTCT--GATGTTGAAGAAAGCTTCAATGTAACATAGACAGTGTCCCTCATGAGTGGCGTTGAGAGACATGACATACTCGCCCTATACAGTGGAT 348
* * * * *

T.brucei GTGGAGTACACTAGCCGTGATCGCTCTAAACGAATATGCAGTGAACCAATATTAATAATGGGACAATCCCATTTATGCT--CAATCGAGTTCATGCAACCTGTACGGGAAGGGGAGG 445
T.cruzi GTGGAGTATAAAGTCTGTGACGCCAAACAAAGCCGTCACCGAGAGCCGATATTAATAATGGGACAATCCCATCATGCT--GAAGTCAGTTCATGTAATCTGTTTGAAGGACTCGTG 448
L.major **GTCCAGTACACACCGCGAC**CGCTCGCGAGCGATGCTGCTCGAGAAAGCATCAAAATCGGGACTATACCTATTATGCT--CAAGTCAAGTGTCTGCAACCTGTACCCGCAAAACACGCG 454
H.sapiens ATTAATATAC--CCGAGGAGC--CAGAGGATCATCCGCAATGCCTTACCT--ATCGCGAGAATGCCATATGCTCTAGTGTCAACTGTGT--TCTTACAGGAAAACCGCAC 457
* * * * *

T.brucei AGGAGCTGATGTGCTATGCGGGAGTGGCCACTTGATCTCGGAGGATTTTCATTATTAAGGTTGTGAGAAAGTTGCTGTTGAGGAGCAGCAGAGTAAGAATCGTGTCTATTTCGAGG 565
T.cruzi AGGAGCTGTTGCGGATGCGGGAGTGTCTCTTGACCCAGGCGGTTACTTCAATATCAAGAGAGTGAAGAAAGTATGCTTGTGTAAGAGCAGCAGAGCAAGAACTCGTGTCTATTTCGAG 568
L.major AAGAGCTGTTGAACATGCGGGAGTGC**CCACTCGACCCTGGTGGCTACTTCAATATCAAAAGGCGTTGAAAAGGTGGCTGGTTCAGGAG**CAGCAAAGCAAGAACTGTCTATCAATGGAG 574 B
H.sapiens CAGAATTTGCCAAACTGAACGAATGTCCCTTAGATCCAGTGGCTACTTCAATGTTAAAGGAGTAGAAAAGTTATTCTTATCCAGAGCAGCTGTCTAAGAACAGGATCATCGTGGAG 577
* * * * *

T.brucei CGGATGACAACCGGAGATTTGTGGACATGTGCAGAGCAAAACGCATTTCCATCTCAAAGTGTTCAGTACTTTCAGGAAAGGCCGATTTGTTATGGTGCACCTCTTTTAAAGGAG 685
T.cruzi CGSATGACAACCGCAATATTGTGCCTCATGTTTCAGAGCAAGACGCATTTCCATTTCAAATGTTCCGTTGACTTTAAGAAGGGGCGGATTTAATGGTGCATCGATCTTCAAGSAG 688
L.major CTGACGAGCAGCGCAACATCTCGGCCACGTCGAGAGCAAGACCACTACTCCATCTCAAAGTGGCGGTTACTTTCGAAGAGGGCAGCATCGTGCTCAGCATCGCTCTTCACAGAGG 694
H.sapiens CTGATGAAAAGGGGCTGTGGAGCTTCAGTTACCAGCTTACCACATGAGAAAAGCAAGCAAAATATGGCTGTGAAAACAGGACGATTTTATTTGAGGCATAACTTTGTTCAGAG 697
* * * * *

T.brucei ACATCCCCATCGTAGTATTAAAGGCGCTCGGCATGGAGAGTGACCAGCAGATTGCACAACACATTTGGAGTTCACCCCGCTTTTCAAAGCGTACTGTTTGCCTGCTTCGAGCAC-GCA 804
T.cruzi ACATTTCCATCGTGGTGTGCTGAAGGCTCTTGGGATGGAAGCGATCAACAGATTTGGCGAGCACATTGGCACGCGCTGCTTTGAAAGTGTCTTATTGCGCTGTTTGGAGCAG-GCT 807
L.major ACATCCCGATCATTTGCTGTTAAAGGCGCTTGGCTTGAGAAATGATCAGCAGCATCACCCAGTGCATCGGCACCTTGGCAGAGTTCAGAAAGTCTTTTTCGCTGCTTCGAGGAG-GCG 813
H.sapiens ATATACCCATTTGCATCATTTTAAAGCCATGGGTGTGGAGAGTGAAGGAAATTTGTGCAGATGATTTGGCAACAGAGAGCAGCTGATGGCTGCATTTGGGCCAGTTCGAAAGAGTGC 817
* * * * *

T.brucei GCCTCGCTTAATGTTAAGACACAGGATGATGCGCTTCACTTCAATGTTGAACGGCGAAAGGAGACTTCTGGGAAATGGACGAAACACAGCAGCGACAGCTTCAAAGTCTAAGGCGGAT 924
T.cruzi GCTCGTTTGGGAGTGAAGACTCAGGACGATGCGCTGCATTTTCAATGTTGAAGAGCTAAGGAGACTTGTGGGAGGTTGGATGACGCGCAGCAGAGACACATTCAGAAGTCCAAGGCGAGC 927
L.major CGTCTGCTGAACGTGGTCAACGAAAGCAGCCCTCGGATGAGAAAGCGGATGAGAGACCGGTGTTGGAGCGGAGGAGAGCAGCAGCAGCAGCAAGTCAACAGGTGCAAGGTGAC 933
H.sapiens AGAAAGCTCAG-ATTTTACACAGATGACGCGATTAATAATATATAGG-GAACAAAGTAAAGGCAA--AGGATGTGGG-GAGGTGGACAA-----AGAAAACAAAATAGAA 921
* * * * *

T.brucei AGCGCTCGGAGTTTCTTGCAAATGTTCTCTGTGTCACATCCGAGAGGGGAAAGTGCAGCGTATTGGAACCTCCGTCACAAAGCGTTGTATGTTTGTATTTATGGTTCGGGCGATGGTA 1044
T.cruzi AATGCGGCGGAGTTTCTTGGAATGTTCTCTTGTGCCACATCCGGGAGGAGCAGGTGCAGCGTACTGGAACCTTCGCCACAAGGCCCTTACGTGTGTTTATGGTGCAGCAGCATGAT 1047
L.major AAGCGGCGGAGTTCCTCGCCACAGTGTACTCTGCCACATCCGGGAGGCGAGGTGCAGAAAGACTGGAACCTTCGCCACAAGGCCCTTACGTCTGCTTATGGTGCAGTGGCATGATC 1053
H.sapiens GAAGCAAGAGAGCTCTCGCTTCCACCATTTGACCCATGTCC-----CAGTTA----AGAAATTCAAITTCGAGCCAAATGTATCTACTGCAAGTATGGTGGGAAAGATTTAT 1029
* * * * *

T.brucei GAGGCGAGTGTGGATTCACTCTCGATGAACGTGATTTTTACGGCAACAAGCGTTCGAGACAACCTGGGACGCTAATGGGGCTCTGTTGCAAGACCTCTTGAACAATAACAACCGC 1164
T.cruzi GAAGCAAGTGTGATTTCTCCCTGCTTGACGAAACGAGTTTTATGTAATAAGCGGTTTGAACAACCTGGTACACTGATGGGCTCTCGTGTGAGGATCTCTTGAAGCAATTTAATCGT 1167
L.major GAGGCGAGT**TCGACACATCTGCTCTGACGAGCGGACTTCTACGGCAACAAGGATTC**GAGACAACCGGAACGCTGATGGCCCTCTGTTTGGAGACTTGTGGAAGCAATTAACCGC 1173 C
H.sapiens CTGCCCCAAGGAGATA-ATAA--AGTTGACGACAGATTTATGTTAACAAGGACTGAAATTTGGCAGCAGCTTTATCTCTTTTGAAGACTTGTCTCAAAAATTTAATCT 1146
* * * * *

T.brucei GTGGTAAAGACCGCAATGGATCAGTTACTTTCCAAAAAGACACGACAAAGCCATTCATCTTAAACAGTTGATGGAAGCAAAATGGAGGTTATACAGAACGGAATCGGTGTGGCGTTG 1284
T.cruzi GTGGTGAAGACCGCGATGGATCAGCAACTGTCCAAGAGGACACGACAAAGCTTTAACGTAAGAGCAGTCAATGGAGGATAAATGGAGGTTATTCAGAGCGGGATCGGGTGGCGTTG 1287
L.major GTTGTGAAGACCGCGATGGATCAGCAGCTGTCCAGAAAGGACTCCACACGCCCTTCAACGTGAAGCAGCTGATGGAGAGCAAGATGGAGGATCCAGAATGGCATGGCGATG 1293
H.sapiens GAAATGAAAAGATTTGCCGACCGGATTTCTTAAGCAAGAGAGCCCA--GTTTGTGTTGTCACCAACATGC--GCCAAGACAGATACC--AATGGCATGGTGAATGCTATT 1257
* * * * *

T.brucei AGTAGTGGCAGATGGGAATGAAACGGTTTAAACATGATCTGACAGGGATAACGACAGTGTGTGTCAGCGGTATCTTACATTTTATGATGATGATGACCCGCTCTGGCATCTTCATTT 1404
T.cruzi AGCAGTGGCCGTTGGGAGCTGAAGCGGTTCAACATGAGCCGTCAGGATCACTCAGGTGCTCTCGGACTGTCTTATATTGATGATGATGATGACTCGTCTCGCCCTCTCCCTT 1407
L.major AGCAGTGGCGATGGGACTTGAAGCGCTTCAACATGAACCGGAGGATCACACAGGTGCTCTCAGGCTCTCGTACATGGCAGCTCGGATGACAGCGCGGCTGGCGCTCCGTT 1413
H.sapiens TCTACCGGAAATTTGCTTTAAAGAGATTTAAATGACCGCCAGGCTGTAACCAAGTGTCTCTGCTTGTATATATCCGCACTGGGATGATGACAAGAACTCTTCCAGTT 1377
* * * * *

T.brucei GAAAAGAGCCGCAAAATCAGTGGACCGCTCGCTGCAGCAAGTCAATGGGGAATGGTGTGCTCCCTGCGATACCCAGAGGGTGAAGTTGGCGGTTGGTTAAGAATTTGCTATTCTT 1524
T.cruzi GAAAAGAGTCCGAAGATTAGTGGGCCACTTATGACGCCAGTCAAGTGGGGAATGGTTTGTCCATGTGACACCGCCGAGGGGAAAGTTGCGGCTTGTGTAAGAATTTGGCATATTG 1527
L.major GAGAAAGCGCAAGTAAAGTGGCC**CGCTCGCTGACGCGAGTCAAGTGGGGAATGGTGTGCCCTTGGATACACAGAGGGGAGAGTTGGCTTCTAGTGAAGAACTTTGCGACGCTC** 1533 D
H.sapiens GAAAACAGGAAAAGTGAAGTGTCTCGCTCCCTCCAGCTCAAGTGGGGAATGCTGTGCTTCCGACACTCTTGAAGAGGAGCATGTGTTTGGTTAAAACATTTGGCCCTTATG 1497
* * * * *

T.brucei AGTCAGGTAACACTCGACATGGATGATTCTGTTGCTGCGGCTGCGTACAATCTGGAGTGGAGGAAGTGGATGATGATCAGCCCCAACAGTTCCTTAAAT--ATTACACA---GTT 1638
T.cruzi AGCCAGTGCAGTGGACATGGATGATTCTTTGTTCCGGGCGGCGCACATACTGGGTGGAGGAGTGGATTCATCAGTTCAGGAGGATTTTGAATT--ATTACAGC---GTT 1641
L.major **AGCCAGTGCAGTGGACATGGATGATTCTTTGTTCCGGGCGGCGCACATACTGGGTGGAGGAGTGGATTCATCAGTTCAGGAGGATTTTGAATT--ATTACAGC---GTT** 1647
H.sapiens ACACACATCACAACTGATGAAGATGGACCAATTTAAATTAGCCAGTAACTGGGAGTGAAGATGTAATTTATGTTGGGAGGAGCTCTTACCCAAATGTGTTCTGTG 1617
* * * * *

2.2 Reacciones de PCR

Para localizar el sitio aceptor del miniexón de C128, el cDNA se preparó con el primer C128-ME-1, usando la enzima transcriptasa reversa (las secuencias de los oligos se especifican en la sección 4 del apartado de materiales y métodos). Posteriormente se llevó a cabo un PCR con los oligos C128-ME2 y Miniexón, amplificándose predominantemente un fragmento de alrededor de 250 pb (Fig.15).

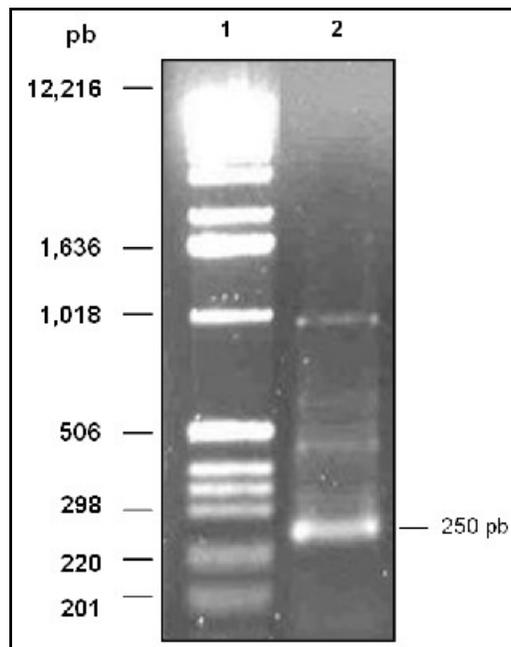


Figura 15. **Amplificación por PCR de la región del sitio aceptor del Miniexón.** Electroforesis en gel de agarosa al 1% donde se corrieron 3 μ l del producto de PCR para caracterizar la región aceptora del miniexón en C128 (carril 2). El carril 1 muestra el marcador de peso molecular (escalera de 1 kb).

Por otro lado, para identificar la región de poliadenilación de C128, el cDNA se preparó con el primer Nested-dT. Posteriormente se llevó a cabo una reacción de PCR con los oligos C128-PA3 y B1 (el primer Nested-dT contiene sitios de reconocimiento para los primers B1 y B2). Al analizarse en un gel los productos de PCR obtenidos, se observaron varias bandas de entre 300 y 1800 pb (Fig. 16 A). Para lograr mayor especificidad en la amplificación, se llevó a cabo un segundo PCR con los primers C128-PA4 y B2. Esta vez se observaron dos bandas prominentes de aproximadamente 400 y 500 pb en un gel de agarosa. De esta

manera, se denominó PA4-A a la banda de 400 pb y PA4-B a la banda de 500pb. Estas se pueden apreciar en el panel B de la figura 16.

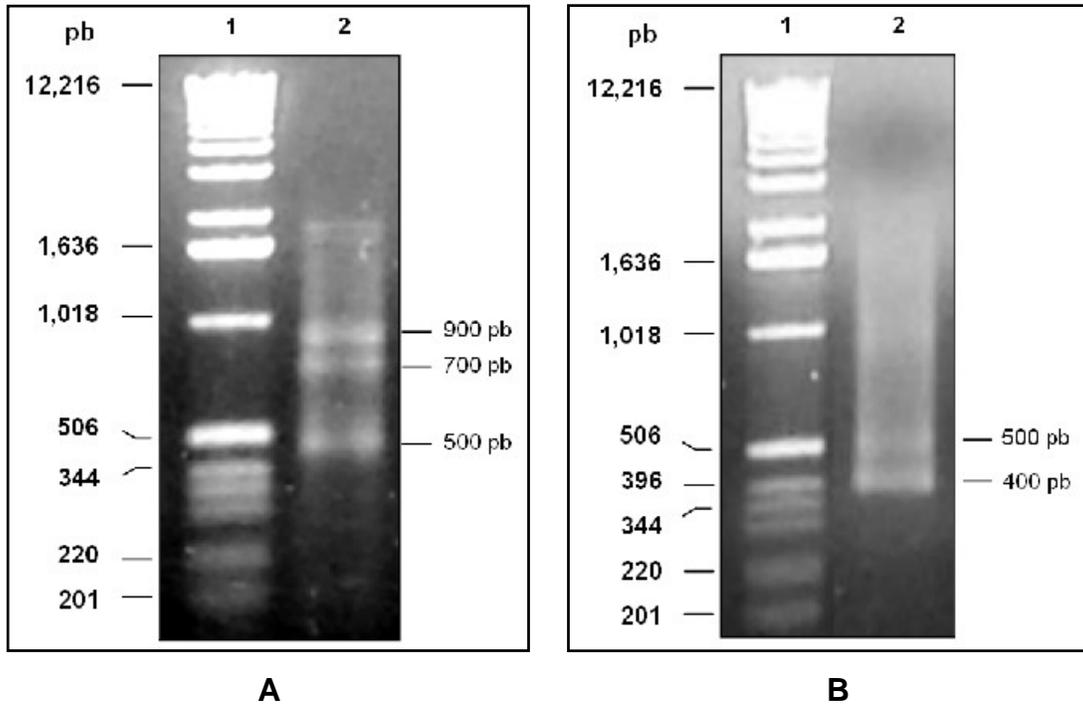


Figura 16. **Amplificación por PCR de la región de Poliadenilación de C128.** Geles de agarosa al 1% donde se corrieron 3 μ l del producto del primer PCR (panel A) y del producto del segundo PCR (panel B) para caracterizar la región de poliadenilación. En ambos casos el carril 1 muestra el marcador de peso molecular (escala de 1 kb).

2.3 Clonación de los fragmentos en el vector pGEM-T Easy

La banda amplificada de la región del miniexón (250 pb) y las dos bandas amplificadas de la región de poliadenilación (400 y 500 pb) fueron purificadas de geles de agarosa con el kit QUIAEX II (QIAGEN). En la figura 17 se puede apreciar una fracción de las bandas purificadas para cada región. Se procedió a clonar las tres bandas de DNA en el vector pGEM-T Easy.

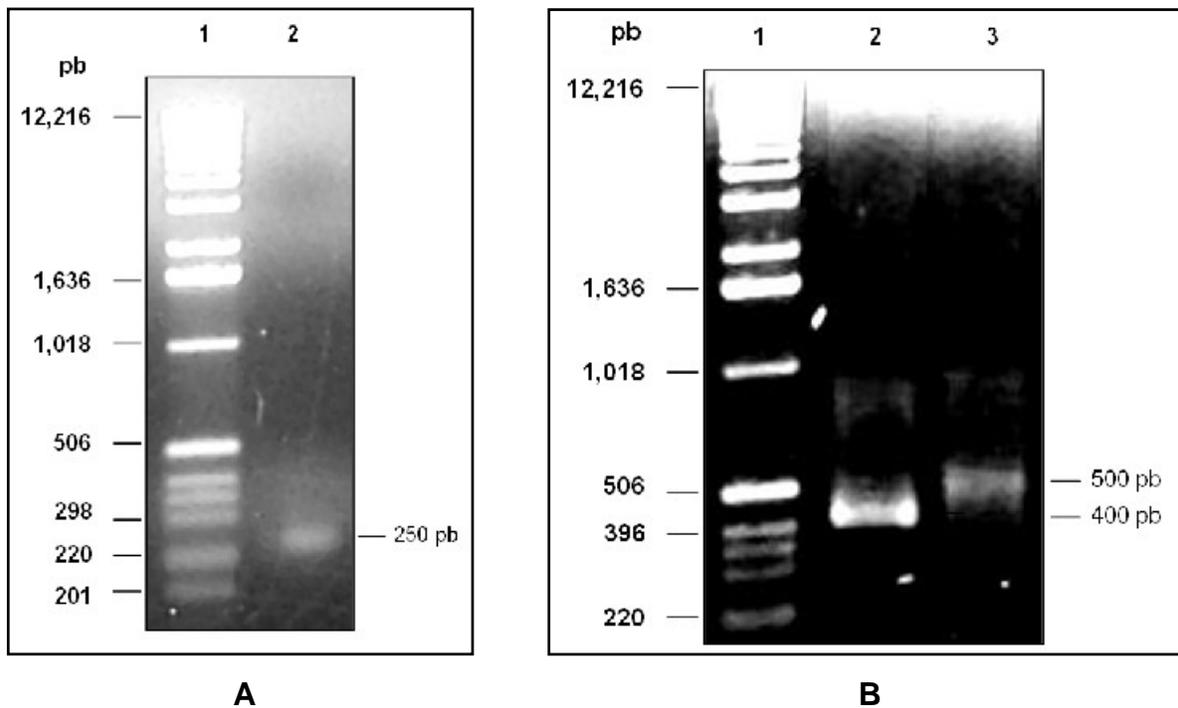


Figura 17. **Fragmentos de la región del sitio aceptor del miniexón (panel A) y de la región de poliadenilación (panel B) purificados de geles de agarosa.** Se indican los tamaños de los insertos. Carril 1: marcador de peso molecular (escala de 1 kb).

Para llevar a cabo la clonación, los tres fragmentos de DNA purificados fueron ligados en el vector pGEM-T Easy. Posteriormente, con las ligaciones fueron transformadas células competentes JM109 de *E. coli*, seleccionándose ocho colonias positivas para la región del miniexón y seis para la región de poliadenilación (tres para el fragmento de 400 pb y 3 para el fragmento de 500 pb). Los plásmidos purificados de dichas colonias fueron digeridos con *Eco* RI para liberar los insertos clonados y analizar su tamaño mediante electroforesis. En todos los carriles de los geles se observó una banda de 3 kb que corresponde al vector, además de las bandas más pequeñas que corresponden a diferentes fragmentos de C128 (Figs. 18 y 19).

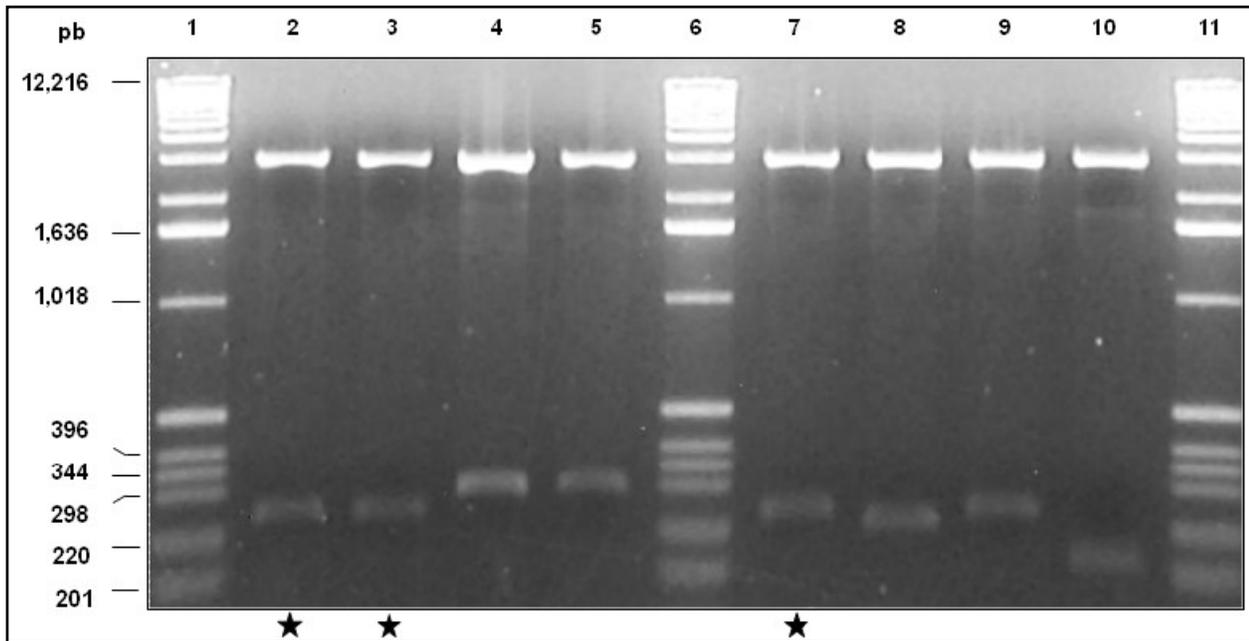


Figura 18. **Digestión de plásmidos con secuencias de la región aceptora del miniexon.** DNA de plásmido de ocho diferentes clonas fue digerido con la enzima *EcoRI* y corrido en un gel de agarosa al 1%. Las clonas positivas (con secuencias de C128) se señalan con una estrella.

En cuanto a la región de poliadenilación, de las seis clonas enviadas a secuenciar, cuatro correspondieron a C128 (Fig. 19, carriles marcados con una estrella).

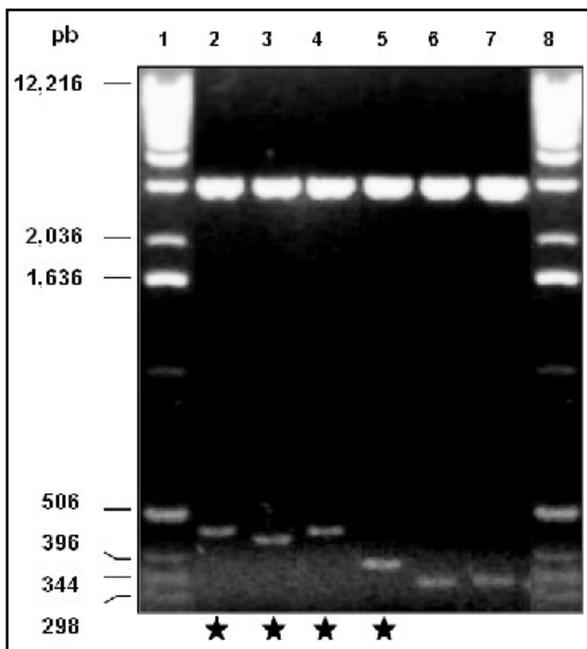


Figura 19. **Digestión de plásmidos con secuencias de la región de poliadenilación.** DNA de plásmido de seis clonas diferentes fue digerido con la enzima *EcoRI* y corrido en un gel de agarosa al 1%. Las clonas positivas (con secuencias de C128) se señalan con una estrella.

2.4 Identificación del sitio aceptor del miniexón

En el caso de la región del miniexón, cuatro de las ocho clonas presentaron el inserto de 250 pb. El resto presentaron insertos un poco más grandes o un poco más pequeños. Seis de las clonas fueron enviadas a secuenciar con los oligos T7 y SP6 (cuya secuencia de reconocimiento está presente en el vector pGEM-T). El análisis de las secuencias indicó que tres de las clonas presentaron secuencias del gen de C128 (Fig. 18, señaladas con una estrella), mientras que las otras tres presentaron secuencias de otros genes. Las clonas fueron analizadas mediante comparaciones tipo BLAST (en la página web de GenDB), donde se confirmó que las secuencias de las regiones amplificadas correspondían al gen de la segunda subunidad mayor de Pol III. Posteriormente se identificaron los oligos específicos para cada región, así como el codón de inicio o de término del gen C128.

La secuencia de las tres clonas positivas para la región del miniexón fue idéntica. En ellas se encontró la secuencia completa del miniexón a 38 bases del codón de inicio de C128 (Fig. 20). Al comparar la secuencia que obtuvimos (cDNA) con la del gen de C128, encontramos un dinucleótido AG en la región donde fue agregado el miniexón (Fig. 21). Este AG corresponde, por lo tanto, al sitio aceptor del miniexón. La distancia encontrada entre el AG y el codón de inicio (38 pb) es similar a la que se ha reportado para otros genes de *Leishmania*. Es importante identificar el sitio aceptor del miniexón, ya que está implicado en el inusual proceso de *trans-splicing*, junto con otros factores (Siegel *et al.*, 2005).

GGGCCGANAANGCATGCTCCC GGCCGCATGGCGGCCGCGGAATTTCGATT	AACGCTATATAAGT	Miniexón
ATCAGTT TCTGTACTTTATTG	CAAACGAGAGCGGTCGCCAAGGGACCACCGCCGTTGGC	ATC GTC
ACAGGTGCGCACGCCATGTCCGACTTTGGTGACGAGTACCAGCGGAAGAAGCTTGAGATGCTTCC		
TGCGCTCATGGGCATGCGGGGCATTCTCAACCACCACATCGCCTCCTTTGACCACTTGATCGAGG		
TGG	AGCTTCAGCGAATTCGCTAA	C128-ME2
GGGAGAGCTCCCAACGCGTTGGATGCATAGCTTGAGTATTCTATAGTGTCACCTAAATAGCTTGG		

Figura 20. **Secuencia nucleotídica de la clona C128 ME-5.** En ella se subrayan los oligonucleótidos Miniexón y C128-ME2. La región resaltada en gris corresponde a la secuencia completa del miniexón. La región 5' no traducida se muestra enmarcada y el cuadro negro señala el codón de inicio (ATG) del gen. La secuencia se generó con el oligo T7.

Un segundo elemento esencial para el proceso de *trans-splicing* es una región rica en pirimidinas (de 9 a 25 C y/o T) localizada río arriba del dinucleótido AG (Benz *et al*, 2005). En el caso de C128, la longitud de esta región es de 13 nucleótidos y se encuentra a una distancia de 46 nucleótidos río arriba del sitio aceptor del miniexón (AG) (Fig. 21).



Figura 21. **Secuencia nucleotídica de la región 5' de C128 en *L. major*.** En el cuadro gris se muestra el sitio aceptor del miniexón (AG) y el codón de inicio (ATG) en negro. El recuadro punteado señala la región rica en pirimidinas. Las secuencias de los oligos usados se encuentran subrayadas.

Al comparar la región que rodea al sitio aceptor del miniexón de C128 (de las bases -12 a +5) con una probable secuencia consenso para *L. major* previamente reportada (Requena *et al.*, 2003), encontramos que existe similitud entre las dos secuencias, pues además del AG se encuentran conservadas la A en posición +2, y las C en las posiciones -9, -8 y -3 (Fig. 22).

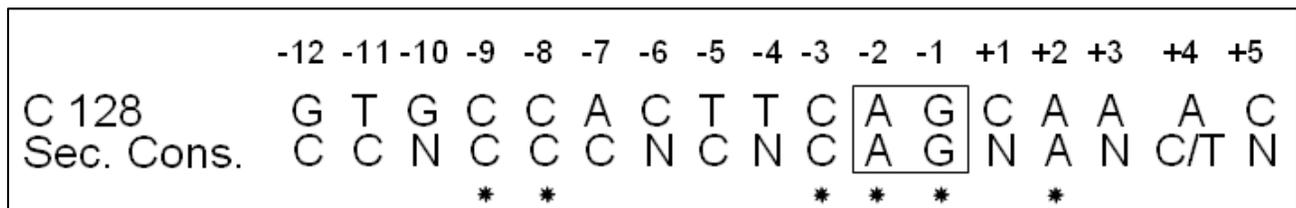


Figura 22. **Comparación de la región que rodea al sitio aceptor del miniexón de C128 y una secuencia consenso para *L. major*.** Se compara de las bases -12 a +5, considerando al AG (encerrado en una caja) como posición -2 y -1, respectivamente. Las letras N indican que puede tratarse de cualquiera de las cuatro bases. Los asteriscos señalan los nucleótidos conservados.

2.5 Localización de la región de poliadenilación

La Figura 23 muestra la secuencia de una de las clonas positivas (C128 PA4-a2) de la región de poliadenilación del mRNA de C128. En ella se señalan los oligos usados en el segundo PCR y el codón de término. El análisis de la secuencia de todas las clonas positivas reveló que la poliadenilación ocurre en una región que abarca de la C localizada 46 bases río abajo del codón de término (clona C128 PA4-a2), hasta la G ubicada a 136 bases del codón de término de C128 (clona C128 PA4-b1). Además, 2 de las 4 clonas positivas presentaron la cola de poli-A en la C localizada 48 bases del codón de término (clonas PA4-a1 y PA4-a4) (Fig. 24).

```
ATGGCGGCCCGCGGAATTCGATTATGGAGCGCGACTGCATGGTTGGCTACGGTGCGTCCAACCTC C128-PA4
CTACNGCGAGCGACTTCTCATCAGCTCCGACATGTTACGGCGGACATTTGCCACGTGTGCGGTA
ACCTCGGCTACAACAATCGCTGTACGTACTGCAAAACCAAGGGGACTACCTCCAAGGTGAACATG
CCCTACGCCTTCAAGCTACTTATCCAAGAGCTACAGGGCATGGGGGTCAGCCTTCGCCTCACGAT
GGACTCCCCGACATAGCCGCCACACGGCGTGGCCCTTTGCATCGTCTTTTCGTGTTCTTTTCCCCA
AAAAAAAAAAAAAAAAATCTAGATGTGGATCCGTGAACCTTCAGAGGATGATGCTCACTCGCCAG B2
```

Figura 23. **Secuencia nucleotídica de la clona C128 PA4-a2.** En ella se subrayan los oligonucleótidos C128-PA4 y B2. La región 3' no traducida se muestra enmarcada y el cuadro negro señala el codón de término (TAG) del gen. La secuencia se generó con el oligo SP6.

Adicionalmente, se encontró una región rica en pirimidinas 73 bases río abajo del sitio de poliadenilación más alejado del codón de término (y a 163 bases del sitio de poliadenilación más cercano al TGA); esta segunda región rica en pirimidinas tiene una longitud de 11 bases (Fig. 24). Como ocurre en el *trans-splicing*, regiones ricas en pirimidinas son necesarias para que se lleve a cabo la poliadenilación de los mRNA en *Leishmania* y otros Tripanosomátidos.

```

CGGGCGAGTTAATGCAGGGCTACGTTTTCTTTGGGCCCATTTACTACCAGCGCCTTAAGCACATG
GTCACAGACAAGATGCACGCCCCGCTCGACCGGGCCACGGTCCGATGCTCACTCGCCAGCCAACCGA C128-PA3
GGGTCGGTCTCGCAGTGGTGGTCTCCGCGTTGGTGAAATGGAGCGCGACTGCATGGTTGGCTACG C128-PA4
GTGCGTCCAACCTCCTCAACGAGCGACTTCTCATCAGCTCCGACATGTTACGGCGGACATTTGC
CACGTGTGCGGTAACCTCGGCTACAACAATCGCTGTACGTACTGCAAAACCAAGGGGACTACCTC
CAAGGTGAACATGCCCTACGCCCTTCAAGCTACTTATCCAAGAGCTACAGGGCATGGGGGTGAGCC
TTCGCCTCACGATGGACTCCCCGACATAGCCGCCACACGGCGTGGCCCTTTGCATCGTCTTTCGT
GTTCTTTTCC1T2TAAACGCTACCCCGTGTAATGGACAGAAAAGTAGCAGAGCTCGGTGCATGCAC
TCCTGTGTTGCACTCTGCACTAGTTTTGCTTCCCTG1CGAGGCCTCACCGGTTGTTCTCACAACAA
CTGTCCCTGCTTCACCATCCCGGAAAAGAAACGAGATGTGGGCCGCCCTCCCTCCTTGACGTGCCAG
AAGGAGGGCACAGGCTCGCGGCATCTCTTGAAACAGGCTGCTTTAGGCAACGCGTGGGCG

```

Figura 24. **Secuencia nucleotídica de la región 3' de C128 en *L. major*.** En un cuadro negro se muestra el codón de término (TAG). Se señalan sombreados los nucleótidos aceptores de la cola de poli-A (el superíndice se refiere al número de clonas que coincidieron con ese sitio). El recuadro punteado señala la región rica en pirimidinas. Las secuencias de los oligos usados se encuentran subrayadas.

3. Experimento tipo Southern-blot

El genoma de *L. major* Friedlin, cepa de referencia del Proyecto del Genoma de *Leishmania*, ha sido ya totalmente secuenciado (Ivens *et al.*, 2005). El análisis de la secuencia indicó que el genoma de *L. major* contiene sólo una copia del gen de C128, la segunda subunidad más grande de Pol III. En *L. mexicana*, por otro lado, no hay secuencias disponibles, por lo que a la fecha se desconoce el número de copias de C128 en esta especie. Para corroborar que C128 es un gen de copia única en *L. major* y determinar el número de copias de C128 en *L. mexicana*, se llevaron a cabo experimentos tipo Southern-blot.

3.1 Amplificación y clonación de un fragmento de C128

Para usar como sonda en los ensayos Southern-blot, se amplificó por PCR un fragmento del gen de C128 de 846 pb, usando los oligos C128 1-5' y C128 2-3' (Figs. 25 y 26A).

```

ACAAGCGATTGAGACAACCGGAACGCTGATGGCCCTCTTGTTTGAGGACTTGCTGAAGCAATTC c128 1-5'
AACCGCGTTGTGAAGACGGCGATGGATCAGCAGCTGTCCAGAAAGGACTCCACACGCCCGTTCAAC
GTGAAGCAGCTGATGGAGAGCAAGATGGAGGTGATCCAGAATGGCATGCGCATGGCGATCAGCAGT
GGGCGATGGGACTTGAAGCGCTTCAACATGAACCGGCAGGGCATCACACAGGTGCTCTCGAGGCTC
TCGTACATTGCCAGCCTCGGCATGATGACGCGGCTGGCGTCTCGTTTCGAGAAGACGCGCAAGGTA
AGTGGCCCACGCTCGCTGCAGCCGAGTCAGTGGGGGATGGTGTGCCCTGCGATACACCAGAGGGC
GAGAGTTGCGGTCTAGTGAAGAACTTTGCGACGCTCAGCCAGGTCACCTTGGACCTCAACGACAAC
TACGTCCGTGCCGCCGCGCACGCACCTTGGTGTGGAGGAGATCGACACCGTTACGCCGACGGACTTT
CTACTACTGCACCGTTTTCTCAACGGCACCTCATTGGCATTACCGCTACCCCAACCGACTG
TGCGCCGGCATTGCACTCTTCGGCGCTCCGGTCGTCTTACCCGCACGTGTCCATCTCAACGCAG
CCACGGCAGCGCACAGTCCAGATCGGCAGTGATGGCGGTGCGCATCGTTCGCCTGCTCATCATCGTG
CGCGACGGAAAGCCGGCCGTCACTCTGCCACCTCGACCGCCTGCGCGACCGGCTGTGCACCCAC
AACGACTTTCTGGCGGAGGGGCTGACAGAGTACGTGGACGTGAACGAATCGAAT c128 2-3'

```

Figura 25. **Secuencia de C128 amplificada por PCR para usar como sonda.** Para la amplificación se usaron los oligos que se indican en la secuencia. El tamaño del fragmento amplificado es de 846 nucleótidos.

Una fracción del producto de PCR se corrió en un gel de agarosa, en el cual se verificó que el tamaño del fragmento correspondiera al esperado (Fig. 26A). El fragmento fue clonado en el vector pGEM-T Easy, para lo cual fue inicialmente ligado en dicho vector, y con la mezcla de ligación fueron transformadas células competentes JM109 de *E. coli*. De varias de las colonias obtenidas se aislaron los plásmidos por el método de minipreps, y éstos fueron digeridos con *Eco* RI para separar al inserto del vector de clonación (Fig. 26B). Dos de las clonas que tuvieron el inserto del tamaño esperado fueron enviadas a secuenciar (Unidad de Secuenciación de la UBIPRO, FES Iztacala) para verificar la identidad del fragmento de C128. De una de las clonas positivas se purificó el inserto y se verificó en un gel de agarosa la cantidad del mismo (Fig. 26C). De esta manera el fragmento de C128 de 846 pb quedó listo para usarse como sonda en los siguientes experimentos.

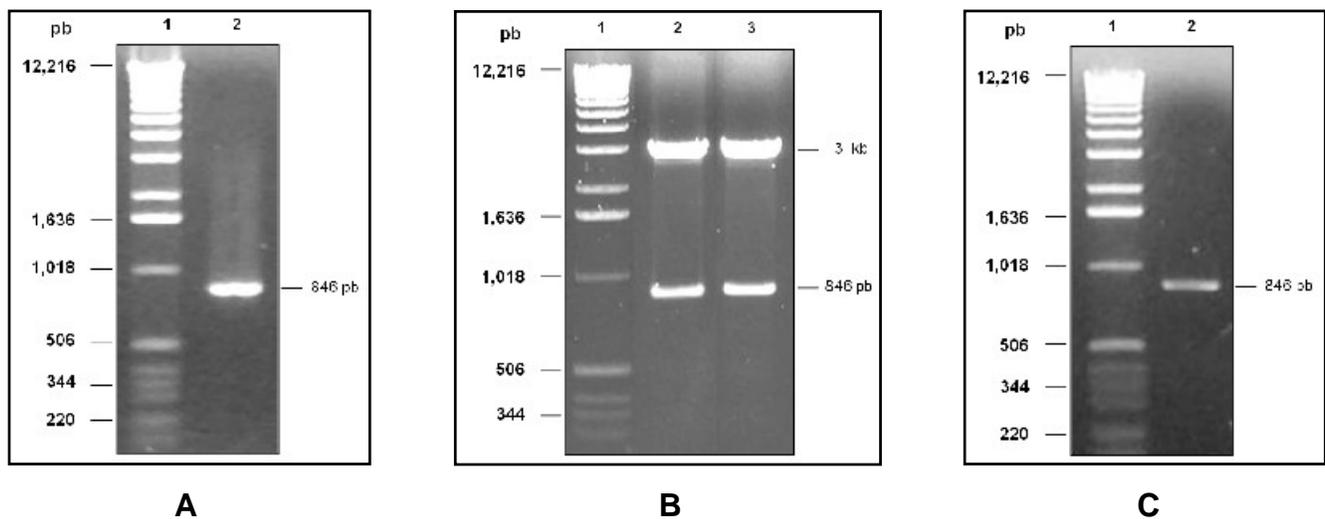


Figura 26. **Amplificación y clonación de un fragmento de 846 pb del gen de C128 de *L. major*.** Panel A: Reacción de PCR para amplificar un fragmento de 846 pb. Panel B: El fragmento de 846 pb, clonado en el vector pGEM T-Easy, fue liberado digiriendo con *Eco* RI. La banda correspondiente al vector (3 kb) se señala. Se muestran dos clonas independientes. Panel C: Inserto de 846 pb purificado; una alícuota de éste se usó para marcar radioactivamente.

3.2 Digestión y electroforesis del DNA genómico

Con el objeto de seleccionar las enzimas de restricción para llevar a cabo el experimento Southern-blot, se analizó la secuencia que rodea al gen de C160 en *L. major* y se construyó un mapa de restricción de la región (Fig. 27). Se seleccionaron seis enzimas de restricción en total (*Apa* I, *Eco* RV, *Hind* III, *Nco* I, *Sac* I y *Spe* I) cuyos sitios de corte flanquean al fragmento de C128 usado como sonda, de forma que en la autorradiografía final del experimento se esperaba observar sólo una banda con cada enzima de restricción.

De esta manera, fue purificado DNA genómico de *L. major* y *L. mexicana*, y fue digerido con las enzimas de restricción antes mencionadas. Las digestiones se corrieron en un gel de agarosa al 0.8%, bajo las condiciones que se especifican en el apartado de materiales y métodos. Al término de la corrida, el gel fue teñido con bromuro de etidio y fotografiado junto a una regla fluorescente (Fig. 28). En el gel pudo observarse que todas las enzimas cortaron eficientemente el DNA, por lo que se continuó con la transferencia.

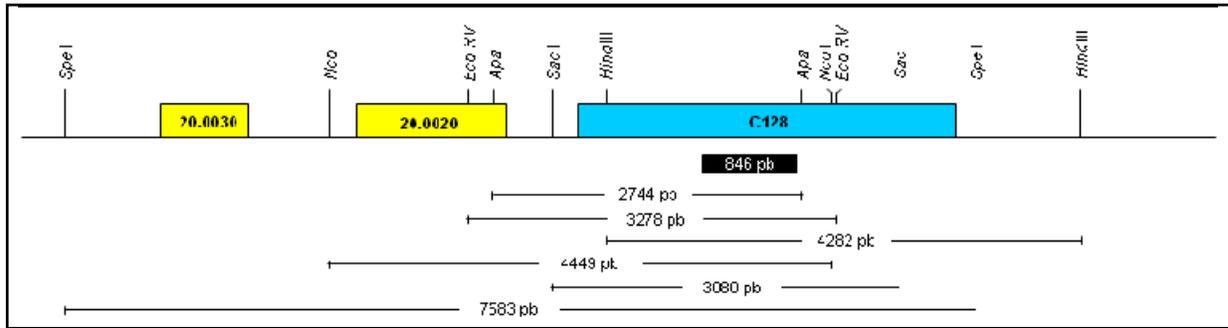


Figura 27. **Mapa de restricción de la región del cromosoma 20 de *L. major* que contiene el gen de C128.** La caja que se presenta debajo del gen C128 representa el fragmento de 846 pb usado como sonda. Las líneas con números indican el tamaño (en pb) de los diversos fragmentos de restricción.

3.3 Transferencia e hibridación

El DNA del gel fue transferido a un filtro de nylon (Hybond-XL) e hibridado con el fragmento de DNA de 846 pb correspondiente a C160 (Fig. 26C) marcado radioactivamente con P^{32} . Después de ser lavado, el filtro fue expuesto en una placa de rayos X para obtener la autorradiografía (Fig. 29). Para *L. major*, se observaron las bandas de los tamaños esperados: 2.74 kb para *Apa* I, 3.27 kb con *Eco* RV, 4.28 kb con *Hind* III, 4.49 kb con *Nco* I, 3.08 kb con *Sac* I y finalmente 7.58 con *Spe* I. Con esto confirmamos que en *L. major* C128 es un gen de copia única. Con respecto a *L. mexicana*, también se presentó sólo una banda en cada carril, lo que nos indica que también esta especie de *Leishmania* presenta únicamente una copia del gen de C128 en su genoma. Los tamaños de las bandas obtenidas son los siguientes: 5.7 kb con *Apa* I, 9.2 kb con *Eco* RV, 4.4 kb con *Hind* III, 4.65 kb con *Nco* I y 12.1 kb con *Sac* I. En el caso de *Spe* I, no fue posible determinar el tamaño de la banda obtenida, pues su tamaño es superior al de la banda más grande del marcador de peso molecular (12.2 kb) (Fig. 29).

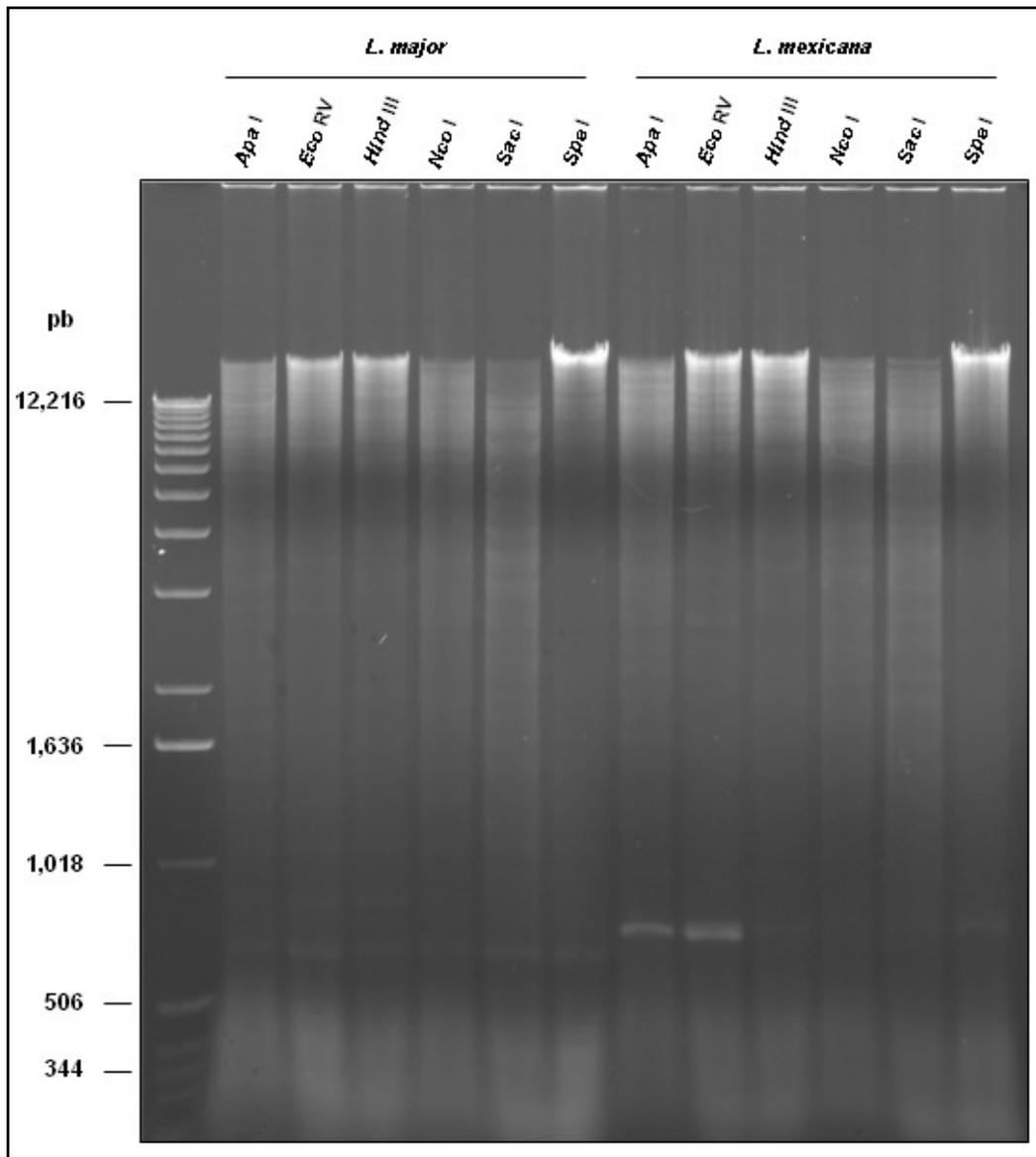


Figura 28. **Perfil electroforético de DNA genómico de *Leishmania* digerido.** El DNA fue digerido con las endonucleasas que se indican y corrido en un gel de agarosa al 0.8%. En el carril 1 se aprecia el marcador de peso molecular (escalera de 1 kb).

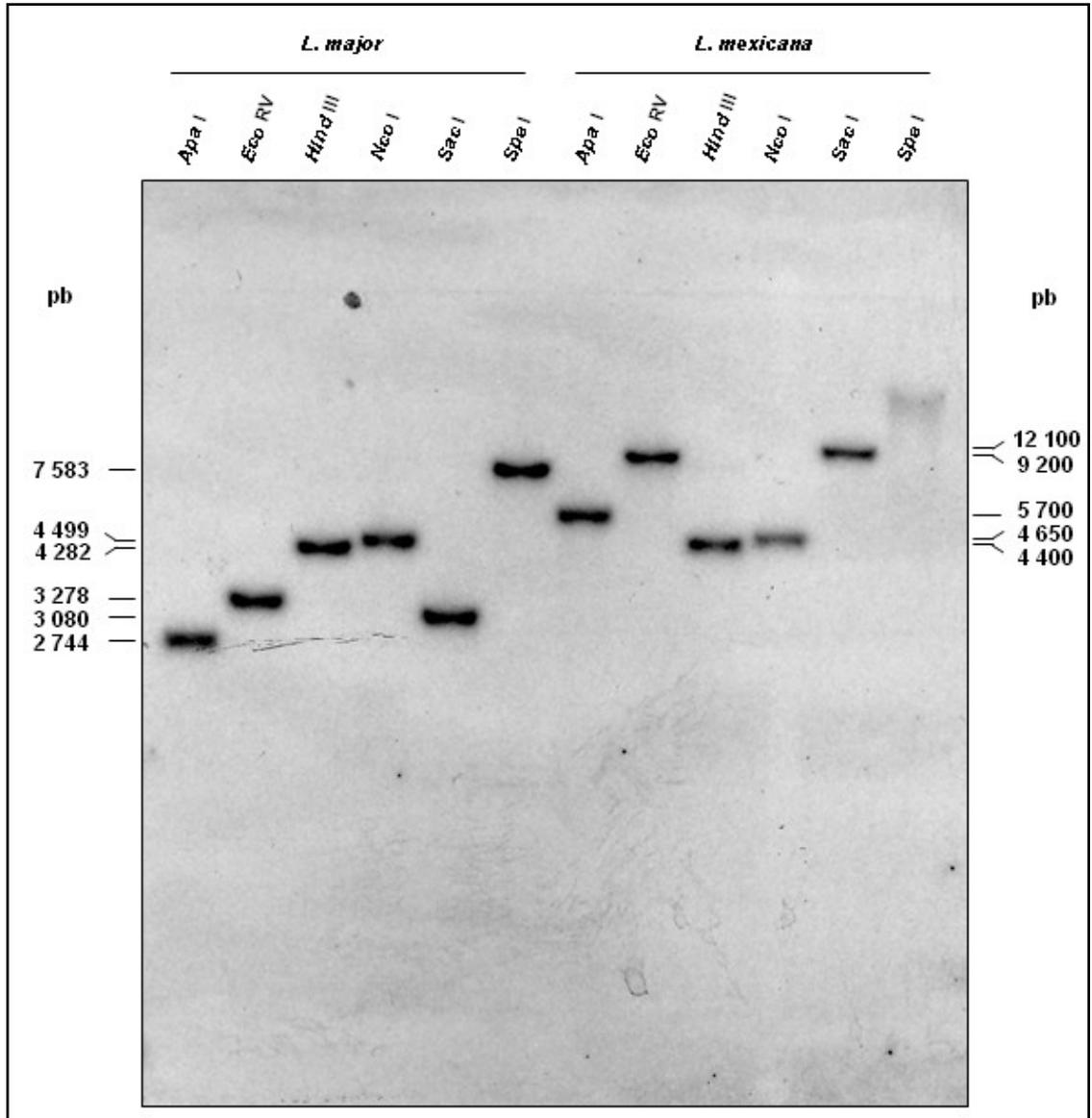


Figura 29. **Autorradiografía del experimento tipo Southern-blot.** La membrana de nylon que contenía el DNA genómico digerido con las enzimas que se indican fue hibridada con un fragmento de C128 marcado con P^{32} . Se señalan los tamaños de las bandas obtenidas.

4. Experimento tipo Northern-blot

Con el objeto de analizar el tamaño y la abundancia de los transcritos de C128 en *L. major* y *L. mexicana* en fase media de crecimiento logarítmico y en fase estacionaria, realizamos un experimento tipo Northern-blot. Como paso inicial, se extrajo RNA total de *L. major* y *L. mexicana* en las dos fases de la curva de crecimiento. Después, 12 µg de cada RNA se corrieron en un gel desnaturizante de agarosa (Fig. 30).

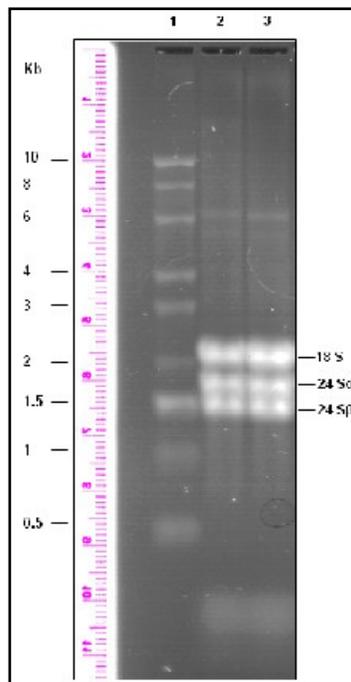


Figura 30. **Perfil electroforético del RNA total de *L. major* (carril 1) y *L. mexicana* (carril 2).** Se corrieron 12 µg de RNA total en un gel desnaturizante de agarosa al 1%. En ambos casos, el RNA mostrado corresponde a promastigotes en fase media de crecimiento logarítmico. El carril 1 corresponde al marcador de peso molecular (escalera de RNA de 10 kb). Se señalan las moléculas grandes de RNA ribosomal.

Posteriormente se llevó a cabo la transferencia del RNA a una membrana de nylon y la hibridación con una sonda radioactiva (marcada con ^{32}P) correspondiente a una parte del gen de C128 (846 pb, Fig. 27C). Después de realizar los lavados, la membrana radioactiva fue expuesta en una placa de rayos X para obtener la autorradiografía; ésta mostró que el mRNA

de C128 tiene un tamaño aproximado de 3.8 kb tanto en *L. major* como en *L. mexicana* (Fig 31). Para *L. major*, la señal de hibridación fue más intensa con el RNA de células en fase media de crecimiento logarítmico, mientras que en *L. mexicana* los dos tipos de RNA mostraron señal con intensidad muy similar. Para determinar si las diferencias observadas entre las dos muestras de RNA de *L. major* son reales, o simplemente pudieran deberse a que se cargaron cantidades diferentes de RNA en el gel, se procedió a re-hibridar el filtro de nylon con una sonda del gen de α -tubulina. Previamente se ha comprobado que α -tubulina se expresa de la misma manera en células en fase media logarítmica que en células en fase estacionaria, por lo que es usada como control de carga en Northern-blots. Como puede apreciarse en la Fig. 31 (panel inferior), la intensidad relativa de las bandas de hibridación obtenidas con α -tubulina en los diferentes carriles es muy similar a la obtenida con C128. Esto nos indica que la cantidad de RNA cargada en los distintos carriles del gel no fue la misma: se cargó más RNA de *L. major* en fase logarítmica; en base a esto, se puede concluir que la expresión de C128 es muy similar en las dos fases de la curva de crecimiento celular, en ambas especies de *Leishmania*.

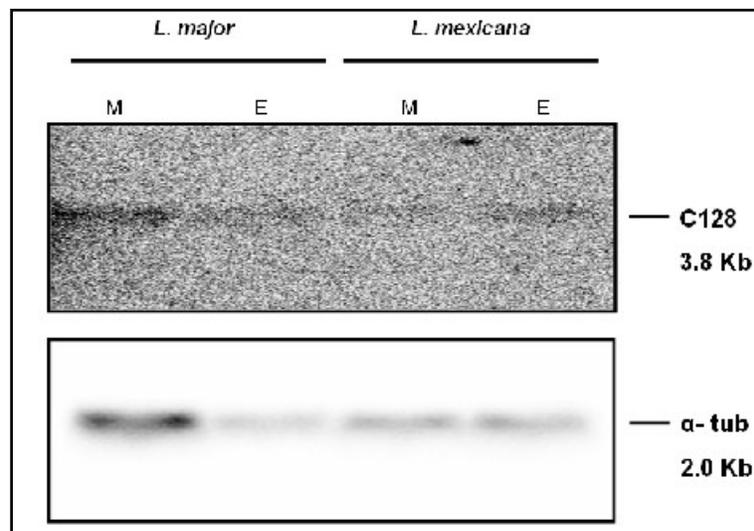


Figura 31. **Autorradiografía del experimento tipo Northern-blot de C128.** En la parte superior se indican las muestras que pertenecen a cada especie de *Leishmania*, ya sea de fase media de crecimiento logarítmico (M) o de fase estacionaria (E). Como sonda se usó un fragmento de 846 pb de C128. En la parte inferior se muestra la re-hibridación de la membrana de nylon con α -tubulina.

DISCUSIÓN

C128 presenta nueve regiones altamente conservadas

C128 es la segunda subunidad más grande de Pol III, enzima encargada de sintetizar moléculas pequeñas de RNA que son esenciales para el crecimiento celular, tales como RNAt, RNAr 5S y snRNAs. Dicha subunidad es homóloga de las segundas subunidades mayores de Pol I (A135) y de Pol II (B150), así como de las subunidades B' y B" de Archea y de la subunidad β de *E. coli*. El gen de C128 fue uno de los ~8200 genes identificados en *L. major* al secuenciarse en su totalidad el genoma del parásito (Ivens, *et al.*, 2005). Posteriormente, fueron aislados complejos transcripcionales de Pol III en *L. major*, y se confirmó que C128 forma parte de ellos (Martínez-Calvillo, *et al.*, 2007). Comparaciones previas de secuencias de aminoácidos de C128 mostraron la presencia de nueve regiones conservadas (A-I). Con el objeto de determinar si en *L. major* y otros tripanosomátidos se presentan las regiones conservadas, se llevaron a cabo comparaciones con el programa CLUSTAL W. Al incluir en la comparación a la subunidad β de *E. coli*, se observaron las 9 regiones conservadas (datos no mostrados). Cuando en las comparaciones se incluyen solamente secuencias de organismos eucariontes, además de las nueve regiones se observan algunas otras secuencias más o menos conservadas (Fig. 12). Así, nuestros resultados mostraron la presencia de las nueve regiones conservadas en los tripanosomátidos. La región conservada más grande corresponde a la región I (92 pb), seguida de la región H (78 pb). Las regiones B y C son las más pequeñas (17 pb).

Las regiones conservadas de la secuencia de C128 de *L. major* presentan mayor porcentaje de identidad con las secuencias de *T. cruzi* (88%) y *T. brucei* (87%) (Tabla 1), lo cual refleja la estrecha relación evolutiva entre las tres especies. En este sentido, resulta interesante que el porcentaje de similitud de C128 entre *L. major* y *G. lamblia* (54%) sea menor al del resto de los organismos comparados, incluidos *H. sapiens* (67%) y *S. cerevisiae* (64%). En cuanto a los dominios, en promedio el más conservado es el E (84% de identidad) y el menos conservado es el dominio G (43% de identidad) (Tabla 1).

La subunidad C128 de *L. major* tiene un tamaño de 1132 aa, que es similar al tamaño de dicha subunidad en las otras especies analizadas, que va de 1119 aa (*E. histolytica*) a 1238 aa (*G. lamblia*). La excepción la constituye C128 de *P. falciparum*, que tiene un tamaño de 1450 aa. Como puede apreciarse en la fig. 12, en la secuencia de C128 de *P. falciparum* se presenta una extensión muy grande en el extremo amino terminal. Además, se presenta una inserción entre los dominios conservados F y G. Por otra parte, *G. lamblia* presenta una inserción entre los dominios conservados B y C. A la fecha se desconoce el significado funcional que pudieran tener dichas inserciones y extensiones en estas dos especies.

La comparación de las secuencias de DNA de C128 mostró un alto grado de conservación entre tripanosomátidos y humano (Fig. 13). La similitud en la secuencia se presenta a lo largo de todo el gen, pero es mayor en las regiones conservadas A-H. La identidad entre *L. major* y *T. brucei* fue del 68%, mientras que entre *L. major* y *T. cruzi* fue del 70%. Asimismo, el porcentaje de identidad entre *L. major* y *H. sapiens* fue del 54%. Como era de esperarse, la similitud en la secuencia nucleotídica es menor a la de la secuencia de aminoácidos, pues muchos de los cambios a nivel de DNA no producen alteraciones en la secuencia de aminoácidos.

Posibles funciones de las regiones conservadas

Existe evidencia experimental que indica que C128 y C160 contienen en conjunto el centro catalítico para polimerizar RNA, y que están involucradas en el inicio, elongación y término de la transcripción (Archambault y Friesen, 1993; Rozenfeld y Thuriaux, 2001). Así, algunas regiones de las dos subunidades mayores forman un amplio canal, el cual conduce al DNA hacia el interior de un “bolso catalizador”. Este bolso contiene el sitio de unión de nucleótidos trifosfatados (NTPs), además de un motivo quelante de Mg^{+2} que forman en conjunto el sitio catalítico de la polimerización de RNA (Cramer *et al.*, 2001). La presencia de estas estructuras en todas las RNA polimerasas indica que el mecanismo transcripcional básico se encuentra conservado universalmente.

El hecho de que las regiones A-I de C128 (y de las segundas subunidades mayores de Pol I y Pol II) se encuentren conservadas a lo largo de prácticamente toda la escala evolutiva

sugiere que dichas regiones juegan un papel importante en el proceso de transcripción (Köck *et al.*, 1988). A la fecha se conoce poco sobre las funciones particulares que llevan a cabo las regiones conservadas de C128. En muchos casos, las funciones se han determinado en las subunidades homólogas de C128 (B150 de Pol II, A135 de Pol I, y subunidad β de la polimerasa de *E. coli*) y por extrapolación se han asignado a C128. A continuación se presenta un resumen de lo que se sabe hasta ahora.

Estudios de mutagénesis en levadura comprobaron que la región A está involucrada en el ensamblaje y estabilidad de la enzima. Además, presumiblemente participa en la unión a Zinc (Archambault y Friesen, 1993). En el caso de Pol II, esta región interactúa con la subunidad ABC10 α (Cramer *et al.*, 2001). Estudios similares mostraron que la región D se encuentra involucrada en la elongación y terminación. Estos últimos efectos también se observaron en las regiones F e I. Además, se ha encontrado que mutaciones en la región F disminuyen la precisión del reconocimiento del promotor y por tanto de la transcripción. Se ha reportado que esta región contiene los aa E y D (posición 752 y 753 en humano) que corresponden al sitio catalítico de la enzima (junto con una región de la subunidad C160) (Archambault y Friesen, 1993; Hu *et al.*, 2002; Cramer *et al.*, 2006). Por otro lado se ha demostrado que la región H de B150 interactúa con B44 (homólogo a AC40 en Pol III) y ABC10 β (Cramer *et al.*, 2001). Otros estudios han demostrado que esta región interactúa directamente con los nucleótidos. Por otro lado, río abajo de la región I se ha encontrado el dominio de unión al Zinc (CGQCGLLGYSGWCHYC). Otros estudios han mostrado que mutaciones realizadas en las regiones D, F, H e I del polipéptido β alteraron la identificación específica del promotor, y afectaron la elongación. Las mismas mutaciones (excepto en la región H) mostraron alteraciones en la terminación de la transcripción. Resultados similares se obtuvieron al realizar estudios en el gen de C128 de *S. cerevisiae* (Dieci *et al.*, 1995; Sepehri y Hernandez, 1997).

Caracterización de los sitios de procesamiento de C128 de *L. major*

En este trabajo se obtuvieron clonas de cDNA mediante RT-PCR para localizar los sitios de procesamiento del gen de C128 en *L. major*. En dichas clonas, el miniexón completo (39 bases) se identificó en el extremo 5', 38 pb río arriba del codón de inicio del gen (Figs. 20 y

32). El sitio aceptor del miniexón consistió en el dinucleótido AG, lo cual resultó consistente con estudios similares en otros genes de Tripanosomátidos, y que es también el sitio consenso del cis-splicing (Requena *et al.*, 2003). En términos generales, la localización de los sitios de corte y de unión están determinados por secuencias del mRNA precursor. En *T. brucei*, el control del *trans*-splicing reside en las regiones intergénicas contenidas en los precursores; son particularmente importantes los trectos de pirimidinas localizados río arriba del sitio aceptor del miniexón. En este sentido, en nuestras clonas observamos que el tracto de polipirimidinas se encuentra a 52 pb río arriba del sitio aceptor del miniexón y tiene una longitud de 13 nucleótidos. Un estudio realizado en *L. chagasi* demostró que para la máxima eficiencia del *trans*-splicing se requiere la presencia del tracto de polipirimidinas de entre 31 y 69 nucleótidos localizados río arriba del sitio aceptor del miniexón. Diversos estudios examinaron las secuencias en los sitios de adición del miniexón, confirmando la fuerte preferencia (cerca del 84%) del miniexón por el primer AG río abajo del tracto de polipirimidinas como sitio aceptor, es decir que este tracto se encuentra inmediatamente río arriba del AG (Stiles *et al.*, 1999). Otros estudios reportan trectos de pirimidinas con longitudes que van de 9 a 30 residuos, a distancias variables del AG (de 10 a cientos de pares de bases), lo cual concuerda con lo que nosotros encontramos en C128. Requena y colaboradores (2003), reportaron una probable secuencia consenso en la región que rodea al sitio aceptor del miniexón, al analizar los nucleótidos que se encuentran en las posiciones -10 a +7, en relación al AG, en 25 diferentes secuencias. Al comparar la región que rodea el sitio aceptor del miniexón de C128 con la secuencia consenso, encontramos que se presenta identidad en 6 de las 17 bases analizadas. La identidad es mayor si se considera que en otras seis posiciones de la secuencia consenso puede presentarse cualquiera de las cuatro bases (Fig. 22).

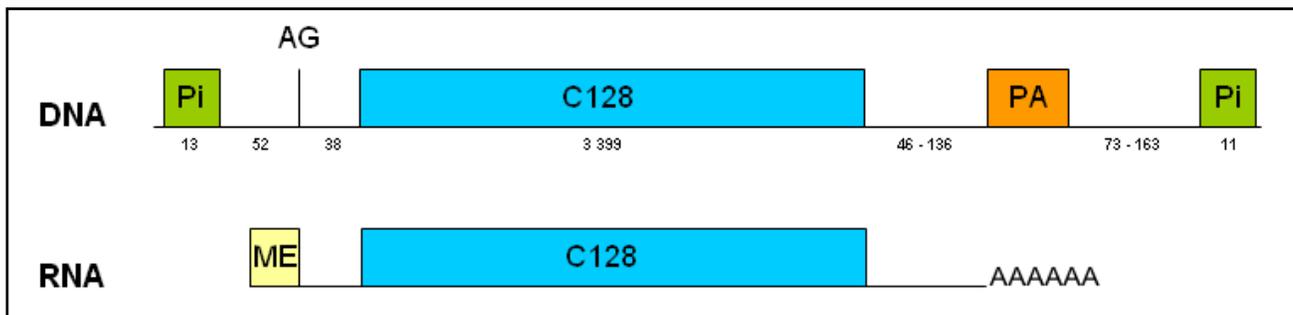


Figura 32. Análisis de los sitios de procesamiento de l gen de C128. Pi, tracto de polipirimidinas; AG, Sitio aceptor del miniexón; PA, región de poliadenilación; ME, miniexón. Se indica el tamaño (en pb) de las distintas regiones.

Con respecto al procesamiento del extremo 3' del mRNA de C128, encontramos que la poliadenilación no se presenta en un nucleótido particular, sino en una región localizada entre 45 y 135 bases río abajo del codón de término. En tripanosomátidos es común que la poliadenilación se presente en varios puntos de una región determinada, más que en un nucleótido único. El análisis de diferentes mRNAs de *T. brucei* indicó que el tamaño de la región 3'-UTR varía de 21 a 5040 bases, con un tamaño promedio de 348 nucleótidos (Benz *et al.*, 2005). La selección de los sitios de poliadenilación es un evento impredecible, aunque existe una fuerte preferencia para que la poliadenilación ocurra en secuencias CA, GA o TA. A 73 pb río abajo de la región de poliadenilación más alejada del codón de término de C128 encontramos una región rica en pirimidinas. Esta distancia es un poco menor a la reportada en *T. brucei* (de 100 a 400 bases). Dicho tracto de pirimidinas está formado por 12 bases (Fig. 24), siendo este tamaño parecido al de los tractos de pirimidinas que participan en la poliadenilación en *T. brucei* (8-17 bases). Adicionalmente, la poliadenilación incrementa la estabilidad del mRNA y permite controlar los niveles de la expresión génica durante el desarrollo del parásito (Palenchar y Bellofatto, 2006).

Número de copias de C128 en *Leishmania*

Determinar el número de copias de un gen específico es necesario cuando se quiere conocer su función mediante deleciones tipo knock-out; es decir, cuando se quiere eliminar todas las copias del gen bajo estudio para observar el efecto que éste tendría en la célula, y de esta manera tratar de dilucidar la función de dicho gen. Mediante recombinación homóloga, es posible realizar knock-outs génicos en *Leishmania* y otros tripanosomátidos, substituyendo el gen de interés por un gen que confiera resistencia a una droga. Mientras mayor sea el número de copias de un gen, mayor será el número de plásmidos necesarios, con genes de resistencia a drogas diferentes, para eliminar todas sus copias del genoma.

En nuestro laboratorio tenemos contemplado analizar la función de C128 en *L. major* y *L. mexicana* mediante este tipo de análisis, por lo que resulta necesario determinar el número exacto de copias del gen. La secuenciación del genoma de *L. major*, finalizada recientemente, demostró la presencia de ~8200 genes en este parásito. La mayoría de los genes están organizados en grupos largos de genes en una misma cadena de DNA (unidades policistrónicas) (Fig. 8). Muchos de los genes son de copia única, mientras que otros forman parte de familias génicas. Aunque el análisis de la secuencia del genoma de *L. major* reveló la presencia de sólo una copia del gen de C128, es frecuente encontrar errores en las secuenciaciones, dada la presencia de regiones repetidas en el genoma de los tripanosomátidos que dificultan el análisis. Por otra parte, el genoma de *L. mexicana* no ha sido aún secuenciado en su totalidad, por lo que se desconoce el número de copias de C128 en esta especie. Por ello, para confirmar que C128 es un gen de copia única en *L. major* y determinar el número de copias de C128 en *L. mexicana*, se llevaron a cabo experimentos tipo Southern-blot. Nuestros resultados en *L. major* mostraron las bandas esperadas, con el tamaño esperado, lo cual corroboró que en el genoma de este parásito sólo existe una copia del gen de C128. Por otro lado, los resultados con *L. mexicana* también indican que C128 es un gen de copia única (Fig. 29).

En levadura, las 17 subunidades que conforman Pol III son codificadas por un gen de copia única, y todos estos genes son esenciales para el crecimiento celular. Además, en *P. falciparum* ha sido identificada sólo una copia del gen de C160 (Li *et al.*, 1991). También se ha reportado que *Arabidopsis thaliana* contiene dos genes que codifican las subunidades AC40 (de Pol I y III) (Ulmasov *et al.*, 1995). En *L. major* se han identificado, mediante análisis *in silico* y purificación de complejos transcripcionales por el método del TAP-tag, los genes de 16 subunidades de Pol III, incluido C128. Únicamente el gen de la subunidad C31 no ha sido identificado en tripanosomátidos. En tripanosomátidos, a diferencia de levadura, cuatro de las subunidades de Pol III son codificadas por dos genes diferentes: ABC10 β , ABC23, ABC27 y C82. Las tres primeras son en realidad subunidades comunes para las tres RNA polimerasas, mientras que C82 es exclusiva de Pol III. Evidencia experimental indica que las dos isoformas de ABC10 β , ABC23 y ABC27 que presentan los Tripanosomátidos forman parte de complejos de transcripción diferentes, pues mientras una de ellas es exclusiva de Pol I, la otra se comparte entre Pol II y Pol III. En cuanto a C82, a la fecha se desconoce si los dos genes son funcionales, o si uno de ellos corresponde a un pseudogen.

Curiosamente, sólo *L. major* presenta las dos copias de C82 (y no *T. brucei* ni *T. cruzi*). En algunas plantas se ha reportado la presencia de dos copias de los genes de B220 y B150 (subunidades mayores de Pol II) (Luo *et al.*, 2007). En este contexto, también en *T. brucei* hay dos copias idénticas de B220 (Köck *et al.*, 1988), aunque en otros tripanosomátidos hay sólo una copia.

Síntesis de C128 en diferentes puntos de la curva de crecimiento

Para conocer la abundancia relativa y el tamaño de los transcritos de C128 transcritos en cultivos de promastigotes de *L. major* y *L. mexicana* durante las fases de crecimiento media logarítmica y estacionaria, fueron realizados ensayos tipo Northern-blot (Fig. 31). Logramos determinar que en ambos casos, el mRNA del gen tiene un tamaño de 3.8 kb. En *L. major*, este resultado es consistente con el tamaño esperado, pues ya conocíamos que el tamaño del gen es de 3399 pb; además, en este trabajo determinamos que sus regiones 5' y 3' no traducidas tienen una longitud de 38 y 45-136 bases, respectivamente. Si además agregamos el miniexón (39 bases) y consideramos que la cola de poli-A normalmente contiene de 100-300 bases (Fig. 32), entonces un mRNA de 3.8 kb tiene el tamaño esperado.

Se ha reportado que la curva de crecimiento de muchos organismos representa una herramienta útil para analizar la expresión diferencial de genes, pues en la mayoría de los casos las células sufren cambios morfológicos y fisiológicos al pasar de la fase media de crecimiento a la fase estacionaria. En el caso de *Leishmania*, se ha observado que durante la fase estacionaria una alta proporción de los promastigotes procíclicos (formas no infectivas, pero replicativas) se transforma en promastigotes metacíclicos infectivos, caracterizados morfológicamente por ser alargados y poco móviles, que además no pueden replicarse. Aunque en *Leishmania* no se ha analizado la expresión génica en este proceso, en *T. cruzi* hay reportes que indican que la transcripción de Pol I y Pol II se ve reducida cuando las células pasan de fase logarítmica a fase estacionaria, por lo que se ven reducidos los transcritos al ser analizados mediante Northern-blot (Cevallos *et al.*, 2005). Sin embargo, también se reportó que los transcritos se estabilizan en fase estacionaria, lo que en otras palabras implica que la vida media de los mRNA es mayor en esta fase, comparada con la fase logarítmica (Cevallos *et al.*, 2005). Nuestros resultados indicaron que en *L. major* no

hay diferencias significativas en la expresión de C128 en células en fase logarítmica *versus* células en fase estacionaria (Fig. 31). Lo mismo encontramos en el caso de *L. mexicana*. Esto sugiere que, a pesar de pertenecer a la misma familia, *T. cruzi* y *Leishmania* regulan la expresión genética en fase estacionaria de manera diferente. Es probable que en *L. major* haya una reducción menos drástica en la síntesis de RNA al entrar en la fase estacionaria, o bien que la estabilización de los transcritos en fase estacionaria sea más marcada en este parásito.

CONCLUSIONES

En el presente trabajo, hemos identificado nueve regiones conservadas en la subunidad C128 de Pol III en *L. major* y otros tripanosomátidos. Dichas regiones corresponden a las previamente identificadas en otros organismos. Las secuencias que conservan mayor similitud con la de *L. major* son las de *T. cruzi* y *T. brucei*. Experimentos futuros permitirán definir si, como se espera, estas regiones conservadas son importantes para la función de C128 en *L. major*. Mediante ensayos de RT-PCR localizamos el sitio aceptor del miniexón a 38 bases del ATG de C128. Al analizar la secuencia que rodea al AG aceptor no encontramos una marcada similitud con una secuencia consenso reportada. También identificamos la región en la que ocurre la poliadenilación del transcrito a 46-136 bases río abajo del codón de término del gen. Esto nos indica que en el RNAm de C128 las regiones 5' y 3' no traducidas son cortas. Localizamos también regiones ricas en pirimidinas en las inmediaciones de los sitios de procesamiento, las cuales podrían participar en la adición tanto del miniexón como de la cola de poli-A. Mediante experimentos tipo Southern-blot, corroboramos la existencia de una sola copia del gen de C128 en *L. major*. Asimismo, determinamos que en *L. mexicana* C128 es también un gen de copia única. Por otro lado, mediante ensayos tipo Northern-blot encontramos que el mRNA de C128 tiene un tamaño de 3.8 kb en *L. major* y *L. mexicana*. Además, no observamos diferencias significativas en la expresión del mRNA de C128 al comparar células en fase de crecimiento logarítmico con células en fase estacionaria.

REFERENCIAS

- Alvar, J., Yactayo, S. y Bern, C. 2006. Leishmaniasis and poverty. *Trends Parasitol* **22**: 552-57.
- Archambault, J. y Friesen, J.D. 1993. Genetics of eukaryotic RNA polymerase I, II and III. *Microbiol Rev.* **57**(3): 703-9.
- Bates, P.A. 2007. Transmission of *Leishmania* metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies. *Int J Parasitol.* **37**(10): 1097-1104.
- Benz, C., Nilsson, D., Andersson, B., Clayton, C. y Guilbride, D.L. 2005. Messenger RNA processing sites in *Trypanosoma brucei*. *Mol Biochem Parasitol.* **143**(2): 125-32.
- Burley, S.K. y Kamada, K. 2002. Transcription factors complexes. *Curr Opin Struct Biol.* **12**(2): 225-8.
- Campbell, D.A., Thomas, S. y Sturm, N.R. 2003. Transcription in kinetoplastid protozoa: why be normal? *Microbes Infect.* **5**(13): 1231-6.
- Cevallos, A.M., Pérez-Escobar, M., Espinoza, N., Herrera, J., López-Villaseñor, I. y Hernández, R. 2005. The stabilization of housekeeping transcripts in *Trypanosoma cruzi* epimastigotes evidences a global regulation of RNA decay during stationary phase. *FEMS Microbiol Lett.* **15**(2): 259.
- Clayton, C. E. 2002. Life without transcriptional control? From fly to man and back again. *EMBO J.* **21**(8): 1881-88.
- Cramer, P. 2006. Recent structural studies of RNA polymerase II and III. *Biochem Soc Trans.* **34**: 1058-61.
- Cramer, P., Bushnell, D.A. y Kornberg, R.D. 2001. Structural basis of transcription: RNA polymerase II at 2.8 Angstrom resolution. *Science.* **292**(5523): 1863-74.

Desjeux, P. 2001. The increase in risk factors for leishmaniasis worldwide. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* **95**(3): 239-42.

Desjeux, P. 2004. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.* **27**(5): 305-315.

Dieci, G., Hermann-Lee, Denmat, S. Lukhtanov, E., Thuriaux, P., Werner, M. y Sentenac, A. 1995. A universally conserved region of the largest subunit participates in the site active of RNA polymerase III. *EMBO J.* **14**(15): 3766-9.

Drummelsmith, J., Brochu, V., Girard, I., Messier, N. y Ouellete, M. 2003. Proteome mapping of the protozoan parasite *Leishmania* and application to the study of drug targets and resistance mechanisms. *Mol Cell. Proteomics* **2**: 146-7.

Ferrari, R., Rivetti, C., Acker, J. y Dieci, G. 2004. Distinct roles of transcription factors TFIIB and TFIIC in RNA polymerase III transcription reinitiation. *Proc Natl Acad Sci USA.* **101**(37): 13442-44.

Flores, Ch.M.D., Postigo, I.R., Mita, M.N., Cruz, I., Alvar, E.J. y Bastrenta, B. 2004. Leishmaniasis visceral subclínica en 123 individuos de un cantón de la provincia Caranavi-La Paz. *Arch Pediatr Urug.* **75**(4): 338-40.

Gállego, M. 2004. Zoonosis emergentes por patógenos parasitos: las leishmaniosis. 2004. *Rev Sci Tech Off Int Epiz.* **23**(2): 661-70.

Geiduscheck, EP. y Kassavetis, G.A. 2001. The RNA polymerase III transcription apparatus. *J Mol Biol.* **310**(1): 1-17.

Goncharov, I., Xu, Y.X., Zimmer, Y., Sherman, K. y Michaeli, S. 1998. Structure-function analysis of the trypanosomatid spliced leader RNA. *Nucleic Acids Res.* **26**(9): 2200-3.

Günzl, A., Vanhamme, L. y Myler, P.J. 2008. Transcription in trypanosomes: a different means to the end. In *Trypanosomes, After the Genome*. Horizon Press, Pittsburgh. USA. En prensa.

Handman, E. 2000. Cell biology of *Leishmania*. *Advances in Parasitol.* **44**: 1-27.

Harwood, R.F. y James, M.T. 1987. *Entomología médica veterinaria*. Limusa, México, D.F. 180-88.

Hu, P., Wu, S., Sun, Y., Yuan, C.C., Kobayashi, R., Myers, M.P. y Hernandez, N. 2002. Characterization of the human RNA polymerase III identifies orthologues for *Saccharomyces cerevisiae* RNA polymerase III subunits. *Mol Cell Biol.* **55**: 8044-48.

Huang, Y. y Maraia, R.J. 2001. Comparison of the RNA polymerase III transcription machinery in *Schizosaccharomyces pombe*, *Saccharomyces cerevisiae* and human. *Nucleic Acids Res.* **29**(13): 2675-85.

Ivens, A.C., Peacock, C.S., Worthey, E.A., Murphy, L., Aggarwal, G., Berriman, M., Sisk, E., Rajandream, M.A., Adlem, E., Aert, R., Anupama, A., Apostolou, Z., Attipoe, P., Bason, N., Bauser, C., Beck, A., Beverley, S.M., Bianchetti, G., Borzym, K., Bothe, G., Bruschi, C.V., Collins, M., Cadag, E., Ciarloni, L., Clayton, C., Coulson, R.M., Cronin, A., Cruz, A.K., Davies, R.M., De Gauden, J., Dobson, D.E., Duesterhoeft, A., Fazelina, G., Fosker, N., Frasch, A.C., Fraser, A., Fuchs, M., Gabel, C., Goble, A., Goffeau, A., Harris, D., Hertz-Fowler, C., Hilbert, H., Horn, D., Huang, Y., Klages, S., Knights, A., Kube, M., Larke, N., Litvin, L., Lord, A., Louie, T., Marra, M., Masuy, D., Matthews, K., Michaeli, S., Mottram, J.C., Müller-Auer, S., Munden, H., Nelson, S., Norbertczak, H., Oliver, K., O'neil, S., Pentony, M, Pohl, T.M., Price, C., Purnelle, B., Quail, M.A., Rabbinowitsch, E., Reinhardt, R., Rieger, M., Rinta, J., Robben, J., Robertson, L., Ruiz, J.C., Rutter, S., Saunders, D., Schäfer, M., Schein, J., Schwartz, D.C., Seeger, K., Seyler, A., Sharp, S., Shin, H., Sivam, D., Squares, R., Squares, S., Tosato, V., Vogt, C., Volckaert, G., Wambutt, R., Warren, T., Wedler, H., Woodward, J., Zhou, S., Zimmermann, W., Smith, D.F., Blackwell, J.M., Stuart, K.D., Barrell, B. y Myler, P.J. 2005. The genome of the kinetoplastid parasite, *Leishmania major*. *Science.* **309**(5733): 436-8.

Kelly, S., Wickstead, B. y Gull, K. 2005. An *in silico* analysis of trypanosomatid RNA polymerases: insights into their unusual transcription. *Biochem Soc Trans.* **33**(6): 1435-7.

Köck, J., Evers, R. y Cornelissen, A.W. 1988. Structure and sequence of the gene for the largest subunit of trypanosomal RNA polymerase III. *Nucleic Acids Res.* **16**(18): 8753, 8766-69.

Kudo, D. y Richard, R. 1980. *Protozoología*. Compañía Editorial Continental, México. 318-30.

Lee, G.L.M. y Van der Ploeg, L.H.T. 1997. Transcription of protein-coding genes in trypanosomes by RNA Polymerase I. *Annu Rev Microbiol.* **51**: 463-73.

Lewin, B. 2004. Promoters and enhancers. *Genes VIII*. Pearson Prentice Hall, USA. 597-605.

Li, W.B., Bzik, D.J., Tanaka, M., Gu, H.M., Fox, B.A. e Inselburg, J. 1991. Characterization of the gene encoding the largest subunit of *Plasmodium falciparum* RNA polymerase III. *Mol Biochem Parasitol.* **46**(2): 229-30.

Lorenzen, K., Vannini, A., Cramer, P. y Heck, A. 2007. Structural biology of RNA polymerase III: Mass spectrometry elucidates subcomplex architecture. *Structure.* **15**: 1237-42.

Luo, J., Yoshikawa, N., Hodson, M.C. y Hall, B.D. 2007. Duplication and paralog sorting of *RPB2* and *RPB1* genes en core eudicots. *Mol Phylogenet Evol.* **44**(2): 850.

Martínez-Calvillo, S., Nguyen, D., Stuart, K. y Myler, P.J. 2004. Transcription initiation and termination on *Leishmania major* chromosome 3. *Eukaryot Cell.* **3**(2): 506-17.

Martínez-Calvillo, S., Saxena, A., Green, A., Leland, A. y Myler, P.J. 2007. Characterization of the RNA polymerase II and III complexes in *Leishmania major*. *Int J. Parasitol.* **37**(5):1-11.

Martínez-Calvillo, S., Yan, S., Nguyen, D., Fox, M., Stuart, K. y Myler, P.J. 2003. Transcription of *Leishmania major* Friedlin chromosome 1 initiates in both directions within a single region. *Mol Cell.* **11**(5): 1291-99.

Marvin, R. y White, R. 2000. Transcription by RNA polymerase I and III. *Nucleic Acids Res.* **28**(6): 1283-89.

Murray, H.W., Berman, J.D., Davies, C.R. y Saravia, N.G. 2005. Advances in leishmaniasis. *Lancet.* **366**(9496): 1561-77.

Myler, P.J., Audleman, L., deVos, T., Hixson, G., Kiser, P., Lemley, C., Magness, C., Rickel, E., Sisk, E., Sunkin, S., Swartzell, S., Westlake, T., Bastien, P., Fu, G., Ivens, A. y Stuart, K. 1999. *Leishmania major* Friedlin chromosome 1 has an unusual distribution of protein-coding genes. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* **96**(6): 2902-6.

Myler, P.J., Beverley, S.M., Cruz, A.K., Dobson, D.E., Ivens, A.C., McDonagh, P.D., Madhubala, R., Martínez-Calvillo, S., Ruiz, J.C., Saxena, A., Sisk, E., Sunkin, S.M., Worthey, E., Yan, S. y Stuart, K.D. 2001. The *Leishmania* genome project: new insights into gene organization and function. *Med Microbiol Immunol.* **190**(1-2): 9-11.

Myler, P.J., Sisk, E., McDonagh, P.D., Martínez-Calvillo, S., Schnauffer, A., Sunkin, S.M., Yan, S., Madhubala, R, Ivens, A y Stuart, K. 2000. Genomic organization and gene function in *Leishmania*. *Biochem Soc Trans.* **28**: 527-31.

Palenchar, J.B. y Bellofatto, V. 2006. Gene transcription in trypanosomes. *Mol Biochem Parasitol.* **146**(2): 135-40.

Parsons, M., Nelson, R.G., Watkins, K.P. y Agabian, N. 1984. *Trypanosome* mRNAs share a common 5' spliced leader sequence. *Cell.* **38**(1): 309-16.

Requena, J.M., Quijada, L., Soto, M. y Alonso, C. 2003. Conserved nucleotides surrounding the *trans*-splicing acceptor site and the translation initiation codon in *Leishmania* genes. *Exp Parasitol.* **103**(1-2): 78-81.

Rozenfeld, S. y Thuriaux, P. 2001. A genetic look at the site active of RNA polymerase III. *EMBO Rep.* **2**(7): 598-602.

Sepehri, S. y Hernandez, N. 1997. The largest subunit of human RNA polymerase III is closely related to the largest subunit of yeast and Trypanosome RNA polymerase III. *Genome Res.* **7**(10): 1006-16.

Siegel, T.N., Tan, K.S. y Cross, G.A. 2005. Systematic study of sequence motifs for RNA *trans* splicing in *Trypanosoma brucei*. *Mol Cell Biol.* **25**(21): 9586-92.

Simpson, A.G., Stevens, J.R. y Lukes, J. 2006. The evolution and diversity of kinetoplastid flagellates. *Trends Parasitol.* **22**(4): 168-72.

Stiles, J.K., Hicock, P.I., Shah, P.H. y Meade, J.C. 1999. Genomic organization, transcription, splicing and gene regulation in *Leishmania*. *Ann Trop Med Parasitol.* **93**(8): 781-98.

Stuart, K., Allen, T.E., Heidmann, S. y Seiwert, S.D. 1997. RNA editing in kinetoplastid protozoa. *Microbiol Mol Biol Rev.* **61**(1): 105-20.

Stuart, K., Schnauffer, A., Ernst, N.L. y Panigrahi, A.K. 2005. Complex management: RNA editing in trypanosomes. *Trends Biochem Sci.* **30**(2): 97-100.

TDR. 2004. Leishmaniasis. Seventeenth Programme Report, progress 2003-2004. 19-23.

Ulmasov, T., Larkin, R.M. y Guilfoyle, T.J. 1995. *Arabidopsis* expresses two genes that encode polypeptides similar to the yeast RNA polymerase I and III AC40 subunit. *Gene.* **29**(1-2): 203-5.

Vanhamme, L. y Pays, E. 1995. Control of gene expression in trypanosomes. *Microbiol Rev.* **59**(2): 223-40.

Willis, I.M. 1993. RNA polymerase III. Genes, factors and transcriptional specificity. *Eur J Biochem.* **212**: 1-10.

Worthey, E.A., Martínez-Calvillo, S., Schnauffer, A., Aggarwal, G., Cawthra, J., Fazelinia, G., Fong, C., Fu, G., Hassebrock, M., Hixson, G., Ivens, A.C., Kiser, P., Marsolini, F., Rickel, E., Salavati, R., Sisk, E., Sunkin, S.M., Stuart, K.D. y Myler, P.J. 2003. *Leishmania major* chromosome 3 contains two long convergent polycistronic gene clusters separated by a tRNA gene. *Nucleic Acids Res.* **31**(14): 4201-10.

Zijlstra, E.E., Musa, A.M., Khalil, E.A.G., el-Hassan, I.M. y el-Hassan, A.M. 2003. Post-kala-azar dermal leishmaniasis. *Lancet Infect Dis.* **3**(2): 87-90.