



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
IZTACALA

RNA pequeño nuclear U4 de
Leishmania major: identificación y
caracterización de su región promotora

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

B I Ó L O G O

Presenta:

RODRIGO MORENO CAMPOS

Director de Tesis: Dr. Santiago Martínez Calvillo

Mayo, 2010





Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Dedicatoria

Esta tesis está dedicada a toda las personas que me han acompañado a lo largo de la vida y me han enseñado lo maravillosa que es. Les agradezco todo su amor, cariño, alegrías, enseñanzas y consejos.

Para mi **mamá Norma**. Simplemente te agradezco todo el amor incondicional que me has tenido y la fortaleza que logras tener en los momentos más difíciles para que salgamos adelante. Sin ti como ejemplo no sería la persona que ahora soy; te amo mamá.

Para mi **Familia**. Su apoyo y amor desde el momento en que nací no tienen precio; nunca encontraré la manera de agradecerles todos los momentos tan felices que he tenido con ustedes.

Para la **UNAM**. A la UNAM le debo mi vida y mis logros. Me ha dado todo lo que soy. Mi madre que es Bióloga, mis mejores amigos, el futbol americano, mi educación y mis maestros. Estoy en deuda con mi hogar la UNAM.

Para el **Doctor Santiago**. El día en que me decidí por la biología molecular. Ese día tuve la gran oportunidad de conocerlo y de que me aceptara para realizar mi tesis en su laboratorio. Lo aprecio mucho y es un ejemplo para mí como persona. La pasión que tiene por la ciencia es algo que admiro mucho de usted. Gracias Doctor Santiago.

Para la **Doctora Elisa**. Doctora, amiga, maestra, mamá, son tantas cosas. Eres increíble nunca había conocido a una persona como tú. Me enseñaste como trabajar en un laboratorio, como pensar y como apasionarme al trabajar. Te agradezco por haberme escuchado en los momentos difíciles de mi vida.

Para mis **Coaches**. Les agradezco la formación que me dieron desde pequeño, sin ustedes mi forma de pensar sería muy diferente. Me enseñaron a nunca rendirme, a siempre ver adelante, a nunca dar un paso atrás y a luchar con todas mis fuerzas para lograr mis objetivos en la vida. “¡Creo en mí, que soy el mejor; creo en mi familia, que es la

mejor; creo en mi amigos, que son los mejores y si es así; Seremos campeones!”

Para mis **amigos**. ¿Qué sería sin ustedes? Simplemente nada; el compartir con ustedes todos mis gustos, pasiones, alegrías y tristezas le da un verdadero sentido a la vida. Realmente no quiero decir nombres ni tenerlos en un orden, ustedes saben quiénes son y saben lo importante que son para mí. Ya se los hare saber de todos modos por si no lo saben. Los amigos se eligen y creo que siempre he tenido a los mejores amigos de todo el mundo, sé que ustedes podrían dar la vida por mí, sé que pueden luchar a mi lado compartiendo los mismos sueños e ideales. En este universo tan caótico tuve la grandiosa suerte de poder vivir en el momento y en el lugar indicado con ustedes. Me siento el ser más dichoso y feliz del universo por darme la oportunidad de haberlos conocido de verdad muchas gracias.

Para el **laboratorio**. Carlos Flores, Daniel Velez, Gabriela Romero, Juan Carlos Vizuet, Luis Enrique Florencio, Norma Padilla y Saúl Rojas. Quisiera ser humilde pero no puedo. Ustedes son los mejores, tienen una pasión y una manera de pensar impresionante. Creo que el doctor Santiago por algo los eligió. Tienen cualidades impresionantes, no dudo ni un momento en lo grandes que van a llegar a ser. Estoy muy orgulloso de ustedes. Gracias por compartir su conocimiento; hacen que me maraville cada vez más de lo compleja y fascinante que es la vida.

Agradecimientos

Agradezco la asesoría y el apoyo incondicional brindado por mi director de tesis Dr. Santiago Martínez Calvillo durante todo el desarrollo de la presente tesis.

Asimismo, también agradezco a la Dra. Elisa Elvira Figueroa Angulo y al Biólogo Luis Enrique Florencio Martínez por el apoyo técnico proporcionado y por la colaboración en la realización de la tesis.

También agradezco al comité revisor de este trabajo:

Dra. Emma Berta Gutiérrez-Cirlos Madrid

Dra. Alicia Elizabeth Hernández Echeagaray

M. en C. Elias Piedra Ibarra

Dr. Erasmo Negrete Abascal

Su ayuda brindada, comentarios y conocimientos fueron de gran importancia para la realización de la tesis.

Durante la realización de la presente tesis de investigación se contó con el apoyo económico de las siguientes instancias:

- a) Universidad Nacional Autónoma de México, Dirección General de Asuntos del Personal Académico en su Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) en el proyecto: IN203909 durante los periodos comprendidos de enero a agosto del 2009 y de enero a abril del 2010, por concepto de beca de licenciatura.
- b) El programa PRONABES (Programa de Becas para la Educación Superior) de la SEP, por concepto de beca de Titulación.
- c) El Programa de Apoyo para Investigadores Nacionales para el Fortalecimiento de Actividades de Tutoría y Asesoría de Estudiantes de Nivel Licenciatura del CONACYT (Proyecto 102259), por el apoyo económico para la realización de algunos de los experimentos de esta tesis.

CONTENIDO

	Índice de figuras y tablas	III
	Abreviaturas	V
	Resumen	1
1	Introducción	3
1.1	Biología Celular	3
1.2	Evolución	4
1.3	Clasificación	5
1.4	Ciclo de Vida	6
1.5	Leishmaniasis	8
1.6	Transcripción en eucariontes	10
1.6.1	RNA polimerasa III	12
1.6.2	Transcriptoma de Pol III	14
1.6.3	Promotores de snRNAs	17
1.6.4	Procesamiento del mRNA	18
1.6.5	Splicing, empalmosoma y snRNAs	19
1.7	Transcripción en cinetoplastidos	24
1.7.1	Organización genómica en tripanosomátidos	25
1.7.2	Procesamiento de los mRNA en tripanosomátidos	26
1.7.3	Empalmosoma y snRNAs de tripanosomátidos	28
1.8	Antecedentes	29
2	Objetivos	32
3	Materiales y Métodos	33
3.1	Bioinformática	33
3.2	Cultivo y conteo de promastigotes de <i>Leishmania</i>	33
3.3	Extracción de DNA genómico	34
3.4	Extracción de RNA total	34
3.4.1	Tratamiento de RNA con DNasa I	35
3.5	Electroforesis en geles de agarosa	35
3.6	Recuperación de DNA de geles de agarosa	36
3.7	Eliminación de sales de muestras de DNA	36
3.8	Amplificación de DNA por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	37
3.9	Adenilación de productos de PCR	39
3.10	Ligaciones de DNA	39
3.11	Transformaciones de células competentes de <i>E. coli</i> .	40
3.12	Purificación de plásmidos en escala pequeña (Minipreps)	41
3.13	Purificación de plásmidos en escala mayor (Midipreps y Maxipreps)	41
3.14	Digestiones con enzimas de restricción	42
3.15	Experimento 5´-RACE	43

3.15.1	Síntesis de cDNA	43
3.15.2	Inserción de cola de citocinas al cDNA (dC-tailed-cDNA)	43
3.15.3	Amplificación del cDNA por PCR	44
3.15.4	Clonación y secuenciación de los productos de PCR	44
3.16	Secuenciación de DNA	45
3.17	Ensayo de “primer extension”	45
3.17.1	Marcaje del oligonucleótido	45
3.17.2	Hibridación	46
3.17.3	Extension del oligonucleótido	46
3.17.4	Preparación del gel y electroforesis	47
3.18	Mutagénesis dirigida	49
3.18.1	Introducción de la secuencia “tag”	49
3.18.2	Digestión con <i>DpnI</i>	49
3.18.3	Transformación de células ultracompetentes XL10-Gold	50
3.19	Transfecciones transitorias	50
3.20	RT-PCR	51
4	Resultados	53
4.1	Localización del gen del U4 snRNA en el genoma de <i>L. major</i>	53
4.2	Sintenia de U4 snRNA en tripanosomátidos	53
4.3	Comparación de la secuencia del U4 snRNA entre tripanosomátidos.	56
4.4	Estructura secundaria del U4 snRNA en <i>L. major</i> .	57
4.5	Localización de un tRNA-like río-arriba del gen del U4 snRNA	58
4.6	Determinación del sitio de inicio de la transcripción del U4 snRNA	61
4.7	Identificación de la región promotora del U4 snRNA	65
4.8	Amplificación y clonación de la región promotora de U4 snRNA	66
4.9	Inserción de una secuencia “tag” en el gen del U4 snRNA	68
4.10	Elaboración de plásmidos con diferentes regiones de la secuencia promotora del gen U4 snRNA	70
4.11	Caracterización funcional del promotor U4 snRNA	74
5	Discusión	78
5.1	Análisis de la localización y secuencia del U4 snRNA	78
5.2	Estructuras secundarias	78
5.3	Sitios de inicio y término de la transcripción	82
5.4	Promotor del U4 snRNA	82
5.5	Modelo de transcripción del U4 snRNA de <i>Leishmania</i>	84
6	Conclusiones	87
7	Referencias	88

Índice de figuras y tablas

Figura 1.	Diferentes etapas de desarrollo de cinetoplástidos patógenos.	4
Figura 2.	Árbol filogenético que muestra la distancia evolutiva en relación con eucariontes superiores, protistas y procariontes.	5
Tabla 1.	Clasificación de las diferentes especies de <i>Leishmania</i> .	6
Figura 3.	Ciclo de vida de <i>Leishmania</i> en la mosca de la arena y en el mamífero.	7
Figura 4.	Localización mundial de la leishmaniasis.	9
Figura 5.	Signos clínicos de la leishmaniasis.	9
Figura 6.	Espectro de la transcripción en eucariontes.	11
Figura 7.	Estructura de Pol III y Pol II.	13
Figura 8.	Factores de transcripción generales de Pol III.	14
Figura 9.	Representación esquemática de los tres tipos de promotores de Pol III.	15
Figura 10.	Composición de los complejos de iniciación de la transcripción de snRNAs por Pol II y Pol III en eucariontes.	17
Figura 11.	Procesamiento del mRNA.	18
Figura 12.	Splicing.	19
Figura 13.	Componentes del empalmosoma.	21
Figura 14.	Estructura e interacciones del U4/U6 di-snRNP.	22
Figura 15.	Espectro de la transcripción en tripanosomátidos.	25
Figura 16.	Representación esquemática de la transcripción policistrónica y el trans-splicing.	27
Figura 17.	Ensamblaje del trans-empalmosoma.	29
Figura 18.	Las cajas A y B de un tRNA o tRNA-like funcionan como promotores para los genes de U snRNAs en tripanosomátidos.	31
Tabla 2.	Oligonucleótidos utilizados para los diferentes experimentos, con su respectiva secuencia.	38
Figura 19.	Mapa de los vectores pGEM-T Easy y pGEM-T.	40
Figura 20.	Principios del 5'-RACE.	44
Figura 21.	Principios del "primer extensión".	47
Figura 22.	Montaje del gel de poliacrilamida en la cámara de electroforesis.	48
Figura 23.	Mutagénesis dirigida.	50
Figura 24.	Principios del RT-PCR.	52
Figura 25.	Localización y secuencia del gen del U4 snRNA en el genoma de <i>L. major</i> .	54
Figura 26.	Sintenia en el locus del U4 snRNA entre tripanosomátidos.	55
Figura 27.	Comparación de secuencias del gen U4 snRNA en diferentes tripanosomátidos.	56
Figura 28.	Estructuras secundarias del U4 snRNA sin interacción con U6 snRNA.	57
Figura 29.	Estructura secundaria del U4/U6 snRNA de <i>L. major</i> y otros eucariontes.	59

Figura 30.	Comparación de las posibles cajas A y B del tRNA ^{PRO} y del tRNA-like con las secuencias consenso en tripanosomátidos.	60
Figura 31.	Estructura secundaria del tRNA ^{PRO} y del tRNA-like asociado al U4 snRNA.	60
Figura 32.	Electroforesis de RNA total de <i>L. major</i> .	61
Figura 33.	Localización y secuencia de los oligonucleótidos de la región del U4 snRNA que fueron usados en este trabajo.	63
Figura 34.	Ensayo 5'-RACE con el U4 snRNA de <i>L. major</i> .	64
Figura 35.	Determinación del sitio de inicio de la transcripción del gen del U4 snRNA de <i>L. major</i> por 5'-RACE.	64
Figura 36.	Localización del sitio de inicio de la transcripción del U4 snRNA de <i>L. major</i> mediante "primer extension".	65
Figura 37.	Amplificación por PCR del fragmento U4-Full.	66
Figura 38.	Caracterización del plásmido pU4-Full.	67
Figura 39.	Secuencia parcial del plásmido pU4-Full.	68
Figura 40.	Caracterización del vector pU4-Tag.	69
Figura 41.	Regiones del locus del U4 snRNA que fueron amplificadas y clonadas para generar los vectores pU4-Tag, pU4ΔtRNA PRO, pU4ΔB, pU4ΔA y pU4ΔAll.	70
Figura 42.	Amplificación por PCR de los insertos U4ΔtRNA PRO, U4ΔB, U4ΔA y U4ΔAll.	71
Figura 43.	Caracterización de los plásmidos pU4ΔT, pU4ΔB, pU4ΔA y pU4ΔAll.	72
Figura 44.	Secuencia parcial del vector pU4ΔTRNA PRO.	72
Figura 45.	Secuencia parcial del vector pU4ΔB.	73
Figura 46.	Secuencia parcial del plásmido pU4ΔA.	73
Figura 47.	Secuencia de parcial del vector pU4ΔAll.	74
Figura 48.	Electroforesis de RNA total aislado 24 horas post-transfección.	75
Figura 49.	Amplificación por PCR del cDNA de U4 snRNA.	76
Figura 50.	Caracterización funcional del promotor del U4 snRNA de <i>L. major</i> .	77
Figura 51.	Modelo de transcripción del U4 snRNA de <i>Leishmania</i> .	86

Abreviaturas

5'-RACE	Amplificación rápida del extremo 5' de cDNA (Rapid Amplification of 5' cDNA Ends)
ATP	Trifosfato de adenosina
B	Bucle
cDNA	DNA complementario
DNA	Ácido desoxirribonucleico
ED	Elemento distal
EI	Elemento intermedio
EP	Elemento proximal
GCP	Gen codificador de proteína
mRNA	RNA mensajero
ncRNA	RNAs no codificantes
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PH	Proteína hipotética
Pol I	RNA polimerasa I
Pol II	RNA polimerasa II
Pol III	RNA polimerasa III
RNA	Ácido ribonucleico
rRNA	RNA ribosomal
SIT	Sitio de inicio de la transcripción
SL	Miniexón ("Spliced Leader")
SNAPc	Complejo Proteico Activador snRNA
snoRNA	RNA pequeño nucleolar
snRNA	RNA pequeño nuclear

snRNP	Ribonucleoproteína pequeña nuclear
T	Tallo
Tag	Etiqueta
TB	Tallo bucle
TBP	Proteína de unión a caja TATA
TF	Factor de transcripción
tRNA	RNA de transferencia
tRNA ^{GLY}	tRNA de glicina
tRNA-like	Molécula semejante a un tRNA
tRNA ^{PRO}	tRNA de prolina
tRNA ^{THR}	tRNA de treonina
VSG	Glicoproteínas variables de superficie

RESUMEN

Leishmania major es un parásito protozoario de la familia Trypanosomatidae que causa la leishmaniasis en el humano. Además del interés médico, el parásito es importante por presentar mecanismos de expresión genética atípicos, diferentes a los encontrados en otros eucariontes. Nuestro laboratorio está interesado en estudiar los mecanismos de transcripción, especialmente los de la RNA polimerasa III (Pol III). Ésta sintetiza moléculas esenciales para el crecimiento celular como RNAs de transferencia (tRNA) y RNAs pequeños nucleares (snRNA). Los snRNAs forman parte de un complejo de ribonucleoproteínas llamado empalmosoma y participan en el trans-splicing, proceso mediante el cual se adiciona al extremo 5' de todos los mRNAs una secuencia de 39 nucleótidos llamada miniexón. El U4 snRNA juega un papel fundamental en el trans-splicing.

En *Leishmania* no ha sido caracterizado ningún promotor de Pol III. Sin embargo, en el parásito relacionado *Trypanosoma brucei* ya han sido caracterizados algunos promotores de snRNAs, en donde existen elementos extragénicos esenciales para la transcripción en la región flanqueante 5', los cuales son una caja A y una caja B. Éstos coinciden, sorprendentemente, con regiones de control internas para un tRNA orientando divergentemente. Asimismo, se presenta una distancia altamente conservada (≈ 95 pb) entre el gen snRNA y el tRNA acompañante.

Con el objeto de estudiar la región promotora del U4 snRNA de *L. major*, inicialmente se llevaron a cabo ensayos de 5'-RACE y "primer extension", y se determinó que el sitio de inicio de la transcripción corresponde con el primer nucleótido del gen U4 snRNA. Posteriormente, fue analizada la secuencia localizada río-arriba de éste, encontrándose que contiene una región tRNA-like y un gen tRNA^{PRO}. El tRNA-like se localizó a 94 pb río-arriba del snRNA y presentó secuencias consenso para las cajas A y B; esto lo convirtió en candidato a regular la expresión del U4 snRNA. Para probar esta hipótesis, se amplificó mediante PCR una región de 398 pb que contenía el gen U4 snRNA, el tRNA-like y el tRNA^{PRO}. Dicha región se clonó en el vector pGEM-T y posteriormente se introdujo dentro del gen U4 snRNA una secuencia "tag" de 15 pb, mediante mutagénesis

dirigida. El “tag” fue usado para diferenciar (por tamaño y secuencia) entre el U4 snRNA endógeno, de aquel que se sintetizaría a partir de los plásmidos (U4 snRNA exógeno). Para localizar las secuencias mínimas que regulan la expresión de U4 snRNA, se clonaron diferentes fragmentos del locus de U4 snRNA en el vector pGEM-T. Los vectores resultantes fueron transfectados en promastigotes de *L. major*, y mediante ensayos de RT-PCR semicuantitativo se determinó su importancia para la transcripción del snRNA. Los resultados sugirieron que la caja B del tRNA-like es necesaria para la expresión del U4 snRNA. Finalmente, se llevó a cabo un análisis *in silico* de la secuencia, estructura secundaria y localización genómica del U4 snRNA en *L. major* y otros tripanosomátidos. Los resultados de este análisis son presentados y discutidos.

1. Introducción

Leishmania major es un parásito hemoflagelado que pertenece a la Clase de los cinetoplástidos, uno de los grupos de microorganismos eucariontes más interesantes. Estos protistas divergieron tempranamente en la evolución (Hannaert et al., 2003) siendo uno de los linajes más antiguos, presentando ramificaciones filogenéticas más profundas que las observadas entre los reinos metazoos como animales, plantas e incluso hongos (Beverley, 1996). Los cinetoplástidos se caracterizan principalmente por la presencia de un cinetoplasto, el cual es una masa larga de DNA fibrilar (kDNA) localizada en la mitocondria, usualmente asociada a la base flagelar (Figura 1) (Adl et al., 2005).

1.1 Biología Celular

La biología celular de los diferentes cinetoplástidos es muy similar. Por ejemplo, todos son protistas móviles con un solo flagelo que se origina cerca de su larga y única mitocondria que emana de una bolsa en la membrana celular, donde también se realiza la endocitosis; sus peroxisomas están modificados para realizar la glicólisis por lo que son conocidos como “glicosomas”; su citoesqueleto está constituido por una capa de microtúbulos que se localizan bajo la membrana celular; su superficie celular se encuentra cubierta por proteínas específicas que son críticas para su supervivencia; típicamente se reproducen asexualmente, dividiéndose por fisión binaria; y durante la división celular su membrana nuclear no se disuelve ni sus cromosomas se condensan (Stuart et al., 2008).

Estos organismos además presentan otras peculiaridades, que incluyen: edición del mRNA mitocondrial; arquitectura única del DNA mitocondrial; trans-splicing de todos los mRNA transcritos; el arreglo de genes en largas unidades policistrónicas. Algunos tripanosomátidos presentan evasión del sistema inmune cambiando sus proteínas de superficie y la habilidad de escapar de la destrucción migrando a vacuolas fagocíticas (Simpson et al., 2004; Pays et al., 2004; Lukes et al., 2005; Liu et al., 2005; Hannaert et al., 2003; Campbell et al., 2003; Besteiro et al., 2005).

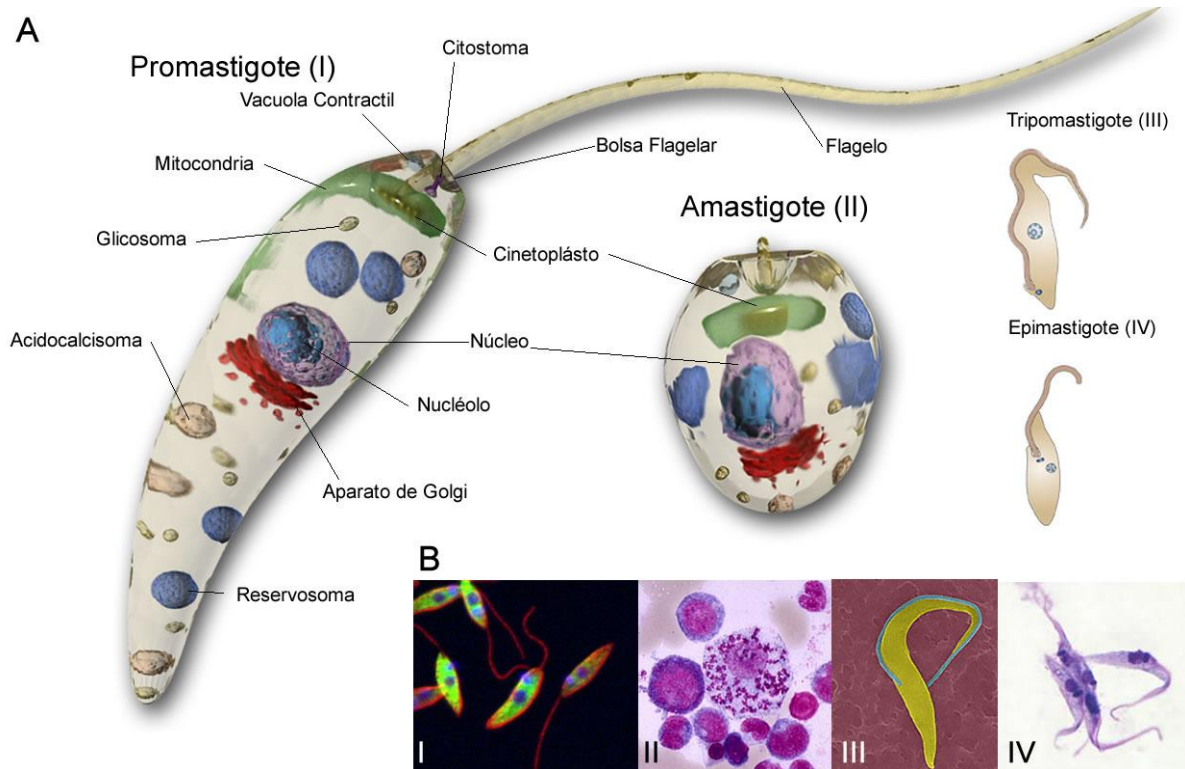


Figura 1. Diferentes etapas de desarrollo de cinetoplástitos patógenos. Estas etapas se definen en base a la forma general de la célula, la posición del cinetoplasto en relación con el núcleo, y la región de donde emerge el flagelo de la bolsa flagelar. A) Morfología de las etapas; promastigote, amastigote, tripomastigote y epimastigote pertenecientes a los cinetoplástitos: *Leishmania major* (I y II), *Trypanosoma cruzi* (II, III y IV) y *Trypanosoma brucei* (III y IV). B) Fotomicrografías con diferentes preparaciones de las etapas de promastigote (I), amastigote (II), tripomastigote (III) y epimastigote (IV).

1.2 Evolución

Hasta hace poco, la historia evolutiva de los cinetoplástitos no era lo suficientemente sólida (Simpson et al., 2006). Recientemente se ha propuesto la hipótesis de que el ancestro común de los cinetoplástitos y los euglénidos adquirió un plástido fotosintético endosimbionte que posteriormente fue perdido del linaje de los cinetoplástitos y que durante este proceso algunas de sus rutas metabólicas fueron secuestradas en los peroxisomas, que posteriormente se convirtieron en glicosomas (Hannaert et al., 2003). Los ancestros distantes de los cinetoplástitos fueron similares a los Jacóbidos en ecología y en morfología. Mediante análisis de la estructura del genoma mitocondrial se determinó recientemente que los parientes más cercanos de los cinetoplástitos no son los euglénidos, sino los diplonémidos, que son un grupo de organismos de vida libre

que ocasionalmente son parásitos facultativos de invertebrados (Figura 2) (Marande et al., 2005).

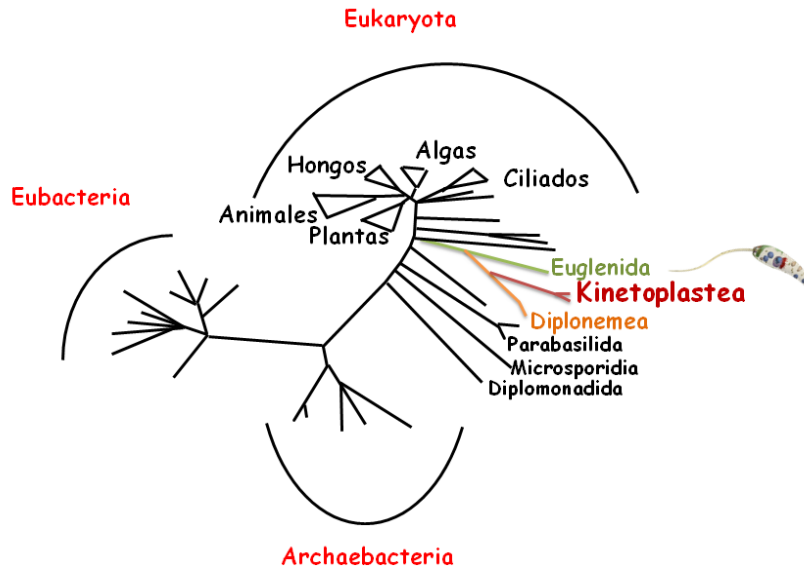


Figura 2. Árbol filogenético que muestra la distancia evolutiva en relación con eucariontes superiores, protistas y procariontes. En el linaje de los euglénidos el endosimbionte fotosintético fue retenido, mientras que fue perdido en el linaje de los cinetoplástidos. Modificada de (Hannaert et al., 2003).

Dentro de los cinetoplástidos, la familia más estudiada es la de los tripanosomátidos, la cual incluye a *Leishmania* y *Trypanosoma*. Estos organismos descendieron de parásitos de insectos mordedores hace al menos 100 millones de años. La transmisión de un tripanosomátido de insectos hacia un huésped mamífero debió de haber ocurrido varias veces, pero pocas de manera exitosa. Sin embargo, cualquier éxito abriría un extenso nicho al parásito, ya que probablemente la transferencia a otros vertebrados se daría con mayor facilidad (Simpson et al., 2006).

1.3 Clasificación

Desde finales del siglo XIX la taxonomía de los parásitos cinetoplástidos se basaba en la presencia de las etapas del ciclo de vida, que son distintivas por su morfología. Sin embargo, diferentes estudios moleculares han transformado el conocimiento de estos organismos, colocando sistemáticamente a *Leishmania* como un protozoo del orden *Trypanosomatida* y de la Familia

Trypanosomatidae (Simpson et al., 2006); en esta última se incluyen once géneros, entre los que se incluyen *Trypanosoma*, *Leptomonas* y *Crithidia* (Adl et al., 2005). *Leishmania*, a su vez, incluye dos subgéneros: *Leishmania* y *Viannia*. El subgénero *Leishmania* incluye nueve complejos en el Viejo Mundo y cuatro en el Nuevo Mundo. En el subgénero *Viannia* del Nuevo Mundo se incluyen cuatro complejos filogenéticos (Tabla 1) (Adl et al., 2005; Gallego, 2004).

Taxón		Autores	
Reino	Protista		Haeckel, 1886
SuperGrupo	Excavata		Cavalier-Smith, 2002; Simpson, 2003
Grupo	Euglenozoa		Cavalier-Smith, 1981; Simpson, 1997
Clase	Kinetoplastea		Honigberg, 1963, emend. Vickerman, 1976
SubClase	Metakinetoplastina		Vickerman, 1976; Lopez-García & Vickerman, 2004
Orden	Trypanosomatida		Kent, 1880; Lopez-García & Vickerman, 2004
Familia	Trypanosomatidae		Doflein, 1901, emend. Grobben, 1905
Género	Leishmania		
SubGénero	Leishmania (L)		Viannia (V)
Complejos	Viejo mundo	Nuevo Mundo	Nuevo mundo
	<i>L. donovani</i>	<i>L. Braziliensis</i>	<i>L. braziliensis</i>
	<i>L. infantum</i>	<i>L. guyanensi</i>	<i>L. guyanensis</i>
	<i>L. tropica</i>	<i>L. naiffi</i>	<i>L. naiffi</i>
	<i>L. killicki</i>	<i>L. lainsoni</i>	<i>L. lainsoni</i>
	<i>L. Aethiopica</i>		
	<i>L. Major</i>		
	<i>L. turanica</i>		
	<i>L. gerbilli</i>		
	<i>L. arabica</i>		

Tabla 1. Clasificación de las diferentes especies de *Leishmania*

1.4 Ciclo de Vida

El ciclo de vida de *Leishmania* comienza cuando moscas de la arena hembras (*Phlebotomus* en el Viejo Mundo, *Lutzomyia* en el Nuevo Mundo) adquieren los parásitos que se encuentran replicándose intracelularmente en forma de amastigotes en los fagolisosomas de los macrófagos y otros fagocitos, cuando se alimentan de un huésped mamífero (Figura 3) (Handman y Bullen, 2002). Cuando los parásitos llegan al intestino de la mosca de la arena se activa su desarrollo, debido al cambio de condiciones en temperatura y pH (Kamhawi, 2006). Los amastigotes se transforman en promastigotes procíclicos (forma replicativa).

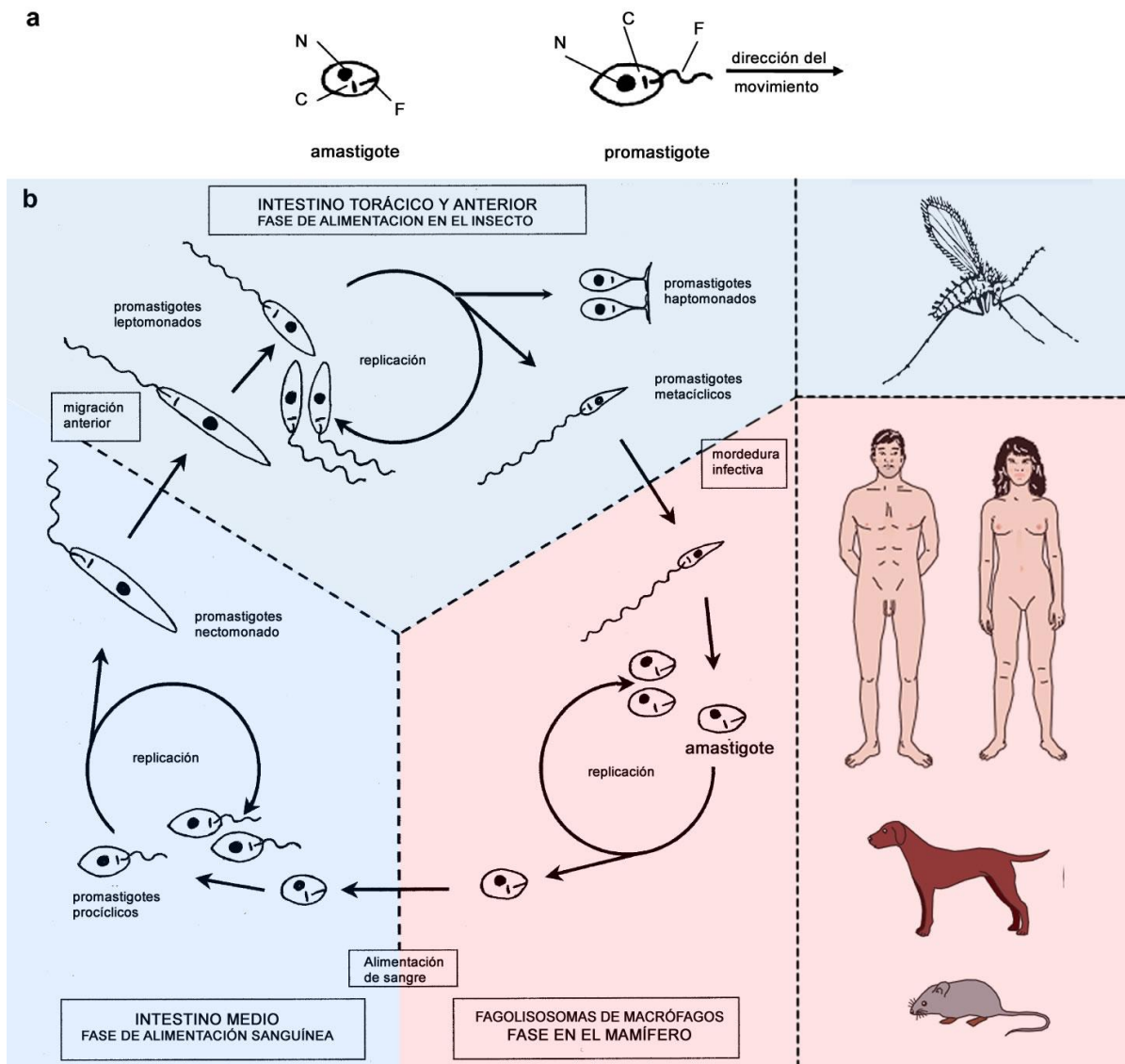


Figura 3. Ciclo de vida de *Leishmania* en la mosca de la arena (azul) y en el mamífero (rojo). (a) La morfología de los amastigotes y promastigotes. Cada forma tiene un núcleo (N), cinetoplasto (C) y un flagelo (F). El cinetoplasto es el genoma mitocondrial. El flagelo en amastigotes es interno y no funcional; en los promastigotes el flagelo se extiende de la célula y empuja al organismo en la dirección en que se muestra, emergiendo de la parte anterior de la célula. (b) La replicación de los parásitos ocurre en tres sitios: los amastigotes dentro de los fagolisosomas de los macrófagos de mamíferos; los promastigotes procíclicos en el intestino medio de la mosca de la arena; y los promastigotes leptomonados en el intestino torácico. Estos estados de replicación se encuentran unidos por varias fases donde no ocurre división celular. Modificado de (Bates, 2007; Gossage et al., 2003)

Después de unos días, el parásito se diferencia en alargados y fuertes promastigotes nectomonados, los cuales son formas migratorias que se mueven a la región anterior del intestino hasta que alcanzan la válvula estomodeal, en donde se transforman en promastigotes leptomonados (formas pequeñas que reinician la replicación) (Figura 3) (Gossage et al., 2003). Algunos de estos promastigotes leptomonados y nectomonados se adhieren a la superficie de la

válvula y se diferencian en promastigotes haptomonados (Wakid y Bates, 2004). Finalmente, algunos de los leptomonados se diferencian en promastigotes metacíclicos, los cuales infectan al mamífero al ser depositados en su piel cuando la mosca se alimenta nuevamente de la sangre del mamífero. De las 500 especies conocidas de flebotómidos, sólo 30 de ellas han sido identificadas como vectores de la enfermedad.

1.5 Leishmaniasis

Numerosas especies del género *Leishmania* causan un espectro de enfermedades conocidas como leishmaniasis. Las enfermedades pueden ocurrir en múltiples regiones endémicas en todo el mundo, como Latinoamérica, África, Asia y los países que rodean al mar Mediterráneo. Se estima que 12 millones de personas se encuentran actualmente infectadas en 88 países alrededor del mundo (Figura 4) (WHO, 2009b) y que la enfermedad amenaza a un total de 350 millones de personas (WHO, 2009b).

La leishmaniasis se presenta con un amplio espectro de manifestaciones clínicas en el hombre (Figura 5):

- a) Leishmaniasis visceral, o kala azar, es la forma más grave. Se caracteriza por la presencia de fiebre, pérdida de peso, espleno- y hepatomegalia y anemia. Este tipo de leishmaniasis es mortal, si no es tratada a tiempo.
- b) La leishmaniasis mucocutánea produce lesiones que pueden llevar a una destrucción masiva y desfigurativa de mucosas, fundamentalmente la nasal y bucal.
- c) La leishmaniasis cutánea se manifiesta con la presencia de llagas o úlceras en las partes expuestas del cuerpo tales como cara, brazos y piernas.

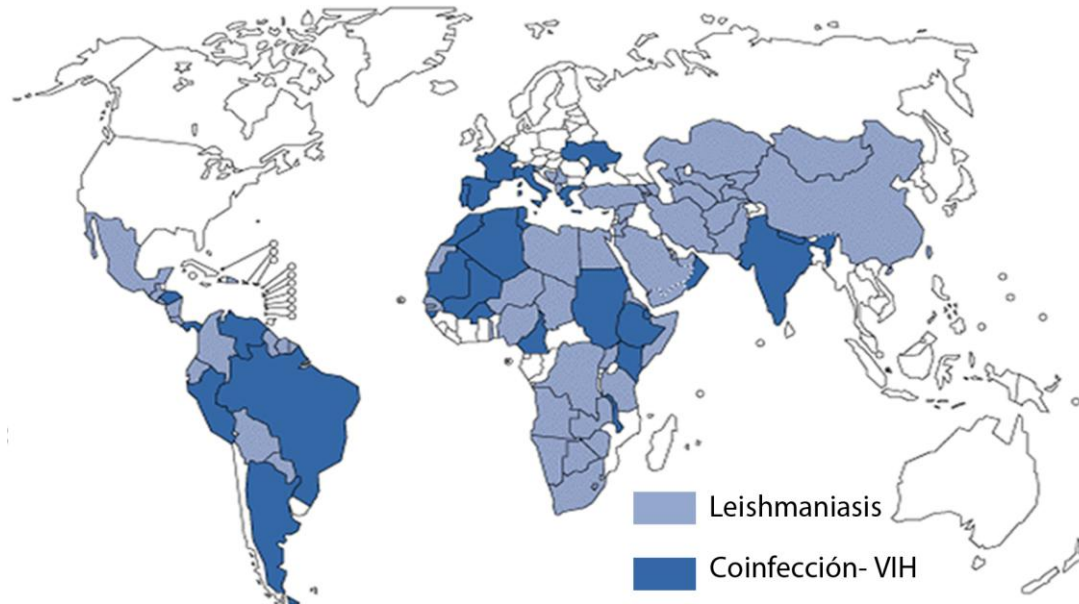


Figura 4. Localización mundial de la leishmaniasis. Regiones de casos de coinfección con VIH (azul marino) y leishmaniasis en general (azul rey).



Figura 5. Signos clínicos de la leishmaniasis. a) Paciente de Perú con leishmaniasis cutánea. b) Paciente de Bolivia con leishmaniasis mucocutánea. c) Paciente de Uganda con leishmaniasis visceral. d) Paciente de India con leishmaniasis dérmica post kala-azar (PKDL). Tomada de (Chappuis et al., 2007).

Se cree que el número de casos nuevos de leishmaniasis cutánea cada año en el mundo es de alrededor 1.5 millones. Para el caso de la leishmaniasis visceral es de alrededor de 500,000 (WHO, 2009b). Se ha detectado un gran número de casos de coinfección *Leishmania*-virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), lo que ha modificado la historia natural de la leishmaniasis. Debido a que ambas enfermedades afectan células similares del sistema inmune, juntas ejercen un daño sinérgico en la respuesta inmune celular (WHO, 2009a).

En México, actualmente se presentan diversas formas clínicas de la leishmaniasis en los estados de Campeche, Chiapas, Coahuila, Guerrero, Jalisco, Michoacán, Morelos, Nayarit, Nuevo León, Oaxaca, Tamaulipas, Quintana Roo, Tabasco, Veracruz y Yucatán (Cordova-Uscanga et al., 1993).

Durante más de medio siglo la base farmacológica del tratamiento de la leishmaniasis han sido los compuestos de antimonio pentavalente, estibogluconato sódico y antimoniato de meglumina, y como alternativas se utiliza la anfotericina B y el isonato de pentamidina. Sin embargo, todos estos medicamentos presentan alta toxicidad, a veces irreversible. Algunos han presentado una disminución en su eficacia en algunas regiones (Fauci et al., 2009). El miltefosine se encuentra bajo investigación como un medicamento oral efectivo para la leishmaniasis (Chang, 2005). También se han identificado moléculas con actividad en contra de infecciones de animales en estudios bioquímicos y moleculares que se están validando (Croft y Coombs, 2003).

1.6 Transcripción en eucariontes

En nuestro laboratorio estamos interesados en estudiar los mecanismos de expresión genética en *Leishmania major* Friedlin, la cepa de referencia del “Proyecto del Genoma de *Leishmania*”. 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. La búsqueda de promotores en regiones genómicas correspondientes a genes de RNAs no codificantes (ncRNA) ayudará a evaluar la importancia relativa

de Pol III en la abundante transcripción de ncRNA que ocurre en los genomas eucariontes (Dieci et al., 2007).

La transcripción (o síntesis de RNA) es el proceso mediante el cual la información contenida en una secuencia de DNA es transferida al RNA. El proceso es realizado por la enzima llamada RNA polimerasa (Pol), la cual requiere reconocer el inicio de un gen para que sea transcrito (Bolsover y Hyams, 2004).

En eucariontes se han purificado tres Pols, denominadas Pol I, Pol II y Pol III. Éstas difieren en su localización nuclear, composición de subunidades y más importante, en la clase de RNAs que sintetizan. De manera general, Pol I sintetiza los precursores de RNA ribosomales (rRNA), Pol II transcribe todos los genes codificadores de proteínas (mRNA) y la mayoría de los genes de RNA pequeños nucleares (snRNA). Pol III es responsable de la síntesis del rRNA 5S, los RNAs de transferencia (tRNA) y del U6 snRNA (Figura 6) (Archambault y Friesen, 1993; Dieci et al., 2007).

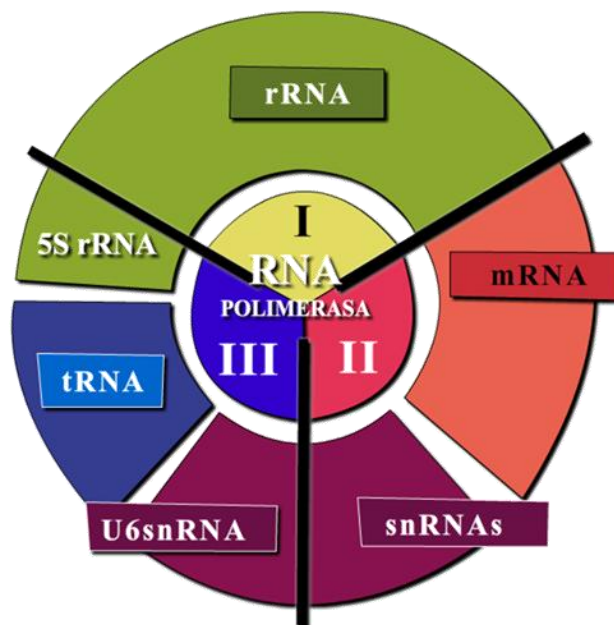


Figura 6. Espectro de la transcripción en eucariontes. En el círculo central se encuentran los tres tipos de RNA Polimerasas: Pol I (amarillo), Pol II (rojo) y Pol III (azul). En el círculo externo se indican los genes transcritos por cada RNA Polimerasa: mRNAs (naranja), snRNAs (morado), tRNA (azul) y rRNA (verde). Modificada de (Campbell et al., 2003).

Pol I, II y III constan de 14, 12 y 17 subunidades, y tienen un peso molecular de 589, 514 y 693 kDa, respectivamente. Diez subunidades forman el núcleo estructural altamente conservado y las subunidades adicionales se encuentran localizadas en la periferia (Figura 7a) (Cramer et al., 2008).

1.6.1 RNA polimerasa III

De las 17 subunidades que constituyen a Pol III, 5 son altamente específicas (no tienen parálogas en Pols I y II) (Dieci et al., 2007). Con respecto a su estructura tridimensional, Pol III se caracteriza por tener un tallo más grueso que el presente en Pol II, además de presentar una abrazadera que se ubica por arriba de la grieta por donde pasa el DNA (Figura 7d). Esto se atribuye a las cinco subunidades específicas, presentes en dos distintos subcomplejos (C82/C34/C31 y C53/C37) (Figura 7b) (Fernandez-Tornero et al., 2007). Estas subunidades proporcionan propiedades específicas a Pol III, que incluyen su localización nuclear y la interacción con su aparato de transcripción; siendo importantes en el reclutamiento de Pol III a sus promotores (Geiduschek y Kassavetis, 2001).

Los factores de transcripción son proteínas que no forman parte de la RNA polimerasa, pero que participan en la regulación de la transcripción, reconociendo y uniéndose a secuencias concretas de DNA, uniéndose a otros factores o uniéndose directamente a la RNA polimerasa. El organismo utilizado como referencia en los eucariontes acerca de los factores de transcripción es la levadura, *Saccharomyces cerevisiae*.

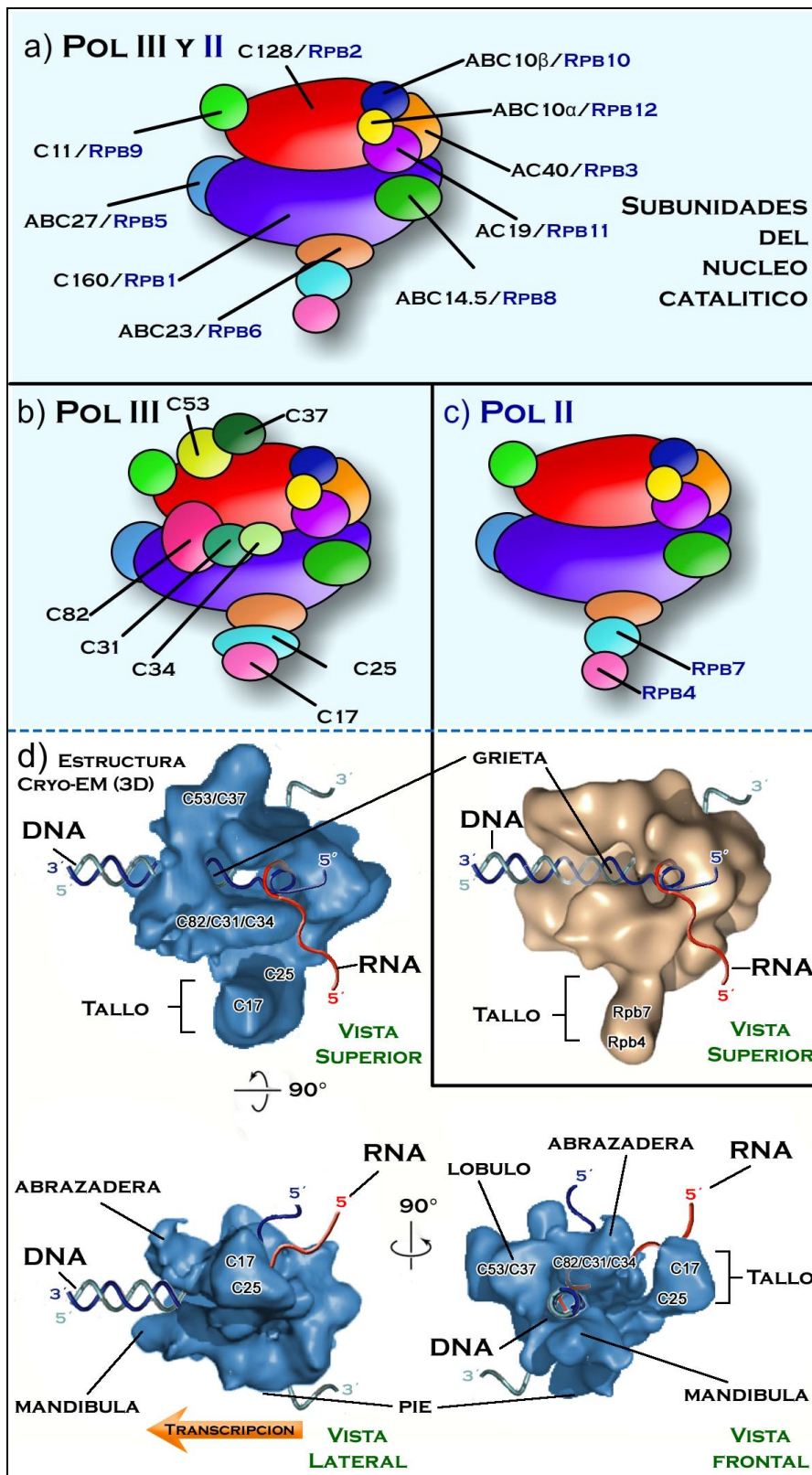


Figura 7. Estructura de Pol III y Pol II. a) Subunidades del núcleo catalítico compartidas por Pol II y III. En color negro se indica el nombre de las subunidades de Pol III y en color azul las subunidades de Pol II. b) Diagrama de la vista superior de Pol III que presenta 7 subunidades específicas que le dan su estructura característica. c) Subunidades específicas de Pol II que forman parte del tallo. d) Comparación de la estructura tridimensional obtenida mediante cryo-EM de Pol III (azul) y Pol II (beige). La estructura tridimensional de Pol III muestra las diferentes estructuras de los subcomplejos en diferentes vistas (superior, lateral y frontal). También se observa la cadena de DNA codificante (azul marino), no codificante (azul agua) y el RNA (rojo). La flecha naranja en la vista lateral indica la dirección de la transcripción de Pol III.

En el caso de Pol III, se han descrito tres factores de transcripción generales (TFs): TFIIIA, TFIIIB (formado por tres subunidades) y TFIIIC (compuesto de seis subunidades) (Figura 8) (Geiduschek y Kassavetis, 2001). TFIIIB está constituido por la proteína de unión a la caja TATA (TBP), Brf y B", que son las proteínas que se encargan de reclutar a pol III. TFIIIC recluta a TFIIIB a sus sitios en el DNA, que se encuentran río-arriba del sitio de inicio de la transcripción (SIT). TFIIIA es el factor específico de unión al gen 5S rRNA, formando la plataforma para unir a TFIIIC a estos genes (Figura 8) (Paule y White, 2000).

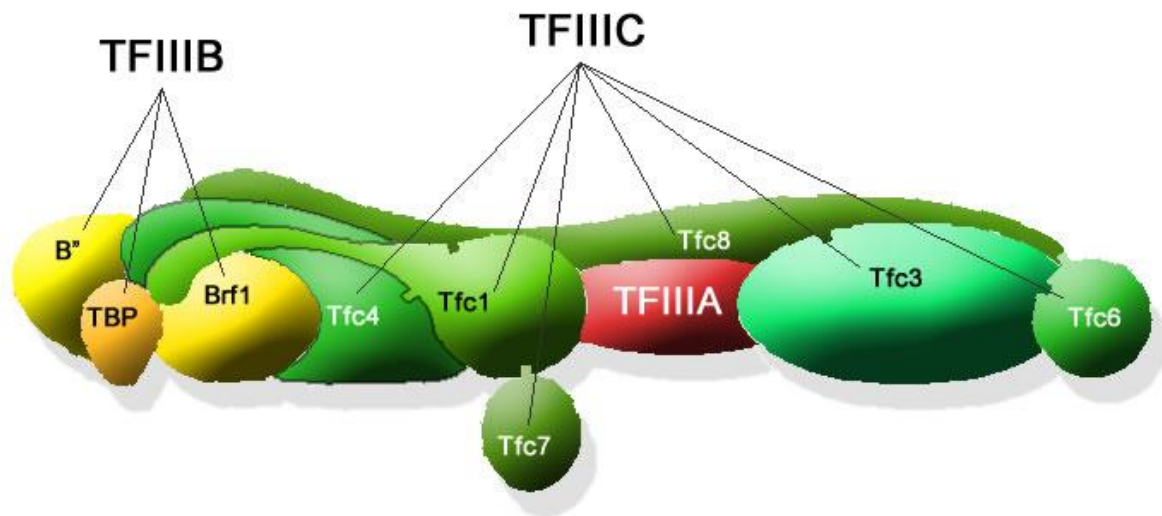


Figura 8. Factores de transcripción generales de Pol III. TFIIIA (rojo); TFIIIB (amarillo), que consta de B", TBP y Brf1; TFIIIC (verde), que tiene 6 subunidades (Tfc 1, 3, 4, 6, 7 y 8). Modificada de (Schramm y Hernandez, 2002).

1.6.2 Transcriptoma de Pol III

Pol III sintetiza el 5S rRNA, los tRNAs, el 7SL RNA, el U6 snRNA y otros RNAs pequeños estables, muchos de ellos involucrados en el procesamiento del RNA. Junto con Pol I domina la transcripción celular, excediendo el 80% de la síntesis total de RNA en células en crecimiento (Paule y White, 2000).

La maquinaria de Pol III hace en gran medida uso de elementos promotores localizados dentro de la región transcrita (Dieci et al., 2007). Estas regiones de control interno son estructuras generalmente discontinuas compuestas de bloques esenciales separados por regiones no esenciales (Paule y White, 2000).

La mayoría de los genes transcritos por Pol III cae dentro de uno de tres grupos bien definidos (tipos I-III), dependiendo de la ubicación o del tipo de elementos que constituyen sus promotores (Figura 9) (Willis, 1993).

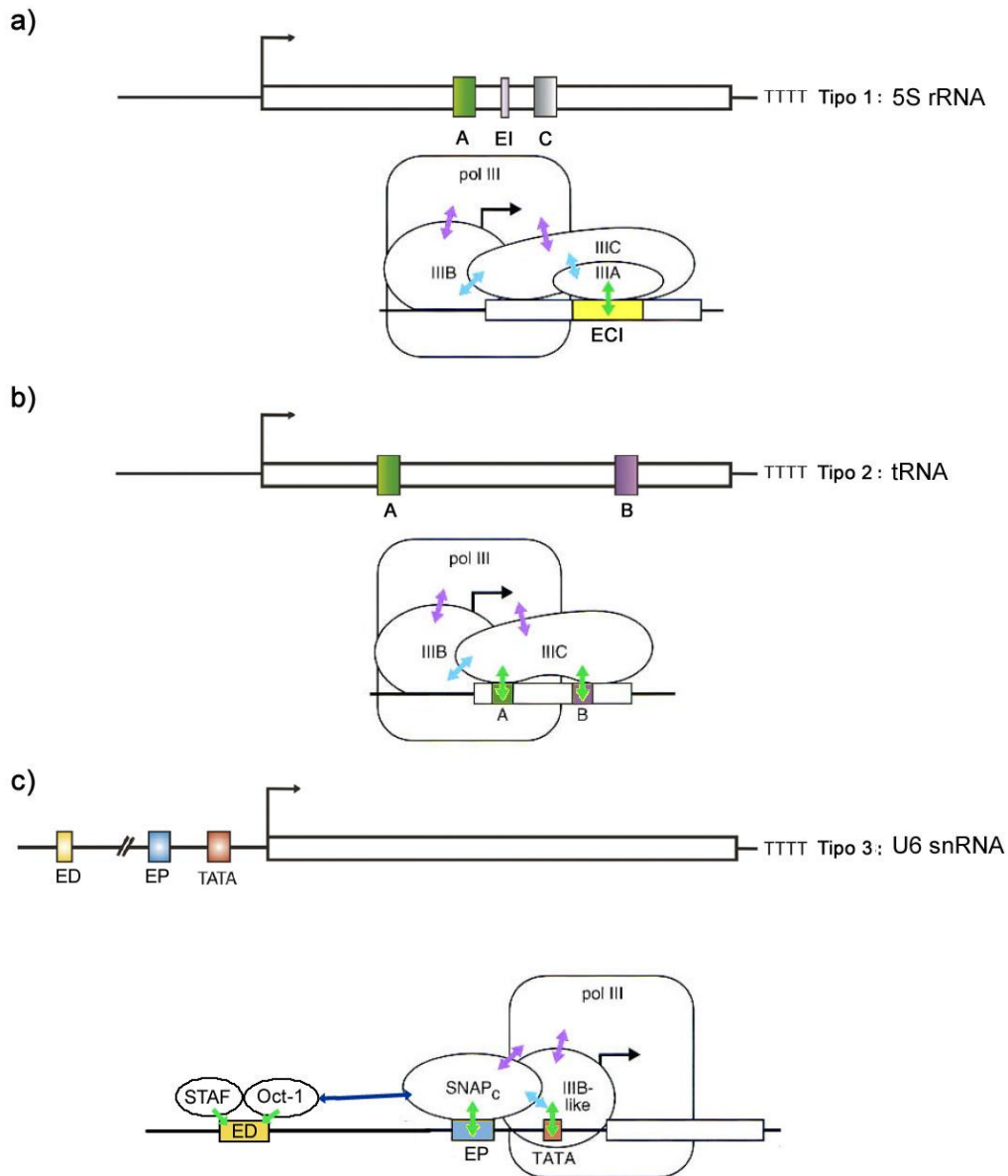


Figura 9. Representación esquemática de los tres tipos de promotores de Pol III. La posición aproximada de los elementos de control, localizados internamente o río-arriba, se encuentra indicada relativamente al SIT (flecha). A, caja A; B, caja B; C, caja C; EI, Elemento intermedio; TTTT, señal de término de la transcripción; EP, elemento proximal; ED, elemento distal; TATA, caja TATA o secuencia TATA-like. Ejemplos de genes representativos de los diferentes tipos de promotores se indican a la derecha. Debajo de cada promotor se muestran los diferentes factores de transcripción principales (TF) que se unen a los diferentes promotores específicos. Las flechas de color azul muestran las interacciones entre FTs, las de color morado las interacciones de FTs con Pol III y las de color verde interacciones de FTs con el DNA. En a) los promotores A, EI y C juntos se les denomina ECI (Elementos de Control Interno). Modificado de (Schramm y Hernandez, 2002; Dieci et al., 2007).

Tipo I. Está presente en los genes del 5S rRNA, que requieren tres elementos promotores: una caja A localizada entre +50 y +64, un elemento intermedio (EI) entre +67 y +72 y una caja C en la región de +80 a + 97 (Figura 9a) (Paule y White, 2000; Willis, 1993). El promotor es relativamente intolerante a cambios en el espacio entre los elementos individuales (Challice y Segall, 1989).

Tipo II. Es característico de los genes de tRNA (Dieci et al., 2007; Paule y White, 2000). Está formado por cajas A y B bien conservadas dentro de la región transcrita (Figura 9b). La caja A se localiza más cerca de la posición +1 (aproximadamente entre +10 a +20), en comparación a la caja A del promotor tipo I, lo que refleja que este elemento promotor participa en la selección del SIT (Willis, 1993). La caja B se localiza a una distancia variable de 30 a 60 pb río-abajo de la caja A. Ambas cajas son reconocidas por el factor de transcripción TFIIC (Dieci et al., 2007).

Tipo III. Se caracteriza por secuencias promotoras que residen exclusivamente río-arriba de la secuencia codificante (Willis, 1993). El promotor tipo III mejor caracterizado pertenece al U6 snRNA de humano. La secuencia requerida para una eficiente expresión es una caja TATA, entre -20 y -25, un elemento proximal (EP) entre -66 y -47 y un elemento distal (ED) entre -244 y -214 (Figura 9c) (Paule y White, 2000). El elemento proximal interactúa con un factor de varias subunidades llamado Complejo Proteico Activador snRNA (SNAPc). El elemento distal contiene sitios de unión (SPH y secuencia octámera) a proteínas Staf y Oct1, respectivamente (Dieci et al., 2007; Hernandez, 2001). Varios genes para Pol III no caen dentro de ninguno de los tres tipos de promotores. Algunos genes presentan secuencias promotoras tanto internas como río-arriba del SIT (Challice y Segall, 1989).

1.6.3 Promotores de snRNAs

En los eucariontes todos los snRNAs son transcritos por Pol II, con la excepción del U6 snRNA que es transcrito por Pol III (Figura 6) (Will y Luhrmann, 2001). Todos los promotores snRNA de los vertebrados contienen un ED, 220 pb río-arriba del SIT, que funciona como intensificador, y un EP a 60 pb del SIT que es un elemento promotor esencial. EP y ED reclutan los mismos factores de transcripción en los diferentes genes snRNA (Figura 10). SNAPc se une a EP y activa el ensamblaje de los complejos iniciadores de la transcripción, mientras que ED contiene a los elementos OCT y SPG que sirven como sitio de unión para los factores de transcripción Oct-1 y Staf. Una característica especial de los promotores U6 snRNA es la presencia de una caja TATA a 25 pb del SIT, que se une a TBP en el complejo TFIIB y conduce al reclutamiento de Pol III (Listerman et al., 2007).

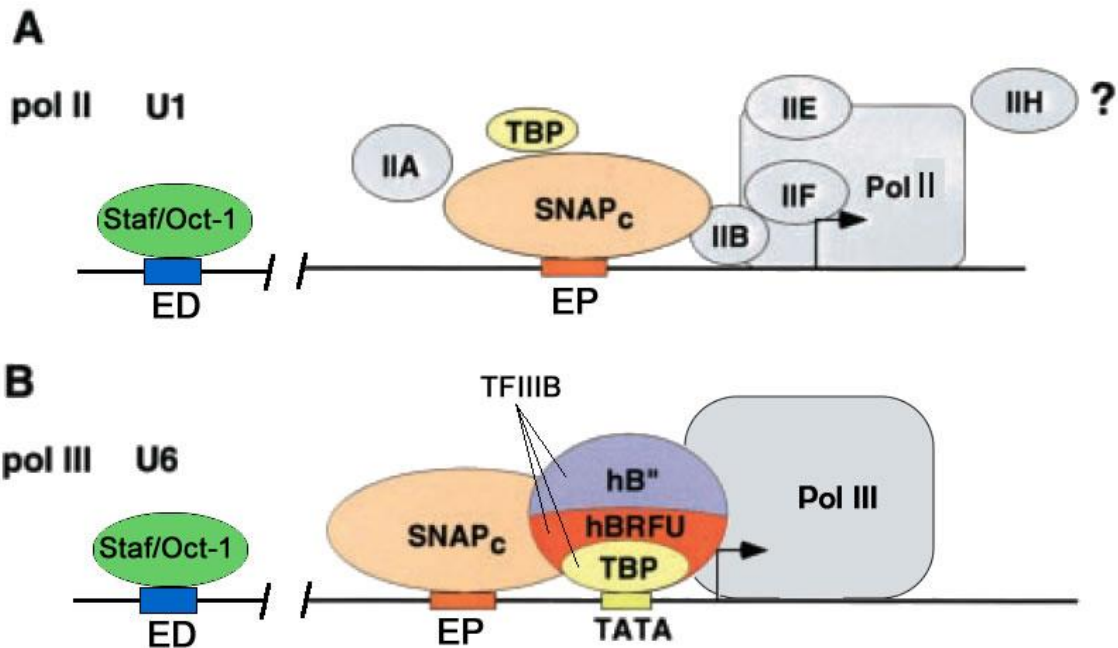


Figura 10. Composición de los complejos de iniciación de la transcripción de snRNAs por Pol II y Pol III en eucariontes. A) El U1 snRNA, que es transcrito por Pol II, tiene como promotores a un elemento proximal (EP) al cual se le une SNAPc y un elemento Distal (ED) al cual se le une Staf y Oct-1, permitiendo la consecuente llegada de los factores de transcripción de Pol II y el posicionamiento de Pol II. B) Pol III transcribe al U6 snRNA. Su promotor es muy parecido al del U1 snRNA, pero tiene una caja TATA río-arriba del SIT, a la cual se une TFIIB; éste recluta a Pol III. Modificado de (Hernandez, 2001).

1.6.4 Procesamiento del mRNA

Tras su transcripción por Pol II, los pre-mRNAs requieren de una serie de modificaciones para su maduración, antes de ser exportados al citoplasma (Figura 11a). Al principio de la transcripción el extremo 5' es modificado por la adición de un casquete (cap), que es un nucleótido modificado referido como 7-metilguanina (m7G). Subsecuentemente, el extremo 3' es modificado por la adición de una larga secuencia de residuos de adenosinas, la cola poli-A (Bolsover y Hyams, 2004). Finalmente, los mRNAs de los eucariontes contienen múltiples secuencias no codificantes, intrones, los cuales deben de ser eliminados para que pueda ocurrir la traducción en los ribosomas. Los intrones están definidos por cuatro secuencias cortas: el sitio de corte 5' ó sitio donador, el sitio de corte 3' ó sitio aceptor, la región de ramificación, y una región rica en pirimidinas (Figura 11b) (Pomeranz, 2005).

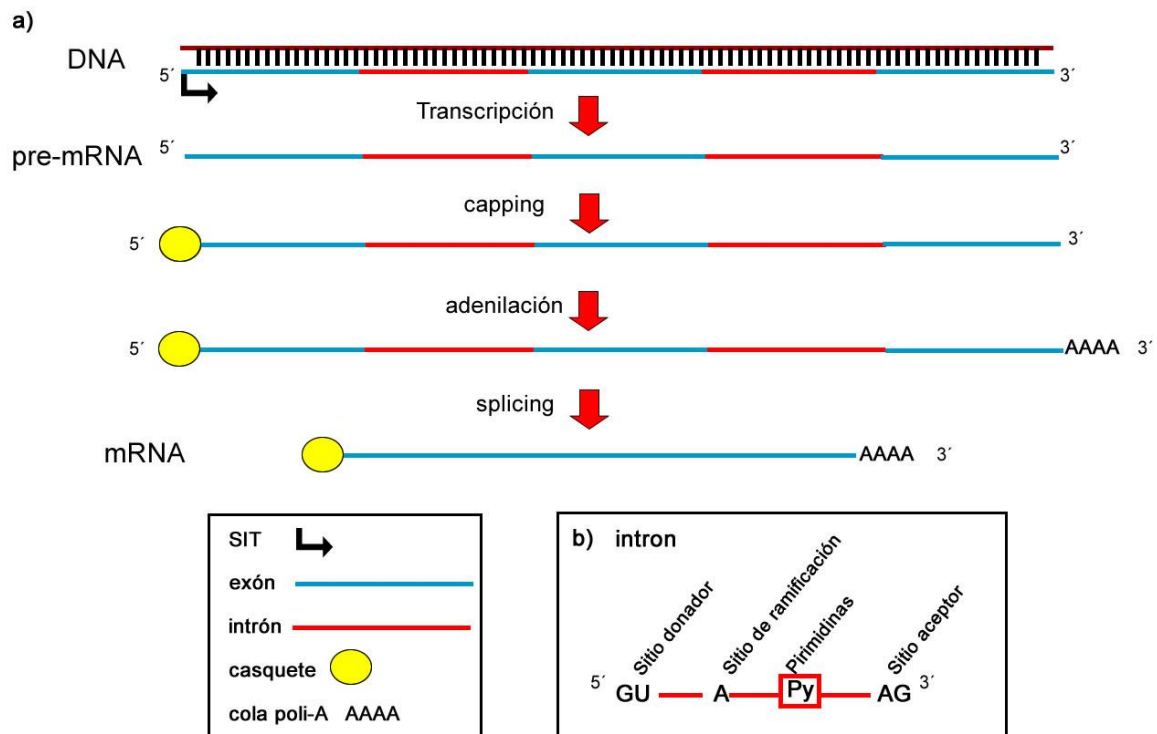


Figura 11. Procesamiento del mRNA. a) modificación del pre-mRNA por capping, adenilación y splicing. b) El intrón presenta cuatro secuencias que son importantes para su eliminación: sitio donador, sitio de ramificación, región rica en pirimidinas y el sitio aceptor.

1.6.5 Splicing, empalmosoma y snRNAs

El proceso de escisión de intrones, conocido como “splicing”, es realizado por un complejo masivo de ribonucleoproteínas pequeñas nucleares (snRNPs) llamado empalmosoma (Nilsen, 2003). El splicing se realiza por una reacción de transesterificación en dos pasos, eliminando al intrón en una estructura con forma de lazo, y generando un producto bi-molecular que consta de los exones 5´ y 3´ unidos (Figura 12 a) (Collins y Guthrie, 2000).

cis-splicing

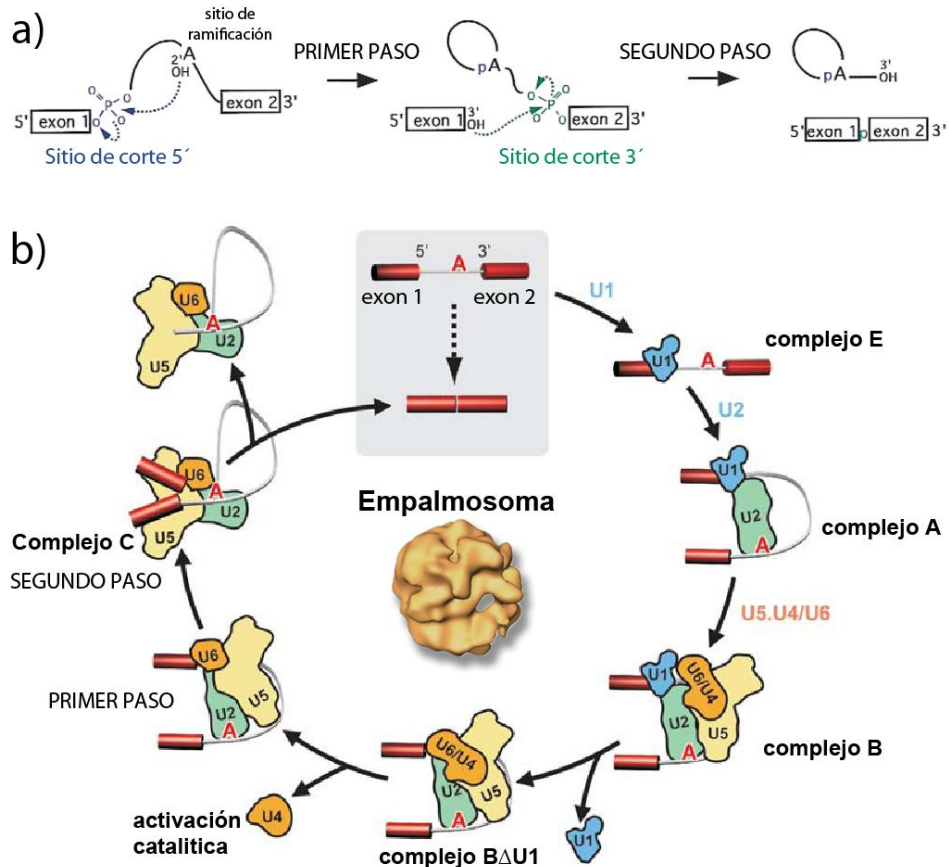


Figura 12. Splicing a) La reacción de splicing del mRNA consta de dos transferencias de grupos fosfatos. En el primer paso, el fosfato del intrón (sitio de corte 5´) es atacado por el hidroxilo 2´ de una A que se ubica en el sitio de ramificación. En el segundo paso, el fosfato del intrón 3´ (sitio de corte 3´) es atacado por el hidroxilo 3´ del exón 1 cortado. Los productos finales de la reacción de splicing son los exones ligados y el intrón cortado en forma de "lazo". b) Representación esquemática del splicing del pre-mRNA y el orden del ensamblaje del empalmosoma. Los intrones son seccionados del pre-mRNA por el empalmosoma que se ensambla por la integración paso a paso de U1, U2 y U4/U6.U5 snRNPs. Modificada de (Collins y Guthrie, 2000; Stark y Luhrmann, 2006).

El empalmosoma está formado por diferentes ribonucleoproteínas pequeñas nucleares (U1, U2, U4, U5 y U6 snRNPs) y por más de 200 proteínas diferentes. Cada snRNP contiene un snRNA diferente (U1-U6) (Figura 13a) (Newman, 2008; Valadkhan, 2007). Los snRNPs U1, U2, U4 y U5 comparten un complejo heptamérico de proteínas Sm con forma de anillo que se une a su respectivo snRNA (Kambach et al., 1999). De igual manera, un complejo similar, llamado Sm-like (LSm), se une específicamente a U6 snRNA. Además, cada snRNP contiene proteínas específicas (Will y Luhrmann, 2001).

Los snRNAs son relativamente cortos, entre 60 y 300 nucleótidos en la mayoría de los organismos. Una característica notable de los snRNAs es su alto grado de conservación en su secuencia y estructura secundaria (tallos y bucles) a través de largas distancias filogenéticas. Estas secuencias conservadas se encuentran principalmente en las regiones de cadena sencilla y corresponden a sitios de unión a proteínas, o a regiones que involucran interacciones RNA-RNA con los sitios de reconocimiento para el corte y empalme del pre-mRNA (Figura 13a) (Padgett, 2005).

Los U4 y U6 snRNAs residen en una snRNP única por su asociación por apareamiento de bases, formando dos hélices intermoleculares (tallo I y tallo II en la Figura 14b y c) (Bringmann et al., 1984). En eucariontes superiores la estructura del U4 snRNA presenta un tallo-bucle en la región 3' (excepto en *S. cerevisiae*), un sitio Sm ubicado casi al final del extremo 3' (al cual se le une el ya mencionado anillo Sm); seguido por un tallo-bucle central (Figura 14c). Asimismo, las proteínas 15.5K y hPrp31 crean un complejo binario por contacto con el tallo-bucle 5' (Figura 14b) (Schultz et al., 2006a). U4/U6 se une además con otras proteínas como CypH, hPrp4 y hPrp3 (Figura 14 b) (Liu et al., 2006). La unión entre estas dos snRNPs es mediada por Prp24 (Raghuathan y Guthrie, 1998a). El complejo U4/U6 se disocia con ayuda del factor de splicing Brr2 y mediante hidrólisis de ATP, justo antes de que el empalmosoma esté listo para la catálisis (Figura 14d) (Raghuathan y Guthrie, 1998b). La separación de U4 y U6 permite a este último

COMPONENTES DEL EMPALMOSOMA

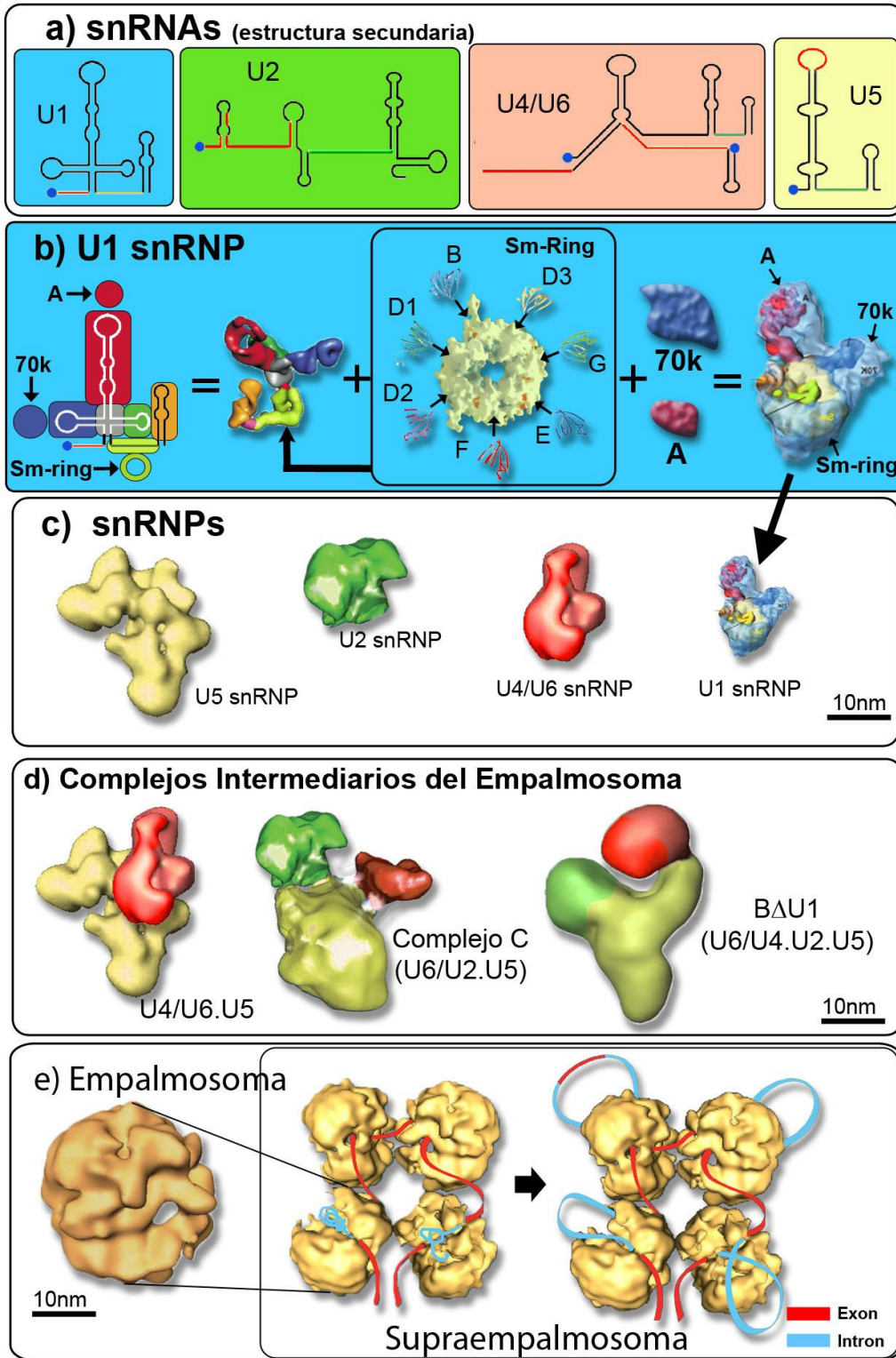


Figura 13. Componentes del empalmosoma. a) Estructura secundaria de los snRNAs U1, U2, U4-U6 y U5. Las líneas paralelas indican apareamiento de bases. Las estructuras conservadas que presentan interacción con el mRNA se muestran en rojo, en verde los sitios de unión con proteínas Sm y en azul el casquete en 5'. b) Estructura tridimensional mediante cryo-EM de U1 snRNA junto con proteínas asociadas (Sm, 70k y A) que forman al complejo ribonucleoproteico U1 snRNP. c) Estructura tridimensional a escala de los complejos snRNPs U5, U2, U4/U6 y U1. d) Complejos intermedios formados por la asociación de los diferentes snRNPs. e) Los complejos snRNPs se encuentran asociados *in vivo* formando al empalmosoma, que a su vez se encuentra asociado con otros empalmosomas formando el supraempalmosoma, el cual realiza el proceso de splicing dentro de las células.

U4/U6 di-snRNP

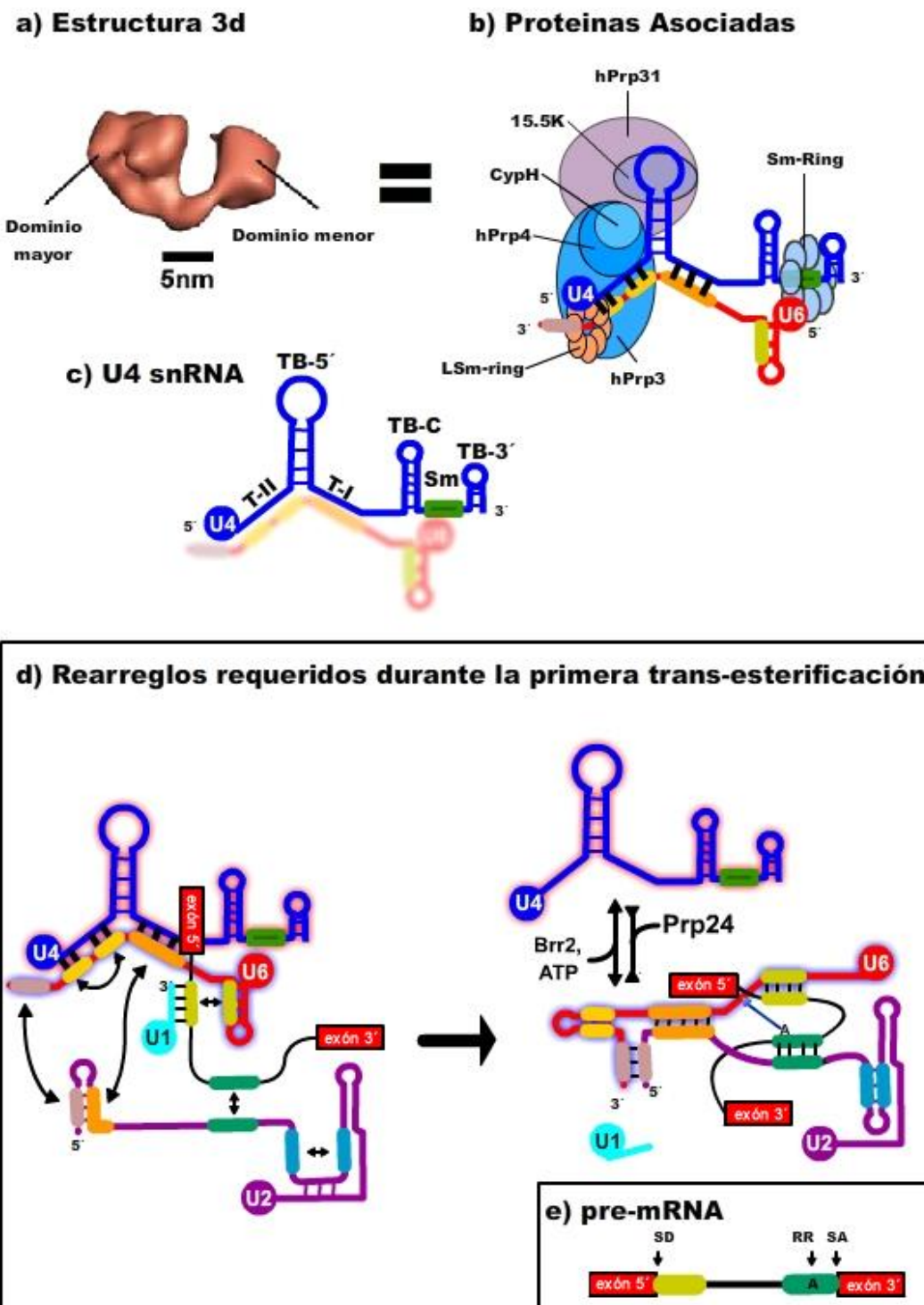


Figura 14. Estructura e interacciones del U4/U6 di-snRNP. a) Estructura 3D de U4/U6 di-snRNP. Dos dominios globulares de tamaño diferente se encuentran conectados por un puente delgado. b) Representación esquemática de las interacciones de U4/U6 snRNAs con proteínas asociadas. c) Estructura secundaria de U4snRNA con sus tallos (T-II y T-I); tallos-bucles (TB-5', TB-C y TB-3') y Sitio Sm. d) Arreglos requeridos para la primera trans-esterificación. Los snRNAs (líneas gruesas) se encuentran coloreados indicando las regiones que se aparean. Prp24 y Brr2/ATP juntan y separan respectivamente a los snRNAs U4 y U6. e) pre-mRNA, con su exón 5'; Sitio Donador, SD; Región de Ramificación, RR; Sitio Aceptor, SA y Exón 3'.

interaccionar con U2 para así formar el sitio catalítico del splicing (Figura 14d) (Staley y Guthrie, 1998).

Microscopía cryo-electrónica (cryo-EM) ha logrado la reconstrucción tridimensional de algunos sub-complejos del empalmosoma (Stark y Luhrmann, 2006). La Figura 13c muestra las estructuras de cuatro complejos snRNP, todos a la misma escala para su comparación. U1 snRNP es la ribonucleoproteína mas pequeña del empalmosoma. Está compuesta por el U1 snRNA, siete proteínas Sm y dos proteínas específicas (U1-A y U1-70K) (Figura 13b) (Stark et al., 2001). Los complejos intermediarios del empalmosoma tienen diferentes estructuras y diferentes snRNPs, algunas mostradas en la Figura 13d (Complejo U4/U6.U2, C y B Δ U1). El complejo C contiene tres de las 5 snRNPs (U2, U5 y U6) (Jurica et al., 2004); la estructura U5.U2/U6 es semejante al complejo C; la estructura pre-catalítica del empalmosoma o complejo B tiene todos las snRNPs con excepción de U1 snRNP (B Δ U1) (Boehringer et al., 2004); el complejo A contiene a U1 y U2 (Behzadnia et al., 2007).

El ensamblaje *in vitro* del empalmosoma requiere de una serie de cambios conformacionales y de interacción por pasos entre los snRNPs, así como de un número de factores de splicing que son dinámicamente reclutados al empalmosoma cuando un pre-mRNA se presenta (Figura 12 b) (Sperling et al., 2008). La formación del empalmosoma inicialmente requiere de la interacción de U1 y U2 snRNPs con el sitio de corte 5' y la región de ramificación, respectivamente, generando el pre-empalmosoma o complejo A. El U4/U6.U5 tri-snRNP, en el cual U4 y U6 snRNAs se encuentran apareados por complementariedad de bases, se une establemente para formar el complejo B, el cual aún no tiene un centro catalítico. Para la activación catalítica del empalmosoma, el complejo B conlleva una serie de cambios en su estructura que involucra la disociación de las hélices U4-U6 RNA y la formación de una intrincada red de interacciones entre las moléculas U6, U2 y el pre-mRNA, las cuales juntas

constituyen parte del núcleo catalítico del empalmosoma. Antes de este arreglo de RNAs, U1 snRNP necesita disociarse del sitio de corte 5´.

El complejo B activado continúa con el primer paso catalítico del splicing, generando el complejo C. El complejo C realiza el segundo paso catalítico que posteriormente formará al complejo post-empalmosoma que contendrá al intrón y al producto mRNA que será liberado (Stark y Luhrmann, 2006). Así, *in vitro* el splicing ocurre como una serie de pasos secuenciales en donde los componentes individuales del empalmosoma se unen y separan del mRNA (Figura 12b). Sin embargo, *in vivo* todos los snRNPs forman parte del empalmosoma desde un principio, y cambios conformacionales del complejo en su conjunto regulan en tiempo y espacio las interacciones de los snRNPs individuales con el pre-mRNA (Figura 13e) (Nilsen, 2002; Azubel et al., 2006).

1.7 Transcripción en cinetoplástidos

La transcripción en los cinetoplástidos muestra variaciones substanciales de los paradigmas de la expresión genética presentes en los eucariontes superiores. Entre las características distintivas de este grupo de organismos se encuentran las siguientes: transcripción policistrónica, escasez de promotores de Pol II, ausencia de regulación en la iniciación de la transcripción para la mayoría de los genes codificadores de proteínas, transcripción de algunos genes que codifican para proteínas por Pol I (Figura 15), ubicación subnuclear exclusiva para la transcripción de glicoproteínas variables de superficie (VSG), dependencia de la transcripción de genes snRNA de genes tRNA localizados río-arriba, síntesis de tRNA mitocondriales en el núcleo y la edición del mRNA mitocondrial (Schnauffer et al., 2003; Campbell et al., 2003).

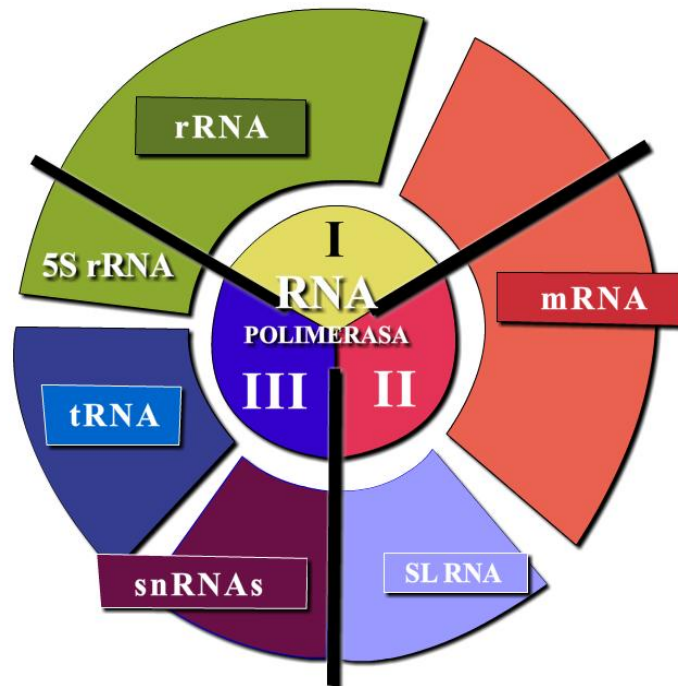


Figura 15. Espectro de la transcripción en tripanosomátidos. En el círculo central se encuentran los tres tipos de RNA Polimerasas: Pol I (amarillo), Pol II (rojo) y Pol III (azul). En el círculo externo se indican los genes transcritos por cada RNA Polimerasa: mRNAs (naranja), snRNAs (morado), tRNA (azul), SL RNA (violeta) y rRNA (verde). En los tripanosomátidos todos los snRNAs son sintetizados por Pol III y algunos mRNAs codificadores de proteína son sintetizados por Pol I. El SL RNA es sintetizado por Pol II. Modificada de (Campbell et al., 2003).

1.7.1 Organización genómica en tripanosomátidos

La comparación del contenido genético y la arquitectura de *T. brucei*, *Trypanosoma cruzi* y *L. major* (conocidos como los Trityps) reveló una fuerte conservación del orden de los genes (sintenia) y un proteoma conservado de alrededor de 6200 genes ordenados en unidades policistrónicas largas (decenas a cientos de genes codificadores de proteínas en un arreglo secuencial en la misma hebra de DNA). El genoma de *L. major* tiene un tamaño de 32.8 megabases (Mb) y está distribuido entre 36 cromosomas diploides que tienen un rango de tamaño de 0.28 a 2.8 Mb. Se han predicho 911 genes de RNA, 39 pseudogenes y 8272 genes codificadores de proteínas, habiendo una densidad de 252 genes por Mb, de los cuales sólo al 36% se les ha atribuido una función (Ivens et al., 2005).

El análisis de la secuencia del cromosoma 1 de *L. major*, el más pequeño del parásito, reveló la presencia de 79 genes. Los primeros 29 genes se encuentran en una unidad policistrónica en la hebra de DNA de abajo, mientras que los otros 50 se localizan en la cadena de arriba (Myler et al., 1999). Ensayos de “run-on” nucleares y de 5´-RACE con sondas específicas para los genes del cromosoma 1 demostraron que la transcripción de las unidades policistrónicas inicia en la región de cambio de orientación de genes, en forma bidireccional y divergente en dirección hacia los telómeros (Martinez-Calvillo et al., 2003). En contraste con el cromosoma 1, el cromosoma 3 contiene dos unidades policistrónicas largas de 67 y 30 genes que inician su transcripción a partir de los telómeros y que convergen en un gen de tRNA, además de un solo gen ubicado a la izquierda que es transcrito divergentemente hacia los telómeros (Martinez-Calvillo et al., 2004; Worthey et al., 2003). Arreglos similares están presentes en el resto de los cromosomas de *L. major*, y en los cromosomas de *T. brucei* y *T. cruzi*. En los cromosomas más largos hay más cambios en la dirección de la transcripción, además de genes transcritos por Pol I y Pol III. El arreglo de genes en los tripanosomátidos es reminiscente al de los operones de bacterias. Sin embargo, a diferencia de los operones de bacterias, los genes presentes en las unidades policistrónicas de los tripanosomátidos no comparten una misma función (Clayton, 2002). Resulta interesante el hecho de que la mayoría de las regiones codificadoras de proteínas no se encuentran interrumpidas por intrones en los tripanosomátidos.

1.7.2 Procesamiento de los mRNA en tripanosomátidos

En los tripanosomátidos la generación de mRNAs maduros, a partir de precursores policistrónicos (pre-mRNA), es realizada a través del procesamiento del RNA por trans-splicing en el extremo 5´ y la consecuente poliadenilación en el extremo 3´ (Matthews et al., 1994). El trans-splicing implica la unión por transferencia de un RNA de 39 nucleótidos (nt) con casquete (cap), llamado miniexón, a los extremos 5´ de cada mRNA (Figura 16) (Ullu et al., 1993).

La estructura secundaria del RNA precursor del miniexón (de 140 nt) presenta 3 tallos-asas. La secuencia de 39 nucleótidos es seguida de un intrón de longitud variable que está compuesto de dos tallos-asas que están separados por una región lineal que es análoga a la región de los snRNAs a la que se unen las proteínas Sm (Liang et al., 2003; Bruzik et al., 1988). Una característica importante del miniexón es la presencia de un casquete hipermodificado, nombrado Cap4 debido a que los 4 nucleótidos después del m7G se encuentran modificados (Zamudio et al., 2007). El casquete juega papeles esenciales en la traducción y la estabilidad de los mRNA en eucariontes (Shatkin y Manley, 2000).

Los genes del miniexón son transcritos por Pol II (Gilinger y Bellofatto, 2001), y se encuentran típicamente repetidos de 100 a 200 veces por genoma, con un arreglo en tándem (Figura 16). Su transcripción abarca el 6% del total de síntesis de

Transcripción policistronica y Trans-splicing

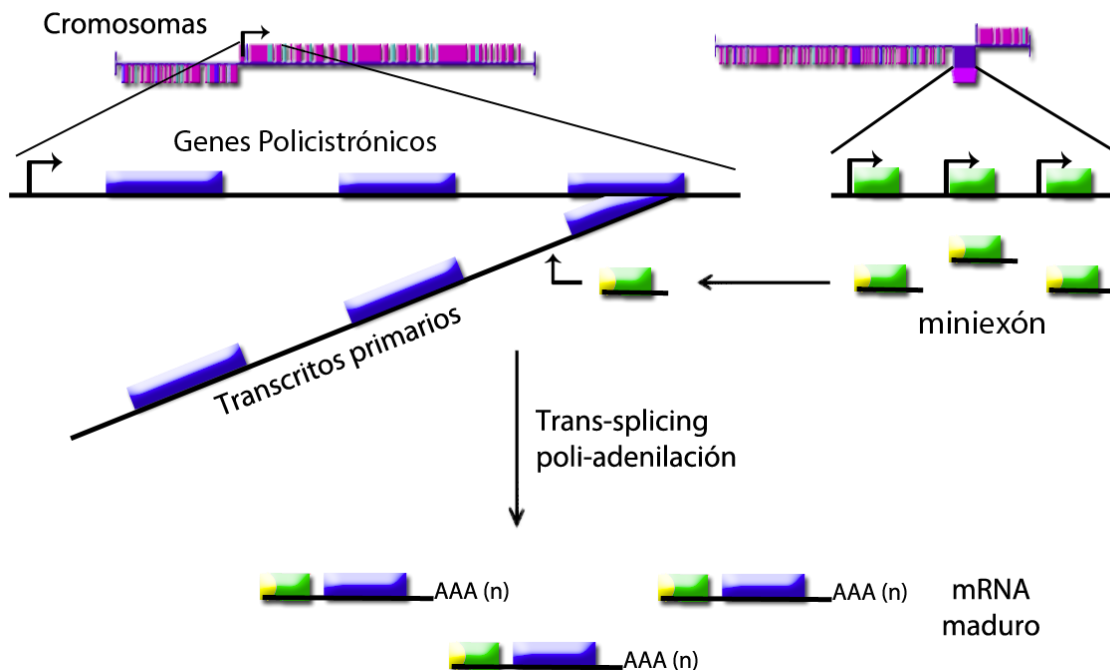


Figura 16. Representación esquemática de la transcripción policistronica y el trans-splicing. A la izquierda se muestra la producción de un transcritos policistronico largo que proviene de un cromosoma; a la derecha, la transcripción y procesamiento de una repetición en tándem del gen del miniexón. En el centro se ejemplifica el proceso de poliadenilación y trans-splicing, donde cada cistron es escindido de la unidad policistronica y se le incorpora en su extremo 5' un miniexón, para generar mRNA maduros.

RNA. Los promotores para su transcripción se encuentran río-arriba del gen y sus elementos críticos en *cis* consisten de dos elementos en -60 y en -30, y en la mayoría de los casos un elemento en -5. Los elementos río-arriba se asemejan al EP de genes snRNA en humanos (Yu et al., 1998; Campbell et al., 2000).

1.7.3 Empalmosoma y snRNAs de tripanosomátidos

De igual manera que el splicing en los eucariontes superiores, el trans-splicing se realiza a través de una reacción de trans-esterificación en dos pasos. Sin embargo, en los tripanosomátidos como producto intermediario se genera un intrón con una estructura en forma de Y (Figura 17) (Murphy et al., 1986). El trans-empalmosoma, que es responsable de unir el miniexón a todos los mRNAs, requiere de los snRNPs U1, U2, U4, U5 y U6. Los componentes del trans-empalmosoma necesitan ser reclutados en un orden preciso. El modelo más aceptado sugiere que el ensamblaje es iniciado por el reconocimiento del sitio de ramificación por U2 snRNP. Este reconocimiento depende de la secuencia del sitio aceptor 3' y de las interacciones entre un intensificador y proteínas ricas en serina (proteínas SR) (Ismaili et al., 1999; Lopez-Estrano et al., 1998). Después ocurre la interacción de U1 snRNP con el sitio donador 5' (Schnare y Gray, 1999; Mair et al., 2000). El ensamblaje del trans-empalmosoma continuaría hacia un complejo catalíticamente competente con el reclutamiento del miniexón (SL) y U4/U6/U5 snRNP, formando el complejo tetra-snRNP (SL-U4/U6/U5). Este complejo permitiría el reconocimiento simultáneo del sitio donador 5' y el sitio aceptor 3'. La transición desde el complejo que contiene a U2 snRNP hasta la formación completa del trans-empalmosoma también es dependiente de la función de las proteínas SR (Furuyama y Bruzik, 2005).

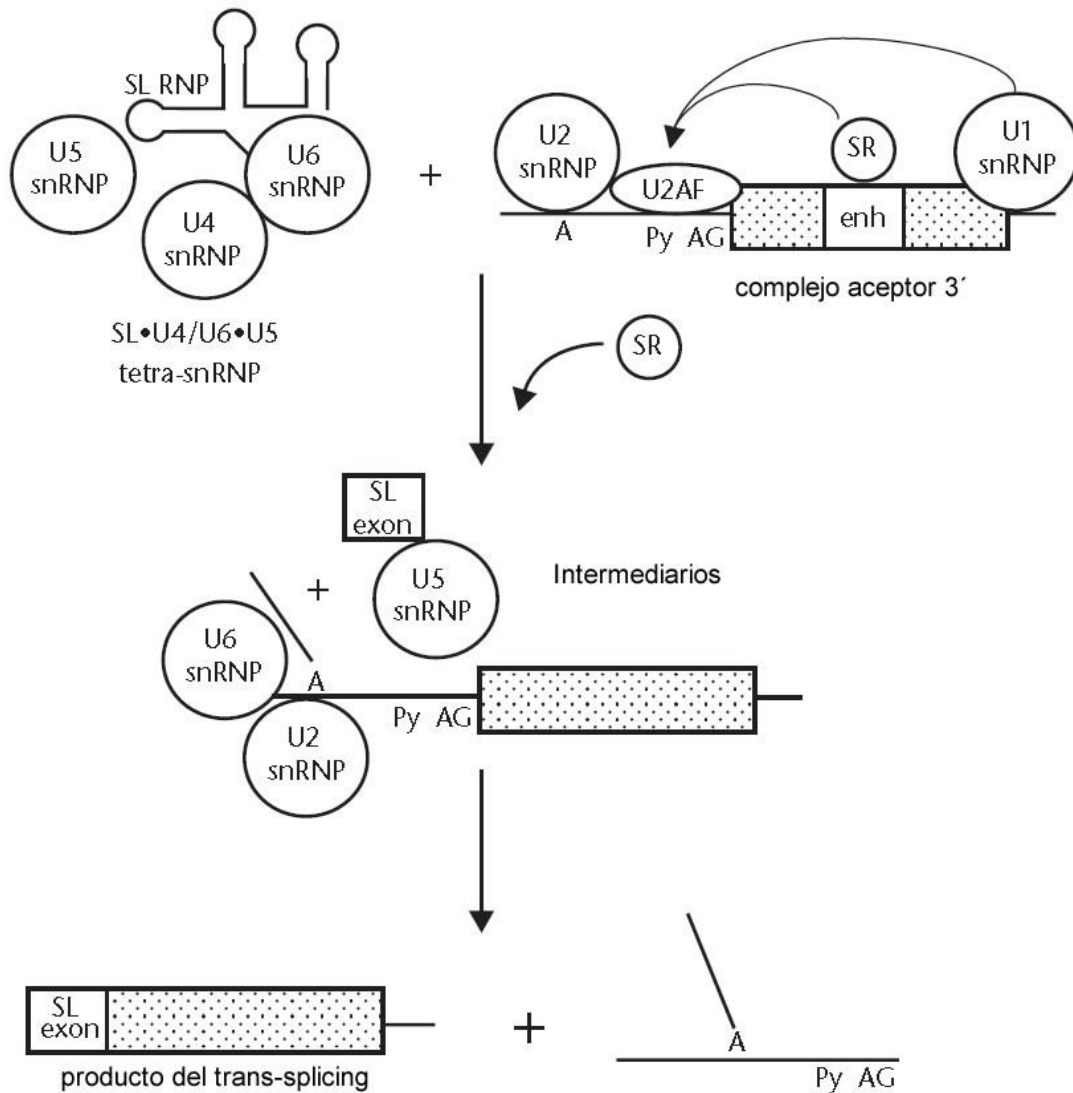


Figura 17. Ensamblaje del trans-empalmosoma. El pre-mRNA presenta un sitio de corte en 3' (sitio receptor AG) que interactúa con U2 snRNP, asistido por interacciones con proteínas SR unidas a amplificadores del splicing (Enh) o por las interacciones de U1 snRNP unido río-abajo en el sitio donador (definiendo al exón). El SL (miniexon) RNP interactúa con el U4/U6.U5 tri-snRNP para formar el complejo SL.U4/U6.U5 tetra-snRNP. En una manera dependiente de proteínas SR, estos complejos iniciales se asocian funcionalmente, llevando a cabo el primer paso catalítico de la reacción, generando el Exón SL y la ramificación en forma de Y como productos intermedios. En el segundo paso de la reacción se forma el producto del trans-splicing (mRNA) ya editado.

1.8 Antecedentes

Pol III no ha sido totalmente caracterizada en tripanosomátidos. El análisis *in silico* del genoma de *L. major* indicó 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: C160, C128, C82, C53, C37, C34, C17, AC40, AC19, ABC27, ABC23 y ABC14.5 (Martinez-Calvillo et al., 2007).

A nivel de secuencia, los primeros promotores de Pol III identificados en cinetoplástidos fueron los promotores tipo I (caja A y caja C) en el gen 5S rRNA (Cordingley, 1985). Sin embargo, no se ha realizado el análisis funcional de dichos promotores. Por otro lado, la secuencia de los elementos promotores clase II (caja A y caja B) se encuentra conservada en todos los genes tRNA (Padilla-Mejia et al., 2009). De manera interesante, la transcripción de los genes U1-U6 snRNAs es realizada por Pol III en los tripanosomátidos (Figura 15), representando una gran diferencia en comparación a otros eucariontes, donde los genes correspondientes a U1-U5 son transcritos por Pol II (Figura 6) (Noonberg et al., 1996). Sin embargo, los elementos característicos de los promotores clase III (EP y ED) del U6 snRNA de vertebrados no se encontraron en los snRNAs de *T. brucei*. En este organismo, la transcripción de los U snRNAs dependen de las cajas A y B de un gen de tRNA (o tRNA-like) localizado río-arriba de éstos, mientras que la iniciación adecuada también requiere de una secuencia localizada al principio del gen U snRNA (Figura 18) (Nakaar et al., 1997). La mayor parte de los estudios en relación con los promotores de los genes snRNA transcritos por Pol III para los tripanosomátidos ha sido realizada en *T. brucei*. El promotor del U6 snRNA exhibe dos elementos esenciales y suficientes, que constituyen las cajas A y B de un tRNA^{Thr} localizado divergentemente río-arriba a 97 pb. Además, las primeras bases del snRNA participan en el posicionamiento de Pol III en el SIT (Figura 18) (Nakaar et al., 1997). El U2 snRNA presenta también estos 3 elementos promotores, con cajas A y B formando parte de una secuencia semejante a un tRNA (tRNA-like) (Fantoni et al., 1994; Gunzl et al., 1995). De igual manera el U1 snRNA presenta un tRNA-like con las cajas A y B localizadas en la posición -105 y -168 respectivamente; sin embargo, sustituciones de +2 a +10 no fueron necesarias como elemento intergénico (Djikeng et al., 2001). El U5 snRNA tiene primero una secuencia tRNA-like a una distancia de 96 pb del SIT y después un

tRNA^{Leu}, ambos orientados divergentemente a U5 snRNA. En *Leptomonas collosoma* y *Leptomonas seymouri* los tRNAs a distancias de 95 a 96 pb participan en la transcripción del U5 snRNA (Bell y Bindereif, 1999; Xu et al., 1997).

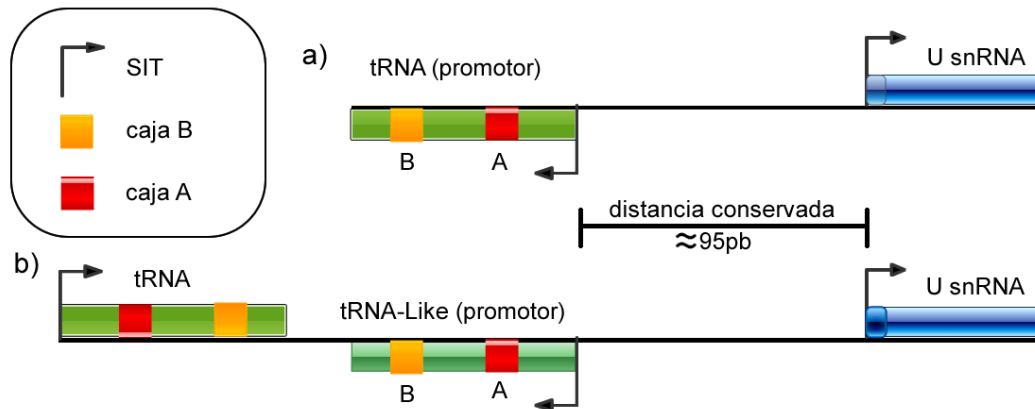


Figura 18. Las cajas A y B de un tRNA o tRNA-like funcionan como promotores para los genes de U snRNAs en tripanosomátidos. a) U snRNA dependiente de cajas A y B de un tRNA. b) U snRNA dependiente de cajas A y B de un tRNA-like. En algunas ocasiones se presentan otros tRNAs en las inmediaciones del snRNA (en la cadena superior o inferior, a distancias mayores de ~95 pb), pero no participan como promotores.

El análisis de la secuencia del locus U4 snRNA en *L. collosoma* indicó la presencia de un tRNA-like divergente a 86 pb del U4 snRNA. El tRNA-like es seguido de dos tRNAs, un tRNA^{Pro} convergente al tRNA-like y un tRNA^{Gly} divergente a U4snRNA. Se ha demostrado que el tRNA-like es esencial para la expresión de U4 snRNA y no los otros genes de tRNA (Li et al., 2000).

A pesar del papel tan importante que llevan a cabo los snRNAs, a la fecha no se ha caracterizado ninguna de sus regiones promotoras en *Leishmania*. De hecho, ninguna región promotora de Pol III ha sido estudiada en este organismo. La identificación de las secuencias que controlan la síntesis de los snRNAs permitirá lograr un mejor entendimiento de los mecanismos que regulan la expresión génica en este protozoo parásito.

2. Objetivos

Objetivo general:

Caracterizar funcionalmente la región promotora del RNA pequeño nuclear (snRNA) U4 en el protozooario parásito *Leishmania major*.

Objetivos particulares:

1. Analizar la localización genómica del U4 snRNA de *L. major* y compararla con la de otros tripanosomátidos.
2. Comparar la secuencia del U4 snRNA de *L. major* con las secuencias homólogas presentes en otros tripanosomátidos.
3. Generar la estructura secundaria del U4 snRNA de *L. major* y de los elementos génicos asociados a él.
4. Determinar la posición del primer nucleótido transcrito en el gen del snRNA U4.
5. Clonar en el vector pGEM-T un fragmento de DNA que contenga el gen del snRNA U4 y secuencias flanqueantes. Introducir una secuencia "tag" en dicho gen.
6. Elaborar una serie de plásmidos que contengan diferentes regiones de la probable secuencia promotora del gen de snRNA U4.
7. Localizar las secuencias esenciales para la síntesis del snRNA U4, analizando su nivel de expresión en células transfectadas con los diferentes plásmidos.

3. Materiales y Métodos

3.1 Bioinformática

Las secuencias de U4 snRNA y secuencias contiguas de *L. major* y de otros organismos fueron obtenidas de bases de datos como NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) y GeneDB (<http://www.genedb.org/>). Éstas fueron comparadas mediante el programa informático de alineamiento de secuencias de tipo local (BLAST) (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>; <http://www.genedb.org/genedb2/blast/>) y analizadas con el paquete informático de biología molecular DNAMAN 5.2.10 (<http://www.lynnon.com/>). La estructura secundaria de RNAs de transferencia se obtuvo del servidor web tRNAscan-SE (<http://lowelab.ucsc.edu/tRNAscan-SE/>) (Lowe y Eddy, 1997); para los snRNAs la estructura secundaria se determinó con el servidor RNA-Fold (<http://rna.tbi.univie.ac.at/cgi-bin/RNAfold.cgi>), RNA-Alifold (<http://rna.tbi.univie.ac.at/cgi-bin/RNAalifold.cgi>) y M-Fold (<http://mfold.bioinfo.rpi.edu/cgi-bin/rna-form1.cgi>), basados en el algoritmo de Michael Zuker (Zuker, 2003); así como también con el programa RNAdraw (<http://www.rnadraw.com/index.html>) (Matzura y Wennborg, 1996). El alineamiento probabilístico para la predicción de la estructura secundaria de los RNAs (PARTS) se examinó con el software RNA structure 5.0 (<http://rna.urmc.rochester.edu/index.html>) (Harmanci et al., 2008). La visualización de las secuencias se realizó con el editor de secuencias BioEdit 7.0.9.0 (<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>). El diseño de oligonucleótidos también se realizó con el software DNAMAN.

3.2 Cultivo y conteo de promastigotes de *Leishmania*

Promastigotes de la cepa *L. major* MHOM/IL/81/Friedlin fueron crecidos a 25°C en medio de cultivo líquido BM (Infusion corazón-cerebro 2X, M199 5X, Hepes 1 M pH 7.5, Hemina 2 mg/ml, Biotina 0.1%, Biopterina 0.5 mg/ml, Penicilina 10,000 u/ml y estreptomycin 10 mg/ml) hasta que alcanzaron la fase media de crecimiento.

Para realizar el conteo celular, el cultivo fue diluido 1:10 en formaldehído al 2 % (50 μ l del cultivo con 450 μ l de formaldehído). De la dilución se tomaron 10 μ l y se colocaron en la cámara de Neubauer para contar el número de parásitos de los 4 cuadrados en diagonal que están dentro de cada uno de los cuatro cuadrantes principales. La suma total se multiplicó por 1×10^5 para obtener el número de parásitos por ml.

3.3 Extracción de DNA genómico

Se centrifugaron 3×10^8 promastigotes de *L. major* a 5,000 rpm durante 10 minutos a 4°C (centrífuga de mesa HERMLE Z 383 K); posteriormente la pastilla se resuspendió en una solución de lisis que contiene 5 μ l de SSC 1X (NaCl 3 M y citrato de sodio 0.6 M), 4.5 ml de TNE (Tris 40 mM pH 7.6, EDTA 1 mM pH 8.0 y NaCl 15 M), 0.5 ml de Sarcosyl al 10% y 100 μ g de proteinasa K. La reacción se agitó en vortex (Daigger Genie 2) y después se mantuvo durante 2 horas a 55°C. A continuación se adicionaron 0.5 volúmenes de fenol y 0.5 volúmenes de alcohol isoamílico, se agitó con vortex y se centrifugó a 4,000 rpm durante 8 minutos a 4°C.

La fase acuosa se transfirió a un tubo falcon de 50 ml, 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 9,000 rpm por 15 minutos y se lavó la pastilla con etanol al 70%, para finalmente resuspender el DNA en 300 μ l 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 260 nm (1 D.O. a 260 nm = 50 μ g/ml).

3.4 Extracción de RNA total

Los cultivos en la fase media de crecimiento logarítmico se centrifugaron a 5,000 rpm durante 10 minutos a 4°C. El pellet de células fue lisado pipeteando repetidamente con 750 μ l del reactivo Trizol (Life Technologies) o Tri (Sigma) por cada 5×10^7 células. Las muestras homogenizadas se incubaron por 5 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente para la fase de separación se adicionaron

200 μl de cloroformo por cada 5×10^7 células y se agitó vigorosamente por 15 segundos para después ser incubadas por 2 minutos a temperatura ambiente y centrifugadas a 12,000 g por 15 minutos a 5°C . Este proceso generó una fase roja de fenol-cloroformo (ubicada abajo), una interfase, y arriba la fase acuosa transparente que tiene el RNA. Para precipitar el RNA, la fase acuosa fue transferida a un tubo nuevo y se mezcló con 500 μl de alcohol isopropílico por cada 5×10^7 células; después fue incubada a temperatura ambiente por 10 minutos y centrifugada (Sorvall Legend Micro 21 R) a 12,000 g por 10 minutos a 5°C . Inmediatamente después se retiró el sobrenadante y la pastilla de RNA se lavó con etanol al 75%, se dejó secar por 10 minutos y se disolvió en un volumen de 20-50 μl de agua DEPC. La concentración de RNA se determinó con un espectrofotómetro (Jenway genova) a 260 nm ($1 \text{ D.O. a } 260 \text{ nm} = 40 \mu\text{g/ml}$).

3.4.1 Tratamiento de RNA con DNasa I

Para eliminar DNA contaminante a las muestras de RNA, se trataron 5 μg de RNA total con DNasa I, en un tubo eppendorf de 0.6 ml. Para ello, se adicionó 1 μl de buffer 10X de DNasa I, 3 μl de DNasa I (3 Unidades, Invitrogen) y se llevó a un volumen final de 50 μl con agua DEPC. Todo se mezcló y se incubó a temperatura ambiente por 15 minutos. Para inactivar a la DNasa I, se adicionó 1 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 . Después se centrifugó a 14,000 rpm durante 15 minutos a 4°C ; la pastilla se dejó secar por 5 minutos. El botón obtenido (RNA total) se resuspendió en 5 μl de agua DEPC.

3.5 Electroforesis en geles de agarosa

El DNA de los diferentes experimentos fue analizado en geles de agarosa (Agarose D-1 low EEO PRONADISA) a diferentes concentraciones (de 1 - 2.5%) con amortiguador TBE 1X (Tris Base-HCl 5.4%, ácido bórico 2.74% y EDTA 0.46%) y 0.1 $\mu\text{g/ml}$ de bromuro de etidio. Los geles se corrieron inmersos en amortiguador TBE 1X dentro de una cámara de electroforesis (Gel XL Ultra V-2,

Labnet) a 25-100 voltios durante tiempo variable. Las moléculas de DNA fueron resuspendidas en amortiguador de carga 1X (azul de bromofenol 0.25%; xilen cianol 0.25%; glicerol 30%) y visualizadas junto con marcadores de peso molecular (1 kb DNA ladder, Invitrogen; 100 pb ladder PROMEGA) en un transiluminador de luz ultravioleta (Transilluminator M-26 UVP) y fotografiadas en un aparato FUJIFILM FLA-500.

3.6 Recuperación de DNA de geles de agarosa

Para realizar la purificación de fragmentos de DNA contenidos en geles de agarosa primero se visualizó y cortó en el transiluminador el fragmento de interés. Posteriormente se pesó el fragmento, se adicionan 3 volúmenes del buffer QC (por cada volumen de agarosa), se incubó a 50°C por 10 minutos para disolver el gel, vortexeando frecuentemente para homogenizar la muestra durante la incubación. Después de que se disolvió completamente el gel se añadió un volumen de isopropanol, se transfirió la mezcla a la columna (Quiaquick spin column, QIAGEN) y se centrifugó (SORVALL Legend Micro 17) por 1 minuto a 13,000 rpm. Para lavar y eliminar las trazas de agarosa de la columna, se adicionaron los bufferes QG y PE, y se centrifugó por 1 minuto a 13,000 rpm respectivamente. Finalmente, el DNA de la columna se eluyó en un volumen de 20-50 µl en un tubo nuevo.

3.7 Eliminación de sales de muestras de DNA

La desalación de las muestras de DNA se llevó a cabo con el kit QIAEX II (QIAGEN). Este método es utilizado para purificar fragmentos de DNA en soluciones acuosas, como por ejemplo las reacciones de PCR que presentan sales, enzimas, dNTPs, etc. Por cada volumen de muestra se agregaron 3 volúmenes de buffer QXI, se vortexeó durante 30 segundos, se adicionaron 10 µl de partículas QIAEX II y se incubó por 10 minutos mezclando cada dos minutos para mantener las partículas en suspensión. Más tarde se centrifugó la muestra por 30 segundos y se eliminó el sobrenadante. Finalmente se lavó el pellet dos veces con 500 µl de buffer PE, se dejó secar por 15 minutos hasta que el pellet tomara un color blanco y se eluyó en 20 µl de agua.

3.8 Amplificación de DNA por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Para amplificar secuencias específicas de DNA se realizaron múltiples reacciones de PCR utilizando diferentes DNA polimerasas (Pfu Ultra, Stratagene; Pfu, Stratagene; Platinum Pfx, Invitrogen; Red Taq, Sigma) con diferentes eficiencias de copiado (fidelidad), dependiendo de la precisión requerida para los experimentos. Los PCRs requirieron de añadir a un tubo de PCR su respectivo buffer de reacción 1X, mezcla de dNTPs 10mM, en algunas ocasiones $MgSO_4$ ó $MgCl_2$, los oligonucleótidos sentido y antisentido específicos (0.1-10 μM cada uno), el DNA templado (normalmente 10-100 ng), la polimerasa respectiva (0.5-2.5 unidades) y finalmente todo esto se llevó a un volumen de 50 μl de agua bidestilada. Después, la mezcla se introdujo al termociclador (Cycler Corbett Research) en donde se efectuaron las reacciones de iniciación a 94°C por 1 minuto; 30 ciclos de: desnaturalización a 94°C por 30-60 segundos, alineamiento durante 1 minuto a temperatura variable (45-55°C), extensión a 72°C durante 1-2 minutos (dependiendo de la velocidad de la polimerasa y del tamaño del DNA). Finalmente, un ciclo de extensión final a 72°C durante 1-2 minutos. En la Tabla 2 y la Figura 33 se muestran los oligonucleótidos utilizados para crear los insertos que se ligaron en los plásmidos pGEM-T o pGEM-T Easy para formar los vectores pU4-Full, pU4-Tag, pU4 Δ tRNA PRO, pU4 Δ B, pU4 Δ A y pU4 Δ All.

Oligonucleótido	Secuencia	Experimento
1 3'Lmj1RNAPro	ACGGTCCAGTGGTCTAGTGG	pU4-Full
2 U4tRNA-like5	GAAAAAGGAGCGCCGCCCC	pU4ΔtRNA PRO
3 3'LmjU4DcajaB	GAAACCGCCCTTTCACCCGT	pU4ΔB
4 3'LmjU4DcajaA	GGCTGGAGTGCCAAATGAAA	pU4ΔA
5 U4-5'	AAGCCTTGCCGAGGGAGATGT	pU4ΔAll
6 U4small-For	AAGCCTTGCCGAGGG	RT-PCR
7 3'U4Oligo Tag	CAAAATTTCCCTGCAGAGATCAGACCATGGTAGGAGTAATGGAG	Mutagenesis
8 3'U4GSP2	CTGCAATAGG AGTAATGGAG	5'RACE
9 5'U4Oligo Tag	CTCCATTACTCCTACCATGGTCTGACTCTCTGCAGGGAAATATTTG	Mutagenesis
10 U4tag-Rev	TGCAGAGAGTCAGACCCATG	RT-PCR
11 3'U4GSP1	CCGTGGTGG ATCAAATATT	Primer extension, 5'RACE, RT PCR
12 5'U4LmjEnd	GACAAAAAGT AGTCCCCACC	pU4-Full, pU4ΔtRNA PRO, pU4ΔB, pU4ΔA y pU4ΔAll
13 AAP	GGCCACGCGTGCAGTAGTACGGGIIIGGGIIIGGIIIG	5'RACE
14 3'Neo reverse 2	AGCAAAGGTGAGATGACAGGA	RT-PCR pB6-Tap
15 NEO-SENSE	GCCGCTTGGTGGAGAGGCT	RT-PCR pB6-Tap
16 NEO-ANTI-SENSE	GCAGCCAGTCCCITCCCGCTT	RT-PCR pB6-Tap

9

Tabla 2. Oligonucleótidos utilizados para los diferentes experimentos, con su respectiva secuencia. Los colores y la numeración de la primera columna corresponden con la Figura 33. En verde se muestran los oligonucleótidos que se utilizaron para generar los diferentes vectores. En azul claro se indican los oligonucleótidos que se utilizaron para amplificar el cDNA del U4 snRNA exógeno (presenta 15 nucleótidos extras en comparación al U4 snRNA endógeno). El oligonucleótido AAP se utilizó para el experimento de "primer extension". El oligonucleótido 3'Neo reverse 2 se utilizó para sintetizar cDNA de neo, y los oligonucleótidos NEO-SENSE y NEO-ANTI-SENSE se utilizaron para amplificar dicho cDNA (el gen de neo está presente en el vector pB6-TAP).

3.9 Adenilación de productos de PCR

Los productos de PCR generados con algunas DNA polimerasas de alta fidelidad (Pfu, por ejemplo) requieren de la adición de adeninas en sus extremos 3' (A-tailing) para formar extremos cohesivos que les permitan ligarse en el vector pGEM-T. Para llevar a cabo esta reacción, se tomó 1-2 μl del fragmento purificado del PCR y se añadió 1 μl de buffer 10X RED de la Taq DNA polimerasa, 1 μl de MgCl_2 25 mM, dATP a una concentración final de 0.2 mM y 5 μl de RED Taq Polimerasa (5 unidades, SIGMA). Todo esto se llevó a un volumen de 10 μl con agua. Posteriormente se incubó a 70°C durante 15 a 30 minutos.

3.10 Ligaciones de DNA

Las secuencias de DNA amplificadas por PCR ya purificadas fueron ligadas en los vectores pGEM-T o pGEM-T Easy (Promega). Los mapas de los vectores y sitios de reconocimiento se muestran en la Figura 19. Estos vectores se usan para la clonación directa de productos de PCR, para su posterior secuenciación; tienen dos genes de selección para bacterias transformadas (resistencia a ampicilina y el gen lacZ, que codifica para la enzima β -galactosidasa). Las reacciones de ligación normalmente contuvieron 100-200 ng de inserto (producto de PCR), 50-100 ng de vector pGEM-T o pGEM-T Easy (50 ng/ μl), 1 μl de T4 DNA ligasa (3 u/ μl , Promega) y 5 μl de buffer "Rapid Ligation" 2X, en un volumen de 10 μl , ajustando con agua desionizada. Las reacciones se llevaron a cabo a 4°C durante toda la noche.

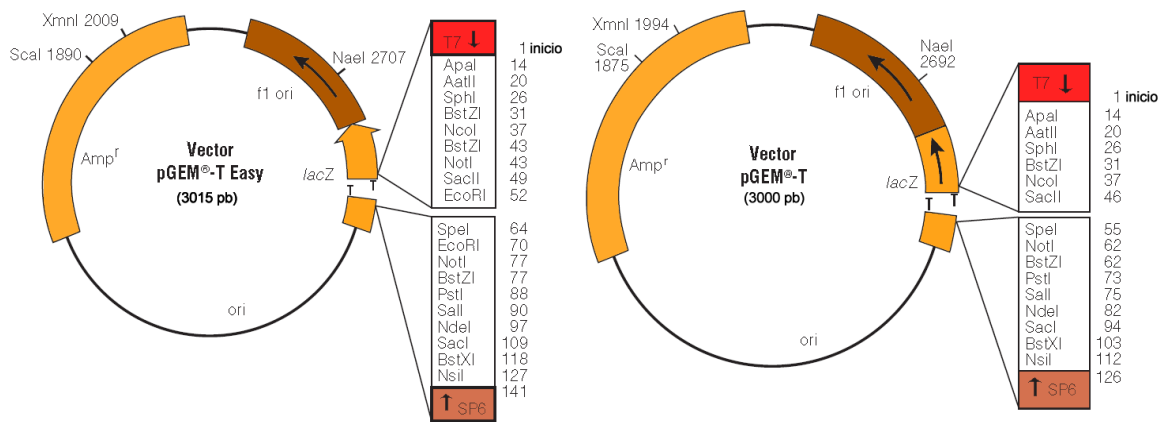


Figura 19. Mapa de los vectores pGEM-T Easy y pGEM-T. Los vectores tienen un tamaño de 3,015 y 3,000 pb respectivamente. Ambos tienen genes de selección de resistencia a ampicilina (Amp^r) y *lacZ*, que codifica para la enzima β -galactosidasa. Se indica el sitio (T), para la clonación de secuencias amplificadas por PCR. También se señalan los sitios de corte de las diferentes enzimas de restricción y los promotores SP6 y T7.

3.11 Transformaciones de células competentes de *E. coli*.

Células competentes de *E. coli* JM109 de alta eficiencia ($>1 \times 10^7$ ufc/ μ g de DNA, Promega) fueron descongeladas de -70°C y se transfirieron 20-50 μ l de células a un tubo Falcon de 15 ml con 2 μ l de la reacción de ligación. Posteriormente se dio un choque térmico durante 45 segundos a 42°C y después los tubos se mantuvieron en hielo por 2 minutos. Después se les adicionaron 950 μ l de medio SOC (triptona 2%, extracto de levadura 0.5%, NaCl 1%, KCl 2.4 mM, $MgCl_2$ 1% y Glucosa 2%) y se mantuvieron durante 90 minutos a 37°C a 225-250 rpm en una incubadora (MaxQ5000, Barnstead Lab-line). Después, las células fueron centrifugadas a 15,000 rpm por 30 segundos. La pastilla fue resuspendida en 100 μ l de medio SOC y sembrada en cajas petri con medio LB agar (Peptona de caseína 1%, extracto de levadura 0.5% y NaCl 0.5%, ajustando a pH 7.5) suplementado con ampicilina (0.01%), IPTG (100 mM) y X-Gal (50 mg/ml) usando un asa triangular. Las células se dejaron crecer toda la noche a 37°C .

También se usaron células electrocompetentes ElectroMAX DH5 α ($>1 \times 10^{10}$ ufc/ μ g, Promega). En este caso, se colocaron 50 μ l de células en una cubeta de electroporación de 0.1 cm, se agregó el DNA de la ligación y se dio un pulso eléctrico de 2.0 kV, 200 Ω y 25 μ F en un electroporador (ECM 630 BTX Harvard Apparatus). Posteriormente, las células fueron transferidas a un tubo falcon de 15

ml que contenía 950 µl de medio SOC. Se continuó la técnica como se indica para las células *E. coli* JM109.

3.12 Purificación de plásmidos en escala pequeña (Minipreps)

Una vez que se tuvieron colonias de bacterias transformadas de color blanco (resistentes a ampicilina y sin capacidad para digerir X-Gal), éstas se inocularon en tubos de ensayo con 5 ml de medio LB con 5 µl de ampicilina (100 µg/µl), y se incubaron a 37°C durante toda la noche. Para purificar plásmidos en pequeña escala (minipreps) se usó el kit Qiaprep (Qiagen). Para ello, las células crecidas toda la noche fueron centrifugadas durante 1 minuto a 13,000 rpm para obtener el pellet celular y eliminar el medio nutritivo LB, se añadieron 250 µl del buffer P1 con RNasa (solución de resuspensión) y se vortexeó. Después se añadieron 250 µl del buffer P2 (solución de lisis) y se mezcló invirtiendo los tubos de 4 a 6 veces; inmediatamente después se añadieron 350 µl del buffer N3 (solución neutralizante) mezclando de la misma manera que con el buffer P2. Seguido de esto se centrifugó durante 10 minutos a 13,000 rpm y el sobrenadante se colocó en la columna (QIAprep spin column), se centrifugó durante 1 minuto y se descartó el líquido que pasó por la columna. En seguida, a la columna se le añadió 0.5 ml del buffer PB, se centrifugó 1 minuto y la columna se colocó dentro de un tubo eppendorf de 1.5 ml nuevo. Finalmente, se añadieron 50 µl de agua destilada, se centrifugó durante un minuto y se obtuvo el plásmido purificado diluido en agua. Con la mini-purificación se obtienen de 3 a 20 µg de plásmido.

3.13 Purificación de plásmidos a gran escala (Midipreps y Maxipreps)

Para preparar plásmidos a gran escala se usaron los kits de Midipreps y Maxipreps de NucleoBond. El procedimiento comienza con la inoculación y crecimiento durante toda la noche de una colonia transformada en 5 ml de medio LB con ampicilina (100 µg/µl). Para el midiprep es necesario escalar el cultivo una vez más de 12 a 16 horas a 37°C, tomando una alícuota de 150 µl y adicionándolos en 150 ml de medio LB; para el caso del maxiprep se inoculan 400 µl para 400 ml de medio LB. Los cultivos son después centrifugados a 4,500 g por

10 minutos a 4°C, para obtener únicamente la pastilla celular y descartar el sobrenadante. Después se resuspendió el pellet vortexeando o pipetando en el buffer de resuspensión con RNasa (8 ml/12 ml para midi/maxi). Posteriormente se agregó el buffer de lisis (8ml/12ml), invirtiendo los tubos 5 veces sin vortexear para evitar la contaminación de DNA cromosómico y se incubó a temperatura ambiente durante 5 minutos. Pasado este tiempo se agregó buffer NEU (neutraliza buffer de lisis) y se mezcló por inversión de 10 a 15 veces (sin vortexear). En seguida toda esta mezcla se precipitó en los filtros (NucleoBond Xtra Filter) que se encuentran dentro de la columna (NucleoBond Xtra column) previamente equilibrada con 12 ml/25 ml de buffer EQU. Para separar el DNA plasmídico del filtro se agregaron 5ml/15ml de buffer EQU. Una vez que quedó todo el producto de lisis celular en el filtro este se eliminó. Después se agregaron 5 ml/15 ml (midi/maxi) de buffer ELU para eluir el DNA de la columna en un tubo Falcon de 50 ml. Para precipitar el DNA se añadieron 0.7 volúmenes de isopropanol 3.5 ml/10.5 ml, se vortexeó y se incubó la muestra a temperatura ambiente por 2 minutos. Esta mezcla después se precipitó en una jeringa de 30 ml que tiene en su extremo un filtro (NucleoBond Finalizer). Se presionó y se descartó el fluido. Inmediatamente después se añadieron 2 ml/5 ml de etanol al 70% a la jeringa para secar la membrana del filtro. Finalmente, para eluir el DNA se separó el filtro de la jeringa de 30 ml y se insertó en la jeringa de 1 ml; a ésta se le añadió 200/400 µl de buffer TRIS (5 mM Tris/HCl, pH 8.5), se presionó y se colectó en un tubo eppendorf de 1.5 ml.

3.14 Digestiones con enzimas de restricción

Los diferentes plásmidos generados se caracterizaron utilizando las siguientes enzimas de restricción: *NcoI-SacI*, *SphI-SpeI*, *XmaI-XbaI*, *EcoRI* y *DpnI* (New England Biolabs). Una reacción de digestión común tuvo 3-12 µg de plásmido purificado, 10-15 U de cada enzima, buffer 1X de la enzima y en ocasiones BSA 1X. Las digestiones se llevaron a cabo durante 4-8 horas a 37°C.

3.15 Experimento 5'-RACE

Para determinar el sitio de inicio de la transcripción del gen U4 snRNA se llevó a cabo la técnica de 5'-RACE (Rapid Amplification cDNA Ends) (Figura 20).

3.15.1 Síntesis de cDNA

Primero se colocaron 5 µg de RNA total de *L. major* tratado con DNasa I en un tubo de PCR, se añadieron 25 ng del oligonucleótido 3'U4GSP1 (CCGTGGTGGGATCAAATATT) y se llevó a un volumen final de 15.5 µl con agua DEPC. La mezcla se incubó a 80°C durante 10 minutos en el termociclador (Cycler Corbett Research). Después se puso el tubo durante 1 minuto en hielo y se centrifugó a 13,000 rpm durante 30 segundos, para después agregar 2.5 µl del buffer PCR 10X, 2.5 µl MgCl₂ (25 mM), 1 µl de dNTPs (10 mM) y 2.5 µl de DTT (0.1 M); teniendo un volumen final de 24 µl que se mezcló e incubó durante 1 minuto a 42°C. Inmediatamente después se agregó la enzima transcriptasa reversa SuperScript II RT (Invitrogen) y se incubó durante 30 minutos a 42°C. Una vez pasado el tiempo se inactivó a la SuperScript II RT elevando la temperatura a 70°C durante 15 minutos. Después se centrifugó 10 segundos a 13,000 rpm (spin), se agregó 1 µl de mezcla de RNasas y se incubó a 37°C durante 30 minutos. A continuación se volvió a dar un spin. Se procedió a purificar el cDNA cargando la muestra en un filtro (microcon Ym-30) y se centrifugó a 14,000 rpm durante 4 minutos. Después, la columna se colocó invertida en un tubo eppendorf nuevo, se midió el volumen que pasó a través del filtro (≈10µl) y a éste se le agregaron 20 µl de agua DEPC para tener un volumen final de 30 µl, que se guardó a -20°C.

3.15.2 Inserción de cola de citocinas al cDNA (dC-tailed-cDNA)

Más tarde se procedió a insertar un tracto de citocinas al cDNA purificado (TdT tailing). Para ello se mezclaron 10 µl del cDNA purificado, 6.5 µl de agua DEPC, 5 µl de buffer 5X tailing y 2.5 µl de dCTP (2 mM). Esta mezcla se incubó durante 3 minutos a 94°C, y después a 4°C durante 1 minuto. Después se agregó 1 µl de TdT recombinasa y se incubó a 37°C durante 10 minutos. Para inactivar la enzima se incrementó la temperatura a 65°C durante 10 minutos.

3.15.3 Amplificación del cDNA por PCR

En un tubo de PCR se colocaron 5 µl del dC-tailed-cDNA de cadena simple y se añadió 26.5 µl de agua destilada, 5 µl de 10X PCR buffer (200 mM Tris-HCl pH 8.4, 500 mM KCl), 6 µl de MgCl₂ (3 mM), 1 µl dNTPs (10 mM), 2 µl oligonucleótido 3'U4GSP2 (10 µM) (CTGCAATAGGAGTAATGGAG), 2 µl de oligonucleótido AAP (10 µM) (GGCCACGCGTCGACTAGTACGGGIIGGGIIGGGIIG), 2.5 µl de RED Taq DNA polimerasa (5 unidades) y agua a un volumen final de 50 µl. Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: desnaturalización inicial a 94°C durante 2 minutos; 30 ciclos (desnaturalización a 94°C por 1 min; alineamiento a 55°C por 1 min; extensión a 72°C por 1 min); extensión final a 72°C durante 5 minutos.

3.15.4 Clonación y secuenciación de los productos de PCR

La banda obtenida del PCR del ensayo de 5'-RACE fue purificada y ligada en el vector pGEM-T Easy. Se realizaron minipreparaciones de plásmido de 20 de las colonias obtenidas. Después los plásmidos fueron digeridos con *EcoRI* y analizados mediante electroforesis en geles de agarosa. Se seleccionaron 17 clonas que tenían insertos del tamaño esperado y se enviaron a secuenciar.

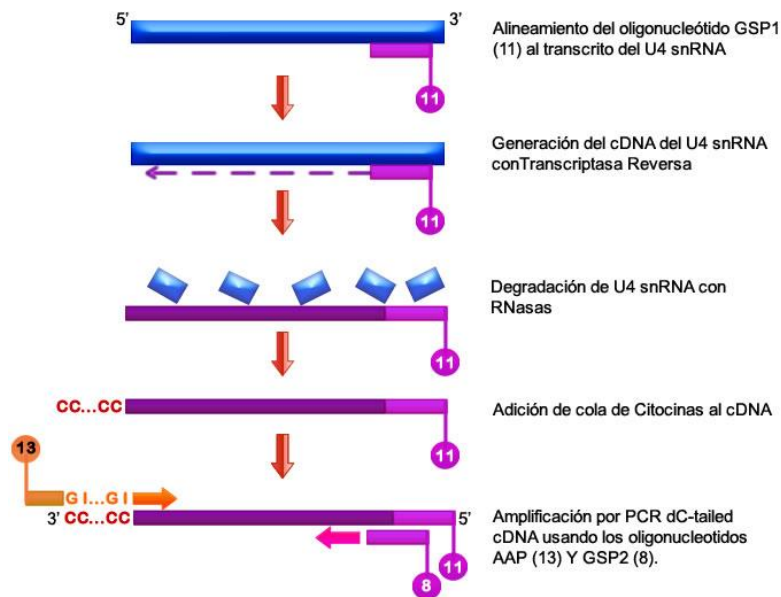


Figura 20. Principios del 5'-RACE.

3.16 Secuenciación de DNA

La secuenciación de DNA se realizó por el método de terminación de la cadena, con el kit “Sequenase 7-deaza-dGTP Sequencing kit” de USB. Como primer paso se desnaturalizó el plásmido pU4-Full (5 µg), añadiendo 0.1 volúmenes de NaOH 2 M y EDTA 0.2 mM, e incubando durante 15 minutos a 37°C. Después esta mezcla se neutralizó con 0.1 volúmenes de acetato de sodio 3 M (pH 4.5) y se precipitó con 2 1/2 volúmenes de etanol (a -70°C, por 15 minutos). Más tarde se lavó la pastilla de DNA con etanol al 70%, se resuspendió en 7 µl de agua destilada, 2 µl de buffer de reacción para la Sequenasa y 1 µl del oligonucleótido 3´U4GSP1. Para alinear el oligonucleótido al plásmido pU4-Full se aumentó la temperatura a 65°C por dos minutos y se dejó enfriar lentamente hasta 35°C (~30 minutos). Mientras la reacción de alineación se enfriaba, se agregaron 2.5 µl de reacción de terminación (80 µM 7-deaza-dGTP, 80 µM dNTPs, 8 µM del respectivo ddNTP, 50 mM NaCl) a 4 tubos marcados (A, G, C y T). Para generar la reacción de marcaje se utilizaron los 10 µl de la reacción de alineación y se agregaron 1 µl de DTT 0.1 M, 2 µl de mezcla de marcaje (previamente diluida), 0.5 µl de α -³²dATP (1250 Ci/mmol) y 2 µl de la polimerasa Sequenasa. La reacción de marcaje se incubó a temperatura ambiente durante 5 minutos. Para detener la actividad de la Sequenasa se transfirieron 3.5 µl de la reacción de marcaje a cada uno de los tubos que tienen la reacción de terminación (A, G, C y T), se mezcló bien y se continuó con la incubación de la reacción de terminación a 37°C por 5 minutos. Finalmente, se añadieron 4 µl de solución de paro y se calentaron las muestras a 75°C por dos minutos. Las reacciones de secuenciación se analizaron en un gel de poliacrilamida al 6% (ver sección 3.17.4).

3.17 Ensayo de “primer extension”

3.17.1 Marcaje del oligonucleótido

Para marcar con ³²P el oligonucleótido 3´U4GSP1 (CCGTGGTGGG ATCAAATATT), se realizó la siguiente mezcla en un tubo eppendorf de 0.6 ml: 1 µl de buffer cinasa 10X, 1 µl de oligonucleótido 3´U4GSP1 (200 ng), 50 µCi de γ -³²P-

ATP (10 $\mu\text{Ci}/\mu\text{l}$, 7000 Ci/mmol), 3 μl de T4 cinasa (10 u/ μl) y 0.8 μl de Agua. Esta solución se mezcló y se incubó durante 10 minutos a 37°C. Posteriormente se incubó a 90°C durante 5 minutos para inactivar a la T4 cinasa. Después se llevó la mezcla a un volumen de 50 μl para precipitarla adicionando 5 μl de glicógeno (10 mg/ml), 300 μl de acetato de amonio (4 M) y 937.5 μl de etanol absoluto. Posteriormente se incubó 1 hora a -70°C, se centrifugó a 14,000 rpm por 15 minutos a 4°C, se eliminó el sobrenadante y se resuspendió en 30 μl de agua. La cantidad de radioactividad incorporada se determinó en un contador de centelleo líquido (Microbeta Windows Workstation, Perkin Elmer).

3.17.2 Hibridación

Fueron mezclados 2 μl del oligonucleótido marcado 3'U4GSP1 (50,000 cpm/ μl) con 5 μl de RNA total (40 μg) de *L. major* previamente tratado con DNasa I y 5 μl de agua DEPC (Figura 21). Esta mezcla se precipitó con 0.1 volúmenes de acetato de sodio 3 M (pH 5.2) y 2.5 volúmenes de etanol absoluto durante 1 hora a -70°C. La pastilla se resuspendió en 30 μl de solución de hibridación (formamida al 80%, PIPES 40 mM pH 6.4, NaCl 0.4 M y EDTA 1 mM pH 8.0). Después se incubó a 30°C durante una noche, se llevó a un volumen de 100 μl con agua DEPC y se precipitó con 0.1 volúmenes de acetato de sodio 3 M y 2.5 volúmenes de etanol absoluto durante 1 hora a -70°C. Para obtener la pastilla se centrifugó a 13,000 rpm durante 15 minutos a 4°C, se quitó el sobrenadante y se dejó secar durante 5 minutos a temperatura ambiente. Finalmente se resuspendió en 12 μl de agua DEPC.

3.17.3 Extensión del oligonucleótido

Los 12 μl de oligonucleótido 3'U4GSP1 hibridado con el RNA se incubaron durante 10 minutos a 80°C y se mezclaron con 2 μl de dNTPs (5 mM), 2.5 μl de buffer de reacción 10X, 2.5 μl de MgCl_2 , 2.5 μl de DTT (0.1 M) y 1.25 μl de RNAsin (40 u/ μl). A esta mezcla de 23 μl se le adicionaron 2 μl de la enzima SuperScript II Transcriptasa Reversa (200 u/ μl) (Invitrogen). Inmediatamente después se incubó durante 1 hora a 42°C y se inactivó a 70°C por 15 minutos. Después se procedió a

eliminar el RNA adicionando 1 μ l de RNasa A e incubando durante 30 minutos a 37°C. Se llevó la mezcla a un volumen de 100 μ l con agua y se realizó una extracción con 100 μ l de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (25:24:1), se centrifugó durante 5 minutos a 14,000 rpm y se transfirió la fase acuosa a un tubo nuevo. Esta fase se precipitó con 5 μ l de glicógeno (10 mg/ml), 0.1 volúmenes de acetato de sodio (3 M) y 2.5 volúmenes de etanol absoluto; seguido de esto, se centrifugó a 13,000 rpm durante 15 minutos a 4°C para obtener la pastilla, la cual se resuspendió en 5 μ l de agua DEPC y 5 μ l de buffer de carga (formamida 95%, EDTA 20 mM, azul de bromofenol 0.05% y xileno-cianol 0.05%).

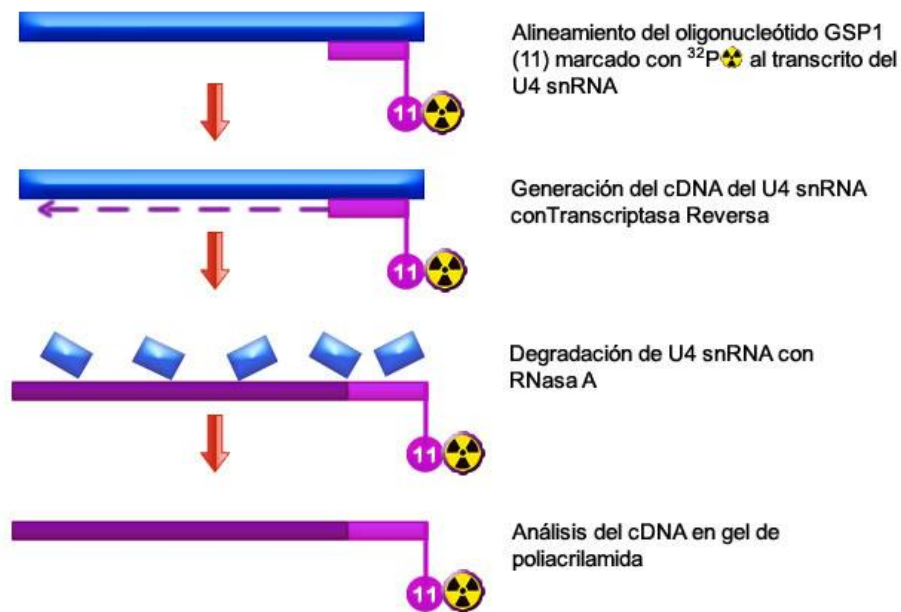


Figura 21. Principios del "primer extensión".

3.17.4 Preparación del gel y electroforesis

El gel para caracterizar el producto de la reacción de "primer extensión", así como el producto de la reacción de secuenciación, fue de poliacrilamida al 6%. Para preparar 200 ml, primero se disolvieron 93.6 g de urea y se añadieron 11.6 g de acrilamida, 0.6 g de bisacrilamida y 10 ml TBE 10X. La mezcla fue llevada a un

volumen de 200 ml con agua y se filtró en papel Whatman. Posteriormente se tomaron 60 ml de la mezcla y se agregaron 520 μ l de persulfato de amonio al 10% y 18.6 μ l de TEMED. Entonces, la mezcla de acrilamida fue vaciada en los vidrios de la cámara de secuenciación (Sequi-Gen GT Nucleic Acid Sequencing Cell, BIORAD). Para armar la cámara de secuenciación (Figura 22) es necesario antes limpiar y siliconizar los vidrios de la cámara. El vidrio superior es siliconizado con \approx 200 μ l de Sigmacote (Sigma) y lavado con jabón, agua, alcohol y acetona. La siliconización impide que el gel de poliacrilamida se adhiera al vidrio. El vidrio inferior únicamente es lavado con jabón, agua, alcohol y acetona. Se utilizó como buffer de corrida TBE 0.6 X y se precurrió durante 1 hora a 30 W. La electroforesis se realizó a 50 W. Una vez que terminó la corrida, el gel se desmontó de la cámara, se transfirió a papel Whatman y se colocó en el secador de geles (Thermo SAVANT Speed Gel - SG210D) durante 45 minutos a 50°C. Finalmente, el gel se expuso en una placa de equipo phosphorimager (FUJI FLA-500) y 24 horas después la placa fue escaneada en el aparato.

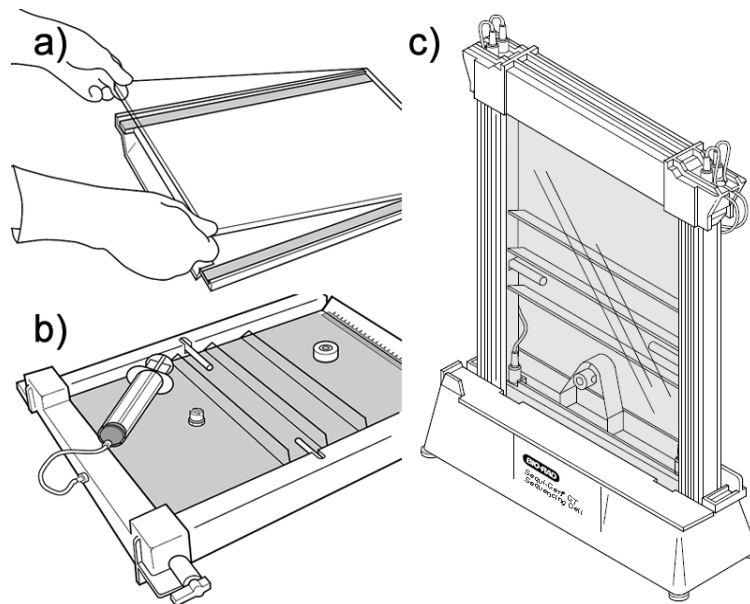


Figura 22. Montaje del gel de poliacrilamida en la cámara de electroforesis. a) montaje de los vidrios previamente lavados. b) vaciado y polimerización del gel de poliacrilamida en la cámara. c) Cámara de secuenciación montada para correr las muestras de “primer extensión” y la secuenciación.

3.18 Mutagénesis Dirigida

La técnica de mutagénesis dirigida se llevó a cabo con el kit QuikChange II XL Site-Directed Mutagenesis (Stratagene) (Figura 23).

3.18.1 Introducción de la secuencia “tag”

Se mezcló en un tubo de PCR 1.5 μ l del vector pU4-Full (10 ng), 5 μ l buffer de reacción 10X, 0.9 μ l de oligonucleótido 3'U4OligoTag (1.36 μ g/ μ l) (CAAATATTCC CTGCAGAGAG TCAGACCATG GTAGGAGTAA TGGAG), 0.9 μ l de oligonucleótido 5'U4OligoTag (1.38 μ g/ μ l) (CTCCATTACT CCTACCATGG TCTGACTCTC TGCAGGGAAT ATTTG), 1 μ l de dNTPs (10 mM), 3 μ l de QuikSolution y 37.7 μ l de agua (volumen final de 50 μ l). A esta mezcla se le añadió 1 μ l de la enzima pFuTurbo DNA polimerasa y se amplificó en el termociclador bajo los siguientes parámetros: desnaturalización inicial a 95°C durante 1 minuto; 18 ciclos (desnaturalización a 95°C por 50 seg; alineamiento a 60°C por 50 seg; extensión a 68°C por 1 min); extensión final de 68°C durante 7 minutos.

3.18.2 Digestión con *DpnI*

Después de la amplificación se procedió a digerir la muestra con 1 μ l de la enzima *DpnI* (10u/ μ l). La enzima es capaz de cortar únicamente el vector parental (pU4-Full) pues está metilado. En contraste el vector nuevo, generado por PCR, no está metilado y no puede ser cortado por la enzima de restricción. La digestión se llevó a cabo a 37°C durante 1 hora.

3.18.3 Transformación de células ultracompetentes XL10-Gold

Para transformar células XL10-Gold (Stratagene) con el nuevo plásmido generado por mutagénesis (pU4-Tag), primero se descongelaron en un tubo Falcon las células en hielo y se transfirieron 2 μ l del vector tratado con *DpnI*. Después se dio un pulso térmico a 42°C durante 30 segundos. Inmediatamente después se añadió 0.5 ml del medio NZY⁺ y se incubó el cultivo durante 1 hora a 37°C, agitando a 225-250 rpm. Posteriormente, las células crecidas fueron centrifugadas a 15,000 rpm por 30 segundos. La pastilla fue resuspendida en 100 μ l de medio y sembrada en una caja petri con medio LB agar usando un asa triangular. Las células se dejaron crecer toda la noche a 37°C. Se purificó y analizó por restricción el plásmido obtenido de varias colonias transformadas. La inserción de la secuencia “tag” en el gen del U4 snRNA se verificó por secuenciación.

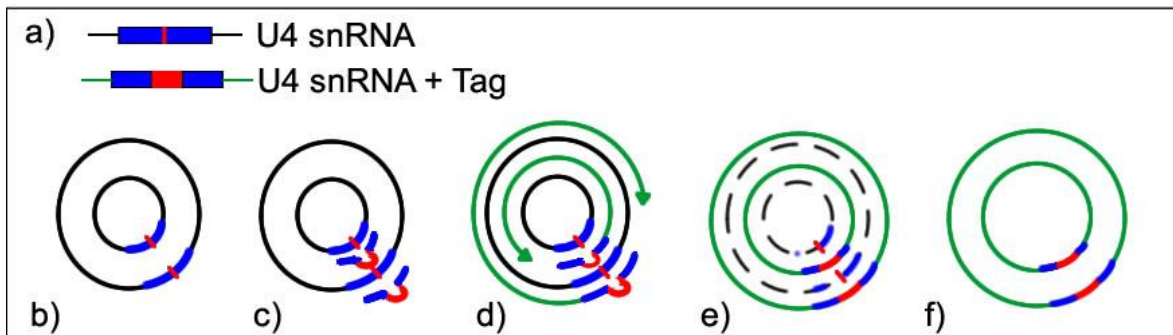


Figura 23. Mutagénesis dirigida. a) En azul se muestra el gen U4 snRNA con el sitio de inserción del “tag” (línea roja) y U4 snRNA+Tag con la secuencia de 15 nucleótidos insertada (rectángulo rojo). b) Plásmido pU4-Full (metilado) purificado de células de *E. coli*. c) Alineamiento de oligonucleótidos U4 oligoTag 3’ y 5’ al plásmido pU4-Full. d) Extensión de los oligonucleótidos utilizando pFu Turbo DNA polimerasa. e) Digestión con *DpnI* del plásmido parental (pU4-Full, metilado). f) Plásmido pU4-tag que fue transformado en células ultracompetentes XL-Gold.

3.19 Transfecciones transitorias

Las transfecciones transitorias involucran la introducción de los plásmidos que contienen las diferentes posibles secuencias promotoras del gen U4 snRNA (pU4.Tag, pU4 Δ tRNA-PRO, pU4 Δ B, pU4 Δ A y pU4 Δ All) al parásito *L. major*. Estos plásmidos transfectados se expresarían en el parásito, generándose un U4 snRNA exógeno que tendría una inserción de 15 pb (“tag”), que no estaría en el U4 snRNA endógeno. Como primer paso, por cada transfección se obtuvieron 1×10^8

promastigotes en fase media logarítmica. El cultivo se centrifugó durante 12 minutos a 4,000 rpm, se retiró el sobrenadante y se resuspendió en 10 ml de PBS-G (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 2 mM KH₂HPO₄ y glucosa al 2%, pH 7.4). Después se centrifugó a 4,000 rpm durante 12 minutos y se resuspendieron los parásitos en 400 µl de buffer Cytomix (25 nM HEPES, 120 mM KCl, 0.15 mM CaCl₂, 10 mM KH₂HPO₄, 2 mM EDTA y 5 mM MgCl₂, pH 7.6). Se transfirieron los 400 µl de cultivo de parásitos a una cubeta de electroporación de 0.2 cm de apertura (Electroporation Cuvettes Plus, BTX) y se agregaron 50 µg de plásmido de expresión de U4 (en un volumen de 50 µl), así como 50 µg de plásmido pB6-TAP (como control de eficiencia de electroporación). Se dio un pulso de 1600 v, 25 Ω y 50 µF en el electroporador (ECM 630 BTX Harvard Apparatus). Inmediatamente después de la transfección se recolectaron los parásitos de la cubeta y se transfirieron a tubos falcon de 50 ml con 10 ml de medio de cultivo para su recuperación. Los cultivos se mantuvieron a 27°C durante 24 horas. Transcurrido este tiempo, se aisló RNA total de los cultivos.

3.20 RT-PCR semicuantitativo

La técnica de RT-PCR semicuantitativo (Figura 24) se utilizó para determinar la expresión del U4 snRNA exógeno. Como primer paso se mezclaron 5 µg de RNA total de promastigotes previamente transfectados (tratado con DNasa I), 1 µl del oligonucleótido U4Lmjend (50 µM), 1 µl dNTPs (10 mM) y 6 µl de Agua DEPC. Esta mezcla se calentó a 65°C durante 5 minutos y se incubó en hielo tres minutos. Más tarde, a estos 13 µl se le agregaron 4 µl de buffer 5X First Strand, 1 µl DTT (0.1 M), 1 µl Rnasin y 1 µl de la enzima Superscript III RT (100 u/µl). La mezcla se incubó a 55°C durante 40 minutos y se inactivó la enzima calentando a 70°C por 15 minutos. Al tener listo el cDNA se continuó con la reacción de PCR que contenía 5 µl de buffer de reacción de red Taq 10X, 6 µl MgCl₂ (25 mM), 1 µl dNTPs (10 mM), 2 µl del oligonucleótido U4small-For (10 µM) para amplificar, 2 µl del oligonucleótido U4tag-Rev (50 µM), 1.5 µl cDNA, 2.5 µl Red Taq (1u/µl) y llevado a un volumen final de 50 µl con agua destilada. Se llevaron a cabo amplificaciones con números de ciclos diferentes, para determinar el número de

ciclos en el que la amplificación estaba en la fase lineal (no en la fase de saturación). Las condiciones finales fueron: desnaturalización inicial a 94°C por 2 minutos; 28 ciclos de desnaturalización a 94°C por 1 minuto, alineamiento a 55°C por 1 minuto y extensión a 72°C durante 1 minuto; con una extensión final 72°C por 2 minutos.

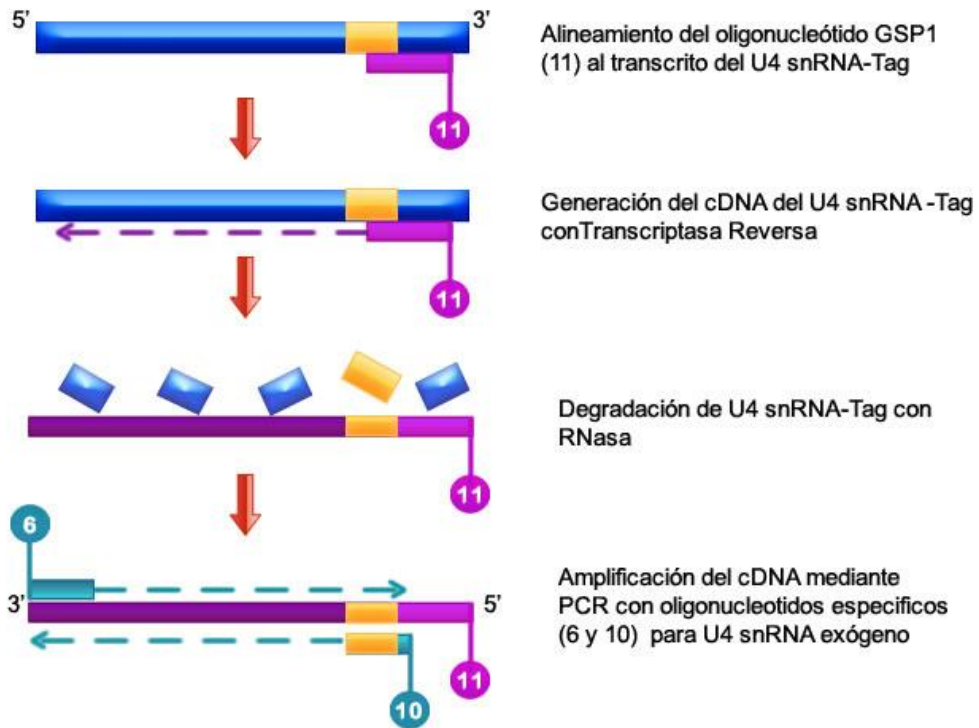


Figura 24. Principios del RT-PCR.

4. Resultados

4.1 Localización del gen del U4 snRNA en el genoma de *L. major*

El análisis *in silico* del genoma de *L. major* reveló la presencia de sólo una copia del gen del U4 snRNA en el parásito. El gen tiene un tamaño de 116 pb y se localiza en el cromosoma 36, en la posición 1033778-1033893 y en la cadena positiva (+) (Figuras 25a y 25b). El cromosoma 36 está formado por 7 unidades policistrónicas que contienen cientos de genes codificadoras de proteínas (GCP); el gen U4 snRNA se ubica en una región de cambio de la dirección de la transcripción (“strand switch region”) entre las unidades convergentes 4 y 5 (Figuras 25a y 25b). A 195 pb río-arriba del U4 snRNA, se halló un gen de tRNA^{PRO}, en la cadena +; seguido de otros 3 tRNAs: tRNA^{GLY} en la cadena negativa (-), tRNA^{THR} (cadena -) y tRNA^{GLY} (cadena +), localizados a 341, 474 y 1189 pb del gen de U4, respectivamente (Figuras 25b y 25c).

4.2 Sintenia de U4 snRNA en tripanosomátidos

La conservación del orden génico (sintenia) de los U4 snRNAs y genes flanqueantes en los diferentes tripanosomátidos fue analizada, con información tomada de la base de datos de GeneDB. El organismo con mayor conservación sinténica en relación con *L. major* fue *L. infantum*, al compartir con *L. major* en su mismo cromosoma 36 a un tRNA^{PRO} (en la cadena +) a 198 pb de distancia. Además, ambas especies presentan el mismo gen de una proteína hipotética (PH) (cadena +) río-arriba de U4 snRNA (hebra +), mientras que río-abajo se presenta el gen percursor de fosfatasa ácida unida a membrana (MBAP) (hebra -) (Figura 26). El siguiente organismo en parecido sinténico fue *L. braziliensis*, que presentó en el cromosoma 35 a los mismos genes, en las mismas direcciones. En este caso, el tRNA^{PRO} se encontró a una distancia de 82 pb río-arriba de U4 snRNA. La identidad y el orden de los genes de proteínas localizados río-arriba de PH y río-abajo de MBAP también está conservado entre las tres especies de *Leishmania* (datos no mostrados); esto es, el gen del U4 snRNA está embebido en una región altamente sinténica.

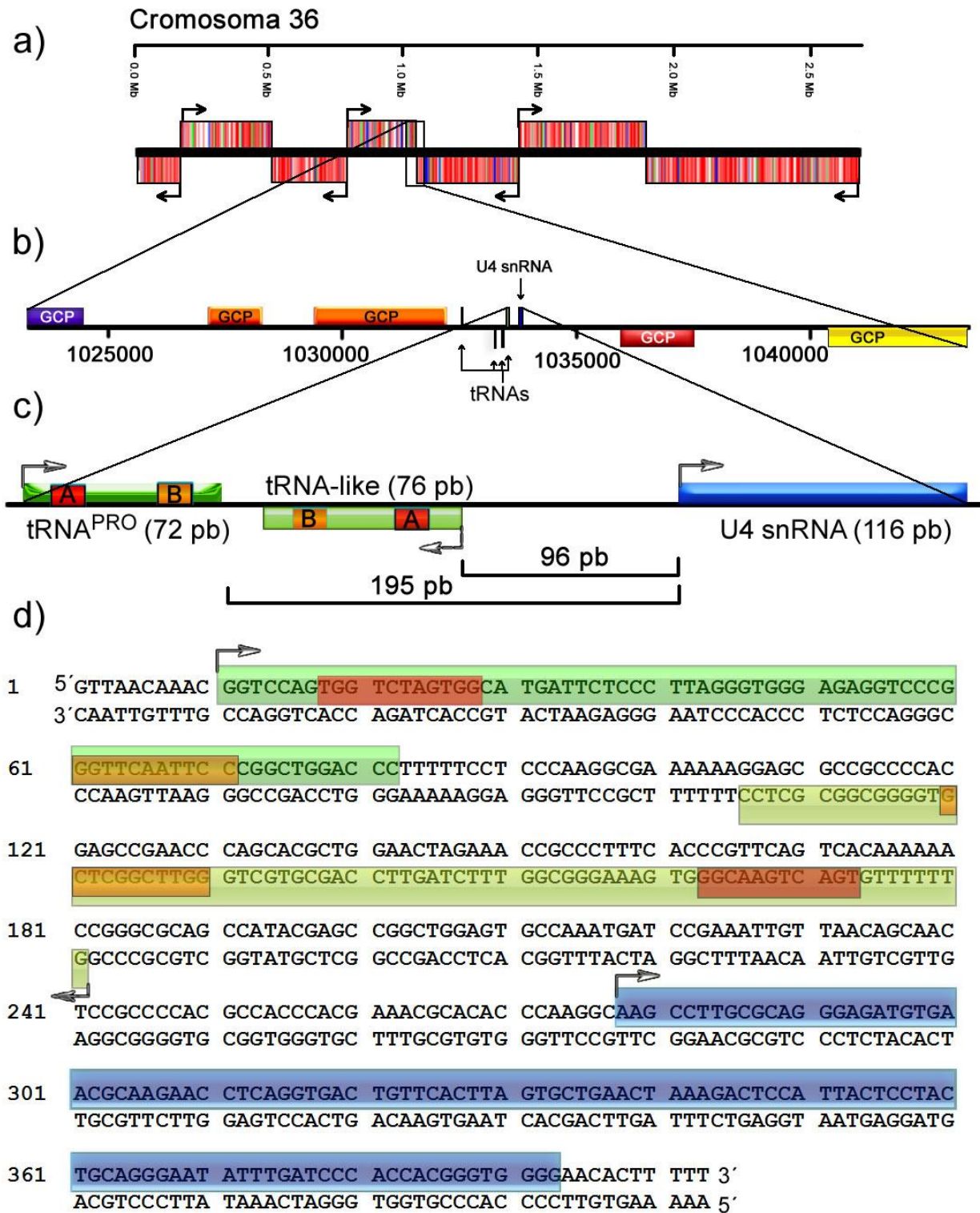


Figura 25. Localización y secuencia del gen del U4 snRNA en el genoma de *L. major*. a) Ubicación de U4 snRNA en el cromosoma 36. Se señalan las siete unidades policistricas que forman el cromosoma. b) U4 snRNA (azul) ubicado en una región de cambio de la dirección de la transcripción, teniendo en sus inmediaciones genes codificadores de proteína (GCP) y genes tRNA. c) Cajas A (rojo) y B (naranja) dentro de tRNA^{PRO} o de tRNA-like (ambos en verde) ubicados río-arriba del sitio de inicio de transcripción (SIT, flecha) de U4 snRNA. d) Secuencia del gen del U4 snRNA (cadena positiva), tRNA-like (cadena negativa), y tRNA^{PRO} (cadena positiva). El tRNA^{PRO} y tRNA-like presentan sus cajas A (en rojo) y B (en anaranjado).

T. brucei y *T. cruzi* no presentaron sintenia en relación al U4 snRNA de *L. major*. Sin embargo, entre ellos compartieron al gen de fibrilarina (NOP I) y al gen de proteína de unión a cromatina (CPB), ubicados río-arriba y río-abajo de U4 snRNA, respectivamente. Río-arriba del U4 snRNA en *T. brucei* se localiza un tRNA^{GLY} a 459 pb; mientras que *T. cruzi* presenta un gen de tRNA^{THR} (+) río-abajo, a 186 pb, seguido de un tRNA^{GLY} (-). El U4 snRNA en *T. brucei* y *T. cruzi* se localiza en los cromosomas 10 y 4, respectivamente.

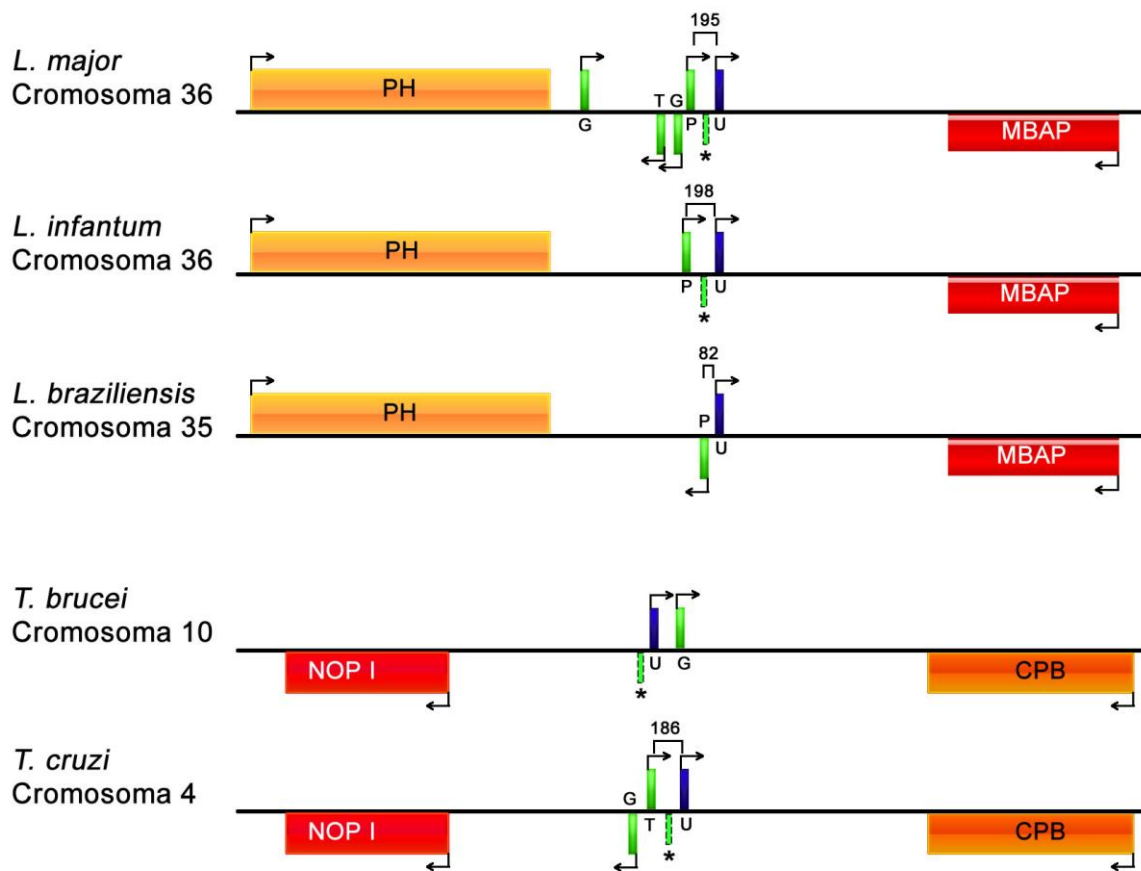


Figura 26. Sintenia en el locus del U4 snRNA entre tripanosomátidos. Comparación de los genes adyacentes a U4 snRNA (U) de diferentes tripanosomátidos. Las flechas indican el sentido de la transcripción de los genes; los números indican la distancia del gen U4 snRNA con el primer gen río arriba reportado. Proteína hipotética (PH); gen precursor de fosfatasa ácida unida a membrana (MBAP); gen de Fibrilarina (NOP I); gen de proteína de unión a cromatina (CPB); genes tRNAs: Glicina (G), Treonina (T), Prolina (P). La localización de posibles tRNA-like (promotores de U4 snRNA) se indica con rectángulos punteados (*).

4.3 Comparación de la secuencia del U4 snRNA entre tripanosomátidos.

La alineación múltiple de ocho genes U4 snRNA de diferentes tripanosomátidos indicó una identidad mayor al 95% entre especies del genero *Leishmania*; mientras que *L. collosoma*, *L. seymouri* y *C. fasciculata* tuvieron un porcentaje de identidad con *L. major* de 84-90%. Asimismo, la identidad que mostró *L. major* con *T. brucei* y *T. cruzi* fue de 80% y 70%, respectivamente (Figura 27). En general, se observó que la región 5' del gen del U4 snRNA está más conservada que el resto del gen. Los U4 snRNAs mas cortos se encontraron en *T. brucei* y *T. cruzi* (110 pb); mientras que el más largo fue de 117 pb, en *L. seymouri*. El árbol filogenético obtenido a partir de la secuencia del U4 snRNA mostró que el organismo más cercano a *L. major* fue *L. infantum* (0.021), seguido de *L. braziliensis* (0.027) (Figura 27). *L. seymouri* (0.030), *C. fasciculata* (0.047) y *L. collosoma* (0.063) formaron un grupo aparte, así como también *T. brucei* (0.079) y *T. cruzi* (0.080).

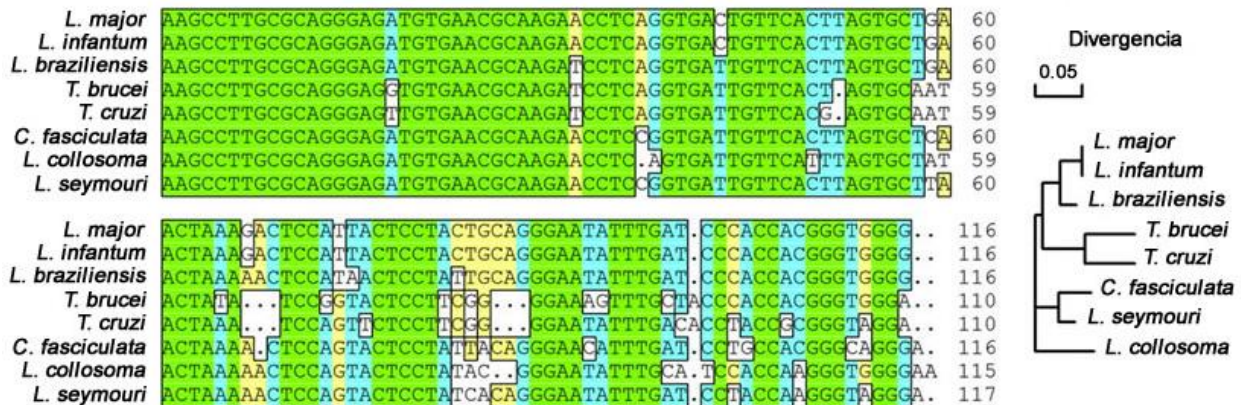


Figura 27. Comparación de secuencias del gen U4 snRNA en diferentes tripanosomátidos. Las secuencias marcadas en verde muestran identidad completa entre las especies, siguiendo el orden de homología en azul, amarillo y blanco. Los puntos indican la ausencia de nucleótidos en alguna de las secuencias. Los números indican la longitud de la secuencia. A la derecha se presenta el árbol filogenético que se obtuvo a partir de las secuencias mostradas.

4.4 Estructura secundaria del U4 snRNA en *L. major*.

Los snRNAs mantienen estructuras secundarias conservadas entre diferentes especies. Con el objeto de generar la estructura secundaria probable del U4 snRNA de *L. major*, *T. brucei* y *T. cruzi*, así como una estructura secundaria consenso para los tritryps, se usaron los programas RNA structure 5.0, RNAfold y RNAalifold. Se encontró que la estructura secundaria consenso de U4 snRNA en los trytrips tiene una forma similar a una “X” (Figura 28), la cual del centro a la izquierda tiene el bucle B-III y dos tallos-bucle (TB-I y TB-II) que derivan de él; mientras que del centro a la derecha tiene dos bucles (B-I y B-II). Del bucle-I derivan dos tallos-bucle (TB-III y TB-IV), en donde está presente el sitio Sm. En *L. major* parece haberse perdido el tallo-bucle-III, y el sitio Sm se localiza en el bucle-I (Figura 28a).

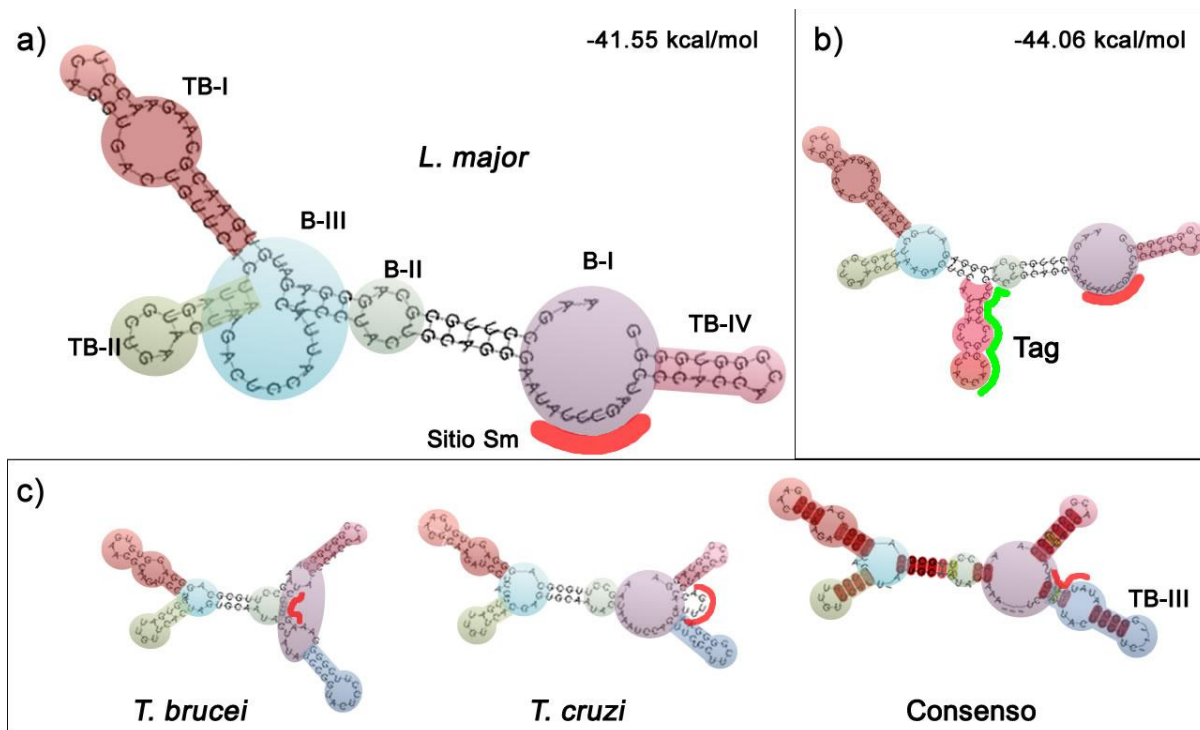


Figura 28. Estructuras secundarias del U4 snRNA sin interacción con U6 snRNA. a) Estructura en *L. major*. b) Estructura de U4 snRNA con secuencia “tag” que incorpora 15 nt extras. c) Estructura de *T. brucei*, *T. cruzi* y la estructura consenso entre los tritryps. En todas las estructuras se muestran con diferentes colores los bucles (B) y tallos-bucles (TB) conservados entre los tritryps. Marcado con línea roja se encuentra el sitio Sm y en verde la secuencia “tag”. En la secuencia consenso, las bases que se encuentran conservadas se encuentran en rojo.

Como se mencionó antes, el U4 snRNA interactúa con el U6 snRNA por apareamiento de bases complementarias. Así, mediante el uso del programa RNA structure 5.0 se generó la estructura secundaria del U4/U6 snRNA de *L. major*. Como se observa en la Figura 29, la estructura secundaria obtenida se parece mucho a la reportada para otros organismos eucariontes. Las estructuras conservadas corresponden al tallo II (T-II), tallo-bucle 5' (TB-5'), tallo I (T-I), tallo-bucle central (TB-C), sitio Sm y el tallo 3' (T-3') (Figura 29a). En la estructura se aprecia cómo la región de apareamiento corresponde a las bases 2 a 63 del U4 snRNA (con excepción de las bases 20-50, que forman el TB-5'), con las bases 56 a 72 del U6 snRNA. Después del apareamiento con el U6 snRNA, el U4 snRNA forma el TB-C (de las bases 78 a 91), seguido del sitio Sm (bases 94 a 99) para finalmente formar el TB-3' (de la base 101 hasta la 116). Así, los U4 snRNAs de los tripanosomátidos, *Homo sapiens* y *S. cerevisiae* comparten el TB-5' y el sitio Sm. Los tripanosomátidos y *H. sapiens* comparten además al TB-C y al TB-3', a diferencia de *S. cerevisiae*, que tiene únicamente un TB-C con doble bucle (Figura 29b).

4.5 Localización de un tRNA-like río-arriba del gen del U4 snRNA

En *T. brucei* y *Leptomonas*, los genes de snRNAs estudiados tienen un gen de tRNA o un tRNA-like localizado a alrededor de 100 pb río-arriba del snRNA y en la cadena contraria. Las cajas A y B del tRNA (o tRNA-like) controlan la expresión del snRNA. En el caso del U4 snRNA de *L. major*, se encuentra anotado un gen de tRNA^{PRO} río-arriba del gen. Sin embargo, dicho tRNA se localiza en la misma cadena que el snRNA y a una distancia de 195 pb. Esto hace poco probable que las cajas A y B del tRNA^{PRO} funcionen como región promotora del gen del U4 snRNA. Por ello nos abocamos a la búsqueda de un tRNA-like que se localizara entre el U4 snRNA y el tRNA^{PRO}, el cual pudiera funcionar como región promotora del U4 snRNA.

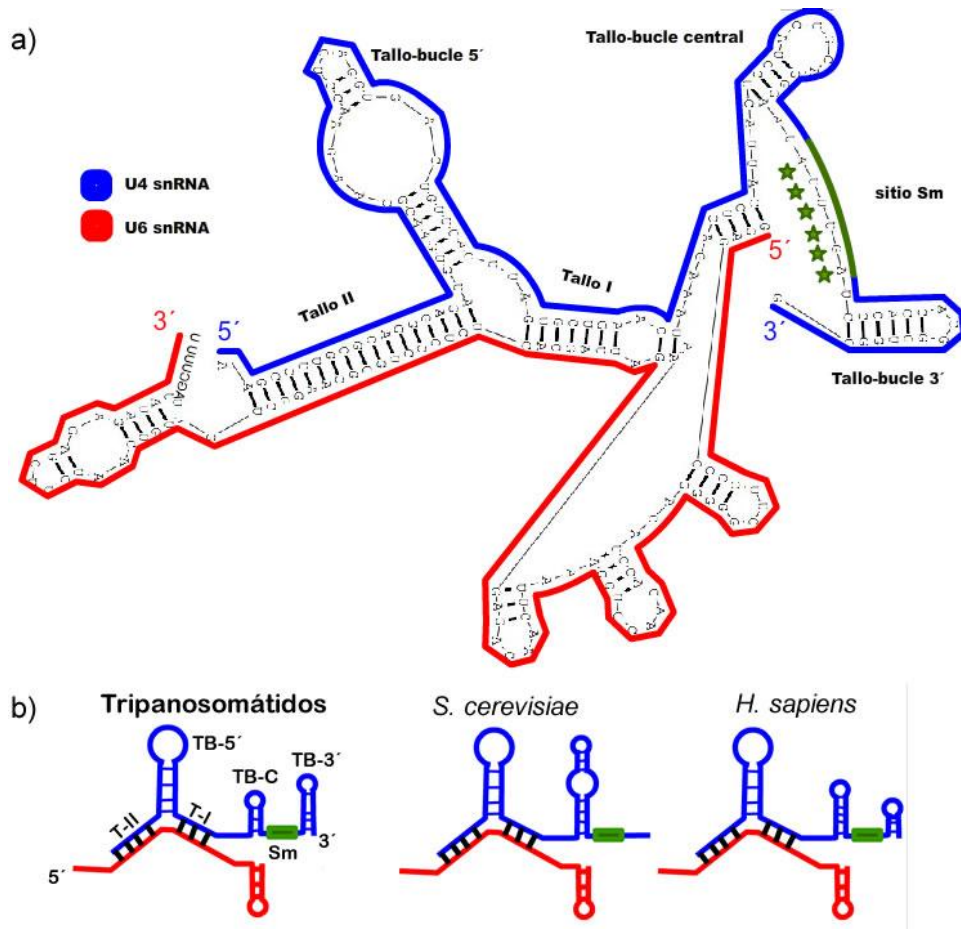


Figura 29. Estructura secundaria del U4/U6 snRNA de *L. major* (panel a) y otros eucariontes (panel b). La estructura se forma por apareamiento de bases (líneas negras) de U4 (azul) con U6 (rojo) snRNAs. Se indican el Tallo II (T-II), tallo-bucle 5' (TB-5'), tallo I (T-I), tallo-bucle central (TB-C), sitio Sm (Sm) y el tallo 3' (T-3).

El análisis de la secuencia reveló la presencia de una molécula semejante a un tRNA (tRNA-like) entre el gen U4 snRNA y el gen tRNA^{PRO}. El tRNA-like se localizó en la cadena negativa, a 96 pb del U4 snRNA (Figura 25c). La secuencia de las dos probables regiones de control interno del tRNA-like (cajas A y B) es muy similar a las secuencias consenso reportadas para los tRNAs de tripanosomátidos: la caja A difirió en dos nucleótidos con respecto a la secuencia consenso, mientras que la caja B sólo difirió en una posición (G en vez de A) (Figura 30). Estas cajas están separadas por 32 pb, que es una distancia común para los tRNAs. La primera base del tRNA-like corresponde a una G, nucleótido común de inicio de tRNAs, localizada a 8 bases río-arriba de la caja A. Además, el tRNA-like presentó un tracto de timinas en su extremo 3' (Figura 25d), el cual también es común en tRNAs. Las cajas A y B presentes en el tRNA^{PRO} son idénticas a las secuencias consenso (Figura 30).

	Caja A	Caja B	Abreviaciones
consenso	*TRGYNYARYGG	**** * * *	R = A o G
tRNA ^{PRO}	<u>TGGTCTAGTGG</u>	<u>GGTTCRA^HNHCN</u>	Y = C o T
tRNA-like	<u>TGACTGAACGG</u>	<u>GGTTCGGCTCG</u>	H = A, C o T
			N = A, C, G o T

Figura 30. Comparación de las cajas A y B del tRNA^{PRO} y del tRNA-like con las secuencias consenso de éstas en tripanosomátidos. Los nucleótidos subrayados son aquellos que son iguales a la secuencia consenso. Los nucleótidos altamente conservados en las secuencias consenso se señalan con un asterisco.

Los tRNAs tienen secuencias y estructuras conservadas para que funcionen e interactúen con otros RNAs y proteínas. La estructura secundaria de los tRNAs se asemeja a un trébol, exhibiendo un brazo aceptor, el brazo D, el brazo anticodón y el brazo TψC. Al analizar el tRNA^{PRO} en el servidor tRNAscan-SE 1.21 se constató una estructura de trébol, con los cuatro brazos característicos (Figura 31a). Sin embargo, como se esperaba, la estructura secundaria del tRNA-like fue diferente a la de un tRNA común, presentándose las cajas A y B a los extremos de posibles brazos D y TψC, con la ausencia del brazo anticodón y del brazo aceptor (Figura 31b).

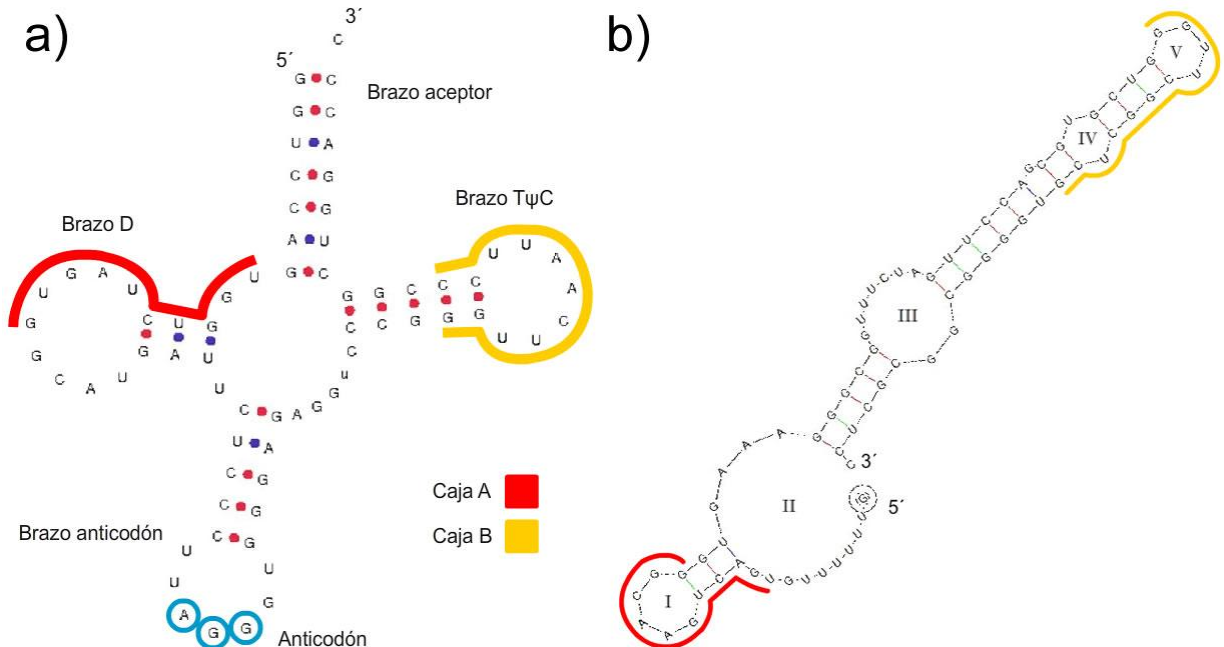


Figura 31. Estructura secundaria del tRNA^{PRO} y del tRNA-like asociado al U4 snRNA. a) tRNA^{PRO} con la ubicación de las cajas A (rojo) y B (naranja) ubicadas dentro del brazo D y TψC, respectivamente. Los nucleótidos marcados en azul señalan el anticodón, y los puntos rojos y azules marcan apareamiento de bases. b) tRNA-like con ubicación de las cajas A y B en los extremos de la estructura. Los números romanos muestran la estructura de 5 diferentes bucles.

4.6 Determinación del sitio de inicio de la transcripción del U4 snRNA

Muchos de los transcritos sintetizados por Pol III contienen en su extremo 5' secuencias cortas que son eliminadas postranscripcionalmente por RNasas, para generar las moléculas de RNA maduras. Para determinar si el transcrito nascente del U4 snRNA de *L. major* contiene nucleótidos adicionales en su extremo 5', se localizó el sitio de inicio de la transcripción del gen mediante ensayos de 5'-RACE (Rapid Amplification of 5' Complementary DNA Ends).

Como primer paso para llevar a cabo el ensayo 5'-RACE, se extrajo RNA total de promastigotes de *L. major*. Para analizar la calidad del RNA, una alícuota de éste fue corrida en un gel de agarosa. Como puede apreciarse en la Figura 32, el RNA presentó una alta calidad, que se manifestó por la nitidez y abundancia de las tres moléculas mayores de RNA ribosomal (18S, 24S α y 24S β).

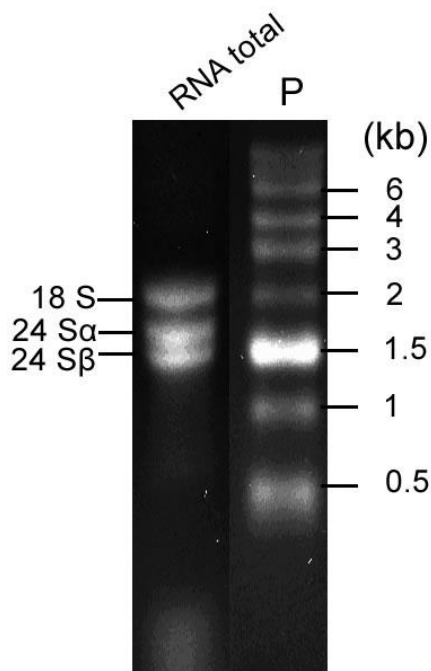


Figura 32. Electroforesis de RNA total de *L. major*. Se indica la posición de las moléculas de rRNA 18S, 24S α y 24S β . En el carril de la derecha se muestra el patrón de peso molecular (P) de 10 kb. Gel de agarosa al 1%.

Así, con este RNA y transcriptasa reversa se preparó el cDNA del U4 snRNA, utilizando el oligonucleótido 3'U4GSP1, el cual se une específicamente a la región 3' del transcrito del U4 snRNA (Figura 33, oligonucleótido 11). Posteriormente, al extremo 3' del cDNA se le agregó un tracto de citocinas. El cDNA se amplificó después por PCR, usando un oligonucleótido poli-G (AAP) y un segundo oligonucleótido específico del U4 snRNA (3'U4GSP2, oligonucleótido 8 en la Figura 33). De esta manera, se generó un producto de PCR de aproximadamente 146 pb (Figura 34a), que fue clonado en el vector pGEM-T. Se analizó un total de 17 clonas mediante restricción con las endonucleasas *NcoI* y *SacI*, enzimas que flanquean el sitio de clonación en el vector pGEM-T. En la Figura 34b se muestran 5 de las restricciones realizadas, observándose en todos los casos un fragmento de aproximadamente 211 pb (que contiene al U4 snRNA, el tracto de citocinas y secuencias flanqueantes del plásmido pGEM-T). El análisis de secuencia de todas las clonas indicó que la transcripción del U4 snRNA de *L. major* inicia en una A que corresponde a la primera base del gen (Figura 35).

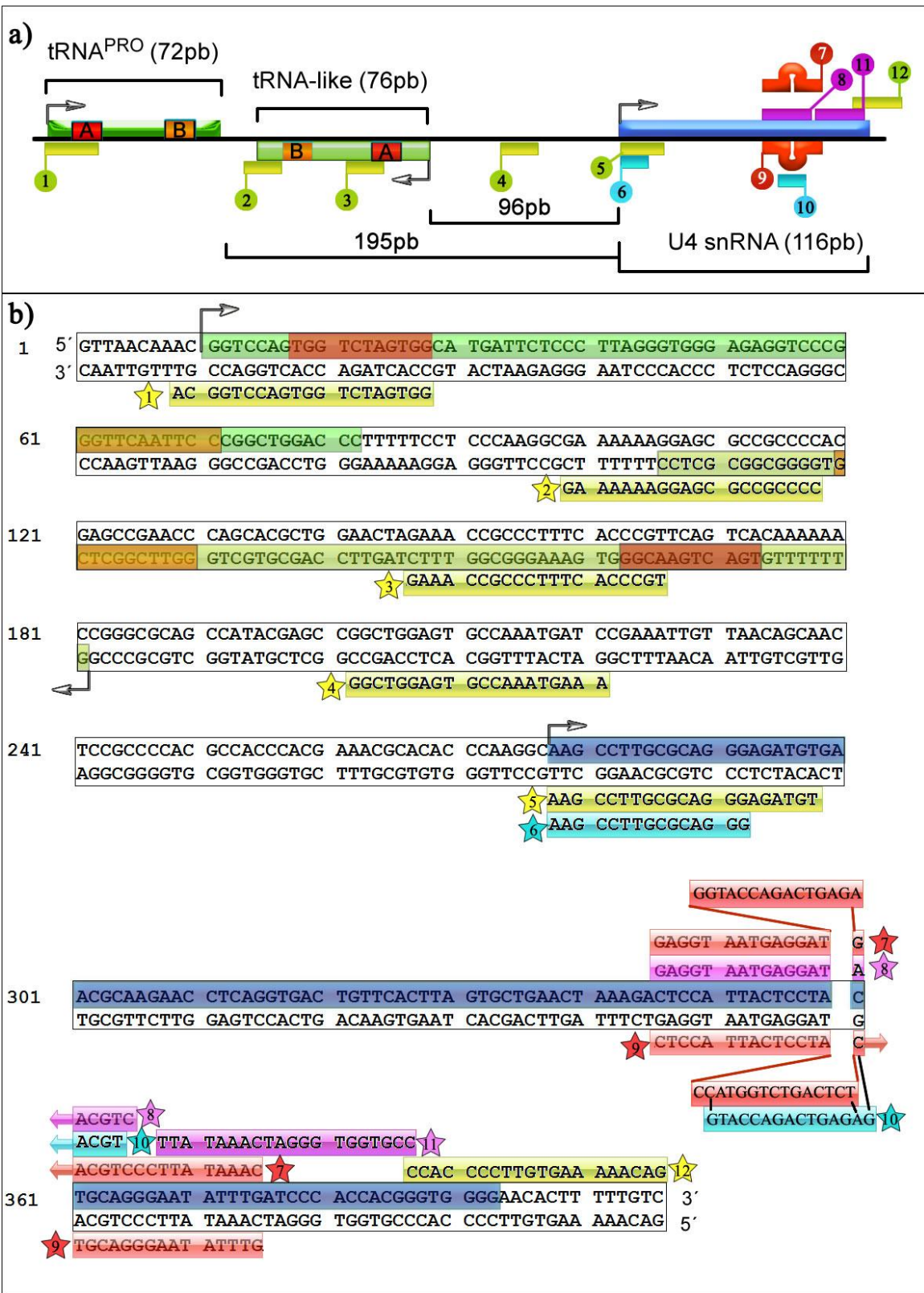


Figura 33. Localización y secuencia de los oligonucleótidos de la región del U4 snRNA que fueron usados en este trabajo. a) Ubicación relativa de los oligonucleótidos. b) Detalles de la secuencia de U4 snRNA y de los oligonucleótidos. Los números señalan el extremo 5' de cada oligonucleótido. Los nombres de los oligonucleótidos son los siguientes: 1) 3'LmjRNAPro; 2) U4tRNA-like5; 3) 3'LmjU4DcajaB; 4) 3'LmjU4DcajaA; 5) U4-5'; 6) U4small-For; 7) 3'U4OligoTag; 8) 3'U4GSP2; 9) 5'U4OligoTag; 10) U4tag-Rev; 11) 3'U4GSP1; 12) 5'U4LmjEnd. Los colores de los oligonucleótidos concuerdan con los presentados en la tabla 3.1 y están relacionados con el tipo de experimento realizado.

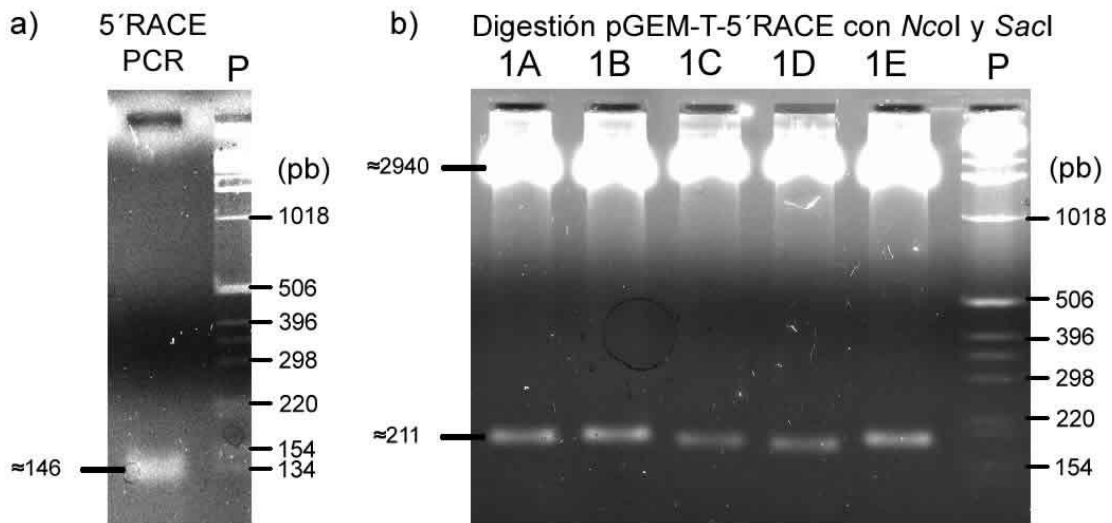


Figura 34. Ensayo 5'-RACE con el U4 snRNA de *L. major*. a) Electroforesis de la amplificación del producto del 5'-RACE. b) Digestión con *Nco*I y *Sac*I de las clonas obtenidas al ligar el producto de PCR en el vector pGEMT. En ambos paneles se usó la escalera de 1 kb (Invitrogen) como patrón de peso molecular (P). Geles de agarosa al 1.2%.



Figura 35. Determinación del sitio de inicio de la transcripción del gen del U4 snRNA de *L. major* por 5'-RACE. En la primera fila se muestra la secuencia del genoma de *L. major*: en azul se señala el gen del U4 snRNA y en verde los nucleótidos localizados río-arriba del gen. Se muestra también la secuencia de 6 clonas del ensayo 5'-RACE. La flecha roja indica el primer nucleótido transcrito.

Para confirmar el resultado obtenido en el experimento de 5'-RACE, se llevó a cabo un ensayo de "primer extension". Para ello, a partir de RNA total y con el oligonucleótido 3'U4GSP1 marcado con P³², que se une al extremo 3' del transcrito del gen U4 snRNA (oligonucleótido 11 en la Figura 33), se generó cDNA con la transcriptasa reversa. Este cDNA se analizó por electroforesis en un gel de

acrilamida junto con las reacciones de secuenciación manual del gen U4 snRNA, llevadas a cabo con el mismo oligonucleótido 3'U4GST1. La reacción de "primer extension" migró a la altura de la C que corresponde al nucleótido -1 (Figura 36); sin embargo, considerando que las reacciones de "primer extension" suelen migrar un poco más o un poco menos que las reacciones de secuenciación, por contener concentraciones diferentes de sales, consideramos que la banda en realidad co-migra con la A que corresponde a la posición +1 del gen. De esta manera, el resultado de este experimento confirmó que el sitio de inicio de la transcripción del gen del U4 snRNA de *L. major* corresponde al primer nucleótido del gen.

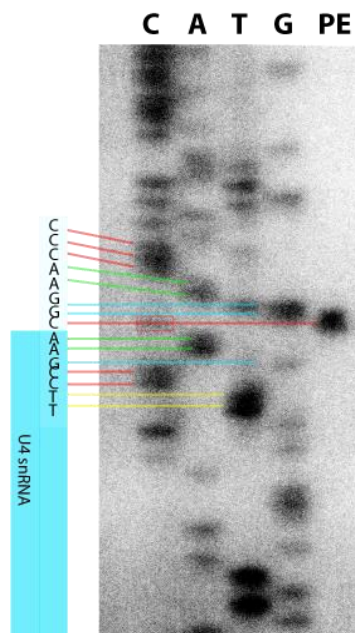


Figura 36. Localización del sitio de inicio de la transcripción del U4 snRNA de *L. major* mediante "primer extension". Electroforesis en un gel de poli-acrilamida al 6% del producto de "Primer Extension" (PE) junto con las reacciones de secuenciación: Citocina (C), Adenina (A), Timina (T) y Guanina (G). A la izquierda se indica la secuencia que rodea el inicio del gen U4 snRNA.

4.7 Identificación de la región promotora del U4 snRNA

Para localizar las regiones de DNA que controlan la expresión del U4 snRNA de *L. major*, se llevó a cabo la siguiente estrategia experimental: A) Fue amplificado por PCR un fragmento de 398 pb que contiene el gen del U4 snRNA y 269 pb de la región flanqueante 5' (que incluye el tRNA^{PRO} y el tRNA-like); el fragmento de DNA fue clonado en el vector pGEM-T. B) Mediante mutagénesis dirigida, fue introducida una secuencia de "tag" de 15 pb en el gen del U4 snRNA; dicho "tag" fue usado para diferenciar entre el U4 snRNA endógeno, de aquel que se

sintetizaría a partir de nuestros plásmidos (U4 snRNA exógeno). C) Se generaron varias construcciones en las que secuencialmente se removieron las regiones 5' flanqueantes del U4 snRNA. D) Los plásmidos obtenidos fueron transfectados en *L. major*, y se purificó RNA total 24 horas después. E) Mediante RT-PCR semicuantitativo se determinó la abundancia del U4 snRNA en las células transfectadas con los diferentes vectores.

4.8 Amplificación y clonación de la región promotora de U4 snRNA

Como primer paso hacia la identificación de la región promotora del U4 snRNA, se amplificó por PCR el gen del U4 snRNA de *L. major* y las secuencias flanqueantes 5' que incluyen el tRNA^{PRO} y el tRNA-like. La reacción se llevó a cabo con los oligonucleótidos 3' LmjtRNA-PRO y 5' U4LmjEnd (Figura 33, oligonucleótidos 1 y 12), amplificándose una banda de 398 pb (Figura 37).

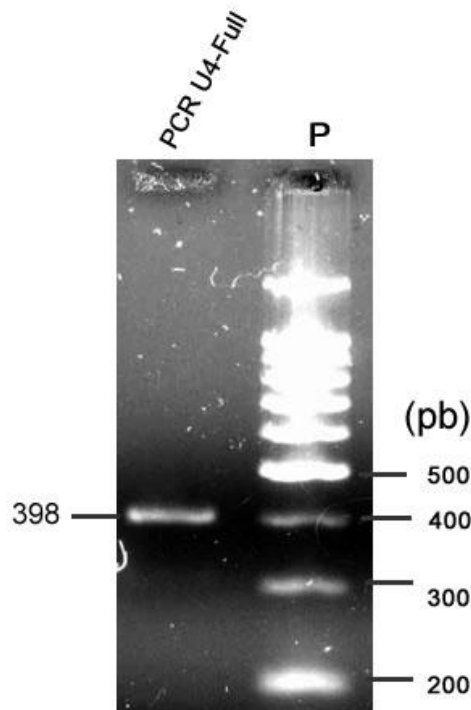


Figura 37. Amplificación por PCR del fragmento U4-Full. Electroforesis en gel de agarosa al 1%. Como marcador de tamaño (P) se muestra la escalera de 100 pb (Invitrogen).

El fragmento de DNA se purificó del gel de agarosa y se ligó al vector pGEM-T con la enzima DNA ligasa T4. El producto de la ligación (pU4-Full) se empleó para transformar células competentes de *E. coli* JM109 mediante choque térmico. Se seleccionaron al azar 3 colonias blancas, y de éstas se purificó DNA plasmídico a pequeña escala. Dichos plásmidos se caracterizaron realizando digestiones con las enzimas de restricción *Nco*I y *Sac*I, las cuales flanquean el sitio de clonación del vector; de esta manera se liberó de pGEM-T el inserto de 457 pb que corresponde a la región del U4 snRNA junto con secuencias flanqueantes que forman parte del polilinker del vector (Figura 38). La secuenciación del vector pU4-Full con los oligonucleótidos SP6 y T7 confirmó que el fragmento clonado correspondió efectivamente al gen del U4 snRNA y sus secuencias flanqueantes 5' (Figura 39).

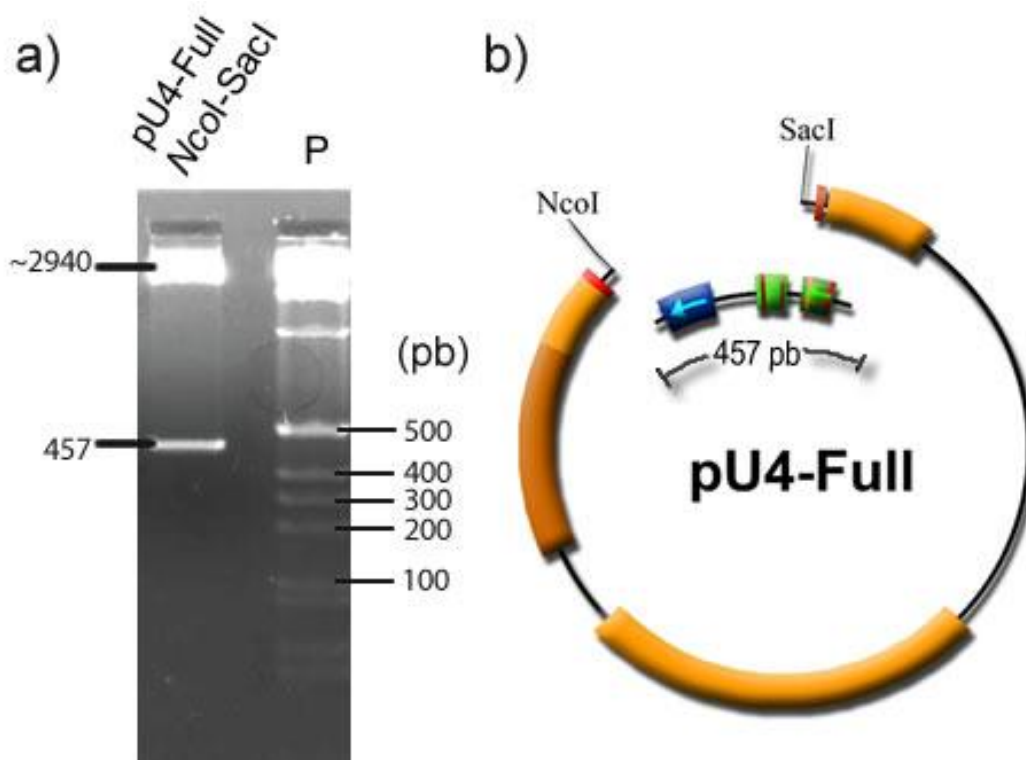


Figura 38. Caracterización del plásmido pU4-Full. a) Electroforesis de la digestión del plásmido pU4-Full con *Nco*I y *Sac*I. Gel de agarosa al 1%, con patrón de 100 pb (P). b) Mapa del plásmido con el inserto liberado por *Nco*I y *Sac*I.

pU4-Full

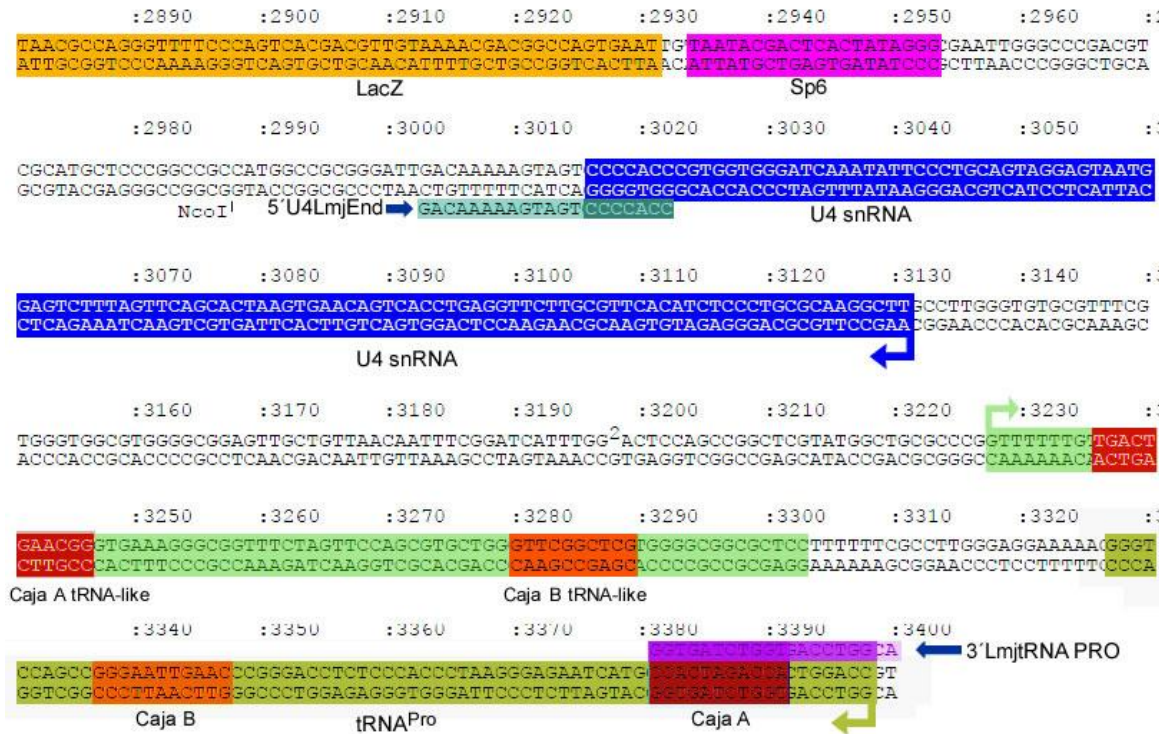


Figura 39. Secuencia parcial del plásmido pU4-Full. En naranja y rosa se observan secuencias que forman parte del vector pGEMT. En la segunda fila se señala la secuencia del sitio de restricción *NcoI* (C/CATGG) seguido del oligonucleótido 5'U4LmjEnd. En azul se muestra el gen U4 snRNA, con su SIT (Flecha Azul). En la cuarta y quinta fila se encuentra el tRNA-like (verde) con sus cajas A y B (rojo y naranja), y en la sexta fila está el tRNA^{PRO}, también con sus cajas y su SIT. En morado se señala el oligonucleótido 3'LmjtRNAPRO.

4.9 Inserción de una secuencia “tag” en el gen del U4 snRNA

Con el propósito de diferenciar por tamaño y secuencia los transcritos del U4 snRNA endógenos (generados a partir del gen localizado en el cromosoma 36) de los exógenos (producidos a partir de los plásmidos) fue necesaria la construcción de un plásmido que tuviera una secuencia “tag” de 15 nucleótidos dentro del gen U4 snRNA. Esto se logró con un kit de mutagénesis dirigida (QuikChange XL Site-Directed Mutagenesis Kit) y utilizando como templado al plásmido pU4-Full y los oligonucleótidos 5'U4OligoTag y 3'U4OligoTag (Figura 33, oligonucleótidos 7 y 9), generando así el plásmido pU4-Tag (Figura 40c). La secuencia “tag” de 15 nucleótidos presenta un sitio de corte para la endonucleasa *NcoI* (C/CATGG) (Figura 40c) por lo que al digerir el plásmido pU4-Tag con *NcoI* y con *SacI* se

liberan 3 fragmentos: de 2943 pb, 400 pb y 72 pb (Figura 40a). Para liberar el fragmento completo sin cortar en el “tag” se utilizaron las endonucleasas *SpeI* y *SphI*, obteniéndose bandas de 444 pb y 2971 pb (Figura 40b). La presencia del “tag” dentro del gen del U4 snRNA se confirmó mediante la secuenciación del vector pU4-Tag con los oligonucleótidos T7 y SP6 (Figura 40c). Cabe señalar que la inserción de la secuencia “tag” de 15 nucleótidos no afectó la estructura secundaria del U4 snRNA; únicamente se formó un tallo-bucle adicional en la región intermedia que no altera el sitio Sm ni las regiones que interactúan con el U6 snRNA (Figura 28b y datos no mostrados).

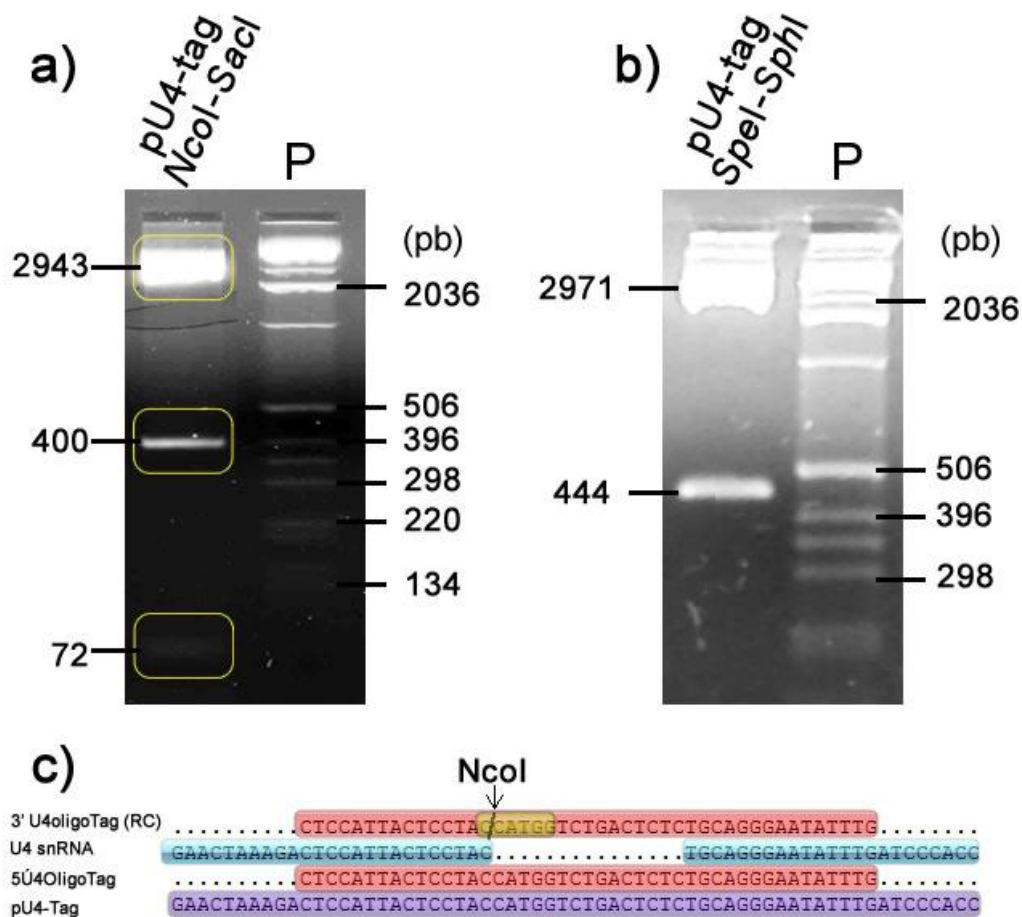


Figura 40. Caracterización del vector pU4-Tag. Digestión del vector con *NcoI* y *SacI* (panel a) y con *SpeI* y *SphI* (panel b). Electroforesis en geles de agarosa al 1.2%. Como patrón (P) se usó la escalera de 1 Kb (Invitrogen). c) Secuencia de la región del plásmido pU4-Tag donde se encuentra el “Tag” de U4-Tag (morado); en rojo se muestran los oligonucleótidos que se utilizaron para crear al plásmido, en amarillo el sitio de corte para *NcoI*, y en azul el gen endógeno del U4 snRNA. Los puntos indican ausencia de nucleótidos.

4.10 Elaboración de plásmidos con diferentes regiones de la secuencia promotora del gen U4 snRNA

Para poder determinar la región promotora del U4 snRNA se crearon diferentes construcciones en las que se eliminaron las secuencias presumiblemente involucradas en la expresión del snRNA. En total se generaron cuatro construcciones, amplificando mediante PCR diferentes segmentos del plásmido pU4-Tag (Figura 41); en todas ellas se utilizó el oligonucleótido 5'U4 Lmjend, el cual se unió a la región 3' del gen U4 snRNA (Figura 33, oligonucleótido 12). En la primera construcción, pU4 Δ tRNA^{Pro}, se eliminó al gen del tRNA^{Pro}, utilizando el oligonucleótido U4tRNA-like5'. En la construcción pU4 Δ B se deletó el tRNA^{Pro} y la caja B del tRNA-like, empleando el oligonucleótido 3'LmjU4DcajaB. La construcción pU4 Δ A utilizó el oligonucleótido 3'LmjU4DcajaA y carece de todos los posibles promotores: tRNA^{Pro} y Cajas B y A del tRNA-like; pero cuenta con 75 pb río-arriba del gen U4 snRNA. Finalmente, pU4 Δ All sólo contiene el gen U4snRNA (sin ninguna secuencia flanqueante 5') y se generó con el oligonucleótido U4-5' (Figuras 33 y 41).

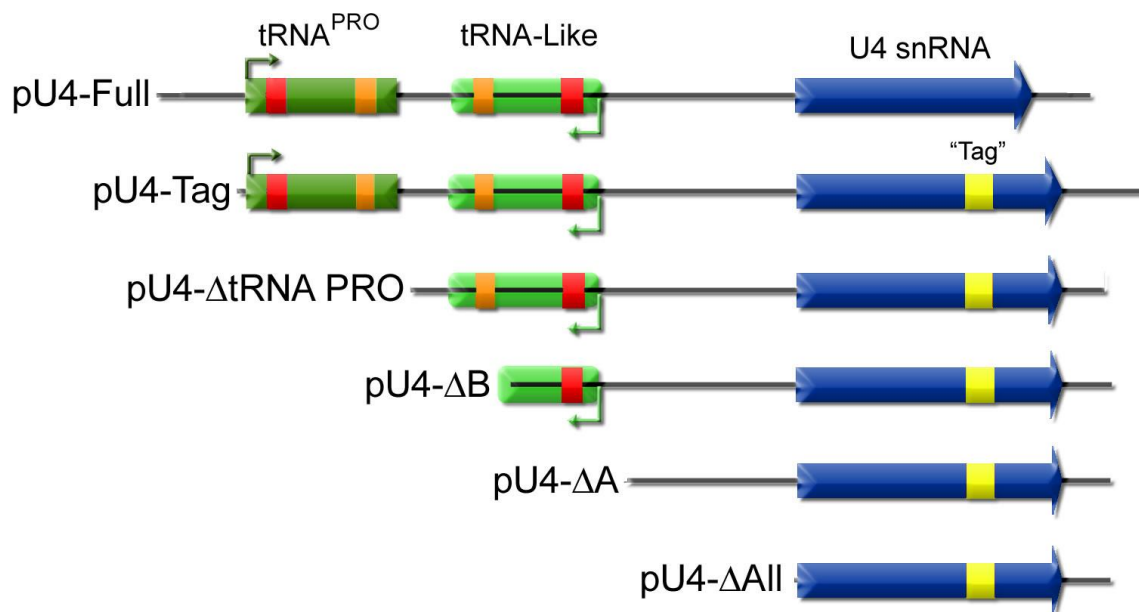


Figura 41. Representación esquemática de las diferentes regiones del locus del U4 snRNA que fueron amplificadas y clonadas para generar los vectores pU4-Tag, pU4 Δ tRNA PRO, pU4 Δ B, pU4 Δ A y pU4 Δ All.

De esta manera, como primer paso para producir los nuevos vectores, se llevó a cabo la amplificación por PCR de los diferentes fragmentos. El análisis por electroforesis de éstos reveló bandas para U4 Δ tRNA PRO, U4 Δ B, U4 Δ A y U4 Δ All de un tamaño aproximado de 320, 275, 220 y 144 pb, respectivamente (Figura 42). Después, las bandas fueron purificadas de los geles de agarosa y clonadas en el vector pGEMT-Easy. Posteriormente se realizaron digestiones de los plásmidos obtenidos, para liberar los insertos del vector pGEMT-Easy, utilizando las enzimas *EcoRI* para pU4 Δ TRNA-PRO, pU4 Δ B y pU4 Δ A; y *SpeI-SphI* para pU4 Δ All; obteniéndose los fragmentos esperados de aproximadamente 341, 294, 240 y 184 pb, respectivamente (Figura 43). Finalmente se secuenciaron los plásmidos para así completar su caracterización (Figuras 44, 45, 46 y 47).

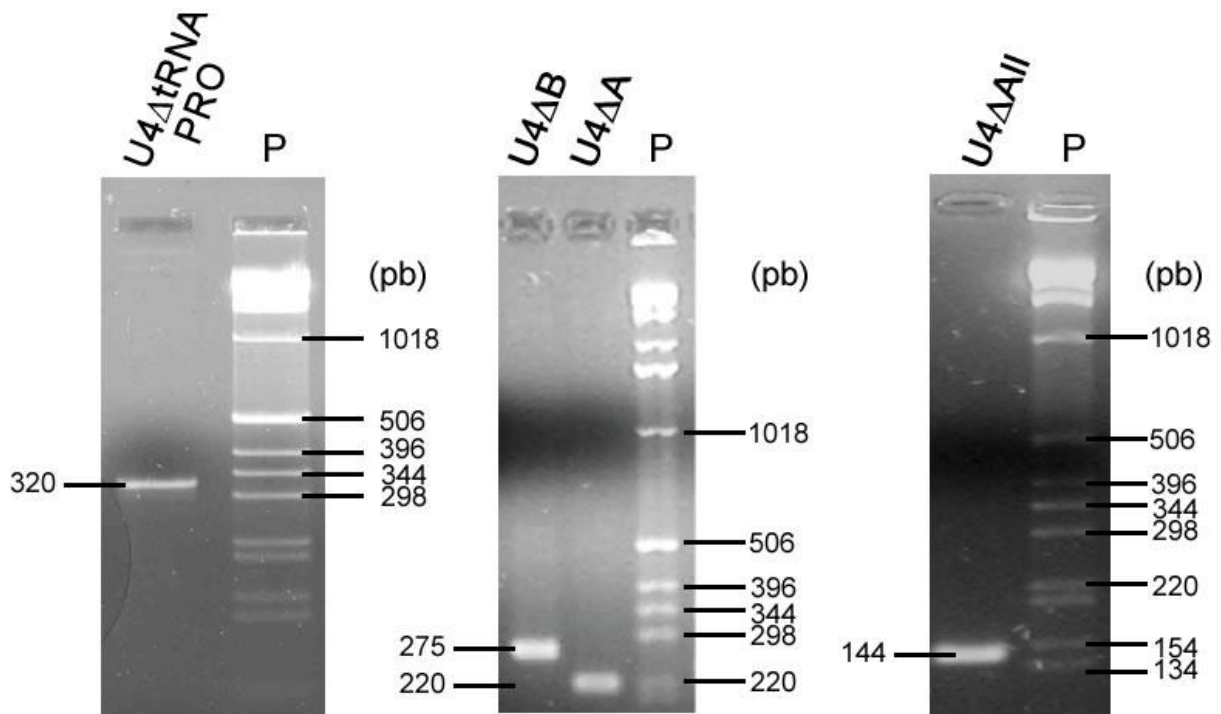


Figura 42. Amplificación por PCR de los insertos U4 Δ tRNA-PRO (panel a), U4 Δ B, U4 Δ A (panel b) y U4 Δ All (panel c). Electroforesis en geles de agarosa al 1.2%. En todos los casos se usó la escalera de 1 Kb como patrón de peso molecular (P).

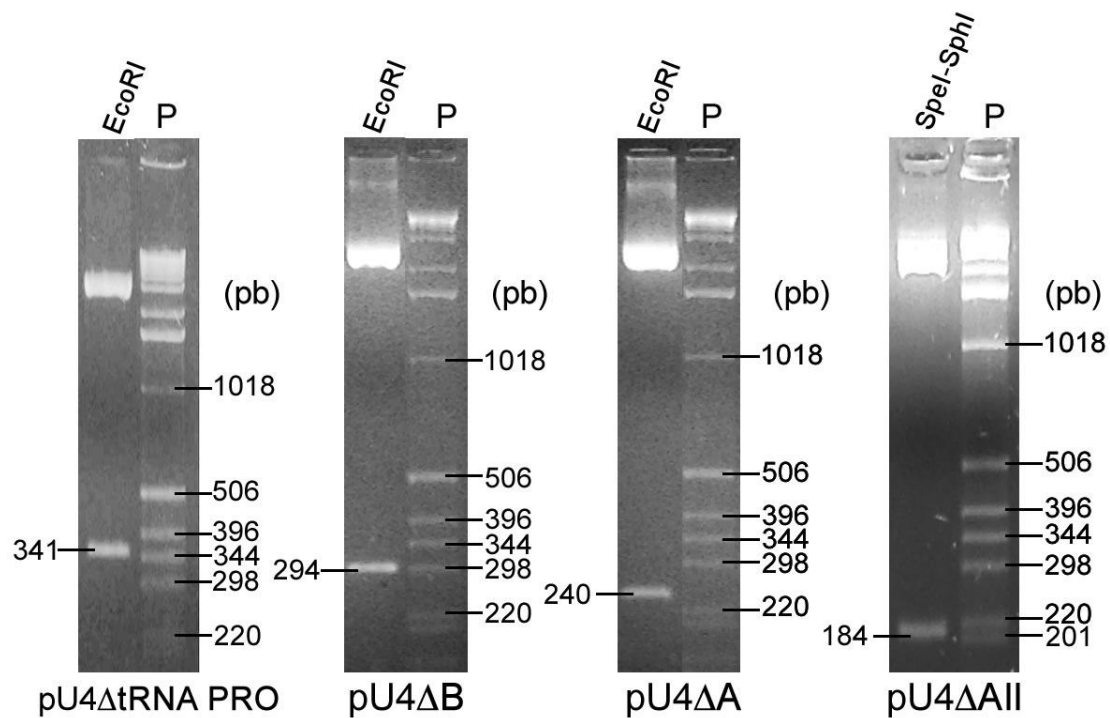


Figura 43. Caracterización de los plásmidos pU4ΔT, pU4ΔB, pU4ΔA y pU4ΔAll. Los plásmidos fueron digeridos con las enzimas señaladas y separados por electroforesis en geles de agarosa al 1.2%. Se usó la escala de 1 Kb como patrón de peso molecular (P).

pU4-ΔTRNA PRO

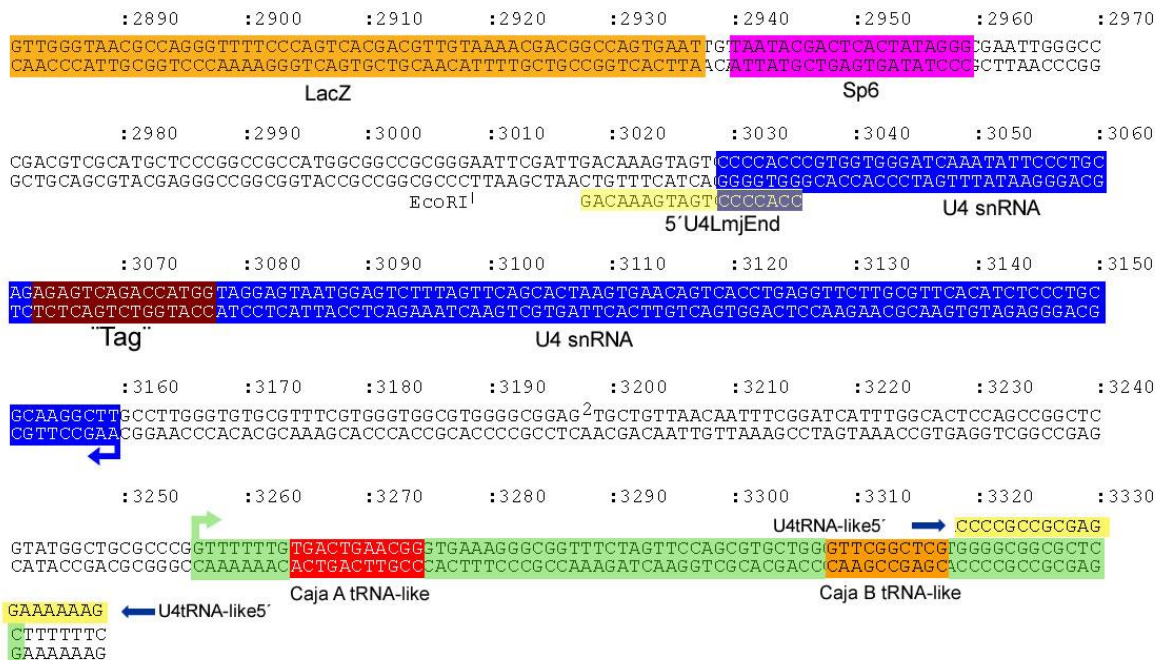


Figura 44. Secuencia parcial del vector pU4ΔTRNA PRO. En naranja y rosa se observan secuencias que forman parte del vector pGEM-T-Easy (Lac Z y SP6). En la segunda fila se señala la secuencia del sitio de restricción *EcoRI* (G/AATTC), seguido del oligonucleótido 5'U4LmjEnd. En azul se muestra el gen U4 snRNA, con la secuencia "tag" en guinda. En la quinta fila se encuentra el tRNA-like (en verde) con sus cajas A y B (rojo y naranja). En amarillo se señala el oligonucleótido 3'LmjRNA-PRO.

pU4-ΔB

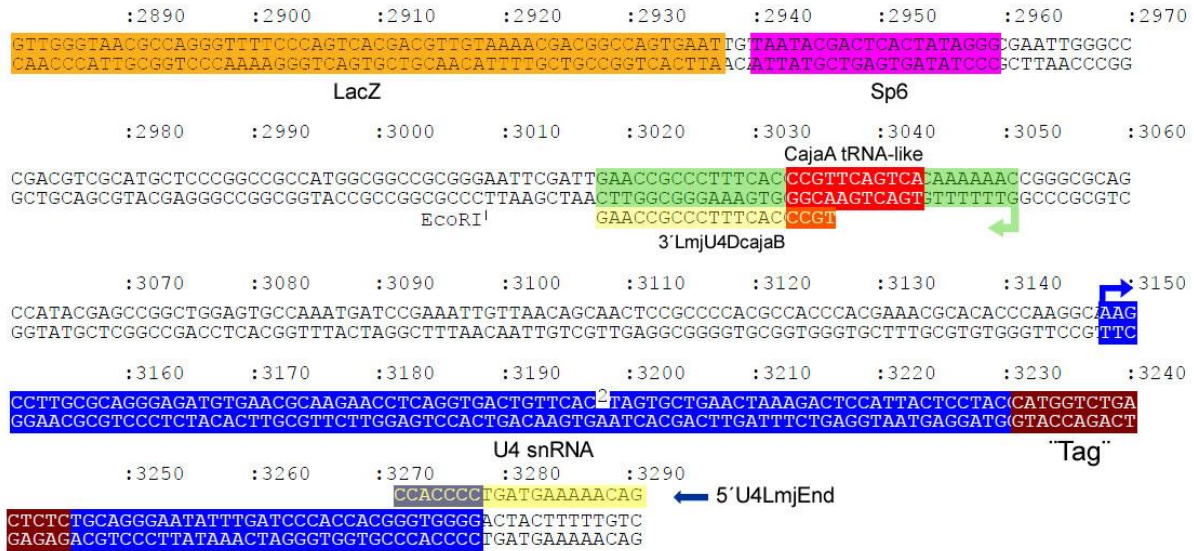


Figura 45. Secuencia parcial del vector pU4ΔB. En naranja y rosa se observan las secuencias que forman parte del vector pGEMT-Easy (LacZ y SP6). En la segunda fila se señala el sitio de restricción *EcoRI* (G/AATTC) seguido del oligonucleótido 3'LmjU4DcajaB (amarillo). En verde se observa parte del tRNA-like, sólo con la caja A (rojo). En la tercera, cuarta y quinta fila se muestra el gen U4 snRNA (azul) con su SIT (flecha azul) y el "tag" (guinda). En amarillo se indica el oligonucleótido 5'U4LmjEnd.

pU4-ΔA

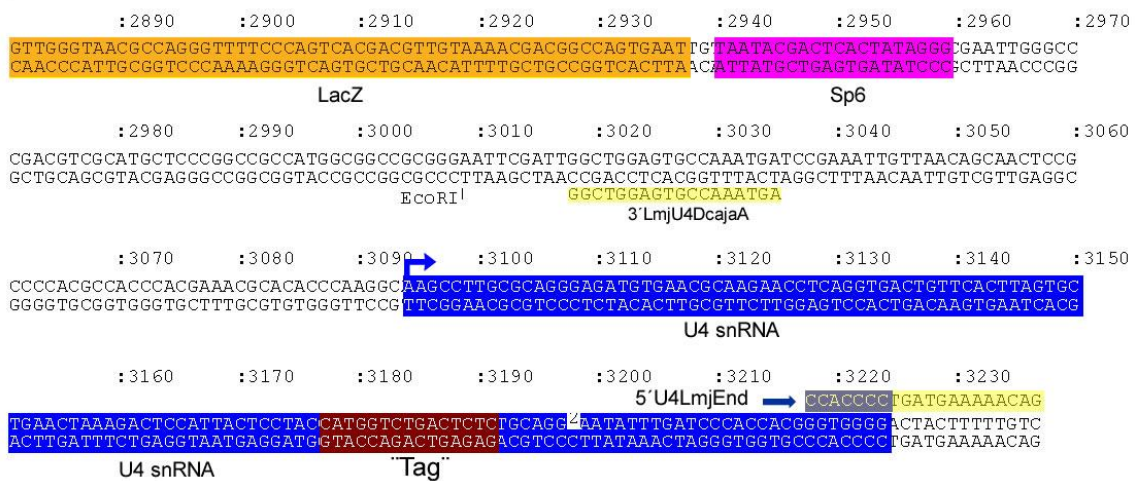


Figura 46. Secuencia parcial del plásmido pU4ΔA. En naranja y rosa se observan las secuencias que forman parte del vector pGEMT-Easy (LacZ y SP6). En la segunda fila se señala el sitio de restricción *EcoRI* (G/AATTC), seguido del oligonucleótido 3'LmjU4DcajaA (amarillo). En la tercera y cuarta fila se muestra el gen U4 snRNA (azul) con su SIT (flecha azul) y el "tag" (guinda). En amarillo se señala el oligonucleótido 5'U4LmjEnd.

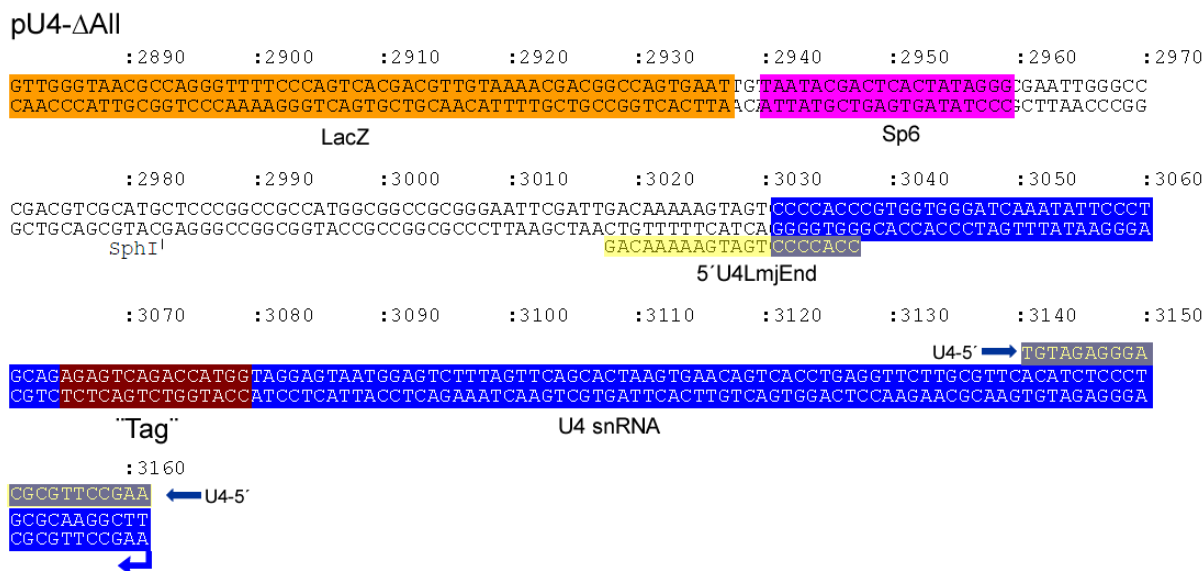


Figura 47. Secuencia de parcial del vector pU4ΔAll. En naranja y rosa se observan las secuencias que forman parte del vector pGEMT-Easy (lacZ y SP6). En la segunda fila se señala el sitio de restricción *SphI* (GCATG/C) seguido del oligonucleótido 5'U4LmjEnd (amarillo). Se muestra el gen U4 snRNA (azul) con su "tag" (guinda) y su SIT (flecha azul). En gris se muestra el oligonucleótido U4-5'.

4.11 Caracterización funcional del promotor U4 snRNA

Promastigotes de *L. major* fueron transfectados independientemente, mediante electroporación, con los vectores pU4-Tag, pU4ΔTRNA-PRO, pU4ΔB y pU4ΔA. Como vector de co-transfección se usó el plásmido pB6-TAP, el cual contiene un gen de resistencia a neomicina. Después de 24 horas fue aislado RNA total de los cultivos transfectados. La calidad y cantidad de RNA se determinó mediante espectrofotometría y electroforesis en geles de agarosa (Figura 48).

La determinación de la abundancia del U4 snRNA exógeno en las muestras de RNA total se realizó mediante RT-PCR semicuantitativo. Para ello, 2 μg de RNA total fueron tratados con DNasa I para eliminar cualquier traza de DNA contaminante. La ausencia del DNA se verificó mediante PCR (datos no mostrados). Posteriormente, se sintetizó cDNA con el oligonucleótido 3'U4 GSP1 y transcriptasa reversa. El cDNA del U4 snRNA se amplificó por PCR con los

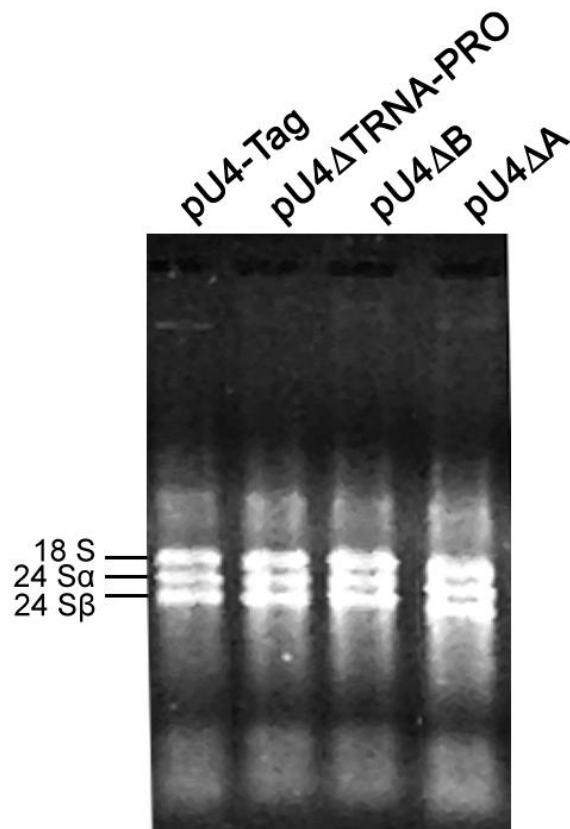


Figura 48. Electroforesis de RNA total aislado 24 horas post-transfección. El RNA fue purificado de células transfectadas con los plásmidos señalados. En todos los casos se aprecian las tres bandas mayores de rRNA. Gel de agarosa al 1%.

oligonucleótidos U4small-For y U4tag-Rev. Este último contiene secuencias complementarias a la secuencia “tag” presente sólo en el U4 snRNA exógeno, que genera un producto de 102 pb (Figura 49). Para asegurarnos de estar en la fase lineal de la amplificación del PCR, y así poder comparar la abundancia del U4 snRNA en las diferentes muestras, se probó diferente número de ciclos, usando cDNA proveniente de las células transfectadas con el vector pU4-Tag. Se encontró que con 28 ciclos la amplificación se encuentra en la fase lineal (Figura 49). Entonces, fue amplificado el cDNA obtenido con las cuatro construcciones mediante un PCR de 28 ciclos. El análisis de los productos de PCR mostró una banda del tamaño esperado (102 pb) con pU4-Tag y pU4 Δ TRNA-PRO (además de una banda inespecífica de tamaño mayor) (Figura 50). Sin embargo, no se observó señal alguna del U4 snRNA con los vectores pU4 Δ B y pU4 Δ A (Figura 50).

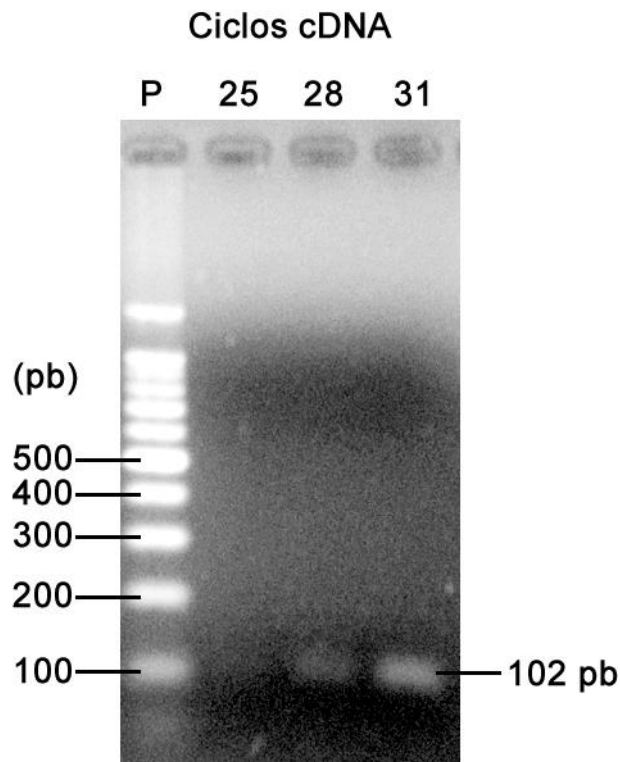


Figura 49. Amplificación por PCR del cDNA de U4 snRNA. La amplificación se llevó a cabo por 25, 28 y 31 ciclos. Desde los 28 ciclos se observa la banda esperada de 102 pb. Como marcador de tamaño se usó la escalera de 100 pb (P). Gel de agarosa al 1.5%.

El cDNA de neo, generado del plásmido de co-transfección pB6-TAP, se sintetizó con el oligonucleótido 3'Neo reverse 2 y se amplificó con los oligonucleótidos NEO-SENSE y NEO-ANTISENSE. El fragmento esperado de 220 pb se obtuvo con las cuatro muestras, y en todos los casos la intensidad de la banda fue muy parecida (Figura 50). Esto significa que la eficiencia de transfección de los diferentes cultivos fue la misma y que las diferencias observadas en la expresión del U4 snRNA se deben entonces a las diferentes secuencias flanqueantes presentes en los vectores.

Así, al eliminar la secuencia del tRNA^{PRO} (vector pU4 Δ TRNA-PRO) no se afectó la expresión del U4 snRNA (Figura 50). Sin embargo, al eliminar la caja B del tRNA-

like (vector pU4 Δ B) desapareció totalmente la señal (Figura 50), indicando que este elemento es necesario para la expresión del U4 snRNA en *L. major*.

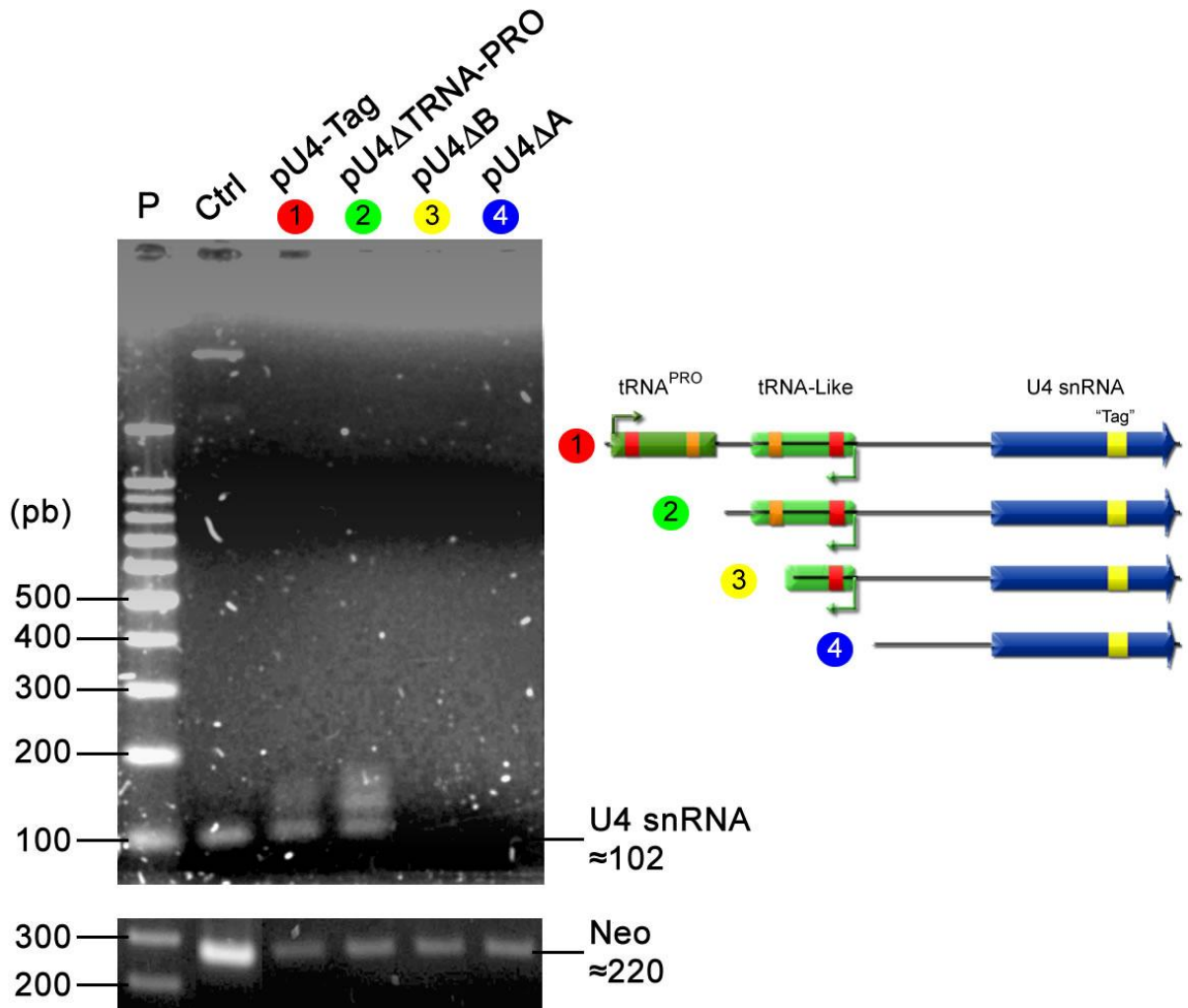


Figura 50. Caracterización funcional del promotor del U4 snRNA de *L. major*. Se muestran los productos de RT-PCR llevados a cabo con RNA total aislado de células transfectadas con los vectores pU4-Tag (1), pU4 Δ TRNA-PRO (2), pU4 Δ B (3) y pU4 Δ A (4). En la parte inferior se muestra el RT-PCR del gen de neo, generado a partir de las mismas muestras de RNA. Como control (Ctrl) se muestran los productos de PCR obtenidos con los plásmidos pU4-Full (U4 snRNA) y pB6-TAP (Neo).

5. Discusión

5.1 Análisis de la localización y secuencia del U4 snRNA

L. major posee únicamente una copia del gen del U4 snRNA (Ivens et al., 2005). Mediante análisis computacionales de los genomas de diferentes tripanosomátidos encontramos que *L. infantum*, *L. braziliensis* y *C. fasciculata* también presentan sólo una copia de dicho gen. Esta situación también se ha reportado para los genes de U2, U3, U4, U5 y U6 snRNAs en *T. brucei*, *L. collosoma*, *L. seymouri* y *L. tarantolae* (Mottram et al., 1989; Marchetti et al., 1998; Li et al., 2000; Bell et al., 2000). En contraste, los eucariontes metazoos en general presentan múltiples copias de los genes de snRNAs, que en algunas ocasiones se ubican en tándem. Los primates como *H. sapiens* y *Pan troglodytes* tienen de 2 a 8 copias de genes snRNA, insectos como *Drosophila melanogaster* 3 a 7 copias, mientras que nemátodos como *Caenorhabditis elegans* tienen de 4 a 17 copias (Marz et al., 2008). En tripanosomátidos, las células necesitan una alta cantidad de los snRNAs para llevar a cabo el trans-splicing de todos los mRNAs de manera eficiente; esto sugiere que el nivel de transcripción de los genes de copia única de todos los snRNAs es muy elevado.

Muchos eucariontes tienen snRNAs que forman parte del llamado empalmosoma menor, encargado de eliminar un tipo particular de intrones (Marz et al., 2008). Entre estos snRNAs se encuentre el U4atac, que es homólogo del U4 snRNA. A la fecha, en ningún tripanosomátido se ha reportado la presencia del U4atac snRNA, ni de ningún otro snRNA del empalmosoma menor.

El gen de U4 snRNA de *L. major* y otras especies de *Leishmania* se encuentra asociado a genes de tRNA en una región localizada entre dos unidades policistrónicas convergentes (Figura 26). Este comportamiento de asociación de snRNAs con tRNAs es común en tripanosomátidos (Nakaar et al., 1995a; Padilla-Mejía et al., 2009). La presencia de genes transcritos por Pol III en los extremos de unidades policistrónicas es también frecuente en este grupo de organismos (Marchetti et al., 1998; Padilla-Mejía et al., 2009). Sin embargo, en *T. brucei* y *T.*

cruzi el gen del U4 snRNA se localiza dentro de una unidad policistrónica (Figura 26).

El locus del U4 snRNA es altamente sinténico entre las diferentes especies de *Leishmania* analizadas, y entre *T. brucei* y *T. cruzi*; sin embargo, no se observó sintenia entre *Leishmania* y *Tripanosoma* (Figura 26). Esta situación es similar a la reportada en eucariontes superiores, donde los snRNAs son sintéticos sólo entre especies muy cercanas evolutivamente, como humano y chimpancé (Marz et al., 2008). La falta de conservación en el orden génico ha llevado a proponer que los snRNAs se comportan como elementos genéticos móviles (Marz et al., 2008).

La secuencia del gen del U4 snRNA de *L. major* es 100% idéntica a la secuencia de *L. infantum*, mientras que la identidad entre *L. major* y *L. braziliensis* es del 95% (Figura 27). Con *L. seymouri* la identidad observada es del 90%, pero con *T. cruzi* la identidad es de sólo 79%. El tamaño del snRNA U4 en tripanosomátidos es de entre 110 (*T. brucei* y *T. cruzi*) y 117 pb (*L. seymouri*). Este es un tamaño relativamente pequeño, comparado con el U4 snRNA de metazoos (142-145 pb) (Krol et al., 1981), de plantas (150-154 pb) (Myslinski y Branlant, 1991) y de levadura (160 pb) (Siliciano et al., 1987). Las primeras 31 pb del gen del U4 snRNA están altamente conservadas, siendo iguales entre todos los tripanosomátidos analizados (con excepción de *T. brucei* y *T. cruzi*, que presentan un cambio) (Figura 27).

El sitio Sm consenso en tripanosomátidos es AAAN₄G (en donde el 71% de los casos N es U) (Li et al., 2000). En el U4 snRNA de *L. collosoma*, *L. seymouri* y *L. tarentolae* se reportó que el sitio Sm (AUAUUUG) se desvió de la secuencia consenso debido a la interrupción del tracto de Us por una A; asimismo, en *T. brucei* hay una G inusual río-arriba del tracto de Us (AAGUUUG) (Li et al., 2000; Bell et al., 2000). En *L. major*, *L. infantum* y *L. braziliensis* ocurrió de igual manera la interrupción del tracto de Us por una A (AUAUUUG) (Figura 28a y datos no mostrados). Esto indica que en realidad la secuencia del sitio Sm de tripanosomátidos es muy variable, por lo que no existiría una secuencia consenso como tal. Esto sugiere que, a diferencia de otros organismos, las proteínas Sm no

reconocen una secuencia específica en los snRNAs de tripanosomátidos, sino más bien una estructura secundaria o terciaria particular.

5.2 Estructuras secundarias

La estructura secundaria del U4 snRNA de *T. cruzi*, *T. brucei*, *L. seymouri*, *L. collosoma* y *L. tarentolae* presenta 4 tallos bucle (TB I-IV) y tres bucles (B I, II y III) (Figura 28, y datos no mostrados) (Li et al., 2000; Bell et al., 2000). Sin embargo, en *L. major*, *L. infantum* y *L. braziliensis* el tallo bucle III está ausente. Otros organismos, como *Physarum polycephalum*, *S. cerevisiae*, y *Schizosaccharomyces pombe* carecen del TB-IV (Myslinski y Branlant, 1991).

La estructura secundaria del U4/U6 snRNA en *L. major* es muy parecida a la reportada en otros tripanosomátidos (*L. seymouri*, *L. collosoma* y *T. brucei*), presentando las estructuras T-II, TB-5', T-I, TB-central, sitio Sm y TB-3' (Figura 29) (Li et al., 2000; Bell et al., 2000; Gunzl et al., 1992). La mayoría de las diferencias en la secuencia de los U4 snRNAs de tripanosomátidos se presentan en las regiones del T-II y el TB-central (Li et al., 2000). Las regiones 5' de las estructuras de U4/U6 snRNAs son similares en *H. Sapiens*, *S. cerevisiae* y los tripanosomátidos. Por el contrario, la región 3' (que abarca el TB-central, el sitio Sm y el TB-3') no se encuentra conservada entre diferentes especies (Hu et al., 1995; Kastner et al., 1991). En *S. cerevisiae*, mutaciones en el T-II (que es una región de apareamiento con el U6 snRNA) así como en el sitio Sm, resultaron en fenotipos letales. En contraste el T-I y el TB-III fueron tolerantes a cambios, aunque mutaciones en dos nucleótidos del TB-5' produjeron alteraciones en el crecimiento celular (Hu et al., 1995). Es probable que modificaciones de la estructura de U4 snRNA en *L. major* y otros tripanosomátidos en estas regiones provoquen cambios similares. De hecho, mutaciones realizadas en el sitio Sm de U4 snRNA de *L. seymouri* indicaron la importancia de éste para la biogénesis de la ribonucleoproteína (Bell et al., 2000).

En varios organismos se han caracterizado proteínas asociadas al U4/U6 snRNA. Por ejemplo, en humanos la proteína 15.5K se une al motivo caja C/D (AAUGA,

caja C; GA, caja D) del tallo-bucle 5' de U4 snRNA (Watkins et al., 2002); esto contribuye a la subsecuente unión de Prp31, del heterotrímero CypH-Prp4-Prp3 (Figura 14b) (Vidovic et al., 2000; Schultz et al., 2006b), y las proteínas Sm, que se unen al sitio Sm y ayudan a la biogénesis y estabilidad de los snRNAs (Will y Luhrmann, 2001; Kiss, 2004). En el tallo bucle 5' de *L. major* existen secuencias parecidas a la caja C/D (AAGA, caja C; GA, caja D) que podrían servir de sitio de unión para una proteína 15.5K-like que ayudaría a la unión de otras proteínas (tal vez homólogas al heterotrímero CypH-Prp4-Prp3). En *L. major* sí se han identificado proteínas Sm generales y proteínas Sm específicas (SSm) para los U4 y U6 snRNAs que requieren del reconocimiento de sitios Sm degenerados (Tkacz et al., 2007).

En *S. cerevisiae* se construyó un U4 snRNA quimérico sustituyendo el tallo-bucle 3' por el de *T. brucei* (que es mucho más pequeño). Se encontró que el U4 quimérico fue incapaz de unirse eficientemente al U6 snRNA, sugiriendo cambios en la conformación de los tallos I y II y la posible falta de unión de una proteína que ayudaría a la asociación de U4/U6 (Bordonne et al., 1990).

El U4 snRNA de *L. major* está asociado con varios tRNAs y con un tRNA-like. El tRNA^{PRO}, que es el más próximo a U4 snRNA, presenta la estructura secundaria característica de trébol (Figura 31a). Por el contrario, el tRNA-like carece del brazo aceptor y el brazo del anticodón (Figura 31b). El tRNA-like asociado al U2 snRNA en *T. brucei* tampoco presentó una estructura de trébol. Se ha reportado que los tRNAs asociados a U snRNAs se expresan en *T. brucei* (Nakaar et al., 1994); también el tRNA-like asociado al U4 snRNA de *L. collosoma* presenta una expresión discreta (Li et al., 2000); sin embargo este último tiene una estructura secundaria de trébol. Sería de interés determinar si el tRNA-like asociado a U4 snRNA de *L. major* es transcrito. En todo caso, si el tRNA-like se expresara, muy probablemente sería degradado rápidamente, pues no presenta una estructura secundaria adecuada.

5.3 Sitios de inicio y término de la transcripción

Pol III inicia la transcripción de genes de tRNAs alrededor de 15 pb río-arriba del inicio del gen, generando transcritos inmaduros (pre-tRNAs) que contienen secuencias extras en la región 5' que necesitan ser procesadas por la riboenzima RNasa P para generar un tRNA maduro (Frank y Pace, 1998). En el caso del RNA RPR1, que forma parte de la RNasa P, la transcripción de Pol III inicia 84 pb río-arriba del gen; el extremo 5' maduro de este RNA se genera también por la acción de RNasas (Lee et al., 1991). En *L. major* existía la posibilidad de que el transcrito primario del gen U4 snRNA contuviera secuencias extras en la región 5' que tuvieran que ser procesadas por algún mecanismo similar. Sin embargo, nuestros resultados revelaron que el sitio de inicio de la transcripción de U4 snRNA corresponde al primer nucleótido del gen (Figura 35), lo cual sugiere que el U4 snRNA no presenta un estado inmaduro con secuencias adicionales en la región 5'. Por otro lado, río-abajo del gen del U4 snRNA de *L. major* se localiza una región de cinco Ts, la cual presumiblemente sirve de señal para el término de la transcripción de Pol III. En *L. major*, se ha visto que la transcripción del tRNA localizado en el cromosoma 3 termina en un tracto de cuatro Ts (Martinez-Calvillo et al., 2004); en vertebrados la terminación ocurre con cuatro Ts y en levadura con cinco (Dieci et al., 2007). Se esperaría entonces que el transcrito primario del U4 snRNA tuviera una secuencia extra de varias bases en su región 3', que sería procesada para producir el extremo 3' maduro de la molécula.

5.4 Promotor del U4 snRNA

Para identificar las secuencias que controlan la transcripción del U4 snRNA de *L. major*, se generaron varios plásmidos que contenían deleciones de los probables elementos promotores (cajas A y B del tRNA^{PRO} y del tRNA-like) (Figura 41). Los vectores fueron transfectados transitoriamente en promastigotes de *L. major*. Mediante ensayos de RT-PCR semicuantitativo se determinó en primer lugar que el tRNA^{PRO} no se requiere para la síntesis del U4 snRNA. Se encontró, en cambio, que la caja B del tRNA-like es indispensable para la expresión de U4 snRNA, pues su deleción abate totalmente la síntesis del RNA (Figura 50). Este

resultado es similar al reportado en *L. collosoma*, donde mutaciones de la caja B del tRNA-like completamente inactivaron la transcripción del U4 snRNA (Li et al., 2000). Asimismo, el U2 snRNA de *T. brucei* se inactivó con mutaciones en la caja B del tRNA-like acompañante (Gunzl et al., 1995; Nakaar et al., 1997; Nakaar et al., 1997).

Nuestros datos sugieren que la caja A del tRNA-like no se requiere para la expresión del U4 snRNA de *L. major* (Figura 50). Esto es contrario a lo encontrado en los U1 y U6 snRNAs de *T. brucei*, donde se reportó que la eliminación de la caja A del tRNA acompañante produce una disminución en la transcripción del snRNA. La importancia de la caja A se ha relacionado con la distancia que guarda con el snRNA, ya que al cambiar la distancia de la caja A del tRNA^{Thr} no ocurrió expresión alguna del U6 snRNA de *T. brucei*, incluso en presencia de la caja B (Fantoni et al., 1994). La expresión de U1 snRNA en *T. brucei* requirió de ambas cajas (A y B) de un tRNA-like (Djikeng et al., 2001). Futuros experimentos permitirán reevaluar la posible importancia de la caja A del tRNA-like en la síntesis del U4 snRNA de *L. major*.

Es probable que el U4 snRNA ancestral en *L. major* y otros tripanosomátidos se encontrara asociado con un gen tRNA que a lo largo de la evolución acumuló mutaciones deletéreas en sus regiones codificantes, con excepción de las cajas A y B, hasta degenerar en un tRNA-like. Esta situación también se ha propuesto para el tRNA-like acompañante del U2 snRNA en *T. brucei* (Nakaar et al., 1994).

La participación de cajas A y B de un tRNA en la transcripción de otros genes no es exclusiva de los tripanosomátidos. En plantas, la expresión de algunos RNAs pequeños nucleolares (snoRNAs) depende de un gen de tRNA localizado río-arriba del snoRNA (Barbezier et al., 2009); en este caso, el tRNA y el snoRNA se localizan en la misma cadena de DNA. Asimismo, la transcripción del gen del SNR52 snoRNA de levadura depende de cajas A y B localizadas río-arriba del gen (Guffanti et al., 2006). Además, el gen RPR1 de *S. cerevisiae*, que codifica la molécula de RNA de la RNasa P, requiere de las cajas A y B de un tRNA-like para su correcta expresión (Lee et al., 1991). Esta estrategia también se ha utilizado

para la expresión de microRNAs (miRNAs) de virus (Pfeffer et al., 2005) y humanos (Borchert et al., 2006). Es probable que la expresión de muchos otros RNAs no codificantes en diferentes organismos dependa de cajas A y B, ya sea presentes en un tRNA, o como elementos promotores independientes, no asociados a ningún gen.

5.5 Modelo de transcripción del U4 snRNA de *Leishmania*

Los promotores para los U snRNAs en *T. brucei* y *Leptomonas* han correspondido con las cajas A y B de tRNAs o tRNAs-like divergentes posicionados a una distancia conservada promedio de 94 pb (Nakaar et al., 1995b; Nakaar et al., 1994). Nuestros resultados sugieren una situación similar para el U4 snRNA de *L. major*.

Normalmente, las cajas A y B presentes en los tRNAs inician el ensamblaje del complejo transcripcional reclutando a TFIIC, que a su vez posiciona a TFIIIB en el sitio de inicio de la transcripción, para que Pol III pueda iniciar la transcripción. El sentido de la transcripción ocurre dependiendo de la orientación de las cajas A y B; iniciando en la región 5' de la caja A y terminando en la región 3' de la caja B, hasta llegar al tracto de Ts (Schramm y Hernandez, 2002; Geiduschek y Kassavetis, 2001; Paule y White, 2000).

En el caso de *L. major* (y otros tripanosomátidos), a primera vista resultaría un problema que el promotor tRNA-like se encuentre divergente al U4 snRNA, ya que posicionaría a las cajas A y B en sentido opuesto a la transcripción del U4 snRNA y consecuentemente promovería la unión de TFIIIB y de Pol III en sentido contrario al gen U4 snRNA (Figura 25c). Sin embargo, en *T. brucei* se ha propuesto un modelo en el que la región localizada entre el gen que actúa como promotor (tRNA o tRNA-like) y el gen U snRNA sería doblada de forma tal que se posicionarían en la misma dirección las regiones 5' de ambos genes (Nakaar et al., 1994). Nosotros proponemos que un factor similar a TFIIC, aún no descrito en tripanosomátidos, participaría activamente en este proceso. Esto se sustenta en parte por la capacidad de TFIIC de levadura de provocar un doblez del DNA en la

región 5' de genes de tRNA (Leveillard et al., 1991), y en su aparente capacidad de organizar la cromatina (Burnol et al., 1993a), como se discute a continuación.

TFIIIC es un multicomplejo proteico compuesto por seis subunidades que forman dos dominios globulares llamados T_B y T_A , que se unen a la caja B y A, respectivamente (Schultz et al., 1989). Los dos dominios están unidos físicamente por la subunidad TFC8 que puede ser estirada hasta 10 nm, dándole gran flexibilidad y la forma característica de mancuerna a TFIIIC (Figura 8) (Geiduschek y Kassavetis, 2001; Burnol et al., 1993b). Al interaccionar con la caja B, TFIIIC es capaz de evitar la represión de la cromatina, ayudando al ensamblaje de los demás factores de transcripción (Burnol et al., 1993a). Resulta interesante el hecho de que la presencia de TFIIIC en regiones de DNA con secuencias de cajas B marca los límites entre dominios de eucromatina y heterocromatina, lo cual sugiere un papel adicional de TFIIIC como una abrazadera que organiza los cromosomas (Noma et al., 2006). Aunque no se ha identificado TFIIIC en tripanosomátidos, ensayos de retardo y de "footprinting" con extractos nucleares de *T. brucei* han demostrado la existencia de un factor proteico que se une a la región río-arriba de U2 snRNA (Tschudi et al., 1990); o que protege las cajas A y B de un tRNA, siendo capaz de doblar el DNA en la región cercana a la caja B en un ángulo de 45° (Bell y Barry, 1995). El espacio conservado de 95 pb entre el gen de snRNA y el tRNA (o tRNA-like) en tripanosomátidos corresponde a nueve vueltas helicoidales en la forma B del DNA (Bell y Barry, 1995). Nosotros creemos que en *L. major* existe un factor homólogo a TFIIIC, que posiblemente perturbe la estructura de los nucleosomas al unirse a la caja B del tRNA-like; subsecuentemente se uniría a la caja A provocando un doblez en el DNA que posicionaría al U4 snRNA en el sentido correcto de la transcripción. Después, permitiría la llegada de TFIIIB que posicionaría a Pol III en el sitio de inicio de la transcripción de U4 snRNA e iniciaría la transcripción (Figura 51). Se presume que el tRNA-like también sería transcrito, como se ha reportado en *T. brucei* (Nakaar et al., 1994).

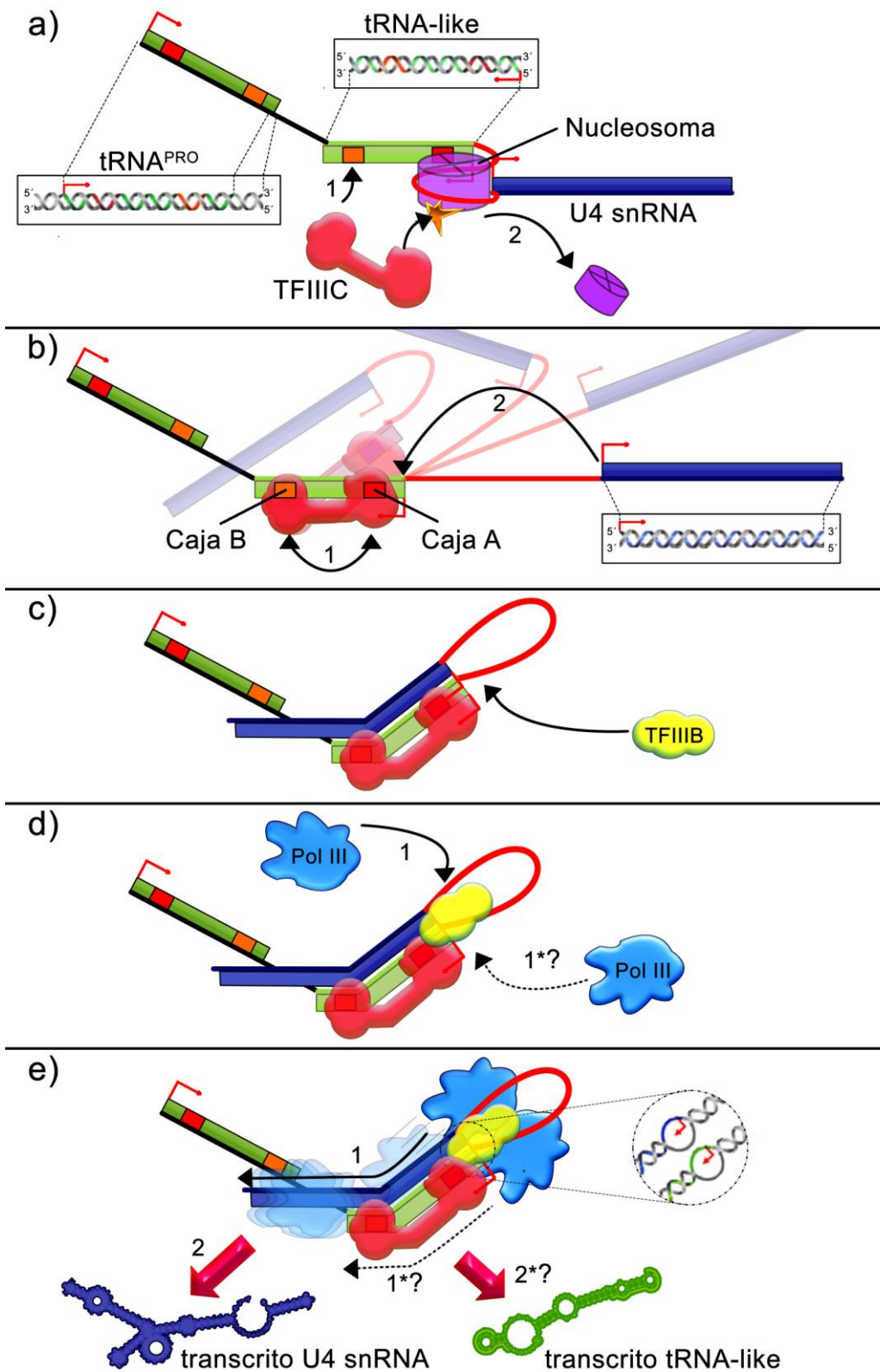


Figura 51. Modelo de transcripción del U4 snRNA de *Leishmania*. a) Disociación de un nucleosoma localizado entre el tRNA-like y el U4 snRNA por acción de TFIIC. b) Posicionamiento de TFIIC en las cajas A y B; provocando un doblez del DNA para que quede orientado U4 snRNA en el sentido de la transcripción. c) Asociación de TFIIB a TFIIC río-arriba del sitio de inicio de la transcripción. d) Unión de Pol III al sitio de inicio de la transcripción con ayuda de TFIIC y TFIIB. e) Transcripción del U4 snRNA y del tRNA-like (probable). En el círculo punteado se observa un aumento de las burbujas de transcripción. En cada panel, las flechas en rojo indican el sentido de la transcripción de los genes. Las flechas negras indican movimiento, mientras que las flechas punteadas indican movimientos probables. Los números indican el orden de las interacciones. En los recuadros en a) y b) se muestra la hebra del DNA en la que se encuentran los genes tRNA^{PRO}, tRNA-like y U4 snRNA

6. Conclusiones

1. El U4 snRNA de *L. major* está asociado a un tRNA-like y a un gen de tRNA^{PRO} (ambos con cajas A y B consenso).
2. El locus del U4 snRNA es altamente sinténico entre especies del mismo género (*Leishmania* o *Trypanosoma*).
3. La secuencia del U4 snRNA, particularmente la región 5', es muy conservada entre tripanosomátidos. El U4 snRNA de tripanosomátidos es relativamente pequeño (110-117 bases), comparando con otros organismos (142-160 bases).
4. La estructura secundaria probable del U4 snRNA de *L. major* es parecida a la de otros tripanosomátidos. También guarda similitud con la de eucariontes superiores. Sin embargo, el U4 snRNA de *L. major* carece del tallo-bucle III.
5. La interacción de los U4/U6 snRNAs de *L. major* es similar a la que se presenta en otros tripanosomátidos, en *H. sapiens* y en *S. cerevisiae*.
6. El tRNA^{PRO} tiene una estructura secundaria de trébol, característica de los tRNAs. En cambio, el tRNA-like no presenta tal estructura.
7. El sitio de inicio de la transcripción del U4 snRNA de *L. major* corresponde al primer nucleótido del gen, lo que indica el transcrito primario del snRNA no presenta una región líder 5'.
8. Resultados preliminares sugieren que la caja B del tRNA-like es necesaria para la expresión del U4 snRNA. Por el contrario, el tRNA^{PRO} no contiene secuencias promotoras del U4 snRNA. Asimismo, la caja A del tRNA-like parece no ser requerida para la transcripción del U4 snRNA.

7. Referencias

Adl, S. M., Simpson, A. G., Farmer, M. A., Andersen, R. A., Anderson, O. R., Barta, J. R., Bowser, S. S., Brugerolle, G., Fensome, R. A., Fredericq, S., James, T. Y., Karpov, S., Kugrens, P., Krug, J., Lane, C. E., Lewis, L. A., Lodge, J., Lynn, D. H., Mann, D. G., McCourt, R. M., Mendoza, L., Moestrup, O., Mozley-Standridge, S. E., Nerad, T. A., Shearer, C. A., Smirnov, A. V., Spiegel, F. W. y Taylor, M. F. (2005). The new higher level classification of eukaryotes with emphasis on the taxonomy of protists. *J. Eukaryot. Microbiol.* 52, 399-451.

Archambault, J. y Friesen, J. D. (1993). Genetics of eukaryotic RNA polymerases I, II, and III. *Microbiol. Rev.* 57, 703-724.

Azubel, M., Habib, N., Sperling, R. y Sperling, J. (2006). Native spliceosomes assemble with pre-mRNA to form supraspliceosomes. *J. Mol. Biol.* 356, 955-966.

Barbezier, N., Canino, G., Rodor, J., Jobet, E., Saez-Vasquez, J., Marchfelder, A. y Echeverria, M. (2009). Processing of a dicistronic tRNA-snoRNA precursor: combined analysis in vitro and in vivo reveals alternate pathways and coupling to assembly of snoRNP. *Plant Physiol* 150, 1598-1610.

Bates, P. A. (2007). Transmission of *Leishmania* metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies. *Int. J. Parasitol.* 37, 1097-1106.

Behzadnia, N., Golas, M. M., Hartmuth, K., Sander, B., Kastner, B., Deckert, J., Dube, P., Will, C. L., Urlaub, H., Stark, H. y Luhrmann, R. (2007). Composition and three-dimensional EM structure of double affinity-purified, human prespliceosomal A complexes. *EMBO J.* 26, 1737-1748.

Bell, M. y Bindereif, A. (1999). Cloning and mutational analysis of the *Leptomonas seymouri* U5 snRNA gene: function of the Sm site in core RNP formation and nuclear localization. *Nucleic Acids Res.* 27, 3986-3994.

Bell, M., Wohner, R. y Bindereif, A. (2000). U4 small nuclear RNA genes of trypanosomes: cloning of the *Leptomonas seymouri* gene and mutational analysis of core snRNP assembly. *Gene* 247, 77-86.

Bell, S. D. y Barry, J. D. (1995). Trypanosome nuclear factors which bind to internal promoter elements of tRNA genes. *Nucleic Acids Res.* 23, 3103-3110.

Besteiro, S., Barrett, M. P., Riviere, L. y Bringaud, F. (2005). Energy generation in insect stages of *Trypanosoma brucei*: metabolism in flux. *Trends Parasitol.* 21, 185-191.

Beverly, S. M. (1996). Hijacking the cell: parasites in the driver's seat. *Cell* 87, 787-789.

Boehring, D., Makarov, E. M., Sander, B., Makarova, O. V., Kastner, B., Luhrmann, R. y Stark, H. (2004). Three-dimensional structure of a pre-catalytic human spliceosomal complex. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 11, 463-468.

Bolsover, S. R. y Hyams, J. S. (2004). Transcription and the Control of Gene Expression. In *Cell Biology: A Short Course*.

Borchert, G. M., Lanier, W. y Davidson, B. L. (2006). RNA polymerase III transcribes human microRNAs. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 13, 1097-1101.

Bordonne, R., Banroques, J., Abelson, J. y Guthrie, C. (1990). Domains of yeast U4 spliceosomal RNA required for PRP4 protein binding, snRNP-snRNP interactions, and pre-mRNA splicing in vivo. *Genes Dev.* 4, 1185-1196.

Bringmann, P., Appel, B., Rinke, J., Reuter, R., Theissen, H. y Luhrmann, R. (1984). Evidence for the existence of snRNAs U4 and U6 in a single ribonucleoprotein complex and for their association by intermolecular base pairing. *EMBO J.* 3, 1357-1363.

Bruzik, J. P., Van Doren, K., Hirsh, D. y Steitz, J. A. (1988). Trans splicing involves a novel form of small nuclear ribonucleoprotein particles. *Nature* 335, 559-562.

Burnol, A. F., Margottin, F., Huet, J., Almouzni, G., Prioleau, M. N., Mechali, M. y Sentenac, A. (1993a). TFIIC relieves repression of U6 snRNA transcription by chromatin. *Nature* 362, 475-477.

Burnol, A. F., Margottin, F., Schultz, P., Marsolier, M. C., Oudet, P. y Sentenac, A. (1993b). Basal promoter and enhancer element of yeast U6 snRNA gene. *J. Mol. Biol.* 233, 644-658.

Campbell, D. A., Sturm, N. R. y Yu, M. C. (2000). Transcription of the kinetoplastid spliced leader RNA gene. *Parasitol. Today* 16, 78-82.

Campbell, D. A., Thomas, S. y Sturm, N. R. (2003). Transcription in kinetoplastid protozoa: why be normal? *Microbes. Infect.* 5, 1231-1240.

Challice, J. M. y Segall, J. (1989). Transcription of the 5 S rRNA gene of *Saccharomyces cerevisiae* requires a promoter element at +1 and a 14-base pair internal control region. *J. Biol. Chem.* 264, 20060-20067.

Chang, K. P. (2005). Leishmaniasis. In *Encyclopedia of Life Sciences*, John Wiley & Sons, ed.

Chappuis, F., Sundar, S., Hailu, A., Ghalib, H., Rijal, S., Peeling, R. W., Alvar, J. y Boelaert, M. (2007). Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control? *Nat. Rev. Microbiol.* 5, 873-882.

Clayton, C. E. (2002). Life without transcriptional control? From fly to man and back again. *EMBO J.* 21, 1881-1888.

Collins, C. A. y Guthrie, C. (2000). The question remains: is the spliceosome a ribozyme? *Nat. Struct. Biol.* 7, 850-854.

Cordingley, J. S. (1985). Nucleotide sequence of the 5S ribosomal RNA gene repeat of *Trypanosoma brucei*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 17, 321-330.

Cordova-Uscanga, C., Albertos-Alpuche, N. E., Andrade-Narváez, F. J. y Cantolara, S. B. (1993). Leishmaniasis: Estudio epidemiológico preliminar en una localidad de la zona endémica de Tabasco. *Salud Pública de México Instituto Nacional de Salud Pública Cuernavaca México* 35, 345-350.

Cramer, P., Armache, K. J., Baumli, S., Benkert, S., Brueckner, F., Buchen, C., Damsma, G. E., Dengl, S., Geiger, S. R., Jasiak, A. J., Jawhari, A., Jennebach, S., Kamenski, T., Kettenberger, H., Kuhn, C. D., Lehmann, E., Leike, K., Sydow, J. F. y Vannini, A. (2008). Structure of eukaryotic RNA polymerases. *Annu. Rev. Biophys.* 37, 337-352.

Croft, S. L. y Coombs, G. H. (2003). Leishmaniasis--current chemotherapy and recent advances in the search for novel drugs. *Trends Parasitol.* 19, 502-508.

Dieci, G., Fiorino, G., Castelnuovo, M., Teichmann, M. y Pagano, A. (2007). The expanding RNA polymerase III transcriptome. *Trends Genet.* 23, 614-622.

Djikeng, A., Ferreira, L., D'Angelo, M., Dolezal, P., Lamb, T., Murta, S., Triggs, V., Ulbert, S., Villarino, A., Renzi, S., Ullu, E. y Tschudi, C. (2001). Characterization of a candidate *Trypanosoma brucei* U1 small nuclear RNA gene. *Mol. Biochem. Parasitol.* 113, 109-115.

Fantoni, A., Dare, A. O. y Tschudi, C. (1994). RNA polymerase III-mediated transcription of the trypanosome U2 small nuclear RNA gene is controlled by both intragenic and extragenic regulatory elements. *Mol. Cell Biol.* 14, 2021-2028.

Fauci, A. S., Braunwald, E., Kasper, D. L., Hauser, S. L., Longo, D. L., Jameson, L., Loscalzo, J. y Herwaldt, B. L. (2009). *Leishmaniasis*. McGraw-Hill.

Fernandez-Tornero, C., Bottcher, B., Riva, M., Carles, C., Steuerwald, U., Ruigrok, R. W., Sentenac, A., Muller, C. W. y Schoehn, G. (2007). Insights into transcription initiation and termination from the electron microscopy structure of yeast RNA polymerase III. *Mol. Cell* 25, 813-823.

Frank, D. N. y Pace, N. R. (1998). Ribonuclease P: unity and diversity in a tRNA processing ribozyme. *Annu. Rev. Biochem.* 67, 153-180.

Furuyama, S. y Bruzik, J. P. (2005). Trans-Splicing. In *Encyclopedia of Life Sciences*, John Wiley & Sons, ed.

Gallego, M. (2004). Zoonosis emergentes por patógenos parásitos: las leishmaniosis. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz* 23, 661-676.

Geiduschek, E. P. y Kassavetis, G. A. (2001). The RNA polymerase III transcription apparatus. *J. Mol. Biol.* 310, 1-26.

Gilinger, G. y Bellofatto, V. (2001). Trypanosome spliced leader RNA genes contain the first identified RNA polymerase II gene promoter in these organisms. *Nucleic Acids Res.* 29, 1556-1564.

Gossage, S. M., Rogers, M. E. y Bates, P. A. (2003). Two separate growth phases during the development of *Leishmania* in sand flies: implications for understanding the life cycle. *Int. J. Parasitol.* 33, 1027-1034.

Guffanti, E., Ferrari, R., Preti, M., Forloni, M., Harismendy, O., Lefebvre, O. y Dieci, G. (2006). A minimal promoter for TFIIIC-dependent in vitro transcription of snoRNA and tRNA genes by RNA polymerase III. *J. Biol. Chem.* 281, 23945-23957.

Gunzl, A., Cross, M. y Bindereif, A. (1992). Domain structure of U2 and U4/U6 small nuclear ribonucleoprotein particles from *Trypanosoma brucei*: identification of trans-spliceosomal specific RNA-protein interactions. *Mol. Cell Biol.* 12, 468-479.

Gunzl, A., Tschudi, C., Nakaar, V. y Ullu, E. (1995). Accurate transcription of the *Trypanosoma brucei* U2 small nuclear RNA gene in a homologous extract. *J. Biol. Chem.* 270, 17287-17291.

Handman, E. y Bullen, D. V. (2002). Interaction of *Leishmania* with the host macrophage. *Trends Parasitol.* 18, 332-334.

Hannaert, V., Bringaud, F., Opperdoes, F. R. y Michels, P. A. (2003). Evolution of energy metabolism and its compartmentation in Kinetoplastida. *Kinetoplastid. Biol. Dis.* 2, 11.

Harmanci, A. O., Sharma, G. y Mathews, D. H. (2008). PARTS: probabilistic alignment for RNA joinT secondary structure prediction. *Nucleic Acids Res.* 36, 2406-2417.

Hernandez, N. (2001). Small nuclear RNA genes: a model system to study fundamental mechanisms of transcription. *J. Biol. Chem.* 276, 26733-26736.

Hu, J., Xu, D., Schappert, K., Xu, Y. y Friesen, J. D. (1995). Mutational analysis of *Saccharomyces cerevisiae* U4 small nuclear RNA identifies functionally important domains. *Mol. Cell Biol.* 15, 1274-1285.

Ismaili, N., Perez-Morga, D., Walsh, P., Mayeda, A., Pays, A., Tebabi, P., Krainer, A. R. y Pays, E. (1999). Characterization of a SR protein from *Trypanosoma brucei*

with homology to RNA-binding cis-splicing proteins. *Mol. Biochem. Parasitol.* 102, 103-115.

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, Gaudenzi 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., Muller-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., Schafer, 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, 436-442.

Jurica, M. S., Sousa, D., Moore, M. J. y Grigorieff, N. (2004). Three-dimensional structure of C complex spliceosomes by electron microscopy. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 11, 265-269.

Kambach, C., Walke, S., Young, R., Avis, J. M., de la Fortelle, E., Raker, V. A., Luhrmann, R., Li, J. y Nagai, K. (1999). Crystal structures of two Sm protein complexes and their implications for the assembly of the spliceosomal snRNPs. *Cell* 96, 375-387.

Kamhawi, S. (2006). Phlebotomine sand flies and *Leishmania* parasites: friends or foes? *Trends Parasitol.* 22, 439-445.

Kastner, B., Bach, M. y Luhrmann, R. (1991). Electron microscopy of U4/U6 snRNP reveals a Y-shaped U4 and U6 RNA containing domain protruding from the U4 core RNP. *J. Cell Biol.* 112, 1065-1072.

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, 1435-1437.

Kiss, T. (2004). Biogenesis of small nuclear RNPs. *J. Cell Sci.* 117, 5949-5951.

Krol, A., Branlant, C., Lazar, E., Gallinaro, H. y Jacob, M. (1981). Primary and secondary structures of chicken, rat and man nuclear U4 RNAs. Homologies with U1 and U5 RNAs. *Nucleic Acids Res.* 9, 2699-2716.

Lee, J. Y., Evans, C. F. y Engelke, D. R. (1991). Expression of RNase P RNA in *Saccharomyces cerevisiae* is controlled by an unusual RNA polymerase III promoter. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *88*, 6986-6990.

Leveillard, T., Kassavetis, G. A. y Geiduschek, E. P. (1991). *Saccharomyces cerevisiae* transcription factors IIIB and IIIC bend the DNA of a tRNA(Gln) gene. *J. Biol. Chem.* *266*, 5162-5168.

Li, L., Otake, L. R., Xu, Y. y Michaeli, S. (2000). The trans-spliceosomal U4 RNA from the monogenetic trypanosomatid *Leptomonas collosoma*. Cloning and identification of a transcribed trna-like element that controls its expression. *J. Biol. Chem.* *275*, 2259-2264.

Liang, X. H., Haritan, A., Uliel, S. y Michaeli, S. (2003). trans and cis splicing in trypanosomatids: mechanism, factors, and regulation. *Eukaryot. Cell* *2*, 830-840.

Listerman, I., Bledau, A. S., Grishina, I. y Neugebauer, K. M. (2007). Extragenic accumulation of RNA polymerase II enhances transcription by RNA polymerase III. *PLoS. Genet.* *3*, e212.

Liu, B., Liu, Y., Motyka, S. A., Agbo, E. E. y Englund, P. T. (2005). Fellowship of the rings: the replication of kinetoplast DNA. *Trends Parasitol.* *21*, 363-369.

Liu, S., Rauhut, R., Vornlocher, H. P. y Luhrmann, R. (2006). The network of protein-protein interactions within the human U4/U6.U5 tri-snRNP. *RNA.* *12*, 1418-1430.

Lopez-Estrano, C., Tschudi, C. y Ullu, E. (1998). Exonic sequences in the 5' untranslated region of alpha-tubulin mRNA modulate trans splicing in *Trypanosoma brucei*. *Mol. Cell Biol.* *18*, 4620-4628.

Lowe, T. M. y Eddy, S. R. (1997). tRNAscan-SE: a program for improved detection of transfer RNA genes in genomic sequence. *Nucleic Acids Res.* *25*, 955-964.

Lukes, J., Hashimi, H. y Zikova, A. (2005). Unexplained complexity of the mitochondrial genome and transcriptome in kinetoplastid flagellates. *Curr. Genet.* *48*, 277-299.

Mair, G., Shi, H., Li, H., Djikeng, A., Aviles, H. O., Bishop, J. R., Falcone, F. H., Gavrilescu, C., Montgomery, J. L., Santori, M. I., Stern, L. S., Wang, Z., Ullu, E. y Tschudi, C. (2000). A new twist in trypanosome RNA metabolism: cis-splicing of pre-mRNA. *RNA.* *6*, 163-169.

Marande, W., Lukes, J. y Burger, G. (2005). Unique mitochondrial genome structure in diplomonads, the sister group of kinetoplastids. *Eukaryot. Cell* *4*, 1137-1146.

Marchetti, M. A., Tschudi, C., Silva, E. y Ullu, E. (1998). Physical and transcriptional analysis of the *Trypanosoma brucei* genome reveals a typical eukaryotic arrangement with close interspersed RNA polymerase II- and III-transcribed genes. *Nucleic Acids Res.* 26, 3591-3598.

Martinez-Calvillo, S., Nguyen, D., Stuart, K. y Myler, P. J. (2004). Transcription initiation and termination on *Leishmania major* chromosome 3. *Eukaryot. Cell* 3, 506-517.

Martinez-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, 491-502.

Martinez-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, 1291-1299.

Marz, M., Kirsten, T. y Stadler, P. F. (2008). Evolution of spliceosomal snRNA genes in metazoan animals. *J. Mol. Evol.* 67, 594-607.

Matthews, K. R., Tschudi, C. y Ullu, E. (1994). A common pyrimidine-rich motif governs trans-splicing and polyadenylation of tubulin polycistronic pre-mRNA in trypanosomes. *Genes Dev.* 8, 491-501.

Matzura, O. y Wennborg, A. (1996). RNAdraw: an integrated program for RNA secondary structure calculation and analysis under 32-bit Microsoft Windows. *Comput. Appl. Biosci.* 12, 247-249.

Mottram, J., Perry, K. L., Lizardi, P. M., Luhrmann, R., Agabian, N. y Nelson, R. G. (1989). Isolation and sequence of four small nuclear U RNA genes of *Trypanosoma brucei* subsp. *brucei*: identification of the U2, U4, and U6 RNA analogs. *Mol. Cell Biol.* 9, 1212-1223.

Murphy, W. J., Watkins, K. P. y Agabian, N. (1986). Identification of a novel Y branch structure as an intermediate in trypanosome mRNA processing: evidence for trans splicing. *Cell* 47, 517-525.

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, 2902-2906.

Myslinski, E. y Branlant, C. (1991). A phylogenetic study of U4 snRNA reveals the existence of an evolutionarily conserved secondary structure corresponding to 'free' U4 snRNA. *Biochimie* 73, 17-28.

Nakaar, V., Dare, A. O., Hong, D., Ullu, E. y Tschudi, C. (1994). Upstream tRNA genes are essential for expression of small nuclear and cytoplasmic RNA genes in trypanosomes. *Mol. Cell Biol.* *14*, 6736-6742.

Nakaar, V., Gunzl, A., Ullu, E. y Tschudi, C. (1997). Structure of the *Trypanosoma brucei* U6 snRNA gene promoter. *Mol. Biochem. Parasitol.* *88*, 13-23.

Nakaar, V., Tschudi, C. y Ullu, E. (1995a). An unusual liaison: Small nuclear and cytoplasmic RNA genes team up with tRNA genes in trypanosomatid protozoa. *Parasitology Today* *11*, 225-228.

Nakaar, V., Tschudi, C. y Ullu, E. (1995b). An unusual liaison: Small nuclear and cytoplasmic RNA genes team up with tRNA genes in trypanosomatid protozoa. *Parasitology Today* *11*, 225-228.

Newman, A. J. (2008). Splicing. In *Encyclopedia of Life Sciences*, John Wiley & Sons, ed.

Nilsen, T. W. (2002). The spliceosome: no assembly required? *Mol. Cell* *9*, 8-9.

Nilsen, T. W. (2003). The spliceosome: the most complex macromolecular machine in the cell? *Bioessays* *25*, 1147-1149.

Noma, K., Cam, H. P., Maraia, R. J. y Grewal, S. I. (2006). A role for TFIIC transcription factor complex in genome organization. *Cell* *125*, 859-872.

Noonberg, S. B., Scott, G. K. y Benz, C. C. (1996). Evidence of post-transcriptional regulation of U6 small nuclear RNA. *J. Biol. Chem.* *271*, 10477-10481.

Padgett, R. A. (2005). mRNA Splicing: Role of snRNAs. In *Encyclopedia of Life Sciences*, John Wiley & Sons, ed.

Padilla-Mejia, N. E., Florencio-Martinez, L. E., Figueroa-Angulo, E. E., Manning-Cela, R. G., Hernandez-Rivas, R., Myler, P. J. y Martinez-Calvillo, S. (2009). Gene organization and sequence analyses of transfer RNA genes in Trypanosomatid parasites. *BMC. Genomics* *10*, 232.

Paule, M. R. y White, R. J. (2000). Survey and summary: transcription by RNA polymerases I and III. *Nucleic Acids Res.* *28*, 1283-1298.

Pays, E., Vanhamme, L. y Perez-Morga, D. (2004). Antigenic variation in *Trypanosoma brucei*: facts, challenges and mysteries. *Curr. Opin. Microbiol.* *7*, 369-374.

Pfeffer, S., Sewer, A., Lagos-Quintana, M., Sheridan, R., Sander, C., Grasser, F. A., van Dyk, L. F., Ho, C. K., Shuman, S., Chien, M., Russo, J. J., Ju, J., Randall, G., Lindenbach, B. D., Rice, C. M., Simon, V., Ho, D. D., Zavolan, M. y Tuschl, T.

(2005). Identification of microRNAs of the herpesvirus family. *Nat. Methods* 2, 269-276.

Pomeranz, D. A. (2005). Spliceosome. In *Encyclopedia of Life Sciences*, John Wiley & Sons, ed.

Raghunathan, P. L. y Guthrie, C. (1998a). A spliceosomal recycling factor that reanneals U4 and U6 small nuclear ribonucleoprotein particles. *Science* 279, 857-860.

Raghunathan, P. L. y Guthrie, C. (1998b). RNA unwinding in U4/U6 snRNPs requires ATP hydrolysis and the DEIH-box splicing factor Brr2. *Curr. Biol.* 8, 847-855.

Schnare, M. N. y Gray, M. W. (1999). A candidate U1 small nuclear RNA for trypanosomatid protozoa. *J. Biol. Chem.* 274, 23691-23694.

Schnauffer, A., Ernst, N. L., Palazzo, S. S., O'Rear, J., Salavati, R. y Stuart, K. (2003). Separate insertion and deletion subcomplexes of the *Trypanosoma brucei* RNA editing complex. *Mol. Cell* 12, 307-319.

Schramm, L. y Hernandez, N. (2002). Recruitment of RNA polymerase III to its target promoters. *Genes Dev.* 16, 2593-2620.

Schultz, A., Nottrott, S., Hartmuth, K. y Luhrmann, R. (2006a). RNA structural requirements for the association of the spliceosomal hPrp31 protein with the U4 and U4atac small nuclear ribonucleoproteins. *J. Biol. Chem.* 281, 28278-28286.

Schultz, A., Nottrott, S., Watkins, N. J. y Luhrmann, R. (2006b). Protein-protein and protein-RNA contacts both contribute to the 15.5K-mediated assembly of the U4/U6 snRNP and the box C/D snoRNPs. *Mol. Cell Biol.* 26, 5146-5154.

Schultz, P., Marzouki, N., Marck, C., Ruet, A., Oudet, P. y Sentenac, A. (1989). The two DNA-binding domains of yeast transcription factor tau as observed by scanning transmission electron microscopy. *EMBO J.* 8, 3815-3824.

Shatkin, A. J. y Manley, J. L. (2000). The ends of the affair: capping and polyadenylation. *Nat. Struct. Biol.* 7, 838-842.

Siliciano, P. G., Brow, D. A., Roiha, H. y Guthrie, C. (1987). An essential snRNA from *S. cerevisiae* has properties predicted for U4, including interaction with a U6-like snRNA. *Cell* 50, 585-592.

Simpson, A. G., Stevens, J. R. y Lukes, J. (2006). The evolution and diversity of kinetoplastid flagellates. *Trends Parasitol.* 22, 168-174.

Simpson, L., Aphasizhev, R., Gao, G. y Kang, X. (2004). Mitochondrial proteins and complexes in *Leishmania* and *Trypanosoma* involved in U-insertion/deletion RNA editing. *RNA*. *10*, 159-170.

Sperling, J., Azubel, M. y Sperling, R. (2008). Structure and function of the Pre-mRNA splicing machine. *Structure*. *16*, 1605-1615.

Staley, J. P. y Guthrie, C. (1998). Mechanical devices of the spliceosome: motors, clocks, springs, and things. *Cell* *92*, 315-326.

Stark, H., Dube, P., Luhrmann, R. y Kastner, B. (2001). Arrangement of RNA and proteins in the spliceosomal U1 small nuclear ribonucleoprotein particle. *Nature* *409*, 539-542.

Stark, H. y Luhrmann, R. (2006). Cryo-electron microscopy of spliceosomal components. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* *35*, 435-457.

Stuart, K., Brun, R., Croft, S., Fairlamb, A., Gurtler, R. E., McKerrow, J., Reed, S. y Tarleton, R. (2008). Kinetoplastids: related protozoan pathogens, different diseases. *J. Clin. Invest* *118*, 1301-1310.

Tkacz, I. D., Lustig, Y., Stern, M. Z., Biton, M., Salmon-Divon, M., Das, A., Bellofatto, V. y Michaeli, S. (2007). Identification of novel snRNA-specific Sm proteins that bind selectively to U2 and U4 snRNAs in *Trypanosoma brucei*. *RNA*. *13*, 30-43.

Tschudi, C., Williams, S. P. y Ullu, E. (1990). Conserved sequences in the U2 snRNA-encoding genes of Kinetoplastida do not include the putative branchpoint recognition region. *Gene* *91*, 71-77.

Ullu, E., Matthews, K. R. y Tschudi, C. (1993). Temporal order of RNA-processing reactions in trypanosomes: rapid trans splicing precedes polyadenylation of newly synthesized tubulin transcripts. *Mol. Cell Biol.* *13*, 720-725.

Valadkhan, S. (2007). The spliceosome: a ribozyme at heart? *Biol. Chem.* *388*, 693-697.

Vidovic, I., Nottrott, S., Hartmuth, K., Luhrmann, R. y Ficner, R. (2000). Crystal structure of the spliceosomal 15.5kD protein bound to a U4 snRNA fragment. *Mol. Cell* *6*, 1331-1342.

Wakid, M. H. y Bates, P. A. (2004). Flagellar attachment of *Leishmania* promastigotes to plastic film in vitro. *Exp. Parasitol.* *106*, 173-178.

Watkins, N. J., Dickmanns, A. y Luhrmann, R. (2002). Conserved stem II of the box C/D motif is essential for nucleolar localization and is required, along with the 15.5K protein, for the hierarchical assembly of the box C/D snoRNP. *Mol. Cell Biol.* *22*, 8342-8352.

WHO. (2009a). Leishmania/HIV Coinfection. http://www.who.int/leishmaniasis/resources/Leishmaniasis_hiv_coinfection5.pdf

WHO. (2009b). Leishmaniasis Burden of disease. <http://www.who.int/leishmaniasis/burden/en/>

Will, C. L. y Luhrmann, R. (2001). Spliceosomal UsnRNP biogenesis, structure and function. *Curr. Opin. Cell Biol.* 13, 290-301.

Willis, I. M. (1993). RNA polymerase III. Genes, factors and transcriptional specificity. *Eur. J. Biochem.* 212, 1-11.

Worthey, E. A., Martinez-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, 4201-4210.

Xu, Y., Ben-Shlomo, H. y Michaeli, S. (1997). The U5 RNA of trypanosomes deviates from the canonical U5 RNA: the *Leptomonas collosoma* U5 RNA and its coding gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 94, 8473-8478.

Yu, M. C., Sturm, N. R., Saito, R. M., Roberts, T. G. y Campbell, D. A. (1998). Single nucleotide resolution of promoter activity and protein binding for the *Leishmania tarentolae* spliced leader RNA gene. *Mol. Biochem. Parasitol.* 94, 265-281.

Zamudio, J. R., Mitra, B., Foldynova-Trantirkova, S., Zeiner, G. M., Lukes, J., Bujnicki, J. M., Sturm, N. R. y Campbell, D. A. (2007). The 2'-O-ribose methyltransferase for cap 1 of spliced leader RNA and U1 small nuclear RNA in *Trypanosoma brucei*. *Mol. Cell Biol.* 27, 6084-6092.

Zuker, M. (2003). Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic Acids Res.* 31, 3406-3415.