



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

“Genes del RNA ribosomal 5S en *Leishmania major*:
análisis de su localización nuclear y de sus
interacciones con proteínas nucleares”

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

RODRIGO MORENO CAMPOS

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: **Dr. Santiago Martínez Calvillo**
Facultad de Estudios Superiores Iztacala, UNAM

COMITÉ TUTOR: **Dra. Rebeca Georgina Manning Cela**
Centro de Investigación y de Estudios Avanzados, IPN

Dr. Javier Rolando Ambrosio Hernández
Facultad de Medicina, UNAM

Dr. Luis Felipe Jiménez García
Facultad de Ciencias, UNAM

México, Ciudad de México, Octubre, 2016



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

“Genes del RNA ribosomal 5S en *Leishmania major*:
análisis de su localización nuclear y de sus
interacciones con proteínas nucleares”

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

RODRIGO MORENO CAMPOS

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: **Dr. Santiago Martínez Calvillo**
Facultad de Estudios Superiores Iztacala, UNAM

COMITÉ TUTOR: **Dra. Rebeca Georgina Manning Cela**
Centro de Investigación y de Estudios Avanzados, IPN

Dr. Javier Rolando Ambrosio Hernández
Facultad de Medicina, UNAM

Dr. Luis Felipe Jiménez García
Facultad de Ciencias, UNAM

México, Ciudad de México, Octubre, 2016



LIC. IVONNE RAMÍREZ WENCE
Directora General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Subcomité de Biología Experimental y Biomedicina del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 25 de abril de 2016, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **DOCTOR EN CIENCIAS** del alumno **MORENO CAMPOS RODRIGO**, con número de cuenta **302114072**, con la tesis titulada "**Genes del RNA ribosomal 5S en *Leishmania major*: análisis de su localización nuclear y de sus interacciones con proteínas nucleares**", realizada bajo la dirección del **DR. SANTIAGO MARTÍNEZ CALVILLO**:

Presidente: DR. ROBERTO JOSÉ RAFAEL HERNÁNDEZ FERNÁNDEZ
Vocal: DR. SERGIO VACA PACHECO
Secretario: DR. LUIS FELIPE JIMÉNEZ GARCÍA
Suplente: DR. ABRAHAM LANDA PIEDRA
Suplente: DR. JAVIER ROLANDO AMBROSIO HERNÁNDEZ

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, Cd. Mx., a 12 de septiembre de 2016.

DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA
COORDINADORA DEL PROGRAMA

c.c.p. Expediente del (la) interesado (a)

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM por la formación recibida durante mis estudios de Doctorado.

Agradezco al CONACyT por la beca otorgada para realizar mis estudios de Doctorado (Becario 257038).

Agradezco a la Coordinación de estudios de Posgrado CEP/UNAM por la beca otorgada para realizar mis estudios de Doctorado (202114072).

Este trabajo fue financiado por los donativos 251831 de CONACyT, IN210712 e IN214715 de PAPIIT (DGAPA, UNAM) otorgados al Dr. Santiago Martínez Calvillo.

Agradezco al Dr. Santiago Martínez Calvillo por la dirección del presente trabajo.

Asimismo, agradezco a los miembros del Comité Tutor, Dra. Rebeca Georgina Manning Cela, Dr. Javier Rolando Ambrosio Hernández y Dr. Luis Felipe Jiménez García por enriquecer este proyecto y mi formación académica.

AGRADECIMIENTOS A TITULO PERSONAL

A la Universidad Nacional Autónoma de México, mi *Alma Mater* que me ha hecho la persona que soy y que me ha permitido conocer a las personas más importantes en mi vida.

Al Dr. Santiago Martínez Calvillo por ser mi padre académico. Le agradezco haberme aceptado en su laboratorio y apoyarme a lo largo de toda esta etapa.

Al Biól. Luis Enrique Florencio Martínez por el gran soporte y ayuda en el laboratorio.

A la Dra. Elisa Elvira Figueroa Angulo, por enseñarme durante mis primeros años de trabajo en el laboratorio.

A los integrantes del jurado de examen de grado:

Dr. Roberto Hernández Fernández, Dr. Sergio Vaca Paniagua, Dr. Luis Felipe Jiménez García, Dr. Abraham Landa Piedra y el Dr. Javier Rolando Ambrosio Hernández.

Un agradecimiento especial a la Dra. Rosaura Hernández Rivas y a la Biól. Olivia Alicia Reynoso Ducoing por la gran ayuda y asesoría brindada durante este proyecto.

A mis amigos y compañero del laboratorio Fiordaliso Roman, Carlos Flores, Gabriela Romero, Saúl Rojas, Ernesto Mendoza, José Luis Reyes, Luis E. Florencio, Daniel Vélez, Adrián Chavestre, Norma Padilla, Juan C. Vizuet, Maricarmen Gómez, etc. Les agradezco todas las experiencias que sucedieron en el laboratorio a lo largo de todo este tiempo de las cuales aprendí mucho.

A mi mamá Norma Aída Moreno Campos, por todo su amor incondicional y apoyo que es el resultado de la persona que soy ahora.

A mi familia por siempre estar a mi lado con todo ese amor y apoyo que me hace luchar y ser mejor cada día.

A mis amigos por su confianza estima y consejos en momentos importantes.

A Robin por crecer conmigo y amarme desde que naciste.

A mi prometida Dulce Selene Acebo Falcón por ser mi Universo, mi fuerza, mi felicidad y mi vida. ¡Te amo!

DEDICATORIA

A mi mamá Norma,

A mi familia,

A mi prometida Selene,

A mis amigos.

Al Universo que conspira para que sucedan grandes cosas en mi vida.

A todas las personas que he conocido a lo largo de mi vida.

ÍNDICE

LISTA DE TABLAS	III
LISTA DE FIGURAS	III
LISTA DE ABREVIACIONES	V
1. RESÚMENES	1
1.1 Resumen.....	1
1.2 Abstract.....	2
2. INTRODUCCIÓN	3
2.1 Biología Celular	3
2.2 Evolución	4
2.3 Clasificación	5
2.4 Ciclo de Vida	6
2.5 Leishmaniasis.....	8
2.6.1 Transcripción en eucariontes	10
2.6.2 RNA polimerasa III.....	11
2.6.3 Transcriptoma de Pol III	14
2.7.1 Genes del rRNA 5S.....	16
2.7.2 Elementos promotores del rRNA 5S.....	16
2.7.3 Factores de transcripción de los genes del rRNA 5S.....	19
2.7.4 Término de la transcripción de los genes del rRNA 5S.....	20
2.7.5 Estructura y función del rRNA 5S	21
2.7.6 Procesamiento del rRNA 5S	23
2.7.7 Transporte y asociación del rRNA 5S	24
2.7.7.1 Proteína “La”	24
2.7.7.2 Transporte nuclear y citoplasmático del rRNA 5S	24
2.7.7.3 Transporte nuclear corto del rRNA 5S con L18	24
2.7.7.4 Transporte nuclear en asociación con L18 y L5	25
2.7.7.5 Asociación del rRNA 5S con las proteínas L18 y L5 en el ribosoma	26
2.7.7.6 Importación mitocondrial del rRNA 5S.....	27
2.8.1 Transcripción en cinetoplastidos.....	27

2.8.2 Organización genómica en tripanosomátidos	27
3. ANTECEDENTES	30
4. OBJETIVOS	31
4.1 Objetivo general.....	31
4.2 Objetivos particulares	31
5. MATERIALES Y MÉTODOS	32
5.1 Bioinformática	32
5.2 Extracción de DNA genómico.....	32
5.3 Amplificación de DNA por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	33
5.4 Electroforesis en geles de agarosa	33
5.5 Construcción de plásmidos	34
5.6 Cultivo celular y transfección.....	35
5.7 Extracción de RNA total.....	35
5.8 Análisis <i>Northern blot</i>	36
5.9 Análisis por 5'-RACE.....	36
5.10 Análisis por RT-PCR.....	37
5.11 Hibridación fluorescente <i>in situ</i> de DNA (DNA-FISH) combinado con inmunofluorescencia.....	37
5.12 RNA-FISH combinado con inmunofluorescencia indirecta.....	38
5.13 Extractos nucleares	39
5.14 Análisis <i>Southwestern</i>	40
5.15 Experimentos DNA <i>pull-down</i>	41
5.16 Espectrometría de masas.....	41
6. RESULTADOS	42
6.1 Análisis de secuencia y genómico de los genes del rRNA 5S.....	42
6.2 Sintenia de los genes del rRNA 5S en especies de <i>Leishmania</i>	48
6.3 Expresión del rRNA 5S antisentido y del rRNA 5S.....	55
6.4 Generación de vectores.....	55
6.5 Localización celular de los genes del rRNA 5S.....	61
6.6 Localización celular de los transcritos del rRNA 5S.....	65

6.7 Interacción <i>in vitro</i> de proteínas nucleares con el gen del rRNA 5S en <i>L. major</i>	68
7. DISCUSIÓN	74
8. CONCLUSIONES	79
9. REFERENCIAS	81
10. APÉNDICE	100
10.1 Artículo para la obtención del grado:.....	100

LISTA DE TABLAS

Tabla 1	72
---------------	----

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Diferentes etapas de desarrollo de cinetoplastidos patógenos.	4
Figura 2 Arbol filogenético.	5
Figura 3. Clasificación de las especies de <i>Leishmania</i>	6
Figura 4. Ciclo de vida de <i>Leishmania</i>	7
Figura 5. Localización mundial de la leishmaniasis.	8
Figura 6. Signos clínicos de la leishmaniasis.	9
Figura 7. Espectro de la transcripción en eucariontes.	11
Figura 8. Estructura de Pol III y Pol II.	13
Figura 9 Representación esquemática de los tres tipos de promotores de Pol III.	15
Figura 10. Elementos promotores de los genes del rRNA 5S en diferentes eucariontes	18
Figura 11. Factores de transcripción de los genes del rRNA 5S.	20
Figura 12. Estructura y función del rRNA 5S eucarionte.....	22
Figura 13. Síntesis y transporte del rRNA 5S.	25
Figura 14. Espectro de la transcripción en tripanosomátidos.	28
Figura 15. Análisis de secuencia de los genes del rRNA 5S en <i>L. major</i>	43
Figura 16. Ensayo 5'-RACE con el rRNA 5S de <i>L. major</i>	44
Figura 17. Alineamiento de secuencias de los genes del rRNA 5S presentes en <i>L. major</i> (Lm), <i>L. mexicana</i> (Lx), <i>L. braziliensis</i> (Lb), <i>L. infantum</i> (Li) y <i>L. tarentolae</i> (Lt).	46
Figura 18. Ensayo RT-PCR con el rRNA 5S de <i>L. major</i>	47
Figura 19. Alineamiento de secuencia de los elementos de control interno putativos (caja A, Elemento intermedio y caja C) en <i>L. major</i> , <i>X. laevis</i> y <i>S. cerevisiae</i>	48
Figura 20. Sintenia de los genes rRNA 5S en diferentes especies de <i>Leishmania</i>	49

Figura 21. Características de los genes del rRNA 5S y señales de término de la transcripción en <i>Leishmania</i>.	51
Figura 22. Pseudogenes de <i>Leishmania</i>	53
Figura 23. Frecuencia de los diferentes tipos de genes del rRNA 5S en diferentes especies de <i>Leishmania</i>	54
Figura 24. Predicción de la estructura secundaria consenso del rRNA 5S en <i>Leishmania</i> . .	54
Figura 25. En <i>L. major</i> no se produce un rRNA 5S antisentido.....	55
Figura 26. Generación de los plásmidos p5SrRNA y p5SrRNA-rev.	56
Figura 27. Mapa de los plásmidos p5SrRNA y p5SrRNA-rev.	57
Figura 28. Generación del plásmido p5SrRNA344.....	58
Figura 29. Generación del plásmido p06.0200.....	58
Figura 30. Obtención del vector pElp3b-PTP.	60
Figura 31. Sonda para ensayos DNA-FISH en <i>L. major</i>	61
Figura 32. Los genes de <i>L. major</i> se localizan en la periferia nuclear.	63
Figura 33. Los genes del rRNA 5S en <i>T. cruzi</i> se encuentran dispersos en el núcleo.....	64
Figura 34. Preparación de sondas para el experimento RNA-FISH.....	66
Figura 35. Los transcritos del rRNA 5S se localizan en el nucléolo y en el citoplasma.	67
Figura 36. Síntesis de sondas utilizadas para el ensayo <i>Southwestern</i>	68
Figura 37. Interacción específica entre el gen del rRNA 5S y proteínas nucleares.	69
Figura 38. Los ensayos DNA <i>pull-down</i> requieren del rRNA 5S biotinilado y extractos nucleares.	70
Figura 39. Ensayo DNA- <i>pull-down</i>	71
Figura 40. Comparación de secuencias de LmjF.31.1050.....	73

LISTA DE ABREVIACIONES

BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
Btn	Biotina
c.p.m	Cuentas por minuto
CBS	Sitio de unión a calmodulina
cDNA	DNA complementario
CID	Disociación inducida por colisión
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dsDNA	DNA de doble cadena
ECI	Elemento de control interno
ED	Elemento distal
EI	Elemento intermedio
ES12	Segmento de expansión 12
FISH	hibridación fluorescente in situ
kDNA	Cinetoplasto
LC	Leishmaniasis cutánea
LCD	Leishmaniasis cutánea diseminada
LCL	Leishmaniasis cutánea localizada
LMC	Leishmaniasis mucocutánea
LV	Leishmaniasis visceral
Mb	Megabases
mRNA	RNA mensajero
ncRNA	RNA no codificante
nt	nucleótidos
pb	Pares de bases
PC	Protuberancia central
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PKDL	Leishmaniasis dermal post-kala azar
Pol	RNA polimerasa
preMRP-L18	Proteína mitocondrial ribosomal L18
ProtA	Proteína A
ProtC	Proteína C
RACE	<i>Rapid Amplification of cDNA Ends</i>
RNA	Ácido ribonucleico
RNP	Ribonucleoproteína
RRM	Motivo de reconocimiento a RNA
rRNA	RNA ribosomal
RT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa reversa
SIT	Sitio de inicio de la transcripción
snoRNA	RNA pequeño nucleolar
snoRNP	Ribonucleoproteína pequeña nucleolar
snRNA	RNA pequeño nuclear

SSE	Elemento de sitio de inicio
TF	Factor de transcripción
TFUE	Elemento río arriba de TFIIB
TLM	Motivo tipo TATA
tRNA	RNA de transferencia
Ts	Tracto de timinas
TUE	Elemento río arriba del SIT
UPE	Elemento promotor río arriba
VIH	Virus de inmunodeficiencia humana
VSG	Glicoproteína variable de superficie

1. RESÚMENES

1.1 Resumen

El RNA ribosomal 5S (rRNA 5S), componente esencial de la subunidad mayor del ribosoma, es sintetizado por la RNA polimerasa III (Pol III). La mayoría de los organismos eucariontes contienen de decenas a cientos de genes del rRNA 5S organizados en arreglo tipo tándem. Sin embargo, el genoma del parásito protozoario *Leishmania major* contiene sólo once genes del rRNA 5S, los cuales se encuentran dispersos en el genoma y asociados con otros genes transcritos por Pol III. En este trabajo reportamos que, en general, el número y orden de los genes del rRNA 5S están conservados entre diferentes especies de *Leishmania*. Mientras que en la mayoría de eucariontes los genes del rRNA 5S se localizan dentro del nucléolo o en sus inmediaciones, ensayos FISH y de inmunofluorescencia mostraron que los genes del rRNA 5S en *L. major* se encuentran dispersos en el núcleo, preferentemente en la periferia nuclear. De manera similar, los genes del rRNA 5S de *Trypanosoma cruzi*, los cuales están organizados en tándem, se encontraron dispersos en el núcleo. En contraste, los transcritos del rRNA 5S de *L. major* se localizaron en el nucléolo y dispersos en el citoplasma, donde se localizan los ribosomas. A diferencia de otros tipos de rRNA, no encontramos RNAs antisentido estables complementarios al rRNA 5S en *L. major*. Análisis de secuencia mostraron que todos los genes del rRNA 5S de *L. major* contienen los elementos de control interno putativos, los cuales son necesarios en otros eucariontes para la unión de los factores de transcripción TFIIA, TFIIC y TFIIB. Notablemente, TFIIA y TFIIC no han sido identificados en *Leishmania* y otros tripanosomátidos. Experimentos *Southwestern* y DNA *pull-down* mostraron la presencia de varias proteínas nucleares de entre 15 a 50 kDa que podrían unirse a los genes del rRNA 5S. Por espectrometría de masas se identificaron cuatro proteínas que podrían interactuar con el gen del rRNA 5S; entre ellas la proteína hipotética LmjF.31.1050, la cual presenta similitud de secuencia y estructura con una de las subunidades de TFIIC, el factor sigma de la RNA polimerasa bacteriana y el factor de terminación Rho.

1.2 Abstract

The 5S ribosomal RNA (5S rRNA), an essential component of the large ribosomal subunit, is synthesized by the RNA polymerase III (Pol III). Most eukaryotic organisms contain from dozens to hundreds of 5S rRNA genes organized in tandem arrangements. However the genome of the protozoan parasite *Leishmania major* contains only eleven 5S rRNA genes, which are scattered throughout the genome and associated with other genes transcribed by Pol III. In this work we report that, in general, the number and order of 5S rRNA genes are conserved among different species of *Leishmania*. While in most eukaryotes 5S rRNA genes are located within the nucleolus or in its vicinity, FISH and immunofluorescence assays showed that the 5S rRNA genes in *L. major* are dispersed in the nucleus, mainly at the nuclear periphery. Similarly, the tandemly repeated 5S rRNA genes in *T. cruzi* are dispersed throughout the nucleus. In contrast, 5S rRNA transcripts in *L. major* were localized within the nucleolus, and scattered throughout the cytoplasm, where mature ribosomes are located. Unlike other rRNA species, stable antisense RNA complementary to 5S rRNA is not produced in *L. major*. Sequence analysis showed that all of the *L. major* 5S rRNA genes contain the putative internal control element, which is necessary in other eukaryotes for the binding of transcription factors TFIIA, TFIIC and TFIIB. Notably, TFIIA and TFIIC have not been identified in *Leishmania* and other trypanosomatids. Southwestern and DNA pull-down experiments showed the presence of several nuclear proteins of about 15 to 50 kDa that could bind the 5S rRNA genes. Mass spectrometry analysis allowed the identification of four proteins that could interact with the 5S rRNA gene; including the hypothetical protein LmjF.31.1050, which shows sequence and structural similarity to one of the TFIIC subunits, the bacterial RNA polymerase sigma factor and the transcription termination factor Rho.

2. INTRODUCCIÓN

Leishmania major es un parásito hemoflagelado que pertenece a la Clase de los cinetoplástidos (kinetoplastida), uno de los grupos de microorganismos eucariontes más interesantes de estudio por presentar diversas particularidades celulares y genéticas. Estos protistas divergieron tempranamente en la evolución ¹ siendo uno de los linajes eucarióticos más antiguos ². Los cinetoplástidos se caracterizan principalmente por la presencia de un cinetoplasto, el cual es una larga red de DNA circular (kDNA) localizada en la mitocondria, usualmente asociada a la base del flagelo ³(Figura 1).

2.1 Biología Celular

La biología celular de los diferentes cinetoplástidos es muy similar. Por ejemplo, todos son organismos móviles con un solo flagelo que se origina en una bolsa en la membrana celular localizada cerca del DNA mitocondrial. La endocitosis y exocitosis ocurren sólo en la bolsa flagelar. Sus peroxisomas, conocidos como glicosomas, están modificados para realizar la glicólisis. Además, su citoesqueleto está constituido por una capa de microtúbulos que se localizan bajo la membrana celular. Asimismo, 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 ⁴.

Estos organismos además presentan otras peculiaridades, que incluyen: edición del mRNA mitocondrial, arquitectura única del DNA mitocondrial, maduración de todos los mRNA por trans-splicing, y el arreglo de genes en unidades policistrónicas largas. Algunos tripanosomátidos presentan evasión del sistema inmune cambiando sus proteínas de superficie y la habilidad de escapar de la destrucción migrando a vacuolas fagocíticas ^{1,5-10}.

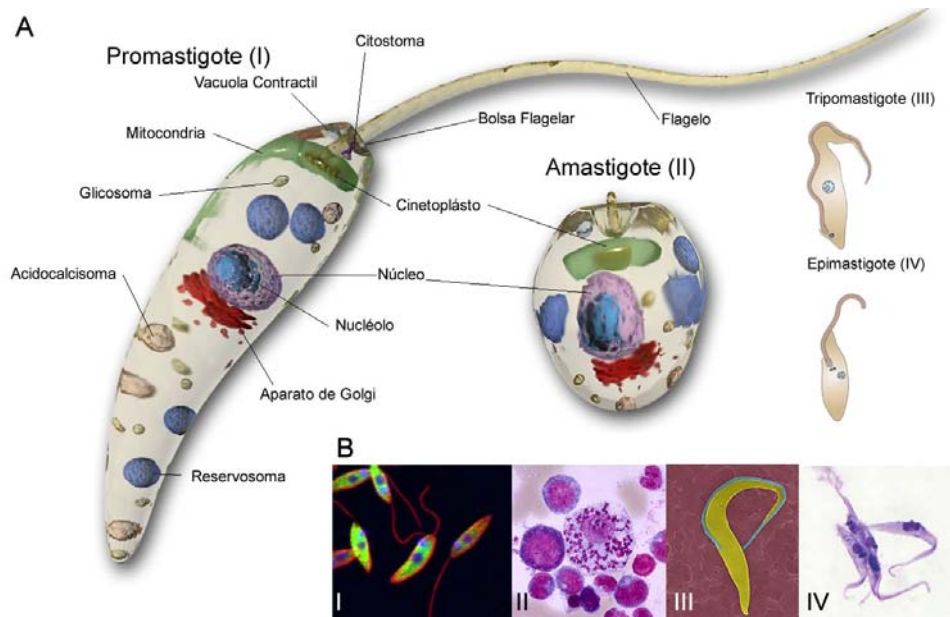


Figura 1. Diferentes etapas de desarrollo de cinetoplastidos patógenos. Estas etapas se definen en base a la forma general de la célula, la posición del cinetoplasto en relación con el núcleo, y la región de donde emerge el flagelo de la bolsa flagelar. **A)** Morfología de las etapas; promastigote, amastigote, tripomastigote y epimastigote pertenecientes a los cinetoplastidos: *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).

2.2 Evolución

Hasta hace poco, la historia evolutiva de los cinetoplastidos no era lo suficientemente sólida¹¹. Recientemente se ha propuesto la hipótesis de que el ancestro común de los cinetoplastidos y los euglénidos adquirió un plástido fotosintético endosimbionte que posteriormente fue perdido del linaje de los cinetoplastidos y que durante este proceso algunas de sus rutas metabólicas fueron secuestradas en los peroxisomas, mismos que después se convirtieron en glicosomas¹. Los ancestros distantes de los cinetoplastidos fueron similares a los Jacóbidos en cuanto a su ecología y morfología. Mediante análisis de la estructura del genoma mitocondrial se determinó recientemente que los parientes más cercanos de los cinetoplastidos no son los euglénidos, sino los diplonémidos, que son un grupo de organismos de vida libre que ocasionalmente son parásitos facultativos de invertebrados¹² (Figura 2).

Dentro de los cinetoplastidos, la familia más estudiada es la de los tripanosomátidos (Trypanosomatidae), la cual incluye a *Leishmania* y *Trypanosoma*, entre otras especies. Estos organismos descendieron de parásitos de insectos mordedores hace al menos 100 millones de años. La transmisión de un tripanosomátido de insectos hacia un hospedero 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 ¹¹.

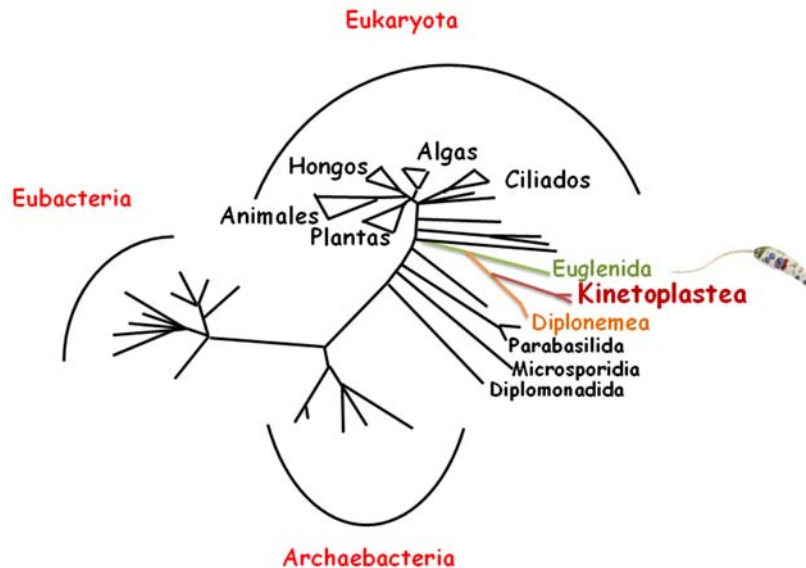
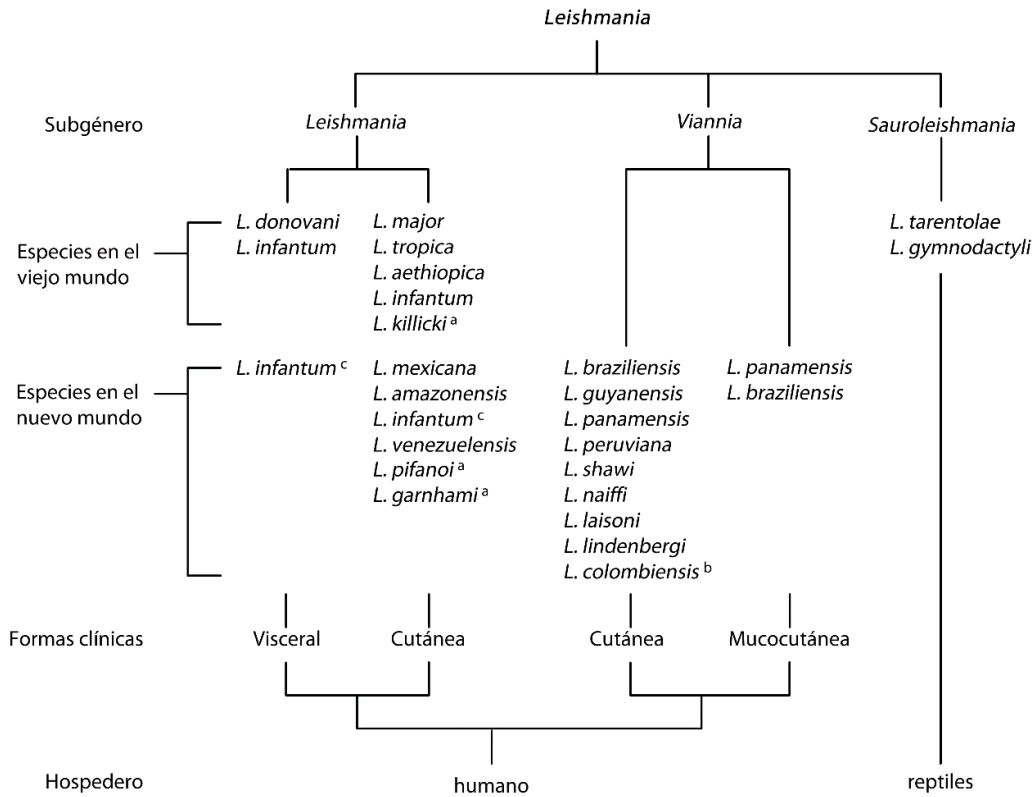


Figura 2 Árbol filogenético. Se muestra la distancia evolutiva en relación con eucariontes superiores, protistas y procariontes. Modificada de ¹.

2.3 Clasificación

A finales del siglo XIX la taxonomía de los parásitos cinetoplástidos se basaba en la presencia de los diferentes estadios de desarrollo del ciclo de vida, que son morfológicamente distintivos. Sin embargo, diferentes estudios moleculares han transformado el conocimiento de estos organismos, colocando sistemáticamente a *Leishmania* como un protozooario del orden *Trypanosomatida* y de la Familia *Trypanosomatidae* ¹¹. En esta última se agrupan once géneros, entre los que se incluyen *Trypanosoma*, *Leptomonas* y *Crithidia* ³. *Leishmania*, a su vez, incluye tres subgéneros: *Leishmania*, *Viannia* y *Sauroleishmania*. Las especies pertenecientes al subgénero *Leishmania* producen leishmaniasis cutánea y/o visceral tanto en el Viejo como en el Nuevo Mundo; mientras que las especies que se incluyen en el subgénero *Viannia* causan leishmaniasis cutánea y/o mucocutánea sólo en el Nuevo Mundo. Por su parte, las especies que pertenecen al subgénero *Sauroleishmania* no son patógenas para el humano, pues infectan sólo reptiles ^{3,13} (Figura 3).



^a El estatus de especie continua bajo discusión.
^b La posición taxonómica se encuentra bajo discusión.
^c En el nuevo mundo es conocida como *L. chagasi*.

Figura 3. Clasificación de las especies de *Leishmania*. Las diferentes especies de *Leishmania* se dividen en tres subgéneros. Se indican las especies que se localizan en el Viejo y/o el Nuevo Mundo. También se señala la forma clínica de la leishmaniasis que producen las diferentes especies, así como su hospedero vertebrado.

2.4 Ciclo de Vida

El ciclo de vida de *Leishmania* comienza cuando las moscas de la arena hembras (*Phlebotomus* en el Viejo Mundo, *Lutzomyia* en el Nuevo Mundo) se alimentan de un hospedero mamífero infectado, adquiriendo los parásitos que se encuentran replicándose intracelularmente en forma de amastigotes en los fagolisosomas de los macrófagos y otros fagocitos ¹⁴ (Figura 4). 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 ¹⁵. Los amastigotes se transforman entonces en promastigotes procíclicos, que es una forma replicativa.

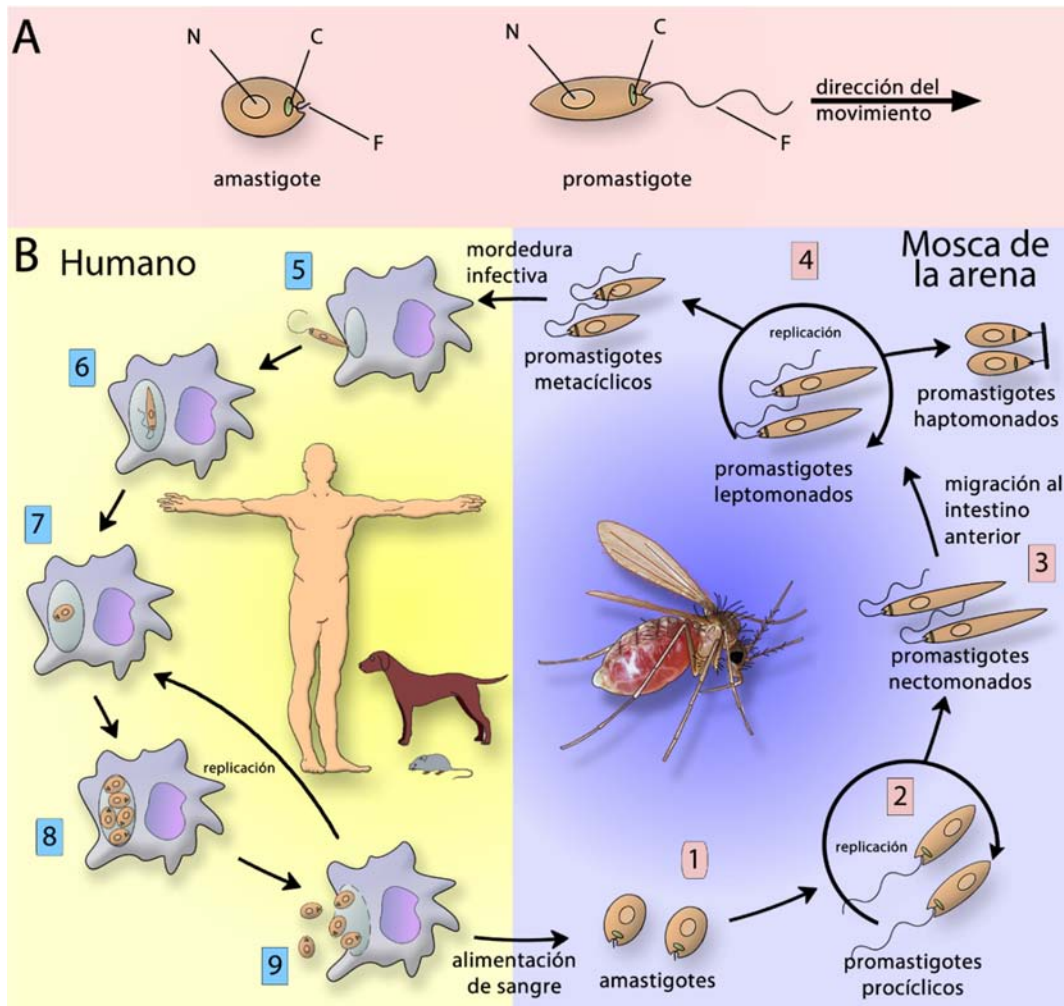


Figura 4. Ciclo de vida de *Leishmania*. Depende de la mosca de la arena (azul) y de un mamífero (amarillo). **A)** La morfología de los amastigotes y promastigotes. Cada forma tiene un núcleo (N), cinetoplasto (C) y un flagelo (F). El cinetoplasto es el genoma mitocondrial. El flagelo en amastigotes 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 estadios de replicación se encuentran unidos por varias fases donde no ocurre división celular.

Después de unos días, el parásito se diferencia en promastigotes nectomonados alargados, 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)¹⁶ (Figura 4). Algunos de estos promastigotes leptomonados y nectomonados se adhieren a la superficie de la válvula y se diferencian en promastigotes haptomonados¹⁷. 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 insectos flebotómidos, sólo 30 de ellas han sido identificadas como vectores de la enfermedad.

2.5 Leishmaniasis

Numerosas especies del género *Leishmania* causan un espectro de enfermedades conocidas como leishmaniasis. Se estima que 12 millones de personas se encuentran actualmente infectadas en 88 países alrededor del mundo ¹⁸, incluyendo Latinoamérica, África, Asia y los países de Europa que rodean al mar Mediterráneo. Se calcula que la enfermedad amenaza a un total de 350 millones de personas ¹⁸ (Figura 5).

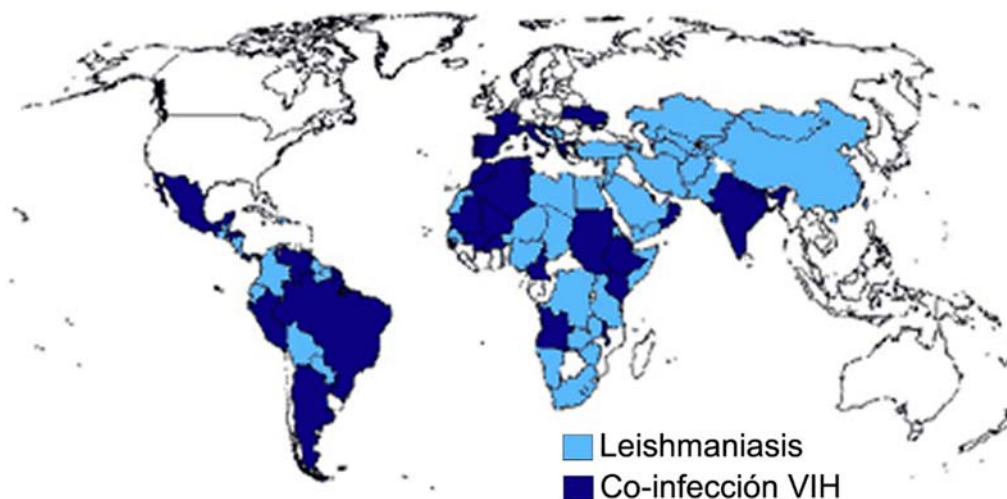


Figura 5. Localización mundial de la leishmaniasis. Se muestran las regiones de casos de co-infección con VIH (azul marino) y leishmaniasis en general (turquesa). Modificada de: http://www.who.int/leishmaniasis/burden/hiv_coinfection/burden_hiv_coinfection/en/

La leishmaniasis se presenta con un amplio espectro de manifestaciones clínicas en el hombre, siendo las principales la leishmaniasis cutánea (LC), la leishmaniasis mucocutánea (LMC) y la leishmaniasis visceral (LV) (Figura 6).

La leishmaniasis cutánea se manifiesta con la presencia de llagas o úlceras en las partes expuestas del cuerpo, tales como cara, brazos y piernas; y puede presentarse de forma localizada (LCL) o diseminada (LCD). La leishmaniasis mucocutánea produce lesiones que

pueden llevar a una destrucción masiva y desfigurativa de mucosas, fundamentalmente la nasal y bucal. La 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. La leishmaniasis dermal post-kala azar (PKDL) es una complicación de la leishmaniasis visceral que desarrolla dermatosis.

Se estima que el número de casos nuevos de leishmaniasis cutánea cada año en el mundo es de alrededor 1.5 millones, mientras que para el caso de la leishmaniasis visceral es de alrededor de 500,000 ¹⁸. 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, ejerciendo juntas un daño sinérgico en la respuesta inmune celular ¹⁹.



Figura 6. 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 ²⁰.

En México, actualmente se presentan diversas formas clínicas de la leishmaniasis cutánea, mucocutánea y visceral en los estados de Campeche, Chiapas, Coahuila, Guerrero, Jalisco, Michoacán, Morelos, Nayarit, Nuevo León, Oaxaca, Tamaulipas, Quintana Roo, Tabasco, Veracruz y Yucatán ²¹.

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 ²². El miltefosine se encuentra bajo investigación como un medicamento oral efectivo para la leishmaniasis ²³. También se han identificado moléculas con actividad en contra de infecciones de animales en estudios bioquímicos y moleculares que se están validando ²⁴.

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.

2.6.1 Transcripción en eucariontes

La transcripción (o síntesis de RNA) es el proceso mediante el cual la información contenida en una secuencia de DNA es copiada a una nueva molécula de RNA. El proceso es realizado por enzimas llamadas RNA polimerasas (Pol), las cuales requieren reconocer el inicio de un gen para que sea transcrito ²⁵.

En eucariontes se han identificado tres RNA polimerasas principales, 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 de varios tipos de moléculas de RNA pequeñas, incluyendo el rRNA 5S, los RNAs de transferencia (tRNA) y el snRNA U6 ^{26,27} (Figura 7).

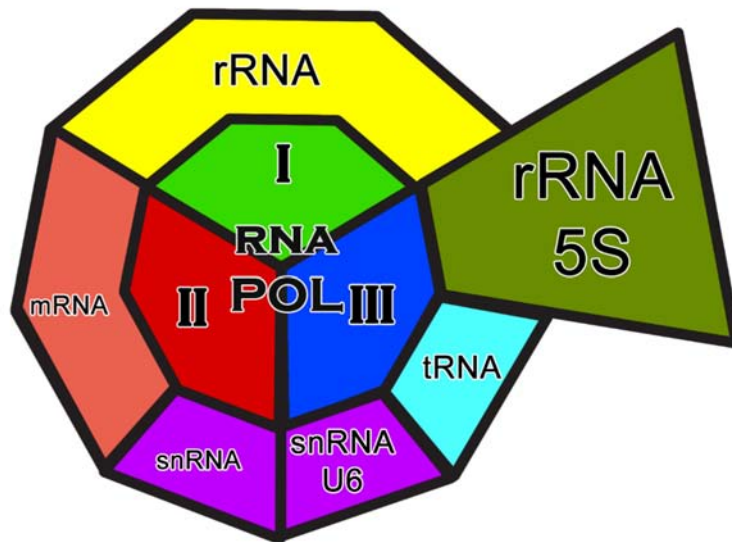


Figura 7. Espectro de la transcripción en eucariontes. En el centro se encuentran los tres tipos de RNA Polimerasas: Pol I (verde), Pol II (rojo) y Pol III (azul). En la zona externa se indican los genes transcritos por cada RNA Polimerasa: mRNAs (naranja), snRNAs (morado), tRNAs (turquesa) rRNAs (amarillo) y rRNA 5S (oliva). Modificada de ⁹.

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 ²⁸ (Figura 8A).

2.6.2 RNA polimerasa III

Pol III es la más compleja de las RNA polimerasas ya que está compuesta de 17 subunidades. Las 10 subunidades que forman el núcleo estructural son: C160, C128, C11, ABC27, ABC23, ABC14.5, ABC10 α , ABC10 β , AC40 y AC19 (Figura 8A). Las dos subunidades más grandes, C160 y C128, muestran homología substancial con las subunidades de Pol II Rpb1 y Rpb2, respectivamente. Cinco subunidades de Pol III son compartidas con Pol I y Pol II (Rpb5, Rpb6, Rpb8, Rpb10 y Rpb12). Las subunidades de Pol III AC40 y AC19 son compartidas con Pol I y son homólogas a las subunidades Rpb3 y Rpb11 de Pol II respectivamente. C11 tiene cierta homología con la subunidad Rpb9 de Pol II y el factor de elongación TFIIIS de Pol II. En la periferia del núcleo estructural de la enzima, Pol III contiene siete subunidades adicionales, las cuales forman 3 subcomplejos distintos: C82/C34/C31, C53/C37 y C17/C25. Los subcomplejos C82/C34/C31 y C53/C37 son específicos de Pol III, mientras que se

piensa que el complejo C17/C25 es la contraparte de los subcomplejos Rpb4/Rpb7 en Pol II, y Rpa14/Rpa43 en Pol I ^{28,29} (Figura 8B). Con respecto a su estructura tridimensional, en comparación con Pol II, Pol III se caracteriza por tener un tallo más grueso (formado por C17 y C25), además de presentar una abrazadera que se ubica por arriba de la grieta por donde pasa el DNA y un lóbulo más grande (Figura 8D). Esto último se atribuye a las cinco subunidades específicas presentes en los subcomplejos C82/C34/C31 y C53/C37 ^{30,31}.

Las subunidades específicas proporcionan propiedades particulares a Pol III, las cuales permiten la interacción con su aparato de transcripción y el reclutamiento de Pol III a sus promotores; facilitando así la iniciación, elongación, término, y reinicio de la transcripción, para poder producir los altos niveles de ncRNAs que son requeridos para el crecimiento y desarrollo celular ³².

Los factores de transcripción son proteínas que participan en la regulación de la transcripción, reconociendo y uniéndose a secuencias específicas de DNA (promotores), o a otros factores, o interaccionando directamente con la RNA polimerasa para promover o bloquear su reclutamiento a genes específicos. En el caso de Pol III, se han descrito diferentes factores de transcripción generales que tienen diferentes rutas de ensamble pero que convergen en el reclutamiento de Pol III ³³.

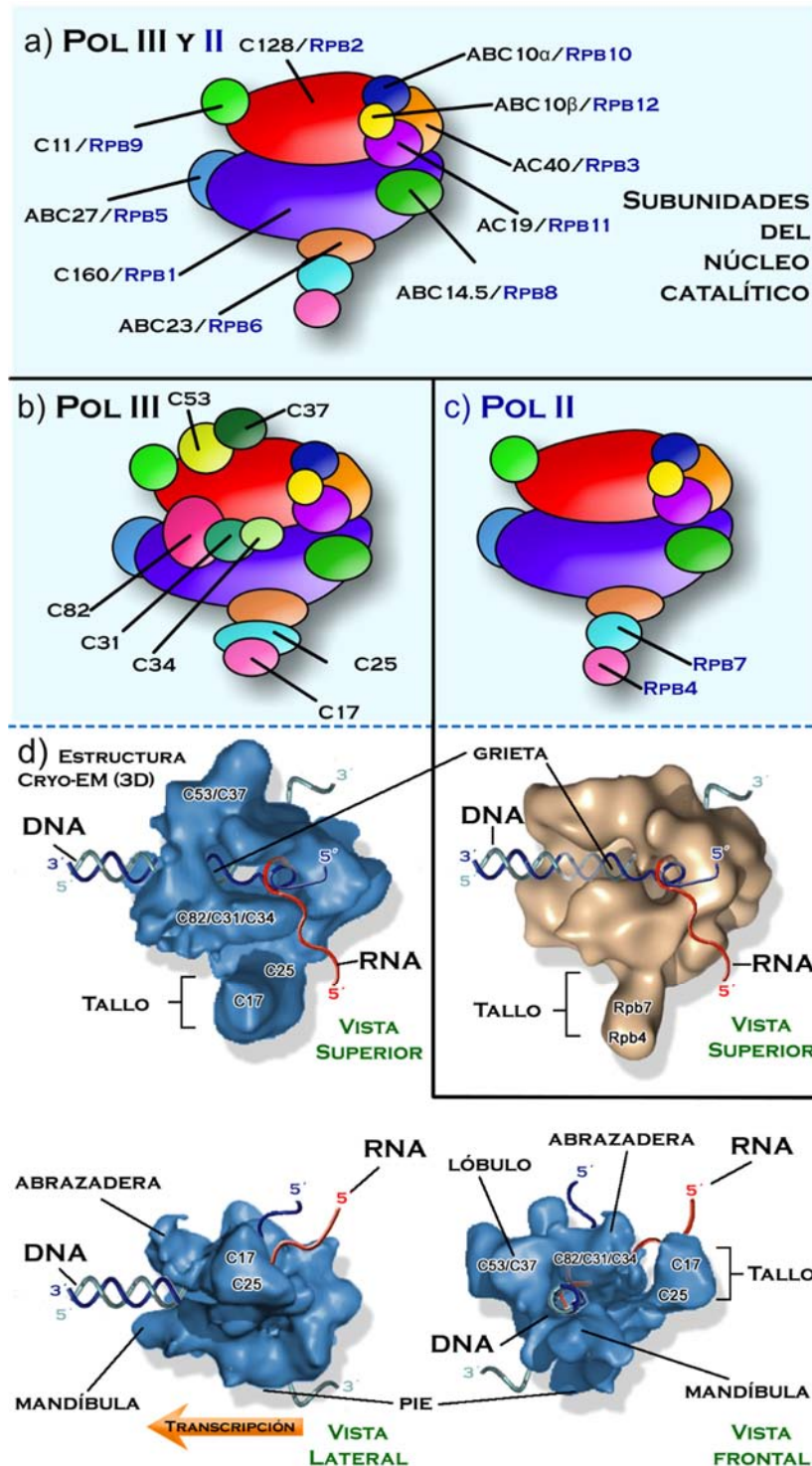


Figura 8. Estructura de Pol III y Pol II. A) Subunidades del núcleo catalítico compartidas por Pol II y III. En color negro se indica el nombre de las subunidades de Pol III y en color azul las subunidades de Pol II. B) Diagrama de la vista superior de Pol III que presenta las 7 subunidades específicas 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.

2.6.3 Transcriptoma de Pol III

Pol III sintetiza el rRNA 5S, los tRNAs, el RNA 7SL, el snRNA U6 y otros RNAs pequeños estables que tienen diversas funciones. Junto con Pol I domina la transcripción celular, excediendo el 80% de la síntesis total de RNA en células en crecimiento³⁴. La maquinaria de Pol III hace en gran medida uso de elementos promotores localizados dentro de la región transcrita²⁷. Estas regiones de control interno son estructuras generalmente discontinuas compuestas de bloques esenciales separados por regiones no esenciales³⁴. La mayoría de los promotores reconocidos por Pol III se agrupa dentro de uno de tres tipos bien definidos (tipos I-III), dependiendo de la ubicación y del tipo de elementos que lo constituyen³⁵ (Figura 9).

Tipo I. Está presente en los genes del rRNA 5S, y está formado por un elemento de control interno (ECI) que contiene 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^{34,35} (Figura 9A). El promotor es relativamente intolerante a cambios en el espacio entre los elementos individuales³⁶. Este tipo de promotor es reconocido por el factor de transcripción específico TFIIA, el cual recluta a TFIIC, TFIIB y a Pol III³⁷.

Tipo II. Es característico de los genes de tRNA, y está formado por cajas A y B bien conservadas dentro de la región transcrita^{27,34} (Figura 9B). La caja A se localiza más cerca de la posición +1 (aproximadamente entre +10 y +20), en comparación a la caja A del promotor tipo I, lo que refleja que este elemento promotor participa en la selección del sitio de inicio de la transcripción (SIT)³⁵. 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 que subsecuentemente recluta al complejo TFIIB para reclutar a Pol III al SIT³⁸.

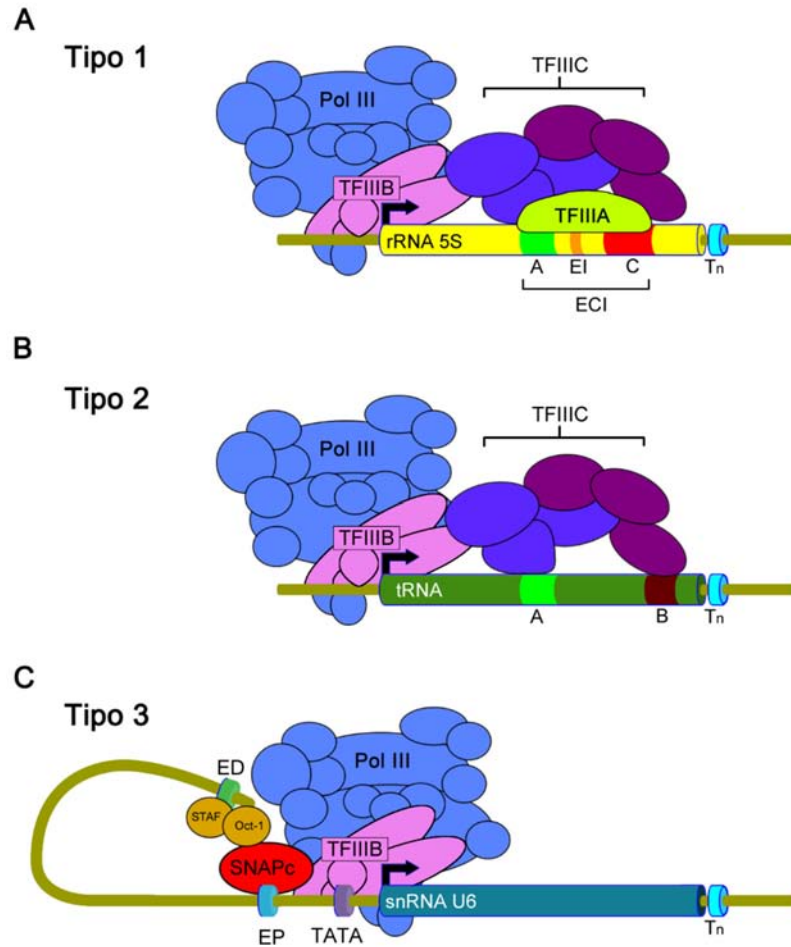


Figura 9 Representación esquemática de los tres tipos de promotores de Pol III. Se muestra el gen del rRNA 5S (tipo 1), un gen de tRNA (tipo 2) y el gen del snRNA U6 (tipo 3). La posición aproximada de los elementos de control, localizados internamente o río arriba, se encuentra indicada relativamente al SIT (flecha). A, caja A; B, caja B; C, caja C; EI, Elemento intermedio; Tn, señal de término de la transcripción; EP, elemento proximal; ED, elemento distal; TATA, caja TATA o secuencia TATA-like. Además se muestran los diferentes factores de transcripción principales que se unen a los diferentes promotores específicos. En el promotor tipo 1, el Elemento de Control Interno (ECI) lo conforman la caja A, el EI y la caja C.

Tipo III. Se caracteriza por secuencias promotoras que residen exclusivamente río arriba de la secuencia codificante³⁵. El promotor tipo III mejor caracterizado pertenece al snRNA U6 de humano. Las secuencias requeridas para una eficiente expresión son una caja TATA entre -20 y -25, un elemento proximal (EP) entre -66 y -47 y un elemento distal (ED) entre -244 y -214³⁴ (Figura 9C). El elemento proximal interactúa con un factor de transcripción de varias subunidades llamado SNAPc. Por su parte, el elemento distal contiene un sitio de unión SPH y una secuencia octámera, reconocidos por los factores de transcripción Staf y Oct1, respectivamente^{27,39}.

Varios genes transcritos por Pol III contienen regiones promotoras con características particulares que no se pueden incluir en alguno de los tres tipos antes descritos, presentando en algunos casos tanto secuencias promotoras internas como secuencias río arriba del SIT³⁶.

2.7.1 Genes del rRNA 5S

Los genes del rRNA 5S en los genomas eucariontes están organizados generalmente en arreglos tipo tándem en uno o varios cromosomas. Sin embargo, estos genes pueden también estar distribuidos al azar en el genoma, asociados a genes transcritos por cualquiera de las tres Pols. Existe variación considerable en el número de copias de los genes del rRNA 5S en diferentes organismos, desde únicamente tres copias en *Plasmodium falciparum*⁴⁰, a cientos de copias en *Xenopus*⁴¹; y hasta alrededor de un millón de copias en el parásito ciliado *Euplotes eurystomus*⁴². Conjuntamente, los genes del rRNA 18S, 5.8S y 28S forman el cistron del rRNA y son transcritos por Pol I, sintetizando un precursor de RNA que debe ser procesado para originar las tres moléculas de rRNA maduras. Usualmente los organismos eucariontes contienen un número similar de copias del cistron del rRNA y de los genes del rRNA 5S, aunque existen excepciones⁴³. La variabilidad en esta relación sugiere que no todas las copias de los genes del rRNA son transcritas en un momento determinado y que existen mecanismos regulatorios que trabajan para mantener un balance en la expresión de todas las moléculas del rRNA⁴⁴. De hecho en *Arabidopsis thaliana* los transcritos del rRNA 5S se originan a partir de sólo dos de seis loci genómicos⁴⁵. Espacialmente los genes del rRNA 5S se localizan en la periferia nucleolar o en el nucleoplasma alrededor del nucléolo, a diferencia de los otros genes rRNA, los cuales se localizan dentro del nucléolo⁴⁶.

2.7.2 Elementos promotores del rRNA 5S en eucariontes

Como se mencionó anteriormente, los promotores del tipo I están presentes en los genes del rRNA 5S. El primer promotor identificado del gen del rRNA 5S fue el de *Xenopus laevis* y es el que se utiliza como modelo para los promotores tipo I⁴⁷⁻⁴⁹ (Figura 10). Subsecuentemente, dos dominios más fueron identificados en la región codificante de los genes del rRNA 5S en *X. laevis*: el elemento río arriba de TFIIIA (TFUE)⁵⁰, y un elemento río arriba del SIT (TUE)⁵¹. En diferentes organismos existen diferencias con respecto al promotor consenso del rRNA 5S. Por ejemplo, en humanos y en otros mamíferos existe un ECI y un elemento río arriba del SIT llamado Caja D (alrededor de -21 a -36)^{52,53}. De manera

interesante, además del ECI, un motivo tipo TATA (TLM) localizado entre los nucleótidos (nt) -30 a -25 en relación al SIT, es esencial para la transcripción *in vitro* del rRNA 5S en *Caenorhabditis elegans* y *C. briggsae* ⁵⁴. Otros metazoos poseen un ECI así como otras regiones regulatorias potenciales río arriba (entre el SIT y el nt -40), incluyendo un motivo WTAA, una caja TATA y una secuencia TLM ⁵⁵. *Drosophila melanogaster* tiene cuatro ECIs (EC-I y II muestran similitud con las cajas A y B respectivamente), y una caja TATA río arriba del SIT (-39 a -26) ⁵⁶. Las regiones promotoras de los genes del rRNA 5S en *Arabidopsis* tienen un ECI y cuatro elementos conservados río arriba del SIT: una citosina en -1, una región de 3 pares de bases (pb) rica en AT de -4 a -2, dos nucleótidos conservados de -12 a -11, y un TLM de -28 a -23 que no se encuentra muy conservada en plantas ^{57,58}. *Saccharomyces cerevisiae* tiene un ECI, un elemento de sitio de inicio (SSE) de -14 a +8, y un elemento promotor río arriba (UPE) de -17 a -20 ^{36,59,60}. *Schizosaccharomyces pombe* tiene un ECI y un elemento TATA río arriba del SIT ⁶¹. El gen del rRNA 5S de *Neurospora crassa* contiene un ECI similar al de *Xenopus*, pero con un caja A divergente; además tiene una ribo caja en la posición +18 a +34 y un TLM río arriba del SIT ^{62,63}. Sorpresivamente, en *Yarrowia lipolytica* alguna de las copias de los genes del rRNA 5S están asociadas a genes de tRNA, formando dicistrones que son transcritos conjuntamente empezando desde el tRNA; la transcripción se reduce drásticamente cuando las cajas A y B del tRNA son mutadas ⁶⁴. Los genes del rRNA 5S en protozoarios como *Naegleria gruberi* y *Trypanosoma cruzi* tienen un ECI que no ha sido caracterizado funcionalmente. *N. gruberi* además tiene una caja TATA río arriba de SIT ^{65,66}. En *Acanthamoeba castellanii* el promotor del gen del rRNA 5S consiste de un ECI, un SSE y una caja TATA río arriba del SIT ⁶⁷. *Trichomonas vaginalis* tiene un ECI putativo, un TLM (-32 nt), un UPE (-13 nt) y un SSE (-1 nt) ⁶⁸. *Plasmodium falciparum* tiene solo una caja A putativa desde +54 a +65 ⁴⁰. De manera interesante parece que los genes de *Giardia lamblia* carecen de un ECI y que sólo tienen un TLM putativo como secuencia promotora ⁶⁶.

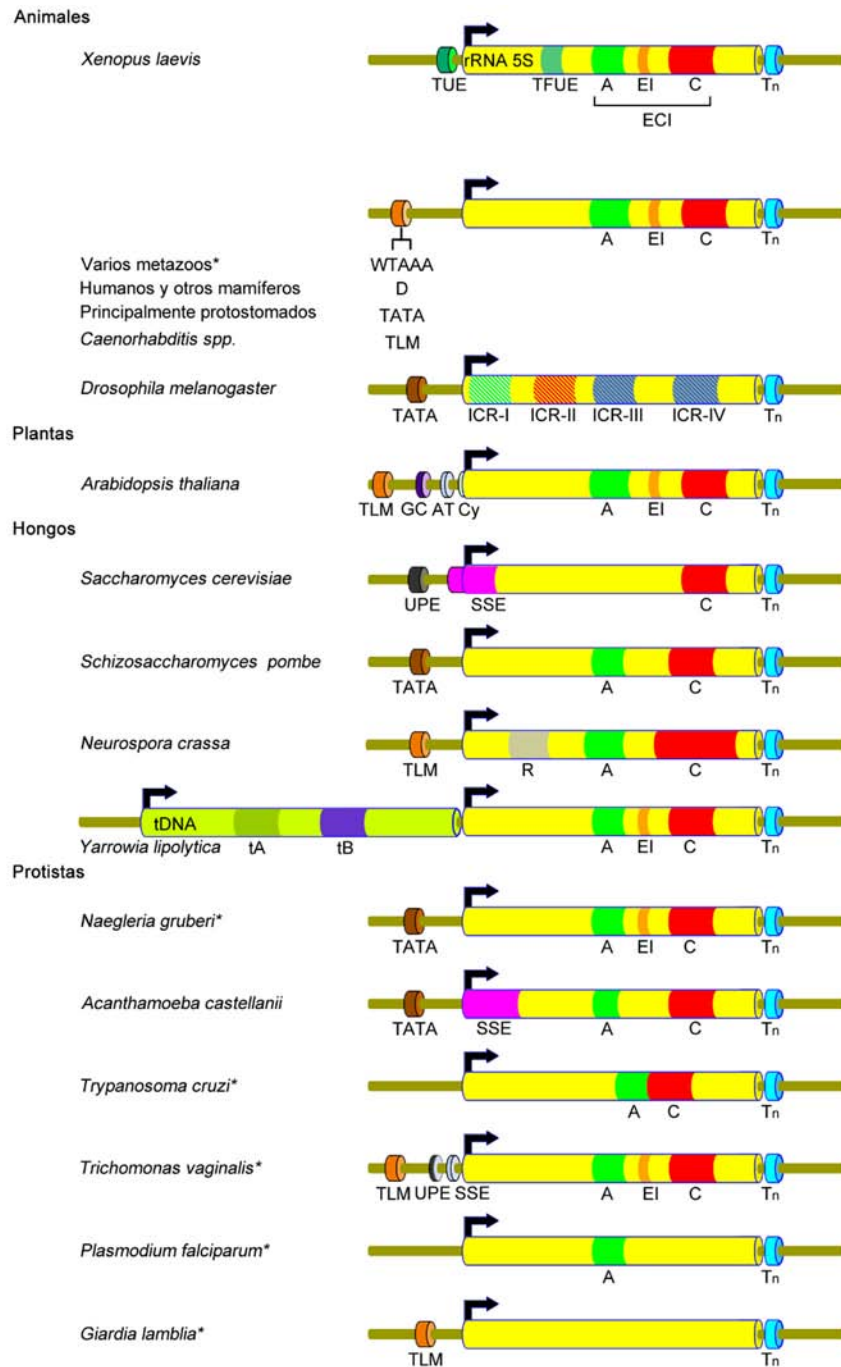


Figura 10. Elementos promotores de los genes del rRNA 5S en diferentes eucariontes Se muestran organizados por reinos (animales, plantas, hongos y protistas). Los genes del rRNA 5S están esquematizados como tubos amarillos. La flecha indica el sitio de inicio de la transcripción (SIT); también el elemento de control interno (ECI) se muestra y está compuesto por la caja A (A), el elemento intermedio (EI) y la caja C (C); Tn, Señal de término; TUE (elemento río arriba del SIT); TFUE (elemento río arriba de TFIIIA). En animales existen varios motivos río arriba del SIT, como WTAA; caja D (D); caja TATA (TATA), motivo tipo TATA (TLM). En *D. melanogaster* regiones de control interno I a IV (ICR-I-IV). Otros motivos del gen del rRNA 5S son: citosina (Cy); dinucleótido GC (GC); región rica en AT (AT); elemento promotor río arriba (UPE); elemento de sitio de inicio (SSE); ribo caja (R); caja A de tRNA (tA); caja B de tRNA (tB). La figura no está a escala.

2.7.3 Factores de transcripción de los genes del rRNA 5S

Pol III requiere de varios factores de transcripción para reconocer los elementos promotores de sus genes blanco. Para que ocurra la transcripción del gen del rRNA 5S, Pol III necesita tres factores de transcripción que se unen en el siguiente orden secuencial: TFIIA, TFIIC y TFIIB ⁶⁹(Figura 11). La unión de los factores de transcripción induce cambios conformacionales en la estructura del gen del rRNA 5S, ayudando a Pol III a unirse para transcribir al gen ⁷⁰.

TFIIA es una proteína de alrededor de 42 kDa que contiene nueve dedos de zinc del tipo Cys2-His2, cuya función esencial es dirigir la expresión genética al unirse al ECI (principalmente a la caja C) ⁷¹. Se ha demostrado que los primeros tres dedos de zinc (1 al 3) se unen fuertemente a la caja C, mientras que los últimos tres dedos de zinc (7 al 9) interactúan con la caja A, y el dedo de zinc 5 se une al EI ^{72,73} (Figura 11).

TFIIC es un complejo proteico compuesto de seis subunidades que se agrupan en dos subcomplejos: τ A (formado por las subunidades Tfc1, Tfc7 y Tfc4) y τ B (Tfc3, Tfc6 y Tfc8) ⁷⁴ (Figura 11). La función de TFIIC es la de unirse y estabilizar el complejo TFIIA-rDNA 5S previamente formado y reclutar a TFIIB. La subunidad Tfc1 contacta la caja A, mientras que Tfc4 interactúa con Brf1 y Bdp1 (subunidades de TFIIB) y con la subunidad C53 de Pol III ⁷⁵. Poco se sabe acerca de cómo TFIIA recluta a TFIIC, aunque en levadura los dedos de zinc 1 al 3 son candidatos para la interacción con TFIIC, uniéndose al subcomplejo τ B en primera instancia; además el aminoácido 81 que se encuentra entre los dedos de zinc ocho y nueve parece ser un segundo sitio de unión para el subcomplejo τ A de TFIIC ^{76,77} (Figura 11).

TFIIB es un complejo trimérico compuesto de las subunidades TBP, Bdp1 y Brf1 (Figura 11), el cual tiene la capacidad de unirse río arriba del SIT y es responsable de reclutar a Pol III. Además, TFIIB está involucrado en la abertura del promotor, por lo que es requerido para la iniciación de la transcripción ^{78,79}. Este factor interactúa directamente con el subcomplejo C82/C34/C31 de Pol III ⁸⁰ y con las subunidades C37 y C17 ^{81,82}.

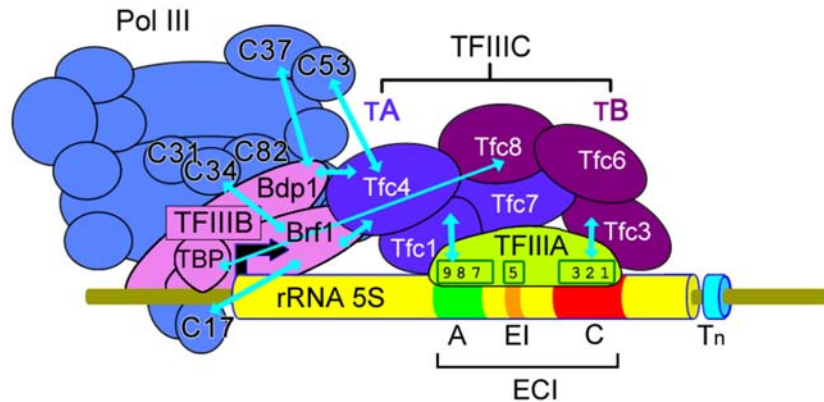


Figura 11. Factores de transcripción de los genes del rRNA 5S. El tubo amarillo representa al gen del rRNA 5S que contiene al elemento de control interno (ECI) con las cajas A y C y el elemento intermedio (EI). TFIIIA con sus dedos de zinc del 1 al 3 reconocen la caja C y los dedos de zinc del 7 al 9 la caja A. TFIIIC se divide en dos subcomplejos: τ B en violeta (Tfc8, Tfc6 y Tfc3) y τ A en morado (Tfc4, Tfc1, Tfc7). TFIIIB tiene tres subunidades TBP, Bdp1 y Brf1 (en color rosa). Pol III se muestra en color azul. Las flechas en color turquesa muestran las subunidades de Pol III, TFIIIB o TFIIIC que tienen contacto entre sí.

2.7.4 Término de la transcripción de los genes del rRNA 5S

Una propiedad inherente de Pol III es su fuerte preferencia por iniciar la transcripción con purinas⁸³. Consecuentemente, la mayoría de los genes del rRNA 5S empiezan con una guanina o una adenina⁸⁴. Río abajo de la mayoría de los genes transcritos por Pol III existe un pequeño tracto de timinas (Ts), que se ha demostrado funciona como señal de terminación de la transcripción⁸⁵. Además, se sabe que el mecanismo de término de la transcripción depende de tres subunidades de Pol III (C53, C37 y C11)⁸⁶. Se ha observado que diferentes especies necesitan un número variable de Ts. Por ejemplo, en genes del rRNA 5S de *Xenopus* y humano un tracto de 4 Ts es suficiente para terminar la transcripción⁸⁷; mientras que en levadura trectos de más de 5 Ts son necesarios. Además existen reportes de señales de término no canónicas, que en su mayoría corresponden a trectos de Ts interrumpidos por otras bases⁸⁸. Notablemente, algunas secuencias de terminación de genes del rRNA 5S en ratón y rata contienen trectos de adeninas, las cuales derivaron de la retrotransposición de transcritos del rRNA 5S. Resulta interesante el hecho de que algunos de estos genes se expresan⁸⁹.

2.7.5 Estructura y función del rRNA 5S

La estructura secundaria del rRNA 5S se encuentra altamente conservada en la naturaleza ⁹⁰, pues en todos los organismos contiene 5 hélices (I-V) y 5 asas (A-E) (Figura 12). La estructura se divide en tres dominios estructurales (α , β y Υ) que se extienden hacia afuera desde el asa A. El dominio α contiene la hélice III, mientras que el dominio β está formado por las hélices II y III y las asas B y C; el dominio Υ contiene las hélices IV y V, y las asas D y E ⁸⁴ (Figura 12A).

En todos los seres vivos el rRNA 5S es un componente integral del ribosoma, formando parte de la subunidad mayor junto con los rRNA 28S y 5.8S, y alrededor de 50 proteínas ⁹¹. Aunque el rRNA 5S se ha estudiado por más de 50 años, su función precisa no ha sido totalmente elucidada. Sin embargo, datos recientes indican que el rRNA 5S enlaza y coordina todos los centros funcionales del ribosoma ⁹² (Figura 12E) y además regula las rutas de señalización que acoplan la proliferación celular con la producción de ribosomas (como la de MDM2-p53) ⁹³ (Figura 12C). Se ha sugerido también que antes de integrarse a la subunidad 60S como una entidad estructural, el rRNA 5S podría funcionar como un tipo de chaperona de RNA con una función similar a la de una llave inglesa que serviría como un punto de control estructural, coordinando así la biogénesis ribosomal ⁹⁴ (Figura 12D).

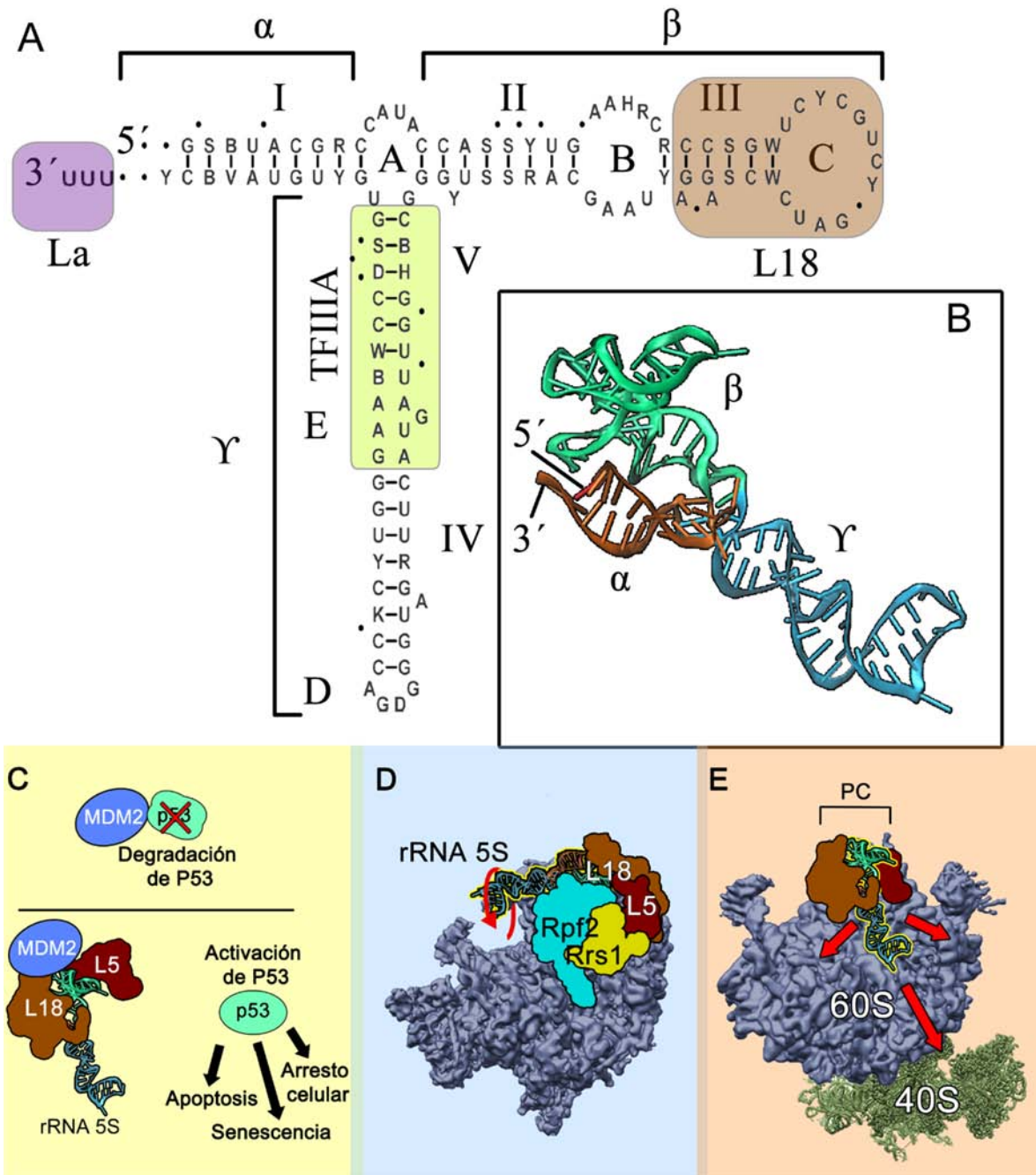


Figura 12. Estructura y función del rRNA 5S eucariote. A) Estructura secundaria del rRNA 5S, mostrando la secuencia consenso, obtenida de diferentes organismos. Las asas se nombran de la A a la E y las hélices del I al V. Los dominios α , β y γ están indicados en corchetes. Las zonas translucidas en morado, lima y café son las zonas de contacto principal de la proteína La, TFIIIA y L18, respectivamente. La nomenclatura de nucleótidos de acuerdo a la IUNMN es la siguiente: N: cualquier nucleótido; Y: C o U; R: A o G; W: A o U; S: G o C; M: A o C; K: G o U. Los puntos denotan nucleótidos no conservados. B) Estructura tridimensional. Los dominios α , β y γ están coloreados en naranja, turquesa y azul; los extremos 5' y 3' también están indicados. La figura fue modificada de ⁸⁴. C) el rRNA 5S en su forma libre (L5-L18-rRNA 5S) actúa bloqueando la función de MDM2 (degradar a P53) por lo que P53 puede regular la proliferación celular. D) el rRNA 5S en la subunidad mayor del ribosoma inmaduro tiene una estructura de llave inglesa que requiere de un movimiento de rotación para posicionarse en su posición final en la protuberancia central; este movimiento de rotación es un punto de control para la biogénesis ribosomal. E) El rRNA 5S en su posición final en la protuberancia central de la subunidad mayor del ribosoma maduro regula los sitios funcionales de la síntesis de proteínas.

2.7.6 Procesamiento del rRNA 5S

El transcrito primario del rRNA 5S necesita ser procesado y modificado para poder ser completamente funcional. En el extremo 3', el pre-rRNA 5S requiere de la remoción del tracto de uridinas. La enzima Rex1p, la cual pertenece a la familia de la exonucleasa RNasa D, es requerida para el procesamiento 3' del rRNA 5S y otros RNAs en levadura ⁹⁵. Este procesamiento es afectado por nucleótidos adyacentes al sitio de procesamiento (nt 118-122). En el rRNA 5S de *Drosophila*, el procesamiento del extremo 3' también es regulado por las hélices II y III, sugiriendo el involucramiento de una proteína que reconoce estas regiones del rRNA 5S ^{96,97}. La eliminación de TFIIIA en *Y. lipolytica* generó moléculas más largas del rRNA 5S, sugiriendo que TFIIIA podría participar en algún tipo de procesamiento ⁶⁴. No existen reportes de procesamiento en el extremo 5' del rRNA 5S en eucariontes; a diferencia de organismos procariontes, donde el pre-rRNA 5S contiene nucleótidos extras en su extremo 5' que son removidos por la tRNasa Z ⁹⁸. Cuando el rRNA 5S contiene nucleótidos extras en la región terminal 3', debido a un procesamiento incorrecto o por mutaciones internas que conllevan a un rRNA 5S de estructura aberrante, puede que ocurra la poli-adenilación en el extremo 3' por la acción de la poli (A) polimerasa. La región de poli-A funciona como una secuencia blanco para la subsecuente degradación del rRNA 5S en el exosoma ^{99,100}.

La única modificación que ha sido reportada en el rRNA 5S es la pseudouridilación. Esta modificación también ocurre en otras moléculas de rRNA y tiene un papel funcional en el procesamiento, doblamiento y transporte del rRNA, así como también en la síntesis de proteínas. El proceso de pseudouridilación es generalmente dirigido por RNAs pequeños nucleolares (snoRNAs) que forman parte de partículas ribonucleoproteicas nucleolares pequeñas (snoRNP) ¹⁰¹. Sin embargo, el proceso de pseudouridilación del rRNA 5S no está dirigido por una snoRNP, sino por la pseudouridina-sintetasa Pus-7, la cual reconoce una secuencia consenso de 7 nt requerida para la formación de pseudouridina en el rRNA 5S ¹⁰².

2.7.7 Transporte y asociación del rRNA 5S

2.7.7.1 Proteína “La”

En eucariontes la primera proteína que contacta al rRNA 5S es la proteína “La”, caracterizada por la presencia de tres regiones principales: el motivo “La” en la región amino-terminal, un motivo de reconocimiento a RNA (RRM), y una región carboxilo altamente cargada. Su principal función es proteger el extremo 3' de los rRNA 5S y otros RNAs pequeños de la digestión de exonucleasas ^{103,104}. “La” también funciona como una chaperona molecular para algunos transcritos y como un factor de retención nuclear ¹⁰⁵. Se ha observado que “La” existe en dos formas, fosforilada y defosforilada, localizada en el nucleoplasma y en el citoplasma, respectivamente. La forma fosforilada es la que se une a los RNAs nacientes ¹⁰⁶. Mutantes en levadura que carecen de “La” mostraron que no es esencial para la viabilidad celular y que no participa en la transcripción del gen del rRNA 5S ¹⁰⁷.

2.7.7.2 Transporte nuclear y citoplasmático del rRNA 5S

En ovocitos de *Xenopus* se ha mostrado que el rRNA 5S es exportado del núcleo hacia el citoplasma para almacenarse en complejos RNP con TFIIIA (formando la RNP 7S) o para una rápida movilización y ensamblaje del ribosoma con la proteína L18 (RNP 5S) ¹⁰⁸. TFIIIA (que también funciona como factor de transcripción) se une al asa E del rRNA 5S usando sus dedos de zinc 4 al 7 ¹⁰⁹ (Figura 13A), lo cual promueve la exportación del RNP 7S al citoplasma ¹¹⁰. Más tarde, el rRNA 5S almacenado en el citoplasma debe de ser reimportado al núcleo del ovocito. Para que esto ocurra, el rRNA 5S se asocia con la proteína L18, la cual parece ser la única proteína requerida para el proceso de importación ¹¹¹⁻¹¹⁴. Se ha determinado que el complejo RNP 5S es formado por un proceso co-traducciona que requiere la unión del rRNA 5S al péptido naciente L18 ¹¹⁵.

2.7.7.3 Transporte nuclear corto del rRNA 5S con L18

En células somáticas de mamíferos existe una ruta alterna más corta en el transporte del rRNA 5S, en donde la proteína L18 reemplaza a la proteína “La”, migrando directamente del sitio de transcripción al nucléolo para su incorporación en los ribosomas ¹¹⁶ (Figura 13B).

Así, esta ruta de transporte no requiere de la exportación y almacén del rRNA 5S en el citoplasma.

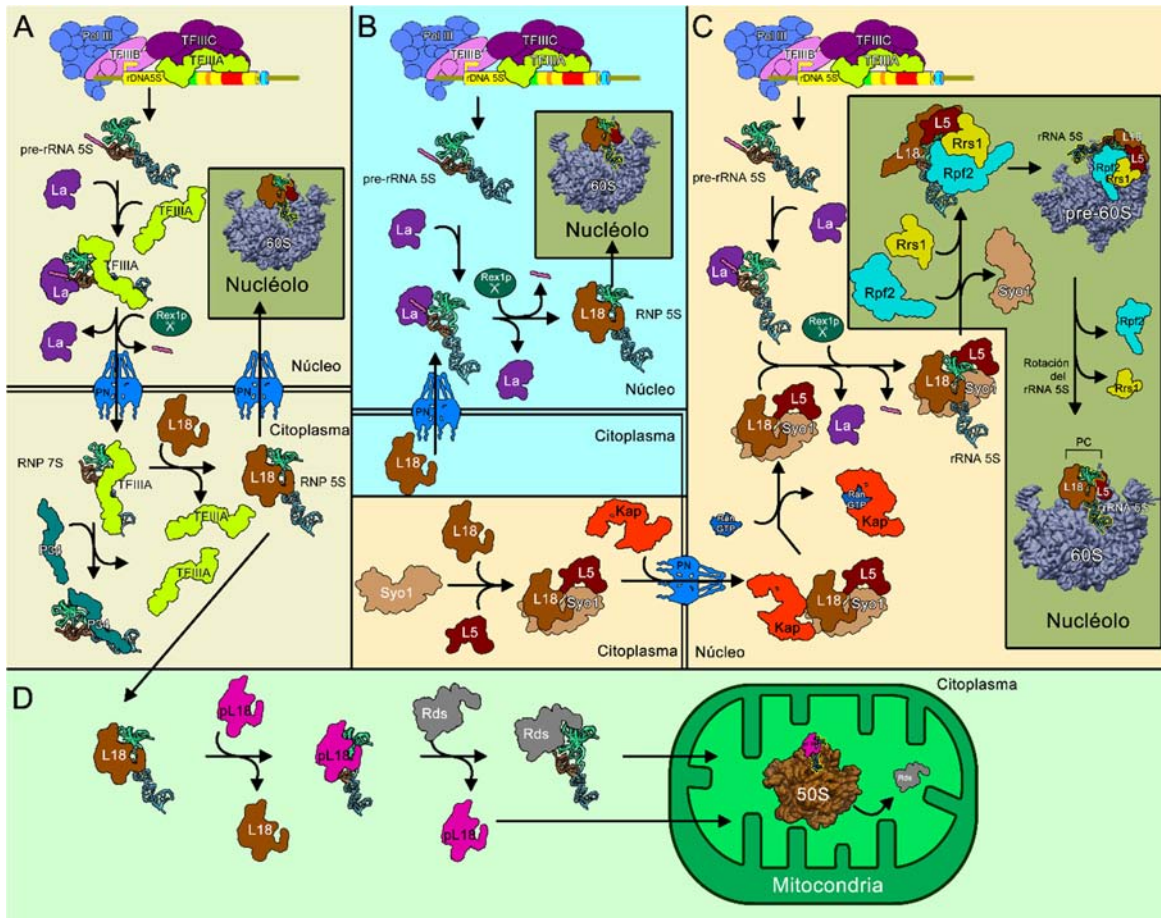


Figura 13. Síntesis y transporte del rRNA 5S. A) transporte nuclear y citoplasmático. B) Transporte nuclear que depende de L18. C) transporte nuclear del rRNA 5S que requiere la unión del complejo trimérico Syo1-L18-L5; además dentro del nucléolo las proteínas Rrs1 y Rpf2 ensamblan al ribosoma inmaduro 60S el trómero rRNA 5S-L18-L5 en una posición que necesita rotar para ubicarse en su posición final en la protuberancia central de la subunidad mayor del ribosoma maduro 60S. D) importación mitocondrial del rRNA 5S (la RNP 5S proviene del cuarto paso en el panel A). Cada panel tiene un diferente color de fondo. PN, poro nuclear; Rds, rodanasa; RNP, ribonucleoproteína.

2.7.7.4 Transporte nuclear en asociación con L18 y L5

Recientemente en levadura ha sido caracterizada una nueva ruta para el transporte del rRNA 5S del nucleoplasma al nucléolo. Esta ruta comienza cuando la proteína Syo1 se asocia simultáneamente con la proteína L18 (anteriormente conocida como L5) y la proteína ribosomal L5 (previamente llamada L11) en el citoplasma para formar el complejo Syo1-L18-L5 (Figura 13C). Subsecuentemente este heterotrónimo se asocia a la proteína importadora Kapβ2 (también conocida como Kap104). Tras la translocación nuclear, Kapβ2

se une a la proteína RanGTP y se separa del complejo trimérico Syo1-L18-L15, el cual se une al rRNA 5S para producir el intermediario ribonucleoproteico Syo-RNP 5S. La conversión de este intermediario en una RNP 5S competente ocurre cuando se disocia Syo1^{117,118}. Subsecuentemente, el complejo L18-L15-rRNA 5S es incorporado en partículas tempranas pre-60S con la ayuda de Rpf2 y Rrs1^{119,120}.

Algunas especies presentan características particulares. En *Xenopus*, por ejemplo, una proteína de nueve dedos de zinc llamada P43, la cual es similar a TFIIIA, se une al rRNA 5S para almacenarlo en el citoplasma¹²¹ (Figura 13A). En el parásito protozoario *Trypanosoma brucei* dos proteínas altamente relacionadas, P43 y P37, complementan a L5 y promueven su interacción con el rRNA 5S, ayudando en eventos de biogénesis ribosomal temprana¹²².

2.7.7.5 Asociación del rRNA 5S con las proteínas L18 y L5 en el ribosoma

El rRNA 5S se encuentra localizado en la protuberancia central (PC) de la subunidad mayor del ribosoma, junto con la hélice de RNA que corresponde al segmento de expansión 12 (ES12) del rRNA 28S, y las proteínas L18, L5, L6e, L30, L21 y L10e. Las proteínas que tienen más interacciones con el rRNA 5S son L18 y L5^{123,124}.

L18 es una proteína ribosomal de alrededor de 34 kDa cuya función en el ribosoma es la de anclar el peptidil-tRNA al sitio P^{91, 125}. Diferentes residuos de los dominios amino, central y carboxilo de L18 se unen al rRNA 5S^{126,127}. De hecho, ensayos de *footprinting* mostraron que L18 protege una parte substancial del rRNA 5S que se extiende desde el asa C a través de la hélice III, asa B, hélice II, asa A y porciones de las hélices I y V¹²⁸. Sin embargo, la interacción más fuerte se hace con dos adeninas desapareadas localizadas en la hélice III, y con el asa C¹²⁹.

L5 es una proteína ribosomal de ~19 kDa, homóloga a la proteína procarionte L5, que participa en la unión entre subunidades, formando un puente inter-subunidad con la proteína S13 de la subunidad menor. L5 además media la unión del peptidil-tRNA con el sitio P del ribosoma¹³⁰. La interacción de L5 con el rRNA 5S se logra después de que la proteína L18 induce cambios conformacionales en las hélices B y C¹³¹.

2.7.7.6 Importación mitocondrial del rRNA 5S

La mayoría de los genomas mitocondriales aparentemente carecen de los genes del rRNA 5S, aunque existen genes homólogos del 28S y 18S que siempre están presentes ¹³². Esto sugiere que los genes del rRNA 5S se perdieron durante la evolución mitocondrial en diferentes organismos. Aunque también es posible la existencia de genes del rRNA 5S altamente divergentes e irreconocibles ¹³³. En relación con esto, se reportó que el genoma mitocondrial en amebas contiene genes parecidos al rRNA 5S que son expresados; además, los transcritos del rRNA 5S se asocian con los ribosomas mitocondriales ¹³⁴. Aunque no hay genes del rRNA 5S en el genoma mitocondrial humano, el rRNA 5S codificado en el genoma nuclear es importado hacia la mitocondria. La importación ocurre cuando los precursores citoplasmáticos de la proteína mitocondrial ribosomal L18 (preMRP-L18) compiten por la unión del rRNA 5S con L18 (RNP 5S); promoviendo cambios conformacionales en el rRNA 5S que se necesitan para la unión con una segunda proteína llamada rodanasa, la cual permite que el rRNA 5S citoplasmático se importe y ensamble en el ribosoma mitocondrial (Figura 13D). Dos regiones del rRNA 5S son requeridas para la importación mitocondrial: la parte proximal de la hélice I, el asa E y la hélice IV ¹³⁵ (Figura 12A).

2.8.1 Transcripción en cinetoplástitos

La transcripción en los cinetoplástitos muestra variaciones substanciales en relación a los paradigmas de la expresión genética de los eucariontes superiores. Entre las características distintivas de este grupo de organismos se encuentran las siguientes: la transcripción policistrónica, el trans-splicing, la escasez de promotores de Pol II, la ausencia de regulación en la iniciación de la transcripción para la mayoría de los genes codificadores de proteínas, la transcripción de algunos genes que codifican para proteínas por Pol I (Figura 14), la ubicación subnuclear exclusiva para la transcripción de glicoproteínas variables de superficie (VSG), la síntesis de tRNA mitocondriales en el núcleo y la edición del mRNA mitocondrial ^{9,136}.

2.8.2 Organización genómica en tripanosomátidos

La comparación del contenido genético de *T. brucei*, *T. cruzi* y *L. major* (conocidos como los TriTryps) reveló una fuerte conservación del orden de los genes (sintenia) y un proteoma conservado de alrededor de 6200 genes codificantes de proteínas que están ordenados en

unidades policistrónicas largas (decenas a cientos de genes 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 le ha atribuido una función ¹³⁷.

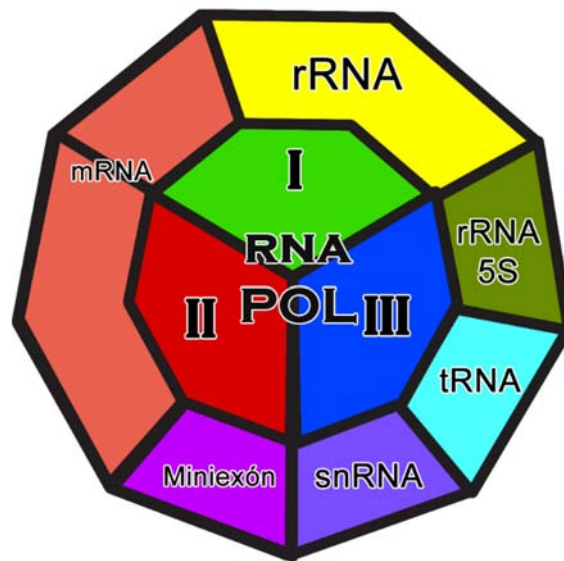


Figura 14. Espectro de la transcripción en tripanosomátidos. En el centro se encuentran los tres tipos de RNA Polimerasas: Pol I (verde), Pol II (rojo) y Pol III (azul). En la parte externa se indican los genes transcritos por cada RNA Polimerasa: mRNAs (naranja), snRNAs (morado), tRNA (turquesa), miniexón (violeta), rRNAs (amarillo) y rRNA 5S (oliva). En los tripanosomátidos todos los snRNAs son sintetizados por Pol III y algunos mRNAs codificadores de proteína son sintetizados por Pol I. El miniexón es sintetizado por Pol II. Modificada de ⁹.

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 ¹³⁸. 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 ¹³⁹. 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 ^{140,141}. 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 ¹⁴². Resulta interesante el hecho de que la mayoría de las regiones codificadoras de proteínas no se encuentran interrumpidas por intrones en los tripanosomátidos.

3. ANTECEDENTES

En *L. major* y otros tripanosomátidos se sabe poco sobre la transcripción de los genes del rRNA 5S y la biogénesis ribosomal. El genoma del parásito sólo contiene once genes del rRNA 5S, los cuales se encuentran dispersos y asociadas con otros genes transcritos por Pol III¹³⁷. En cambio, en *T. brucei* y en *T. cruzi* los genes del rRNA 5S se encuentran organizados en arreglos tipo tándem^{65,143}. En *T. brucei* se predijo la estructura secundaria del rRNA 5S, encontrándose que es muy parecida a la estructura consenso de eucariontes superiores. Además, se determinó el SIT y se identificaron por comparación las probables regiones de control interno^{144,145}. Notablemente, de los tres factores de transcripción requeridos para la transcripción del rRNA 5S, sólo TFIIB ha sido identificado en *Leishmania* y otros tripanosomátidos^{137,146,147}. En *T. brucei* y en *T. cruzi* se han caracterizado dos proteínas esenciales de unión al rRNA 5S llamadas P34/P37 y TcP37/NRBD, respectivamente, que forman un complejo con la proteína ribosomal L5. Cuando estas proteínas no están presentes el rRNA 5S se desestabiliza y la ruta de biogénesis ribosomal es comprometida¹⁴⁸. La estructura del ribosoma de *T. brucei* a nivel atómico reveló la presencia de segmentos de expansión inusualmente largos que forman puentes entre la subunidad mayor y menor, además de la región de la protuberancia central que es donde se localiza el rRNA 5S en los ribosomas maduros¹⁴⁹. En ninguna especie del género *Leishmania* se han estudiado los genes del rRNA 5S, ni las secuencias y proteínas que regulan su transcripción. Tampoco se ha analizado la localización nuclear de los genes del rRNA 5S en relación con el nucléolo, ni la localización nuclear y citoplásmica de los transcritos del rRNA 5S o la existencia de RNAs antisentido complementarios al rRNA 5S. En el presente trabajo analizamos varios de estos aspectos en los genes y transcritos del rRNA 5S en *L. major*.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

Determinar la localización celular de los genes y los transcritos del rRNA 5S en el protozoario parásito *L. major*. Asimismo, analizar las interacciones DNA-proteína entre los genes del rRNA 5S y proteínas nucleares.

4.2 Objetivos particulares

- Determinar el número, secuencia y contexto genómico de los genes del rRNA 5S entre diferentes especies de *Leishmania*.
- Localizar los sitios de inicio y término de la transcripción del rRNA 5S de *L. major*.
- Determinar la localización celular del rRNA 5S, así como la localización nuclear de sus regiones codificantes (genes del rRNA 5S).
- Determinar si se expresan RNAs antisentido complementarios al rRNA 5S.
- Analizar las interacciones entre la región promotora probable del gen del rRNA 5S y proteínas nucleares mediante ensayos *Southwestern*.
- Aislar e identificar proteínas que se unan al promotor del gen del rRNA 5S por medio de cromatografías de afinidad a DNA (DNA *pull-down*) y espectrometría de masas.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Bioinformática

La información para los análisis de secuencias y los mapas de sintenia de las diferentes especies de *Leishmana* (*L. major*, *L. mexicana*, *L. braziliensis*, *L. donovani* y *L. infantum*) se obtuvieron de las bases de datos de TriTrypDB (<http://tritrypsdb.org/tritrypdb/>) (Release 26). Las búsquedas BLAST se realizaron para identificar genes no anotados del rRNA 5S y pseudogenes. Las comparaciones de secuencia se hicieron usando el programa DNAMAN (versión 7). Para localizar o verificar la presencia e identidad de los genes de RNAt, se utilizó el programa tRNAscan-SE (<http://lowelab.ucsc.edu/tRNAscan-SE/>). La búsqueda de motivos conservados se realizó con Motif Search (<http://www.genome.jp/tools/motif/>) y el modelamiento por homología se hizo con SWISS-MODEL (<http://swissmodel.expasy.org/interactive>). La estructura secundaria consenso del rRNA 5S se predijo con el servidor web RNAalifold (<http://rna.tbi.univie.ac.at/cgi-bin/RNAalifold.cgi>).

5.2 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 µl de SSC 1× (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 mM), 0.5 ml de Sarcosyl al 10% y 100 µg 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 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 µl de TE (Tris-HCl 10 mM pH 7.6 y EDTA 0.2 mM pH 8.0). La concentración del DNA fue estimada en un espectrofotómetro a 260 nm (1 D.O. a 260 nm = 50 µg/ml).

5.3 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 (KAPAtaq, KAPAbiosystems; 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. Las reacciones de PCR se realizaron con la DNA polimerasa (0.5-2.5 unidades) y su respectivo buffer de reacción 1×, mezcla de dNTPs 10 mM, los oligonucleótidos sentido y antisentido específicos (0.1-10 μM cada uno), el DNA molde (normalmente 10-100 ng), y en algunas ocasiones MgSO₄ ó MgCl₂ 1.5 a 5 mM; finalmente la reacción se llevó a un volumen de 50 μl con 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; 30-40 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.

5.4 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 1× (Tris Base-HCl 5.4%, ácido bórico 2.74% y EDTA 0.46%) y 0.1 μg/ml de bromuro de etidio. Las moléculas de DNA fueron resuspendidas en amortiguador de carga 1× (azul de bromofenol 0.25%; xilen cianol 0.25%; glicerol 30%) y corridas junto con marcadores de peso molecular (1 kb Plus DNA ladder, Invitrogen; 50 bp DNA ladder, Fermentas; 100 pb ladder PROMEGA) Los geles se corrieron inmersos en amortiguador TBE 1× dentro de una cámara de electroforesis (Gel XL Ultra V-2, Labnet) a 25-100 voltios durante tiempo variable. Después de la electroforesis, los geles fueron fotografiados con un aparato Gel Doc EZ System (Bio-Rad).

5.5 Construcción de plásmidos

Tres fragmentos de DNA de *L. major* fueron amplificados por PCR y clonados en el vector pGEM-T Easy (Promega). Para el plásmido p5SrRNA, un fragmento de 118 pb (+1 a +118 en relación con el sitio de inicio de la transcripción de los genes del rRNA 5S) se amplificó con los oligonucleótidos 5SrRNA-F1 (5'-GAGTACGACCACACTTGAGTG) y 5SrRNA-R1 (5'-GAGTACGGCACTCAGGGTT). Para el vector p5SrRNA344, un fragmento de 344 pb (desde -31 hasta +313 en relación con el sitio de inicio del gen *LmjF15.5SrRNA.01*) se amplificó con los oligonucleótidos Lm15-rRNA5S 5' (5'-GAAAGCATCTCTGTGGGTTCTGA) y Lm15-rRNA5S 3' (5'-CCCGGGGTCCTGCAAATG). Para el vector pRegionE, un fragmento de 120 pb de *LmjF.06.0200* (que codifica para una proteína hipotética) se amplificó con los oligonucleótidos Lm06.0200-5' (5'-CCATCCCATGACAAGAGC) y Lm 06-0200-región-3' (5'-TTTGCCGCCACTGCCACTG). Para obtener el vector pB6-PTP, el sitio de calmodulina (CBS) presente en pB6-TAP¹⁵⁰ fue reemplazado con el epítipo de la proteína C (ProtC)¹⁵¹. Para hacer esto, pB6-TAP se digirió con *XbaI* y *NheI* y el CBS fue eliminado por electroforesis en un gel de agarosa. La secuencia ProtC se obtuvo al alinear los oligonucleótidos ProtC-sense (5'-CTAGAGGTTCCGACGGCGAAGATCAGGTGGATCCTCGTCTTATTGATGGGAAATATGATATTCCAACACTG) y ProtC-antisense (5'-CTAGCAGTAGTTGGAATATCATATTTCCCATCAATAAGACGAGGATCCACCTGATCTTCGCCGTCGGAACCT), los cuales contienen sitios de restricción *XbaI* y *NheI* en sus extremos. El fragmento ProtC después fue clonado en el cuerpo del vector de pB6-TAP. Para obtener el vector pELp3b-PTP, el gen RBP6 en pB6-PTP fue reemplazado con el gen Elp3b de *L. major* (*LmjF.23.1350*). Para preparar el cuerpo del vector de pB6-PTP, el vector fue digerido con *XmaI* y *XbaI* y el fragmento del gen de RPB6 se eliminó por electroforesis en un gel de agarosa. El gen Elp3b fue amplificado por PCR a partir de DNA genómico con los oligonucleótidos Elp3-AgeI-5' (5'-ATACCGGTATGTCCGACCACGCCGACAT) y Elp3-XbaI-3' (5'-ATTCTAGAGGGTGTGTTCTTGTGGAACC). El producto de PCR se clonó en el vector pGEM-T Easy (Promega), se digirió con *AgeI* y *XbaI* y se ligó en el cuerpo del vector de pB6-PTP. Para obtener el plásmido pCold-LmNop56, El gen completo de *L. major* (LmNop56) se amplificó con los oligonucleótidos LmNop56-Kpn1-F (5'-

GGTACCATGTCGAGAACGCTGTACA) y LmNop56-XbaI-R (5'-TCTAGACCCGGACTCAGAGGCGGC), se clonaron en pGEM-T Easy y se subclonaron en los sitios de restricción *KpnI* y *XbaI* del vector de expresión pCold1 (Takara Bio Inc.). Todos los vectores fueron verificados por secuenciación.

5.6 Cultivo celular y transfección

Promastigotes de *L. major* MHOM/IL/81/Friedlin (LSB-132.1) fueron crecidos en medio BM (medio 1× M199 pH 7.2 que contiene 10% de suero fetal bovino inactivado, 9.5 g/l infusión de cerebro corazón, HEPES 40 mM, hemina 0.01 mg/ml, biotina 0.0002 %, 100 IU/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomicina, y 1× de L-glutamina) a 26°C y tomados en fase media logarítmica. Epimastigotes de *T. cruzi* CL Brener se mantuvieron en medio infusión de hígado triptosa y glucosa (LIT) que contiene suero fetal bovino inactivado al 10 %, 50 IU/ml penicilina, 50 µg/ml estreptomicina y hemina 0.025 mg/ml a 28°C. Para obtener una línea celular de *L. major* que expresara la versión de la proteína nucleolar Elp3B con un tag de PTP, células de *L. major* se transfectaron por electroporación con el vector pElp3b-PTP. La electroporación y el plaqueo fueron realizados como previamente se describe en ¹⁵². Brevemente, 4×10^7 promastigotes fueron transfectados en 0.4 ml de buffer de electroporación (HEPES 25 mM, KCl 120 mM, CaCl₂ 0.15 mM, MgCl₂ 5 mM, KH₂PO₄ 10 mM, K₂HPO₄ 10 mM, EDTA 2 mM, pH 7.6) con 10 µg de pElp3b-PTP por electroporación a 1600 V, 50 µF y 25 Ω (ECM Electro Cell Manipulator, BTX). Las células se dejaron crecer por 24 horas antes de que se esparcieran en placas que contenían agarosa Seaplaque GTG al 0.7% (FMC Bioproducts) en medio BM con 50 µg/ml de G418. Algunas de las colonias aisladas se seleccionaron para continuar con su análisis detallado.

5.7 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 botón de células fue lisado pipeteando repetidamente con 750 µl 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 contiene 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 tratada con DEPC. La concentración de RNA se determinó con un espectrofotómetro (Jenway genova) a 260 nm ($1 \text{ D.O. a } 260 \text{ nm} = 40 \text{ µg/ml}$).

5.8 Análisis Northern blot

Experimentos *Northern blot* se realizaron separando 10-30 µg de RNA total en geles al 10 % de poliacrilamida con 8 M urea. Después de la electroforesis, el RNA se transfirió a membranas Hybond N+ (GE Healthcare) por electro transferencia usando una cámara semi seca Trans-Blot SD (Bio-Rad). La sonda para el rRNA 5S correspondió al oligonucleótido 5S rRNA-R1 (R1 (5'-GAGTACGGCACTCAGGGTT)), y la sonda antisentido correspondió al oligonucleótido 5S rRNA -F1 (5'-GAGTACGACCACACTTGAGTG). Los oligonucleótidos se marcaron con [γ - ^{32}P] ATP usando T4 cinasa. La hibridación se realizó en 6× SSPE (60 mM Na_2HPO_4 , 0.9 M NaCl y 6 mM EDTA), 5× solución Denhardt y 1% SDS a 42°C. Los lavados se realizaron a 55°C en $0.2 \times \text{SSC}$ y 0.1 % SDS.

5.9 Análisis por 5'-RACE

Para localizar el sitio de inicio de la transcripción de los genes del rRNA 5S en *L. major*, se hicieron experimentos de amplificación rápida de los extremos 5' (5'-RACE) con 4 µg de RNA total con el kit de Life Technologies, Inc. La síntesis de la primera cadena de cDNA se realizó con el oligonucleótido 5SrRNA-R1 (5'-GAGTACGGCACTCAGGGTT) y las amplificaciones del PCR se realizaron con el oligonucleótido anidado 5SrRNA-R2 (5'-CCCGAGTCATCACTGACCTCAG) y el oligonucleótido AAP (5'-GGCCACGCGTCGACTAGTACGGGIIGGGIIGGGIIG). Los productos del PCR anidado fueron clonados en el vector pGEM-T Easy (Promega) para su posterior secuenciación.

5.10 Análisis por RT-PCR

El sitio de término de la transcripción de los genes del rRNA 5S fue mapeado adicionando una cola de poli(A) al RNA total. Con este propósito, 4 µg de RNA total fueron mezclados con 1 µl de ATP 25 mM, 2 µl de buffer de reacción 5× de la Poli (A) polimerasa y 1200 unidades de poli (A) polimerasa de levadura (USB) en un volumen final de 20 µl. La mezcla se incubó por 20 minutos a 37°C, y la reacción fue detenida calentando a 65°C por 10 minutos. El cDNA se preparó con el oligonucleótido anidado Nested(dT) (5'-CCTCTGAAGGTTACGGATCCACATCTAGATTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTVN). La primera amplificación por PCR se realizó con los oligonucleótidos 5SrRNA-F1 y B1 (5'-CCTCTGAAGGTTACGGAT) y el segundo PCR con los oligonucleótidos 5SrRNA-F2 (5'-TGAAAACACCATATCCCGT) y B2 (5'-CACGGATCCACATCTAGAT). Los productos anidados de PCR fueron clonados en el vector pGEM-T Easy (Promega) y secuenciados.

5.11 Hibridación fluorescente *in situ* de DNA (DNA-FISH) combinado con inmunofluorescencia

Para estos experimentos se utilizó una línea celular de *L. major* Friedlin que expresa la proteína recombinante nucleolar Elp3b-PTP. Para los ensayos DNA-FISH, 1×10^6 células en fase media logarítmica fueron tomadas, lavadas dos veces en PBS y dispersadas en laminillas cubiertas con poli-L-lisina. Las células fueron fijadas con paraformaldehído al 4% por 30 minutos a 4°C, permeabilizadas con Tritón X-100 al 0.1% por 5 minutos a temperatura ambiente y lavadas con PBS. La sonda de DNA fue desnaturalizada en buffer de hibridación (formamida desionizada al 50%, fosfato de sodio salino EDTA (SSPE) 2×, dextrán sulfato al 10%, DNA de esperma de salmón 250 µg/ml) a 95°C por 10 minutos. Finalmente se sellaron las laminillas con marcos plásticos, la sonda se incubó por 10 minutos a 80°C y después por 16 horas a 37°C. El sello se removió y las laminillas primero se lavaron con formamida al 50% y SSC 2× por 30 minutos a 37°C; después con 1×, 2× y 3× de SSC por 10 minutos a 37°C cada lavado. Las laminillas se incubaron con estreptavidina conjugada con Alexa Fluor 568 (dilución 1:1500, Life Technologies) en buffer de bloqueo (NaCl 150 mM, ácido maléico 100 mM, Tween 20 al 0.1%) por 30 minutos. Finalmente se hicieron dos lavados con PBS y Tween 20 al 0.05% por 5 minutos y un lavado con PBS previamente al montaje con solución Vectashield-DAPI (4',6-diamino-2-fenilindol) (Vector Laboratories Inc.).

Los tratamientos control con DNAsa y RNAsa se hicieron después del paso de permeabilización usando 6 U de DNAsa I (libre de RNAsa) (Thermo Scientific) por una hora a 37°C, o con 20 µg de RNAsa A (Promega) por 30 minutos a 37°C.

La sonda de 344 pb (desde -31 hasta 313 en relación con el SIT del gen *LmjF15.5SrRNA.01*) se amplificó por PCR a partir del plásmido p5SrRNA344 con los oligonucleótidos Lm15-rRNA5S 5' y Lm15-rRNA5S 3' y fue marcada con el kit Biotin-High Prime (Roche).

Para continuar con la inmunofluorescencia indirecta, después del último lavado con PBS en el DNA-FISH, las células fueron fijadas con paraformaldehído al 4% por 30 minutos a 4°C, lavadas dos veces con PBS y permeabilizadas con NP-40 al 0.1%. Las células se bloquearon con BSA al 2% por 30 minutos y se incubaron con el anticuerpo primario policlonal de conejo anti-proteína C (Delta Biolabs) diluido a 1:25 con solución de bloqueo por una hora a temperatura ambiente y lavadas con PBS. Después, las células se incubaron con un anticuerpo secundario de cabra anti-conejo conjugado con Alexa Fluor 488 (Life Technologies) diluido a 1:300 con solución de bloqueo a temperatura ambiente por una hora, y lavadas con PBS por 10 minutos. Finalmente, las células fueron montadas con solución Vectashield-DAPI (Vector Laboratories Inc.). Las imágenes se obtuvieron utilizando un microscopio Carl Zeiss AX10 y fueron analizadas con el programa Zen 2012 (edición azul). Ensayos de DNA-FISH con epimastigotes de *T. cruzi* CL Brener se hicieron bajo las mismas condiciones. En el DNA-FISH acoplado con inmunofluorescencia se utilizó un anticuerpo primario policlonal contra la proteína nucleolar NOP56 de *L. major* diluido 1:1000.

5.12 RNA-FISH combinado con inmunofluorescencia indirecta

Para este experimento primero se generó por transcripción *in vitro* una sonda antisentido de RNA, complementaria al rRNA 5S, usando el kit MEGAscript T7 (Ambion) con biotina 11-UTP (Ambion) siguiendo las instrucciones del fabricante. El DNA molde utilizado en la reacción fue un producto de PCR obtenido del vector p5SrRNA-rev con los oligonucleótidos 5SrRNA-F1 y promotor T7. Como control negativo, para detectar al rRNA 5S antisentido se transcribió *in vitro* al rRNA 5S a partir de un producto de PCR que se amplificó con los oligonucleótidos 5SrRNA-R1 y el promotor T7 a partir del vector p5SrRNA (ver sección 6.4). También se sintetizó *in vitro* un RNA no relacionado que contenía el *polylinker* del

vector pGEM-T easy, el cual se obtuvo a partir de DNA templado que se amplificó por PCR utilizando los oligonucleótidos T7 y SP6, a partir de dicho plásmido.

Después, se tomaron promastigotes de la línea celular de *L. major* que expresa la proteína recombinante Elp3b-PTP, se dispersaron en portaobjetos, y se permeabilizaron y lavaron como se indica en la sección del DNA-FISH. La sonda de RNA (3 ng/30 μ l) se desnaturalizó a 65°C por 5 minutos en buffer de hibridación con 40 U de inhibidor de RNasa Ribolock (Thermo Scientific) y se dejó en hielo. Las laminillas se sellaron en marcos de plástico y se hibridaron 5 minutos a 65°C, e inmediatamente después se incubaron por 20 horas a 37°C. Estas laminillas se lavaron con formamida al 50% y SSC 2 \times por 15 minutos a 50°C, en SSC 2 \times por 15 minutos a 37°C, dos veces en SSC 1 \times 15 minutos a 37°C y una vez en SSC 0.5 \times 15 minutos a 37°C. Después, se incubaron con estreptavidina conjugada con Alexa Fluor 568 (dilución 1:1000, Life Technologies) en PBS por una hora a temperatura ambiente. Finalmente, las laminillas se lavaron dos veces en SSC 2 \times 15 minutos y se montaron en solución Vectashield-DAPI (Vector Laboratories Inc.). Los tratamientos control con DNasa y RNasa también se realizaron después de la permeabilización, como se indica en la sección de DNA-FISH.

En algunos experimentos se realizó la inmunofluorescencia indirecta antes de los ensayos de RNA-FISH. En estos casos, las células fueron dispersadas en las laminillas de vidrio, permeabilizadas y lavadas como se indicó en la sección del DNA-FISH. Las células fueron después incubadas con el anticuerpo primario policlonal de conejo anti-proteína C (Delta Biolabs) diluido 1:20 en BSA al 0.5% por 30 minutos a temperatura ambiente y lavadas con PBS. Las células después fueron incubadas con un anticuerpo secundario de cabra anti-conejo conjugado con Alexa Fluor 488 (Life Technologies) diluido a 1:300 con solución de bloqueo a temperatura ambiente por 30 minutos, lavadas dos veces con PBS para continuar con la hibridación de la sonda de RNA.

5.13 Extractos nucleares

Proteínas nucleares de *L. major* se obtuvieron como se ha reportado anteriormente¹⁵³ con algunas modificaciones. Los núcleos se aislaron a partir de 5×10^7 promastigotes, lavando tres veces en PBS y resuspendiendo las células en 4 ml de buffer de lisis frío (HEPES-KOH 10

mM pH 7.9, MgCl₂ 1.5 mM, KCl 10 mM, ditiotreitól 0.5 mM, inhibidor de proteasas al 1% de SIGMA). Se permitió que las células se hincharan en hielo por 10 minutos y fue adicionado NP-40 a una concentración final de 0.2%. Las células fueron transferidas a un homogeneizador de vidrio con mazo de teflón y rotas con 10 golpes. Los núcleos se colectaron por centrifugación a 12,000 rpm por 15 segundos a 4°C, se resuspendieron en 100 µl de buffer C frío (HEPES-KOH 20 mM pH 7.9, glicerol al 25%, NaCl 420 mM, MgCl₂ 1.5 mM, EDTA 0.2 mM, DTT 0.5 mM, coctel inhibidor de proteasas al 1%) y se incubaron por 20 minutos para una extracción de proteínas nucleares con alta concentración de sal. Finalmente la muestra fue centrifugada a 12,000 rpm por 4 minutos a 4°C y la fracción del sobrenadante, que contiene las proteínas nucleares, fue almacenada a -70°C.

5.14 Análisis *Southwestern*

Alrededor de 90 µg de proteínas nucleares se separaron por SDS-PAGE usando geles de poliacrilamida al 14%. Las proteínas fueron electro-transferidas a membranas de PVDF en buffer de transferencia (Tris-base 25 mM, glicina 190 mM, metanol al 20%) a 100 V por 2 horas a 4°C. Las membranas fueron bloqueadas y renaturalizadas en buffer de unión (HEPES 10 mM, NaCl 50 mM, MgCl₂ 10 mM, EDTA 0.1 mM, DTT 1 mM y Tritón X-100 0.1×) con PVP-40 al 0.5% durante 2 horas a temperatura ambiente. Las membranas fueron cortadas en tiras que corresponden a cada carril electroforético. Las tiras fueron incubadas con 2.5×10⁵ c.p.m. de sondas de DNA (gen del rRNA 5S y DNA no relacionado) por 3 horas en buffer de unión con 10 µg/ml poli dI:dC y 0, 20 u 80 µg de DNA de esperma de salmón como competidor. Finalmente las tiras fueron lavadas 3 veces por 30 minutos en buffer de lavado (HEPES 10 mM, NaCl 300 mM, MgCl₂ 10 mM, DTT 1 mM y leche descremada en polvo al 0.25% p/v). Las tiras se dejaron secar al aire libre y se expusieron para obtener la autoradiografía. La sonda del rRNA 5S (118 pb) se amplificó por PCR a partir del plásmido p5SrRNA con los oligonucleótidos 5SrRNA-F1 y 5SrRNA-R1. La sonda no relacionada corresponde a un fragmento de 140 pb del gen *LmjF.06.0600* (que codifica una proteína hipotética) y se obtuvo al digerir el vector pRegionE con *EcoRI*. Ambas sondas se marcaron con [α -32P] dCTP usando el kit de marcaje High Prime (Amersham).

5.15 Experimentos DNA *pull-down*

Una fragmento biotinilado de 99 pb del gen del rRNA 5S fue generado mediante la amplificación por PCR, a partir del vector p5SrRNA, con el oligonucleótido 5SrRNA-F2bio5 (5' [Btn] -TGAAAACACCATATCCCGT) (biotinilado en su extremo 5') y el oligonucleótido 5SrRNA-R1 (5'-GAGTACGGCACTCAGGGTT). Un control sin biotinar también fue amplificado con los oligonucleótidos SrRNA-F2 y 5SrRNA-R1.

Perlas magnéticas de Estreptavidina Dynabeads (Thermo Scientific) se lavaron 3 veces con buffer de lavado y unión 2× (Tris 10 mM pH 7.5, EDTA 1 mM, NaCl 2 M y Tween 20 al 0.1%). Después, 10 µg de sonda fueron incubados con 1 mg de perlas magnéticas por 15 minutos a temperatura ambiente en buffer de lavado y unión 1× y lavadas tres veces con buffer TE (Tris 10 mM, EDTA 1mM). Los complejos DNA-perlas magnéticas fueron incubados por 30 minutos a 4°C en buffer de unión (HEPES 24 mM, DTT 40 mM, Ficoll al 4%, KCl 60 mM, MgCl₂ 3 mM, ZnCl₂ 1 mM) con 750 µg de extractos nucleares, 1 mg/ml poli dI:dC y 10 ng/µl de DNA no relacionado (un fragmento de 140 pb del gen *LmjF.06.0600*). Las perlas fueron lavadas dos veces en buffer de unión y eluidas en NaCl 200 mM y Tris-Cl 25 mM pH 7.5. Una fracción de las proteínas eluidas fue analizada por SDS-PAGE y teñida con plata (kit SilverQuest, Thermo Scientific).

5.16 Espectrometría de masas

Una fracción de las proteínas concentradas obtenidas en el ensayo DNA *pull-down* fueron digeridas con tripsina. Las muestras fueron enviadas a analizar por espectrometría de masas a la Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigación y a la Industria, de la Universidad Nacional Autónoma de México. La separación de los péptidos tripticos por cromatografía líquida a pequeña escala se realizó en un sistema NanoAcquity (Waters Corporation). Los péptidos se analizaron en un espectrómetro Synapt F2-S. El espectro de disociación inducida por colisión (CID) se comparó con la base de datos de las proteínas de *L. major* (versión 9.0; descargada de TriTrypDB) usando el programa ProteinLynx Global SERVER (Waters Corporation).

6. RESULTADOS

6.1 Análisis de secuencia y genómico de los genes del rRNA 5S

El genoma de *L. major* tiene sólo once genes del rRNA 5S, los cuales se encuentran dispersos en seis diferentes cromosomas (5, 9, 11, 15, 21 y 23), asociados con otros genes transcritos por Pol III ¹³⁷ (Figura 15). Los cromosomas 5, 15 y 23 contienen un solo gen del rRNA 5S, mientras que el cromosoma 21 contiene dos genes y el cromosoma 9 y 11 poseen tres genes cada uno. En su extremo 5', diez de los genes del rRNA 5S se encuentran flanqueados por un gen de tRNA localizado a una distancia corta (51 a 73 pb) (Figura 15). En ocho de estos loci, los genes del tRNA y el rRNA 5S se localizan en la misma cadena. El gen del rRNA 5S restante (*LmjF.21.5SrRNA.02*) contiene un gen codificante de proteína en su extremo 5'. En el extremo 3', siete genes del rRNA 5S se encuentran flanqueados por genes codificantes de proteína y cuatro por un gen de tRNA. Los genes codificantes de proteína se encuentran separados por largas distancias de entre 698 a 7897 pb de los genes del rRNA 5S. En contraste, las distancias son cortas (60 a 80 pb) entre los genes del rRNA 5S y los genes de tRNA en el extremo 3' (Figura 15).

De acuerdo con la base de datos de TriTrypDB, la longitud de los once genes de *L. major* fluctúa de 119 a 123 pb. El alineamiento de secuencias mostró que el tamaño varía debido a diferencias en la asignación del primer nucleótido de los genes (Figura 15). Además, dos de los genes carecen de una C en el extremo 3' del gen. El resto de las secuencias es idéntico, con la excepción de la base +70, la cual puede ser una G (en ocho genes) o una A (en tres genes) (Figura 15).

Para determinar si existe variación en el extremo 5' de los genes del rRNA 5S, se realizó un experimento 5'-RACE. Como primer paso para llevar a cabo el ensayo, se extrajo RNA total de promastigotes de *L. major*. Con transcriptasa reversa se preparó el cDNA, utilizando el oligonucleótido 5SrRNA-R1, el cual se une específicamente a la región 3' del transcrito del rRNA 5S. Posteriormente, al extremo 3' del cDNA se le agregó un tracto de citosinas con la enzima TdT. El cDNA se amplificó después por PCR, usando un oligonucleótido que hibrida con el tracto de citosinas (AAP) y el oligonucleótido 5SrRNA-R2. De esta manera, se generó un producto de PCR de aproximadamente 130 pb (Figura 16A), que fue clonado en el vector pGEM-T easy. Se analizó un total de 34 clonas mediante restricción con la endonucleasa

*Eco*RI, enzima que flanquea el sitio de clonación en el vector. En la Figura 16B se muestran 5 de las restricciones realizadas, observándose en todos los casos un fragmento de aproximadamente 160 pb, que contiene al rRNA 5S, el tracto de citosinas y secuencias flanqueantes del plásmido pGEM-T easy.

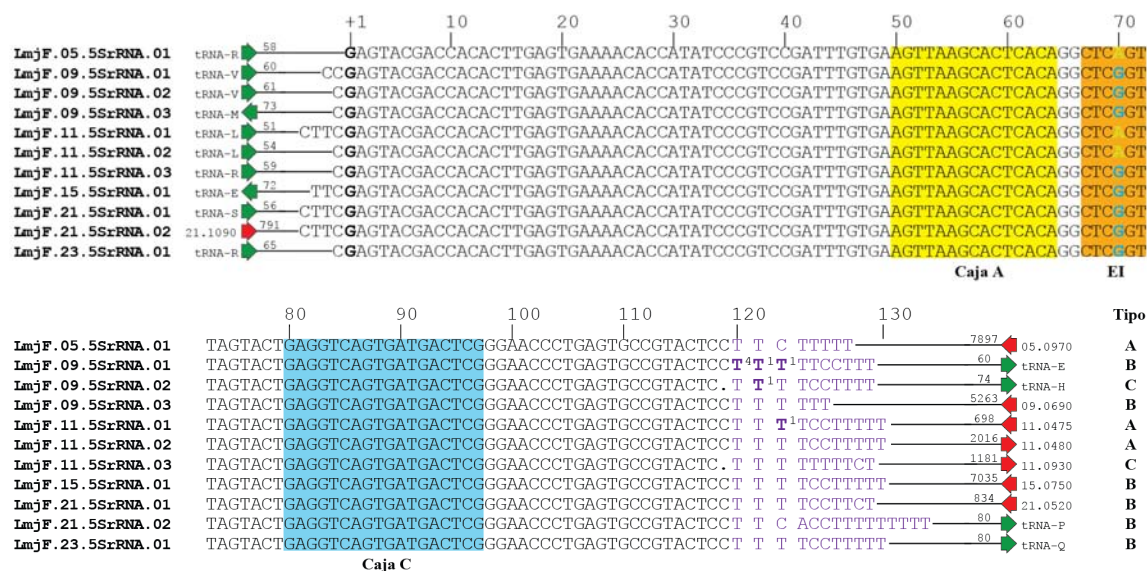


Figura 15. Análisis de secuencia de los genes del rRNA 5S en *L. major*. Alineamiento de secuencias de los once genes del rRNA 5S presentes en *L. major*, mostrando las secuencias anotadas en la base de datos de TriTrypDB. Los genes de tRNA flanqueantes (flechas verdes) y los genes codificantes de proteína (flechas rojas) están indicados. Los números especifican la distancia en pares de bases entre el gen del rRNA 5S y sus genes flanqueantes. La G mostrada en negritas (posición +1) corresponde al sitio de inicio de la transcripción mapeado por experimentos de 5'-RACE. En el extremo 3', el tracto de Ts se muestra en morado. Los residuos de T en negritas muestran los sitios de término de la transcripción localizados por RT-PCR, especificando el número de clonas en cada posición. Además se muestra la posición putativa de la caja A, elemento intermedio (EI) y la caja C. Los genes se clasificaron en tipos A, B y C.

El análisis de secuencia de todas las clonas analizadas mostró que todas comienzan con una G, que está marcada como +1 en la Figura 15, lo cual indicó que la transcripción de las 11 copias de los genes del rRNA 5S comienzan en ese nucleótido. Se ha reportado que la transcripción de los genes del rRNA 5S en *T. cruzi* y en *T. brucei* comienza en una G localizada en la misma posición^{65,144}.

Considerando las diferencias de secuencia, los once genes de rRNA 5S de *L. major* pueden clasificarse en tres grupos: genes tipo A (longitud de 119 pb, representado por 3 genes) contienen una A en la posición 70 y dos Cs en el extremo 3'; tipo B (longitud de 119 pb, ejemplificado por seis genes) poseen una G en la base 70 y dos Cs en el extremo 3'; y tipo C

(longitud de 118 pb, representados por dos genes) contienen una G en la posición 70 y una C en el extremo 3' (Figura 15).

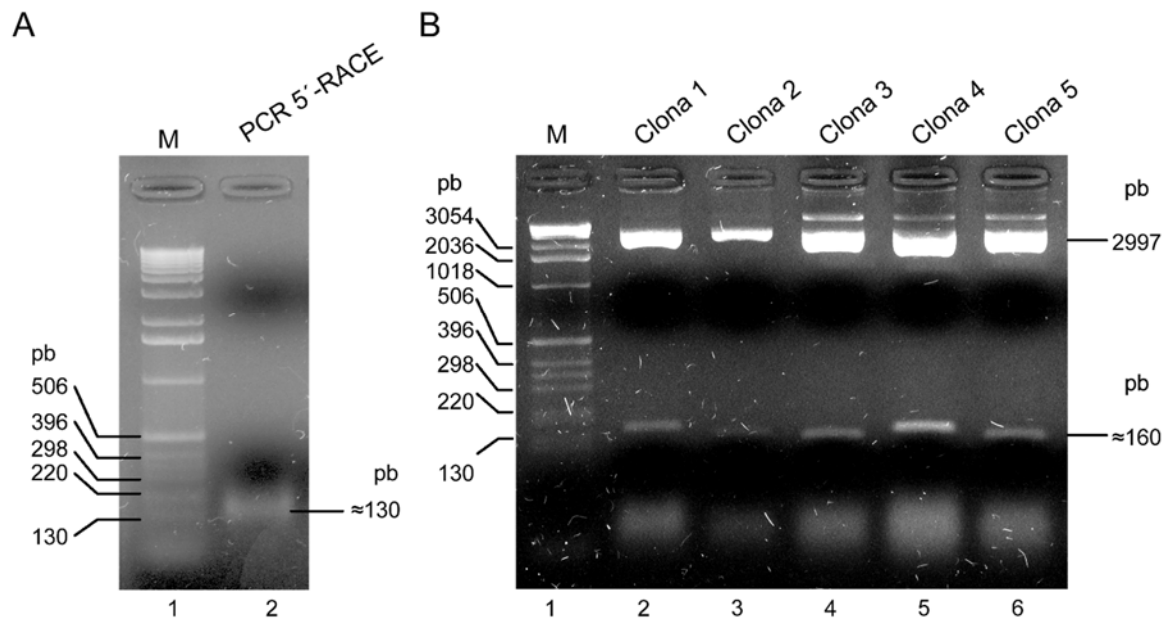


Figura 16. Ensayo 5'-RACE con el rRNA 5S de *L. major*. A) Electroforesis de la reacción de PCR para determinar el sitio de inicio de la transcripción utilizando los oligonucleótidos AAP y 5S rRNA-R2. B) Caracterización de 5 clonas mediante digestión de DNA plasmídico con la endonucleasa *EcoRI*. Se observan insertos de ~160 pb y el vector de 3018 pb. El marcador de peso molecular (M) corresponde a la escalera de 1 kb (Invitrogen). Pb, pares de bases; M, marcador de peso molecular de 1kb (Invitrogen).

Se ha determinado que un tracto de varios residuos de Ts actúa como señal de término de la transcripción de Pol III¹⁵⁴. Nuestros análisis de secuencia revelaron que todos los genes del rRNA 5S en *L. major* contienen un tracto de seis a siete Ts en el extremo 3' (Figura 15). El gen *LmjF.09.5SrRNA.03* tiene un tracto continuo de seis Ts, mientras que el resto de los genes contiene trectos de Ts discontinuos que están interrumpidos por una o varias Cs. Se ha reportado que algunos genes transcritos por Pol III poseen un segundo tracto de Ts que actúa como señal de término de reserva “*backup*”⁸⁸. El segundo tracto de Ts normalmente se encuentra localizado dentro de las primeras 30 pb río abajo del primer tracto. En *L. major*, solo un gen del rRNA 5S (*LmjF.21.5SrRNA.02*) tiene una señal de Ts de reserva (Figura 15 y Figura 17). Esto sugiere que los genes del rRNA 5S de *L. major* requieren de solamente un tracto de Ts para finalizar eficientemente la transcripción.

Para determinar los sitios de término de la transcripción de los genes del rRNA 5S en *L. major*, se realizaron reacciones de RT-PCR con RNA total que fue poli-adenilado *in vitro*.

El cDNA del rRNA 5S se amplificó por PCR, usando los oligonucleótidos 5SrRNA-F1 y B1, obteniendo un fragmento de aproximadamente 170 pb (Figura 18A, carril 2). Para aumentar la especificidad del ensayo se realizó un segundo PCR con los oligonucleótidos anidados 5SrRNA-F2 y B2, observándose un fragmento de ~150 pb (Figura 18A, carril 3). Más tarde, este fragmento se clonó en el vector pGEM-T easy, y se analizó un total de 24 clonas mediante restricción con la endonucleasa *EcoRI*, enzima que flanquea el sitio de clonación en el vector. En la Figura 18B se muestran 5 de las restricciones realizadas, observándose en todos los casos un fragmento de aproximadamente 180 pb que contiene al rRNA 5S, el tracto de adeninas y secuencias flanqueantes del plásmido pGEM-T easy.

El análisis de secuencia de las clonas obtenidas mostró que, como se esperaba, el término de la transcripción de los genes del rRNA 5S se localizó dentro del tracto de Ts ubicado río abajo de los genes. En cuatro de las clonas analizadas, el tracto de adeninas se añadió después de la primera T, mientras que en dos clonas se añadió después de la segunda T, y en dos clonas se añadió después de la tercera T (Figura 15).

Varias clonas terminaron en la C localizada inmediatamente antes del tracto de Ts, probablemente representando el extremo 3' maduro del rRNA 5S de *L. major*. En *T. brucei*, el extremo 3' maduro del rRNA 5S se mapeó en una posición similar¹⁵⁵. De manera interesante, se identificaron transcritos de los tres tipos de genes del rRNA 5S presentes en *L. major*, lo cual indica que al menos un gen agrupado dentro de los tipos A, B o C es transcrito en promastigotes en crecimiento exponencial.

El elemento de control interno (ECI) en los genes del rRNA 5S en *X. laevis* y *S. cerevisiae* consiste de una caja A, un EI y una caja C^{156,157}. Análisis de secuencia de los genes del rRNA 5S en *L. major* nos permitió identificar los tres elementos promotores homólogos putativos (Figura 19).

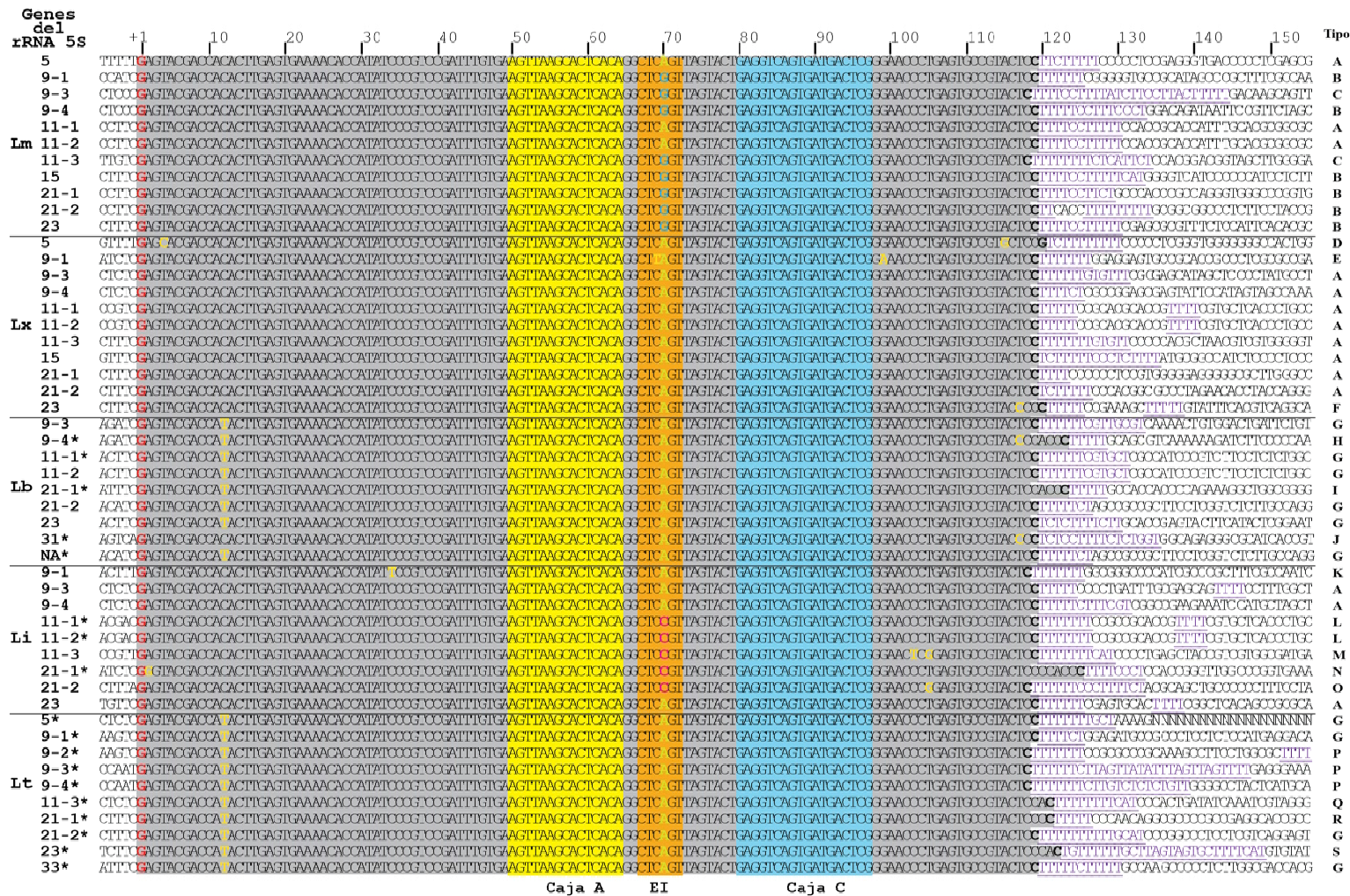


Figura 17. Alineamiento de secuencias de los genes del rRNA 5S presentes en *L. major* (Lm), *L. mexicana* (Lx), *L. braziliensis* (Lb), *L. infantum* (Li) y *L. tarentolae* (Lt). Los genes están sombreados en gris. La G mostrada en rojo (posición +1) corresponde al sitio de inicio de la transcripción mapeado por ensayos de 5'-RACE en *L. major*. La última base putativa de cada gen se muestra en negritas. En el extremo 3', el tracto de Ts se muestra en morado y subrayado. Las posiciones de la caja A, elemento intermedio (EI) y la caja C están indicadas. Los tipos de genes rRNA 5S están indicados (A-S).

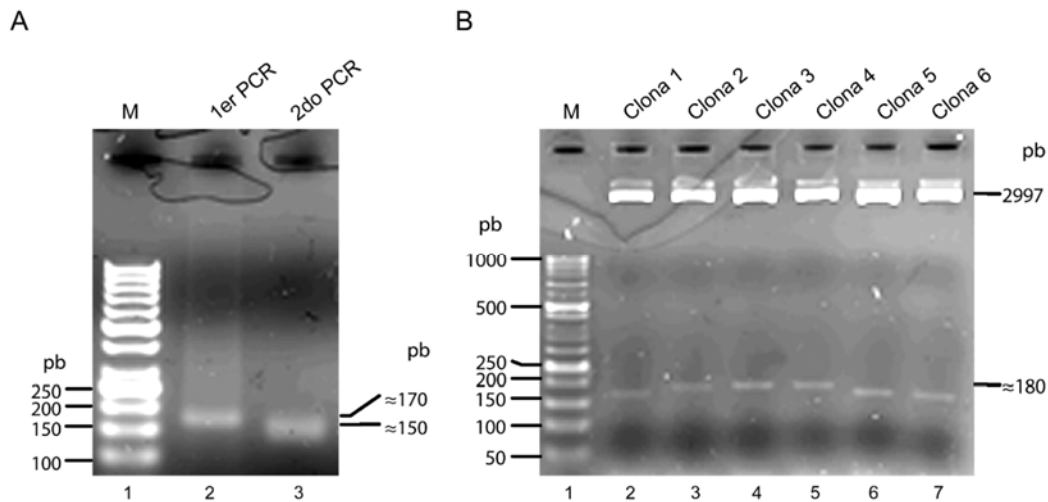


Figura 18. Ensayo RT-PCR con el rRNA 5S de *L. major*. A) Electroforesis de dos reacciones de PCR para determinar el sitio de término de la transcripción; el primer PCR utilizó los oligonucleótidos 5SrRNA-F1 y B1, mientras que el segundo utilizó a los oligonucleótidos 5SrRNA-F2 y B2. B) Caracterización de 6 clonas mediante digestión de DNA plasmídico con la endonucleasa *EcoRI*. Se observan los fragmentos liberados de ~180 pb y el vector pGEM-T easy de 3018 pb. Pb: Pares de bases. El marcador de peso molecular (M) corresponde a la escalera GeneRuler de 50 pb (Fermentas).

La caja A de *L. major*, localizada de las bases 50 a 64, es muy similar a la caja A de *S. cerevisiae*, ya que nueve de 15 nucleótidos están conservados; en cambio, sólo ocho bases se encuentran conservadas entre *L. major* y *X. laevis*.

Por otro lado, el EI de *L. major*, que se localizó en la posición 67 a 72, tiene mayor similitud con el EI de *X. laevis* que con el de *S. cerevisiae*: cuatro de seis nucleótidos se encuentran conservados entre *L. major* y *X. laevis*, mientras que dos bases se encuentran conservadas entre *L. major* y *S. cerevisiae*. El elemento promotor menos conservado fue la caja C, localizada de la base 80 a la 97, ya que sólo siete de 18 bases se encuentran conservadas entre *L. major* y *X. laevis*, y sólo dos bases se encuentran conservadas entre *L. major* y *S. cerevisiae* (Figura 19). Notablemente, la base +70, que es el nucleótido interno que varía entre los genes del rRNA 5S, se encuentra dentro del EI (Figura 19). De tal forma, es posible que la presencia de un cambio dentro del EI en los genes del rRNA 5S promueva una regulación diferencial de Pol III en *L. major*.

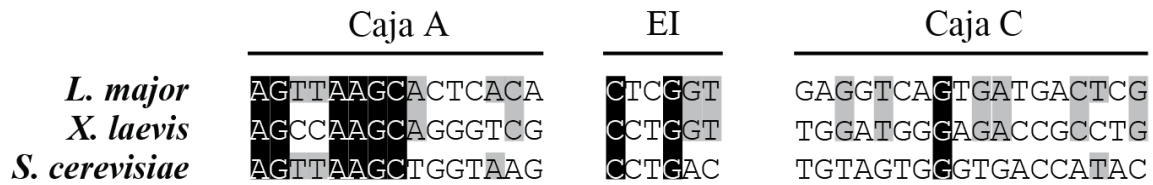


Figura 19. Alineamiento de secuencia de los elementos de control interno putativos (caja A, Elemento intermedio y caja C) en *L. major*, *X. laevis* y *S. cerevisiae*. Los nucleótidos conservados en las tres especies se muestran sombreados en negro, mientras que los nucleótidos conservados entre *L. major* y *X. laevis* o *S. cerevisiae* están sombreados en gris.

6.2 Sintenia de los genes del rRNA 5S en especies de *Leishmania*

Para determinar el número de genes del rRNA 5S en otras especies de *Leishmania*, analizamos las bases de datos del genoma de *L. mexicana* U1103, *L. braziliensis* M2904, *L. infantum* JPCM5 y *L. tarentolae* Parrot-TarII¹⁵⁸⁻¹⁶¹. Once genes del rRNA 5S están anotados en *L. mexicana*, 7 genes en *L. infantum*, y sólo seis genes in *L. braziliensis*. En *L. tarentolae* ningún gen del rRNA 5S esta anotado. Sin embargo, análisis tipo BLAST en las bases de datos de los diferentes genomas nos permitió la identificación de genes del rRNA 5S en *L. tarentolae*, así como genes adicionales o pseudogenes en otras especies (Figura 20).

La comparación de secuencias mostró que los genes del rRNA 5S se encuentran conservados en las diferentes especies de *Leishmania* (Figura 17 y Figura 21). Ya que la G en la posición +1 se encuentra presente en todos los genes, consideramos esta base como el primer nucleótido para todos ellos. La última base de cada gen del rRNA 5S se estableció como el nucleótido localizado justo antes del tracto de Ts. Con estos parámetros, encontramos que la longitud de los genes fluctuó de 108 a 125 bases. Comparando con los genes de *L. major*, existen tres genes que tienen nucleótidos adicionales inmediatamente antes del tracto de Ts, con una longitud de 123 a 125 pb (gen 1 localizado en el cromosoma 21 en *L. braziliensis* y *L. infantum*; y el gen 4 localizado en el cromosoma 9 de *L. braziliensis*). Sin embargo, cinco de los genes anotados parecen corresponder a pseudogenes, ya que carecen de partes del ECI y/o presentan cambios a lo largo de la secuencia (Figura 22): el gen localizado en el cromosoma 5 en *L. infantum* (108 pb), el gen 1 en el cromosoma 9 (110 pb) y el gen anotado en el cromosoma 15 en *L. braziliensis* (111 pb). Dos pseudogenes putativos adicionales, que presentan varios cambios a todo lo largo de la secuencia (incluyendo algunas sustituciones

dentro del ECI) se localizaron en el genoma de *L. braziliensis*: el del cromosoma 5 (126 pb) y el gen 3 en el cromosoma 11 (119 pb). De esta manera, nuestro análisis indica que el número de genes auténticos del rRNA 5S es de: 11 genes en *L. major* y *L. mexicana*, 10 genes en *L. tarentolae* y nueve en *L. braziliensis* y en *L. infantum*.

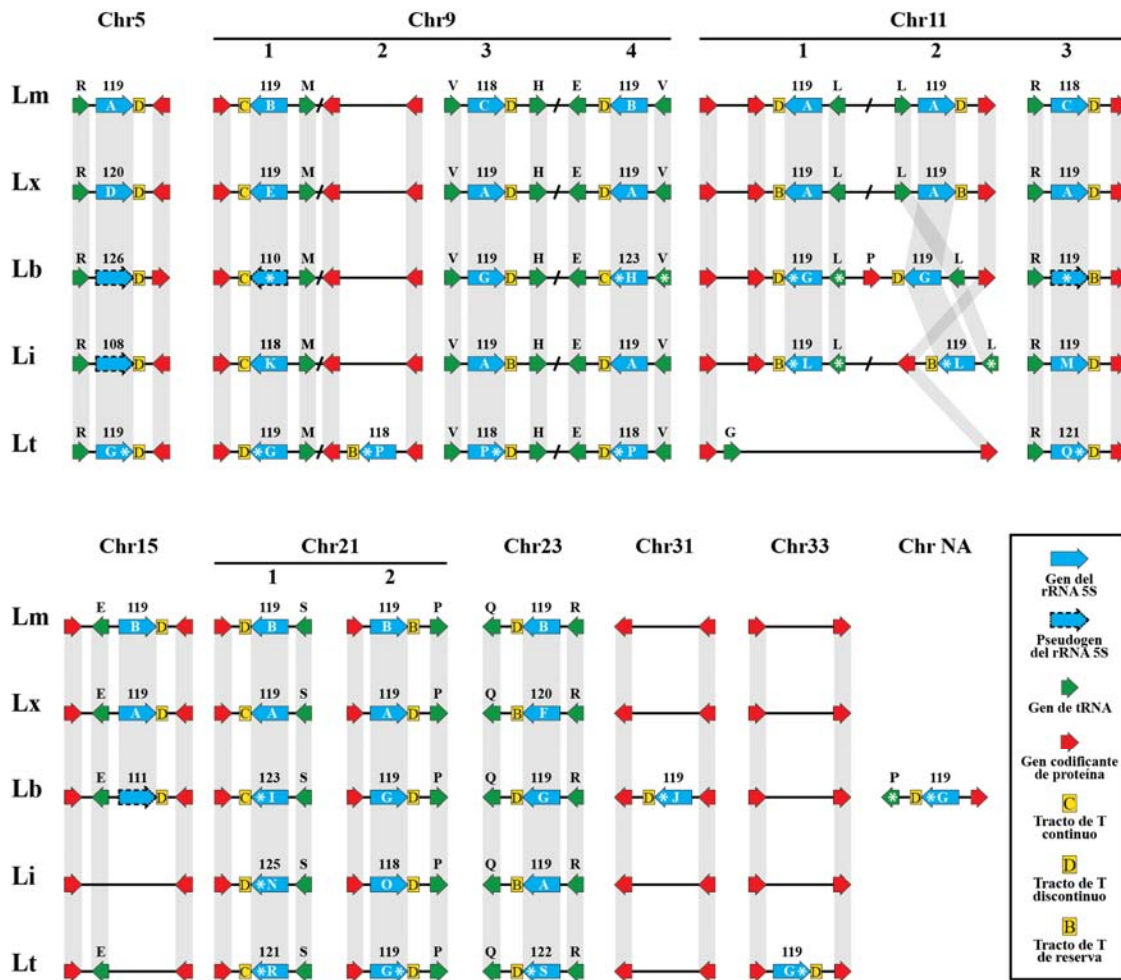


Figura 20. Sintenia de los genes rRNA 5S en diferentes especies de *Leishmania*. El contexto genómico de los genes del rRNA 5S se presenta para *L. major* (Lm), *L. mexicana* (Lx), *L. braziliensis* (Lb), *L. infantum* (Li) y *L. tarentolae* (Lt). Los genes ortólogos están unidos por líneas grises. La localización del cromosoma está indicada arriba de cada mapa sinténico, excepto por el gen del rRNA 5S en Lb cuya localización cromosómica no ha sido asignada aún (Chr NA). El número arriba de cada gen del rRNA 5S muestra la longitud del gen en pares de bases. El tipo de gen del rRNA 5S (A-S) está indicado dentro de cada flecha azul. Los pseudogenes del rRNA 5S se muestran como flechas azules bordeadas por líneas punteadas. El tipo de trectos de T en el extremo 3' en cada gen del rRNA 5S está indicado: tracto de T continuo (C), tracto de T discontinuo (D), tracto de T de reserva (B). Para los genes de tRNA (flechas verdes), el aminoácido correspondiente está indicado (R=Arg, M=Met, V=Val, H=His, E=Glu, L=Leu, S=Ser, P=Pro, G=Gly y Q=Gln). Los genes codificantes de proteína se muestran como flechas rojas. Los genes que no están anotados en la base de datos de TriTrypDB están marcados con un asterisco (*). La figura no está a escala.

En general, la secuencia de los genes del rRNA 5S en *Leishmania* está altamente conservada (Figura 17). La mayoría de las sustituciones de nucleótidos se presentan en sólo uno o dos genes. Por ejemplo, una sustitución de una T por una C se presenta en la posición +4 en el gen del rRNA 5S localizado en el cromosoma 5 de *L. mexicana*. También, un cambio de C por T se observa en la posición +34 en el gen 1 del cromosoma 9 en *L. infantum*. En la posición +12, una sustitución de una A por una C se presenta en ocho genes del rRNA 5S en *L. braziliensis*. De manera interesante, la posición más variable es el nucleótido +70, el cual se localiza en el EI. Como se mencionó antes, en *L. major* puede ser una G o una A. En *L. mexicana*, *L. braziliensis* y *L. tarentolae* el nucleótido +70 siempre es una A, mientras que en *L. infantum* es una C en 5 genes y una A en 4 genes (Figura 17).

El orden de los genes del rRNA 5S se encuentra altamente conservado entre *L. major* y *L. mexicana*, ya que están flanqueados por genes sinténicos codificantes de proteína y genes de tRNA (Figura 20). En *L. infantum* el orden también es conservado, pero no contiene el gen localizado en el cromosoma 15 en otras especies. La mayoría de los genes del rRNA 5S en *L. braziliensis* muestra sintenia con las otras especies de *Leishmania*. Sin embargo, *L. braziliensis* tiene dos genes del rRNA 5S que no se encuentran presentes en otras especies de *Leishmania*: uno localizado en el cromosoma 31 y otro cuya localización cromosómica no se ha determinado aún (Figura 20). *L. tarentolae* no contiene los genes 1 y 2 del cromosoma 11 y el gen del cromosoma 15, pero posee genes adicionales en el cromosoma nueve (gen 2) y el cromosoma 33. Al igual que en *L. major*, todos los genes del rRNA 5S, excepto por el gen 2 del cromosoma 21, contienen un gen de tRNA en su extremo 5' en *L. mexicana* y *L. infantum*. Es importante mencionar que varios genes de tRNA no anotados se identificaron en este loci con el servidor tRNAscan-SE (marcados con asterisco en la Figura 20). En *L. braziliensis* hay tres genes que no son precedidos por un gen de tRNA (gen 2 del cromosoma 21, el gen del cromosoma 31 y el gen con la localización cromosómica desconocida). Notablemente, el gen del rRNA 5S encontrado en el cromosoma 31 en *L. braziliensis* es el único que no contiene un gen de tRNA ni en su extremo 5' ni en el 3'.

genes del rRNA 5S	ID TriTrypDB	Longitud	Cadena	Posición	Tipo de terminación	Longitud del primer tracto de Ts	Longitud del segundo tracto de Ts	Distancia entre el 1er y 2do tracto de Ts
5	LmjF.05.5SrRNA.01	119	+	360083..360201	D	8	-	-
9-1	LmjF.09.5SrRNA.03	119	-	277005..276887	C	6	-	-
9-3	LmjF.09.5SrRNA.02	118	+	405671..405788	D	27	-	-
9-4	LmjF.09.5SrRNA.01	119	-	418738..418620	D	14	-	-
11-1	LmjF.11.5SrRNA.01	119	-	156905..156787	D	11	-	-
Lm 11-2	LmjF.11.5SrRNA.02	119	+	163008..163126	D	11	-	-
11-3	LmjF.11.5SrRNA.03	118	+	381623..381740	D	16	-	-
15	LmjF.15.5SrRNA.01	119	+	323210..323328	D	14	-	-
21-1	LmjF.21.5SrRNA.01	119	-	166286..166168	D	10	-	-
21-2	LmjF.21.5SrRNA.02	119	+	448851..448969	B	2	Avg: 9	4
23	LmjF.23.5SrRNA.01	119	-	225680..225562	D	11	11.8	-
5	LmxM.05:rRNA:rfamsca:361991-362109	120	+	361991..362110	D	10	-	-
9-1	LmxM.09:rRNA:rfamsca:251967-252085	119	-	252085..251967	C	7	-	-
9-3	LmxM.09:rRNA:rfamsca:380921-381039	119	+	380921..381039	D	12	-	-
9-4	LmxM.09:rRNA:rfamsca:391554-391672	119	-	391672..391554	D	6	-	-
11-1	LmxM.11:rRNA:rfamsca:157979-158097	119	-	158097..157979	B	5	4	12
Lx 11-2	LmxM.11:rRNA:rfamsca:163755-163873	119	+	163755..163873	B	5	4	12
11-3	LmxM.11:rRNA:rfamsca:361629-361747	119	+	361629..361747	D	12	-	-
15	LmxM.15:rRNA:rfamsca:288997-289115	119	+	288997..289115	D	16	-	-
21-1	LmxM.21:rRNA:rfamsca:156060-156178	119	-	156178..156060	C	4	-	-
21-2	LmxM.21:rRNA:rfamsca:430811-430929	119	+	430811..430929	D	7	Avg: -	-
23	LmxM.23:rRNA:rfamsca:217667-217785	120	-	217785..217666	H	5	8.09	5
9-3	LbrM.09:rRNA1	119	+	395413..395531	D	14	-	-
9-4*	*	123	-	403745..403623	C	5	-	-
11-1*	*	119	-	63370..63252	D	12	-	-
11-2	LbrM.11:rRNA1	119	-	68610..68492	D	12	-	-
Lb 21-1*	*	123	-	159391..159269	C	5	-	-
21-2	LbrM.21:rRNA1	119	+	430680..430798	D	7	-	-
23	LbrM.23:rRNA1	119	-	215667..215549	D	11	-	-
31*	*	119	-	965247..965129	D	16	Avg: -	-
NA*	*	119	-	607851..607733	D	7	9.88	-
9-1	LinJ.09:rRNA1	118	-	266769..266652	C	7	-	-
9-3	LinJ.09:rRNA2	119	+	400163..400281	H	5	4	18
9-4	LinJ.09:rRNA3	119	-	413091..412973	D	12	-	-
11-1*	*	119	-	162781..162663	B	7	4	11
Li 11-2*	*	119	-	212062..211944	H	7	4	11
11-3	LinJ.11:rRNA1	119	+	371388..371506	D	10	-	-
21-1*	*	125	-	163366..163242	D	8	-	-
21-2	LinJ.21:rRNA1	118	+	445667..445784	D	15	Avg: -	-
NA* 23	LinJ.23:rRNA1	119	-	228303..228185	H	6	8.55	4
5	*	119	+	359812..359930	D	10	-	-
9-1	*	119	-	249842..249724	D	6	-	-
9-2	*	118	-	257062..256945	B	7	5	26
9-3	*	118	+	377890..378007	D	29	-	-
Lt 9-4	*	118	-	390508..390391	D	21	-	-
11-3	*	121	+	390508..390391	D	11	-	-
21-1	*	121	-	167666..167546	C	5	-	-
21-2	*	119	+	442984..443102	D	14	-	-
23	*	122	-	213231..213110	D	27	Avg: -	-
33	*	119	+	649716..649834	D	11	14.1	-

Figura 21. Características de los genes del rRNA 5S y señales de término de la transcripción en *Leishmania*. Los tipos de terminación están clasificados como: tracto de Ts continuo (C), tracto de Ts discontinuo (D) o tracto con reserva (B). Todas las distancias y longitudes están indicadas en pares de bases. Los genes que se identificaron en este trabajo y que no tienen un nombre en TriTrypDB, están marcados con asterisco.

Todos los genes del rRNA 5S en diferentes especies de *Leishmania* contienen un tracto de varias Ts en su extremo 3' (Figura 17 y Figura 21). La mayoría de los genes tienen trectos de Ts discontinuos que están interrumpidos por hasta cuatro nucleótidos, que predominantemente son Cs. De forma similar a *L. major*, sólo el gen 1 del cromosoma 9 posee un tracto de T continuo en *L. infantum*. Sin embargo, dos genes contienen un tracto continuo de Ts en *L. mexicana* y en *L. braziliensis*. Curiosamente, cuatro genes del rRNA 5S en *L. infantum* tienen un tracto de Ts de reserva.

Un total de 19 tipos diferentes (A-S) de genes del rRNA 5S se encuentra presente en las cinco especies de *Leishmania* analizadas (mostrando de 3 a 6 tipos por especie (Figura 23). El tipo A es el tipo más extendido, siendo representado por ocho genes en *L. mexicana*, 3 genes en *L. major* y cuatro genes en *L. infantum*. El tipo G corresponde a seis genes *L. braziliensis* y cuatro genes en *L. tarentolae*. La mayoría de los otros tipos está representada por un solo gen del rRNA 5S.

La predicción de la estructura secundaria consenso del rRNA 5S en *Leishmania* mostró que consiste de cinco hélices (I-V), dos asas tipo horquilla (C y D), dos asas internas (B y E) y una región bisagra (A) a la cual se le unen tres hélices (Figura 24), como se ha reportado en otros organismos⁸⁴. El nucleótido +70, que varía en diferentes especies de *Leishmania*, se posiciona en la hélice V y se aparea con el nucleótido +105. Es interesante notar que dos genes en *L. infantum* que poseen una C en el nucleótido +70 contienen una G en la posición +105, permitiendo así que se mantenga la complementariedad de bases. La posición +12 también es variable, pero se localiza en el asa A.

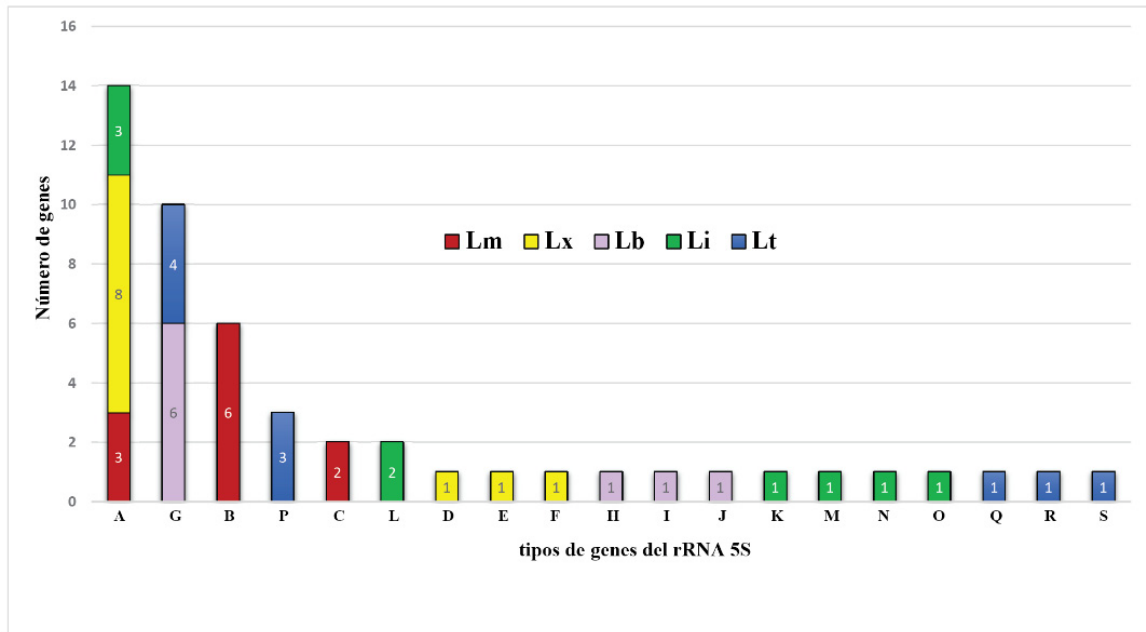


Figura 23. Frecuencia de los diferentes tipos de genes del rRNA 5S en diferentes especies de *Leishmania*. En colores se distinguen las diferentes especies. Las letras A-S muestran los diferentes tipos de genes del rRNA 5S.

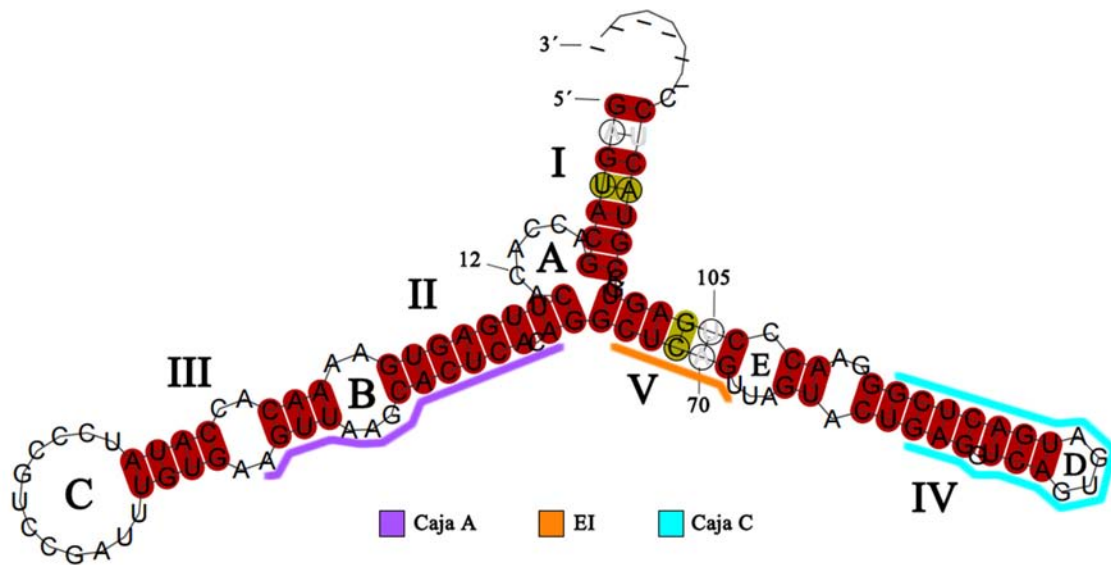


Figura 24. Predicción de la estructura secundaria consenso del rRNA 5S en *Leishmania*. Las cinco hélices (I-V) y cinco asas (A-E) están indicadas. La posición de los elementos de control interno (Caja A, EI y Caja C) también se muestra. Las posiciones variables (+12+70 y +105) se indican.

6.3 Expresión del rRNA 5S antisentido y del rRNA 5S

Se ha reportado que *Leishmania* y *T. brucei* producen RNAs antisentido complementarios al rRNA 18S, 5.8S y 28S. Aunque no se sabe su función, se asocian con poliribosomas, y el programa de muerte celular tipo apoptosis activa su fragmentación ¹⁶². También, los cloroplastos de *Arabidopsis thaliana* y otras plantas producen un RNA 5S antisentido que inhiben el procesamiento y la maduración de precursores del rRNA 5S ¹⁶³. Para explorar si se generan transcritos antisentido en *L. major*, se realizaron ensayos *Northern blot* con oligonucleótidos cadena-específicos. Curiosamente, mientras que se observó un rRNA 5S abundante del tamaño esperado (~120 bases), no se detectó un rRNA 5S antisentido (Figura 25). Es así que a diferencia de otras moléculas de rRNA en *Leishmania* y rRNA 5S en cloroplastos, no se detectaron RNAs antisentido complementarios al rRNA 5S en *L. major*.

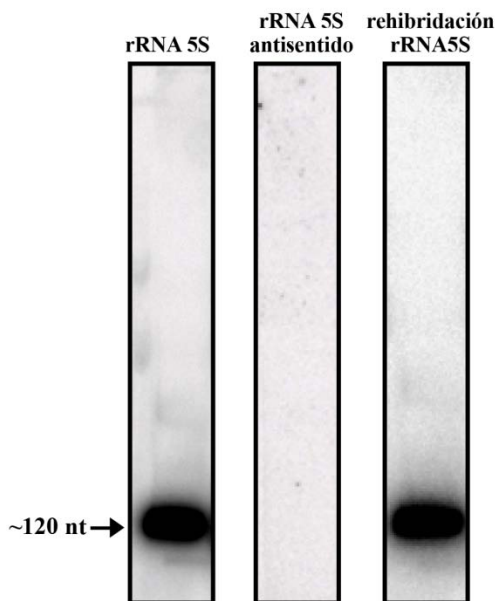


Figura 25. En *L. major* no se produce un rRNA 5S antisentido. RNA total de promastigotes de *L. major* se analizó por *Northern blot* con sondas específicas para detectar al rRNA 5S (imagen de la izquierda) o rRNA 5S antisentido (imagen de en medio). La re-hibridización de la membrana de en medio con la sonda para detectar al rRNA 5S mostró la banda específica de ~120 bases, revelando la integridad del RNA (imagen de la derecha).

6.4 Generación de vectores

Con la finalidad de clonar un fragmento de DNA que contuviera secuencias del gen del rRNA 5S de *L. major* para utilizarlo en diferentes experimentos (RNA-FISH, Southwestern, DNA-pull-down); se amplificó por PCR el gen completo del rRNA 5S, a partir de DNA genómico, con los oligonucleótidos 5SrRNA-F1 y 5SrRNA-R1 (Figura 26A).

Este producto de PCR (118 pb) se clonó en el vector pGEM-T easy. Se analizó un total de 10 clonas mediante restricción con la endonucleasa *EcoRI*, cuyos sitios de corte flanquean al sitio de clonación en el vector. En la Figura 26B se muestra la digestión de cinco clonas, observándose en todos los casos la liberación del fragmento esperado de 138 pb (que contiene al rRNA 5S y las secuencias flanqueantes del vector). La clona 5 fue enviada a secuenciar, revelando que el gen del rRNA 5S fue clonado en orientación sentido con respecto al promotor T7. El plásmido generado se llamó p5SrRNA. La secuenciación de las clonas 1 a 4 indicó que en éstas el gen del rRNA 5S está en orientación antisentido con respecto al promotor T7; a este plásmido se le llamo p5SrRNA-rev (Figura 27A y B).

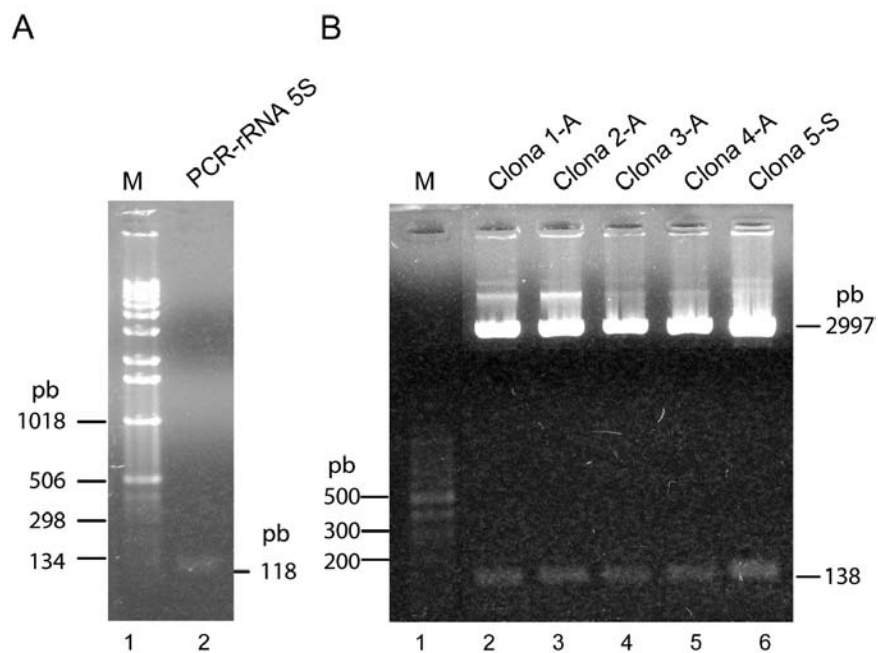


Figura 26. Generación de los plásmidos p5SrRNA y p5SrRNA-rev. A) Amplificación por PCR del gen del rRNA 5S de *L. major* a partir de DNA genómico. B) Caracterización de 5 clonas mediante digestión de DNA plasmídico con la endonucleasa *EcoRI*. Se observan los insertos de 138 pb y el vector de 2997 pb. Las clonas 1 a la 4 tienen al gen del rRNA 5S en orientación antisentido con respecto al promotor T7 (p5SrRNA-rev). La clona 5 tiene al 5S rRNA en dirección sentido con respecto al promotor T7 (p5SrRNA). M; marcador de 1 kb (Invitrogen).

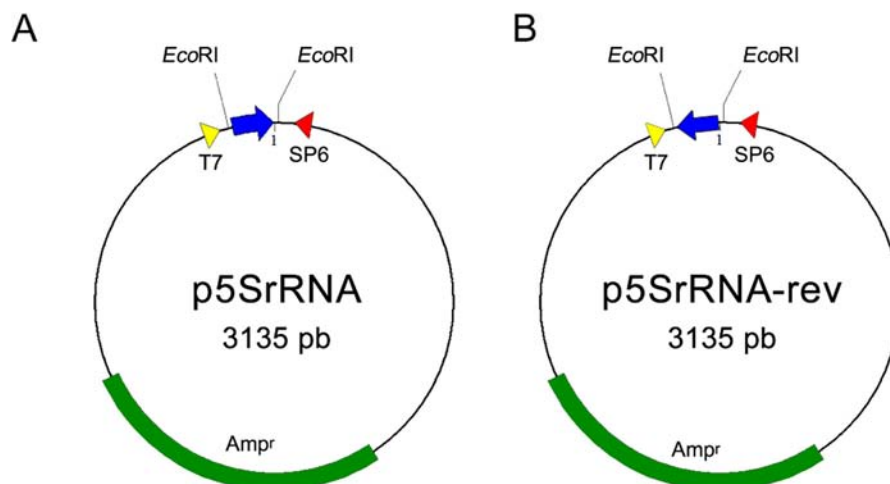


Figura 27. Mapa de los plásmidos p5SrRNA y p5SrRNA-rev. Los plásmidos tienen al gen del rRNA 5S (mostrado en azul) en dirección sentido (A) o antisentido (B) con respecto al promotor T7.

También fue clonado en pGEM-T easy un fragmento de 344 pb del gen del rRNA 5S de *L. major* del cromosoma 15 (*LmjF.15.5SrRNA.01*). Dicho fragmento, que además del gen del rRNA 5S contiene sus secuencias flanqueantes, fue amplificado por PCR con los oligonucleótidos Lm15-rRNA5S 5' y Lm15-rRNA5S 3' (Figura 28A, carril 2). El producto de PCR fue ligado al vector pGEMT easy (Figura 28B, carril 2), generando así el plásmido p5SrRNA344 (Figura 28C).

Además, para usarse como control negativo (sonda no relacionada) en los ensayos de Southwestern, fue clonado un fragmento de 120 pb del gen *LmjF.06.0200*, que codifica para una proteína hipotética. El fragmento fue amplificado por PCR con los oligonucleótidos Lm06.0200-5' y Lm 06-0200-región-3' (Figura 29A, carril 2) para posteriormente ser clonado en pGEM-T easy (Figura 29B, carril 2), obteniendo así el vector pRegionE (Figura 29C).

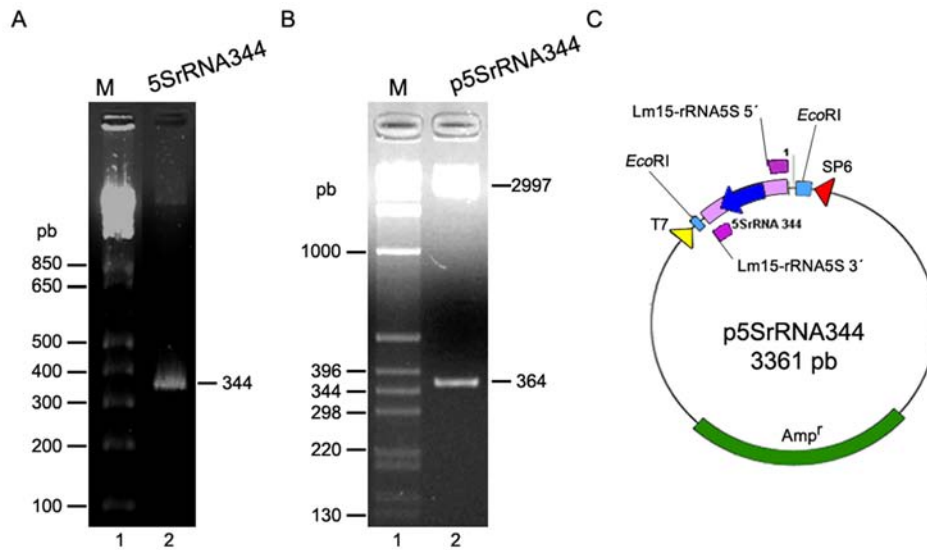


Figura 28. Generación del plásmido p5SrRNA344. A) Amplificación por PCR del fragmento que contiene al gen del rRNA 5S y secuencias flanqueantes en 5' y 3' de *L. major* a partir de DNA genómico. B) Caracterización del plásmido mediante digestión con la endonucleasa *EcoRI*. Se observan los insertos de 364 pb y el vector de 2997 pb. C) Mapa del plásmido p5SrRNA344 mostrando los sitios de corte de *EcoRI* y los oligonucleótidos usados en el PCR. M; marcador de 1 kb (Invitrogen).

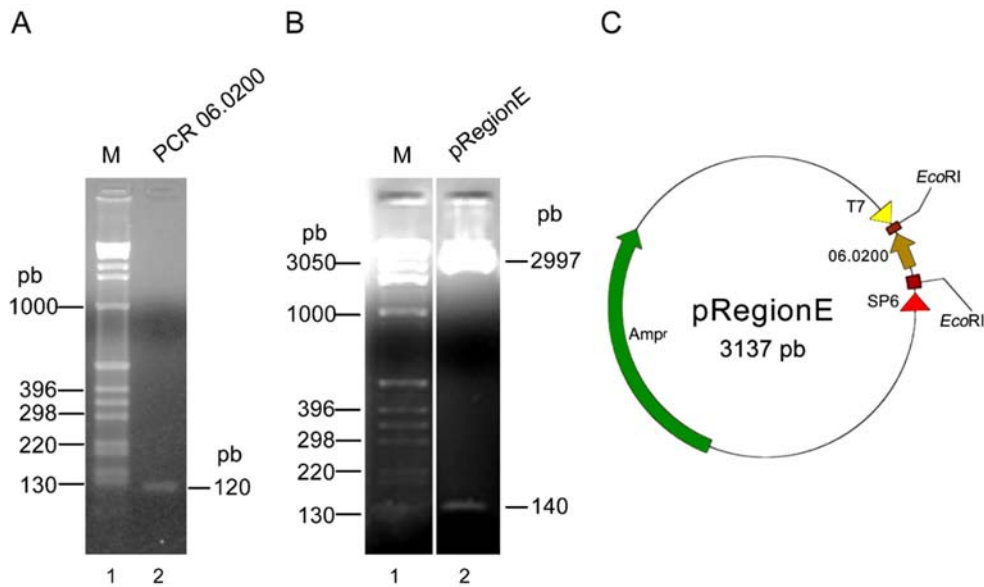


Figura 29. Generación del plásmido p06.0200. A) Amplificación por PCR del fragmento que contiene a un fragmento del gen 06.0200 de *L. major* a partir de DNA genómico. B) Caracterización del plásmido mediante digestión con la endonucleasa *EcoRI*. Se observan los insertos de 140 pb y el vector de 2997 pb. C) Mapa del plásmido pRegionE mostrando los sitios de corte de *EcoRI*. M; marcador de 1 kb (Invitrogen).

Adicionalmente, para teñir el nucléolo en los ensayos de inmunofluorescencia (ver más adelante), fue generado el vector pElp3-PTP, en el que el gen de la proteína nucleolar Elp3b fue fusionado a la bandera PTP. Esta bandera consta de un epítipo de la proteína C (ProtC) y un dominio de unión a la proteína A de *Staphylococcus aureus* (ProtA), separados por un sitio de corte de la proteasa TEV (Figura 30A) (Schimanski *et al.*, 2005). Para generar el vector pElp3b-PTP, el gen de RPB6 (ABC23) presente en el vector pB6-PTP (Vélez Ramírez, 2009) se liberó digiriendo con *XmaI* y *XbaI*; posteriormente el cuerpo del vector de 6668 pb se purificó (Figura 30B y C). Después se ligó el cuerpo del vector de pB6-PTP (sin RPB) con el gen de Elp3b, el cual fue amplificado por PCR con los oligonucleótidos Elp3-AgeI-5' y ELP3-XbaI-3' a partir del plásmido pElp3 (Figura 30B y D). El plásmido pElp3 se creó amplificando a partir de DNA genómico al gen Elp3b con los oligonucleótidos Elp3-AgeI-5' y Elp3-XbaI-3' para posteriormente ser clonado en pGEM-T easy. El plásmido pElp3-PTP fue caracterizado mediante digestión con la enzima *XhoI*, la cual corta al plásmido en 4 fragmentos (Figura 30B y E), y mediante secuenciación. Finalmente el plásmido fue electroporado en promastigotes de *L. major*. Las células que incorporaron el plásmido fueron seleccionadas con la droga G418, se obtuvieron clones celulares y se realizaron ensayos tipo *Western-blot* empleando el anticuerpo PAP que reconoció al epítipo de ProtA, confirmando así la obtención de la línea celular Elp3-PTP (Figura 30F).

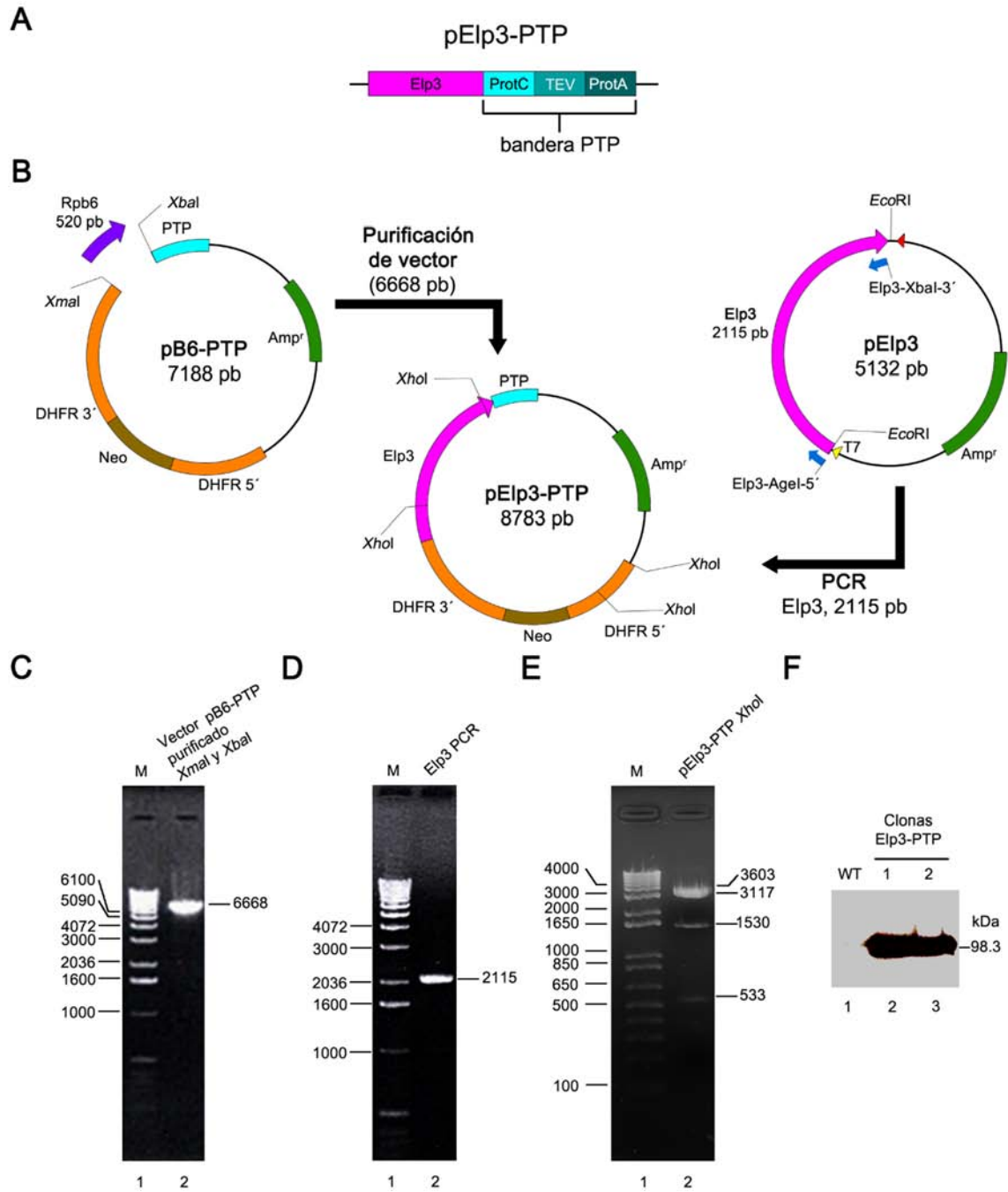


Figura 30. Obtención del vector pElp3b-PTP. A) El vector pElp3-PTP contiene al gen Elp3 fusionado a la bandera PTP, que consta de dominios de ProtC, TEV y ProtA. B) El plásmido pElp3b-PTP se creó ligando el vector pB6-PTP (sin Rpb6) con el producto de PCR del gen de Elp3b amplificado a partir del plásmido pElp3. C) vector pB6-PTP purificado con *XmaI* y *XbaI*. D) producto de PCR que contiene al gen de Elp3b. E) Caracterización del plásmido pElp3-PTP digiriendo con *XhoI*. M; Marcador de peso molecular 1 kb (invitrogen). F) *Western-blot* con el anticuerpo PAP que reconoce al epítipo ProtA de la proteína recombinante Elp3b-PTP.

6.5 Localización celular de los genes del rRNA 5S

Para investigar la distribución nuclear de los genes del rRNA 5S en promastigotes de *L. major*, se realizaron ensayos FISH con una sonda de DNA de doble cadena que se biotiniló con el kit de biotin-High Prime. Esta sonda correspondió al fragmento de 344 pb del vector p5SrRNA344, que contiene al gen del rRNA 5S y secuencias flanqueantes. El fragmento se amplificó por PCR usando como templado el plásmido p5SrRNA344 con los oligonucleótidos Lm15-rRNA5S 5' y Lm15-rRNA5S 3' (Figura 28C y Figura 31 carril 3). Además se sintetizó una sonda control (840 pb) que contiene un fragmento del gen del rRNA 18S (del cromosoma 27) a partir de PCR utilizando como templado DNA genómico y los oligonucleótidos rRNA A-5' y B-18S-R (Figura 31 carril 2). Estas sondas se marcaron a todo lo largo del DNA con biotina con el kit de Biotin High Prime (Roche).

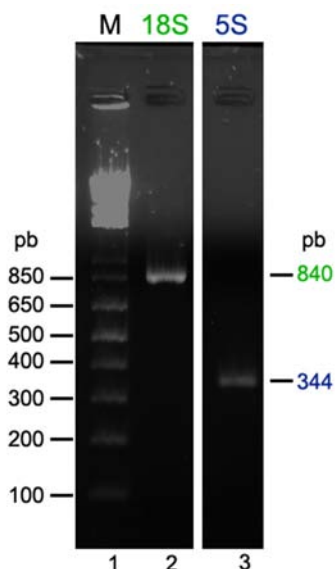


Figura 31. Sonda para ensayos DNA-FISH en *L. major*. Electroforesis en gel de agarosa de los fragmentos 18SrRNA (840 pb) y 5SrRNA344 (344 pb) utilizados como sondas (marcados con biotina) para los ensayos DNA-FISH.

Después del proceso de hibridación y lavado de las células, las sondas se incubaron con estreptavidina conjugada con Alexa Fluor 568. La sonda de 344 pb claramente detectó varios puntos brillantes de los genes del rRNA 5S localizados en la periferia nuclear o dispersos por todo el núcleo (teñido con DAPI) (Figura 32A).

Para determinar la localización de los genes del rRNA 5S con respecto al nucléolo, se trabajó con la línea celular de *L. major* que expresa una versión de la proteína nucleolar Elp3b¹⁶⁴ fusionada a la bandera PTP.

Experimentos de FISH conjugados con inmunofluorescencias indirectas fueron realizados con esta línea celular. Los experimentos mostraron que en la mayoría de las células los genes del rRNA 5S se encuentran dispersos en el núcleo, o localizados en la periferia nuclear, pero no asociados con el nucléolo (Figura 32B). En contraste, como se esperaba se observó colocalización nucleolar de los genes del rRNA 18S con Elp3b (Figura 32C). También se utilizaron controles con tratamientos con DNAsa y RNAsa para confirmar la unión específica de la sonda de DNA. Como se esperaba, después de tratamiento con DNAsa la señal del gen del rRNA 5S se eliminó (al igual que la señal con DAPI), pero después del tratamiento con RNAsa los puntos fluorescentes se siguieron detectando. Entonces, estos resultados demostraron que los genes del rRNA 5S presentes en *L. major* se encuentran principalmente distribuidos en la periferia nuclear, no asociados con el nucléolo.

En *T. cruzi*, los genes del rRNA 5S se encuentran organizados en arreglos en tándem en dos cromosomas diferentes⁶⁵. Para determinar la distribución nuclear de estos genes en epimastigotes, realizamos experimentos FISH con una sonda dsDNA marcada con biotina. De manera similar a *L. major*, varios puntos brillantes se distribuyeron en el núcleo (Figura 33). Para analizar la localización de los genes del rRNA 5S con respecto al nucléolo, experimentos RNA FISH conjugados con inmunofluorescencia indirecta se realizaron con un anticuerpo dirigido contra la proteína nucleolar Nop56. Como se muestra en la Figura 33B, los genes del rRNA 5S en epimastigotes de *T. cruzi* no parecen asociarse al nucléolo. Entonces, nuestros resultados indican que los genes del rRNA 5S en tripanosomátidos no se encuentran asociados con el nucléolo, independientemente de si éstos se encuentran dispersos en el genoma (como en *L. major*) o en arreglos en tándem (como en *T. cruzi*).

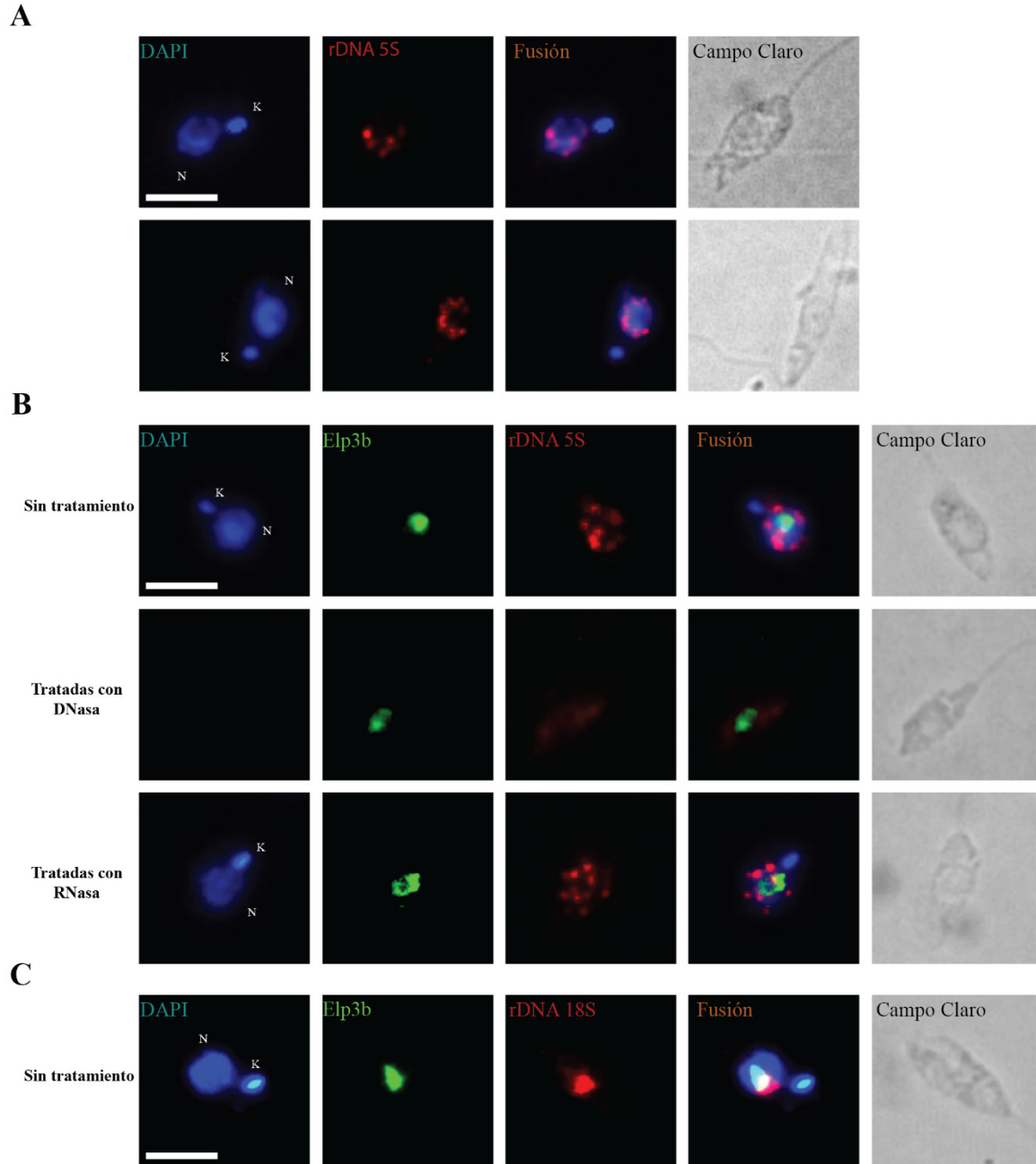


Figura 32. Los genes de *L. major* se localizan en la periferia nuclear. **A)** Experimento DNA-FISH usando la sonda del gen del rRNA 5S (rojo). Núcleo (N) y cinetoplasto (K) fueron teñidos con DAPI (azul). Se muestran las células de dos experimentos independientes. **B)** DNA-FISH acoplado con inmunofluorescencia usando la sonda de DNA del rRNA 5S (rojo), y el anticuerpo anti-proteína C para detectar a proteína nucleolar Elp3b fusionada a la bandera PTP (verde). Los tratamientos control con DNasa y RNasa también se muestran. **C)** DNA-FISH acoplado a inmunofluorescencia usando la sonda de gen del rRNA 18S (rojo), y el anticuerpo anti-proteína C para detectar la proteína recombinante Elp3b-PTP (verde). Las barras de tamaño representan 2 μ m.

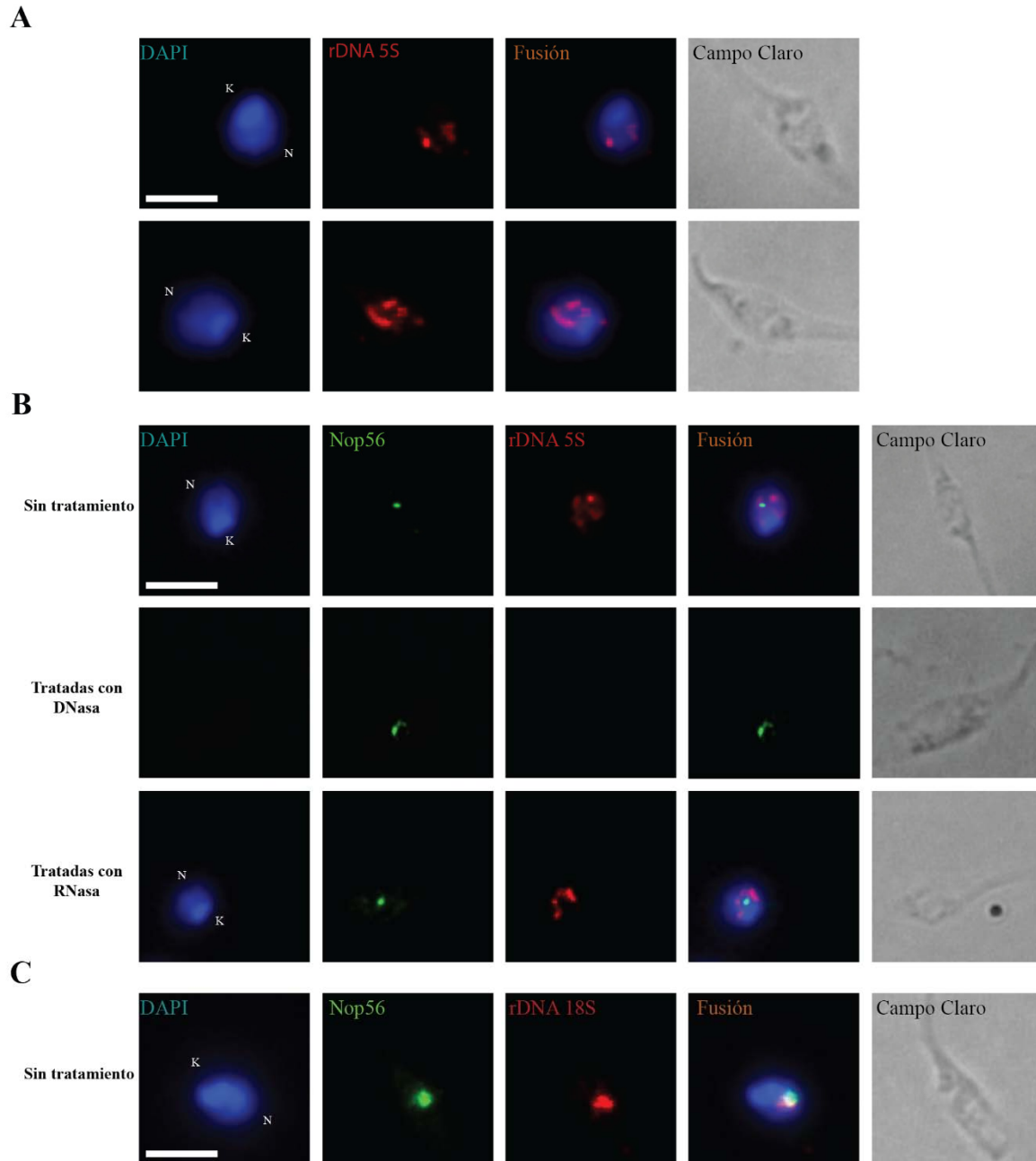


Figura 33. Los genes del rRNA 5S en *T. cruzi* se encuentran dispersos en el núcleo. A) Experimentos DNA-FISH usando una sonda contra el rRNA 5S (rojo). Núcleo (N) y Cinetoplasto (K) se tiñeron con DAPI (azul). Se muestran las células de dos experimentos independientes. **B)** DNA-FISH acoplado a inmunofluorescencia usando una sonda para el gen del rRNA 5S (rojo) y un anticuerpo contra la proteína nucleolar Nop56 (verde). Se muestran los tratamientos control con DNasa y RNasa. **C)** DNA-FISH acoplado a inmunofluorescencia usando una sonda contra el gen del rRNA 18S (rojo) y un anticuerpo para detectar a Nop56 (verde). Las barras de tamaño representan 2 μ m.

6.6 Localización celular de los transcritos del rRNA 5S

La localización subcelular del rRNA 5S de *L. major* se determinó por experimentos RNA-FISH. En estos experimentos una ribsonda antisentido se transcribió *in vitro* con UTP marcado con biotina y se acopló con estreptavidina fluorescente para detectar los transcritos del rRNA 5S (Figura 34A).

Para sintetizar la sonda de RNA complementaria al rRNA 5S se usó el plásmido p5SrRNA-rev, que tiene al gen del rRNA 5S orientado en el sentido correcto para que el promotor T7 pudiera transcribir al RNA antisentido (Figura 27B y Figura 34A). Un fragmento de 196 pb amplificado por PCR con los oligonucleótidos T7 y 5SrRNA-F1 confirmó la correcta orientación del gen (Figura 34B). El fragmento amplificado por PCR fue purificado (Figura 34C, carril 2) y se utilizó como DNA templado para la reacción de transcripción *in vitro* que incorporó bio11-UTP. Posteriormente el DNA templado se degradó adicionando DNAsa. El RNA antisentido que se sintetizó tiene un tamaño de 177 nucleótidos, y presenta una ligera diferencia de tamaño, apenas perceptible, cuando se compara con un control de RNA antisentido del rRNA 5S sin biotinilar (Figura 34C carriles 3 y 4).

Después de la hibridación para detectar al rRNA 5S se observó una señal discreta en el núcleo, además de una fuerte fluorescencia dispersa por todo el citoplasma (Figura 35A). Los controles negativos que detectan al rRNA 5S antisentido y la sonda no relacionada no dieron señal como era de esperarse (Figura 35A). Al combinar el FISH con ensayos de inmunofluorescencia se demostró que el rRNA 5S y la señal de Elp3b colocalizan, demostrando que los transcritos del rRNA 5S están localizados en el nucléolo (Figura 35B). La señal observada en el citoplasma, que es más fuerte en zonas alrededor del núcleo, muy probablemente corresponda al rRNA 5S presente en los ribosomas que están distribuidos por todo el citoplasma. Como se esperaba, la señal del rRNA 5S no fue afectada en los experimentos control con células previamente tratadas con DNAsa. En contraste, con el tratamiento con RNAsa no se detectó señal, como era de esperarse (Figura 35B).

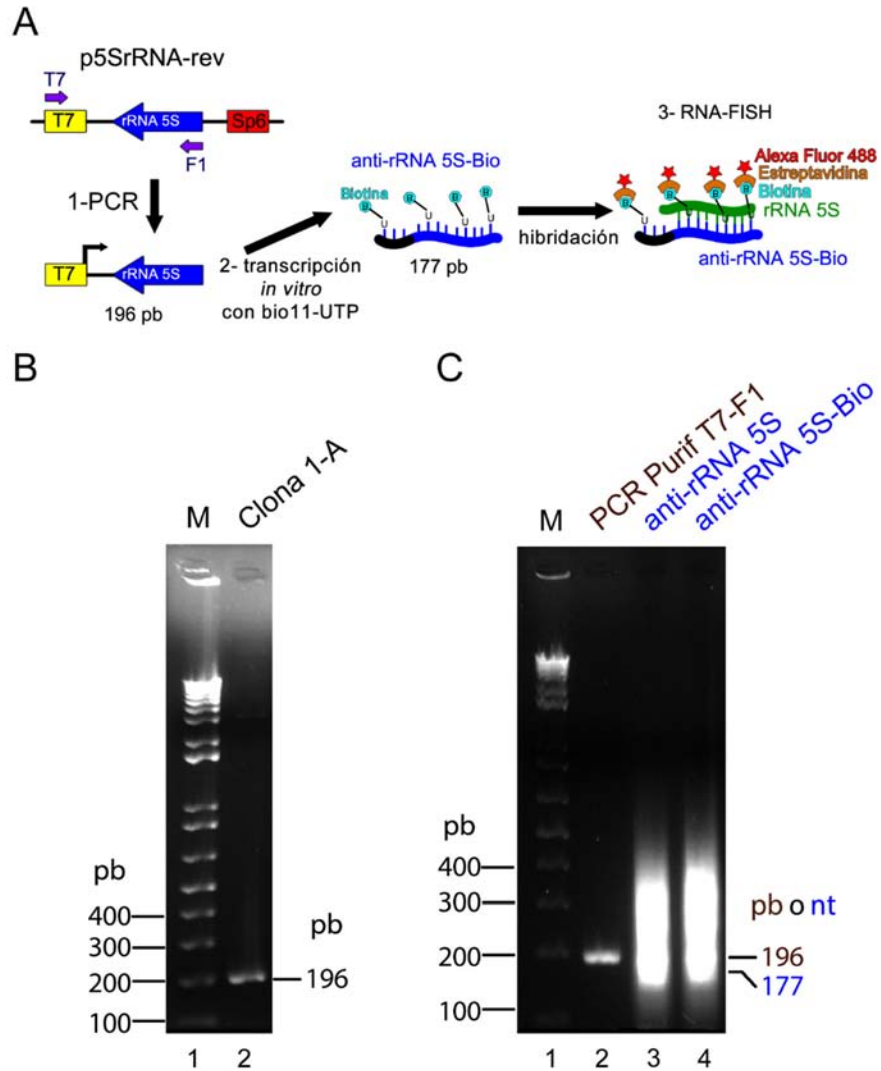


Figura 34. Preparación de sondas para el experimento RNA-FISH. A) Síntesis del DNA molde por PCR (1) para transcribir *in vitro* (2) al rRNA 5S antisentido biotinilado (anti-rRNA 5S-Bio); durante el RNA-FISH (3) la sonda anti-rRNA 5S-Bio hibridó con el rRNA 5S en las células; además se agregó estreptavidina acoplada a un fluoróforo (Alexa Fluor 488). B) Amplificación por PCR del gen del rRNA 5S (196 pb) para determinar el sentido del gen en 4 clones del plásmido p5SrRNA-rev. C) Los fragmentos amplificados por PCR que contienen al promotor T7 y al gen del rRNA 5S en dirección antisentido se purificaron (carril 2) y se utilizaron como DNA templado para la reacción de transcripción *in vitro*. Después de la reacción de transcripción *in vitro* el anti-rRNA 5S-Bio junto con un control anti-rRNA 5S sin biotinar se visualizaron en el carril 4 y 3, respectivamente. M; Marcador 1kb plus (Thermo Fisher Scientific).

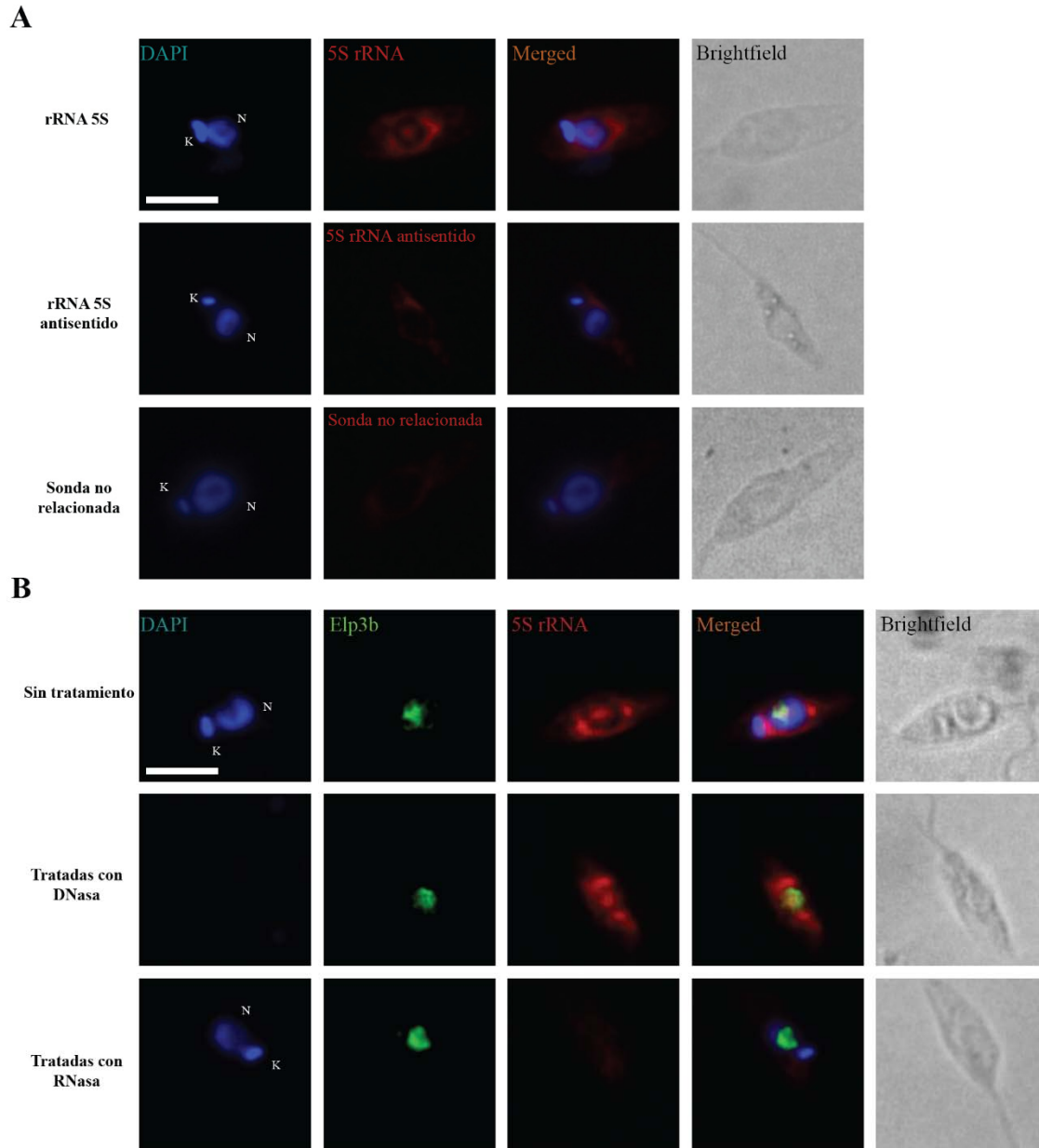


Figura 35. Los transcritos del rRNA 5S se localizan en el nucléolo y en el citoplasma. A) Ensayo RNA-FISH usando una sonda de RNA biotilada (rojo) complementaria al rRNA 5S. Núcleo (N) y cinetoplasto (K) fueron teñidos con DAPI (azul). **B)** RNA-FISH acoplado con inmunofluorescencias usando una sonda de RNA complementaria al rRNA 5S (rojo), y un anticuerpo anti-proteína C para detectar la versión PTP-tag de la proteína nucleolar Elp3b (verde). Los tratamientos control con DNasa y RNasa se muestran también. Las barras de tamaño representan 2 μ m.

6.7 Interacción *in vitro* de proteínas nucleares con el gen del rRNA 5S en *L. major*

Para investigar la presencia de las proteínas que se unan a los genes del rRNA 5S en *L. major*, se realizaron ensayos *Southwestern* con la sonda del gen del rRNA 5S (118 pb) que se obtuvo por PCR con los oligonucleótidos 5SrRNA-F1 y 5SrRNA-R1 a partir del vector p5SrRNA (Figura 36A y B carril 2).

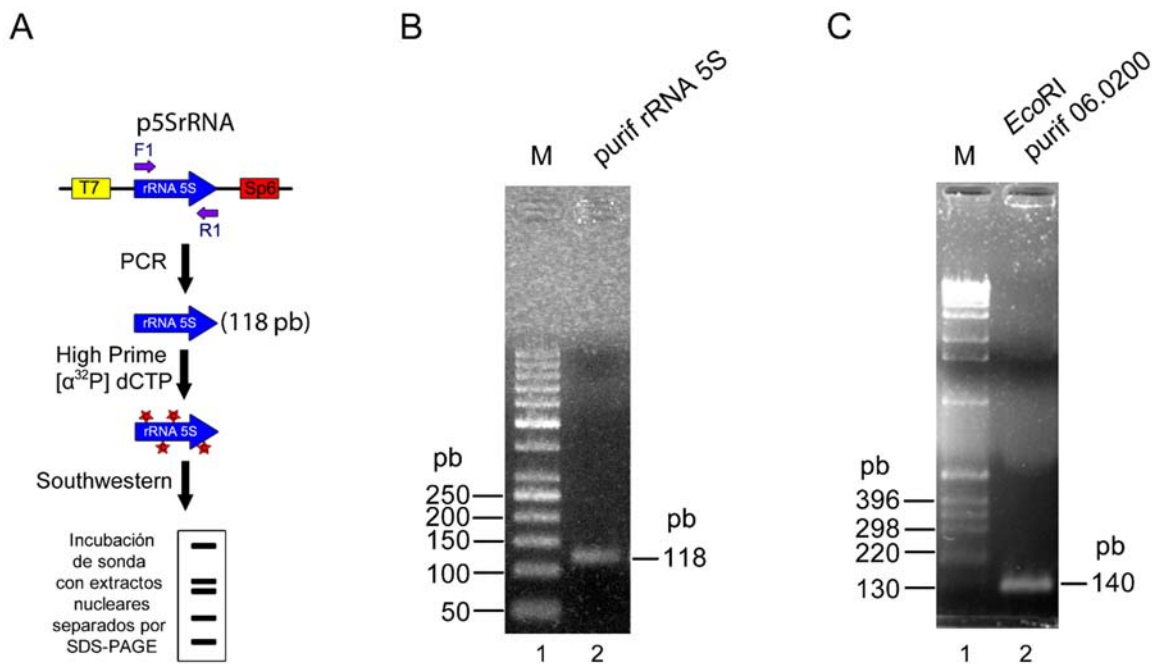


Figura 36. Síntesis de sondas utilizadas para el ensayo *Southwestern*. A) Esquema que muestra la obtención y marcaje del gen del rRNA 5S para el ensayo *Southwestern*. B) Sonda purificada del rRNA 5S de 118 pb. C) Sonda no relacionada (*LmjF.06.0200*, 140 pb) purificada.

Además se utilizó como control negativo una sonda no relacionada que tiene un fragmento de 140 pb del gen *LmjF.06.0200* (que codifica para una proteína hipotética) que se obtuvo al digerir el plásmido pRegionE con *EcoRI* (Figura 36C). Ambas sondas fueron marcadas radioactivamente con [α^{32} P] dCTP mediante High Prime (Amersham).

Por otro lado, proteínas nucleares de *L. major* fueron separadas por SDS-PAGE y transferidas a una membrana de PVDF. Las proteínas unidas a la membrana fueron renaturalizadas e incubadas con la sonda del gen del rRNA 5S. Como se muestra en la Figura 37, la sonda se unió a varias proteínas con peso molecular en un rango de 15 a 50 kDa. Se adicionó DNA

competidor (DNA de esperma de salmón) a dos diferentes concentraciones para demostrar la especificidad de unión. La presencia de 80 μg de DNA competidor no afectó la unión de proteínas a la sonda del gen del rRNA 5S (Figura 37, carril 3), lo cual sugiere que la interacción es específica. En contraste, hubo unión débil de proteínas de bajo peso molecular con la sonda no relacionada (parte de la región codificante de *LmjF.06.0200*) en presencia de 80 μg de DNA competidor (Figura 37, carril 4).

Para aislar e identificar las proteínas que se unen al gen del rRNA 5S se realizó un ensayo DNA *pull-down* (Figura 38A) seguido de un análisis por espectrometría de masas. Primero, extractos nucleares de *L. major* (Figura 38B) se incubaron con una sonda de 99 pb biotinilada en su extremo 5' que contiene un fragmento del gen del rRNA 5S (con los elementos promotores internos) (Figura 38C).

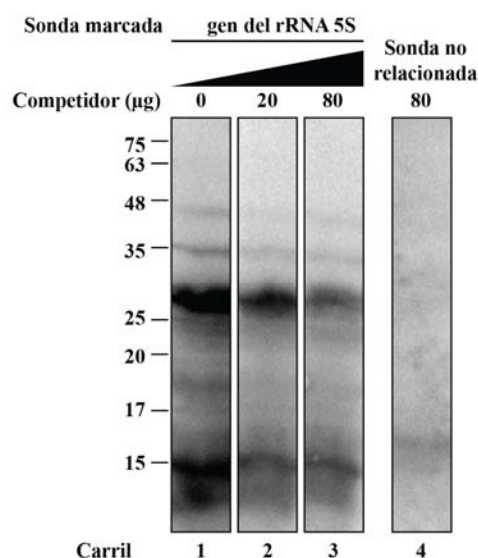


Figura 37. Interacción específica entre el gen del rRNA 5S y proteínas nucleares. Análisis *Southwestern*. Membranas que contienen proteínas nucleares fueron incubadas con un fragmento marcado radioactivamente correspondiente al gen del rRNA 5S (carril 1 al 3) o con una sonda no relacionada (fragmento del gen *LmjF.06.0600*) (carril 4) en la presencia de 0 (carril 1), 20 (carril 2) y 80 μg (carril 3 y 4) de DNA de esperma de salmón como competidor.

Esta sonda se obtuvo por PCR con los oligonucleótidos 5SrRNA-F2bio5 (marcado con biotina en su extremo 5') y 5SrRNA-R1, a partir del vector p5SrRNA (Figura 38A y C). Como control se usó una sonda del gen del rRNA 5S sin biotinar, amplificada con los oligonucleótidos 5SrRNA-F2 y 5SrRNA-R1. Después se utilizaron perlas magnéticas acopladas a estreptavidina para capturar el gen del rRNA 5S acoplado con biotina y a sus

proteínas asociadas, las cuales fueron eluidas de las perlas después de una extensa serie de lavados (Figura 38A).

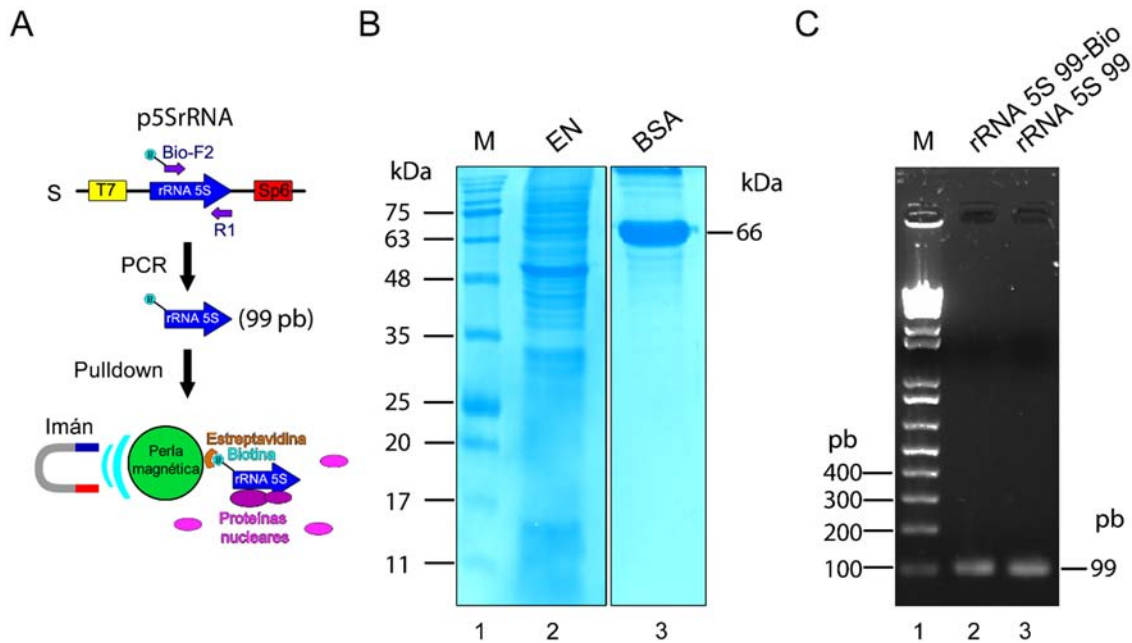


Figura 38. Los ensayos DNA pull-down requieren del rRNA 5S biotinilado y extractos nucleares. A) Representación esquemática del ensayo de DNA pull-down. Las sonda del rRNA 5S (99 pb) se obtuvo a partir de PCR con el oligonucleótido biotinilado 5SrRNA-F2bio5 y 5SrRNA R1; después esta sonda se incubó con extractos nucleares y se realizó el pull-down cuando las perlas magnéticas con estreptavidina se acoplaron a la sonda biotinilada del rRNA 5S con las proteínas específicas. B) Extractos nucleares separados por peso mediante SDS-PAGE (carril 2). También fue corrida BSA como control de carga (carril 3). El marcador de tamaño corresponde a BlueStar Plus preteñido (M) C) Las sondas purificadas del rRNA 5S con biotina (carril 2) y sin biotina (carril 3) tienen un tamaño de 99 pb.

Una fracción de las proteínas aisladas se analizó por SDS-PAGE y tinción con plata (Figura 39, carril 1). Las proteínas aisladas con el control sin biotina también fueron analizadas (Figura 39, carril 2). En la muestra correspondiente al rRNA 5S biotinilado se observaron varias bandas de proteínas, específicamente en el rango de 35 a 70 kDa, que no estuvieron presentes en el experimento control (Figura 39). Para poder identificar el mayor número de proteínas posibles, las fracciones remanentes de las proteínas aisladas fueron concentradas, digeridas con tripsina y analizadas por espectrometría de masas sin ser previamente separadas en un gel.

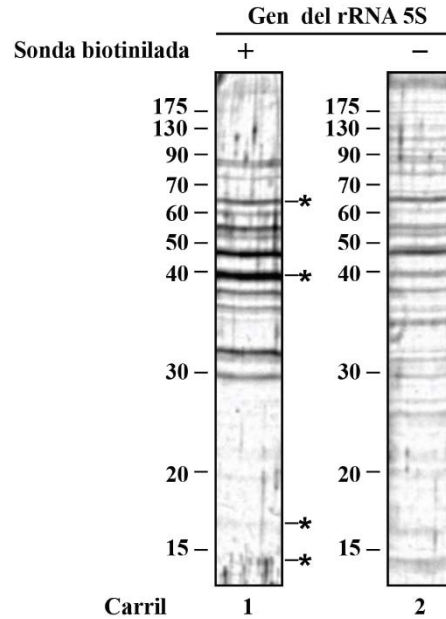


Figura 39. Ensayo DNA-pull-down. Extractos nucleares (750 μ g) fueron incubados con 10 μ g de sonda biotinilada del gen rRNA 5S (carril 1) o con sonda no biotinilada del gen del rRNA 5S como control (carril 2). Las perlas magnéticas con estreptavidina acoplada fueron utilizadas para capturar al gen del rRNA 5S biotinilado y sus proteínas asociadas. Después de que las perlas se lavaron, una fracción de las proteínas se eluyeron y se resolvieron en un gel SDS-PAGE al 12% y se tiñeron con plata. Las dos muestras completas fueron analizadas por espectrometría de masas, identificándose cuatro proteínas, señaladas con un asterisco, que podrían unirse al gen del rRNA 5S de *L. major*.

Un total de 45 proteínas fueron identificadas. Sin embargo, sólo ocho de estas proteínas estuvieron presentes exclusivamente en la muestra con la sonda del gen del rRNA 5S biotinilado (no en el control sin biotinilar). La mitad de estas proteínas parecen ser contaminantes: una proteína putativa glicosomal fosfoenolpiruvato carboxiquinasa (LmjF.27.1810, 13 péptidos identificados), proteína mitocondrial de unión a RNA RPB38 (LmjF.23.0760, 20 péptidos), un factor de elongación 1 beta putativo (LmjF.34.0840, 23 péptidos) y la proteína 11 de membrana cinetoplástida (LmjF.35.2210, 2 péptidos). Las cuatro proteínas restantes podrían efectivamente interactuar con los genes del rRNA 5S: DNA polimerasa Kappa putativa (LmjF.28.1420), histona H2B (LmjF.19.0030), calmodulina (LmjF.09.0910) y una proteína hipotética de función desconocida (LmjF.31.1050) (Tabla 1).

Tabla 1. Identificación espectrométrica de proteínas que posiblemente se unan a los genes del rRNA 5S

Proteína identificada	Descripción	PM (kDa)	% cobertura	Péptidos trípticos
LmjF.28.1420	DNA polimerasa kappa putativa	67.1	18.1	EEVINYV YSDSHTEEIAADCAALEDHGR FTDIDDDHAGLNSTR YLQEFPAVSASDIAHDFR TYDTEQFSVTLPSHTNDLK GSAFYQK AGLQQVDKDYVEHVIQEASK
LmjF.31.1050	proteína hipotética función desconocida	38.7	20.2	VQFPQEIAAADHR EEAAEQPEEDATEL NIVVEATTEVDG VLSAPAVEK SHAVPYEGTVVHPSSR SAEHGAAAQSQTEK SHAVPYEGTVVHPSSR FPQEIAAADHR SAEHGAAAQSQTEK HGAAAQSQTEK
LmjF.09.0910	calmodulina	16.8	15.4	LTDEEVDEMIR DGNGFISAAELR
LmjF.19.0030	histona H2B	11.8	29	IVLPAELAK IVNSYVNDVMER ICTEAASIVR LPAELAK

Es de esperar que la DNA polimerasa Kappa y la histona H2B se unan directamente al DNA. Por otra parte, calmodulina podría unirse indirectamente al DNA, pues se ha reportado que interactúa con factores de transcripción y otras proteína de unión a DNA ¹⁶⁵. El análisis de secuencia de LmjF.31.1050 no mostró la presencia de secuencias conservadas o de motivos con la mayoría de programas, como pFam, Prosite y Smart. Sin embargo, el análisis con el programa Swiss Model reveló que la región N-terminal de LmjF.31.1050 presenta una similitud baja de secuencia y estructura con la proteína Tfc8 de *S. cerevisiae* (Figura 40, panel A). Resulta interesante el hecho de que Tfc8 es una de las subunidades del factor de transcripción TFIIC, el cual participa en la transcripción del rRNA 5S en otras especies. Además, la base de datos NCBI-CDD de búsqueda de motivos mostró que la región C-terminal de LmjF.31.1050 presenta también una similitud baja con el factor sigma bacteriano de la RNA polimerasa (Figura 40, panel B) y con el factor de terminación Rho (Figura 40, panel C). Así, nuestros resultados sugieren que LmjF.31.1050 podría interactuar con los genes del rRNA 5S en *L. major*.

A

```

LmjF.31.1050 7-EFETPAEVRPSGQNGI-NMAAAPAREDGFVSATELASKPHPNRAIQSTV-----SVPH
Sc_Tfc8      64-EFENKLDLFELAQQNGLLNSQFVCYPRVCKPSPIDDWMAVLSNNGNVSVFKDNKMLTNLDS
          ***. . . . : ***: * . * * : * . . . . . :
          : . . . . . : . . . . . : . . . . . : . . . . . :

LmjF.31.1050 --SVPHTRILSRPSAGGVHFS DAGRTAASGSANG -88
Sc_Tfc8      LTNLDSKGNLSSRTYHCFEWNPIESSIVVGNE DG -151
          : . . ** : . . . . : . . * . : *
          : . . . . . : . . . . . : . . . . . : . . . . . :

```

B

```

LmjF.31.1050 213-RRPPHSQTAGQGAVKATKAKQPVGISKKTQGENGRAHCTEPAASSQESGKRKAAAARTAE
Sigma        21-KKLAAKSKSKGFITKEEIKEALESKKKTPEQIDQVLIFLSGMVKDIDDATESDIPKKKTK
          : : . . . . : . * : . . * . : : . . . . : . . . . : : :
          : . . . . . : . . . . . : . . . . . : . . . . . :

LmjF.31.1050 AAAAAKGS PKQKPAKKAIPAAAAAATTNAKSAEHGAAAQSQTEKSAAAAEASADQACV
Sigma        TAAK--AAAAKAPAKKLLDELSSKKA EKKNALDKDDDLNLYVKDIDVLNQADDDDDDD
          : * * . : : * * * : : : : : : : : : : : : . : . * :
          : . . . . . : . . . . . : . . . . . : . . . . . :

LmjF.31.1050 DKKNIVEEATTEVDGVLSAPAVEKEAAAAAKHADPEATGAKEEAAEQPEED -383
Sigma        DDDLDDDDI DDDDD-----DEDDDEDDDDDDVDEDEEKKEAKELEKLSDD -184
          * . . : : : * : . * . * : : : * : . : *
          : . . . . . : . . . . . : . . . . . : . . . . . :

```

C

```

LmjF.31.1050 260-SGKRKA-----AAARTAEAAAAAKGSPKQKPAKKAIPAAAAAATTNAKSAEHGAAAQ
Rho          44-SGMRKGELIAAIKEARGGAAAAAATPAAPAAAAARRAARAAAAARQAEQPAEAAAAAKAE
          * * * . * * . * * * * * * : * : * * * * : : : . * * :
          : . . . . . : . . . . . : . . . . . : . . . . . :

LmjF.31.1050 SQTEKSAAAAEASADQACVDKKNIVEEATTEVDGVLSAPAVEKEAAAAAKHADPEATGAK
Rho          AAPAARAAAAAAAEAA-----SAPEAAQARERRERGEREAARRGAARKAGEGGEQPATEAR
          : * * * * * : . * * : . * . * * * . : : * * * :
          : . . . . . : . . . . . : . . . . . : . . . . . :

LmjF.31.1050 EEAAEQPEEDATE-386
Rho          ADAARTEEEERD-170
          : * * * : * * : :
          : . . . . . : . . . . . : . . . . . : . . . . . :

```

Figura 40. Comparación de secuencias de LmjF.31.1050. La secuencia de aminoácidos de LmjF.31.1050 se comparó con Tfc de *S. cerevisiae* (A), la secuencia consenso del factor Sigma de la RNA polimerasa bacteriana (B), y la secuencia consenso del factor de terminación bacteriana Rho (C), presentando únicamente las regiones que tienen similitud, de acuerdo con el programa Swiss Model, y la base de datos NCBI-CDD en la parte de búsqueda de dominios conservados. Los números indican los primeros y últimos aminoácidos mostrados para cada secuencia.

7. DISCUSIÓN

En el presente trabajo se llevó a cabo un análisis amplio de la secuencia, número y organización genómica de los genes del rRNA en *L. major* y otras especies de *Leishmania*. Nuestros resultados demostraron que el género *Leishmania* se caracteriza por la presencia de un bajo número de genes del rRNA 5S, los cuales fluctúan desde nueve genes en *L. braziliensis* y *L. infantum* hasta 11 genes en *L. major* y *L. mexicana*. De manera interesante, en las especies que carecen de un gen del rRNA 5S se encuentra una secuencia degenerada (pseudogen) en la región sinténica correspondiente (Figura 20), como también se ha reportado anteriormente para genes codificantes de proteína en *Leishmania*^{158,160}. El orden de los genes del rRNA 5S se encuentra conservado entre diferentes especies de *Leishmania*. Sin embargo dos genes del rRNA 5S no sinténicos se encontraron presentes en el genoma de *L. braziliensis*, uno localizado en el cromosoma 31 y otro cuya localización cromosómica no ha sido aún determinada (Figura 20). Mientras que los genes del rRNA 5S de *Leishmania* se encuentran dispersos como copias independientes por todo el genoma, en diferentes especies de género *Trypanosoma* se encuentran en repetidos en tándem, y en algunas especies se encuentran asociadas a genes del miniexón, transcritos por Pol II^{43,166}. Para determinar el contexto genómico en otros tripanosomátidos se analizaron las bases de datos de genomas como *Crithidia fasciculata*, *Leptomonas seymouri* and *Endotrypanum monterogeei*. Mientras que existe un solo gen del rRNA 5S en *C. fasciculata*, ningún gen del rRNA 5S se identificó en *L. seymouri*, lo cual indica que las bases de datos se encuentran incompletas. Por otra parte, 14 genes diferentes del rRNA 5S se encontraron en *E. monterogeei*. Curiosamente, algunos de los genes del rRNA 5S se encontraron dispersos como genes únicos (como en *Leishmania*), mientras que otros genes se encontraron organizados en arreglos en tándem conteniendo hasta cuatro genes (como en *Trypanosoma*). Se ha estimado que *T. brucei* y *T. cruzi* poseen aproximadamente 1500 copias del gen del rRNA 5S^{65,143}. Así, el número y organización genómica de los genes del rRNA 5S es altamente variable en tripanosomátidos.

La secuencia de los genes del rRNA 5S en las diferentes especies de *Leishmania* es casi idéntica (Figura 17). La secuencia también se encuentra conservada cuando se compara con los genes del rRNA 5S de otros tripanosomátidos. En *L. major*, los genes del rRNA 5S

pueden agruparse en tres tipos, basados en la presencia de una G o una A en la posición +70, y la presencia de una o dos Cs en el extremo 3' de los genes (Figura 15). Notablemente, el análisis RT-PCR demostró que al menos un gen de cada tipo se transcribe en promastigotes en crecimiento exponencial (Figura 15). Análisis *Northern blot* mostraron un transcrito abundante de ~120 bases; y a diferencia de otros tipos de rRNA, no se detectaron moléculas de rRNA 5S antisentido (Figura 25). Un total de 19 tipos (A a la S) de genes del rRNA 5S se encontraron presentes en las cinco especies de *Leishmania* analizadas (Figura 17, Figura 20 y Figura 23). El análisis de secuencia de los genes de *L. major* reveló la presencia de los tres elementos promotores internos putativos (caja A, EI y caja C), los cuales se encuentran conservados con regiones homólogas en *S. cerevisiae* y *X. laevis* (Figura 19). En *L. major*, el nucleótido variable en +70 se encuentra posicionado dentro del EI (Figura 15), abriendo la posibilidad de que los genes del rRNA 5S sean expresados diferencialmente en estos organismos.

La estructura secundaria del rRNA 5S de *Leishmania* se encuentra altamente conservada con respecto a la de otros eucariontes (Figura 24), lo cual es un resultado esperado considerando la conservación de la secuencia del rRNA 5S a lo largo de la escala evolutiva⁸⁴. De manera interesante, la gran mayoría de los genes del rRNA 5S en *Leishmania* son precedidos por un gen de tRNA localizado a una distancia cercana. Esto nos permite sugerir la hipótesis de que, además de los elementos promotores internos, las cajas A y B de genes de tRNA vecinos podrían participar en la regulación de la transcripción de rRNA 5S en estos parásitos. En tripanosomátidos, se ha reportado que las cajas A y B de tRNAs aledaños son necesarias para la transcripción de los snRNAs¹⁶⁷.

Nuestros datos sugieren que la transcripción de los genes de *L. major* comienza en una guanina (marcada como +1 en la Figura 15) que está conservada dentro del género *Leishmania*. Notablemente, la transcripción de los genes del rRNA 5S en *T. cruzi* y en *T. brucei* inicia en la misma posición^{65,144}. Nuestros resultados también demostraron que la transcripción de los genes de *L. major* termina en un tracto de residuos de Ts localizado inmediatamente río abajo de los genes. Un tracto de Ts de longitud variable se encontró en cada gen del rRNA 5S en las diferentes especies analizadas de *Leishmania* (Figura 17). Se ha reportado en otros organismos que la eficiencia de terminación de Pol III tiende a

incrementar con la longitud de tracto de Ts⁸⁸. Para los genes de tRNA, la longitud promedio del tracto de Ts es de 4.8 bases en *L. major* y *T. brucei*, y 6.5 bases en *T. cruzi*¹⁶⁸. En los genes del rRNA 5S se encontraron trectos de Ts largos, cuya longitud promedio varía de 8 bases (en *L. mexicana*) a 14 bases (en *L. tarentolae*) (Figura 17 y 21).

Algunos genes transcritos por Pol III contienen una señal de terminación débil que requiere de un tracto de Ts de reserva para terminar eficientemente la transcripción⁸⁸. Los transcritos resultantes contienen secuencias adicionales en la región 3', cuyo procesamiento para generar el RNA maduro produce moléculas pequeñas de RNA que pueden participar en diversos procesos biológicos. Por ejemplo, en humanos y otros vertebrados, RNAs pequeños que derivan de secuencias adicionales en la región 3' de los tRNAs, se acumulan en el citoplasma, donde participan en regulación y silenciamiento genético y podrían estar involucrados en otras funciones biológicas^{169,170}. Los trectos de Ts de reserva en los genes del rRNA 5S son comunes en *L. infantum* al estar presentes en 4 genes (44%) (Figura 21, panel B). Un segundo tracto de Ts también es frecuente en los genes de tRNA en tripanosomátidos, dado que están presentes en 58 (48%), 18 (27%) y 13 (16%) en *T. cruzi*, *T. brucei* y *L. major*, respectivamente¹⁶⁸. Sería interesante determinar si en estos parásitos se producen RNAs pequeños derivados de la región 3' de los genes de tRNAs y del rRNA 5S, y si éstos participan en la regulación genética, como se ha mostrado en vertebrados.

Experimentos combinados DNA-FISH con inmunofluorescencias demostraron que los once genes del rRNA 5S presentes en *L. major* se encuentran principalmente localizados en la periferia nuclear. En *T. cruzi* los genes del rRNA 5S se observaron como puntos brillantes distribuidos en el núcleo. De manera interesante, ninguno de los genes parece estar localizado dentro del nucléolo o en la periferia nucleolar en estos organismos. Esto es diferente de lo que se ha encontrado en *S. cerevisiae* y *Dictyostelium*, donde los genes del rRNA 5S son nucleolares, pues se encuentran asociados a las unidades del rRNA que contienen a los genes de los rRNA 18S, 5.8S y 28S^{171,172}. Sin embargo, la asociación de los genes del rRNA 5S y el nucléolo se ha observado en varias especies en donde los genes del rRNA 5S no se encuentran asociados a la unidad del rRNA⁴⁶. De hecho, en la planta *Pisum sativum*, que tiene alrededor de 5,000 copias del gen del rRNA 5S organizadas en seis arreglos en tándem, se reportó una clara asociación de al menos un arreglo con la periferia nucleolar¹⁷³. Además,

los genes del rRNA 5S en células de humano se localizaron a menudo en la periferia nucleolar¹⁷⁴. Se ha sugerido que los genes del rRNA 5S asociados al nucléolo son los que tienen una mayor transcripción, produciendo transcritos dentro del nucléolo, que es la parte de la célula donde se requieren¹⁷³. Sin embargo, en *Drosophila melanogaster* los genes del rRNA 5S no parecen estar localizados en la vecindad del nucléolo¹⁷⁵. Cabe mencionar que la distribución observada de los genes del rRNA 5S en *L. major* se asemeja a la distribución nuclear reportada para BRF1, una subunidad del factor de transcripción TFIIB de Pol III en *T. brucei*¹⁴⁷.

Con el propósito de asociarse con los pre-ribosomas, se espera que el rRNA 5S se localice en el nucléolo en algún momento dado. De acuerdo con este hecho, ensayos de RNA-FISH combinado con inmunofluorescencias indirectas demostraron que el rRNA 5S colocaliza con la proteína nucleolar Elp3b (Figura 35). Es importante notar que existe una ligera diferencia entre los patrones observados para el rRNA 5S y la proteína Elp3b (Figura 35). En tripanosomátidos, el nucléolo tiene una estructura bipartita, compuesta por un componente denso fibrilar, que parece incluir a los centros fibrilares, y un componente granular^{176,177}. Mientras que se espera que el rRNA 5S se localice en el componente granular, donde ocurre el ensamblaje de los ribosomas, Elp3b se localizaría en los centros fibrilares, los sitios activos de transcripción de Pol I. Además, el rRNA 5S también se encontró disperso en el citoplasma, especialmente en áreas cercanas al núcleo, donde los ribosomas maduros se encuentran. En vertebrados el 5S rRNA y el rRNA 28S también tienen una distribución similar, citoplasmática y nuclear^{174,178}.

En *T. brucei* y en *T. cruzi* se han identificado varias proteínas que interactúan con el rRNA 5S, incluyendo P34, P37 y L5^{122,148}. Sin embargo, ninguna de estas proteínas se han reportado que se una a los genes del rRNA 5S en *Leishmania* y otros tripanosomátidos. Es por esto que, para comenzar con el estudio de las proteínas que se unen y que podrían participar en la transcripción de los genes del rRNA 5S en *L. major*, se realizaron ensayos *Southwestern*. En estos ensayos se observó que varias proteínas con peso molecular de 15 a 50 kDa se unieron específicamente a los genes del rRNA 5S (Figura 37). Experimentos preliminares de DNA *pull-down* y de espectrometría de masas nos permitieron identificar cuatro proteínas que se podrían unir a los genes del rRNA 5S (Figura 39 y Tabla 1). De éstas,

LmjF.31.1050 codifica una proteína de 38 kD que se encuentra presente en otras especies de *Leishmania*, pero no en *Trypanosoma*. Es interesante que la región amino terminal de *LmjF.31.1050* muestra similitud con el dominio terminal de Tfc8 de *S. cerevisiae*, una de las subunidades del factor de transcripción TFIIC (Figura 40A). TFIIC está compuesta por dos subcomplejos, τ A y τ B; y aparentemente Tfc8 se encuentra involucrada en conectar ambos subcomplejos y en las interacciones con TBP ¹⁷⁹. En general la homología entre Tfc8 y *LmjF.31.1050* es baja, ya que muestra un 17.8 % de identidad. Sin embargo, las secuencias de aminoácidos de la mayoría de las subunidades de TFIIC son altamente divergentes de levadura a humanos ¹⁸⁰. Por ejemplo, Tfc8 de levadura presenta porcentajes de identidad de 20.7% y 27.6% con sus ortólogos en humano y en *Schizosaccharomyces pombe*, respectivamente. Además, la región carboxilo terminal de *LmjF.31.1050* presenta cierta homología con dos proteínas que participan en la transcripción en bacterias: el factor Sigma de la RNA polimerasa (con un 20,7% de identidad) (Figura 40B) y el factor de terminación de la transcripción Rho (con un 13.9% de identidad) (Figura 40C). Estudios futuros determinarán si *LmjF.31.1050* realmente participan en la transcripción de los genes del rRNA 5S en *L. major*.

8. CONCLUSIONES

- El género *Leishmania* presenta un bajo número de genes del rRNA 5S, cuya secuencia y organización genómica se encuentra conservada.
- Los genes del rRNA 5S se dividen en tres tipos y al menos un gen de cada tipo es transcrito en promastigotes de *L. major*.
- Los genes del rRNA 5S de *L. major* presentan regiones de control interno probables (formadas por la caja A, el elemento intermedio y la caja C). Su secuencia está conservada con regiones homólogas de *X. laevis* y *S. cerevisiae*.
- Las especies de *Leishmania* que carecen de algún gen del 5S rRNA presentan en muchos casos un pseudogen en la región sinténica correspondiente.
- Existe un total de 19 tipos de genes del rRNA 5S en las especies de *Leishmania* analizadas.
- La estructura secundaria consenso del rRNA 5S en las especies de *Leishmania* se encuentra conservada con respecto a otros eucariontes.
- La transcripción del gen del rRNA 5S de *L. major* inicia en una G conservada en los géneros *Leishmania* y *Trypanosoma*.

- La transcripción del 5S rRNA finaliza en un tracto de Ts localizado inmediatamente después de los genes.
- Los genes del rRNA 5S de *L. major* se encuentran dispersos en el núcleo o localizados en la periferia nuclear, pero no se encuentran asociados con el nucléolo. Una localización similar se observó para los genes del rRNA 5S de *T. cruzi*.
- Los transcritos del rRNA 5S se localizaron en el nucléolo y dispersos en el citoplasma.
- Ensayos *Southwestern* mostraron la presencia de varias proteínas nucleares que se unen específicamente a los genes del rRNA 5S en *L. major*.
- Mediante ensayos DNA *pull-down* y de espectrometría de masas fueron identificadas cuatro proteínas que podrían unirse a los genes del rRNA 5S. Entre éstas, LmjF.31.1050 muestra cierta homología con la subunidad Tfc8 de TFIIC.

9. REFERENCIAS

1. Hannaert, V., Bringaud, F., Opperdoes, F. R. & Michels, P. A. Evolution of energy metabolism and its compartmentation in Kinetoplastida. *Kinetoplastid Biol. Dis.* **2**, 11 (2003).
2. Beverley, S. M. Hijacking the cell: parasites in the driver's seat. *Cell* **87**, 787–789 (1996).
3. Adl, S. M. *et al.* The new higher level classification of eukaryotes with emphasis on the taxonomy of protists. *J. Eukaryot. Microbiol.* **52**, 399–451 (2005).
4. Stuart, K. *et al.* Kinetoplastids: related protozoan pathogens, different diseases. *J. Clin. Invest* **118**, 1301–1310 (2008).
5. Simpson, L., Aphasizhev, R., Gao, G. & Kang, X. Mitochondrial proteins and complexes in Leishmania and Trypanosoma involved in U-insertion/deletion RNA editing. *RNA N. Y. N* **10**, 159–170 (2004).
6. Pays, E., Vanhamme, L. & Perez-Morga, D. Antigenic variation in Trypanosoma brucei: facts, challenges and mysteries. *Curr. Opin. Microbiol.* **7**, 369–374 (2004).
7. Lukes, J., Hashimi, H. & Zikova, A. Unexplained complexity of the mitochondrial genome and transcriptome in kinetoplastid flagellates. *Curr. Genet.* **48**, 277–299 (2005).
8. Liu, B., Liu, Y., Motyka, S. A., Agbo, E. E. C. & Englund, P. T. Fellowship of the rings: the replication of kinetoplast DNA. *Trends Parasitol.* **21**, 363–369 (2005).
9. Campbell, D. A., Thomas, S. & Sturm, N. R. Transcription in kinetoplastid protozoa: why be normal? *Microbes. Infect.* **5**, 1231–1240 (2003).
10. Besteiro, S., Barrett, M. P., Rivière, L. & Bringaud, F. Energy generation in insect stages of Trypanosoma brucei: metabolism in flux. *Trends Parasitol.* **21**, 185–191 (2005).

11. Simpson, A. G. B., Stevens, J. R. & Lukeš, J. The evolution and diversity of kinetoplastid flagellates. *Trends Parasitol.* **22**, 168–174 (2006).
12. Marande, W., Lukes, J. & Burger, G. Unique mitochondrial genome structure in diplomemids, the sister group of kinetoplastids. *Eukaryot. Cell* **4**, 1137–1146 (2005).
13. Gallego, M. Zoonosis emergentes por patógenos parásitos: las leishmaniosis. *Rev. Sci. Tech. - Off. Int. Épizooties* **23**, 661–676 (2004).
14. Handman, E. & Bullen, D. V. R. Interaction of *Leishmania* with the host macrophage. *Trends Parasitol.* **18**, 332–334 (2002).
15. Kamhawi, S. Phlebotomine sand flies and *Leishmania* parasites: friends or foes? *Trends Parasitol.* **22**, 439–445 (2006).
16. Gossage, S. M., Rogers, M. E. & Bates, P. A. Two separate growth phases during the development of *Leishmania* in sand flies: implications for understanding the life cycle. *Int. J. Parasitol.* **33**, 1027–1034 (2003).
17. Wakid, M. H. & Bates, P. A. Flagellar attachment of *Leishmania* promastigotes to plastic film in vitro. *Exp. Parasitol.* **106**, 173–178 (2004).
18. Alvar, J. *et al.* Leishmaniasis Worldwide and Global Estimates of Its Incidence. *PLoS ONE* **7**, e35671 (2012).
19. Okwor, I. & Uzonna, J. E. The immunology of *Leishmania*/HIV co-infection. *Immunol. Res.* **56**, 163–171 (2013).
20. Chappuis, F. *et al.* Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control? *Nat. Rev. Microbiol.* **5**, 873–882 (2007).
21. González, C. *et al.* Current knowledge of *Leishmania* vectors in Mexico: how geographic distributions of species relate to transmission areas. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **85**, 839–846 (2011).

22. Singh, B. & Sundar, S. Leishmaniasis: vaccine candidates and perspectives. *Vaccine* **30**, 3834–3842 (2012).
23. Chang, K.-P. in *eLS* (John Wiley & Sons, Ltd, 2001).
24. Croft, S. L. & Coombs, G. H. Leishmaniasis--current chemotherapy and recent advances in the search for novel drugs. *Trends Parasitol.* **19**, 502–508 (2003).
25. Bolsover, S. R., Hyams, J. S., Shephard, E. A., White, H. A. & Wiedemann, C. G. in *Cell Biology* 105–127 (John Wiley & Sons, Inc., 2003).
26. Archambault, J. & Friesen, J. D. Genetics of eukaryotic RNA polymerases I, II, and III. *Microbiol. Rev.* **57**, 703–724 (1993).
27. Dieci, G., Fiorino, G., Castelnuovo, M., Teichmann, M. & Pagano, A. The expanding RNA polymerase III transcriptome. *Trends Genet* **23**, 614–622 (2007).
28. Cramer, P. *et al.* Structure of eukaryotic RNA polymerases. *Annu. Rev. Biophys.* **37**, 337–352 (2008).
29. Vannini, A. & Cramer, P. Conservation between the RNA polymerase I, II, and III transcription initiation machineries. *Mol. Cell* **45**, 439–446 (2012).
30. Fernández-Tornero, C. *et al.* Insights into transcription initiation and termination from the electron microscopy structure of yeast RNA polymerase III. *Mol. Cell* **25**, 813–823 (2007).
31. Hoffmann, N. A. *et al.* Molecular structures of unbound and transcribing RNA polymerase III. *Nature* **528**, 231–236 (2015).
32. Arimbasseri, A. G., Rijal, K. & Maraia, R. J. Comparative overview of RNA polymerase II and III transcription cycles, with focus on RNA polymerase III termination and reinitiation. *Transcription* **5**, e27639 (2014).

33. Geiduschek, E. P. & Kassavetis, G. A. The RNA polymerase III transcription apparatus. *J.Mol.Biol.* **310**, 1–26 (2001).
34. Paule, M. R. & White, R. J. Survey and summary: transcription by RNA polymerases I and III. *Nucleic Acids Res* **28**, 1283–1298 (2000).
35. Willis, I. M. RNA polymerase III. Genes, factors and transcriptional specificity. *Eur.J.Biochem.* **212**, 1–11 (1993).
36. Challice, J. M. & Segall, J. 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 (1989).
37. Teichmann, M., Dieci, G., Pascali, C. & Boldina, G. General transcription factors and subunits of RNA polymerase III. *Transcription* **1**, 130–135 (2010).
38. Vannini, A. A structural perspective on RNA polymerase I and RNA polymerase III transcription machineries. *Biochim. Biophys. Acta* **1829**, 258–264 (2013).
39. Hernandez, N. Small nuclear RNA genes: a model system to study fundamental mechanisms of transcription. *J.Biol.Chem.* **276**, 26733–26736 (2001).
40. Shippen-Lentz, D. E. & Vezza, A. C. The three 5S rRNA genes from the human malaria parasite *Plasmodium falciparum* are linked. *Mol.Biochem.Parasitol.* **27**, 263–273 (1988).
41. Chipev, C. C. & Wolffe, A. P. Chromosomal organization of *Xenopus laevis* oocyte and somatic 5S rRNA genes in vivo. *Mol. Cell. Biol.* **12**, 45–55 (1992).
42. Roberson, A. E., Wolffe, A. P., Hauser, L. J. & Olins, D. E. The 5S RNA gene minichromosome of *Euplotes*. *Nucleic Acids Res.* **17**, 4699–4712 (1989).

43. Torres-Machorro, A. L., Hernandez, R., Cevallos, A. M. & Lopez-Villasenor, I. Ribosomal RNA genes in eukaryotic microorganisms: witnesses of phylogeny? *FEMS MicrobiolRev* **34**, 59–86 (2010).
44. Conconi, A., Widmer, R. M., Koller, T. & Sogo, J. M. Two different chromatin structures coexist in ribosomal RNA genes throughout the cell cycle. *Cell* **57**, 753–761 (1989).
45. Cloix, C. *et al.* Analysis of the 5S RNA Pool in *Arabidopsis thaliana*: RNAs Are Heterogeneous and Only Two of the Genomic 5S Loci Produce Mature 5S RNA. *Genome Res.* **12**, 132–144 (2002).
46. Haeusler, R. A. & Engelke, D. R. Spatial organization of transcription by RNA polymerase III. *Nucleic Acids Res* **34**, 4826–4836 (2006).
47. Bogenhagen, D. F., Sakonju, S. & Brown, D. D. A control region in the center of the 5S RNA gene directs specific initiation of transcription: II. The 3' border of the region. *Cell* **19**, 27–35 (1980).
48. Sakonju, S., Bogenhagen, D. F. & Brown, D. D. A control region in the center of the 5S RNA gene directs specific initiation of transcription: I. The 5' border of the region. *Cell* **19**, 13–25 (1980).
49. Pieler, T., Hamm, J. & Roeder, R. G. The 5S gene internal control region is composed of three distinct sequence elements, organized as two functional domains with variable spacing. *Cell* **48**, 91–100 (1987).
50. Keller, H. J., You, Q. M., Romaniuk, P. J. & Gottesfeld, J. M. Additional intragenic promoter elements of the *Xenopus* 5S RNA genes upstream from the TFIID-binding site. *Mol. Cell. Biol.* **10**, 5166–5176 (1990).

51. Oei, S. L. & Pieler, T. A transcription stimulatory factor binds to the upstream region of *Xenopus* 5 S RNA and tRNA genes. *J. Biol. Chem.* **265**, 7485–7491 (1990).
52. Nielsen, J. N., Hallenberg, C., Frederiksen, S., Sørensen, P. D. & Lomholt, B. Transcription of human 5S rRNA genes is influenced by an upstream DNA sequence. *Nucleic Acids Res.* **21**, 3631–3636 (1993).
53. Hallenberg, C. & Frederiksen, S. Effect of mutations in the upstream promoter on the transcription of human 5S rRNA genes. *Biochim. Biophys. Acta* **1520**, 169–173 (2001).
54. Nelson, D. W., Linning, R. M., Davison, P. J. & Honda, B. M. 5'-flanking sequences required for efficient transcription in vitro of 5S RNA genes, in the related nematodes *Caenorhabditis elegans* and *Caenorhabditis briggsae*. *Gene* **218**, 9–16 (1998).
55. Vierna, J., Wehner, S., Höner zu Siederdisen, C., Martínez-Lage, A. & Marz, M. Systematic analysis and evolution of 5S ribosomal DNA in metazoans. *Heredity* **111**, 410–421 (2013).
56. Sharp, S. J. & Garcia, A. D. Transcription of the *Drosophila melanogaster* 5S RNA gene requires an upstream promoter and four intragenic sequence elements. *Mol. Cell. Biol.* **8**, 1266–1274 (1988).
57. Venkateswarlu, K., Lee, S. W. & Nazar, R. N. Conserved upstream sequence elements in plant 5S ribosomal RNA-encoding genes. *Gene* **105**, 249–254 (1991).
58. Cloix, C., Yukawa, Y., Tutois, S., Sugiura, M. & Tourmente, S. In vitro analysis of the sequences required for transcription of the *Arabidopsis thaliana* 5S rRNA genes. *Plant J. Cell Mol. Biol.* **35**, 251–261 (2003).
59. Lee, Y., Erkin, A. M., Van Ryk, D. I. & Nazar, R. N. In vivo analyses of the internal control region in the 5S rRNA gene from *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res.* **23**, 634–640 (1995).

60. Lee, Y., Wong, W. M., Guyer, D., Erkin, A. M. & Nazar, R. N. In vivo analyses of upstream promoter sequence elements in the 5 S rRNA gene from *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Mol. Biol.* **269**, 676–683 (1997).
61. Hamada, M., Huang, Y., Lowe, T. M. & Marais, R. J. Widespread use of TATA elements in the core promoters for RNA polymerases III, II, and I in fission yeast. *MolCell Biol* **21**, 6870–6881 (2001).
62. Tyler, B. M. Transcription of *Neurospora crassa* 5 S rRNA genes requires a TATA box and three internal elements. *J. Mol. Biol.* **196**, 801–811 (1987).
63. Shi, Y. G. & Tyler, B. M. All internal promoter elements of *Neurospora crassa* 5 S rRNA and tRNA genes, including the A boxes, are functionally gene-specific. *J. Biol. Chem.* **266**, 8015–8019 (1991).
64. Acker, J. *et al.* Dicistronic tRNA-5S rRNA genes in *Yarrowia lipolytica*: an alternative TFIIA-independent way for expression of 5S rRNA genes. *Nucleic Acids Res.* **36**, 5832–5844 (2008).
65. Hernandez-Rivas, R., Martinez-Calvillo, S., Romero, M. & Hernandez, R. *Trypanosoma cruzi* 5S rRNA genes: molecular cloning, structure and chromosomal organization. *FEMS MicrobiolLett* **71**, 63–67 (1992).
66. Feng, J.-M., Sun, J., Xin, D.-D. & Wen, J.-F. Comparative analysis of the 5S rRNA and its associated proteins reveals unique primitive rather than parasitic features in *Giardia lamblia*. *PLoS One* **7**, e36878 (2012).
67. Peng, Z. & Bateman, E. Analysis of the 5S rRNA gene promoter from *Acanthamoeba castellanii*. *Mol. Microbiol.* **52**, 1123–1132 (2004).

68. Torres-Machorro, A. L., Hernández, R., Sánchez, J. & López-Villaseñor, I. The 5S ribosomal RNA gene from the early diverging protozoa *Trichomonas vaginalis*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **145**, 269–273 (2006).
69. Orioli, A., Pascali, C., Pagano, A., Teichmann, M. & Dieci, G. RNA polymerase III transcription control elements: themes and variations. *Gene* **493**, 185–194 (2012).
70. Braun, B. R., Kassavetis, G. A. & Geiduschek, E. P. Bending of the *Saccharomyces cerevisiae* 5S rRNA gene in transcription factor complexes. *J. Biol. Chem.* **267**, 22562–22569 (1992).
71. Camier, S., Dechampsme, A. M. & Sentenac, A. The only essential function of TFIIIA in yeast is the transcription of 5S rRNA genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **92**, 9338–9342 (1995).
72. Nolte, R. T., Conlin, R. M., Harrison, S. C. & Brown, R. S. Differing roles for zinc fingers in DNA recognition: structure of a six-finger transcription factor IIIA complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95**, 2938–2943 (1998).
73. Layat, E., Probst, A. V. & Tourmente, S. Structure, function and regulation of Transcription Factor IIIA: From *Xenopus* to *Arabidopsis*. *Biochim. Biophys. Acta* **1829**, 274–282 (2013).
74. Male, G. *et al.* Architecture of TFIIC and its role in RNA polymerase III pre-initiation complex assembly. *Nat. Commun.* **6**, 7387 (2015).
75. Acker, J., Conesa, C. & Lefebvre, O. Yeast RNA polymerase III transcription factors and effectors. *Biochim. Biophys. Acta* **1829**, 283–295 (2013).
76. Milne, C. A. & Segall, J. Mapping regions of yeast transcription factor IIIA required for DNA binding, interaction with transcription factor IIIC, and transcription activity. *J. Biol. Chem.* **268**, 11364–11371 (1993).

77. Rothfels, K., Rowland, O. & Segall, J. Zinc fingers 1 and 7 of yeast TFIIA are essential for assembly of a functional transcription complex on the 5 S RNA gene. *Nucleic Acids Res.* **35**, 4869–4881 (2007).
78. Kassavetis, G. A., Letts, G. A. & Geiduschek, E. P. The RNA polymerase III transcription initiation factor TFIIB participates in two steps of promoter opening. *EMBO J.* **20**, 2823–2834 (2001).
79. Kassavetis, G. A. & Geiduschek, E. P. Transcription factor TFIIB and transcription by RNA polymerase III. *Biochem.Soc.Trans.* **34**, 1082–1087 (2006).
80. Kenneth, N. S., Marshall, L. & White, R. J. Recruitment of RNA polymerase III in vivo. *Nucleic Acids Res.* **36**, 3757–3764 (2008).
81. Schramm, L. & Hernandez, N. Recruitment of RNA polymerase III to its target promoters. *Genes Dev* **16**, 2593–2620 (2002).
82. Wu, C.-C., Lin, Y.-C. & Chen, H.-T. The TFIIF-Like Rpc37/53 Dimer Lies at the Center of a Protein Network To Connect TFIIC, Bdp1, and the RNA Polymerase III Active Center ▽. *Mol. Cell. Biol.* **31**, 2715–2728 (2011).
83. Korn, L. J., Birkenmeier, E. H. & Brown, D. D. Transcription initiation of Xenopus 5S ribosomal RNA genes in vitro. *Nucleic Acids Res.* **7**, 947–958 (1979).
84. Szymanski, M., Zielezinski, A., Barciszewski, J., Erdmann, V. A. & Karlowski, W. M. 5SRNadb: an information resource for 5S ribosomal RNAs. *Nucleic Acids Res.* **44**, D180-183 (2016).
85. Arimbasseri, A. G., Rijal, K. & Maraia, R. J. Transcription termination by the eukaryotic RNA polymerase III. *Biochim. Biophys. Acta* **1829**, 318–330 (2013).

86. Arimbasseri, A. G. & Maraia, R. J. Mechanism of Transcription Termination by RNA Polymerase III Utilizes a Non-template Strand Sequence-Specific Signal Element. *Mol. Cell* **58**, 1124–1132 (2015).
87. Korn, L. J. & Brown, D. D. Nucleotide sequence of xenopus borealis oocyte 5S DNA: Comparison of sequences that flank several related eucaryotic genes. *Cell* **15**, 1145–1156 (1978).
88. Braglia, P., Percudani, R. & Dieci, G. Sequence context effects on oligo(dT) termination signal recognition by *Saccharomyces cerevisiae* RNA polymerase III. *J.Biol.Chem.* **280**, 19551–19562 (2005).
89. Drouin, G. Expressed retrotransposed 5S rRNA genes in the mouse and rat genomes. *Genome Natl. Res. Counc. Can. Génome Cons. Natl. Rech. Can.* **43**, 213–215 (2000).
90. Szymanski, M., Barciszewska, M. Z., Erdmann, V. A. & Barciszewski, J. 5S Ribosomal RNA Database. *Nucleic Acids Res.* **30**, 176–178 (2002).
91. Gongadze, G. M. 5S rRNA and ribosome. *Biochem. Biokhimiia* **76**, 1450–1464 (2011).
92. Dinman, J. D. 5S rRNA: Structure and Function from Head to Toe. *Int. J. Biomed. Sci. IJBS* **1**, 2–7 (2005).
93. Sloan, K. E., Bohnsack, M. T. & Watkins, N. J. The 5S RNP couples p53 homeostasis to ribosome biogenesis and nucleolar stress. *Cell Rep* **5**, 237–247 (2013).
94. Leidig, C. *et al.* 60S ribosome biogenesis requires rotation of the 5S ribonucleoprotein particle. *Nat. Commun.* **5**, 3491 (2014).
95. van, H. A., Lennertz, P. & Parker, R. Three conserved members of the RNase D family have unique and overlapping functions in the processing of 5S, 5.8S, U4, U5, RNase MRP and RNase P RNAs in yeast. *EMBO J* **19**, 1357–1365 (2000).

96. Preiser, P. R. & Levinger, L. F. In vitro processing of *Drosophila melanogaster* 5 S ribosomal RNA. 3' end effects and requirement for internal domains of mature 5 S RNA. *J. Biol. Chem.* **266**, 7509–7516 (1991).
97. Preiser, P. R. & Levinger, L. F. *Drosophila* 5 S RNA processing requires the 1-118 base pair and additional sequence proximal to the processing site. *J. Biol. Chem.* **266**, 23602–23605 (1991).
98. Hölzle, A. *et al.* Maturation of the 5S rRNA 5' end is catalyzed in vitro by the endonuclease tRNase Z in the archaeon *H. volcanii*. *RNA N. Y. N* **14**, 928–937 (2008).
99. Kadaba, S., Wang, X. & Anderson, J. T. Nuclear RNA surveillance in *Saccharomyces cerevisiae*: Trf4p-dependent polyadenylation of nascent hypomethylated tRNA and an aberrant form of 5S rRNA. *RNA* **12**, 508–521 (2006).
100. Fulnecek, J. & Kovarik, A. Low abundant spacer 5S rRNA transcripts are frequently polyadenylated in *Nicotiana*. *Mol. Genet. Genomics MGG* **278**, 565–573 (2007).
101. Decatur, W. A. & Fournier, M. J. RNA-guided Nucleotide Modification of Ribosomal and Other RNAs. *J. Biol. Chem.* **278**, 695–698 (2003).
102. Miyazaki, M. Studies on the nucleotide sequence of pseudouridine-containing 5S RNA from *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biochem. (Tokyo)* **75**, 1407–1410 (1974).
103. Rinke, J. & Steitz, J. A. Precursor molecules of both human 5S ribosomal RNA and transfer RNAs are bound by a cellular protein reactive with anti-La lupus antibodies. *Cell* **29**, 149–159 (1982).
104. Wolin, S. L. & Cedervall, T. The La protein. *Annu.Rev.Biochem.* **71**, 375–403 (2002).
105. Maraia, R. J. La protein and the trafficking of nascent RNA polymerase iii transcripts. *J. Cell Biol.* **153**, F13-18 (2001).

106. Intine, R. V., Tenenbaum, S. A., Sakulich, A. L., Keene, J. D. & Maraia, R. J. Differential phosphorylation and subcellular localization of La RNPs associated with precursor tRNAs and translation-related mRNAs. *Mol. Cell* **12**, 1301–1307 (2003).
107. French, S. L. *et al.* Visual analysis of the yeast 5S rRNA gene transcriptome: regulation and role of La protein. *Mol. Cell. Biol.* **28**, 4576–4587 (2008).
108. Allison, L. A., North, M. T. & Neville, L. A. Differential binding of oocyte-type and somatic-type 5S rRNA to TFIIIA and ribosomal protein L5 in *Xenopus* oocytes: specialization for storage versus mobilization. *Dev. Biol.* **168**, 284–295 (1995).
109. Lee, B. M. *et al.* Induced fit and ‘lock and key’ recognition of 5S RNA by zinc fingers of transcription factor IIIA. *J. Mol. Biol.* **357**, 275–291 (2006).
110. Rudt, F. & Pieler, T. Cytoplasmic retention and nuclear import of 5S ribosomal RNA containing RNPs. *EMBO J.* **15**, 1383–1391 (1996).
111. Allison, L. A., Romaniuk, P. J. & Bakken, A. H. RNA-protein interactions of stored 5S RNA with TFIIIA and ribosomal protein L5 during *Xenopus* oogenesis. *Dev. Biol.* **144**, 129–144 (1991).
112. Murdoch, K. J. & Allison, L. A. A role for ribosomal protein L5 in the nuclear import of 5S rRNA in *Xenopus* oocytes. *Exp. Cell Res.* **227**, 332–343 (1996).
113. Claussen, M., Rudt, F. & Pieler, T. Functional modules in ribosomal protein L5 for ribonucleoprotein complex formation and nucleocytoplasmic transport. *J. Biol. Chem.* **274**, 33951–33958 (1999).
114. Rudt, F. & Pieler, T. Cytosolic import factor- and Ran-independent nuclear transport of ribosomal protein L5. *Eur. J. Cell Biol.* **80**, 661–668 (2001).

115. Lin, E., Lin, S. W. & Lin, A. The participation of 5S rRNA in the co-translational formation of a eukaryotic 5S ribonucleoprotein complex. *Nucleic Acids Res.* **29**, 2510–2516 (2001).
116. Steitz, J. A. *et al.* A 5S rRNA/L5 complex is a precursor to ribosome assembly in mammalian cells. *J. Cell Biol.* **106**, 545–556 (1988).
117. Kressler, D. *et al.* Synchronizing nuclear import of ribosomal proteins with ribosome assembly. *Science* **338**, 666–671 (2012).
118. Bange, G., Murat, G., Sinning, I., Hurt, E. & Kressler, D. New twist to nuclear import: When two travel together. *Commun. Integr. Biol.* **6**, e24792 (2013).
119. Asano, N. *et al.* Structural and functional analysis of the Rpf2-Rrs1 complex in ribosome biogenesis. *Nucleic Acids Res.* **43**, 4746–4757 (2015).
120. Madru, C. *et al.* Chaperoning 5S RNA assembly. *Genes Dev.* **29**, 1432–1446 (2015).
121. Zang, W. Q. & Romaniuk, P. J. Characterization of the 5 S RNA binding activity of *Xenopus* zinc finger protein p43. *J. Mol. Biol.* **245**, 549–558 (1995).
122. Ciganda, M., Prohaska, K., Hellman, K. & Williams, N. A novel association between two trypanosome-specific factors and the conserved L5-5S rRNA complex. *PLoS ONE*. **7**, e41398 (2012).
123. Ben-Shem, A., Jenner, L., Yusupova, G. & Yusupov, M. Crystal structure of the eukaryotic ribosome. *Science* **330**, 1203–1209 (2010).
124. Ben-Shem, A. *et al.* The structure of the eukaryotic ribosome at 3.0 Å resolution. *Science* **334**, 1524–1529 (2011).
125. Meskauskas, A. & Dinman, J. D. Ribosomal protein L5 helps anchor peptidyl-tRNA to the P-site in *Saccharomyces cerevisiae*. *RNA N. Y. N* **7**, 1084–1096 (2001).

126. Michael, W. M. & Dreyfuss, G. Distinct domains in ribosomal protein L5 mediate 5 S rRNA binding and nucleolar localization. *J. Biol. Chem.* **271**, 11571–11574 (1996).
127. Rosorius, O. *et al.* Human ribosomal protein L5 contains defined nuclear localization and export signals. *J. Biol. Chem.* **275**, 12061–12068 (2000).
128. DiNitto, J. P. & Huber, P. W. Mutual induced fit binding of *Xenopus* ribosomal protein L5 to 5S rRNA. *J. Mol. Biol.* **330**, 979–992 (2003).
129. Huber, P. W., Rife, J. P. & Moore, P. B. The structure of helix III in *Xenopus* oocyte 5 S rRNA: an RNA stem containing a two-nucleotide bulge. *J. Mol. Biol.* **312**, 823–832 (2001).
130. Rhodin, M. H. J., Rakauskaitė, R. & Dinman, J. D. The central core region of yeast ribosomal protein L11 is important for subunit joining and translational fidelity. *Mol. Genet. Genomics MGG* **285**, 505–516 (2011).
131. Scripture, J. B. & Huber, P. W. Binding site for *Xenopus* ribosomal protein L5 and accompanying structural changes in 5S rRNA. *Biochemistry (Mosc.)* **50**, 3827–3839 (2011).
132. Gray, M. W., Burger, G. & Lang, B. F. Mitochondrial evolution. *Science* **283**, 1476–1481 (1999).
133. Adams, K. L. & Palmer, J. D. Evolution of mitochondrial gene content: gene loss and transfer to the nucleus. *Mol. Phylogenet. Evol.* **29**, 380–395 (2003).
134. Bullerwell, C. E. *et al.* Abundant 5S rRNA-like transcripts encoded by the mitochondrial genome in amoebzoa. *Eukaryot. Cell* **9**, 762–773 (2010).
135. Smirnov, A. *et al.* Two distinct structural elements of 5S rRNA are needed for its import into human mitochondria. *RNA N. Y. N* **14**, 749–759 (2008).

136. Schnauffer, A. *et al.* Separate insertion and deletion subcomplexes of the *Trypanosoma brucei* RNA editing complex. *Mol.Cell* **12**, 307–319 (2003).
137. Ivens, A. C. *et al.* The genome of the kinetoplastid parasite, *Leishmania major*. *Science* **309**, 436–442 (2005).
138. Myler, P. J. *et al.* *Leishmania major* Friedlin chromosome 1 has an unusual distribution of protein-coding genes. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **96**, 2902–2906 (1999).
139. Martinez-Calvillo, S. *et al.* Transcription of *Leishmania major* Friedlin chromosome 1 initiates in both directions within a single region. *Mol.Cell* **11**, 1291–1299 (2003).
140. Martinez-Calvillo, S., Nguyen, D., Stuart, K. & Myler, P. J. Transcription initiation and termination on *Leishmania major* chromosome 3. *Eukaryot.Cell* **3**, 506–517 (2004).
141. Worthey, E. A. *et al.* *Leishmania major* chromosome 3 contains two long convergent polycistronic gene clusters separated by a tRNA gene. *Nucleic Acids Res* **31**, 4201–4210 (2003).
142. Clayton, C. E. Life without transcriptional control? From fly to man and back again. *EMBO J* **21**, 1881–1888 (2002).
143. Hasan, G., Turner, M. J. & Cordingley, J. S. Ribosomal RNA genes of *Trypanosoma brucei*: mapping the regions specifying the six small ribosomal RNAs. *Gene* **27**, 75–86 (1984).
144. Lenardo, M. J., Dorfman, D. M., Reddy, L. V. & Donelson, J. E. Characterization of the *Trypanosoma brucei* 5S ribosomal RNA gene and transcript: the 5S rRNA is a spliced-leader-independent species. *Gene* **35**, 131–141 (1985).
145. Cordingley, J. S. Nucleotide sequence of the 5S ribosomal RNA gene repeat of *Trypanosoma brucei*. *Mol.Biochem.Parasitol.* **17**, 321–330 (1985).

146. Schimanski, B., Nguyen, T. N. & Gunzl, A. Characterization of a multisubunit transcription factor complex essential for spliced-leader RNA gene transcription in *Trypanosoma brucei*. *MolCell Biol* **25**, 7303–7313 (2005).
147. Velez-Ramirez, D. E. *et al.* BRF1, a subunit of RNA polymerase III transcription factor TFIIIB, is essential for cell growth of *Trypanosoma brucei*. *Parasitology* **142**, 1563–1573 (2015).
148. Umaer, K. & Williams, N. Kinetoplastid Specific RNA-Protein Interactions in *Trypanosoma cruzi* Ribosome Biogenesis. *PLoS.ONE*. **10**, e0131323 (2015).
149. Hashem, Y. *et al.* High-resolution cryo-electron microscopy structure of the *Trypanosoma brucei* ribosome. *Nature* **494**, 385–389 (2013).
150. Martinez-Calvillo, S., Saxena, A., Green, A., Leland, A. & Myler, P. J. Characterization of the RNA polymerase II and III complexes in *Leishmania major*. *Int.J.Parasitol.* **37**, 491–502 (2007).
151. Schimanski, B., Nguyen, T. N. & Gunzl, A. Highly efficient tandem affinity purification of trypanosome protein complexes based on a novel epitope combination. *Eukaryot.Cell* **4**, 1942–1950 (2005).
152. Beverley, S. M. & Clayton, C. E. Transfection of *Leishmania* and *Trypanosoma brucei* by electroporation. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* **21**, 333–348 (1993).
153. Andrews, N. C. & Faller, D. V. A rapid micropreparation technique for extraction of DNA-binding proteins from limiting numbers of mammalian cells. *Nucleic Acids Res.* **19**, 2499 (1991).
154. Moir, R. D. & Willis, I. M. Regulation of pol III transcription by nutrient and stress signaling pathways. *Biochim.Biophys.Acta* **1829**, 361–375 (2013).

155. Hitchcock, R. A., Zeiner, G. M., Sturm, N. R. & Campbell, D. A. The 3' termini of small RNAs in *Trypanosoma brucei*. *FEMS MicrobiolLett* **236**, 73–78 (2004).
156. White, R. J. Transcription by RNA polymerase III: more complex than we thought. *Nat.Rev.Genet.* **12**, 459–463 (2011).
157. Dieci, G., Bosio, M. C., Fermi, B. & Ferrari, R. Transcription reinitiation by RNA polymerase III. *Biochim.Biophys.Acta* **1829**, 331–341 (2013).
158. Peacock, C. S. *et al.* Comparative genomic analysis of three *Leishmania* species that cause diverse human disease. *Nat.Genet.* **39**, 839–847 (2007).
159. Downing, T. *et al.* Whole genome sequencing of multiple *Leishmania donovani* clinical isolates provides insights into population structure and mechanisms of drug resistance. *Genome Res* **21**, 2143–2156 (2011).
160. Rogers, M. B. *et al.* Chromosome and gene copy number variation allow major structural change between species and strains of *Leishmania*. *Genome Res* **21**, 2129–2142 (2011).
161. Raymond, F. *et al.* Genome sequencing of the lizard parasite *Leishmania tarentolae* reveals loss of genes associated to the intracellular stage of human pathogenic species. *Nucleic Acids Res* **40**, 1131–1147 (2012).
162. Padmanabhan, P. K., Samant, M., Cloutier, S., Simard, M. J. & Papadopoulou, B. Apoptosis-like programmed cell death induces antisense ribosomal RNA (rRNA) fragmentation and rRNA degradation in *Leishmania*. *Cell Death Differ.* **19**, 1972–1982 (2012).
163. Sharwood, R. E., Hotto, A. M., Bollenbach, T. J. & Stern, D. B. Overaccumulation of the chloroplast antisense RNA AS5 is correlated with decreased abundance of 5S rRNA in vivo and inefficient 5S rRNA maturation in vitro. *RNA N. Y. N* **17**, 230–243 (2011).

164. Alsford, S. & Horn, D. Elongator Protein 3b Negatively Regulates Ribosomal DNA Transcription in African Trypanosomes. *MolCell Biol* (2011). doi:10.1128/MCB.01026-10
165. Zeng, H. *et al.* Involvement of calmodulin and calmodulin-like proteins in plant responses to abiotic stresses. *Front Plant Sci* **6**, 600 (2015).
166. Beauparlant, M. A. & Drouin, G. Multiple independent insertions of 5S rRNA genes in the spliced-leader gene family of trypanosome species. *Curr.Genet.* **60**, 17–24 (2014).
167. Nakaar, V., Gunzl, A., Ullu, E. & Tschudi, C. Structure of the *Trypanosoma brucei* U6 snRNA gene promoter. *Mol.Biochem.Parasitol.* **88**, 13–23 (1997).
168. Padilla-Mejia, N. E. *et al.* Gene organization and sequence analyses of transfer RNA genes in Trypanosomatid parasites. *BMC.Genomics* **10**, 232 (2009).
169. Liao, J. Y. *et al.* Deep sequencing of human nuclear and cytoplasmic small RNAs reveals an unexpectedly complex subcellular distribution of miRNAs and tRNA 3' trailers. *PLoS.ONE.* **5**, e10563 (2010).
170. Haussecker, D. *et al.* Human tRNA-derived small RNAs in the global regulation of RNA silencing. *RNA.* **16**, 673–695 (2010).
171. Hofmann, J. *et al.* The *Dictyostelium discoideum* 5S rDNA is organized in the same transcriptional orientation as the other rDNAs. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* **191**, 558–564 (1993).
172. Thompson, M., Haeusler, R. A., Good, P. D. & Engelke, D. R. Nucleolar clustering of dispersed tRNA genes. *Science* **302**, 1399–1401 (2003).
173. Highett, M. I., Beven, A. F. & Shaw, P. J. Localization of 5 S genes and transcripts in *Pisum sativum* nuclei. *JCell Sci* **105 (Pt 4)**, 1151–1158 (1993).

174. Matera, A. G., Frey, M. R., Margelot, K. & Wolin, S. L. A perinucleolar compartment contains several RNA polymerase III transcripts as well as the polypyrimidine tract-binding protein, hnRNP I. *JCell Biol* **129**, 1181–1193 (1995).
175. Hochstrasser, M. & Sedat, J. W. Three-dimensional organization of *Drosophila melanogaster* interphase nuclei. II. Chromosome spatial organization and gene regulation. *JCell Biol* **104**, 1471–1483 (1987).
176. Ogbadoyi, E., Ersfeld, K., Robinson, D., Sherwin, T. & Gull, K. Architecture of the *Trypanosoma brucei* nucleus during interphase and mitosis. *Chromosoma* **108**, 501–513 (2000).
177. López-Velázquez, G. *et al.* Electron microscopy analysis of the nucleolus of *Trypanosoma cruzi*. *Microsc. Microanal. Off. J. Microsc. Soc. Am. Microbeam Anal. Soc. Microsc. Soc. Can.* **11**, 293–299 (2005).
178. Weisenberger, D. & Scheer, U. A possible mechanism for the inhibition of ribosomal RNA gene transcription during mitosis. *JCell Biol* **129**, 561–575 (1995).
179. Mylona, A. *et al.* Structure of the tau60/Delta tau91 subcomplex of yeast transcription factor IIIC: insights into preinitiation complex assembly. *Mol. Cell* **24**, 221–232 (2006).
180. Dumay-Odelot, H. *et al.* Identification, molecular cloning, and characterization of the sixth subunit of human transcription factor TFIIC. *J. Biol. Chem.* **282**, 17179–17189 (2007).

10. APÉNDICE

10.1 Artículo para la obtención del grado:

Moreno Campos, R., Florencio-Martínez, L. E., Nepomuceno-Mejía, T., Rojas-Sánchez, S., Vélez Ramírez, D. E., Padilla-Mejía, N. E., Figueroa-Angulo, E., Manning-Cela, R. & Martínez-Calvillo, S. Molecular Characterization of 5S ribosomal RNA genes and transcripts in the protozoan parasite *Leishmania major*. *Parasitology*. (2016).

Molecular characterization of 5S ribosomal RNA genes and transcripts in the protozoan parasite *Leishmania major*

RODRIGO MORENO-CAMPOS¹, LUIS E. FLORENCIO-MARTÍNEZ¹,
TOMÁS NEPOMUCENO-MEJÍA¹, SAÚL ROJAS-SÁNCHEZ¹,
DANIEL E. VÉLEZ-RAMÍREZ¹, NORMA E. PADILLA-MEJÍA¹,
ELISA FIGUEROA-ANGULO¹, REBECA MANNING-CELA² and
SANTIAGO MARTÍNEZ-CALVILLO^{1*}

¹ Unidad de Biomedicina, Facultad de Estudios Superiores Iztacala, Universidad Nacional Autónoma de México, Av. De los Barrios 1, Col. Los Reyes Iztacala, Tlalnepantla, Edo. de México, CP 54090, México

² Departamento de Biomedicina Molecular, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN, Av. IPN 2508, México, D.F., CP 07360, México

(Received 18 February 2016; revised 31 August 2016; accepted 1 September 2016)

SUMMARY

Eukaryotic 5S rRNA, synthesized by RNA polymerase III (Pol III), is an essential component of the large ribosomal subunit. Most organisms contain hundreds of 5S rRNA genes organized into tandem arrays. However, the genome of the protozoan parasite *Leishmania major* contains only 11 copies of the 5S rRNA gene, which are interspersed and associated with other Pol III-transcribed genes. Here we report that, in general, the number and order of the 5S rRNA genes is conserved between different species of *Leishmania*. While in most organisms 5S rRNA genes are normally associated with the nucleolus, combined fluorescent *in situ* hybridization and indirect immunofluorescence experiments showed that 5S rRNA genes are mainly located at the nuclear periphery in *L. major*. Similarly, the tandemly repeated 5S rRNA genes in *Trypanosoma cruzi* are dispersed throughout the nucleus. In contrast, 5S rRNA transcripts in *L. major* were localized within the nucleolus, and scattered throughout the cytoplasm, where mature ribosomes are located. Unlike other rRNA species, stable antisense RNA complementary to 5S rRNA is not detected in *L. major*.

Key words: 5S rRNA, Pol III transcription, *Leishmania*, gene expression.

INTRODUCTION

In all living organisms, the 5S ribosomal RNA (rRNA) is an integral component of the ribosome. It forms part of the large ribosomal subunit, together with the 28S and 5·8S rRNAs and around 50 proteins. Although the 5S rRNA has been studied for more than 50 years, its precise function in protein synthesis has not been totally elucidated. However, recent data indicate that the 5S rRNA links together and coordinates all of the functional centres of the ribosome (Dinman, 2005). 5S rRNA also regulates the signalling pathways that couple cell proliferation with ribosome production (Sloan *et al.* 2013), and may function as a wrench-like RNA chaperone before completely integrating into the native 60S subunit as a structural entity (Leidig *et al.* 2014).

Eukaryotic organisms usually contain from 100 to 1000 copies of the 5S rRNA genes (Torres-Machorro *et al.* 2010). However, *Plasmodium falciparum* possesses only three copies, whereas the ciliated

protozoan *Euplotes eurystomus* contains about a million copies (Roberson *et al.* 1989). In most cases, 5S rRNA genes are organized as tandem head-to-tail arrays in one or several loci, but 5S rRNA genes can also be randomly scattered in the genome. RNA polymerase III (Pol III) is responsible for the synthesis of 5S rRNA, while RNA polymerase I (Pol I) produces the 18S, 5·8S and 28S rRNA molecules. 5S rRNA genes possess a type 1 intragenic promoter, which in *Xenopus laevis* and other organisms consists of a box A, an intermediate element (IE) and a box C. These three elements constitute the internal control region (ICR) (Schramm and Hernandez, 2002). The ICR is recognized by transcription factor TFIIA, a protein that contains nine zinc fingers. The TFIIA–DNA complex recruits TFIIC, which in turn promotes the binding of TFIIB and Pol III (Acker *et al.* 2013; Moir and Willis, 2013). Transcription of the 5S rRNA gene terminates within a T tract located downstream of the coding region. Consequently, the 3' end of the transcript contains several U residues that have to be removed in order to generate a mature and functional 5S rRNA (van *et al.* 2000; van Spaendonk *et al.* 2001). As it is transcribed, the 5S rRNA acquires a distinctive secondary structure that is highly conserved throughout nature. Immediately

* Corresponding author: Unidad de Biomedicina, Facultad de Estudios Superiores Iztacala, Universidad Nacional Autónoma de México, Av. De los Barrios 1, Col. Los Reyes Iztacala, Tlalnepantla, Edo. de México, CP 54090, México. E-mail: scalv@campus.iztacala.unam.mx

after transcription, the La protein interacts transiently with the U residues present in the 3' end of the 5S rRNA, to protect it from exonuclease digestion (Wolin and Cedervall, 2002). Then, ribosomal proteins L5 and L11 associate with the 5S rRNA to form the 5S ribonucleoprotein (RNP), which migrates to the nucleolus to participate in large ribosomal subunit assembly. In *Xenopus* oocytes, 5S rRNA is stored in the cytoplasm as 7S RNPs that contain TFIIIA, or as 42S RNPs that contain tRNAs and the thesaurin proteins (Viel *et al.* 1991).

Little is known about 5S rRNA and ribosome biogenesis in the early-diverging eukaryote *Leishmania major*, the causative agent of cutaneous leishmaniasis in the Old World. The genome of this trypanosomatid parasite contains only 11 copies of the 5S rRNA gene, which are interspersed and associated with other Pol III-transcribed genes (Ivens *et al.* 2005). Interestingly, out of the three transcription factors required for 5S rRNA transcription, only TFIIIB has been identified in *Leishmania* and other trypanosomatids (Ivens *et al.* 2005; Schimanski *et al.* 2005a; Velez-Ramirez *et al.* 2015). Here we report that the number and genomic organization of 5S rRNA genes are conserved among different *Leishmania* species. In contrast to most organisms, in *L. major* 5S rRNA genes are disseminated all over the nucleus and do not seem to be associated with the nucleolus. A similar distribution of 5S rRNA genes was observed in related parasite *Trypanosoma cruzi*. By contrast, 5S rRNA transcripts in *L. major* were localized within the nucleolus, and dispersed in the cytoplasm.

MATERIALS AND METHODS

Bioinformatic analysis

Information for sequence analysis and synteny maps of the different species of *Leishmania* (*L. major*, *L. mexicana*, *L. braziliensis*, *L. infantum* and *L. tarentolae*) was obtained from the TriTrypDB databases (<http://tritrypdb.org/tritrypdb/>) (Release 26). The basic local alignment search tool (BLAST) was used to identify non-annotated 5S rRNA genes and pseudogenes. Sequence comparisons were performed using the DNAMAN program (version 7). To locate or verify the presence and identity of tRNA genes, the tRNAscan-SE program was used (<http://lowelab.ucsc.edu/tRNAscan-SE/>). The consensus secondary structure of 5S rRNA was predicted with the RNAalifold web server (<http://rna.tbi.univie.ac.at/cgi-bin/RNAalifold.cgi>).

Northern blot analysis

Northern blot experiments were performed as previously described (Rojas-Sánchez *et al.* 2016). The 5S rRNA probe corresponds to oligonucleotide 5S

rRNA-R1 (5'-GAGTACGGCACTCAGGGTT), and the antisense probe corresponds to oligonucleotide 5SrRNA-F1 (5'-GAGTACGACCACACTT GAGTG).

Plasmid constructs

Three DNA fragments from *L. major* were amplified by polymerase chain reaction (PCR) and cloned into pGEM-T Easy vector (Promega, Fitchburg, USA). For plasmid p5SrRNA, a 118 bp fragment (from +1 to +118 in relation to the transcription start site of the 5SrRNA genes) was amplified with oligonucleotides 5SrRNA-F1 (5'-GAGTACGACCACACTT GAGTG) and 5SrRNA-R1 (5'-GAGTACGGCACTCAGGGTT). For the p5SrRNA344 vector, a 344 bp fragment (from -31 to +313 in relation to the transcription start site of the *LmjF15-5SrRNA.01* gene) was amplified with oligonucleotides Lm15-rRNA5S 5' (5'-GAAAGC ATCTCTGTGGGTTCGA) and Lm15-rRNA5S 3' (5'-CCCGGG GTCCTGCAATG). For vector pRegionE, a 120 bp fragment from *LmjF.06-0600* (that encodes a hypothetical protein) was amplified with oligonucleotides Lm15-rRNA5S 5' (5'-GAAAGCATCTCTGTGGGTTCGA) and Lm15-rRNA5S 3' (5'-CCCGGGGTCCTGCAATG). The PTP tag consists of Protein A (ProtA) and Protein C (ProtC) epitopes separated by a tobacco etch virus protease cleavage site (Schimanski *et al.* 2005b). To obtain the pB6-PTP vector, the calmodulin-binding site (CBS) present in pB6-TAP (Martinez-Calvillo *et al.* 2007) was replaced with the ProtC epitope. To do so, pB6-TAP was digested with *Xba*I and *Nhe*I and the CBS was eliminated by agarose gel electrophoresis. The ProtC sequence was obtained by annealing primers ProtC-sense (5'-CTAGAGGTTCCGAC GCGAAGATCAGGTGGATCCTCGTCTTA TTGATGGGAAATATGATATTCCAAC TAC TG) and ProtC-antisense (5'-CTAGCAGTAG TTGGAATATCATATTTCCCATCAATAAGAC GAGGATCCACCTGATCTTTCGCCGTCGGA ACCT), which contain *Xba*I and *Nhe*I restriction sites at the ends. The ProtC fragment was then cloned into the pB6-TAP backbone. To obtain vector pElp3b-PTP, the RPB6 gene present in pB6-PTP was replaced with the *L. major* Elp3b gene (*LmjF.23-1350*). To prepare the pB6-PTP backbone, the vector was digested with *Xma*I and *Xba*I and the RPB6 gene fragment was eliminated by agarose gel electrophoresis. The Elp3b gene was PCR-amplified from genomic DNA with oligonucleotides ELP3-AgeI-5' (5'-ATACCGGTATG TCCGACCACGCCGACAT) and ELP3-*Xba*I-3' (5'-ATTCTAGAGGGTGTGTTCTTGTGGAA CC). The PCR product was cloned into pGEM-T Easy vector (Promega, Fitchburg, USA), digested with *Age*I and *Xba*I and ligated into the pB6-PTP

backbone. To obtain plasmid pCold-LmNop56, the entire Nop56 gene from *L. major* (LmNop56) was amplified with primers LmNop56-KpnI-F (5'-GGTACCATGTTCGAGAACGCTGTACA) and LmNop56-XbaI-R (5'-TCTAGACCCGGACTCAGAGGCGGC), cloned into pGEM-T Easy and then subcloned into the *KpnI* and *XbaI* restriction sites of the pCold1 expression vector (Takara Bio Inc., Shiga, Japan). All constructs were verified by sequencing.

Cell culture and transfection

Promastigotes from *L. major* MHOM/IL/81/Friedlin (LSB-132-1) were grown in BM medium (1 × M199 medium pH 7.2 containing 10% heat-inactivated fetal bovine serum, 9.5 g L⁻¹ brain heart infusion broth (Sigma, St. Louis, USA), 40 mM 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid (HEPES), 0.01 mg mL⁻¹ haemin, 0.0002% biotin, 100 IU mL⁻¹ penicillin, 100 µg mL⁻¹ streptomycin and 1 × L-glutamine) at 26 °C and harvested in the mid-log phase. Epimastigotes of *T. cruzi* CL Brener were maintained in LIT (liver infusion-tryptose) medium containing 10% heat-inactivated fetal bovine serum, 50 IU mL⁻¹ penicillin, 50 µg mL⁻¹ streptomycin and 0.025 mg mL⁻¹ haemin at 28 °C. To obtain an *L. major* cell line that expresses a PTP-tagged version of the nucleolar protein Elp3b, wild-type *L. major* cells were transfected by electroporation with the pElp3b-PTP vector. Electroporation and cell plating were performed as previously described (Beverley and Clayton, 1993). Briefly, 4 × 10⁷ promastigotes in 0.4 mL electroporation buffer (25 mM HEPES, 120 mM KCl, 0.15 mM CaCl₂, 5 mM MgCl₂, 10 mM KH₂PO₄, 10 mM K₂HPO₄, 2 mM EDTA, pH 7.6) were transfected with 10 µg of pElp3b-PTP by electroporation at 1600 V, 50 µF and 25 Ω (BTX Electro Square Porator ECM 830, Holliston, USA). Cells were grown for 24 h before spreading on plates containing 0.7% Seaplaque GTG agarose (FMC Bioproducts) in BM medium with 50 µg mL⁻¹ G418. Some of the isolated colonies were selected for further analysis.

5' Rapid Amplification of cDNA Ends (5'-RACE) analysis

In order to locate the transcription start site of the *L. major* 5S rRNA genes, 5'-RACE experiments were performed with 4 µg of total RNA with a kit from Life Technologies, Inc. The first strand cDNA was synthesized with primer 5SrRNA-R1 (5'-GAGTACGGCACTCAGGGTT), and the PCR amplifications were performed with the nested primer 5SrRNA-R2 (5'-CCCGAGTCATCAC TGACCTCAG) and nested Abridged Anchor Primer, AAP (5'-GGCCACGCGTCGACTAG TACGGGIIGGGIIGGGIIG). The nested PCR

products were cloned into the pGEM-T Easy vector (Promega, Fitchburg, USA) and sequenced.

RT-PCR analysis

Transcription termination sites for 5S rRNA genes were mapped by poly(A) tailing of total RNA. For this purpose, 4 µg of total RNA were mixed with 1 µL of 25 mM ATP, 2 µL of 5 × poly (A) polymerase reaction buffer (USB, Cleveland, USA) and 1200 units of yeast poly (A) polymerase (USB, Cleveland, USA) in a final volume of 20 µL. The mixture was incubated for 20 min at 37 °C, and the reaction was terminated by heating at 65 °C for 10 min. The cDNA was prepared with oligonucleotide Nested(dT) (5'-CCTCTGAAGGTTTCACGGATCCACATCTAGATTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT VN). The first PCR amplification was done with primers 5SrRNA-F1 and primer B1 (5'-CCTCTGAAGGTTTCACGGAT), and the second PCR with primers 5SrRNA-F2 (5'-TGAAAACA CCATATCCCGT) and primer B2 (5'-CACGGA TCCACATCTAGAT). The nested PCR products were cloned into the pGEM-T Easy vector (Promega, Fitchburg, USA) and sequenced.

DNA-fluorescent *in situ* hybridization (FISH) combined with indirect immunofluorescence

For the experiments with *L. major*, a cellular line that expresses the nucleolar recombinant protein Elp3b-PTP was used. For the DNA-FISH assay, 1 × 10⁶ mid-log cells were harvested, washed twice with phosphate buffer solution (PBS) and spread into a poly-L-lysine coated glass slide. Cells were fixed with 4% paraformaldehyde for 30 min at 4 °C, permeabilized with 0.1% Triton X-100 for 5 min at room temperature, and washed with PBS. The DNA probe was denatured in hybridization buffer (50% deionized formamide, 300 mM NaCl, 20 mM NaH₂PO₄, 2 mM EDTA, 10% dextran sulphate, 250 µg mL⁻¹ herring salmon sperm DNA) at 95 °C for 10 min. Finally, sealed in a plastic frame, the probe was incubated for 10 min at 80 °C, and then for 16 h at 37 °C. The seal was removed and the slides were first washed with 50% formamide and 2 × saline sodium citrate (SSC) buffer for 30 min at 37 °C; and then with 1 ×, 2 × and 3 × SSC buffer for 10 min at 37 °C each. SSC buffer 20 × contains 3 M NaCl in 0.3 M sodium citrate (pH 7.0). The slides were incubated with streptavidin Alexa Fluor 568 conjugate (1:1500 dilution, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) in blocking buffer (150 mM NaCl, 100 mM maleic acid, 0.1% Tween-20) for 30 min. Finally, two washes with PBS and 0.05% Tween-20 for 5 min and one wash with PBS were made prior the mounting with Vectashield with 4', 6-diamidino-2-

phenylindole (DAPI) solution (Vector Laboratories, Burlingame, CA). DNase or RNase control treatments were done after permeabilization using 6 U of DNase I (RNase-free) (Thermo Scientific, Waltham, USA) for 1 h at 37 °C; or 20 µg RNase A (Promega, Fitchburg, USA) for 30 min at 37 °C. The 344-bp probe (from -31 to +313 in relation to the transcription start site of the *LmjF15.5SrRNA.01* gene) was amplified by PCR from the p5SrRNA344 plasmid with oligonucleotides Lm15-rRNA5S 5' and Lm15-rRNA5S 3' and was labelled with Biotin-High Prime (Roche). To continue with the indirect immunofluorescence, after the final wash with PBS, cells were fixed with 4% paraformaldehyde for 30 min at 4 °C, washed twice with PBS and permeabilized with 0.1% nonidet P-40. Cells were blocked with 2% bovine serum albumin (BSA) for 30 min and incubated with rabbit anti-Protein C polyclonal antibody (Delta Biolabs, Muraoka Drive Gilroy, CA, USA) diluted at 1:25 with blocking solution for 1 h at room temperature, and washed with PBS. Next, cells were incubated with a secondary goat anti-rabbit antibody conjugated with Alexa Fluor 488 (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) diluted at 1:300 with blocking solution at room temperature for 1 h, and washed with PBS for 10 min. Finally, cells were mounted with Vectashield-DAPI solution (Vector Laboratories, Burlingame, CA). Images were obtained using a Carl Zeiss AX10 microscope and analysed with the ZEN 2012 software (Blue edition). The experiments with *T. cruzi* were performed as described above, using wild-type epimastigotes, the LmNop56 polyclonal antibody (diluted at 1:100) and goat anti-mouse antibody conjugated with Alexa Fluor 488 (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) (diluted at 1:300).

RNA-FISH combined with indirect immunofluorescence

An antisense RNA probe, complementary to the 5S rRNA, was generated by *in vitro* transcription using the MEGAshortscript T7 kit (Ambion) with biotin-11-UTP (Ambion) following the manufacturer's instructions. The template DNA was a PCR product obtained from vector p5SrRNA with oligonucleotide 5SrRNA-F1 and a T7-promoter primer. Promastigotes from the *L. major* cellular line that expresses the recombinant protein Elp3b-PTP were harvested, spread in glass slides, permeabilized and washed as indicated in the 'DNA-FISH' section. The RNA probe (4 ng) was denatured at 70 °C for 5 min in hybridization buffer with 40 U of RiboLock RNase Inhibitor (Thermo Scientific, Waltham, USA). Slides were sealed in plastic frames and hybridized for 16 h at 40 °C. The slides were washed with 50% formamide and 2 × SSC for 15 min at 42 °C, and were incubated with

streptavidin Alexa Fluor 568 conjugate (1:1000 dilution, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) in PBS for 1 h at room temperature. Finally, the slides were washed in 2 × SSC for 10 min and were mounted in Vectashield-DAPI solution (Vector Laboratories, Burlingame, CA). DNase and RNase control treatments were also performed after permeabilization. In some experiments, indirect immunofluorescence was performed before the RNA-FISH assay. In such cases, cells were harvested, spread in glass slides, permeabilized and washed as indicated in the 'DNA-FISH' section. Cells were then incubated with rabbit anti-Protein C polyclonal antibody (Delta Biolabs, Muraoka Drive Gilroy, CA, USA) diluted at 1:20 in 0.5% BSA for 30 min at room temperature and washed with PBS. Cells were then incubated with a secondary goat anti-rabbit antibody conjugated with Alexa Fluor 488 (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) diluted at 1:300 with blocking solution at room temperature for 30 min washed twice with PBS to continue with the hybridization with the RNA probe.

Production of LmNop56 polyclonal antibody

Escherichia coli BL21 (DE3) competent cells were transformed with the pCold-LmNop56 construct. Expression of LmNop56 recombinant protein (LmNop56r) was induced with 1 mM IPTG (isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside) at 37 °C for 18 h. The LmNop56r protein was purified by affinity chromatography with Ni-Sepharose 6 Fast Flow matrix (GE Healthcare, Little Chalfont, England) following the manufacturer's instructions. Six-week-old male BALB-C mice were immunized intravenously with purified LmNop56r (100 µg) mixed with TiterMax Gold adjuvant (Sigma, St. Louis, USA) at a 1:1 (ratio). Pre-immune normal mouse serum was collected before inoculation. Serum was collected 6 weeks after antigen immunization. The specificity of the anti-LmNop56 polyclonal antibody was confirmed by the Western blot analysis against LmNop56r and parasite protein extracts.

RESULTS

Sequence and genomic analysis of 5S rRNA genes in L. major

The *L. major* genome possesses only 11 copies of the 5S rRNA gene, which are interspersed on six different chromosomes (5, 9, 11, 15, 21 and 23) and associated with other Pol III-transcribed genes (Ivens *et al.* 2005). At their 5' end, 10 of the 5S rRNA genes are flanked by a tRNA gene located at a short distance (between 51 and 73 bp) (Fig. 1A). The remaining 5S rRNA gene (*LmjF.21.5SrRNA.02*) contains a protein-coding gene at its 5' end. At their 3' end,

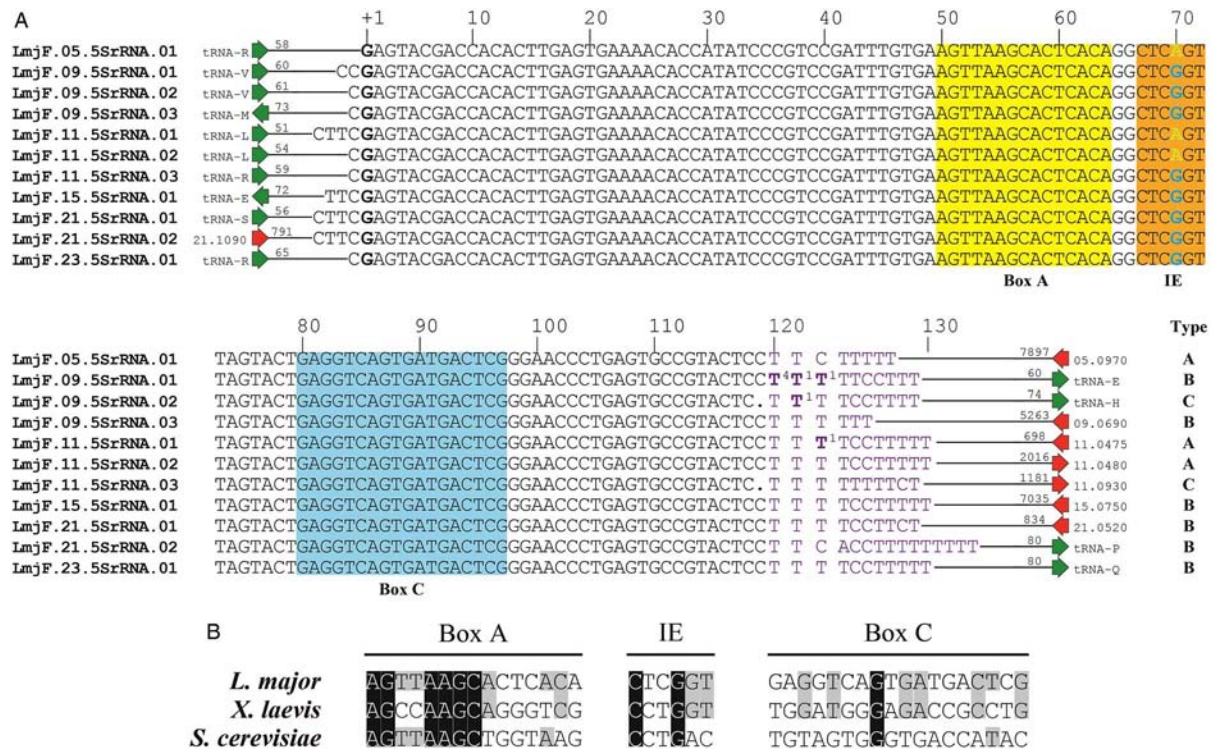


Fig. 1. Sequence analysis of 5S rRNA genes in *L. major*. (A) Sequence alignment of the 11 5S rRNA genes present in *L. major*, as annotated in the TriTrypDB databases. Flanking tRNA genes (green arrows) and protein-coding genes (red arrows) are indicated. The numbers specify the distance (in bp) between the 5S rRNA gene and flanking genes. The G shown in bold type (position +1) corresponds to the transcription start site mapped by 5'-RACE analysis. At the 3' end, the clusters of Ts are shown in purple. T residues in bold type denote the transcription termination sites located by RT-PCR, specifying the number of clones found at each position. The locations of putative box A, intermediate element (IE) and box C are shown. Genes were classified as types A, B and C, as indicated. (B) Sequence alignment of putative internal control elements (box A, IE and box C) in *L. major*, *X. laevis* and *S. cerevisiae*. Nucleotides conserved in the three species are denoted by black shading, while nucleotides conserved between *L. major* and *X. laevis* or *S. cerevisiae* are indicated by grey shading.

most 5S rRNA genes are flanked by a protein-coding gene, which is separated from the 5S rRNA gene by long distances ranging from 698 to 7897 bp (Fig. 1A).

According to the TriTrypDB databases, the length of the eleven *L. major* 5S rRNA genes fluctuates from 119 to 123 bp. A sequence alignment showed that these size variations are due to differences in the assigned first nucleotide of the genes (Fig. 1A). Also, two of the genes lack a C in the 3' end of the gene. The rest of the sequence is identical, with the exception of base +70, which can be either a G or an A (Fig. 1A). In order to determine if there is actually variation in the 5' end of the 5S rRNA genes, a 5'-RACE experiment was carried out. All the clones analysed started at the G that is labelled as +1 in Fig. 1A, which strongly suggests that transcription of the 5S rRNA genes initiates in that nucleotide. Transcription of 5S rRNA genes in *T. cruzi* and *Trypanosoma brucei* is reported to initiate at a G located in the same position (Lenardo *et al.* 1985; Hernandez-Rivas *et al.* 1992). Thus, the eleven *L. major* 5S rRNA genes can be classified into three groups: type A genes (119 bp long) contain an A at position 70 and two Cs in the 3' end; type B genes

(119 bp long) possess a G at base 70 and two Cs in the 3' end; and type C genes (118 bp long) contain a G at position 70 and one C in the 3' end (Fig. 1A).

A cluster of several T residues acts as a signal to terminate Pol III transcription (Moir and Willis, 2013). Sequence analysis revealed that all the 5S rRNA genes in *L. major* contain a run of 6–11 Ts at the 3' end (Fig. 1A). One gene (*LmjF.09.5SrRNA.03*) has a continuous cluster of six T residues, while the rest of the genes contain discontinuous T tracts that are interrupted by one or several Cs. A common feature in Pol III-transcribed genes is the presence of a second cluster of Ts that acts as a potential 'backup' termination signal (Braglia *et al.* 2005). In *L. major*, only one of the 5S rRNA genes (*LmjF.21.5SrRNA.02*) possesses a backup T-run (Figs 1A and S1).

To determine the transcription termination sites on 5S rRNA genes in *L. major*, RT-PCR was performed. As expected, transcription of the 5S rRNA genes ends within the cluster of Ts located downstream of the genes (Fig. 1A). Several clones ended at the C located immediately before the T cluster, most likely representing the mature 3' end of the

L. major 5S rRNA. In *T. brucei*, the mature 3' terminus of the 5S rRNA was mapped in a similar position (Hitchcock *et al.* 2004). Interestingly, we identified transcripts from the three types of 5S rRNA genes present in *L. major*, which showed that at least one copy of types A, B and C genes is transcribed in exponentially growing promastigotes.

The ICR in 5S rRNA genes in *X. laevis* and *Saccharomyces cerevisiae* consists of a box A, an IE and a box C (White, 2011; Dieci *et al.* 2013). Sequence analysis of the 5S rRNA genes in *L. major* allowed us to identify putative homologues of these three promoter elements (Fig. 1B). *Leishmania major* box A is very similar to *S. cerevisiae* box A, as nine out of 15 nucleotides are conserved. In contrast, the IE from *L. major* is more similar to the IE from *X. laevis* than to the one from *S. cerevisiae*: four out of six nucleotides are conserved between *L. major* and *X. laevis*, while two bases are conserved between *L. major* and *S. cerevisiae*. The least conserved promoter element is box C, as seven out of 18 bases are conserved between *L. major* and *X. laevis*, and only two bases are conserved between *L. major* and *S. cerevisiae* (Fig. 1B). Notably, base +70, which is the only internal nucleotide that is variable among 5S rRNA genes, lies within the IE (Fig. 1A). Thus, the occurrence of a change within the ICR in 5S rRNA genes suggests that differential regulation of Pol III transcription is feasible in *L. major*.

It was reported that *Leishmania* and *T. brucei* produce natural antisense RNAs complementary to 18S, 5·8S and 28S rRNA molecules. Although their function is not known, they associate with polyribosomes, and programmed cell death induces their fragmentation (Padmanabhan *et al.* 2012). Also, chloroplasts from *Arabidopsis thaliana* and other plants produce an antisense 5S rRNA that inhibits 5S rRNA maturation (Sharwood *et al.* 2011). To explore if antisense 5S rRNA transcripts are generated in *L. major*, Northern blot analyses with strand-specific oligonucleotides were performed. Interestingly, while an abundant 5S rRNA of the expected size (~120 bases) was observed, no antisense 5S rRNA transcripts were detected (data not shown). Thus, unlike other rRNA molecules in *Leishmania* and 5S rRNA in chloroplasts, stable antisense RNA complementary to 5S rRNA is not detected in *L. major*.

Synteny of 5S rRNA genes in *Leishmania* species

To determine the number of 5S rRNA genes in other species of *Leishmania*, we analysed the genome databases of *L. mexicana* U1103, *L. braziliensis* M2904, *L. infantum* JPCM5 and *L. tarentolae* Parrot-TarII (Peacock *et al.* 2007; Downing *et al.* 2011; Rogers *et al.* 2011; Raymond *et al.* 2012). Eleven 5S rRNA genes are annotated in *L. mexicana*,

seven genes in *L. infantum* and six genes in *L. braziliensis*. In *L. tarentolae* no single 5S rRNA gene is annotated. However, BLAST searches in the genome databases allowed us to identify several 5S rRNA genes in *L. tarentolae* and additional genes or pseudogenes in the other species (Fig. 2).

Sequence comparisons showed that 5S rRNA genes are conserved in the different *Leishmania* species (Fig. S1, panels A and B). As the G at position +1 is present in all the genes, we considered this base as the first nucleotide for all the genes. The last base of each 5S rRNA gene was established as the nucleotide located right before the T cluster. With these parameters, we found that the length of the genes ranged from 108 to 125 bases. However, five of the annotated genes seem to actually correspond to pseudogenes, since they lack parts of the ICR and/or present several changes all along the sequence: the gene located on Chr5 in *L. infantum* (108 bp), and four genes in *L. braziliensis* (the gene on Chr5, gene 1 on Chr9, gene 3 on Chr11 and the gene on Chr15) (Fig. S2). Thus, the number of authentic 5S rRNA genes seems to be: 11 genes in *L. major* and *L. mexicana*, 10 genes in *L. tarentolae* and nine genes in *L. braziliensis* and *L. infantum*.

Overall, the sequence of the 5S rRNA genes in *Leishmania* is highly conserved (Fig. S1, panel A). Remarkably, the most variable position is nucleotide +70, which is located within the IE. As mentioned earlier, in *L. major* it can be either a G or an A. In *L. mexicana*, *L. braziliensis* and *L. tarentolae* nucleotide +70 is always an A, while in *L. infantum* it is a C in five genes and an A in four genes (Fig. S1, panel A). The order of the 5S rRNA genes is conserved between *L. major* and *L. mexicana*, as they are flanked by syntenic protein-coding genes and tRNA genes (Fig. 2). *L. infantum* does not contain the gene located on Chr15 in the other species. The majority of the 5S rRNA genes in *L. braziliensis* show synteny with the other species of *Leishmania*. However, *L. braziliensis* possesses two 5S rRNA genes that are not present in any other *Leishmania* species: one located on Chr31 and one whose chromosomal location has not been determined yet (Fig. 2). *L. tarentolae* does not contain genes 1 and 2 on Chr11 and the gene on Chr15, but possesses additional 5S rRNA genes on Chr9 (gene 2) and Chr33 (Fig. 2).

The vast majority of 5S rRNA genes in the different *Leishmania* species contain a tRNA gene at their 5' end. It is worth noting that several non-annotated tRNA genes were identified in these loci with the tRNAscan-SE search server (marked with an asterisk in Fig. 2). All the 5S rRNA genes in the different species of *Leishmania* contain a cluster of several T residues at the 3' end (Fig. S1, panels A and B). Most genes have discontinuous T tracts that are interrupted by up to three nucleotides, which predominantly are Cs. Interestingly, four

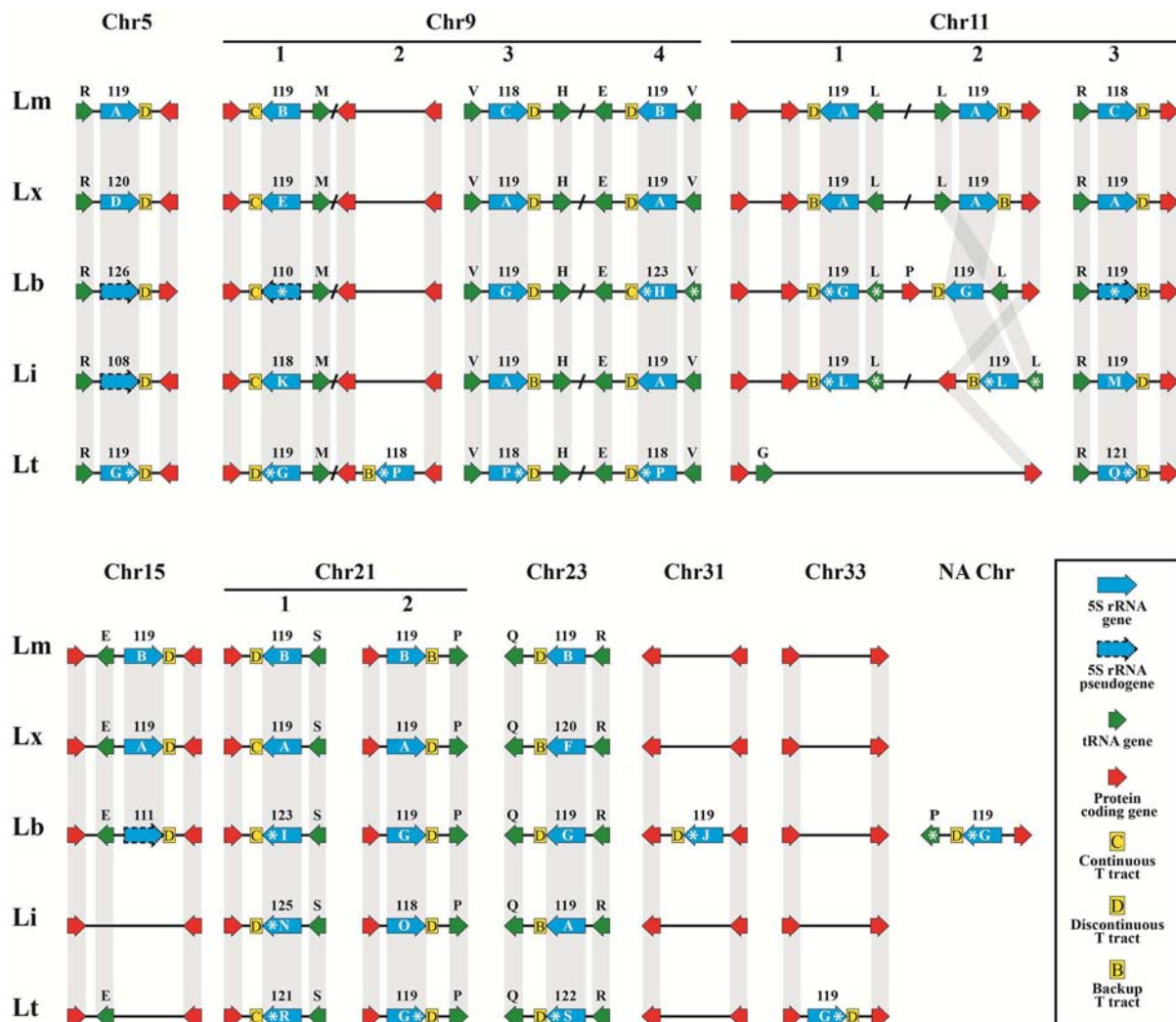


Fig. 2. Synteny of 5S rRNA genes in different species of *Leishmania*. The genomic context of 5S rRNA genes is presented for *L. major* (Lm), *L. mexicana* (Lx), *L. braziliensis* (Lb), *L. infantum* (Li) and *L. tarentolae* (Lt). Orthologous genes are joined by grey lines. Chromosome location is indicated on top of each individual synteny map, except for a 5S rRNA gene in Lb, whose chromosomal location has not been assigned yet (NA Chr). The number above each 5S rRNA gene (blue arrows) denotes the length of the gene (in bp). The type of 5S rRNA gene (A-S) is indicated inside each blue arrow. Putative 5S rRNA pseudogenes are shown as blue arrows bordered by dashed lines. The type of T cluster at the 3' end of each 5S rRNA gene is indicated: continuous T tract (C), discontinuous T tract (D) and backup T tract (B). For tRNA genes (green arrows), the corresponding amino acid is indicated (R=Arg, M=Met, V=Val, H=His, E=Glu, L=Leu, S=Ser, P=Pro, G=Gly and Q=Gln). Protein-coding genes are shown as red arrows. Genes that are not annotated in the TriTrypDB databases are labelled with an asterisk (*). Figure is not to scale.

copies of the 5S rRNA genes in *L. infantum* have a backup T cluster.

5S rRNA genes are located in the nuclear periphery

To investigate the nuclear distribution of 5S rRNA genes in promastigotes from *L. major*, FISH assays were performed with a biotin-labelled dsDNA probe, and incubating with streptavidin Alexa Fluor 568 conjugate. The probe clearly detected the 5S rRNA genes as several bright spots localized in the nuclear periphery or scattered throughout the nucleus (which was stained with DAPI) (Fig. 3A). In order to determine the localization of 5S rRNA genes with respect to the nucleolus,

an *L. major* cell line that expresses a PTP-tagged version of the nucleolar protein Elp3b (Alsford and Horn, 2011) was obtained (see the 'Materials and Methods' section). Conjugated FISH and indirect immunofluorescence experiments were carried out in this cell line. These experiments showed that in most cells 5S rRNA genes are not associated with the nucleolus (Fig. 3B). In contrast, nucleolar colocalization of 18S rRNA genes and Elp3b was observed, as expected (Fig. 3C). DNase and RNase treatment controls were used to confirm the specific binding of the probe to DNA. As expected, after DNase treatment 5S rRNA-gene signal was abolished (as well as DAPI signal), but after RNase treatment the

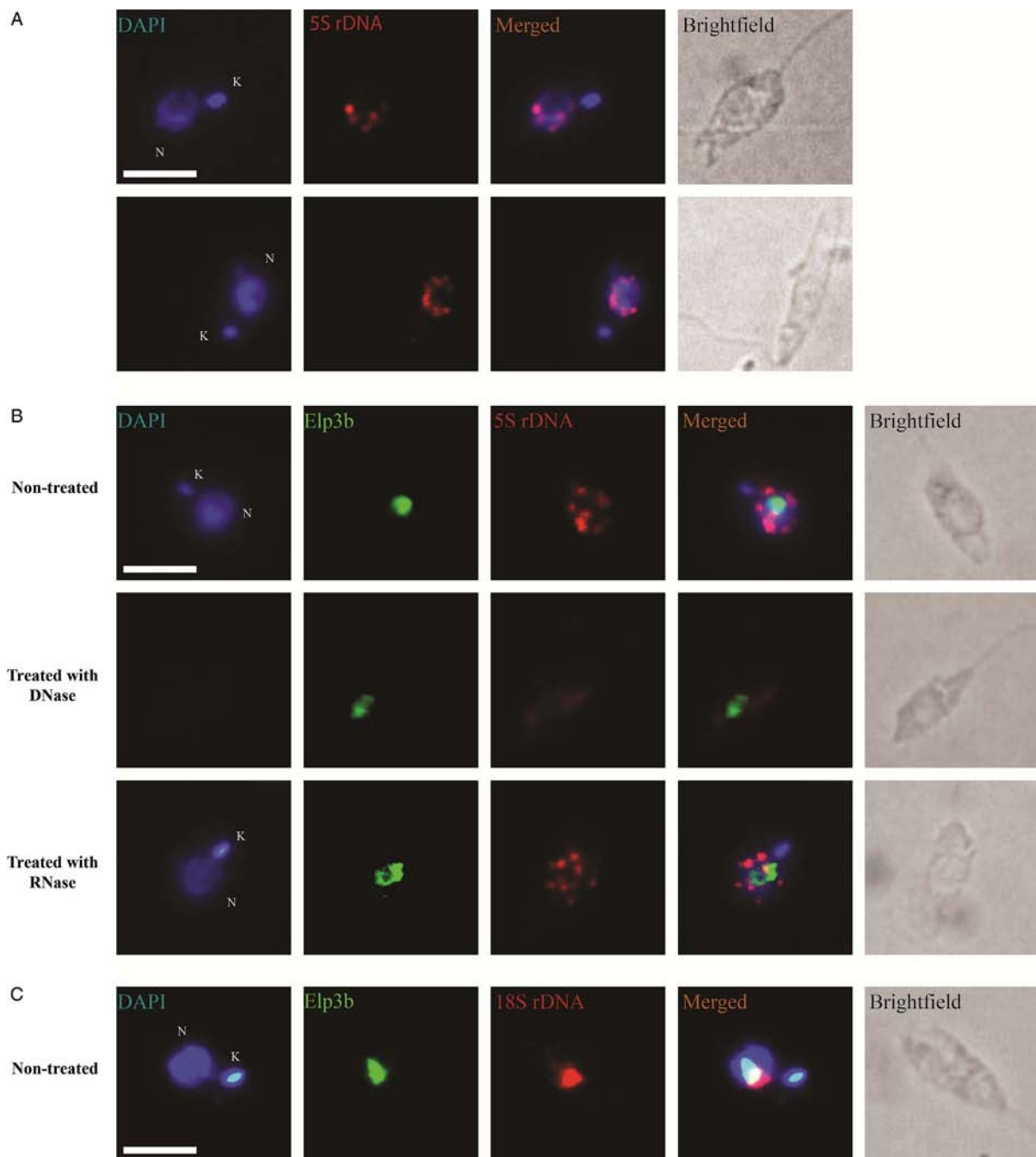


Fig. 3. 5S rRNA genes in *L. major* are located in the nuclear periphery. (A) DNA-FISH experiments using a 5S rRNA-gene probe (red). Nuclei (N) and kinetoplast (K) were stained with DAPI (blue). Cells from two independent experiments are shown. (B) DNA-FISH coupled with immunofluorescence using a 5S rRNA-gene probe (red), and an anti-protein C antibody to detect a PTP-tagged version of the nucleolar protein Elp3b (green). Control treatments with DNase and RNase are shown. (C) DNA-FISH coupled with immunofluorescence using an 18S rRNA-gene probe (red) and an anti-protein C antibody to detect the recombinant protein Elp3b-PTP (green). Size bars represent 2 μm .

fluorescent spots were still clearly detected. Thus, these data show that the 5S rRNA genes present in *L. major* are mainly distributed in the nuclear periphery (Fig. 3B).

In *T. cruzi*, 5S rRNA genes are organized as tandem arrays in two different chromosomes (Hernandez-Rivas *et al.* 1992). To determine the nuclear distribution of these genes in epimastigotes, we performed FISH experiments with a biotin-

labelled dsDNA probe. Similarly to *L. major*, several bright spots were distributed throughout the nucleus (Fig. 4A). To analyse the localization of 5S rRNA genes with respect to the nucleolus, conjugated FISH and indirect immunofluorescence experiments were carried out with an antibody directed against the nucleolar protein 56 (Nop56). As shown in Fig. 4B, 5S rRNA genes in *T. cruzi* epimastigotes do not seem to associate with the

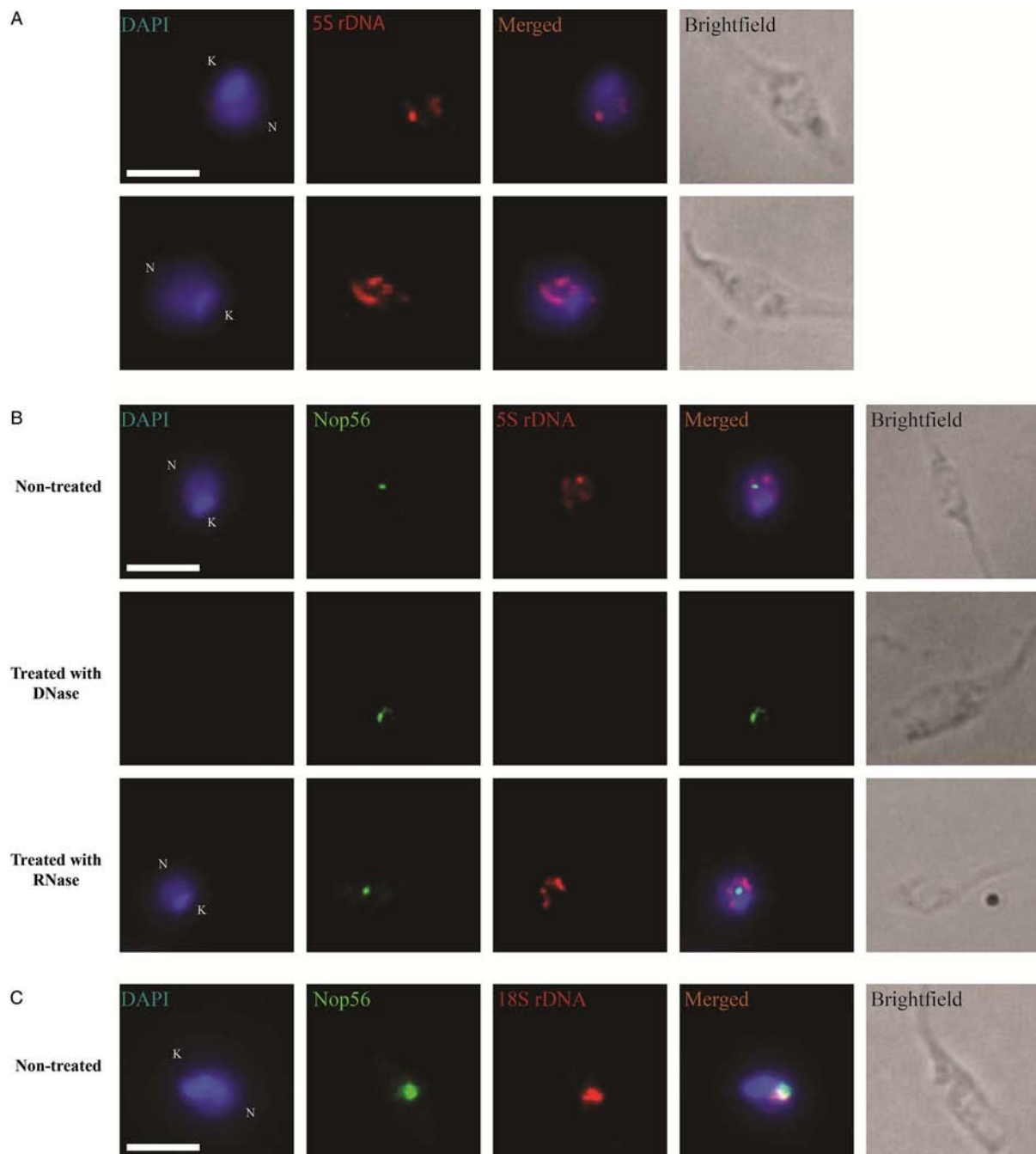


Fig. 4. 5S rRNA genes in *T. cruzi* are dispersed in the nucleus. (A) DNA-FISH experiments using a 5S rRNA-gene probe (red). Nuclei (N) and kinetoplast (K) were stained with DAPI (blue). Cells from two independent experiments are shown. (B) DNA-FISH coupled with immunofluorescence using a 5S rRNA-gene probe (red), and an antibody against the nucleolar protein Nop56 (green). Control treatments with DNase and RNase are shown. (C) DNA-FISH coupled with immunofluorescence using an 18S rRNA-gene probe (red), and an antibody to detect Nop56 (green). Size bars represent 2 μ m.

nucleolus. Thus, regardless of whether 5S rRNA genes are scattered in the genome or organized as tandem arrays, they are apparently not associated with the nucleolus in trypanosomatids.

5S rRNA is located in the nucleolus and cytoplasm

The subcellular localization of *L. major* 5S rRNA was determined by FISH analysis. In these

experiments, a biotinylated antisense riboprobe was transcribed *in vitro* and coupled with fluorescent streptavidin to detect the 5S rRNA transcripts. The hybridization produced a discrete and large spot in the nucleus, as well as strong fluorescence dispersed throughout the cytoplasm (Fig. 5A). By combining FISH and immunofluorescence assays we demonstrated that the 5S rRNA and Elp3b signals colocalize, showing that the 5S rRNA transcripts are

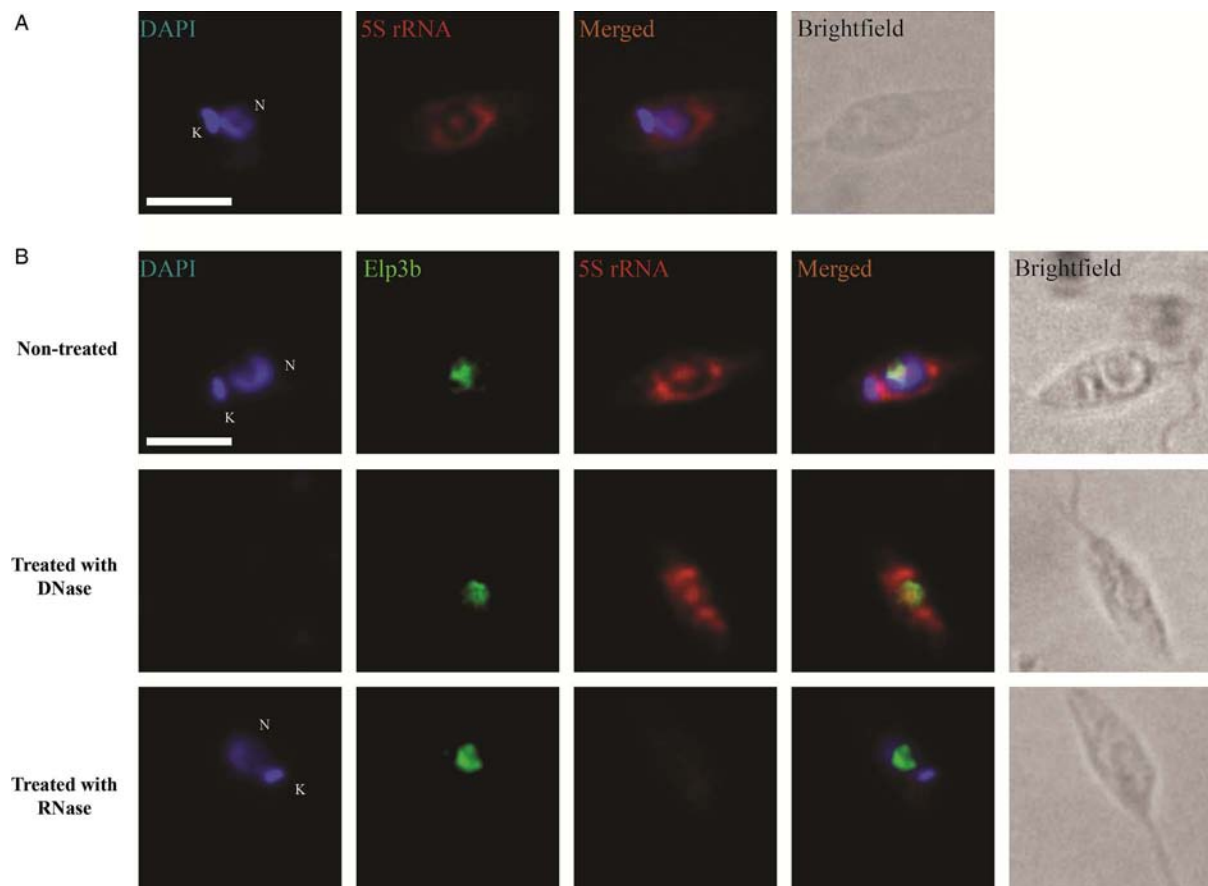


Fig. 5. 5S rRNA transcripts are located in the nucleolus and the cytoplasm. (A) RNA-FISH assay using a biotinylated antisense riboprobe (red) complementary to the 5S rRNA. Nuclei (N) and kinetoplast (K) were stained with DAPI (blue). (B) RNA-FISH coupled with immunofluorescence using an antisense 5S rRNA riboprobe (red), and an anti-protein C antibody to detect a PTP-tagged version of the nucleolar protein Elp3b (green). Control treatments with DNase and RNase are shown. Size bars represent 2 μm .

localized in the nucleolus (Fig. 5B). The observed cytoplasmic signal, which is stronger in the areas around the nucleus, most likely corresponds to 5S rRNA present in ribosomes that are distributed all over the cytoplasm. As expected, 5S rRNA signal was not affected in control FISH experiments with cells pretreated with DNase. By contrast, no signal was detected in the control treatment with RNase (Fig. 5B).

DISCUSSION

Our analysis indicates that the genus *Leishmania* is characterized by the presence of a small number of 5S rRNA genes, which ranges from nine genes in *L. braziliensis* and *L. infantum* to 11 genes in *L. major* and *L. mexicana*. Interestingly, in the species that lack a 5S rRNA gene there is in some cases a degenerate sequence (pseudogene) in the corresponding region of synteny (Fig. 2), as has been reported previously for protein-coding genes in *Leishmania* (Peacock *et al.* 2007; Rogers *et al.* 2011). It is worth noting that the orientation of all 5S rRNA genes is conserved across *Leishmania* species, with

the exception of gene 2 on Chr11, which is inverted in *L. braziliensis* and *L. infantum* (Fig. 2). While in *Leishmania* the 5S rRNA genes are dispersed as independent copies throughout the genome, in the different species of the genus *Trypanosoma* they are tandemly repeated, and in some species they are linked to the spliced-leader genes, transcribed by Pol II (Torres-Machorro *et al.* 2010; Beauparlant and Drouin, 2014). It was estimated that *T. brucei* and *T. cruzi* possess approximately 1500 copies of the 5S rRNA gene (Hasan *et al.* 1984; Hernandez-Rivas *et al.* 1992). Thus, the number and genomic organization of 5S rRNA genes is highly variable between *Leishmania* and *Trypanosoma*. In order to determine the genomic context of 5S rRNA genes in other trypanosomatids, we analysed the genome databases of *Crithidia fasciculata*, *Leptomonas seymouri* and *Endotrypanum monterogeii*. While only one 5S rRNA gene was found in *C. fasciculata*, no single gene was identified in *L. seymouri*, which probably indicates that these genome databases are incomplete. On the other hand, 14 different 5S rRNA genes were found in *E. monterogeii*. Interestingly, some of these 5S rRNA genes are

dispersed as single genes (such as in *Leishmania*), whereas other genes are organized in tandem arrays that contain up to four genes (such as in *Trypanosoma*) (data not shown). Analyses of genome sequences from other trypanosomatids, not available at present time, will help understand the evolution of 5S rRNA genes in this group of early-branched eukaryotes.

In *L. major*, 5S rRNA genes can be grouped into three types (A–C), and RT–PCR analysis showed that at least one gene of each type is transcribed in exponentially growing promastigotes (Fig. 1A). A total of 19 different types (A to S) of 5S rRNA genes are present in the five *Leishmania* species analysed (showing 3–6 types per species) (Figs 2 and S1). Type A is the most widespread, as it is represented by eight genes in *L. mexicana*, three genes in *L. major* and three genes in *L. infantum*. Type G corresponds to six genes in *L. braziliensis* and four genes in *L. tarentolae* (Fig. S1, panel C). Most of the other types are represented by a single 5S rRNA gene. Prediction of the consensus secondary structure of the 5S rRNA genes in *Leishmania* shows that it consists of five helices (I–V), two hairpin loops (C and D), two internal loops (B and E) and a hinge region (A), which are organized in a three-helix junction (Fig. S3), as reported in other organisms (Szymanski *et al.* 2016). The variable nucleotide +70 is positioned within helix V, and it base-pairs with nucleotide +105. In most genes, an A at position +70 base-pairs with a U at position +105. However, it is interesting to note that two 5S rRNA genes in *L. infantum* that possess a C at nucleotide +70 contain a G at base +105, so that base complementarity is maintained. Position +12 is also variable, but it is located in loop A (Fig. S3).

Conserved internal promoter elements most likely control transcription of 5S rRNA genes in *Leishmania* (Fig. 1). Interestingly, the vast majority of 5S rRNA genes in these parasites are preceded by a tRNA gene located at a short distance. Thus, it is tempting to hypothesize that, in addition to the internal promoter elements, boxes A and B from the neighbour tRNA gene might participate in the transcriptional regulation of 5S rRNA, as has been reported for snRNA genes in trypanosomatids (Nakaar *et al.* 1994; Rojas-Sánchez *et al.* 2016). A cluster of T residues of variable length, frequently followed by a backup T-cluster, was found on every single 5S rRNA gene in the different species of *Leishmania* analysed (Fig. S1). A second T stretch is also common in tRNA genes in trypanosomatids (Padilla-Mejia *et al.* 2009). In other organisms, transcripts that end within the backup T tract contain long 3' trailer regions, whose processing to create mature RNAs generates small RNA molecules that may play functional roles. In human and other vertebrates, for instance, small RNAs derived from tRNA 3' trailers accumulate in the cytoplasm,

where they participate in the regulation of gene silencing and might be involved in other biological functions (Haussecker *et al.* 2010; Liao *et al.* 2010). It would be interesting to determine if stable 5S rRNA and/or tRNA 3' trailers are produced in *Leishmania* and if they participate in gene regulation.

Combined DNA-FISH and indirect immunofluorescence experiments showed that the 11 5S rRNA genes present in *L. major* are mainly located at the nuclear periphery (Fig. 3). In *T. cruzi*, 5S rRNA genes were observed as bright spots distributed throughout the nucleus (Fig. 4). Interestingly, most genes in *L. major* and *T. cruzi* do not seem to be located within the nucleolus or at the nucleolar periphery. A similar result was reported for 5S rRNA genes in *T. brucei* (Ersfeld and Gull, 1997). However, this is different from what has been found in *S. cerevisiae* and *Dictyostelium*, where 5S rRNA genes are linked to the rRNA units (that contain the 18S, 5.8S and 28S rRNA genes) and are consequently nucleolar (Hofmann *et al.* 1993; Thompson *et al.* 2003). Nevertheless, association of 5S rRNA genes and the nucleolus has been observed in several species where the 5S rRNA genes are not linked to the rRNA unit in the linear DNA (Haeusler and Engelke, 2006). For instance, in the plant *Pisum sativum*, which has around 5000 copies of the 5S rRNA genes organized in six tandem arrays, a clear association of at least one of the arrays with the nucleolar periphery was observed (Highett *et al.* 1993). Also, 5S rRNA genes in human cells were often located at the nucleolar periphery (Matera *et al.* 1995). It has been hypothesized that the 5S rRNA genes that are associated with the nucleolus are most actively transcribed, producing transcripts at the nucleolus where they are needed (Highett *et al.* 1993). However, in *Drosophila melanogaster*, 5S rRNA genes do not seem to be located in the vicinity of the nucleolus (Hochstrasser and Sedat, 1987). It is worth noting that the observed distribution of 5S rRNA genes in *L. major* resembles the nuclear spreading reported for BRF1, a subunit of Pol III transcription factor TFIIIB, in *T. brucei* (Velez-Ramirez *et al.* 2015).

For the purpose of associating with pre-ribosomes, 5S rRNAs are expected to locate at the nucleolus at some point. In accord with this fact, combined RNA-FISH and indirect immunofluorescence assays demonstrated that the 5S rRNA colocalizes with the nucleolar protein Elp3b (Fig. 5), which shows that the 5S rRNA transcripts are localized in the nucleolus in *L. major*. Nevertheless, 5S rRNA was also found to be scattered in the cytoplasm, especially in the areas near the nucleus, where mature ribosomes are located. A similar nucleolar and cytoplasmic distribution has been reported for 5S rRNA and 28S rRNA in vertebrates (Matera *et al.* 1995; Weisenberger and Scheer, 1995), and for 18S rRNA in *T. brucei* (Chaves *et al.* 1998). It

is worth noting that there is a substantial difference between the patterns observed for the 5S rRNA and the Elp3b protein (Fig. 5). In trypanosomatids, the nucleolus has a bipartite structure, as it is composed of a dense fibrillar component (that seems to include the fibrillar centres) and a granular component (Ogbadoyi *et al.* 2000; López-Velázquez *et al.* 2005). While 5S rRNA is expected to locate into the granular component, where pre-ribosome assembly occurs, Elp3b would be localized in the dense fibrillar component, the sites of active Pol I transcription in trypanosomatids.

In conclusion, in the present study we have shown that the genus *Leishmania* presents a small number of 5S rRNA genes, whose sequence and genomic organization is conserved. Our results also demonstrate that 5S rRNA genes in *L. major* are mainly located at the nuclear periphery, and not associated with the nucleolus, as has been reported in most species. A similar localization was observed for the tandemly repeated 5S rRNA genes in *T. cruzi*. By contrast, 5S rRNA transcripts in *L. major* were localized within the nucleolus, and scattered throughout the cytoplasm. Thus, our results significantly increase the knowledge of 5S rRNA genes and Pol III transcription in an early-branched eukaryote.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

The supplementary material for this article can be found at <http://dx.doi.org/10.1017/S0031182016001712>

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Javier R. Ambrosio, Luis F. Jiménez-García and Rosaura Hernández-Rivas for fruitful discussions and Ana M. Cevallos-Gaos for critical reading of the manuscript. We also thank Rossana Arroyo and Jaime Ortega López for the pCold1 vector. This work is one of the requirements to obtain the PhD degree in Posgrado en Ciencias Biológicas (UNAM) for Rodrigo Moreno-Campos, who was the recipient of doctoral fellowships from CONACyT (Fellowship 257038, CVU 288471) and CEP/UNAM (302114072).

FINANCIAL SUPPORT

This work was supported by grants 251831 from CONACyT, IN210712 and IN214715 from PAPIIT (UNAM) to S. Martínez-Calvillo and by grants 132312 and 139898 from CONACyT to R. Manning-Cela.

REFERENCES

Acker, J., Conesa, C. and Lefebvre, O. (2013). Yeast RNA polymerase III transcription factors and effectors. *Biochimica et Biophysica Acta* **1829**, 283–295.

Alsford, S. and Horn, D. (2011). Elongator protein 3b negatively regulates ribosomal DNA transcription in African trypanosomes. *Molecular and Cellular Biology* **31**, 1822–1832.

Beauparlant, M. A. and Drouin, G. (2014). Multiple independent insertions of 5S rRNA genes in the spliced-leader gene family of trypanosome species. *Current Genetics* **60**, 17–24.

Beverley, S. M. and Clayton, C. E. (1993). Transfection of *Leishmania* and *Trypanosoma brucei* by electroporation. *Methods in Molecular Biology* **21**, 333–348.

Braglia, P., Percudani, R. and Dieci, G. (2005). Sequence context effects on oligo(dT) termination signal recognition by *Saccharomyces cerevisiae* RNA polymerase III. *The Journal of Biological Chemistry* **280**, 19551–19562.

Chaves, I., Zomerdijk, J., Dirks-Mulder, A., Dirks, R. W., Raap, A. K. and Borst, P. (1998). Subnuclear localization of the active variant surface glycoprotein gene expression site in *Trypanosoma brucei*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**, 12328–12333.

Dieci, G., Bosio, M. C., Fermi, B. and Ferrari, R. (2013). Transcription reinitiation by RNA polymerase III. *Biochimica et Biophysica Acta* **1829**, 331–341.

Dinman, J. D. (2005). 5S rRNA: structure and function from head to toe. *International Journal of Biomedical Science* **1**, 2–7.

Downing, T., Imamura, H., Decuyper, S., Clark, T. G., Coombs, G. H., Cotton, J. A., Hilley, J. D., de, D. S., Maes, I., Mottram, J. C., Quail, M. A., Rijal, S., Sanders, M., Schonian, G., Stark, O., Sundar, S., Vanaerschot, M., Hertz-Fowler, C., Dujardin, J. C. and Berriman, M. (2011). Whole genome sequencing of multiple *Leishmania donovani* clinical isolates provides insights into population structure and mechanisms of drug resistance. *Genome Research* **21**, 2143–2156.

Ersfeld, K. and Gull, K. (1997). Partitioning of large and minichromosomes in *Trypanosoma brucei*. *Science* **276**, 611–614.

Haeusler, R. A. and Engelke, D. R. (2006). Spatial organization of transcription by RNA polymerase III. *Nucleic Acids Research* **34**, 4826–4836.

Hasan, G., Turner, M. J. and Cordingley, J. S. (1984). Ribosomal RNA genes of *Trypanosoma brucei*: mapping the regions specifying the six small ribosomal RNAs. *Gene* **27**, 75–86.

Haussecker, D., Huang, Y., Lau, A., Parameswaran, P., Fire, A. Z. and Kay, M. A. (2010). Human tRNA-derived small RNAs in the global regulation of RNA silencing. *RNA* **16**, 673–695.

Hernández-Rivas, R., Martínez-Calvillo, S., Romero, M. and Hernández, R. (1992). *Trypanosoma cruzi* 5S rRNA genes: molecular cloning, structure and chromosomal organization. *FEMS Microbiology Letters* **71**, 63–67.

Hightett, M. I., Beven, A. F. and Shaw, P. J. (1993). Localization of 5 S genes and transcripts in *Pisum sativum* nuclei. *Journal of Cell Science* **105**, 1151–1158.

Hitchcock, R. A., Zeiner, G. M., Sturm, N. R. and Campbell, D. A. (2004). The 3' termini of small RNAs in *Trypanosoma brucei*. *FEMS Microbiology Letters* **236**, 73–78.

Hochstrasser, M. and Sedat, J. W. (1987). Three-dimensional organization of *Drosophila melanogaster* interphase nuclei. II. Chromosome spatial organization and gene regulation. *Journal of Cell Biology* **104**, 1471–1483.

Hofmann, J., Winckler, T., Hanenkamp, A., Bukenberger, M., Schumann, G., Marschalek, R. and Dinger, T. (1993). The *Dictyostelium discoideum* 5S rDNA is organized in the same transcriptional orientation as the other rDNAs. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **191**, 558–564.

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., Ciarlioni, L., Clayton, C., Coulson, R. M., Cronin, A., Cruz, A. K., Davies, R. M., De, G. J. *et al.* (2005). The genome of the kinetoplastid parasite, *Leishmania major*. *Science* **309**, 436–442.

Leidig, C., Thoms, M., Holdermann, I., Bradatsch, B., Berninghausen, O., Bange, G., Sinning, I., Hurt, E. and Beckmann, R. (2014). 60S ribosome biogenesis requires rotation of the 5S ribonucleoprotein particle. *Nature Communications* **5**, 3491.

Lenardo, M. J., Dorfman, D. M., Reddy, L. V. and Donelson, J. E. (1985). Characterization of the *Trypanosoma brucei* 5S ribosomal RNA gene and transcript: the 5S rRNA is a spliced-leader-independent species. *Gene* **35**, 131–141.

Liao, J. Y., Ma, L. M., Guo, Y. H., Zhang, Y. C., Zhou, H., Shao, P., Chen, Y. Q. and Qu, L. H. (2010). Deep sequencing of human nuclear and cytoplasmic small RNAs reveals an unexpectedly complex subcellular distribution of miRNAs and tRNA 3' trailers. *PLoS ONE* **5**, e10563.

López-Velázquez, G., Hernández, R., López-Villaseñor, I., Reyes-Vivas, H., Segura-Valdez, M. de L. and Jiménez-García, L. F.

- (2005). Electron microscopy analysis of the nucleolus of *Trypanosoma cruzi*. *Microscopy and Microanalysis: The Official Journal of Microscopy Society of America, Microbeam Analysis Society, Microscopical Society of Canada* **11**, 293–299.
- Martinez-Calvillo, S., Saxena, A., Green, A., Leland, A. and Myler, P. J.** (2007). Characterization of the RNA polymerase II and III complexes in *Leishmania major*. *International Journal for Parasitology* **37**, 491–502.
- Matera, A. G., Frey, M. R., Margelot, K. and Wolin, S. L.** (1995). A perinucleolar compartment contains several RNA polymerase III transcripts as well as the polypyrimidine tract-binding protein, hnRNP I. *Journal of Cell Biology* **129**, 1181–1193.
- Moir, R. D. and Willis, I. M.** (2013). Regulation of pol III transcription by nutrient and stress signaling pathways. *Biochimica et Biophysica Acta* **1829**, 361–375.
- Nakaar, V., Dare, A. O., Hong, D., Ullu, E. and Tschudi, C.** (1994). Upstream tRNA genes are essential for expression of small nuclear and cytoplasmic RNA genes in trypanosomes. *Molecular and Cellular Biology* **14**, 6736–6742.
- Ogbadoyi, E., Ersfeld, K., Robinson, D., Sherwin, T. and Gull, K.** (2000). Architecture of the *Trypanosoma brucei* nucleus during interphase and mitosis. *Chromosoma* **108**, 501–513.
- Padilla-Mejia, N. E., Florencio-Martinez, L. E., Figueroa-Angulo, E. E., Manning-Cela, R. G., Hernandez-Rivas, R., Myler, P. J. and Martinez-Calvillo, S.** (2009). Gene organization and sequence analyses of transfer RNA genes in Trypanosomatid parasites. *BMC Genomics* **10**, 232.
- Padmanabhan, P. K., Samant, M., Cloutier, S., Simard, M. J. and Papadopoulou, B.** (2012). Apoptosis-like programmed cell death induces antisense ribosomal RNA (rRNA) fragmentation and rRNA degradation in *Leishmania*. *Cell Death and Differentiation* **19**, 1972–1982.
- Peacock, C. S., Seeger, K., Harris, D., Murphy, L., Ruiz, J. C., Quail, M. A., Peters, N., Adlem, E., Tivey, A., Aslett, M., Kerhornou, A., Ivens, A., Fraser, A., Rajandream, M. A., Carver, T., Norbertczak, H., Chillingworth, T., Hance, Z., Jagels, K., Moule, S., Ormond, D., Rutter, S., Squares, R., Whitehead, S., Rabinowitsch, E., Arrowsmith, C., White, B., Thurston, S., Bringaud, F., Baldauf, S. L. et al.** (2007). Comparative genomic analysis of three *Leishmania* species that cause diverse human disease. *Nature Genetics* **39**, 839–847.
- Raymond, F., Boisvert, S., Roy, G., Ritt, J. F., Legare, D., Isnard, A., Stanke, M., Olivier, M., Tremblay, M. J., Papadopoulou, B., Ouellette, M. and Corbeil, J.** (2012). Genome sequencing of the lizard parasite *Leishmania tarentolae* reveals loss of genes associated to the intracellular stage of human pathogenic species. *Nucleic Acids Research* **40**, 1131–1147.
- Roberson, A. E., Wolffe, A. P., Hauser, L. J. and Olins, D. E.** (1989). The 5S RNA gene minichromosome of *Euplotes*. *Nucleic Acids Research* **17**, 4699–4712.
- Rogers, M. B., Hille, J. D., Dickens, N. J., Wilkes, J., Bates, P. A., Depledge, D. P., Harris, D., Her, Y., Herzyk, P., Imamura, H., Otto, T. D., Sanders, M., Seeger, K., Dujardin, J. C., Berriman, M., Smith, D. F., Hertz-Fowler, C. and Mottram, J. C.** (2011). Chromosome and gene copy number variation allow major structural change between species and strains of *Leishmania*. *Genome Research* **21**, 2129–2142.
- Rojas-Sánchez, S., Figueroa-Angulo, E., Moreno-Campos, R., Florencio-Martinez, L. E., Manning-Cela, R. G. and Martinez-Calvillo, S.** (2016). Transcription of *Leishmania major* U2 small nuclear RNA gene is directed by extragenic sequences located within a tRNA-like and a tRNA-Ala gene. *Parasites & Vectors* **9**, 401. doi: 10.1186/s13071-016-1682-3.
- Schimanski, B., Nguyen, T. N. and Gunzl, A.** (2005a). Characterization of a multisubunit transcription factor complex essential for spliced-leader RNA gene transcription in *Trypanosoma brucei*. *Molecular and Cellular Biology* **25**, 7303–7313.
- Schimanski, B., Nguyen, T. N. and Gunzl, A.** (2005b). Highly efficient tandem affinity purification of trypanosome protein complexes based on a novel epitope combination. *Eukaryotic Cell* **4**, 1942–1950.
- Schramm, L. and Hernandez, N.** (2002). Recruitment of RNA polymerase III to its target promoters. *Genes & Development* **16**, 2593–2620.
- Sharwood, R. E., Hottot, A. M., Bollenbach, T. J. and Stern, D. B.** (2011). Overaccumulation of the chloroplast antisense RNA AS5 is correlated with decreased abundance of 5S rRNA *in vivo* and inefficient 5S rRNA maturation *in vitro*. *RNA* **17**, 230–243.
- Sloan, K. E., Bohnsack, M. T. and Watkins, N. J.** (2013). The 5S RNP couples p53 homeostasis to ribosome biogenesis and nucleolar stress. *Cell Reports* **5**, 237–247.
- Szymanski, M., Zielezinski, A., Barciszewski, J., Erdmann, V. A. and Karlowski, W. M.** (2016). 5SRNadb: an information resource for 5S ribosomal RNAs. *Nucleic Acids Research* **44**, D180–D183.
- Thompson, M., Haeusler, R. A., Good, P. D. and Engelke, D. R.** (2003). Nucleolar clustering of dispersed tRNA genes. *Science* **302**, 1399–1401.
- Torres-Machorro, A. L., Hernandez, R., Cevallos, A. M. and Lopez-Villasenor, I.** (2010). Ribosomal RNA genes in eukaryotic microorganisms: witnesses of phylogeny? *FEMS Microbiology Reviews* **34**, 59–86.
- van, H. A., Lennertz, P. and Parker, R.** (2000). Three conserved members of the RNase D family have unique and overlapping functions in the processing of 5S, 5-8S, U4, U5, RNase MRP and RNase P RNAs in yeast. *EMBO Journal* **19**, 1357–1365.
- van Spaendonk, R. M., Ramesar, J., van, W. A., Eling, W., Beetsma, A. L., van Gemert, G. J., Hooghof, J., Janse, C. J. and Waters, A. P.** (2001). Functional equivalence of structurally distinct ribosomes in the malaria parasite, *Plasmodium berghei*. *The Journal of Biological Chemistry* **276**, 22638–22647.
- Velez-Ramirez, D. E., Florencio-Martinez, L. E., Romero-Meza, G., Rojas-Sanchez, S., Moreno-Campos, R., Arroyo, R., Ortega-Lopez, J., Manning-Cela, R. and Martinez-Calvillo, S.** (2015). BRF1, a subunit of RNA polymerase III transcription factor TFIIIB, is essential for cell growth of *Trypanosoma brucei*. *Parasitology* **142**, 1563–1573.
- Viel, A., le, M. M., Philippe, H., Morales, J., Mazabraud, A. and Denis, H.** (1991). Structural and functional properties of thesaurin a (42Sp50), the major protein of the 42 S particles present in *Xenopus laevis* previtellogenic oocytes. *Journal of Biological Chemistry* **266**, 10392–10399.
- Weisenberger, D. and Scheer, U.** (1995). A possible mechanism for the inhibition of ribosomal RNA gene transcription during mitosis. *Journal of Cell Biology* **129**, 561–575.
- White, R. J.** (2011). Transcription by RNA polymerase III: more complex than we thought. *Nature Reviews Genetics* **12**, 459–463.
- Wolin, S. L. and Cedervall, T.** (2002). The La protein. *Annual Review of Biochemistry* **71**, 375–403.

Figure S1. Sequence analysis of 5S rRNA genes in different species of *Leishmania*. **A)** Sequence alignment of the 5S rRNA genes present in *L. major* (Lm), *L. mexicana* (Lx), *L. braziliensis* (Lb), *L. infantum* (Li) and *L. tarentolae* (Lt). Genes are indicated by grey shading. The G shown in red (position +1) corresponds to the transcription start site mapped by 5'-RACE analysis in *L. major*. The putative last base of each gene is shown in bold type. At the 3' end, the clusters of Ts are shown in purple and underlined. The locations of putative box A, intermediate element (IE) and box C are indicated. The type of 5S rRNA gene is indicated. **B)** Characteristics of 5S rRNA genes and transcription termination signals in *Leishmania*. Termination types were classified as: continuous T-cluster (C), discontinuous T-cluster (D) or backup T-tract (B). All distances and lengths are indicated in base pairs. The genes that were identified in this work, and that do not have a TriTrypDB name, are marked with an asterisk. **C)** Frequency of the different types of 5S rRNA genes found in the species of *Leishmania*, as shown in panel A.

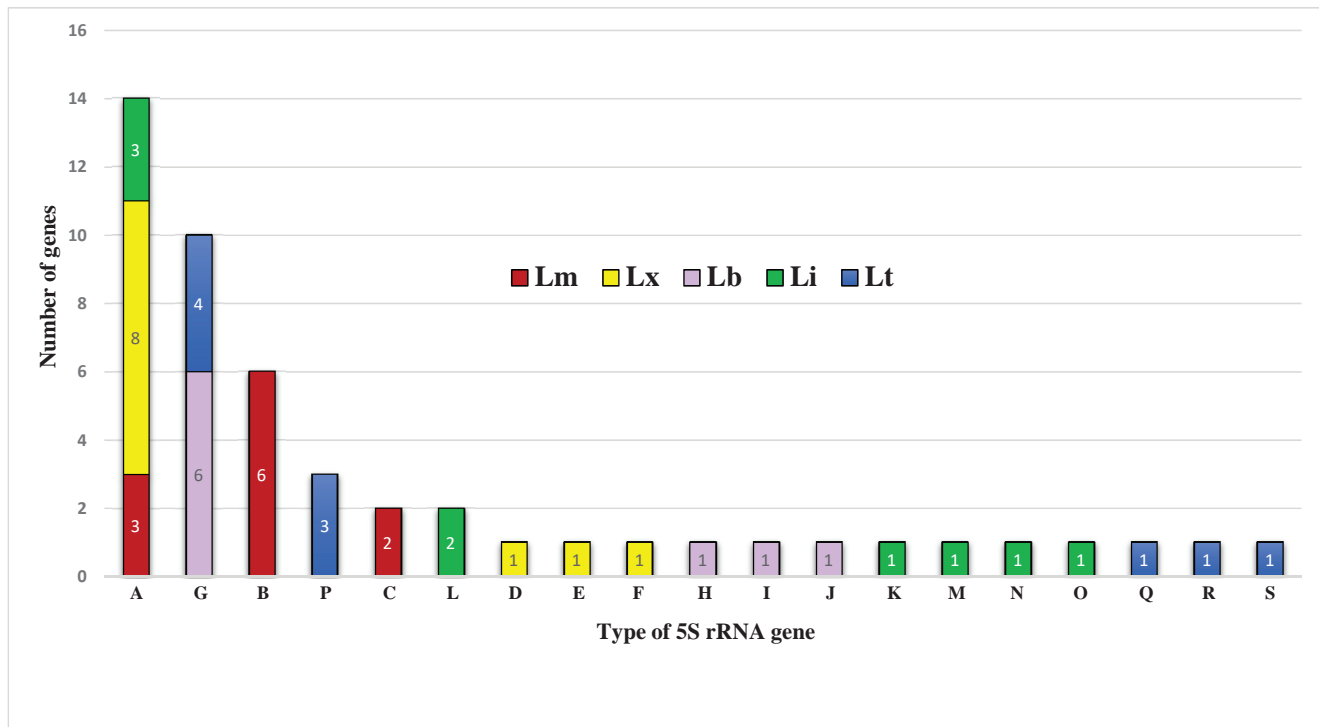
Figure S2. Sequence comparisons of a 5S rRNA gene in *L. major* (*LmjF.09.5SrRNA.01*) and putative 5S rRNA pseudogenes found in other species of *Leishmania*. LbrM.05.rRNA1, LbrM.15.rRNA1 and LinJ.05.rRNA2 are annotated in TriTrypDB as 5S rRNA genes. LbrM.09.Pseudo5S and LbrM.11.Pseudo5S were identified in this work. The TriTrypDB browser landmark is shown between parentheses for each pseudogene.

Figure S3. Predicted consensus secondary structure of 5S rRNA in *Leishmania*. The five helices (I-V) and five loops (A-E) are indicated. The position of the internal control region (Box A, IE and Box C) is also shown. The variable positions (+12, +70 and +105) are denoted.

B

	5SrRNA gene	TriTrypDB ID	Lenght	Strand	Position	Termination Type	Lenght of 1st T Cluster	Lenght of 2nd T Cluster	Distance between 1st & 2nd T cluster
	5	LmjF.05.5SrRNA.01	119	+	360083..360201	D	8	-	-
	9-1	LmjF.09.5SrRNA.03	119	-	277005..276887	C	6	-	-
	9-3	LmjF.09.5SrRNA.02	118	+	405671..405788	D	27	-	-
	9-4	LmjF.09.5SrRNA.01	119	-	418738..418620	D	14	-	-
Lm	11-1	LmjF.11.5SrRNA.01	119	-	156905..156787	D	11	-	-
	11-2	LmjF.11.5SrRNA.02	119	+	163008..163126	D	11	-	-
	11-3	LmjF.11.5SrRNA.03	118	+	381623..381740	D	16	-	-
	15	LmjF.15.5SrRNA.01	119	+	323210..323328	D	14	-	-
	21-1	LmjF.21.5SrRNA.01	119	-	166286..166168	D	10	-	-
	21-2	LmjF.21.5SrRNA.02	119	+	448851..448969	B	2	Avg: 9	4
	23	LmjF.23.5SrRNA.01	119	-	225680..225562	D	11	11.8	-
<hr/>									
	5	LmxM.05:rRNA:rfamscan:361991-362109	120	+	361991..362110	D	10	-	-
	9-1	LmxM.09:rRNA:rfamscan:251967-252085	119	-	252085..251967	C	7	-	-
	9-3	LmxM.09:rRNA:rfamscan:380921-381039	119	+	380921..381039	D	12	-	-
	9-4	LmxM.09:rRNA:rfamscan:391554-391672	119	-	391672..391554	D	6	-	-
Lx	11-1	LmxM.11:rRNA:rfamscan:157979-158097	119	-	158097..157979	B	5	4	12
	11-2	LmxM.11:rRNA:rfamscan:163755-163875	119	+	163755..163873	B	5	4	12
	11-3	LmxM.11:rRNA:rfamscan:361629-361747	119	+	361629..361747	D	12	-	-
	15	LmxM.15:rRNA:rfamscan:288997-289115	119	+	288997..289115	D	16	-	-
	21-1	LmxM.21:rRNA:rfamscan:156060-156178	119	-	156178..156060	C	4	-	-
	21-2	LmxM.21:rRNA:rfamscan:430811-430929	119	+	430811..430929	D	7	Avg: -	-
	23	LmxM.23:rRNA:rfamscan:217667-217785	120	-	217785..217666	B	5	8.09	5
<hr/>									
	9-3	LbrM.09.rRNA1	119	+	395413..395531	D	14	-	-
	9-4*	*	123	-	403745..403623	C	5	-	-
	11-1*	*	119	-	63370..63252	D	12	-	-
Lb	11-2	LbrM.11.rRNA1	119	-	68610..68492	D	12	-	-
	21-1*	*	123	-	159391..159269	C	5	-	-
	21-2	LbrM.21.rRNA1	119	+	430680..430798	D	7	-	-
	23	lbrM.23.rRNA1	119	-	215667..215549	D	11	-	-
	31*	*	119	-	965247..965129	D	16	Avg: -	-
	NA*	*	119	-	607851..607733	D	7	9.88	-
	<hr/>								
	9-1	LinJ.09.rRNA1	118	-	266769..266652	C	7	-	-
	9-3	LinJ.09.rRNA2	119	+	400163..400281	B	5	4	18
	9-4	LinJ.09.rRNA3	119	-	413091..412973	D	12	-	-
Li	11-1*	*	119	-	162781..162663	B	7	4	11
	11-2*	*	119	-	212062..211944	B	7	4	11
	11-3	LinJ.11.rRNA1	119	+	371388..371506	D	10	-	-
	21-1*	*	125	-	163366..163242	D	8	-	-
	21-2	LinJ.21.rRNA1	118	+	445667..445784	D	15	Avg: -	-
NA*	23	LinJ.23.rRNA1	119	-	228303..228185	B	6	8.55	4
<hr/>									
	5	*	119	+	359812..359930	D	10	-	-
	9-1	*	119	-	249842..249724	D	6	-	-
	9-2	*	118	-	257062..256945	B	7	5	26
Lt	9-3	*	118	+	377890..378007	D	29	-	-
	9-4	*	118	-	390508..390391	D	21	-	-
	11-3	*	121	+	390508..390391	D	11	-	-
	21-1	*	121	-	167666..167546	C	5	-	-
	21-2	*	119	+	442984..443102	D	14	-	-
	23	*	122	-	213231..213110	D	27	Avg: -	-
	33	*	119	+	649716..649834	D	11	14.1	-

Figure S1

C**Figure S1**

