



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

**Caracterización molecular del gen
de la subunidad mayor (C160)
de la RNA polimerasa III de
*Leishmania major***

T E S I S

Que para obtener el título de

BIÓLOGO

Presenta:

Inti Iván Sánchez Santamaría

Director de tesis: Dr. Santiago Martínez Calvillo

Febrero, 2008



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

AGRADECIMIENTOS

Con cariño a mis padres
Socorro Santamaría Sánchez y Silvano Sánchez Zarate

Y mis hermanos
Julio Cesar Sánchez Santamaría y Ulises Sánchez Santamaría

A quienes dedico este trabajo

De manera especial

Dr. Santiago Martínez Calvillo
A quien agradezco todas la enseñanzas en la teoría y en la práctica y también la oportunidad que me brindo de estar en este proyecto

Al Biol. Luís Enrique Florencio Martínez
Que siempre estuvo con nosotros en la elaboración de esta tesis y siempre demostró su amistad incondicional

A toda mi familia, por haber confiado en mí y desearme siempre lo mejor

Y por último a todas las personas que he conocido durante todo este camino en la Universidad en especial a los que estuvieron más cerca de mí y han llegado a ser personas muy especiales. Así como a todos los compañeros del Laboratorio 1 de la UBIMED.

Gracias a todos

ÍNDICE

| | |
|----------------------------------------------------------------------------|----|
| Resumen | 1 |
| Introducción | 3 |
| Tipos de leishmaniasis | 4 |
| Leishmaniasis en México | 7 |
| Tratamiento | 8 |
| Transcripción en eucariontes | 8 |
| RNA polimerasas | 9 |
| Promotores de pol III | 11 |
| Factores de transcripción | 13 |
| Organización genómica en tripanosomátidos | 15 |
| Procesamiento de los mRNA en tripanosomátidos | 16 |
| Promotores en tripanosomátidos | 18 |
| Promotores de pol III en Tripanosomátidos | 19 |
| Subunidades de pol III en <i>Leishmania</i> | 20 |
| Objetivos | 21 |
| Materiales y Métodos | 22 |
| Cultivos celulares | 22 |
| Extracción de RNA total | 22 |
| Aislamiento de DNA genómico (DNAg) | 23 |
| RT-PCR | 24 |
| Clonación en el vector pGEM-T Easy | 25 |
| Digestiones de DNA genómico con enzimas de restricción | 28 |
| Experimento tipo Southern-blot | 28 |
| Experimento tipo Northern-blot | 30 |
| Marcaje radioactivo de C160 | 31 |
| Resultados | 32 |
| Determinación del número de copias del gen de C160 en <i>Leishmania</i> | 32 |
| Caracterización del mRNA de C160 | 36 |

| | |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Localización de los sitios de procesamiento del mRNA de C160 | 36 |
| Análisis del tamaño y abundancia del mRNA de C160 en <i>L. major</i> | 44 |
| Comparación de la secuencia de C160 entre varias especies | 46 |
| Discusión | 56 |
| C160 es un gen de copia única en <i>Leishmania</i> | 56 |
| Mapeo del sitio aceptor del miniexón y de la región de poliadenilación de C160 en <i>L. major</i> | 58 |
| Tamaño y abundancia del mRNA de C160 | 59 |
| Identificación de regiones conservadas de C160 en <i>L. major</i> | 60 |
| Probables funciones de las regiones conservadas | 62 |
| Conclusiones | 64 |
| Referencias | 65 |

RESUMEN

Leishmania es un protozoo flagelado que en el hombre produce la leishmaniasis. Pertenece a la familia Trypanosomatidae, junto con otros parásitos como *Trypanosoma cruzi* y *Trypanosoma brucei*. Estos organismos se caracterizan por presentar mecanismos de expresión genética atípicos, tales como la transcripción policistónica y el trans-splicing. En nuestro grupo de trabajo estamos interesados en estudiar los procesos transcripcionales en *Leishmania major* Friedlin, cepa de referencia del proyecto del genoma de *Leishmania*. En particular, estamos interesados en entender la transcripción de la RNA Polimerasa III (Pol III), enzima responsable de sintetizar RNA de transferencia (tRNA), RNA ribosomal (rRNA) 5S y algunos RNAs pequeños nucleares (snRNAs), moléculas esenciales para el crecimiento celular. Un primer paso en el análisis del proceso transcripcional es identificar y caracterizar las subunidades que forman parte de Pol III en *L. major*. A este respecto, en levadura Pol III está formada por 17 subunidades, siendo C160 la subunidad más grande; esta subunidad contiene parte del centro catalítico para polimerizar el RNA. Dado el papel esencial de C160 en la transcripción de Pol III, nuestro interés está dirigido hacia la caracterización de esta subunidad. Así, mediante experimentos tipo Southern-blot, usando como sonda un fragmento de C160 de 921 pb marcado con ^{32}P , se confirmó que C160 es un gen de copia única en el genoma de *L. major*, y se determinó que en *L. mexicana* hay también solamente una copia de dicho gen. Además, realizando ensayos de RT-PCR fueron localizadas las señales de procesamiento (sitio aceptor del miniexón y región de poliadenilación) del mRNA de C160. El análisis de las clonas de cDNA obtenidas permitió localizar la región de poliadenilación entre las 136 y 323 bases río abajo del codón de término. Por otra parte, el sitio aceptor del miniexón (AG) se localizó 536 bases río arriba del codón de inicio de C160. Regiones ricas en pirimidinas (presumiblemente involucradas en el procesamiento del mRNA) fueron localizadas en las inmediaciones de las regiones de procesamiento. Al realizar una comparación de la región que rodea al sitio aceptor del miniexón de C160 con una secuencia

consenso para *L. major* previamente reportada, se observó que existe poca similitud entre las dos secuencias, lo que sugiere que únicamente el AG y la región rica en pirimidinas son necesarios para el trans-splicing. Mediante experimentos tipo Northern-blot se determinó que el mRNA en *L. major* tiene un tamaño aproximado de 5.7 kb, mientras que su tamaño en *L. mexicana* es de 5.5 kb. No observamos diferencias significativas en la expresión de C160 al comparar células en fase de crecimiento logarítmico con células en fase estacionaria. Finalmente, la comparación de la secuencia de C160 entre tripanosomátidos reveló la presencia de 8 regiones conservadas. Dichas regiones coinciden con las regiones conservadas A-H previamente reportadas en otros organismos. Experimentos futuros permitirán definir si, como se espera, estas regiones conservadas son importantes para la función de C160 en *L. major*.

INTRODUCCIÓN

Leishmania es un protozooario flagelado de importancia médica y biológica. Este organismo, descrito por primera vez en 1900 por Leishman (Handman, 2000), es un parásito intracelular en las células del sistema reticuloendotelial de vertebrados. Varias especies de *Leishmania* producen en el hombre la leishmaniasis (Shaw y Lainson, 1987). *Leishmania* pertenece a la familia Trypanosomatidae, del orden Kinetoplastida, la cual incluye a otros parásitos como *Trypanosoma cruzi* y *Trypanosoma brucei* (Kudo, 1979).

Todas las especies de *Leishmania* son transmitidas por mosquitos vectores de los géneros *Phlebotomus* (en el viejo mundo) y *Lutzomyia* (en el nuevo mundo). El ciclo de vida de *Leishmania* se inicia cuando un mosquito es infectado al picar a un mamífero que presenta leishmaniasis (Fig. 1). Dentro de las células del mamífero los parásitos se encuentran en un estadio denominado amastigote, y éstos se diferencian en promastigotes procíclicos en el intestino medio del mosquito, en donde se replican repetidamente por fisión binaria; en este momento el parásito ha cambiado morfológicamente: de ser redondo y con un flagelo muy corto, pasa a una forma alargada, delgada y con flagelo largo. Los parásitos migran después al aparato picador-chupador del insecto, en donde pasan al estadio de promastigotes metacíclicos; éste es un estadio infectivo, incapaz de replicarse. Cuando el mosquito infectado pica a un mamífero le transmite al protozooario, que se aloja rápidamente en los macrófagos, dentro de fagolisosomas, donde se diferencia en amastigotes. Estas formas se replican y posteriormente lisan al macrófago, liberándose y pudiendo entonces infectar otras células (Fig. 1) (Handman, 2000). *Leishmania* es un organismo digenético, pues habita en dos hospederos específicos: el mosquito, que es donde se desarrolla como promastigote en el intestino del insecto vector y en macrófagos de mamíferos, donde sobrevive y se desarrolla intracelularmente como amastigotes no flagelados.

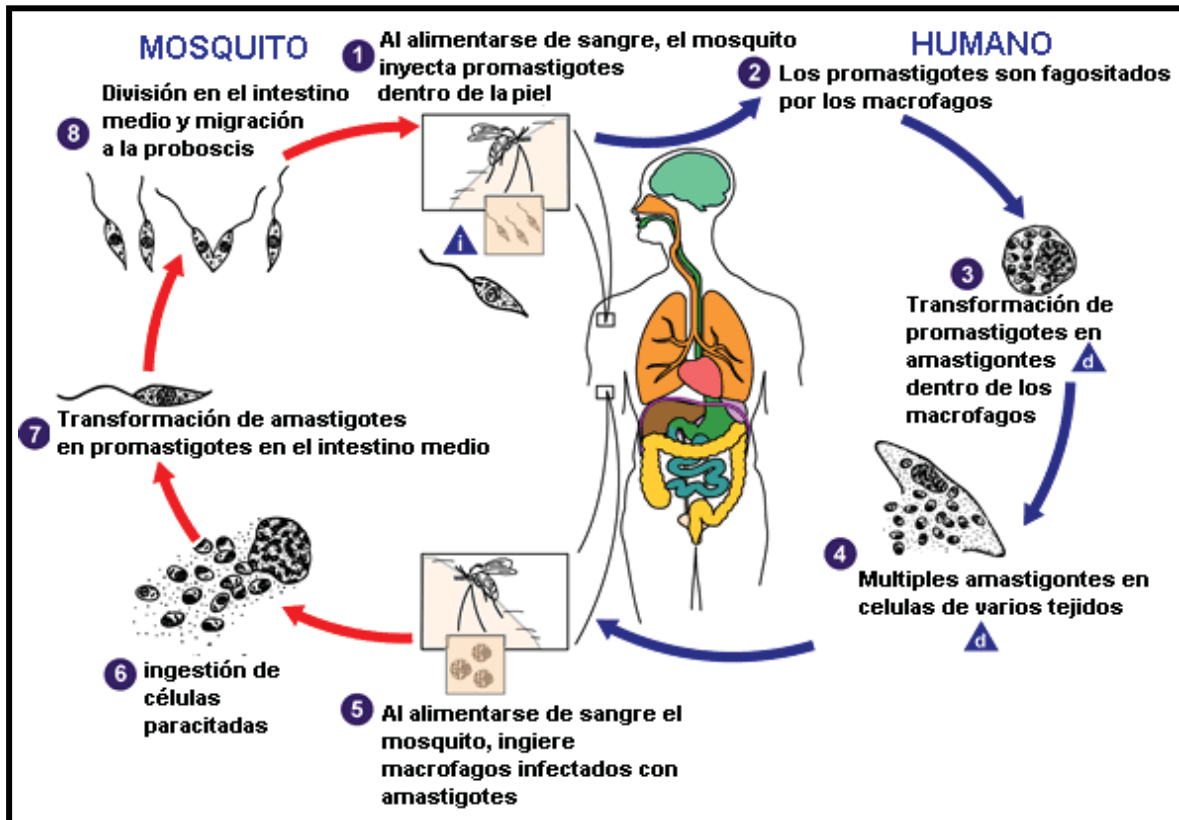


Figura 1. Ciclo de vida de *Leishmania* (tomado de CDC).

Tipos de leishmaniasis

La leishmaniasis tiene diversas manifestaciones clínicas, que van desde las lesiones ulcerativas en la piel, inflamación y completa destrucción de las mucosas, hasta la infección diseminada visceral también conocida como “Kala-azar”. Esta enfermedad puede ocurrir en múltiples regiones endémicas en todo el mundo (Fig. 2), afectando tanto a niños como adultos y es causada por casi dos docenas de distintas especies de *Leishmania*. Varios animales domésticos pueden ser también infectados por *Leishmania* y servir como reservorios del parásito. Hay tres tipos principales de leishmaniasis: cutánea, mucocutánea y visceral (Murray *et al.*, 2005).



Figura 2. Distribución mundial de leishmaniasis cutánea; esta distribución es muy similar a la de la leishmaniasis visceral (tomado de la Organización Mundial de la Salud, 2005)

Leishmaniasis Cutánea

Este tipo de leishmaniasis es causada en el viejo mundo (en el Mediterráneo y en regiones del mar Caspio) por *L. major*, *L. tropica* y *L. aethiopica*; mientras que en América es causada principalmente por *L. mexicana*, *L. amazonensis*, *L. braziliensis* y *L. peruviana*. La leishmaniasis cutánea se caracteriza por la presencia de lesiones, como lo son las pápulas, nódulos y úlceras, aunque las lesiones ulcerativas son más comunes en el nuevo mundo. En principio una pápula es visible en donde el mosquito ha picado, después se forma un nódulo, que crece y se transforma en una úlcera. En la enfermedad del viejo mundo también se forman lesiones en forma de una placa delgada o hiperqueratosis parecidas a verrugas. Se han reportado casos de pacientes infectados con el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) que desarrollan también la leishmaniasis cutánea (Murray *et al.*, 2005).

Leishmaniasis mucocutánea

Este tipo de leishmaniasis es conocida también como “espundia”, y causa una destrucción masiva de la faringe y de las cavidades oral y nasal. La leishmaniasis mucocutánea se inicia con un eritema y ulceraciones, produciéndose después las lesiones inflamatorias destructivas. En el enfermo, las desfiguraciones y mutilaciones producidas en el rostro causan gran sufrimiento de por vida. Esta enfermedad es ocasionalmente reportada fuera de Latinoamérica, y puede ser adquirida por los viajeros (Murray *et al.*, 2005). Las especies de *Leishmania* que en América causan este tipo de enfermedad son: *L. braziliensis* y *L. guyanensis*, mientras que en África, Asia y Europa es causada por *L. donovani*, *L. major* y *L. infantum* (Desjeux, 2004). Ésta es una enfermedad de importancia en salud pública en países subdesarrollados debido a la agresividad con la que ataca al paciente y también por el nivel de mortalidad que llega a ser significativo.

Leishmaniasis visceral

La leishmaniasis visceral es causada por *L. donovani* en el subcontinente de la India, Asia y África, por *L. infantum* en la región del Mediterráneo, en el sureste y centro de Asia, y por *L. chagasi* en América. La leishmaniasis visceral se manifiesta por medio de fiebre, debilidad, anorexia y pérdida de peso; Los niños pueden desarrollar diarreas y el retraso de crecimiento. La hepatomegalia y la esplenomegalia son a menudo las principales características de la leishmaniasis visceral. El oscurecimiento de la piel (fiebre negra o kala-azar) es frecuente. La anemia, la leucopenia o trombocitopenia y la hipergamaglobulemia son también características. La leishmaniasis visceral puede presentar una recaída (de 6-12 meses después de un tratamiento aparentemente efectivo) y puede venir una recrudescencia de la infección. La reaparición puede ser espontánea. Con el tiempo la enfermedad no tratada puede causar caquexia, enfermedad multisistémica, sangrado de trombocitopenia, susceptibilidad a las infecciones secundarias y por último, puede causar la muerte (Murray *et al.*, 2005).

Cada año, un estimado de 1.5 a 2 millones de niños y adultos desarrollan leishmaniasis (cutánea: 1-1.5 millones; visceral: 0.5 millones), y la incidencia de la infección es substancial cuando las infecciones subclínicas son incluidas. La leishmaniasis está asociada a aproximadamente 70 000 muertes al año. El 90% se manifiesta como leishmaniasis cutánea en Afganistán, Pakistán, Siria, Arabia Saudita, Algeria, Irán, Brasil y Perú; el 90% de la leishmaniasis visceral se presenta en la India, Bangladesh, Nepal, Sudán y Brasil.

En los últimos años se han producido progresos tangibles en la diagnosis, el tratamiento y en control del vector. Los investigadores han incrementado los conocimientos en cuanto a la comprensión de la enfermedad, la susceptibilidad, la expresión así como la relación parásito-hospedero y también en términos del desarrollo de vacunas contra esta enfermedad.

Es importante mencionar que la secuencia del genoma, tanto de *Leishmania major* como la del vector *Lutzomyia longipalpis* ha sido recientemente completada. Este logro es un claro avance en cuanto a la comprensión de diversos aspectos de la biología del parásito, la transmisión y la patogénesis, lo cual llevará a que esta enfermedad sea un blanco más fácil en los tratamientos con drogas y con vacunas mucho más efectivas (Murray *et al.*, 2005).

Leishmaniasis en México

Se considera que la leishmaniasis puede llegar a ser un problema de salud pública en México, pues ha sido reportada en 22 estados. La presencia de leishmaniasis cutánea (causada por *L. mexicana*) se reportó por primera vez en México en 1912, en los trabajadores del chicle y por eso recibe el nombre de “úlceras del chiclero”. Hasta 1994 sólo cuatro casos de leishmaniasis mucocutánea habían sido registrados en México. Esos casos se confirmaron en los estados de Oaxaca, Veracruz y Tabasco y se consideró que el agente causal fue *L. mexicana*. En el estado de Campeche, la leishmaniasis cutánea es causada por *L. mexicana* y *L.*

braziliensis. Por último, entre 1987 y 1994 se reportaron 326 casos humanos de leishmaniasis cutánea en el estado de Nayarit, los cuales también fueron causados por *L. mexicana* (Sánchez-Tejeda *et al.*, 2001).

Tratamiento

El control de la leishmaniasis ha sido entorpecido por el hecho de que esta enfermedad es una zoonosis, que tiene como principales hospederos a roedores, perros y otros animales domésticos. El antimonio orgánico pentavalente ha sido el fármaco principal en el tratamiento de la leishmaniasis en la última mitad del siglo. Otras drogas como la anfotericina B, alopurinol y aminosidina (paramomicina) no han probado ser tan útiles como inicialmente se esperaba. Los intentos hasta ahora realizados por la Organización Mundial de la Salud (OMS) en sus programas de control de vacunación sólo se han llevado a cabo para tratar la leishmaniasis cutánea. Esto significa que ha habido logros en esta área, pero aún queda un largo camino antes de la producción de una vacuna exitosa para administrarla de una forma masiva en el campo (Handman, 2000).

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 hacia 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.

Transcripción en eucariontes

La transcripción involucra la síntesis de una cadena de RNA, tomando como templado a una molécula de DNA de doble cadena. El RNA resultante es idéntico en secuencia a una de las hebras de DNA, que es llamada hebra codificante; y es complementario a la otra hebra, que fue usada como templado para esta síntesis.

La síntesis del RNA es catalizada por la enzima RNA polimerasa. La transcripción comienza cuando la RNA polimerasa se une a una región especial, el promotor, localizado generalmente río arriba del gen. En la mayoría de los genes el promotor incluye las primeras bases transcritas. Desde este punto, la RNA polimerasa avanza a lo largo del templado, sintetizando al RNA hasta que alcanza una secuencia que le indica donde debe detenerse, llamada terminador. Esta acción define una unidad de transcripción, que se extiende desde el promotor hasta el terminador.

El producto de la transcripción es conocido como transcrito primario. Éste consistirá de un RNA que se extiende desde el promotor hasta el terminador, poseyendo los extremos originales 5' y 3'. Sin embargo el transcrito primario es casi siempre inestable, por lo que tiene que modificarse en sus extremos para no ser degradado.

La transcripción es la primera etapa en la expresión del gene; este paso se encuentra debidamente controlado. Las proteínas reguladoras son la que determinan si un gen en particular se encuentra listo para ser transcrito por la RNA polimerasa. La mayoría de los eventos de la regulación ocurren durante el inicio de la transcripción, aunque las etapas subsecuentes a la transcripción se regulan algunas veces (Lewin, 2004).

RNA polimerasas

El núcleo eucariótico tiene tres tipos de RNA polimerasas, cuyas masas moleculares están comprendidas entre 500 y 700 kDa. Cada una de ellas se encarga de producir diferentes moléculas de RNA. La RNA polimerasa I (Pol I) se localiza en el nucleolo y se encarga de catalizar las síntesis del precursor 45S del RNA ribosomal (rRNA), el cual se procesa para generar las moléculas de rRNA maduras 28S, 18S y 5.8S. Por otra parte, la RNA polimerasa II (Pol II) se encuentra situada en el nucleoplasma, y se encarga de sintetizar los precursores

del mRNA y de algunos RNAs pequeños nucleares (snRNAs) (Voet y Voet, 1995). La RNA polimerasa III (Pol III) también se encuentra presente en el nucleoplasma, y se encarga de sintetizar los precursores del rRNA 5S, los RNA de transferencia (tRNA) y de una variedad de otros RNAs pequeños nucleares y citosólicos.

Además de estas enzimas nucleares (que también son conocidas como RNA polimerasas A, B y C, respectivamente), las células eucarióticas contienen RNA polimerasas mitocondriales y de cloroplastos (Voet y Voet, 1995). Dentro de las polimerasas más estudiadas está la Pol III de *Saccharomyces cerevisiae*, la cual se encuentra bien definida, y todas sus subunidades han sido caracterizadas. Pol III es la más compleja de las RNA polimerasas, pues contiene el mayor número de subunidades: 17 en levadura, comparado con 12 subunidades de Pol II y 14 subunidades en Pol I (Fig. 3) (Paule y White, 2000). Cinco de las 17 subunidades son compartidas con Pol I y II (ABC27, ABC23, ABC14.5, ABC10 α y ABC10 β), dos son compartidas con Pol I (AC19 y AC40) y diez son exclusivas de Pol III (C160, C128, C82, C53, C37, C34, C31, C25, C17 y C11) (Hu *et al.*, 2002).

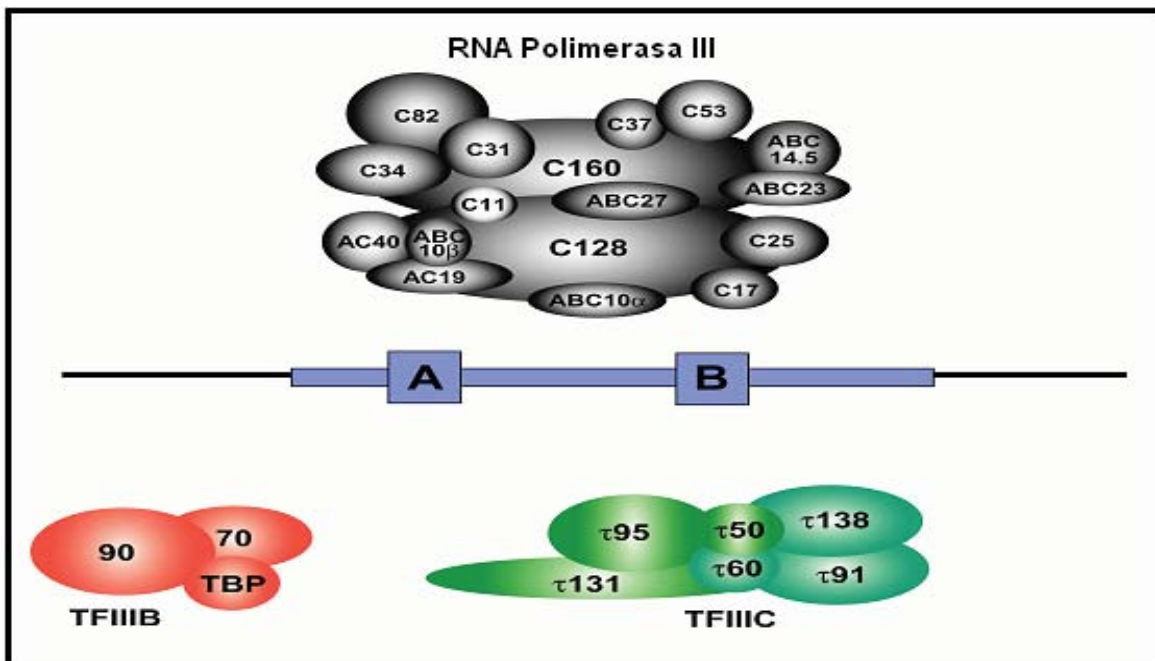


Figura. 3. Esquema de la constitución general de la RNA polimerasa III y los factores de transcripción TFIIB y TFIIC, visto en un ensamble de un tRNA con sus respectivas cajas A y B.

Un total de 17 genes de copia única codifican las subunidades de la Pol III en *S. cerevisiae*. Se sabe que 16 de estos genes son esenciales, y uno todavía no se ha analizado. Cinco de estas subunidades son definidas como un núcleo central en Pol III, por estar evolutivamente relacionadas con las 5 subunidades de la RNA polimerasa de *Escherichia coli*: (1) C160 (C se refiere a Pol III, mientras que el número 160 es la masa aproximada en kDa) es la subunidad mayor, evolutivamente relacionada con las subunidades mayores de Pol I y Pol II, y con la subunidad mayor de RNA polimerasas arqueobacteriana y bacteriana (α y β' , respectivamente); (2) C128, que es similarmente relacionada con la segunda subunidad mayor de Pol I y Pol II, y con las subunidades B de arqueobacterias y β bacteriana; (3) AC40, que es una subunidad común entre Pol I y III, y está evolutivamente relacionada con subunidades de Pol II B44 (RPB3), α bacteriana y D de arqueobacteria; (4) AC19, que está relacionada con las subunidades B12.5 (RPB11) de Pol II, α de arqueobacterias, y L de bacterias; (5) ABC23 (RPB6), que está relacionada con subunidades ω de *E. coli* y K de arqueobacterias (Geiduschek y Kassavetis, 2001).

Promotores de Pol III

Un promotor se define como la secuencia de DNA que es suficiente para dirigir la correcta iniciación de la transcripción de un gen, mediada por una RNA polimerasa (Pieler *et al.*, 1987). La característica más llamativa e inusual de los promotores usados por Pol III, es que la mayoría requiere elementos localizados río abajo del nucleótido +1 (sitio de inicio de la transcripción), dentro de la región codificadora. Estas regiones de control interno son generalmente estructuras compuestas de bloques esenciales separadas por regiones no esenciales (Paule y White, 2000). Los promotores de los genes que son transcritos por Pol III pueden clasificarse en tres tipos (Fig. 4).

El tipo 1 está presente en los genes del rRNA 5S, y se caracteriza por la presencia de tres secuencias intragénicas elementales: las cajas A y C y un elemento

intermedio (Fig. 4) (Pieler *et al.*, 1987). En el gen somático del rRNA 5S de *Xenopus laevis* la caja A se localiza entre las bases +50 y +64; el elemento intermedio entre +67 y +72, y la caja C de +80 a +97. El promotor es relativamente intolerante a cambios en el espaciamiento entre los elementos individuales.

Los promotores del tipo 2 son identificados por presentar como elementos de control interno una caja A y una caja B (Fig. 4). La caja A se localiza generalmente (alrededor de 10-20 pb) del sitio de inicio de la transcripción. El bloque B se localiza a distancias variables (entre 30-60 pb) río abajo del bloque A. La localización del bloque B es extremadamente variable, en parte porque algunos genes del tRNA tienen intrones cortos dentro de sus regiones de codificación. Los genes de tRNA y de adenovirus VA RNA han sido estudiados exhaustivamente como modelos poseedores de esta clase de elementos.

La característica principal de los promotores del tipo 3 radica en que las secuencias residen exclusivamente río arriba del gen, es decir, se encuentran posicionados extragénicamente (Fig. 4). El prototipo de este grupo lo constituye el gen del snRNA U6. Estos promotores tienen una secuencia TATA cerca de la posición -30 que es crítica para la determinación del sitio de inicio de la transcripción, y un elemento de secuencia proximal (PSE) alrededor de la posición -60. Estos dos elementos constituyen un promotor basal sujeto a la actuación de un elemento de secuencia distal (DSE) (Willis, 1993). El promotor mejor caracterizado del tipo III ha sido el del gene U6 en humano. Estas secuencias requieren para la expresión eficiente una caja TATA entre las -30 y -25pb, una secuencia de elemento proximal (PSE) entre las -66 y -47, además requieren de un elemento distal (DSE) entre -244 y -214pb (Paule y White, 2000).

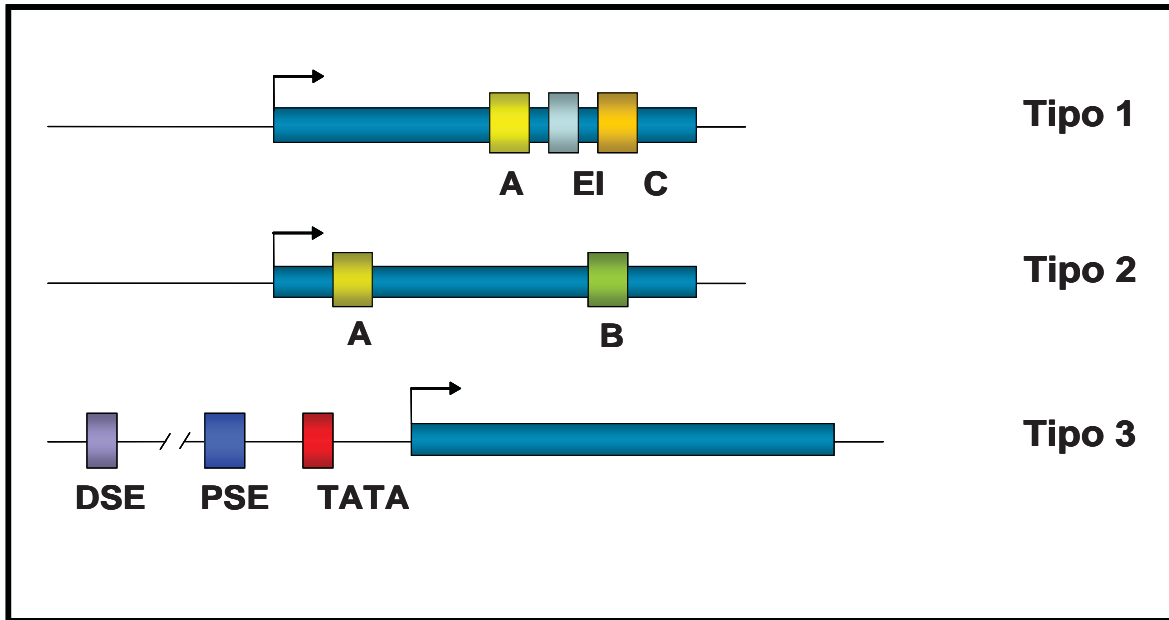


Figura 4. Representación de los tipos de promotores de Pol III. Se indica la posición de las cajas A, B, C y TATA; así como el elemento intermedio (EI), el elemento de secuencia proximal (PSE) y el elemento de secuencia distal (DSE).

Factores de transcripción

Ciertas proteínas, denominadas factores de transcripción, tienen afinidad específica por los promotores. Son proteínas muy conservadas evolutivamente, que promueven la formación de un complejo plurimolecular alrededor del sitio de inicio de la transcripción, que incluye el promotor, los propios factores de transcripción generales y la RNA polimerasa. Se puede decir que al reconocer el promotor actúan como mediadores para que se fije la polimerasa, definiendo así el punto de inicio de transcripción y activando a la enzima para que comience a sintetizar el RNA (Willis, 1993). Por lo tanto, el inicio de la transcripción es un proceso que se lleva a cabo al formarse un complejo que se encuentra unido por enlaces proteína-DNA y proteína-proteína. La información acerca de los factores de transcripción de Pol III se encuentra mejor detallada en sistemas como el de *S. cerevisiae* y en el humano. La levadura se toma como referencia para otros organismos. El análisis de la transcripción de Pol III en humano proporciona datos interesantes acerca del aparato de transcripción de la Pol III en metazoarios. Para

pol III se han descrito tres factores de transcripción, TFIIIA, TFIIIB y TFIIIC, los cuales se describirán a continuación.

TFIIIA

El reclutamiento de TFIIIC en los genes del rRNA 5S requiere de la presencia de un factor gen-específico conocido como TFIIIA. Es un factor específico de los promotores del tipo I, y se une directamente al DNA. El TFIIIA de *X. laevis* fue el primer factor de transcripción eucariótico purificado y además el primero del cual se clonó el cDNA. Es también miembro fundador de la familia conocida como Dedos de Zinc, puesto que la mayor parte de sus 344 aminoácidos forman nueve dedos de zinc dispuestos en tándem. TFIIIA sirve como un adaptador, proporcionando una plataforma que permite que TFIIIC sea reclutado sobre los genes del rRNA 5S.

TFIIIB

Sin importar el tipo de promotor, la función primaria del TFIIIC es reclutar a TFIIIB. Este proceso ha sido mejor caracterizado en levadura, en donde TFIIIB se ha reconstituido enteramente a partir de componentes recombinantes. Es un complejo de tres polipéptidos, uno de los cuales es el TBP (TATA-binding protein) (Fig. 3). El más grande de los componentes de TFIIIB tiene un peso molecular de 90 kDa, y es conocido como polipéptido B''; esta proteína es poco conservada, excepto por un dominio llamado SANT. El otro componente de TFIIIB es una subunidad de 70 kDa que exhibe una identidad del 23 % y una semejanza del 44 % con TFIIIB. Debido a esta homología, se conoce como factor TFIIIB-relacionado o BRF (Paule y White, 2000). El TFIIIB de levadura es una proteína que se une al DNA que puede ser atraída de dos maneras a regiones de unión río-arriba del sitio de inicio de la transcripción: se une directa y fuertemente a cajas TATA a través de TBP, o puede ser atraída al complejo de iniciación a través de la interacción con TFIIIC. En cualquier caso, el TBP termina haciendo contacto directo con el DNA (Geiduschek y Kassavetis, 2001).

TFIIIC

El armado del complejo de iniciación en los genes de tRNA comienza cuando las secuencias de los bloques A y B son reconocidas por el complejo llamado TFIIIC (Transcriptional Factor IIIC). Este es uno de los mayores y más complejos factores de transcripción conocidos. En *S. cerevisiae*, TFIIIC está compuesto de 6 subunidades (τ_{138} , τ_{131} , τ_{95} , τ_{91} , τ_{60} y τ_{55}) (Fig. 3). Experimentos de Fotocrosslinking han mostrado que varias subunidades de TFIIIC se extienden a través del gene tRNA^{tyr}. Se encuentran en contacto tanto con el bloque A como el B, aunque el último es el determinante principal para la afinidad de unión. Es notable que esos dos elementos promotores sean reconocidos simultáneamente por un solo factor, puesto que la distancia que los separa puede variar substancialmente entre diversos genes (Paule y White, 2000).

Organización genómica en tripanosomátidos

Las características genéticas de los tripanosomátidos han sido objeto de considerables investigaciones, sobre todo en los últimos años. En términos de genética molecular los organismos más estudiados son *Leishmania* y *Trypanosoma*. Los tripanosomátidos tienen dos genomas, uno dentro del núcleo y otro dentro de la mitocondria. El último, llamado cinetoplasto, constituye entre el 10-30 % del DNA total en la célula. Se sabe que estos organismos son diploides. Una característica general es que muchos de los genes presentan varias copias organizadas en tándem. El caso más notable es el de los genes de las glicoproteínas de superficie variables (VSG) en *T. brucei*, que presenta alrededor de 1000 copias en el genoma del parásito.

El genoma de *Leishmania* tiene un tamaño de alrededor de 34 Mb, y está organizado en 36 cromosomas que van desde los 0.3 hasta a 2.5 Mb (Martínez-Calvillo *et al.*, 2004). La identificación de los 36 cromosomas se llevó a cabo por medio de electroforesis en campos alternos pulsados, pues los cromosomas en estos organismos no se condensan significativamente durante su ciclo celular.

Recientemente se finalizó la secuenciación del genoma de *L. major* Friedlin, la cepa de referencia del Proyecto del Genoma de *Leishmania*. Al analizar la secuencia se observó que en este organismo, los genes se encuentran organizados en grupos grandes de genes en la misma cadena de DNA (unidades policistrónicas). El análisis de la secuencia también reveló la presencia de ~8,200 genes (Ivens *et al.*, 2005). La mayoría de estos genes no muestran ninguna similitud con los genes de otros organismos (excepto otros tripanosomátidos), y es probable que muchos de ellos tengan funciones parásito-específicas (Myler *et al.*, 1999; Worthey *et al.*, 2003).

Procesamiento de los mRNA en tripanosomátidos

Leishmania, así como otros miembros de la familia Trypanosomatidae, presentan mecanismos de expresión genética inusuales. La transcripción en tripanosomátidos es policistrónica, es decir, varios genes se transcriben juntos, generando transcritos primarios largos que tienen que ser procesados para dar origen a los mRNA maduros (Fig. 5). Los mRNA maduros se generan a partir de los transcritos policistrónicos mediante trans-splicing (en el extremo 5') y poliadenilación (en el extremo 3'). El trans-splicing, o splicing entre dos moléculas, es un evento de procesamiento de RNAs en eucariontes en donde participan dos moléculas precursoras independientes. Fue descrito originalmente en tripanosomátidos, y después fue encontrado también en nemátodos, tremátodos y *Euglena*. En todos estos organismos la reacción intramolecular da como resultado un exón no codificante, llamado *Spliced-Leader* (SL) o miniexón, en el extremo 5' de los mRNA maduros, y otro exón codificante que contiene el codón iniciador ATG con el marco de lectura completo (Cevallos y Hernández, 2001). En tripanosomátidos, el SL es de 39 nucleótidos y está presente en todos los mRNA maduros. El SL contiene el "cap" en su extremo 5', el cual es necesario para la estabilidad de los mRNA (Vanhamme y Pays, 1995).

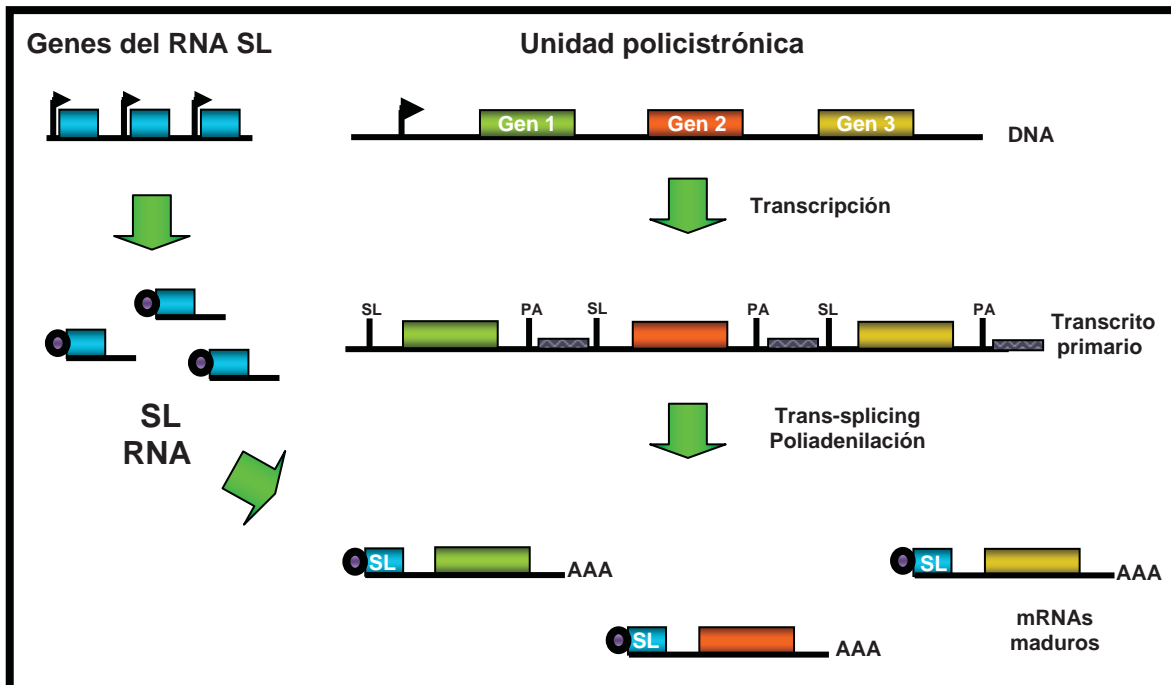


Figura 5. Síntesis de mRNA en *Leishmania*. El círculo en el extremo 5' del RNA SL representa el cap. En el transcritto primario se indican las regiones de procesamiento para adicionar el RNA SL (SL) y la cola de poli-A (PA). En el mRNA maduro se señala la cola de poli-A (AAA).

El mecanismo de trans-splicing es muy similar al del cis-splicing, y en ambos participan los snRNAs. En tripanosomátidos se sabe poco sobre las secuencias necesarias para el trans-splicing. El sitio 3' aceptor del SL es siempre el dinucleótido AG, sitio consenso usado también en el cis-splicing. Una serie continua de pirimidinas contiguas al dinucleótido AG es también importante, pues si estas son removidas experimentalmente se activan sitios aceptores crípticos.

No se sabe de una señal consenso de poliadenilación en tripanosomátidos. Sin embargo, se ha observado que regiones ricas en pirimidinas, localizadas río abajo de los sitios de poliadenilación, son muy importantes para este proceso. Hay evidencias que indican que la poliadenilación y el trans-splicing están acoplados, y que una misma región rica en pirimidinas regula ambos eventos.

Promotores en tripanosomátidos

Poco es lo que se conoce sobre el inicio de la transcripción en tripanosomátidos. Las únicas regiones promotoras que han sido ampliamente caracterizadas son las de la unidad de rRNA (transcrita por Pol I) (Martínez-Calvillo *et al.*, 2001; Yan *et al.*, 1999) y las del RNA SL (transcrito por Pol II) (Gilinger y Bellofatto, 2001; Gilinger *et al.*, 2004; Saito *et al.*, 1994).

Los promotores de Pol I se identificaron por primera vez en *T. brucei*, no sólo en el *locus* del rRNA, sino también río-arriba de los genes que codifican los VSG y las prociclinas GPEET. El único promotor de pol II caracterizado es el del RNA SL, que interviene directamente en el trans-splicing. La célula requiere una gran cantidad de este RNA, pues el SL debe estar presente en todos los mRNA. Para cubrir esta necesidad, los tripanosomátidos presentan más de cien copias del gen del RNA SL por genoma haploide. Cabe aclarar que, a diferencia de los genes de mRNA, el gen del RNA SL es transcrito de manera monocistrónica. El promotor del RNA SL ha sido analizado detalladamente en tres especies: *T. brucei*, *Leptomonas seymoury* y *Leishmania tarentolae* y se encontró que se encuentra conservado, consistiendo de un elemento bipartito río-arriba y un elemento iniciador cerca del sitio de inicio de la transcripción (Günzl *et al.*, 2008)

El análisis transcripcional realizado en los cromosomas 1 y 3 de *L. major* demostró que la transcripción de Pol II inicia únicamente “río arriba” del primer gene de una unidad policistrónica (Martínez-Calvillo *et al.*, 2003; Martínez-Calvillo *et al.*, 2004). En el caso del cromosoma 1, la transcripción fue examinada por análisis de run-on nuclear, usando sondas de DNA de cadena sencilla correspondientes a la mayoría de los 79 genes del cromosoma. Dichos genes se encuentran organizados en dos unidades policistrónicas, una de 29 genes (en la cadena de abajo) y otra de 50 genes (en la cadena de arriba). Los resultados indicaron que la transcripción de todo el cromosoma inicia únicamente entre los genes 29 y 30, en la región del cromosoma donde se da el cambio en la orientación de los genes. De esta

manera, los mRNAs de estos dos grupos de genes son transcritos divergentemente y hacia los telómeros (Martínez-Calvillo *et al.*, 2003).

El cromosoma 3 de *L. major* presenta dos unidades policistrónicas convergentes de 67 y 30 genes. El análisis transcripcional por medio de run-on nuclear reveló que la transcripción inicia únicamente río arriba del primer gen de cada unidad policistrónica, tal como se observó en el cromosoma 1. Entre las dos unidades policistrónicas convergentes se localiza un gen de tRNA (transcrito por Pol III). De manera interesante, se encontró que la transcripción del cromosoma (de Pol II) termina en la región que contiene dicho gen (Martínez-Calvillo *et al.*, 2004).

Promotores de Pol III en tripanosomátidos

En tripanosomátidos, Pol III transcribe todos los snRNAs (U1 a U6), además de los tRNA y el rRNA 5S. Análisis de secuencia de los genes de tRNA y del rRNA 5S han permitido la identificación de los dominios de control interno (cajas A, B y C), pero a la fecha no se ha caracterizado funcionalmente ningún promotor. En cambio, varios promotores de genes de snRNAs y del gen del RNA 7SL han sido caracterizados en *T. brucei* y en *Leptomonas*. Estos genes tienen un gen de tRNA contiguo, hacia su extremo 5' localizado en la cadena opuesta de DNA. Sorprendentemente, las cajas A y B del tRNA vecino son esenciales para la expresión del snRNA y del RNA 7SL. En la mayoría de casos, se requieren también elementos regulatorios intragénicos del snRNA y del RNA 7SL (Fantoni *et al.*, 1994; Nakaar *et al.*, 1995) para lograr un nivel de expresión óptimo. Hasta la fecha, ningún promotor de Pol III ha sido caracterizado en *Leishmania*. De igual manera, ninguna de las subunidades de Pol III ha sido analizada en este parásito.

Subunidades de Pol III en *Leishmania*

El análisis *in silico* realizado con el genoma de *L. major* reveló que la mayoría de los genes que codifican para las subunidades de Pol III, incluida C160, están presentes en *L. major*. Sin embargo, ningún factor de transcripción fue identificado. Con el objeto de identificar a los componentes proteicos de los complejos transcripcionales de Pol III en *L. major*, recientemente se reportó el uso de la técnica de Purificación por Afinidad en Tándem (TAP-tag), usando como blanco el gen de la subunidad ABC23. En los complejos purificados se identificaron 12 subunidades de Pol III: C160, C128, C82, C53, C37, C34, C17, AC40, AC19, ABC27, ABC23 y ABC14.5. El gen de C160 se localizó en el cromosoma 34 del *L. major*.

De las 17 subunidades que conforman Pol III en levadura, C160 es la subunidad más grande y juega un papel muy importante en el proceso de transcripción. C160 contiene, junto con C128 (la segunda subunidad más grande), el centro catalítico para polimerizar RNA, y aparentemente no sólo está involucrada en el inicio y elongación de la transcripción, sino que también participa en el término de la misma (Willis, 1993; Geiduschek y Kassavetis, 2001; Huang y Maraia, 2001). Dado el papel esencial de C160 en la transcripción de Pol III, la caracterización de su gen en *Leishmania* resulta necesaria para lograr un mejor entendimiento de los procesos de expresión génica en los protozoarios parásitos de la familia Trypanosomatidae.

OBJETIVOS

1. Determinar el número de copias del gen de C160 en los genomas de *Leishmania major* y *Leishmania mexicana*.
2. Localizar el sitio aceptor del miniexón y la región de poliadenilación en el mRNA de C160 de *L. major*.
3. Analizar el tamaño y la abundancia de los transcritos de C160 en cultivos de promastigotes de *L. major* y *L. mexicana* en fase media de crecimiento logarítmico y en fase estacionaria.
4. Comparar las secuencias de aminoácidos y DNA de C160 en *L. major* con secuencias homólogas en otros organismos para localizar probables dominios funcionales.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cultivos celulares

En este trabajo se utilizaron promastigotes procíclicos de *Leishmania major* Friedlin y la cepa Bricaire de *Leishmania mexicana*, que fueron crecidos a 27°C en medio BM 1X (infusión de cerebro y corazón 0.25X, M199 0.5X, suplementado con suero fetal bovino 10%, hepes 40 mM pH 7.5, hemina 0.01mg/ml, biotina 0.02%, bioppterina 1.25 µg/ml, penicilina [100 u/ml]/estreptomycin [0.1 mg/ml]), hasta que éstos alcanzaron la fase media de crecimiento.

Conteo de parásitos

De los cultivos se hizo una dilución 1:10, tomando 50 µl de cada cultivo y mezclando con 450 µl de formaldehído al 2%, de los cuales se tomaron 10 µl y se colocaron en una cámara de Neubauer. Se contó el número de parásitos en cuatro cuadros en diagonal de cada uno de los cuadrantes principales. El valor obtenido se multiplicó por 10⁵ para obtener el número de parásitos por ml de cultivo.

Extracción de RNA total

Los cultivos fueron cosechados en la fase media de crecimiento logarítmico, centrifugando a 9000 g durante 10 min a 4°C en el rotor 220.78 VO2 (Hermle). La pastilla de células se lisó usando el reactivo TRIZOL-LS, pipeteando repetidamente. Se usaron 750 µl del reactivo por cada 5 X 10⁷ células. Posteriormente se procedió a realizar la fase de separación, donde se incubaron las muestras a temperatura ambiente por 5 min y después se adicionaron 200 µl de cloroformo por cada 750 µl de TRIZOL-LS. Las muestras se agitaron vigorosamente y se centrifugaron a 12 000 g por 5 min a 4°C. Después de este proceso la mezcla se separó en una fase roja y una acuosa. Para precipitar el RNA, se transfirió la fase acuosa a un tubo nuevo y se mezcló con 500 µl de alcohol isopropílico, por cada 750 µl de reactivo TRIZOL-LS. Se incubó a

temperatura ambiente durante 10 min y se centrifugó a 12 000 g, durante 10 min, a 4°C. Se lavó la pastilla de RNA una vez con 1 ml de etanol al 75 % por cada 750 µl de reactivo de TRIZOL-LS que fue usado en la homogenización inicial (7.12 ml de etanol 75 %), se mezcló en un vortex, Genie 2 (DAIGGER) y se centrifugó a 7500 g por 5 min a 4°C. La pastilla de RNA obtenida se dejó secar, manteniendo el tubo destapado por 10 min y se disolvió en 300 µl de agua libre de RNAsas. El RNA se mantuvo a -20°C. La concentración del RNA fue determinada leyendo en el espectrofotómetro (Life Science Analyser-DNA, Genova) a 260 y 280 nm (1 D. O. a 260 nm = 40 µg/ml).

Aislamiento de DNA genómico (DNAg)

Un total de 3×10^8 células en fase media de crecimiento logarítmico se centrifugaron durante 10 min a 9000 g a 4°C. Se resuspendió la pastilla en 5 ml de una solución que contiene: 5 ml de SSC 1X, 4.5 ml de TNE, 0.5 ml de sarcosyl al 10 %. Después se agregaron 100 µg de proteinasa K y se agitó en vortex, manteniendo la mezcla a 55°C durante 2 hrs. Posteriormente se adicionó 1 volumen de fenol: cloroformo: alcohol isoamilico (25:24:1), se agitó en vortex y se centrifugó a 7000 g por 8 min, a 4°C. La fase acuosa se transfirió a un tubo nuevo, y se realizó una extracción con 1 volumen de cloroformo, centrifugando a 7000 g durante 8 min a 4°C. Posteriormente se transfirió la fase acuosa a un tubo nuevo y el DNA se precipitó con 0.1 volumen de acetato de sodio 3 M y 2.5 volúmenes de etanol absoluto y se mantuvo toda la noche a -20°C. Posteriormente se centrifugó a 16000 g, a 4°C por 15 min, y se lavó la pastilla con etanol al 70 %. Por último, el DNA se resuspendió en TE (Tris 10mM pH 7.6; EDTA 0.2 mM pH 8.0). La concentración del DNA fue estimada en un espectrofotómetro a 260 y 280 nm (1 D. O. 260 nm = 50 µg/ml).

Electroforesis en gel de agarosa

Los fragmentos de DNA resultantes de distintos experimentos fueron fraccionados por electroforesis en geles de agarosa (Agarose D-1 Low EEO, CONDA) teñidos con bromuro de etidio (a una concentración final de 10 mg/ml). El buffer de corrida

fue TBE 1X (Tris-HCl 5.4 %, ácido bórico 2.74 % y EDTA 0.46 %), y se usó una cámara de electroforesis "Gel XL ultra V2" (Labnet). Las corridas se realizaron generalmente a 100 V, durante 40 min ó hasta que el primer colorante corriera tres cuartas partes del gel. Las bandas de DNA fueron visualizadas en un transiluminador de luz ultravioleta (TFX-35, Life Technologies) y fotografiadas en un aparato FUJIFILM FLA-500. Como marcador de tamaño se usó la escalera de DNA de 1 kb (Invitrogen).

Tratamiento de RNA con DNAsa I

Este proceso se llevó a cabo para eliminar el DNA contaminante en la muestra de RNA. Para esto, se tomaron 5 µg de RNA total en un tubo Eppendorf y se agregaron 4 µl de buffer 10X de DNAsa I, 3 µl de DNAsa I (Invitrogen) equivalente a 3 unidades. Después se llevó a un volumen de 40 µl con agua tratada con dietil pirocarbonato (DEPC), se mezcló e incubó el tubo a temperatura ambiente por 15 min. Posteriormente se agregó 2 µl de EDTA 25mM (para inactivar a la DNAsa I) y se calentó por 10 min a 65°C. El RNA se precipitó con 1/10 volúmenes de acetato de sodio 3M y 2.5 volúmenes de etanol y se resuspendió en 5 µl de agua DEPC.

RT-PCR

Síntesis de cDNA

A partir del RNA total se sintetizó cDNA (DNA complementario). Para localizar los sitios de poliadenilación, el cDNA se produjo con el primer Nested (dT) (CCTCTGAAGGTTACGGATCCACATCTAGATTTTTTTTTTTTTTTTTTTVN), mientras que para mapear el sitio aceptor del Spliced-leader se sintetizó con el primer C160-ME-1 (CATCGTTGACGCCGAAGTTCTT). Para esto, en un tubo Eppendorf libre de nucleasas se adicionaron los siguiente reactivos: 1 µl del oligo correspondiente 50 µM (Nested-dT o C160-ME-1), 5 µg de RNA total (tratado con DNAsa I), 1 µl de mezcla de dNTP 10 mM (10 mM de cada nucleótido: dATP, dGTP, dTTP y dCTP), con agua DEPC a volumen de final de 13 µl. Después se

calentó la mezcla a 65°C durante 5 min y se incubó en hielo por 5 min. Se colectó el contenido del tubo mediante una breve centrifugación en una microcentrífuga (Beckman Coulter), y se adicionaron 4 µl de buffer first-strand 5X, 1µl de RNAsin (inhibidor de RNAsas), 1µl de transcriptasa reversa SuperScript III (200 unidades/µl, Invitrogen); se mezcló pipeteando (subiendo y bajando suavemente). Después se procedió a incubar a 50°C por 45 min. Para inactivar la reacción se calentó a 70°C durante 15 min, fue entonces cuando el cDNA estuvo listo para ser amplificado por PCR.

PCR

Para realizar la reacción de PCR se adicionó lo siguiente a un tubo Eppendorf: 5µl Buffer PCR 10X [200 mM Tris-HCl (pH 8.4), 500 mM KCl], 5µl MgCl₂ 50 mM, 1µl de mezcla de dNTP 10mM, 1µl de oligo sentido (10 µM), 1µl de oligo antisentido (10 µM), 1 µl Taq DNA polimerasa (5U/µl, RED Taq, SIGMA), 2µl de cDNA; esta mezcla se llevó a un volumen de 50µl con agua destilada estéril, mezclando suavemente. Después la mezcla se llevó al termociclador (Palm-cycler, Corvett Research) en donde se efectuaron las reacciones en las siguientes condiciones: I Ciclo- 94°C por 3 min; II Ciclo- 94°C por 1 min, 58°C por 2 min, 72°C por 2 min, 30 veces; III Ciclo- 72°C por 7 min.

Clonaciones en el vector pGEM-T Easy

Purificación de DNA de geles de agarosa

Para este procedimiento se usó el kit QIAEX II (QIAGEN). Para ello, primero se separó el DNA por electroforesis en un gel de agarosa al 1.2 %, para después cortar del gel las bandas de interés (tomando la mínima cantidad de gel, removiendo el exceso de agarosa). Se pesó el fragmento del gel que contenía el DNA, y se adicionaron 900 µl de buffer QX1 (correspondientes a 3 volúmenes). Después se adicionaron 10 µl de perlas QIAEX II y se incubó a 50°C por 10 min, mezclando cada 2 min. Posteriormente se centrifugó a velocidad máxima por 30 min y se lavó la pastilla con 500 µl de buffer QX01. Se resuspendió y centrifugó

nuevamente, y la pastilla se lavó 2 veces con 500 μ l de buffer PE. Después, la pastilla se dejó secar por 25 min y se resuspendió en 20 μ l de Tris-Cl 10 mM, pH 8.5, incubándose después a temperatura ambiente por 5 min. Pasado este tiempo se centrifugó la mezcla a velocidad máxima por 30 seg. Posteriormente se tomó el sobrenadante, que contenía el DNA purificado, y se transfirió a un tubo nuevo.

Ligación en el vector pGEM-T Easy

Primero se centrifugó el tubo que contenía el vector pGEM-T Easy (Promega) para coleccionar toda la muestra en el fondo del tubo. La reacción de ligación se llevó a cabo mezclando lo siguiente: 5 μ l buffer de rápida ligación 2X, 0.75 μ l de pGEM-T Easy (50ng), 3.25 μ l del producto de PCR, 1 μ l de T4 DNA ligasa (100 u). La muestra se mezcló pipeteando y se incubó a 4°C durante toda la noche.

Transformación

Para el proceso de transformación se usaron células competentes de alta eficiencia ($>10^8$ UFC/ μ g) y media eficiencia ($>10^7$ UFC/ μ g) de la cepa JM109 de *E. coli* (Promega). Primero se prepararon placas de medio LB con ampicilina (100 μ g/ml), suplementadas con 20 μ l de Xgal 40 μ g/ml y 100 μ l de IPTG 0.5 mM. A un tubo de microcentrífuga estéril, enfriado previamente en hielo, se adicionaron 2 μ l de reacción de ligación. Posteriormente se transfirieron 35 μ l de células competentes JM109, y se mantuvo el tubo en hielo por 20 min. Pasado este tiempo se dió un choque térmico de 42°C por 48 seg, retirándolas después de este periodo y pasándolas rápidamente a hielo, en donde reposaron por 2 min. Posteriormente se transfirieron las mezclas a tubos de 15 ml, y se adicionaron 950 μ l de medio SOC [Bacto-tryptone, Bacto (2 gr/100ml, yeast extract, NaCl 1M, KCl 1M, Mg²⁺ stock) MgCl₂ 1 M- 6 agua, MgSO₄- 7 agua], Los tubos se incubaron 1.5 hrs a 37°C en agitación (150 rpm) en una incubadora de piso (Max Q 5000, Barnstead Lab-Line). Después, y con la ayuda de un asa triangular, se plaquearon 100 μ l de cada cultivo de transformación en placas de LB/ampicilina, Éstas se dejaron incubando a 37°C durante toda la noche.

Purificación de plásmidos en pequeña escala (minipreps)

Este ensayo se llevó a cabo con el kit QIAprep de QIAGEN, usando 2.5-5 ml de cultivos crecidos toda la noche (provenientes de las colonias obtenidas en la transformación). Los cultivos se centrifugaron a 15000 g durante 30 seg, y el botón celular se resuspendió en 250 μ l de buffer P1. Después se adicionaron 250 μ l de buffer P2, agitando los tubos por inversión. Después se adicionaron 350 μ l de buffer N3, se agito por inversión, y se centrifugó por 10 min a 15000 g en la microcentrífuga; el sobrenadante obtenido se transfirió a las columnas de centrifugación QIAprep. Las columnas se centrifugaron 60 seg y se eliminó el sobrenadante. A continuación se lavaron las columnas con la adición de 0.75 ml de buffer PE, y fueron centrifugadas durante 60 seg. El líquido acumulado en el fondo de las columnas se decantó y después se centrifugó 1 min. Pasado este periodo se eluyó el DNA de las columnas, adicionando 50 μ l de buffer EB e incubando por 1 min a temperatura ambiente. Finalmente, la columna se transfirió a un tubo nuevo y se centrifugó durante 1 min. En el tubo se colectó el DNA de plásmido. Éste DNA fue digerido con la enzima *Eco* RI, para verificar el tamaño del inserto clonado en el vector. Para esto, se mezclaron 10 μ l DNA, 1 μ l (10 U) de *Eco* RI (Invitrogen), 2 μ l buffer 10X (REact 3), 7 μ l de agua, en un volumen final de 20 μ l por muestra de DNA. Los tubos se incubaron por 5 hrs a 37°C.

Desalado de DNA

El kit QIAEX II de QIAGEN se utilizó para limpiar (eliminar sales) el DNA de un amplificado de PCR; para esto, se colocaron 30 μ l de DNA en un tubo limpio, y se adicionaron 90 μ l de Buffer QXI; después se agregaron 10 μ l de acetato de sodio 3 M, pH 5.0 y se mezcló subiendo y bajando suavemente. Posteriormente se agregaron 10 μ l de perlas QIAEX II (previamente mezclada en vortex por 30 seg), y se incubo a temperatura ambiente por 10 min, agitándose en vortex cada 2 min. A continuación la mezcla se centrifugó a 15000 g por 30 seg y se retiró el sobrenadante. La pastilla obtenida se lavó 2 veces con 500 μ l de buffer PE. Posteriormente el sobrenadante se eliminó y se dejo secar la pastilla a

temperatura ambiente, dejando el tubo destapado. Después se resuspendió la pastilla en 20 μ l de Tris-Cl, pH 8.5, incubando a temperatura ambiente durante 5 min. Como último paso se centrifugó la mezcla por 30 seg a 15000 g y el sobrenadante (DNA limpio) se transfirió a un tubo nuevo.

Digestiones de DNA genómico con enzimas de restricción

Se digirieron 6 μ g de DNAg de *L. major* y de *L. mexicana* (con las enzimas *Apa* I, *Cla* I, *Hind* III, *Sal* I, *Sph* I y *Xho* I), en un volumen final de 20-25 μ l. Las digestiones de DNAg se llevaron a cabo empleando concentraciones de enzimas de restricción en un exceso de 5 veces, considerando las condiciones recomendadas por las casas comerciales de las enzimas (NE-Biolabs e Invitrogen). Las muestras se incubaron a 37°C durante toda la noche.

Experimento tipo Southern-blot

El DNA digerido con las enzimas *Apa* I, *Cla* I, *Hind* III, *Sal* I, *Sph* I y *Xho* I, fue fraccionado por electroforesis en un gel de agarosa al 0.8%. Se corrió a 80 V por 5 hrs aproximadamente, hasta que el primer colorante recorrió tres cuartas partes del gel. Al terminar la corrida se hizo una muesca en el gel en la parte superior izquierda quedando el marcador en el primer carril. Se fotografió el gel junto a una regla fluorescente poniendo el cero a la altura del primer pozo. Posteriormente el gel se colocó en un recipiente y se enjuago dos veces con agua desionizada, agitándolo suavemente. A continuación el gel se colocó en una solución despurinizante (11 ml de HCl, más 989 ml de agua desionizada), durante 10 min y posteriormente se enjuagó 3 veces con agua desionizada. Después se transfirió el gel a una solución desnaturizadora (87.66 gr de NaCl, 20 gr de NaOH y agua a un volumen final de 1 L) durante 50 min, en agitación constante y suave. Al termino del periodo se enjuagó 2 veces con agua desionizada. Posteriormente el gel se sumergió en una solución neutralizante (NaCl 87.66 gr, Tris Base 66.6 gr y agua a un volumen final de 1 L, pH 7.0) durante 30 min, en agitación constante y suave. Después de este tratamiento el gel se sometió a la transferencia por capilaridad, usando SSC 10X (3.0 M de NaCl, 0.3 M Acetato de sodio a pH 7.0)

como buffer de transferencia. Para esto, se colocó en el interior de un recipiente amplio una base de cristal forrada con dos capas de papel Whatman (el papel se colocó doblado hacia abajo, quedando en contacto con el fondo del recipiente), adicionando solución de transferencia para humedecer el papel. Después se colocó sobre el papel el gel de manera invertida. A continuación se colocó en la parte de arriba del gel una membrana de Hybond (Amersham). La membrana era del mismo tamaño del gel, y previamente fue hidratada en solución de transferencia; sobre la membrana de Hybond se colocaron dos capas de papel Whatman del tamaño de la membrana, previamente humedecidas. Por encima de este complejo se colocó una capa gruesa de sanitas de aproximadamente 6 cm, sobre la cual se acomodó un cristal con un ligero peso sobre él. Se adicionó solución de transferencia y se dejó toda la noche; al día siguiente se reemplazó el paquete de sanitas por uno de menor grosor y se agregó más SSC 10X, y se continuó con la transferencia por varias hrs más. Después de este proceso se desmontó el blot; antes de quitar la membrana, se marcó cada pozo y se hizo una muesca en la membrana para ubicar el carril 1. A continuación, la membrana se enjuagó en SSC 2X por 1 min, dos veces. La membrana se dejó secar durante 5 min, y se procedió a fijar el DNA a la membrana en el horno de luz UV Stratalinker 1800 (Stratagene). Después se dejó secar la membrana a temperatura ambiente, y se guardó a la misma temperatura. Por último, para verificar que el DNA se hubiera transferido a la membrana, el gel fue teñido con bromuro de etidio (0.5 µg/ml) y observado en un trans-iluminador de luz UV.

Las membranas fueron prehibridadas por 2 hrs a 42°C, en 20 ml de solución de hibridación, [Formamida 50%, SSC 5X, SDS 0.2% y Solución Denhardtts 4X (Ficoll 400 0.08%, PVP-40 0.08%, Albúmina serica bovina 0.08%)]. Después, las membranas se hibridaron por 24 hrs con 5×10^6 cpm (cuentas por minuto) de DNA marcado con ^{32}P (desnaturalizado) en la misma solución de hibridación. Transcurrido este periodo se realizó el lavado de filtros; el primer lavado se hizo por 3 min a temperatura ambiente en SSC 2X y SDS 0.1%. Después se lavó con la misma solución a 65°C por 30 min. Posteriormente se hicieron dos lavados con SSC 0.5X y SDS 0.1% a 65°C por 30 min. Todo este procedimiento se realizó en

botellas de hibridación de 16 cm, en un horno de hibridación marca Thermo electron corporation. Terminados los lavados, la membrana se puso a secar sobre papel Whatman, se envolvió en plástico y se expuso en las placas de rayos X. El revelado de la placa se llevó a cabo en un cuarto oscuro con luz roja. Primero se dejó la placa en la solución reveladora hasta que se visualizaron las bandas, inmediatamente después se transfirió en agua por 2 min y para finalizar se colocó por 10 min en solución fijadora, y se puso a secar.

Experimento tipo Northern-Blot

El RNA total de *Leishmania* fue fraccionado por electroforesis en un gel desnaturalizante de agarosa al 1.2% y formaldehído al 6%, en buffer MOPS 1X (Mops 0.05 M y EDTA 1mM, pH 7). Para cada carril, se precipitaron 12 µg de RNA con ETOH absoluto y acetato de sodio y se resuspendieron en 3 µl de agua DEPC. Posteriormente se adicionó a cada tubo 4.4 µl de buffer A (294 µl de buffer Mops/EDTA 10X pH 7.0, 706 µl de agua DEPC), 11.6 µl de formaldehído/formamida (89 µl de formaldehído 37%; 250 µl de formamida desionizada). Después se calentó la mezcla a 70°C por 10 min, y se pasó a hielo inmediatamente, y justo antes de cargar en el gel se agregó 1.5 µl de Buffer de carga (2 µl formaldehído 37%, 5 µl de formamida desionizada, 7 µl colorantes). La electroforesis se llevó a cabo a 80 V, hasta que el azul de bromofenol migró tres cuartas partes del gel (aproximadamente 5 hrs), mezclando el buffer de corrida (MOPS 1X) cada hora. Al término de la corrida, se cortaron del gel los carriles con los marcadores de peso molecular (10 Kb RNA Ladder, invitrogen), se tiñeron con bromuro de etidio (0.5 µg/ml) por 5 min, y se fotografiaron junto a una regla fluorescente. El resto del gel se lavo 2 veces (5 min por vez) con agua desionizada. Posteriormente se dejó 30 min en agua y posteriormente, 60 min en SSC 10X. El blot se hizo de la misma forma que en el experimento tipo Southern-Blot, teniendo cuidado de eliminar todas las burbujas entre el gel y la membrana de Hybond. Al día siguiente se cambiaron las sanitas y se continuó con transferencia hasta que se humedeció el segundo paquete de sanitas. El filtro se lavó una vez con SSC 2X. A continuación se dejó secar a temperatura ambiente y

después se fijó el RNA a la membrana con luz UV en el Stratalinker. Por último se guardó la membrana a temperatura ambiente. La prehibridación, hibridación y lavado de las membranas se llevó a cabo como se indica en los experimentos tipo Southern.

Marcaje radioactivo de C160

El marcaje de C160 se realizó con el kit High Prime (Roche), tomando 2.5 μ l de DNA (25 ng) que previamente fue purificado de un gel de agarosa. El DNA se llevó a un volumen final de 11 μ l con 8.5 μ l de agua, y fue desnaturalizado por medio de calor. Después se adicionaron 4 μ l de solución High Prime, y 5 μ l (50 μ Ci) de [α^{32} P] dCTP; se mezcló y centrifugó brevemente incubándose a 37°C durante 10 min. Después la reacción se detuvo adicionando 2 μ l de EDTA 0.2 M pH 8. Finalmente los nucleótidos que no fueron incorporados al DNA se removieron con una columna de Sefadex G-50 (ProbeQuant G-50, Amersham), siguiendo las indicaciones de la casa comercial.

Secuenciación

Este procedimiento se llevó a cabo en la Unidad de Biotecnología y Prototipos (UBIPRO) de la FES-Iztacala, en el laboratorio de análisis y química de ADN. Las muestra enviadas se procesaron en el Secuenciador Automático 3100, Genetic Analyser de Applied Biosystems.

El análisis *in silico* de las secuencias se realizó utilizando los programas bioinformáticos Blast 2.0 (Basic Local Alignment Search Tool) y Clustal W 1.82.

RESULTADOS

1. Determinación del número de copias del gen de C160 en *Leishmania*

La secuenciación del genoma de *Leishmania major* Friedlin se finalizó en el 2005 (Ivens *et al.*, 2005). De acuerdo con dicha secuencia, el genoma de *L. major* contiene sólo una copia del gen de la subunidad mayor de Pol III, C160. En *L. mexicana*, por otro lado, no hay secuencias disponibles, por lo que a la fecha se desconoce el número de copias de C160 en esta especie. Para corroborar que C160 es un gen de copia única en *L. major* y determinar el número de copias de C160 en *L. mexicana*, se llevaron a cabo experimentos tipo Southern-blot.

Para usar como sonda en los ensayos Southern-blot, se amplificó por PCR un fragmento del gen de C160 de 921 pb (Fig. 6 A). Dicho fragmento fue clonado en el vector pGEM-T Easy (Fig. 6 B).

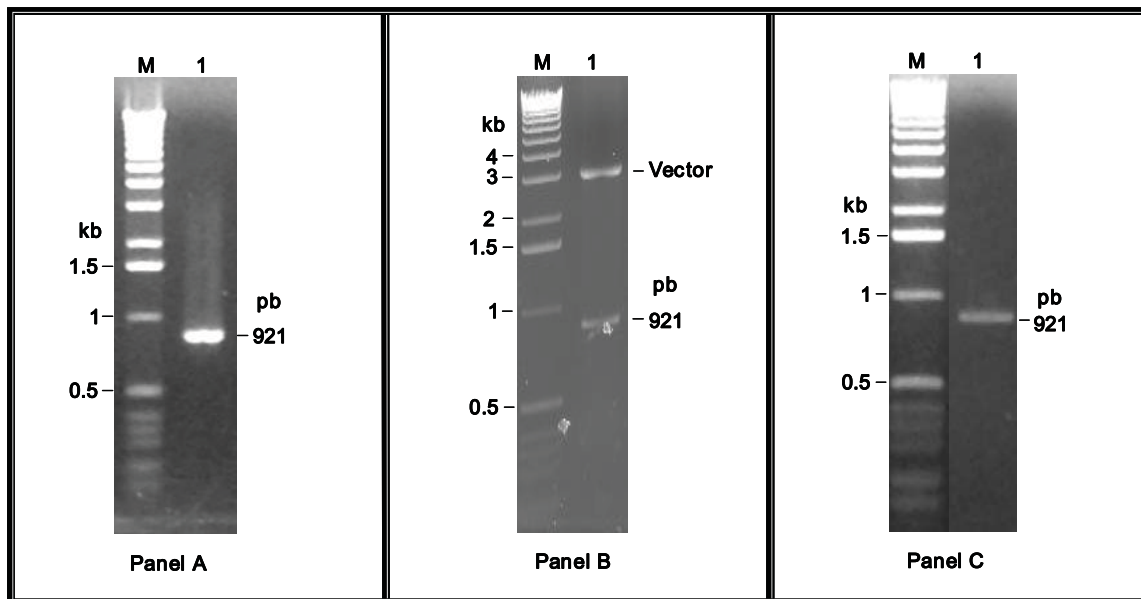


Figura 6. Clonación de un fragmento de 921 pb del gen de C160 de *L. major*. Panel A: Reacción de PCR para amplificar un fragmento de 921 pb. Panel B: El fragmento de 921 pb, clonado en el vector pGEM T-Easy, fue liberado digiriendo con *Eco* RI. La banda correspondiente al vector (3 kb) se señala. Panel C: Inserto de 921 pb purificado. Una alícuota de éste se usó para marcar radioactivamente.

Para seleccionar las enzimas de restricción y llevar a cabo el Southern-blot, se analizó la secuencia que rodea al gen de C160 en *L. major* y se construyó un mapa de restricción (Fig. 7). Se eligieron 5 enzimas (*Apa* I, *Hind* III, *Sal* I, *Sph* I y *Xho* I) cuyos sitios de corte flanquean al fragmento usado como sonda y una enzima (*Cla* I) que corta dentro de fragmento usado como sonda. Con las primeras se esperaría una banda en la autorradiografía, mientras que con la última se esperarían dos bandas. Los tamaños esperados de las bandas son los siguientes:

- *Apa* I 7904 pb
- *Hind* III 4075 pb
- *Sal* I 3761 pb
- *Sph* I 1665 pb
- *Xho* I 3466 pb
- *Cla* I 3624 y 6492 pb

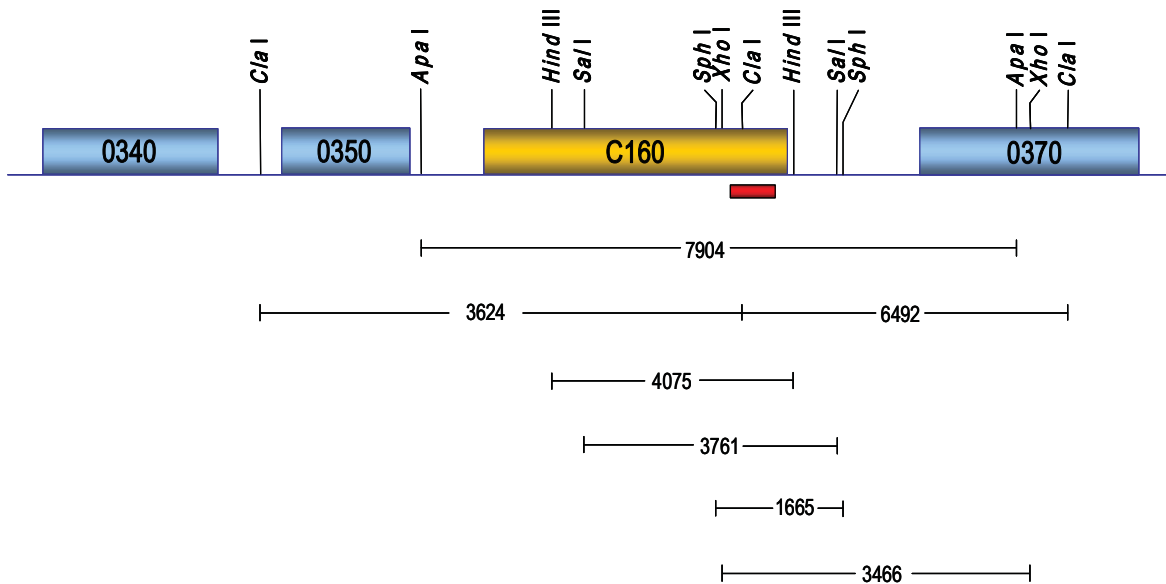


Figura 7. Mapa de restricción de la región del cromosoma 34 de *L. major* que contiene el gen de C160. La caja que se presenta debajo del gen C160 representa el fragmento de 921 pb usado como sonda. Las líneas con números indican el tamaño (en pb) de los diversos fragmentos de restricción.

Para iniciar el ensayo, fue purificado DNA genómico (DNAg) de cultivos de *L. major* y de *L. mexicana*. Después, 5 µg del DNA fueron digeridos con las enzimas antes mencionadas. Las electroforesis se llevaron a cabo en geles de agarosa al 0.8 %. Al término de las corridas, los geles fueron teñidos con bromuro de etidio y fotografiados junto a una regla fluorescente (Fig. 8). En los geles pudo apreciarse que todas las enzimas de restricción cortaron eficientemente el DNAg.

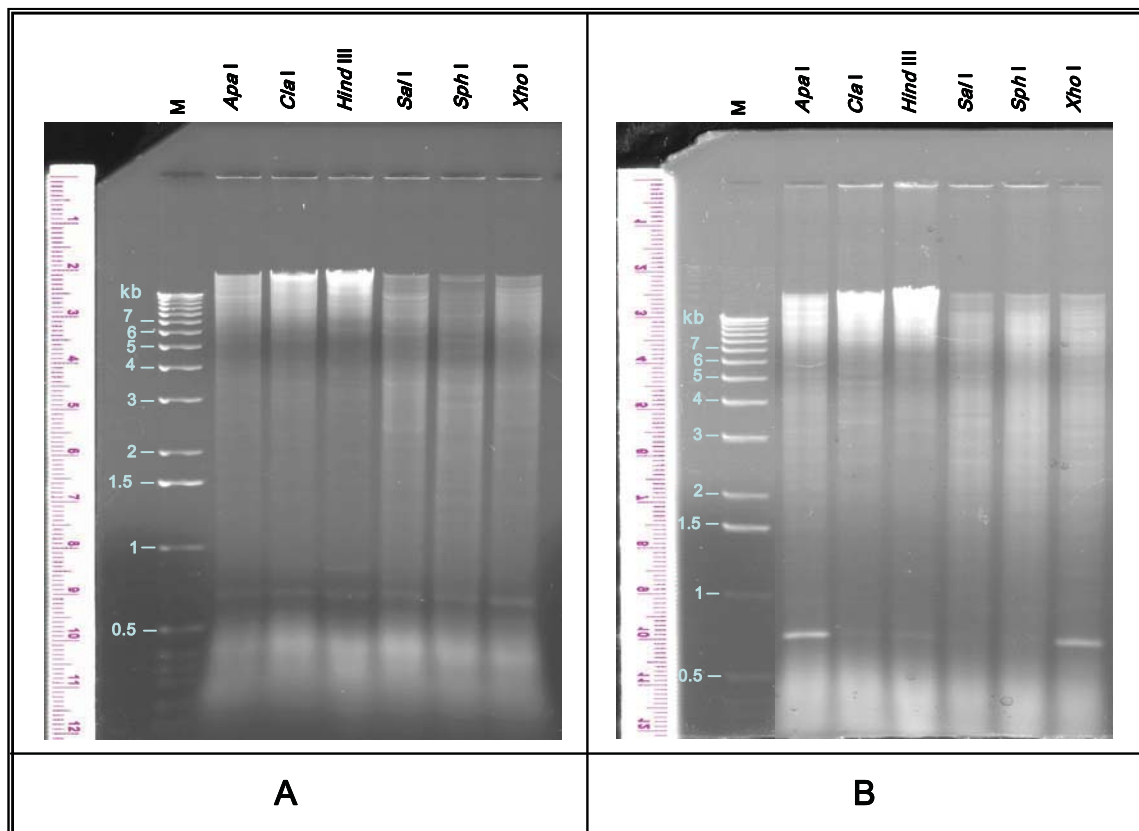


Figura 8. Electroforesis de DNAg de *L. major* (A) y *L. mexicana* (B) en geles de agarosa al 0.8 % teñidos con bromuro de etidio. El DNA fue digerido con las enzimas que se indican. En el primer carril de cada gel se muestra el marcador de peso molecular (escala de 1 kb).

Posteriormente, el DNA de los geles fue transferido a membranas de nylon, y éstas fueron hibridadas con el fragmento de DNA correspondiente a C160 marcado radioactivamente con ^{32}P . Después de ser lavados, los filtros fueron expuestos en placas de rayos X para obtener las autorradiografías (Fig. 9). En el caso de *L. major* se observaron las bandas del tamaño esperado (Fig. 9 A), con lo

cual confirmamos que solamente hay una copia del gen de C160 en el genoma de este parásito. En cuanto a *L. mexicana*, se observó una banda en las digestiones con *Apa* I, *Xho* I y *Hind* III (de 9.5, 6.0 y más de 12 kb, respectivamente). Como sucede con *L. major*, en la digestión con *Cla* I se apreciaron dos bandas (de 9.8 y 3.4 kb); además, con *Sal* I también se observaron dos bandas (de 1.8 y 0.9 kb) en la autorradiografía. Esto indica que en *L. mexicana* hay un sitio de corte de *Cla* I y *Sal* I dentro del fragmento del gen de C160 que se usó como sonda. En el caso de *Sph* I se aprecian tres bandas de alto peso molecular (una de 8 kb y dos de más de 12 kb), que parecieran ser resultado de una digestión parcial. Estos resultados nos indican que C160 es también un gen de copia única en *L. mexicana*.

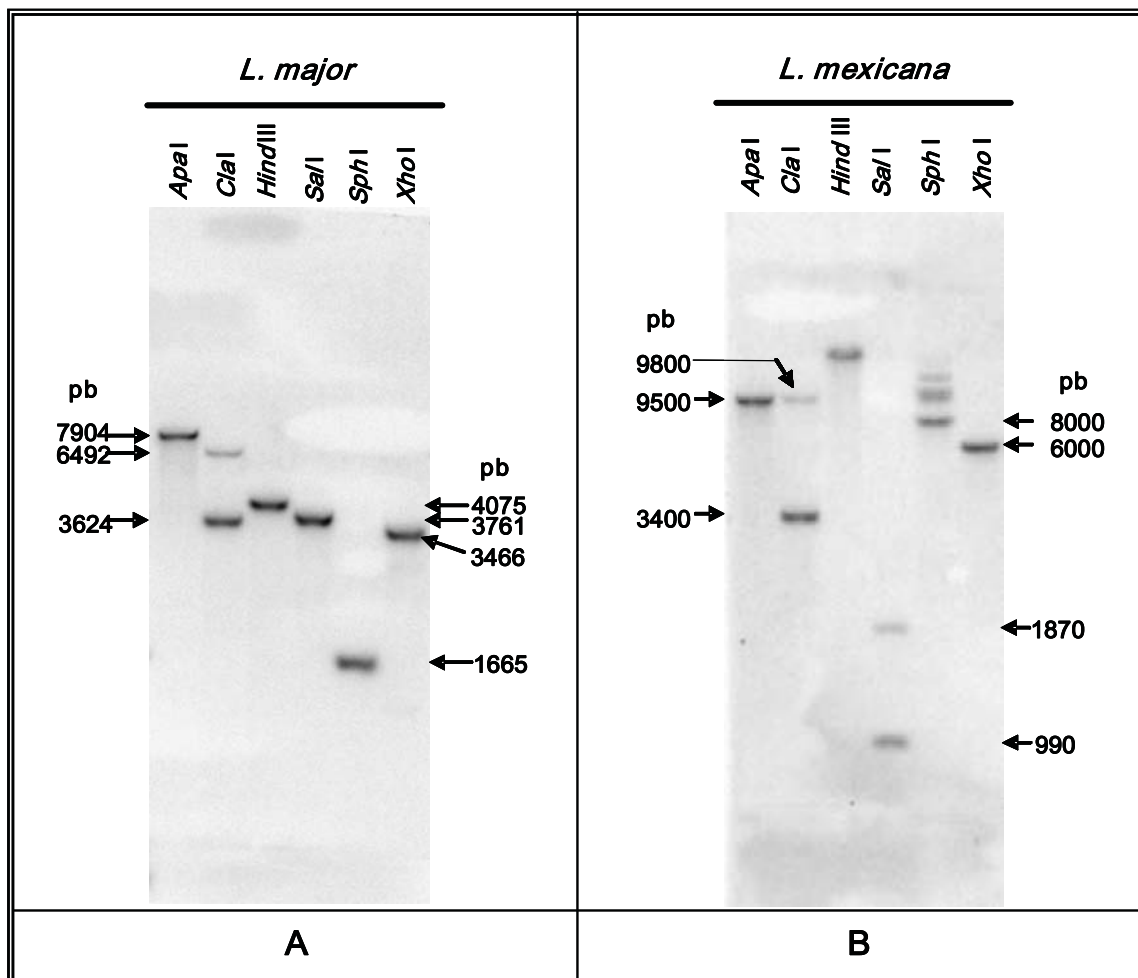


Figura 9. Experimento tipo Southern-blot para determinar el número de copias de C160 en *L. major* (panel A) y *L. mexicana* (panel B). Las membranas de nylon que contenían DNAg digerido con las enzimas que se indican fueron hibridadas con un fragmento de C160 marcado con ^{32}P . Se señalan los tamaños de las bandas obtenidas.

2. Caracterización del mRNA de C160

Para caracterizar el mRNA de C160 mediante experimentos de RT-PCR y ensayos Northern-blot se purificó RNA total de cultivos de *L. major* en fase media de crecimiento logarítmico y en fase estacionaria. Para ello, primero se estandarizaron las condiciones de crecimiento de *L. major* en medio líquido BM, encontrando que los promastigotes alcanzan la fase media de crecimiento logarítmico en tres días y la fase estacionaria de 6 a 7 días (Fig. 10), una curva muy similar fue observada en *L. mexicana* (datos no mostrados).

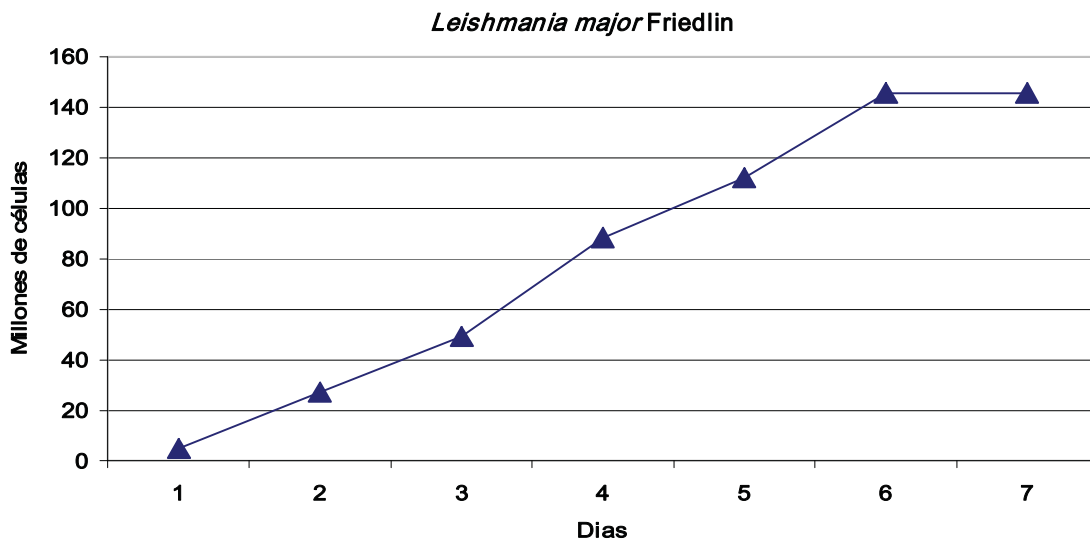


Figura 10. Curva de crecimiento de promastigotes de *L. major*. El número de parásitos, creciendo en medio BM, se determinó en una cámara de Neubauer.

2.1 Localización de los sitios de procesamiento del mRNA de C160.

Con las células en fase media de crecimiento logarítmico (cultivos de tres días) se aisló RNA total para llevar a cabo ensayos de RT-PCR para localizar las señales de procesamiento (el sitio aceptor del miniexón y la región de poliadenilación) del mRNA de C160. Antes de proceder con el experimento, el RNA se analizó en un gel desnaturizante de agarosa, observándose que presentaba muy buena calidad (Fig. 11).

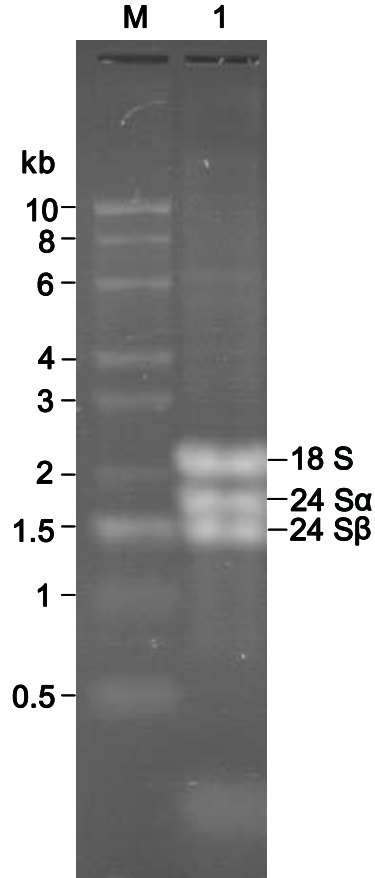


Figura 11. Electroforesis en un gel desnaturante de agarosa al 1% del RNA total aislado de cultivos de *L. major* en fase media de crecimiento logarítmico. Las tres bandas prominentes que se observan corresponden a las tres moléculas grandes del RNA ribosomal de *L. major* (18S, 24S α y 24S β). Carril M: marcador.

Para localizar el sitio de poliadenilación, el cDNA se preparó con el primer Nested-dT (CCTCTGAAGGTTACGGATCCACATCTAGATTTTTTTTTTTTTTTTTTNN), usando la enzima transcriptasa reversa. Posteriormente se llevó a cabo un PCR con los oligos C160-PA-1 (TTGAAGTCGTCTGGCAAGGCT) y B1 (CCTCTGAAGGTTACGGAT) (el primer Nested-dT contiene sitios de reconocimiento para los primers B1 y B2). Al analizarse en un gel los productos de PCR obtenidos, se observaron varias bandas de entre 300 y 1400 pb (Fig. 12 A). Para lograr mayor especificidad en la amplificación, llevamos a cabo un segundo PCR con los primers C160-PA2 (AGGTGTTCCCTGCGCAGCTCTT) y B2

(CACGGATCCACATCTAGAT). Esta vez se observaron solo dos bandas (de aproximadamente 340 y 500 pb) en un gel de agarosa (Fig. 12 B, carril C160 PA).

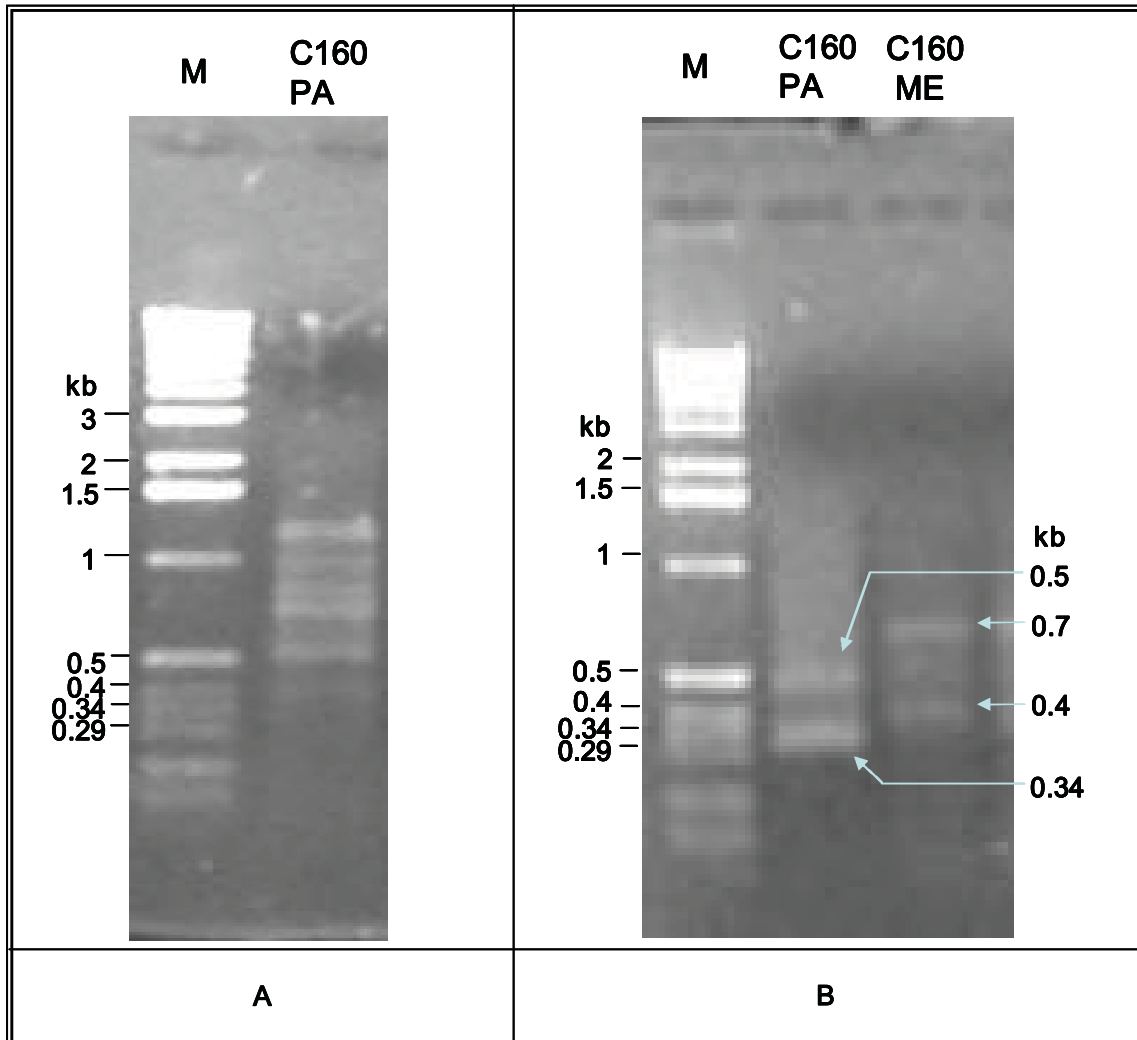


Figura 12. Amplificación por PCR de las regiones de poliadenilación (C160 PA) y del sitio aceptor del miniexón (C160 ME) del mRNA de C160. **Panel A:** electroforesis de los productos del primer PCR para localizar los sitios de poliadenilación de C160. **Panel B:** Productos del segundo PCR para localizar los sitios de poliadenilación de C160, y productos de PCR para identificar del sitio aceptor del miniexón. Carril M: marcador de tamaño (escalera de 1 kb).

Por otro lado, para localizar el sitio aceptor del miniexon, el cDNA se preparó con el primer C160 ME 1 (CATCGTTGACGCCGAAGTTCTT). Posteriormente se llevó a cabo un PCR con los oligos C160-ME-2 (AGAGAGGAGACTGTACTTGAT) y

Miniexón (AACGCTATATAAGTATCAGTT), amplificándose dos bandas de alrededor de 400 y 700 pb (Fig.12 B, carril C160 ME).

Las cuatro bandas que fueron amplificadas (dos de la región de poliadenilación y dos de la región del miniexón) fueron purificadas de geles de agarosa (Fig. 13) y clonadas en el vector pGEM-T Easy.

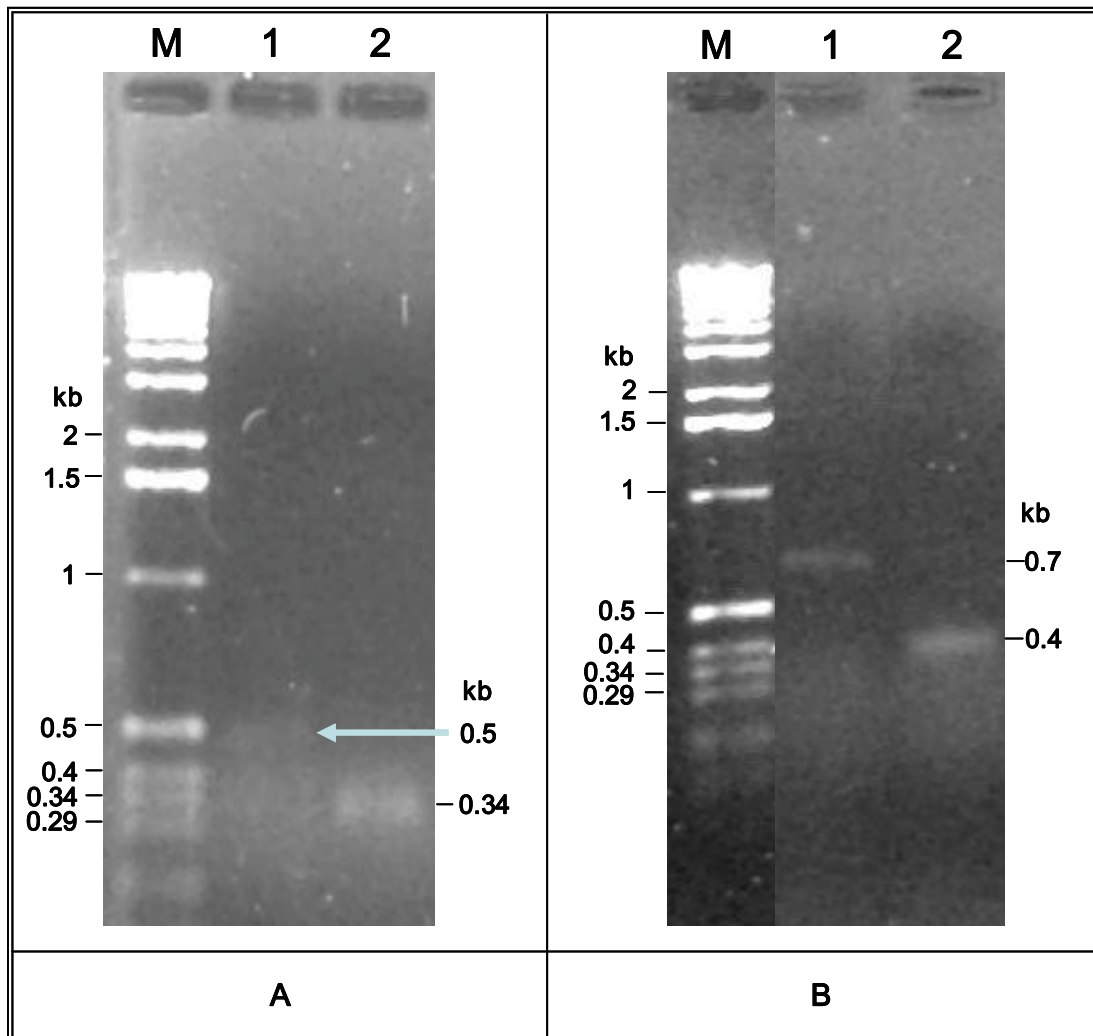


Figura 13. Insertos de la región de poliadenilación (panel A) y del sitio aceptor del miniexón (panel B) purificados de geles de agarosa. Se indican los tamaños de los insertos. Carril M: marcador de peso molecular.

Para llevar a cabo la clonación, los cuatro fragmentos de DNA fueron inicialmente ligados en el vector pGEM-T Easy. Con las ligaciones fueron transformadas células competentes JM109 de *E. coli*. De seis colonias correspondientes a cada

inserto fue aislado el DNA de plásmido mediante la técnica de minipreps. Los plásmidos fueron después digeridos con *Eco* RI para liberar los insertos clonados y analizar su tamaño mediante electroforesis (Fig. 14). En todos los carriles del gel se observó una banda de 3 kb que corresponde al vector, además de las bandas más pequeñas que corresponden a diferentes fragmentos de C160 (Fig. 14).

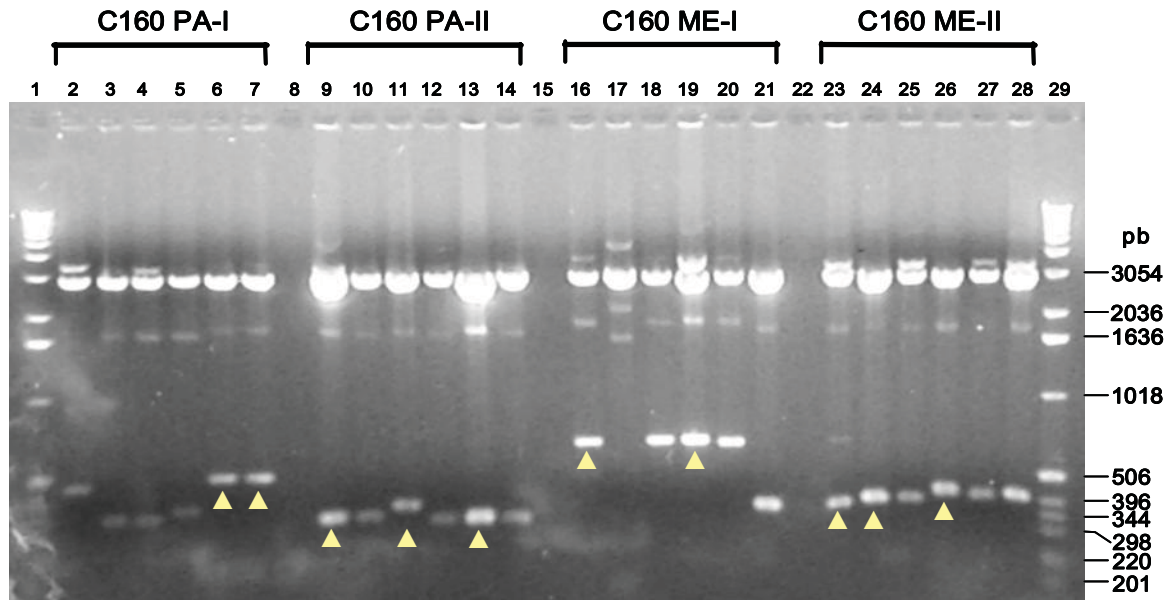


Figura 14. Electroforesis de DNA de minipreps digeridos con *Eco* RI. Del carril 2 al 14 se observan los insertos de C160 poliadenilación (de aproximadamente 340 y 500 pb); del carril 16 al 28 observamos los insertos de C160 miniexón (de aproximadamente 400 y 700 pb). Se señalan con un triángulo las 10 clonas enviadas a secuenciar. En los carriles 1 y 29 se muestra el marcador de peso molecular (escalera de 1 kb).

Cinco clonas correspondientes a poliadenilación y cinco clonas de la región del miniexón fueron enviadas a secuenciar con los oligos SP6 y T7. Dos ejemplos de las secuencias obtenidas se muestran en la Fig. 15, en donde se indican los oligos usados en la amplificación (C160-PA-2 y B2 para la región de poliadenilación, y C160- ME-2 y Miniexón para la región del sitio aceptor del miniexón).

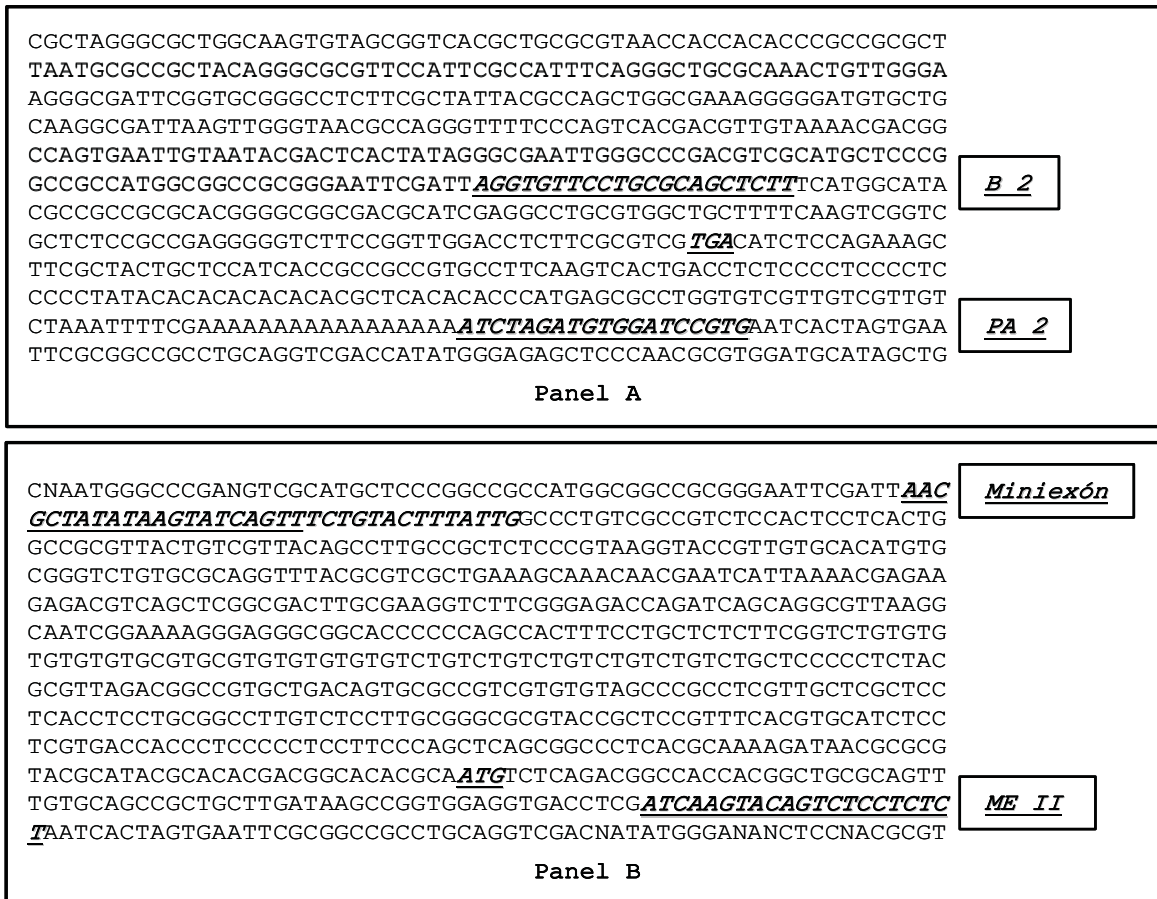


Figura 15. Secuencia nucleotídica de las clonas PA-II-1 (panel A) y ME-1-4 (panel B). La secuencia del panel A se obtuvo con el oligo SP6. En ella se indican los oligonucleótidos C160-PA2 y B2 (subrayados en negritas cursivas), así como el codón de término TGA. La secuencia del panel B se obtuvo con el primer T7. En ella se señalan los oligos Miniexón y C160-ME2 (subrayados en negritas cursivas), así como el codón de inicio ATG. Las secuencias contiguas al oligo Miniexón (que se encuentran en negrita cursiva, pero sin subrayar) son parte del spliced-leader o miniexón completo.

Las cinco clonas de poliadenilación fueron positivas, localizándose la región de poliadenilación del mRNA de C160 entre 136 y 323 pb río abajo del codón de término de C160 (Fig. 16 B). Esta distancia es similar a la reportada para otros genes de *Leishmania* y de *T. brucei*. Río abajo de la región de poliadenilación (a 176 pb) encontramos una región rica en pirimidinas (formada por 14 pirimidinas) (Fig. 16 B). Dicha región puede ser importante para que se lleve a cabo el proceso de poliadenilación.

```

acctccaacacgcacacacgcgcctcccatgcagcagtatgcccgaatgtcaccacatgcatacacgcgcgc
gcacacctttgccaacggcgaacgggtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtggcaccatcacctcgtct
ctgtaccgcgcacttcgcatgtttggtctcgcgcactcctctcgtgtctccgtctccttctctttctcg
ccgctaaccgtccctgcggacgctcatgctcgtctctttctttccttaggcccctgtcgcgctcctcactcctc
actggccgcggtactgtcgttacagccttgccgctctcccgttaaggtaaccgcttggtgcacatgtgcgggtctg
tgcgcagggtttacgcgtcgtgaaagtaaacaacgaatcattaaaacgagaagagagcgtcagctcggcgact
tgcgaaggctcttcgggagaccagatcagcaggcgttaaggcaatcggaaaagggaggggcgcacccccagc
cactttcctgctctctctcggctgtgtgtgtgtgtgtgcgtgcggtgtgtgtgtgtgtctgtctgtctgtctg
ctgctccccctctacgcgttagacggcctgtcgcacagtgcgcccgtctgtgtagccccgctctgtctgctcg
ctcctcactcctcgtgcgccttgtctccttgccggcgcgtaccgctccgtttcacgtgcacatctcctcgtgacc
accctccccctccttcccagctcagcggcctcaccgcaaaagataacgcgcgtacgcatacgcacacgcagcg
cacacgcaatgtctcagacggccaccacggctcgcgcagtgtgtgcagccgctgcttgataagccggtggagg
tgacctcgatcaagtacagtctcctctctgaagacacgatccaccgctcctcggctcgtcctgccaccgcg
tgattgggaccgaaaagaacttcg

```

Panel A

```

cggccttgaagtcgtctggcaaggctcgcgcggtcggcaagcacagcaagaaggtggagccgacgcgccaagg
agggtgttcctgcgcagctctttcatggcatacgcggcgcgacggggcggcgacgcatcgaggctcgtcgtg
gctgcttttaagtcggctcgtctctccgcggagggggtcttccgggtggacctcttcgcgctcgtgacacatcc
agaaagcttcgctactgctccatcaccgcgcgctgccttcaagtcactgacctctccccctccccct
atacacacacacacacgcctcacacaccatgagcgcctgggtgtcgttgctgctaaatttttgaatcga
gcaaaaaggtgaagggcgttgctttccctggcgcctgcgtgcactcctctgcgacggcagcgtgttacgctc
actcgcgcctgccccaccgccggcggcggcgcctcgcacatgctgtggatgcggcgatgatttcactctttgcg
tgctggccaaacggctcgccccctcccctacccaccacctcaaccggcaccggcgtagtgtaggctgctc
accaagtgaagcactgcactggatgccaccacacacctctccttgcattgtccaggtagtggcggcgg
cagcggtaagaagagtatgtatgcggcggaggacatccgccaatgcgcgctctcaccccgccccctcct
tcgcagacgaagctccaacgcctctctgcgcgtctctctctctctcgtgtgcaccgcatctcccactgtccag
ctgggtgcgctctttacg

```

Panel B

Figura 16. Secuencia nucleotídica de C160 en *L. major*. **Panel A.** Región 5' del gen de C160. Se presentan sombreados el sitio aceptor del miniexón (AG), el codón de inicio (ATG) y el oligo C160 ME 2. Río arriba del AG aceptor del miniexón se señala (en negritas y subrayada) una región rica en pirimidinas. **Panel B.** Región 3' del gen de C160. Las secuencias sombreadas representan el codón de término (TGA) y el oligonucleótido C160-PA-2. Asimismo, se presentan sombreados y subrayados los sitios de poliadenilación: a, t, c y c (todos localizados río-abajo del codón de término). Una región rica en pirimidinas localizada río abajo de los sitios de poliadenilación se muestra en negritas y subrayada.

Con respecto a las clonas correspondientes al sitio aceptor del miniexón, sólo dos de ellas resultaron positivas. En éstas se localizó el miniexón a 536 pb río arriba del codón de inicio (Fig. 15 B). Al comparar la secuencia del mRNA de C160 con la de su gen, encontramos un dinucleótido AG en la región donde fue agregado el miniexón (Fig. 16 A). Este AG corresponde, por lo tanto, al sitio aceptor del miniexón. La distancia encontrada entre el AG y el codón de inicio (536 pb) es

similar a la que se ha reportado para otros genes de *Leishmania*. Análisis llevados a cabo en otros genes han mostrado que invariablemente se presentan trectos ricos en pirimidinas río-arriba del sitio aceptor del miniexón, y que estas secuencias son necesarias para que se lleve a cabo el trans-splicing. Al analizar la secuencia de C160, se encontró una región rica en pirimidinas (formada por 17 pirimidinas) muy cerca (47 pb río-arriba) del sitio aceptor del miniexón (Fig. 16 A). Al comparar la región que rodea al sitio aceptor del miniexón de C160 (de las bases -12 a +5) con una probable secuencia consenso para *L. major* previamente reportada (Requena *et al.*, 2003), observamos que existe poca similitud entre las dos secuencias, pues además del AG, sólo se localizaron dos nucleótidos conservados: una C en la posición +4 y una C en la posición -5 (Fig. 17).

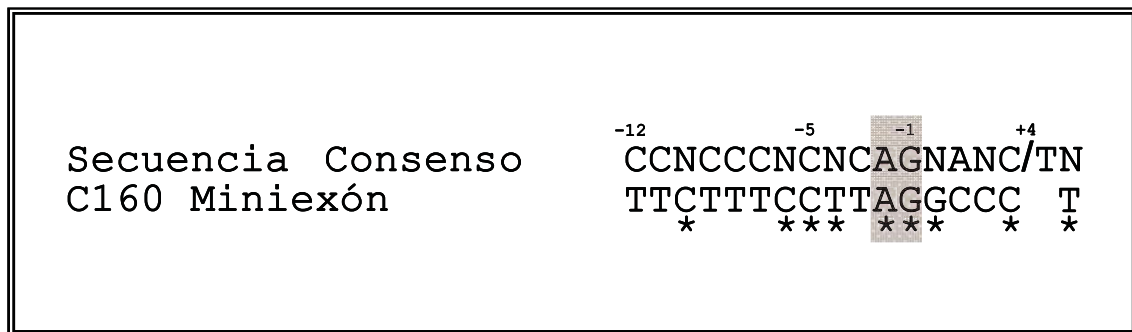


Figura 17. Comparación de la región que rodea al sitio aceptor del miniexón entre C160 y una secuencia consenso para *L. major*. Se compara de las bases -12 a +5, considerando al AG (encerrado en una caja) como posición -2 y -1, respectivamente. Las letras N indican que puede tratarse de cualquiera de las cuatro bases. Los asteriscos señalan los nucleótidos conservados.

2.2 Análisis del tamaño y abundancia del mRNA de C160 en *L. major*.

Se llevaron a cabo experimentos tipo Northern-blot para determinar la abundancia y tamaño de los transcritos de C160 en cultivos de promastigotes de *L. major* y *L. mexicana* en fase media de crecimiento logarítmico y en fase estacionaria. Dicho experimento se inició corriendo en un gel desnaturalizante de agarosa el RNA de las dos diferentes especies de *Leishmania* (Fig. 18).

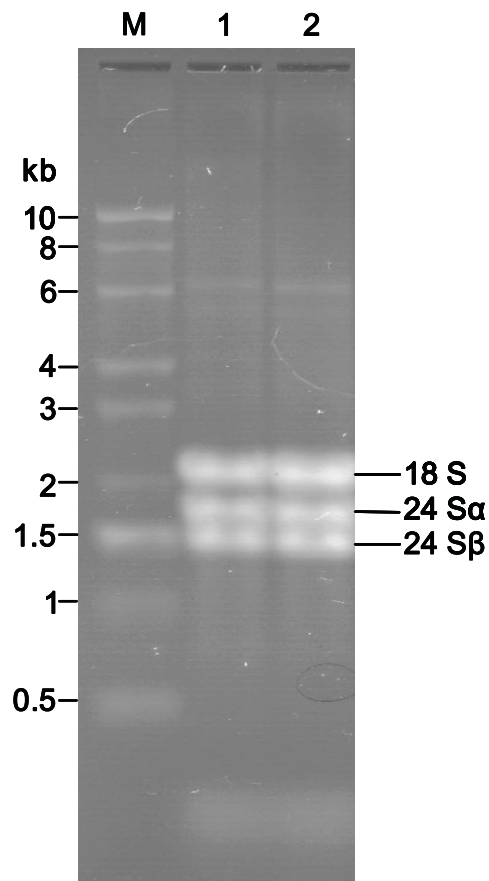


Figura 18. Gel desnaturalizante de agarosa al 1.2 % en el que se muestra RNA de *L. major* (carril 1) y *L. mexicana* (carril 2). En ambos casos, el RNA mostrado corresponde a promastigotes en fase media de crecimiento logarítmico. En el carril M se presenta el marcador de peso molecular (escalera de RNA de 10 kb). Se indica la posición de las tres moléculas grandes de RNA ribosomal (18S, 24S α y 24S β).

Después se realizó la transferencia del RNA del gel a una membrana de nylon para hibridarlo con un fragmento del gen de C160 marcado radioactivamente con ^{32}P . La autorradiografía del experimento mostró que el mRNA de C160 en *L. major* tiene un tamaño aproximado de 5.7 kb, mientras que su tamaño en *L. mexicana* es de alrededor de 5.5 kb (Fig. 19). En el caso de *L. major*, la señal de hibridación fue más intensa con el RNA aislado de células en fase media de crecimiento logarítmico, mientras que en *L. mexicana* la señal fue mayor con el RNA aislado de células en fase estacionaria. Para determinar si estas diferencias son reales, o simplemente pudieran deberse a que se cargaron cantidades diferentes de RNA en el gel, se procedió a re-hibridar el filtro de nylon con una sonda del gen de α -tubulina. Previamente se ha comprobado que α -tubulina se expresa de la misma manera en células en fase media logarítmica que en células en fase estacionaria, por lo que es usada como control de carga en Northern-blots. Como puede apreciarse en la Fig. 19, la intensidad relativa de las bandas de hibridación obtenidas con α -tubulina en los diferentes carriles es muy similar a la obtenida con C160. Esto nos indica que la cantidad de RNA cargada en los distintos carriles del gel no fue la misma: se cargó menos RNA de *L. major* en fase estacionaria y de *L. mexicana* en fase logarítmica; en base a esto, podemos concluir que la expresión de C160 es muy similar en las dos fases de la curva de crecimiento celular, en ambas especies de *Leishmania*.

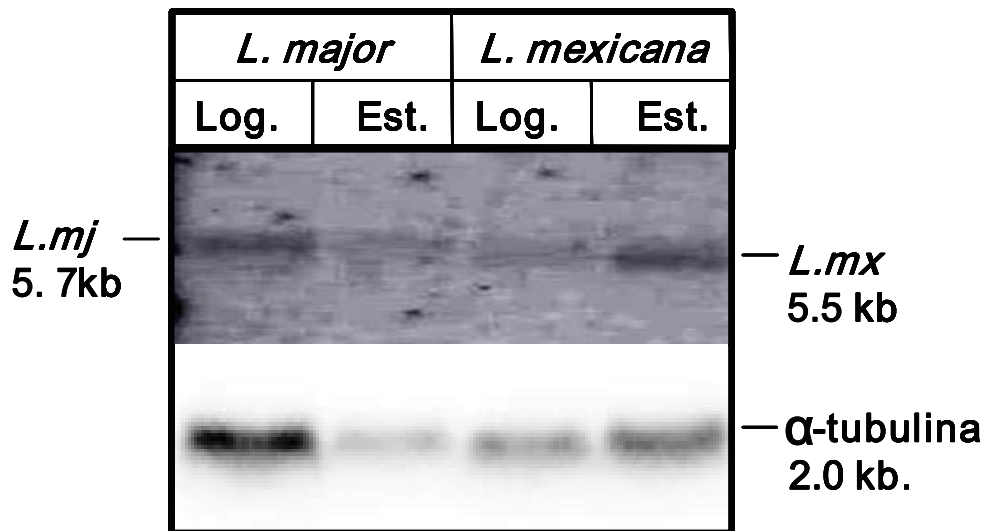


Figura 19. Hibridación tipo Northern-blot de C160. Se usó RNA de *L. major* y *L. mexicana* en fase media de crecimiento logarítmico (Log) y en fase estacionaria (Est). Como sonda se usó un fragmento del gen C160. En la parte inferior se muestra la re-hibridación del filtro de nylon con una sonda de α -tubulina como control de carga.

3. Comparación de la secuencia de C160 entre varias especies.

Estudios previos han reportado la presencia de regiones conservadas en la subunidad mayor de Pol III entre varias especies de eucariontes. Incluso al comparar las secuencias de C160 con aquellas de la subunidad β' de la RNA polimerasa de *E. coli* se han encontrado regiones con cierto grado de conservación. Para determinar si entre las secuencias de aminoácidos de C160 de *Leishmania major* y la secuencia de subunidades mayores de otros tripanosomátidos y eucariontes se presentan regiones conservadas, se realizó un alineamiento con el programa Clustal W 1.82. Este análisis reveló la presencia de 8 regiones conservadas, las cuales coinciden con las regiones conservadas A-H previamente reportadas. En la Fig. 20 se muestran las 8 regiones conservadas en la secuencia de aminoácidos de C160 de *L. major*, mientras que en la Fig. 21 se muestra el alineamiento de cada dominio conservado entre ocho especies diferentes de eucariontes. El dominio conservado más pequeño es el E, que tiene sólo 48 pb, mientras que el dominio conservado F es el más grande, siendo de 399 pb.

MSQTATTAQ FVQPLLDKPV EVTSIKYSLL SEDTIHRLSV LPCHRVIGTE KNFGVNDGRL **A**
 GPSDRLSVCN TCGQRSIECT GHAGHIDLEV PVFHLGYFSA VIRVCRTICK RCSNVLLTRE
 EMEYYLHRLR STTHEPQORA AIIKGIQEDA YKTRVCLMCG GLNGTVRRVR PMRIVHEKYL
 VDLRRGEQAN EDPTAFFQEE LRSAVMHNSE VGAKHEFVHE FLHPQRVKKL FEAIPOEQVP
 LLGLQPGTSP CSLLISTLLV PPVCVRPRGM STTSHIREDD LTTQYNEILI CSDMMSDGTN **B**
 DAARSVETWE LLQTRVARLL DAALPGFPSH LRTVECKSYA QRMKGKQGRF RGNLSGKRVD **C**
 FSGRSVISPD PNLRIDELAV PLRVARVLTYPQRFVAGNIQ LMRRLVRNGP HVHPGALTVY
 LSKECSRKSL RNARDREAIA ARLSIGDVVE RHMNGDYIL FNRQPSLHRI SLMHRARVL **D**
 PFRTFRFNEC CCAPYNAFD GDEMNIHVVO TEEARAEAKE LMLTSHNIIT AKNGEPIIAC
 TQDFLTAAYL VTSRDALFDR ASFTQMVSHW LGNETQYALP IPAILKPAEL WTGKQLFELI **E**
 LRPTPETQLL LNLEAKARFY SGAGRHDDPA EGYVAFLDSV FLSGRLDKKL LGGGAKDGLF
 ARLYALGGGE QTATCMSRIA QFTARYLQNY GFSLGLGDVS PTPSLNEKKA AVLAVSFDKC
 DRLISLAKTG RLIPKPGMSV KQSLEAMLNA ELSQVRDACG SAAVQALDAK SNAPLIMVNS **F**
 GSKGSALNTA QMMACVGQOT VSGKRIMNAF QDRALPHFPR FAEDPASRGF VASSFYSGLS
 PTEFFFHGMA GREGIVDTAV KTAETGYIYR RLSKAMENLS VGYDASVRSV QGNIVQLRYG
 EDGMDPWLME GAHGTPLNLD QEWLSNRAAY ARFRKHIDSV ISEGWGSGGL AASADPLLQT
 YRRLYDEWHA VSMLPGELDT FVHLLHHADE ATLASCARLM EVEAAIRGAT PSSAAASQQL
 LQQLAQQHGS DRLRSDIQAF FRKKRDELVQ LRQKLKPLD AHAPAAASAK AVRGGEKRKP
 GPHGDVPPSV TADASTSAAA VQAFAESLQA ELLPLTKGML LHFLEASARK VHRKLCFPGT **G**
 PCGAIAAQSV GEPSTQMTLR TFHFAGVASM SITQGVPRLV EIINANKSIA TPVITAPIVL
 EDEFTSIDLA SASRTQYQAA RAVKGLMERV LLKEITREMV EVVTPRAYI HIFLNMELIE
 RLLLPIDAAV VCQRLYAAAA RPMSPLRHLS EACADVSRD SLVIKSYEKD PARVHFNVQH
 LLTLLPDLVV GGVPVNRVM IADRSEKLLA EGAELLSVMS LPYVDGVRTT CNHVAVIERA
 LGIEAARETI VKEITSILQA YSLNIDIRHI YLLADVMTSR GVVLGITRYG IQKMNNNVLT **H**
 MASFERTTEH LYNAAMTERE DVNLSVSESI IIGKPIPLGT SSFNI LLNKG SVAPPGSNTG
 RMPSPQSAH AAAAALKSSG KAAAVGKHSK KVEPTPKEVF LRSSF MAYAA AHGAATHRGL
 RGCFSRSL S AEGVFRDLDF AS

Figura 20. Secuencia de aminoácidos de la subunidad mayor de pol III (C160) de *L. major*. Las ocho regiones conservadas se presentan subrayadas y sombreadas. Por otra parte encerrado en una caja se encuentra el motivo que está conservado en todas las subunidades mayores ubicado en la región D.

Figura 21. Alineamiento de la secuencia de aminoácidos de las regiones conservadas de C160 de *L. major* entre ocho especies diferentes, este se realizó mediante el programa Clustal. "*" indica que los residuos de aminoácidos en cada columna son idénticos en todas la secuencias de cada alineamiento. ":" indica que se han observado sustituciones conservadas. "." significa que se han observado sustituciones semiconservadas. Encerrado en una caja se señala el motivo que está conservado en todas las subunidades mayores ubicado en la región D.

DOMINIO A
L.major FGVNDGRLG-PSDRLSVCNTCGQRS--IECTG-----HAGHIDLEVPVF-HLGYFSAVIRVCRRTICKRCSNVLL 65
T.cruzi YGVNDPRLG-VCDRVSFCATCGLRS--IDCVG-----HPGHIDLETPVF-HLGFFTTILRICRTICKRCSHLL 65
T.brucei YGVNDARLG-VCDRLSICETCGLNS--IECVG-----HPGHIDLEAPVF-HLGFFTTVLRICRTICKRCSHVLL 65
P.falciiparum YGVLDLKLK-AHKSNSVCETCNKLL--INCSG-----HFGYIELNYPVF-HIGYKYI IHILYCICKYCSSLLL 65
E.histolytica NGVLDLRLG-VCDLSVCETCGKRI--EECSG-----HFAVINLELPVF-HIGFFRPIIQVLQCVCKNCNRILL 65
G.lamblia YKVLNHFVS-LAIVKEAQEQAKQVNCPPFCH--AP-STICKKSQGFVLRMHEERATKILADVIKHQK---- 66
S.cerevisiae NGALDPKMG-VSSSLECATCHGNL--ASCHG-----HFGHLKLALPVF-HIGYFKATIQLQIGICKNCSAILL 65
H.sapiens YGVLDHRMG-TSEKDRPCETCGKNL--ADCLG-----HYGYIDLELPCF-HVGYFRAVIGILQMICKTCCHIML 65
. : : . . . * . : : : : : *

DOMINIO B
L.major SPCSLLISTLLVPPVPCVRPRGMST-TSHIREDDLTTQYNEIL 41
T.cruzi SPVDLLVTLLVPPVSVRPRGSSG-TANIRDDDLTGQYNDIL 41
T.brucei SPTDLLMTLLVPPVPRPRGCAG-TTIVRDDDLTAQYNDIL 41
P.falciiparum -PEKLIITALLVPPNTIRPSVID-EHGTAEDDLTCILSEIT 40
E.histolytica PPENMILTSVPVPIAIRPSVAMDGGNASNEDDLTTQLKEIM 42
G.lamblia RPQDVILTHIPVPPSCLRPSVQSGSGAGTTEDNLTSHLVRIL 42
S.cerevisiae RPETYIWRYLPAAPPVCI RPSVMQDS PASNEDDLTVKLTEIV 42
H.sapiens KPSDLILTRLLVPLCFRPSVSDLKSGTNEDDLTMKLTEII 42
* : : . ** . ** : * : ** *

DOMINIO C
L.major QRKMGKQGRFRGNLSGKRVDFSGRSVISPDPNLRIDELAVPLRVARVLTYPQRVFAGNIQLMRRLVRNGPHVHPGA 76
T.cruzi QRLKKGHRFRGNLSGKRVDFSGRSVISPDPNLDVDELAVPLRVARVLTYPQRVFKSNLELMRRLVRNGPNVHPGA 76
T.brucei QRLKSKHGRFRGNLSGKRVDFSGRSVISPDPNLDVDELAVPLRVARVLTYPQRVFKANHELMRRLVRNGPHVHPGA 76
P.falciiparum QRLKKGEGFRGNLSGKRVDFSGRTVISPDPNISIDEVVI PKIIAMRLTYPETVNKYNDIKLMLIKNGCNKWPGA 76
E.histolytica QRLKKGHRFRGNLLGKRVDFSGRTVISPDPNLDIEQIGVPKLMAVKLTYPERVTKHNIDKLRQLVINGSNNYPGC 76
G.lamblia DRKLGKAGRFRGNLSGKRVDFSGRTVISPDPNLSMQQVAIPRLIAQNLTFPEIVTSRNIRFLRELI LNG-KTYPGA 75
S.cerevisiae QRLKMGKQGRFRGNLSGKRVDFSGRTVISPDPNLSIDEVAVPDRVAKVLTYPKVTYRNRHKLQELIVNGPNVHPGA 76
H.sapiens QRLKMGKQGRFRGNLSGKRVDFSGRTVISPDPNLRIDEVAVPVHVAKILTFPEKVNKANINFLRKLQVNGPEVHPGA 76
:*:*:* ***** ** *****:*:*:*****:* : : : : : * : * **:*: * * : : * : ** . **.

DOMINIO D
L.major LSIGDVVERHVMNGDYILFNRQPSLHRISLMAHRARVLPFRTRFRNECCCAPYNADFDGDEMNIHVQTEEARAEAKELMLTSHNIITAKNGEPII ACTQD 101
T.cruzi LSIGDVVERHVMNGDVVLFNRQPSLHRISLMAHRARVLPFRTRFRNECCCAPYNADFDGDEMNVHLVQTEEARAEAFELMLTAKNIINAKNGEPII ACTQD 101
T.brucei LAVGDIVERHVMNGDLVLFNRQPSLHRVSMMAHRARVLPFRTRFRNECCCAPYNADFDGDEMNVHVFQTEKARAEALQLMSTARNIIIAKNGEPII ACTQD 101
P.falciiparum LNIIGDVVERHICDGDIVLFNRQPSLHRMSIMCHKAKIMDFKTRFRNECVCS PYNADFDGDEMNLDPQTEEARAEALYLMNVKHNLIITPKNGEVI IAL TQD 101
E.histolytica LKIGDIVERHLEDNDIVLFNRQPSLHRISIMCHRAKILPWRTRLRFNECVCTPYNADFDGDEMNLHVPQTEEARAECLMLMHSAKNLQTPRTGQMI I AETQD 101
G.lamblia LRPNDIVYRHLLPNDTLFNRQPSLHRMSIMQFNAVIHENRTFSFNPVVCSPFNADFDGDEMNI FYMGOQEARAEAGILMGSHENIISPRHGECMIGLTQD 101
S.cerevisiae LQIGDVVERHLEDGDVLFNRQPSLHRLSILSHYAKIRPWRTRFRNECVCTPYNADFDGDEMNLHVPQTEEARAEALNLMGVKNNLLTPKSGEPII AATQD 101
H.sapiens LKYGDIVERHLIDGDVLFNRQPSLHKL SIMAHLARVKPHRTFRFRNECVCTPYNADFDGDEMNLHLPQTEEARAEALVLMGTKANLVTPRNGEPLIAAIQD 101
* .:*:* ** : * :*****: : : : . * : : * : * * :*****: * : : * : ** * * : : : * : * *

DOMINIO E
L.major PIPAILKPAELWTGKQ 16
T.cruzi PIPTILKPELWTGKQ 16
T.brucei PIPAILKPVELWTGKQ 16
P.falciiparum PIPAILKPELWTGKQ 16
E.histolytica PTPAYLKPKKLWTGKQ 16
G.lamblia SQPCIVYPRQLYSGKQ 16
S.cerevisiae PPPAIMKPYLWTGKQ 16
H.sapiens PPPTILKPVTLWTGKQ 16
. * : * * : : **

DOMINIO F

L.major NAPLIMVNSGSKGSALNTAQMMACVGGQOTVSGKRIMNAFQDRALPHFRFAEDPASRGFVASSFYSGLSPTTEFFHHGMAGREGIVDTAVKTAETGYIYRRLSKAMENLSVGYDASVRSVQ 120
T.cruzi NTPLIMVQSGSKGSALNIAQMMACVGGQOTVSGKRILNAFQDRSLPHFYRFEEAPSARGFVANSFYSGLTPTEFFHHMAGREGLVDTAVKTAETGYIYRRLMKAMENLSVRYDGTARNR 120
T.brucei NTPLIMVQSGSKGSALNIAQMMACVGGQOTVSGKRILDAFQDRSLPHFHRFEEAPAARGFVANSFYSGLSPTTEFFHHMAGREGLVDTAVKTAETGYIYRRLMKAMENLSVRYDGTARNR 120
P.falciparum NKPLIMFNSGAKGALINIAQMIACVGGQONVAGQRIQNGFINRTPHFFHCKDSESRGFVQNSFYTGLSPTTEFFHHMAGREGLVDTAVKTAETGYMQRRMLKALEDLSIHVDYSVRSCD 120
E.histolytica NSPLVMALSGSKGSVINISQMIACVGGQOTVNGGRVSDGFISRSPLPHFALHSRTPQAKGFVKNSEFTGLNATEFFHHMAGREGLVDSAVKTAETGYMQRRMLKALEDLHVHYDGTVRSAS 120
G.lamblia NKPLIMSLCGSKGSPINIAQMI IILGQQSFGGSRAPDDFYTRSTPYFYHYSKEPNAKGFILNSFYTGLLPPFEFLAHARAGRDGVIDSACKTADTGYLQRRMLVKCLEDLVSVSYDFTVRNSK 120
S.cerevisiae NAPLIMATCGSKGSTLNVSQMVAVVGGQIIISGNRVPDGFQDRSLPHFHKNSKTPQSKGFVRNSFFSGLSPPEFLFHAISGREGLVDTAVKTAETGYMSRRMLKSLEDLSCQYDNTVRTSA 120
H.sapiens NSPLTMALCGSKGSFINISQMIACVGGQAIISGSRVPDGFENRSLPHFEKHSKLPAAKGFVANSFYSGLTPTEFFHHMAGREGLVDTAVKTAETGYMQRRMLVKSLEDLCSQYDLTVRSST 120
* * * .*:*: : * :*: : :*: * * * : * * : * * . . :*: :*: * * . * : * .*:*: : * * * :*: * * * * * * * * * * * * * * * * * * .

L.major GNIVQLRYGEDGM 133
T.cruzi GDVVQFRFGEDGL 133
T.brucei GDVIQLRFEDGL 133
P.falciparum KQIVQFIYGGDAL 133
E.histolytica LTVIEFKYGGDGL 133
G.lamblia KSVVQFRFGHDF 133
S.cerevisiae NGIVQFTYGGDGL 133
H.sapiens GDIIQFIYGGDGL 133
::: : * * .:

DOMINIO G

L.major PGTPCGAIAAQSVGEPSTQMTLRTFFHFAGVASMSITQGVPRLVEIINANKSIATPVITA 59
T.cruzi PGTPCGAIAAQSVGEPSTQMTLRTFFHFAGVASMSITQGVPRLVEIINANRNIAATPVVITA 59
T.brucei PGTPCGAIAAQSVGEPSTQMTLRTFFHFAGVASMSITQGVPRLVEVINANRNIAATPVVITA 59
P.falciparum PGDAVGSISAQSIGEPGTQMTLKTFFHFAGVASMNVTLGVPRIKEIINASNSIQTPILNI 59
E.histolytica AGTPVGALAGQSMGEPSTQMTLKTFFHFAGVASMNIALGVPRIKEIINASKKIQTPIVITA 59
G.lamblia PGSPCGAVAAQSVGEPSTQMTLKSFFHAGLASMNIITQGVPRLKEIVDGVVKIISTPIITV 59
S.cerevisiae PGTAIGAIGAQSIGEPGTQMTLKTFFHFAGVASMNVTLGVPRIKEIINASKVISTPIINA 59
H.sapiens PGSAVGALCAQSIGEPGTQMTLKTFFHGGVASMNIITLGVPRIKEIINASKAISTPIITA 59
.* . *:: .*:*:*.*:*.*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*. * * * .

DOMINIO H

L.major LTMASFERTTEHLYNAAMTEREDVNLSVSESI IIGKPIPLGTSSFNI 47
T.cruzi LTMASFERTTDHLYNAAATQRVDENLSVSESI IIGKPVPLGTTSFSL 47
T.brucei LTMASFERTTDHLYNAAATQRVDRDLSVSDSI IVGKPVPLGTTSFDL 47
P.falciparum LMLASFEETNEHLFVSSFFKNVDEINNISESI IVGKNIPIGTGAFQL 47
E.histolytica FTFASFERTNDHLFDAAVHSRKDEIKGVSESI IVGNQVGLGTGLMQI 47
G.lamblia IMLASFECTGEHLFNAALGNKVDEANGVTESI IILGKPMMSGTGSFSL 47
S.cerevisiae LQLASFECTTDHLFDAAFYMKKDAVEGVSECI IILGQTM SIGTGSFKV 47
H.sapiens IMLASFECTADHLFDAAYFGQKDSVCGVSECI IMGIPMNIIGTLFKL 47
: :*:*. * *:: : . * . :*:*: * * : * * : * .:

Como era de esperarse, las secuencias de *L. major* tienen mayor similitud con las de otros tripanosomátidos, como *T. brucei* y *T. cruzi* (Fig. 21 y Tabla 1). En promedio hay 80.8% de identidad entre *L. major* y *T. brucei*, y 82.1% de identidad entre *L. major* y *T. cruzi* (Tabla 1). Por otro lado, entre *L. major* y el protozoario *Giardia lamblia* hay solamente 44.8 % de identidad. Esta similitud es incluso menor a la que presentan *Homo sapiens* y *S. cerevisiae* con *L. major* (61.1 y 58.9 % de identidad, respectivamente). En promedio, los dominios más conservados son el E y el G, con 77.2 y 76.5 % de identidad, respectivamente; mientras que los dominios menos conservados son el A y el B, que muestran 48.7 y 47.4 % de identidad, respectivamente (Tabla 1).

En lo que respecta a la secuencia de nucleótidos de C160, la identidad entre *L. major* y *T. brucei*, y entre *L. major* y *T. cruzi* es, en ambos casos, del 61 %. Por otra parte, el porcentaje de identidad entre *L. major* y *S. cerevisiae* es de solamente 19 % (Fig. 22). Entre los tripanosomátidos, la similitud en la secuencia se presenta a lo largo de todo el gen, pero es mayor en las regiones conservadas A-H. En la Fig. 22 se muestra el alineamiento de sólo una parte de los genes, en la que están contenidas las regiones conservadas A, B y C. El resto del gen presenta una conservación similar (datos no mostrados).

| <i>Dominios</i> <i>Especies</i> | <i>A</i> | <i>B</i> | <i>C</i> | <i>D</i> | <i>E</i> | <i>F</i> | <i>G</i> | <i>H</i> | <i>Promedio de similitud VS L. major</i> |
|------------------------------------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|------------------------------------------|
| <i>E. histolytica</i> | 53 | 36 | 63 | 67 | 75 | 57 | 71 | 51 | 59.1% |
| <i>G. lamblia</i> | 6 | 34 | 54 | 54 | 43 | 48 | 69 | 51 | 44.8% |
| <i>H. sapiens</i> | 49 | 46 | 75 | 68 | 75 | 61 | 71 | 44 | 61.1% |
| <i>P. falciparum</i> | 47 | 42 | 59 | 71 | 93 | 65 | 66 | 46 | 61.1% |
| <i>S. cerevisiae</i> | 44 | 39 | 73 | 69 | 75 | 61 | 72 | 46 | 59.8% |
| <i>T. brucei</i> | 73 | 65 | 84 | 84 | 93 | 81 | 93 | 74 | 80.8% |
| <i>T. cruzi</i> | 69 | 70 | 88 | 91 | 87 | 78 | 94 | 80 | 82.1% |
| <i>% entre dominios</i> | 48.7% | 47.4% | 70.8% | 72% | 77.28% | 64.4% | 76.5% | 56% | |

Tabla 1. Porcentajes de identidad en la secuencia de aminoácidos de las regiones conservadas de C160 entre *L. major* y otros organismos eucariotes.

Figura 22. Alineamiento de la secuencia de nucleótidos de C160 entre *L. major* y otras especies. Se muestran sólo los primeros 1467 nucleótidos del gen de *L. major*, en donde se incluyen las regiones conservadas A, B y C (las cuales se muestran sombreadas). Los asteriscos indican la presencia del mismo nucleótido en las cuatro especies.

Discusión

C160 es un gen de copia única en *Leishmania*

Recientemente se finalizó la secuenciación del genoma de *L. major*. Al analizar la secuencia del parásito se encontraron ~8200 genes, los cuales están organizados en grupos largos de genes en una misma cadena de DNA (unidades policistrónicas) (Fig. 5). Interesante resultó el hecho de que la mayoría de los genes no muestra similitud con los genes de otros organismos, lo cual nos indica que estos genes pueden ser específicos de los miembros de la familia Trypanosomatidae (Myler *et al.*, 2000). Muchos de los genes son de copia única, mientras que otros forman parte de familias génicas.

Conocer el número de copias de un gen determinado es necesario cuando se quiere conocer su función mediante delecciones tipo knock-out; es decir, cuando se quiere eliminar todas las copias del gen bajo estudio para observar el efecto que éste tendría en la célula, y de esta manera tratar de dilucidar la función de dicho gen. En *Leishmania* y otros tripanosomátidos es posible realizar knock-outs génicos mediante recombinación homóloga, substituyendo el gen de interés por el gen de un marcador de selección (como alguno que confiera resistencia a una droga). Mientras mayor sea el número de copias de un gen, mayor número de construcciones (con marcadores de selección diferentes) será necesario para eliminar toda sus copias del genoma. Como en nuestro grupo de trabajo tenemos contemplando en un futuro analizar la función de C160 en *L. major* y *L. mexicana* mediante este tipo de análisis, resulta necesario determinar el número exacto de copias del gen.

El análisis de la secuencia del genoma de *L. major* reveló la presencia de sólo una copia del gen de C160. Sin embargo, es frecuente encontrar errores en las secuenciaciones, dada la presencia de regiones repetidas en el genoma de los tripanosomátidos que dificultan el análisis. Por otra parte, el genoma de *L.*

mexicana no ha sido aún secuenciado en su totalidad, por lo que no se conoce el número de copias de C160 en esta especie. Por ello, para confirmar que C160 es un gen de copia única en *L. major* y determinar el número de copias de C160 en *L. mexicana*, se llevaron a cabo experimentos tipo Southern-blot. En la autorradiografía de *L. major* se observaron las bandas esperadas, con el tamaño esperado, lo cual corroboró que en el genoma de este parásito sólo existe una copia del gen de C160. Los resultados con *L. mexicana* también indican que C160 es un gen de copia única (Fig. 9).

Se sabe que todas las 17 subunidades que conforman Pol III en *S. cerevisiae* (Fig. 3) son codificadas por un gen de copia única, y que todos los genes son esenciales para la viabilidad celular. En *L. major* se han identificado, mediante análisis *in silico* y purificación de complejos transcripcionales, los genes de 16 subunidades de Pol III, entre los que se encuentra C160. Sólo el ortólogo de la subunidad C31 no ha sido identificado en este parásito. A diferencia de levadura, cuatro de las subunidades de Pol III en *L. major* son codificadas por dos genes diferentes: ABC10 β , ABC23, ABC27 y C82. Las tres primeras son en realidad subunidades comunes para las tres RNA polimerasas, mientras que C82 es exclusiva de Pol III. Ahora se sabe que las dos isoformas de ABC10 β , ABC23 y ABC27 que presentan los Tripanosomátidos forman parte de complejos de transcripción diferentes, pues mientras una de ellas es exclusiva de Pol I, la otra se comparte entre Pol II y Pol III. Con respecto a C82, a la fecha se desconoce el significado funcional de la presencia de dos isoformas diferentes de la proteína.

Por otra parte, es importante señalar que en *T. brucei* se ha reportado la presencia de dos copias idénticas del gen de la subunidad mayor de Pol II (B220) (Kock *et al.*, 1988; Smith *et al.*, 1989). C160 está evolutivamente relacionada con esta subunidad, así como con las subunidades mayores de Pol I (A190) y de las RNA polimerasas de arqueobacterias y bacterias (α y β' respectivamente) (Geudescheck y Kasbetis, 2001).

Mapeo del sitio aceptor del miniexón y de la región de poliadenilación de C160 en *L. major*

Mediante ensayos de RT-PCR se obtuvieron clonas de cDNA de C160 para localizar el sitio aceptor del miniexón y la región de poliadenilación. Dicho análisis nos permitió determinar que el sitio aceptor del miniexón AG se localiza a 536 pb río arriba del codón de inicio de C160 (Fig. 16 A). Existen pocos reportes del tamaño de regiones 5' no traducidas en *Leishmania*. En *T. brucei* se encontró que el tamaño de dicha región varía desde sólo 7 bases (en el gen de la proteína ribosomal S16) hasta 1030 bases (en el gen de una proteína hipotética) (Benz *et al.*, 2005). Sin embargo, el 92% de los 5'-UTRs analizados en *T. brucei* es menor a 300 bases, reportándose un tamaño promedio de 68 bases. En este contexto, la región 5'-UTR de C160 en *L. major* resulta ser muy grande. Al comparar la región que rodea al sitio aceptor del miniexón de C160 con una probable secuencia consenso previamente reportada (Requena *et al.*, 2003), encontramos que existe una similitud baja, de solo dos nucleótidos: una C en la posición +4 y una C en la posición -5 (Fig. 17). Análisis llevados a cabo en otros genes han mostrado que invariablemente se presentan trectos ricos en pirimidinas río-arriba del sitio aceptor del miniexón, y que estas secuencias son necesarias para que se lleve a cabo el trans-splicing. Al analizar la secuencia de C160, encontramos una región rica en pirimidinas (formada por 17 pirimidinas) muy cerca (47 pb río-arriba) del sitio aceptor del miniexón. Estudios previos en *T. brucei* han mostrado que trectos de pirimidinas de 9 ó 10 bases son suficientes para dirigir el trans splicing, aunque el tamaño promedio es de 13 bases (Benz *et al.*, 2005). La distancia promedio entre el tracto de pirimidinas y el AG aceptor es de 24 bases, aunque se han reportado distancias entre 10 y 80 bases. Así, el tracto de 17 pirimidinas localizado en el gen de C160 de *L. major* puede considerarse grande (Fig. 16 A), y está localizado a una distancia relativamente grande del sitio aceptor del miniexón.

Actualmente se sabe que la cola de poli A es requerida para completar el procesamiento del mRNA y no existe una señal consenso para que se dé la

poliadenilación en el extremo 3' del transcrito. En el presente estudio, encontramos varios sitios de poliadenilación para el mRNA de C160. Todos ellos se presentan en una región localizada entre los 136 y 323 pb del codón de término de C160. Es común que la poliadenilación se presente en varios puntos de una región determinada, más que en un nucleótido único. El análisis de diferentes transcritos de *T. brucei* indicó que el tamaño de la región 3'-UTR varía de 21 a 5040 bases, con un tamaño promedio de 348 nucleótidos (Benz *et al.*, 2005). A 176 pb río abajo de la región de poliadenilación más alejada del codón de término de C160 encontramos una región rica en pirimidinas. Esta distancia es similar a la reportada en *T. brucei* (de 100 a 400 bases). Dicho tracto de pirimidinas está formado por 14 bases (Fig. 16 B), siendo este tamaño parecido al de los tractos de pirimidinas que participan en la poliadenilación en *T. brucei* (8-17 bases).

Tamaño y abundancia del mRNA de C160

Uno de los objetivos de este trabajo fue determinar la abundancia relativa y el tamaño de los transcritos de C160 en cultivos de promastigotes de *L. major* y *L. mexicana* en fase media de crecimiento logarítmico y en fase estacionaria (Fig. 10), mediante experimentos tipo Northern-blot. Nuestros resultados mostraron que el mRNA de C160 en *L. major* tiene un tamaño aproximado de 5.7 kb, mientras que su tamaño en *L. mexicana* es de alrededor de 5.5 kb (Fig. 19). En el caso de *L. major*, este tamaño es el esperado, considerando que el gen tiene un tamaño de 4749 pb y que las regiones no traducidas 5' y 3' tienen un tamaño de 536 y 136-323 pb, respectivamente (ver sección anterior); si además consideramos que la cola de poli-A pudiera tener un tamaño de alrededor de 100 bases, entonces el tamaño del mRNA de C160 sería de aproximadamente 5.7 kb, que es justamente el tamaño que obtuvimos en el Northern-blot. Ya se ha reportado en *T. brucei* que el mRNA de C160 tiene un tamaño de 5.4 kb, mientras que el mRNA de A190 (subunidad mayor de Pol I) es de 6.9 kb (Kock *et al.*, 1988; Smith *et al.*, 1989).

Al comparar la abundancia de los transcritos de C160 entre promastigotes procíclicos en fase logarítmica y promastigotes procíclicos en fase estacionaria, no encontramos diferencias significativas en ninguna de las dos especies de *Leishmania* (Fig. 19). La curva de crecimiento de promastigotes representa una herramienta útil para analizar la expresión diferencial de genes, pues las células sufren cambios morfológicos y fisiológicos al pasar de la fase media de crecimiento a la fase estacionaria. Durante la fase estacionaria, una alta proporción de los promastigotes procíclicos se transforma en promastigotes metacíclicos, que son formas infectivas que no tienen la capacidad de replicarse. Morfológicamente, las células se alargan y disminuyen su movilidad. En *T. cruzi*, se ha reportado que la transcripción de Pol I y Pol II se reduce en células en fase estacionaria, lo cual se hace evidente al analizar los transcritos mediante Northern-blots; sin embargo, la vida media de los mRNA es mayor en células en fase estacionaria que en fase logarítmica (Cevallos y Hernández, 2005). En *Leishmania* no existen reportes al respecto. Nuestros resultados muestran que la abundancia del mRNA de C160 no disminuye en la fase estacionaria (Fig. 19), contrario a lo reportado en *T. cruzi*, esto podría ser resultado de una reducción menos drástica en la tasa de transcripción en *Leishmania* al entrar a la fase estacionaria, o bien deberse a una estabilización muy marcada de los mRNA en la fase estacionaria (o a una combinación de ambas).

Identificación de Regiones Conservadas de C160 en *L. major*

Comparaciones de secuencias de aminoácidos de C160 en diferentes especies de organismos eucariontes nos revelaron la presencia de 8 regiones conservadas (A-H), distribuidas a lo largo de toda la proteína. Como se observa en la Fig. 21, el dominio conservado más pequeño es el E, que tiene sólo 48 pb, mientras que el dominio conservado F es el más grande, siendo de 399 pb. Las secuencias de *L. major* tienen mayor similitud con las de otros tripanosomátidos, como *T. brucei* y *T. cruzi*: en promedio se encontró 80.8 % de identidad entre *L. major* y *T. brucei*, y 82.1 % entre *L. major* y *T. cruzi*. Por otro lado, entre *L. major* y el protozoario *G.*

lamblia hay solamente 44.8 % de identidad. Resulta sorprendente que esta similitud es incluso menor a la que presentan *H. sapiens* y *S. cerevisiae* con *L. major* (61.1 y 58.9 % de identidad, respectivamente). En promedio, los dominios más conservados son el E y el G, con 77.2 y 76.5 % de identidad, respectivamente; mientras que los dominios menos conservados son el B y el A, que muestran 47.4 y 48.7 % de identidad, respectivamente (Tabla 1).

En general, las secuencias de las subunidades mayores de Pol III de los ocho organismos estudiados tienen un tamaño similar, que va de 1379 aa (*E. histolytica*) a 1671 aminoácidos (*G. lamblia*). La excepción es C160 de *Plasmodium falciparum*, que presenta un tamaño de 2339 aminoácidos. En el alineamiento de las secuencias de los diferentes organismos eucariontes (datos no mostrados), se observó que existen cuatro inserciones significativas en la secuencia de C160 de *P. falciparum*: entre los dominios conservados C y D, entre D y E, entre F y G y entre G y H. Por otro lado, una inserción fue identificada en la secuencia de *G. lamblia* entre los dominios conservados C y D. Estas inserciones traen como consecuencia el tamaño mayor de C160 en *P. falciparum* y en *G. lamblia*. Se desconoce el significado funcional que pudieran tener estas inserciones.

El alineamiento de la secuencia de nucleótidos de C160 mostró que la identidad entre *L. major* y *T. brucei*, y entre *L. major* y *T. cruzi* es del 61 %, en los dos casos (Fig. 22). Por otra parte, el porcentaje de identidad entre *L. major* y *S. cerevisiae* es de solamente 19 %. Como era de esperarse, la similitud en la secuencia nucleotídica es menor a la de la secuencia de aminoácidos, pues muchos de los cambios a nivel de DNA no producen alteraciones en la secuencia de aminoácidos.

Probables funciones de las regiones conservadas

Al igual que en bacterias, las 2 subunidades mayores de todas las RNA polimerasas de eucariontes forman un canal, el cual conduce al DNA hacia el interior de un “bolsillo catalizador”. Este bolsillo contiene el sitio de unión de nucleótidos trifosfatados (NTPs), además de un motivo quelante de Mg^{+2} (NADFDGD) que forman en conjunto el sitio catalítico de la polimerización de RNA (Cramer *et al.*, 2001). La presencia de estas estructuras en todas las RNA polimerasas indica que el mecanismo transcripcional básico se encuentra conservado universalmente. Las subunidades específicas proporcionan las características específicas o distintivas para cada tipo de RNA polimerasa. El hecho de que las regiones A-H de C160 (y de las subunidades mayores de Pol I y Pol II) se encuentren conservadas a lo largo de prácticamente toda la escala evolutiva sugiere que dichas regiones juegan un papel importante en el proceso de transcripción. A la fecha se conoce poco sobre las funciones particulares que llevan a cabo las regiones conservadas de C160. En muchos casos, las funciones se han determinado en las subunidades mayores de Pol I o Pol II, y por extrapolación se han asignado a C160. A continuación se presenta un resumen de lo que se sabe hasta ahora.

► Región A: contiene aminoácidos que se unen a átomos de zinc. Esta unión es un prerequisite para la formación de una enzima funcional. La región A está además involucrada en ensamble y estabilidad de la polimerasa, así como en la interacción con las subunidades C82, C34 y C31 (Archambault y Friesen, 1993; Cramer *et al.*, 2001).

► Región C: contiene una región aparentemente involucrada, junto con la región D, en la unión a la molécula de DNA. Participa en el ensamblaje y estabilidad de la polimerasa.

► Región D: este dominio resulta sorprendente por el hecho de tener el motivo YNADFDGDEM_N, el cual es parte del sitio catalítico y se encuentra conservado en todas las subunidades mayores. Cuando se limita al heptapéptido NADFDGD, también se encuentra en las RNA polimerasas de arqueobacterias, *E. coli*, virus vaccinia y RNA polimerasas de cloroplastos. Se ha demostrado que al mutar este motivo se afecta directamente la elongación de la transcripción; además, se ha visto que contiene un sitio de unión a magnesio, el cual confiere estabilidad a la polimerasa (Kock *et al.*, 1988; Cramer *et al.*, 2001). Este motivo fue identificado en la secuencia de C160 de *L. major* (Fig. 20).

► Región E: al realizar un estudio usando como modelo la estructura tridimensional de Pol II en levadura, se mostró que este dominio interactúa con la subunidad ABC14.5 (Cramer *et al.*, 2001).

► Región F: contiene el sitio de unión de la droga α -amanitina, inhibidor de las RNA polimerasas (Archambault y Thuriaux, 1993). También se ha visto que este dominio interactúa con las subunidades B12.6 y B150 durante el ensamblaje de Pol II (Cramer *et al.*, 2001). Participa en el término de la transcripción.

► Región G: en Pol II de levadura, se ha visto que interactúa con la subunidad ABC23 (Cramer *et al.*, 2001). Participa en el inicio de la transcripción.

► Región H: se cree que está involucrada en elongación de la transcripción (Archambault y Friesen, 1993). Estudios de estructura tridimensional sugieren que este dominio interactúa con C128 y ABC23 (Cramer *et al.*, 2001). Aparentemente involucrado, junto con la región D, en la unión a nucleótidos.

CONCLUSIONES

- Mediante experimentos tipo Southern-blot se confirmó que C160 es un gen de copia única en el genoma de *L. major*. Asimismo, se determinó que en *L. mexicana* hay también solamente una copia de dicho gen.
- La localización de las señales de procesamiento del mRNA de C160 se realizó por medio de ensayos de RT-PCR. Así, se encontró que la región de poliadenilación se localiza entre las 136 y 323 bases río abajo del codón de término; además, una región rica en pirimidinas (14 bases) se ubicó 176 bases río abajo de la región de poliadenilación.
- El sitio aceptor del miniexón (AG) se localizó 536 bases río arriba del codón de inicio de C160, y se identificó una región rica en pirimidinas (17 bases) a una distancia de 47 bases del sitio aceptor del miniexón. Al comparar la región que rodea al sitio aceptor del miniexón de C160 con una probable secuencia consenso para *L. major* previamente reportada, encontramos que existe poca similitud entre las dos secuencias, pues además del AG, sólo se encontraron dos nucleótidos conservados. Esto sugiere que únicamente el AG y la región rica en pirimidinas son necesarios para el trans-splicing.
- Para analizar los transcritos de C160 se realizaron experimentos tipo Northern-blot, en donde se observó que el mRNA en *L. major* tiene un tamaño aproximado de 5.7 kb, mientras que su tamaño en *L. mexicana* es de 5.5 kb. No observamos diferencias significativas en la expresión de C160 al comparar células en fase de crecimiento logarítmico con células en fase estacionaria.

- La comparación de la secuencia de C160 entre tripanosomátidos reveló la presencia de 8 regiones conservadas. Dichas regiones coinciden con las regiones conservadas A-H previamente reportadas en otros organismos. En la región conservada D se encontró un motivo que está conservado en todas las subunidades mayores. Experimentos futuros permitirán definir si, como se espera, estas regiones conservadas son importantes para la función de C160 en *L. major*.

Referencias

Archambault, J., Friesen, J. Genetics of Eukaryotic RNA Polymerases I, II, and III. 1993. Microbiological Reviews. 57: 703-724.

Ben-Shlomo, H., Levitan, A., Beja, O., Michaeli, S. 1997. The trypanosomatid *Leptomonas collosoma* 7SL RNA gene. Analysis of elements controlling its expression. Nucleic Acids Research. 25: 4977-4984.

Benz, C., Nilsson, D., Andersson, B., Clayton, C., Guilbride, L.D. Messenger RNA processing sites in *Trypanosoma brucei*. 2005. Molecular and Biochemical Parasitology. 143: 125-134.

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

Boothroyd, J. C. 1990. Molecular Biology of trypanosomes, in: wiler, D.J., Pereira, M.E.A. and Wirth, D. Cell Biology, Molecular Biology and Immunology parasites. Fremen Press, New York. 333-343.

Brooks, G. F., Butel., Morse, S.A. 1999. Microbiología Medica de Jawetz, Melnick y Adelberg. Dieciseisava edición. El manual moderno de México. México. pp. 757-759.

Cevallos A.M., Hernández R. *Trypanosoma cruzi* y la enfermedad de Chagas (Tripanosomiasis americana). 2001. En Microbios en linea. UNAM. México.

Clayton, E. C. 2002. Life without transcriptional control? From Fly to man and Back again. European Molecular Biology Organization Journal. 21: 1881-1888.

Cramer, P., Bushnell, A. D., Kornberg, D. R. Structural Basis of Transcription: RNA Polymerase II at 2.8 Ångstrom Resolution. 2001. *Science*. 292: 1863-1876.

Desjeux, P. 2004. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. *Comparative Immunology Microbiology and Infectious Diseases*. 27: 305-318.

Fantoni, A., Dare, A.O., Tschudi, C. 1994. RNA polymerase III-mediated transcription of the *Trypanosome* U2 small nuclear RNA gene is controlled by both intragenic and extragenic regulatory elements. *Molecular and Cellular Biology*. 14: 2021-2028.

Geiduschek, E. P., Kassavetis, A. G. 2001. The RNA Polymerase III Transcription Aparatus. *Journal of Molecular Biology*. 310: 1-26.

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

Gilinger, G., Luo, H., Bellofatto, V. 2004. In vivo transcription analysis utilizing chromatin immunoprecipitation reveals a role for *Trypanosome* transcription factor PBP-1 in RNA polymerase III-dependent transcription. *Molecular and Biochemical Parasitology*. 134: 169-173.

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

Handman, E. 2000. Cell Biology of *Leishmania*. *Advances in parasitology*. 44: 1-39

Harword, R.F., James, M.T. 1987. *Entomología Médica y Veterinaria*. Limusa S.A de S.V. México. pp. 180:183,185.

Hernández, N. 2001. Small nuclear RNA genes: a model system to study fundamental mechanisms of transcription. *The Journal of Biological Chemistry*. 276: 26733-26736.

Huang, Y., Maraia, R. J. 2001. Comparison of the RNA polymerase III transcription machinery in *Schizosaccharomyces pombe*, *Saccharomyces cerevisiae* and human. *Nucleic Acids Research*. 29: 2675-2690.

Hu, P., Wu, S., Sun, Y. C., Yuan, C., Kobayashi, R., Myers, M. P., Hernandez, N. 2002. Characterization of human RNA polymerase III identifies orthologues for *Saccharomyces cerevisiae* RNA polymerase III subunits. *Molecular and Cellular Biology*. 22: 8044-8055.

Ivens, A.C., Peacock C.S., Worthey, E.A., Murphy, Aggarwal, L. G., Berriman, M., Sisk, E., Rajandream, M.-A., 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, C., Cadag, E., Ciarloni, L., Clayton, C., Coulson, R.M.R., Cronin, A., Cruz, A.K., Davies, R.M., De Gaudenzi, J., Dobson, D.E., Duesterhoeft, A., Fazelinia, G., Fosker, N., Frasch, A.C., Fraser, A., Fuchs, M., Gabel, C. Goble, A., Goffeau, A., Harris, D., Hertz-Fowler, C., Hilbert, H., Horn, D., Huang, Y., Klages, S., Knights, A., Kube, M., Larke, N., Litvin, L., Lord, A., Louie, Marra, T., Masuy, M. D., Matthews, K., Michaeli, S., Mottram, J.C., Mueller-Auer, S., Munden, H., Nelson, S., Norbertczak, H., Oliver, K., O'Neil, S., Pentony, M., Pohl, T.M., Price, C., Purnelle, B., Quail, M.A., Rabinowitsch, E., Reinhardt, R., Rieger, M., Rinta, J., Robben, J., Robertson, L., Ruiz, J.C., Rutter, S., Saunders, D., Schäfer, M., Schein, J., Schwartz, D.C., Seeger, K., Seyler, A., Sharp, S., Shin, H. Sivam, D., Squares, R., Squares, S., Tosato, V., Vogt, C., Volckaert, G., Wambutt, R., Warren, T., Wedler, H., Woodward, J., Zhou, S., Zimmermann, W., Smith, D.F., Blackwell, J., Stuart, K.D., Barrell, B., Myler, P.J. 2005. The genome of the kinetoplastid parasite, *Leishmania major*. *Science*. 309: 436–442.

Kock, J., Evers, R., Cornelissen W.C.A. Structure and sequence of the gene for the largest subunit of trypanosomal RNA polymerase III. 1988. Nucleic Acids Research. 16: 8753-8772.

Kudo, R.R. 1979. Protozoología. 5 edición. Continental, S.A., México. pp. 328-330.

Lewin, B. 2000. Genes VII. Oxford University Press. United States of America. pp. 885-887, 907-910.

Lewin, B. 2004. Genes VIII. Pearson Prentice Hall, United States of America. pp.597-605.

Luque, C. J., Hernández, S. A. 2001. Texto ilustrado de Biología Molecular e Ingeniería Genética (Conceptos Técnicos y aplicaciones en Ciencias de la Salud). Harcourt. Madrid España. pp. 170- 173, 187-196.

Maraia, R., Sakulich, A. L., Brinkmann, E., Green, E. D. 1999. Gene encoding human Ro-associated autoantigen Y5 RNA. Nucleic Acids Research 24:3552-3559.

Martínez-Calvillo, S., Sunkin, S. M., Yan,S., Fox, M., Stuart, K., Myler,P. J. 2001. Genomic organization and functional characterization of the *Leishmania major* Friedlin ribosomal RNA gene locus. Molecular and Biochemical Parasitology. 116 : 147-157.

Martínez-Calvillo, S., Shaofeng, Y., Nguyen, D., Fox, M., Stuart, K., Myler, P.J. 2003. transcription of *Leishmania major* Friedlin chromosome 1 initiates in both directions within a single region. Molecular Cell. 11: 1291-1299.

Martínez-Calvillo, S., Nguyen, D., Stuart, K., Myler P.J. 2004. Transcription Initiation and Termination on *Leishmania major* Chromosome 3. *Eukariotic Cell*. 3: 506-517.

Myler, P. J., Audleman, L., deVos, T., Hixson, G., Kiser, P., Lemley, C., Magness, C., Rickell, E., Sisk, E., Sunkin, S., Swartzell, S., Westlaque, T., Bastien, P., Fu, G., Ivens, A., Stuart, K. 1999. *Leishmania major* Friedlin chromosome 1 has an unusual distribution of protein-coding genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 96: 2902-2906.

Myler, P.J., Sisk, E., McDonagh, P. D., Martínez-Calvillo, S., Schnauffer, A., Sunkin, S. M., Yan, S., Yan, R., Madhubala, R., Ivens, A., Stuart, K. 2000. Genomic organization and gene function in *Leishmania*. *Biochemical Society Transactions*. 28: 527-531.

Murray, H .W., Berman, J. D., Davies, C. R., Saravia, N. G. 2005. Advances in leishmaniasis. *The Lancet*. 366: 1561-1577.

Nakaar, V., Gunzl, A., Ullu, E., Tschudi, C. 1997. Structure of the *Trypanosoma brucei* U6 snRNA gene promoter. *Molecular and Biochemical Parasitology*. 88:13-23.

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

Olsen, W.O. 1974. *Animal parasites*. 3rd edition. Dover Publications, Inc. New York. 48: 50,52.

Parsons, M., Nelson, R. G., Watkins, K. P., Agabian, N. 1984. *Trypanosome* mRNAs share a common 5' spliced leader sequence. *Cell* 38: 309-316.

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

Pieler, T., Hamm, J., Roedor, R. G. 1987. 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.

Rapley, R. 2000. *The Nucleic Acid Protocols Handbook*. Humana Press. Totowa, Ney Jersey. pp. 77-79, 182-194, 213-227.

Requena, M. J., Quijada, L., Soto, M., Alonso, C. Conserved nucleotides surrounding the trans-splicing acceptor site and the translation initiation codon in *Leishmania* genes. 2003. *Experimental Parasitology*. 103: 78-81.

Rosenthal, D. S., Doering, J. L. 1983. The genomic organization of dispersed tRNA and 5 S RNA genes in *Xenopus laevis*. *The Journal of Biological Chemistry*. 258: 7402-7410.

Rozenfeld, S., Thuriaux, P. A genetic look at the active site of RNA polymerase III. 2001. *European Molecular Biology Organization Journal*. 2: 598-603.

Saito, R. M., Elgort, M. G., Cambell, D.A. 1994. A conserved upstream element is essential for transcription of the *Leishmania tarentolae* mini-exon gene. *European Molecular Biology Organization*. 13: 5460-5469.

Sánchez-Tejeda, G., Rodríguez, N., Parra, I.C., Hernández–Montes, O., Barker, C. D., Monroy-Ostria. 2001. Cutaneous Leishmaniasis Caused by Members of *Leishmania braziliensis* Complex in Nayarit, State of México. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz on-line*. 96: 15-19.

Shaw, J. J., Lainson, R. 1987. Ecology and epidemiology: New World. Academic Press, London, UK. pp. 291-361.

Smith, L.J., Levin, R.J., Agabian, N. Molecular characterization of the *trypanosoma brucei* RNA polymerase I and III largest subunit genes. 1989. The Journal of Biological Chemistry. 264: 18091-18099.

Swindle, J., Tait, A. 1996. Tripanosomatid genetics. In molecular Biology of parasitic Protozoa. Smith, D.F. Parsons, M. Oxford, UK: Oxford University Press. pp. 6-34.

Vanhamme, L., Pays, E. 1995. Control of gene expression in trypanosomes. Microbiological Reviews. 59: 223-240.

Voet, J., Voet, D. 1995. Biochemistry. Second Edition. John Wiley and Sons, inc. New York. pp. 1223-1251.

Willis, I.M. 1993. RNA Polymerase III Genes factors and transcriptional specificity. European Journal of Biochemistry. 212: 1-11.

Worthey, E., Martínez-Calvillo, S., Schnauffer, A., Aggerwal, G., Cawthra, J., Fazelinia, G., Fu, G., Hassebrock, M., Hixson, G., Ivens, A. C., Kiser, P., Marsolini, F., Rickell, E., Salavati, R., Sisk, E., Sunkin, S. M., Stuart, K.D., Myler, P. J. 2003. *Leishmania major* chromosome 3 contains two long convergent polycistronic gene clusters separated by a tRNA gene. Nucleic Acids Research. 31: 4201-4210.

Yan, S., Lodes, M. J., Fox, M., Myler, P. J., Stuart, K. 1999. Characterization of the *Leishmania donovani* ribosomal RNA promoter. Molecular and Biochemical Parasitology. 103: 197-210.