



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
IZTACALA**

**Análisis de la estructura
nucleosomal en genes transcritos
por la RNA Polimerasa III en
*Leishmania major***

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

B I Ó L O G O

Presenta:

Juan Carlos Vizuet de Rueda

Director de Tesis: Dr. Santiago Martínez Calvillo

SEPTIEMBRE, 2009





Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Dedicatoria.

Esta tesis es el final de un pequeño camino que inicie hace aproximadamente 18 años, ya que comenzó desde que iba en el Kinder y terminó con una licenciatura, mas sin embargo este término marca el inicio de otro camino a un largo, que son los estudios de posgrado. Por lo que esta tesis la dedico a todas las personas que estuvieron conmigo a lo largo de estos 18 años.

Para mi **mamá Gregoria**, sin tus consejos y enseñanzas no hubiera podido llegar hasta este lugar y sé que todo lo que haga en esta vida será gracias a ti, sin tu apoyo y consejos a lo largo de este camino me hubiera desviado y no sería lo que soy en este momento un Biólogo; gracias por permitirme estar aquí y compartir mis triunfos y derrotas. Sé que me acompañaras en todo el camino que me queda.

Para mi **papá Eusebio**, tu apoyo en todo este tiempo me ha servido para poder salir adelante, tú me enseñaste a trabajar, a esforzarme y lograr mis objetivos. En momentos así me acuerdo de tu frase de hace años “No importa si sacas un 6 de calificación, pero demuestra que te lo has ganado”. Me has enseñado que para ser alguien digno no se necesitan estudios, si no un gran valor y determinación. Muchas gracias por todo este apoyo Papá.

Para mi **hermano Eusebio**, te agradezco por tu tiempo en el que estuviste conmigo, siempre me supiste hacer reír y me hiciste pasármela muy bien, he llegado a una meta a la que tu no quisiste llegar, eso me duele mucho en el alma, mas sin embargo quiero que sepas que cuentas conmigo para todo lo que sea necesario, aunque a veces no lo parezca. Tú fuiste por años mi ídolo a seguir, hasta que un día nuestras metas fueron diferentes.

Para mi **hermano Daniel**, tu al contrario fuiste por un tiempo el ídolo que no quería seguir, pero me demostraste en los últimos años que el trabajo constante hace la diferencia, tú me has enseñado que el que persevera alcanza, gracias por tu inmenso apoyo en esta última etapa, han sido los mejor años que he tenido.

Para el **Dr. Santiago**, usted fue la persona que me enseñó que mi futuro dependía de mí, recuerdo lo que algún día me dijo: “Que quieres ser, una persona que lucha por superarse y salir adelante haciendo un posgrado, o simplemente quieres pasar el resto de tu vida tomando cervezas y viendo futbol, despreocupado de la vida.” Muchas gracias por todo su apoyo y consejos, sé que a veces no soy el estudiante que todos quisieran tener, pero me esforzaré por demostrar al 100% lo contrario. Gracias por brindarme la oportunidad de estar con usted y poder realizar un proyecto de calidad, de los que no se hacen en cualquier lugar; si algo lo caracteriza a usted es por ser muy bueno en lo que hace, yo haré todo lo posible por ser igual.

A todos **mis amigos**, me robó Daniel Vélez mi frase de que a mis amigos lo cuento con los dedos de mis manos, sin embargo les quiero agradecer por estar en las malas y mas en las buenas conmigo, por aguantar mi carácter

fuerte y a veces inesperado, por compartir mis amores y desamores, así como triunfos y fracasos. Gracias Noé Zacaula por estar conmigo estos 5 años de la carrera, tú sin duda has sido mi mejor amigo y así espero que siga siendo y que podamos un día cumplir nuestro sueño de ser Biólogos exitosos que cantan canciones ya borrachos sobre desamores, mientras van manejando autos de lujo. A ti Miguel Nuñez (Karno), por estar conmigo aunque solo fuera la mitad de la carrera, es una pena que te hayas alejado de nosotros, gracias por tus aportes y risas que me hacían la vida más amena; y mil gracias por estar conmigo cuando veía desboronarse toda mi vida frente de mí y me hiciste ser más fuerte que nunca; al igual que con Noé. A ti Ricardo Nolasco, por aguantarme todos estos 11 años, gracias eres uno de mis mejores amigos, espero que nuestras profesiones no nos logren distanciar. A mis amigos del laboratorio Carlos Flores (Charly Brown) por estar conmigo en mi tiempo de inadaptado en el laboratorio y compartir esas tardes de calor con una buena espumosa, espero que sigamos llevándonos muy bien y que logremos todas nuestras metas. A Daniel Vélez (Levadurin), al principio me caías mal, no te bajaba de arrogante y matado en la escuela, pero lo mejor de todo es que he cambiado mi visión hacia ti, y ahora eres una de las personas que mas estimo, espero que podamos estar juntos haciendo el doctorado, para seguir molestándote, jeje, gracias por hacer estos años que el labo sea más ameno y divertido. A la maestra Norma Edith Padilla (Normiga), gracias por ser una buena amiga conmigo, haz estado en esos momento en mi vida en lo que tú me diste las palabras de consuelo y animo que necesitaba; y gracias también a José Luis Reyes (JLo), por escucharme cuando tenía mis problemas, muchas gracias. A la Dra. Elisa Elvira Figueroa (Dra. F), gracias por enseñarme lo básico para trabajar en el laboratorio, eres una gran persona ya que siempre nos hacías reír con tus ocurrencias. A Luis Enrique Florencio, por apoyarme y enseñarme (y no a contar) que debo ser mas autosuficiente, gracias por tu apoyo. Por último gracias a Saúl Rojas (Marinerito) y a Rodrigo Moreno (Mr. Musculo) por este año lleno de risas y buenos momentos.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco la asesoría brindada a lo largo del desarrollo de la presente tesis de licenciatura a mi director de tesis, Dr. Santiago Martínez Calvillo, por brindarme el apoyo incondicional en cada etapa de la investigación, así como de la escritura, quien resultó esencial para lograr la conclusión de esta tesis.

Agradezco también al Biól. Luis Enrique Florencio Martínez por el apoyo técnico proporcionado.

Asimismo les agradezco a todo mi comité tutorial:

Dr. Sergio Vaca Pacheco, su ayuda brindada fue sobresaliente para ver las prospectivas de este trabajo, al realizar un posgrado, así como los alcances de este tipo de investigación.

Dr. Erasmo Negrete Abascal, sus comentarios ayudaron a que este trabajo no fuera tan especializado, brindando ideas para su mejor entendimiento, asimismo ayudó a mejorar los procedimientos técnicos.

Dra. Miriam Rodríguez Sosa, sus comentarios ayudaron a que este trabajo quedara mejor, resaltando cosas las cuales les faltaba al trabajo, en la parte de conclusiones.

Dra. Elvia Gallegos Neyra, sus conocimientos en parasitología ayudaron a que esta tesis tuviera un enfoque que no se hubiera tenido.

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

a) Universidad Nacional Autónoma de México, Dirección General de Asuntos del Personal Académico en su Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) en los proyectos: IN203606 e IN203909-3 por concepto de beca de licenciatura, durante los periodos comprendidos de Agosto del 2008 a Noviembre del 2008 y de Enero del 2009 a Junio del 2009. b) Al Gobierno Federal junto con la Universidad Nacional Autónoma de México, en su programa Programa Nacional de Becas para la Educación Superior (PRONABES), por su apoyo económico brindado desde Agosto del 2005 hasta julio del 2008.

CONTENIDO

3.1	Cultivo de promastigotes de <i>Leishmania</i>	19
	Índice de figuras y tablas	V
	Abreviaturas	VI
	Resumen	1
1	Introducción	2
1.1	Generalidades sobre <i>Leishmania</i>	2
1.2	Transcripción en eucariontes	5
1.3	Expresión génica en tripanosomátidos	8
1.4	La cromatina y su papel en la transcripción	11
1.5	Estructura de la cromatina en tripanosomátidos	16
2	Objetivos	18
3	Materiales y Métodos	19
3.2	Aislamiento de DNA genómico	19
3.3	Clonación de fragmentos genómicos	20
3.3.1	Amplificación por reacción en cadena de la polimerasa	20
3.3.2	Purificación de DNA en geles de agarosa	20
3.3.3	Ligaciones y transformaciones	21
3.3.4	Purificación y análisis de plásmidos	22
3.4	Purificación de insertos	23
3.5	Preparación de células competentes	24
3.6	Aislamiento de núcleos y cromatina	24
3.7	Digestión con nucleasa micrococcal	25
3.8	Experimentos tipo Southern-blot	26
3.8.1	Electroforesis y transferencia a membranas de nylon	26
3.8.2	Marcaje radioactivo de fragmentos de DNA	26
3.8.3	Pre-hibridación e hibridación	27
3.8.4	Lavado de filtros radioactivos y exposición	28
4	Resultados	29
4.1	Selección de las regiones del genoma de <i>L. major</i> por analizarse	29
4.2	Clonación de los diferentes fragmentos genómicos de <i>L. major</i>	31
4.3	Aislamiento de núcleos	35
4.4	Obtención de la cromatina de <i>Leishmania</i>	36
4.5	Estructura nucleosomal del locus chr11-II	40
4.6	Análisis nucleosomal del locus chr03	43
4.7	Patrón nucleosomal del locus chr31-I	47
4.8	Estructura de la cromatina del cistrón del rRNA	52
4.9	Análisis de la cromatina de la región SSR del cromosoma 1	56
4.10	Controles de hibridación	60
5	Discusión	62
6	Conclusiones	68
7	Referencias	69

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

Figura 1.	<i>Leishmania</i> spp.	2
Figura 2.	Ciclo de vida de <i>Leishmania</i> .	3
Figura 3.	Tipos de Leishmaniasis.	4
Figura 4.	Mapa de la distribución de Leishmaniasis cutánea en el mundo.	5
Figura 5.	Tipos de promotores de Pol III.	7
Figura 6.	Organización de los genes y producción de los RNAm en tripanosomátidos.	9
Figura 7.	Tipos de unidades policistrónicas presentes en los tripanosomátidos.	9
Figura 8.	Niveles de compactación del DNA.	12
Figura 9.	Nucleosomas.	12
Tabla 1.	Oligonucleótidos usados para amplificar las diferentes regiones del genoma de <i>Leishmania</i> que se analizaron.	21
Figura 10.	Mapas genómicos de los loci analizados.	30
Tabla 2.	Fragmentos amplificados por PCR.	31
Figura 11.	Electroforesis de fragmentos amplificados por PCR.	32
Figura 12.	Electroforesis de fragmentos amplificados por PCR.	32
Figura 13.	Electroforesis de los vectores digeridos con <i>EcoRI</i> .	33
Figura 14.	Electroforesis de las digestiones con <i>EcoRI</i> .	33
Figura 15.	Electroforesis de las digestiones con <i>EcoRI</i> .	34
Figura 16.	Electroforesis de las digestiones con <i>EcoRI</i> .	34
Figura 17.	Comparación entre las secuencias del gen de tRNA Ala (Gen) y el producto clonado en pGEMT-Easy (tRNA Ala Clona 4).	35
Figura 18.	Electroforesis de las digestiones de núcleos de <i>L. major</i> en fase media logarítmica con distintas concentraciones de MNasa.	36
Figura 19.	Electroforesis de las digestiones de núcleos de <i>L. major</i> en fase estacionaria con MNasa en presencia de distintos inhibidores de DNAsas.	37
Figura 20.	Electroforesis de las digestiones de núcleos de <i>L. mexicana</i> .	38
Figura 21.	Electroforesis de las digestiones de núcleos de <i>Leishmania</i> .	39
Figura 22.	Estructura de la cromatina en el gen del rRNA 5S del locus ch11-II.	40
Figura 23.	Análisis nucleosomal del gen de tRNA-Arg del locus ch11-II.	41
Figura 24.	Análisis de la cromatina del fragmento 11.0930 del locus ch11-II.	42
Figura 25.	Estructura de la cromatina en el fragmento 11-Inter del locus ch11-II.	43
Figura 26.	Patrón nucleosomal del gen de Crom3-tRNA del locus chr03.	44
Figura 27.	Estructura nucleosomal del fragmento Crom3-D del locus chr03.	45
Figura 28.	Estructura de la cromatina del fragmento Crom3-E bis del locus chr03.	46
Figura 29.	Análisis nucleosomal del fragmento Crom3-68 del locus chr03.	47
Figura 30.	Estructura de la cromatina del gen del snRNA U2 del locus ch31-I.	48
Figura 31.	Análisis de la cromatina del fragmento Inter U2 del locus ch31-I.	49
Figura 32.	Patrón nucleosomal del fragmento t-like U2 del locus ch31-I.	50
Figura 33.	Estructura nucleosomal del gen de tRNA-Ala del locus ch31-I.	51
Figura 34.	Estructura de la cromatina del gen de aATP11 del locus ch31-I.	52
Figura 35.	Análisis nucleosomal del gen del rRNA 18S.	53
Figura 36.	Análisis de la cromatina del fragmento rRNA A del cistrón del rRNA.	54
Figura 37.	Estructura de la cromatina del fragmento rRNA B del cistrón del rRNA.	55
Figura 38.	Patrón nucleosomal del fragmento rRNA C del cistrón del rRNA.	56
Figura 39.	Estructura nucleosomal del fragmento <i>ssr2</i> del locus SSR del cromosoma 1.	57
Figura 40.	Estructura de la cromatina del fragmento <i>ssr1</i> del locus SSR del cromosoma 1.	58
Figura 41.	Análisis nucleosomal del fragmento Gen 32 del locus SSR del cromosoma 1.	59
Figura 42.	Estructura de la cromatina del fragmento Gen 33 del locus SSR del cromosoma 1.	60
Figura 43.	Control del análisis nucleosomal en <i>L. major</i> .	61

ABREVIATURAS

DNA	Ácido desoxirribonucleico
EI	Elemento intermedio
ESD	Elemento de secuencia distal
ESP	Elemento de secuencia proximal
gDNA	Ácido desoxirribonucleico genómico
MNasa	Nucleasa micrococcal
mRNA	RNA mensajero
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
Pol I	RNA polimerasa I
Pol II	RNA polimerasa II
Pol III	RNA polimerasa III
RNA	Ácido ribonucleico
rRNA	RNA ribosomal
SIT	Sitio de inicio de la transcripción
snRNA	RNA pequeño nuclear
SSR	Región de cambio de sentido (“Strand Switch Region”)
STT	Sitio de término de la transcripción
tRNA	RNA de transferencia

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Generalidades sobre *Leishmania*

Leishmania es un protozoo flagelado que pertenece al orden Kinetoplastidae y a la familia Trypanosomatidae. Este grupo de organismos divergió tempranamente del linaje eucariótico y muestra varias características biológicas únicas, algunas de las cuales fueron encontradas posteriormente en otros eucariontes (Haile y Papadopoulou, 2007). El parásito produce en el hombre una enfermedad llamada leishmaniasis, y fue observado por primera vez por Cunningham en 1885 y descrito posteriormente por Leishman en 1900 y Donovan en 1903. *Leishmania* habita en dos hospederos altamente específicos, que son la mosca de la arena (perteneciente a los géneros *Phlebotomus* en el viejo mundo y *Lutzomyia* en el nuevo mundo, de la familia Psychodidae) y un mamífero. En el intestino de la mosca de la arena crece como promastigote flagelado, que es alargado, tiene un núcleo central y un cinetoplasto (DNA mitocondrial) en la parte anterior, del cual se origina un flagelo de más de 20 μm de largo (Fig. 1). El estadio de amastigote crece y se reproduce dentro de los fagolisosomas de los macrófagos; es ovalado y presenta un flagelo muy corto (Fig. 1) (Vannier-Santos *et al.*, 2002).

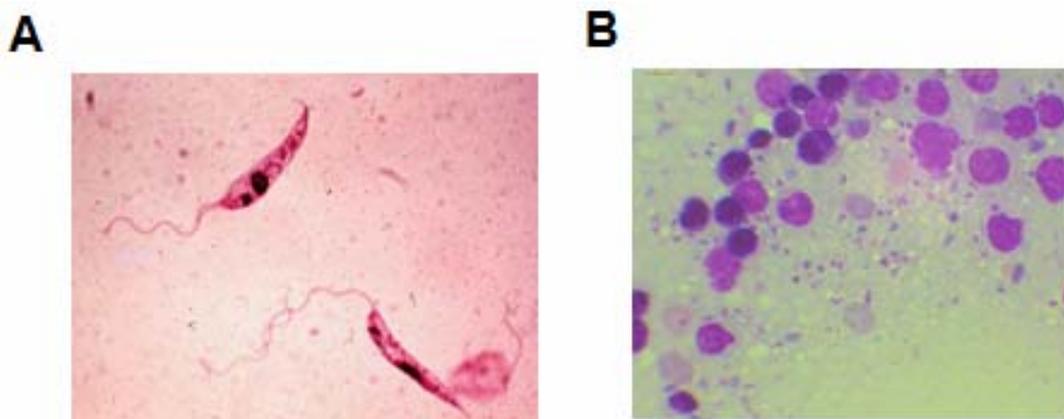


Figura 1. *Leishmania* spp. Se muestran promastigotes (A) y amastigotes (B).

La infección en el hombre comienza cuando una mosca de la arena pica e inyecta en la sangre a la forma infecciosa, los promastigotes (Fig. 2); ya en el

mamífero, los promastigotes son fagocitados por los macrófagos, donde se diferencian en amastigotes, los que se reproducen dentro de las células infectadas y afectan a otros tejidos. El insecto se infecta al ingerir sangre con macrófagos infectados con amastigotes. Ya dentro del intestino de la mosca los amastigotes se diferencian en promastigotes, los cuales se reproducen y migran hacia la probóscide, donde serán inoculados a un nuevo hospedero mamífero (Fig. 2). En el ser humano también se puede adquirir mediante trasplantes de órganos, transfusiones de sangre o por jeringas infectadas con el parásito.

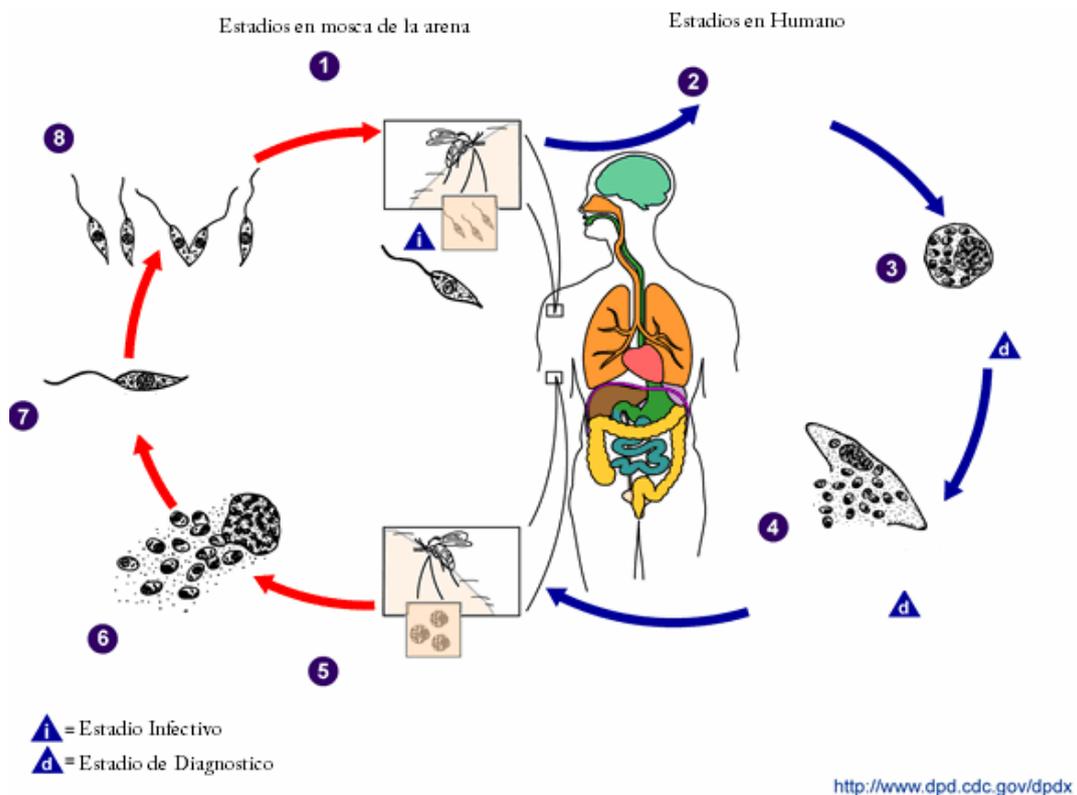


Figura 2. Ciclo de vida de *Leishmania spp.* Se muestran los estadios del parásito y su desarrollo tanto en mamíferos como en el vector. (1) La mosca de la arena se alimenta de sangre e inyecta promastigotes en la piel. (2) Los promastigotes son fagocitados por los macrófagos. (3) Los promastigotes se transforman en amastigotes dentro de los macrófagos. (4) Los amastigotes se reproducen dentro de las células de varios tejidos, incluyendo a los macrófagos. (5) La mosca de la arena se alimenta de sangre, ingiriendo macrófagos infectados con amastigotes. (6) Liberación de los parásitos de las células. (7) Los amastigotes se transforman en promastigotes en el intestino medio. (8) Se dividen las células en el intestino medio y migran hacia la probóscide. Figura tomada de www.dpd.cdc.gov/dpdx.

Leishmania produce desde úlceras leves en la piel hasta infecciones de órganos internos que pueden producir la muerte del individuo (Fig. 3). Así, la leishmaniasis ha sido clasificada de acuerdo a sus manifestaciones clínicas en tres tipos: cutánea, mucocutánea y visceral. La leishmaniasis cutánea se

caracteriza por la presencia de úlceras en el sitio donde picó el insecto transmisor, las cuales pueden tardar varios meses en cicatrizar. La leishmaniasis mucocutánea produce las mismas úlceras en la piel, pero después de sanar reaparecen, principalmente en los tejidos mucosos de la nariz y boca; las úlceras son acompañadas de infecciones secundarias y la destrucción masiva de tejidos. Y por último, la leishmaniasis visceral es una enfermedad sistémica severa, en la cual los parásitos se alojan en el hígado, bazo y médula ósea. Esta forma de la enfermedad es usualmente mortal (Handman, 2000). Existen al menos diez especies de *Leishmania* que son patógenas para humanos. Por ejemplo *L. major* y *L. mexicana* producen leishmaniasis cutánea; *L. donovani* provoca leishmaniasis visceral y *L. braziliensis* causa leishmaniasis mucocutánea.



Figura 3. Leishmaniasis cutánea (A), mucocutánea (B) y visceral (C). (Imágenes tomadas de: <http://wpcontent.answers.com/wikipedia/en/thumb/1/12/Leishmaniasis.jpg/350px-Leishmaniasis.jpg>, <http://www.stanford.edu/class/humbio103/ParaSites2006/Leishmaniasis/images/MC3.jpg> y [http://www.leishrisk.net/Leishrisk/UserFiles/Image/child%20with%20VL\(1\).jpg](http://www.leishrisk.net/Leishrisk/UserFiles/Image/child%20with%20VL(1).jpg)).

La leishmaniasis es endémica de las regiones tropicales de África, América, Asia y algunas zonas alrededor del mar Mediterráneo (Fig. 4). La Organización Mundial de Salud considera que 350 millones de personas en todo el mundo corren el riesgo de contraer la leishmaniasis. Según las estimaciones, hay 14 millones de personas infectadas y cada año se registran aproximadamente dos millones de casos nuevos. Según la OMS cada año se presentan unos 500,000 casos de leishmaniasis visceral (el 90 % en Bangladesh, Brasil, India, Nepal y Sudán, según las estimaciones provoca más

de 50,000 defunciones) y 1,500,000 casos de leishmaniasis cutánea (el 90 % en Afganistán, Arabia Saudita, Argelia, Brasil, Perú, Irán y Sudán).

Como estrategia para poder pasar inadvertida en el vector u hospedero, *Leishmania* regula diferencialmente la expresión de los genes de proteínas de superficie. Durante su ciclo de vida, varios cientos de genes son diferencialmente regulados: 2-9 % son modulados a nivel de RNA y del 12-18 % son regulados a nivel proteico (Haile y Papadopoulou, 2007).

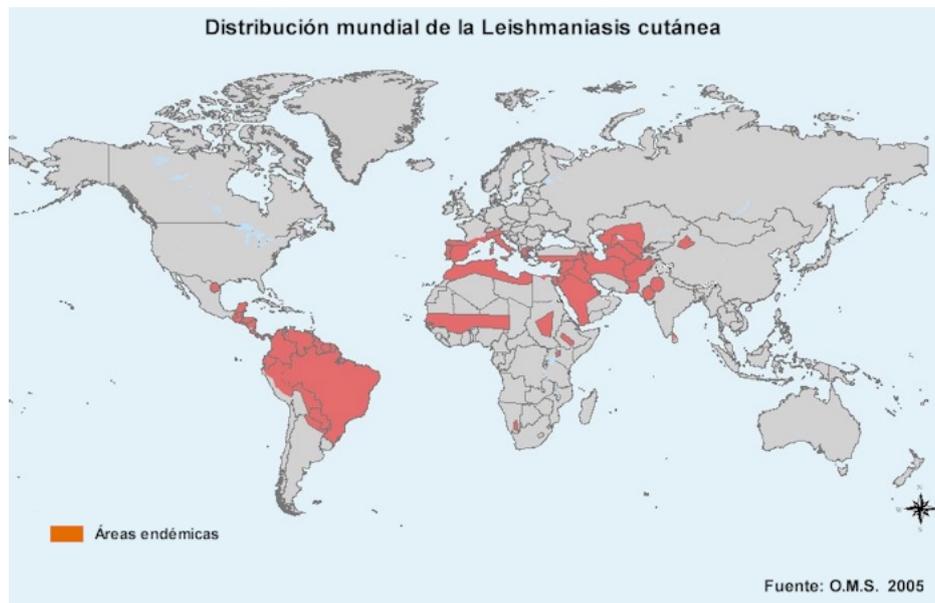


Figura 4. Mapa de la distribución de Leishmaniasis cutánea en el mundo (Tomado de O.M.S. 2005).

En nuestro laboratorio estamos interesados en estudiar los mecanismos de expresión genética en *Leishmania major* Friedlin (LmjF), la cepa de referencia del “proyecto del genoma de *Leishmania*”. En particular, nuestro interés está enfocado en el análisis de la transcripción de la RNA polimerasa III (Pol III), la cual sintetiza moléculas de RNA pequeñas que son esenciales para el crecimiento celular (Martinez-Calvillo *et al.*, 2007).

1.2 Transcripción en eucariontes

En células eucariontes el DNA está localizado en el núcleo, en donde es transcrito en diferentes tipos de moléculas de RNA. Este RNA está involucrado de manera directa o indirecta en múltiples procesos celulares como la

reproducción, crecimiento, reparación y regulación del metabolismo. La regulación en la expresión de un gen ocurre principalmente a nivel del inicio de la transcripción y es influenciada por la estructura de la cromatina, aunque la regulación también puede ocurrir durante la elongación de la transcripción, postranscripcionalmente, o durante la traducción.

Las enzimas encargadas de sintetizar el RNA son las RNA polimerasas. Existen tres tipos de RNA polimerasas en eucariontes: Pol I, Pol II y Pol III. Pol I está involucrada en la producción de los RNA ribosomales (rRNA) 18S, 5.8S y 28S, y Pol II participa en la síntesis de los RNA mensajeros (mRNA) y algunos RNAs pequeños nucleares (snRNAs). Pol III sintetiza moléculas de RNA pequeñas que son esenciales para el crecimiento celular, tales como RNA de transferencia (tRNA), rRNA 5S y algunos snRNAs. Pol III es la más compleja de las RNA polimerasas, pues contiene el mayor número de subunidades: 17 en levadura, comparando con 12 subunidades de Pol II y 14 subunidades de Pol I (Martínez-Calvillo *et al.*, 2007).

La característica más distintiva e inusual de las regiones promotoras de Pol III es que la mayoría de ellas requieren secuencias localizadas “río abajo” del sitio de inicio de la transcripción (SIT, +1), dentro de la región codificadora. Dependiendo de la localización y tipo de elementos, la mayoría de los promotores de Pol III se agrupan en tres categorías distintas (Fig. 5). Los promotores tipo I, característicos de los genes de rRNA 5S, consisten de tres regiones de control interno: Caja A, Elemento Intermedio (EI) y una Caja C. Estos elementos se extienden por alrededor de 50 pb, comenzando en la posición +45. Los promotores del tipo II están presentes en los genes de tRNA, y están formados por dos dominios internos: Cajas A y B. Las cajas A se localizan cerca del SIT, mientras que las cajas B tienen una localización variable. Los promotores del tipo III consisten de elementos que residen exclusivamente “río arriba” del gen. Éstos normalmente contienen una caja TATA cerca de la posición -30, un dominio proximal (ESP) en la posición -60, y un dominio distal (ESD) aún más alejado del SIT, alrededor de la posición -200. Este tipo de promotor lo presenta el snRNA U6 (Paule y White, 2000).

Además de la Pol III, varios factores generales de transcripción están involucrados en la síntesis de RNA. Entre éstos, los mejor estudiados son TFIIIA, TFIIIB y TFIIIC. TFIIIB se considera como el factor general para la iniciación de la transcripción de Pol III, pues es requerido por los tres tipos de promotores. TFIIIA es un factor específico de los promotores tipo I (del rRNA 5S), en donde reconoce la caja A. En la levadura, este factor está constituido por un solo péptido (de 50 kDa) que contiene nueve dedos de zinc organizados en tándem. TFIIIC es un factor que es requerido por promotores tipo 1 y tipo 2; en el caso de los tipo 2, TFIIIC reconoce directamente las cajas A y B del promotor. La función principal de TFIIIC es la de reclutar a TFIIIB a la región del sitio de inicio de la transcripción. A su vez, TFIIIB recluta directamente a Pol III a los promotores. En el caso de los promotores tipo 3, el factor SNAPc se une al elemento de secuencia proximal (ESP) y Oct-1 al elemento de secuencia distal (ESD), lo que facilita la asociación de TFIIIB a la caja TATA del promotor (Dieci *et al.*, 2007).

Un simple grupo de cuatro o más residuos T, normalmente flanqueados por secuencias ricas en G+C, actúan como una señal para terminar la transcripción por Pol III. Algunas subunidades de TFIIIC, como TFIIIC2, al parecer están involucradas en la terminación de la transcripción, así como en la reiniciación de la transcripción. También se ha encontrado que las subunidades C11, C37 y C53 de Pol III forman un subcomplejo que también participa en la terminación y reiniciación de la transcripción.

Promotor tipo I

Ejemplo, Genes de *Xenopus* 5S rRNA



Promotor tipo II

Ejemplo, Gen de *Saccharomyces* SUP4 tRNA



Promotor tipo III

Ejemplo, Gen Humano de U6 snRNA

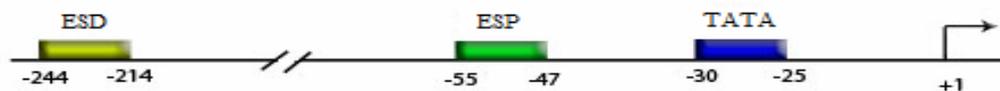


Figura 5. Tipos de Promotores de Pol III. El sitio de inicio de la transcripción (SIT) es indicado por +1 y la flecha, y el sitio de terminación es indicado por Tn. También se muestran la posición de varios elementos promotores, incluyendo el elemento intermedio (EI), el elemento de la secuencia proximal (ESP) y el elemento de la secuencia distal (ESD) (Hernández-Rivas *et al.*, 2007).

1.3 Expresión génica en tripanosomátidos.

El genoma nuclear de *L. major* (32.8 Mb) está distribuido entre 36 cromosomas relativamente pequeños, los cuales tienen un tamaño de 0.28 a 2.8 Mb. En este parásito, así como en otros tripanosomátidos, los genes están organizados en unidades policistrónicas largas, que pueden contener varios cientos de genes codificadores de proteínas arreglados secuencialmente en la misma cadena de DNA (Hernández-Rivas *et al.*, 2007). Esto se hizo evidente al ser publicada la secuencia completa del cromosoma 1 de *L. major* (Myler *et al.*, 1999). El análisis de la secuencia reveló un arreglo sorprendente de los 79 genes identificados: 29 de ellos se localizaron en la hebra de DNA inferior y los restantes 50 en la hebra superior. La secuenciación del genoma completo de *L. major* (Ivens *et al.*, 2005), *T. cruzi* (El-Sayed *et al.*, 2005) y *T. brucei* (Berriman *et al.*, 2005) reveló que todos los cromosomas de los tripanosomátidos presentan un arreglo similar al del cromosoma 1 de *L. major*, con unidades policistrónicas largas que pueden contener más de 200 genes.

En lo que respecta a promotores de genes que codifican proteínas se sabe muy poco. Estudios de run-on nuclear llevados a cabo con fragmentos de DNA del cromosoma 1 de *L. major* indicaron que la transcripción de todo el cromosoma inicia de manera bidireccional únicamente en la región intergénica que separa las dos unidades policistrónicas (entre los genes 29 y 30) (Martínez-Calvillo *et al.*, 2003). Resultados similares se obtuvieron al analizar la transcripción en el cromosoma 3, lo que indica que en *L. major* la transcripción inicia únicamente río arriba del primer gen de una unidad policistrónica (Martínez-Calvillo *et al.*, 2004). De esta manera, se forman transcritos primarios largos que contienen información para sintetizar varias proteínas (Johnson *et al.*, 1987; Martínez-Calvillo *et al.*, 2003). Los mRNA maduros son producidos por dos procesos: trans-splicing y poliadenilación (Fig. 6) (Parsons *et al.*, 1984). El trans-splicing es un proceso mediante el cual se agrega al extremo 5' de todos los RNAm una secuencia de 39 bases, conocida como miniexón o spliced-leader. El miniexón porta el cap, por lo que proporciona estabilidad al RNAm. Los mecanismos post-transcripcionales parecen regular los niveles de los RNAm. Secuencias en la región no traducida 3' (3'-UTR) de los RNAm juegan un papel importante en dicha regulación. No existe ningún sitio específico consenso para la señal de poliadenilación en tripanosomátidos (Haile y Papadopoulou, 2007).

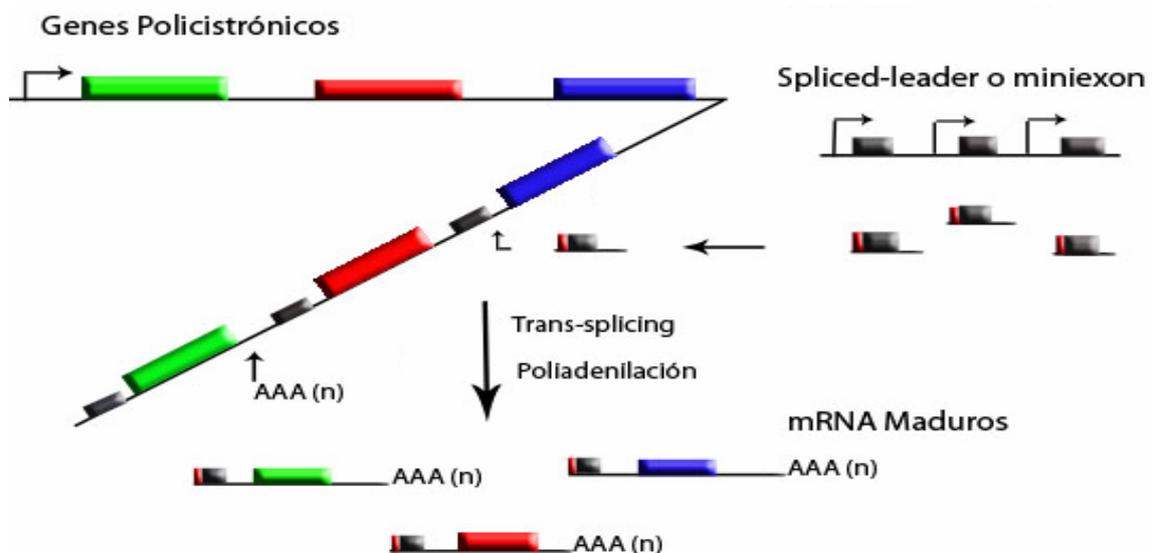


Figura 6. Organización de los genes y producción de los mRNA en tripanosomátidos. Se muestra la manera en que son transcritos los genes en tripanosomátidos, así como los procesos de trans-splicing y

la poliadenilación. El rectángulo rojo en el extremo 5' del miniexón representa el CAP (Campbell *et al.*, 2000).

A causa de la transcripción policistrónica, la cual puede ser convergente o divergente (Fig. 7), la identificación de regiones promotoras se ha visto dificultada en este grupo de organismos. A la fecha, el único promotor de Pol II que ha sido ampliamente caracterizado es el del gen que codifica para el RNA miniexón. Tanto en *T. brucei* como en *L. tarentolae* y *Leptomonas seymouri*, el promotor del miniexón está formado por un dominio bipartita río arriba (localizado alrededor de las bases -30 y -60) y un dominio localizado en la región de inicio de la transcripción (+1) (Gunzl *et al.*, 1997).

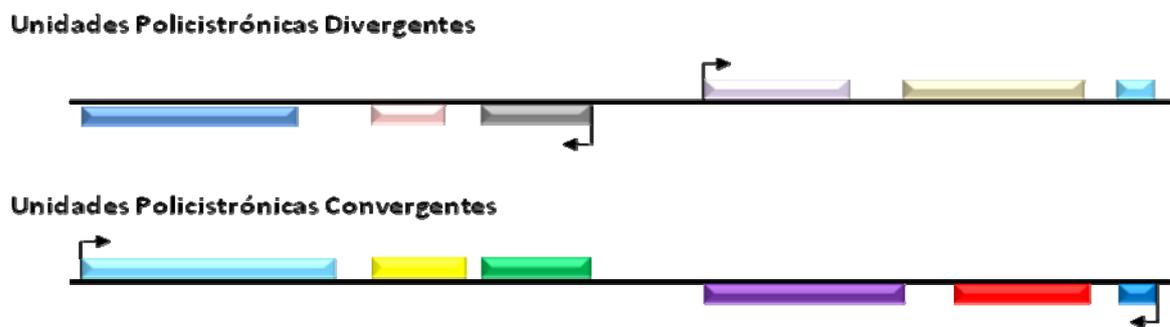


Figura 7. Tipos de unidades policistrónicas presentes en los tripanosomátidos. Las flechas indican la dirección de la transcripción.

La transcripción policistrónica de varios cientos de genes y la carencia de promotores bien definidos para la RNA Pol II nos indica que la mayoría de los genes son regulados postranscripcionalmente. Los únicos genes cuya transcripción es sabida que es regulada durante el desarrollo, mediante el silenciamiento ocasionado por la cromatina, son los que codifican para las dos proteínas de superficie más abundantes en *T. brucei* [Prociclinas EP y las glicoproteínas variantes de superficie (VSGs)] (Vanhamme y Pays, 1995).

En tripanosomátidos, todos los snRNAs son sintetizados por Pol III, además de los tRNA, el rRNA 5S y el RNA 7SL. En *T. brucei* y *Leptomonas* ya han sido caracterizados los promotores de algunos snRNAs y del RNA 7SL (Nakaar *et al.*, 1997). Estos genes tienen un gen de tRNA contiguo, hacia su extremo 5' y localizado en la cadena opuesta de DNA. Sorprendentemente, las cajas A y B del tRNA vecino son esenciales para la expresión del snRNA y del 7SL RNA. En la mayoría de los casos, se requieren también elementos

regulatorios intragénicos del snRNA y del RNA 7SL para lograr un nivel de expresión óptimo. Aunque no es muy claro como las cajas A y B del tRNA promueven la expresión del snRNA, se ha propuesto un modelo de “loop de DNA” en el que los sitios de inicio de la transcripción de los genes de snRNA y del tRNA son aproximados de manera tal que el factor TFIIIB facilita la llegada de Pol III en ambos sitios. Como en eucariontes superiores, las secuencias ricas en Ts funcionan como una señal de terminación para Pol III en tripanosomátidos. Por ejemplo, la transcripción de tRNA del cromosoma 3 en *L. major* termina en una región de cuatro Ts localizadas río abajo del gen (Martínez-Calvillo *et al.*, 2004).

En *Leishmania* no ha sido caracterizado ningún promotor de Pol III. Aunque muchos de los genes de tRNA, rRNA 5S y snRNAs se encuentran agrupados en clusters en varios cromosomas, cada gen parece contener un promotor y una región de término de la transcripción (Padilla-Mejía *et al.*, 2009); por esto, es muy probable que cada gen se transcriba independientemente, generando RNAs monocistrónicos (a diferencia de los transcritos policistrónicos de Pol II). Recientemente fueron aislados y purificados complejos transcripcionales de Pol III en *L. major* mediante la técnica de purificación por afinidad en tándem (TAP-tag), identificándose las subunidades C160, C128, C82, C53, C37, C34, C17, AC40, AC19, ABC27, ABC23 y ABC14.5 (Martínez-Calvillo *et al.*, 2007). El análisis *in silico* de los genomas de los tripanosomátidos permitió la identificación de los genes de otras de las subunidades de Pol III, y de muchas de las subunidades de Pol I y Pol II. Sin embargo, la mayoría de los factores de transcripción no fueron encontrados; lo que indica que éstos no están presentes en tripanosomátidos, o bien si están presentes pero su secuencia ha divergido considerablemente (Myler *et al.*, 1999).

1.4 La cromatina y su papel en la transcripción

Debido a que la longitud total del DNA es de varios cientos de miles de veces el diámetro de la célula, el empaquetamiento del mismo es crucial para

mantener la forma celular; así, el DNA en el núcleo celular se asocia con proteínas para empacarse y formar cromosomas (Fig. 8). Este complejo DNA/proteínas es llamado cromatina. El empaquetamiento del material genético en cromatina genera un obstáculo para diferentes procesos regulatorios como la transcripción, replicación, recombinación y reparación del DNA (Recillas, 2000). La unidad estructural de la cromatina es el nucleosoma, el cual está formado por proteínas llamadas histonas (proteínas básicas pequeñas) (Fig. 9).

Las histonas representan alrededor del 50% del peso de la cromatina. Estas proteínas tienen una longitud de 123 ± 14 aminoácidos, con un peso molecular de 13.5 ± 1.5 kDa y punto isoelectrico de 11 ± 0.5 (Alsford y Horn, 2004). Cada nucleosoma contiene cerca de 180 nucleótidos de DNA dando dos vueltas al octámero de histonas, formado por dos copias de las histonas H2A, H2B, H3 y H4 (Fig. 9). Una copia de la histona H1 se une a los restantes 40 pb de DNA que une a un nucleosoma con el siguiente (William *et al.*, 2006). Cada nucleosoma tiene un diámetro de alrededor de 10 nm. Las histonas son ricas en aminoácidos con cargas positivas, que interactúan con las cargas negativas de los grupos fosfato del DNA (Lodish *et al.*, 2008).

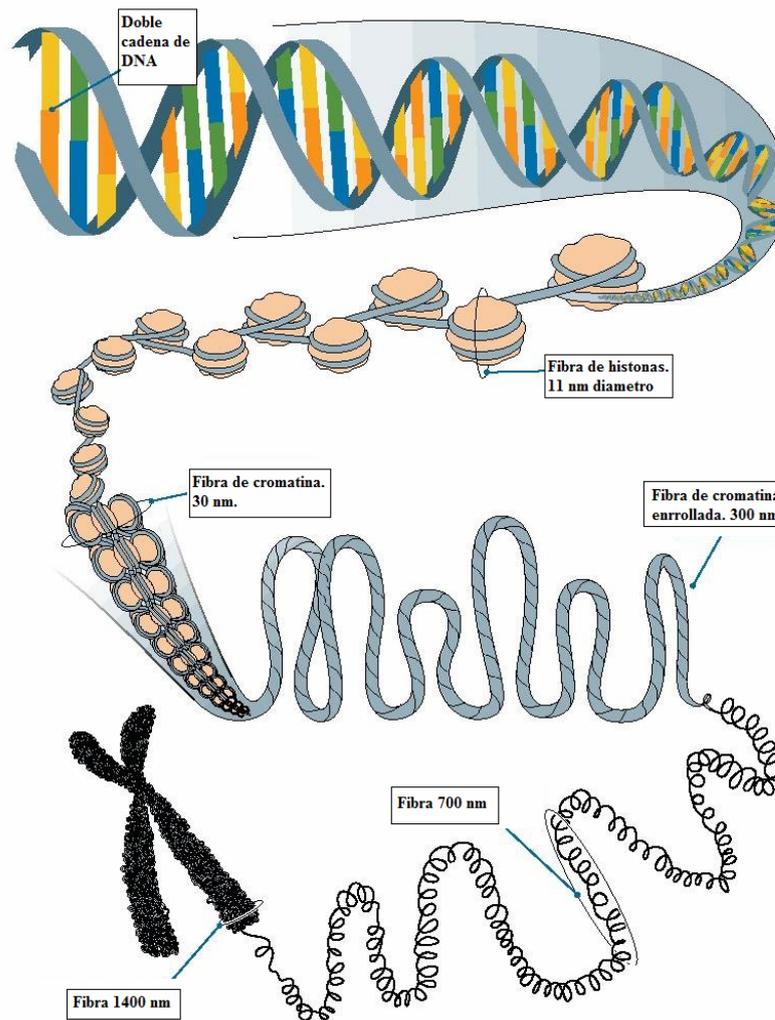


Figura 8. Niveles de compactación del DNA. Se muestran los diferentes niveles de compactación del DNA hasta formar cromosomas. (Tomada de: <http://preupsubiologia.googlepages.com/cromatina.jpg/cromatina-full.jpg>).

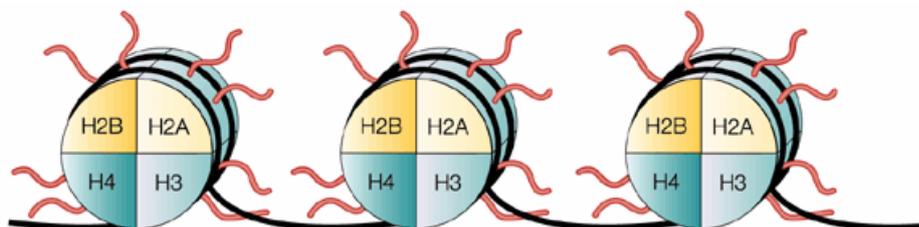


Figura 9. Nucleosomas. Se muestran las histonas que conforman los nucleosomas, el cual con el DNA forma la cromatina. Los filamentos que salen de los nucleosomas representan las colas de histonas, las cuales sufren modificaciones como la acetilación, metilación, etc.

Además del empacamiento del DNA, la estructura de la cromatina regula la expresión de los genes. Para que un gen o grupo de genes pueda ser expresado de manera correcta en tiempo y espacio, se necesita un sistema de regulación que ejerza su influencia a distintos niveles. Para realizar esto, la

cromatina debe de llevar a cabo continuamente procesos de compactación y descompactación, organización y localización precisa dentro del núcleo (Recillas, 2000).

La cromatina existe al menos en formas distintas: una forma condensada relacionada al silenciamiento de la transcripción (heterocromatina) y una forma relajada asociada a la transcripción activa (eucromatina). La heterocromatina es generalmente encontrada en los centrómeros y telómeros de los cromosomas. La mayoría de las regiones transcritas de DNA se encuentran en la eucromatina. La cromatina en las regiones cromosomales que no están siendo transcritas o replicadas forma predominantemente fibras de 30-nm, las cuales están formadas por nucleosomas condensados en forma de zig-zag (Lodish *et al.*, 2008) (Fig. 8).

Cada núcleo de nucleosomas contiene colas N-terminales de 19-39 residuos que se extienden desde la estructura globular del nucleosoma, y las proteínas H2A y H2B contiene también una C-terminal; estas son llamadas “colas de histonas”, estas colas son requeridas para la condensación de la cromatina.

Las histonas pueden ser modificadas con pequeños grupos químicos (acetilación, metilación, fosforilación o ADP-ribosilación) o por polipéptidos (ubiquitinación o sumoilación) (Alsford y Horn, 2004). Una histona en particular nunca va a tener todas estas modificaciones simultáneamente, pero las histonas en un nucleosoma específico pueden colectivamente tener varios tipos diferentes de modificaciones. Las combinaciones particulares de las modificaciones postranscripcionales encontradas en diferentes regiones de la cromatina forman un “código de histonas” que influye en la función de la cromatina, creando o removiendo sitios de unión para proteínas asociadas a la cromatina (Lodish *et al.*, 2008). El “código de histonas” es leído por proteínas que se unen a las colas de las histonas modificadas y pueden promover la condensación o descondensación de la cromatina, formando estructuras de cromatina abiertas o cerradas.

Algunos dominios presentes en las proteínas que se asocian con las colas de histonas juegan papeles importantes en la regulación de la estructura de la cromatina. Por ejemplo, los bromodominios se unen a las colas de histonas acetiladas y por lo tanto se asocian con la cromatina activa transcripcionalmente. TFIID, una proteína involucrada en la transcripción, contiene dos bromodominios espaciados, los cuales probablemente la ayudan a asociarse con la cromatina transcripcionalmente activa. Esta proteína también tiene actividad de acetilasa de histonas, la cual puede mantener la cromatina en un estado hiperacetilado que favorece a la transcripción (Lodish *et al.*, 2008).

Otra forma de remodelamiento que ha sido descubierta es la que se da por los complejos de remodelación de la cromatina, que son complejos proteicos que usan la energía de la hidrólisis del ATP para cambiar temporalmente la estructura de los nucleosomas. El estado remodelado podría resultar del movimiento de los dímeros H2A-H2B en el núcleo de histonas; los tetrámeros H3-H4 son particularmente estables y difícilmente son re-arreglados. Gradualmente el estado remodelado puede revertirse a un nucleosoma estándar. Un segundo complejo de remodelación puede catalizar cambios en la posición de los nucleosomas a lo largo del DNA. Incluso, algunos complejos pueden transferir un núcleo de histonas de una molécula de DNA a otra.

La conformación del nucleosoma depende en gran medida de la histona H1, que inhibe la transcripción de los genes de las células mediante el empaquetamiento de nucleosomas adyacentes en una organización más apretada que impide el ingreso hacia los genes de los factores de transcripción y de la RNA polimerasa. Por otro lado, parece existir una competencia para la modificación del residuo de lisina localizado en la novena posición de la histona H3. Si este sitio es acetilado, la histona se desestabiliza y puede causar la dispersión del nucleosoma. Si este sitio no es acetilado, puede ser metilado. La metilación de una histona incrementa la estabilidad del nucleosoma, impidiendo su disociación o movimiento. La histona metilada puede ser capaz de reclutar a las enzimas que metilan el DNA; una vez que éste es metilado puede

estabilizar aun más al nucleosoma. El DNA metilado puede también unirse más eficientemente a la histona H1, formando una estructura más compacta (Scott, 2005).

La estructura general de la cromatina es muy similar en las células de todos los eucariontes, incluyendo hongos, plantas y animales, indicando que la estructura de la cromatina fue optimizada al inicio de la evolución de las células eucariontes. La secuencia de los aminoácidos de las cuatro histonas que forman el centro del nucleosoma (H2A, H2B, H3 y H4) está altamente conservada entre distintas especies (Alberts *et al.*, 2002). Sin embargo, la histona H1 varía de organismo a organismo. Un organismo dado puede presentar variantes de las histonas que forman el centro del nucleosoma; por ejemplo, la histona H2AX es incorporada en los nucleosomas, en lugar de la H2A, en una pequeña fracción de los nucleosomas en todas las regiones de la cromatina. Cuando el DNA de doble cadena se llega a romper, la histona H2AX es fosforilada y participa en el proceso de reparación del cromosoma; probablemente su función es la de unirse a proteínas reparadoras (Alsford y Horn, 2004). Estos pequeños cambios en las secuencias de aminoácidos en las histonas pueden influir en la estabilidad del nucleosoma, así como en su tendencia a plegarse en la fibra de 30 nm y otras grandes estructuras (Lodish *et al.*, 2008).

La estructura de la cromatina regula la expresión de un gen, pues al estar empacado el DNA en nucleosomas se impide el acceso de la RNA Polimerasa al DNA. En el caso de muchos genes transcritos por Pol II, se ha observado que las regiones promotoras carecen de nucleosomas; lo mismo está reportado para los promotores de los genes del rRNA. Sin embargo, poco se sabe respecto a la organización de la cromatina en genes transcritos por Pol III (Lewin, 2004). En estudios realizados en *Xenopus* para ver el efecto de las histonas sobre la transcripción de Pol III, a embriones se les inyectó mRNA de la histona H1, obteniendo como resultado la represión substancial del gen rRNA 5S; por otro lado, al inhibirse la expresión de la histona H1 se observó el efecto contrario: la tasa de transcripción de los genes del rRNA 5S se incrementó considerablemente (Paule y White, 2000). Esto indica que la

estructura de la cromatina juega un papel muy importante en la expresión de genes sintetizados por Pol III.

La nucleasa micrococcal es una endonucleasa ampliamente usada para analizar la estructura nucleosomal. La enzima corta entre los nucleosomas (corta el DNA que une a los nucleosomas), generando inicialmente grupos de nucleosomas y finalmente partículas nucleosomales individuales. Cuando la cromatina se digiere parcialmente con nucleasa micrococcal y se analiza mediante electroforesis, se observa una escalera en la que la banda menor corresponde a un nucleosoma individual (alrededor de 180 pb) y las bandas mayores corresponden a multímeros nucleosomales (dímeros, trímeros, etc.). Así, se ha observado que la longitud del DNA presente en el nucleosoma varía del valor típico de 180-200 pb en muchas especies, pues en algunos hongos se ha reportado que el DNA asociado al nucleosoma es de sólo 154 pb, mientras que en erizo de mar éste tiene un tamaño de 260 pb. De igual manera, se ha reportado que el tamaño del DNA de enlace varía entre distintas especies y tipos celulares entre 10 y 90 pb. Durante la replicación celular, el DNA es ensamblado en cortos nucleosomas, después de pasar por la orquilla de replicación. Este proceso depende de chaperonas específicas que se unen a las histonas y las ensamblan juntas con un nuevo DNA replicado en nucleosomas (Lodish *et al.*, 2008).

1.5 Estructura de la cromatina en tripanosomátidos

En los tripanosomátidos ha sido muy poco estudiada la estructura de la cromatina y su papel en la regulación de la expresión génica. Una característica distintiva de estos parásitos es que su cromatina no se compacta durante la mitosis para formar cromosomas metafásicos (Galanti *et al.*, 1998). De hecho, estos organismos no forman la fibra típica de 30 nm *in vitro* (Alsford y Horn, 2004). Sin embargo, el número reducido de promotores y la aparente ausencia de muchos de los factores de transcripción en los tripanosomátidos sugieren que la epigenética podría jugar un papel importante en la regulación de la expresión génica en estos organismos.

Los genes de las histonas H1, H2A, H2B, H3 y H4 están presentes en los tripanosomátidos. Sin embargo las histonas de estos organismos están entre las más divergentes conocidas; esta divergencia es particularmente predominante en los extremos N-terminal de las histonas. La histona H1 es la menos conservada, cuando se compara entre organismos. Los tripanosomátidos tienen histonas H1 atípicas, pues carecen de un dominio globular (Galanti *et al.*, 1998). En los tripanosomátidos muchos genes que codifican histonas están agrupados en arreglos en tándem, pero cada tipo de gen es encontrado a veces en cromosomas separados. La presencia de múltiples copias de genes podría facilitar el incremento en los niveles de expresión génica. También se ha reportado la presencia de genes de variantes de histonas y de genes de enzimas involucradas en la modificación de histonas, como acetil-transferasas y metil-transferasas (Recillas, 2000; Alford y Horn, 2004); esto refuerza la idea de que la estructura de la cromatina es importante para la expresión génica en tripanosomátidos.

Digestiones de la cromatina con nucleasa micrococcal en *T. brucei* y *T. cruzi* revelaron que la organización básica de la cromatina en estas especies es similar, aunque no idéntica, a la de eucariontes superiores. En *L. major* Friedlin no se ha analizado la estructura de la cromatina ni estudiado el papel que ésta juega en la expresión génica. En ningún tripanosomátido se ha analizado la estructura de la cromatina en genes transcritos por Pol III. Este tipo de análisis resulta necesario para lograr un mejor entendimiento de los procesos transcripcionales en este grupo de protozoos parásitos.

2. OBJETIVOS

Objetivo general:

Determinar la organización nucleosomal en genes de tRNA, rRNA 5S y snRNA U2 de *Leishmania spp.*

Objetivos particulares:

1. Estandarizar la técnica de digestión de la cromatina con nucleasa micrococcal en *L. major* y *L. mexicana*.
2. Determinar si la estructura nucleosomal de la cromatina de *L. major* y *L. mexicana* es similar a la que se presenta en otros organismos eucariontes.
3. Clonar diferentes fragmentos de DNA correspondientes a los loci de tRNA-Lys (chr03), rRNA 5S (chr11-II) y snRNA U2 (chr31-I) de *L. major* en el vector pGEM-T-Easy.
4. Determinar la distribución de nucleosomas en los genes de tRNA, rRNA 5S y snRNA U2 en *Leishmania*.
5. Analizar la estructura de la cromatina en el cistrón del rRNA (transcrito por Pol I) y en la región SSR del cromosoma 1 (transcrita por Pol II).
6. Determinar posibles diferencias en la estructura nucleosomal entre promastigotes de *Leishmania* creciendo activamente y aquellos que han dejado de dividirse.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Cultivo de promastigotes de *Leishmania*

Promastigotes de *L. major* MHOM/IL/81/Friedlin (LmjF) fueron crecidos a 27°C en medio líquido BM (Infusión de cerebro-corazón 0.25x, medio M199 0.5x, hepes 40 mM, hemina 10 µg/ml, biotina 0.08 µM, biopterina 1.25 µg/ml, penicilina 100 U/ml, estreptomina 0.1 mg/ml, suplementado con suero fetal bovino al 10 %), hasta alcanzar la fase media de crecimiento logarítmico (aproximadamente 1-2 días) o la fase estacionaria (4-5 días aproximadamente) Promastigotes de *L. mexicana* Bricarie fueron crecidos a 27 °C en medio líquido M-199 1x, suplementado con suero fetal bovino al 10 %, hepes 40 mM, hemina 4 µg/ml, penicilina (100 U/ml) /estreptomina (0.1 mg/ml) y L/glutamina 1x, hasta alcanzar la fase de crecimiento medio logarítmico o la fase estacionaria.

3.2 Aislamiento de DNA genómico

Se contaron en una cámara Neubauer 3×10^8 células de promastigotes de *Leishmania* y se centrifugaron a 2884 x g durante 10 mins. a 4°C; posteriormente la pastilla fue re-suspendida en solución de lisis que contiene SSC 0.5 X (NaCl 3M y citrato de sodio 0.6M), TNE-Tris (Tris 40 mM, pH 7.6, EDTA 1 mM, pH 8.0 y NaCl 15 M), Sarcosyl 0.5% y 100 µg de proteinasa K. La reacción se mantuvo durante 2 horas a 55°C, posteriormente se adicionaron 0.5 volúmenes de fenol y 0.5 volúmenes de alcohol isoamílico para posteriormente centrifugarse (HERMLE Z383K, rotor 220.78 V02) a 1846 x g durante 8 mins. La fase acuosa se transfirió a un tubo de plástico de 50 ml (Falcon), luego se extrajo el DNA con 1 volumen de cloroformo, se agitó vigorosamente en vortex y se centrifugó a 1846 x g durante 8 mins. Enseguida se transfirió la fase acuosa a un tubo nuevo y se precipitó con 0.1 volúmenes de acetato de sodio 3 M y 2.5 volúmenes de etanol absoluto y se dejó a -20 °C toda la noche. Al día siguiente se centrifugó la muestra a 4153 x g durante 15 mins. y se lavó la pastilla con etanol al 70 %, para finalmente resuspender el DNA en 400 µl de TE (Tris-HCl 10 mM, pH 7.6 y EDTA 0.2 mM, pH 8.0). La

concentración de DNA fue estimada con un espectrofotómetro a 260 nm (1 D.O. a 260 nm = 50 µg/ml).

3.3 Clonación de fragmentos genómicos

3.3.1 Amplificación por reacción en cadena de la polimerasa

Las secuencias de los fragmentos de los genes de tRNA, rRNA 5S, snRNA U2, cistrón del rRNA y del cromosoma 1 de *L. major* fueron obtenidas de las bases de datos de GeneDB y de “The National Center for Biotechnology Information (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Estos fragmentos fueron amplificados por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con oligonucleótidos específicos (Tabla 1), usando DNAg como templado; la mezcla de reacción contenía 5 µl de Buffer Redtaq (10x), 1µl de dNTPs (10 mM), 1 µl de cada uno de los primers (forward y reverse, 10 µM), 1 µl de DNAg (100 ng/µl), 1 µl de enzima Red Taq (1 U/µl, SIGMA) y 40 µl de agua. Los fragmentos fueron purificados de geles de agarosa al 2% (Agarosa D-1 LOW EEO, Pronadisa) en TBE 1x (Tris base 89 mM, ácido bórico 89 mM y EDTA 2 mM), con bromuro de etidio 0.1 µg/ml. El buffer de corrida también fue TBE 1x. Después de que polimerizó el gel se corrieron los productos de PCR, a los cuales se les adicionó buffer de muestra (Gel-loading buffer III 1x, compuesto por azul de bromofenol 0.25 %, xileno cianol FF 0.25% y glicerol 30 %). Los marcadores usados fueron de 1 kb y de 100 pb (Invitrogen). Las corridas se realizaron en una cámara de electroforesis (Gel XL Ultra V-2, Labnet) a 100 volts, hasta que el azul de bromofenol migró hasta la parte inferior del gel.

3.3.2 Purificación del DNA en geles de agarosa

Se procedió a recuperar el DNA de los geles de agarosa, usando el kit Nucleospin Extract II (Macherey-Nagel). Para ello, con una navaja se cortó el fragmento del gel que tenía la banda de DNA de interés y se colocó en un tubo eppendorf de 1.5 ml. Posteriormente se adicionaron 200 µl de buffer NT por cada 100 mg de agarosa, y se incubó la muestra a 50 °C hasta que la agarosa

estuviera disuelta (agitando en el vortex cada 2 mins.); luego se transfirió la muestra a una columna NucleoSpin Extract II que además tenía un tubo eppendorf para coleccionar los residuos; se centrifugó 1 min. a 11 000 x g, se desechó el residuo y se agregó a la columna 600 µl de buffer NT3; se volvió a centrifugar 1 min. a la misma velocidad que la vez anterior, se desechó el residuo y se volvió a centrifugar por 2 mins. la muestra y se cambió el tubo eppendorf por un tubo nuevo, para finalmente eluir el DNA en 50 µl de agua, dejando reposar 1 min. y centrifugando 1 min. a 11 000 x g.

Locus	Inserto	Oligonucleótidos
chr03	Crom3-68	crom3-68-5' (ggcgtgaagaatggaagtg) crom3-68-3' (ccgtgtatggccaaagcaa)
	Crom3-D	crom3-D-5' (cattggaggcgtgctttcc) crom3-D-3' (caccagtcaactggcgctgg)
	Crom3-tRNA	crom3-tRNA-5' (ccgatgctttccacctgcg) crom3-tRNA-3' (tgccgtttaccgagaggcca)
	Crom3-E bis	crom3-E-bis 5'(cacgacgacgcataacaacg) crom3-E-bis 3'(ccaacacgtgagctgcttc)
chr11-II	tRNA-Arg	tRNA-arg-5' (atgtccgtgtggctcaatgg) tRNA-arg-3' (accactcagtgaggtaagg)
	rRNA 5S	rRNA5S-5' (gtcgagtacgaccacacttg) rRNA5S-3' (aagagtacggcactcagggt)
	11-Inter	11-Inter-5' (gaacttgggaatgccttctg) 11-Inter-3' (gcaagaagaatgtggaacgg)
	11.0930	11.0930-5' (Agcagcagttcattgaggct) 11.0930-3' (gccgatcatcatcctctaag)
chr31-I	aATP11	aATP11-5' (ggctgtcatcttggcaaaact) aATP11-3' (gggtactagcgcaggataat)
	Inter U2	inter-U2-5' (tagagtcttgcagctgcaa) inter-U2-3' (ccctcacagcgtttatag)
	U2	U2-5' (aaacgtggaactccaaggaa) U2-3' (tatcttctcggctatttagc)
	t-like U2	t-like-U2-5' (aatcagcggtttctcactgcc) U2tRNA-like-3' (aggaaaagatgcttctgacgag)
	tRNA-Ala	tRNA-Ala-5' (attgggacgttaccgctcg) tRNA-Ala-3' (attgcccaggccttca)
Cistrón de rRNA	rRNA A	rRNA-A-5' (ttgttgggtggaggtgaga) rRNA-A-3' (caaaatcatcaaacccgctc)
	rRNA B	rRNA-B-5' (gtgaagggtgaaggaagggt) rRNA-B-3' (ttccgcaaccacaagat)
	18S	18S-5' (catgcatgctcagaatcac) 18S-3' (cgtttcgccaagtatccaa)
	rRNA C	rRNA-C-5' (ttgtgggtccttgccttt) rRNA-C-3' (ggattgtcggatgtctcttg)
SSR del cromosoma 1	Gen 32	Gen32-5' (gaagtagccgtagtgcagca) Gen32-3' (cgcaaatgtccatgaggac)
	Ssr1	ssr1-5' (agagcggagaagagacagcg) ssr1-3' (tgcgactcgtccatgtgat)
	Ssr2	ssr2-5' (aacggcaagaatggctgcat) ssr2-3' (cgacaaagtgtgctgcacac)
	Ssr3	ssr3-5' (aacatgagaccacaagcga) ssr3-3' (tgtagtcagcttctaccgc)
	Gen 33	Gen33-5' (tcatatctcagccagcttg) Gen33-3' (gttcagggtcccacataaccg)

Tabla 1. Oligonucleótidos usados para amplificar las diferentes regiones del genoma de *Leishmania major* que se analizaron.

3.3.3 Ligaciones y transformaciones

Los fragmentos purificados fueron ligados en el vector pGEM-T Easy (Promega). La reacción incluyó 2 µl del inserto (producto del purificado obtenido por PCR), 50 ng del vector pGEM-T Easy, 1 µl de ligasa T4 (3 U/µl, Promega) y 5 µl de buffer de ligación rápida (2X), en un volumen final de 10 µl, ajustando con agua. Se mezcló muy bien por pipeteo y se dejó que la reacción de ligación ocurriera a 4°C durante toda la noche. Las ligaciones se transformaron en células competentes *E. coli* JM109. Para esto, 200 µl de células se transfirieron a un tubo Falcon de 15 ml y se adicionaron 2 µl de la reacción de ligación; se dejaron incubando 20 mins. a 4 °C, y posteriormente se dio un choque térmico durante 45 segundos a 42 °C. Inmediatamente después los tubos se pasaron al hielo (2 mins.), se agregaron 800 µl de medio SOC (triptona 2 %, extracto de levadura 0.5 %, NaCl 1 %, KCl 2.4 mM, Cl₂Mg 1 % y Glucosa 2 %), y se incubó durante 1 hora a 37 °C en agitación rápida. Las células fueron centrifugadas a 13305 x g por 30 segundos y la pastilla fue resuspendida en 100 µl de medio LB y sembrada en cajas Petri con medio LB agar (Peptona de caseína 1 %, extracto de levadura 0.5 % y NaCl 0.5 %, ajustando a pH 7.5) con ampicilina (0.01 %), IPTG (100 mM) y X-Gal (50 mg/ml). Las células se dejaron crecer durante toda la noche a 37 °C.

3.3.4 Purificación y análisis de plásmidos

Se seleccionaron a las colonias bacterianas blancas, que habían incorporado al vector y el inserto, y se crecieron en 5 ml de medio LB con ampicilina (0.01 %), dejando los cultivos toda la noche a 37 °C en agitación rápida. Al siguiente día se transfirieron a un tubo eppendorf 250 µl de glicerol al 50% y 750 µl del cultivo, se dejaron 1 hora a 4 °C y posteriormente se almacenaron a -70 °C. Del resto del cultivo se procedió a obtener el DNA

mediante un kit de minipreps (QIAGEN). Para ello, se centrifugó el cultivo a 5000 x g por 1 min. para obtener una pastilla de células, las que se resuspendieron en 250 µl de buffer P1 (agitando) y se transfirieron a un tubo eppendorf nuevo de 1.5 ml. Posteriormente se les agregó 250 µl de buffer P2 y se mezcló inmediatamente invirtiendo los tubos de 4 a 6 veces, después se agregó 250 µl de buffer N3 (mezclando como la vez anterior); después se centrifugaron por 10 mins. a 18 000 x g, y el sobrenadante se pasó a un columna QIAprep colocada dentro de un tubo eppendorf nuevo; luego se centrifugó por 1 min. a 18 000 x g, se tiró el líquido contenido en el tubo eppendorf, se agregaron 0.5 ml de buffer PB y se centrifugó otra vez por 1 min. a 18 000 x g. Se volvió a tirar el líquido del eppendorf, se lavó la columna adicionando 0.75 ml de buffer PE y se centrifugó por 1 min. a las mismas gravedades que la vez pasada; se desechó de nuevo el líquido en el eppendorf y se centrifugó bajo las mismas condiciones por 1 min. para remover los residuos del buffer de lavado. Finalmente, para eluir el DNA se colocó la columna QIAprep en un tubo eppendorf de 1.5 ml nuevo, se agregó 50 µl de agua, se dejó reposar por 1 min., para después centrifugar por 1 min. a 18 000 x g, quedando el DNA en el eppendorf nuevo. Una muestra pequeña (~5 µl) de cada uno de los plásmidos obtenidos fue digerida con *EcoRI* para determinar si se había clonado el inserto del tamaño esperado. Las clonas positivas fueron enviadas a secuenciar para verificar la identidad de cada inserto. La secuenciación se llevó a cabo en el Laboratorio de Bioquímica Molecular de la Unidad de Biotecnología y Prototipos de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala, UNAM. El Método empleado fue “BIG DYE Terminador Fluorescente Based Sequencing”, con un equipo ABI 3100.

3.4 Purificación de insertos

Se tomaron 19 µl del DNA obtenido por miniprep y se digirieron con *EcoRI*. Para esto, el DNA se mezcló con 0.6 µl de la enzima (20 U/ µl, BioLabs), 2.5 µl de buffer (10X NEBuffer *EcoRI*) y finalmente 2.9 µl de agua. La reacción se llevó a cabo a 37 °C por 5 horas. Esta enzima libera el inserto clonado, separándolo del cuerpo del vector pGEM-T. Se corrieron 25 µl de la digestión para liberar los fragmentos en un gel de agarosa al 2 %, hasta que el

azul de bromo-fenol alcanzara el borde del gel, después se colocó el gel en un transiluminador de luz UV (M-26, UVP), donde con una navaja cortamos los fragmentos de gel que contenían nuestros insertos y se pasaron a un tubo eppendorf nuevo; por cada 100 mg de agarosa se agregó 200 µl de buffer NT, posteriormente se incubó la muestra a 50° C de 5 a 10 min, agitando hasta que la agarosa fue totalmente disuelta. Luego se colocó una columna NucleoSpin Extract II en un tubo de 2 ml NucleoSpin Collecting y se le agregó la muestra, se centrifugó por 1 min a 11 000 x g., desechando la fase del tubo colector, después se agregó 600 µl de buffer NT3 y se volvió a centrifugar al mismo tiempo y velocidad y se desechó de nuevo el líquido del tubo colector; se volvió a centrifugar por 2 min. a 11 000 x g. para remover todo el buffer NT3, por último se colocó la columna NucleoSpin Extract II en un tubo eppendorf, se agregaron 50 µl de agua, se dejó reposar por un min. y se centrifugó por 1 min. a 11 000 x g, quedando el DNA del fragmento en el agua contenida en el tubo eppendorf y se guardó a -20°C.

3.5 Preparación de células competentes

Se tomaron de 10 a 12 colonias de *E. coli* JM109 y se crecieron en 200 ml de medio LB a 27°C, con agitación rápida (200-250 rpm) hasta alcanzar una densidad óptica de $A_{600} = 0.6$. Se incubó el cultivo 10 min en hielo. Se centrifugaron las células 10 min a 3000 rpm a 4°C, se resuspendió el pellet en 3.2 ml de TB (10mM Pipes, 55 mM $MnCl_2$ 15 mM $CaCl_2$ y 250 mM KCl) enfriado en hielo y se incubó en hielo durante 10 min. Se centrifugó como se hizo anteriormente y se resuspendió el pellet en 0.8 ml de TB, y se agregó dimetil sulfóxido (DMSO) a una concentración final del 7 %; se incubó en hielo por 10 min. Por último se hicieron alícuotas de 600 µl en tubos Eppendorf previamente enfriados en hielo e inmediatamente se congelaron sumergiéndolos en hielo seco con etanol absoluto y se almacenaron a -70 °C.

3.6 Aislamiento de núcleos y de cromatina

Se centrifugaron 18×10^8 promastigotes de *Leishmania* a 7000 x g durante 10 min a 4°C, posteriormente se lavaron las células dos veces con 10

ml de PBS-G (10 mM Na₂HPO₄, 10 mM NaH₂PO₄, 145 mM NaCl y 2% glucosa), se resuspendió a la pastilla en 10 ml de buffer de lisis (10 mM Tris-HCl pH 7.5, 3 mM CaCl₂ y 2 mM MgCl₂), después se centrifugó a 6000 x g durante 10 min a 4 °C y se resuspendió la pastilla en 4 ml de buffer de lisis con inhibidores de proteasas, se adicionó 200 µl de NP-40 % y se mezcló. A continuación se transfirieron las células a un homogenizador de vidrio con mazo de teflón pre-enfriado a 4 °C y se rompieron las células manualmente (dando de 50 a 150 golpes); se checó al microscopio para verificar la lisis celular. Los núcleos fueron colectados centrifugando a 3500 rpm durante 10 mins. a 4 °C, la pastilla fue re-suspendida en 1 ml de buffer de almacén de núcleos (Sacarosa 340 mM, KCl 60 mM, NaCl 15 mM, espermina 0.15 mM, espermidina 0.15 mM y Tris-HCl 15 mM); se transfirieron los núcleos a un tubo eppendorf de 1.5 ml y se volvió a centrifugar a 900 x g durante 10 mins. a 4 °C, se desechó el sobrenadante y por último se re-suspendió la pastilla en 250 µl de buffer de almacén de núcleos, procurando mezclar bien y se almacenó a -70°C.

3.7 Digestión con nucleasa micrococcal

La cromatina contenida en los núcleos fue digerida con nucleasa micrococcal (MNasa). Para ello se tomaron 25 µl de núcleos (de los 250 µl obtenidos en la sección 6). Se agregaron 4 µl de DTT (100 mM), para *L. major* fase media logarítmica y 6 µl de DTT (100 mM) para *L. major* fase estacionaria; también se agregaron 0.4 µl de CaCl₂ (100 mM) y 10 µl de nucleasa micrococcal (0.1 U/ µl, USB). El tiempo de digestión fue de 12 mins. para *L. major* en fase media logarítmica y 3 mins. para *L. major* en fase estacionaria, a 30 °C. Se detuvo la reacción agregando 40 µl de solución de paro (EDTA 0.2 M, proteinasa K 10 mg/ml) y se llevó a volumen final de 150 µl con agua. Posteriormente se agregó 1 volumen de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (25:24:1, Invitrogen), se agitó brevemente, se centrifugó a velocidad máxima por 5 mins. y se transfirió la fase acuosa a un tubo eppendorf de 1.5 ml nuevo. Después se agregó 5 µl de RNAasa A (4 mg/ml, Promega) y se incubó a 37 °C por 1 hora. Luego se repitió la extracción con fenol-cloroformo-alcohol isoamílico, se dejó precipitando el DNA con 2.5 volúmenes de etanol absoluto,

0.1 volúmenes de acetato de sodio 3 M, a -20 °C toda la noche. Al día siguiente se centrifugó a velocidad máxima por 10 mins., se desechó la fase líquida, se lavó el botón con 500 µl de etanol al 70 %, se volvió a centrifugar y se dejó secar la pastilla, para finalmente resuspender en 13 µl de agua. Se corrieron 3 µl de la muestra en un gel de agarosa al 2 % para verificar que se hubiera hecho bien la digestión. Los controles negativos (sin MNasa) se llevaron a cabo tomando 25 µl de núcleos de *L. major* en fase media logarítmica y estacionaria, se agregó 4 µl de DTT (100 mM) y 0.4 µl de CaCl₂ (100 mM), se llevó a un volumen de 150 µl con agua, se agregó 1 volumen de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico y se continuó con el resto de la técnica ya descrita para los núcleos digeridos con MNasa.

3.8 Experimentos tipo Southern-blot

3.8.1 Electroforesis y transferencia a membranas de nylon

La cromatina que fue digerida y que quedó resuspendida en 10 µl de agua se corrió en un gel de 350 ml de agarosa al 1.5 % en TBE 1x, a 90 voltios por 5 horas y 30 mins. Cuando hubo terminado de correr se tomó una fotografía del gel junto a una regla fluorescente. Para comenzar la transferencia del DNA, el gel se enjuagó dos veces con agua desionizada, agitando suavemente por 1 min. cada una. Después se trató al gel con tres soluciones: solución despurinizante (HCl 10 %) por 10 mins., luego 50 mins. en solución desnaturizadora (NaCl 14.5 M y NaOH 0.5 M), y por último en solución neutralizante (NaCl 1.5 M y Tris Base 0.5 M, pH 7.0) durante 30 mins. Todas las inmersiones y lavados se realizaron en agitación suave y a temperatura ambiente. Para iniciar la transferencia, en un recipiente de vidrio se colocó un vidrio forrado por dos capas de papel Whatman, se adicionó posteriormente solución de transferencia (SSC 10 X) para humedecer el papel, evitando dejar burbujas en todos los casos; después se colocó el gel de manera invertida sobre el papel Whatman. Sobre el gel se colocó una membrana de nylon

(Hybond-N+, Amersham, GE Healthcare). Posteriormente se colocaron 2 capas de papel Whatman, previamente humedecidas en SSC 10 X y encima de todo se colocó una capa de ~5 cm de papel absorbente cortado a la medida del gel. Finalmente, se colocó un vidrio sobre el papel y un frasco con agua, con un peso de ~500 g, sobre el vidrio. La transferencia del DNA se realizó por capilaridad durante 18 horas en solución de transferencia. Después se desmontó el blot, y el DNA contenido en la membrana de nylon fue fijado con radiación UV usando el Stratalinker (Stratalinker mod. 1800, Stratagene). Para verificar que el DNA se hubiera transferido bien se sumergió el gel en un baño de bromuro de etidio (0.5 µg/ml) durante 10 mins. y se visualizó en un transiluminador de luz UV.

3.8.2 Marcaje radioactivo de fragmentos de DNA

Se adicionaron 100 ng de DNA en un tubo eppendorf de 1.5 ml, llevando a un volumen de 11 µl con agua. Se desnaturalizó el DNA hirviendo en un baño María por 10 mins. y después dejándolo en hielo por 5 mins. Posteriormente se adicionaron 4 µl de High Prime (Roche) y 5 µl de (α -³²P)-dCTP, mezclando bien y centrifugando la muestra a 900 x g por 30 segundos. La mezcla se incubó por 10 mins. a 37°C, para luego detener la reacción agregando 2 µl de EDTA (0.2M, pH 8.0).

Para remover los nucleótidos radioactivos no incorporados al DNA se llevó a cabo una cromatografía de exclusión molecular con columnas de sefadex G-50 (ProbeQuant G-50, GE Healthcare). Como paso inicial, se ajustó el volumen de la mezcla a 50 µl con buffer STE 150 mM, pH 8.0 (NaCl 150 mM diluido en 50 ml de TE). Se prepararon las columnas siguiendo las indicaciones del fabricante. Brevemente, se rompió el broche inferior de la columna y se colocó en un tubo eppendorf de 1.5 ml, se aflojó la tapa y se centrifugó a 735 x g por 1 min.; posteriormente se transfirió la columna a un tubo de 1.5 ml nuevo y se agregó los 50 µl de la sonda radioactiva, y se centrifugo nuevamente a 735 x g por 2 mins., quedando el DNA marcado en el fondo. Se cuantificó 1 µl de la sonda en un contador de centelleo (Wallac 1450 MicroBeta, Perkin Elmer) y el resto se almacenó a -20°C.

3.8.3 Pre-hibridación e hibridación

Para pre-hibridar la membrana, ésta se colocó en una botella de 16 cm de largo del horno de hibridación (Hybaid Sake'n'stack, Thermo Electron). Luego se agregaron 20 ml de solución de hibridación [Formamida 50 %, SSC 5X, SDS 0.2 % y solución Denharts 4 X (Ficoll 400 0.08 %, PVP-40 0.05 % y albumina sérica bovina 0.08 %)] a la botella y se incubó durante 2 horas a 42°C en el horno de hibridación. Posteriormente se eliminaron 5 ml de la solución de hibridación, y se adicionaron 5 millones de cuentas por min. (cpm) de la sonda radioactiva desnaturalizada (llevándola a un volumen de 200 µl con agua, se cerró el tubo previamente perforado de la tapa, se dejó en agua hirviendo por 10 mins., dejando después en hielo por 2 mins. y se centrifugó brevemente). Se dejó hibridar por 24 horas a 42 °C.

3.8.4 Lavado de los filtros radioactivos y exposición

Los filtros se lavaron por 3 mins. a temperatura ambiente en SSC 2 X y SDS 0.1 %. Después se repitió este lavado por 30 mins. a 65 °C. Posteriormente se realizaron dos lavados con SSC 0.3 % y SDS 0.1% a 65 °C por 30 mins. Finalmente se dejó secar la membrana sobre papel Whatman y se envolvió en plástico adherente transparente. Para obtener la autorradiografía, los filtros se dejaron exponer en una placa de rayos X (BioMax MS, Kodak) durante 2 días, junto con una pantalla intensificadora, a -70 °C. Luego se retiraron los filtros, las placas se revelaron con líquido revelador (GBX, Kodak), se enjuagaron con agua y se fijaron con líquido fijador (GBX, Kodak). Esto se realizó en el cuarto oscuro. Las membranas también se expusieron en placas de un equipo tipo Phosphorimager (FLA-5000, Fujifilm), escaneándose en el aparato después de 12 horas de exposición.

4. Resultados

4.1 Selección de las regiones del genoma de *L. major* por analizarse

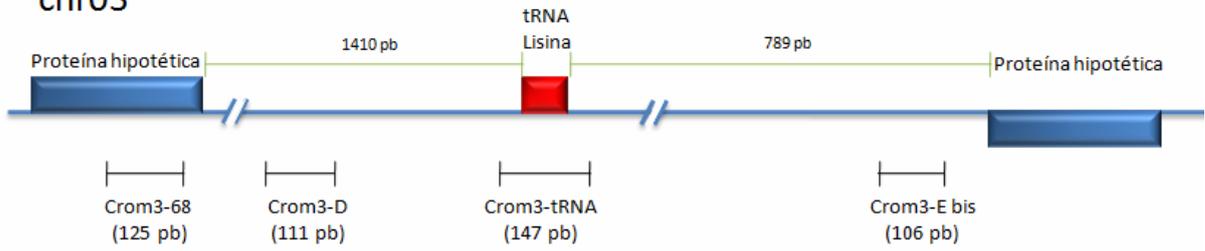
El genoma de *L. major* contiene 83 genes de tRNA, 11 genes del rRNA 5S y un gen para cada uno de los snRNAs (U1 a U6). Estos genes, transcritos por Pol III, en su mayoría se encuentran organizados en clusters de 2 a 13 genes, distribuidos en 31 loci en 19 cromosomas (Padilla-Mejía *et al.*, 2009). Fueron seleccionados tres loci para su análisis de estructura nucleosomal: chr03, chr11-II y chr31-I (Fig. 10).

El locus chr03 se eligió por contener un gen de tRNA de lisina (tRNA-Lys) localizado entre dos unidades policistrónicas convergentes; el gen tRNA-Lys ya fue caracterizado transcripcionalmente, confirmándose que es transcrito por Pol III (Worthey *et al.*, 2003). El locus chr11-II se seleccionó por presentar un gen del rRNA 5S, además de genes de tRNA de arginina (tRNA-Arg) y de metionina (tRNA-Met).

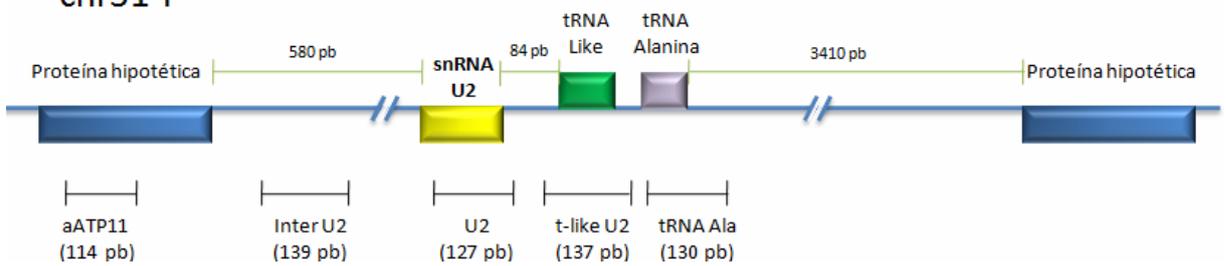
Finalmente, el locus chr31-I se escogió porque contiene el gen del snRNA U2 y un tRNA de alanina (tRNA-Ala); en este locus también se presenta un tRNA-*like* (molécula parecida a un tRNA), que presumiblemente contiene la región promotora del snRNA U2 (Fig. 10). De esta manera, serían analizados diferentes tipos de genes sintetizados por Pol III (tRNAs, rRNA 5S y snRNA U2).

Además, para usar como control se eligió el locus del cistrón del rRNA (transcrito por Pol I), y la región SSR del cromosoma 1 (transcrita por Pol II). En el caso del cistrón del rRNA, el sitio de inicio de la transcripción y la región promotora ya fueron caracterizados (Monnerat *et al.*, 2003) (Fig. 10). Por otro lado, en la región SSR del cromosoma 1 fueron localizados varios sitios de inicio de la transcripción de Pol II para ambas unidades policistrónicas contenidas en dicho cromosoma (Martinez-Calvillo *et al.*, 2003) (Fig. 10).

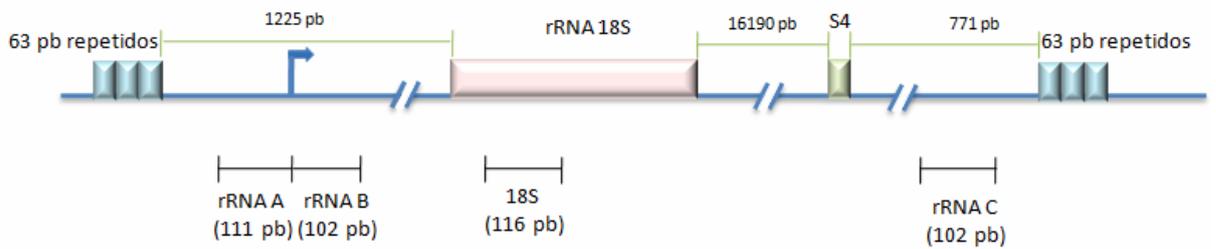
chr03



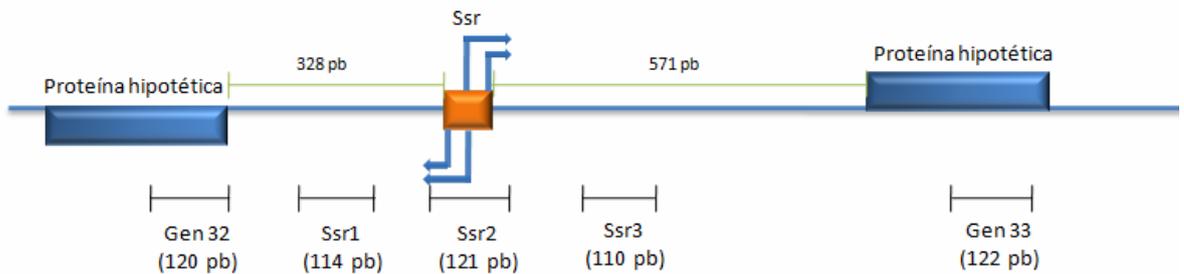
chr31-I



Cistrón del rRNA



SSR del cromosoma I



chr11-II

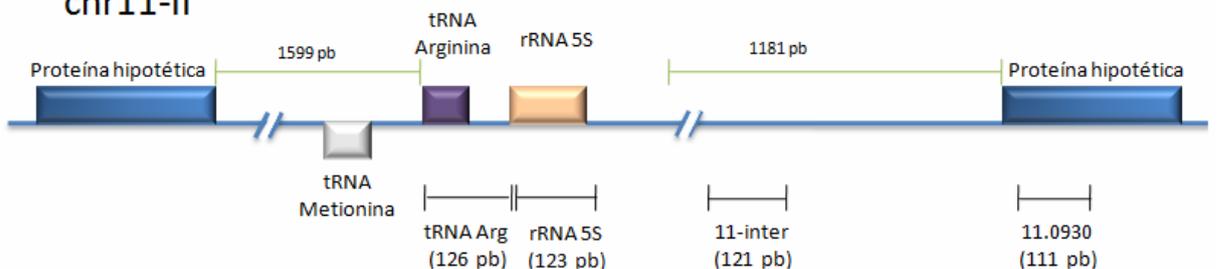


Figura 10. Mapas genómicos de los loci analizados. Se señalan los fragmentos amplificados y analizados. Las flechas indican los sitios de inicio de la transcripción conocidos a la fecha (Vanhamme, 2008)

4.2 Clonación de los diferentes fragmentos genómicos de *L. major*

De los loci seleccionados se amplificaron por PCR diferentes fragmentos de entre 106 y 147 pb que contienen genes transcritos por las tres RNA polimerasas, regiones promotoras (confirmadas y probables) y regiones intergénicas (Fig. 10). Para ello, fueron diseñados oligonucleótidos específicos para cada fragmento (tabla 2). Asimismo, fue purificado DNA genómico a partir de cultivos de promastigotes de *L. major*. Para realizar cada reacción de PCR se usaron 100 ng de DNA, con los oligonucleótidos específicos, a las temperaturas de alineación (“annealing”) que se indican en la tabla 2.

Locus	Fragmento	Tamaño (pb)	Temperatura de alineación (°C)
chr03	Crom 3-68	125	62
	Crom 3-D	111	66
	Crom 3-tRNA	147	69
	Crom 3-Ebis	106	55
chr31-I	aATP11	114	55
	Inter U2	139	58
	U2	127	50
	t-like U2	137	65
	tRNA Ala	130	66
Cistrón del rRNA	rRNA A	111	55
	rRNA B	117	58
	18S	116	58
	rRNA C	117	58
SSR del cromosoma I	gen 32	120	58
	ssr1	114	62
	ssr2	121	55
	ssr3	110	57
	gen 33	122	55
chr11-II	tRNA Arg	126	55
	rRNA 5S	109	58
	11 inter	121	58
	11.0930	110	58

Tabla 2. Fragmentos amplificados por PCR para *L. major*. Se indica su tamaño en pb y la temperatura de alineación usada para su amplificación.

Una vez realizados los PCRs, se corrieron 5 µl de cada reacción en geles de agarosa al 2 %. En todos los casos se obtuvieron los fragmentos del

tamaño esperado (Figs. 11 y 12). Por ejemplo, el fragmento correspondiente a crom3-tRNA (147 pb) se observa justo entre las bandas de 100 y 200 pb del marcador de tamaño (Fig. 11, carril 2); y el fragmento correspondiente a rRNA C (117 pb) puede apreciarse un poco arriba de la banda de 100 pb del marcador (Fig. 12, carril 8).

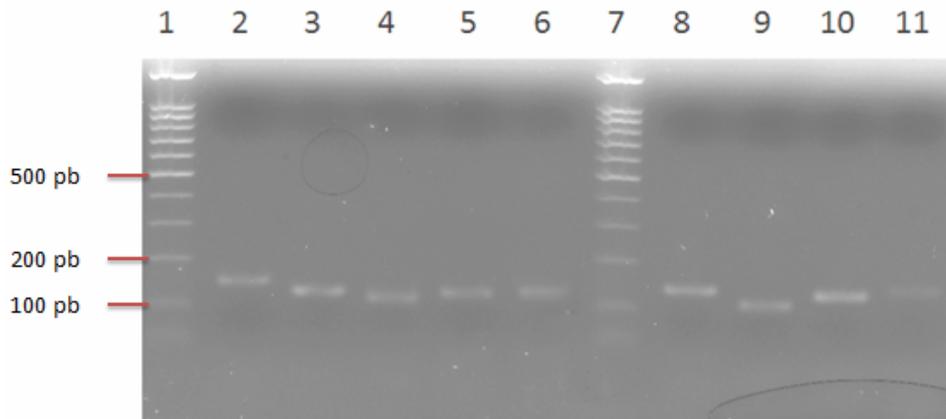


Figura 11. Electroforesis de fragmentos amplificados por PCR para *L. major*. Marcador de peso molecular (escala de 100 pb, carriles 1 y 7); los fragmentos: crom3-tRNA (carril 2), U2 (carril 3), aATPII (carril 4), crom3-68 (carril 5), crom3-E bis (carril 6), t-like U2 (carril 8), crom3-D (carril 9), tRNA Ala (carril 10) e inter U2 (carril 11). Gel de agarosa al 2%.

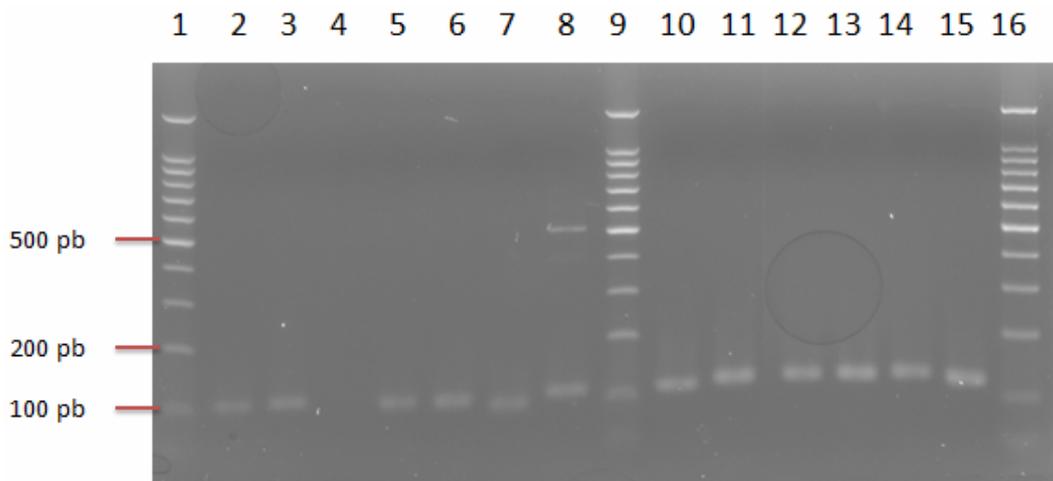


Figura 12. Electroforesis de fragmentos amplificados por PCR para *L. major*. Marcador de peso molecular (escala de 100 pb, carriles 1, 9 y 16); los fragmentos: 11.0939 (carril 2), ssr1 (carril 3), ssr2 (carril 4), ssr3 (carril 5), rRNA A (carril 6), rRNA B (carril 7), rRNA C (carril 8), 18S (carril 10), rRNA 5S (carril 11), 11 inter (carril 12), gen 33 carril (13), tRNA Arg (carril 14) y el gen 32 (carril 15). Gel de agarosa al 2%.

Una vez que se obtuvieron los productos de PCR, se procedió a desalarlos y a ligarlos en el vector pGEMT-T Easy. Posteriormente se transformaron células competentes *E. coli* JM109 que se obtuvieron en el

laboratorio, se plaquearon las células en cajas de LB agar con X-Gal, IPTG y ampicilina, y se dejaron crecer toda la noche a 37 °C. Se seleccionaron varias de las colonias blancas obtenidas para aislar el DNA plasmídico. Dicho DNA se analizó mediante digestiones con la enzima *EcoRI*, la cual libera el fragmento que se haya ligado al vector. Se tomaron 5 µl de cada digestión y se corrieron en geles de agarosa al 2 %. Todos los plásmidos mostraron insertos del tamaño esperado. El fragmento de DNA de alto peso molecular que se observa en todos los carriles, corresponde al vector pGEM-T Easy (3 kb) (Figs. 13-16).

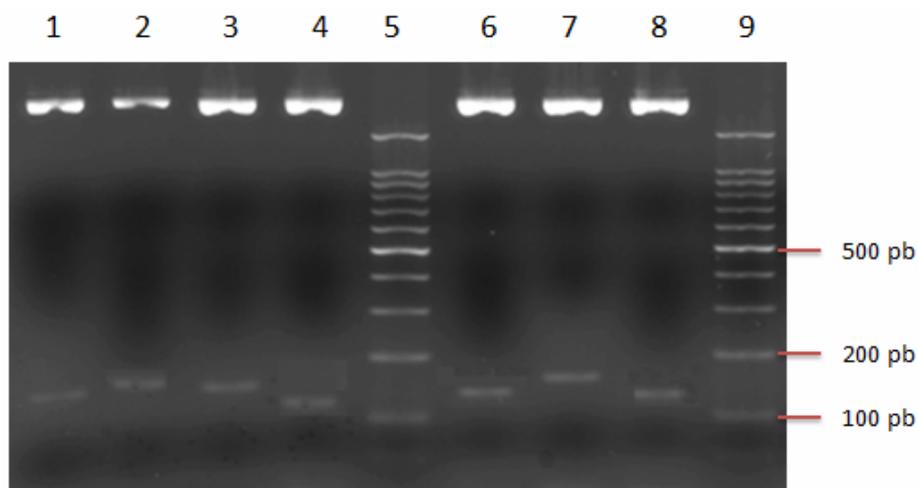


Figura 13. Electroforesis de los vectores digeridos con *EcoRI*. Marcador de peso molecular (escala de 100 pb, carriles 5 y 9); los fragmentos: tRNA Ala (carril 1), Inter U2 (carril 2), tLike U2 (carril 3), aATP11 (carril 4), U2 (carril 6), Crom3 tRNA (carril 7) y Crom3-D (carril 8). Gel de agarosa al 2%.

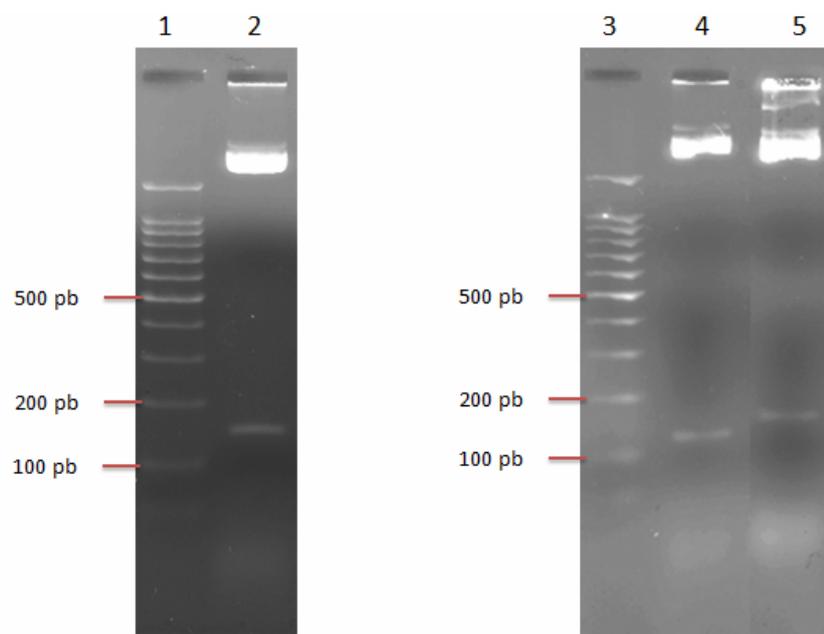


Figura 14. Electroforesis de las digestiones con *EcoRI*. Marcador de peso molecular (escalera de 100 pb, carriles 1 y 3); los fragmentos: Crom3-68 (carril 2), rRNA A (carril 4) y 11-inter (carril 5). Gel de agarosa al 2%.

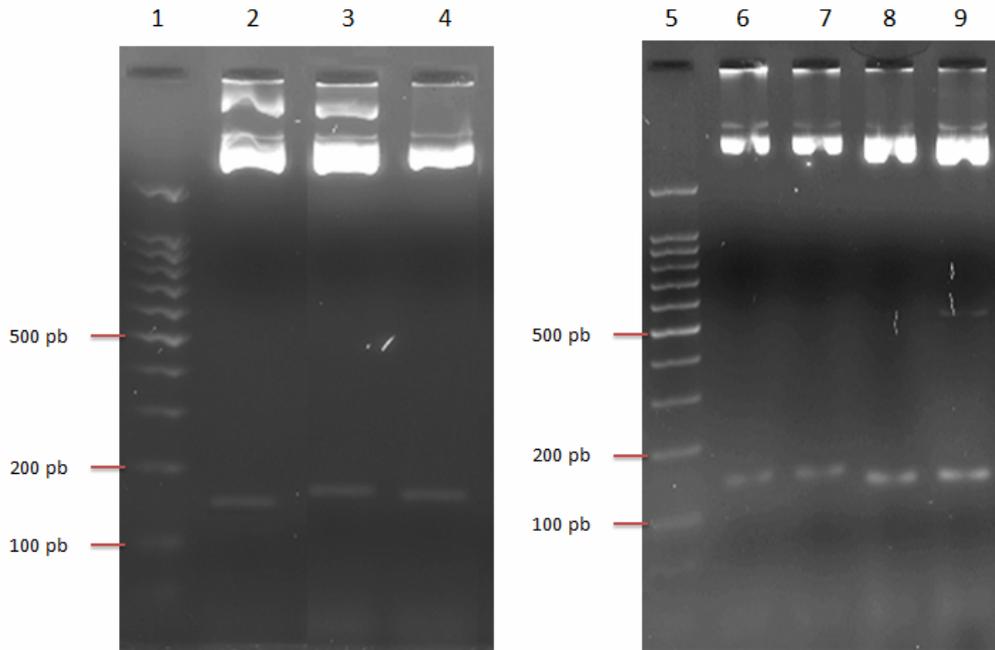


Figura 15. Electroforesis de las digestiones con *EcoRI*. Marcador de peso molecular (escalera de 100 pb, carriles 1 y 5); los fragmentos: Gen 33 (carril 2), tRNA Arg (carril 3), Ssr1 (carril 4), rRNA 5s (carril 6), Gen 32 (carril 7), Ssr3 (carril 8) y rRNA B (carril 9). Gel de agarosa al 2%.

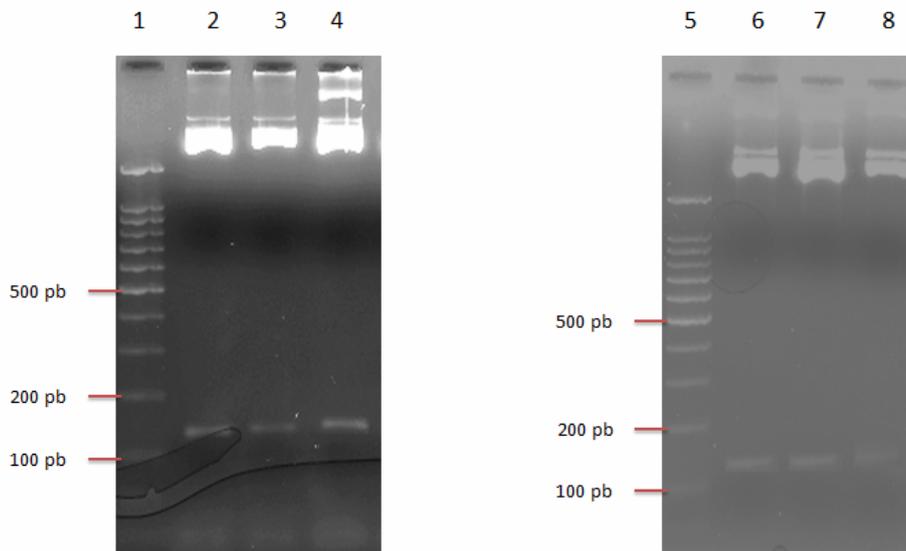


Figura 16. Electroforesis de las digestiones con *EcoRI*. Marcador de peso molecular (escalera de 100 pb, carriles 1 y 5); los fragmentos: 11.0930 (carril 2), rRNA C (carril 3), Ssr2 (carril 4), Crom3- E bis (carril 6), U2 (carril 7) y 18S (carril 8). Gel de agarosa al 2%.

Después de que se verificó que los fragmentos liberados del vector tenían el tamaño esperado, fueron enviados a secuenciar con el oligonucleótido T7 (el vector pGEM-T Easy presenta un sitio de unión a este oligonucleótido).

Se analizaron las secuencias obtenidas, y se confirmó la identidad de todos los fragmentos clonados. Como ejemplo, en la figura 17 se muestra la comparación entre la secuencia esperada y la secuencia obtenida para el fragmento tRNA Ala. Como puede apreciarse, ambas secuencias son idénticas.

```

Gen          ATTGGGACGTTACCGCGTCGGGGATGTAGCTCAGATGGTAGAGCGACCGCTTAGCATGCG
tRNA Ala C  ATTGGGACGTTACCGCGTCGGGGATGTAGCTCAGATGGTAGAGCGACCGCTTAGCATGCG
*****

Gen          GTAGGTATTGGGATCGATACCCAACCTTCTCCAACCTTTTTCACCCGACAAGTGAAAGGCCT
tRNA Ala C  GTAGGTATTGGGATCGATACCCAACCTTCTCCAACCTTTTTCACCCGACAAGTGAAAGGCCT
*****

Gen          GGGCCGCAAT
tRNA Ala C  GGGCCGCAAT
*****

```

Figura 17. Comparación entre las secuencias del gen de tRNA Ala (Gen) y el producto clonado en pGEMT-Easy (tRNA Ala Clona 4). Se muestra sólo una parte de la comparación.

Posteriormente, se hicieron nuevos minipreps de las clonas positivas, para obtener una mayor cantidad de vector, y se realizaron digestiones con *EcoRI*. Los fragmentos se purificaron de geles de agarosa, se cuantificaron y se almacenaron a -20°C , para posteriormente marcarlos radioactivamente.

4.3 Aislamiento de núcleos

El siguiente paso en el proyecto de investigación fue el aislamiento de núcleos y cromatina de promastigotes de *L. major* (ver materiales y métodos). Los núcleos fueron purificados de cultivos en fase media logarítmica y de cultivos en fase estacionaria. Esto con el objeto de determinar la estructura de la cromatina tanto en células creciendo activamente, como en células que han dejado de dividirse. Por otro lado, también se aislaron núcleos de promastigotes de *L. mexicana* (en fase media y estacionaria) para poder comparar los resultados entre dos especies diferentes de *Leishmania*. Cabe aclarar que la similitud en la secuencia de DNA de las diferentes especies de *Leishmania* es en general alta, por lo que se esperaría que la mayoría de los fragmentos de *L. major* que fueron clonados hibriden con el DNA de *L. mexicana*. Para obtener las células en fase media logarítmica, los cultivos se

cosecharon cuando alcanzaron una densidad celular de $15-20 \times 10^6$ cél/ml (alrededor de 24 h). Para fase estacionaria, los cultivos se dejaron crecer aproximadamente 5 días, tiempo en el que la densidad celular ya no se incrementaba ($\sim 80 \times 10^6$ cél/ml). Así, los núcleos fueron aislados y digeridos con MNasa; posteriormente, la cromatina fue aislada y analizada mediante electroforesis (ver siguiente sección).

4.4 Obtención de la cromatina de *Leishmania*

Para estandarizar la técnica de digestión con MNasa de la cromatina contenida en los núcleos, se usó un gradiente de concentración de la enzima, que fue desde 0.0005 U/ml hasta 200 U/ml. Las digestiones se llevaron a cabo por un tiempo constante de 3 min, a 30°C, usando 25 μ l de núcleos ($\sim 3 \mu$ g de DNA).

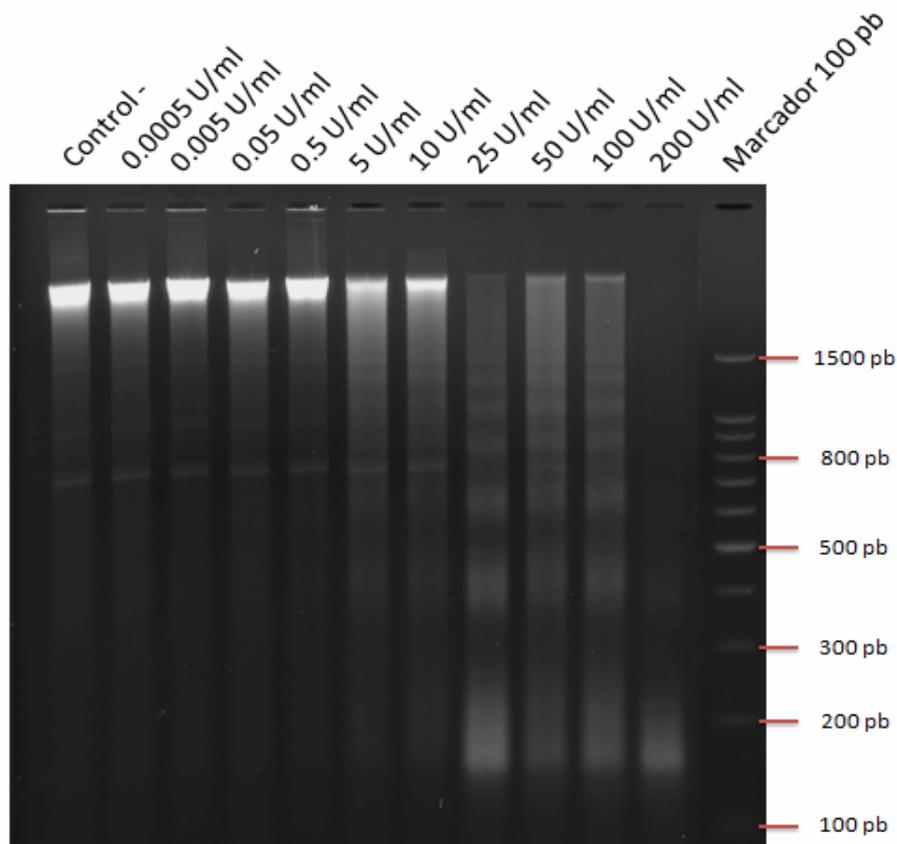


Figura 18. Electroforesis de las digestiones de núcleos de *L. major* en fase media logarítmica con distintas concentraciones de MNasa. Gel de agarosa al 2 %.

La figura 18 muestra el resultado obtenido con núcleos de *L. major* en fase media logarítmica. Al digerir la cromatina con 25 U/ml de la enzima (carril 8) se observó una escalera en la que la banda menor corresponde a un nucleosoma individual (alrededor de 190 pb) y las bandas mayores corresponden a multímeros nucleosomales (dímeros, trímeros, etc.). Al digerir con 200 U/ml se observan principalmente monómeros (carril 11). Con esto confirmamos que la cromatina de *L. major* se organiza en nucleosomas, y que éstos tienen un tamaño de alrededor de 190 pb.

Al digerir los núcleos de *L. major* en fase estacionaria bajo diversas condiciones, se obtenía siempre un barrido y una banda difusa que correspondía al monómero (Fig. 19, carril 2). Esto debido a la presencia de DNAsas nativas de *L. major* que tienden a sobre expresarse en células que han dejado de dividirse, como parte de una vía tipo apoptosis o muerte celular programada (Zangger *et al.*, 2002), y que producían la degradación de la cromatina durante su purificación. Para tratar de inhibir la acción de dichas DNAsas, los núcleos fueron tratados de diferentes maneras: agregando $ZnCl_2$ 15 mM (Fig. 19, carril 4), DTT 15 mM (Fig. 19, carril 6). La adición de DTT 15 mM inhibió las DNAsas nativas, observándose la escalera nucleosomal esperada (Fig. 19 carril 6).

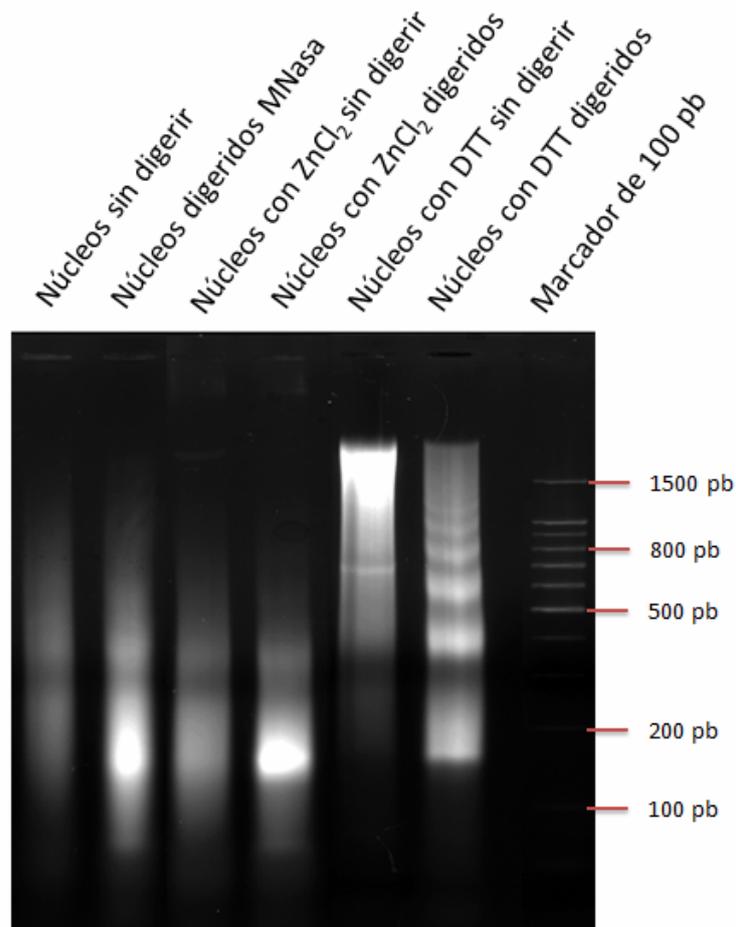


Figura 19. Electroforesis de las digestiones de núcleos de *L. major* en fase estacionaria con MNasa en presencia de distintos inhibidores de DNAsas: Zinc 15 mM y DTT 15 mM.

Experimentos similares se llevaron a cabo para estandarizar las condiciones de digestión con MNasa de los núcleos de *L. mexicana*. Para esta especie, las condiciones que resultaron más favorables para la obtención de la escalera nucleosomal fueron 3 min de digestión a 30°C con DTT 15 mM para fase media logarítmica; para la fase estacionaria se digirió por 12 mins. en presencia de DTT 15 mM. Al igual que para *L. major*, la concentración de MNasa fue de 25 U/ml (Fig. 20).

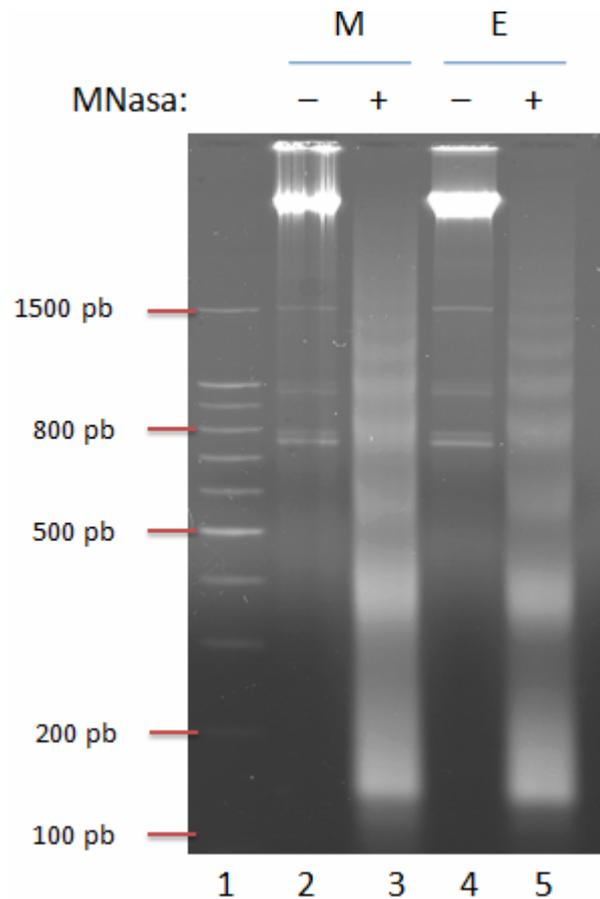


Figura 20. Electroforesis de las digestiones de núcleos de *L. mexicana* fase media logarítmica (M) y fase estacionaria (E). Marcador de peso molecular (escala de 100 pb, carril 1); Fase media logarítmica sin digerir (carril 2), Fase media logarítmica Digestión (carril 3), Fase estacionaria sin digerir (carril 4) y Fase estacionaria Digestión (carril 5).

De esta manera, se obtuvieron las condiciones experimentales para digerir con MNasa la cromatina de *L. major* y *L. mexicana* en fase media y en fase estacionaria. Cabe señalar que en algunos casos tuvo que ajustarse el tiempo de digestión para que se observara la escalera nucleosomal, ya que al paso del tiempo los cultivos de promastigotes de *Leishmania* tienden a cambiar su metabolismo, y su DNA puede volverse más sensible (o menos sensible) a la digestión con MNasa. Para verificar que la digestión se hubiera realizado correctamente, se corría una alícuota de la muestra en un gel de agarosa al 1.5%.

Para analizar la estructura de la cromatina en diferentes regiones de los genomas de *L. major* y *L. mexicana*, se procedió a realizar digestiones de la cromatina para obtener la escalera de nucleosomas. Las digestiones fueron

corridas en geles de agarosa (como ejemplo, ver Fig. 21), transferidas a membranas de nylon e hibridadas con fragmentos de DNA marcados radioactivamente. Para cada especie, cada membrana contenía cromatina digerida de células en fase media (carriles 3 y 8) y en fase estacionaria (carriles 5 y 10), así como cromatina sin digerir (carriles 2, 4, 7 y 9).

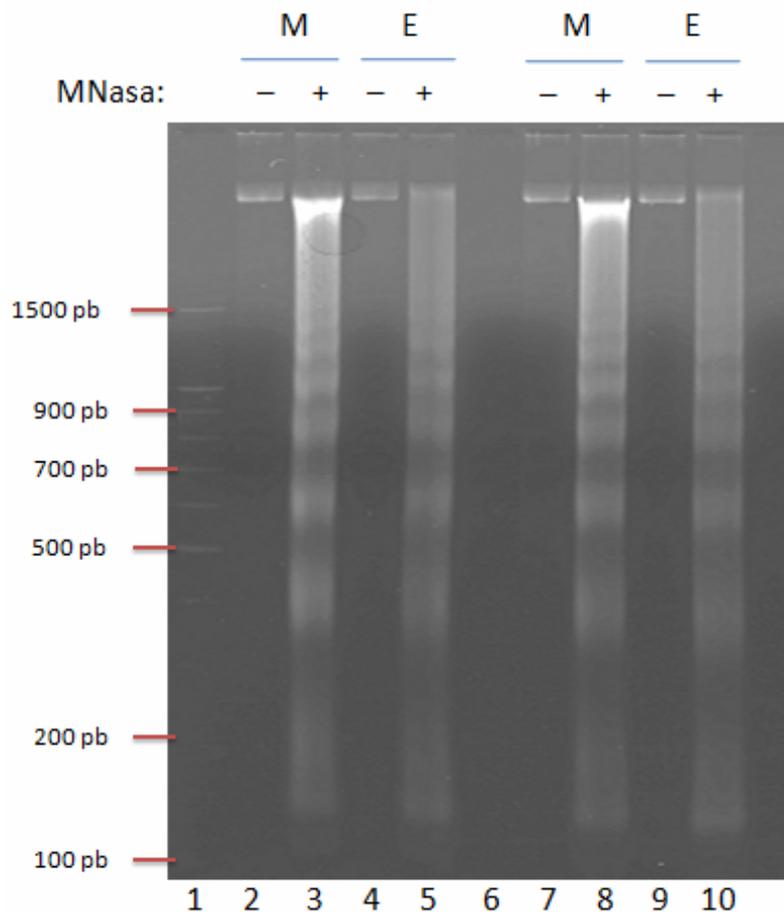


Figura 21. Electroforesis de las digestiones de núcleos de *Leishmania* en fase media logarítmica (M) y en fase estacionaria (E) con MNasa. Marcador de peso molecular (escalera de 100 pb, carril 1); LmjF media logarítmica sin digerir (carril 2), LmjF media logarítmica Digestión (carril 3), LmjF estacionaria sin digerir (carril 4), LmjF estacionaria Digestión (carril 5), LmxB media logarítmica sin digerir (carril 7), LmxB media logarítmica Digestión (carril 8), LmxB estacionaria sin digerir (carril 9) y LmxB estacionaria Digestión (carril 10). Gel de agarosa al 1.5%

4.5 Estructura nucleosomal del locus chr11-II

El primero de los loci transcritos por Pol III que se analizó fue el del rRNA 5S. Al hibridar la membrana de *L. major* con el fragmento que contiene el gen del rRNA 5S se apreció un barrido a todo lo largo del carril, tanto en fase

media logarítmica como en fase estacionaria (Fig. 22 A). Dentro del barrido se aprecian bandas muy tenues que parecen corresponder con algunos nucleosomas. Este patrón de hibridación es característico de regiones transcritas activamente, en donde los nucleosomas se unen débilmente al DNA. Este tipo de hibridación también indica que el nucleosoma no se une a una posición fija del DNA, sino que se una en varias regiones del mismo. Un resultado similar se presentó en *L. mexicana* (Fig. 22 B).

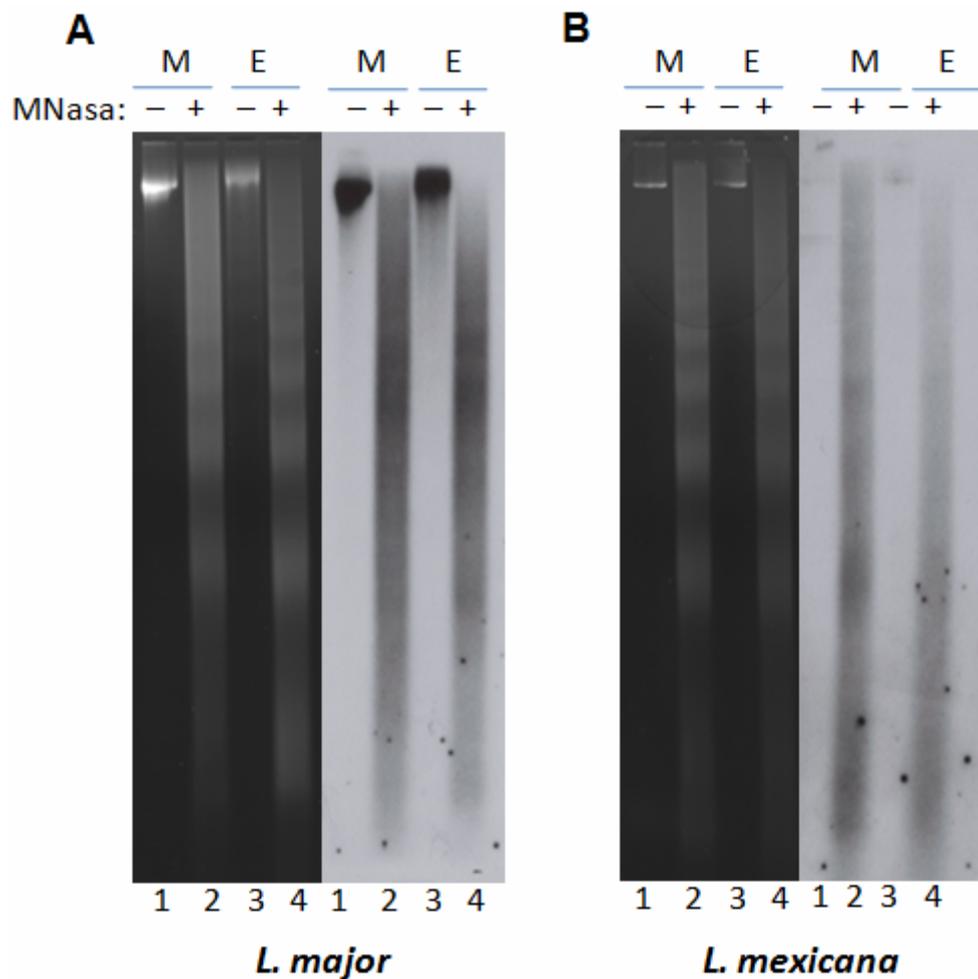


Figura 22. Estructura de la cromatina en el gen del rRNA 5S del locus ch11-II en *L. major* (panel A) y *L. mexicana* (panel B). En la parte izquierda de cada panel se muestra el gel de agarosa al 1.5 % teñido con bromuro de etidio, mientras que en la parte derecha se presenta la autorradiografía obtenida después de hibridar con el rRNA 5S. Se analizó cromatina de células en fase media de crecimiento (M) (carriles 1 y 2) y en fase estacionaria (E) (carriles 3 y 4). Cromatina sin digerir se presenta en los carriles 1 y 3.

El tRNA de arginina que se localiza río arriba del rRNA 5S mostró una señal de hibridación muy similar a la del rRNA 5S, observándose un barrido a todo lo largo de los carriles (Fig. 23). Esto indica que este gen de tRNA

tampoco se empaqueta en nucleosomas. Resultados similares se observaron en células en fases media y estacionaria, en las dos especies de *Leishmania*.

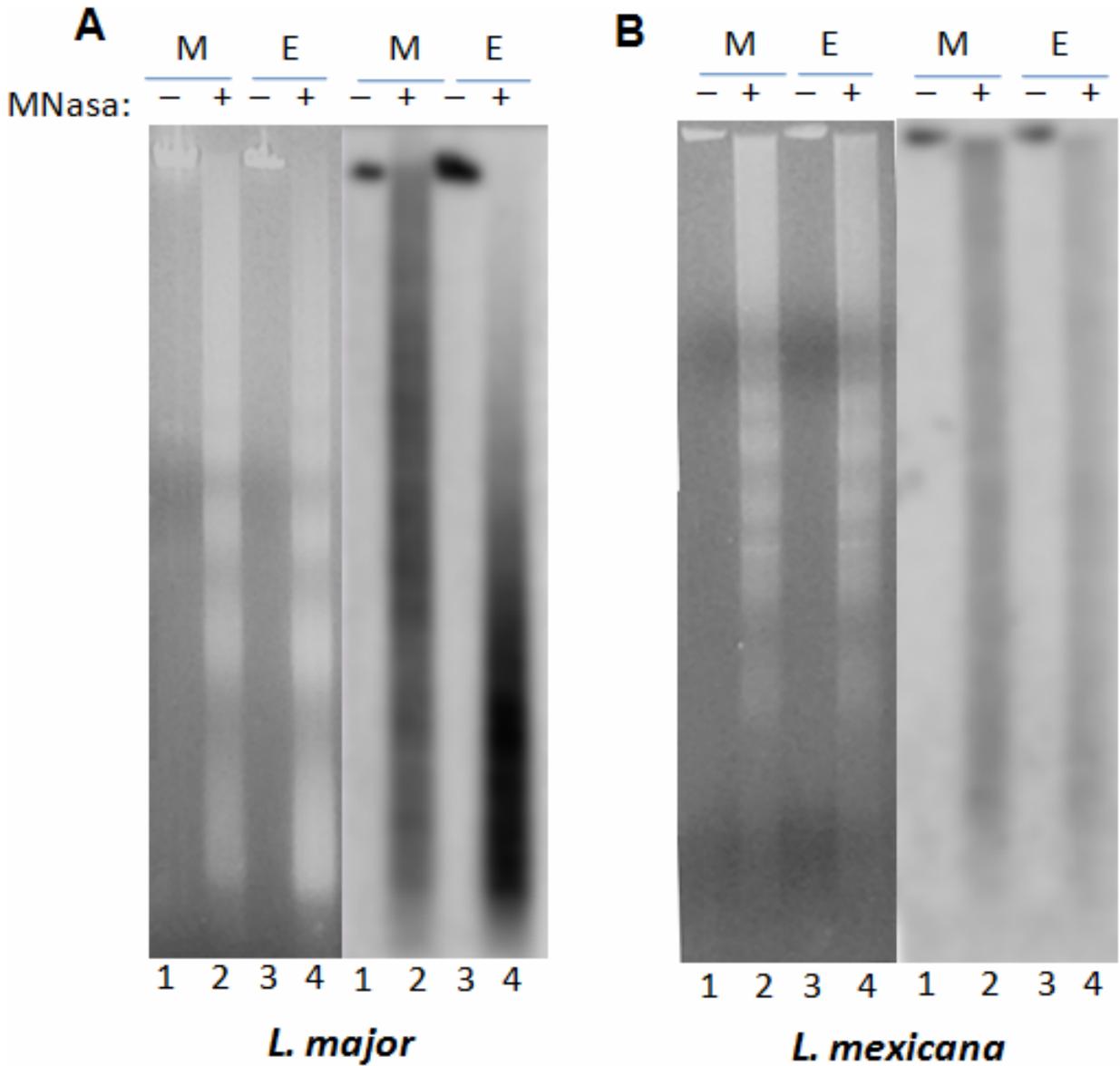


Figura 23. Análisis nucleosomal del gen de tRNA-Arg del locus ch11-II en *L. major* (panel A) y *L. mexicana* (panel B). En la parte izquierda de cada panel se muestra el gel de agarosa al 1.5 % teñido con bromuro de etidio, mientras que en la parte derecha se presenta la autorradiografía obtenida después de hibridar con el gen tRNA-Arg. Se analizó cromatina de células en fase media de crecimiento (M) (carriles 1 y 2) y en fase estacionaria (E) (carriles 3 y 4). Cromatina sin digerir se presenta en los carriles 1 y 3.

El gen 11.0930 se localiza río abajo del gen del rRNA 5S, y codifica para una proteína hipotética, por lo que es transcrito por Pol II. El análisis de cromatina de esta región del genoma reveló una escalera nucleosomal muy bien definida tanto en *L. major* como en *L. mexicana* (Fig. 24). Esto significa

que este gen se encuentra formando nucleosomas compactos. Las bandas nucleosomales parecen ser más definidas en células en fase estacionaria que en fase media.

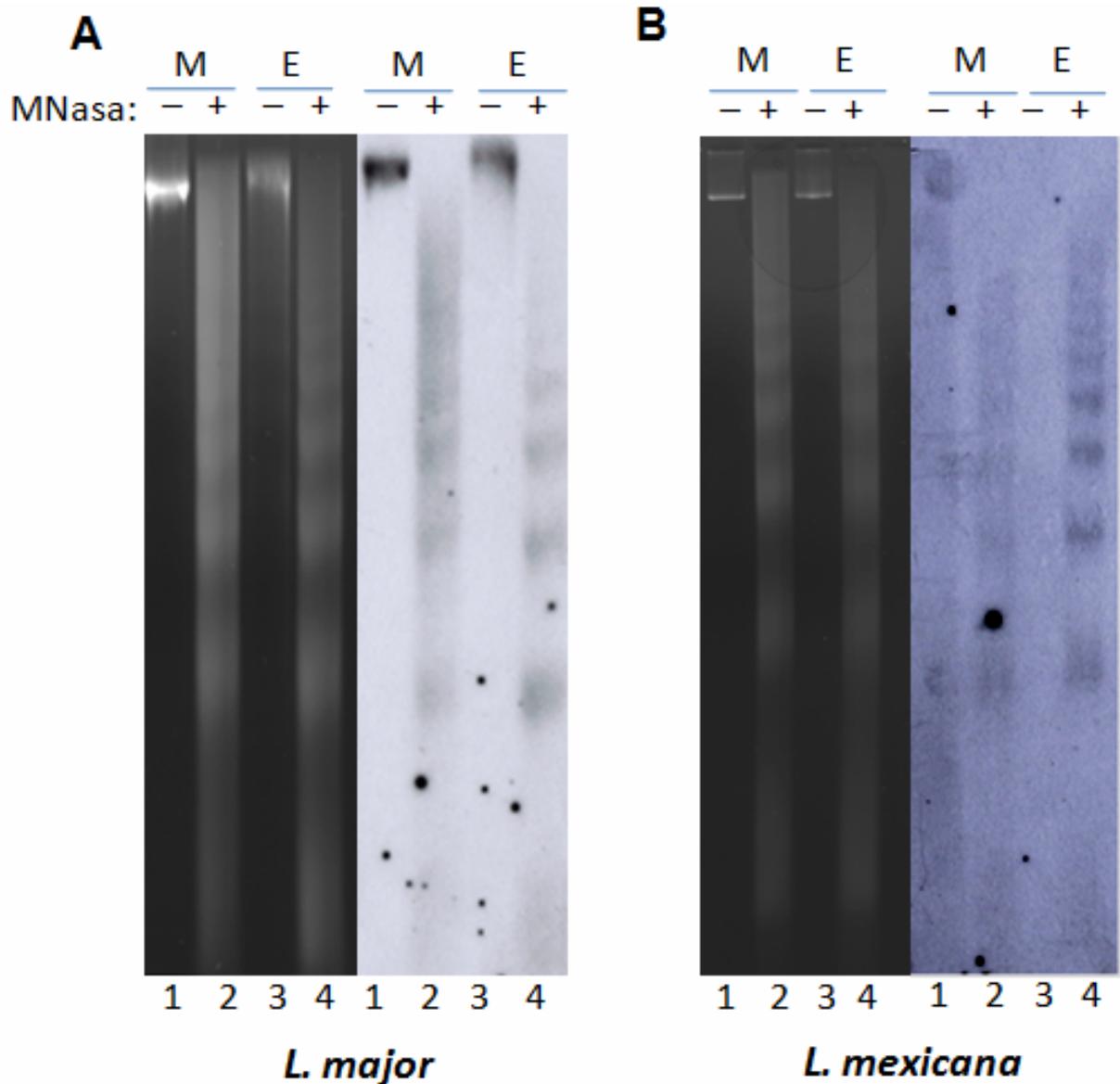


Figura 24. Análisis de la cromatina del fragmento 11.0930 del locus ch11-II en *L. major* (panel A) y *L. mexicana* (panel B). En la parte izquierda de cada panel se muestra el gel de agarosa al 1.5 % teñido con bromuro de etidio, mientras que en la parte derecha se presenta la autorradiografía obtenida después de hibridar con el fragmento 11.0930. Se analizó cromatina de células en fase media de crecimiento (M) (carriles 1 y 2) y en fase estacionaria (E) (carriles 3 y 4). Cromatina sin digerir se presenta en los carriles 1 y 3.

También se analizó la región intergénica entre el gen de rRNA 5S y el gen 11.0930 (fragmento 11-inter) en *L. major*. El fragmento mostró una escalera nucleosomal aún mejor definida que la obtenida con el gen 11.0930

(Fig. 25), lo que indica que esta región intergénica forma nucleosomas muy compactos, tanto en fase media logarítmica como en estacionaria.

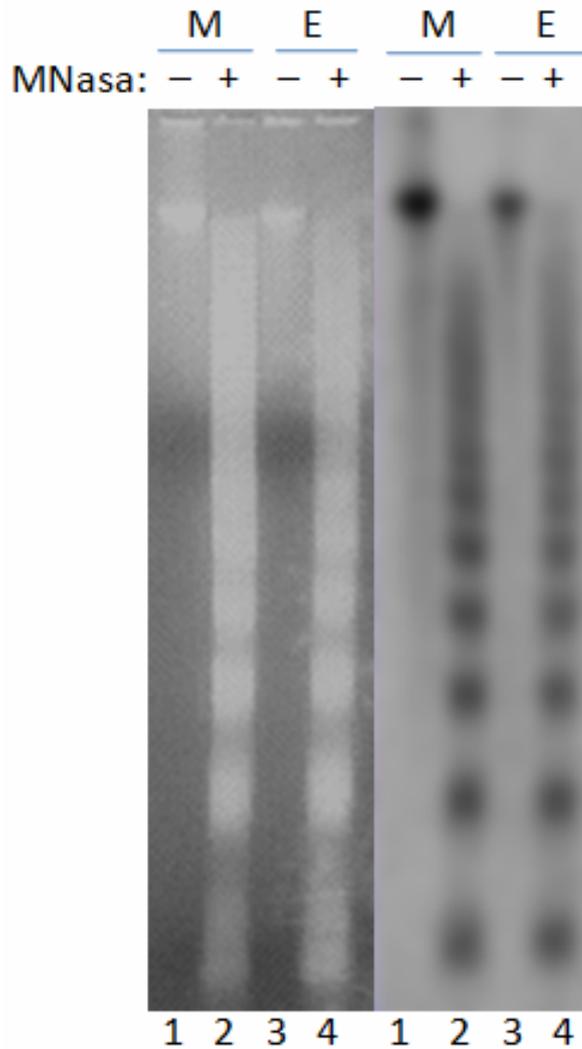


Figura 25. Estructura de la cromatina en el fragmento 11-Inter del locus ch11-II en *L. major*. En la parte izquierda se muestra el gel de agarosa al 1.5 % teñido con bromuro de etidio, mientras que en la parte derecha se presenta la autorradiografía obtenida después de hibridar con el fragmento 11-Inter. Se analizó cromatina de células en fase media de crecimiento (M) (carriles 1 y 2) y en fase estacionaria (E) (carriles 3 y 4). Cromatina sin digerir se presenta en los carriles 1 y 3.

4.6 Análisis nucleosomal del locus chr03

La siguiente región del genoma que se analizó fue el locus chr03, que contiene un gen de tRNA-Lys (transcrito por Pol III), el cual se localiza entre dos unidades policistrónicas convergentes (transcritas por Pol II) (Fig. 10). Se observó un barrido en ambas especies de *Leishmania* y en ambas condiciones

de crecimiento (Fig. 26 A y B). Este resultado nos indica que la región del tRNA-Lys no está formando nucleosomas, y que su transcripción muy probablemente sea constitutiva.

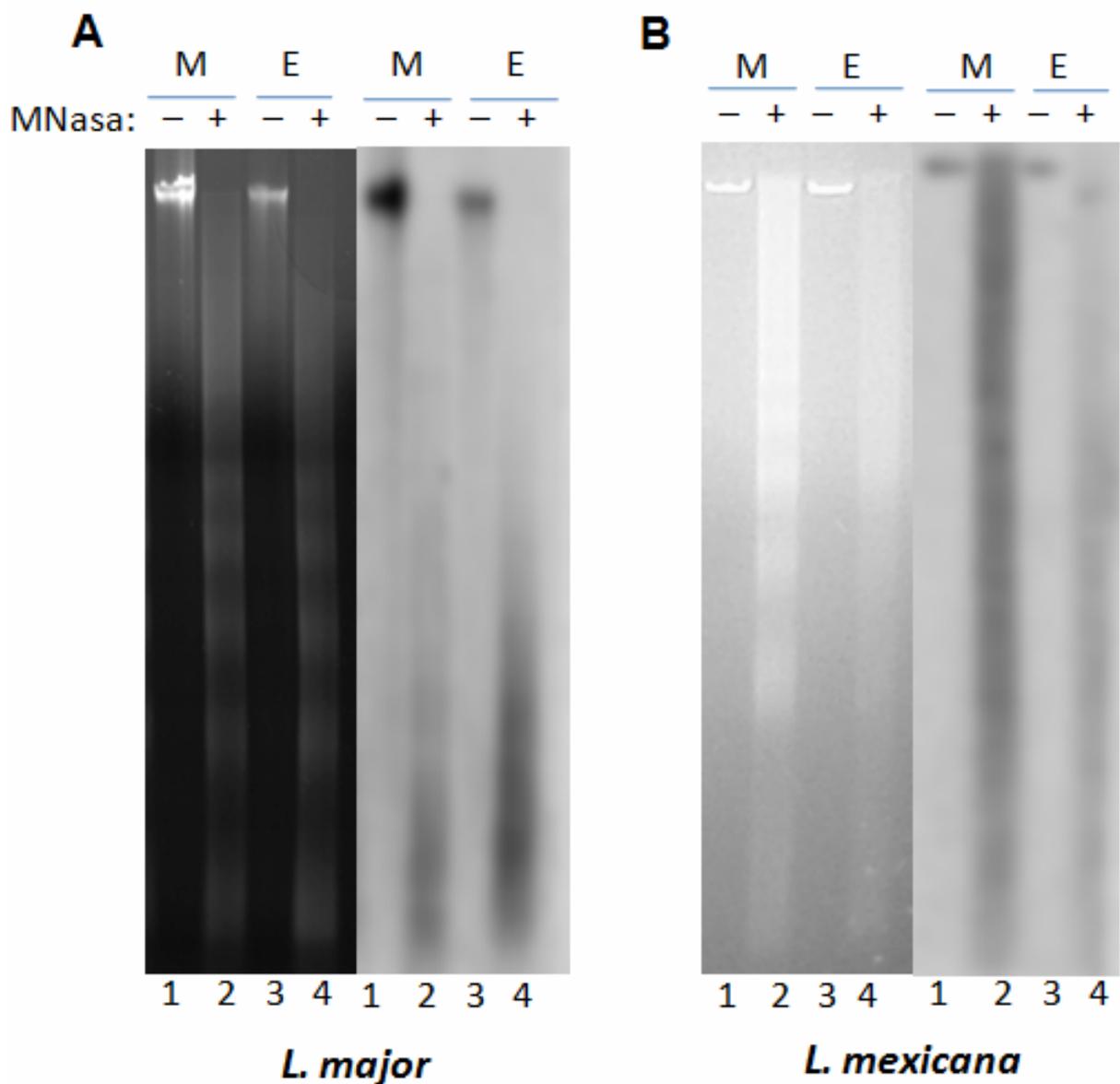


Figura 26. Patrón nucleosomal del gen de Crom3-tRNA del locus chr03 en *L. major* (panel A) y *L. mexicana* (panel B). En la parte izquierda de cada panel se muestra el gel de agarosa al 1.5 % teñido con bromuro de etidio, mientras que en la parte derecha se presenta la autorradiografía obtenida después de hibridar con el gen Crom3-tRNA. Se analizó cromatina de células en fase media de crecimiento (M) (carriles 1 y 2) y en fase estacionaria (E) (carriles 3 y 4). Cromatina sin digerir se presenta en los carriles 1 y 3.

El fragmento Crom3-D contiene secuencias de la región intergénica localizada río arriba del tRNA-Lys (Fig. 10). Dicha región mostró en *L. major* un barrido del que sobresalen bandas cuyo tamaño no corresponde en la mayoría

de los casos a los multímeros nucleosomales, lo que significa que probablemente haya reacomodos nucleosomales (Fig. 27).

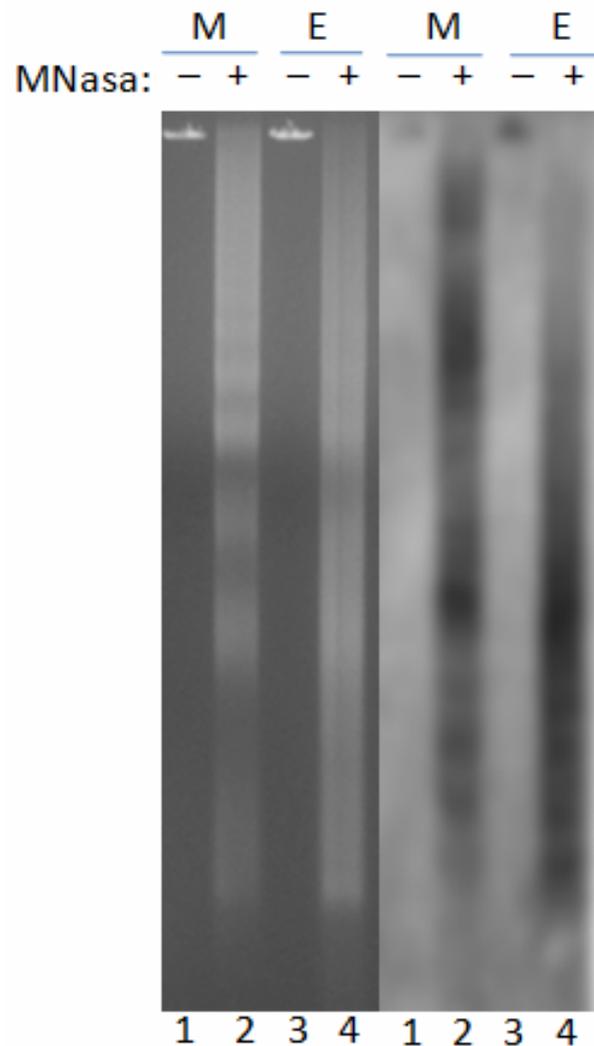


Figura 27. Estructura nucleosomal del fragmento Crom3-D del locus chr03 en *L. major*. En la parte izquierda se muestra el gel de agarosa al 1.5 % teñido con bromuro de etidio, mientras que en la parte derecha se presenta la autorradiografía obtenida después de hibridar con el fragmento Crom3-D. Se analizó cromatina de células en fase media de crecimiento (M) (carriles 1 y 2) y en fase estacionaria (E) (carriles 3 y 4). Cromatina sin digerir se presenta en los carriles 1 y 3.

Asimismo, el análisis en *L. major* de la región Crom3-E bis, que constituye la región intergénica localizada río abajo del tRNA-Lys mostró un barrido, principalmente de alto peso molecular, del que sobresalen algunas bandas que coinciden en algunos casos con las bandas nucleosomales (Fig. 28).

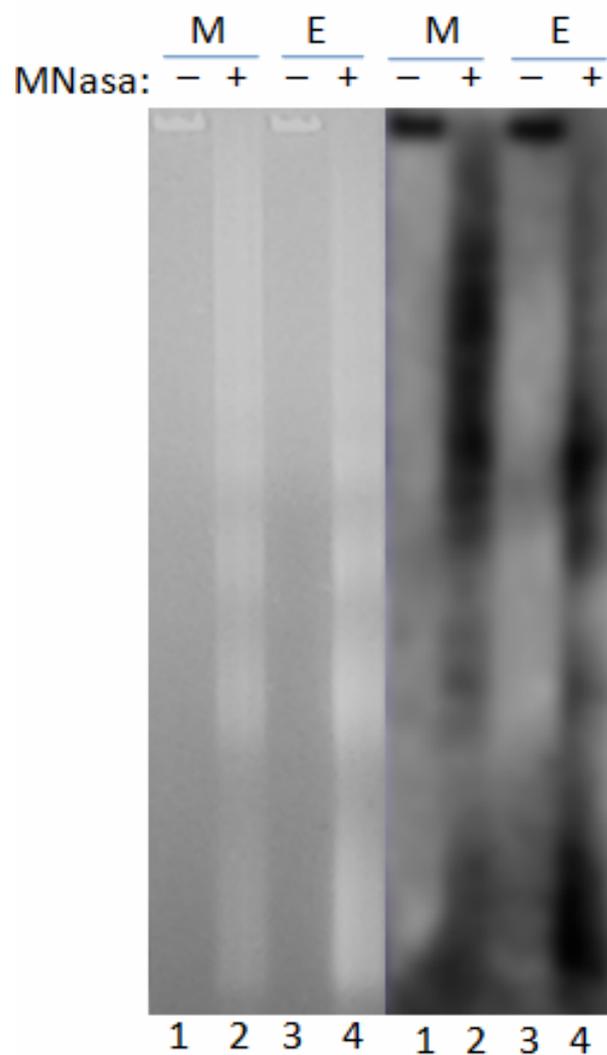


Figura 28. Estructura de la cromatina del fragmento Crom3-E bis del locus chr03 en *L. major*. En la parte izquierda de cada panel se muestra el gel de agarosa al 1.5 % teñido con bromuro de etidio, mientras que en la parte derecha se presenta la autorradiografía obtenida después de hibridar con el fragmento Crom3-E bis. Se analizó cromatina de células en fase media de crecimiento (M) (carriles 1 y 2) y en fase estacionaria (E) (carriles 3 y 4). Cromatina sin digerir se presenta en los carriles 1 y 3.

El análisis de la proteína hipotética que se ubica río arriba del tRNA-Lys (fragmento crom3-68) indicó que dicha región está organizada en nucleosomas en ambas especies de *Leishmania*, tanto en fase media logarítmica como en fase estacionaria. Cabe destacar que entre el monómero y el dímero de *L. major* se observan 3 bandas adicionales, las cuales posiblemente correspondan a algún reacomodo del nucleosoma (Fig. 29).

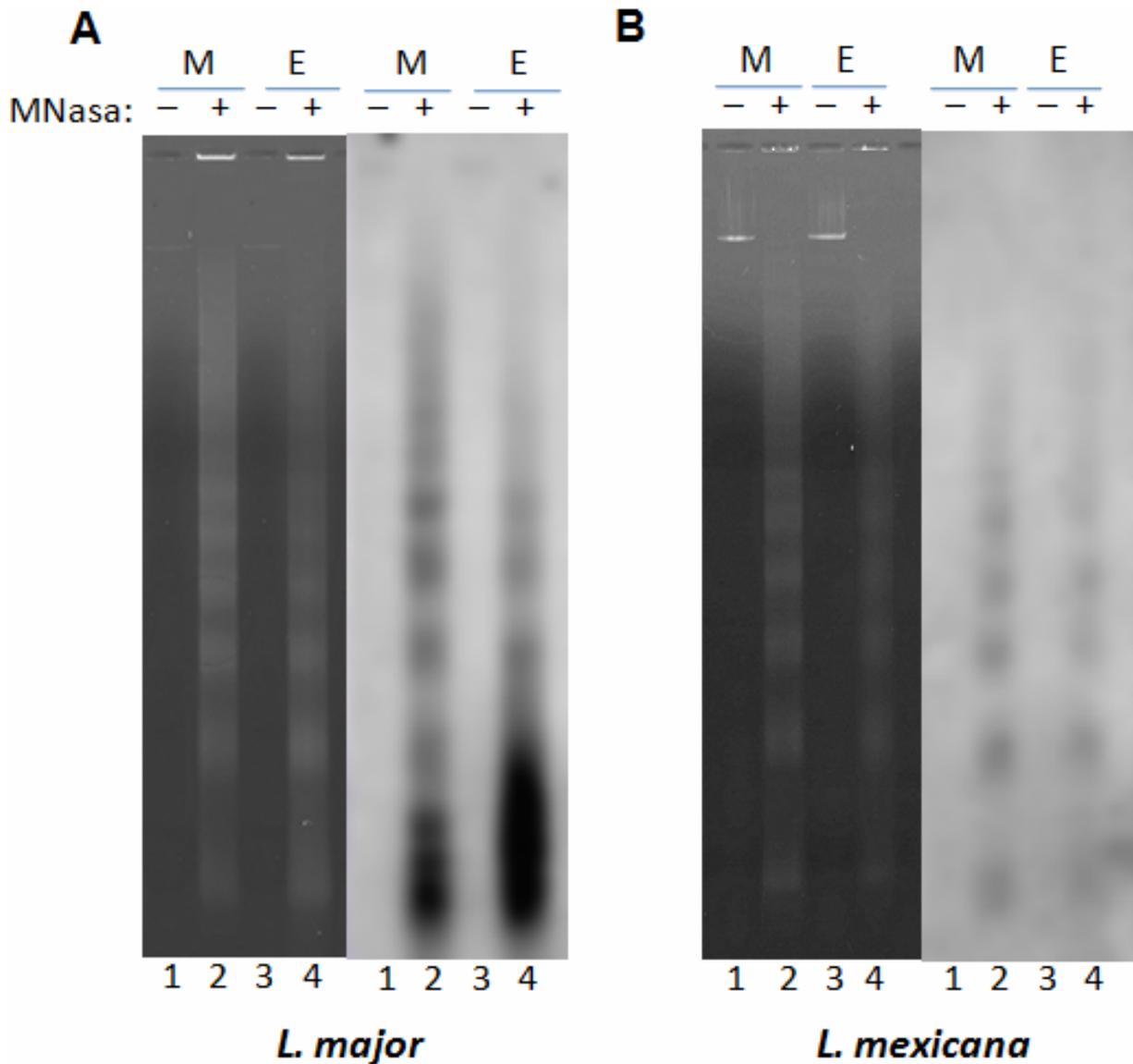


Figura 29. Análisis nucleosomal del fragmento Crom3-68 del locus chr03 en *L. major* (panel A) y *L. mexicana* (panel B). En la parte izquierda de cada panel se muestra el gel de agarosa al 1.5 % teñido con bromuro de etidio, mientras que en la parte derecha se presenta la autorradiografía obtenida después de hibridar con el fragmento Crom3-68. Se analizó cromatina de células en fase media de crecimiento (M) (carriles 1 y 2) y en fase estacionaria (E) (carriles 3 y 4). Cromatina sin digerir se presenta en los carriles 1 y 3.

4.7 Patrón nucleosomal del locus chr31-I

Otro de los loci transcritos por Pol III que se analizó fue el chr31-I, el cual contiene el gen del snRNA U2. Al analizar la cromatina de dicho gen se obtuvo en *L. major* un barrido del que sobresalen algunas bandas nucleosomales (Fig. 30). Un patrón muy similar se obtuvo en fase media logarítmica y en fase

estacionaria. Este tipo de hibridación es característico de regiones que se transcriben activamente, ya que carecen de nucleosomas (Hitchcock *et al*, 2007).

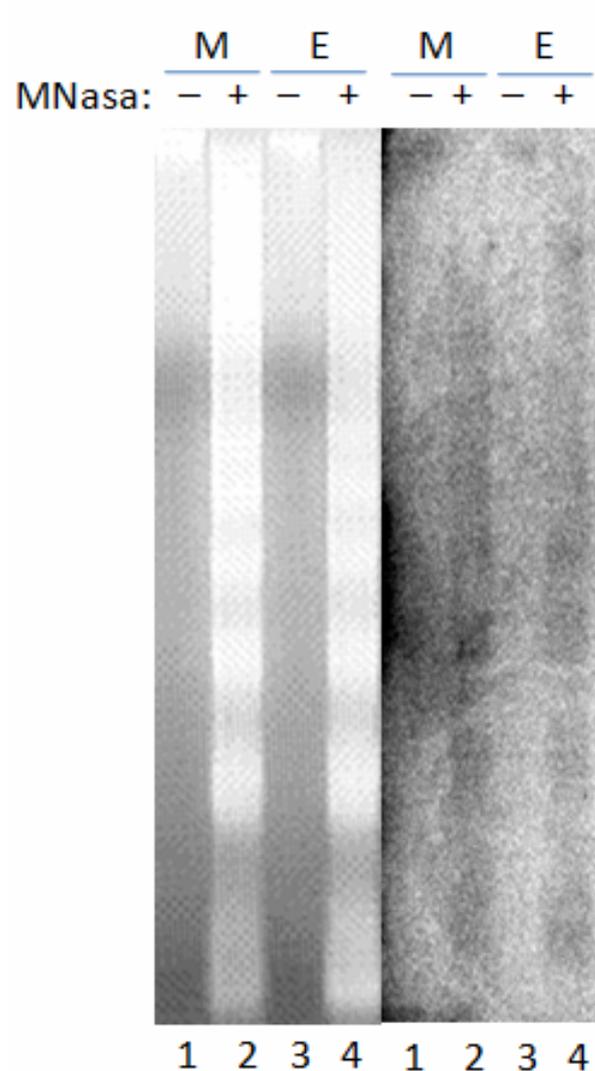


Figura 30. Estructura de la cromatina del gen del snRNA U2 del locus ch31-I en *L. major*. En la parte izquierda de cada panel se muestra el gel de agarosa al 1.5 % teñido con bromuro de etidio, mientras que en la parte derecha se presenta la autorradiografía obtenida después de hibridar con el gen U2. Se analizó cromatina de células en fase media de crecimiento (M) (carriles 1 y 2) y en fase estacionaria (E) (carriles 3 y 4). Cromatina sin digerir se presenta en los carriles 1 y 3.

El fragmento Inter U2, que contiene parte de la región intergénica localizada río abajo del gen snRNA U2 (Fig. 10), mostró en *L. major*, en ambas condiciones de crecimiento (fase media logarítmica y fase estacionaria), que está formando nucleosomas (Fig. 31).

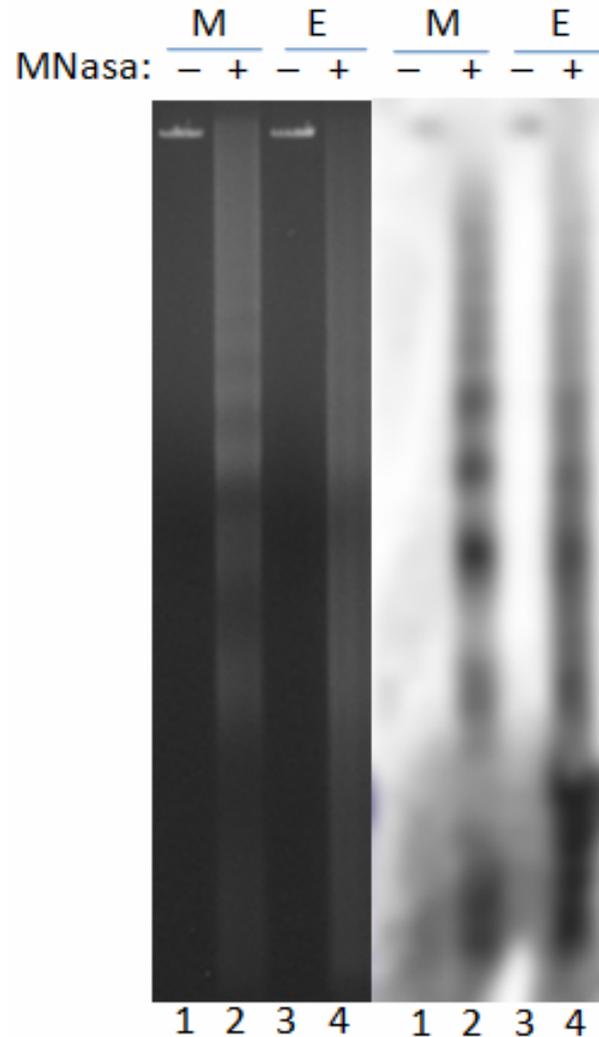


Figura 31. Análisis de la cromatina del fragmento Inter U2 del locus ch31-I en *L. major*. En la parte izquierda se muestra el gel de agarosa al 1.5 % teñido con bromuro de etidio, mientras que en la parte derecha se presenta la autorradiografía obtenida después de hibridar con el fragmento Inter U2. Se analizó cromatina de células en fase media de crecimiento (M) (carriles 1 y 2) y en fase estacionaria (E) (carriles 3 y 4). Cromatina sin digerir se presenta en los carriles 1 y 3.

La región t-like U2 se localiza río arriba del gen snRNA U2 y contiene un tRNA-like. El análisis de este fragmento en *L. major* mostró un barrido con algunas bandas que sobresalen (Fig. 32). Varias de estas bandas se localizan entre los nucleosomas, lo que podría indicar reacomodos nucleosomales.

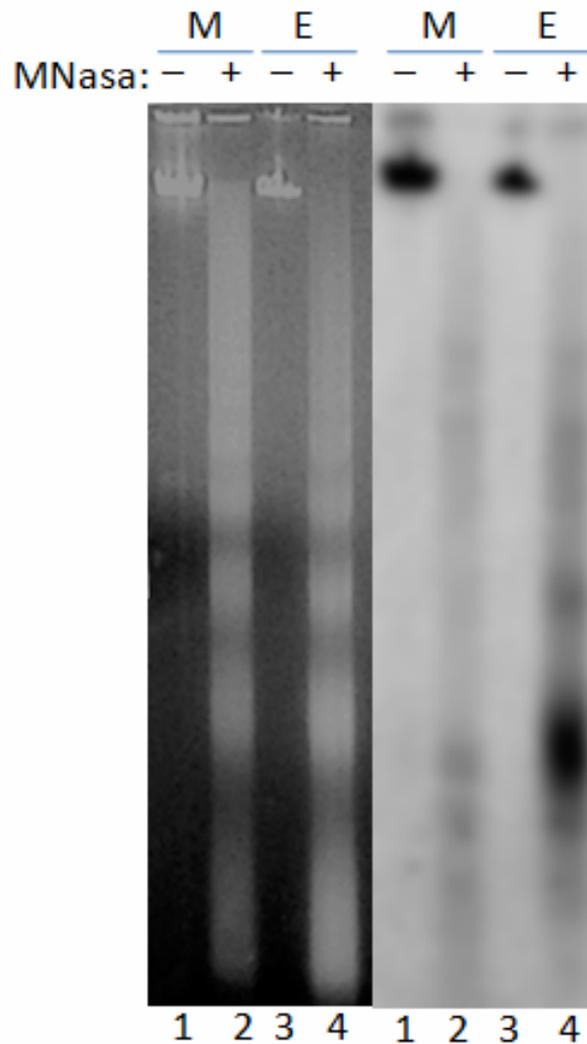


Figura 32. Patrón nucleosomal del fragmento t-like U2 del locus ch31-I en *L. major*. En la parte izquierda se muestra el gel de agarosa al 1.5 % teñido con bromuro de etidio, mientras que en la parte derecha se presenta la autorradiografía obtenida después de hibridar con el fragmento t-like U2. Se analizó cromatina de células en fase media de crecimiento (M) (carriles 1 y 2) y en fase estacionaria (E) (carriles 3 y 4). Cromatina sin digerir se presenta en los carriles 1 y 3.

También se analizó el gen de tRNA de alanina (tRNA-Ala) localizado río arriba de tRNA-like. Al igual que los otros tRNAs estudiados, el tRNA-Ala mostró la carencia de organización nucleosomal en ambos estadios de crecimiento, tanto en *L. major* y *L. mexicana* (Fig. 33). Esto indica que los tRNAs se transcriben permanentemente en *Leishmania*.

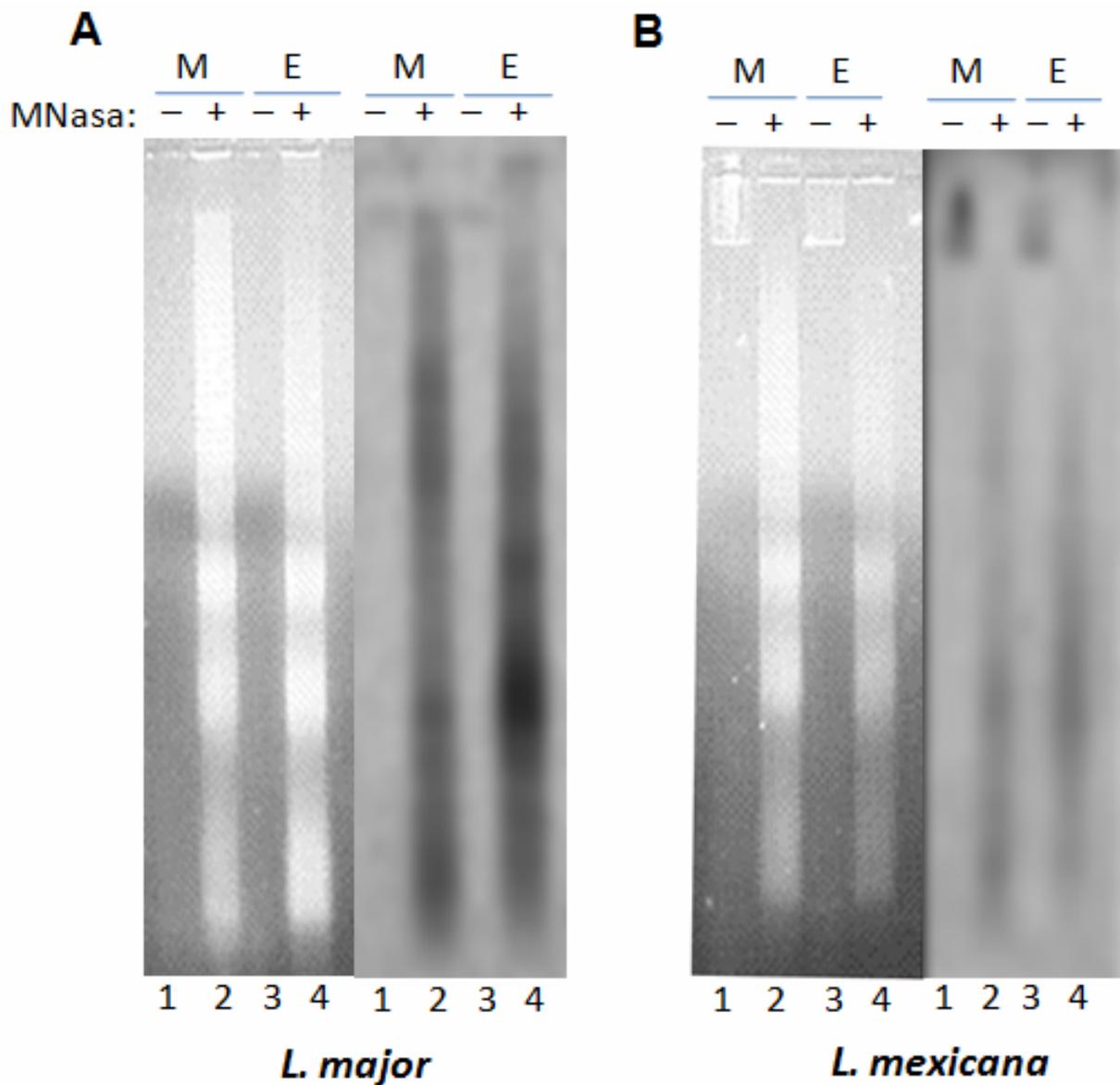


Figura 33. Estructura nucleosomal del gen de tRNA-Ala del locus ch31-I en *L. major* (panel A) y *L. mexicana* (panel B). En la parte izquierda de cada panel se muestra el gel de agarosa al 1.5 % teñido con bromuro de etidio, mientras que en la parte derecha se presenta la autorradiografía obtenida después de hibridar con el gen tRNA-Ala. Se analizó cromatina de células en fase media de crecimiento (M) (carriles 1 y 2) y en fase estacionaria (E) (carriles 3 y 4). Cromatina sin digerir se presenta en los carriles 1 y 3.

El último fragmento del locus chr31-I que se analizó fue aATP11, que contiene parte del gen de una proteína hipotética (transcrito por Pol II) mapeada río abajo del gen del snRNA U2. Se encontró que este fragmento se encuentra organizado en nucleosomas en *L. major*, en ambas condiciones de crecimiento (Fig. 34).

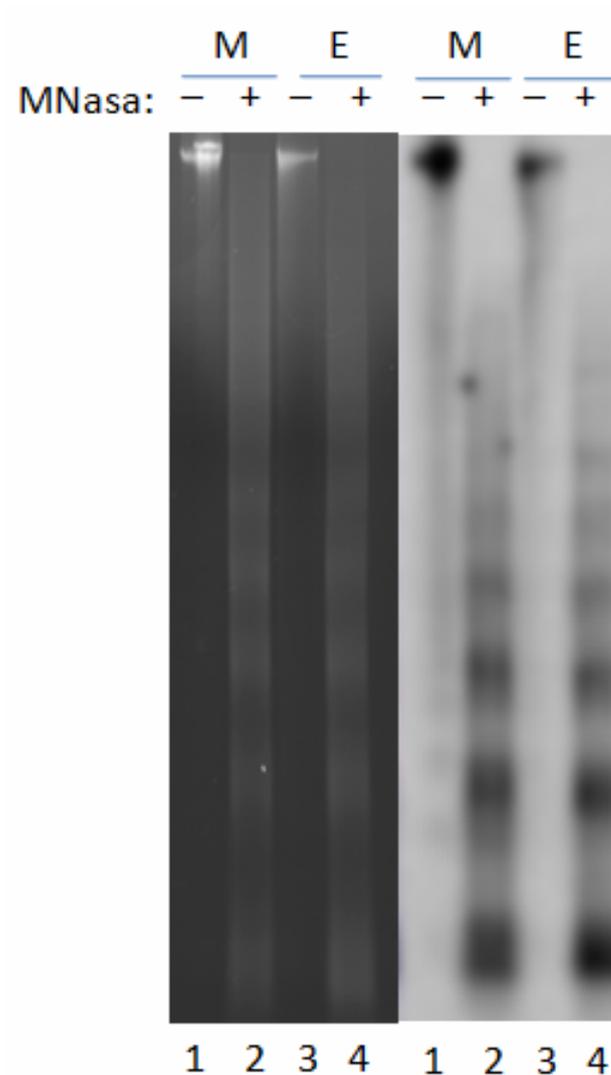


Figura 34. Estructura de la cromatina del gen de aATP11 del locus ch31-I en *L. major*. En la parte izquierda de cada panel se muestra el gel de agarosa al 1.5 % teñido con bromuro de etidio, mientras que en la parte derecha se presenta la autorradiografía obtenida después de hibridar con el gen aATP11. Se analizó cromatina de células en fase media de crecimiento (M) (carriles 1 y 2) y en fase estacionaria (E) (carriles 3 y 4). Cromatina sin digerir se presenta en los carriles 1 y 3.

4.8 Estructura de la cromatina del cistrón de rRNA

Los genes presentes en el cistrón del rRNA son transcritos por Pol I. En los tripanosomátidos, el cistrón ribosomal está formado por 8 genes de rRNA diferentes. El primero de los genes del cistrón es el del rRNA 18S, localizado a 1043 pb río abajo del sitio de inicio de la transcripción en *L. major* (Padilla-

Mejía *et al.*, 2009). El último de los genes es el del rRNA S4 (Fig. 10). El análisis de la estructura nucleosomal del rRNA 18S indicó que esta región está formando en un mayoría nucleosomas en *L. major*, tanto en fase media logarítmica como en fase estacionaria (Fig. 35).

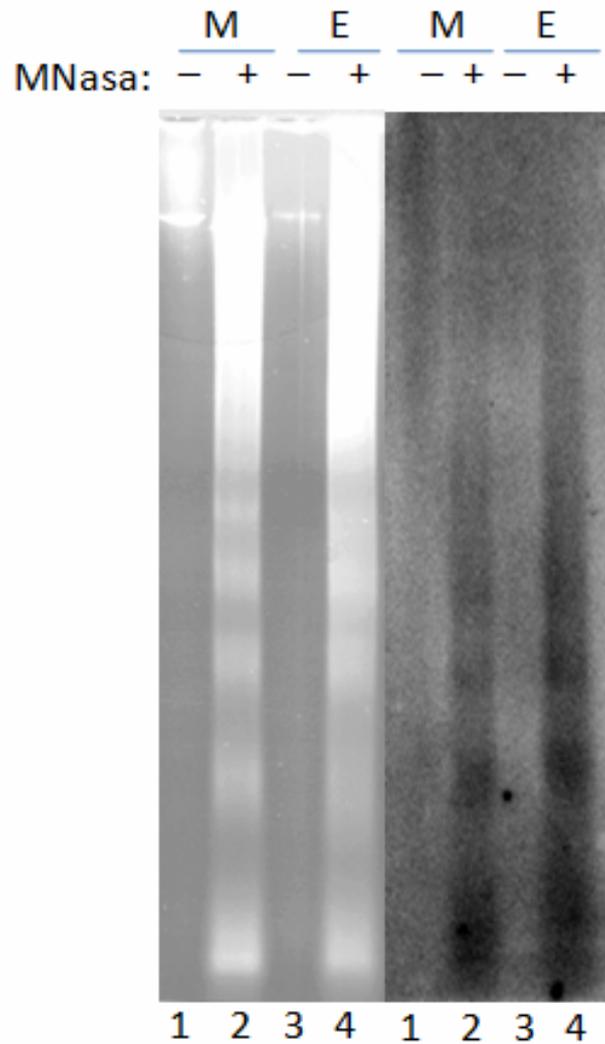


Figura 35. Análisis nucleosomal del gen del rRNA 18S en *L. major*. En la parte izquierda se muestra el gel de agarosa al 1.5 % teñido con bromuro de etidio, mientras que en la parte derecha se presenta la autorradiografía obtenida después de hibridar con el gen 18S. Se analizó cromatina de células en fase media de crecimiento (M) (carriles 1 y 2) y en fase estacionaria (E) (carriles 3 y 4). Cromatina sin digerir se presenta en los carriles 1 y 3.

Otra fragmento que se analizó dentro del mismo locus fue el rRNA A, que contiene la región promotora del cistrón ribosomal. Como se esperaba, con este fragmento se obtuvo un barrido tenue en *L. major*, característico de

regiones promotoras (Fig. 36 A). Resultados similares se observaron en *L. mexicana* (Fig. 36 B).

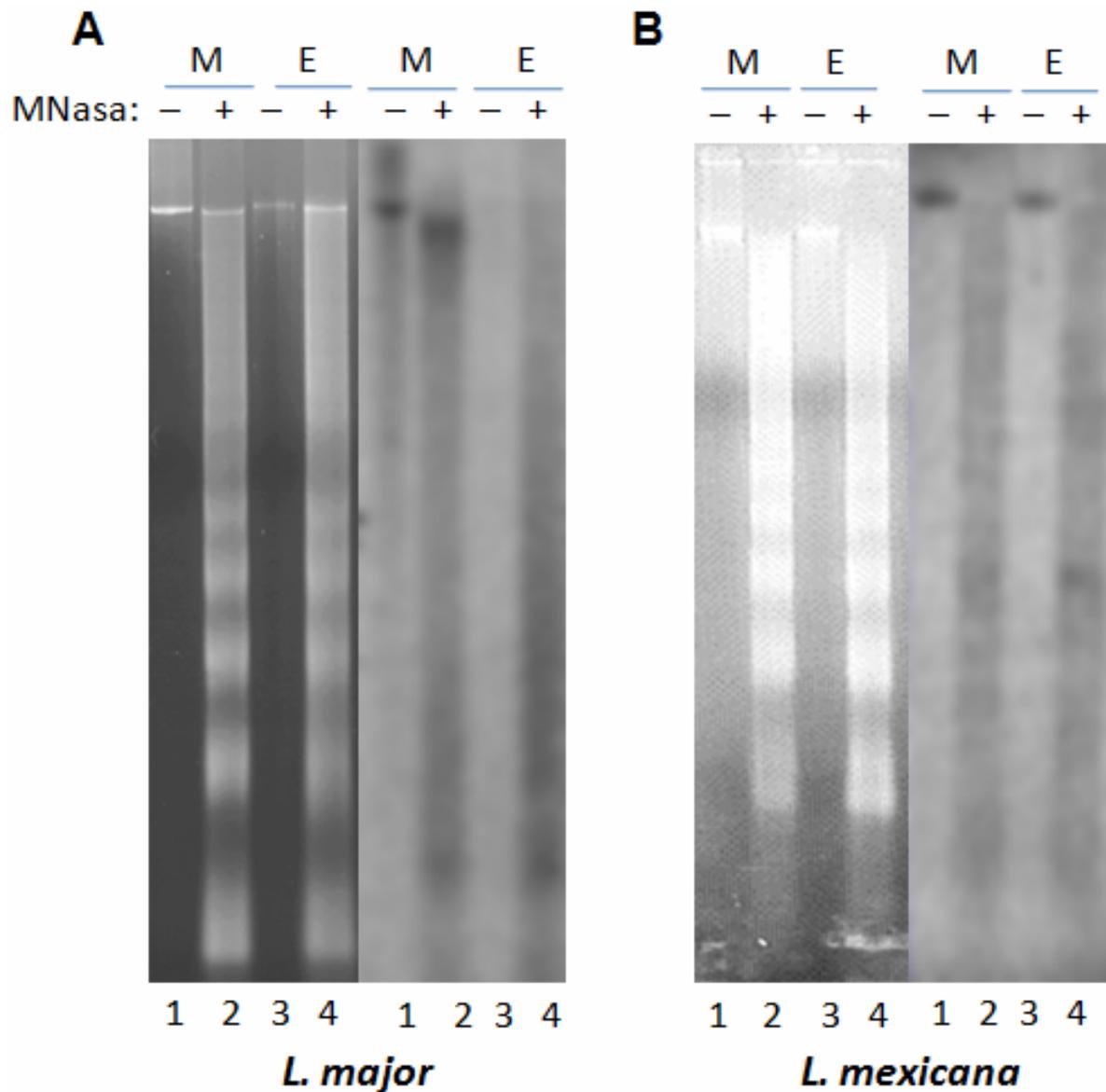


Figura 36. Análisis de la cromatina del fragmento rRNA A del cistrón del rRNA en *L. major* (panel A) y *L. mexicana* (panel B). En la parte izquierda de cada panel se muestra el gel de agarosa al 1.5 % teñido con bromuro de etidio, mientras que en la parte derecha se presenta la autorradiografía obtenida después de hibridar con el fragmento rRNA A. Se analizó cromatina de células en fase media de crecimiento (M) (carriles 1 y 2) y en fase estacionaria (E) (carriles 3 y 4). Cromatina sin digerir se presenta en los carriles 1 y 3.

El fragmento rRNA B, el cual se localiza río abajo del sitio de inicio de la transcripción (Fig. 10), presentó un barrido en fase media logarítmica, así como en fase estacionaria (Fig. 37); esto indica que en la región no se están formando nucleosomas. Sin embargo, sobre el barrido se aprecian bandas,

algunas de las cuales coinciden con los nucleosomas (Fig. 37 A). Resultados similares se obtuvieron en *L. mexicana* (Fig. 37 B).

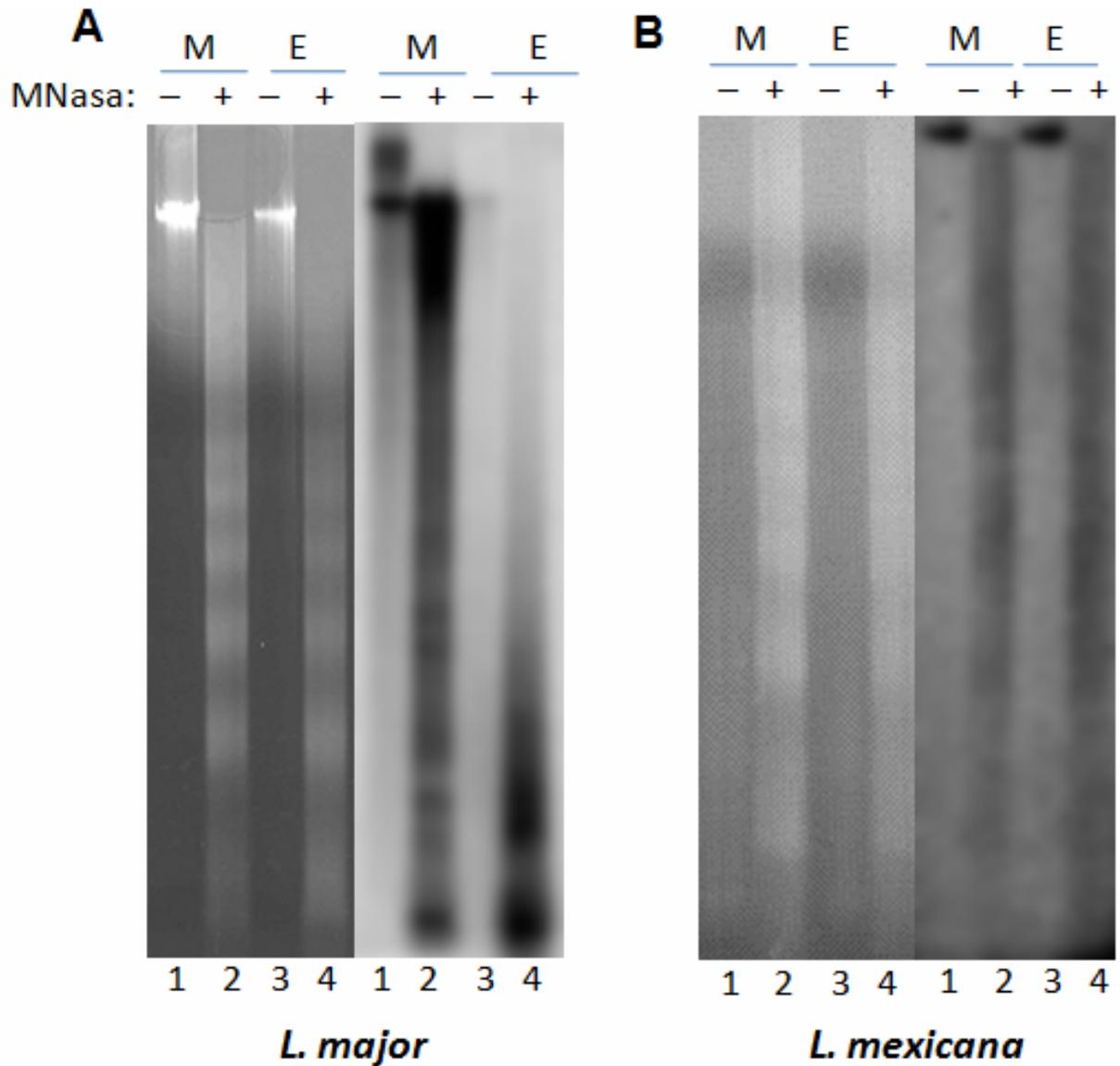


Figura 37. Estructura de la cromatina del fragmento rRNA B del cistron del rRNA en *L. major* (panel A) y *L. mexicana* (panel B). En la parte izquierda de cada panel se muestra el gel de agarosa al 1.5 % teñido con bromuro de etidio, mientras que en la parte derecha se presenta la autorradiografía obtenida después de hibridar con el fragmento rRNA B. Se analizó cromatina de células en fase media de crecimiento (M) (carriles 1 y 2) y en fase estacionaria (E) (carriles 3 y 4). Cromatina sin digerir se presenta en los carriles 1 y 3.

El último fragmento analizado en este locus fue rRNA C, localizado en el extremo 3' del cistron ribosomal, en la región donde termina la transcripción (Fig. 10). Como se aprecia en la Figura 38, rRNA C mostró un arreglo nucleosomal compacto tanto en fase media logarítmica como en fase estacionaria en *L. major*, lo que sugiere que esta región no se transcribe.

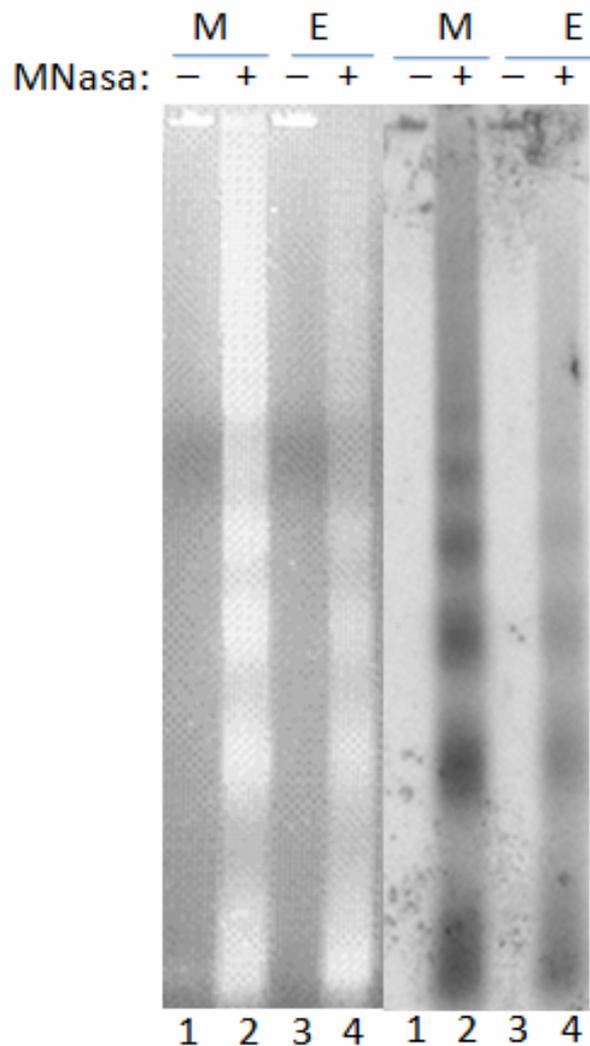


Figura 38. Patrón nucleosomal del fragmento rRNA C del cistrón del rRNA en *L. major*. En la parte izquierda se muestra el gel de agarosa al 1.5 % teñido con bromuro de etidio, mientras que en la parte derecha se presenta la autorradiografía obtenida después de hibridar con el fragmento rRNA C. Se analizó cromatina de células en fase media de crecimiento (M) (carriles 1 y 2) y en fase estacionaria (E) (carriles 3 y 4). Cromatina sin digerir se presenta en los carriles 1 y 3.

4.9 Análisis de la cromatina de la región SSR del cromosoma 1

Finalmente, se analizó la estructura de la cromatina en la región SSR del cromosoma 1 de *Leishmania*. Como se mencionó anteriormente, la región SSR separa dos unidades policistrónicas divergentes, y en ella fueron localizados varios sitios de inicio de la transcripción de Pol II para ambas

unidades policistrónicas (Fig. 10). El análisis del fragmento *ssr2*, que contiene los sitios de inicio de la transcripción, reveló un barrido que se presenta principalmente en la parte inferior del gel, entre el monómero y el trímero nucleosomal (Fig. 39). Del barrido sobresale la banda del monómero y bandas localizadas entre los nucleosomas. Este patrón indica que la región *ssr2* presenta una asociación débil con nucleosomas, y que algunos de éstos presentan re-arreglos.

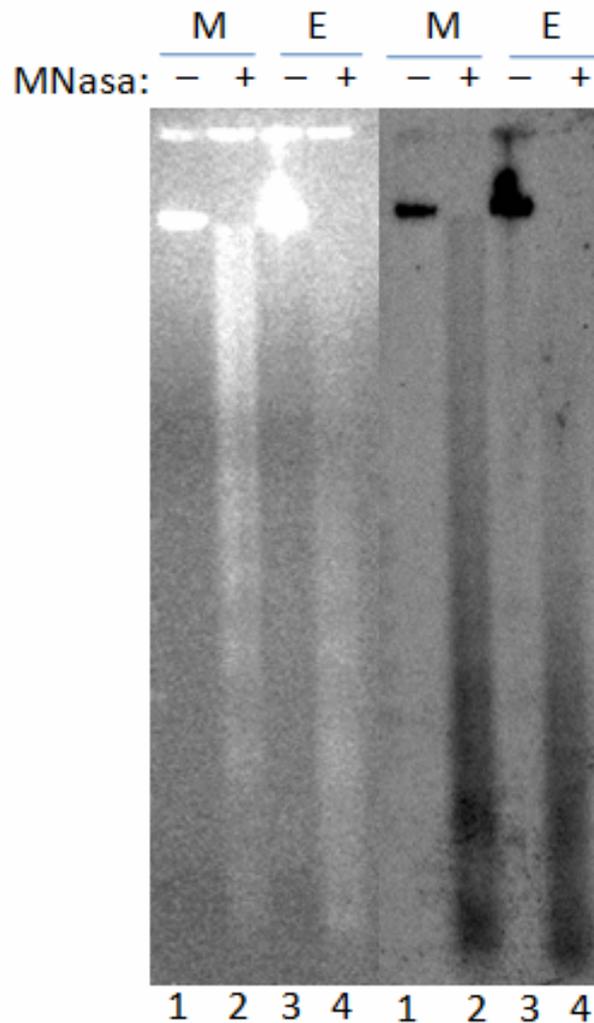


Figura 39. Estructura nucleosomal del fragmento *ssr2* del locus SSR del cromosoma 1 en *L. major*. En la parte izquierda se muestra el gel de agarosa al 1.5 % teñido con bromuro de etidio, mientras que en la parte derecha se presenta la autorradiografía obtenida después de hibridar con el fragmento *srr2*. Se analizó cromatina de células en fase media de crecimiento (M) (carriles 1 y 2) y en fase estacionaria (E) (carriles 3 y 4). Cromatina sin digerir se presenta en los carriles 1 y 3.

La región *ssr1* se localiza río arriba de la región *ssr2* (Fig. 10). El análisis de esta región mostró, en ambas fases de crecimiento de *L. major*, que está formando nucleosomas, ya que la hibridación mostró el arreglo de multímeros de nucleosomas (Fig. 40).

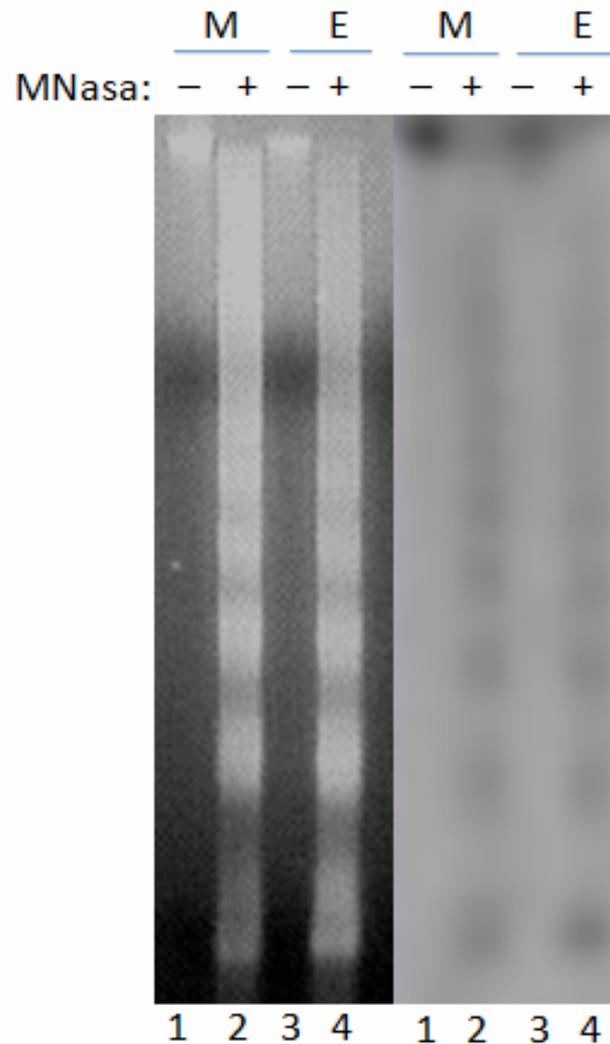


Figura 40. Estructura de la cromatina del fragmento *ssr1* del locus SSR del cromosoma 1 en *L. major*. En la parte izquierda se muestra el gel de agarosa al 1.5 % teñido con bromuro de etidio, mientras que en la parte derecha se presenta la autorradiografía obtenida después de hibridar con el fragmento *ssr1*. Se analizó cromatina de células en fase media de crecimiento (M) (carriles 1 y 2) y en fase estacionaria (E) (carriles 3 y 4). Cromatina sin digerir se presenta en los carriles 1 y 3.

Por último, se analizaron las regiones codificadoras de las dos proteínas que flanquean la región SSR (genes 32 y 33). El Gen 32, localizado río arriba de *ssr1*, mostró un arreglo nucleosomal muy bien definido en las dos especies

de *Leishmania*, tanto en fase media logarítmica, como en fase estacionaria (Fig. 41).

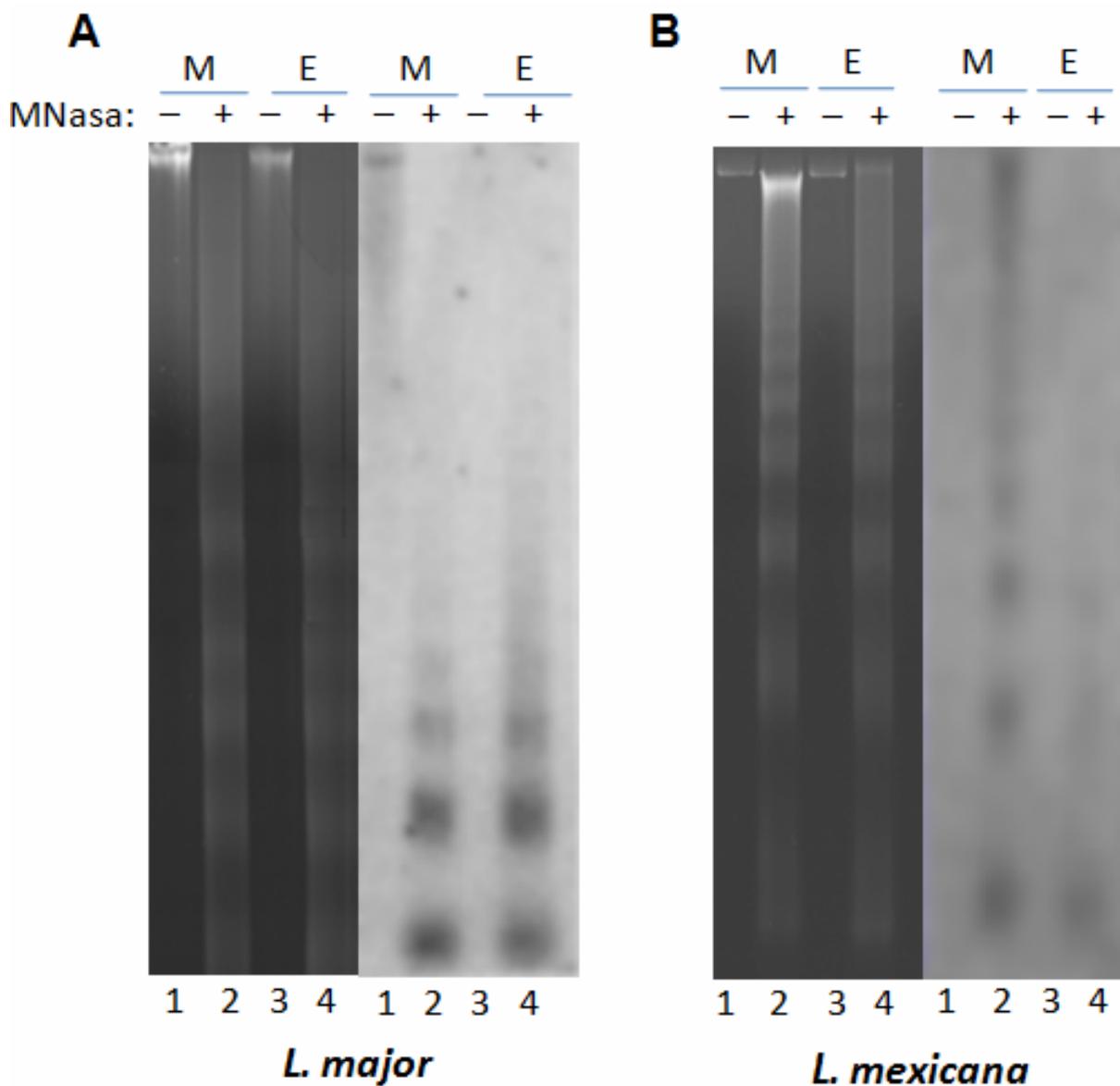


Figura 41. Análisis nucleosomal del fragmento Gen 32 del locus SSR del cromosoma 1 en *L. major* (panel A) y *L. mexicana* (panel B). En la parte izquierda de cada panel se muestra el gel de agarosa al 1.5 % teñido con bromuro de etidio, mientras que en la parte derecha se presenta la autorradiografía obtenida después de hibridar con el fragmento Gen 32. Se analizó cromatina de células en fase media de crecimiento (M) (carriles 1 y 2) y en fase estacionaria (E) (carriles 3 y 4). Cromatina sin digerir se presenta en los carriles 1 y 3.

Un arreglo nucleosomal definido también se observó con el Gen 33, el cual se localiza río abajo de *ssr2* para *L. major* (Fig. 42), lo mismo se obtuvo para *L. mexicana* (Fig. 42 B).

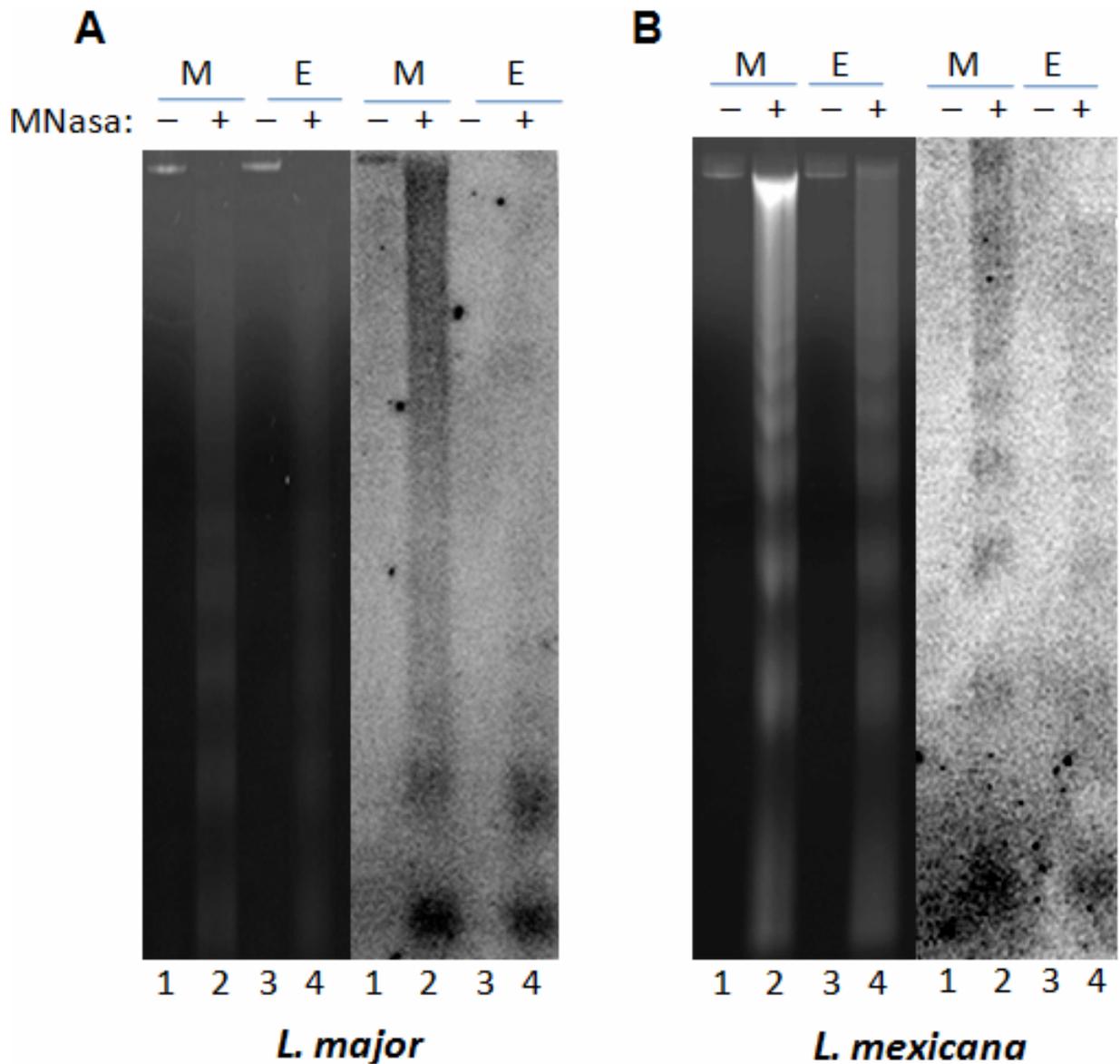


Figura 42. Estructura de la cromatina del fragmento Gen 33 del locus SSR del cromosoma 1 en *L. major* (panel A) y *L. mexicana* (panel B). En la parte izquierda de cada panel se muestra el gel de agarosa al 1.5 % teñido con bromuro de etidio, mientras que en la parte derecha se presenta la autorradiografía obtenida después de hibridar con el fragmento Gen 33. Se analizó cromatina de células en fase media de crecimiento (M) (carriles 1 y 2) y en fase estacionaria (E) (carriles 3 y 4). Cromatina sin digerir se presenta en los carriles 1 y 3.

4.10 Controles de hibridación

Para verificar que los barridos observados con algunas sondas se debieran a la falta de organización nucleosomal, y no a la degradación de la cromatina, se llevó a cabo un experimento control. Para éste se seleccionó la membrana hibridada con el fragmento crom3-D, que había producido un barrido (Fig. 43 B). Se esperó a que decayera la marca radioactiva de la membrana para después re-hibridarla con la sonda aATP11 (que había producido una escalera nucleosomal). La re-hibridación de la membrana generó una escalera nucleosomal con aATP11 (Fig. 43 C). Con esto, podemos concluir que el barrido observado con crom3-D es producto de una carencia de organización nucleosomal en esa región del genoma de *Leishmania*.

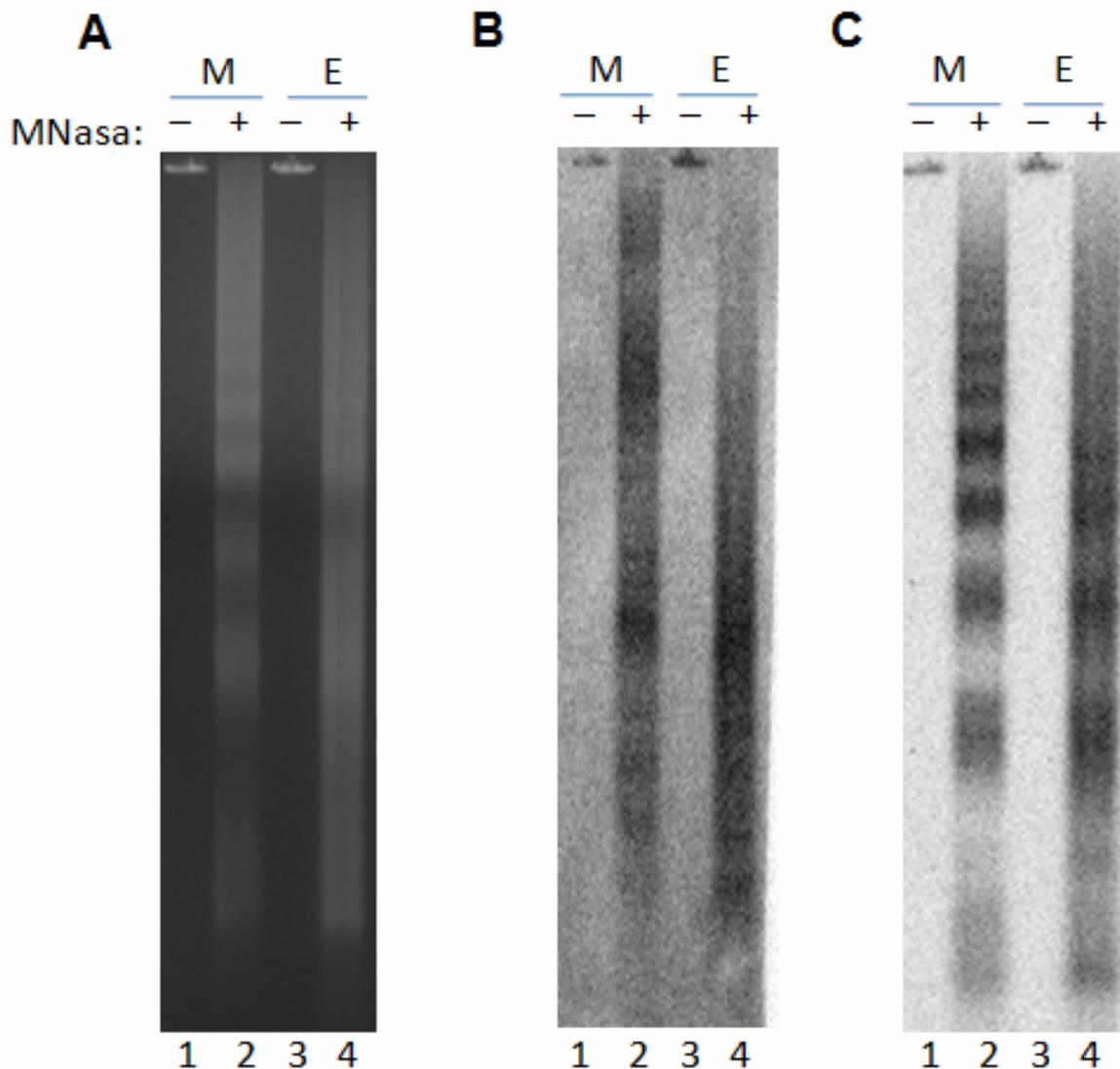


Figura 43. Control del análisis nucleosomal en *L. major*. Gel de agarosa con la digestión de la cromatina (panel A). Hibridación de la membrana de nylon con la sonda Crom3-D (panel B). Hibridación de la misma membrana, ya limpia, con la sonda aATP11 (panel C). Se analizó cromatina de células en fase media de crecimiento (M) (carriles 1 y 2) y en fase estacionaria (E) (carriles 3 y 4). Cromatina sin digerir se presenta en los carriles 1 y 3.

5. Discusión

Es bien sabido que la estructura de la cromatina juega un papel muy importante en la regulación de la expresión génica (Workman y Kingston, 1998). La MNasa es una enzima ampliamente usada para obtener información acerca de la localización de nucleosomas a lo largo de una cadena de DNA. En general, se ha observado que aquellas regiones de DNA que no son transcritas se asocian fuertemente con el octámero de histonas, generando una escalera de nucleosomas al ser digeridas con MNasa. Por otro lado, las regiones de DNA que son transcritas activamente se unen débilmente a los octámeros de histonas, mostrando un barrido como patrón de digestión (Hamid *et al.*, 1996; Weischet *et al.*, 1983; Lohr, 1983). Genes que son transcritos en niveles bajos presentan un patrón nucleosomal intermedio. En realidad, estos diferentes patrones de digestión con MNasa se presentan principalmente en las regiones promotoras, que son las zonas de DNA que tienen contacto directo con factores de transcripción y con RNA polimerasas. Las regiones codificadoras suelen presentar una estructura nucleosomal definida, independientemente de su nivel de transcripción.

En los tripanosomátidos se sabe muy poco acerca de la estructura de la cromatina y su relación con la transcripción. En este trabajo se usó la técnica de digestión de cromatina con MNasa para determinar la estructura nucleosomal de genes transcritos por Pol III en *L. major* y *L. mexicana*. Como primer paso, encontramos condiciones de digestión con MNasa que nos permitieron obtener una escalera para ambas especies de *Leishmania*, en donde la banda inferior corresponde al monómero nucleosomal y las bandas mayores corresponden a multímeros nucleosomales (Fig. 18). Dichas condiciones fueron: 25 U/ml de MNasa a 30°C, usando 25 µl de núcleos (~3 µg de DNA). Cabe aclarar que las condiciones de digestión tuvieron que reajustarse constantemente, dado que ciertas preparaciones de cromatina tendían a sobre digerirse o a no digerirse totalmente bajo las condiciones que inicialmente fueron las ideales. Esto debido a que los cultivos de *Leishmania* cambian su metabolismo con el paso del tiempo. El parámetro generalmente cambiado fue el tiempo de digestión (de 1.5 hasta 20 mins.), y en algunos

casos se adicionó DTT (10-15 mM), para inhibir a las endonucleasas propias de *Leishmania* (Cleland, 1963; Zangger *et al.*, 2002).

El análisis de los patrones de digestión de la cromatina nos permitió determinar que el tamaño del nucleosoma en *L. major* y en *L. mexicana* es de ~180 pb. Esto es similar a lo encontrado en otros organismos, donde la longitud del DNA presente en el nucleosoma generalmente va de los 180 a los 200 pb. Existen algunas excepciones, como algunos hongos que presentan nucleosomas de 154 pb, y el erizo de mar, cuyo nucleosoma es de 260 pb (Lewin, 2004).

Los genes transcritos por Pol III analizados fueron: tRNA-Lys (locus chr03), tRNA-Arg (locus chr11-II), tRNA-Ala (locus chr31-I), rRNA 5S (locus chr11-II) y snRNA U2 (locus chr31-I). Los tRNAs contienen regiones de control interno (cajas A y B) y lo mismo ocurre con el rRNA 5S (cajas A y C). El análisis de la estructura de la cromatina de estos genes mostró, como se esperaba, un barrido característico de regiones altamente transcritas (Figs. 22, 23, 26 y 33). Factores de transcripción, aún no identificados, se deben estar uniendo a las regiones de control interno para que Pol III pueda iniciar la transcripción. El gen tRNA-Ala mostró, además del barrido, algunas bandas tenues que parecen corresponder con nucleosomas (Fig. 33). Dado que el genoma de *L. major* contiene otras 4 copias del gen de tRNA-Ala, que son entre 73 y 90 % idénticas al gen de tRNA-Ala del locus chr31-I, la presencia de las bandas nucleosomales tenues podría indicar que alguno de los otros genes se encontraba parcialmente reprimido al momento de aislar la cromatina. En otros organismos se ha reportado que no todos los genes de tRNA para un mismo aminoácido son transcritos al mismo tiempo y al mismo nivel; por ejemplo, en *Bombyx mori* se encontró que los genes de tRNA-Gly que son poco transcritos tienen nucleosomas posicionados río arriba de los genes y que en los genes altamente transcritos existe una carencia de nucleosomas (Parthasarthy y Gopinathan, 2006).

En el caso del rRNA 5S, mientras en *L. major* se aprecia únicamente un barrido, en *L. mexicana* se logran observar bandas nucleosomales tenues. Esto indicaría que no todas las copias del gen del rRNA 5S en *L. mexicana* estaban

siendo activamente transcritas al momento de que se aislaron los núcleos. Se sabe que en *L. major* hay 11 copias del gen del rRNA 5S, pero se desconoce su número en *L. mexicana*. Se ha reportado que en *Xenopus laevis* los genes del rRNA 5S están preferencialmente organizados en nucleosomas (Young y Carroll., 1983). Este organismo contiene alrededor de 30 000 copias del gen arregladas en tándem, por lo que sólo una mínima parte de ellas debe estar activa en un momento determinado. Dado que la gran mayoría de los genes están apagados, se obtiene el patrón de heterocromatina. La presencia de un barrido entre las bandas de los nucleosomas indica la actividad de la minoría de los genes del rRNA 5S (Lohr, 1983).

En lo que respecta al snRNA U2, se presume que su región promotora está contenida en el tRNA-like localizado hacia su región 5' (Figura 10). Mientras el snRNA U2 mostró un barrido tenue del que sobresalen los nucleosomas, la región t-like U2 presentó un barrido con algunas bandas que no corresponden a la escalera nucleosomal (Figs. 30 y 32), lo cual indica que los nucleosomas que se unen débilmente a esta región lo hacen de manera irregular. En *S. cerevisiae* la activación del promotor del snRNA U2 está acompañada por la disrupción de varios nucleosomas posicionados justo río arriba del gen (Morse *et al.*, 1992). Algunas de las bandas que se observan entre los nucleosomas podrían también explicarse por el hecho de que la MNasa puede cortar, en algunos casos, dentro del octámero de histonas, y no únicamente en el DNA que separa los nucleosomas. Se ha reportado que la enzima tiene afinidad por las secuencias CATA y CTA localizadas en zonas ricas en GC, independientemente de que se localicen en el DNA linker o en el DNA que rodea al octámero de histonas (Dingwall *et al.*, 1981; Hörz y Altenburger, 1981).

Recientemente se encontró que en la cromatina de inmediaciones de los loci que contienen tRNAs y snRNAs en *L. major* y *T. brucei* se encuentra presente la histona H4 acetilada en la lisina 10 (H4-K10ac), la histona H3 acetilada en las lisinas 9 y 14 (H3-K9ac/K14ac), así como las variantes de histonas H2AV y H2BV (Siegel *et al.*, 2009; Thomas *et al.*, 2009). Estas modificaciones y variantes de histonas son marcadores de eucromatina.

Las regiones intergénicas que flanquean al gen tRNA-Lys (fragmentos Crom3-D y Crom3-E bis) mostraron en *L. major* un barrido del que sobresalen bandas cuyo tamaño no corresponde en la mayoría de los casos a los multímeros nucleosomales, lo que significa que probablemente en estas regiones haya re-arreglos o reposicionamientos nucleosomales (Figs. 27 y 28). Esto no es sorprendente, dado que el tRNA-Lys se localiza en una región donde convergen dos unidades policistrónicas (región SSR convergente). Así, en la región intergénica que contiene al fragmento crom3-D se lleva a cabo el término de la transcripción de la unidad polcistrónica de la izquierda (de Pol II) y el inicio de la transcripción del tRNA-Lys (Pol III). En la región intergénica que contiene al fragmento crom3-E bis se lleva a cabo el término de la transcripción del tRNA-Lys (Pol III) y el término de la transcripción de la unidad policistrónica de la derecha (de Pol II). Se ha reportado en *T. brucei* la presencia de las variantes de histonas H3V y H4V en regiones SSR convergentes (Talbert y Henikoff, 2009), como en la que se localiza el tRNA-Lys de *L. major*. Estas variantes de histonas se han relacionado con el término de la transcripción de Pol II. Creemos que la presencia de estas histonas modificadas en los nucleosomas de esta región, aunado a los diversos eventos de inicio y término de la transcripción, podrían generar los patrones de digestión atípicos que observamos.

Las otras dos regiones intergénicas que analizamos en los loci transcritos por Pol III, 11-inter y inter-U2, mostraron escaleras nucleosomales bien definidas (Figs. 25 y 31). Asimismo, los genes codificadores de proteínas que flanquean a los genes sintetizados por Pol III (Crom3-68, aATP11, Gen 32, Gen 33 y 11.0930) presentaron escaleras bien definidas (patrón de heterocromatina) (Figs. 24, 29, 34, 41 y 42), lo que indica que forman nucleosomas muy compactos, tanto en fase media logarítmica como en estacionaria. Cabe aclarar que aunque estas regiones presenten cromatina compacta eso no significa que no se estén transcribiendo. Se requiere que la cromatina esté relajada sólo en los sitios de inicio de la transcripción, donde se pega la RNA polimerasa al DNA; posteriormente la enzima puede atravesar y

transcribir regiones de cromatina compacta, desplazando los nucleosomas que encuentre a su paso (Workman y Kingston, 1998).

El análisis de la región SSR del cromosoma 1 reveló que, como se esperaba, el fragmento que contiene los sitios de inicio de la transcripción (*ssr2*) muestra predominantemente un barrido (Fig. 39). Esto a diferencia del fragmento contiguo *ssr1* (Fig. 40) y de los genes de Pol II flanqueantes que muestran un patrón claramente nucleosomal (Figs. 41 y 42). Trabajos recientes indican que regiones SSR divergentes, como la del cromosoma 1, contienen altos niveles de histona H4 acetilada en la lisina 10 (H4-K10ac) y de la histona H3 acetilada en las lisinas 9 y 14 (H3-K9ac/K14ac). Al igual que en los loci de tRNAs, también se observó la presencia de las variantes de histonas H2AV y H2BV (Siegel *et al.*, 2009; Thomas *et al.*, 2009). Estas modificaciones y variantes de histonas son marcadores de cromatina activa (eucromatina).

La región promotora del cistron del rRNA (fragmento rRNA A), mostró el barrido característico de las zonas de inicio de la transcripción (Fig. 36). Asimismo el fragmento rRNA B, que contiene una parte del promotor y las primeras bases transcritas del cistron ribosomal, también mostró un patrón no-nucleosomal (Fig. 37). Por otro lado, el rRNA 18S presentó un patrón nucleosomal, como se esperaba, (Fig. 35) y lo mismo ocurrió con el fragmento rRNA C (Fig. 38). Este último fragmento se localiza en el extremo 3' del cistron ribosomal, en una zona donde finaliza la transcripción de Pol I (Martínez-Calvillo *et al.*, 2001), por lo que era de esperarse que tuviera un patrón nucleosomal. El genoma de *L. major* contiene alrededor de 20 copias del cistron del RNA ribosomal en un arreglo en tándem (Martínez-Calvillo *et al.*, 2001). El hecho de que el promotor del cistron mostrara un claro barrido sugiere que todas las copias del cistron se están expresando. En levadura se encontró que aproximadamente la mitad de los cistrones del rRNA son transcritos. Los genes inactivos presentan un nucleosoma posicionado en el promotor (Jones *et al.*, 2007). A diferencia de los promotores, los genes del rRNA 18S y 28S presentan siempre un patrón nucleosomal, independientemente de su tasa de transcripción (Lohr, 1984). Sin embargo, los genes inactivos suelen presentar metilación en la lisina 9 de la histona H3 (H3-

K9me2), mientras que los genes activos se metilan en la lisina 4 de la histona H3 (H3-K4me3) (Lawrence y Pikaard, 2004); cabe señalar que el estado de la cromatina en copias inactivas ha sido muy controversial, debido a la dificultad de estudiar la estructura de la cromatina de genes multicopia, en estados heterogéneos de cromatina (Paule y White, 2000; Birch y Zomerdijk, 2008). También se ha visto en *S. cerevisiae* que los espaciadores intergénicos que flanquean a las copias de los genes rRNA están empaquetadas en un arreglo nucleosomal (Dammann *et al.*, 1993; Lucchini y Sogo, 1994).

No se encontraron diferencias significativas en la estructura de la cromatina entre las dos especies de *Leishmania* (*L. major* y *L. mexicana*). Tampoco se encontraron diferencias importantes al comparar la estructura nucleosomal entre células creciendo activamente (en fase media de crecimiento logarítmico) y células que han dejado de dividirse (en fase estacionaria). Aunque *Leishmania* no regula la transcripción de sus genes a nivel individual, se ha propuesto que los niveles generales de transcripción pueden verse reducidos cuando las células alcanzan la fase estacionaria. Trabajos recientes en *L. major* indican que la presencia de histona H3 acetilada (indicadora de eucromatina) es mayor en células que se están dividiendo rápidamente que en células en fase estacionaria (Thomas *et al.*, 2009). También se ha reportado que los niveles de expresión de la histona H1 son mayores en células en fase estacionaria (Belli, 2000). Nuestros resultados indican que estas diferencias no son evidentes al analizar la cromatina mediante digestiones con MNasa.

6. Conclusiones

1. El tamaño del nucleosoma en *L. major* y en *L. mexicana* (~180 pb) es similar al encontrado en otros organismos eucariontes.
2. Los genes transcritos por Pol III (tRNA-Lys, tRNA-Arg, tRNA-Ala, rRNA 5S y snRNA U2) mostraron una organización no-nucleosomal.
3. Los genes transcritos por Pol II (Crom3-68, aATP11, Gen 32, Gen 33 y 11.0930) están formando nucleosomas, al igual que la mayoría de las regiones intergénicas. En cambio la región promotora del cromosoma 1 no está organizada en nucleosomas.
4. La región SSR convergente del cromosoma 3 (fragmentos Crom3-D y Crom3-E bis) mostró un patrón nucleosomal atípico, acorde con los diversos eventos de inicio y término de la transcripción que ahí se presentan.
5. El gen transcrito por Pol I (rRNA 18S) y la región rRNA C presentaron un arreglo nucleosomal, mientras que la región promotora (fragmentos rRNA A y rRNA B) no se asocia a los octámeros de histonas.
6. No observamos diferencias significativas en la estructura de la cromatina entre *L. major* y *L. mexicana*. Tampoco se encontraron diferencias importantes al comparar la estructura nucleosomal entre células creciendo activamente y células que han dejado de dividirse.

1. REFERENCIAS

- Alberts, A., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. y Walter, P. *Molecular Biology of the Cell*. 4th edition. Editorial Garland Science, 2002. 208-216p.
- Alsford, S. y Horn, D. (2004). Trypanosomatid histones. *Molecular Microbiology*, 53: 365-372.
- Hamid, Q. A., Thanumalayan. S. y Parnaik, V. K. (1996). An improved method to distinguish micrococcal nuclease sensitivity of chromatin. *Journal of biochemical and biophysical methods*, 33: 59-64.
- Berriman, M., Ghedin, E., Hertz-Fowler, C., Blandin, G., Renauld, H., Bartholomeu, D. C., Lennard, N. J., Caler, E., Hamlin, N. E., Haas, B. *et al.* (2005). The genome of the African trypanosome *Trypanosoma brucei*. *Science*, 309: 416-422.
- Birch, J. L. y Zomerdijk, J.C. B. M. (2008). Structure and function of ribosomal RNA gene chromatin. *Biochemical Society*, 36: 619-624.
- Campbell, D. A., Sturm, N. R. y Yu, M. C. (2000). Transcription of the Kinetoplastid Spliced Leader RNA Gene. *Parasitology Today*, 16.
- Cleland, W. W. (1963). Dithiothreitol, a new protective reagent for sh groups. *Biochemistry*, 3: 480-482.
- Dammann, R., Lucchini, R., Koller, T. y Sogo, J. M. (1993). Chromatin structures and transcription of rDNA in yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Research*, 21: 2331-2338.
- Dieci, G., Fiorano, G., Castelnuovo, M., Teichmann, M. y Pagano, A. (2007). The expanding RNA polymerase III transcriptome. *TRENDS in Genetics*, 23: 614-622.
- Dingwall, D., Lomonosoff, G. P. y Laskey, R. A. (1981). High sequence specificity of micrococcal nuclease. *Nucleic Acids Research*, 9: 2659-2673.
- El-Sayed, N. M., Myler, P. J., Bartholomeu, D. C., Nilsson, D., Aggarwal, G., Tran, A. N., Ghedin, E., Worthey, E. A., Delcher, A. L., Blandin, G. *et al.* (2005). The genome sequence of *Trypanosoma cruzi*, etiologic agent of Chagas disease. *Science*, 309: 409-415.
- Galanti, M., Galindo, V., Sabaj, V., Espinoza, I. y Toro, G. (1998). Histone Genes in Trypanosomatids. *Parasitology Today*, 14: 64-70.
- Gunzl, A., Ullu, E., Dorner, M., Fragoso, S. P., Hoffmann, K. F., Milner J. D., Morita, Y., Nguu, E. K., Vanacova, S., Wunsch, S., Dare, A. O., Kwon, H. y Tschudi, C. (1997). Transcription of the *Trypanosoma brucei* spliced leader RNA gene is dependent only on the presence of upstream regulatory elements. *Molecular & Biochemistry Parasitology*, 85: 67-76.

- Haile, S. y Papadopoulou, B. (2007). Developmental regulation of gene expression in trypanosomatid parasitic protozoa. *Current Opinion in Microbiology*, 10: 569-577.
- Handman, E. (2000). Cell Biology of *Leishmania*. *Advances in Parasitology*, 44: 2-5.
- Hernández-Rivas, R., Florencio-Martínez, L. E., Martínez-Salazar, M. y Martínez-Calvillo, S. (2007). Gene expression and transcriptional machinery in trypanosomatid and apicomplexa parasites. *Advances in the Immunobiology of Parasitic Diseases* (Terrazas, L. ed.) Research Signpost, Kerala, India. pp. 313-337.
- Hitchcock, R. A., Thomas, S., Campbell, D. A. y Sturm, N. R. (2007). The promoter and transcribed regions of the *Leishmania tarentolae* spliced leader RNA genes array are devoid of nucleosomes. *BMC Microbiology*, 7: 44.
- Hörz, W. y Altenburger, W. (1981). Sequence specific cleavage of DNA by micrococcal nuclease. *Nucleic Acids Research*, 9: 2643-2658.
- Ivens, A. C., Peacock, C. S., Worthey, E. A., Murphy, L., Aggarwal, G., Berriman, M., Sisk, E., Rajandream, M. A., Adlem, E., Aert, R. *et al.* (2005). The genome of the kinetoplastid parasite, *Leishmania major*. *Science*, 309: 436-442.
- Johnson, J., Kooter, J. M. y Borst, P. (1987). Inactivation of transcription by UV irradiation of *T. brucei* provides evidence for a multicistronic transcription unit including a VSG gene. *Cell*, 51: 273-281.
- Jones, H. S., Kawauchi, J., Braglia, P., Alen, C. M., Kent, N. A. y Proudfoot, N. J. (2007). RNA polymerase I in yeast transcribes dynamic nucleosomal rDNA. *Nature Structural & Molecular Biology*, 14: 123-30.
- Lawrence, R. J. y Pikaard, C. S. (2004). Chromatin turn ons and turn offs of ribosomal RNA Genes. *Cell Cycle*, 3:7.
- Lewin B. *Genes VIII*. Editorial Person Prentice Hall, 2004. 571-595 p.
- Lodish, H., Berk, A., Kaiser, C., Krieger, M., Scott, M., Bretscher, A., Ploegh, H. y Matsudaira, P. *Molecular Cell Biology*. 6th edition. Editorial Freeman I, 2008. 248-258
- Lohr, D. (1983). The chromatin structure of an actively expressed, single copy yeast gene. *Nucleic Acids Research*, 11: 6755-6773.
- Lucchini, R. y Sogo, J. M. (1994). Chromatin structure and transcriptional activity around the replication forks arrested at the 3' end of the Yeast rRNA genes. *Molecular and Cellular Biology*, 14: 318-326.
- Martínez-Calvillo, S., Nguyen, D., Stuart, K. y Myler, P. J. (2004). Transcription initiation and termination on *Leishmania major* chromosome 3. *Eukaryot Cell*, 3: 506-17.

- Martínez-Calvillo, S., Saxena, A., Green, A., Leland, A. y Myler, P. J. (2007). Characterization of the RNA polymerase II and III complexes in *Leishmania major*. *International Journal of Parasitology*, 37: 491-502.
- Martínez-Calvillo, S., Sunkin, S. M., Yan, S. F., Fox, M., Stuart, K. y Myler, P. J. (2001). Genomic organization and functional characterization of the *Leishmania major* Friedlin ribosomal RNA gene locus. *Molecular & Biochemical Parasitology*, 116: 147–157.
- Martínez-Calvillo, S., Yan, S., Nguyen, D., Fox, M., Stuart, K. y Myler, P. J. (2003) Transcription of *Leishmania major* Friedlin chromosome 1 initiates in both directions within a single región. *Molecular Cell*, 11: 1291-1299.
- Monnerat, S., Martínez-Calvillo, S., Worthey, E., Myler, P. J., Stuart, K. D. y Fasel, N. (2003). Genomic organization and gene expression in a chromosomal region of *Leishmania major*. *Molecular & Biochemical Parasitology*, 134: 233–243.
- Morse, R. H., Roth, S. Y. y Simpson, R. T. (1992). A transcriptionally active tRNA gene interferes with nucleosoma positioning in vivo. *Molecular and Cellular Biology*, 12: 4015-4025.
- Myler, P. J., Audleman, L., Devos, T., Hixson, G., Kiser, P., Lemley, C., Magness, C., Rickel, E., Sisk, E., Sunkin, S., Swartzell, S., Westlake, T., Bastien, P., Fu, G., Ivens, A. y Stuart, K. (1999). *Leishmania major* Friedlin chromosome 1 has an unusual distribution of protein-coding genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 9: 2902-2906.
- Nakaar, V., Gunzl, A., Ullu, E. y Tschudi, C. (1997). Structure of the *Trypanosoma brucei* U6 snRNA gene promoter. *Molecular & Biochemical Parasitology*, 88: 13-23.
- Padilla-Mejía, N. E., Florencio-Martínez, L. E., Figueroa-Angulo, E. E., Manning-Cela, R. G., Hernández-Rivas, R., Myler, P. J. y Martínez-Calvillo, S. (2009). Gene organization and sequence analyses of transfer RNA genes in Trypanosomatid parasites. *BMC Genomics* 2009, 10:232.
- Parsons, M., Nelson, R. G., Watkins, K. P. y Agabian, N. (1984). Trypanosome mRNAs share a common 5' spliced leader sequence. *Cell*, 38: 309-316.
- Parthasarthy, A. y Gopinathan, P. (2006). Transcriptional activation of a moderately expressed tRNA gene by a positioned nucleosome. *Biochemical Journal*, 396: 439-447.
- Paule, M. y White, R. (2000). Transcription by RNA polymerases I and III. *Nucleic Acids Research*, 28: 1283-1298.
- Recillas, F. (2000). La estructura de la cromatina y su relación con la regulación de la expresión genética. *BEB*, 20: 6-18.
- Scott, F. G. *Biología del Desarrollo*. 7ª. Edición. Editorial panamericana, 2005. 115-132 p.

- Siegel, T. N., Hekstra, D. R., Kemp, L. E., Figueredo, L. M., Lowell, J. E., Fenyo, D., Wang, X., Dewell, S. y Cross, G. A. M. (2009). Four histone variants mark the boundaries of polycistronic transcription units in *Trypanosoma brucei*. *Genes & Development*, 23: 1063-1076.
- Talbert, P. B. y Henikoff, S. (2009). Chromatin-based transcriptional punctuation. *Genes & Development*, 23: 1037-1041.
- Thomas, S., Green, A., Sturm, N. R., Capmbell, D. A. y Myler, P. J. (2009). Histone acetylations mark origins of polycistronic transcription in *Leishmania major*. *BMC Genomics*, 10: 152.
- Vanhamme, L. (2008). Trypanosome RNA Polymerases and Transcription Factors: Sensible Trypanocidal Drug Targets? *Current drugs targets*, 9: 979-996.
- Vanhamme, L. y Pays, E. (1995). Control of Gene Expression in Trypanosomes. *Microbiological Reviews*, 59: 223:240.
- Vannier-Santos, M., Martiny, A. y Souza, W. (2002). Cell Biology of *Leishmania spp.*: Invading and Evading. *Current Pharmaceutical Design*, 8: 297-318.
- Weischet, O. W., Glotov, B. O. y Zachau, H. G. (1983). Protection of expressed immunoglobulin genes against nuclease cleavage. *Nucleic Acids Research*, 11: 3593-3612.
- William, J., Sullivan, Jr., Arunasalam, N. y Sergio, A. (2006). Histones and histone modifications in protozoan parasites. *Cellular Microbiology*, 8: 1850-1861.
- Workman, J. L. y Kingston, R. E. (1998). Alteration of nucleosome structure as a mechanism of transcriptional regulation. *Annual Review of Biochemistry*, 67:545-579.
- Worthey, E. A., Martinez-Calvillo, S., Schnauffer, A., Aggarwal, G., Cawthra, J., Fazelinia, G., Fong, C., Fu, G., Hassebrock, M., Hixson, G., Ivens, A. C., Kiser, P., Marsolini, F., Rickel, E., Salavati, R., Sisk, E., Sunkin, S. M., Stuart, K. D. y Myler, P. J. (2003). *Leishmania major* chromosome 3 contains two long convergent polycistronic gene clusters separated by a tRNA gene. *Nucleic Acids Research*, 31: 4201-4210.
- Young, D. y Carroll, D. (1983). Regular arrangement of nucleosomes on 5S rRNA genes in *Xenopus laevis*. *Molecular and Cellular Biology*, 3: 720-730.
- Zangger, H., Mottram, J. C. Y Fasel, N. (2002). Cell death in *Leishmania* induced by stress and differentiation: programmed cell death or necrosis? *Cell Death and Differentiation*, 9: 1126-1139.