



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

**“Estudio de la arquitectura de la cromatina y su implicación en la actividad
transcripcional en *Leishmania major*”**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA:

JUAN CARLOS VIZUET DE RUEDA

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

COMITÉ TUTOR: Dra. Rosaura Hernández Rivas
Cinvestav Zacatenco, IPN

COMITÉ TUTOR: Dr. Julio César Carrero Sánchez
Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM

Cd. Mx., ABRIL, 2016.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



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

**“Estudio de la arquitectura de la cromatina y su implicación en la actividad
transcripcional en *Leishmania major*”**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA:

JUAN CARLOS VIZUET DE RUEDA

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

COMITÉ TUTOR: Dra. Rosaura Hernández Rivas
Cinvestav Zacatenco, IPN

COMITÉ TUTOR: Dr. Julio César Carrero Sánchez
Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM

Cd. Mx., ABRIL, 2016.

Dr. Isidro Ávila Martínez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Subcomité de Biología Experimental y Biomedicina del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 15 de febrero de 2016, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **DOCTOR EN CIENCIAS** del alumno **VIZUET DE RUEDA JUAN CARLOS**, con número de cuenta **302171378**, con la tesis titulada **"ESTUDIO DE LA ARQUITECTURA DE LA CROMATINA Y SU IMPLICACIÓN EN LA ACTIVIDAD TRANSCRIPCIONAL EN *Leishmania major*"**, realizada bajo la dirección del **DR. SANTIAGO MARTÍNEZ CALVILLO**:

Presidente: DR. FEDERICO ÁVILA MORENO
Vocal: DR. ROBERTO JOSÉ RAFAEL HERNÁNDEZ FERNÁNDEZ
Secretario: DRA. ROSAURA HERNÁNDEZ RIVAS
Suplente: DR. LUIS ENRIQUE ARIAS ROMERO
Suplente: DR. JULIO CÉSAR CARRERO SÁNCHEZ

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

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, Cd. Mx., a 11 de marzo de 2016.

M. del Coro Arizmendi

DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA
COORDINADORA DEL PROGRAMA



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

AGRADECIMIENTOS

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

Agradezco al CONACyT por la beca otorgada para realizar mis estudios de Doctorado (Becario 239707).

Agradezco al COMECYT por la beca de titulación (Folio Becario 15BTD0006).

Este trabajo fue financiado por los donativos 128461 de CONACyT, IN210712 e IN214715 de PAPIIT (DGAPA, UNAM), todos otorgados al Dr. Santiago Martínez Calvillo.

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

Asimismo, agradezco enormemente a los miembros del Comité Tutor, Dra. Rosaura Hernández Rivas y Dr. Julio César Carrero Sánchez por enriquecer este proyecto y mi formación académica.

AGRADECIMIENTOS A TÍTULO PERSONAL

A la Universidad Nacional Autónoma de México, que ha sido mi *Alma Mater* desde la preparatoria hasta mis estudios de doctorado, siempre estaré en deuda con la Máxima Casa de Estudios.

Al Dr. Santiago Martínez por haberme aceptado en su laboratorio, por dirigir esta tesis y por su enorme apoyo a lo largo de esta etapa.

Al Biól. Luis Enrique Florencio Martínez por su apoyo técnico.

A los integrantes del jurado de examen de grado:

Dra. Rosaura Hernández Rivas, Dr. Julio César Carrero Sánchez, Dr. Federico Ávila Moreno, Dr. Roberto Hernández Fernández y el Dr. Luis Enrique Arias Romero,

por sus comentarios durante la revisión de esta tesis, los cuales ayudaron a enriquecer el presente trabajo.

Un agradecimiento especial a la Dra. Rosaura Hernández por su ayuda para estandarizar las condiciones de ChIP y de FISH; al Dr. Federico Ávila Moreno quien me brindo asesoría en el análisis de los experimentos ChIP. Al profesor Antonio Edmundo Cisneros Cisneros por su ayuda en el análisis estadístico. A Georgina García Moran por su ayuda y amistad.

Dedico esta tesis doctoral a toda mi familia y a mis amigos que me apoyaron incondicionalmente a lo largo de toda esta etapa de formación.

A mi familia, mis padres Eusebio y Gregoria, a mis hermanos Eusebio y Daniel. A mi esposa Eddie y a mis dos hijos Leonardo y Sebastián. Ustedes han sido mi motor durante todos estos años.

A todos mis amigos del laboratorio Norma Padilla, Gabriela Romero, Luis E. Florencio, Rodrigo Moreno y Fiordaliso Roman gracias por su ayuda y consejos. A mis otros amigos Ernesto Mendoza, José Luis Reyes, César Terrazas y Carlos Flores, por haber estado siempre conmigo en las buenas y en las malas.

“En esta vida hay que ser como una navaja suiza, cuando no la haces de cuchillo, la haces de desarmador”

JC Vizuet

DEDICATORIA

A mi mamá Gregoria,

A mi papá Eusebio,

A mi hermano Eusebio,

A mi hermano Daniel,

A mi esposa Eddie,

A mis hijos Leonardo y Sebastián,

Porque siempre han estado conmigo, por su apoyo, por haber estado conmigo en la alegría y la tristeza, por su infinito amor y por ser mi motor para salir adelante.

ÍNDICE

1.	RESUMENES	
1.1.	Resumen	1
1.2.	Abstract	2
2.	INTRODUCCION	
2.1	Generalidades sobre <i>Leishmania</i>	3
2.2	Transcripción en eucariontes	8
2.3	La cromatina y su papel en la transcripción	11
2.4	Epigenética en genes transcritos por las tres RNA Polimerasas	16
2.5	Expresión génica en tripanosomátidos	19
2.5.1	Organización del genoma y transcripción policistrónica	19
2.5.2	Regiones promotoras y factores de transcripción	21
2.5.3	Término de la transcripción	25
2.6	Estructura de la cromatina en tripanosomátidos.	26
3.	ANTECEDENTES	29
4.	OBJETIVOS	30
5.	METODOLOGIA	
5.1	Cultivo de promastigotes de <i>Leishmania major</i>	31
5.2	Aislamiento del DNA genómico	31
5.3	Clonación de fragmentos genómicos	32
5.4	Ligaciones y transformaciones	34
5.5	Purificación y análisis de plásmidos	34
5.6	Purificación de insertos	35
5.7	Preparación de células competentes	36
5.8	Aislamiento de núcleos y cromatina	36
5.9	Digestión con nucleasa micrococcal	37
5.10	Electroforesis y transferencia a membranas de nylon	38
5.11	Marcaje radioactivo de fragmentos de DNA	39
5.12	Pre-hibridación e hibridación	40
5.13	Lavado de los filtros radioactivos y exposición	40
5.14	Western-blot con histonas purificadas	41
5.15	Inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP)	41
5.16	PCR cuantitativo (qPCR)	43
5.17	Inmunofluorescencia y FISH	43
6.	RESULTADOS	
6.1	Selección de las regiones a analizar de <i>L. major</i>	45
6.2	Clonación de los fragmentos de DNA de <i>L. major</i>	47
6.3	Obtención de la cromatina de <i>L. major</i>	50
6.4	Estructura nucleosomal en los genes del rRNA	51
6.5	Arquitectura nucleosomal en la región del SSR del cromosoma 1	53
6.6	Análisis nucleosomal del cromosoma 11	55
6.7	Genes del rRNA tienen un código de histonas	57
7.	DISCUSION	
7.1	Estructura nucleosomal en genes transcritos por Pol II y Pol III	66
7.2	Genes del rRNA tienen una estructura definida	69
7.1	Código de histonas en genes del rRNA	71
8.	CONCLUSIONES	75
9.	LITERATURA CITADA	76
10.	APENDICE	
10.1	Artículo para obtener el grado: Vizuet-de-Rueda, et al., 2016.	87

LISTA DE FIGURAS Y TABLAS

Figura 1	Tipos de Leishmaniasis	4
Figura 2	Mapa de la distribución de Leishmaniasis visceral en el mundo	5
Figura 3	Promastigotes y amastigotes de <i>Leishmania spp.</i>	6
Figura 4	Ciclo de vida de <i>Leishmania spp.</i>	7
Figura 5	Promotores de genes transcritos por Pol I y Pol II	10
Figura 6	Tipos de Promotores de Pol III.	11
Figura 7	Niveles de compactación del DNA y figura de los nucleosomas	13
Figura 8	Organización de los genes y producción de los mRNA en tripanosomátidos	21
Figura 9	Representación esquemática de las regiones promotoras en tripanosomátidos	24
Figura 10	Epigenética en la transcripción en tripanosomátidos	28
Figura 11	Mapas de los loci analizados en <i>L. major</i>	46
Figura 12	Electroforesis de fragmentos de <i>L. major</i> amplificados por PCR	47
Figura 13	Electroforesis de los vectores digeridos con <i>EcoRI</i>	48
Figura 14	Análisis por alineamiento de los fragmentos clonados en pGEMT-Easy	49
Figura 15	Electroforesis de los fragmentos purificados	49
Figura 16	Electroforesis de digestiones con distintas concentraciones de MNasa	50
Figura 17	Electroforesis de cromatina parcialmente digerida con 25 U/ml de MNasa	51
Figura 18	Estructura nucleosomal en genes del rRNA transcritos por Pol I	53
Figura 19	Análisis de la estructura nucleosomal en el locus Chr01	54
Figura 20	Análisis de la estructura nucleosomal en el locus Chr11	56
Figura 21	Control de hibridación de experimentos Southern-blot	57
Figura 22	Alineamiento del extremo N-terminal de las histonas H3 y H4 de humano y <i>L. major</i>	59
Figura 23	Identificación de modificaciones presentes en las histonas H3 y H4 en <i>L. major</i>	59
Figura 24	Distribución de la histona H3 en los genes del rRNA de <i>L. major</i>	60
Figura 25	Distribución de modificaciones de histonas asociadas con la activación transcripcional en los genes del rRNA de <i>L. major</i>	62
Figura 26	Análisis de inmunofluorescencia y de FISH de los genes del rRNA	63
Figura 27	Distribución de la histona H4K20me3 en los genes del rRNA de <i>L. major</i>	64
Figura 28	Esquema de la distribución de nucleosomas, histona H3, y marcas de eucromatina y H4K20me3 en la unidad del rRNA de <i>L. major</i>	65
Tabla 1	Oligonucleótidos empleados para amplificar los fragmentos de <i>L. major</i> .	33

1. RESÚMENES

1.1 Resumen

Leishmania es un protozoo tripanosomátido que causa la leishmaniasis en humanos. Este parásito se caracteriza por presentar mecanismos de expresión genética atípicos como la transcripción policistrónica. Poco se sabe acerca de la estructura nucleosomal y regulación epigenética de la transcripción en *Leishmania*. En el presente trabajo se analizó la arquitectura de la cromatina en genes transcritos por las tres RNA polimerasas (Pol) de *L. major*. Para ello se realizaron Southern blots empleando cromatina parcialmente digerida con MNasa y sondas de genes transcritos por las tres RNA polimerasas. Se encontró que la región promotora de los genes del rRNA, transcritos por Pol I, está libre de nucleosomas, al igual que la región promotora de genes transcritos por Pol II y genes transcritos por Pol III como los tRNAs y el gen rRNA 5S. Por otra parte, el espaciador intergénico de los genes del rRNA presentó una estructura nucleosomal compacta, similar a la observada en los genes y regiones intergénicas transcritas por Pol II. Por último, la región codificante del rRNA presentó una estructura nucleosomal intermedia. La distribución de diferentes histonas modificadas fue analizada mediante ensayos de inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP) en la unidad del rRNA, revelando que H3K14ac, H3K23ac y H3K27ac, marcas epigenéticas relacionadas con activación transcripcional, están enriquecidas en la región promotora. En contraste, la marca H4K20me3, asociada con silenciamiento transcripcional, se encontró ausente de la región promotora, pero enriquecida en el extremo 3' de la región codificante del rRNA. Finalmente, el patrón de distribución de H3K9me3, generalmente asociada a la formación de heterocromatina, fue muy parecido al patrón mostrado por marcas de eucromatina, sugiriendo que esta modificación podría estar involucrada en la activación transcripcional de los genes que codifican el rRNA en *L. major*.

1.2 Abstract

Leishmania is the trypanosomatid protozoa that produces leishmaniasis in humans. The parasite possesses atypical mechanisms of gene expression, including polycistronic transcription. Little is known about nucleosome structure and epigenetic regulation of transcription in *Leishmania*. Here we analyze the chromatin architecture of genes transcribed by the three RNA polymerases (Pol) in *L. major*. Southern blots of MNase-partially-digested chromatin with DNA probes spanning the whole rRNA gene repeat, transcribed by Pol I, showed that the intergenic spacer presents a tight nucleosomal structure, whereas the promoter region is practically devoid of nucleosomes. Intermediate levels of nucleosomes were found in the rRNA coding regions. Protein-coding genes and intergenic regions transcribed by Pol II showed a strong nucleosomal structure. In contrast, tRNA and 5S rRNA genes, transcribed by Pol III, presented a marked smearing in the MNase digestion profile that indicates an open chromatin structure. The distribution of some histone modifications was analyzed by ChIP assays in the rRNA genes, showing that H3K14ac, H3K23ac and H3K27ac, epigenetics marks that are generally associated with activation of transcription, are enriched in the promoter region. In contrast, H4K20me3, which is generally related to transcriptional silencing, was absent from the promoter region and enriched in the 3' end of the coding region. Interestingly, the distribution pattern for H3K9me3, generally linked to heterochromatin formation, was very similar to the distribution observed with the euchromatin marks, suggesting that this modification is involved in transcriptional activation of rRNA genes in *L. major*.

2. INTRODUCCIÓN

2.1 Generalidades sobre *Leishmania*

Leishmania es un parásito protozoo que pertenece a la familia *Trypanosomatidae*, la cual incluye a otros parásitos como *Trypanosoma brucei* y *Trypanosoma cruzi*. *Leishmania*, agente causal de la leishmaniasis, fue observado por primera vez por Cunningham en 1885 y descrito posteriormente por Leishman en 1900 y Donovan en 1903. Existen cerca de 20 especies de *Leishmania* que son patógenas para el hombre y alrededor de 30 especies de insectos que transmiten al parásito en todo el mundo (Antinori, et al., 2012; Kayne y Scott, 2011; WHO, 2015).

Leishmania produce desde úlceras leves en la piel hasta infecciones de órganos internos que pueden producir la muerte del individuo. 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 también produce 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 (Fig. 1) (Handman, 2000).



Figura 1. Leishmaniasis cutánea (A), mucocutánea (B) y visceral (C) (www.cuidatusaludcondiane.com/leishmaniasis/; www.studyblue.com/notes/n/parasites/deck/9370598; www.emedmd.com/content/leishmaniasis).

La leishmaniasis es endémica de regiones tropicales y subtropicales de África, América, Asia y algunas zonas de Europa localizadas alrededor del mar Mediterráneo (Fig. 2). La Organización Mundial de Salud (OMS) considera que 310 millones de personas en todo el mundo corren el riesgo de contraer la leishmaniasis visceral, la cual causa 20 000 muertes anualmente, y aproximadamente 1 millón de casos de leishmaniasis cutánea se han reportado en los últimos 5 años (WHO, 2015).

En América Latina se han reportado casos de los tres tipos de leishmaniasis. En México cada año se presentan cerca de 800 casos de la enfermedad. El estado con mayor número de casos es Chiapas, aunque hay reportes en otros estados como Guerrero, Puebla, Morelos, Veracruz, Tabasco, Oaxaca, Nayarit, Yucatán, Quintana Roo, Campeche, Coahuila, Jalisco y Sinaloa. (Alvar, et al., 2012; <http://www.epidemiologia.salud.gob.mx/>).

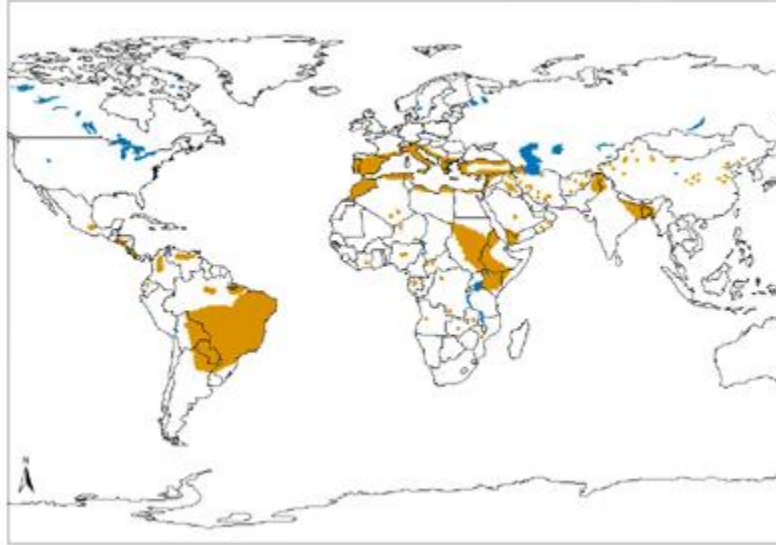


Figura 2. Mapa de la distribución de Leishmaniasis visceral en el mundo (www.who.int/leishmaniasis/leishmaniasis_maps/en/).

Leishmania habita en dos hospederos 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 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. El estadio de amastigote crece y se reproduce dentro de los fagolisosomas de los macrófagos, es ovalado y presenta un flagelo muy corto (Fig. 3) (Vannier-Santos, et al., 2002).

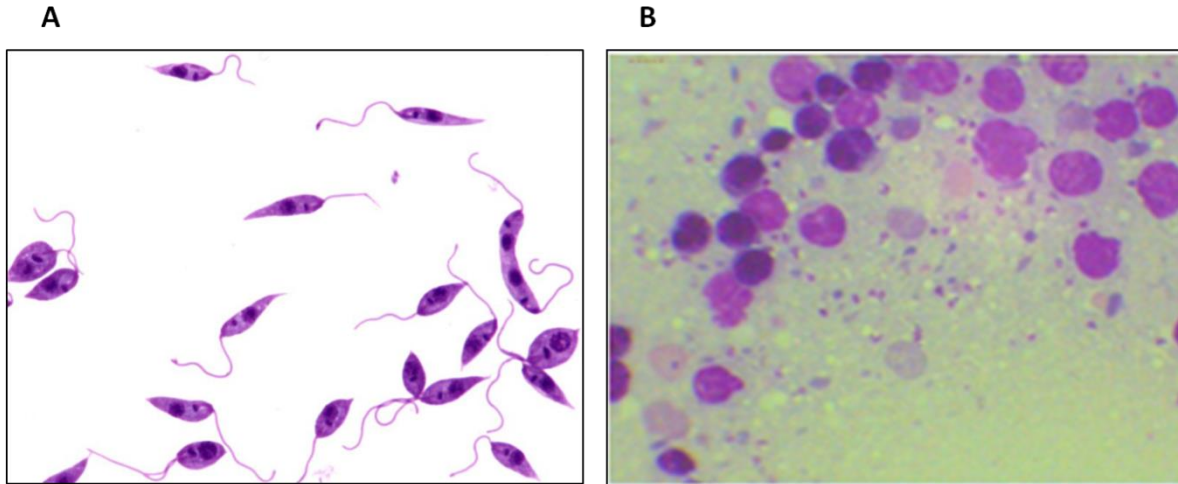


Figura 3. *Leishmania* spp. Se muestran promastigotes (A) y amastigotes (B). (www.alfaveterinaria.es/wp-content/uploads/2013/06/leishmania-donovani-promastigotes.jpg; www.workforce.calu.edu/Bucklelew/Leishmania%20donovani%20spleen%20smear.htm).

La infección en el hombre comienza cuando una mosca de la arena infectada pica e inyecta en la sangre a los promastigotes metacíclicos, que son las formas infecciosas. Una vez en el mamífero, los promastigotes son fagocitados por los macrófagos donde se diferencian en amastigotes que se reproducen dentro de fagolisosomas. Después, los amastigotes producen la lisis del macrófago por carga parasitaria y al ser liberados pueden infectar otras células, o ser ingeridos por una mosca de la arena. En el intestino del insecto, los amastigotes se diferencian en promastigotes procíclicos, los cuales se reproducen y migran hacia la probóscide, donde se diferencian a promastigotes metacíclicos infectivos (Fig. 4). *Leishmania* también puede ser transmitido al humano mediante transplantes de órganos, transfusiones de sangre o por jeringas infectadas con el parásito.

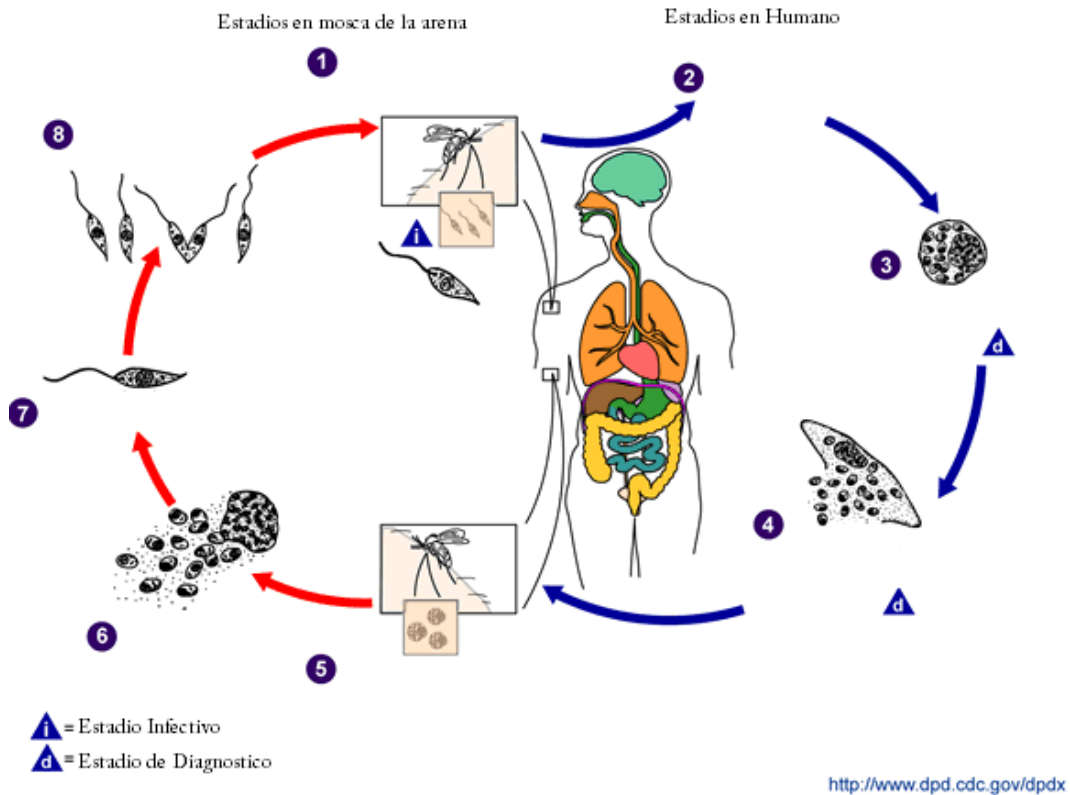


Figura 4. Ciclo de vida de *Leishmania* spp. Se muestran los estadios del parásito y su desarrollo tanto en mamíferos como en el vector. (1) La mosca de la arena se alimenta de sangre e inyecta promastigotes en la piel. (2) Los promastigotes son fagocitados por los macrófagos. (3) Los promastigotes se 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.

Debido a su complicado ciclo de vida, *Leishmania* debe regular de manera fina y precisa la expresión de sus genes para adaptarse a las diversas condiciones fisiológicas de sus dos hospederos. Además, *Leishmania* y otros tripanosomátidos se caracterizan por presentar mecanismos de expresión genética atípicos, diferentes a los presentes en otros eucariontes, como el *trans-splicing* y la transcripción policistronica. Así, nuestro grupo de trabajo está interesado en el estudio de los mecanismos de expresión génica en *L. major*, la cepa de referencia del Proyecto del Genoma de *Leishmania*. En particular estamos interesados en la identificación y caracterización de regiones promotoras y factores de transcripción, así como en el estudio de la regulación epigenética.

2.2 Transcripción en eucariontes

En células eucariontes el DNA está localizado en el núcleo, donde es transcrito para formar diferentes tipos de moléculas de RNA, involucradas 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, post-transcripcionalmente, o durante la traducción. Las enzimas encargadas de sintetizar los diferentes tipos de RNA son las RNA polimerasas, destacando tres tipos principales de RNA polimerasas: Pol I, Pol II y Pol III. La Pol I está involucrada en la síntesis de los RNA ribosomales (rRNA) 18S, 5.8S y 28S. Pol II participa en la síntesis de los RNA mensajeros (mRNA) y la mayoría de los RNAs pequeños nucleares (snRNAs), entre otras moléculas de RNA. Por su parte, Pol III sintetiza moléculas de RNA pequeñas que son esenciales para el crecimiento celular tales como: los RNAs de transferencia (tRNAs), el rRNA 5S y el snRNA U6, entre otras (Paule y White, 2000). 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 (Geiduschek y Kassavetis, 2001; Hu, et al., 2002).

La transcripción de los genes del rRNA (rDNA) por Pol I requiere la formación de un complejo de pre-inicio en el promotor, que incluye a UBF (upstream binding factor) y el factor de selectividad del promotor llamado SL1 en humano y TIF-IB en ratón. Este último contiene a TBP (*TATA binding protein*) y varios factores asociados a TBP específicos de Pol I (TAF_{1s}). Los TAF_{1s} tienen un papel muy importante en el ensamblaje del complejo de transcripción, pues ayudan a la interacción entre el promotor y Pol I (revisado en McStay y Grummt, 2008). En la mayoría de las especies, los promotores de los genes de rDNA tienen una organización estructural muy parecida, la cual consta de dos dominios esenciales: un elemento río arriba cerca de la posición -50 llamado elemento

promotor río arriba (UPE), y un dominio promotor central cerca del sitio de inicio de la transcripción +1 (Inr) (Fig. 5) (Russell y Zomerdijk, 2005).

Los genes del rRNA tienen la mayor tasa transcripcional en eucariontes ya que son necesarios para formar a los ribosomas, encargados de la síntesis de proteínas. Estos transcritos representan más del 60% de la transcripción nuclear total (Warner, 1999). Los genes del rRNA, localizados en el nucléolo, están arreglados como repetidos en tándem de genes idénticos y separados por secuencias espaciadoras. En *S. cerevisiae* existe un arreglo único de aproximadamente 150 repetidos de genes del rRNA (Warner, 1999). Algunas de estas copias se transcriben sólo en alguna etapa del crecimiento celular (Reeder, et al., 1999; Russell y Zomerdijk, 2006). Los genes que contienen la secuencia codificante ribosomal son transcritos en conjunto formando un precursor largo de RNA (35S a 47S rRNA, dependiendo del organismo), el cual es procesado para formar los rRNAs maduros (18S, 5.8S y 25/28S) (revisado en Hamperl, et al., 2013).

Con respecto a Pol II, se ha demostrado que la región promotora basal incluye al sitio de inicio de la transcripción (+1) y varias secuencias flanqueantes. La región promotora está formada por aproximadamente 40 bases y contiene subregiones funcionales llamadas elementos núcleo del promotor, entre los que se incluye la caja TATA, el elemento iniciador (Inr), el elemento promotor río abajo (DPE), un elemento de reconocimiento de TFIIB (BRE), y los elementos core del promotor río abajo (DCE). Los elementos en cis que constituyen al núcleo del promotor dirigen el reclutamiento y ensamblaje del complejo de pre-inicio (PIC), el cual está compuesto por Pol II y los factores de transcripción generales TFIIA, TFIIB, TFIID, TFIIIE, TFIIF y TFIIH (Fig. 5). TFIIB se une a las secuencias BRE, mientras que TFIID se une a la caja TATA y al Inr (Lee y Young, 2000; Juven-Gershon, et al., 2008; Sainsbury, et al., 2015; Roy y Singer, 2015).

Pol I: rDNA



Pol II: mRNA

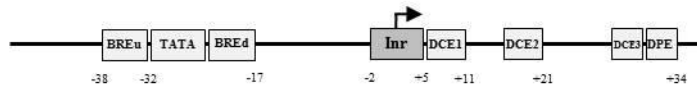


Figura 5. Promotores de genes transcritos por Pol I y Pol II. El sitio de inicio de la transcripción (SIT, +1) es indicado con la flecha. En los genes del rRNA se muestran los elementos: *upstream promotor element* (UPE) y el elemento iniciador (Inr). Para los genes transcritos por Pol II se muestran varios elementos que pueden o no presentarse en distintos genes: elemento iniciador (Inr); caja TATA (TATA); elemento de reconocimiento de TFIIB (BRE), que puede localizarse río arriba (BREu) o río abajo de la caja TATA (BREd); elemento promotor río abajo (DPE); y por último los elementos *core* río abajo (DCE1-3) (revisado en McStay y Grummt, 2008; Lee y Young, 2000; Juven-Gershon, et al., 2008)

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, los promotores de Pol III se agrupan en tres categorías distintas (Fig. 6). 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, presentes en los genes de tRNA, 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. Por último, 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 (PSE) en la posición -60, y un dominio distal (DSE) aún más alejado del SIT, alrededor de la posición -200. Este tipo de promotor lo presenta el snRNA U6 (Paule y White, 2000).

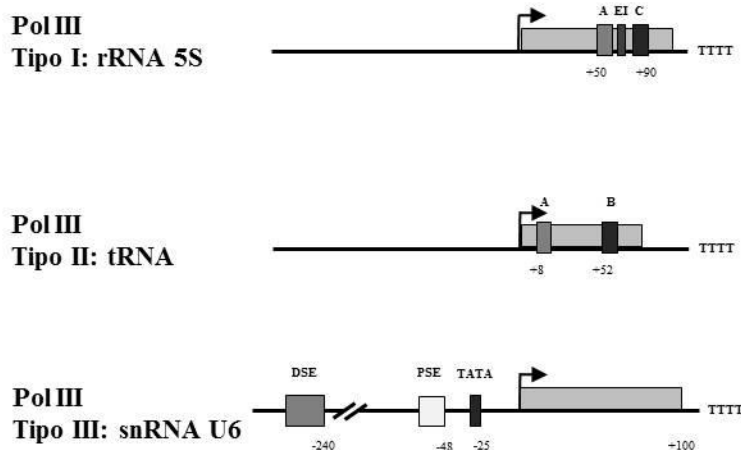


Figura 6. Tipos de Promotores de Pol III. El sitio de inicio de la transcripción (SIT) es indicado por +1 y la flecha, y el sitio de terminación es indicado por Ts. También se muestran la posición de varios elementos promotores, incluyendo el elemento intermedio (EI), el elemento de la secuencia proximal (PSE), el elemento de la secuencia distal (DSE), y las cajas A, B y C (revisado en Willis, 1993; Paul y White, 2000).

Además de Pol III, varios factores generales de transcripción están involucrados en la síntesis de RNA. Entre éstos los mejor estudiados son TFIIB, TFIIB y TFIIC. TFIIB se considera como el factor general para la iniciación de la transcripción de Pol III, ya que se requiere para los tres tipos de promotores. TFIIB es un factor específico de los promotores tipo I (rRNA 5S), en donde reconoce la caja A. En el caso de los promotores tipo III, el factor SNAPc se une al elemento de secuencia proximal (PSE) y Oct-1 al elemento de secuencia distal (DSE), lo que facilita la asociación de TFIIB 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 (Revisado en Martínez-Calvillo, et al., 2010).

2.3 La cromatina y su papel en la transcripción

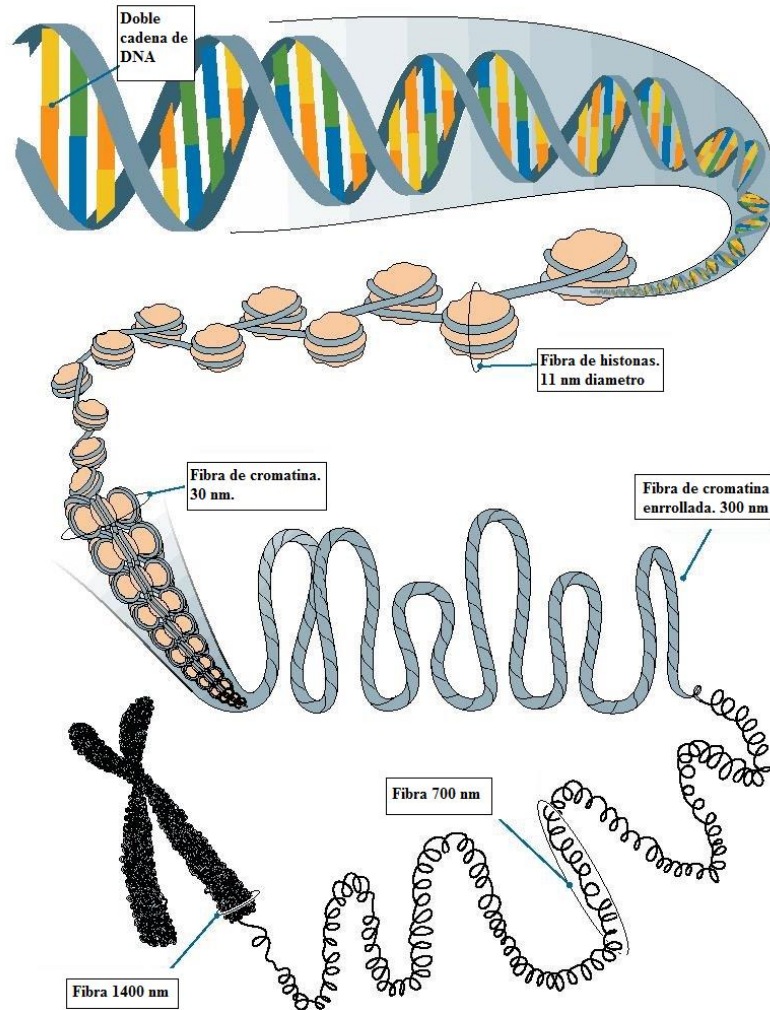
El DNA de un organismo se asocia a proteínas para formar la cromatina y así empaquetarse dentro del núcleo (Fig. 7A). El empaquetamiento del material genético en cromatina genera un obstáculo para diferentes procesos de regulación dependientes de DNA como: transcripción, replicación, recombinación y reparación del DNA (Recillas, 2000). La unidad estructural de la cromatina es el

nucleosoma, el cual contiene cerca de 180 nucleótidos de DNA que dan dos vueltas alrededor del octámero de histonas formado por dos copias de las histonas H2A, H2B, H3 y H4 (Fig. 7B). Una copia de la histona H1 se une a los 40 pb de DNA que unen a un nucleosoma con el siguiente (DNA *linker*) (William, et al., 2006). Las histonas representan alrededor del 50% del peso de la cromatina, y tienen una longitud de 123 ± 14 aminoácidos, con un peso molecular de 13.5 ± 1.5 kDa y punto isoeléctrico de 11 ± 0.5 y un diámetro de alrededor de 10 nm (Alsford y Horn, 2004). 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).

La cromatina, además de empaquetar el DNA, puede regular 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 sufrir continuamente procesos de compactación y descompactación, organización y localización precisa dentro del núcleo (Recillas, 2000).

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 cromatina existe al menos en dos 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, así como en genes transcripcionalmente inactivos. La mayoría de las regiones transcritas de DNA se encuentran en eucromatina (Lodish, *et al.*, 2008).

A



B

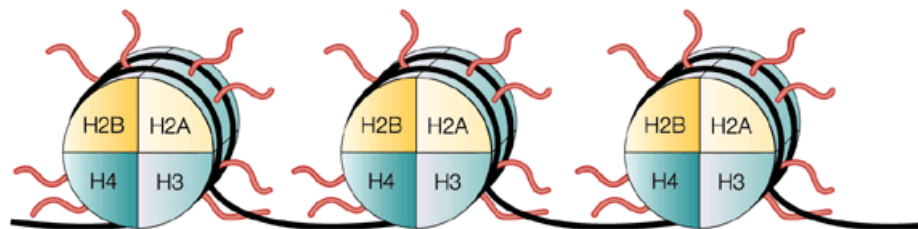


Figura 7. (A) Niveles de compactación del DNA. Se muestran los diferentes niveles de compactación del DNA hasta formar cromosomas (tomada de: <http://preupsubiologia.googlepages.com/cromatina.jpg/cromatina-full.jpg>). (B) Nucleosomas. Se muestran a las histonas H2A, H2B, H3 y H4 que conforman el núcleo de los nucleosomas, los cuales forman la cromatina al unirse con el DNA. Los filamentos que sobresalen de los nucleosomas representan las colas de histonas, las cuales sufren modificaciones como la acetilación y la metilación. La histona H1, que se une entre nucleosomas, no se muestra.

La secuencia de aminoácidos de las cuatro histonas que forman el centro del nucleosoma (H2A, H2B, H3 y H4) está altamente conservada entre distintas especies. En contraste, la histona H1 varía de organismo a organismo (Alberts, et al., 2002). Cada histona contiene extremos N-terminales de 19-39 residuos que se extienden desde la estructura globular del nucleosoma, y son llamadas “colas de histonas”, las cuales son requeridas para la condensación de la cromatina, ya que son las que sufren principalmente modificaciones post-traduccionales como: acetilación, metilación, fosforilación, ADP-ribosilación, ubiquitinación o sumoilación (Alsford y Horn, 2004). Las histonas en un nucleosoma específico pueden colectivamente tener diferentes tipos diferentes de modificaciones. Las combinaciones particulares de las modificaciones post-traduccionales encontradas en diferentes regiones de la cromatina forman un “código de histonas” que influye en la función de la cromatina, ya sea creando o removiendo sitios de unión para proteínas asociadas a la cromatina. 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 abierta o cerrada (Lodish, et al., 2008). Algunos dominios presentes en las proteínas que se asocian con las colas de histonas juegan un papel importante 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 a cromatina activa transcripcionalmente. BDF1 es una proteína que se asocia con el factor de transcripción TFIID, y contiene un bromodominio que le ayuda a asociarse con la cromatina transcripcionalmente activa (Lodish, et al., 2008).

Existen variantes de histonas, proteínas muy parecidas a las histonas canónicas, que son expresadas a muy bajos niveles en contraste con sus contrapartes convencionales. Las variantes de histonas tienen una expresión y localización específica, y confieren nuevas propiedades funcionales y estructurales a los nucleosomas. Por ejemplo, la variante de histona H2AZ en *S. cerevisiae* (Htz1) está enriquecida en regiones transcripcionalmente activas, evitando la propagación de la heterocromatina y facilitando la elongación de Pol II (Meneghini, et al., 2003; Santisteban, et al., 2011).

Otra forma de regulación descrita es aquella controlada por los complejos de remodelación de la cromatina, que son complejos proteicos dependientes de la energía de la hidrólisis del ATP para cambiar temporalmente la estructura de los nucleosomas o añadir variantes de histonas. Por lo general los dímeros H2A-H2B en el núcleo de histonas son removidos, pues los tetrámeros H3-H4 son particularmente más estables y difícilmente son re-arreglados. Gradualmente el estado de remodelamiento puede revertirse. 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. Los complejos de remodelación también participan en el intercambio de histonas canónicas por variantes de histonas (Lodish, et al., 2008).

La conformación de la cromatina depende en gran medida de la histona H1, que inhibe la transcripción de los genes mediante el empaquetamiento de nucleosomas adyacentes en una organización más condensada que impide el ingreso de los factores de transcripción y la RNA polimerasa. Por otro lado, parece existir una competencia por modificar el residuo de lisina localizado en la novena posición de la histona H3 (H3K9), ya que si es acetilado la histona se desestabiliza y puede causar la disociación del DNA; en cambio, si es metilado se incrementa la estabilidad del nucleosoma con el DNA impidiendo su disociación o movimiento. Una histona metilada puede funcionar como sitio de unión para enzimas que metilan al DNA; una vez que este sitio es metilado puede estabilizar aún más al nucleosoma. El DNA metilado puede también unirse más eficientemente a la histona H1, formando una estructura muy compacta (Scott, 2005).

La nucleasa micrococcal (MNasa) es una endonucleasa ampliamente usada para analizar la estructura nucleosomal. La enzima corta los segmentos del DNA que unen a los nucleosomas (DNA *linker*), generando inicialmente grupos de nucleosomas y finalmente partículas nucleosomales individuales. Cuando la cromatina se digiere parcialmente con MNasa y se analiza el DNA mediante

electroforesis se observa una escalera en la que la banda inferior corresponde a un nucleosoma individual (alrededor de 180 pb) y las bandas superiores corresponden a multímeros nucleosomales (dímeros, trímeros, etc.). Así, se ha observado que la longitud del DNA presente en el nucleosoma varía de entre 180-200 pb en muchas especies, aunque en algunos hongos se ha reportado que el DNA asociado al nucleosoma es de sólo 154 pb; mientras que en erizo de mar tiene un tamaño de 260 pb. De igual manera, se ha reportado que el tamaño del DNA entre nucleosomas (DNA *linker*) varía entre distintas especies y tipos celulares entre 10 y 90 pb. Durante la replicación celular el DNA es ensamblado en nucleosomas cortos después de pasar por la horquilla de replicación. Este proceso depende de chaperonas específicas que se unen a las histonas y las ensamblan al DNA recién replicado, reconstituyendo el nucleosoma (Lodish, et al., 2008).

2.4 Epigenética en genes transcritos por las tres RNA Polimerasas

La estructura de la cromatina regula la expresión de un gen, pues al estar empacado el DNA en nucleosomas se impide el acceso de los factores de transcripción y de las RNA Polimerasas al DNA. Con respecto a los genes transcritos por Pol I y su alta tasa transcripcional, se ha sugerido desde hace tiempo que carecen de una estructura nucleosomal definida. Evidencia de que los genes del rRNA inactivos transcripcionalmente son selectivamente reprimidos por la estructura de la cromatina proviene de estudios usando la técnica de psoralen *cross-linking*. Los genes del rRNA activos transcripcionalmente forman un “*cross-link*” con el psoralen, indicando una estructura de la cromatina abierta, posiblemente libre de nucleosomas; mientras que los genes del rRNA inactivos son resistentes al entrecruzamiento con psoralen, indicando que el DNA está empaquetado en nucleosomas (Conconi, et al., 1989; Dammann, et al., 1993; Dammann, et al., 1995; revisado en Grummt y Pikaard, 2003). En contraste, estudios previos digiriendo cromatina con MNasa sugieren que los genes del rRNA activos tienen al menos algún tipo de estructura nucleosomal (Lohr, 1983), y

estudios usando formaldehído y cross-linking con UV han demostrado que están asociados con histonas (Belikov, et al., 1990; Dimitrov, et al., 1992).

Asimismo, se ha visto la presencia de modificaciones post-traduccionales en las histonas tanto en genes ribosomales activos como inactivos. Por ejemplo, genes activos se caracterizan por tener metilada la lisina 4 de la histona H3 (H3K4me₂₋₃), también la lisina 32 de la histona H3 (H3K32me₁₋₂) o acetilada la lisina 12 en la histona H4 (H4K12ac). Los genes del rRNA activos también se caracterizan por presentar DNA hipometilado. Por otro lado, los genes inactivos presentan marcas epigenéticas represivas como hipermetilación del DNA, y trimetilación de H3K9, H3K27 y H4K20. H3K9me₃ se asocia a la proteína de la heterocromatina 1 (HP1) que está involucrada en la formación de la heterocromatina (Revisado en Goodfellow y Zomerdiik, 2013; Németh, et al., 2008; McStay y Grummt, 2008, Grummt y Pikaard, 2003; McStay y Grummt, 2008; Bannister, et al., 2001). La metilación del DNA es la adición covalente de un grupo metilo en la posición 5' de las citidinas dentro del dinucleótido CpG, la cual generalmente correlaciona con represión transcripcional. La metilación en el DNA de los genes ribosomales ayuda a dar estabilidad genómica, evitando la recombinación génica en estas regiones ribosomales que son muy repetidas en el genoma (Kobayashi, 2008).

Cabe destacar que cerca de la mitad de todos los genes del rRNA se encuentran transcripcionalmente apagados en algún momento dado (Conconi, et al., 1989; French, et al., 2003). El silenciamiento de los genes del rRNA es llevado a cabo principalmente por un complejo remodelador de la cromatina llamado NoRC en eucariontes superiores (Santoro y Grummt, 2005; Strohner, et al., 2004). NoRc y SIN3 son reclutados al promotor de Pol I a través de la interacción con el factor de transcripción TTF1 (Zhou, et al., 2002), lo que permite remodelar y modificar covalentemente a los nucleosomas a lo largo de los genes del rRNA, así se impide que Pol I se una y transcriba. La desacetilación y metilación de las colas de histonas, así como la metilación de DNA, ayudan a mantener apagados a los

genes ribosomales. Los genes del rRNA activos son transcritos a una alta tasa transcripcional de aproximadamente 50 complejos de Pol I por gen (French, et al., 2003).

En genes transcritos por Pol II recientemente se ha demostrado que la región promotora tiene menor densidad nucleosomal que la región codificante (Bernstein, et al., 2004; Sekinger, et al., 2005). Más aún, se ha observado que Pol II puede transcribir regiones de DNA empaquetadas en nucleosomas (Lorch, et al., 1987, Lorch, et al., 1988). También se ha demostrado que la región de sitio de inicio de la transcripción (~200 pb) está libre de nucleosomas, pero que está flanqueada por dos nucleosomas bien posicionados que contienen marcas de activación, como acetilación de H3 y H4 (Yuan, et al., 2005). Principalmente la marca de activación H3K4me3 está enriquecida en los extremos 5' de genes transcripcionalmente activos, y se ha observado que el nivel de acetilación es proporcional a la tasa de transcripción (Pokholok, et al., 2005). Por el contrario, marcas relacionadas con represión transcripcional, como H3K27me3, están enriquecidas en la región promotora en genes apagados (revisado en Bing, et al., 2007).

Con respecto al estado de la cromatina en genes transcritos por Pol III se conoce poco. El mapeo de nucleosomas en el genoma completo (*Genome Wide*) ha mostrado una baja densidad nucleosomal en genes altamente transcritos por Pol III, presumiblemente debido a la presencia de regiones promotoras internas (Lewin, 2004; Lee, et al., 2004). En estudios realizados en *Xenopus* para evidenciar el efecto de las histonas sobre la transcripción de Pol III, se inyectó mRNA de la histona H1 a embriones obteniendo una represión substancial del gen del 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 habla de que la transcripción de Pol III está fuertemente regulada por la estructura de los nucleosomas.

Evidencia experimental ha demostrado que en el rRNA 5S existe un nucleosoma posicionado en el cuerpo del gen, el cual ayuda a reprimir la transcripción (Shimamura, et al., 1988). La accesibilidad de TFIIIA a la caja C es modulada por el desplazamiento de este nucleosoma (Dong, et al., 1990). Esta modulación de la unión de TFIIIA por el posicionamiento de un nucleosoma es la razón por la cual existe una regulación diferencial en la transcripción del rRNA 5S en *Xenopus* (Yang y Hayes, 2003). En trabajos recientes con genes de tRNA se ha visto que el gen SUP4 de levadura es regulado por nucleosomas que lo flanquean, aun cuando el cuerpo del gen está libre de nucleosomas (Mahapatra, et al., 2011).

En resumen, existe amplia evidencia experimental que indica que la estructura de la cromatina juega un papel muy importante en la regulación de la transcripción llevada a cabo por las distintas RNA polimerasas eucariontes.

2.5 Expresión génica en tripanosomátidos

Leishmania y otros tripanosomátidos se caracterizan por presentar mecanismos de expresión genética atípicos, diferentes a los presentes en otros organismos eucariontes. Entre éstos se encuentra la transcripción policistrónica, el trans-splicing y la presencia de un número reducido de regiones promotoras (revisado en Martínez-Calvillo, et al., 2010).

2.5.1 Organización del genoma y transcripción policistrónica

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 (Myler, et al., 1999, Martínez-Calvillo, et al., 2003). Las unidades policistrónicas se hicieron evidentes al ser publicada la secuencia

completa del cromosoma 1 de *L. major*, pues 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 (Myler, et al., 1999). 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.

Una característica muy importante de los parásitos de la familia *Trypanosomatidae*, incluida *Leishmania*, es que la transcripción es policistrónica para genes transcritos por la RNA Polimerasa II. En otras palabras, la transcripción de Pol II inicia exclusivamente río arriba del primer gen de cada unidad policistrónica, y se generan transcritos primarios largos, los cuales deben ser procesados para obtener a los mRNA maduros; éstos se producen por transplicing, proceso por medio del cual se agrega una secuencia de 39 nucleótidos al extremo 5' de cada mRNA. Esta secuencia es conocida como miniexon o RNA spliced leader (SL-RNA). Como ocurre en otros organismos, en el extremo 3' de los mRNA de los tripanosomátidos se agrega un tracto de adeninas (Van del Ploeg, 1986).

Si bien todos los genes que forman parte de una unidad policistrónica se transcriben a una misma tasa, no todos los mRNAs generados son estables y traducidos en un momento determinado. Así, la expresión genética es principalmente regulada a nivel post-transcripcional en los tripanosomátidos. La vida media de los mRNA y su nivel de traducción son controlados por secuencias cortas presentes en las regiones no traducidas, principalmente en la región 3'-UTR (Haile y Papadopoulou, 2007).

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) (Fig. 8). 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).

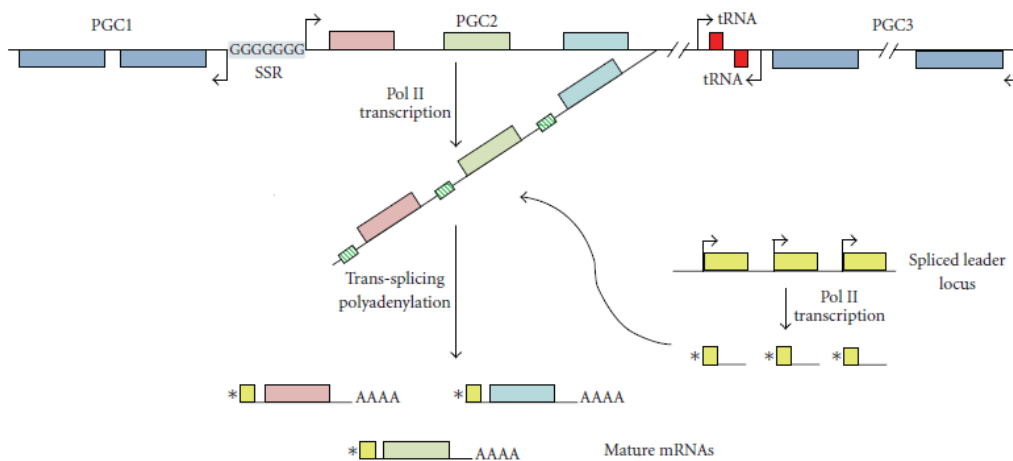


Figura 8. Organización de los genes y producción de los mRNA en tripanosomátidos. Se muestra un cromosoma hipotético formado por tres unidades policistrónicas (PGC1 a PGC3). En la región SSR, Pol II inicia la transcripción de PGC1 y PGC2, generándose transcritos primarios largos (mostrado sólo para PGC2, para simplificar la figura), los cuales son procesados por trans-splicing y poliadenilación para originar los mRNA maduros. Los genes del *spliced leader* son transcritos también por Pol II, en loci independientes (modificada de Martínez-Calvillo, et al., 2010).

2.5.2 Regiones promotoras y factores de transcripción

Los tripanosomátidos, al divergir muy temprano del linaje eucariótico, presentan secuencias promotoras no conservadas con eucariontes superiores, lo que ha dificultado la identificación y caracterización de dichas regiones promotoras. A la fecha el único promotor de Pol II que ha sido ampliamente caracterizado es el del gen que codifica para el 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) (Fig. 9).

En *T. brucei* 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 (Fig. 9). Aunque no es muy claro cómo 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 de transcripción TFIIIB facilita la llegada de Pol III en ambos sitios. Al igual que en eucariontes superiores las secuencias ricas en timinas 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 timinas localizadas río abajo del gen (Martínez-Calvillo, et al., 2004).

En tripanosomátidos la mayoría de los genes de tRNA y rRNA 5S se encuentran agrupados en *clusters* en varios cromosomas, y cada gen parece contener un promotor y una región de término de la transcripción (Padilla-Mejía, et al., 2009). Aunque no han sido caracterizados funcionalmente los promotores, los genes de tRNA contienen secuencias similares a las típicas cajas A y B, mientras que los genes del rRNA 5S contienen cajas A y C, además del elemento intermedio (Fig. 9). Así, es muy probable que cada gen se transcriba independientemente generando RNAs monocistrónicos (a diferencia de los transcritos policistrónicos de Pol II). Con respecto a los genes del rRNA, en *L. major* ya se caracterizó el sitio de inicio de transcripción localizado a 1043 pb río arriba del gen del rRNA 18S y 184 pb río debajo de los repetidos de 63 pb presentes en los espaciadores intergénicos (región IGS). Un fragmento de 391 pb de la región -184 a +207 (relativo al sitio de inicio de transcripción) contiene al

promotor de Pol I. La transcripción de Pol I termina justo después del último gen de rRNA, antes de los repetidos de 63 pb (Martínez-Calvillo, et al., 2001). Por otro lado, en *T. brucei* ya fueron caracterizadas las regiones promotoras de las prociclinas y los genes variantes de superficie (VSGs) (Fig. 9). Tanto prociclinas como VSGs son transcritos por Pol I, lo que hace de *T. brucei* el único organismo en el que Pol I tiene la capacidad de transcribir genes codificadores de proteínas.

También fueron aislados y purificados complejos transcripcionales de Pol II y Pol III en *L. major* mediante la técnica de purificación por afinidad en tándem (TAP-tag), siendo identificadas 12 subunidades de Pol III (C160, C128, C82, C53, C37, C34, C17, AC40, AC19, ABC27, ABC23 y ABC14.5) y 10 subunidades de Pol II (ABC10 β , ABC23, ABC27, B220, B150, B44, B32, B16, ABC14.5, B12.6) (Martínez-Calvillo, et al., 2007). El análisis *in silico* del genoma de *L. major* permitió la identificación de los genes de otras de las subunidades de Pol II y Pol III, y de muchas de las subunidades de Pol I. Entre los factores de transcripción de Pol II identificados en tripanosomátidos se encuentra TFIIA, TFIIIB, TFIIH y TBP (revisado en Martínez-Calvillo, et al., 2010).

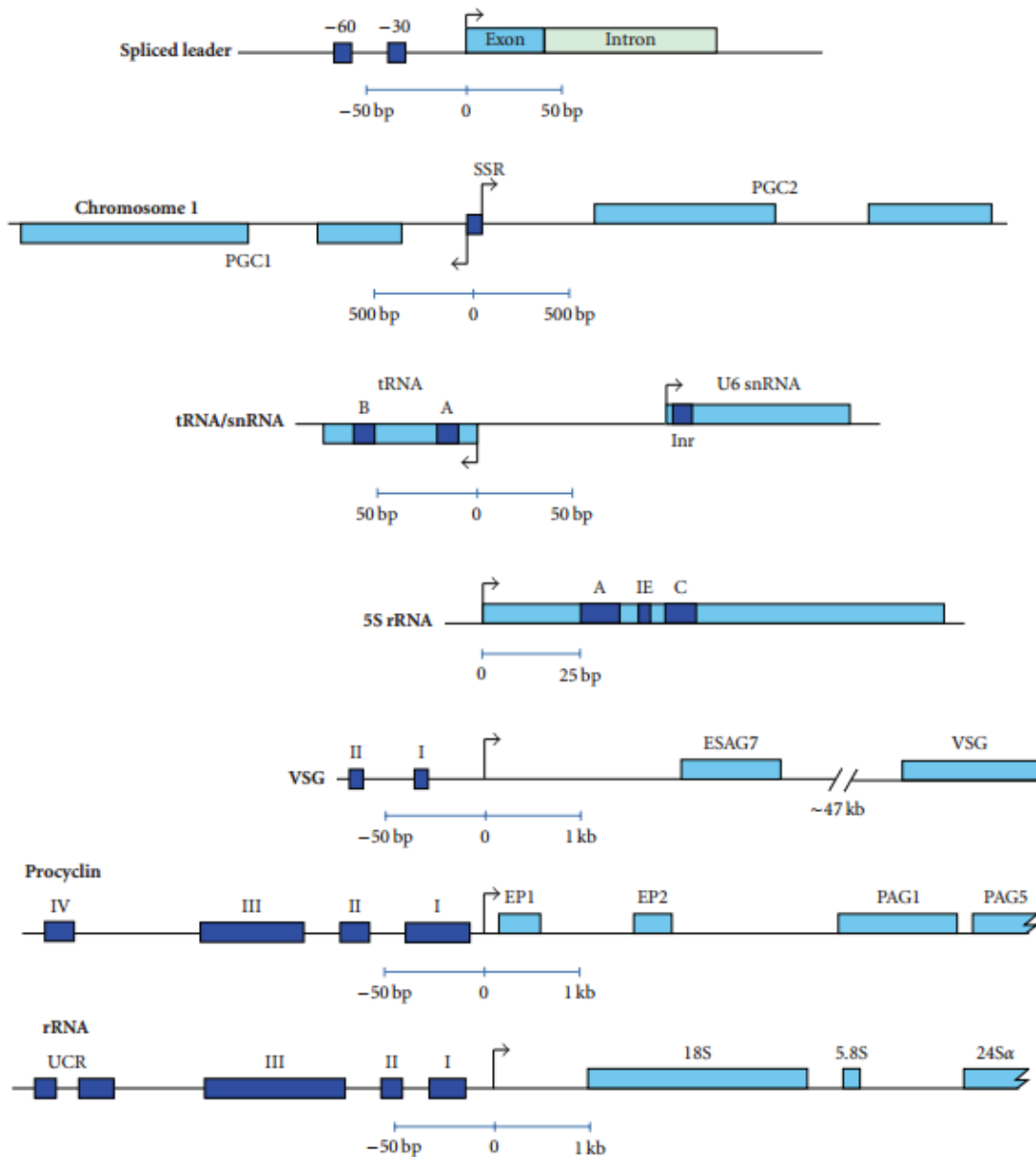


Figura 9. Representación esquemática de las regiones promotoras en tripanosomátidos. Los sitios de inicio de transcripción están marcados con flechas. Los elementos promotores requeridos para el inicio de la transcripción están anotados como cajas azules oscuras. Las regiones codificantes están en color azul claro. El *spliced leader* RNA y la región SSR del cromosoma I (transcrito por Pol II) corresponden a *L. tarentolae* y *L. major*, respectivamente. El locus tRNA/snRNA U6 y el rRNA 5S (transcritos por Pol III) corresponden a *T. brucei*. Los genes VSG, prociclina y rRNA (transcritos por Pol I) también corresponden a *T. brucei* (tomado de Martínez-Calvillo, et al., 2010).

2.5.3 Término de la transcripción

El término de la transcripción en tripanosomátidos es un proceso pobremente estudiado. Se ha reportado la presencia de un tracto de timinas (Ts), similar a las regiones ricas en Ts que están involucradas en el término de la transcripción de Pol III, que están localizadas río abajo del gen RNA miniexón que ayudarían al término de la transcripción de Pol II. Al menos seis Ts se requieren para un eficiente término de la transcripción *in vivo* en *L. tarentolae* (Sturm, et al., 1999). En cambio, la transcripción de genes codificadores de proteínas por parte de Pol II no termina en trectos ricos en Ts, ya que estas secuencias son muy comunes en las regiones intergénicas entre cada gen. Así, debe existir alguna diferencia funcional entre los complejos de Pol II que sintetizan al RNA miniexón y los que transcriben a los genes codificadores de proteínas. Es posible que mecanismos epigenéticos estén involucrados en tales diferencias.

En *L. major*, el término de la transcripción en el cromosoma 3, el cual contiene dos unidades policistrónicas convergentes separadas por un gen de tRNA, ocurre dentro de la región del tRNA (Worthey, et al., 1999; Martínez-Calvillo, et al., 2004). La presencia de una región de termino entre dos unidades policistrónicas convergentes sugiere que en *Leishmania*, al igual que en levadura, se podría requerir la separación de unidades transcritas por Pol II adyacentes por señales propias de término de la transcripción para impedir la colisión de polimerasas (Prescott y Proudfoot, 2002). Debido a que varias unidades policistrónicas están separadas por tRNAs o por otros genes transcritos por Pol III, se presume que éstos podrían servir como señales de término de la transcripción de Pol II (Padilla-Mejía, et al., 2009). Se ha reportado que la transcripción por Pol III del gen U2 snRNA de *T. brucei* termina en varias Ts localizadas río abajo del gen (Gunzul, et al., 1995).

En mamíferos el factor TTF-I se une al elemento terminador en el extremo 3' de la región transcrita de los genes del rRNA, forzando a Pol I a pausar en una región de DNA rica en Ts para inducir el término de la transcripción (Uliana, et al.,

1996, Jansa y Grummt, 1999). En *L. infantum*, la transcripción cesa río abajo del extremo 3' de los genes del rRNA, en una área que contiene secuencias cortas con el potencial de formar estructuras tipo tallo-asa (burbuja), las cuales son secuencias reminiscentes de terminadores transcripcionales de bacterias (Requena, et al., 1997). En *L. major* se ha descrito la presencia de secuencias similares en una región donde termina la transcripción (Martínez-Calvillo, et al., 2001).

2.6 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 los mecanismos epigenéticos podrían jugar un papel importante en la regulación de la expresión génica en estos organismos.

Los genes que codifican para las histonas H1, H2A, H2B, H3 y H4 están presentes en los tripanosomátidos; sin embargo, la estructura primaria de las histonas de estos organismos son divergentes, particularmente en los extremos N-terminal. Sin embargo, existen varios aminoácidos conservados. La histona H1 es la menos conservada cuando se compara entre organismos. Los tripanosomátidos tienen histonas H1 atípicas, pues carecen de un dominio globular, el cual es indispensable para formar una cromatina aún más compacta (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 generalmente en cromosomas diferentes. 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 (Alsford 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 MNasa 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. Los tripanosomátidos contienen muchas de las modificaciones de histonas presentes en otros organismos, aunque también presentan algunas modificaciones atípicas (Revisado en Figueredo, et al., 2009). Mediante espectrometría de masas y alineamientos de secuencias se ha inferido algunas modificaciones y su posible papel en la regulación de la transcripción. Experimentalmente se ha observado que H3K4me3, H3K9ac, H3K14ac, H4K5ac, H4K8ac, H4K10ac, H4K12ac y H4K16ac están enriquecidas en los sitios de inicio de la transcripción en los tripanosomátidos (Siegel, et al., 2009; Respuela, et al., 2008; Thomas, et al., 2009; Mandava, et al., 2007; Da Cunha, et al., 2006). Recientemente, se han identificado variantes de histonas que han sido involucradas en varios procesos celulares como variación antigénica y control del ciclo celular, entre otros. Por ejemplo, se ha encontrado a las variantes de histonas H2AZ y H2Bv cerca de los sitios de inicio de la transcripción (Janzen, et al., 2006, 2006b; Siegel, et al., 2008, 2009; Kawahara, et al., 2008; Figueiredo, et al., 2008, 2009, 2010); mientras que estudios ChIP-seq han mostrado que las variantes de histonas H3V y H4V están presentes en regiones de cambio de hebra convergentes (región SSR) y otras partes del genoma de *T. brucei* donde la transcripción termina (Fig. 10) (Siegel, et al., 2009).

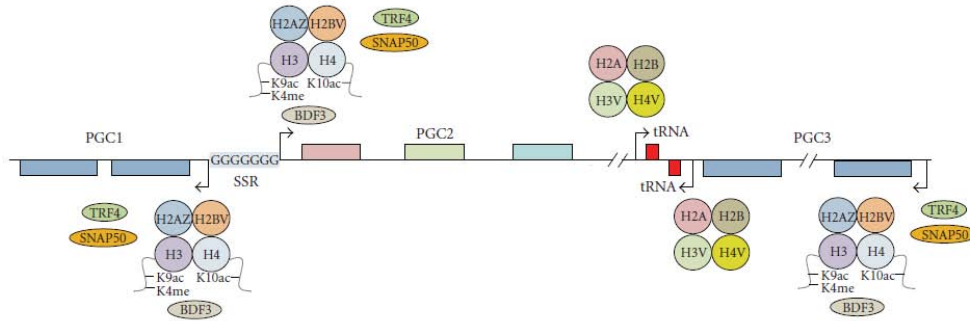


Figura 10. Epigenética en la transcripción en tripanosomátidos. En la parte superior se muestra un cromosoma hipotético con tres unidades policistrónicas (PGC1-3). Los sitios de inicio de transcripción están marcados con flechas. Tractos de Gs están generalmente en las regiones SSR. Nucleosomas cercanos a las regiones de inicio de transcripción contienen variantes de histonas como H2AZ y H2BV. El extremo N-terminal de las histonas está acetilado en H3K9 y H4K10, y metilado en H3K4. Se muestra al factor del bromodominio BDF3, los factores de transcripción TRF4 y SNAP50. Las regiones de término de transcripción están presentes variantes de histonas como H3V y H4V (revisado en Martínez-Calvillo, et al., 2010).

El estudio de la estructura de la cromatina en regiones transcritas por las tres RNA polimerasas de *Leishmania* resulta necesario para lograr entender los alcances de la regulación epigenética en los parásitos tripanosomátidos, los cuales son un grupo de organismos que divergieron tempranamente del linaje eucariótico. Así, en el presente trabajo se analizó la estructura nucleosomal en regiones de DNA transcritas por tres RNA polimerasas en *L. major*. Además, se seleccionó la unidad del rRNA de *L. major* para investigar la distribución de algunas histonas modificadas en estos genes y determinar su importancia en la regulación transcripcional de Pol I. La unidad del rRNA resulta un adecuado modelo de estudio considerando que se conocen las regiones de inicio y término de la transcripción (Martínez-Calvillo, et al., 2001). Además, la presencia de sólo 12 copias de la unidad en *L. major* sugiere fuertemente que todas ellas están activas en células en fase media de crecimiento logarítmico. Asimismo, resulta muy importante el estudio de los genes del rRNA debido a que existen resultados contradictorios en otros organismos con relación a la estructura nucleosomal en genes ribosomales activos.

3. ANTECEDENTES

La transcripción en los parásitos tripanosomátidos muestra algunas características atípicas en comparación con eucariontes superiores, entre los que se encuentra la transcripción policistrónica, carencia de promotores clásicos para genes transcritos por Pol II, entre otros (Martínez-Calvillo, et al., 2010).

Previamente se había encontrado en el parásito *Leishmania major* pocos sitios de inicio de la transcripción para genes transcritos policistronicamente por Pol II. Un solo sitio de inicio de transcripción sirve para transcribir de decenas y cientos de genes en conjunto (Martínez-Calvillo, et al., 2003); sin embargo, se sabe muy poco de cómo se regula el inicio de la transcripción en estas regiones, al igual que en genes transcritos por Pol I y Pol III. Genes de tRNA, transcritos por Pol III, se han encontrado en regiones donde termina la transcripción por Pol II (revisado en Padilla-Mejía, et al., 2009). Y existen cerca de 12 copias de los genes del rRNA, transcritos por Pol I, de los cuales se desconocen los mecanismos que regulan la transcripción de estos RNAs (Martínez-Calvillo, et al., 2001).

Un gran número de modificaciones post-traduccionales en las histonas se han identificado recientemente en tripanosomátidos. Estas incluyen varias modificaciones encontradas en eucariontes superiores, como la acetilación y metilación en varios residuos de lisinas en las histonas H3 y H4 (da Cunha, et al., 2006; Mandava, et al., 2007). Sin embargo, aún existen muchas modificaciones por estudiar, algunas de las cuales son exclusivas para estos organismos.

Nosotros tenemos un profundo interés en estudiar el estado de la cromatina en genes transcritos por las tres RNA polimerasas en *L. major*. A la fecha no se sabe muy bien la estructura de la cromatina en regiones promotoras y codificantes y menos se ha estudiado el papel de modificaciones post-traduccionales de histonas en el inicio y término de la transcripción.

4. OBJETIVOS

Objetivo general:

Analizar la arquitectura de la cromatina y su papel en la actividad transcripcional de *Leishmania major*.

Objetivos particulares:

1. Determinar y comparar la estructura nucleosomal en genes transcritos por las tres RNA polimerasas mediante digestiones con MNasa y ensayos Southern-Blot.
2. Evaluar una posible correlación entre la abundancia de la histona H3 y los patrones obtenidos mediante MNasa/Southern-Blot.
3. Determinar la abundancia de distintas marcas de activación y represión transcripcional a lo largo de los genes rRNA mediante CHIP.
4. Analizar la colocación de marcas epigenéticas de activación con la región que contiene el sitio de inicio de la transcripción de los genes del rRNA mediante Inmuno-FISH.

5. METODOLOGÍA

5.1 Cultivo de promastigotes de *Leishmania major*

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

5.2 Aislamiento del 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 min. 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 min. 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 min. 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 min. 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).

5.3 Clonación de fragmentos genómicos

Las secuencias de los fragmentos de genes transcritos por las tres RNA polimerasas (Chr01, Chr11-II y Chr27) de *L. major* fueron obtenidas de las bases de datos de GeneDB. Estos fragmentos fueron amplificados por PCR usando oligos específicos (Tabla 1). Las PCRs se hicieron usando DNAg, con mezclas de reacción que contenían 5 µl de Buffer Redtaq (10×), 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 1× (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 1×. Se corrieron los productos de PCR, a los cuales se les adicionó buffer de muestra (Gel-loading buffer III 1×, 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.

Se procedió a recuperar el DNA de los geles de agarosa usando el kit Nucleospin Extract II (Macherey-Nagel). 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. 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, luego se transfirió la muestra a una columna NucleoSpin Extract II y 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 min. la muestra y se cambió el tubo eppendorf por un tubo nuevo. Finalmente se agregaron 50 µl de agua y se dejó reposar por 1 min. antes de centrifugar por 1 min. a 11 000 x g.

Locus	Inserto	Tamaño y TM	Oligonucleótidos
Cistrón rDNA Chr27	Fragmento A1	101 pb; 55°C	63r-A-5' (5'-GTCGCGTGTGAGTGATGAG) 63r-A-3' (5'-GTTTGGGTGGAGGTGAGACT)
	Fragmento A2	111 pb; 55°C	rRNA-A-5' (5'-TTGTTTGGGTGGAGGTGAGA) rRNA-A-3' (5'-CAAATCATCAAACCCGTTT)
	Fragmento A3	102 pb; 58°C	rRNA-B-5' (5'-GTGAAGGGTGAAGGAAGGGT) rRNA-B-3' (5'-TTCCGCGCAACCCACAAGAT)
	Fragmento A4	116 pb; 58°C	18S-5' (5'-CATGCATGCCTCAGAATCAC) 18S-3' (5'-CGTTTCGCCAAGTTATCCAA)
	Fragmento A5	107 pb; 55°C	24SBegin-5' (5'-GAGCCAAAGAAGGTGTTAG) 24SBegin-3' (5'-GTCAAGTTGGCAGGTATTT)
	Fragmento A6	113 pb; 59°C	24Sβ-5' (5'-TTCCGGAGTCTTGTTCGAG) 24Sβ-3' (5'-GAGATTTCTGTCCCACTGAGC)
	Fragmento A7	119 pb; 57°C	S6-5' (5'-ACATCATCGAATCGCCACCTAC) S6-3' (5'-CGCGAGACACGTCGTGTTT)
	Fragmento A8	104 pb; 53°C	S4-Last-5' (5'-TCTCCAAACGAGAGAACATG) S4-Last-3' (5'-TGAACCTTGAGGCCTGA)
	Fragmento A9	117 pb; 58°C	rRNA-C-5' (5'-TTGTGGGGTCTTGCCCTTT) rRNA-C-3' (5'-GGATTGTCGGATGTCTCTTG)
	Fragmento A10	63 pb; 50°C	63r-5' (5'-CGCCCCAGTAGTCGAGCATT) 63r-3' (5'-GCGACACAACGCTCCTGCAA)
SSR Chr01	Fragmento B1	120 pb; 54°C	inter30-31-5' (5'-GCCTATGAACCGTAGAATGGG) inter30-31-3' (5'-TGTTCCCTTGTGTGGTAGCC)
	Fragmento B2	120 pb; 58°C	gen31-5' (5'-GAAGTAGCCGTAGTGCAGCA) gen31-3' (5'-CGCAGAATGTCCATGAGGAC)
	Fragmento B3	114 pb; 62°C	ssr1-5' (5'-AGAGCGGAGAAGAGACAGCG) ssr1-3' (5'-TGCGACTGCGTCCATGTGAT)
	Fragmento B4	80 pb; 47°C	ssr1-2-5' (5'-GATCAGTGGACGCGATC) ssr1-2-3' (5'-TGTAGGCTGAGAAGTCTGC)
	Fragmento B5	121 pb; 55°C	ssr2-5' (5'-AACGGCAAGAATGGCTGCAT) ssr2-3' (5'-CGACAAAGTGTGTCGCACAC)
	Fragmento B6	108 pb; 58°C	ssr2-3-5' (5'-GGGACACCACGTGAGAAGAAC) ssr2-3-3' (5'-TTCGGCGCTGAAACAGTG)
	Fragmento B7	110 pb; 57°C	ssr3-5' (5'-AACATGAGACCCACAAGCGA) ssr3-3' (5'-TGTAGTCAGCTTCTACCCGC)
	Fragmento B8	107 pb; 60°C	ssr4-5' (5'-AATCACAGCAGCATAACAG) ssr4-3' (5'-GCGTCATGGCTTCACTAACAG)
	Fragmento B9	122 pb; 55°C	gen32-5' (5'-TCATATCTCAGCCAGCTTGG) gen32-3' (5'-GTTCAAGTCCCACATAACCG)
Chr11-II	Fragmento C1	102 pb; 60°C	11.0920-5' (5'-GAAAGGAAATGGCAAGGGTG) 11.0920-3' (5'-AGCACTCCGCCAAGTACGATAG)
	Fragmento C2	114 pb; 63°C	JC1-5' (5'-TTGGGTGAAAGAGACGCGAG) JC1-3' (5'-CAAAGGAAACGGCCACACAC)
	Fragmento C3	116 pb; 59°C	KRNO-5' (5'-GGTAGGCAGATAGCGTTCAGAG) KRNO-3' (5'-CCACTGAGCCGCACAAATTC)
	Fragmento C4	118 pb; 47°C	KRNO-Met-5' (5'-GTTGCTGGTCTTTGTCCG) KRNO-Met-3' (5'-TTCTTACGCTCCTCCTGG)
	Fragmento C5	101 pb; 55°C	tRNA-Met-5' (5'-AAAGTTTGGACCGGTGAG) tRNA-Met-3' (5'-CACAACCTTCACTCGTAGCCG)
	Fragmento C6	91 pb; 55°C	Met-Arg-5' (5'-ACGGCTACGAGTGAAAGTTG) Met-Arg-3' (5'-TTGAGCCACACGGACATG)
	Fragmento C7	126 pb; 55°C	tRNA-arg-5' (5'-ATGTCCGTGTGGCTCAATGG) tRNA-arg-3' (5'-ACCACTCAGTGAGGCTAAGG)
	Fragmento C8	123 pb; 58°C	rRNA5S-5' (5'-GTGAGTACGACCACACTTG) rRNA5S-3' (5'-AAGAGTACGGCACTCAGGGT)
	Fragmento C9	107 pb; 56°C	5S-Final-5' (5'-CATTCTCCACGGACGGTAG) 5S-Final-3' (5'-TTCTGTGTGCGCGATGAG)
	Fragmento C10	100 pb; 56°C	5S-11-5' (5'-TTGGATGTGCGGATCTGAG) 5S-11-3' (5'-CCAAACGGCAGAGTTTC)
	Fragmento C11	121 pb; 58°C	11-Inter-5' (5'-GAACTTGGGAATGCCTTCTG) 11-Inter-3' (5'-GCAAGAAGAATGTGGAACGG)
	Fragmento C12	111 pb; 58°C	11.0930-5' (5'-AGCAGCAGTTCATTGAGGCT) 11.0930-3' (5'-GCCGATCATCATCTCTAAG)

Tabla 1. Oligonucleótidos empleados para amplificar los fragmentos de *L. major*.

5.4 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 (2×), 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. La mezcla de ligación se transformó en células competentes *E. coli* JM109. Para esto, 200 µl de células competentes se transfirieron a un tubo Falcon de 15 ml y se adicionaron 2 µl de la reacción de ligación; se dejaron incubando 20 min. 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 min.), 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 (100µg/ml), IPTG (100 mM) y X-Gal (50 mg/ml). Las células se dejaron crecer durante toda la noche a 37°C.

5.5 Purificación y análisis de plásmidos

Se seleccionaron las colonias bacterianas blancas, que habían incorporado al vector y el inserto, y se crecieron en 5 ml de medio LB con ampicilina (100µg/ml), dejando los cultivos toda la noche a 37°C en agitación rápida. Al día siguiente 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 μ l de buffer P2 y se mezcló inmediatamente invirtiendo los tubos de 4 a 6 veces, se agregó 250 μ l de buffer N3 (mezclando como la vez anterior). Después se centrifugaron por 10 min. 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 750 μ l 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 μ l 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 μ l) 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.

5.6 Purificación de insertos

Se tomaron 19 μ l del DNA obtenido por miniprep (~150 ng/ μ l) y se digirieron con *EcoRI*. Para esto, el DNA se mezcló con 0.6 μ l de la enzima (20 U/ μ l, BioLabs), 2.5 μ l de buffer (10 \times NEBuffer *EcoRI*) y finalmente 2.9 μ l 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 μ l de la digestión para liberar los fragmentos en un gel de agarosa al 2%, hasta que el azul de bromofenol 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 1 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.

5.7 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 37°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.

5.8 Aislamiento de núcleos y de cromatina

Fueron centrifugados 1.8×10^9 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 10% 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 min. 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 min. 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.

5.9 Digestión con nucleasa micrococcal

La cromatina contenida en los núcleos fue digerida con nucleasa micrococcal (MNasa). Para ello se tomaron 25 µl de núcleos resuspendidos en buffer de almacén de núcleos; se agregaron 4 µl de DTT (100 mM), 0.4 µl de CaCl₂ (100 mM) y 10 µl de nucleasa micrococcal (0.1 U/ µl, USB). El tiempo de digestión fue de aproximadamente 3 min. a 30°C. La reacción se detuvo 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 min., al término se transfirió la fase acuosa a un tubo eppendorf de 1.5 ml nuevo. Después, se agregaron 5 µl de RNAasa A (4 mg/ml, Promega) e 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 min., se desechó la fase líquida y se lavó el botón con 500 μ l de etanol al 70%, se volvió a centrifugar y se dejó secar la pastilla, para finalmente resuspender en 13 μ l de agua. Se corrieron 3 μ l 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 μ l de núcleos de *L. major* en fase media logarítmica, se agregó 4 μ l de DTT (100 mM) y 0.4 μ l de CaCl_2 (100 mM), se llevó a un volumen de 150 μ l 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.

5.10 Electroforesis y transferencia a membranas de nylon

La cromatina que fue digerida y que quedó resuspendida en 10 μ l de agua se corrió en un gel de 350 ml de agarosa al 1.5 % en TBE 1 \times , a 90 voltios por 5 horas y 30 min. 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 min., luego 50 min. 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 min. 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 \times) 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 \times 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 la transferencia del DNA se sumergió el gel en un baño de bromuro de etidio (0.5 µg/ml) durante 10 min. y fue visualizado con un transiluminador de luz UV.

5.11 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 min. y después dejándolo en hielo por 5 min. 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 min. 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. Previamente, 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 min; 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.

5.12 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 5×, SDS 0.2%) y solución Denharts 4× (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 min., dejando después en hielo por 2 min. y se centrifugó brevemente). Se dejó hibridar por 24 horas a 42°C.

5.13 Lavado de los filtros radioactivos y exposición

Los filtros se lavaron por 3 min. a temperatura ambiente en SSC 2× y SDS 0.1%. Después, se repitió este lavado por 30 min. a 65°C. Posteriormente, se realizaron dos lavados con SSC 0.3% y SDS 0.1% a 65 °C por 30 min. 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 liquido revelador (GBX, Kodak), se enjuagaron con agua y se fijaron con liquido 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.

5.14 Western-blot con histonas purificadas

Se centrifugaron 1×10^8 promastigotes de *Leishmania* a $7000 \times g$ durante 10 min. a 4°C , posteriormente se lavaron las células dos veces con 10 ml de PBS complementado con glucosa al 2% y empastillados. Luego, las células fueron resuspendidas en buffer de lisis (10mM Tris-HCl pH 7.5, 3mM CaCl_2 , 2 mM MgCl_2), conteniendo inhibidores de proteasas $1\times$ (Sigma) y 200 μl de NP40 (10%); las células fueron rotas mecánicamente usando un homogenizador. Los núcleos fueron empastillados y lavados con 0.3 y 0.5 M de NaCl. Las histonas fueron extraídas usando 10 volúmenes de HCl 0.25 M que contiene inhibidores de proteasas $1\times$ (Sigma) por toda la noche. Finalmente, las histonas fueron precipitadas con acetona, para ser después cuantificadas y separadas en un gel de poliacrilamida al 18% y transferidas a membranas PVDF. Aproximadamente 15 μg de histonas de LmjF fueron usadas en cada experimento contra diferentes anticuerpos: H3 1:2500 (Abcam, ab1791), H3K9me3 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (Abcam, ab8898), H3K14ac 1:2000 (Abcam, (Abcam ab52946), H3K23ac 1:2500 (Merck Millipore 07-355), H3K27ac 1:10000 (Merck Millipore, 07-360), H4 1:500 (Abcam ab7311), H4K20me3 1:1000 (Merck Millipore, 07-463), y como control negativo IgG de conejo (Abcam ab37415). Como control positivo se usaron 1 μg de histonas de timo de ternera.

5.15 Inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP)

Se usaron 1×10^8 células LmjF que fueron lavadas con PBS frío, empastilladas y fijadas con PBS-formaldehído al 1% por 5 minutos a 37°C . La reacción fue detenida adicionando glicina (125 mM), las células fueron lavadas en PBS y empastilladas. Posteriormente, las células fueron resuspendidas en buffer de lisis (10mM Tris-HCl pH 7.5, 3mM CaCl_2 , 2 mM MgCl_2) que contenía inhibidores de proteasas $1\times$ (Sigma), las células fueron rotas usando un sonicador (Sonics Vibra Cell VCX130) (15 s on/off, 40% amplitud) por 5 min. Los núcleos fueron limpiados usando un colchon de sacarosa (340 mM) y se empastillaron a 4°C . La

pastilla fue resuspendida en buffer de sonicación (1% SDS, 10 mM EDTA, 50 mM Tris-HCl pH 8.1). La cromatina fue sonicada para obtener un tamaño promedio de DNA de entre 200 y 1000 pb usando un sonicar bioruptor (Diagenode Bioruptor UCD-200) (30 s on/off, high intensity) por 40 ciclos. Posteriormente, la cromatina fue diluida en buffer de dilución de CHIP (0.01% SDS, 1.1% Triton X100, 1.2 mM EDTA, 16.7 mM Tris-HCl pH 8.1, 167 mM NaCl) que contiene inhibidores de proteasas 1× (Sigma y Roche). El extracto sonicado fue preclareado usando agarosa con proteína A/G (Santa Cruz Biotechnology) e incubado por 1 h a 4°C en rotación. Después el 10% de la cromatina fue tomado como INPUT. Cerca de 1-3 µl de los anticuerpos fueron usados para los experimentos CHIP que incluye a antihistona H3 (Abcam, ab1791), H3K9me3 (Abcam, ab8898), H3K14ac (Abcam, ab52946), H3K23ac (Merck Millipore 07-355), H3K27ac (Merck Millipore, 07-360), H4 (Abcam ab7311), H4K20me3 (Merck Millipore, 07-463), y como control negativo negativo IgG de conejo (Abcam ab37415), que fueron incubados en rotación toda la noche a 4°C con la cromatina. Los complejos proteína-DNA fueron incubados por 1 h usando agarosa con proteína A/G (Santa Cruz Biotechnology) y se adicionó DNA de esperma de salmón sonicado y finalmente se lavó con los siguientes buffers: Low Salt Wash Buffer (0.1% SDS, 1% Triton X100, 2 mM EDTA, 20 mM Tris-HCl pH 8.0, 150 mM NaCl); High Salt Wash Buffer (0.1% SDS, 1% Triton X100, 2 mM EDTA, 20 mM Tris-HCl pH 8.0, 500 mM NaCl); LiCl Wash Buffer (10 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM EDTA, 1% NP40, 1% Deoxycolate, 250 mM LiCl) y finalmente con TE Buffer (10 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM EDTA). Los complejos fueron eluidos de las perlas después de lavar con Elution Buffer (1% SDS, 100 mM NaHCO₃) y posteriormente se revirtió el cross-link con NaCl (200 mM) a 65°C por toda la noche. Después, se hizo un tratamiento con RNasa A, el DNA fue precipitado y purificado usando acetato de sodio y etanol absoluto para ser finalmente cuantificado. Cada experimento CHIP fue realizado por triplicado.

5.16 PCR cuantitativo (qPCR)

El material inmunoprecipitado fue analizado usando PCR en tiempo real, se empleó 2 ng de INPUT y de los inmunoprecipitados, los cuales fueron analizados usando los primers listados anteriormente para el cistrón ribosomal del cromosoma 27 (Tabla 1). La especificidad de amplificación fue analizada con las curvas de melt. El enriquecimiento fue calculado usando el método $\Delta\Delta C_t$ (donde C_t es el *threshold*). Para calcular la densidad nucleosomal de H3 y H4 se usó *Fold Enrichment*. El enriquecimiento del resto de las marcas de histonas fue calculado con *Fold Enrichment* y normalizado con la densidad nucleosomal de las histonas H3 o H4, según correspondía. Se analizaron las tres replicas biológicas y se calcularon promedios y desviaciones estándar.

5.17 Inmunofluorescencia y FISH

Los experimentos de inmunofluorescencia fueron hechos usando 1×10^6 células LmjF, las células fueron lavadas en PBS y empastilladas. Los parásitos fueron adheridos a portaobjetos tratados con Poly-L-Lysine por 15 min., posteriormente fueron fijados por 30 min. a 4°C usando PBS con paraformaldehído al 4% y después lavados con PBS. Las células fueron permeabilizadas con 0.1% Triton X100 por 10 min. y bloqueadas usando la Súper Solución de Bloqueo (SSB) (5% BSA, 2% leche y 1% gelatina de pez, Sigma) por toda la noche a 4°C. Las diluciones de los anticuerpos fueron las siguientes: H4 1:800 (Abcam ab7311), H3K4me3 1:50 (Abcam, ab8580), H3K9me3 1:50 (Abcam, ab8898) y H3K27ac 1:100 (Merck Millipore, 07-360); la incubación fue por 1 hora y se hicieron lavados con PBS y PBS-Tween 20 al 0.05%. El anticuerpo secundario fue Goat Anti-Rabbit IgG 1:800 (Lifetechnologies, A-11011). Para los experimentos FISH los parásitos fueron fijados con paraformaldehído al 4% y permeabilizados de nuevo con Triton X100. Se usó 1.5 μ l de sonda del promotor ribosomal (la cual fu previamente marcada con fluoresceína) en buffer de hibridación buffer (50% formamide, 2 \times saline sodium phosphate EDTA [SSPE], 10% dextran sulfate, 250 μ g/ml DNA de esperma de salmon sonificado), se desnaturalizó y se hibridó a 80°C por 10 min. y

después a 37°C por al menos 17 horas. Finalmente, fueron lavados con 2x SSC-50% formamida por 30 min. a 37°C, 1x SSC, 2x SSC y 4x SSC por 10 min. a 50°C. Se agregó Vecta Shield con DAPI y se procedió a poner el cubreobjetos y sellar con barniz. Las imágenes fueron tomadas en un microscopio de fluorescencia y las imágenes analizadas con el software Zen de Carl Zeiss.

6. Resultados

6.1 Selección de las regiones a analizar de *L. major*

Fueron seleccionados tres loci para analizar su estructura nucleosomal: la unidad del rRNA, localizada en el cromosoma 27 (chr27), que es transcrita por Pol I; la región SSR del cromosoma 1 (chr01), que es la zona donde inicia la transcripción de todo el cromosoma de manera bidireccional por Pol II; y una región del cromosoma 11 (Chr11) que contiene tres genes transcritos por Pol III, que están flanqueados por regiones transcritas por Pol II (Fig. 11). Diferentes fragmentos de estos tres loci fueron amplificados por PCR para ser usados como sondas en ensayos tipo Southern blot con cromatina parcialmente digerida con MNasa.

El genoma de *L. major* tiene aproximadamente 12 copias de la unidad del rRNA organizadas en tándem (*head-to-tail*) en el Chr27 (Martínez-Calvillo, et al., 2001; Ivens, et al., 2005). Elementos repetidos de 63 pb se encuentran entre los espaciadores intergenicos (IGS) delimitando cada cistrón del rRNA. El sitio de inicio de la transcripción de cada unidad del rRNA fue localizado 1043 pb río arriba del gen rRNA 18S y 184 pb río debajo de los repetidos de 63 pb. Un fragmento de 391 pb (entre las posiciones -184 y +207, relativo al sitio de inicio de transcripción) contiene al promotor de Pol I (Martínez-Calvillo, et al., 2001). Para el análisis se seleccionaron 10 regiones, de aproximadamente 100 pb, a lo largo del cistrón del rRNA: dos en la región promotora (A1 y A2), una en la región de inicio de la transcripción (A3), cinco en la región codificadora (A4-A8); una en la región en donde termina la transcripción (A9); y una última región que contiene uno de los repetidos de 63 pb que delimitan cada unidad del rRNA (A10) (Fig. 11).

El análisis de *run-on* nuclear del cromosoma 1 de *L. major* mostró que la transcripción por Pol II del cromosoma entero inicia en la región de cambio de hebra (strand-switch región, SSR) localizada entre las dos unidades policistrónicas divergentes presentes en este cromosoma (Martínez-Calvillo, et al., 2003). Para cada unidad policistrónica se identificaron múltiples sitios de inicio de la

transcripción, contenidos en una región de ≈ 100 pb que contiene trectos largos de Gs (o trectos de Cs), pero que no contiene caja TATA o algún otro elemento promotor típico de Pol II. Así, a diferencia de la mayoría de eucariontes, donde cada gen posee su propio promotor, una región única parece dirigir la expresión completa del cromosoma 1 en *L. major*. De aquí se generó nuestro interés por analizar esta región del cromosoma 1.

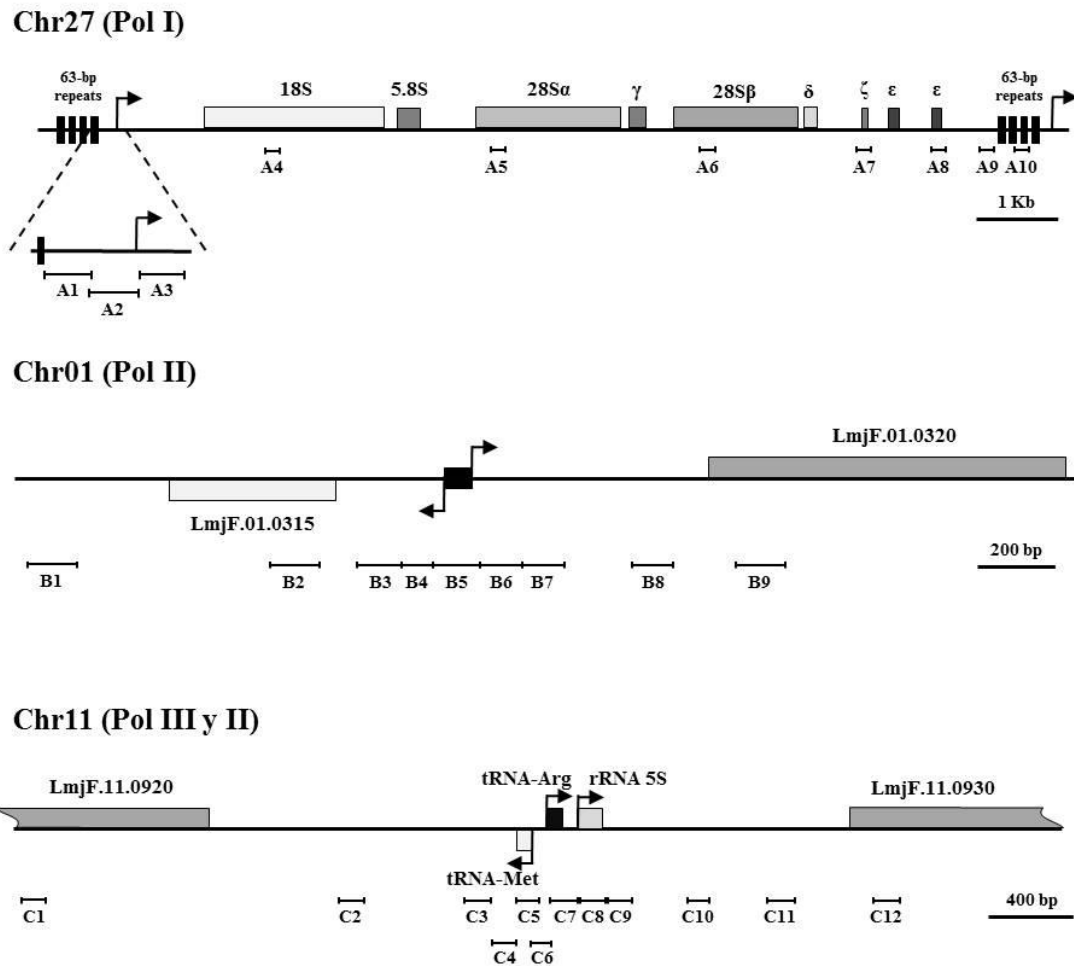


Figura 11. Mapas de los loci analizados en *L. major*. Chr27 contiene a los genes del rRNA, los cuales son transcritos por Pol I. Cada cistrón está delimitado por los repetidos de 63 pb. Chr01 presenta genes transcritos por Pol II. La región de inicio de la transcripción es señalada por una caja negra (región SSR). Chr11 contiene tres genes transcritos por Pol III (tRNA-Met, tRNA-Arg y 5S rRNA) contenidos dentro de una unidad policistronica transcrita por Pol II. Se señalan los fragmentos usados como sondas. Las flechas indican los sitios de inicio de la transcripción.

Un total de 9 fragmentos diferentes de esta zona (B1 a B9) fueron seleccionados para su análisis (Fig. 11). Por último, el Chr11 contiene un gen de tRNA de metionina (tRNA-Met), un gen de tRNA de arginina (tRNA-Arg), y un gen del rRNA 5S; los cuales se encuentran flanqueados por los genes LmjF.11.0920 y LmjF.11.0930 (genes de proteínas hipotéticas), que están dentro una unidad policistrónica transcrita por Pol II (Fig. 11). En consecuencia esta región del Chr11 es interesante por contener regiones transcritas por Pol III y Pol II, y fueron seleccionados 12 fragmentos diferentes (C1 a C12) para su análisis de estructura de la cromatina (Fig. 11).

6.2 Clonación de fragmentos de DNA de *L. major*

Para este análisis se amplificó por PCR un total de 31 fragmentos de aproximadamente 100 pb. Dichos fragmentos corresponden a regiones codificadoras, regiones promotoras o regiones intergénicas de los tres loci de estudio (Fig. 11). En la mayoría de los casos se obtuvo una banda del tamaño esperado, y cuando se obtenían varias bandas se cortaba la banda del tamaño esperado para evitar contaminación (en la Fig. 12 se muestran solamente algunos ejemplos de fragmentos de los tres loci analizados).

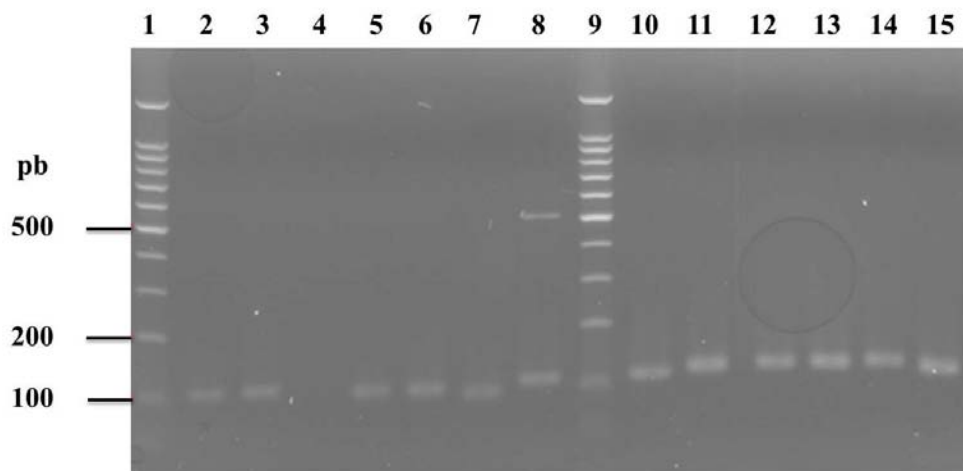


Figura 12. Electroforesis de fragmentos de *L. major* amplificados por PCR. Se muestran los fragmentos: C12 (carril 2), B3 (carril 3), B5 (carril 4), B7 (carril 5), A2 (carril 6), A3 (carril 7), A9 (carril 8), A4 (carril 10), C8 (carril 11), C11 (carril 12), B9 (carril 13), C7 (carril 14) y el B2 (carril 15). Marcador de peso molecular (escalera de 100 pb, carriles 1 y 9). Gel de agarosa al 2%.

Una vez que se obtuvieron los productos de PCR, se procedió a ligarlos en el vector pGEMT-T Easy. Posteriormente, se transformaron células competentes *E. coli* JM109, las células transformadas se crecieron 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 clonado en el vector. Todos los plásmidos mostraron insertos del tamaño esperado. Algunos ejemplos de las digestiones se muestran en la figura 13. El fragmento de DNA de ~3 Kb que se observa en todos los carriles corresponde al vector pGEM-T Easy (Fig. 13).

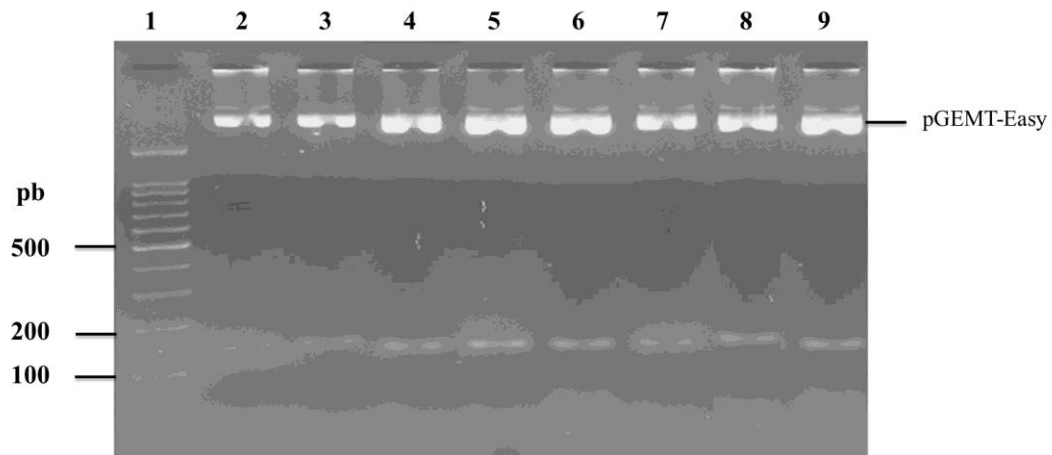


Figura 13. Electroforesis de los vectores digeridos con *EcoRI*. Se muestran los fragmentos: A8 (carril 2), A6 (carril 3), A4 (carril 4), C5 (carril 5), B8 (carril 6), B1 (carril 7), C2 (carril 8) y C3 (carril 9). Marcador de peso molecular (escalera de 100 pb, carril 1). Gel de agarosa al 2%.

Después de que se verificó que los fragmentos liberados del vector tenían el tamaño esperado, fueron enviados a secuenciar empleando el oligonucleótido T7 o SP6, que flanquean el sitio de clonación del vector pGEM-T Easy. Se analizaron las secuencias obtenidas, y se confirmó la identidad de todos los fragmentos clonados. Como ejemplo se muestra la comparación entre la secuencia esperada y la secuencia obtenida para el fragmento C5 (tRNA-Met). Como puede apreciarse, ambas secuencias son idénticas (Fig. 14).

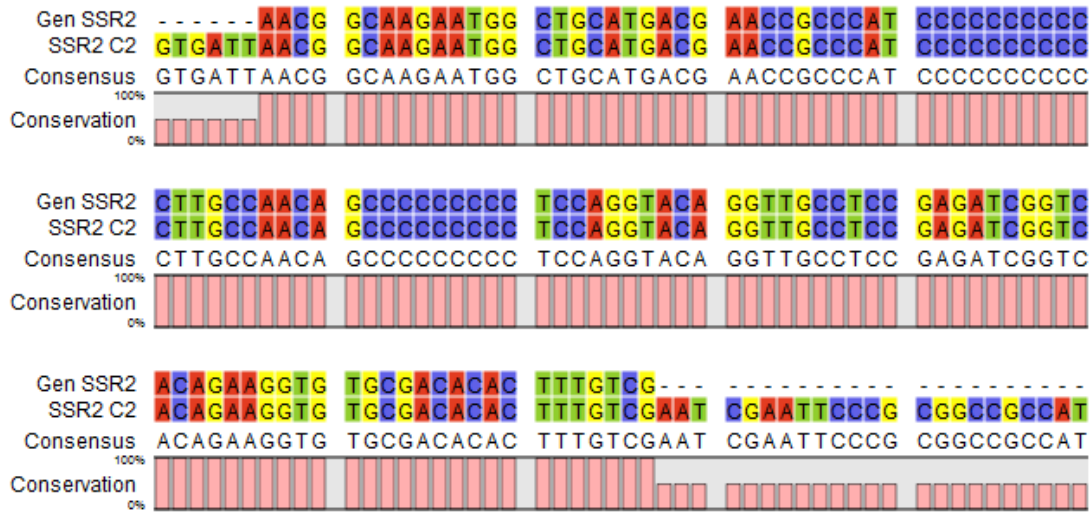


Figura 14. Comparación entre las secuencias del Sitio de Inicio de Transcripción del Chr01 y el producto clonado en pGEMT-Easy (Fragmento B5, Clona 2). Con líneas punteadas se señalan las bases que están presentes tanto en el gen como en el fragmento clonado, las cuales son idénticas. Con puntos se señalan las bases de DNA que están presentes sólo en el vector pGEMT-Easy.

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 a partir de geles de agarosa (en la Fig. 15 se muestran ejemplos representativos), se cuantificaron y almacenaron a -20°C , para después marcarlos radioactivamente.

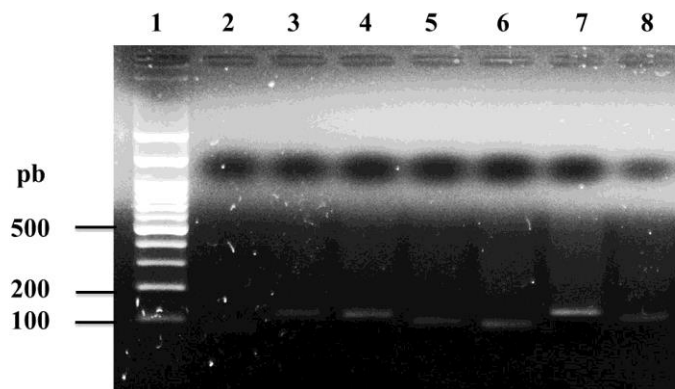


Figura 15. Electroforesis de los fragmentos purificados. Se muestran los fragmentos: B4 (carril 2), C2 (carril 3), C3 (carril 4), C5 (carril 5), C6 (carril 6), C7 (carril 7) y C9 (carril 8). Marcador de peso molecular (escalera de 100 pb, carril 1). Gel de agarosa al 2%.

6.3 Obtención de cromatina de *L. major*

El siguiente paso fue el aislamiento de núcleos y cromatina de promastigotes de *L. major* en fase de crecimiento media logarítmica. Una vez obtenidos los núcleos se procedió a digerir la cromatina con MNasa y a analizar el patrón de digestión por electroforesis. Para estandarizar la técnica de digestión con MNasa de la cromatina contenida en los núcleos, se usó un gradiente de concentraciones de la enzima que fue desde 5 hasta 200 U/ml. Las digestiones se hicieron por un tiempo constante de 4 min, a 30°C, usando 25 µl de núcleos (~3 µg de DNA).

Al digerir la cromatina con 25 U/ml de la enzima se observó un patrón de escalera en la que la banda menor corresponde a un nucleosoma individual (alrededor de 190 pb) y las bandas mayores corresponden a múltiplos nucleosomales (dímeros, trímeros, etc.) (Fig. 16). Al digerir con 200 U/ml se observan principalmente monómeros. Con esto se confirmó que la cromatina de *L. major* se organiza en nucleosomas, y que éstos tienen un tamaño aproximado de 190 pb.

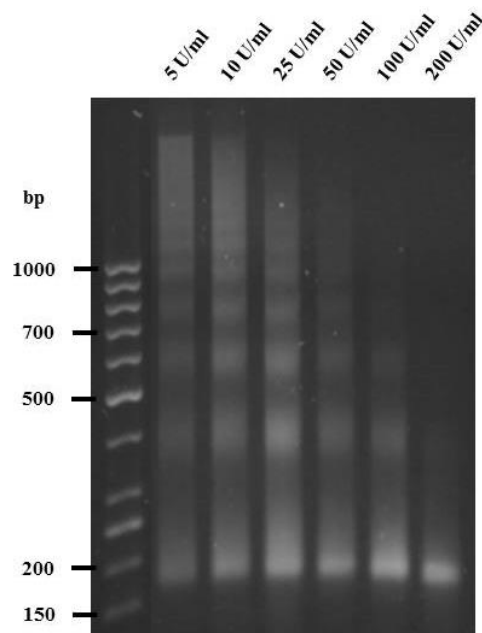


Figura 16. Electroforesis de las digestiones de cromatina de *L. major* en fase media logarítmica con distintas concentraciones de MNasa. Gel de agarosa al 2 %. El marcador de peso molecular 1 kb.

De esta forma fueron estandarizadas las condiciones de la digestión de la cromatina de *L. major* con MNasa. Sin embargo, cabe señalar que en algunos casos se tuvo que ajustar el tiempo de digestión para que se observara la escalera nucleosomal, ya que la cromatina de diferentes cultivos de promastigotes de *L. major* mostró diferente sensibilidad a la digestión con MNasa. Entonces, se procedió a digerir la cromatina con 25 U/ml de MNasa para correrla en geles de agarosa al 1.5% (Fig. 17), y transferirla a membranas de nylon para ser usada en experimentos tipo Southern blot.

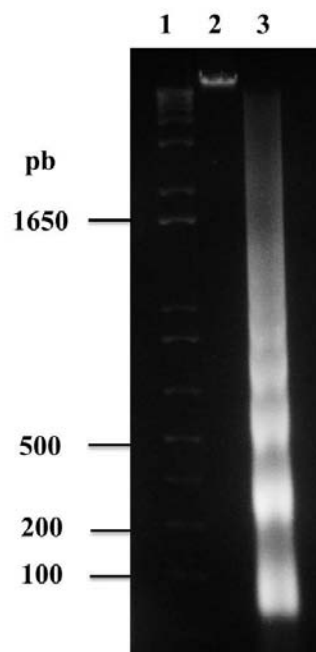


Figura 17. Electroforesis de cromatina de *L. major* parcialmente digerida con 25 U/ml de MNasa para transferir a membranas de nylon. Cromatina sin digerir (carril 2), Cromatina parcialmente digerida (carril 3). Marcador de peso molecular (escalera de 100 pb, carril 1). Gel de agarosa 1.5%.

6.4 Estructura nucleosomal en los genes del rRNA

Para conocer la organización nucleosomal a lo largo del cistrón del rRNA, transcrito por Pol I, se llevaron a cabo ensayos Southern blot, hibridando escaleras nucleosomales con distintas sondas marcadas radioactivamente que se localizan desde la región promotora hasta la región de repetidos de 63 pb (Fig. 18).

Como se observa en la Figura 18, la región promotora (sonda A2) presentó un patrón de hibridación de barrido, característico de regiones promotoras, lo que indica que esta región carece de nucleosomas. Un patrón muy parecido fue observado con las sondas A1 (la cual contiene parte del promotor) y la sonda A3 (localizada dentro de la región transcrita, pero que presumiblemente contiene parte del promotor). En cambio, la región de repetidos de 63 pb (sonda A10) y la región intergénica localizada entre 28S ϵ rRNA y los repetidos de 63 pb (sonda A9) mostraron una escalera nucleosomal muy definida, lo que indica que estas regiones están empacadas en una estructura nucleosomal muy fuerte. De manera interesante, las sondas que contienen a las secuencias codificantes de los genes del rRNA (sondas A4 a A8) presentan un barrido del que sobresalen algunas bandas que corresponden principalmente a las bandas del mono- y di-nucleosoma. Por lo tanto, el patrón obtenido con la mayoría de estas sondas es intermedio entre la escalera nucleosomal muy definida observada con los repetidos de 63 pb y el patrón de barrido de la región promotora. Con la sonda A8, la cual contiene al gen 28S ϵ rRNA, se observan algunas bandas que no corresponden a las bandas nucleosomales, lo que posiblemente refleje un re-arreglo en la posición de los nucleosomas en la región 3' de la unidad del rRNA. La señal de hibridación observada con esta sonda fue más fuerte que la señal obtenida con otras sondas de la región transcrita (sondas A3 a A7), quizás porque el gen 28S ϵ rRNA está duplicado en la mayoría de las copias de la unidad del rRNA en *L. major* (Fig. 18). Así, nuestros resultados indican que los genes rRNA de *L. major* muestran una estructura nucleosomal; sin embargo, los nucleosomas parecen ser inestables, ya que ellos deben ser removidos cada vez que pasa Pol I.

Es importante señalar que nuestros resultados de Southern blot apoyan la hipótesis de que todos los genes del rRNA son transcripcionalmente activos en promastigotes de *L. major* que crecen exponencialmente. La región del promotor (A2) y las regiones flanqueantes (A1 y A3) muestran un barrido que indica que estas regiones están libres de nucleosomas; si algunas copias de los genes del rRNA fueran inactivas, las escaleras nucleosomales serían evidentes en estas

regiones. Mas aún, los patrones debiles y difusos observados en las regiones codificantes se parecen mucho a lo observado en una mutante de levadura que contiene solamente copias activas de genes del rRNA (Jones, et al., 2007). Estos patrones son muy diferentes de las fuertes escaleras nucleosomales observadas en la levadura *wild type*, la cual contiene aproximadamente 150 copias de los genes del rRNA, la mitad de los cuales están inactivos. Escaleras nucleosomales también han sido reportadas en las regiones codificantes de los genes del rRNA en otros organismos que contienen repetidos activos e inactivos (Conconi, et al, 1992).

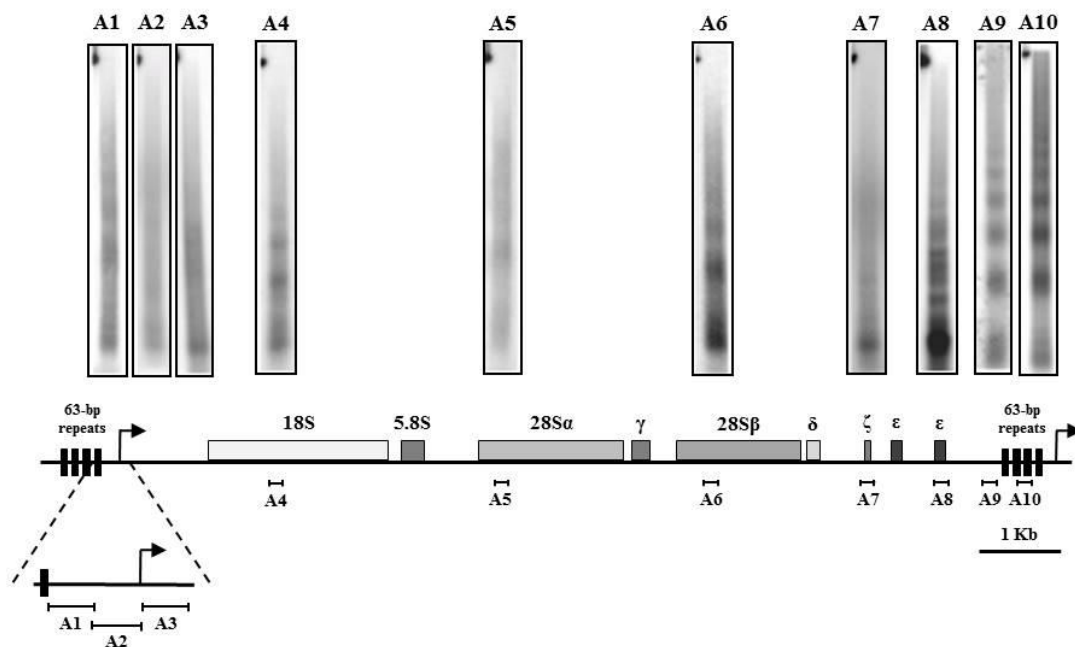


Figura 18. Estructura nucleosomal en genes del rRNA transcritos por Pol I. Se muestra el análisis de cromatina parcialmente digerida y de Southern blot de 10 regiones a lo largo de los genes del rRNA de *L. major*. En la parte superior se muestra las imágenes de las autorradiografías y en el mapa se señalan las regiones analizadas y con flechas los sitios de inicio de la transcripción.

6.5 Arquitectura nucleosomal en la región SSR del cromosoma 1

Para estudiar cómo se organiza la cromatina en genes transcritos por la RNA polimerasa II, fueron realizados experimentos tipo Southern blot con sondas que abarcan la región SSR del Chr01 y los genes flanqueantes (Fig. 19). En este

caso encontramos que la región B5, la cual contiene los sitios de inicio de la transcripción de las dos unidades policistronicas contenidas en el Chr01, muestra predominantemente un barrido del que sobresalen algunas bandas nucleosomales.

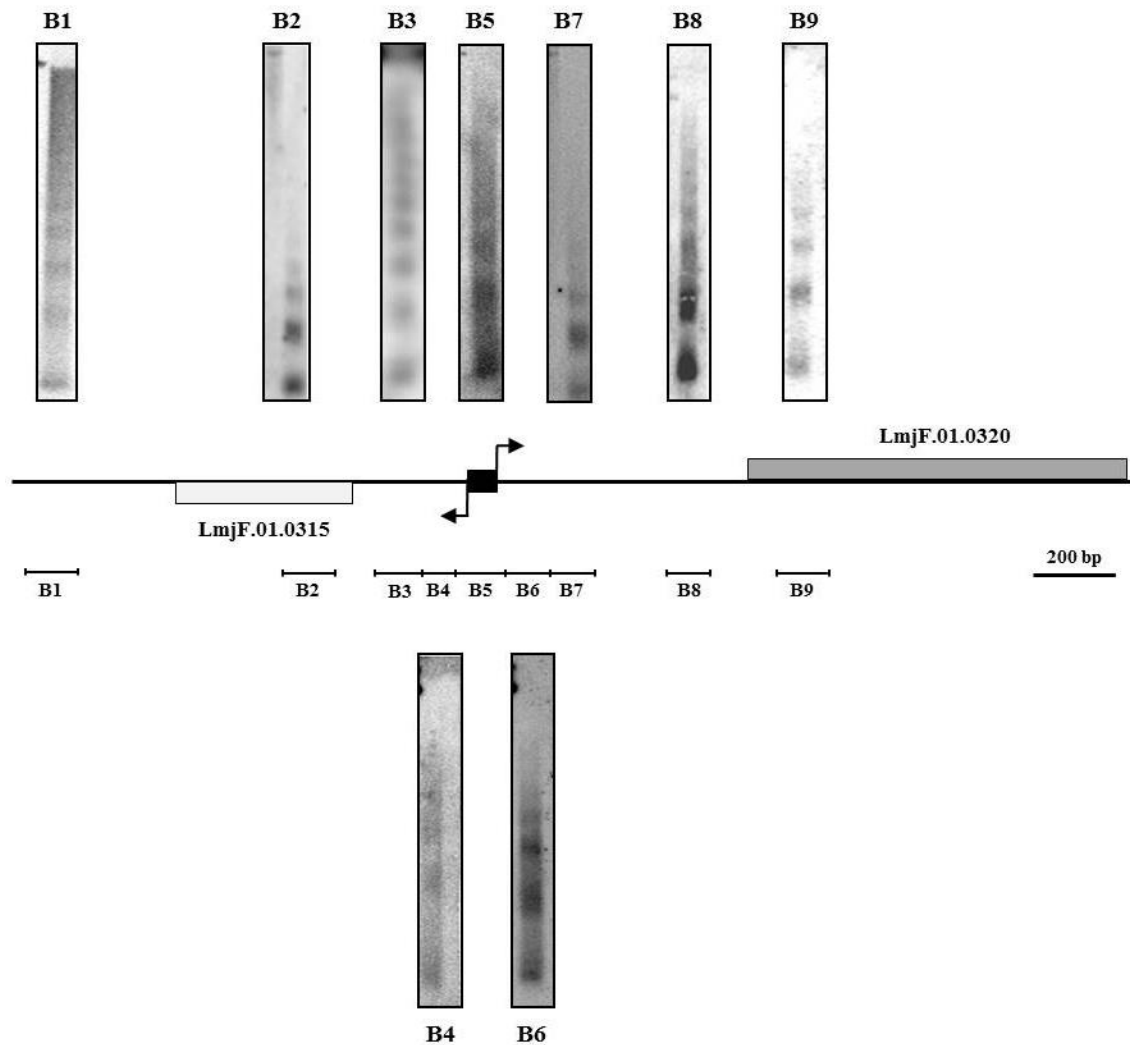


Figura 19. Análisis de la estructura nucleosomal en el locus Chr01. Experimentos Southern blot fueron llevados a cabo con cromatina parcialmente digerida con MNasa. La posición de las sondas se indica con las barras enumeradas. La caja negra muestra la región SSR (sonda 5) y las flechas indican los sitios de inicio de la transcripción.

Las regiones que flanquean este fragmento (sondas B4 y B6) mostraron un patrón similar, pero en el que la escalera nucleosomal fue un poco más evidente.

A partir de la sonda B3 (del lado izquierdo) y de la sonda B7 (del lado derecho) se apreció un patrón nucleosomal muy marcado, el cual se conserva en el resto de las sondas analizadas (B1, B2, B8 y B9). Estos datos indican que la región que incluye los sitios de inicio de la transcripción de Pol II contiene pocos nucleosomas (o nucleosomas débilmente unidos). La presencia de los nucleosomas se hace paulatinamente evidente al alejarnos de esta región, tanto río arriba como río abajo, hasta llegar a fragmentos fuertemente empacados en nucleosomas (Fig. 19).

6.6 Análisis nucleosomal del cromosoma 11

Por último, fueron analizados los genes transcritos por Pol III, los cuales se encuentran dentro de una unidad policistrónica transcrita por Pol II, en el Chr11. Nuestros resultados claramente mostraron un barrido para el tRNA-Met, el tRNA-Arg y el rRNA 5S (sondas C5, C7 y C8 respectivamente) (Fig. 20). Este es un resultado esperado, considerando que estos genes contienen regiones promotoras internas. Para la región río abajo inmediata al gen rRNA 5S (sonda C9) se apreció un empaquetamiento parcial de la cromatina menos definido que con la sonda contigua C10. Con la sonda C11 se observó una marcada escalera nucleosomal, similar a la obtenida con la sonda C12, aunque con esta última no se observa claramente el monómero y dímero nucleosomal. De manera interesante, la sonda que está entre el tRNA-Met y tRNA-Arg presentó un patrón nucleosomal (sonda C6). En la región río arriba del tRNA-Met (sonda C4) se observó un barrido del cual sobresale una banda principalmente del tamaño del monómero nucleosomal. En cambio, las sondas localizadas río arriba de ésta (C1 a C3) mostraron un patrón nucleosomal muy definido (Fig. 20). Así, nuestros resultados muestran un patrón nucleosomal muy complejo en esta zona en la que convergen las RNA polimerasas II y III.

En resumen, nuestros resultados demuestran que la región promotora de Pol I y los genes transcritos por Pol III (que contienen promotores internos) están libres de nucleosomas. De manera interesante, la región de inicio de la transcripción de Pol II del Chr01 no parece estar totalmente libre de nucleosomas. Regiones intergénicas y genes transcritos por Pol II presentan un patrón nucleosomal compacto, al igual que en las regiones intergénicas entre cada cistrón del rRNA. Por último, las regiones codificadoras de la unidad del rRNA presentan una mezcla entre patrones nucleosomales laxos y compactos.

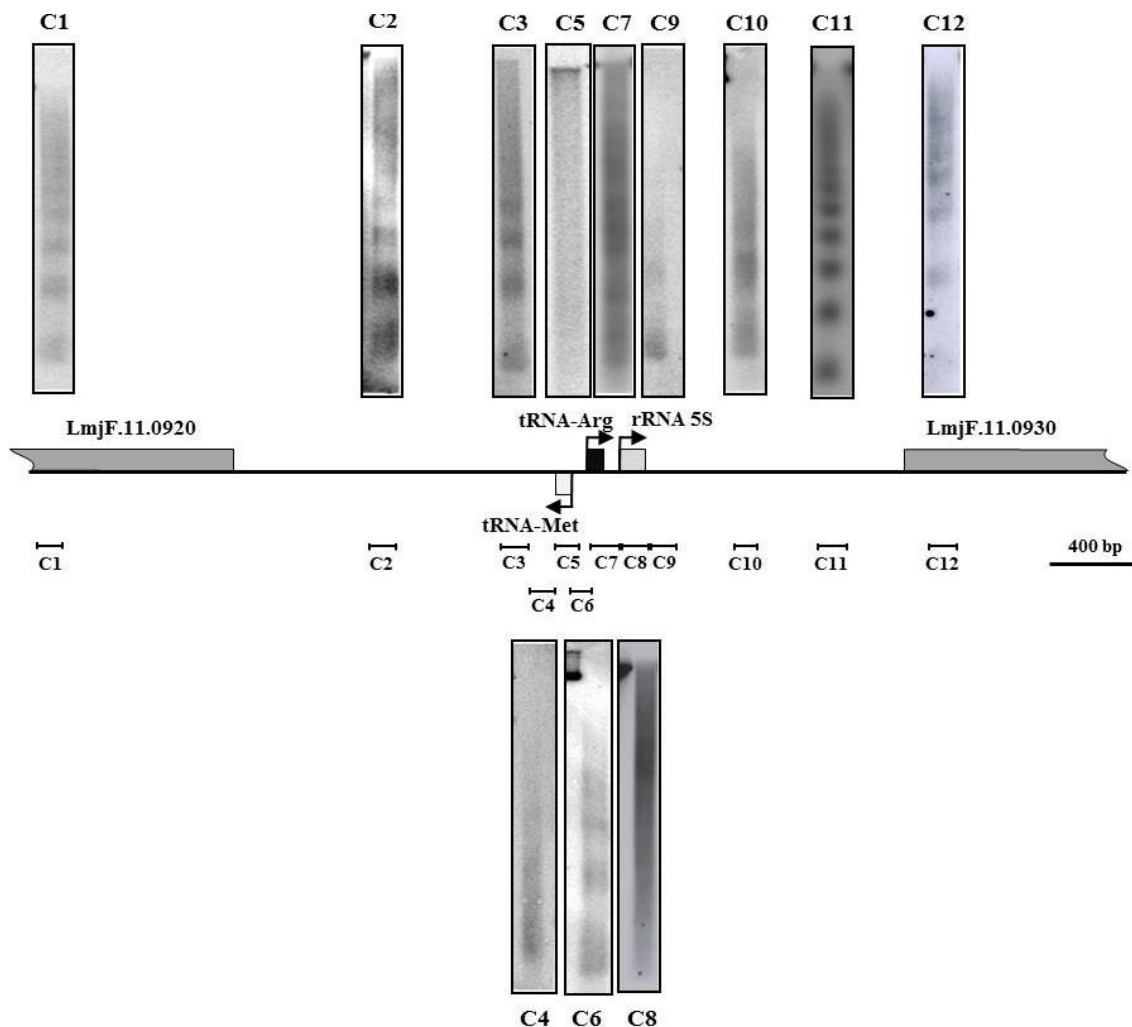


Figura 20. Análisis de la estructura nucleosomal en el locus Chr11. Experimentos Southern blot fueron llevados a cabo con cromatina parcialmente digerida con MNasa. La posición de las sondas se indica con las barras enumeradas. Se muestra al tRNA de Metionina, el tRNA de Arginina y el rRNA 5S (sondas C5, C7 y C8 respectivamente); así como a los genes LmjF.11.0920 y LmjF.11.0939, transcritos por Pol II (sondas C1 y C12). Las flechas indican los sitios de inicio de la transcripción.

Para verificar que los patrones de barrido observados empleando 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 de re-hibridación. Así, una membrana inicialmente hibridada con una sonda del rRNA 5S (transcrito por Pol III), que mostró un barrido muy evidente, presentó una clara escalera nucleosomal al ser re-hibridada con una sonda que corresponde al gen LmjF.31.0570 (transcrito por Pol II), revelando la integridad de la cromatina (Fig. 21).

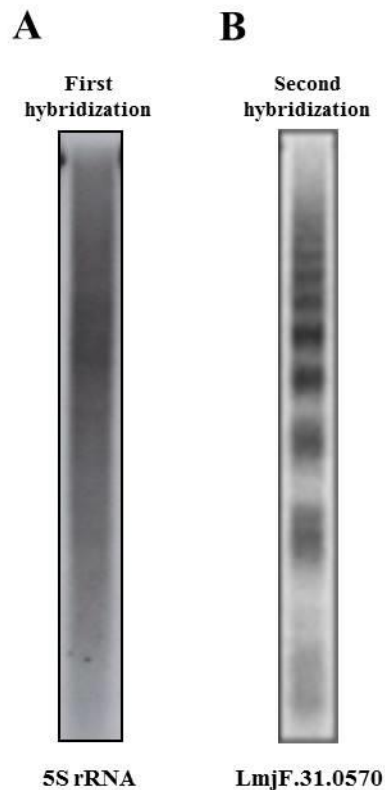


Figura 21. Control de hibridación. Experimentos Southern-blot fueron llevados a cabo con cromatina parcialmente digerida con MNasa. Se muestra el patrón de hibridación obtenido con el gen rRNA 5S transcrito por Pol III. Posteriormente esta membrana fue re-hibridada con una sonda de un gen transcrito por Pol II (LmjF.31.05.70).

6.7 Genes del rRNA tienen un código de histonas

Una vez analizada la arquitectura de la cromatina en genes transcritos por las tres RNA polimerasas, se decidió investigar más a fondo el estado de la cromatina en la unidad del rRNA, transcrita por Pol I, debido a que ésta contiene regiones de inicio y término de la transcripción bien definidas. Además, en otros

organismos se ha encontrado evidencia experimental contradictoria en relación a la importancia de la cromatina en la transcripción de los genes del rRNA (Zentner, et al., 2011; Grummt, 2007; Hamperl, et al., 2012; Jones, et al., 2007). Ha sido difícil analizar epigenéticamente a los genes del rRNA debido a su alto número de copias, y estudios *genome wide* no han revelado información precisa debido a la complejidad de analizar regiones repetidas. El análisis de los genes del rRNA se ha complicado además por el hecho de que no todas sus copias son transcripcionalmente activas en un momento determinado. Por ejemplo, se estima que en levadura sólo la mitad de las unidades del rRNA se expresan en un tiempo dado. *L. major* constituye un buen modelo para el estudio de los genes del rRNA por el hecho de que posee sólo ~12 copias de éstos. Además, por contener tan pocos genes, es muy probable que todos ellos sean expresados en células creciendo activamente, para poder cubrir la alta demanda de ribosomas.

Entonces, una vez analizada la estructura nucleosomal del cistrón del RNA ribosomal mediante Southern blot con escaleras nucleosomales, procedimos a tratar de determinar si algunas marcas epigenéticas están presentes en estos genes. Así, en primera instancia se hicieron alineamientos de los extremos N-terminal de las histonas H3 y H4 de humano con las de *L. major*, con la finalidad de ver el grado de conservación de los aminoácidos y así poder seleccionar a los mejores anticuerpos comerciales disponibles para emplearlos en este estudio. A pesar de que *L. major* divergió tempranamente del linaje eucariótico, el alineamiento mostró que la secuencia N-terminal de las histonas H3 y H4 de *L. major* es parecida a la secuencia de los ortólogos de humano, observándose varios aminoácidos conservados (cajas grises en la Fig. 22). De esta manera, fueron seleccionados algunos anticuerpos comerciales que reconocen modificaciones relacionadas con activación transcripcional (H3K14ac, H3K23ac, H3K27ac) y con represión transcripcional (H3K9me3 y H4K20me3); así como anticuerpos que reconocen a las histonas H3 y H4.

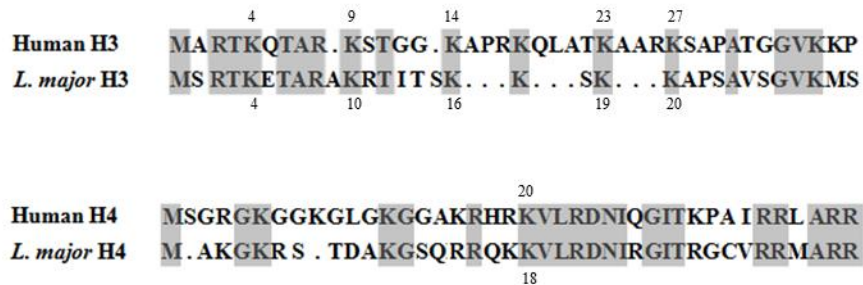


Figura 22. Alineamiento del extremo N-terminal de las histonas H3 y H4 de humano y *L. major*. Se muestran los números de algunas lisinas importantes y en cajas grises se muestran los aminoácidos conservados.

Se probó la especificidad de los anticuerpos por Western blot usando histonas de *L. major* parcialmente purificadas. Se detectó principalmente una banda del tamaño esperado con todos los anticuerpos probados y como se esperaba, con IgG Normal de conejo, usado como control negativo, no se observó ninguna señal, lo que indica que las señales obtenidas empleando anticuerpos comerciales se deben a la especificidad del anticuerpo (Fig. 23).

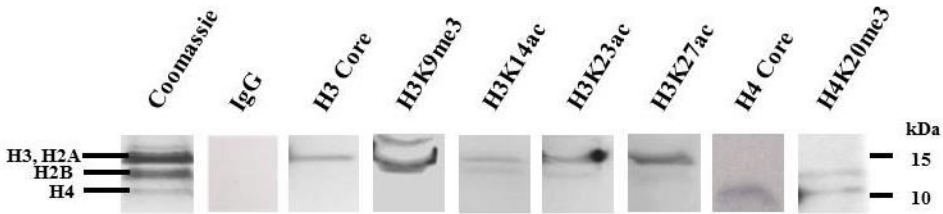


Figura 23. Identificación de modificaciones presentes en las histonas H3 y H4 en *L. major*. Aproximadamente 15 µg de histonas parcialmente purificadas fueron separadas en un gel SDS-PAGE al 18%. Las histonas H3 y H4, así como varias modificaciones presentes en estas histonas fueron detectadas por Western blot usando los anticuerpos previamente señalados. IgG fue usado como control negativo.

Una vez validados, los anticuerpos fueron empleados para realizar ensayos de inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP). En estos experimentos la cromatina fue fijada con formaldehído y sonicada, y el DNA inmunoprecipitado se analizó mediante PCR en tiempo real (qPCR) usando oligonucleótidos de distintas regiones de la unidad del rRNA. Con estos experimentos se determinó el patrón

de distribución de las diferentes marcas epigenéticas a todo lo largo de la unidad del rRNA.

Una posible limitación de nuestros experimentos es que la señal obtenida con diferentes fragmentos representa una acumulación de señales de todos los repetidos de genes del rRNA, y no discrimina entre repetidos individuales que podrían ser transcripcionalmente activos o inactivos. Sin embargo, nuestros resultados sugieren que todos los repetidos de genes rRNA están activos en promastigotes creciendo exponencialmente.

Como primer paso se obtuvo la densidad nucleosomal en la unidad del rRNA usando a la histona H3 (Fig. 24). En concordancia con los ensayos Southern blot, encontramos que los niveles de histona H3 fueron bajos en la región promotora (sondas A1 y A2).

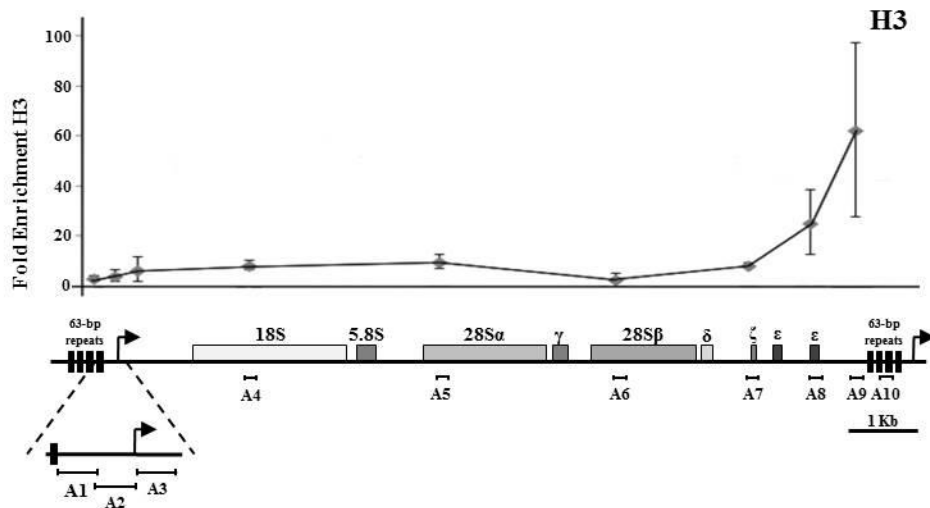


Figura 24. Distribución de la histona H3 en los genes del rRNA de *L. major*. Análisis ChIP fue llevado a cabo con el anticuerpo contra la histona H3. Mediante qPCR fueron amplificados los fragmentos indicados con las barras enumeradas. Los valores están dados como *Fold Enrichment*. El resultado es el promedio de tres experimentos independientes. Las barras de error indican la desviación estándar.

Dichos niveles se incrementaron ligeramente en la región transcrita (sondas A3 a A5), aunque se observó una ligera reducción en la región del rRNA 28Sβ

(sonda A6). Finalmente, se observó un incremento gradual en la abundancia de la histona H3 en el extremo 3' de la unidad del rDNA (sondas A7 y A8) y en la región intergénica (sonda A9) (Fig. 24). En general, estos resultados confirmaron los resultados obtenidos en los ensayos Southern blot (Fig. 18).

Como se esperaba, las marcas de activación transcripcional H3K14ac (Fig. 25A), H3K23ac (Fig. 25B) y H3K27ac (Fig. 25C) mostraron enriquecimiento principalmente en la región promotora (sonda A2); aunque, también se encontraron distribuidas a lo largo de la región codificante (sonda A4 a A7). De manera interesante, los niveles más bajos de estas modificaciones se encontraron en la región IGS, inmediatamente río arriba de los repetidos de 63 pb, en la región donde termina la transcripción de Pol I (sonda A9).

Con respecto a la marca de heterocromatina H3K9me3 (Fig. 25D), inesperadamente mostró un patrón de distribución muy similar al presentado por las tres marcas de eucromatina analizadas, mostrando enriquecimiento principalmente en la región promotora (sonda A2), y en la región codificante (sonda A4-A6). Además, esta marca está ausente en la región de término de la transcripción (sonda A9). Entonces, estos datos indican que en *L. major* H3K9me3 podría ser una marca de eucromatina.

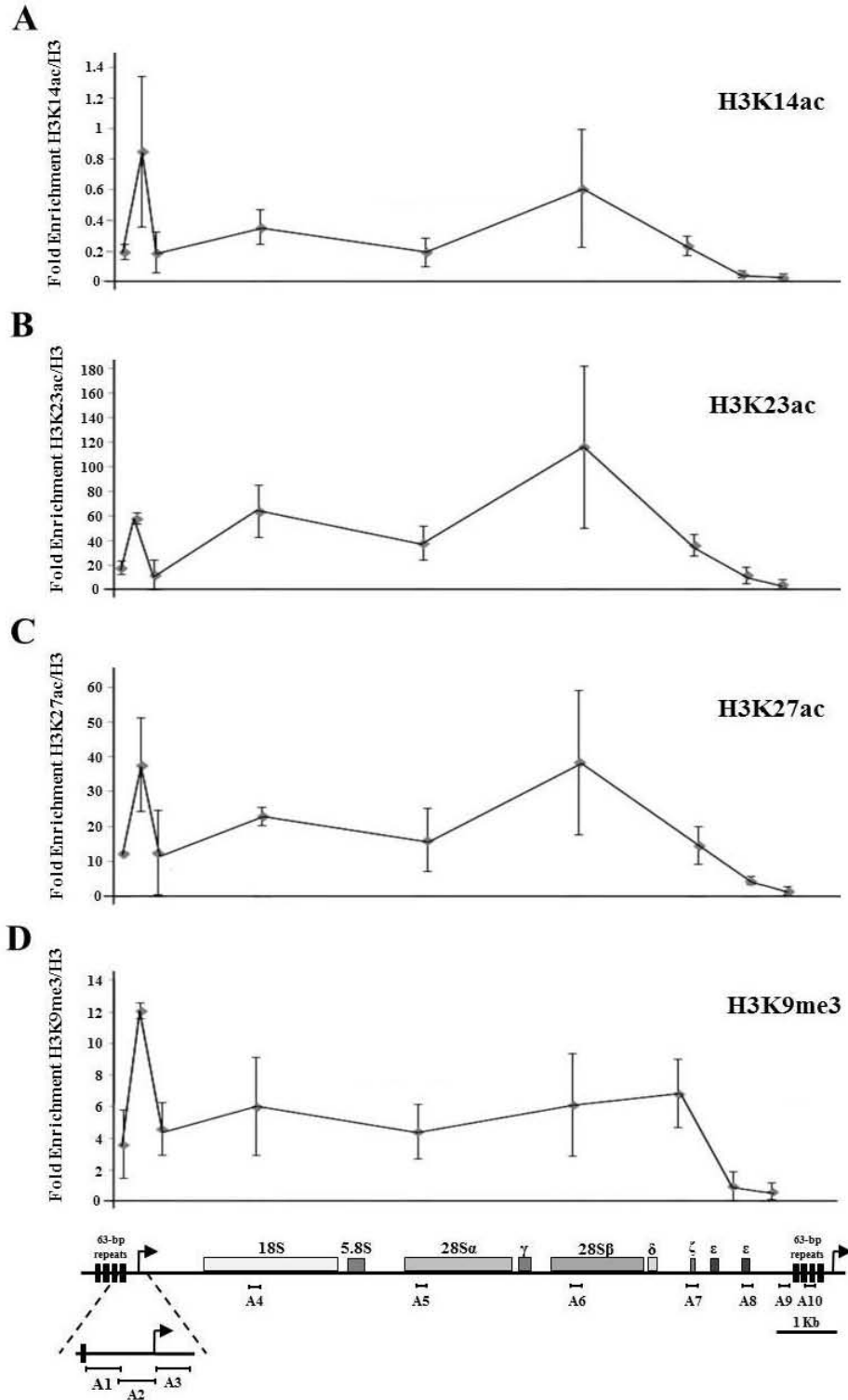


Figura 25. Distribución de modificaciones de histonas asociadas con la activación transcripcional en los genes del rRNA de *L. major*. Análisis ChIP fueron llevados a cabo con anticuerpos contra H3K14ac (A), H3K23ac (B), H3K27ac (C) y H3K9me3 (D). Mediante qPCR fueron amplificados los fragmentos indicados con las barras enumeradas. Los valores, mostrados como *Fold Enrichment*, fueron normalizados con la cantidad de histona H3. El resultado es el promedio de tres experimentos independientes. Las barras de error indican la desviación estándar.

Para investigar de manera adicional la asociación de H3K9me3 con la región de inicio de la transcripción en los genes rRNA de *L. major*, se llevaron a cabo experimentos de inmunolocalización acoplados con FISH. Como primera parte se hizo el FISH usando un fragmento de DNA que contiene el sitio de inicio de la transcripción. Como se esperaba, la señal se detectó en el nucléolo (Fig. 26A). Al hacer los experimentos de inmunolocalización combinados con FISH, se observó que la mayor parte de H3K9me3 está en el nucleoplasma (señal roja); sin embargo, también se detectó señal en el nucléolo, la cual co-localizó con la región de inicio de la transcripción del rDNA (señal verde). Resultados similares se obtuvieron con H3K4me3 y H3K23ac, que son otras marcas de activación transcripcional (Fig. 26B). Es importante señalar que la amplia distribución de H3K9me3 complica el análisis de las imágenes.

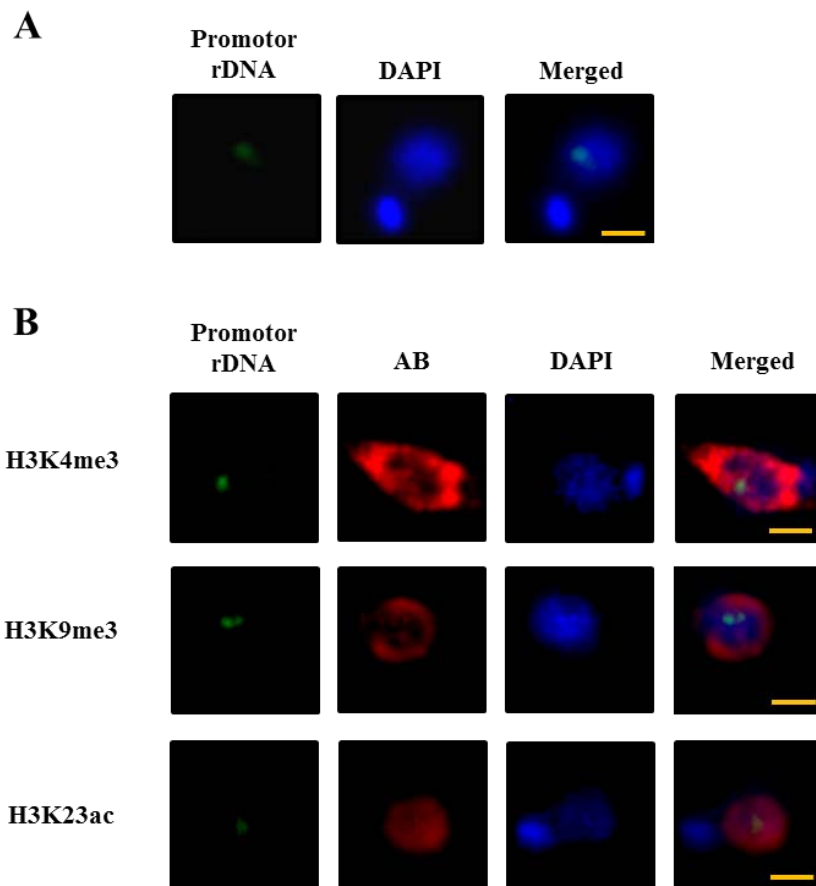


Figura 26. Análisis de inmunofluorescencia usando anticuerpos anti H3K9me3, H3K4me3 y H3K23ac (rojo) combinado con DNA FISH (verde) con la región promotora del rDNA de *L. major*. El DNA fue teñido con DAPI (azul). La barra de escala representa 10 μ m.

H4K20me3, generalmente relacionada con silenciamiento transcripcional, fue la única marca de histonas que presentó un patrón de distribución distinto al resto de las marcas analizadas, ya que estuvo enriquecido a lo largo de la región codificante (Fig. 27, sondas A4 a A8), y estuvo ausente en la región promotora (A2). Como esta modificación estuvo ausente en el espaciador intergenico, no parece estar relacionada con la formación de heterocromatina. Así, H4K20me3 probablemente no está relacionada en la regulación transcripcional de los genes rRNA en *L. major*, podría estar participando tal vez en replicación de DNA o en algún otro proceso. La distribución encontrada de H4K20me3 sugiere que no es una marca represiva en los genes rRNA de *L. major*.

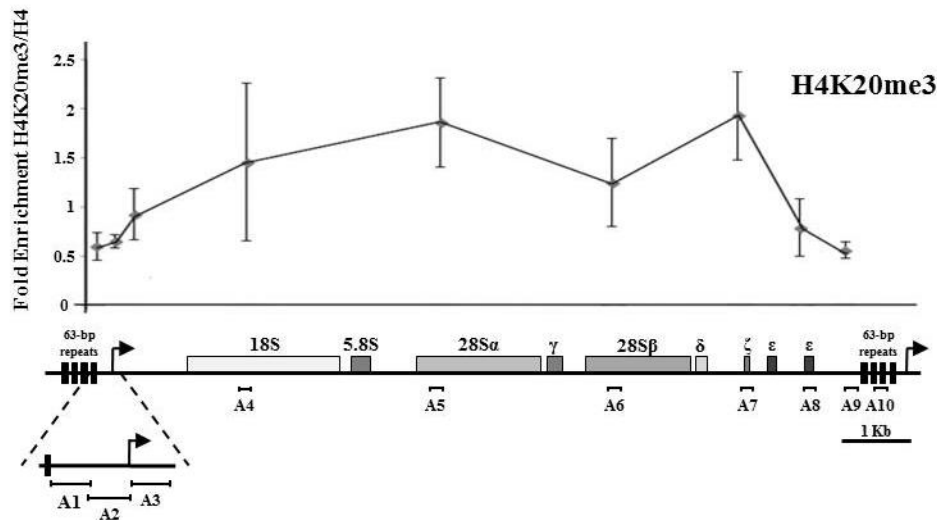


Figura 27. Distribución de la histona H4K20me3 en los genes del rRNA de *L. major*. El análisis ChIP fue llevado a cabo con el anticuerpo contra la histona H4K20me3. Mediante qPCR fueron amplificadas los fragmentos indicados con las barras enumeradas. Los valores, presentados como *Fold Enrichment*, fueron normalizados con la cantidad total de la histona H4. El resultado es el promedio de tres experimentos independientes. Las barras de error indican la desviación estándar.

En su conjunto, nuestros resultados sugieren que las histonas y sus modificaciones post-transcripcionales juegan un papel importante en la transcripción de Pol I en los genes del rRNA de *L. major*. Encontramos que existe una menor densidad nucleosomal en la región promotora y de inicio de la transcripción, mientras que en la región de término y en los repetidos de 63 pb se encuentra una mayor densidad nucleosomal (Fig. 28). Las marcas de histonas

H3K14ac, H3K23ac, H3K27ac y H3K9me3 se comportan como marcas de activación transcripcional, ya que se encuentran principalmente enriquecidas en la región promotora. Sin embargo, también están presentes a lo largo del cistrón del rRNA. La marca H4K20me3 tiene una distribución muy diferente a la de las otras marcas analizadas, lo que sugiere un papel distinto al silenciamiento transcripcional (Fig. 28). Este constituye el primer reporte en el que se analizan en *L. major* las marcas epigenéticas H3K23ac, H3K27ac, H3K9me3 y H4K20me3. Además, aunque H3K9me3, H3K27ac y H4K20me3 habían sido previamente detectadas en los genes del rRNA en otros organismos, este es el primer trabajo en el que se analiza con detalle su distribución en toda la unidad del rRNA.

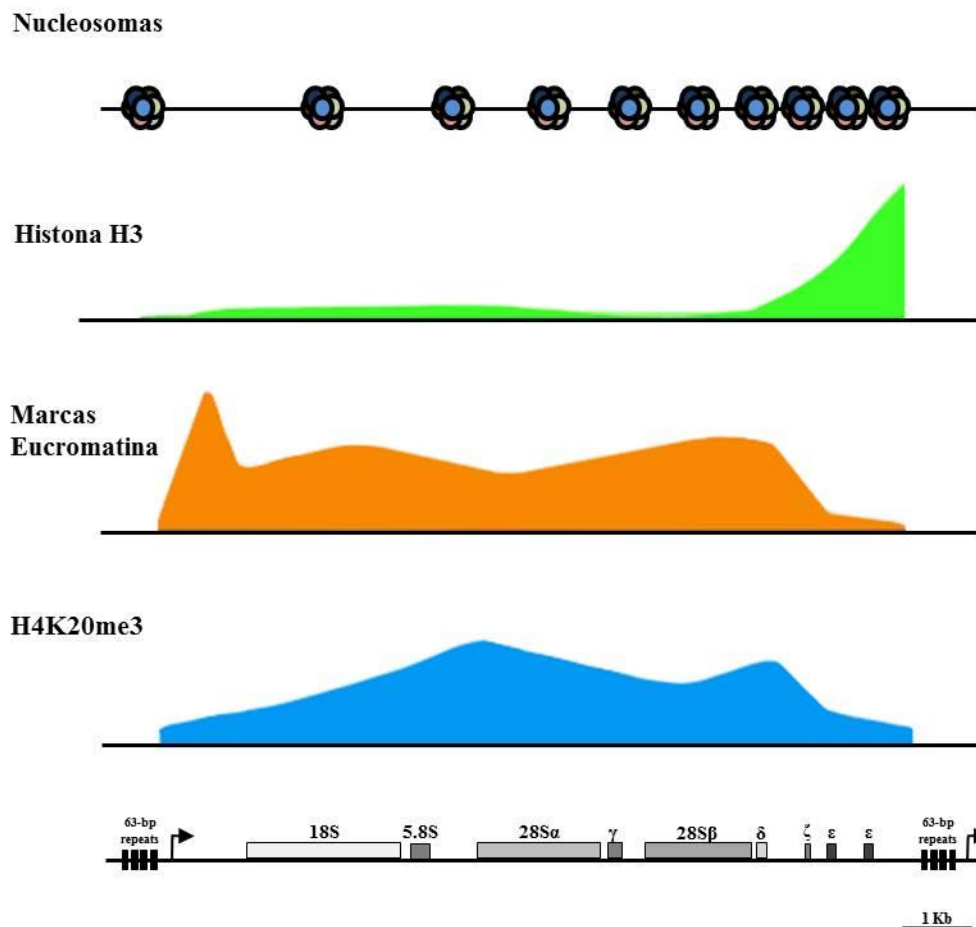


Figura 28. Esquema de la distribución de nucleosomas, histona H3, y marcas de eucromatina y H4K20me3 en la unidad del rRNA de *L. major*. Figuras hechas con PowerPoint 2010 y Sketch Book Pro 6.0.1.

7. DISCUSIÓN

7.1 Estructura nucleosomal en genes transcritos por Pol II y Pol III

La cromatina juega un papel importante en la regulación de la transcripción (Workman y Kingstone, 1998). La MNasa es una enzima muy empleada en estudios de la arquitectura de la cromatina. Se ha observado que regiones transcripcionalmente activas carecen de nucleosomas o presentan nucleosomas débilmente unidos, por lo que presentan un patrón de barrido cuando se analizan mediante Southern blots con cromatina parcialmente digerida con la MNasa. Por el contrario, regiones que no están siendo transcritas tienen una asociación muy fuerte con los nucleosomas, por lo que presentan una escalera nucleosomal muy evidente en los ensayos Southern blot. Genes que tienen una tasa transcripcional baja tienen un patrón nucleosomal intermedio. 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 las RNA polimerasas. Las regiones codificadoras de proteínas, transcritas por Pol II, suelen presentar una estructura nucleosomal definida, independientemente de su nivel de transcripción (Hamid, et al., 1996; Weischet, et al., 1983; Lohr, 1983).

En 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 Southern blot con cromatina parcialmente digerida para determinar la estructura nucleosomal de genes transcritos por las tres RNA polimerasas en promastigotes de *L. major* creciendo activamente. Como primer paso se estandarizaron condiciones de digestión con MNasa para obtener una escalera nucleosomal clara, en donde la banda inferior corresponde al monómero nucleosomal y las bandas mayores corresponden a multímeros nucleosomales (Fig. 16). 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 bajo las condiciones que inicialmente fueron las ideales. Esto posiblemente se deba a que los cultivos de *Leishmania* cambian su metabolismo con el paso del tiempo, haciendo su cromatina más o menos sensible. 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* es de ~190 pb, el cual es muy parecido al reportado en otros organismos, donde la longitud del DNA en el nucleosoma generalmente va de los 180 a los 200 pb. Sin embargo, existen algunas excepciones, como algunos hongos que presentan nucleosomas con 154 pb; y el erizo de mar, cuyo DNA asociado al nucleosoma es de 260 pb (Lewin, 2004).

En el locus Chr01, transcrito por Pol II, se observó en la región promotora (región SSR, Fig. 19, sonda B5), donde inicia la transcripción para ambas unidades policistrónicas divergentes, un barrido del que sobresalen bandas nucleosomales muy tenues, lo que indica que esta región está predominantemente libre de nucleosomas. Este resultado es de esperarse, ya que se ha reportado recientemente que en las regiones SSR divergentes se encuentran altos niveles de marcas de eucromatina. Asimismo, se ha visto la presencia de variantes de histonas relacionadas con transcripción en tripanosomátidos (Siegel, et al., 2009; Thomas, et al., 2009). Por otro lado, fue reportado que la región promotora y secuencias codificantes del gen del *spliced leader* en *Leishmania tarentolae*, el cual es transcrito también por Pol II, carecen de nucleosomas (Hitchcock, et al., 2007). En genes transcritos por Pol II en otros organismos se encontró que la región promotora tiene menor densidad nucleosomal que la región codificante (Bernstein, et al., 2004; Sekinger, et al., 2005). Otros trabajos han reportado que la región del sitio de inicio de la transcripción en genes transcritos por Pol II está libre de nucleosomas (~200 pb), y que hay dos nucleosomas bien posicionados que flanquean dicha región (Yuan, et al., 2005).

Por otro lado, las secuencias intergénicas y los genes codificadores de proteínas del cromosoma 1 mostraron un patrón nucleosomal compacto y espaciado regularmente (Fig. 19, sondas B1-B4 y B6-B9). Un patrón nucleosomal regular también fue encontrado en genes codificadores de proteínas de *T. brucei* (Figueiredo y Cross, 2010), el cual posiblemente refleje la baja tasa transcripcional de Pol II en los tripanosomátidos. En otros organismos se ha observado que la cromatina solamente está relajada en los sitios de inicio de la transcripción, donde se une la RNA polimerasa al DNA, y que Pol II puede transcribir regiones de cromatina compacta, desplazando los nucleosomas que encuentre a su paso (Workman y Kingston, 1998; Lorch, et al., 1987; Lorch, et al., 1988).

Los genes transcritos por Pol III del locus Chr11 mostraron un barrido en los ensayos Southern blot (Fig. 20, sondas C5, C7 y C8). Este resultado concuerda con la presencia de elementos de control interno en estos genes, donde factores de transcripción, aún no identificados, se deben unir para que Pol III pueda iniciar la transcripción. Por ello, es de esperar que estas regiones deban estar libres de nucleosomas. En otras especies, el mapeo de nucleosomas por *genome wide* ha mostrado una baja densidad nucleosomal en genes altamente transcritos por Pol III (Lewin, 2004; Lee, et al., 2004). Aunque cabe aclarar que no todos los genes de tRNA son transcritos al mismo tiempo y al mismo nivel. En *Bombyx mori* se encontró que los genes de tRNA-Gly que tienen baja actividad transcripcional presentan nucleosomas posicionados río arriba de los genes, mientras que los genes altamente transcritos carecen de nucleosomas (Parthasarthy y Gopinathan, 2006).

Al igual que los tRNAs, el rRNA 5S, del cual hay solamente 11 genes en *L. major*, mostró un barrido característico de regiones libres de nucleosomas. Nuevamente, dicho patrón es el esperado para genes con promotores internos. Asimismo, este resultado sugiere que los 11 genes del rRNA 5S de *L. major* son activos transcripcionalmente. En *Xenopus laevis*, que contiene alrededor de 30,000 copias del gen del rRNA 5S arregladas en tándem, sólo una pequeña parte

de estos genes son transcritos en un momento determinado. Así, debido a que la mayoría de los genes están apagados, se obtiene predominantemente un patrón de heterocromatina al analizar su cromatina (Young y Carroll., 1983; Lohr, 1983).

7.2 Genes del rRNA tienen una estructura nucleosomal definida

La alta actividad transcripcional de los genes del rRNA los ha hecho objeto de estudios para tratar de entender el papel que juega la estructura de la cromatina en la transcripción. Mucho se ha discutido acerca del estado nucleosomal en genes activos, habiéndose reportado resultados contradictorios al respecto. Por ejemplo, usando psoralen crosslinking (el cual permite distinguir si una región de DNA está o no ensamblada en nucleosomas) se ha observado que genes activos transcripcionalmente carecen de nucleosomas, mientras que genes apagados tienen una estructura nucleosomal compacta (Cech, T.R y Karrer, K.M, 1980; Lucchini y Sogo, 1992). Por otro lado, al digerir cromatina con MNasa o enzimas de restricción se ha visto que los genes del rRNA activos poseen un estado nucleosomal alterado, y usando imágenes electrónicas se ha sugerido la presencia de histonas parcialmente dobladas, lo que propone un modelo en el cual hay una dinámica nucleosomal que permite a Pol I transcribir a través de los nucleosomas (Mathis y Gorovsky, 1976, Muscarella, et al., 1987, Prior, et al., 1983, Jones, et al., 2007). Usando MNasa-seq se encontró que existe una menor abundancia de nucleosomas en genes transcripcionalmente activos que en genes apagados (Zetner, et al., 2011).

Las diferencias entre los resultados reportados por estos grupos de investigación se deben en gran medida a la técnica de análisis empleada y al organismo estudiado. Además, el número de copias de genes ribosomales y su estado transcripcional son factores importantes a la hora de hacer este tipo de estudios. Recientemente se publicó un estudio en *S. cerevisiae* para tratar de entender el estado nucleosomal en genes ribosomales, en el que se usó una cepa que poseía un bajo número de copias de los genes del rRNA en comparación con

la cepa silvestre (Jones, et al., 2007). La idea fue que al usar células que tuvieran un bajo número de genes del rRNA todos ellos fueran activos transcripcionalmente, quitando así el fondo de los genes del rRNA apagados. Encontraron que los genes del rRNA están en una estructura nucleosomal dinámica, con nucleosomas desfasados (*unphased*) y que los genes del rRNA están asociados con enzimas remodeladoras de la cromatina, lo que cambió la idea de que los genes ribosomales activos carecían de una estructura nucleosomal (Jones, et al., 2007).

En este trabajo, al analizar los genes del rRNA de *L. major*, la región promotora y las zonas flanqueantes mostraron un barrido característico de zonas de inicio de la transcripción (Fig. 18, sonda A1-A3). El hecho de que la región promotora mostrara un barrido indica que posiblemente todas las copias de los genes del rRNA son activas transcripcionalmente. Esta observación se apoya en el hecho de que el genoma de *L. major* contiene únicamente ~12 copias del cistrón del rRNA (Martinez-Calvillo, et al., 2001), número sumamente bajo en comparación con otros eucariontes. Por ello, se presume que todos los genes del rRNAs deben transcribirse en promastigotes creciendo activamente, para poder sintetizar todos los ribosomas requeridos por la célula.

Se ha reportado en levadura que solamente la mitad de los genes del rRNA son transcritos en un momento determinado, y que las copias inactivas presentan un nucleosoma posicionado en su promotor (Jones, et al., 2007). En *T. brucei* se ha propuesto que algunos de los genes rRNA están transcripcionalmente activos, lo cual no ha sido formalmente verificado (Alsford, et al., 2005; Stanne y Rudenko, 2010; Figueiredo y Cross, 2010). Asimismo, se reportó que los genes de glicoproteínas variantes de superficie (VSG), que son transcritos por Pol I, también están libres de nucleosomas (Stanne y Rudenko, 2010; Figueiredo y Cross, 2010).

Por otro lado, la región donde termina la transcripción, y los repetidos de 63 pb que delimitan cada cistrón del rRNA muestran una estructura nucleosomal muy compacta (Fig. 18, sondas A9 y A10), muy parecida a la encontrada en *S.*

cerevisiae para dichas regiones (Dammann, et al., 1993; Lucchini y Sogo, 1994). Los genes de los rRNA 18S y 28S (Fig. 18, sondas A4-A8) mostraron un patrón nucleosomal débil, el cual refleja en la mayoría de los casos una alta tasa transcripcional, ya que los nucleosomas deben ser continuamente desensamblados y ensamblados cada vez que pasa Pol I para transcribir. Resultados similares (un barrido del que sobresalían bandas muy débiles correspondientes al mononucleosoma) fueron encontrados al analizar también por Southern blot cromatina parcialmente digerida de una cepa mutante de *S. cerevisiae* que presentaba solamente 150 copias de los genes del rRNA; lo cual apunta a una unión muy débil del nucleosoma debido a la alta tasa transcripcional de Pol I (Jones, et al., 2007).

En resumen, encontramos que pese a la alta tasa transcripcional de Pol I en los genes del rRNA en *L. major* existe una estructura nucleosomal definida, donde la región promotora está libre de nucleosomas, la región de termino y espaciadores ribosomales están muy empaquetados, mientras que el cuerpo de los genes tiene una estructura nucleosomal intermedia, la cual podría reflejar la alta actividad transcripcional de Pol I (Fig. 18).

7.3 Código de histonas en genes del rRNA

El descubrimiento de que las histonas están presentes en genes del rRNA transcripcionalmente activos nos permite pensar que existe un código de histonas que ayuda al remodelamiento de la cromatina y facilita la transcripción de Pol I. Recientemente se han descrito modificaciones de histonas a lo largo de los genes ribosomales, pero estos resultados no son del todo claros ya que sólo son analizadas pocas regiones de los genes. Asimismo, usan como referencia organismos con un alto número de copias de genes ribosomales, la mayoría de los cuales no están activos transcripcionalmente al mismo tiempo.

Para corroborar los resultados obtenidos por MNasa-Southern blot se decidió realizar ensayos ChIP usando un anticuerpo contra la histona H3 (Fig. 24). Los resultados mostraron una correlación entre el estado nucleosomal y la densidad de la histona H3. Por ejemplo, en la región promotora (donde se apreció un barrido en el Southern blot) se observó una baja cantidad de histona H3. En las regiones codificadoras, donde por Southern blot se observó una mezcla de patrones de cromatina, se obtuvo una abundancia intermedia de la histona H3; y en la región de término de la transcripción se apreció una alta cantidad de histona H3, la cual concuerda con las escaleras muy definidas de nucleosomas observadas en los Southern blots. Nuestros resultados coinciden con los obtenidos en experimentos similares llevados a cabo en *T. brucei* y en *S. cerevisiae* (Stanne y Rudenko, 2010; Jones, et al., 2007).

En eucariontes superiores los genes del rRNA activos transcripcionalmente están hipometilados en las islas CpG, y marcados con modificaciones de histonas asociadas con activación transcripcional, como H3K4me3 y H3K9ac. En cambio, los genes apagados están hipermetilados y marcados con modificaciones de histonas represivas como H3K27me3 y H4K20me3 (McStay y Grummt, 2008, Grummt, 2007). Decidimos ver si existían modificaciones de histonas en los genes del rRNA en *L. major*, por lo que empleamos anticuerpos comerciales contra modificaciones relacionadas con activación o represión transcripcional (H3K9me3, H3K14ac, H3K23ac, H3K27ac y H4K20me3). Algunas de estas modificaciones ya habían sido analizadas en eucariontes de manera exhaustiva, como H3K9me3 y H4K20me3. En cambio, otras modificaciones han sido muy poco estudiadas, como H3K14ac, H3K23ac y H3K27ac. La mayoría de las modificaciones estudiadas en este trabajo (H3K9me3, H3K23ac, H3K27ac y H4K20me3) constituyen un reporte nuevo para los genes del rRNA de *L. major*.

Cabe mencionar que en los tripanosomátidos se han detectado modificaciones en las histonas por ensayos de espectrometría de masas, y que muy recientemente se ha empezado a estudiar el papel de dichas modificaciones

(Da Cunha, et al., 2006; Janzen, et al., 2006; Kawahara, et al., 2008; Siegel, et al., 2008; Villanova, et al., 2009; Siegel, et al., 2009; Lowell, et al., 2005; Respuela, et al., 2008; Thomas, et al., 2009 y Mandava, et al., 2007).

Nuestros resultados indican que las marcas H3K9me3, H3K14ac, H3K23ac y H3K27ac se comportan como marcas de eucromatina, ya que están enriquecidas principalmente en la región promotora (Fig. 25). Sin embargo, también están presentes a lo largo de la región codificante. Como era de esperarse, la presencia de estas marcas en el sitio de término de la transcripción disminuye a niveles basales. Experimentos ChIP-seq con células humanas demostraron que marcas de activación transcripcional, como H3K4me3 y H3K27ac, están principalmente enriquecidas en la región espaciadora intergenica (IGS), habiendo un máximo de enriquecimiento en la región promotora de cada clístron del rRNA (Zentner, et al., 2011). En *Arabidopsis*, por otra parte, se reportó que la marca de heterocromatina H3K9me2 está asociada a genes ribosomales apagados (Lawrence y Pikaard, 2004 y Lawrence, et al., 2004b). Sin embargo, recientemente se observó que H3K9 metilada y HP1 γ , asociados generalmente a represión, están presentes dentro de la región transcrita de genes ribosomales activos en humano (Yuan, et al., 2007). Más aún, se determinó que H3K9me2-3 y HP1 γ están presentes en todos los genes transcripcionalmente activos de Pol II en mamíferos (Vakoc, et al., 2005; revisado en Hediger y Gasser, 2006). Estos reportes apoyan nuestros resultados que sugieren que H3K9me3, enriquecida en la región promotora, podría funcionar como marca de activación transcripcional en *L. major*.

Por último, la distribución de la marca H4K20me3 fue muy diferente a la de las otras marcas analizadas, ya que se encontró dentro de la región codificante, siendo la región promotora y el espaciador intergénico donde no fue abundante. Zentner y colaboradores reportaron para células humanas que la marca de represión H4K20me1 está enriquecida en la región IGS, pero no en las regiones codificantes (Zentner, et al., 2011); aunque también se reportó que esta marca tiene

una distribución azarosa en el genoma de *Plasmodium*, no relacionada con heterocromatina (López-Rubio, et al., 2009). Esto sugiere que al igual que en *Plasmodium* esta marca presenta un patrón de distribución muy distinto que no parece correlacionar con activación o represión de la transcripción.

Como se mencionó antes, una de las posibles limitaciones de este estudio es el hecho de que la señal obtenida en los experimentos ChIP representa una mezcla de señales de los 12 cistrones del rRNA, y no se diferencia entre cistrones transcripcionalmente activos o inactivos. Aunque, nuestro análisis por Southern blot sugiere fuertemente que todos los cistrones del rRNA están activos transcripcionalmente en células de *L. major* creciendo exponencialmente, nosotros no podemos descartar la posibilidad de que algunas copias sean inactivas. Sin embargo, es importante señalar que muchos trabajos donde analizan la distribución de modificaciones de histonas en genes del rRNA, en otros organismos, reportan ensayos ChIP usando células que contienen una mezcla de genes transcripcionalmente activos y apagados (Nemeth, et al., 2008; Zentner, et al., 2011; Zentner, et al., 2014. Zentner et al. (2011) discuten que diferentes estudios han demostrado que las modificaciones relacionadas con activación transcripcional están asociadas con los repetidos activos, mientras que las marcas represivas están relacionadas con las copias inactivas. Por consecuencia, ellos proponen que los distintos patrones de modificaciones que observan ocurren en repetidos ribosomales independientes, y no en el mismo repetido (Zentner, et al., 2011). El patrón de distribución que observamos con H3K9me3 es muy parecido al patrón obtenido con las marcas de eucromatina, ya que está presente en la región promotora y ausente en la región de término de la transcripción. El hecho de que esta marca no está enriquecida en el espaciador intergenico sugiere que la señal observada no se origina de un repetido del rRNA inactivo transcripcionalmente, sino de uno activo. Así, consideramos que las principales conclusiones de nuestros resultados no cambiarían aun si alguno de los genes del rRNA fuera inactivo.

8. CONCLUSIONES

1. Las regiones promotoras de genes transcritos por Pol I y Pol II están libres de nucleosomas, al igual que los genes transcritos por Pol III.
2. Las regiones intergénicas y codificantes de proteínas, transcritas por Pol II, muestran un arreglo nucleosomal regular, muy similar al encontrado en los espaciadores intergénicos de la unidad del rRNA.
3. Las regiones codificantes de los genes del rRNA muestran una estructura nucleosomal intermedia entre la región promotora (libre de nucleosomas) y la región de término de la transcripción (cromatina muy compacta).
4. Las marcas de histonas H3K14ac, H3K23ac y H3K27ac se encuentran enriquecidas principalmente en la región promotora de los genes del rRNA, aunque también están presentes en la región codificante del cistron ribosomal.
5. La marca H3K9me3, generalmente relacionada con heterocromatina y represión transcripcional, tiene una distribución muy parecida a la de marcas de activación transcripcional en *L. major*.
6. La marca H4K20me3 muestra un patrón de distribución distinto al de las otras marcas analizadas, pues está ausente en la región promotora y parcialmente enriquecida en la región codificante de la unidad del rRNA.

9. LITERATURA CITADA

Alvar, J., Vélez, I.D., Bern, C., Herrero, M., Desjeux, P., Cano, J., Jannin, J., den Boer, M. y WHO Leishmaniasis Control Team. (2012). Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. PLoS One. 7(5).

Bannister, A.J., Zegerman, P., Partridge, J.F., Miska, E.A., Thomas, J.O., Allshire, R.C. y Kouzarides, T. (2001). Selective recognition of methylated lysine 9 on histone H3 by the HP1 chromo domain. Nature. 410(6824):120-4.

Belikov, S.V., Dzherbashyajan, A.R., Preobrazhenskaya, O.V., Karpov, V.L. y Mirzabekov, A.D. (1990). Chromatin structure of *Drosophila melanogaster* ribosomal genes. FEBS Lett. 273:205–207.

Bernstein, B.E., Liu, C.L., Humphrey, E.L., Perlstein, E.O. y Schreiber, S.L. (2004). Global nucleosome occupancy in yeast. Genome Biol. 5(9): R62.

Bing, Li., Carey, M. y Workman, J.L. (2007). The role of chromatin during transcription. Cell. 128: 707-719.

Cech, T.R y Karrer, K.M. (1980). Chromatin structure of the ribosomal RNA genes of *Tetrahymena thermophila* as analyzed by trimethylpsoralen crosslinking in vivo. J. Mol. Biol. 136: 395–416.

Clayton, C., Shapira, M. (2007). Post-transcriptional regulation of gene expression in trypanosomes and leishmanias. Mol Biochem Parasitol, 156:93-101.

Cleland, W.W. (1963). Dithiothreitol, a new protective reagent for sh groups. Biochemistry, 3: 480-482.

Conconi, A., Widmer, R.M., Koller, T. y Sogo, J.M. (1989). Two different chromatin structures coexist in ribosomal RNA genes throughout the cell cycle. Cell 57: 753–761.

Conconi, A., Widmer, R.M., Koller, T., Sogo, J.M. (1989). Two different chromatin structures coexist in ribosomal RNA genes throughout the cell cycle. Cell. 57(5):753-61.

da Cunha, J.P., Nakayasu, E.S., de Almeida, I.C. y Schenkman, S. (2006). Post-translational modifications of *Trypanosoma cruzi* histone H4. *Mol Biochem Parasitol*, 150(2):268-77.

Dammann, R., Lucchini, R., Koller, T. y Sogo, J.M. (1993). Chromatin structures and transcription of rDNA in yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res.* 21:2331–2338.

Dammann, R., Lucchini, R., Koller, T., Sogo, J.M. (1995). Transcription in the yeast rRNA gene locus: distribution of the active gene copies and chromatin structure of their flanking regulatory sequences. *Mol Cell Biol.* 15(10):5294-303.

Dimitrov, S.I., Tateossyan, H.N., Stefanovsky, V.Yu., Russanova, V.R., Karagyozov, L. y Pashev, I.G. (1992). Binding of histones to *Xenopus laevis* ribosomal genes with different levels of expression. *Eur. J. Biochem.* 204, 977–981.

Dong, F., Hansen, J.C. y van Holde, K.E. (1990). DNA and protein determinants of nucleosome positioning on sea urchin 5S rRNA gene sequences in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 87(15):5724-8.

Feng, W., Yonezawa, M., Ye, J., Jenuwein, T. y Grummt I. (2010). PHF8 activates transcription of rDNA genes through H3K4me3 binding and H3K9me1/2 demethylation. *Nature structural & molecular biology*, 17(4): 445-450.

Figueiredo, L.M., Cross, G.A.M. (2010). Nucleosomes are depleted at the VSG expression site transcribed by RNA polymerase I in African trypanosomes. *Eukaryot Cell*, 9:148–54.

Figueiredo, L.M., Cross, G.A.M., Janzen, C.J. (2009). Epigenetic regulation in African trypanosomes: a new kid on the block. *Nat Rev Microbiol*, 7:504–13.

Figueiredo, L.M., Janzen, C.J., Cross, G.A.M. (2008). A histone methyltransferase modulates antigenic variation in African trypanosomes. *PLoS Biol*, 6:e161.

French, S.L., Osheim, Y.N., Cioci, F., Nomura, M. y Beyer, A.L. (2003). In exponentially growing *Saccharomyces cerevisiae* cells, rRNA synthesis is determined by the summed RNA polymerase I loading rate rather than by the number of active genes. *Mol. Cell. Biol.* 23:1558–1568.

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

Goodfellow, S.J, y Zomerdijk, J.C. (2013). Basic mechanisms in RNA polymerase I transcription of the ribosomal RNA genes. *Subcell Biochem.* 61:211-36.

Grummt, I. (2007). Different epigenetic layers engage in complex crosstalk to define the epigenetic state of mammalian rRNA genes. *Human Molecular Genetics*, 15:R21.R27.

Grummt, I. y Pikaard, C.S. (2003). Epigenetic silencing of RNA polymerase I transcription. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 4(8):641-9.

Gunzul, A., Tschudi, C., Nakaar, V. y Ullu, E. (1995). Accurate transcription of the *Trypanosoma brucei* U2 small nuclear RNA genes in a homologous extract. *Journal of Biological Chemistry.* 270(29):17287-17291.

Haile, S., Papadopoulou, B. (2007). Developmental regulation of gene expression in trypanosomatid parasitic protozoa. *Current Opinion in Microbiology*, 10:569-577.

Hamid, Q.A., Thanumalayan, S. y Parnaik, V.K. (1996). An improved method to distinguish micrococcal nuclease sensitivity of chromatin. *J Biochem Biophys Methods*, 15;33(1):59-64.

Hamperl, S., Wittner, M., Babl, V., Perez-Fernandez, J., Tschochner, H., Griesenbeck, J. (2013). Chromatin states at ribosomal DNA loci. *Biochimica et Biophysica Acta* 1829, 405-417.

Hediger, F. y Gasser, S.M. (2006). Heterochromatin protein 1: don't judge the book by its cover!. *Curr Opin Genet Dev.* 16(2):143-50.

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 gene array are devoid of nucleosomes. *BMC. Microbiol.* 7, 44.

Hu, P., Wu, S., Sun, Y., Yuan, C.C., Kobayashi, R., Myers, M.P., Hernandez, N. (2002). Characterization of human RNA polymerase III identifies orthologues for *Saccharomyces cerevisiae* RNA polymerase III subunits. *Mol. Cell. Biol.* 22, 8044–8055.

Jansa, P. y Grummt, I. (1999). Mechanism of transcription termination: PTRF interacts with the largest subunit of RNA polymerase I and dissociates paused transcription complexes from yeast and mouse. *Molecular and general Genetics.* 262(3):508-514.

Janzen, C.J., Fernandez, J.P., Deng, H., Diaz, R., Hake, S.B., Cross, G.A.M. (2006). Unusual histone modifications in *Trypanosoma brucei*. *FEBS Lett*, 580:2306–10.

Janzen, C.J., Hake, S.B., Lowell, J.E., Cross, G.A.M. (2006b). Selective di- or trimethylation of histone H3 lysine 76 by two DOT1 homologs is important for cell cycle regulation in *Trypanosoma brucei*. *Mol Cell*, 23:497–507.

Johnson, P.J., Kooter, J.M., Borst, P. (1987). Inactivation of transcription by UV irradiation of *Trypanosoma brucei* provides evidence for a multicistronic transcription unit including a VSG gene. *Cell.* 51(2):273-81.

Jones, H.S., Kawauchi, J., Braglia, P., Alen, C.M., Kent., N, A., Proudfoot, N.J. (2007). RNA polymerase I in yeast transcribes dynamic nucleosomal rDNA. *Nature structural & molecular biology.* 14 (2): 123-130.

Juven-Gershon, T., Hsu, J.Y., Theisen, J.W. y Kadonaga, .JT. (2008). The RNA polymerase II core promoter - the gateway to transcription. *Curr Opin Cell Biol.* 20(3):253-9.

Juven-Gershon, T., Hsu, J.Y., Theisen, J.W. y Kadonaga, J.T. (2008). The RNA polymerase II core promoter—the gateway to transcription. *Current Opinion in Cell Biology.* vol. 20, no. 3:253–259.

Kawahara, T., Siegel, T.N., Ingram, A.K., Alsford, S., Cross, G.A.M., Horn, D. (2008). Two essential MYST-family proteins display distinct roles in histone H4K10 acetylation and telomeric silencing in trypanosomes. *Mol Microbiol*, 69:1054–68.

Keener, J., Dodd, J.A., Lalo, D. y Nomura, M. (1997). Histones H3 and H4 are components of upstream activation factor required for the high-level transcription of yeast rDNA by RNA polymerase I. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:13458–13462.

Kobayashi, T. (2008). A new role of the rDNA and nucleolus in the nucleus-rDNA instability maintains genome integrity. *Bioessays* 30: 267-272.

Kornberg, R.D. y Lorch, Y. (1999). Twenty-five years of the nucleosome, fundamental particle of the eukaryote chromosome. *Cell*, 98: 285-294.

Lawrence, R.J., Earley, K., Pontes, O., Silva, M., Chen, Z.J., Neves, N., Viegas, W. y Pikaard, C.S. (2004b). A concerted DNA methylation/histone methylation switch regulates rRNA gene dosage control and nucleolar dominance. *Mol Cell.*, 13(4):599-609.

Lawrence, R.J., Pikaard, C.S. (2004). Chromatin Turn Ons and Turn Offs of Ribosomal RNA Genes. *Cell Cycle*, 3:7, 880-883.

Lee, C.K., Shibata, Y., Rao, B., Strahl, B.D. y Lieb, J.D. (2004). Evidence for nucleosome depletion at active regulatory regions genome-wide. *Nat Genet.* 36(8):900-5.

Lee, T.I. y Young, R. A. (2000). Transcription of eukaryotic protein-coding genes. *Annual Review of Genetics*. vol. 34:77–137.

Lee, T.I. y Young, R.A. (2000). Transcription of eukaryotic protein-coding genes. *Annual Review of Genetics*. 34: 77-137.

Lewin B. *Genes VIII*. Editorial Person Prentice Hall, 2004. 571-595 p.

Lohr, D. (1983). Chromatin structure differs between coding and upstream flanking sequences of the yeast 35S ribosomal genes. *Biochemistry* 22, 927–934.

Lohr, D. (1983). The chromatin structure of an actively expressed, single copy yeast gene. *Nucleic Acids Research*, 11: 6755-6773.

Lorch, Y., LaPointe, J.W. y Kornberg, R.D. (1987). Nucleosomes inhibit the initiation of transcription but allow chain elongation with the displacement of histones. *Cell*. 49(2):203-10.

Lorch, Y., LaPointe, J.W. y Kornberg, R.D. (1988). On the displacement of histones from DNA by transcription. *Cell*. 55(5):743-4.

Lowell, J.E., Kaiser, F., Janzen, C.J. y Cross, G.A. (2005). Histone H2AZ dimerizes with a novel variant H2B and is enriched at repetitive DNA in *Trypanosoma brucei*. *J Cell Sci.*, 15;118(Pt 24):5721-30.

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.

Luchinni, R. y Sogo, J.M. (1992). Different chromatin structures along the spacers flanking active and inactive *Xenopus* rRNA genes. *Mol Cell Biol*, (10):4288-96.

Mahapatra, S., Dewari, P.S., Bhardwaj, A. y Bhargava, P. (2011). Yeast H2A.Z, FACT complex and RSC regulate transcription of tRNA gene through differential dynamics of flanking nucleosomes. *Nucleic Acids Res.* 39(10):4023-34.

Mandava, V., Fernandez, J.P., Deng, H., Janzen, C.J., Hake, S.B., Cross, G.A.M. (2007). Histone modifications in *Trypanosoma brucei*. *Mol Biochem Parasitol*, 156:41–50.

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

Martínez-Calvillo, S., 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.

Martinez-Calvillo, S., Vizuet-de-Rueda, J.C., Florencio-Martínez, L.E., Manning-Cela R.G. y Figueroa-Angulo E.E. (2010). Gene expression in trypanosomatid parasites. *J Biomed Biotechnol.* doi: 10.1155/2010/525241.

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

McStay, B., Grummt, I. (2008). The Epigenetics of rRNA Genes: From Molecular to chromosome biology. *Annu.Rev.Cell Dev. Biol.* 24:131-57.

Meneghini, M.D., Wu, M. y Madhani, H.D. (2003). Conserved histone variant H2A.Z protects euchromatin from the ectopic spread of silent heterochromatin. *Cell*. 112(5):725-36.

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.

Németh, A., Guibert, S., Tiwari, V.K., Ohlsson, R. y Längst, G. (2008). Epigenetic regulation of TTF-I-mediated promoter-terminator interactions of rRNA genes. *EMBO J*. 27(8):1255-65.

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*. 10(232).

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). Survey and summary: transcription by RNA polymerases I and III. *Nucleic Acids Res*. 6: 1283:1298.

Pokholok, D.K., Harbison, C.T., Levine, S., Colem M., Hannett, N.M., Lee, T.I., Bell, G.W., Walker, K., Rolfe, P.A., Herbolzheimer, E., Zeitlinger, J., Lewitter, F., Gifford, D.K. y Young, R.A. (2005). Genome-wide map of nucleosome acetylation and methylation in yeast. *Cell*. 122(4): 517-27.

Prescott, E.M. y Proudfoot, N.J. (2002). Transcriptional collision between convergent genes in budding yeast. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(13):8796-8801.

Prior, C.P., Cantor, C.R., Johnson, E.M., Littau, V.C. y Allfrey, V.G. (1983). Reversible changes in nucleosome structure and histone H3 accessibility in transcriptionally active and inactive states of rDNA chromatin. *Cell* 34: 1033–1042.
Rando, O.J. (2007). Global patterns of histone modifications. *Current Opinion in Genetics & Development*, 17:1-6.

Reeder, R.H. (1999). Regulation of RNA polymerase I transcription in yeast and vertebrates. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* 62, 293-327.

Requena, J.M., Soto, M., Quijada, L., Carrillo, G. y Alonso, C. (1997). A region containing repeated elements is associated with transcriptional termination of *Leishmania infantum* ribosomal RNA genes. *Molecular and Biochemical Parasitology.* 84(1):101-110.

Respuela, P., Ferella, M., Rada-Iglesias, A., Aslind, L. (2008). Histone acetylation and methylation at sites initiating divergent polycistronic transcription in *Trypanosoma cruzi*. *Journal of Biological Chemistry*, vol. 283, no. 23, pp. 15884–15892.

Roy, A.L. y Singer, D.S. (2015). Core promoters in transcription: old problem, new insights. *Trends in Biochemical Sciences.* 40(3):165-171.

Russell, J. y Zomerdijk, J.C.B.M. (2005). RNA-polymerase-I-directed rDNA transcription, life and works. *Trends Biochem Sci.* 30(2):87-96.

Russell, J. y Zomerdijk, J.C.B.M. (2006). The RNA polymerase I transcription machinery. *Biochem. Soc. Symp.* 203:216.

Sainsbury, S., Bernecky, C. y Cramer, P. (2015). Structural basis of transcription initiation by RNA polymerase II. *Molecular Cell Biology.* 16:129-143.

Santisteban, M.S., Hang, M. y Smith, M.M. (2011). Histone variant H2A.Z and RNA polymerase II transcription elongation. *Mol Cell Biol.* 31(9):1848-60.

Santoro, R. y Grummt, I. (2005). Epigenetic mechanism of rRNA gene silencing: temporal order of NoRC-mediated histone modification, chromatin remodeling, and DNA methylation. *Mol. Cell. Biol.* 25: 2539–2546.

Sekinger, E.A., Moqtaderi, Z. y Struhl, K. (2005). Intrinsic histone-DNA interactions and low nucleosome density are important for preferential accessibility of promoter regions in yeast. *Mol. Cell.* 18: 735-748.

Shimamura, A., Tremethick, D. y Worcel, A. (1988). Characterization of the repressed 5S DNA minichromosomes assembled in vitro with a high-speed supernatant of *Xenopus laevis* oocytes. *Mol Cell Biol.* 8(10):4257-69.

Siegel, T.N., Hekstra, D.R., Kemp, L.E., Figueiredo, L.M., Lowell, J.E., Fenyo, D., Wang, X., Dewell, S., Cross, G.A. (2009). Four histone variants mark the boundaries of polycistronic transcription units in *Trypanosoma brucei*. *Genes Dev*, 23:1063–76.

Siegel, T.N., Kawahara, T., Degrasse, J.A., Janzen, C.J., Horn, D., Cross, G.A.M. (2008). Acetylation of histone H4K4 is cell cycle regulated and mediated by HAT3 in *Trypanosoma brucei*. *Mol Microbiol*, 67:762–71.

Stanne, T.M. y Rudenko, G. (2010). Active VSG Expression Sites in *Trypanosoma brucei* Are Depleted of Nucleosomes. *Eukaryotic Cell*, 136–147.

Strohner, R., Németh, A., Nightingale, K.P., Grummt, I., Becker, P.B. y Längst, G. (2004). Recruitment of the nucleolar remodeling complex NoRC establishes ribosomal DNA silencing in chromatin. *Mol. Cell. Biol.* 24:1791–1798.

Sturm, N.R., Yu, M.C. y Campbell, D.A. (1999). Transcription termination and 3'-end processing of the spliced leader RNA in kinetoplastids. *Molecular and Cellular Biology*, 19 (2): 1595-1604.

Thomas, S., Green, A., Sturm, N.R., Campbell, D.A., Myler, P.J. (2009). Histone acetylations mark origins of polycistronic transcription in *Leishmania major*. *BMC Genomics*, 10:152.

Tongaonkar, P., French, S.L., Oakes, M.L., Vu, L., Schneider, D.A., Beyer, A.L. y Nomura, M. (2005). Histones are required for transcription of yeast rRNA genes by RNA polymerase I. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102:10129–10134.

Uliana, S.R.B., Fisher, W., Stempliuk, V.A. y Floeter-Winter, L.M. (1996). Structural and functional characterization of the *Leishmania amazonensis* ribosomal RNA promoter. *Molecular and Biochemical Parasitology*. 76(1-2):245-255.

Vakoc, C.R., Mandat, S.A., Olenchok, B.A. y Blobel, G.A. (2005). Histone H3 lysine 9 methylation and HP1 γ are associated with transcription elongation through mammalian chromatin. *Mol. Cell* 19:381–91.

Van der Ploeg, L.H. (1986). Discontinuous transcription and splicing in trypanosomes. *Cell*. 47:479-480.

Villanova, G.V., Nardelli, S.C., Cribb, P., Magdaleno, A., Silber, A.M., Motta, M.C., Schenkman, S. y Serra E. (2009). *Trypanosoma cruzi* bromodomain factor 2

(BDF2) binds to acetylated histones and is accumulated after UV irradiation. *Int J Parasitol*, 39(6):665-73.

Warner, J.R. (1999). The economics of ribosome biosynthesis in yeast. *Trends Biochem. Sci.* 24:437-440.

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.

Willis, I.M. (1993). RNA polymerase III. Genes, factors and transcriptional specificity. *European Journal of Biochemistry*. vol. 212, no. 1:1-11.

Worthey, E.A., Martinez-Calvillo, S., Schnauffer, A., Aggarwal, G., Cawthra, J., Fazelinia, G., Fong, C., Fu, G., Hassebrock, M., Hixson, G., Ivans, 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(14):4201-4210.

Wright, J.R., Siegel, T.N. y Cross, G.A. (2010). Histone H3 trimethylated at lysine 4 is enriched at probable transcription start sites in *Trypanosoma brucei*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 172(2):141-4.

Yang, Z. y Hayes, J.J. (2003). *Xenopus* transcription factor IIIA and the 5S nucleosome: development of a useful in vitro system. *Biochem Cell Biol.* 81(3):177-84.

Young, D. y Carroll, D. (1983). Regular arrangement of nucleosomes on 5S rRNA genes in *Xenopus laevis*. *Molecular and Cellular Biology*, 3: 720-730.

Yuan, G.C., Liu, Y.J., Dion, M.F., Slack, M.D., Wu, L.F., Altschuler, S.J. y Rando, O.J. (2005). Genome-scale identification of nucleosome positions in *S. cerevisiae*. *Science*. 309: 626-630.

Yuan, X., Feng, W., Imhof, A., Grummt, I. y Zhou, Y. (2007). Activation of RNA polymerase I transcription by cockayne syndrome group B protein and histone methyltransferase G9a. *Mol Cell*. 27(4):585-95.

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.

Zentner, G.E., Saiakhova, A., Manaenkov, P., Adams, M.D. y Scacheri, P.C. (2011). Integrative genomic analysis of human ribosomal DNA. *Nucleic Acids Research*, 39(12):4949-4.

Zhou, Y., Santoro, R. y Grummt, I. (2002). The chromatin remodeling complex. NoRC targets HDAC1 to the ribosomal gene promoter and represses RNA polymerase I transcription. *EMBO J.* 21:4632–4640.

10. APÉNDICE

10.1 Artículo para la obtención del grado:

Vizuet-de-Rueda, J.C., Florencio-Martínez, L.E., Padilla-Mejía, N.E., Manning-Cela, R., Hernández-Rivas, R. y Martínez-Calvillo, S. (2016). Ribosomal RNA Genes in the Protozoan Parasite *Leishmania major* Possess a Nucleosomal Structure. *Protist.* 167(2):121-135.

ORIGINAL PAPER

Ribosomal RNA Genes in the Protozoan Parasite *Leishmania major* Possess a Nucleosomal Structure



Juan C. Vizuet-de-Rueda^a, Luis E. Florencio-Martínez^a, Norma E. Padilla-Mejía^a,
Rebeca Manning-Cela^b, Rosaura Hernández-Rivas^b, and Santiago Martínez-Calvillo^{a,1}

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

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

Submitted September 4, 2015; Accepted February 3, 2016
Monitoring Editor: Michael L. Ginger

Little is known about nucleosome structure and epigenetic regulation of transcription of rRNA genes in early-branched eukaryotes. Here we analyze the chromatin architecture and distribution of some histone modifications in the rRNA genes in the parasitic protozoon *Leishmania major*. Southern blots of MNase-partially-digested chromatin with DNA probes spanning the whole rRNA gene repeat showed that the intergenic spacer presents a tight nucleosomal structure, whereas the promoter region is practically devoid of nucleosomes. Intermediate levels of nucleosomes were found in the rRNA coding regions. ChIP assays allowed us to determine that H3K14ac, H3K23ac and H3K27ac, epigenetics marks that are generally associated with activation of transcription, are enriched in the promoter region. In contrast, H4K20me3, which is generally related to transcriptional silencing, was absent from the promoter region and intergenic spacer and enriched in the coding region. Interestingly, the distribution pattern for H3K9me3, generally linked to heterochromatin formation, was very similar to the distribution observed with the euchromatin marks, suggesting that this modification could be involved in transcriptional activation of rRNA genes in *L. major*.

© 2016 Elsevier GmbH. All rights reserved.

Key words: Pol I transcription; epigenetic regulation; rRNA genes; *Leishmania major*; histone modification; nucleosome structure.

¹Corresponding author; fax +52 55 5623-1138
e-mail scalv@campus.iztacala.unam.mx (S. Martínez-Calvillo).

Abbreviations: Pol, RNA polymerase; rRNA, ribosomal RNA; PTM, post-translational modification; IGS, intergenic spacer; TSS, transcription start site; MNase, micrococcal nuclease.

Introduction

In eukaryotes, ribosomal RNA (rRNA) genes are tandemly repeated at one or few chromosomal loci. The rRNA genes are transcribed by RNA polymerase I (Pol I), which produces a primary transcript (~35-47S) that is processed into the mature 18S, 5.8S and 28S rRNAs (Goodfellow and Zomerdijk 2012; Paule and White 2000). These three rRNA molecules, together with the Pol III-transcribed 5S rRNA, comprise the main structural and catalytic components of the ribosome. The number of rRNA gene repeats varies from ~100 to more than 10,000 among different organisms (Russell and Zomerdijk 2005; Sollner-Webb and Mougey 1991). Interestingly, only a subset of rRNA genes is transcribed at any given time (Grummt 2007), and it has been established that chromatin structure plays an important role in the silencing and activation of these genes (Hamperl et al. 2013; Lawrence and Pikaard 2004; McStay and Grummt 2008).

Eukaryotic DNA is folded into nucleosomes, the basic repetitive units of chromatin, that comprise ~150 bp of DNA wrapped around a histone octamer composed of two copies each of histones H2A, H2B, H3 and H4 (Kornberg and Lorch 1999). Chromatin structure is important in several biological processes, including transcriptional regulation, and DNA recombination and replication. Changes in chromatin architecture can be achieved by histone post-translational modifications (PTMs) (Kouzarides 2007), and by incorporation of distinct histone variants (Weber and Henikoff 2014). Histone PTMs include methylation, acetylation and phosphorylation, which occur at specific residues mainly within the N-terminal tail of histones (Kouzarides 2007; Rando 2007).

Each rRNA gene repeat contains regulatory sequences that include promoters, enhancers and terminators, which are located within an intergenic spacer (IGS) of variable length (Torres-Machorro et al. 2010). Analyses of the nucleosomal structure of rRNA genes have been complicated by the repetitive nature of rRNA genes and by the presence of both active and inactive genes at any particular time. Nevertheless, different lines of evidence indicate that transcriptionally active rRNA gene repeats show an open chromatin state characterized by acetylated histones (Goodfellow and Zomerdijk 2012; Grummt 2007; Zentner et al. 2011). In contrast, inactive rRNA gene repeats possess a packaged chromatin structure characterized by methylation of the DNA and repressive histone modifications, for instance, trimethylation of

lysine 9 in histone H3 (H3K9me3) (Zentner et al. 2014).

The trypanosomatid parasite *Leishmania major* possesses atypical mechanisms of gene expression, including polycistronic Pol II transcription and maturation of mRNAs by trans-splicing (Martinez-Calvillo et al. 2010; Michaeli 2011). Little is known about chromatin structure and epigenetic regulation in *L. major* and other trypanosomatids. Histones in these organisms are divergent from those found in other organisms. Nevertheless, as in other organisms, nucleosomes constitute the basic structural unit of chromatin in trypanosomatids (Belli 2000; Figueiredo et al. 2009; Horn 2001). A genome-wide study showed the presence of histone H3 acetylated at K9/K14 at the origins of Pol II polycistronic transcription in *L. major* (Thomas et al. 2009). Other studies revealed that origins of Pol II transcription contain acetylated (H3K9/K14 and H4K10) and methylated (H3K4) histones in the related parasites *Trypanosoma cruzi* (Respuela et al. 2008) and *Trypanosoma brucei* (Siegel et al. 2009). Also, histone variants H2AZ and H2BV are enriched at Pol II transcription start sites in *T. brucei* (Siegel et al. 2009). Thus, post-translational histone modifications and histone variants might generate an open chromatin structure that is needed for initiating Pol II transcription in trypanosomatids.

The knowledge of transcription and chromatin structure in rRNA genes in *L. major* is scarce. It was estimated that the genome of this parasite contains only ~12 copies of the rRNA gene repeat per haploid genome, organized in head-to-tail tandem arrays on chromosome 27 (Ivens et al. 2005; Martinez-Calvillo et al. 2001). Repetitive elements of 63 bp are contained within the IGS, between the 18S and the 28S rRNA genes. As in other trypanosomatids, the *L. major* 28S rRNA gene is fragmented into six separate molecules: 28S α , β , γ , δ , ϵ and ζ . However, some of the rRNA gene repeats in *L. major* possess two copies of the 28S ϵ rRNA gene (Martinez-Calvillo et al. 2001). The transcription start site (TSS) of the rRNA unit was localized to 1043 bp upstream of the 18S rRNA gene and 184 bp downstream of the 63-bp repeats. A 391-bp fragment from -184 to +207 (relative to the TSS) was shown to contain a Pol I promoter that can drive high levels of expression of a reporter gene. Transcription of the rRNA genes seems to terminate upstream of the 63-bp repeats (Martinez-Calvillo et al. 2001).

Here we report the analysis of chromatin architecture of rRNA genes in *L. major*. Nucleosomal ladders analyzed by Southern blots showed that the

rRNA coding region has a nucleosomal structure. The distribution of several histone modifications related to transcriptional activation (H3K14ac, H3K23ac and H3K27ac) was analyzed by ChIP assays, which demonstrated that they are enriched in the promoter region. On the other hand, the silencing mark H4K20me3 was enriched in the coding region and absent from the promoter and intergenic spacer. Notably, the heterochromatin mark H3K9me3 presented a distribution pattern that strongly resembles the distribution observed with the euchromatin marks, which suggests that in *L. major* it may participate in the activation of transcription of rRNA genes.

Results

L. major rRNA Genes Possess a Nucleosomal Structure

The role that chromatin structure plays in the expression of multiple-copy rRNA genes in different organisms has been a controversial matter for many years: while some studies have shown that actively transcribed rRNA genes are essentially nucleosome-free, other studies have reported that active rRNA genes possess nucleosomal structure (Conconi et al. 1989; Jones et al. 2007; Lohr 1983; Tongaonkar et al. 2005). The protozoan parasite *L. major* contains a relatively low number of rRNA gene repeats (~12), and it is therefore possible that all of them are transcriptionally active at any one time in exponentially growing cells. Thus, *L. major* is a good model for the study of the relation between chromatin structure and Pol I transcription. Consequently, in order to analyze the nucleosomal architecture of the rRNA genes in *L. major*, Southern blots of MNase-partially-digested chromatin were carried out. When fractionated by electrophoresis on agarose gels, the *L. major* chromatin digested with a series of concentrations of MNase exhibited a distinctive DNA ladder pattern, with the length of the DNA in each band representing a multiple of the monomer that corresponds to the DNA bound to a single nucleosome plus linker DNA (Supplementary Material Fig. 1S). The monomer contains ~200 bp of DNA in *L. major*, which is similar to the length of DNA present in nucleosomal monomers from other species.

The Southern blot analysis was performed with a range of ³²P-labelled DNA probes spanning the whole rRNA gene repeat, from the promoter region to the 63-bp repeat region. As shown in Figure 1,

the promoter region (probe 2, from position -1 to -111 in relation to the TSS) presented a smeared hybridization pattern, characteristic of promoter regions, that indicates that this area of the rRNA gene repeat is devoid of nucleosomes. A similar pattern was observed with probe 1 (from position -89 to -190, which may contain an upstream domain of the promoter region) and with probe 3 (from +1 to +107). In contrast, both the 63-bp repeat region (probe 10) and the intergenic region located between 28S_ε rRNA and the 63-bp repeats (probe 9) showed well-defined nucleosomal ladders, indicating that these regions are packed into a tight nucleosomal structure. Notably, the probes that contained rRNA coding sequences (probes 4 to 8) presented a smeary pattern with embedded bands that predominantly correspond to mono- and di-nucleosomal bands. Therefore, the pattern presented by the majority of the rRNA genes is intermediate between the well-defined nucleosomal ladder of the 63-bp repeats and the smear presented by the promoter region. With probe 8, that contains the 28S_ε rRNA gene, some bands that do not correspond to nucleosomal bands were observed, probably reflecting rearrangements in the position of the nucleosomes in the 3' end region of the rRNA repeat. The hybridization signal obtained with this probe was stronger than the signal observed with other probes from the transcribed regions (probes 3 to 7), perhaps because the 28S_ε rRNA gene is duplicated in some of the rRNA gene repeats in *L. major*. Thus, our results indicate that the transcribed region of the rRNA gene repeat in *L. major* shows a nucleosomal structure; however, nucleosomes seem to be unstable, as they are most likely continuously removed by the passage of Pol I.

Notably, our Southern blot results support the hypothesis that all rRNA genes are transcriptionally active in exponentially growing *L. major* promastigotes. The promoter region (probe 2) and flanking regions (probes 1 and 3) showed a smeared hybridization pattern that indicates that this area is nucleosome-free; if some rRNA genes were inactive, nucleosomal ladders would have been evident in this region. Moreover, the weak and fuzzy nucleosomal patterns observed in the rRNA coding region in *L. major* strongly resemble those observed in a yeast mutant that contains only active rRNA genes (Jones et al. 2007). These patterns are very different from the strong nucleosomal ladders observed in the rRNA genes in wild type yeast, which contains ~150 rRNA gene repeats, half of which are inactive. Sharp nucleosomal ladders have also been reported in the rRNA coding regions from other

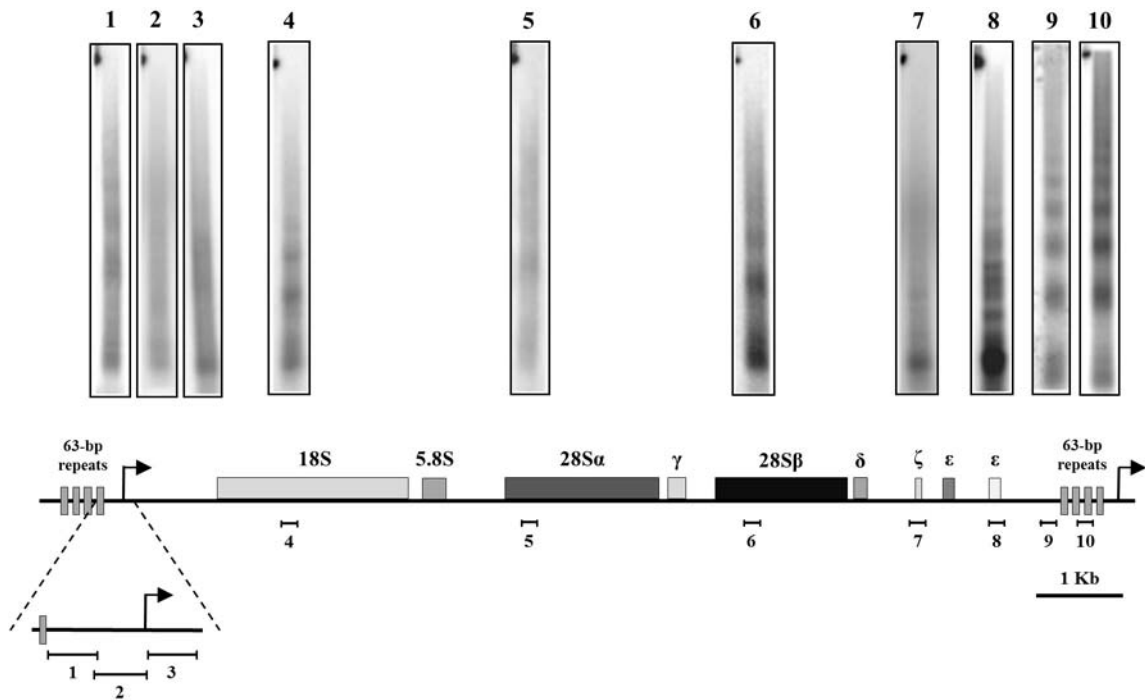


Figure 1. Nucleosome structure analysis in the rRNA gene repeat. Southern blot experiments were performed with chromatin partially digested with MNase (20 U/ml, for 4 min at 30 °C), followed by DNA extraction. Around 3 μ g of digested chromatin was separated on 1.5% agarose gels. After electrophoresis, nucleic acids were transferred to Hybond N+ membranes (Amersham) by capillarity. Blots were hybridized with DNA fragments labeled with [α - 32 P]dCTP. The position of the probes is indicated in the map of the *L. major* rRNA gene repeat shown in the bottom part of the figure. The arrows denote the transcription start sites. The 63-bp repeat regions are not to scale.

organisms that contain active and inactive repeats (Conconi et al. 1992).

Since coding regions in the rRNA gene repeat showed a very distinctive nucleosomal pattern, we wondered whether coding regions transcribed by the other two RNA Polymerases present a similar nucleosomal architecture. Therefore, nucleosomal ladders were analyzed by Southern blots with two Pol III-transcribed genes (tRNA-Lys and 5S rRNA) and two Pol-II transcribed genes (*LmjF.31.0570* and *LmjF.030680*). As shown in Figure 2A, the tRNA-Lys and 5S rRNA genes, which contain internal promoter elements, presented a marked smearing in the MNase digestion profile that indicates an open chromatin structure. These hybridization signals were very similar to the one showed by the rRNA promoter (probe 2). By contrast, protein-coding genes (transcribed by Pol II) showed a strong nucleosomal structure (Fig. 2B) that resembles the patterns obtained with the IGS (probe 9) and the 63-bp repeat region (probe 10). To demonstrate that the smeared or atypical hybridization patterns presented with some of the probes were

not due to degradation of the DNA, some of the membranes were stripped and re-hybridized with a Pol II probe. A nucleosomal ladder was observed in all the cases after re-hybridization, revealing the integrity of the chromatin (Fig. 2C and data not shown). Thus, our results show that the nucleosomal structure of coding regions from the rRNA genes is very different from the nucleosomal patterns presented by Pol II and Pol III coding regions.

Distribution of Histone Modifications at rRNA Genes in *L. major*

In different organisms, transcription of rRNA genes is regulated by histone modifications. In *L. major*, a genome-wide study showed the presence of histone H3K9/K14ac in different regions of the rRNA gene repeat (Thomas et al. 2009), indicating that histone modifications might be also important for Pol I transcription in this parasite. To determine the presence of other histone modifications in the nucleosomes from the *L. major* rRNA genes, we performed ChIP assays with formaldehyde

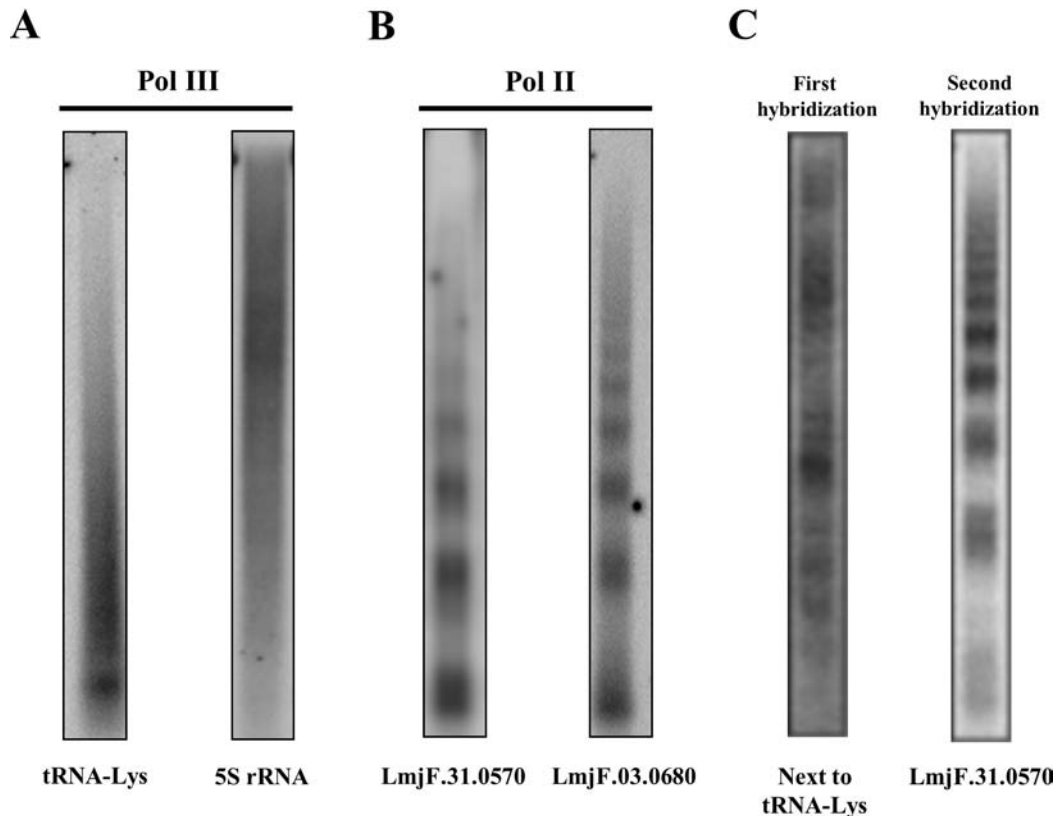


Figure 2. Nucleosome structure of genes transcribed by Pol III and Pol II. Southern blot experiments were performed with chromatin partially digested with MNase. A) The probes corresponded to a tRNA-Lys gene and a 5S rRNA gene (transcribed by Pol III) (panel A); and *LmjF.31.0570* and *LmjF.03.0680* (transcribed by Pol II) (panel B). Panel C shows the hybridization of a membrane with a probe located next to the tRNA-Lys gene, and the re-hybridization of the same membrane with a *LmjF.31.0570* probe.

cross-linked chromatin. In these experiments we analyzed the distribution of three epigenetic marks generally associated with activation of transcription (H3K14ac, H3K23ac and H3K27ac), and two marks usually related to repression of transcription (H3K9me3 and H4K20me3), in addition to unmodified histone H3. One possible limitation of our experimental approach is that the signal obtained with the different rRNA gene fragments represents a cumulative of signals from all rRNA repeats, and does not discriminate between individual repeats that might be transcriptionally active or inactive. Although our data suggest that all rRNA gene repeats are active in exponentially growing promastigotes, we will discuss the results considering the possibility that some rRNA repeats are inactive (see below).

As a first step, Western blot analyses with partially purified *L. major* histones were performed to determine the presence of these modifications in the chromatin of the parasite. Commercially available antibodies were used in these assays,

taking advantage of the conservation of lysine (K) residues in the *L. major* histones H3 and H4 (Supplementary Material Fig. 1S). Reaction with expected-size bands was found with all the analyzed antibodies (Fig. 3A). Cross-reactivity with another histone was found in some cases, as has been observed in other works.

Thus, to determine the presence of histone modifications across the rRNA gene repeat, immunoprecipitated material with the different antibodies was analyzed by qPCR with primers that would amplify nine of the ten fragments analyzed by Southern blot (see maps in Figs 1 and 3). Initially, nucleosome occupancy was evaluated with the anti-histone H3 antibody (or no antibody as a negative control).

In accordance with the Southern blot analysis, we found that histone H3 is highly enriched in the intergenic region (probe 9) and in the 3' end of the rRNA coding region (probe 8) (Fig. 3B). The levels of histone H3 were low at the promoter region (probes 1 and 2), and they slightly increased in the

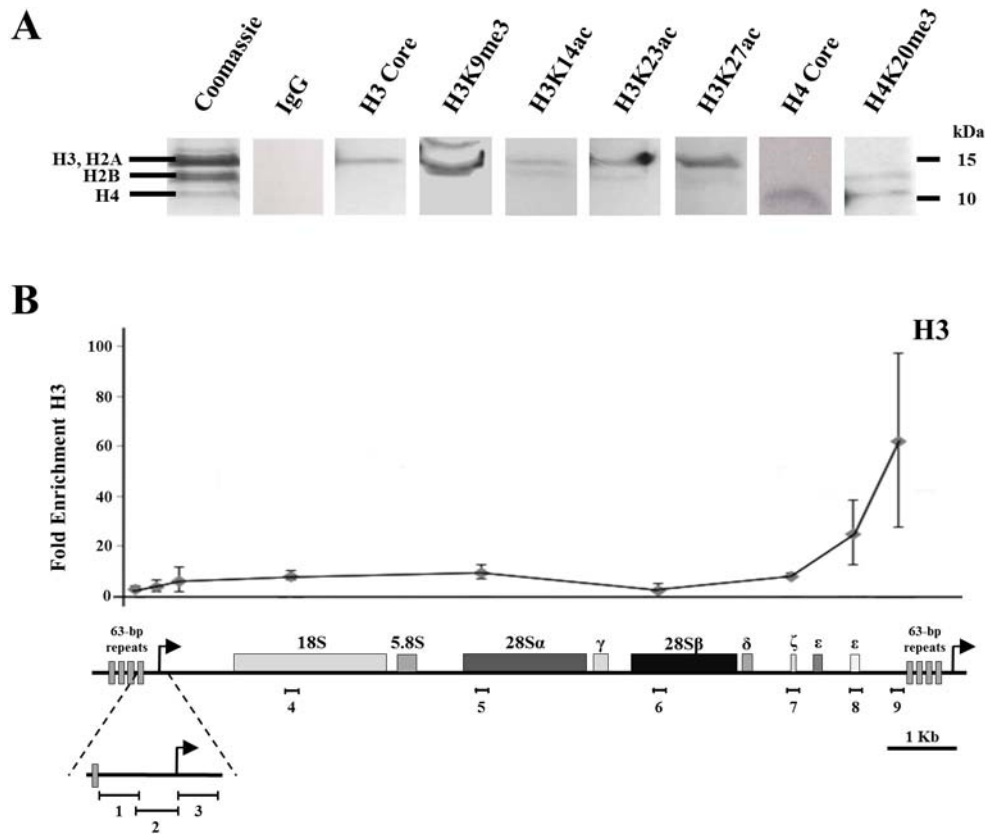


Figure 3. (A) Identification of modifications present on histones H3 and H4 in *L. major* chromatin. Around 15 μ g of partially-purified *L. major* histones were separated by 18% SDS-PAGE. Histones H3 and H4, as well as various modifications present on these histones were detected by immunoblotting with site-specific antibodies. IgG was used as negative control. **(B)** Histone H3 distribution in the rRNA gene repeat. ChIP analysis was performed with a histone H3 antibody. qPCR was performed to amplify the fragments indicated in the map shown below. Values are given as fold enrichment. The results are the average of three independent experiments. Error bars denote standard deviation.

transcribed region (probes 3 to 5). A small decrease in H3 abundance was found in the 28S β region (probe 6), before observing a gradual increase with probes 7, 8 and 9 (Fig. 3B).

As expected, H3K14ac, H3K23ac and H3K27ac, which are associated with activation of transcription, showed an enrichment peak in the promoter region (probe 2) (Fig. 4). These modifications were also distributed across the coding region of the repeat (probes 4 to 7). Notably, the lowest level of these modifications were found in the intergenic fragment located immediately upstream of the 63-bp repeats (probe 9), in a region where Pol I transcription terminates.

The distribution of H4K20me3 (Fig. 5), generally related to transcriptional silencing, was distinct from the other epigenetic marks that we analyzed, since it was enriched all along the rRNA coding region (probes 4 to 8) and was absent from the promoter region (probe 2). As this modification

was also absent from the intergenic spacer (probe 9), it does not seem to be related to heterochromatin formation. Thus, H4K20me3 is probably not involved in transcriptional regulation of the rRNA genes in *L. major*. Instead, it might participate in DNA replication or any other process. Remarkably, H3K9me3 (normally enriched in transcriptionally silent regions), showed a pattern of distribution that strongly resembles the profiles obtained with the euchromatin marks: enrichment in the promoter region and absence in the transcription termination region (Fig. 4D). Thus, unlike other organisms, H3K9me3 seems to be involved in transcription activation in the *L. major* rRNA genes.

To further explore the association of H3K9me3 and the rRNA promoter region in *L. major*, conjugated immunolocalization and FISH experiments were carried out. The majority of the H3K9me3 signal was found in the nucleoplasm; however some signal was detected in the nucleolus, in

the same area where the rRNA TSS region was located (Fig. 6). Similar results were obtained with H3K4me₃, another euchromatin mark (Fig. 6).

Altogether, these results show that the *L. major* rRNA promoter region is enriched with H3K14ac, H3K23ac and H3K27ac, modifications generally associated with activation of transcription. Interestingly, H3K9me₃, that is normally present in transcriptionally silent regions, was also enriched in the promoter region, which suggests that this modification might participate in transcription activation in the *L. major* rRNA genes. The distribution found for H4K20me₃ suggests that it is not a repressive mark in the *L. major* rRNA genes. To the best of our knowledge, four of the histone modifications that we analyzed (H3K23ac, H3K27ac, H3K9me₃ and H4K20me₃) had not been identified in trypanosomatids before.

Discussion

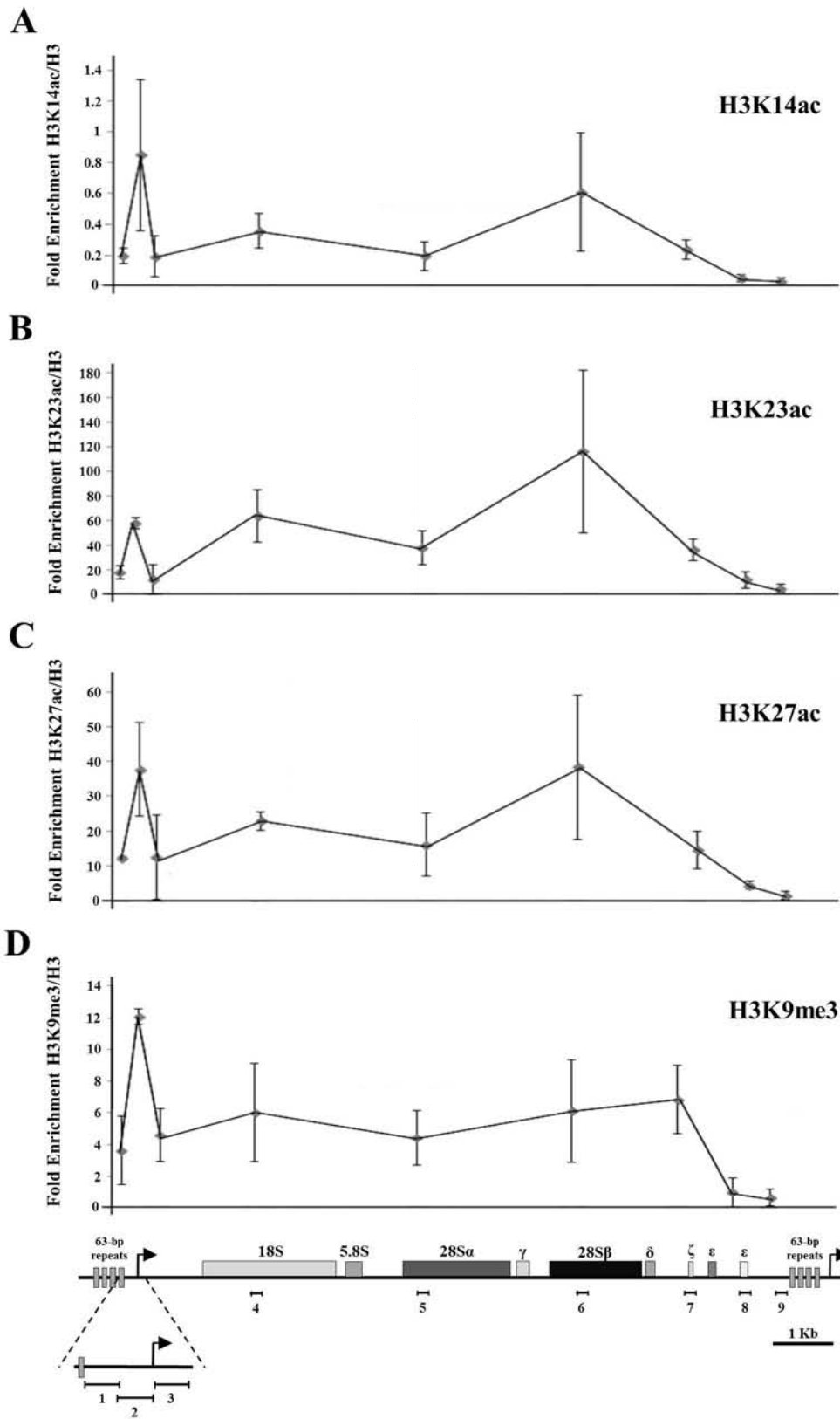
To direct the production of ribosomes, up to 60% of nascent RNA synthesis in a cell is accounted for by the transcription of rRNA genes. As the abundance of ribosomes depends upon the availability of rRNA, a regulated transcription system has developed to generate the required high levels of rRNA and to guarantee that rRNA transcription is coupled with cellular growth necessities. It has been established that epigenetic mechanisms are important for the regulation of Pol I transcription. However, nucleosome structure in active versus silent rRNA genes has been a controversial issue. Psoralen cross-linking, electron microscopy and MNase-seq experiments have indicated that active rRNA genes are devoid of nucleosomes (Cech and Karrer 1980; Conconi et al. 1989; Zentner et al. 2011). In contrast, MNase digestion studies and ChIP analyses have shown that active rRNA genes possess a nucleosomal structure (Jones et al. 2007; Prior et al. 1983; Tongaonkar et al. 2005). Thus, diverse technical approaches might produce different results. Additional variation may be generated by the fact that the number of active rRNA genes in a particular cell is not constant, but changes in accordance with cell requirements (Moss 2004).

In this work, our Southern blot analysis with partially digested chromatin with MNase show that the promoter region of the rRNA genes in *L. major* is practically nucleosome-free (probes 1 and 2 in Fig. 1). The smeared pattern observed with the promoter region was very similar to the patterns shown with Pol III-transcribed

genes, which contain internal promoter elements (Fig. 2A). In *Leishmania tarentolae*, the promoter region and coding sequences of the spliced leader RNA genes, which are transcribed by Pol II, also showed smeared hybridization patterns, demonstrating that these regions are depleted of nucleosomes (Hitchcock et al. 2007). Moreover, it was reported in *T. brucei* that active variant surface glycoprotein (VSG) expression sites, transcribed by Pol I, are also depleted of nucleosomes (Figueiredo and Cross 2010; Stanne and Rudenko 2010).

Our results also showed that the intergenic region and the 63-bp repeats are packed into a tight nucleosomal structure (probes 9 and 10 in Fig. 1). The clear nucleosomal ladders observed with these regions strongly resemble the profiles shown with protein-coding genes (Fig. 2B). A regularly spaced nucleosomal structure was also found for protein-coding genes in *T. brucei* (Figueiredo and Cross 2010). It is possible that the strong nucleosomal structure found for protein-coding genes in trypanosomatids is the consequence of a relatively low Pol II transcriptional rate. The 18S and 28S rRNA genes (probes 4 to 8 in Fig. 1) showed a weak nucleosomal pattern, which most likely reflects the high transcriptional rate of rRNA genes in *L. major*, as nucleosomes should be continuously disassembled and reassembled at each passage of Pol I. The Southern blot results were supported by ChIP and qPCR assays with an anti-histone H3 antibody, which show that the levels of histone H3 were very low at the promoter region, low in most of the transcribed region, and high in the 3' end of the rRNA coding region and the intergenic region (Fig. 3B). A similar distribution of histone H3 was found in the rRNA gene repeat of *T. brucei* (Figueiredo and Cross 2010; Stanne and Rudenko 2010).

Southern blot analysis on partially-digested chromatin with MNase in wild type *S. cerevisiae* (that contains ~150 rRNA gene repeats, half of which are inactive), have demonstrated strong signals (that corresponded to mono-, di- and trinucleosome bands) for the intergenic region and the rRNA coding regions (Jones et al. 2007). On the other hand, whereas in a yeast strain with reduced numbers (~42) of all actively transcribed rRNA gene repeats the signal obtained with the intergenic region was similar to that obtained with the wild type cells, coding regions showed a weaker and fuzzy signal that mostly corresponded to the mononucleosome (Jones et al. 2007). As in yeast, the intergenic region in the rRNA genes in *L. major* showed a strong nucleosomal ladder, and similarly to the



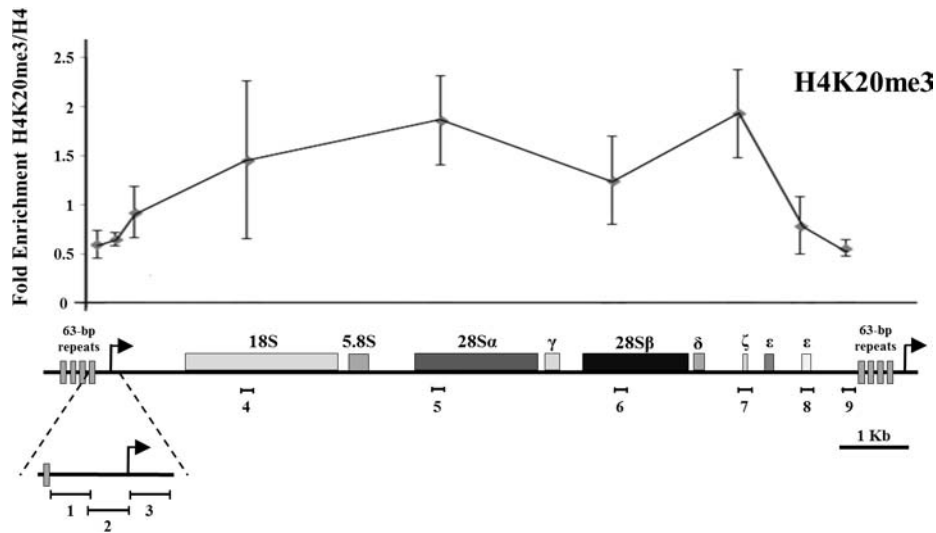


Figure 5. Distribution of H4K20me3 on the rRNA gene repeat. ChIP analyses were performed with antibodies against H4K20me3. qPCR was carried out to amplify the fragments indicated in the map shown below. Values, given as fold enrichment, were normalized for the total amount of histone H4. The results are the average of three independent experiments. Error bars denote standard deviation.

yeast mutant, the signal observed with the rRNA coding probes was weaker and fuzzy. Thus, the nucleosomal patterns observed in the rRNA genes in *L. major* strongly resemble those observed in the yeast mutant that contains only active rRNA genes, which suggests that in *L. major* the ~12 copies of the rRNA gene repeat might be active in exponentially growing cells. In *T. brucei* it has been proposed that some of the rRNA gene repeats are transcriptionally inactive, although it has not been formally verified (Alford et al. 2005; Figueiredo and Cross 2010; Stanne and Rudenko 2010). In both wild type and mutant yeast, the promoter region showed a complex band pattern that was different from the nucleosomal profile. The authors state that this pattern reflects stable Pol I initiation complexes bound to the promoter (Jones et al. 2007). Unlike yeast, the *L. major* promoter region showed a smeared hybridization pattern (Fig. 1).

It has been established in different organisms that histone modifications participate in the regulation of Pol I transcription. The early-branched eukaryote *L. major* does not seem to be the exception, as our ChIP assays showed that H3K14ac, H3K23ac and H3K27ac, which are associated with

active genes, are enriched in the promoter region of the rRNA genes (Figs 4 and 7). These marks were also found within the coding sequences of the rRNA repeat. Although activation marks are not generally found in rRNA coding sequences, several cases have been reported in vertebrates. For example, H3K27me3, H3K4me2 and H3K4me3 are enriched in the coding region of the mouse rRNA genes (Nemeth et al. 2008; Zentner et al. 2014), while enrichment of H3K9ac was found in coding regions of human rRNA genes (Zentner et al. 2011).

Methylation of H3K9 has been generally linked to heterochromatin formation and gene silencing. However, some studies in mammalian cells have shown that H3K9me2 and H3K9me3, as well as HP1, are enriched in the coding region of Pol I and Pol II genes and facilitate transcription elongation (Vakoc et al. 2005; Yuan et al. 2007). The distribution profile that we found for H3K9me3 suggest that this epigenetic mark might be involved in transcriptional activation of rRNA genes in *L. major*, as it is enriched in the promoter region and absent in the intergenic spacer (Fig. 4D). The close localization of H3K9me3 and the rRNA TSS region was also suggested by combined immunofluorescence

Figure 4. Distribution of histone modifications associated to transcriptional activation on the rRNA gene repeat. ChIP analyses were performed with antibodies against H3K14ac (A), H3K23ac (B), H3K27ac (C) and H3K9me3 (D). qPCR was performed to amplify the fragments indicated in the map shown below. Values, given as fold enrichment, were normalized for the total amount of histone H3. The results are the average of three independent experiments. Error bars denote standard deviation.

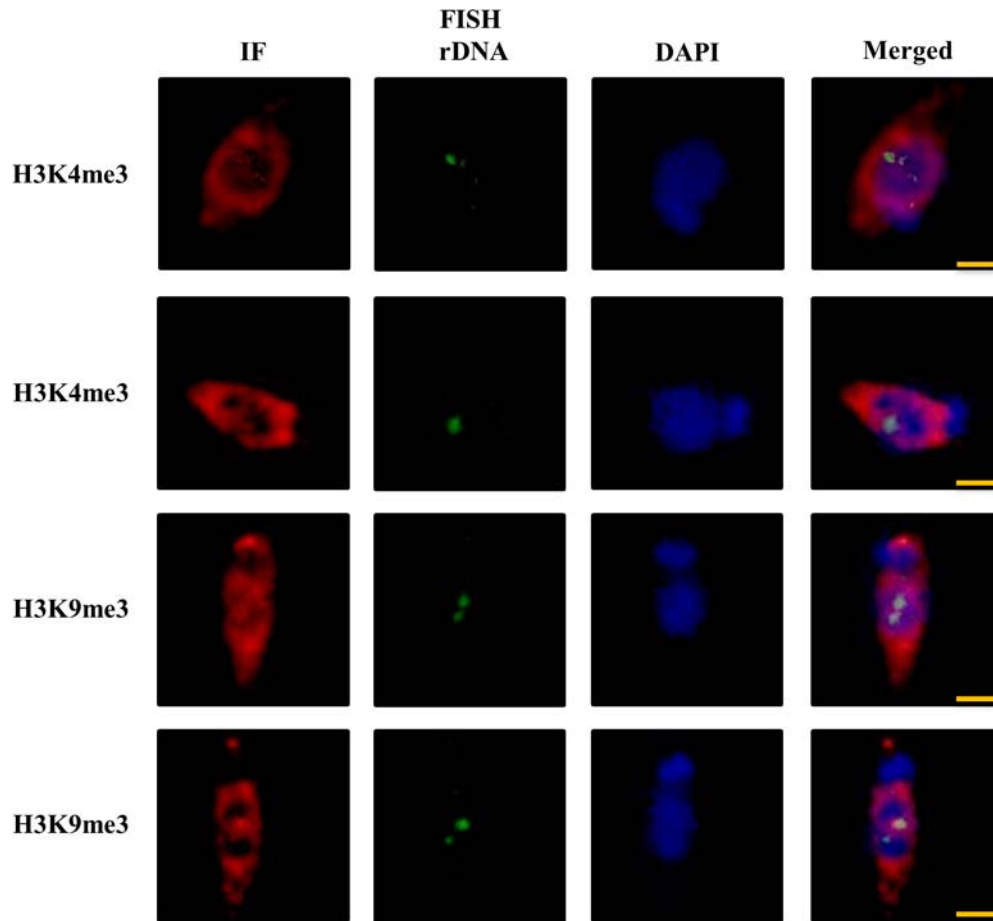


Figure 6. Immunofluorescence analysis using antibodies against H3K9me3 and H3K4me3 (red) combined with DNA FISH (green) with the *L. major* rRNA TSS region (rDNA). DNA was stained with DAPI (blue). Scale bar, 10 μ m.

and FISH assays (Fig. 6). However, as H3K9me3 showed a very broad distribution, we are aware that the overlap might not be meaningful.

H4K20me3 is required for the establishment of heterochromatin at pericentric and telomeric regions (Dambacher et al. 2013). However, it was reported in *Plasmodium* that this mark is also enriched in chromosome internal regions, not related to heterochromatin (Lopez-Rubio et al. 2009). Our results showed that H4K20me3 is enriched in the *L. major* rRNA coding region, but was depleted from the promoter region and intergenic spacer (Figs 5 and 7). Thus, similarly to *Plasmodium*, this mark presented a very distinctive distribution pattern that does not seem to correlate with activation or repression of transcription. In mouse rRNA genes, H4K20me3 is not enriched in the coding region, but only in the IGS. However, another repression mark, H3K27me3, showed high enrichment peaks in the coding

regions, in addition to some parts of the IGS (Zentner et al. 2014). Likewise, high levels of H3K9me2 were detected throughout the rRNA coding region, with reduced abundancies in the promoter and terminator regions (Nemeth et al. 2008). Moreover, H3K9me1 is highly enriched in coding sequences from human rRNA genes, while H3K27me3 and H4K20me1 are almost absent in this region (Zentner et al. 2011). Therefore, the distribution of the different heterochromatin marks within the rRNA gene repeat is very heterogeneous.

As pointed out above, one limitation of this report is that the signal obtained with the rRNA gene fragments in the ChIP analysis represents a mixture of signals from all rRNA gene repeats, and does not differentiate between transcriptionally active and inactive repeats. Although our Southern blot analysis suggests that all the rRNA gene repeats are active in exponentially growing *L. major* promastigotes, we cannot rule out the possibility that some

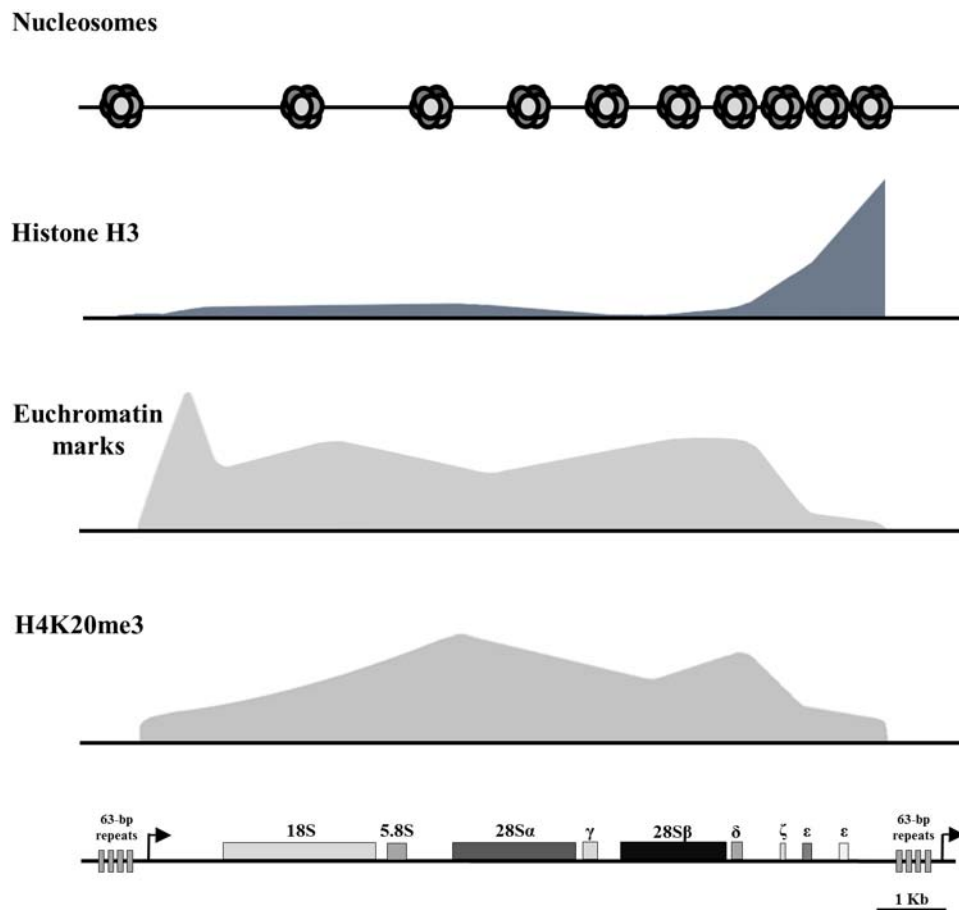


Figure 7. Schematic distribution of nucleosomes, histone H3, euchromatin marks and H4K20me3 in the *L. major* rRNA gene repeat. It summarizes the data presented in [Figures 1, 3, 4 and 5](#).

of them are inactive. It is worth noting, however, that several of the works that analyze the distribution of histone modifications in rRNA genes in other organisms have reported ChIP assays with cells that contain a mixture of transcriptionally active and inactive genes ([Nemeth et al. 2008](#); [Zentner et al. 2011, 2014](#)). [Zentner et al. \(2011\)](#) discuss that different studies have shown that modifications related to gene activation generally associate with active repeats, while repressive marks are associated with inactive repeats. Consequently, they propose that the distinctive modification patterns they observe occur on independent gene repeats, and not on the same repeat ([Zentner et al. 2011](#)). The pattern of distribution that we observe with H3K9me3 strongly resembles the profiles obtained with the euchromatin marks, as it is present in the promoter region and absent in the transcription termination region ([Fig. 4D](#)). The fact that this mark is not enriched in the intergenic spacer

strongly suggests that the observed signal does not originate from a transcriptionally inactive rRNA repeat, but from an active one. Thus, we consider that the main conclusions of our results would not change even if some of the rRNA genes are inactive.

Together, our results support the conclusions that rRNA genes in *L. major* possess a nucleosomal structure and that four histone modifications (H3K14ac, H3K23ac, H3K27ac and H3K9me3) are enriched in the promoter region. These modifications might play an important role in the activation of transcription of rRNA genes. By contrast, H4K20me3, which is enriched in the coding region of the rRNA repeat, but absent in the intergenic spacer and promoter region, might not participate in transcriptional repression in *L. major*, as it does in other organisms. Our results give the first insight into the epigenetic regulation of Pol I transcription in *L. major*. Future studies will

elucidate the mechanisms by which these histone modifications control rRNA transcription in *L. major*.

Methods

Culture of *L. major*: Promastigotes from *L. major* MHOM/IL/81/Friedlin (LSB-132.1) were grown in BM medium (1× M199 medium pH 7.2 containing 10% heat-inactivated fetal bovine serum, 0.25× brain heart infusion, 40 mM Hepes, 0.01 mg/ml hemin, 0.0002% Biotin, 100 IU/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin and 1× L-glutamine) at 26 °C and harvested in the mid-log phase.

Molecular cloning of DNA fragments into pGEM-T Easy: DNA fragments from *L. major* chromosome 27 were amplified by PCR and cloned into pGEM-T Easy vector (Promega). Fragment 1 (101 bp, from -190 to -89 in relation to the TSS) was amplified with oligonucleotides 63r-A-5' (5'-GTCGCGTGTGAGTGATGAG) and 63r-A-3' (5'-GTTTGGGTGGAGGTGAGACT); and fragment 2 (111 bp, from -111 to -1) with primers rRNA-A-5' (5'-TTGTTTGGGTGGAGGTGAGA) and rRNA-A-3' (5'-CAAAATCATCAAACCCGTTCC). Fragment 3 (102 bp, from +1 to +102) was amplified with oligonucleotides rRNA-B-5' (5'-GTGAAGGGTGAAGGAAGGGT) and rRNA-B-3' (5'-TTCCGCGCAACCCACAAGAT); and fragment 4 (116 bp, corresponding to part of the 18S rRNA gene, *LmjF27.rRNA.01*) with oligonucleotides 18S-5' (5'-CATGCATGCCTCAGAATCAC) and 18S-3' (5'-CGTTTCGCCAAGTTATCCAA). Fragment 5 (107 bp, corresponding to part of the 28S α rRNA gene, *LmjF27.rRNA.13*) was amplified with primers 24SBegin-5' (5'-GAGCCAAAGAA-GGTGTTAG) and 24SBegin-3' (5'-GTCAAGTTGG-CAGGTATTT); and fragment 6 (113 bp, from the 28S β rRNA gene, *LmjF27.rRNA.25*) with primers 24S β -5' (5'-TTCCGGAGTCTTGTTCGAG) and 24S β -3' (5'-GAGATTTCTGTTCCCACTGAGC). Fragment 7 (119 bp, from the 28S ζ rRNA gene, *LmjF27.rRNA.37*) was amplified with primers S6-5' (5'-ACATCATCGAATCGCCACCTAC) and S6-3' (5'-CGCGAGACACGTCGTGTTG); and fragment 8 (104 bp, from the 28S ϵ rRNA gene, *LmjF27.rRNA.44*) with oligonucleotides S4-Last-5' (5'-TCTCCAAACGAGAGAACATG) and S4-Last-3' (5'-TGAACCTTGAGGCCCTGA). Fragment 9 (117 bp, from the intergenic region between the 28S ϵ rRNA gene and the 63-bp repeats) was amplified with primers rRNA-C-5' (5'-TTGTGGGGTCCCTTGCCCTTT) and rRNA-C-3' (5'-GGATTGTCGGATGTCTCTTG); and fragment 10 (63 bp, containing one copy of the 63-bp repeats) with primers 63r-5' (5'-CGCCCCAGTAGTCGAGCATT) and 63r-3' (5'-GCGACACAACGCTCCTGCAA). Fragments from genes transcribed by Pol III and Pol II were also amplified and cloned into pGEM-T Easy. The tRNA-Lys gene (*LmjF.03.TRNALYS.01*) (147 bp) was amplified with primers crom3-tRNA-5' (5'-CCGATGCTTCCACCTTGCG) and crom3-tRNA-3' (5'-TGCCGTTTACCGAGAGGCCCA); and the 5S rRNA gene (*LmjF.11.5SRRNA.03*) (123 bp) with primers rRNA5S-5' (5'-GTGCGAGTACGACCACACTTG) and rRNA5S-3' (5'-AAGAGTACGGCACTCAGGGT). A fragment located next to the tRNA-Lys gene (111 bp) was amplified with oligonucleotides crom3-D-5' (5'-CATTGGAGGCGTGCCTTCC) and crom3-D-3' (5'-CACCAGTCAACTGGGCGTGG); and *LmjF.31.0570* (114 bp) with oligonucleotides aATP11-5' (5'-GGCTGTCATCTTGGCAAAC) and aATP11-3' (5'-GGGTACTAGCGCAGGATAAT). *LmjF.03.0680* (125 bp) was

amplified with primers crom3-68-5' (5'-GGCGCTGAAG-AATGGAAGTG) and crom3-68-3' (5'-CCGTGTATGGG-CCAAAGCAA). After transformation of JM109 competent cells, plasmid DNA was purified from colorless colonies with NucleoSpin Plasmid columns (Macherey-Nagel) as specified by the supplier. The identity of each insert was confirmed by sequencing using the T7 and SP6 primers. All the constructs were digested with *EcoRI* to purify the corresponding DNA fragment.

Nucleosome structure analysis: Nuclei were isolated from 1.8×10^8 *L. major* promastigotes by washing twice in PBS, resuspending the cells in 4 ml ice-cold lysis buffer (10 mM Tris-HCl pH 7.5, 3 mM CaCl₂, 2 mM MgCl₂), and adding NP-40 to a final concentration of 0.5%. Cells were transferred to a Dounce homogenizer and broken with 40 strokes. The nuclei were collected by centrifugation (1,400 g) and resuspended in nuclei storage buffer (340 mM sucrose, 60 mM KCl, 15 mM NaCl, 0.15 mM spermine, 0.15 mM spermidine, 15 mM Tris-HCl, 0.1 mM EDTA). Then, they were partially digested with micrococcal nuclease (MNase) (20 U/ml, for 4 min at 30 °C) followed by DNA extraction. Around 3 µg of digested chromatin was separated on 1.5% agarose gels. Genomic DNA was also included as naked DNA control. After electrophoresis, nucleic acids were transferred to Hybond N+ membranes (Amersham) by capillarity. Blots were hybridized with DNA fragments labeled with [α -³²P]dCTP using the High Prime labeling system (Amersham). Hybridizations were performed in 50% formamide, 5× SSC, 0.2% SDS, 4× Denhardt's reagent and 100 µg/ml salmon sperm DNA at 42 °C. Washing was carried out at 65 °C in 0.2× SSC and 0.1% SDS.

Histone extraction and Western blot analysis: Nuclei were obtained from 2×10^8 *L. major* promastigotes as described for the nucleosome structure analysis, but including 1× protease inhibitor cocktail (Sigma) in the lysis buffer. The nuclei pellet was resuspended in 10 volumes of 0.25 M HCl containing protease inhibitors, and histones were acid extracted overnight at 4 °C, and precipitated with acetone. Approximately 15 µg of histones were separated on 18% polyacrylamide gels and blotted onto PVDF membranes. Proteins were detected with commercial polyclonal antibodies and a horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody, and developed using an ECL kit (GE Healthcare). The antibodies used were: histone H3 (1:2500 dilution, Abcam ab1791), H3K9me3 (1 µg/ml, Abcam ab8898), H3K14ac (1:2000, Abcam ab52946), H3K23ac (1:2500, Merck Millipore 07-355), H3K27ac (1:10000, Merck Millipore 07-360), H4 (1:500, Abcam ab7311) and H4K20me3 (1:1000, Merck Millipore 07-463). As control, 1 µg of histones from calf thymus (Roche) were used.

Chromatin immunoprecipitation (ChIP) assays: For each ChIP experiment, 1×10^8 promastigotes from *L. major* were fixed with formaldehyde (final concentration of 1%) for 5 min at 37 °C. The reaction was stopped by the addition of glycine (125 mM final). Cells were washed in PBS, pelleted and resuspended in lysis buffer (10 mM Tris-HCl pH 7.5, 3 mM CaCl₂, 2 mM MgCl₂) containing protease inhibitor cocktail (Sigma). Cells were broken with a Vibra-Cell VCX130 ultrasonic processor (Sonic) (15 s on/off, 40% amplitude) for 5 min. Nuclei were pelleted and resuspended in sonication buffer (1% SDS, 10 mM EDTA, 50 mM Tris-HCl pH 8.1). Chromatin was sonicated to an average DNA size of about 200 to 500 bp using a BioRuptor UCD-200 (Diagenode) (30 s on/30 s off, high intensity) for 40 cycles. Chromatin was diluted in ChIP dilution buffer (0.01% SDS, 1.1% Triton X100, 1.2 mM EDTA, 16.7 mM Tris-HCl pH 8.1, 167 mM NaCl) containing protease inhibitor cocktail. The sonicated material was pre-cleared by adding protein A/G agarose beads (Santa Cruz Biotechnology) and rotating for

1 h at 4 °C. Approximately 10% of the sonicated chromatin was taken as input material. And 1 or 2 μ l of the antibodies (~5 μ g) were added to the chromatin samples and incubated overnight. The protein-DNA complexes were incubated for 1 h with protein A/G agarose beads and 200 ng of sonicated salmon sperm DNA and washed with the following buffers: low salt wash buffer (0.1% SDS, 1% Triton X-100, 2 mM EDTA, 20 mM Tris-HCl pH 8.0, 150 mM NaCl); high salt wash buffer (0.1% SDS, 1% Triton X-100, 2 mM EDTA, 20 mM Tris-HCl pH 8.0, 500 mM NaCl); LiCl wash buffer (10 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM EDTA, 1% NP40, 1% Deoxycolate, 250 mM LiCl) and with TE buffer (10 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM EDTA). Beads were resuspended in elution buffer (1% SDS, 100 mM NaHCO₃) and incubated for 30 min at room temperature. Cross-links were reversed with 200 mM NaCl at 65 °C overnight. Following RNase A and proteinase K treatment, DNA was precipitated with sodium acetate and ethanol and quantified. Each ChIP experiment was performed at least three times.

Quantitative real-time PCR: Around 2 ng of immunoprecipitated DNA and input material were analyzed by quantitative real-time PCR (qPCR) assays using the Platinum SYBR Green qPCR SuperMix-UDG kit (Invitrogen) in a Rotor-Gene 3000 cyclor (Corbett Research) according to the manufacturer's recommendations. All qPCR reactions were performed in triplicate, using primers and conditions that were optimized to produce a single amplicon of the correct size. Fragments 1 to 9 were amplified with the same primers used for the molecular cloning into pGEM-T Easy (see above). Each amplification product was analyzed for specificity by both agarose gel electrophoresis and melt curve analysis. Standard curves for primer pairs were derived from input DNA dilution series and ranged in their r^2 value from 0.98 to 1.0. Data were analyzed by the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method, and the results shown as fold enrichment. Thus, the ChIP signals were divided by the mock signals (IgG), representing the ChIP signal as the fold increase in signal relative to the background signal. To calculate the nucleosomal density, histones H3 and H4 were used. Histone modifications were normalized with nucleosomal density (H3 or H4). The different levels of fold enrichment shown in Figures 3 to 5 reflect the different affinities of the antibodies used, which resulted in lower or higher amounts of immunoprecipitated DNA.

Combined immunofluorescence and FISH: For each assay, 1×10^6 mid-log cells were harvested, washed twice with $1 \times$ PBS and spread into a poly-L-lysine coated glass slide. Cells were fixed with 4% paraformaldehyde for 30 min at 4 °C, permeabilized with 0.1% Triton X-100 for 10 min at room temperature, and blocked with 4% BSA, 2% milk and 1% gelatin from cold water fish skin (Sigma) overnight at 4 °C. Cells were then incubated with anti-H3K4me3 (1:50, Abcam) or anti-H3K9me3 (1:50, Abcam) for 1 h at room temperature, and washed with $1 \times$ PBS and 0.05% Tween. Next, cells were incubated at room temperature with a secondary goat anti-rabbit antibody conjugated with Alexa 568 (red) (Life technologies) diluted at 1:800, and washed with $1 \times$ PBS and 0.05% Tween. Cells were then mounted with Vectashield-DAPI solution (Vector Laboratories Inc.). To continue with the FISH, the slides were fixed again using 4% paraformaldehyde. The cells were then permeabilized with 0.1% Triton X-100 for 10 min at room temperature, and washed with PBS. The DNA probe was denatured in hybridization buffer (50% formamide, $2 \times$ saline sodium phosphate EDTA, 10% dextran sulfate, 250 μ g/ml herring salmon sperm DNA) at 95 °C for 5 min. Finally, sealed in a plastic frame, the probe was incubated for 10 min at 80 °C, and then for 16 h at 37 °C. Images were obtained using a Carl Zeiss AX10 microscope and analyzed with the ZEN 2012 software (Blue edition). The DNA probe (748 bp, from +1 to +748 in relation to the TSS of the

rRNA genes) was amplified by PCR with the oligonucleotides rRNA-B-5' (5'-GTGAAGGGTGAAGGAAGGGT) and rRNA-B-18S-3' (5'-TTGACCTCTTGTGGCTG) and was labeled with Fluorescein-High Prime (Roche).

Acknowledgements

We thank Julio C. Carrero-Sánchez for fruitful discussions and Antonio E. Cisneros for help with qPCR analysis. This work is one of the requirements to obtain the PhD degree in Posgrado en Ciencias Biológicas (UNAM) for Juan C. Vizuet-de-Rueda, who was the recipient of a doctoral fellowship from CONACyT (Fellowship 239707, CVU 346062). This work was supported by grants 128461 from CONACyT, IN210712 and IN214715 from PAPIIT (UNAM) to Santiago Martínez-Calvillo.

Appendix A. Supplementary Data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.protis.2016.02.001>.

References

- Alsford S, Kawahara T, Glover L, Horn D (2005) Tagging a *T. brucei* rRNA locus improves stable transfection efficiency and circumvents inducible expression position effects. *Mol Biochem Parasitol* **144**:142–148
- Belli SI (2000) Chromatin remodelling during the life cycle of trypanosomatids. *Int J Parasitol* **30**:679–687
- Cech TR, Karrer KM (1980) Chromatin structure of the ribosomal RNA genes of *Tetrahymena thermophila* as analyzed by trimethylpsoralen crosslinking in vivo. *J Mol Biol* **136**:395–416
- Conconi A, Sogo JM, Ryan CA (1992) Ribosomal gene clusters are uniquely proportioned between open and closed chromatin structures in both tomato leaf cells and exponentially growing suspension cultures. *Proc Natl Acad Sci USA* **89**:5256–5260
- Conconi A, Widmer RM, Koller T, Sogo JM (1989) Two different chromatin structures coexist in ribosomal RNA genes throughout the cell cycle. *Cell* **57**:753–761
- Dambacher S, Hahn M, Schotta G (2013) The compact view on heterochromatin. *Cell Cycle* **12**:2925–2926
- Figueiredo LM, Cross GA (2010) Nucleosomes are depleted at the VSG expression site transcribed by RNA polymerase I in African trypanosomes. *Eukaryot Cell* **9**:148–154
- Figueiredo LM, Cross GA, Janzen CJ (2009) Epigenetic regulation in African trypanosomes: a new kid on the block. *Nat Rev Microbiol* **7**:504–513

- Goodfellow SJ, Zomerdijk JC** (2012) Basic mechanisms in RNA polymerase I transcription of the ribosomal RNA genes. *Subcell Biochem* **61**:211–236
- Grummt I** (2007) Different epigenetic layers engage in complex crosstalk to define the epigenetic state of mammalian rRNA genes. *Hum Mol Genet* **16**(Spec No 1):R21–R27
- Hamperl S, Wittner M, Babl V, Perez-Fernandez J, Tschochner H, Griesenbeck J** (2013) Chromatin states at ribosomal DNA loci. *Biochim Biophys Acta* **1829**:405–417
- Hitchcock RA, Thomas S, Campbell DA, Sturm NR** (2007) The promoter and transcribed regions of the *Leishmania tarentolae* spliced leader RNA gene array are devoid of nucleosomes. *BMC Microbiol* **7**:44
- Horn D** (2001) Nuclear gene transcription and chromatin in *Trypanosoma brucei*. *Int J Parasitol* **31**:1157–1165
- Ivens AC, Peacock CS, Worthey EA, Murphy L, Aggarwal G, Berriman M, Sisk E, Rajandream MA, Adlem E, Aert R, Anupama A, Apostolou Z, Attipoe P, Bason N, Bauser C, Beck A, Beverley SM, Bianchetti G, Borzym K, Bothe G, Bruschi CV, Collins M, Cadag E, Ciarlioni L, Clayton C, Coulson RM, Cronin A, Cruz AK, Davies RM, De GJ, Dobson DE, Duesterhoeft A, Fazelina G, Fosker N, Frasch AC, Fraser A, Fuchs M, Gabel C, Goble A, Goffeau A, Harris D, Hertz-Fowler C, Hilbert H, Horn D, Huang Y, Klages S, Knights A, Kube M, Larke N, Litvin L, Lord A, Louie T, Marra M, Masuy D, Matthews K, Michaeli S, Mottram JC, Muller-Auer S, Munden H, Nelson S, Norbertczak H, Oliver K, O'neil S, Pentony M, Pohl TM, Price C, Purnelle B, Quail MA, Rabinowitsch E, Reinhardt R, Rieger M, Rinta J, Robben J, Robertson L, Ruiz JC, Rutter S, Saunders D, Schafer M, Schein J, Schwartz DC, Seeger K, Seyler A, Sharp S, Shin H, Sivam D, Squares R, Squares S, Tosato V, Vogt C, Volckaert G, Wambutt R, Warren T, Wedler H, Woodward J, Zhou S, Zimmermann W, Smith DF, Blackwell JM, Stuart KD, Barrell B, Myler PJ** (2005) The genome of the kinetoplastid parasite, *Leishmania major*. *Science* **309**:436–442
- Jones HS, Kawauchi J, Braglia P, Alen CM, Kent NA, Proudfoot NJ** (2007) RNA polymerase I in yeast transcribes dynamic nucleosomal rDNA. *Nat Struct Mol Biol* **14**:123–130
- Kornberg RD, Lorch Y** (1999) Twenty-five years of the nucleosome, fundamental particle of the eukaryote chromosome. *Cell* **98**:285–294
- Kouzarides T** (2007) Chromatin modifications and their function. *Cell* **128**:693–705
- Lawrence RJ, Pikaard CS** (2004) Chromatin turn ons and turn offs of ribosomal RNA genes. *Cell Cycle* **3**:880–883
- Lohr D** (1983) Chromatin structure differs between coding and upstream flanking sequences of the yeast 35S ribosomal genes. *Biochemistry* **22**:927–934
- Lopez-Rubio JJ, Mancio-Silva L, Scherf A** (2009) Genome-wide analysis of heterochromatin associates clonally variant gene regulation with perinuclear repressive centers in malaria parasites. *Cell Host Microbe* **5**:179–190
- Martinez-Calvillo S, Vizuet-de-Rueda JC, Florencio-Martinez LE, Manning-Cela RG, Figueroa-Angulo EE** (2010) Gene expression in trypanosomatid parasites. *J Biomed Biotechnol* **2010**:525241
- Martinez-Calvillo S, Sunkin SM, Yan S, Fox M, Stuart K, Myler PJ** (2001) Genomic organization and functional characterization of the *Leishmania major* Friedlin ribosomal RNA gene locus. *Mol Biochem Parasitol* **116**:147–157
- McStay B, Grummt I** (2008) The epigenetics of rRNA genes: from molecular to chromosome biology. *Annu Rev Cell Dev Biol* **24**:131–157
- Michaeli S** (2011) Trans-splicing in trypanosomes: machinery and its impact on the parasite transcriptome. *Future Microbiol* **6**:459–474
- Moss T** (2004) At the crossroads of growth control; making ribosomal RNA. *Curr Opin Genet Dev* **14**:210–217
- Nemeth A, Guibert S, Tiwari VK, Ohlsson R, Langst G** (2008) Epigenetic regulation of TTF-I-mediated promoter-terminator interactions of rRNA genes. *EMBO J* **27**:1255–1265
- Paule MR, White RJ** (2000) Survey and summary: transcription by RNA polymerases I and III. *Nucleic Acids Res* **28**:1283–1298
- Prior CP, Cantor CR, Johnson EM, Littau VC, Ailfrey VG** (1983) Reversible changes in nucleosome structure and histone H3 accessibility in transcriptionally active and inactive states of rDNA chromatin. *Cell* **34**:1033–1042
- Rando OJ** (2007) Global patterns of histone modifications. *Curr Opin Genet Dev* **17**:94–99
- Respuela P, Ferella M, Rada-Iglesias A, Aslund L** (2008) Histone acetylation and methylation at sites initiating divergent polycistronic transcription in *Trypanosoma cruzi*. *J Biol Chem* **283**:15884–15892
- Russell J, Zomerdijk JC** (2005) RNA-polymerase-I-directed rDNA transcription, life and works. *Trends Biochem Sci* **30**:87–96
- Siegel TN, Hekstra DR, Kemp LE, Figueiredo LM, Lowell JE, Fenyo D, Wang X, Dewell S, Cross GA** (2009) Four histone variants mark the boundaries of polycistronic transcription units in *Trypanosoma brucei*. *Genes Dev* **23**:1063–1076
- Sollner-Webb B, Mougey EB** (1991) News from the nucleolus: rRNA gene expression. *Trends Biochem Sci* **16**:58–62
- Stanne TM, Rudenko G** (2010) Active VSG expression sites in *Trypanosoma brucei* are depleted of nucleosomes. *Eukaryot Cell* **9**:136–147
- Thomas S, Green A, Sturm NR, Campbell DA, Myler PJ** (2009) Histone acetylations mark origins of polycistronic transcription in *Leishmania major*. *BMC Genomics* **10**:152
- Tongaonkar P, French SL, Oakes ML, Vu L, Schneider DA, Beyer AL, Nomura M** (2005) Histones are required for transcription of yeast rRNA genes by RNA polymerase I. *Proc Natl Acad Sci USA* **102**:10129–10134
- Torres-Machorro AL, Hernandez R, Cevallos AM, Lopez-Villasenor I** (2010) Ribosomal RNA genes in eukaryotic microorganisms: witnesses of phylogeny? *FEMS Microbiol Rev* **34**:59–86
- Vakoc CR, Mandat SA, Olenchok BA, Blobel GA** (2005) Histone H3 lysine 9 methylation and HP1gamma are associated with transcription elongation through mammalian chromatin. *Mol Cell* **19**:381–391

Weber CM, Henikoff S (2014) Histone variants: dynamic punctuation in transcription. *Genes Dev* **28**:672–682

Yuan X, Feng W, Imhof A, Grummt I, Zhou Y (2007) Activation of RNA polymerase I transcription by cockayne syndrome group B protein and histone methyltransferase G9a. *Mol Cell* **27**:585–595

Zentner GE, Balow SA, Scacheri PC (2014) Genomic characterization of the mouse ribosomal DNA locus. *G3 (Bethesda)* **4**:243–254

Zentner GE, Saiakhova A, Manaenkov P, Adams MD, Scacheri PC (2011) Integrative genomic analysis of human ribosomal DNA. *Nucleic Acids Res* **39**:4949–4960

Available online at www.sciencedirect.com

ScienceDirect