

UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

**«Elaboración de una genoteca de expresión.
Aislamiento caracterización de un gen codificante
para la histona H1 de Leishmania braziliensis»**

Autor: Zulma Aragón Mamani

Departamento de Parasitología, Ecología y Genética

A mi MADRE.

**A mis abuelos:
Pablo y Catalina**

ÍNDICE

ABREVIATURAS	v
--------------------	---

INTRODUCCIÓN	3
--------------------	---

Capítulo 1

1.1 EL GÉNERO LEISHMANIA Y LA LEISHMANIASIS	4
1.2 CICLO BIOLÓGICO DE LEISHMANIA SP.	8
1.3 BIOLOGÍA MOLECULAR DE LOS TRIPANOSOMÁTIDOS	9
1.3.1 Organización génica	10
1.3.2 Procesos necesarios para la expresión de genes	12
1.3.3 Regulación de la expresión génica	15
1.4 LAS HISTONAS	16
1.4.1 Estructura de los genes de las histonas	19
1.4.2 Genes Histona en tripanosomátidos	20
1.4.2.1 Histonas H2A y H2B	20
1.4.2.2 Histonas H3 y H4	22
1.4.2.3 Histona H1	23

Capítulo 2

OBJETIVOS	26
-----------------	----

Capítulo 3

MATERIAL Y MÉTODOS	28
3.1 MICROORGANISMOS Y CONDICIONES DE CULTIVO	29
3.1.1 Microorganismos utilizados	29
3.1.2 Medios y Condiciones de cultivo	29
3.2 SUEROS DE PACIENTES	31
3.3 PURIFICACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS DE LEISHMANIA MOHM/PE/95/LQ-8 .	32
3.3.1 Extracción y Purificación de DNA de Leishmania	32
3.3.2 Extracción y Purificación de RNA de Leishmania	33
3.3.3 Aislamiento de RNA poli(A)+	34

3.4 PURIFICACIÓN DE PLÁSMIDOS DE BACTERIAS TRANSFORMADAS	35
3.5 DIGESTIÓN DE DNA CON ENDONUCLEASAS DE RESTRICCIÓN	36
3.6 ELECTROFORESIS CONVENCIONAL DE ÁCIDOS NUCLEICOS EN GELES DE AGAROSA .	37
3.7 ESTIMACIÓN DEL PESO MOLECULAR Y LA CONCENTRACIÓN EN DISOLUCIONES DE FRAGMENTOS LINEALES DE DNA	38
3.8 AMPLIFICACIÓN DE RNA MEDIANTE REACCIÓN DE RT-PCR	39
3.9 CONSTRUCCIÓN DE UNA GENOTECA DE DNA COMPLEMENTARIO (cDNA) DE LEISHMANIA MOHM/PE/95/LQ-8	41
3.9.1 Síntesis de la primera cadena de DNA complementario	42
3.9.2 Síntesis de la segunda cadena de DNA complementario	42
3.9.3 Purificación de cDNA	43
3.9.4 Producción de extremos cohesivos con Eco RI y Not I	43
3.9.5 Preparación del vector de clonaje	44
3.10 PREPARACIÓN Y TRANSFORMACIÓN DE CÉLULAS BACTERIANAS COMPETENTES	45
3.11 SELECCIÓN DE CLONES cDNA DE LEISHMANIA CON SUEROS DE PACIENTES CON LEISHMANIASIS	46
3.12 CONFIRMACIÓN DE CLONES POSITIVOS MEDIANTE DOT-BLOT	48
3.13 SELECCIÓN DE CLONES cDNA MEDIANTE HIBRIDACIÓN CON SONDAS DE DNA	48
3.14 SECUENCIACIÓN DE DNA	49
3.15 PREPARACIÓN Y MARCAJE DE SONDAS DE DNA	51
3.15.1 Marcaje radioactivo de DNA	51
3.15.2 Marcaje no radioactivo de DNA	51
3.16 ANÁLISIS DE ÁCIDOS NUCLEICOS TRANSFERIDOS A SOPORTES SÓLIDOS, MEDIANTE HIBRIDACIÓN CON SONDAS DE DNA	52
3.16.1 Southern blot	52
3.16.2 Northern blot	53
3.17 ANÁLISIS DE LOS CROMOSOMAS MEDIANTE ELECTROFORESIS DE CAMPO PULSADO, TRANSFERENCIA A SOPORTES SÓLIDOS, E HIBRIDACIÓN CON SONDAS DE DNA	54

Capítulo 4

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 PUESTA A PUNTO DE UN MÉTODO DE EXTRACCIÓN DE RNA TOTAL DE

LEISHMANIA BRAZILIENSIS MHOM/PE/95/LQ8	57
4.2 CONSTRUCCIÓN DE UNA GENOTECA DE DNA COMPLEMENTARIO DE LEISHMANIA BRAZILIENSIS MHOM/PE/95/LQ8	60
4.3 BÚSQUEDA DE CLONES cDNAs DE LEISHMANIA BRAZILIENSIS CODIFICANTES DE POLIPÉPTIDOS ANTIGÉNICOS	62
4.4 SECUENCIACIÓN DEL CLON C8LB	65
4.5 AISLAMIENTO DE UN CLON cDNA DE LONGITUD COMPLETA CODIFICANTE PARA LA HISTONA H1	70
4.6 ANÁLISIS BLASTA DEL CLON C8LB'	73
4.7 ANÁLISIS DE HOMOLOGÍA DE LA PROTEÍNA H1 DE LEISHMANIA BRAZILIENSIS ...	76
4.8 ANÁLISIS DE LA SECUENCIA DE NUCLEÓTIDOS DEL cDNA DEL CLON C8LB' ...	83
4.9 ORGANIZACIÓN GENÓMICA DEL GEN CODIFICANTE PARA LA HISTONA H1 DE LEISHMANIA BRAZILIENSIS	86
4.10 ANÁLISIS DE RNA MENSAJERO DE LA HISTONA H1 DE LEISHMANIA BRAZILIENSIS	93
CONCLUSIONES	95
REFERENCIAS	97

ABREVIATURAS

aa	Aminoácido
AcNa	Acetato de sodio
ALD	Aldolasa
Amp	Ampicilina
BSA	Seroalbúmina bovina
cDNA	DNA complementario
DNA	Ácido desoxiribonucleico
DHFR	Dihidrofolato reductasa
ddH ₂ O	Agua ultrapura
cpm	Cuentas por minuto
EDTA	Etilendiamino ácido tetracético
F/Clf/I	Fenol/Cloroformo/isoamílico 25/24/1
gGAPDH	Gliceraldehido fosfato deshidrogenasa glicosomal
gp63	Glicoproteína de superficie de 63 kDa
HEPES	N-2-hydroxyetilpiperazina-N'-2-ácido etanosulfónico
IPTG	Isopropiltio-β-D-galactosido
kpb	Mil pares de bases
kDa	Kilodalton
LB-Amp	Medio Luria-Bertani conteniendo ampicilina
LB-Tc	Medio Luria-Bertani conteniendo tetraciclina
medRNA	RNA donador del miniexón
MOPS	3-(N-morfolino)ácido propanosulfónico
ng	Nanogramos
μg	Microgramos
μl	Microlitros
μCi	Microcurios
Oligo-dT	Oligonucleótido de timidina
ORF	Open reading frame o pauta de lectura abierta
³² P	Fósforo radioactivo
PARP	Proteína repetitiva de ácido procíclico
pb	Pares de bases
PBS	Tampón fosfato salino
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PGI	Fosfoglucosa isomerasa

pre-mRNA	RNA mensajero pre-maduro
RNA	Ácido ribonucleico
RNAsa	Ribonucleasa
RNA pol II	RNA polimerasa II
rRNA	RNA ribosomal
S	Sdberdberg
SDS	Sodio dodecil sulfato
SSC	Tampón citrato de sodio salino
snRNPs	Ribonucleoproteínas pequeñas del núcleo
SL	Spliced leader o secuencia líder
TBE	Tampón Tris borato EDTA
TBS	Tampón Tris salino
Tc	Tetraciclina
TE	Tampón Tris EDTA
THT	Transportador de hexosa de <i>Trypanosoma</i>
TNT	Tampón Tris
Tris	Trihydroximetil aminometano
U	Unidades de enzima
UBI	Ubiquitina
UTR	Región no traducible
VSG	Glicoproteína variable de superficie
xg	Fuerza centrífuga relativa
X-gal	5-bromo-4-cloro-3 indol- β -D-galactósido

Introducción

Las enfermedades causadas por parásitos eucarióticos constituyen uno de los principales problemas de salud en los países tropicales y subtropicales, debido a su naturaleza y repercusión social. Entre los parásitos protozoarios de mayor relevancia por su impacto sobre la calidad de vida humana se encuentran aquellos pertenecientes al género *Leishmania*. Estos protozoos afectan cada año a millones de personas causando una gama amplia de síntomas, que cursan desde las lesiones más notorias y discapacitantes como es el caso de las leishmaniasis cutánea y mucocutánea hasta infecciones viscerales denominadas leishmaniasis visceral, que llegan a prolongarse durante años con consecuencias fatales, produciendo así altos índices de mortalidad y morbilidad. A esto hay que añadir además, la implicación en el desarrollo socioeconómico de los países azotados por dichas enfermedades.

En el mundo científico, se han logrado avances muy importantes en lo referente al conocimiento de los parásitos complejos y al arsenal quimioterapéutico e inmunoproliférico. No obstante, resultan aún insuficientes para erradicar las enfermedades causadas por dichos parásitos. La complejidad genética de los parásitos eucarióticos respecto de los procarióticos, implica una capacidad de adaptación a las defensas de los hospedadores, que les permite sobrevivir en éstos durante largo tiempo. Los mecanismos moleculares y bioquímicos asociados a esta capacidad, tienen relación directa con la cronicidad de las enfermedades causadas por la mayoría de estos parásitos. Dada la complejidad de estos organismos el desarrollo de la bioquímica, inmunología y biología molecular de los parásitos ha sido lento con respecto al avance logrado por la microbiología en la prevención de las enfermedades bacterianas.

A pesar de que la mayoría de los avances logrados en el conocimiento de los parásitos son de tipo descriptivo, el advenimiento de nuevas técnicas bioquímicas y moleculares permite augurar en un futuro no muy lejano un entendimiento más certero sobre los mecanismos evolutivos, biológicos y patogénicos de los parásitos eucarióticos de mayor importancia médica y económica.

Capítulo 1
EL GÉNERO LEISHMANIA Y LA
LEISHMANIASIS

1.1 EL GÉNERO *Leishmania* Y LA LEISHMANIASIS.

El nombre de *Leishmania* se asignó en honor a Sir William Boog Leishman, médico inglés y profesor de Patología en la Escuela de Sanidad Militar de Netley en la India, descubridor del germen del Kala-azar y de otras formas de leishmaniasis ¹

Las especies del género *Leishmania* son protozoos flagelados situados taxonómicamente en el orden *Kinetoplastida*, suborden *Trypanosomatina*, y familia *Trypanosomatidae*.² Estos organismos, parásitos del hombre y otros mamíferos, son el agente causal de la **leishmaniasis humana**, enfermedad que afecta en la actualidad a más de 14 millones de personas en 88 países de 4 continentes donde se registran alrededor de 2 millones de casos nuevos anuales.³ Dentro del término leishmaniasis se incluyen tres formas clínicas principales: leishmaniasis cutánea, leishmaniasis mucocutánea y leishmaniasis visceral. La evolución de la enfermedad hacia las diferentes posibilidades clínicas, depende de la eficacia de la respuesta inmune del paciente y de la virulencia de la especie.^{4,5}

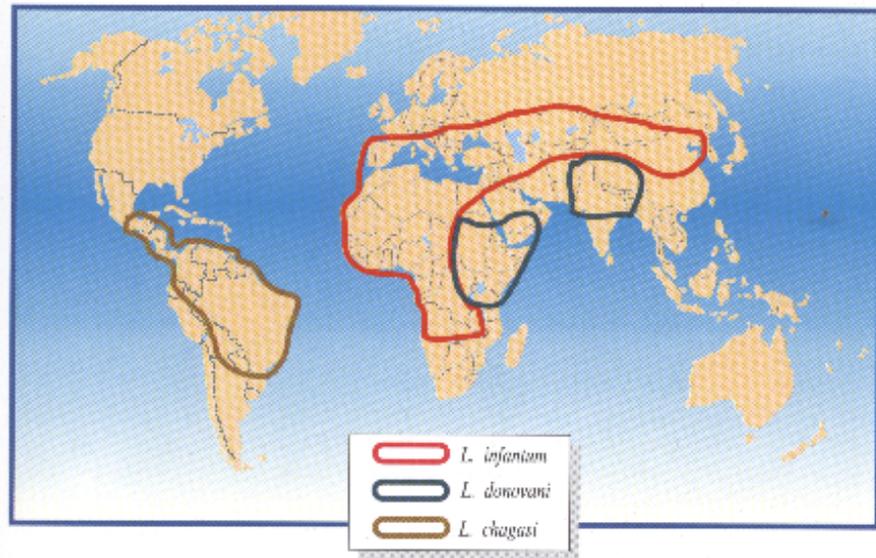
¹ Schmidt G.D. y Roberts L.S (1984). Fundamentos de Parasitología. C.E.C.S.A. pp 63-90. México.

² Chang K.P., Fong D. and Bray R.S. (1985). Biology of *Leishmania* and leishmaniasis. En: Leishmaniasis (Chang K.P. and Bray R.S., ed.). pp, 2-27. Elsevier. Amsterdam.

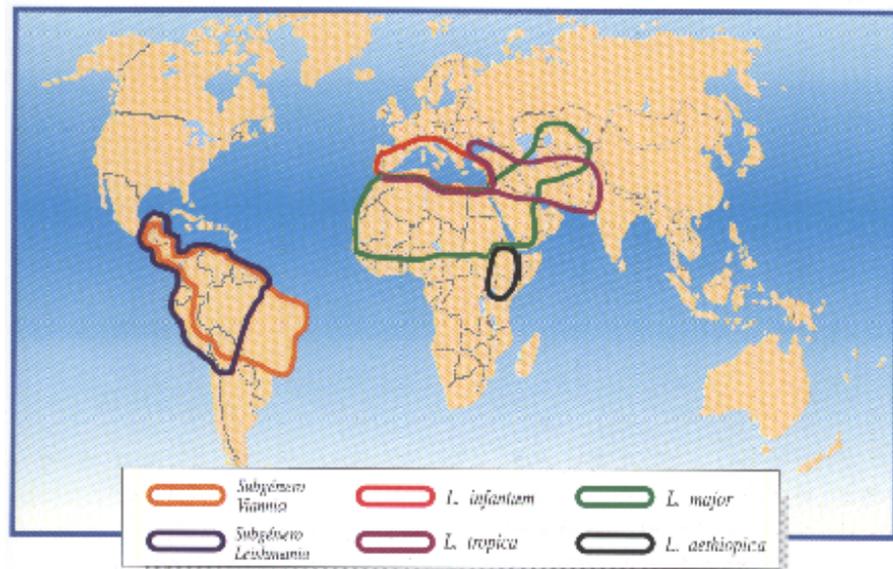
³ WHO. (1993). The leishmaniasis. CTD/MIP/wP. 93. 8, WHO/HQ. Geneva.

⁴ Marsden P.D. and Jones T.C. (1985). Clinical manifestations, diagnosis and treatment of leishmaniasis. En: leishmaniasis (Chang P.K. and Bray R.S., ed.). pp, 183-198. Elsevier. Amsterdam.

⁵ Chang P.K., Chaudhuri G. y Fong D. (1990). Molecular determinants of *Leishmania* virulence.



a)



b)

Esquema 1. Distribución geográfica de a) leishmaniasis visceral, b) leishmaniasis cutánea y mucocutánea. De Alvar E.J.P. (1997). La Leishmaniasis: de la biología al control.

En América Latina la leishmaniasis cutánea, la mucocutánea y la visceral se distribuyen en casi la totalidad del continente (Esquema 1 y 2). La forma cutánea simple es atribuida a especies del complejo *L. mexicana* y del complejo *L. braziliensis*, éste último también es responsable de la forma mucocutánea; la forma visceral es producida por *L. chagasi*.^{6,7}

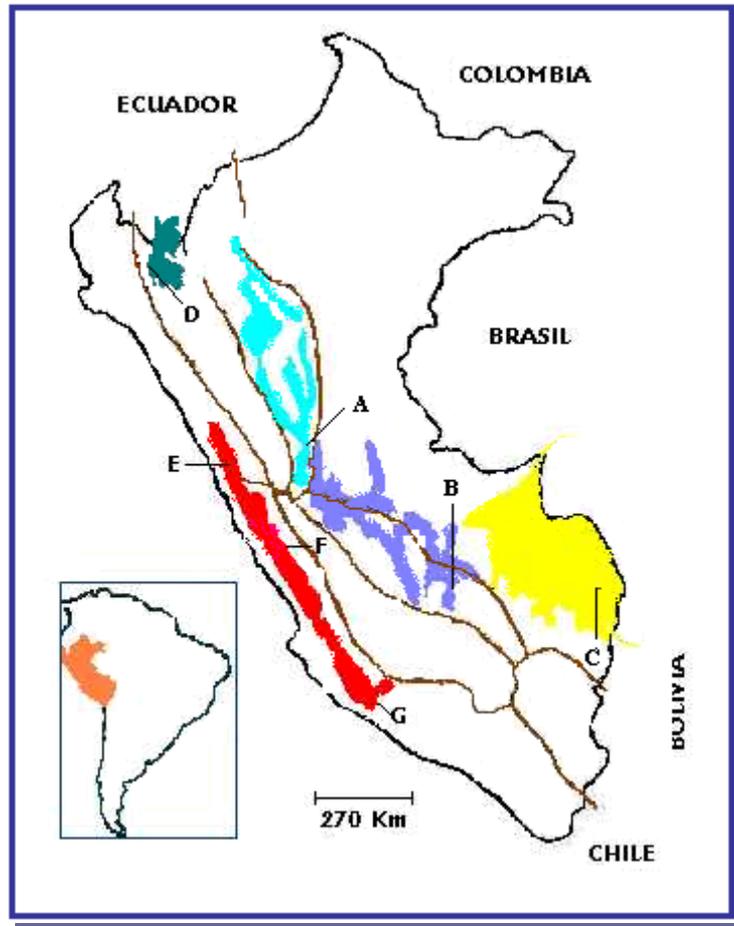
En Perú, la leishmaniasis cutánea que predomina en los valles interandinos, se le conoce como “uta”, y la leishmaniasis que compromete mucosas, predominante en la amazonía, recibe el nombre de “espundia” (Esquema 3). Estas dos manifestaciones clínicas se inician de la misma forma, con la aparición de una pápula que generalmente se ulcera; en algunos casos las úlceras cicatrizan espontáneamente, y en otros casos progresa hacia una forma crónica (uta) que puede llegar a invadir mucosas (espundia).⁸

A la especie *Leishmania peruviana* se le ha atribuido como el agente causal de la “uta”, aunque en algunos casos se ha reportado la implicación de *Leishmania panamensis* y *Leishmania mexicana*. La “espundia” en cambio, es causada por las especies del complejo *Leishmania braziliensis*.⁸ También se han encontrado híbridos de *Leishmania peruviana* y *Leishmania braziliensis*, tal es el caso de los zymodemas nuevos caracterizados y denominados como MHOM/PE/95/LQ1 (MON-230), MHOM/PE/95/LQ8 (MON-231) y MHOM/PE/95/LQ2 (MON-232).

⁶ Lopez M., Inga R., Cangalaya M., Echevarria J., Llanos-Cuentas A., Orrego C. and Arévalo J. (1993). Diagnosis of *Leishmania* using the polymerase chain reaction: A simplified procedure for field work. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 49, 348-356.

⁷ Shaw J.J. and Laison R. (1987). Recent advances in studies on the ecology and epidemiology of New world leishmaniasis. En: *Leishmaniasis in biology and medicine*, Vol. I, Biology and Epidemiology (Peters W. and Killick-Kendrick R., ed.). pp, 291-363. Academic Press, London.

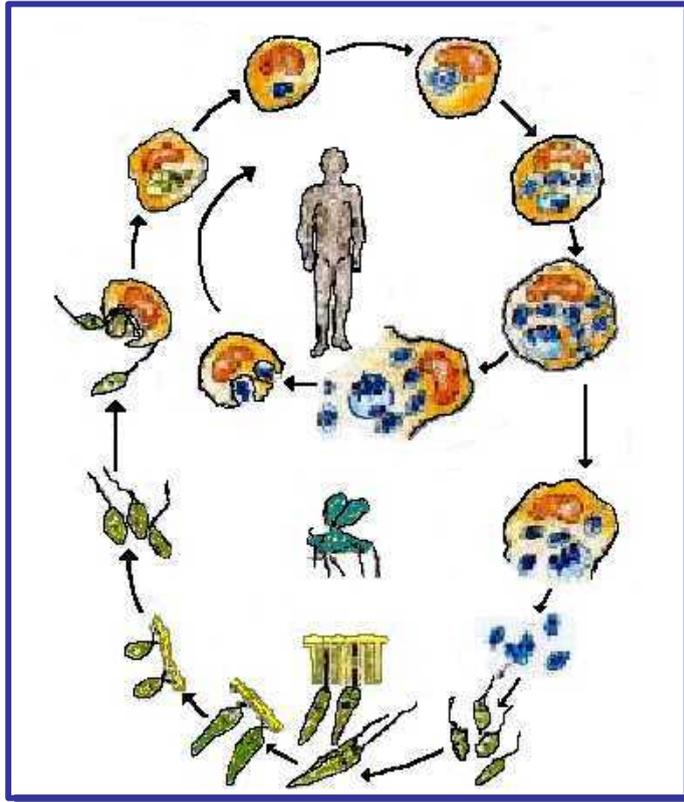
⁸ Guerra H. (1988). Distribución de *Leishmania* en Perú. En: *Research on Control Strategies for the leishmaniases* (Walton B.C., Wijeyaratne P.M. and Modabber F., ed.). pp, 135-145. IDRC. Ottawa.



Esquema 2. Distribución geográfica de la uta y la espondia en Perú. **A**, Huallaga/Huánuco; **B**, Chanchamayo/Santa Ana; **C**, Inambari; **D**, Huancabamba; **E**, Surco Norte; **F**, Surco Centro; **G**, Surco Sur. En las regiones **A**, **B** y **C** se encuentra la especie *L. braziliensis*; en las regiones **D**, **E**, **F** y **G** se encuentra la especie *L. peruviana*. De Dujardin J.C., Dujardin J.P., Tibayrenc M., Timperman G., De Doncker S., Jacquet D., Arévalo J., Llanos-Cuentas A., Guerra H., Bermúdez H., Hamers R. and Le Ray D. (1995). Karyotype plasticity in Neotropical *Leishmania*: an index for measuring genomic distance among *L.(V.) peruviana* and *L.(V) braziliensis*. *Parasitology*.

1.2 CICLO BIOLÓGICO DE *Leishmania* sp.

Leishmania posee un ciclo de vida complejo (Esquema 3), en el que participan los insectos vectores, dípteros de los géneros *Phlebotomus* y *Lutzomyia*, y un rango amplio de hospedadores mamíferos, incluido el hombre.⁹ Las hembras del insecto vector son hematófagas por lo que son consideradas las únicas responsables de la transmisión del parásito.¹⁰



Esquema 3. Ciclo de vida de las especies del complejo *L. braziliensis* en el hospedador vertebrado y en el insecto vector.

⁹ Alexander J. and Russell D.G. (1992). The interaction of *Leishmania* species with macrophages. *Adv. Parasitol.* 31, 176-231.

¹⁰ Larivière M., Beauvais B., Derouin F. and Traoré F. (1987). *Parasitologie Medicale*. pp, 55-62. Ellipses. Francia.

Adaptado de Chang K.P. and Bray R.S. (1985).
Leishmaniasis.

El ciclo se inicia cuando el insecto vector ingiere las formas **amastigotes** del parásito mediante picadura al hospedador vertebrado infectado. Estos parásitos una vez ingeridos se transforman en **promastigotes** y migran hacia la cavidad anterior del tubo digestivo del insecto. Al cabo de unos días (8-20) después de un proceso de multiplicación por fisión binaria, los flagelados bloquean parcialmente la cavidad faríngea del insecto. En el momento en que el insecto pica a un hospedador sano, previa a la succión de sangre, vacía el contenido de su faringe y de esta manera algunos de los promastigotes infestivos son desplazados e inoculados en la piel del vertebrado. Al introducirse en los tejidos, los parásitos invaden las células del sistema fagocítico mononuclear (macrófagos), donde se transforman en amastigotes y se multiplican en el interior de los lisosomas. Las células infectadas se lisan y quedan en libertad los amastigotes que luego serán fagocitados por otras células, con lo que la infestación se propaga a otros órganos o tejidos más distantes según la especie infestante o el estado inmunológico del hospedador. El ciclo se cierra cuando un insecto vector no infestado ingiere amastigotes en el momento en que produce la picadura.¹¹

1.3 BIOLOGÍA MOLECULAR DE LOS TRIPANOSOMÁTIDOS

Dentro de la escala evolutiva, los tripanosomátidos están considerados como una escala intermedia entre las bacterias y las levaduras, según estudios de comparación realizados a nivel de los genes que codifican para las subunidades pequeñas de los rRNAs.¹² Otras características, como la presencia de una estructura subcelular denominada kinetoplasto, aproximan a los tripanosomátidos hacia los

¹¹ Markell E.K., Voge M. and John D. (1990). *Parasitología Médica*. pp, 104-150. Interamericana. McGraw-Hill. España.

¹² Sogin M.L., Elwood H.J. and Gunderson H.H. (1986). Evolutionary diversity of small-subunit rRNA genes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* pp, 83, 1383.

organismos eucarióticos,¹³ y a nivel molecular el proceso de transcripción policistrónica¹⁴ es una característica que los aproxima a los organismos procarióticos. Asimismo, las diferencias encontradas en la secuencia de aminoácidos de las histonas, comparadas con la de otras especies (homología menor al 50%), revelan la distancia filogenética entre los kinetoplastidos y el resto de los eucariotas;¹⁵ además, los procesos de *trans-splicing* y edición del RNA son propiedades inusuales características de los tripanosomátidos.^{16, 17} A nivel evolutivo estos procesos moleculares han requerido adaptaciones importantes a nivel bioquímico, así como el desarrollo de mecanismos complejos que están implicados en la regulación de la expresión genética, y consecuentemente en el desarrollo de nuevas estrategias de evasión a las respuestas de los hospedadores.¹⁸

1.3.1 Organización génica

Al igual que la inmensa mayoría de los eucariotas, los tripanosomátidos poseen dos genomas: DNA nuclear y DNA mitocondrial (DNA de kinetoplasto). Este último constituye del 10 al 30 % del DNA celular total,¹⁹ y está formado por numerosas moléculas de DNA circulares concatenadas entre sí como si fuera una red de círculos, que dependiendo de su tamaño reciben el nombre de

¹³ a) Borst P., Hoeijmakers J. and Hajduk S. (1981). Structures, function and evolution of kinetoplast DNA. *Parasitology.*, 82, 81-93. b) Para una mayor revisión ver en Englund P.T. (1981). Kinetoplast DNA. *Biochem. Phy. Prot.* pp, 51, 695.

¹⁴ Borst P. (1986). Discontinuous transcription and antigenic variation in trypanosomes. *Annu. Rev. Biochem.* 55, 701.

¹⁵ Puerta C., Martin J., Alonso C. and López M.C. (1994). Isolation and characterization of the gene encoding histone H2A from *Trypanosoma cruzi*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 64, 1.

¹⁶ Agabian N. (1990). *Trans* splicing of nuclear pre mRNAs. *Cell.* 61, 1157.

¹⁷ Benne R. (1994). RNA editing in trypanosomes. *Eur. J. Biochem.* 221, 9.

¹⁸ Parsons M. (1990). Current concepts in stage-regulated gene expression in kinetoplastida. *Parasitol. Today.* 6, 244.

¹⁹ Borst P., Van der Ploeg M., Van Hoek J.F.M., Tas J. and James J. (1982). On the DNA content of trypanosomes. *Mol. Biochem. Parasitol.* 6, 13.

maxicírculos y minicírculos. En ellos se encuentran, entre otros genes, los que codifican los RNA ribosomales (rRNA) y los RNA guías (gRNA), respectivamente.²⁰ Los gRNAs juegan un papel importante en la edición de los RNA mensajeros (mRNA) mitocondriales.²¹ Por otro lado, el genoma nuclear es menos complejo y no condensa durante la división celular.²² Estudios diversos sobre el contenido del DNA total y de la complejidad cinética del mismo, en los que se utilizaron técnicas electroforéticas en campo pulsado (PFGE), polimorfismo de la longitud de fragmentos de restricción (RFLPs) y análisis de variación de isoenzimas, han permitido esclarecer la ploidía de los tripanosomátidos, determinando que el genoma es diploide en estos organismos.²³

En el genoma de los tripanosomátidos se ha encontrado secuencias de genes de copia única, secuencias moderadamente repetidas y secuencias altamente repetidas.²⁴ En el caso de *Leishmania donovani*^{23, 24} y *Trypanosoma brucei*¹⁹, su genoma contiene alrededor del 60-68 % de secuencias de genes de copia única, mientras que en *Trypanosoma cruzi*²⁴ solamente el 23 % son de copia simple y por lo tanto contiene un alto grado de secuencias de genes repetidos. En general, la mitad de los genes estudiados hasta la fecha, son genes repetidos en tándem que pueden estar localizados en un mismo

²⁰ Englund P.T., Guilbride D.L., Hwa K-Y., Jhonson C.E., Li C., Rocco L.J. and Torri A.F. (1996). Kinetoplast DNA: structure and replication. En: Molecular Biology of Parasitic Protozoa (Smith D.F. and Parsons M., ed.). pp, 75-87. IRL Press. New York.

²¹ Hajduk S.L. and Sabatini R.S. (1996). RNA editing: post-transcriptional restructuring of genetic information. En: Molecular Biology of Parasitic Protozoa (Smith D.F. and Parsons M., ed.). pp, 134-158. IRL Press. New York.

²² Borst P., Fowler F., Frasch F., Hoeijmakers J.H.J. and Weijers P.J. (1980). Characterization of DNA from *Trypanosoma brucei* and related trypanosomes by restriction endonuclease digestion. *Mol. Biochem. Parasitol.* 1, 221.

²³ Swindle J. and Tait A. (1996). Trypanosomatid genetics. En: Molecular Biology of Parasitic Protozoa (Smith D.F. and Parsons M., ed.). pp, 6-34. IRL Press. New York.

²⁴ Thomas M.C., Fernández A., Moro A., García J.A. y González A. (1993). Biología molecular de los tripanosomátidos. En: Parasitología Molecular (Rivas L. y López M.C., ed). pp, 135-143. CSIC. Madrid.

cromosoma o en diferentes cromosomas. Teniendo en cuenta estas frecuencias, la organización génica de los tripanosomátidos se puede definir bajo 5 clases que se recogen en el esquema 4, a la vez que se citan algunos ejemplos de genes actualmente caracterizados.²³

CLASE		EJEMPLOS		
		<i>T. brucei</i>	<i>T. cruzi</i>	<i>Leishmania</i>
1	1-3 copias en un locus	PGI, ALD, gGPADH	ALD, gGPADH	DHFR, gGPADH
2	1-4 copias en dos loci	RNA pol II, PARP		
3	Multiplicación en un locus	UBI, SL, THT, β TUB	rRNA, SL, UBI	gp63, rRNA
4	Multiplicación en más de un locus	rRNA	SL	β TUB
5	Familia de genes en muchos loci	VSG	gp85	

Esquema 4. Organización génica en *T. brucei*, *T. cruzi* y *Leishmania*. Se muestran algunos ejemplos de los genes que corresponden a los distintos tipos de organización génica. Los cromosomas están representados por líneas, y las variaciones de color de las líneas representan a cromosomas no homólogos. De Swindle J. and Tait A. (1996). Trypanosomatid genetics

1.3.2 Procesos necesarios para la expresión de genes

Una serie de procesos inusuales son requisito importante para la expresión de genes en los tripanosomátidos. Aunque el inicio de la transcripción es el aspecto menos conocido debido al exiguo número de promotores descritos, se conoce que la transcripción es policistronica^{25, 26} y posiblemente los promotores están localizados

²⁵ Smith D.F. (1990). Trypanosomatid transfection: stable introduction of DNA into protozoa. *Parasitol. Today*. 6, 245.

corriente arriba de los genes agrupados en tándem.^{27, 28} La transcripción de estos genes resulta en la generación de transcritos primarios policistrónicos, los cuales son procesados en mRNAs monogénicos mediante *trans-splicing*²⁹ en el extremo 5' y poliadenilación³⁰ en el extremo 3'. Asimismo, se ha evidenciado que genes de copia única, ligados físicamente, también son transcritos policistrónicamente.²⁴

El mecanismo de *trans-splicing* es una reacción intermolecular, que esencialmente consiste en la adición de los primeros 39 nucleótidos del transcrito primario del mini-exón (o medRNA, de aproximadamente 95 nucleótidos en *Leishmania*) al precursor del transcrito policistrónico (pre-mRNA) en el sitio aceptor del *splicing* el dinucleótido AG 3', precedido de una secuencia rica en polipirimidinas^{31, 29}. En la reacción también intervienen elementos cofactores tales como los RNAs nucleares pequeños y partículas de ribonucleoproteínas pequeñas (snRNPs).³² Consecuentemente, todos los mRNAs presentan una caperuza en el extremo 5' con una secuencia común denominada *spliced leader* (SL). En el género *Leishmania* se ha demostrado que el sitio de adición de la secuencia de poli (A)⁺ en el extremo 3', corriente abajo del gen, está determinado por el sitio

²⁶ Parsons M. (1990). Currents concepts in stage-regulated gene expression in kinetoplastida. *Parasitol. Today*. 6, 244.

²⁷ Curotto M.A., Laban A. and Wirth D. (1992). Gene expression in *Leishmania*: analysis of essential 5' DNA sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 89, 2703.

²⁸ Saito R.M., Elgort M.G. and Campbell D.A. (1994). A conserved upstream element is essential for transcription of the *Leishmania tarentolae* mini-exon gene. *EMBO. J.* 22, 5460.

²⁹ Wong A., Curotto M.A. and Wirth D. (1994). Identification of a cis-acting gene regulatory element from the *lemdr 1* locus of *Leishmania enriettii*. *J. Biol. Chem.* 42, 26497.

³⁰ Huang J. and Van der Ploeg L.H.T. (1991). Maturation of polycistronic pre-mRNA in *trypanosoma brucei*: analysis of trans splicing and poly (A) addition at nascent RNA transcripts from the hsp 70 locus. *Mol. Cell. Biol.* 11, 3180.

³¹ Ullu E., Tschudi C. and Günzi A. (1996). Trans-splicing in trypanosomatid protozoa. En: *Molecular Biology of Parasitic Protozoa* (Smith D. and Parsons M., de). pp, 115. IRL press.

³² Tschudi C. and Ullu E. (1990). Destruction of U2, U4 o U6 small nuclear RNA blocks trans splicing in trypanosome cells. *Cell.* 61, 459.

aceptor AG del SL, corriente arriba del gen, lo cual indica que el proceso de poliadenilación está asociado al de *trans-splicing*. Esto permite explicar la ausencia de la secuencia AAUAAA en el extremo 3'-UTR, muy conservada en el resto de los eucariotas.³³

Los transcritos mitocondriales después de ser procesados, son modificados mediante un proceso denominado **edición del RNA**³⁴, que consiste en la adición o eliminación de uridinas en posiciones específicas. La inserción puede variar desde unos pocos a más de 500 nucleótidos de uridina.³⁵ La información para estas reacciones está dada por los gRNAs (40-70 nucleótidos), los cuales están modificados por poliuracilación en el extremo 3', post-transcripcionalmente mediante la actividad enzimática uridiltransferasa terminal TUTasa.³⁶³⁷ Hay evidencias que sugieren la participación de complejos de ribonucleoproteínas de alto peso molecular (editosomas) en el proceso de edición.³⁵ Por otro lado, se han propuesto dos mecanismos de regulación del *RNA editing*, a nivel de la síntesis de los gRNAs y a nivel del uso de éstos últimos.³⁷ Como resultado se crean pautas de lectura abiertas diferentes a partir de los mismos transcritos primarios.

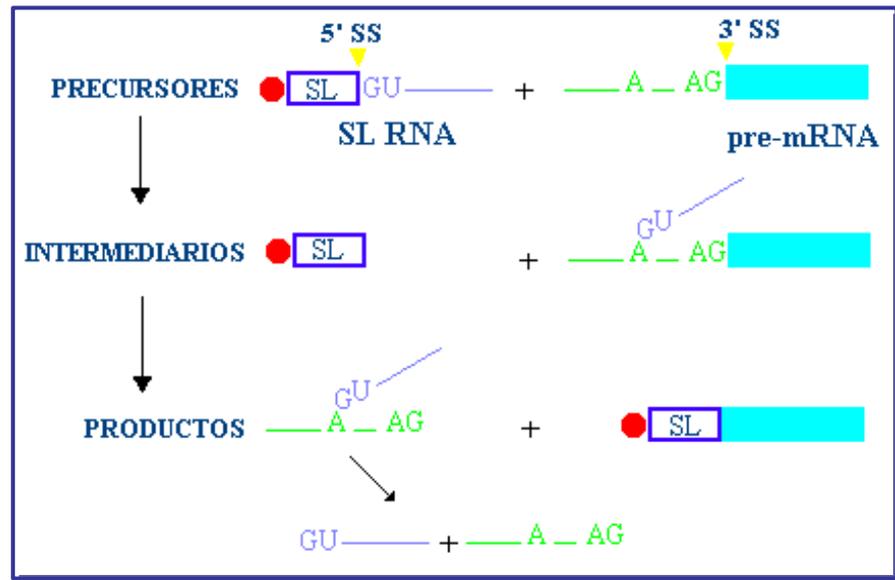
³³ Graham S.V. (1995). Mechanisms of stage-regulated gene expression in kinetoplastida. *Parasitol. Today*. 11, 217.

³⁴ Seiwert S.D. (1995). The ins and outs of editing RNA in kinetoplastids. *Parasitol. Today*. 11, 362.

³⁵ Göringer H.U., Köller J. and Shu H.H. (1995). Multicomponent complexes involved in kinetoplastid RNA editing. *Parasitol. Today*. 11, 265.

³⁶ Blum B., Bakalara N. and Simpson L. (1990). A model for RNA editing in kinetoplastid mitochondria: guide RNA molecules transcribed from maxicircle DNA provide the edited information. *Cell*. 60, 189.

³⁷ Hajduk S.L. and Sabatini R.S. (1996). RNA editing: post-transcriptional restructuring of genetic information. En: *Molecular Biology of Parasitic Protozoa* (Smith D. and Parsons M., ed.). pp, 134. IRL press.



Esquema 5. Mecanismo de *Trans-splicing* en tripanosomátidos. GU, dinucleótido conservado en el sitio *splice* 5' (5'SS); AG, dinucleótido conservado en el sitio del *splice* 3' (3'SS). De Ullu E., Tschudi C. and Günzi A. (1996). *Trans-splicing in trypanosomatid protozoa*.

1.3.3 Regulación de la expresión génica

Como consecuencia de la transcripción policistrónica en los tripanosomátidos, la expresión de genes no puede ser regulado a nivel de iniciación de la transcripción o durante la elongación³⁸. Pese a esto, muchos genes contiguos pertenecientes a la misma unidad de transcripción son regulados diferencialmente en las distintas etapas del ciclo de vida del parásito, por modulación de la cantidad de mRNA específica de estado.^{39, 40} Además, en un determinado estado de

³⁸ Pays E. and Vanhamme L. (1996). Developmental regulation of gene expression in african trypanosomes. En: *Molecular Biology of Parasitic Protozoa* (Smith D. and Parsons M., ed). pp, 88. IRL press.

³⁹ Nourbakhsh F., Uliana S. and Smith D. (1996). Characterization and expression of a stage-regulated gene of *Leishmania major*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 76, 201.

desarrollo, los diferentes genes de una unidad transcripcional normalmente no son expresados en el mismo nivel, por lo tanto, los cambios a nivel de proteínas específicas son frecuentemente regulados por modulación de la cantidad de mRNA final, y esta regulación está determinada por un control a nivel post-transcripcional.⁴¹ En base a esto, se ha sugerido que una regulación a nivel del proceso de maduración del RNA, *trans-splicing*, y poliadenilación, podría ser muy importante para determinar la regulación de genes en los tripanosomátidos.^{42, 33}

1.4 LAS HISTONAS

En las células eucarióticas, casi todo el DNA cromosómico está asociado a un grupo de cinco proteínas diferentes, cargadas positivamente, denominadas **Histonas**. Estas histonas se conocen como H1, H2A, H2B, H3 y H4,⁴³ fuera de estas también existen algunas variantes alélicas y post-traduccionales de las mismas.⁴⁴ Dos copias de las histonas H2A, H2B, H3 y H4 forman dobletes de H2A-H2B y H3-H4, que interactúan principalmente a través de su dominio globular hidrofóbico para formar un octámero (núcleo de histonas) donde los dímeros H3-H4 se encuentran en el exterior.^{43, 44} El DNA que envuelve el núcleo de histonas (aproximadamente 140 pb de longitud) da justo un poco menos de dos vueltas alrededor del octámero de histonas,

⁴⁰ Gibson W.C., Swinkels B.S. and Borst P. (1988). Post-transcriptional control of the differential expression of phosphoglycerate kinase genes in *Trypanosoma brucei*. *J. Mol. Biol.* 201, 315.

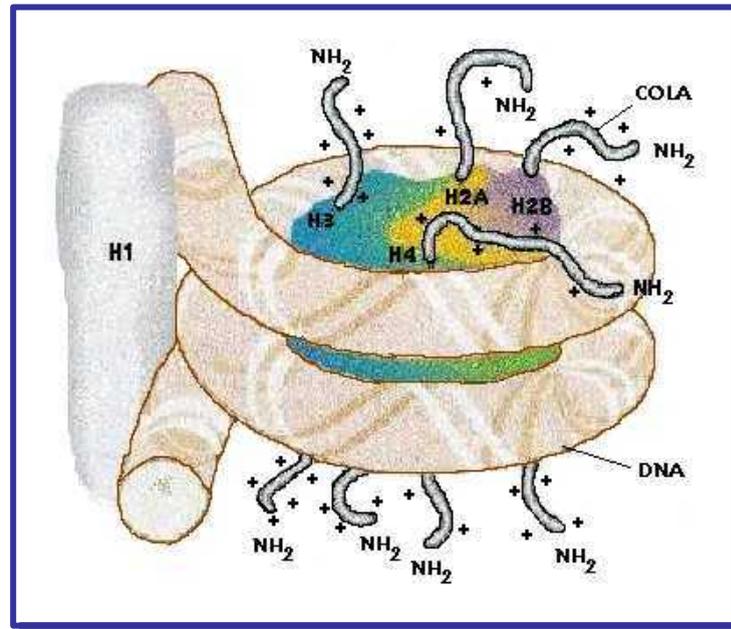
⁴¹ Soto M., Requena J.M. and Alonso C. (1993). Isolation, characterization and analysis of the expression of the *Leishmania* ribosomal PO protein genes. *Mol. Biochem. Parasitol.* 61, 265.

⁴² Hug M., Hotz H.R., Hartmann C. and Clayton C. (1994). Hierarchies of RNA-processing signals in a trypanosome surface antigen mRNA precursor. *Mol. Cell. Biol.* 14, 7428.

⁴³ Darnell J., Lodish H. and Baltimore D. (1990). Molecular cell biology. pp, 1-1161. W.H. Freeman and Company, New York. USA.

⁴⁴ Galanti N., Galindo M., Sabaj V., Espinoza I. and Toro G.C. (1998). Histone genes in trypanosomatids. *Parasitol. Today.* 14, 64.

conformando de esta manera el nucleosoma.⁴³ La histona H1, a través de su dominio globular, interactúa con el sitio de entrada y de salida del DNA en el nucleosoma, y por medio de su dominio C-terminal interactúa con el DNA separador localizado entre cada partícula nucleosomal.⁴⁴ Las regiones N-terminales de las histonas del octámero interactúan débilmente con el DNA y la H1. La unidad formada por un nucleosoma y una H1 unida se denomina cromatosoma.⁴³

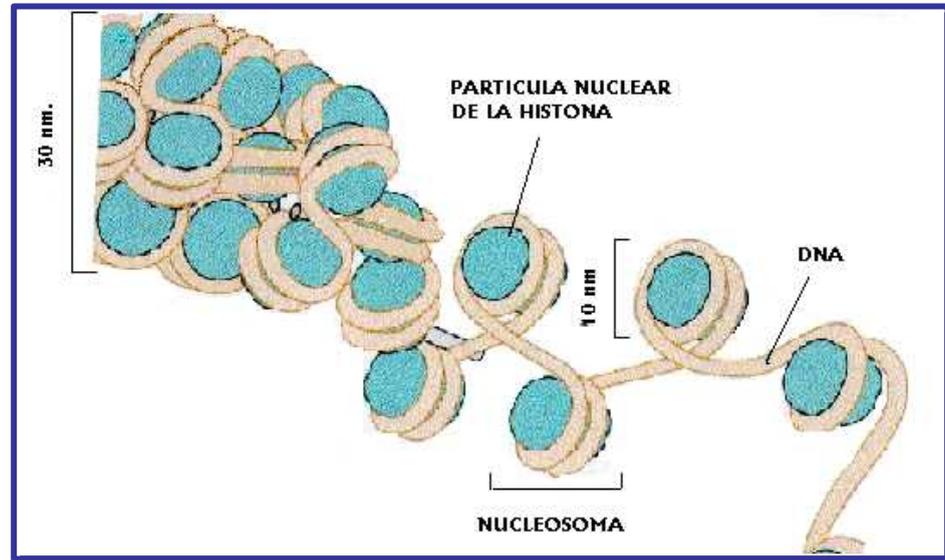


Esquema 6. Estructura del nucleosoma. De Grunstein M. (1992). Las histonas, proteínas reguladoras de genes.

En los eucariotas superiores, los nucleosomas constituyen la unidad de organización de la cromatina y la base de la compactación de la misma en cromosomas durante la división celular. De manera similar la cromatina de los tripanosomátidos está organizado en nucleosomas; pero la cromatina no se condensa en cromosomas durante la división celular.⁴⁵ Inicialmente se pensó que los kinetoplástidos carecían de H1, justificando así la falta de condensación de la cromatina. Actualmente

⁴⁵ Solari A.J. (1980). Function of the dense plaques during mitosis in *Trypanosoma cruzi*. *Exp. Cell. Res.* 127, 457.

se ha identificado histonas H1 o proteínas similares a la H1 en *Crithidia fasciculata*, *Trypanosoma brucei*, *Trypanosoma cruzi* y *Leishmania major*.⁴⁶ La carencia del dominio globular central en las H1 descritas en estos organismos podría ser uno de los aspectos relacionados con la falta de condensación de la cromatina.



Esquema 7. Estructura de la cromatina. En tripanosomátidos la cromatina no condensa en cromatina de 30 nm. De Grunstein M. (1992). Las histonas, proteínas reguladoras de genes.

Un estudio detallado sobre la cromatina de los tripanosomátidos podría sugerir dianas farmacológicas específicas y útiles para el diseño de agentes químicos contra estos parásitos.⁴⁴ Teniendo en cuenta que los flagelados están considerados entre los eucariotas más antiguos de la tierra, el estudio de la organización de la cromatina es también

⁴⁶ Noll T.M., Desponds Ch., Belli S.I., Glaser T.A. and Fasel N.J. (1997). Histone H1 expression varies during the *Leishmania major* life cycle. *Mol. Biochem. Parasitol.* 84, 215.

importante en el entendimiento de la historia de la organización genómica.⁴⁷

1.4.1 Estructura de los genes de las histonas

En los eucariotas en general, los genes de las histonas poseen múltiples copias, están agrupados en regiones de secuencias nucleotídicas de longitud variable (dependiendo del organismo) y el grupo entero se repite en formaciones en tándem; las regiones de DNA espaciador entre los genes o entre los grupos de genes, varía frecuentemente en las diferentes especies o incluso en un mismo organismo.^{48, 49} La orientación de los genes histona puede ser distinta dentro del grupo y en un mismo cromosoma, lo que demuestra que cada gen es una unidad de transcripción independiente. Teniendo en cuenta la regulación de los genes histona, estos genes se han agrupado en dos clases; la clase más frecuente comprende los genes histona dependientes de la replicación, y la segunda clase menos frecuente, comprende los genes que codifican histonas basales (variantes no alélicas), cuya transcripción ocurre en un nivel basal durante el ciclo celular.^{49, 50} En eucariotas superiores, la mayoría de los mRNAs se encuentran poliadenilados excepto los mRNAs de las histonas que, más bien, presentan una secuencia tallo-lazo en su extremo 3'.⁵¹ En contraste, los mRNAs transcritos de los genes histona que codifican

⁴⁷ Espinoza I., Toro G.C., Hellman U. and Galanti N. (1996). Histone H1 and core histones in *Leishmania* and *Crithidia*: comparison with *Trypanosoma*. *Exp. Cell. Res.* 224, 1.

⁴⁸ Osley M.A. (1991). The regulation of histone synthesis in the cell cycle. *Annu. Rev. Biochem.* 60, 827.

⁴⁹ Maxson R., Cohn R. and Kedes L. (1983). Expression and organization of histone genes. *Annu. Rev. Genet.* 17, 239.

⁵⁰ Wu R.S., and Bonner W.M. (1981). Separation of basal histone synthesis from S-phase histone synthesis in dividing cells. *Cell.* 27, 321.

⁵¹ Shumperli D. (1988). Multilevel regulation of replication-dependent histone genes. *Trends. Genet.* 4, 187.

histonas basales, están poliadenilados y no presentan la estructura tallo-lazo en su extremo 3'.⁵²

En general, la transcripción de los mRNAs de las histonas y la síntesis de las proteínas histónicas, ocurre durante la replicación del DNA, es decir, en la fase S del ciclo celular, de forma paralela con el ensamblaje de la nueva cromatina. Durante las fases G1 y G2 del ciclo celular y la mitosis ocurren un descenso dramático de los niveles de proteínas histonas así como de sus mRNAs.⁵³ Por tanto, esta regulación tiene lugar a nivel de la transcripción de los genes de las histonas y de la estabilidad de los mRNAs de las mismas.⁵⁴

1.4.2 Genes histona en Tripanosomátidos

1.4.2.1 Histonas H2A y H2B

En *T. cruzi* los genes de la H2A están organizados en unidades repetidas en tándem, distribuidos en dos clusters, localizados en un mismo cromosoma en torno a 700 kb. Uno de estos clusters contiene al menos seis copias del gen, mientras que el otro contiene más de 18 unidades.¹⁵ En el caso del genoma de *L. donovani infantum*, existen al menos 4 genes que codifican para la proteína H2A y la diferencia encontrada en la secuencia de nucleótidos de las regiones intergénicas 5' de dos clones estudiados, sugiere que son dos las unidades transcripcionales H2A expresadas en *Leishmania*.⁴⁴ Asimismo, se ha descrito que estos genes se expresan durante el estado promastigote, con índices superiores en la fase logarítmica que en la fase estacionaria, con lo cual los mRNAs serían poco regulados en la etapa proliferativa de los promastigotes. Los mRNAs de la H2A, presentan en su extremo 3' una secuencia de nucleótidos cuya simetría permite la

⁵² Wells D. and Kedes L. (1985). Structure of a human histone cDNA: evidence that basally expressed histone genes have intervening sequences and encode polyadenylated mRNAs. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 82, 2834.

⁵³ Heintz N. (1991). The regulation of histone gene expression during the cell cycle. *Biochem. Biophys. Acta.* 1088, 327.

⁵⁴ Marzluff W.F. and Pandey N.B. (1988). Multiple regulatory steps control histone mRNA concentration. *Trends. Genet.* 13, 49.

formación de una estructura tallo-lazo similar a las estructuras secundarias observadas en los mRNAs de la H2A en *Leishmania*, que en contraste a estas, se localizan corriente arriba del sitio de poliadenilación.⁵⁵ Las proteínas H2A traducidas están compuestas de 135 aminoácidos en *T. cruzi*¹⁵ y de 132 aminoácidos en *L. donovani infantum*,⁵⁶ con una masa molecular aproximada de 14 kDa. La homología es del 48 % comparado con la H2A de otros organismos como *Plasmodium*, levaduras y humanos.

Los genes que codifican para la histona H2B de *L. enrietti*, se encuentran organizados en copias múltiples, unidos en tándem y distribuidos en dos cromosomas. Los mRNAs de la histona H2B están presentes en ambas formas de vida del parásito (promastigote y amastigote), existiendo un nivel de mRNA más alto en los promastigotes, lo cual podría estar relacionado con el corto tiempo de duplicación de estas formas de vida respecto al de los amastigotes. El producto traducido es una proteína de 111 aminoácidos, la cual presenta una alta homología con la región C-terminal de la histona H2B de otras especies.⁵⁷

En *T. cruzi* los genes que codifican la H2B se encuentran organizados en tándem con unidades en torno a 750 pb, repetidos más de 18 veces, y localizados en dos cromosomas de peso molecular superior a 1.7 Mb. El mRNA de la histona H2B se ha encontrado en dos formas celulares replicativas de los tripanosomas, epimastigote y amastigote no así en tripomastigote; esto concuerda con el mecanismo regulatorio de los niveles de mRNA de las histonas en otros organismos.⁴⁸ Sin embargo, el nivel de mRNA de la H2B es afectado de una o más maneras inusuales cuando la replicación del DNA es inhibida

⁵⁵ Soto M., Requena J.M., Jimenez-Ruiz A. and Alonso C. (1991). The mRNA coding for the nucleosomal protein H2A of *Leishmania* is polyadenylated and has stem-loop at the 3' end. *Nucleic. Acid. Res.* 19, 45.

⁵⁶ Soto M., Requena J.M., Gomez L.C., Navarrete I. and Alonso C. (1992). Molecular characterization of a *leishmania infantum* antigen identified as histone H2A. *Eur. J. Biochem.* 205, 211.

⁵⁷ Genske J.E. Cairns B.R. Stack S.P. and Landfear S.M. (1991). Structure and regulation of histone H2B mRNA from *Leishmania enrietti*. *Mol. Cell. Biol.* 11, 240.

con agentes bloqueantes, sugiriendo un mecanismo de regulación alternativo a nivel de mRNA en estos organismos. El producto codificado por este gen, corresponde a una proteína de 112 aminoácidos con masa molecular de 12 kDa. Esta proteína muestra un 45 % de homología con la H2B de los eucariotas superiores.⁵⁸

1.4.2.2 Histonas H3 Y H4

En *T. cruzi* los genes que codifican la histona H3 están organizados en tándem, con una unidad repetida de 1 Kb, y un número estimado de 14 copias de genes. La localización cromosómica de los clusters depende de la cepa de parásito, fluctuando desde 1 a 1.4 Mb. La proteína traducida por estos genes tiene un peso molecular de 14.6 kDa, con una homología significativa en la región hidrofóbica globular y una divergencia alta en el extremo N-terminal con respecto a la H3 de otras especies.⁵⁹ De manera similar, la H4 presenta un 50 % de homología comparado con la H4 humana.⁶⁰ Estos datos son interesantes teniendo en cuenta que la H3 y la H4 son considerados como modelos de conservación de proteínas. En otro estudio, se ha clonado un gen de *L. infantum* que ha mostrado homología con la secuencia consenso del gen de la histona H3, el producto de éste gen tiene alta homología con una secuencia consenso en la región globular y en la región C-terminal de la H3 de otras especies.⁶¹

La divergencia observada en el extremo N-terminal de las histonas H3 y H4 en los tripanosomátidos puede estar relacionada con

⁵⁸ García-Salcedo J.A., Oliver J.L., Stock R.P. and González A. (1994). Molecular characterization and transcription of the histone H2B gene from the protozoan parasite *Trypanosoma cruzi*. *Mol. Microbiol.* 13, 1033.

⁵⁹ Bontempi E.J., Porcel B.aM., Henriksson J., Carlsson L., Rydaker M., Segura E.L., Ruiz A.M. and Pettersson U. (1994). Genes for histone H3 in *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem. Parasitol.* 66, 147

⁶⁰ Toro G.C., Wernstadt C., Medina C. Jaramillo M., Hellmann U. and Galanti M. (1992). Extremely divergent histone H4 sequence from *Trypanosoma cruzi*: evolutionary implications. *J. Cell. Biochem.* 49, 266.

⁶¹ Soto M., Requena J.M., Morales G. and Alonso C. (1994). The *Leishmania infantum* histone H3 possesses an extremely divergent N-terminal domain. *Biochem. Biophys. Acta.* 1219, 533.

la fragilidad de su cromatina cuando es tratada con nucleasa micrococcal o con solución salina. Por otro lado, los resultados del tratamiento de la cromatina de *T. brucei* con tripsina inmovilizada sugieren que la histona H4 (o parte de ella) está localizada en la superficie del octámero, en contraste a la localización interna de la H4 observada en eucariotas superiores.⁶²

1.4.2.3 Histona H1

Al igual que otros genes de tripanosomátidos, los genes que codifican la histona H1 están organizados en tándem con orientación cabeza-cola.^{63, 64, 65} En *Trypanosoma cruzi*, las unidades de los genes de H1 tienen entre 650 a 700 pb de longitud, los cuales están repetidos en 20 copias y localizados en un único cromosoma de 2.2 Mb;⁶³ además dependiendo de la cepa de parásito, el número de copias de los genes puede variar. La transcripción de los genes H1 sigue el mismo proceso que cualquier otro gen en tripanosomátidos, por cuanto, los mRNAs de la H1 presentan el mini-exón o SL en el extremo 5' y están poliadenilados en el extremo 3'; el sitio de adición de la fracción poli (A) se encuentra ubicado de 220 a 222 nucleótidos corriente abajo del

⁶² a) Bender K., Betschart B., Schifaaller J., Kampf U. and Hecker H. (1992). Sequence differences between histones of procyclic *Trypanosoma brucei* and higher eukaryotes. *Parasitology*. 105, 97. b) Bender K., Betschart B., Marium C., Michalon P. and Hecker H. (1992). Structural differences between the chromatin of procyclic *Trypanosoma brucei brucei* and of higher eukaryotes as probed by immobilized trypsin. *Acta Tropica*. 52, 69.

⁶³ Campetella A., Henriksson J., slund L., Frasch A.C.C., Pettersson U., and Cazzul J.J. (1992). The major cysteine proteinase (cruzipain) from *Trypanosoma cruzi* is encoded by multiple polymorphic tandemly organized genes located on different chromosomes. *Mol. Biochem Parasitol*. 50, 225.

⁶⁴ Swindle J., Ajioka J., Eisen H., Sanwal B., Jacquemot C., Browder Z. and Buck G. (1988). The genomic organization and transcription of the ubiquitin genes of *Trypanosoma cruzi*. *EMBO. J.* 7, 1121.

⁶⁵ slund L., Carlsson L., Henriksson J., Ryd ker M., Toro G.C., Galanti N. and Pettersson U. (1994). A gene family encoding heterogeneous histone H1 proteins in *Trypanosoma cruzi*. *Mol. Biochem. Parasitol*. 65, 317.

codon de terminación del gen.⁶³ Otra característica es la presencia de una región conservada rica en timinas en el extremo 3' del gen.⁶³

Los polipéptidos H1 producidos por los genes H1, oscilan entre 74 a 97 aminoácidos en *T. cruzi*⁶³ y 105 aminoácidos en *L. major* y tienen una secuencia de aminoácidos rica en alanina, lisina, prolina y arginina, que corresponde al dominio C-terminal de otras histonas H1; es decir carecen totalmente del dominio globular central. Sin embargo presentan sitios de fosforilación específicas de las H1, los que pueden dar lugar a diferentes subtipos de estas histonas. Estos subtipos son específicos en determinados tejidos o bien en determinados estados de desarrollo, por cuanto la expresión de estos subtipos H1 sugieren diferencias funcionales relacionados con las variaciones en la estructura de la cromatina que existe dentro del genoma y durante el desarrollo de los organismos. De esta manera, las diferencias en la condensación de la cromatina observada en los diferentes estados de desarrollo de los tripanosomátidos, podrían estar relacionadas con las peculiaridades estructurales de las proteínas H1 o las proteínas similares a la H1.

Las interrupciones del ciclo celular juegan un papel importante en los tripanosomátidos parásitos, ya sea durante la proliferación celular, o durante el desarrollo de sistemas de control de la infectividad y supervivencia en el hospedador, cuando ocurre la etapa de transición (estado de no-división) consistente en un estado de preadaptación para sobrevivir en el siguiente hospedador y precediendo la siguiente fase proliferativa. Esto es el caso del proceso de transformación de promastigotes en amastigotes (en *Leishmania*), en el cual no hay división durante las primeras 24 horas de la infección. Las histonas H1 descritas y otras variantes podrían cumplir una función importante en el desarrollo y control del ciclo celular, como en las adaptaciones del parásito a los cambios de las condiciones de desarrollo.

En base a las propiedades de solubilidad, metacromacia, características inmunoquímicas y movilidad electroforética de las proteínas H1, se han descrito las H1 en *Trypanosoma brucei*, *Crithidia fasciculata* y *Leishmania major*.

Capítulo 2

OBJETIVOS

OBJETIVOS

1. Construcción de una genoteca de expresión de *Leishmania braziliensis*.
2. Búsqueda de genes que expresen proteínas con carácter antigénico, utilizando sueros de pacientes diagnosticados clínicamente con leishmaniasis.
3. Estudio y caracterización de los genes codificantes para proteínas antigénicas de *Leishmania braziliensis*.

Capítulo 3
MATERIAL Y MÉTODOS

3.1 MICROORGANISMOS Y CONDICIONES DE CULTIVO

3.1.1 Microorganismos utilizados

En los diferentes trabajos realizados en esta memoria se emplearon los siguientes microorganismos:

- *Leishmania braziliensis*, cepa MOHM/PE/95/LQ8 (zymodema MON-231). Estos parásitos se aislaron a partir de las lesiones que presentaron los pacientes clínicamente diagnosticados con leishmaniasis, procedentes del Departamento de Cusco, Perú⁶⁶, y se caracterizaron en el Laboratorio CHU de Montpellier, Francia.
- *Escherichia coli*, cepa XL2-Blue MRF' (*Stratagene*) caracterizada por los marcadores: *mcrA*⁻ 183, (*mcrCB*⁻, *mrr*⁻, *hsdSMR*⁻) 173, *endA1*, *supE44*, *thi-1*, *recA1*, *gyrA96*, *relA1*, *lac* (F' *proAB*, *lacI*^qΔM15, Tn10, *Amy*^f, *Cam*^f). Se empleó en la construcción de la genoteca de DNA complementario, y en otras manipulaciones genéticas.
- *Escherichia coli*, cepa NM522 (*Stratagene*) caracterizada por los marcadores: *supE thi-1* Δ(*lac-proAB*) Δ(*mcrCB*⁻ *hsdSMR*⁻)5 (K⁻, ^mK⁻) (F' *proAB*, *lacI*^qΔM15). Se empleó en otras manipulaciones genéticas.

3.1.2 Medios y condiciones de cultivo

a) Para parásitos

Las cepas de *Leishmania* se aislaron inicialmente en medio agar-sangre, USMARU, rico en nutrientes necesarios para el

⁶⁶ El aislamiento de parásitos fue coordinado por el Grupo de investigación "Leishmaniasis" del Area de Microbiología de la Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco en Perú.

crecimiento de promastigotes ⁶⁷, seguidamente las cepas así aisladas se adaptaron y mantuvieron bajo la forma promastigote en medio líquido RPMI-1640. Este medio se compuso de RPMI al 0.83 % ((p/v), Difco), HEPES al 0.48 % ((p/v), Sigma), NaHCO₃ al 0.16 % ((p/v), Merck), mezcla de aminoácidos, ácidos orgánicos, azúcares al 1.17 % ((p/v), solución madre 10X, -20 °C), y mezcla de vitaminas al 0.0002 % ((p/v), solución madre 1000X, -20 °C), luego se tamponó a pH 7.2 con NaOH al 5 %. Posteriormente se añadió al medio suero bovino fetal inactivado hasta una concentración final del 20 % ((v/v), Gibco BRL). El medio así preparado se esterilizó por filtración usando filtros de 0.22 µm (Millipore) y se conservó a 4 °C. En el momento preciso de su uso se añadió gentamicina (Gevramicin® 40 mg/ml) esterilizada por filtración, hasta una concentración final de 40 µg/ml, para evitar contaminaciones con bacterias.

El mantenimiento de las formas promastigote de *Leishmania* se realizó mediante resiembras cada 48 o 72 h en 2 ml de medio RPMI, e incubados a temperatura de 22 °C. Además se mantuvo una colección de todas las cepas de *Leishmania*, conservadas en glicerol al 15 % y a -80 °C.

b) Para bacterias

Las cepas de *E. coli* se cultivaron tanto en medios de cultivo líquidos como sólidos. Los medios sólidos se obtuvieron añadiendo agar al medio líquido correspondiente, hasta una concentración final del 2 % (p/v). Los componentes sensibles a la temperatura tales como la ampicilina y tetraciclina se prepararon en forma de solución madre concentrada, y se esterizaron por filtración (Gelman Science 0,22µm), luego se añadieron al medio autoclavado (15 lb de presión, 120 °C por 15 min) después de que su temperatura alcanzó por debajo de 50 °C. Se utilizó el medio LB (Luria-Bertani), compuesto de

⁶⁷ Evans D.(1989). Handbook on isolation characterization and cryopreservation of *Leishmania*. En: Special programme for research and training in tropical diseases. UNDP/WORLD BANK/WHO. pp 1-45

extracto de levadura al 0.5 % (p/v), triptona o peptona de caseína al 1 % (p/v) y NaCl al 1 % (p/v), tamponado a pH 7 con NaOH.

Cuando se quiso seleccionar bacterias portadoras de plásmidos que confieren resistencia a la ampicilina se añadió al medio de cultivo dicho antibiótico 100 µg/ml (solución madre 500 X, -20 °C). Además se consideró necesario añadir al medio de cultivo, tetraciclina 12.5 µg/ml (solución madre 500 X en etanol, -20 °C, fotosensible), para mantener el factor F' de la cepa hospedadora (XL2-Blue MRF') de los plásmidos recombinantes. Para detectar bacterias portadoras de plásmidos recombinantes, en los que el gen codificante del péptido α de la β -galactosidasa había sido interrumpido (colonias blancas), se extendieron sobre las placas de LB-Amp 30 µl de una solución de IPTG (25 mg/ml, -20 °C), y 4 µl de una solución de X-gal en dimetilformamida (20 mg/ml, -20 °C; fotosensible).

La incubación de los cultivos líquidos se realizó con agitación orbital a 250 rpm y a temperatura de 37 °C. Estos medios de cultivo líquido se inocularon a partir de una colonia fresca aislada en cultivo sólido, o a partir de precultivos frescos crecidos en medio líquido durante 12 a 24 h. El mantenimiento de bacterias se llevó a cabo mediante resiembras mensuales en placas de medio LB y se conservaron a 4 °C. Además se mantuvo una colección de todas las cepas de *E. coli*, conservadas en glicerol al 15 % y a -80 °C.

3.2 SUEROS DE PACIENTES

Los sueros utilizados en este trabajo se obtuvieron de pacientes que acudieron a los hospitales: H. Regional, H. Lorena y H. Quillabamba del Departamento de Cusco en Perú, por consulta de lesión sospechosa de leishmaniasis (cutánea y mucocutánea) o por control de tratamiento. Además se obtuvieron sueros de personas afectadas con leishmaniasis procedentes de la ciudad de Kiteni, en varias expediciones a dicha zona, considerada endémica de esta enfermedad. Todos estos casos se diagnosticaron clínicamente

positivos, y se confirmó mediante técnicas inmunológicas (Montenegro y ELISA), y parasitológicas (frotis sanguíneo y cultivo). Los datos epidemiológicos de cada paciente se recogieron en fichas individuales, considerando procedencia, edad, sexo, tipo de lesión, tiempo de lesión con relación al tipo de lesión, tratamiento y ubicación de la lesión. Los sueros así obtenidos se fraccionaron en alícuotas, se codificaron con el número de identificación de la ficha del paciente y se conservaron a - 80 °C.

3.3 PURIFICACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS DE *Leishmania* MOHM/PE/95/LQ8

3.3.1 Extracción y purificación de DNA

La extracción de DNA genómico de *Leishmania* se realizó utilizando el método descrito por Medina y col.⁶⁸ con algunas modificaciones, en el que se combina la lisis de las células con tritón y proteinasa K, eliminación de restos orgánicos con F/Clf/I, tratamiento de los ácidos nucleicos liberados con RNAsas y precipitación del DNA purificado.

Se partió de 6×10^8 promastigotes, procedentes de un cultivo en fase logarítmica de crecimiento, recogidos mediante centrifugación a $3.000 \times g$, 10 min a 4 °C, y lavados con 10 ml de PBS (NaCl 130 mM, Na_2HPO_4 70 mM, NaH_2PO_4 3 mM, pH 7.2). Los promastigotes así preparados se sometieron al proceso de extracción mediante resuspensión en 2.5 ml de solución de lisis (Tris-HCl 10 mM pH 8.0, EDTA 1 mM, tritón 4 % (v/v)) conteniendo proteinasa K (20 mg/ml). La suspensión se dejó incubando a 56 °C, agitando cada 10 min durante 1 h. Seguidamente se añadieron 2.5 ml de fenol equilibrado (pH 8.0), se mezcló suavemente durante 5 min y se centrifugó a $4.000 \times g$, 10 min a 12 °C. A la fase acuosa resultante

⁶⁸ Medina-Acosta E. and Cross G. (1993). Rapid Isolation of DNA from trypanosomatid protozoa using a simple 'mini-prep' procedure. *Mol. Biochem. Parasitol.* 59, 327.

se le añadió 2.5 ml de F/Clf/I, se mezcló y centrifugó a 4.000 x g, 10 min a 12 °C. Se recuperó la fase acuosa resultante y se mezcló suavemente con 2.5 ml de Clf durante 5 min y se centrifugó a 4.000 x g, 10 min a 12 °C. Los ácidos nucleicos recuperados en la fase acuosa se trataron con 2.5 ml de solución de RNAsa (Tris-HCl 100 mM pH 7.5, EDTA 10 mM, RNAsa I 400 µg/ml). Esta mezcla se incubó a 37°C, durante 1h. Finalizada la eliminación de RNAs, el DNA genómico se purificó añadiendo 3 ml de F/Clf/I, se mezcló suavemente durante 5 min y se centrifugó a 4.000 x g, 10 min a 12 °C. A la fase acuosa resultante se añadió 3 ml de Clf/I, se mezcló y centrifugó a 4.000 x g, 10 min a 12 °C. Seguidamente el DNA genómico se precipitó añadiendo 250 µl de AcNa y 5 ml de etanol absoluto frío (-20 °C), se mezcló suavemente y dejó a -20 °C durante 12 h. El DNA precipitado se lavó dos veces con 1 ml de etanol frío al 70 % (-20 °C) mediante centrifugación a 13.000 x g., 10 min a 4 °C, luego se secó a 37 °C durante 10 min y finalmente se resuspendió en 100 µl de ddH₂O.

3.3.2 Extracción y purificación de RNA total

La purificación de RNA total, se realizó a partir de células de *Leishmania*, mediante un procedimiento de extracción con fenol ácido (\cong pH 5.0) y a temperatura de 65 °C, el cual se preparó saturando fenol puro con agua libre de RNAsas.⁶⁹ Las posibles ribonucleasas presentes en las soluciones empleadas se inactivaron añadiéndoles dietilpirocarbonato (DEPC) hasta una concentración final del 0.1 % (v/v). Se dejó que este compuesto actuara durante la noche y, finalmente, sus restos se eliminaron mediante esterilización en autoclave. El tris y el EDTA utilizados fueron de calidad “para biología molecular”, es decir, libre de nucleasas (Sigma).

⁶⁹ Collart M.A. and Oliviero S. (1993) Preparation of yeast RNA by extraction with hot acidic phenol. En: Current Protocols in Molecular Biology (Ausubel F.M., Brent R., Kingston R.E., Moore D.D., Seidman J.G., Smith J.A. and Struhl K. eds) pp 13.12.1-13.12.5, Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience, New-York.

Se partió de 10^8 promastigotes de *Leishmania* (cepa MHOM/PE/95/LQ8), procedentes de un cultivo fresco, recogidos mediante centrifugación a 3.000 x g, 10 min. a 4 °C, lavados con 10 ml de ddH₂O y transferidos a tubos de 1.5 ml. Los promastigotes así preparados se sometieron inmediatamente al proceso de extracción, mediante resuspensión en 400 µl del tampón TES (Tris-HCl 10 mM, pH 7.5, EDTA 10 mM, SDS 0.5 %) precalentado a 65 °C y, se adicionó inmediatamente 400 µl de fenol ácido caliente. La suspensión celular se agitó enérgicamente durante 10 seg y luego se incubó a 65 °C durante 15 min con agitación cada 3 min. para evitar la separación de la fase acuosa y fenólica. A continuación, la mezcla se incubó en baño de agua/hielo durante 5 min, y centrifugó a 13.000 x g, 5 min a 4 °C. La fase acuosa resultante se sometió a dos extracciones sucesivas con 400 µl de fenol ácido, y con 400 µl de cloroformo saturado con agua, agitando enérgicamente durante 10 seg, luego se centrifugó a 13.000 x g., 5 min. a 4 °C. Finalmente, el RNA presente en la última fase acuosa recuperada se precipitó y se mantuvo en ese estado a -20°C hasta el momento de su uso. El RNA insolubilizado se sedimentó mediante centrifugación a 13.000 x g, 5 min a 4 °C, lavándolo posteriormente con etanol frío al 70 %, y disolviéndolo en ddH₂O calentando a 65 °C durante 20 min.

3.3.3 Aislamiento de RNA poli (A)⁺

A partir de una preparación de RNA total, se aisló RNA poliadenilado mediante cromatografía de afinidad en columnas de celulosa-oligo(dT), para lo cual se utilizaron los reactivos de purificación del “QuickPrep® *Micro* mRNA Purification Kit” (*Pharmacia*), siguiendo las instrucciones del fabricante con algunas modificaciones.

Se partió de 100 µg de RNA total disuelto en 120 µl, purificado según el método descrito en el apartado 3.3.2. A ésta disolución de RNA se añadió 400 µl del tampón de extracción y 680 µl del tampón de elución, se homogenizó y se centrifugó a

13.000 x g., 1 min. La fase acuosa resultante se añadió a la celulosa-oligo (dT), se mezcló suavemente mediante movimientos de inversión durante 3 min, y centrifugó a 13.000 x g, 1 min, eliminando el sobrenadante. La celulosa-oligo (dT) conteniendo el RNA poli (A)⁺ unido, se sometió a lavados sucesivos con tampón de alta concentración de sales y con tampón de baja concentración de sales. Después se transfirió a una columna cromatográfica donde el RNA poliadenilado se aisló por elución con 200 µl de ddH₂O precalentada a 65°C. Luego de esta purificación se consideró necesario una segunda purificación para eliminar los RNA ribosomales que se aislaron junto al RNA poliadenilado, para ello, se añadió al RNA eluido 2 µl de SDS 10 % (p/v), se incubó a 65 °C durante 10 min, e inmediatamente se enfrió en una mezcla hielo/alcohol durante 5 min. Seguidamente se añadieron 20 µl de NaCl 5 M, 2 µl de EDTA 0.1 M y 20 µl de Tris 0.1 M; luego se centrifugó a 13.000 x g, 1 min. Después de este tratamiento el RNA poliadenilado resultante se purificó en una columna de celulosa-oligo (dT) de la misma manera como se describió anteriormente.

3.4 PURIFICACIÓN DE PLÁSMIDOS DE BACTERIAS TRANSFORMADAS

Las minipreparaciones plasmídicas utilizadas para una comprobación rápida, mediante digestión con endonucleasas de restricción de los plásmidos portados por un conjunto de clones bacterianos, se realizaron siguiendo el método descrito por Wilde y Kaderbhai.⁷⁰ Las células bacterianas contenidas en 1.5 ml de cultivo crecido durante 16 h en medio LB-Amp, se recogieron mediante centrifugación a 13.000 x g, 1 min. y se resuspendieron en 200 µl de Tris-HCl 50 mM pH 8.0, EDTA 62.5 mM, LiCl 2.5 mM y Tritón X-100 al 4 % (v/v). A continuación se añadieron 200 µl de fenol/cloroformo (1:1) e inmediatamente la mezcla resultante se agitó

⁷⁰ Wilde H.M. and Kaderbhai M.A. (1990). A simple single-step procedure for small-scale preparation of *Escherichia coli* plasmids. Nucl. Acids. Res., 18: 1660

enérgicamente por 15 seg y centrifugó a 13.000 x g., 2 min. Los ácidos nucleicos presentes en la fase acuosa superior se precipitaron añadiendo 2 vol. de etanol, se incubaron durante 2 min a temperatura ambiente y centrifugó a 13.000 x g, 10 min a 4°C. Luego el precipitado se lavó con 1 ml de etanol, se secó al vacío y se disolvió en 50 µl de ddH₂O estéril.

Una vez identificado el clon bacteriano que porta un plásmido de interés para posteriores manipulaciones (subclonaje, secuenciación), se purificó a pequeña y mediana escala empleando en algunos casos un Kit de la casa *Pharmacia* (FlexiPrep Kit) y en otros, un Kit de la casa *Promega* (WizardTM Plus Miniprep DNA Purification System). En ambos Kit se combina un método de liberación de plásmidos mediante lisis alcalina con la eliminación del RNA con Rnasa, y limpieza de los plásmidos mediante unión a una matriz de sílica en presencia de una sal caotrópica, tiocianato de guanidinio.

3.5 DIGESTIÓN DE DNA CON ENDONUCLEASAS DE RESTRICCIÓN

Se utilizaron endonucleasas de restricción de tipo II suministradas por diversas casas comerciales (*Boehringer Mannheim*, *Promega*, *Pharmacia*, y *Amersham*), siguiendo las recomendaciones generales dadas por Bloch⁷¹ y las indicaciones particulares del fabricante.

Generalmente se realizaron digestiones completas de plásmidos recombinantes, con diferentes enzimas para estimar el tamaño de los fragmentos de cDNA portados por éstos, así como digestión completa de DNA genómico de *Leishmania*, partiendo de

⁷¹ Bloch K.D. (1995). Restriction endonucleases and restriction mapping. En: Currents Protocols in Molecular Biology (Ausubel F.M., Brent R., Kingston R.E., Moore D.D., Seidman J.G., Smith J.A. and Struhl K. eds) pp 3.0.3-3.3.2, Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience, New-York.

varias concentraciones de DNA molde, los cuales se indicarán en resultados. Cuando se tuvo que realizar digestiones parciales del DNA genómico de *Leishmania*, se partió de 500 ng de DNA genómico por cada tiempo estudiado.

3.6 ELECTROFORESIS CONVENCIONAL DE ÁCIDOS NUCLEICOS EN GELES DE AGAROSA

Se utilizaron sistemas de electroforesis submarina⁷² compuestos de geles de agarosa de concentración variable, generalmente al 0.8 % (p/v) y el tampón de electroforesis TAE 1X (solución madre 50X: Tris acetato 2M, pH 8, EDTA 50 mM; conservado a temperatura ambiente). El bromuro de etidio empleado para teñir los ácidos nucleicos se incorporó al gel fundido, una vez que su temperatura alcanzó 60 °C, hasta una concentración final de 0.2 µg/ml (solución madre 1 mg/ml, 4 °C), o de 0.5 µg/ml cuando se consideró necesaria la visualización de RNA total o DNA genómico digerido con endonucleasas. El tampón de carga se preparó como una solución madre 6X (azul de bromofenol 2.5 mg/ml, glicerol 300 µl/ml; 4°C). Entre los electrodos de la cubeta de electroforesis, generalmente se aplicaron diferencias de potencial constantes de 5 voltios/cm, excepto para la separación de DNA genómico digerido con endonucleasas con vistas a su transferencia a un soporte sólido, se aplicaron diferencias de potencial de 2 voltios/cm. Los resultados de las electroforesis se visualizaron exponiendo los geles a la luz ultravioleta de 340 nm de longitud de onda, en un transiluminador (marca Ultralum Dual Light_{Tm} Transilluminator) y luego se fotografiaron con una cámara Polaroid modelo MP-40 provista de película instantánea tipo 667, y se digitalizó con un sistema de captación de imágenes (GelPrinter by TDI). Estos sistemas de electroforesis también se usaron para analizar de manera sencilla la calidad de las preparaciones de RNA total de *Leishmania*.

⁷² Sambrook J., Fritsch E.F. and Maniatis T. (1989). Molecular cloning: A laboratory manual (2nd ed.) Cold Spring Harbor, N.Y. Cold Spring Harbor Laboratory press.

Cuando se tuvo que analizar los RNAs de *Leishmania* por hibridación con sondas de DNA marcadas, la electroforesis de RNA se realizó en condiciones desnaturalizantes⁷³ en geles de electroforesis compuestas de agarosa al 1 %, en tampón de electroforesis 1X conteniendo MOPS 0.2 M. y formaldehído hasta una concentración final de 2.2 M. Estos dos últimos componentes fueron añadidos a la agarosa fundida una vez que ésta alcanzó los 60 °C. Las muestras de RNA (1µg/µl) se desnaturalizaron mediante resuspensión en 30 µl de tampón de electroforesis conteniendo MOPS 0.2 M y formamida al 50 % (v/v), se incubaron a 65 °C durante 10 min, y se enfriaron inmediatamente en una mezcla agua/hielo. A las muestras así preparadas se les añadió 0.2 vol. de tampón de carga 6X. A continuación se procedió a la separación electroforética como se describió anteriormente. Las posibles RNAsas presentes en el instrumental de electroforesis (cubeta, molde y peine) se eliminaron mediante lavados con H₂O₂ al 10 % y con ddH₂O tratada con dietilpirocarbonato.

3.7 ESTIMACIÓN DEL PESO MOLECULAR Y LA CONCENTRACIÓN EN DISOLUCIONES DE FRAGMENTOS LINEALES DE DNA

El tamaño de los fragmentos de DNA bicatenario, expresado en kilopares de bases (kb), se estimó comparando sus distancias de migración electroforética con las de marcadores de tamaño conocido, y considerando que existe una relación lineal e inversamente proporcional entre la distancia y el logaritmo del peso molecular. Como marcadores de peso molecular se utilizaron los fragmentos obtenidos al digerir el DNA del fago φX174 con la endonucleasa de restricción *Hae* III, y del fago Lambda con la endonucleasa de restricción *Hind* III o, conjuntamente con las endonucleasas *Hind* III y *Eco* RI. Los tamaños de dichos marcadores son: 1.35, 1.08, 0.87,

⁷³ Leirach H., Diamond D., Wozney D.J.M. and Boedtker H. (1977). RNA molecular weight determinations by gel electrophoresis under denaturing conditions, a critical reexamination. *Biochemistry* 16, 4743.

0.6, 0.31, 0.28, 0.27, 0.23, 0.19, 0.12 y 0.072 kb, en el primer caso; 23.13, 9.42, 6.56, 4.36, 2.32, 2.03, 0.56 y 0.12 kb, en el segundo caso, y 21.22, 5.14, 4.97, 4.27, 3.53, 2.02, 1.9, 1.58, 1.37, 0.98, 0.83, 0.56 y 0.12 kb en el tercer caso; también se usó el marcador “100 Base-Pair Ladder” de la casa *Pharmacia biotech*. Como marcadores de RNA se usó RNA ribosomal de *Trypanosoma cruzi*.

Cuando no se consideró necesaria la cuantificación exacta de la concentración de DNA bicatenario, ésta se estimó tras electroforesis en gel de agarosa, comparando a simple vista la fluorescencia emitida por diluciones de un patrón de concentración conocida, con la fluorescencia emitida por la muestra problema. Algunas veces, previa a la electroforesis las muestras problema se sometieron a digestión con una endonucleasa de restricción. Sin embargo, para la estimación exacta de la concentración de ácidos nucleicos se midió la absorción de la luz ultravioleta de 260 y 280 nm de longitud de onda en el sistema Gene-quant, empleando cubetas de cuarzo y tampón TE pH 8 para la dilución de la muestra y como blanco de absorción de la luz. La relación A_{260}/A_{280} informa el grado de pureza de la muestra (1.8 - 1.9 para DNA, 1.9 - 2.0 para RNA), y la fiabilidad de la cuantificación. El valor de A_{260} indica la concentración de ácidos nucleicos, teniendo en cuenta que una $A_{260} = 1$ equivale a 50 μg de DNA bicatenario/ml o a 40 μg de RNA/ml.

3.8 AMPLIFICACIÓN DE RNA MEDIANTE REACCIÓN DE RT-PCR

La reacción de RT-PCR consta de dos reacciones, en primer lugar se llevó a cabo una reversotranscripción a partir de RNA catalizado por una transcriptasa reversa, generándose moléculas de DNA complementario (cDNA), y en segundo lugar se produce una amplificación de los cDNAs generados mediante reacción en cadena de la DNA polimerasa.

La reversotranscripción se realizó utilizando los componentes del “1st strand cDNA synthesis Kit” de la casa *Boehringer mannheim*,

siguiendo las instrucciones del fabricante con algunas modificaciones, para lo cual se partió de 5 µg de RNA total y 20 pmol de cebador antisentido en tampón RT-PCR 1X, todos ellos contenidos en un volumen de 20 µl. Esta mezcla de reacción se incubó en un termociclador Gene-Amp 9600 de la marca *Perkin Elmer* a temperaturas de:

94 °C por 2 seg
70 °C por 10 seg. (rampa = 2 min.)
60 °C por 10 seg. (rampa = 5 min.)
42 °C durante 30 min.
99 °C por 5 min.

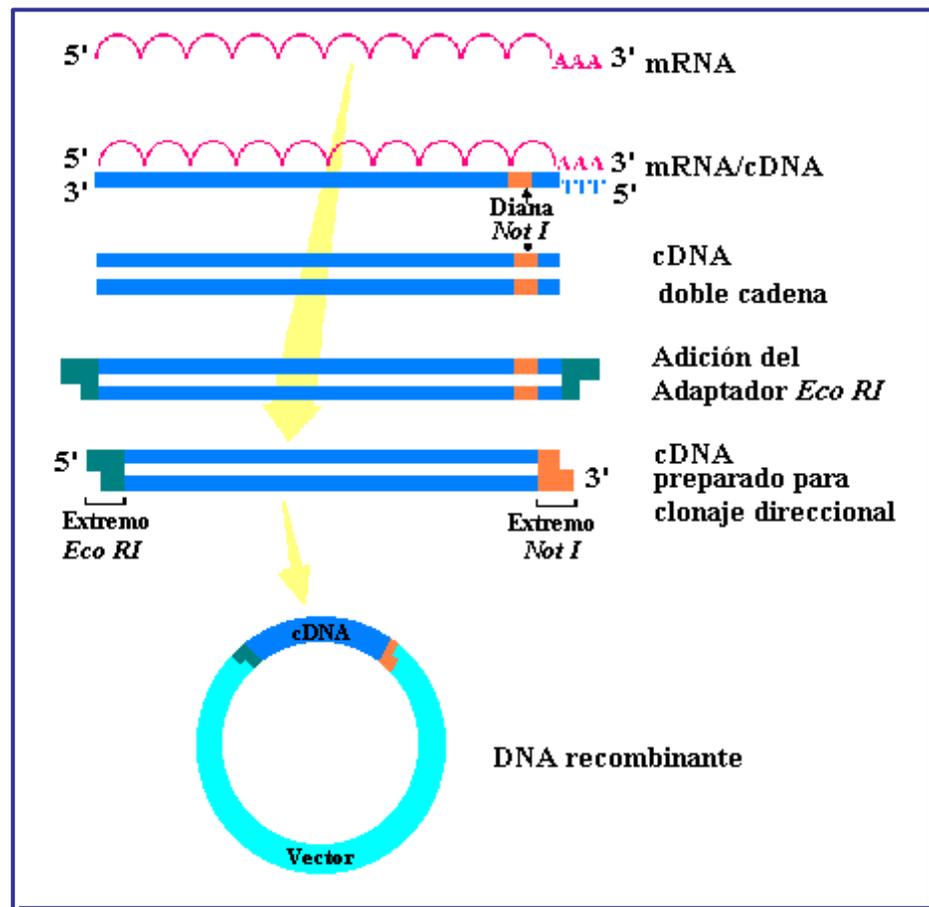
La enzima transcriptasa reversa se añadió cuando se alcanzó la temperatura de 42 °C.

La amplificación de los cDNAs sintetizados se realizó añadiendo al resultado de la reacción anterior, 20 pmol de cebador sentido y 2.5 unidades de Taq DNA polimerasa (*Perkin Elmer*), además se añadió tampón RT-PCR 1X, y ddH₂O hasta un volumen final de 50 µl. Esta mezcla de reacción se incubó en un termociclador *Perkin Elmer* a temperaturas de:

94 °C por 1 min.
94 °C por 1 min.] 30 ciclos
69 °C por 30 seg.]
72 °C por 1 min.]
72 °C por 7 min
4 °C por 5 min.

3.9 CONSTRUCCIÓN DE UNA GENOTECA DE DNA COMPLEMENTARIO (cDNA) DE *Leishmania* MOHM/PE/95/LQ8

En la construcción de una genoteca de expresión a partir de RNA poliadenilado de *Leishmania* se utilizó una combinación de los componentes de dos Kit, el TimeSaver® cDNA Synthesis Kit y el Directional Cloning Toolbox de *Pharmacia Biotech*, siguiendo las instrucciones del fabricante con algunas modificaciones. En el esquema 8, se representa el diseño de la estrategia seguida en la construcción de la genoteca de expresión.



Esquema 8. Diseño experimental de la construcción de una genoteca de expresión de *Leishmania braziliensis* MHOM/PE/95/LQ8.

3.9.1 Síntesis de la primera cadena de DNA complementario

La reacción de síntesis de la primera cadena de cDNA a partir de mRNA, ha sido catalizada por una transcriptasa reversa del virus MMLV (moloney murine leukemia virus).

Se partió de 1.5 µg de RNA poli(A)⁺ contenido en un volumen de 20 µl. Este RNA se desnaturalizó mediante incubación a 65 °C durante 10 min, e inmediatamente se enfrió en una mezcla agua/hielo durante 5 min. Una vez desnaturalizado se añadió el tampón de reacción, y 4.3 µg del cebador *Not I*/oligo-dT de secuencia: 5'- d(AACTGGAAGAATTC GCGGCCGCAGGAA(T)₁₈) -3'. La región subrayada en la secuencia representa el sitio de corte de la endonucleasa de restricción *Not I*. La mezcla de reacción se incubó a 45 °C durante 1 h en un termociclador *Perkin Elmer*. El resultando de esta primera reacción son moléculas híbridas de RNA/cDNA.

3.9.2 Síntesis de la segunda cadena de DNA complementario

En la segunda reacción la enzima RNasa H mella el RNA en las moléculas híbridas RNA/cDNA, y la DNA polimerasa I utiliza estas mellas como cebadores para sintetizar la cadena complementaria de cDNA.

A la reacción resultante de la síntesis de la primera cadena aproximadamente igual a 33 µl, se añadió el tampón de reacción de síntesis de la segunda cadena, y se incubó a 12 °C durante 30 min, y luego a 22 °C durante 1 h. en un termociclador *Perkin Elmer*. Seguidamente las enzimas se inactivaron incubando la reacción a 65 °C durante 10 min y posteriormente se dejaron enfriar a temperatura ambiente.

3.9.3 Purificación de cDNA

Las moléculas de cDNA sintetizadas se purificaron en columnas de cromatografía de exclusión molecular, compuestas de Sepharosa *CL-4B*.

La reacción resultante de la segunda síntesis de cDNA se mezcló con 100 µl de F/Clf/I, y se agitó en un agitador tipo vortex por 15 seg, y se centrifugó a 13.000 x g, 2 min. La fase acuosa resultante se aplicó en la columna de Sepharosa previamente equilibrada por tres veces con 2 ml de OPA 1X (*Pharmacia*). Se centrifugó a 400 x g. durante 2 min. y el eluido resultante conteniendo las moléculas de cDNA de alto peso molecular se recuperó en un tubo de 1.5 ml.

3.9.4 Producción de extremos cohesivos *Eco* RI y *Not* I

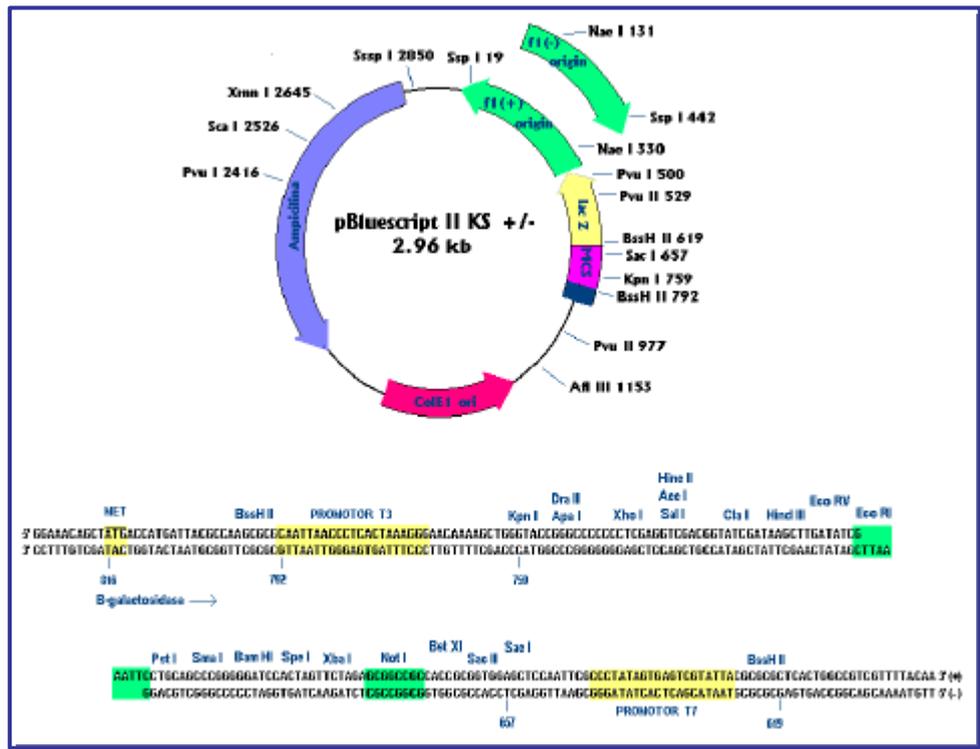
Para garantizar un clonaje direccional en los sitios *Eco* RI y *Not* I del vector pBS KS usado en la construcción de la genoteca, se añadió a las moléculas de cDNA un adaptador con extremo cohesivo 5', correspondiente a la diana *Eco* RI, cuya secuencia es:



Para ello, al eluido (100 µl) obtenido en el proceso de purificación se añadió 2 µl del adaptador *Eco* RI (0.01 A₂₆₀ U/µl.), 1 µl de solución de ATP 15 mM y 1 µl de T4 DNA ligasa, luego se centrifugó a 13.000 x g, 2 seg. para asegurar una mezcla homogénea, y se incubó a 16 °C durante 1 h. Después de este tiempo la ligasa se inactivó incubando la reacción a 65 °C durante 10 min, y se dejó enfriar a temperatura ambiente. A continuación se añadió a la reacción 1.5 µl de solución de ATP 75 mM y 1 µl de T4 PNK, para fosforilar los dos extremos de las moléculas de cDNA. Esta preparación se mezcló con cuidado y se incubó a 37 °C durante 30 min. La T4 PNK también se inactivó de la misma manera que la ligasa. Luego se añadió a la reacción 1 µl de *Not* I (20 U) y 3.3 µl de NaCl 5M, se mezcló e incubó a 37 °C durante 2 h, con la finalidad de crear un extremo cohesivo *Not* I en el lado 3' de las moléculas de cDNA, dejando que

la enzima actúe cortando la diana *Not* I del cebador *Not* I/oligo-dT₁₈. Luego la enzima se inactivó de la misma manera que la ligasa y la T4 PNK, y a continuación se realizó una segunda purificación de las moléculas de cDNA en una columna de Sepharosa, siguiendo el proceso de purificación descrito en el apartado 3.9.3. Por último el volumen final del eluido se ajustó hasta 150 µl con OPA 1X y se conservó a 4 °C.

3.9.5 Preparación del vector de clonaje



Esquema 9. Mapa de restricción del vector pBluescript KS +/-

Para realizar el clonaje direccional de los fragmentos de cDNA en el sitio *Eco* RI/*Not* I del vector pBluescript KS (pBS KS, *Stratagene*), se partió de 5 µg de este plásmido, que se digirieron con 36 U de la enzima *Not* I y con 80 U de *Eco* RI a 37 °C durante 3h.

Después de comprobar mediante electroforesis, que la digestión fue completa, este digesto pBS KS/*NotI/EcoRI* se purificó utilizando el Kit “High Pure PCR Product Purification Kit” (*Boehringer Mannheim*). El fundamento del Kit consiste en la unión del DNA a fibras de vidrio en presencia de sales caotrópicas, eliminándose fragmentos de DNA pequeños y proteínas. La elución del DNA plasmídico recombinante se realizó con ddH₂O precalentada a 65 °C. Las características del vector pBS KS se muestran en el esquema 9.

3.10 PREPARACIÓN Y TRANSFORMACIÓN DE CÉLULAS BACTERIANAS COMPETENTES

Tanto para la preparación de células competentes, como para su transformación con DNA se siguió el método de calcio/rubidio descrito por Hanahan,⁷⁴ con ciertas modificaciones.

Una colonia bacteriana se inoculó en 5 ml de LB, y después de 12 h. de incubación a 37 °C, este cultivo se utilizó para inocular 100 ml de LB precalentado a 37 °C, el cual se incubó a la misma temperatura, con agitación vigorosa, hasta alcanzar una $A_{550} = 0.48$. El cultivo así obtenido, se mantuvo en agua/hielo durante 5 min, y luego las células se recogieron mediante centrifugación a 1.000 x g, 5 min a 4 °C. Las células se resuspendieron en 30 ml de tampón TFB1 frío (RbCl₂ 78 mM, MnCl₂ 50 mM, CaCl₂ 10 mM, acetato potásico 30 mM, glicerol 15 % (v/v); pH 5.8), y se incubaron en agua/hielo durante 30 min, luego se recogieron mediante centrifugación a 1.000 x g, 5 min a 4 °C, y se resuspendieron suavemente en 4 ml de tampón TFB2 frío (RbCl₂ 7.8 mM, CaCl₂ 76 mM, glicerol 15 % (v/v), MOPS 0.2 % (p/v); pH 7). La suspensión de células competentes resultante se fraccionó en alícuotas de 200 µl, en tubos de 1.5 ml estériles (tubos Eppendorf) que se conservaron a -80 °C durante un tiempo mínimo de 24 h, y máximo de 6 meses antes de ser usadas.

⁷⁴ Hanahan D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.*, 166, 557.

Para llevar a cabo la transformación de *E. coli*, las células bacterianas competentes congeladas se mantuvieron a temperatura ambiente hasta que la suspensión pase al estado líquido, seguidamente se incubaron en agua/hielo durante 10 min. A los 200 µl de suspensión celular se le añadió el DNA con el que se pretendió transformar (una concentración máxima de 0.1 mg o 0.3 mg en caso de una mezcla de ligación), en un volumen de 10 a 50 µl, y se mantuvo en agua/hielo durante 20 min. A continuación la mezcla se incubó a 37 °C durante 2 min y nuevamente se mantuvo en agua/hielo durante 2 min. Tras este enfriamiento se añadieron 4 vol. de medio LB a temperatura ambiente, y se incubó con agitación suave a 37 °C durante 40 a 60 min. Por último las células se recogieron mediante centrifugación a 13.000 x g, 15 seg, se resuspendieron suavemente en un volumen variable de ddH₂O estéril y se sembraron alícuotas de 50 ó 100 µl de esta suspensión en medio LB-Amp sólido.

Para introducir los DNA recombinantes de pBS/cDNA en bacterias, se utilizaron células ultracompetentes XL2-Blue MRF' de la casa *Pharmacia*, siguiendo las instrucciones del fabricante.

3.11 SELECCIÓN DE CLONES cDNA DE *Leishmania* CON SUEROS DE PACIENTES CON LEISHMANIASIS

La expresión de los fragmentos de cDNA de *Leishmania* clonados en el gen *Lac Z* del vector pBS KS en *E. coli*, se indujo para identificar clones de cDNA que expresen proteínas antigénicas capaces de ser reconocidas por anticuerpos desarrollados en pacientes que padecen leishmaniasis. Los sueros de estos pacientes, se preabsorvieron con proteínas de varias cepas de *E. coli* unidas a agarosa (Sigma), siguiendo las instrucciones del fabricante, con el fin de bajar el título de anticuerpos contra proteínas de *E. coli* con relación al título de anticuerpos contra proteínas de *Leishmania* presentes en los sueros. Mediante una reacción específica antígeno anticuerpo, que se detecta indirectamente con un segundo anticuerpo marcado enzimáticamente, visualizamos y seleccionamos los clones que expresaron proteínas antigénicas.

La genoteca de expresión se diluyó hasta obtener colonias separadas por placa de LB-Amp-Tc. Luego se sembraron en varias placas y se incubaron a 37 °C durante 12 h. Seguidamente se realizaron réplicas mediante transferencia de las colonias a membranas de nitrocelulosa libres de tritón (Sigma). Estas colonias así transferidas se indujeron con IPTG 1 mM, colocando los filtros con las colonias dirigidas hacia arriba, en medio LB-Amp-IPTG sólido, y se incubaron a 37 °C durante 10 h. Las colonias a partir de las cuales se hicieron la replicas también se incubaron a 37 °C durante 2 h. para regenerarlas. Finalizada la inducción de las colonias bacterianas, éstas se sometieron a dos tratamientos líticos sucesivos, primero por inmersión de los filtros en cloroformo durante 1 min, los cuales se secaron a 37 °C durante 5 min, y segundo, los filtros se incubaron en solución de lisis (Tris-HCl 100 mM pH 7.8, NaCl 150 mM, MgCl₂ 5 mM, BSA 1.5 % (p/v), DNAsa I 1 µg/ml, lisozima 40 µg/ml) con agitación, durante 12 h. a temperatura ambiente. A continuación los filtros se lavaron agitando por tres veces consecutivas con tampón TNT (Tris-HCl 10 mM pH 8, NaCl 150 mM, Tween-20 al 0.05% (v/v)) durando 30 min cada lavado. Los filtros limpios de restos celulares y de ácidos nucleicos se incubaron en tampón de bloqueo (TNT conteniendo BSA 3 % (p/v) y leche desnatada 5 % (p/v)) durante 2 h, y se lavaron con agitación por dos veces en TNT. Seguidamente, se procedió a la identificación de colonias productoras de proteínas antigénicas, mediante incubación de los filtros en tampón de bloqueo conteniendo una mezcla de sueros (preabsorvidos con proteínas de *E.coli*), con agitación durante 2 h. Tras esta incubación, los filtros se lavaron tres veces con agitación, de manera intercalada con tampón TNT conteniendo BSA 3 % (p/v) y NP-40 0.1 % (p/v) durando 15 min cada lavado. Para detectar la reacción antígeno-anticuerpo, se utilizó un segundo anticuerpo anti-IgG marcado con fosfatasa alcalina (*Boehringer Mannheim*), por lo que, los filtros se incubaron con agitación en tampón de bloqueo conteniendo el segundo anticuerpo durante 2 h. Seguidamente los filtros se lavaron por tres veces como en los casos anteriores. A continuación estos filtros se incubaron sin agitación en tampón de revelado (Tris-HCl 100 mM pH 9.5, NaCl 100 mM, MgCl₂ 5 mM), al que se añadió previamente justo antes de usar, el sustrato de la enzima, BCIP (5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato) en combinación

con NBT (azul de tetrazolium). La reacción enzima-substrato se visualizó por el desarrollo de color.

3.12 CONFIRMACIÓN DE CLONES POSITIVOS MEDIANTE DOT-BLOT

Se inoculó una colonia previamente seleccionada con sueros, en 2 ml de medio de cultivo líquido LB-Amp-Tc y se incubó a 37 °C durante 16 h. Seguidamente se separó un alícuota de 1.5 ml de este cultivo y se guardó a 4 °C, mientras que el alícuota restante (0.5 ml) se centrifugó a 10.000 x g, 2 min. El precipitado celular se resuspendió suavemente en 0.5 ml de LB-Amp conteniendo IPTG hasta una concentración final de 1 mM, luego se completó el volumen hasta 2 ml añadiendo 1.5 ml de este mismo medio, y se incubó a 37 °C durante 10 h, de esta manera se indujo la producción de polipéptidos.

Tras la inducción el cultivo se centrifugó a 10.000 x g por 2 min. y las células precipitadas se resuspendieron en 50 µl de medio LB. Cinco microlitros de esta resuspensión se colocó sobre un filtro de nitrocelulosa libre de tritón y se dejó secar a temperatura ambiente durante 10 min. A continuación las colonias así colocadas en los filtros, se sometieron a lisis y detección inmunológica de la misma manera como se describió en el apartado anterior.

3.13 SELECCIÓN DE CLONES cDNA MEDIANTE HIBRIDACIÓN CON SONDAS DE DNA

La genoteca de expresión de *Leishmania*, se diluyó hasta obtener colonias separadas por placa de LB-Amp-Tc. Se sembró 100 µl de la dilución en varias placas y se dejaron crecer incubando a 37 °C durante 12h. Las colonias así crecidas se transfirieron a membranas de nylon (*Boehringer Mannheim*) y seguidamente se trataron con distintas soluciones en el orden siguiente: solución SDS

al 10% durante 10 min, solución desnaturizante (NaOH 0.5 M, NaCl 1.5 M) durante 5 min, solución neutralizante (Tris-HCl 0.5 M pH 7.4, NaCl 1.5 M) durante 5 min, dos veces, y solución SSC 2 X (Sol. Madre 20 X: NaCl 3 M, citrato sódico 0.3M pH 7.0) durante 15 min. El tratamiento con estas soluciones se realizó colocando las membranas con las colonias hacia arriba sobre papel 3MM humedecido con la solución respectiva. Tras este tratamiento los ácidos nucleicos presentes en las bacterias quedaron liberadas, por cuanto luego se fijaron a 80 °C durante 30 min.

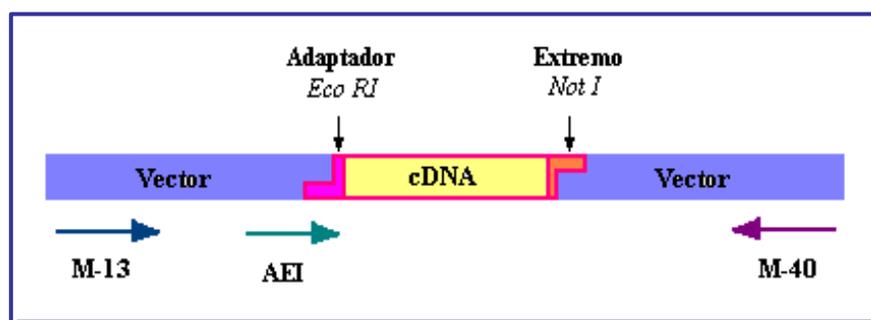
Los procesos de bloqueo de membrana, hibridación de la sonda y lavados de ésta, se realizaron en un horno de hibridación Hybridiser modelo HB-2D de marca *Techne*. El bloqueo se realizó durante 1 h a 68 °C con 10 ml. de solución de prehibridación (SSC 5 X, SDS 0.02 % (p/v), N-lauril sarcosina 0.1 % (p/v) y agente bloqueante (*Boehringer manheim*) 1 % (p/v)). La hibridación se realizó durante 16 h a 68 °C con 10 ml de solución de hibridación conteniendo los mismos componentes de la solución de prehibridación más 100 ng/ml de sonda de DNA marcada con digoxigenina recién desnaturizada a 95 °C durante 10 min. Finalizada la hibridación, la solución de hibridación se conservó a -20 °C para posteriores usos, y la membrana se sometió a dos lavados en condiciones de baja rigurosidad durante 5 min. a temperatura ambiente con 50 ml de SSC 2X, SDS 0.1 % (p/v), y dos lavados en condiciones de alta rigurosidad con 50 ml de SSC 0.1 X, SDS 0.1 %. La detección de los puntos de hibridación de la sonda se realizó con un anticuerpo antidigoxigenina conjugado con fosfatasa alcalina, usando como substrato NBT/BCIP (*Boehringer Manheim*) siguiendo las instrucciones del fabricante.

3.14 SECUENCIACIÓN DE DNA

El análisis de la secuencia de nucleótidos de los clones de cDNA identificados con sueros, se realizó mediante secuenciación cíclica automática basado en el método enzimático de los

dideoxinucleótidos de Sanger,⁷⁵ usando como cebadores los oligonucleótidos universales M-13 y M-40; asimismo se usó un cebador de secuencia complementaria al adaptador *Eco* RI. Estos oligonucleótidos se marcaron con carboxicianina en el extremo 5'. En el esquema 10, se intenta representar los sitios de unión de los cebadores utilizados en este proceso.

Las reacciones de secuenciación se realizaron utilizando los componentes de “ALFexpress™ AutoCycle™ Sequencing Kit” de *Pharmacia*, siguiendo las instrucciones del fabricante. Se partió de 1 a 2 µg de DNA molde, las reacciones de secuenciación se llevaron a cabo en un termociclador modelo GeneAmp 9600 de marca *Perkin Elmer*. El producto de las reacciones de secuenciación se sometió a electroforesis bajo condiciones desnaturalizantes en gel de poliacrilamida (acrilamida/bisacrilamida 19/1 al 6 %, urea 7 M) en tampón TBE 0.6 X en un secuenciador automático “ALFexpress™ DNA Sequencer” de *Pharmacia*, aplicándose un potencial eléctrico constante de 25 W, a temperatura de 57 °C.



Esquema 10. Representación gráfica de los sitios de unión de los cebadores utilizados en la secuenciación de clones cDNA de *Leishmania braziliensis*.

⁷⁵ Sanger F., Nicklen S. and Coulson A.R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl. Acad. Sci. USA* 74, 5463.

3.15 PREPARACION Y MARCAJE DE SONDAS DE DNA

3.15.1 Marcaje radioactivo de DNA

Los fragmentos de DNA de cadena doble, se marcaron con ^{32}P mediante incorporación de $[\alpha^{32}\text{P}]\text{dCTP}$, utilizando una mezcla de cebadores de 6 nucleótidos de secuencia aleatoria, y los reactivos del Kit “rediprime DNA labelling system” (Amersham), siguiendo las instrucciones del fabricante.

La reacción de marcaje se realizó en un volumen final de 50 μl , conteniendo 100 ng de DNA molde y 50 μCi de $[\alpha^{32}\text{P}]\text{dCTP}$ con 1.9×10^9 cpm/ μg de actividad específica. El DNA se desnaturalizó a 95 °C durante 5 min, luego se colocó inmediatamente en hielo y se centrifugó a 13.000 x g, durante 5 seg. Una vez desnaturalizado el DNA se añadió a la reacción de marcaje y se incubó a 37 °C durante 10 min. La separación de la sonda marcada de los oligonucleótidos y la eliminación de la marca no incorporada se realizó mediante filtración en columnas de Sephadex G-50 previamente equilibradas con 5 ml de ddH₂O. La actividad específica de la sonda se midió en un contador de centelleo.

3.15.2 Marcaje no radioactivo de DNA

El marcaje no radiactivo de DNA se llevó a cabo por medio de la reacción de PCR, incorporando al azar deoxiuridin trifosfato (dUTP) marcado con digoxigenina.

Se partió de 36 ng de DNA, 100 pmol de cada cebador (sentido y antisentido). En esta mezcla de reacción se incorporó además, dNTPs (dCTP, dGTP 1 mM; dTTP 0.65 mM; dUTP 0.35mM), tampón de reacción 1X del Kit “DIG DNA Labeling Kit” (Boehringer mannheim), 5 U de Taq DNA polimerasa (Perkin Elmer) y ddH₂O hasta completar un volumen final de 100 μl . La reacción de PCR se llevó a cabo en un termociclador Perkin Elmer, incubando a temperaturas de:

94 °C por 1 min	}	30 ciclos
94 °C por 30 seg.		
72 °C por 1 min.		
72 °C por 7 min.		
4 °C por 5 min.		

3.16 ANÁLISIS DE ÁCIDOS NUCLEICOS TRANSFERIDOS A SOPORTES SÓLIDOS, MEDIANTE HIBRIDACIÓN CON SONDAS DE DNA

3.16.1 Southern blot

Este análisis se realizó sobre DNA genómico de *Leishmania*. Como primer paso el DNA se digirió completamente con las endonucleasas de restricción oportunas (3µg de DNA/digestión), durante 12 h a la temperatura adecuada. Tras la digestión las muestras se fraccionaron mediante electroforesis en geles de agarosa aplicando una diferencia de potencial constante de 2 V/cm. Seguidamente se realizó la depurinación incubando el gel en una solución de HCl 0.25 N con agitación durante 15 min, luego se neutralizó con NaOH 0.4 N durante 30 min. Después de este tratamiento, los fragmentos de restricción se transfirieron a membranas de nylon cargadas positivamente (*Boheringer Mannheim*) mediante transferencia capilar descendente⁷⁶ en condiciones alcalinas (solución de transferencia: NaOH 0.4 N). Tras el proceso de transferencia, las membranas se neutralizaron y se lavaron en SSC 2 X (sol. madre 20 X: NaCl 3M y citrato sódico 0.3 M pH 7.0), Tris-HCl 0.5 M pH 7.5, con agitación durante 20 min. La membrana se colocó entre 2 papeles 3MM y se secó a 120°C por 10 min.

Los procesos de bloqueo de membrana, hibridación de la sonda y lavados de esta en las condiciones de rigurosidad adecuadas se

⁷⁶ Chomczynski P. (1992) One-hour downward alkaline capillary transfer for blotting of DNA and RNA. *Annal. Biochem.* 201, 134.

realizaron en un horno de hibridación, Hybridiser modelo HB-2D de marca Techne. El bloqueo se realizó durante 1 h. con 20 ml de solución de prehibridación (SSC 5X, 10 mM NaPO₄ (pH 6.5), Denhardt's 5X, SDS 0.02 % (p/v)) a 42°C. La hibridación se realizó durante 16 h con 10 ml de solución de hibridación, conteniendo los mismos componentes de la solución de prehibridación más la sonda recién desnaturalizada (95 °C por 10 min) y 100 µg/ml de DNA de esperma de salmón, durante 12 h, a la misma temperatura del lavado en condiciones de alta rigurosidad. Finalizada la hibridación, la solución de hibridación se conservó a -20 °C para posteriores usos, y la membrana se sometió a dos lavados en condiciones de baja rigurosidad durante 5 min a temperatura ambiente con 50 ml de SSC 2X, SDS 0.1 % (p/v), y dos lavados en condiciones de alta rigurosidad. La posición de las bandas de hibridación en la membrana se reveló por autoradiografía.

3.16.2 Northern blot

Este tipo de análisis se realizó sobre RNA total de promastigotes de *Leishmania* en fase logarítmica. Se partió de 5 µg de RNA total que se fraccionaron mediante electroforesis, en condiciones desnaturalizantes en geles de agarosa-formaldehído como se describió en el apartado 3.6. A continuación el RNA fraccionado se transfirió a un soporte sólido (membrana de nylon de *Boehringer Mannheim*), siguiendo el procedimiento descrito en el apartado 3.16.1. Después de la transferencia, las membranas se lavaron en SSC 2X, y se secaron a temperatura ambiente durante 5 minutos, y luego a 80 °C durante 2h. La hibridación se realizó frente a una sonda de DNA siguiendo el mismo procedimiento del apartado anterior y luego se reveló por autoradiografía.

3.17 ANÁLISIS DE LOS CROMOSOMAS MEDIANTE ELECTROFORÉISIS DE CAMPO PULSADO, TRANSFERENCIA A SOPORTES SÓLIDOS, E HIBRIDACIÓN CON SONDAS DE DNA

El fraccionamiento de los cromosomas en los tripanosomátidos en función de su tamaño se realiza mediante electroforesis en campo pulsado (PFGE).⁷⁷ Esta técnica se basa en la aplicación de pulsos de campos eléctricos de dirección variable sobre el DNA, en primer lugar los parásitos son sometidos a tratamiento especial para liberar los cromosomas intactos, el cual se realiza dentro de bloques de agarosa, y en segundo lugar estos cromosomas son separados mediante PFGE y transferidos a un soporte sólido. La localización de una secuencia génica de interés, se determina mediante hibridación con una sonda.

Se partió de 8×10^7 promastigotes de *Leishmania* por bloque a preparar, procedentes de un cultivo fresco en fase exponencial de crecimiento, recogidos mediante centrifugación a $3.000 \times g$, 15 min a 4°C , lavados tres veces con 10 ml de PBS frío y resuspendidos en un volumen de PBS equivalente a 0.3 ml por cada bloque. Seguidamente se añadió un volumen igual de una solución de agarosa de bajo punto de fusión (“low-melting” de *Bio-Rad*) al 1.2 % (p/v) en PBS, la cual se fundió previamente y se enfrió a 40°C . Los promastigotes así preparados se transfirieron a los moldes hasta un volumen de 0.6 ml/molde y se dejó que los bloques alcanzaran el estado semisólido a temperatura ambiente. A continuación se desmontaron los moldes con cuidado, se tomaron los bloques con una espátula y se incubaron en 16 ml de solución de lisis (EDTA 500 mM pH 9, N-Laurylsarcosina Na 1 % (p/v), Proteinasa K 1 mg/ml), durante 48 h, a 50°C . Tras la lisis, los bloques se lavaron con EDTA 200 mM pH 8, tres veces a temperatura ambiente durante 2 a 3 h cada lavado. Los bloques así preparados se conservaron a 4°C hasta el momento de su uso. Por otro lado, se preparó un gel de agarosa al 1 % en tampón TBE 0.5X. Seguidamente los bloques conteniendo las muestras se

⁷⁷ Schwartz P. and Cantor C.R. (1984). Separation of yeast chromosome-sized DNAs by pulsed field gradient gel electrophoresis. *Cell*. 37, 67.

fragmentaron en tamaños similares al de los pocillos del gel, se colocaron dentro de estos pocillos y se sellaron con la misma agarosa. Una vez cargadas las muestras se sometieron a electroforesis a 14 °C, bajo un sistema de voltaje constante de 120 V, 210 mA, y con el sistema de inversión del campo eléctrico siguiente:

75 seg.	N/S-E/W	28 h.
100 seg.	N/S-E/W	18 h.
200 seg.	N/S-E/W	18 h.
250 seg.	N/S-E/W	0 h.

Después de la electroforesis se realizó la transferencia a una membrana de nylon durante 26 h. con SSC 10x y la hibridación con sonda de DNA, como se ha descrito anteriormente en el apartado 2.16.1. La membrana se reveló por autoradiografía.

Capítulo 4
RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 PUESTA A PUNTO DE UN MÉTODO DE EXTRACCIÓN DE RNA TOTAL DE *Leishmania braziliensis* MHOM/PE/95/LQ8

La extracción de RNA total de alta pureza y calidad, a partir de promastigotes de *Leishmania*, se consideró importante para el aislamiento de RNA poliadenilado requerido en la construcción de una genoteca de expresión. Actualmente existen métodos o técnicas en biología molecular que permiten el aislamiento de RNA total de buena calidad de tripanosomátidos, pero son procesos tediosos que requieren período de tiempos largos, debido a que implican el desarrollo de varias etapas.^{72,78,79} En este entender la búsqueda de métodos simplificados es constante. En el presente trabajo se adaptó y puso a punto un método de extracción de RNA total descrito para levaduras,⁷⁰ el cual se aplicó eficientemente a promastigotes de *Leishmania* con algunas modificaciones. El método consiste en un tratamiento simple de las células con detergente iónico SDS y fenol ácido caliente (apartado 3.3.2) para conseguir la solubilidad del RNA en la fase acuosa, dejando el DNA y demás restos celulares retenidos en la interfase debido al pH ácido del fenol y a la temperatura elevada.

Las preparaciones de RNA obtenidos con éste método se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1 % (figura 1), en el cual se observaron 3 bandas discretas correspondientes a los RNA ribosomales, rRNA 24S α , rRNA 24S β y rRNA 18S, características de los tripanosomátidos⁸⁰, y no se observó DNA cromosómico contaminante. El rendimiento se determinó mediante espectrofotometría resultando 4.2 mg de RNA

⁷⁸ Chomczynski P. and Sacchi N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate – phenol –chloroform extraction. *Analytical Biochemistry*. 162, 156.

⁷⁹ Yancopoulos G.D. and Alt F. (1990). Preparation of cytoplasmic RNA. En: *Methods for cloning analysis of eukariotic genes*. (Bothwell A., Yancopoulos G.D. and Alt F. ed.). Jones and Bartlett Publisher, pp 18. Boston.

⁸⁰ Thomas M.C., Cano F.A., Moro A., García S.J.A. y González A. (1993). *Biología Molecular de los Tripanosomátidos*. En: *Parasitología Molecular* (Rivas L.L. y López M.C. ed.). CSIC. Madrid.

total a partir de 10^9 promastigotes de *Leishmania*; en cambio, cuando se trabajó con cantidades superiores a la cantidad indicada de promastigotes, no se consiguió la pureza deseada del RNA.

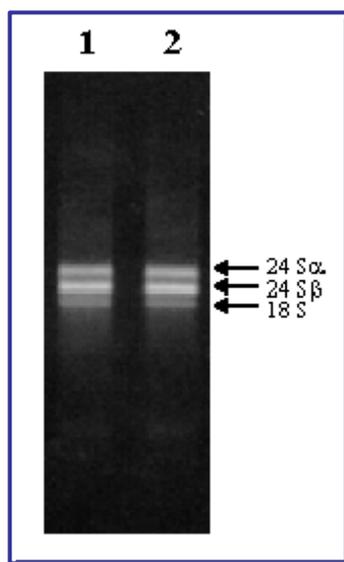


Figura 1. RNA total de promastigotes de *Leishmania*. Análisis mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% teñido con BrEt al 0.05 %.

Se muestran los rRNAs característicos, 24S α , 24S β y 18S.

Carril 1, 0.75 μ g de RNA

Carril 2, 1.0 μ g de RNA.

Mediante la reacción de RT-PCR (apartado 3.8) se analizó la integridad del RNA, para lo cual se utilizaron dos cebadores, que son el KMP-S de secuencia 5'-ATGGCCACCACGTACGAGGAG-3' y el KMP-AS de secuencia 5'-GGACGGGTACTGCGCAGCCTT-3', diseñados para amplificar el ORF del gen que codifica para la proteína KMP-11 de *Leishmania infantum*.⁸¹ Como control de la reacción se amplificó una mezcla de reactivos carente de RNA y DNA. Los productos de la reacción se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% (figura 2). En la muestra

⁸¹ Bereberich C., Requena J.M. and Alonso C. (1997). Cloning of genes and expression and antigenicity analysis of the *Leishmania infantum* KMP-11 protein. *Exp. Parasitol.* 85, 105.

problema se observó el producto de amplificación correspondiente a 273 pb, lo cual coincide con el tamaño esperado del gen KMP-11 de *Leishmania braziliensis*, dado que, el tamaño de este gen es similar en ambas especies.⁸² Cabe indicar además, que no se observó ningún producto de amplificación en la muestra control. Por lo tanto, la adaptación del método de extracción y las variaciones realizadas en este trabajo, son válidas y eficaces para obtener RNA de alta calidad.

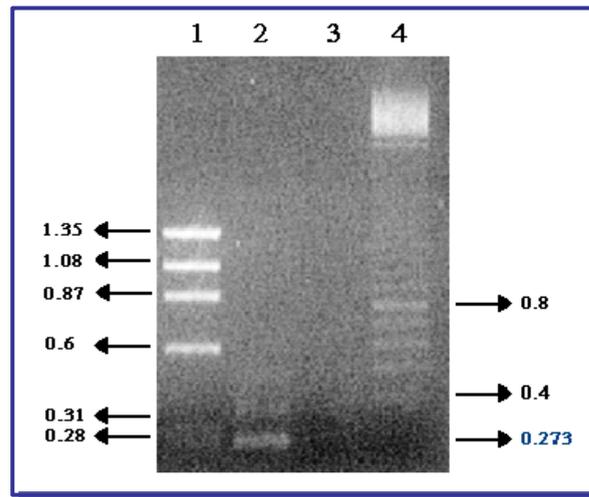


Figura 2. RT-PCR. Electroforesis en gel de agarosa al 1% teñido con BrEt al 0.05 %. Se muestra el producto de amplificación de 273 pb correspondiente al gen KMP-11 de *L. braziliensis*.
 Carril 1, DNA del fago ϕ X174 digerido con *Hae* III
 Carril 2, Producto amplificado KMP-11.
 Carril 3, Control negativo
 Carril 4, marcador de peso molecular “100 base pair–Ladder”.

⁸² El gen KMP-11 de *Leishmania braziliensis* se clonó y secuenció en el Laboratorio de Parasitología de la Universidad de La Laguna. Datos no publicados.

4.2 CONSTRUCCIÓN DE UNA GENOTECA DE DNA COMPLEMENTARIO DE *Leishmania braziliensis* MHOM/PE/95/LQ8

A partir de 100 μg de RNA total obtenido de *Leishmania braziliensis* MOHM/PE/95/LQ8, se aislaron y purificaron 2.6 μg de RNA poli (A)⁺. Este valor se calculó por espectrofotometría. El RNA poli (A)⁺ se utilizó para generar moléculas de cDNA mediante reacciones de síntesis, catalizadas por una transcriptasa reversa y una DNA polimerasa I siguiendo la metodología descrita en el apartado 3.9. Los cDNAs obtenidos se purificaron mediante cromatografía de exclusión molecular siguiendo la metodología descrita en el apartado 3.9.3, en el que quedaron eliminadas las moléculas de cDNA menores de 400 pb.

Para la inserción direccional de los fragmentos de cDNA en el vector pBluescript, se crearon extremos cohesivos *Eco* RI 5' y *Not* I 3' en las moléculas de cDNA (apartado 3.9.4). Para obtener un número máximo de clones recombinantes, la relación óptima cDNA/vector en la reacción de ligación, quedó establecida en una relación de 5 μl /50 ng. Esta mezcla de ligación se utilizó para transformar células competentes de *E. Coli*, cepa XL2-Blue MRF'. De este proceso resultaron 14.000 clones transformantes, que son los constituyentes de la genoteca de expresión de *Leishmania braziliensis* cepa MHOM/PE/95/LQ8.

El porcentaje de clones portadores de insertos de cDNA, se estimó replicando 40 transformantes de la genoteca en medio de cultivo sólido LB-Amp conteniendo IPTG y X-gal. Este estudio demostró que el 55 % de las colonias presentaron interrupción del gen *lac Z* del plásmido (colonias blancas), y el resto de las colonias (45 %) no mostraron tal interrupción del gen *lac Z* (colonias azules y ligeramente azules), lo cual indicó que éstas no portaban insertos. No obstante, tras estudiar algunas colonias ligeramente azules elegidas al azar, mediante electroforesis de los plásmidos linealizados con *Eco* RI (figura 4), se determinó que el 33 % de estas colonias portaban insertos de cDNA. Por cuanto, resultó que el 70 % de los clones conformantes de la genoteca de expresión portan insertos.

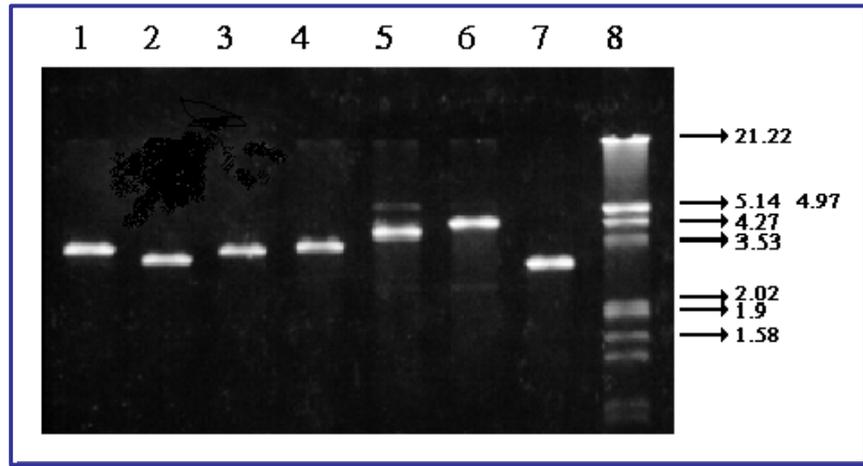


Figura 3. Análisis electroforético de plásmidos recombinantes obtenidos de colonias blancas y linealizados con *Eco* RI. Gel de agarosa al 0.9 %.
 Carril 1-6, Plásmidos linealizados portadores de insertos de cDNA.
 Carril 7, Plásmido control linealizado, pBS KS sin inserto
 Carril 8, DNA del fago λ digerido con *Hind* III y *Eco* RI.

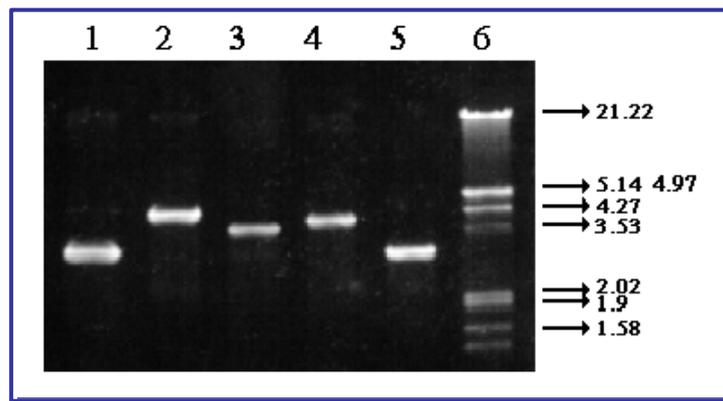


Figura 4. Análisis electroforético de plásmidos recombinantes obtenidos de colonias ligeramente azules y linealizados con *Eco* RI. Gel de agarosa al 0.9 %.
 Carril 2-4, Plásmidos linealizados portadores de insertos de cDNA
 Carril 1 y 5, Plásmido control linealizado pBS KS sin inserto.
 Carril 6, DNA del fago λ digerido con *Hind* III y *Eco* RI.

Asimismo, el análisis mediante linealización con *Eco RI* de los plásmidos portadores de inserto y electroforesis, demostró que los insertos de cDNA de las colonias conformantes de la genoteca de expresión (figura 3 y 4) tienen un tamaño superior a 1 kb en más del 50 % de las mismas

4.3 BÚSQUEDA DE CLONES cDNAs DE *Leishmania braziliensis* CODIFICANTES DE POLIPÉPTIDOS ANTIGÉNICOS

La genoteca de cDNA se diluyó hasta obtener aproximadamente 3.000 colonias por placa de LB-Amp-Tc, de esta manera se estudiaron alrededor de 18.000 colonias distribuidas en 6 placas. Para la selección de clones que expresaran polipéptidos antigénicos de *Leishmania braziliensis*, se realizó un inmunosondeo utilizando una combinación de 3 sueros de personas afectadas por leishmaniasis, de procedencia peruana. Estos sueros se seleccionaron de un conjunto de 100 sueros analizados mediante la técnica de ELISA, en el que presentaron los títulos de anticuerpos más altos frente a antígeno crudo de promastigotes de *Leishmania*. El inmunosondeo se llevó a cabo siguiendo la metodología descrita en el apartado 3.11, en el que la dilución utilizada de la combinación de sueros indicada anteriormente, tras ensayar una serie de diluciones (1/75, 1/150, 1/300, 1/600,..., 1/4800), quedó establecida en 1/300 (máxima dilución a la que se encontraron clones positivos), y la dilución del segundo anticuerpo se estableció en 1/10,000 según las recomendaciones del fabricante.

De este proceso se obtuvieron 6 clones positivos, los cuales se sometieron a un segundo inmunosondeo, realizando 5 réplicas de cada clon en medio sólido LB-Amp conteniendo IPTG 1mM. De esta manera se seleccionaron 2 clones positivos que se denominaron como C4LB y C8LB (Figura 5). Al mismo tiempo se realizaron otras 5 réplicas en el mismo medio pero conteniendo además X-gal, con el fin de ver que dichas réplicas presentaban interrupción del gen *lac Z* o por el contrario no lo presentaban, por cuanto, se obtuvo que las réplicas de los clones C4LB y C8LB si presentaron de manera clara

dicha interrupción (colonias blancas), en tanto que el resto de las réplicas se mostraron como colonias azules.

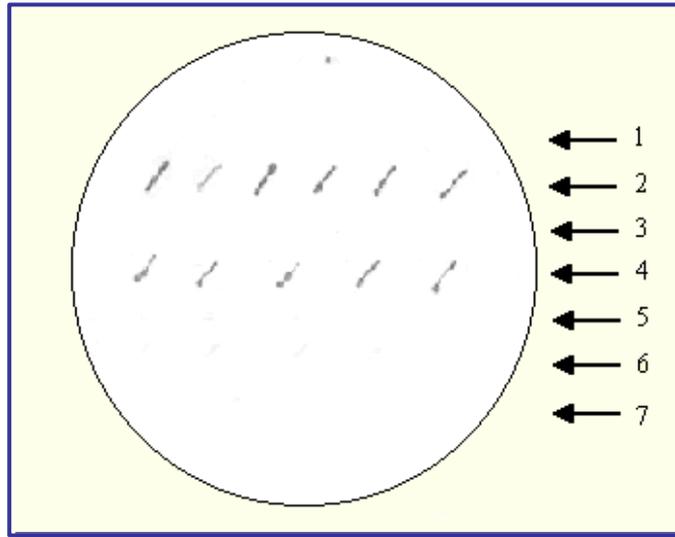


Figura 5. Clones seleccionados por inmunosondeo utilizando sueros de pacientes que padecen leishmaniasis.

- 1, Cinco réplicas de un clon conteniendo pBS KS sin inserto.
- 2, Cinco réplicas del clon C4LB.
- 4, Cinco réplicas del clon C8LB
- 3,5,6 y 7, Cinco réplicas de los cuatro clones restantes que no tuvieron reacción específica Ag-Ac.

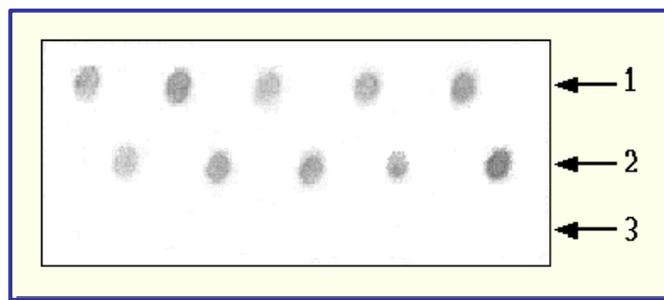


Figura 6. Dot-Blot. Inmunoensayo de los clones seleccionados con sueros de pacientes que padecen leishmaniasis.

- 1, 5 réplicas del clon C8LB.
- 2, 5 réplicas del clon C4LB.
- 3, 5 réplicas de un clon conteniendo pBS KS sin inserto.

Después de este último inmunosondeo se consideró conveniente realizar un nuevo ensayo basado en la técnica de Dot-Blot de acuerdo a lo descrito en el apartado 3.12, con el fin de confirmar los resultados indicados antes. Para ello se estudiaron 5 réplicas de los clones C4LB y C8LB. El resultado de este ensayo se presenta en la figura 6, donde se observa que los clones C4LB y C8LB son positivos.

Tras la selección de los clones positivos se estimó el tamaño de los insertos de cDNA codificantes de los polipéptidos antigénicos, mediante linealización de los plásmidos recombinantes con *Eco* RI, y análisis por electroforesis en geles de agarosa al 0.8 %. De este análisis se estimó que el clon C4LB porta un inserto de aproximadamente 1100 pb de longitud, y el clon C8LB porta un inserto de 550 pb de longitud aproximadamente. En la figura 7 se muestra el resultado de este análisis.

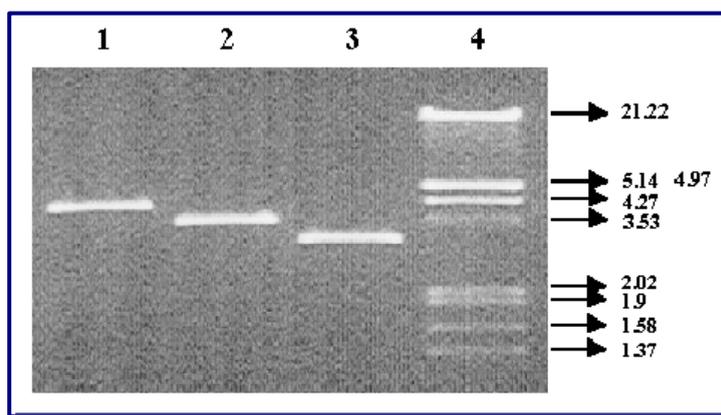


Figura 7. Análisis electroforético de los clones cDNA seleccionados por inmunosondeo en gel de agarosa al 0.8 % y digeridos con *Eco* RI.
Carril 1, Clon C4LB.
Carril 2, Clon C8LB.
Carril 3, pBS KS sin inserto.
Carril 4, DNA del fago Lambda digerido con *Hind* III y *Eco* RI.

4.4 SECUENCIACIÓN DEL CLON C8LB

El clon de C8LB se secuenció por el método de los didesoxinucleótidos de Sanger, como se indicó en el apartado 3.14. En las reacciones de secuenciación se utilizaron los cebadores universales, M-13 de secuencia: 5' -TTTCACACAGGAAACAGCTATGAC- 3' y M-40 de secuencia: 5' -CGCCAGGGTTTCCAGTCACGAC- 3'. El cebador M-13 hibrida 100 pb corriente abajo del sitio de clonación *Not* I del vector pBS KS, y el cebador M-40 hibrida 100 pb corriente arriba del sitio de clonaje *Eco* RI.

ATG	ACC	ATG	ATT	ACG	CCA	AGC	TCG	AAA	TTA	30
ACC	CTC	ACT	AAA	GGG	AAC	AAA	AGC	TGG	GTA	60
CCG	GGC	CCC	CCC	TCG	AGG	TCG	ACG	GTA	TCG	90
ATA	AGC	TTG	ATA	TCG	AAT	TCG	GCA	CGA	GGC	120
CCG	ATG	AAG	TAT	AGC	GGC	GTC	CCC	ATC	CGC	150
CGC	ATC	GAC	TCC	CGT	TAC	GTG	ATC	GCC	ACG	180
AGC	ACC	AAG	GTC	GAT	ATC	TCC	AGC	GTT	GAC	210
ACG	TCG	TCC	ATC	ACC	CCT	GAG	GTG	TTT	CTG	240
CGC	CCC	AAG	GCG	GAG	AAG	CCG	ACC	AAG	TGC	270
GAA	GGA	GAC	TTC	ATG	GGT	GAC	AAG	CAA	AAG	300
GCT	AAG	GCG	GAG	AAG	GCT	GCC	AAG	AAA	ACC	330
TCC	AAG	GCG	GAG	AAG	AAG	ACC	GTC	GTG	TCG	360
GAC	GCG	CGC	GCC	CAG	CTG	CAG	AAG	AAG	ATC	390
GAC	GCC	GCT	CTC	GTC	GCG	GCC	ATC	AAG	AAG	420
GAC	GCT	CAG	GGT	AAG	GAG	AAG	GCC	GGC	TAC	450
CTG	CGC	TCT	GTC	TTC	ACA	GTG	AAG	CCG	GGT	480
GAT	GCG	CCG	CAC	CGC	TGG	AAC	TGG	TAA	GCA	510
CAT	GGC	GCC	CGG	CGC	GCC	CTC	GTA	GCG	CGT	540
ACT	GGT	GGC	ATA	GGT	TCG	CTA	ACT	GTA	CAG	570
CTC	CTC	ACC	AGA	GGA	GCG	GGG	CCA	AGT	GCA	600
CCA	TCT	GAC	GTG	CCT	GAT	CTG	CCT	CAT	GCT	630
CGT	TTC	TTG	GTG	TCT	TTC	TCG	GCA	TTT	TCT	660
TTC	TCA	TTT	TCA	AAA	AAA	AAA	AAA	AAA	AAA	690

Figura 8. Secuencia de nucleótidos del clon C8LB. Se muestra la secuencia del inserto cDNA (azul), el codón de iniciación ATG del gen *lacZ* del vector pBS KS (púrpura), y el codón de terminación TAA de la proteína de fusión *lacZ*-cDNA (rojo). La secuencia de color verde corresponde al adaptador *Eco* RI.

Asimismo, se utilizó el oligonucleótido AEI de secuencia: 5' -CGTTGATATCGAATTCG- 3', cuyo extremo 3' es complementario a la secuencia del adaptador *Eco* RI utilizado en la construcción de la genoteca de expresión.

En la figura 8 se muestra la secuencia de nucleótidos obtenida. Esta secuencia muestra que el cDNA es de longitud incompleta debido a la ausencia de la secuencia SL característica de los mRNAs maduros de los tripanosomátidos. Este cDNA presenta una pauta de lectura abierta, la cual es expresada como una proteína fusionada al polipéptido *lacZ* del vector pBluescript. Esta proteína de fusión consta de 167 aminoácidos, de los cuales los 40 primeros aminoácidos corresponden al producto traducido del gen *lac Z*, y los siguientes 129 aminoácidos al producto del fragmento cDNA (figura 8).

La pauta de lectura abierta correspondiente al fragmento cDNA del clon C8LB, se analizó mediante los programas informáticos FASTA y BLASTA, donde se encontró que la secuencia de aminoácidos codificada por este cDNA presenta homología con la secuencia de aminoácidos propuesta para dos histonas H1 de tripanosomátidos,^{83,84} y para la H1 de humanos.⁸⁵ En la tabla 1 se muestra los resultados de este análisis.

⁸³ Fasel N.J. Robyr D.C., Mauel J. and Glaser T.A. (1994). Identification of a histone H1-like gene expressed in *Leishmania major*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 62, 321.

⁸⁴ Aslund L., Carlsson L., Henriksson J. Rydaker M., Toro C.G., Galanti N. and Pettersson U. (1994). A gene family encoding heterogeneous histone H1 proteins in *Trypanosoma cruzi*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 65, 317.

⁸⁵ Wells D. and McBride C. (1989). A comprehensive compilation and alignment of histones and histone genes. *Nucleic. Acids. Res.* 17 (Suppl.), 311.

% S	% I	Comparación de la secuencia de aminoácidos del cDNA C8LB e histonas H1 de tripanosomátidos
30.6	27.4	<p>8 <i>PKKASP</i>KKASP<i>PKKAAP</i>KKAVAKKTPAKKTAKKPAV 42 . . 41 <i>PKAEKPTKCEGDFMGDKQKAKAEKSAK</i>TSKAEKK 75</p> <p>43 <i>KKPAAKKRAAP</i>KKKPAAAKKA<i>VTKSAK</i> 69 . : : 76 <i>TVVSDARAQLQKKIDAALVAAIKKDAQ</i> 102</p> <p>Homología entre la H1 de <i>T. cruzi</i> y la proteína codificada de C8LB</p>
41.4	39.0	<p>46 <i>KKVAKKPAKKVVKKPAKKVVKKPAKKVVKKAVKAVKK</i> 82 . . . 61 <i>KAKAEKSAK</i>TSKAEKKT<i>TVVSDARAQLQKKIDAALVA</i> 95</p> <p>83 <i>AVKK</i> 86 : 96 <i>AIKK</i> 99</p> <p>Homología entre la H1 de <i>L. major</i> y la proteína deducida de C8LB</p>
39.6	39.6	<p>145 <i>ATPKKSAK</i>TPKKAKKPA<i>AAATVTKK</i>VAKSPKKAKVA 18 . . . 60 <i>AKAEKSAK</i>TSKAEKKT<i>TVVSDARAQLQKKIDAALVA</i> 95</p> <p>181 <i>KPKKAAKSAKA</i> 192 . 96 <i>AIKKDAQGKEKA</i> 107</p> <p>Homología entre la H1 de <i>humanos</i> y la proteína deducida de C8LB</p>

Tabla 1. Análisis BLASTA del clon C8LB. Se muestra el porcentaje de similitud (% S) e identidad (% I) de la comparación de distintas histonas H1. En color rojo se representa la secuencia de aminoácidos de la H1 de *T. cruzi*, en color verde se muestra la secuencia de aminoácidos de la H1 de *L. major*, en color rosado la secuencia de aminoácidos de la H1 de humanos, y en color azul se muestra la secuencia de aminoácidos deducida del cDNA C8LB. Los números representan la posición de los aminoácidos.

% S	% I	Comparación de la secuencia de aminoácidos de las histonas H1
56.3	53.8	<p>4 AAVPPKKASPKKASPCKAAPPKAVAKKTPAKKTAKKPA 41 . . : . : </p> <p>8 AAVSAATTSPQKSS.RSSPKRAAVGKKTGAKKVAKKTF 44</p> <p>42 VKKPAAKKRAAPKKKPAAAKKAVTKSAKKHAAK..KAP 77 </p> <p>49 AKKVAKKPAKKVVKKP..AKKVKKPAKKVVKKAVKAV 80</p> <p>78 KKAVKKAPK 86 </p> <p>81 KKAVKKVVK 89</p> <p>Homología entre la H1 de <i>T. cruzi</i> y la H1 de <i>L. major</i></p>
44.3	44.3	<p>4 AAVPPKKASPCKASPCKAAPPKAVAKKTPAKKTAKKP 40 . . . </p> <p>134 AAKPKKAA.GGATPKKSAKTPKKAKKPAATVTTK 170</p> <p>41 AVKKPAAKKRAAPKKKPAAAKKAVTKSAKKHAAKKAP 77 . </p> <p>171 VAKSPKAKVAKPKKAAKSAKAVKPKAAKPKVVKPK 206</p> <p>78 KKAVKK 83 </p> <p>207 KAAPK 212</p> <p>Homología entre la H1 de <i>T. cruzi</i> y la H1 de humanos</p>
40.2	39.2	<p>8 AAVSAATTSPQKSSRSSPKRAAVGKKTGAKKVAKKTF 43 . . . : </p> <p>111 AASGEAKPKVKKAGGTPKK.PVGAAKPKKAAGGAT 145</p> <p>44 AKKVAKKPAKKVVKKPAKKVVKKPAKKVVKKAVKAVK 78 </p> <p>146 PKKSAKTPKKAKKPAATVTKKVAKSPKAKVAKPK 180</p> <p>79 KAVKKVVKAVKTAKKSSKKSSAKK 105 </p> <p>181 KAAKSAKAVKPKAAKPKVVKPKK 207</p> <p>Homología entre la H1 de <i>L. major</i> y la H1 de humanos</p>

Tabla 2. Análisis BLASTA de la histona H1 de *L. major*, *T. cruzi* y humano

Los resultados del BLASTA de la secuencia de aminoácidos de la proteína deducida del cDNA C8LB (tabla 1), muestra que el porcentaje de similitud e identidad entre esta proteína y la histona H1 de *L. major* es del 41.4 % y 39 % respectivamente. Los valores porcentuales homólogos entre la proteína codificada por el clon C8LB con la H1 de *T. cruzi* (%S = 30.6, %I = 27.4) y con la H1 de humanos (%S = 39.6, %I = 39.6), son relativamente más bajos (tabla 1). Ocurre lo contrario cuando se compara la H1 de *T. cruzi* con la de *L. major* (tabla 2), en la que se registra un alto porcentaje de similitud (56.3 %) y de identidad (53.8 %), mientras que comparadas estas dos con la de humanos, se registra valores porcentuales de homología más bajos, entre un 40.2 % a 44.3 % de similitud y un 39.2 % a 44.3 % de identidad (tabla 2).

Fasel y col.⁸³ en los estudios realizados en *L. major*, demostraron que la secuencia de aminoácidos deducida para la histona H1 en esta especie tiene una longitud de 105 aminoácidos y muestra una composición similar a la región de aminoácidos básicos de las proteínas histonas H1 en otros tripanosomátidos, así también, tiene similitud significativa con el extremo carboxi-terminal de la H1 de humanos, y carece del dominio hidrofóbico central característico de estas histonas H1 en eucariotas superiores. El gen codificante para esta histona H1 comprende dos elementos repetidos que codifican para dominios ricos en lisina. Los análisis informáticos mostraron una homología entre el 36 y el 45 % con las histonas H1 de *Sea urchin*, humano, ratón y pollo.⁸⁶ Sin embargo, las homologías encontradas no determinaron si el gen codificaba una proteína H1 o una proteína parecida a la H1,⁸⁶ por ello en un trabajo posterior demostraron las características bioquímicas e inmunocitoquímicas de la H1 y concluyeron que dicho gen codifica la H1 en *L. major*. Determinaron también que la regulación se produce a través de la diferenciación del parásito según las observaciones de acumulación del mRNA de la H1 y de la proteína misma en promastigotes como en amastigotes.⁸³

⁸⁶ Noll T.M., Desponds Ch., Belli S.I., Glaser T.A. and Fasel N.J. (1997). Histone H1 expression varies during the *Leishmania major* life cycle. *Mol. Biochem. Parasitol.* 84, 215.

En *T. cruzi* se ha encontrado más de 15 copias de genes que codifican diferentes polipéptidos de histona H1. Las secuencias de aminoácidos deducidas para las distintas H1, muestran amplias variaciones entre ellas; son polipéptidos excepcionalmente cortos (74 - 97 aa) con un valor pI que oscila entre 11.88 – 12.55, que corresponden al dominio C-terminal rico en lisina y prolina de otras histonas H1, y carecen completamente del dominio globular central.⁸⁴ Para los subtipos de histona H1 de este organismo se ha deducido una secuencia consenso correspondiente a 12 residuos de aminoácidos en la región N-terminal, 30 residuos en la región central y 16 aminoácidos en la región C-terminal.⁸⁴ Asimismo se ha observado en todos los subtipos de H1, varios sitios de fosforilación (1 – 3 copias de los dominios SPKK y TPAK), por cuanto, la fosforilación reversible puede regular la unión de estos subtipos de histona H1 al DNA en este organismo.⁸⁴

Tras la obtención de los primeros datos de homología entre la secuencia de aminoácidos deducida de la pauta de lectura abierta del clon C8LB con la de otros tripanosomátidos y la de humanos (tabla 1), se consideró importante el aislamiento del clon cDNA de longitud completa con el fin de estudiar el gen completo y la proteína codificada por dicho gen.

4.5 AISLAMIENTO DE UN CLON cDNA DE LONGITUD COMPLETA CODIFICANTE PARA LA HISTONA H1

Tras el resultado anterior, se consideró oportuno aislar cDNAs de longitud completa codificantes para posibles histonas H1 de *Leishmania braziliensis*. Por lo que, se realizó un segundo sondeo de la genoteca de expresión mediante hibridación de colonias, según lo descrito en el apartado 3.13, utilizando una sonda de DNA que consta de 393 pb de longitud, y corresponde a la región codificante de la H1 de *L. braziliensis* (figura 9). Esta sonda se marcó con digoxigenina mediante PCR, usando el plásmido C8LB como DNA molde, y los oligonucleótidos C8-S y C8-AS como cebadores, cuyas secuencias respectivas son: 5' -CCCGATGAAGTATAGCGGCGTCCCC-3' y 5' -TGTGCTTACCAGTTCAGCGGTGCG- 3'.

C	CCG	ATG	AAG	TAT	AGC	GGC	GTC	CCC	ATC	28
CGC	CGC	ATC	GAC	TCC	CGT	TAC	GTG	ATC	GCC	58
ACG	AGC	ACC	AAG	GTC	GAT	ATC	TCC	AGC	GTT	88
GAC	ACG	TCG	TCC	ATC	ACC	CCT	GAG	GTG	TTT	118
CTG	CGC	CCC	AAG	GCG	GAG	AAG	CCG	ACC	AAG	148
TGC	GAA	GGA	GAC	TTC	ATG	GGT	GAC	AAG	CAA	178
AAG	GCT	AAG	GCG	GAG	AAG	GCT	GCC	AAG	AAA	208
ACC	TCC	AAG	GCG	GAG	AAG	AAG	ACC	GTC	GTG	238
TCG	GAC	GCG	CGC	GCC	CAG	CTG	CAG	AAG	AAG	268
ATC	GAC	GCC	GCT	CTC	GTC	GCG	GCC	ATC	AAG	298
AAG	GAC	GCT	CAG	GGT	AAG	GAG	AAG	GCC	GGC	328
TAC	CTG	CGC	TCT	GTC	TTC	ACA	GTG	AAG	CCG	358
GGT	GAT	GCG	CCG	CAC	CGC	TGG	AAC	TGG	TAA	388
GCA	CA									393

Figura 9. Secuencia del producto de amplificación utilizado como sonda. Se muestra el sitio de unión de los cebadores C8-S y C8-AS (rojo). El producto de amplificación tiene 393 pb.

Los clones positivos detectados, se sometieron a una selección para determinar aquellos que portaran los cDNAs de longitud completa, mediante amplificación de un fragmento de DNA en reacción PCR conteniendo el cebador C8-AS descrito antes, y el cebador de secuencia 5' -AGGTATCAGTTTCTGTACTTTA- 3'. Este último oligonucleótido corresponde al extremo 3' de la secuencia SL de los mRNAs maduros de las especies de *Leishmania*.⁸⁷ Este análisis permitió la identificación de un cDNA de 815 pb de longitud denominado como **C8LB'**.

La secuencia de nucleótidos del cDNA C8LB' y la secuencia de aminoácidos deducida a partir de ésta, se muestra en la figura siguiente (figura10).

⁸⁷ Scholler J.K., Mc Ardle S., Reed S. and Karemoto R. (1989). Conservation of the 5' end of the medRNA in New World species of *Leishmania*. *Nucl. Acids. Res.* 17, 7999.

AT	CAG	TTT	CTG	TAC	TTT	ATT	GTC	ACT	CTG	GGT	TTC	35
ACA	CGA	GTT	TTT	TGT	AGA	ATG	GCC	GCC	ACC	AAG	TGC	71
						M	A	A	T	K	C	6
CCC	GCG	AAG	CGG	AAG	GTC	GCG	AAG	AAA	GTG	TCG	CGC	107
P	A	K	R	K	V	A	K	K	V	S	R	18
AAG	AGC	CCC	GAG	TAC	ACG	ACC	CTG	CGC	AAG	AGT	TGT	143
K	S	P	E	Y	T	T	L	R	K	S	C	30
GCC	CCT	GGC	GCC	ATC	GCG	ATC	ATC	CTT	GCC	GGC	CGC	179
A	P	G	A	I	A	I	I	L	A	G	R	42
TTT	CGC	GGT	CGC	CGC	GCC	GTG	ATC	CTG	AAG	CAG	CTG	215
F	R	G	R	R	A	V	I	L	K	Q	L	54
CCG	CAC	AAC	GGC	CCG	CTG	GTC	GTG	TCC	GGC	CCG	ATG	251
P	H	N	G	P	L	V	V	S	G	P	M	66
AAG	TAT	AGC	GGC	GTC	CCC	ATC	CGC	CGC	ATC	GAC	TCC	287
K	Y	S	G	V	P	I	R	R	I	D	S	78
CGT	TAC	GTG	ATC	GCC	ACG	AGC	ACC	AAG	GTC	GAT	ATC	323
R	Y	V	I	A	T	S	T	K	V	D	I	90
TCC	AGC	GTT	GAC	ACG	TCG	TCC	ATC	ACC	CCT	GAG	GTG	359
S	S	V	D	T	S	S	I	T	P	E	V	102
TTT	CTG	CGC	CCC	AAG	GCG	GAG	AAG	CCG	ACC	AAG	TGC	395
F	L	R	P	K	A	E	K	P	T	K	C	114
GAA	GGA	GAC	TTC	ATG	GGT	GAC	AAG	CAA	AAG	GCT	AAG	431
E	G	D	F	M	G	D	K	Q	K	A	K	126
GCG	GAG	AAG	TCT	GCC	AAG	AAA	ACC	TCC	AAG	GCG	GAG	467
A	E	K	S	A	K	K	T	S	K	A	E	138
AAG	AAG	ACC	GTC	GTG	TCG	GAC	GCG	CGC	GCC	CAG	CTG	503
K	K	T	V	V	S	D	A	R	A	Q	L	150
CAG	AAG	AAG	ATC	GAC	GCC	GCT	CTC	GTC	GCG	GCC	ATC	539
Q	K	K	I	D	A	A	L	V	A	A	I	162
AAG	AAG	GAC	GCT	CAG	GGT	AAG	GAG	AAG	GCC	GGC	TAC	575
K	K	D	A	Q	G	K	E	K	A	G	Y	174
CTG	CGC	TCT	GTC	TTC	ACA	GTG	AAG	CCG	GGT	GAT	GCG	611
L	R	S	V	F	T	V	K	P	G	D	A	186
CCG	CAC	CGC	TGG	AAC	TGG	TAA	GCA	CAT	GGC	GCC	CGG	647
P	H	R	W	N	W	*						192
CGC	GCC	CTC	GTA	GCG	CGT	ACT	GGT	GGC	ATA	GGT	TCG	683
CTA	ACT	GTA	CAG	CTC	CTC	ACC	AGA	GGA	GCG	GGG	CCA	719
AGT	GCA	CCA	TCT	GAC	GTG	CCT	GAT	CTG	CCT	CAT	GCT	755
CGT	TTC	TTG	GTG	TCT	TTC	TCG	GCA	TTT	TCT	TTC	TCA	791
TTT	TCA	AAA	AAA	AAA	AAA	AAA	AAA					815

Figura 10. Secuencia de nucleótidos del clon C8LB'. Se muestra la secuencia SL (verde), el tracto poli (A)⁺ (rojo), la caja T rica en timidinas (púrpura) y dinucleótidos AG (rosado). Asimismo el ORF codificante para la posible proteína H1 (azul).

4.6 ANÁLISIS BLASTA DEL CLON C8LB'

La proteína deducida a partir de la pauta de lectura abierta localizada entre los nucleótidos 54 y 632 del cDNA C8LB', consta de 192 aminoácidos (figura 10). El análisis BLASTA (tabla 3) realizado para el producto traducido de esta pauta, revela que tiene cierta homología con algunas proteínas ribosomales, y con las proteínas H1, tal y como se encontró en los primeros análisis realizados para la proteína deducida del ORF (C8LB) encontrada inicialmente.

Sequences producing High-scoring Segment Pairs:		High Score	Probability P(N)	Smallest Sum N
sp: <u>RL6_SCHPO</u>	60S RIBOSOMAL PROTEIN L6 (FRAGMENT).	128	5.2e-39	4
sp: <u>RL16A_YEAST</u>	60S RIBOSOMAL PROTEIN YL16A.	158	1.7e-38	3
sp: <u>RL16B_YEAST</u>	60S RIBOSOMAL PROTEIN YL16B.	153	5.8e-38	3
sp: <u>RL6_MESCR</u>	60S RIBOSOMAL PROTEIN L6 (YL16-LIKE).	152	4.8e-34	3
sp: <u>RL6_CAEEL</u>	PROBABLE 60S RIBOSOMAL PROTEIN L6.	218	4.3e-24	1
sp: <u>RL6_HUMAN</u>	60S RIBOSOMAL PROTEIN L6 (tax-responsi..	115	1.5e-22	3
sp: <u>RL6_MOUSE</u>	60S RIBOSOMAL PROTEIN L6 (tax-responsi..	116	2.0e-21	3
sp: <u>RL6_RAT</u>	60S RIBOSOMAL PROTEIN L6 (neoplasm-rel..	116	2.4e-21	3
sp: <u>H1D_HUMAN</u>	HISTONE H1D (H1.2).	67	0.00011	3
sp: <u>PHI3_MYTCA</u>	SPERM-SPECIFIC PROTEIN PHI-3 (PL-IV).	51	0.020	2
sp: <u>RL27_HUMAN</u>	60S RIBOSOMAL PROTEIN L27.	75	0.024	1
sp: <u>H12_MOUSE</u>	HISTONE H1.2 (H1 VAR.1) (H1C).	52	0.029	3
sp: <u>SKI3_YEAST</u>	SUPERKILLER 3 PROTEIN.	72	0.11	1
sp: <u>RL27_CAEEL</u>	60S RIBOSOMAL PROTEIN L27.	69	0.17	1
sp: <u>H5B_XENLA</u>	HISTONE H5B (XLH5B) (H1E) (H1-SB).	65	0.19	2
sp: <u>YX14_CAEEL</u>	HYPOTHETICAL 115.3 KD PROTEIN C03F11.4..	69	0.26	1
sp: <u>H5A_XENLA</u>	HISTONE H5A (XLH5A) (H1D) (H1-SA).	68	0.27	1
sp: <u>H1_TETTH</u>	HISTONE H1.	55	0.31	2
sp: <u>H1O_CHITH</u>	HISTONE H1, ORPHON.	64	0.35	2
sp: <u>H13_MOUSE</u>	HISTONE H1.3 (H1 VAR.4) (H1D).	59	0.39	2
sp: <u>CYL2_BOVIN</u>	CYCLICIN II (MULTIPLE-BAND POLYPEPTIDE II).	67	0.42	1
sp: <u>POLS_SFV</u>	STRUCTURAL POLYPROTEIN (CONTAINS: COAT...	67	0.45	1
sp: <u>NFM_HUMAN</u>	NEUROFILAMENT TRIPLET M PROTEIN (160KD...	64	0.49	2
sp: <u>H1E_CHITE</u>	HISTONE H1E.	63	0.54	2
sp: <u>RL33_BACST</u>	50S RIBOSOMAL PROTEIN L33.	55	0.57	1
sp: <u>KIME_METJA</u>	MEVALONATE KINASE (EC 2.7.1.36) (MK).	49	0.58	2
sp: <u>H15_MOUSE</u>	HISTONE H1.5 (H1 VAR.5) (H1B).	58	0.61	2
sp: <u>H1_ECHCR</u>	HISTONE H1, GONADAL (FRAGMENT).	49	0.66	2
sp: <u>H1_PARAN</u>	HISTONE H1, GONADAL.	60	0.68	2
sp: <u>RS4_SOLTU</u>	40S RIBOSOMAL PROTEIN S4.	48	0.72	2
sp: <u>H1C_CHITE</u>	HISTONE H1C.	61	0.73	2
sp: <u>ICAL_PIG</u>	CALPAIN INHIBITOR (CALPASTATIN).	44	0.75	5
sp: <u>H1_CHITH</u>	HISTONE H1.	56	0.75	2
sp: <u>H1A_CHITE</u>	HISTONE H1A.	61	0.75	2
sp: <u>TOLA_ECOLI</u>	TOLA PROTEIN.	64	0.76	1
sp: <u>RL24_HUMAN</u>	60S RIBOSOMAL PROTEIN L24.	63	0.77	1
sp: <u>RS8_YEAST</u>	40S RIBOSOMAL PROTEIN S8(S14)(YS9)(RP19).	63	0.81	1
sp: <u>H1C1_XENLA</u>	HISTONE H1C (CLONE XLHW2).	58	0.82	2
sp: <u>RS4_GOSHI</u>	40S RIBOSOMAL PROTEIN S4.	48	0.82	2
sp: <u>RL71_YEAST</u>	60S RIBOSOMAL PROTEIN YL8 (L6) (RP11).	63	0.83	1

sp: <u>H1B_CHITE</u>	HISTONE H1B.	60	0.85	2
sp: <u>Y694_METJA</u>	HYPOTHETICAL PROTEIN MJ0694.	63	0.86	1
sp: <u>H14_MOUSE</u>	HISTONE H1.4 (H1 VAR.2) (H1E).	50	0.86	3
sp: <u>H1B_HUMAN</u>	HISTONE H1B (H1.4).	47	0.86	3
sp: <u>SRPR_CANFA</u>	SIGNAL RECOGNITION PARTICLE RECEPTOR ...	63	0.87	1
sp: <u>SRPR_HUMAN</u>	SIGNAL RECOGNITION PARTICLE RECEPTOR ...	63	0.87	1
sp: <u>RL24_BACST</u>	50S RIBOSOMAL PROTEIN L24.	50	0.91	2
sp: <u>HMW2_MYCPN</u>	CYTADHERENCE HIGH MOLECULAR WEIGHT PROT..	64	0.91	2
sp: <u>CALD_CHICK</u>	CALDESMON (CDM).	62	0.94	1
sp: <u>CALD_HUMAN</u>	CALDESMON (CDM).	62	0.95	1
sp: <u>MAPB_HUMAN</u>	MICROTUBULE-ASSOCIATED PROTEIN 1B.	62	0.95	1
sp: <u>RL24_THETH</u>	50S RIBOSOMAL PROTEIN L24.	46	0.95	2
sp: <u>RL27_YEAST</u>	PROBABLE 60S RIBOSOMAL PROTEIN L27.	56	0.95	2
sp: <u>H1B_STRPU</u>	HISTONE H1-BETA, LATE EMBRYONIC.	61	0.96	1
sp: <u>TCOF_HUMAN</u>	TREACLE PROTEIN (TREACHER COLLINS SYND..	54	0.97	2
sp: <u>H5_ANSAN</u>	HISTONE H5.	45	0.97	2
sp: <u>H1_SALTR</u>	HISTONE H1.	57	0.97	2
sp: <u>RL27_PYRST</u>	60S RIBOSOMAL PROTEIN L27.	60	0.97	1
sp: <u>MST1_DROHY</u>	AXONEME-ASSOCIATED PROTEIN MST101(1).	61	0.97	1
sp: <u>YL17_CAEEL</u>	HYPOTHETICAL 131.5 KD PROTEIN C02F12.7..	65	0.98	2
sp: <u>EDC8_DAUCA</u>	EMBRYONIC PROTEIN DC8 (CLONE 8/10).	61	0.98	1
sp: <u>H1_MAIZE</u>	HISTONE H1.	53	0.98	2
sp: <u>RL3A_YEAST</u>	60S RIBOSOMAL PROTEIN L30A (RP29) (YL21).	60	0.98	1
sp: <u>UL52_HCMVA</u>	PROBABLE MAJOR ENVELOPE GLYCOPROTEIN UL..	45	0.98	3
sp: <u>H1_ONCMY</u>	HISTONE H1.	54	0.98	2
sp: <u>IGA_NEIGO</u>	IGA-SPECIFIC SERINE ENDOPEPTIDASE PREC..	61	0.98	1
sp: <u>M21_STRPY</u>	M PROTEIN, SEROTYPE 2.1 PRECURSOR.	48	0.99	3
sp: <u>H1A_HUMAN</u>	HISTONE H1A (H1.1).	52	0.99	2
sp: <u>H12_VOLCA</u>	HISTONE H1-II.	60	0.990	1
sp: <u>H5_CAIMO</u>	HISTONE H5.	45	0.992	2
sp: <u>H12_RAT</u>	HISTONE H1.2 (H1D).	48	0.993	3
sp: <u>SCA1_MOUSE</u>	ATAXIN-1 (SPINOCEREBELLAR ATAXIA TYPE...	60	0.996	1
sp: <u>MAZ4_SCHCO</u>	MATING-TYPE PROTEIN A-ALPHA Z4.	60	0.996	1
sp: <u>ATPE_METJA</u>	ATP SYNTHASE, SUBUNIT E (EC 3.6.1.34).	59	0.998	1
sp: <u>NFH_HUMAN</u>	NEUROFILAMENT TRIPLET H PROTEIN (200 ...	53	0.998	2
sp: <u>NEUM_HUMAN</u>	NEUROMODULIN (AXONAL MEMBRANE PROTEI ...	59	0.998	1
sp: <u>UPF3_YEAST</u>	NONSENSE-MEDIATED MRNA DECAY PROTEIN-...	59	0.9992	1
sp: <u>H2B1_CHLRE</u>	HISTONE H2B-I.	58	0.9995	1
sp: <u>H2B4_CHLRE</u>	HISTONE H2B-IV.	58	0.9995	1
sp: <u>RL24_KLULA</u>	60S RIBOSOMAL PROTEIN L24 (L30).	58	0.9995	1
sp: <u>MFD_BACSU</u>	TRANSCRIPTION-REPAIR COUPLING FACTOR.	59	0.9996	1
sp: <u>MYSG_CHICK</u>	MYOSIN HEAVY CHAIN, GIZZARD SMOOTH MUS..	59	0.9996	1
sp: <u>MST2_DROHY</u>	AXONEME-ASSOCIATED PROTEIN MST101(2).	59	0.9998	2
sp: <u>H11L_CHICK</u>	HISTONE H1.11L.	47	0.9998	2
sp: <u>H13_GLYBA</u>	HISTONE H1-III.	56	0.9999	2
sp: <u>B4_XENLA</u>	B4 PROTEIN (HISTONE H1-LIKE PROTEIN).	58	0.9999	1
sp: <u>H1_TETPY</u>	HISTONE H1.	46	0.99990	2
sp: <u>H2B_ARATH</u>	HISTONE H2B (FRAGMENT).	57	0.99990	1
sp: <u>H1E_CHIPA</u>	HISTONE H1E.	47	0.99991	2
sp: <u>SMY2_YEAST</u>	SMY2 PROTEIN.	44	0.99994	3
sp: <u>Y026_METJA</u>	HYPOTHETICAL PROTEIN MJ0026.	43	0.99995	3

Tabla 3. Análisis BLASTA del clon C8LB’.

Por otro lado, se realizó el análisis de homologías únicamente entre las proteínas ribosomales L6, resultando de ello, que dichas proteínas presentan un alto porcentaje de identidad alrededor del

70 %, debido a que son muy conservadas a lo largo de la evolución. A continuación se muestra un ejemplo de la homología encontrada entre dos proteínas ribosomales.



Figura 11. Homología entre la proteína ribosomal L6 de humanos (rojo) y L6 de rata (celeste). Idénticos = 231/287 (80%), Positivos = 231/287 (80%).

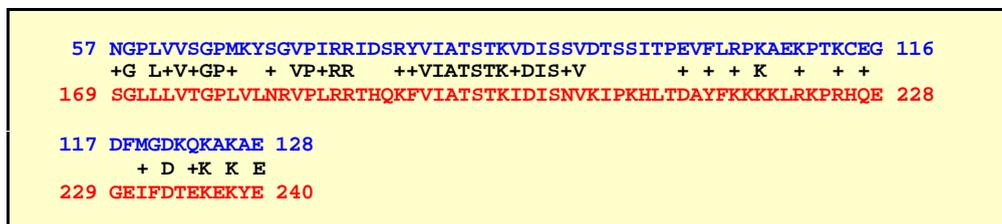


Figura 12. Homología entre la proteína ribosomal L6 de humanos (rojo) y la proteína deducida del clon C8LB' (azul). Idénticos = 25/72 (34%), positivos = 43/72 (59%).

Según los datos mostrados en las figuras 11 y 12, el porcentaje de homología entre la proteína deducida del clon **C8LB'** y la proteína ribosomal es muy bajo (34 %), si se compara con el porcentaje de

homología existente entre las proteínas ribosomales L6 (mayor al 70 %).

Las proteínas H1 tienen un alto grado de variabilidad inclusive dentro de la misma especie, por ejemplo, las distintas H1 reportadas en *T. cruzi* como se mencionó anteriormente. Dentro de este contexto los datos de porcentaje de similitud e identidad (Fig. 11 y 12), hace suponer que el producto de la pauta de lectura abierta del cDNA **C8LB'**, es una posible proteína H1 de *L. braziliensis*, no siendo una proteína ribosomal.

4.7 ANÁLISIS DE HOMOLOGÍA DE LA PROTEÍNA H1 DE *Leishmania braziliensis*

La familia de las histonas H1 se caracteriza por la gran variabilidad de su secuencia de aminoácidos; tal es el caso de las proteínas H1 descritas en *T. cruzi*, con más de 15 secuencias diferentes cuya homología sólo alcanza a unos pequeños dominios, existiendo grandes regiones en las que la secuencia de aminoácidos es totalmente divergente.⁸⁴ Según los datos de homología, la secuencia consenso de la H1 de *T. cruzi*, así como la secuencia de aminoácidos de la H1 de *L. major*, corresponden al dominio C-terminal de la H1 de eucariotas superiores.^{83, 84, 85} Asimismo la posible proteína H1 de *L. braziliensis* descrita en este trabajo, tiene mayor homología con la región C-terminal de la H1 de humanos. Las homologías encontradas entre la H1 de *L. braziliensis* y la H1 de otros tripanosomátidos y humanos, se basa en los valores del porcentaje de similitud y el porcentaje de identidad presentados en las tablas 1 y 2, donde se ha observado que dichos valores porcentuales no son mayores al 50%.

En este estudio, se propone una comparación de la secuencia de aminoácidos de la proteína H1 de *Leishmania braziliensis*, con la secuencia consenso para la H1 descrita en *Trypanosoma cruzi*,⁸⁴ con la secuencia de la H1 de *Leishmania major*,⁸³ y con la H1 de humanos⁸⁵ (figura 13), donde se evidencia, la presencia de una región con homología significativa en las tres especies comprendida entre los residuos 130 al 150; así como, numerosos aminoácidos coincidentes de forma independiente.

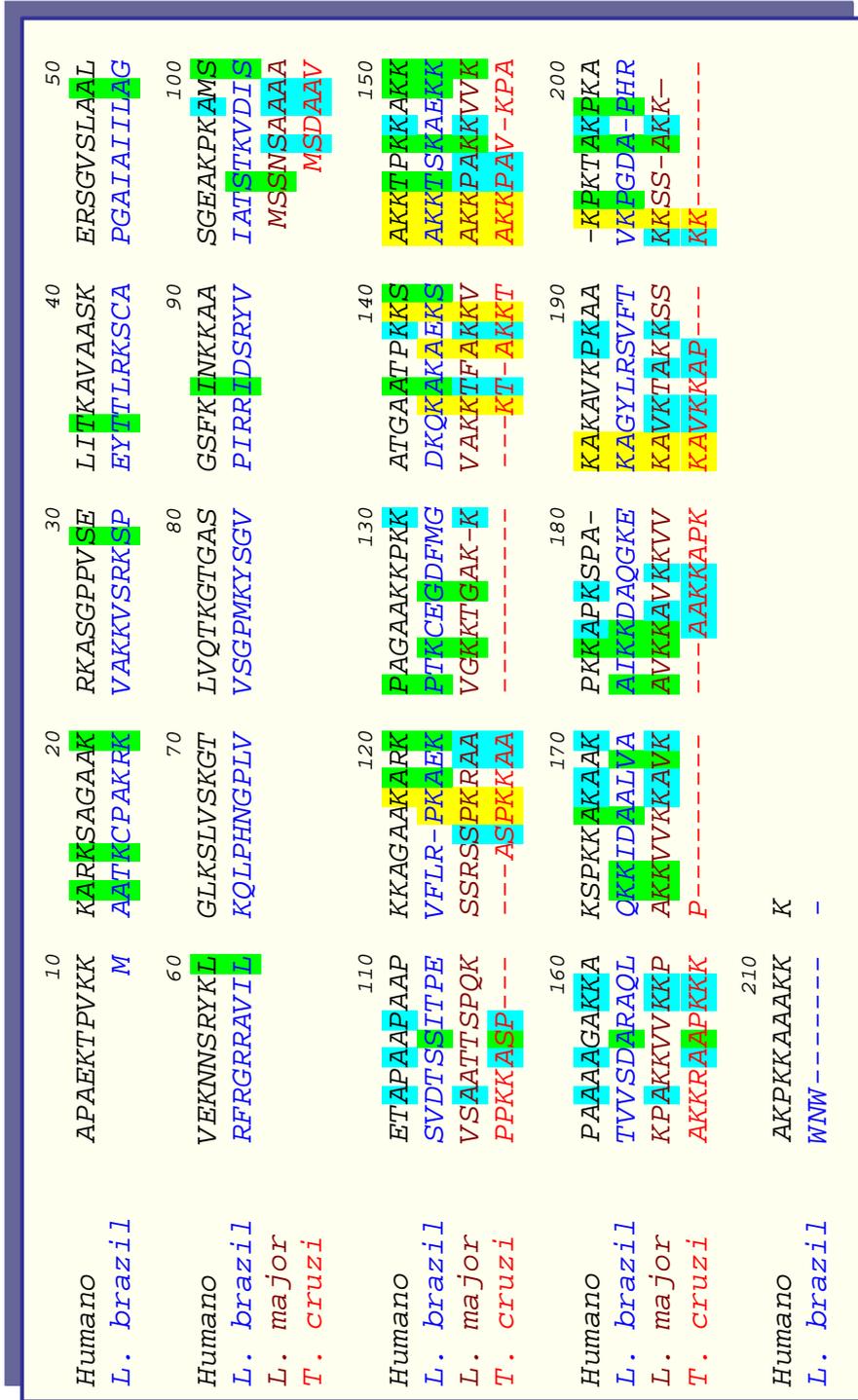


Figura 13. Homología de la secuencia de aa de la histona H1 de *L. braziliensis* con la de *L. major*⁸³, la secuencia consenso de *T. cruzi*⁸⁴ y con la de humanos.⁸⁵ Los aa resaltados en color amarillo son los coincidentes en las tres especies de tripanosomátidos y con la humana. Los aa resaltados en color verde son coincidentes entre *L. braziliensis* y cualesquiera de las otras 3 especies. En color celeste se resaltan los aa coincidentes entre *L. major*, *T. cruzi* y humano.

En las diferentes pautas de lectura abierta para las H1 descritas en *T. cruzi*⁸⁴ se ha observado una extensa heterogeneidad en algunas partes de la molécula, y se ha establecido 3 regiones homólogas con aminoácidos conservados que consisten en una secuencia N-terminal de 12 residuos de longitud, una secuencia central de 30 residuos y una secuencia C-terminal de 16 residuos.⁸⁴ La homología significativa registrada entre la H1 de *L. braziliensis* y *T. cruzi*, mencionada anteriormente, se corresponde con la región central de esta secuencia consenso.

Asimismo, en la región comprendida entre los aminoácidos 160 y 200 (región C-terminal), existen residuos coincidentes con las otras histonas H1, determinados principalmente por lisina, alanina y valina; en tanto que en la región N-terminal, la homología registrada está determinada principalmente por los aminoácidos lisina, serina y alanina.

Cabe indicar que, además de los datos de homología ya presentados, se ha encontrado que, la región comprendida entre los aminoácidos 1 al 64 de la H1 de *L. braziliensis*, tiene un 55 % de similitud y un 35 % de identidad con la H1 de *Triticum aestivum*.

ATKCPAKERSRRKCRARAPSTRPCARVVPLAPSRSSLPAAFVAA	C8LB'
.	
AAKSPAKKKPAAKPKAKAPAKTTKAAAKPKAAAKAKAPAKTTKAA	<i>T. aestivum</i>

Figura 14. Homología entre la proteína H1 de *L. braziliensis* y la H1 de *T. aestivum*.

Por otro lado, se observa que entre las posiciones 115 – 150 (Fig. 13), en la proteína H1 de *L. braziliensis* se repite tres veces el dominio KAEK en los motivos PKAEKP, AKAEKS y SKAEKK. La presencia de serina en dos de estos motivos sugiere que podrían ser sitios de fosforilación de esta proteína H1 en *L. braziliensis*, y por tanto los sitios de unión al DNA. Sin embargo, estos motivos no corresponden a los sitios de fosforilación característicos ([S/T]-P-X-

[K/R]) descritos en las histonas H1 de eucariotas superiores,^{88,89} los cuales se han observado en todos los subtipos de H1 en *T. cruzi*, donde se repiten de una a tres veces los dominios SPKK y TPAK. En *L. major* hay un único dominio de este tipo, SPKR, pero hay otros dominios, AKKVAKK y PAKKVVKK, que aunque no se ajustan a los observados en las H1 de eucariotas superiores y *T. cruzi*, curiosamente se repiten dos veces entre las posiciones 120 y 170, lo que sugiere que podrían estar relacionados con los sitios de unión al DNA.

Mediante el programa “Genne runner”, se ha encontrado un posible sitio de amidación (RGRR) en la posición 54, y varios sitios posibles de fosforilación caracterizados para la proteína kinasa dependiente de cAMP y cGMP (KKTS y KKVS) en las posiciones 23 y 142, para la casein-kinasa II (TKVD, SSVD, TKCE y SKAE) en las posiciones 95, 100, 122 y 145, para la tirosina kinasa (RRIDSRY) en la posición 83, y para la proteína kinasa C (SRK, TLR, STK, SAK, TSK y TVK). en las posiciones 26, 34, 94, 140, 144 y 190

Cabe indicar también, que los datos obtenidos del BLASTA revelan que el dominio de alta homología comprendido entre los aminoácidos 141 al 150 representado en la figura 13, está presente en la H1 descrita en el díptero *Chironomus thummi*. Esta característica refuerza aún más la probabilidad de asignar al producto del cDNA C8LB’ como una proteína H1. Seguidamente se muestra el dominio descrito en las dos especies y en la humana.

KAKAEKS	SAKKT	SKAEKK	<i>L. braziliensis</i>
GAATPKA	AKKT	PKKAKK	<i>Ch. thummi</i>
A	KKSAKKT	PKKAKK	Humano

⁸⁸ Suzuki, M. (1989). SPKK, a new nucleic acid-binding unit of protein found in histone. EMBO. J. 8, 797.

⁸⁹ Hill C.S., Packman L.C. and Thomas J.O. (1990). Phosphorylation at clustered – Ser-Pro-X-Lys/Arg- motifs in sperm – specific histone H1 and H2B. EMBO. J. 9, 805.

A través del dominio C-terminal cargado positivamente, la histona H1 de eucariotas superiores interactúa con los grupos fosfato cargados negativamente del DNA separador o DNA *linker* de los nucleosomas, mientras que a través del dominio central globular se enlaza al sitio de entrada y salida del DNA que envuelve el núcleo de histonas, y mediante la región N-terminal, se une tanto al DNA separador como a la cola N-terminal de las histonas conformantes del núcleo del nucleosoma (H2A-H2B y H3-H4).^{90,91,92,93} Dentro de este contexto es posible que las histonas H1 en los tripanosomátidos que carecen de la región globular, sean histonas con función en la regulación de genes,^{83, 84} por ejemplo en *T. brucei*, las variantes de la histona H1 participan en la proliferación y diferenciación celular, tal y como ocurre en eucariotas superiores.⁹⁴

El tamaño de las proteínas histona varía según la especie; así, en eucariotas superiores, el tamaño oscila entre 190 y 220 aminoácidos,⁸⁵ mientras que en *T. cruzi* las diferentes proteínas H1 alcanzan entre 79 y 94 residuos de aminoácidos.⁸⁴ Del mismo modo, la H1 descrita en *L. major* contiene 105 residuos.⁸³ En este contexto, el producto traducido de la pauta de lectura para la H1 en *Leishmania braziliensis* descrito en este trabajo, consta de 192 aminoácidos. El peso molecular de las proteínas H1 varía ampliamente entre los eucariotas superiores y los tripanosomátidos, por ejemplo la H1 de timo de ternera es una proteína de 21 kDa, mientras que en *T. cruzi*

⁹⁰ a) Allan J., Hartman P.G., Crane-Robinson C. and Aviles F.X. (1980). The structure of histone H1 and the location in chromatin. *Nature*. 288, 675.

b) Allan J., Harborne N., Rau D.C. and Gould H. (1982). Participation of core histone tails in the stabilization of the chromatin solenoid. *J. Cell. Biol.* 93, 285.

⁹¹ Kyu-Min L. and Hayes J.J. (1998). Linker DNA and H1 dependent reorganization of histone-DNA interactions within the nucleosome. *Biochem.* 37, 8622.

⁹² Maeder D.L. and Bohm L. (1991). The C-domain in the H1 histone is structurally conserved. *Biochem. Biophys. Acta.* 1076, 233.

⁹³ Rodriguez A.T., Perez L., Moran F., Montero F. and Suau P. (1991). Cooperative interaction of the C-terminal domain of histone H1 with DNA. *Biophys. Chem.* 39, 145.

⁹⁴ Burri M., Schlime W., Betschart B., Kampf U., Schaller J. and Hecker H. (1993). Biochemical and functional characterization of histone H1-like proteins in the procyclic *Trypanosoma brucei brucei*. *Parasitol. Res.* 79, 649.

oscilan desde 7.4 a 9.7 kDa,⁸⁴ y en *L. major* tiene un peso molecular de 12 kDa;⁸³ en *L. braziliensis* se ha determinado un peso molecular teórico de aproximadamente 21 kDa, similar al valor reportado en eucariotas superiores.

Por otro lado, el valor calculado de pI = 10.36 para esta proteína H1 de *L. braziliensis*, es relativamente bajo comparado con el valor pI de las proteínas H1 descritas en eucariotas superiores, como *Tetrahymena* (pI=11.25),⁹⁵ *Gallus gallus* (pI =11.9),⁹⁶ y humanos (pI = 11.62),⁸⁵ siendo aún más bajo cuando es comparada con el valor pI (11.8 – 12.55) de las H1 de *T. cruzi*.⁸² A pesar de tener un valor pI relativamente bajo es una proteína de carácter básico, lo cual corresponde a lo esperado para una proteína H1.

Las proteínas H1 tienen una composición de aminoácidos que consta de un alto contenido en lisina y alanina.^{83,84,85} El tercer aminoácido cuantitativamente más abundante varía según la especie.⁹³ En la proteína H1 deducida del clon C8-LB de *L. braziliensis*, los aminoácidos lisina con un 20 % y arginina con un 11.62 % (valores porcentuales del peso molecular), constituyen los aminoácidos más abundantes (tabla 4). El aminoácido arginina, ha sido descrito como un aminoácido que puede reemplazar a la alanina en las histonas H1 descritas en otros eucariotas superiores (Ej. *Gallus gallus*). El tercer aminoácido más abundante en la H1 de *L. braziliensis*, lo constituye el aminoácido alanina con un 10.19 %.

Si bien es cierto que los valores porcentuales de lisina y alanina de la H1 descrita en el presente estudio son comparativamente más bajos que los valores respectivos en la H1 de *C. fasciculata*,

⁹⁵ Wu M., Allis C.D., Richman R., Cook R.G. and Gorovsky M.A. (1986). An intervening sequence in an unusual histone H1 gene of *Tetrahymena thermophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 83, 8674.

⁹⁶ Ruiz-Carrillo A., affolter M. and Renaud J. (1983). Genomic organization of the genes coding for the six main histones of the chicken: Complete sequence of the H5 gene. *J. Mol. Biol.* 170, 84.

T. cruzi y *L. mexicana*⁹⁷, indica que estos valores porcentuales varía mucho de una especie a otra, por ejemplo, el aminoácido serina en *L. mexicana* se encuentra en un 9.15 %, mientras que en *C. fasciculata* constituye el 5.71% y en *T. cruzi* el 5.9 %, con lo cual el tercer aminoácido más abundante en estas dos últimas especies lo constituye el aminoácido prolina con un 8.95 % en *C. fasciculata* y 10.97 % en *T. cruzi*. Esta variabilidad registrada en el valor porcentual de los aminoácidos en las distintas H1 de tripanosomátidos, es un dato más que apoya la teoría de la variabilidad de las histonas H1 en las diferentes especies desde los eucariotas más inferiores hasta los superiores.

Amino Ácidos	<i>Tetrahy- mena</i>	<i>Oxytricha</i>	<i>C. fasciculata</i>	<i>T. cruzi</i>	<i>L. mexicana</i>	<i>L. braziliensis</i>
Lisina	29.9	31.6	26.63	32.35	29.32	20.20
Histidina	2.3	0.5	0.71	1.3	1.52	1.48
Arginina	2.4	3.4	1.97	2.0	3.22	11.62
A. aspártico	9.9	1.9	1.5	3.71	2.38	5.71
Treonina	8.6	4.1	2.56	1.79	3.14	6.24
Serina	7.5	6.9	5.71	5.9	9.15	7.51
A. glutámico	7.3	1.2	7.45	2.6	3.52	3.48
Prolina	6.1	5.1	8.95	10.97	8.2	6.58
Glicina	3.5	2.8	10.6	4.3	5.5	3.93
Alanina	14.0	29.2	32.06	26.5	27.9	10.19
Cisteína	-	-	ND	ND	ND	1.73
Valina	3.9	8.1	0.84	4.77	1.42	8.37
Metionina	Trazas	-	ND	ND	ND	2.13
Isoleucina	2.3	4.3	0.29	0.8	0.57	6.87
Leucina	1.7	0.3	0.38	1.54	3.14	5.62
Tirosina	0.5	0.2	0.15	0.7	0.45	3.45
Fenilalanina	0.4	0.2	0.15	0.5	0.46	3.15

Tabla 4. Comparación de la composición de aminoácidos de la histona H1 de *Leishmania braziliensis* con otros tripanosomátidos y eucariotas superiores. Valores expresados en porcentaje del peso molecular.

⁹⁷ Espinoza I., Toro G.C., Hellman U. and Galanti N. (1996). Histone H1 core histones in *Leishmania* and *Chirithidia*: Comparison with *Trypanosoma*. *Exp. Cell. Res.* 224, 1.

Por otro lado, se ha evidenciado en estudios previos que las distintas H1 descritas, muestran movilidad diferente en SDS-PAGE para cada género, siendo una característica más, que apoya dicha variabilidad.⁹⁶

Debido a que las H1 juegan un papel importante en la estabilización del nucleosoma y en la formación de la estructura de la cromatina en eucariotas superiores, la falta de condensación de la cromatina en los tripanosomátidos durante la división celular, puede estar relacionado con las características peculiares de las H1 descritas en estos organismos, entre ellas la carencia del dominio globular.^{83,84,96}

4.8 ANÁLISIS DE LA SECUENCIA DE NUCLEÓTIDOS DEL cDNA del CLON C8LB'

En el extremo 5' del cDNA C8LB' está presente la secuencia SL propia de todos los mRNAs maduros de los tripanosomátidos. En este caso la secuencia SL no se clonó completamente, sino 21 nucleótidos que coinciden con el extremo 5' de los SL de los mRNAs descritos para otras especies de *Leishmania*. En la Tabla 5 se muestra la comparación de las secuencias SL del clon C8LB' entre distintas especies de *Leishmania*.

Organismo	Secuencia <i>Spliced leader</i>			
<i>L. mexicana</i>	AACTAACGCT	ATATAAGTAT	CAGTTTCTGT	ACTTTATTG
<i>L. donovani</i>	AACTAACGCT	ATATAAGTAT	CAGTTTCTGT	ACTTTATTG
<i>L. enriettii</i>	AACTAACGCT	ATATAAGTAT	CAGTTTCTGT	ACTTTATTG
<i>L. seymouri</i>	AACTAACGCT	ATATAAGTAT	CAGTTTCTGT	ACTTTATTG
<i>L. braziliensis</i>	AACTAACGCT	ATATAAGTAT	CAGTTTCTGT	ACTTTATTG
C8LB'	-----	----- AT	CAGTTTCTGT	ACTTTATTG

Tabla 5. Comparación de la secuencia SL del clon C8LB' con otras especies del género *Leishmania*.⁹⁷

En la región no traducible 5' (5' UTR) del cDNA C8LB' (figura 10) se puede observar corriente arriba del codón ATG, varios

dinucleótidos AG y un tracto de polipirimidinas, los cuales podrían constituir los elementos requeridos en el proceso de *Trans-splicing*⁹⁸.

El codón de iniciación ATG de la región codificante para la H1, en la secuencia GAATGGC, se encuentra a 32 pb corriente abajo de la secuencia SL, y el codón de terminación TAA se encuentra localizado a 164 pb corriente arriba del tracto de poli (A)⁺ en la secuencia GGTAAGC. Esta situación recuerda a los datos descritos en *T. cruzi*,⁸⁴ donde el sitio de adición de poli (A)⁺, está a 220-222 pb corriente abajo del codón de terminación.

El extremo 3' de este cDNA está poliadenilado como ocurre en la mayoría de los genes de otros tripanosomátidos y otros eucariotas,^{99,100} así como también todos los mRNAs de histonas de levaduras,¹⁰¹ y los mRNAs de las histonas H3 y H4 de algunas plantas.¹⁰² Asimismo, la secuencia SL está presente en el extremo 5' del cDNA, propia de todos los mRNAs maduros de los tripanosomátidos.

En la secuencia del cDNA del clon C8LB' se encuentran también secuencias simétricas, localizadas en la región 3'UTR, las cuales pueden formar estructuras tallo-lazo, ya descritas en los mRNAs de *Leishmania*,¹⁰³ de *Trypanosoma*¹⁰⁴ y otros eucariotas

⁹⁸ Ullu F., Tschudi Ch. and Gunzi A. (1996). *Trans-splicing* in trypanosomatid protozoa. En: Molecular Biology of parasitic Protozoa (Smith D.F. and Parsons M., ed.) pp. 115-133.

⁹⁹ Soto M., Requena J. M., Carlos Gomey L., Navareti I. and Alonso C. (1992) Molecular characterization of a *Leishmania donovani infantum* antigenic identified as histone H2A. *Eur. J. Biochem.* 205,211.

¹⁰⁰ Genske J.E., Cairns B. R., Stack S. P. and Landfear S.M. (1991). Structure and regulation of histone H2B mRNAs from *Leishmania enriettii*. *Mol. Cell. Biol.* 11, 240.

¹⁰¹ Fahrner K., Yarger J. and Hereford L. (1980). Yeast histone mRNA is polyadenylated. *Nucleic Acids Res.* 8, 5725.

¹⁰² Chabouti M. E., Chaubet N., Clement B., Gigot C. and Phillips G. (1988). Polyadenylation of histone H3 and H4 mRNAs in dicotyledonous plants. *Gene.* 71, 217.

¹⁰³ Soto M., Requena J.M., Jimenez-Ruiz A. and Alonso C. (1991). The mRNA coding for the nucleosomal protein H2A of *Leishmania* is polyadenilated and has stem-loops at the 3' end. *Nucleic. Acid. Res.* 19, 4554.

superiores.¹⁰⁵ Estas secuencias están implicadas en la regulación de la expresión de las proteínas histonas, porque dan estabilidad a los mRNAs y en la formación de mRNAs maduros.^{103,104,105,106}

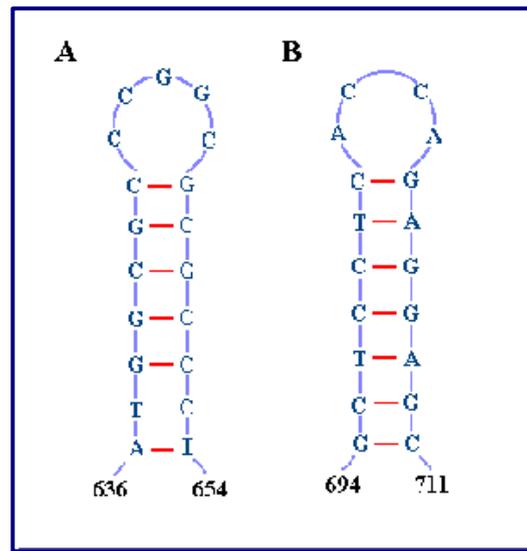


Figura 15. Estructuras tallo-lazo en la región 3'UTR de C8LB'.

La estructura tallo-lazo A, localizada entre los nucleótidos 636 – 654 (fig. 15-A) contiene 7 pb de tallo y 5 pb de lazo, parecido a como ocurre en eucariotas superiores (6 pb de tallo y 4pb de lazo).¹⁰⁶ La segunda estructura B (figura 15-B), se encuentra ubicada entre los nucleótidos 694 – 711 con 7 pb correspondiente al tallo y 4 pb correspondiente al lazo, algo parecido se observó en el mRNA de la H2A (7 pb tallo y 4 pb lazo) de *T. cruzi*.¹⁰⁴ La estructura tallo-lazo B es la más próxima a la secuencia poli (A)⁺, se encuentra exactamente a 85 pb corriente arriba de esta secuencia. En *L. major*, se han

¹⁰⁴ Puerta C., Martín J., Alonso C. and López M.C. (1994). Isolation and characterization of the gene encoding histone H2A from *Trypanosoma cruzi*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 64, 1.

¹⁰⁵ Osley M.A. (1991). The regulation of histone synthesis in the cell cycle. *Annu. Rev. Biochem.* 60, 827.

¹⁰⁶ Marzluff W.F. and Pandey N.B. (1988). Multiple regulatory steps control histone mRNA concentrations. *Trends. Biochem. Sci.* 13, 49.

descrito estructuras tallo-lazo de mayor tamaño más próximas (26 pb) al tracto poli (A)⁺.⁸⁶

4.9 ORGANIZACIÓN GENÓMICA DEL GEN CODIFICANTE PARA LA HISTONA H1 DE *Leishmania braziliensis*

El DNA genómico de *L. braziliensis* MHOM/PE/95/LQ8 se digirió con diferentes endonucleasas de restricción: *Ava* I, *Eco* RV, *Hind* III, *Nar* I, *Pst* I, *Pvu* II y *Sal* I. Los fragmentos resultantes de la digestión se analizaron mediante Southern blot según la metodología descrita en el apartado 3.16.1. En el proceso de hibridación se utilizó una sonda de DNA obtenida por PCR de la región codificante de la H1 y marcada con ³²P. En la figura 16, se muestra el resultado de estas hibridaciones.

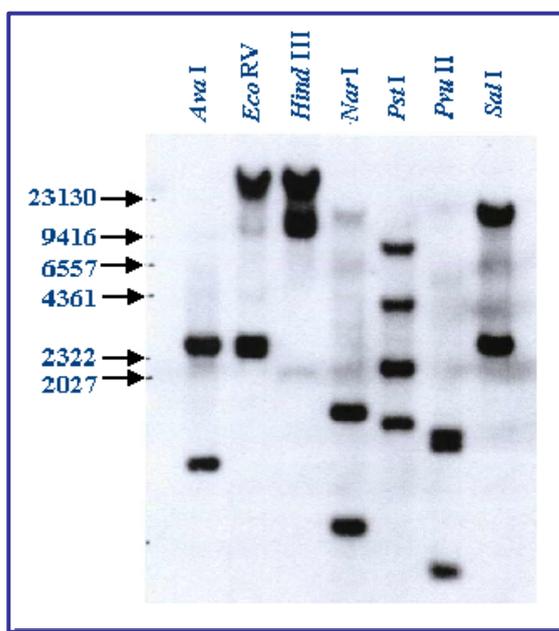


Figura 16. Análisis Southern blot de la digestión del DNA genómico de *L. braziliensis* con diversas endonucleasas de restricción. La electroforesis se realizó en gel de agarosa al 0.8 %, los fragmentos se transfirieron a membranas de nylon cargada positivamente y se hibridaron bajo condiciones de alta astringencia.

De los fragmentos resultantes de la digestión con *Ava* I, se obtuvieron dos fragmentos de 2.8 kb y 0.75 kb que hibridaron con la sonda. La endonucleasa *Eco* RV tiene una diana a 270 pb corriente abajo a partir del codón de iniciación ATG del gen en estudio (Figura 10). De los fragmentos resultantes de la digestión con esta enzima, se observó que dos de ellos (3 kb y 2.8 kb) hibridaron con la sonda. Con la enzima *Hind* III se obtuvo un fragmento de aproximadamente 12.2 kb, lo cual indica que esta diana no se encuentra dentro de la zona intergénica. La endonucleasa *Nar* I tiene una diana de restricción a 95 pb corriente abajo del codón ATG, y son dos los fragmentos resultantes de la digestión con esta enzima que hibridaron con la sonda, de 1.3 kb y 0.51 kb. En el caso de la digestión con *Pvu* II, tres fragmentos hibridaron con la sonda, correspondientes a los pesos de 1 kb, 0.9 kb y 0.29 kb; el fragmento correspondiente a 0.29 kb es consecuencia de la presencia de una diana *Pvu* II a 457 pb corriente abajo del codón ATG y otra diana a 175 pb corriente abajo del mismo codón. Finalmente, de los fragmentos obtenidos del tratamiento con *Pst* I, se observó que 4 fragmentos hibridaron con la sonda. Estos fragmentos corresponden a 9.8 kb, 4.8 kb, 2.2 kb y 1.2 kb, cabe resaltar que, dentro de la secuencia del gen en estudio existe una diana *Pst* I a 455 pb corriente abajo del codón de iniciación ATG.

Asimismo, se realizaron digestiones parciales con *Pst* I sobre el mismo DNA genómico. El análisis del comportamiento de los fragmentos obtenidos de esta digestión con *Pst* I (Figura 17), revela que transcurridos 5 minutos de digestión aparece una banda de 21 kb, la cual, tras 10 minutos de digestión se fracciona en una banda de 12.9 kb y otra de 8.8 kb. A medida que aumenta el tiempo de digestión la banda de 12.9 kb da lugar a otra de 11.5 kb y de 2.2 kb, mientras que la banda de 8.8 kb se desdobla en dos fragmentos de 4.8 kb y de 3 kb. A su vez, esta última da lugar al fragmento de 1.2 kb. Consecuentemente, tras la digestión completa se obtuvo 4 fragmentos bien definidos, correspondientes a 11.5 kb, 4.8 kb, 2.2 kb y 1.2 kb.

Cabe indicar además que, la intensidad de las bandas correspondientes a 11.5 kb y 2.2 kb es mayor que las otras dos, lo cual es debido a que las bandas menos intensas son el resultado de la

hibridación de la sonda con la región que contiene la parte del gen de menor longitud, resultante del corte en la diana interna *Pst* I.

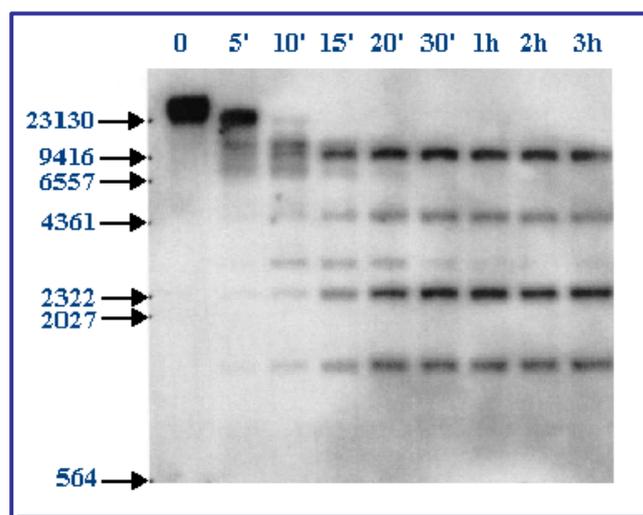


Figura 17. Análisis Southern blot de las digestiones parciales con *Pst* I del DNA genómico de *L. braziliensis*. La electroforesis se realizó en gel de agarosa al 0.8 %, los fragmentos se transfirieron a membranas de nylon cargada positivamente, se hibridaron bajo condiciones de alta astringencia.

El elevado polimorfismo observado en el patrón del cariotipo de *Leishmania*, obtenido mediante electroforesis de campo pulsado, dificulta el estudio de los cromosomas de estos protozoos, ya que este patrón puede ser inclusive específico de cepa.^{107,108,109,110} En la figura

¹⁰⁷ Comeau A.M., Miller S.I. and Wirth D.F. (1986). Chromosome location of four genes in *Leishmania*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 21, 161.

¹⁰⁸ Pagès M. Bastien P., Veas F., Rossi V., Bellis M., Wincker P., Rioux J.A. and Roizes G. (1989). Chromosome size and number polymorphisms in *Leishmania infantum* suggest amplification/deletion and possible genetic exchange. *Mol. Biochem. Parasitol.* 36, 161.

¹⁰⁹ Samaras N. and Spithill T.W. (1987). Molecular karyotype of five species of *Leishmania* and analysis of gene locations and chromosomal rearrangements. *Mol. Biochem. Parasitol.* 25, 279.

¹¹⁰ Scholler J.K., Reed S.G. and Stuart K. (1986). Molecular karyotype of species and subspecies of *Leishmania*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 20, 279.

18, se muestra el patrón obtenido para la cepa MHOM/PE/95/LQ2 de *Leishmania braziliensis*.

Se sabe que determinados cromosomas no homólogos pueden coemigrar en una misma banda, o bien, cromosomas homólogos pueden aparecer como dos bandas. Este factor ha dado lugar al desconocimiento del número exacto de cromosomas de *Leishmania*.^{111,112} En general el genoma de estos protozoos puede estar constituido por 20 a 36 cromosomas con un tamaño que oscila desde 150 kb (minicromosomas) hasta 4 Mb.

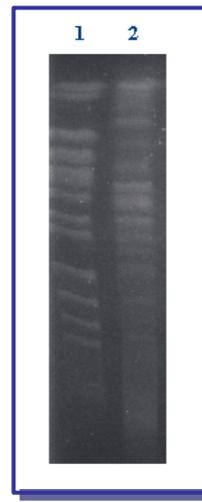


Figura 18. Electroforesis de Campo Pulsado de los cromosomas de *Leishmania braziliensis* en el gel de agarosa al 1 %.

1. Cromosomas de levaduras.
2. Cromosomas de MHOM/PE/95/LQ2.

Luego de ser separados los cromosomas mediante electroforesis de campo pulsado, estos se transfirieron a membranas de nylon cargadas positivamente mediante Southern blot (apartado

¹¹¹ Blaineau C., Bastien P., Rioux J.A., Roizes G. and Pages M. (1991). Long-range restriction maps of size-variable homologous chromosomes in *Leishmania infantum*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 46, 293.

¹¹² Iovannisci D.M. y Beverley S.M. (1989). Structural alterations of chromosome 2 in *Leishmania major* as evidence for diploidy, including spontaneous amplification of the mini-exon array. *Mol. Biochem. Parasitol.* 34,177.

3.16.1), y se hibridaron con una sonda de DNA marcada radioactivamente con ^{32}P , que corresponde a la región codificante para la histona H1 de *Leishmania braziliensis*, con la finalidad de localizar los cromosomas en las que se encuentran los genes H1. El resultado de esta prueba se muestra en la figura 19, en la que se observa la existencia de dos bandas de hibridación con la sonda, a la altura de 1.8 Mb y 0.7 Mb, de lo cual, se deduce que el gen en estudio se encuentra localizado en dos cromosomas independientes.

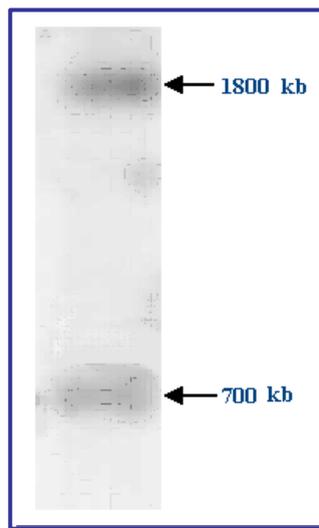


Figura 19. Análisis de los cromosomas intactos de *L. braziliensis*. La electroforesis se realizó en gel de agarosa al 1 %. Los cromosomas se transfirieron a membranas de nylon y se hibridaron bajo condiciones de alta astringencia.

El análisis Southern de las digestiones completas y parciales, así como el análisis de los cromosomas, permitió determinar que los genes codificantes para la histona H1 de *L. braziliensis*, están organizados en dos grupos formados por dos copias, en tándem con orientación cabeza-cola, separados por una región de 2.8 kb y localizados en dos cromosomas independientes. Particularmente en los tripanosomátidos, los genes están agrupados en tándem con

orientación cabeza-cola,^{113 114} sin embargo, la organización génica de los genes histonas consiste en agrupamientos de varias copias, donde no están unidas las diferentes clases de histonas y están localizados sobre cromosomas diferentes, por ejemplo, los genes H1 en *T. cruzi* están localizados sobre un cromosoma de 2.2 Mb, mientras los genes de la H3 se encuentran en un cromosoma de 1 Mb.¹¹⁵ En este trabajo se demuestra que los genes codificantes para la H1 en *Leishmania braziliensis*, se encuentran localizados sobre dos cromosomas diferentes como se mencionó anteriormente, uno de 1.8 Mb y otro de 0.7 Mb. Esto indica que también los genes codificantes para una misma histona se localizan en diferentes cromosomas. En la figura 20 se propone el esquema de la posible organización genómica del gen de la H1 en *L. braziliensis*.

¹¹³ Old R.W. and Woodland H.R. (1984). Histone genes: Not so simple after all. *Cell*. 38, 624.

¹¹⁴ Marañón C., Puerta C., Alonso C. and López M.C. (1998). Control mechanisms of the H2A genes expression in *Trypanosoma cruzi*. *Mol. Biochem. Parasitol.*

¹¹⁵ Bontempi E.J., Porcel B.M., Henrikson J., Carlsson L., Rydaker M. Segura E.L., Ruiz A.M. and Pettersson U. (1995). Genes for histone H3 in *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem. Parsitol.* 66.

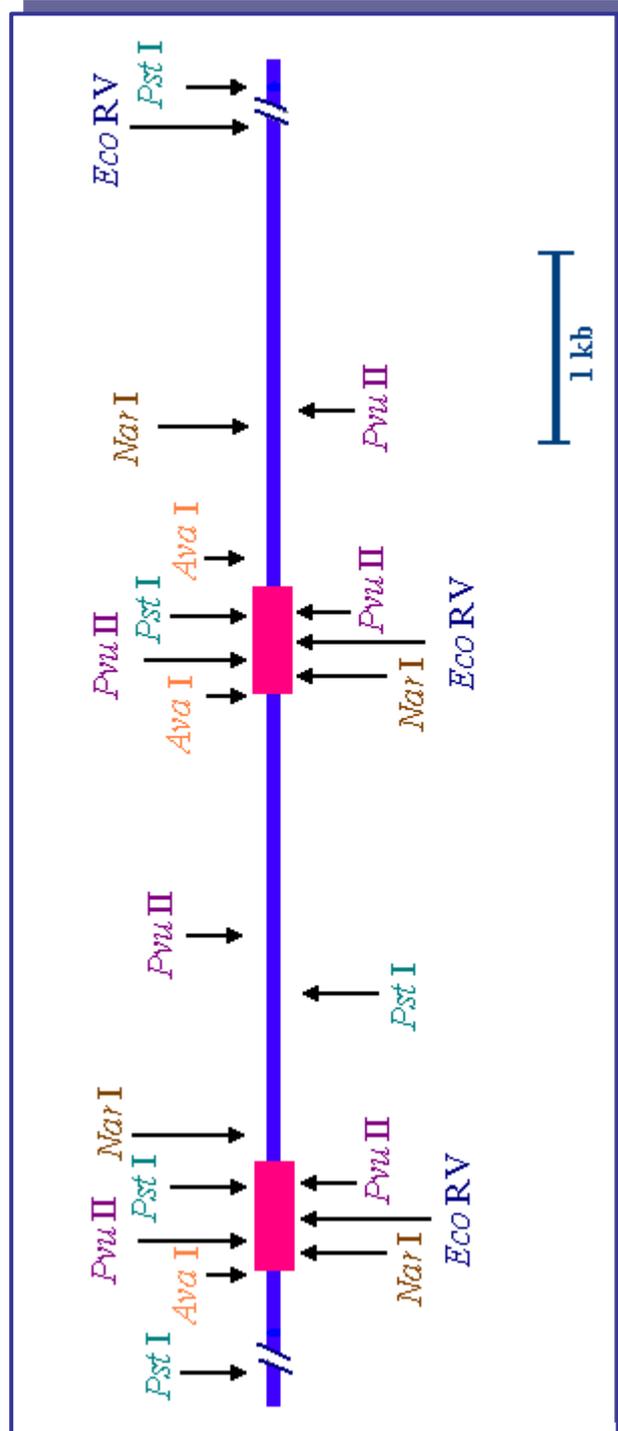


Figura 20. Propuesta de la Organización Genómica del gen codificante para la Histona H1 de *Leishmania braziliensis*.

4.10 ANÁLISIS DEL mRNA DE LA HISTONA H1 DE *Leishmania braziliensis*

La expresión de la familia de los genes histona H1 se analizó por hibridación tipo Northern del mRNA poliadenilado de promastigotes de *L. braziliensis* en fase logarítmica de crecimiento; para lo cual, se utilizó una sonda de DNA correspondiente a la región codificante de la H1 de *L. braziliensis*, utilizada también en los análisis de tipo Southern. En la figura 21, se puede observar que hay dos señales de hibridación, que indica la presencia de dos mensajeros poliadenilados de 0.9 kb y 1.2 kb de longitud respectivamente. Mediante análisis densitométricos de las bandas observadas se determina que ambos mRNAs hibridan con igual intensidad. Esto indica que ambos se encuentran en el citoplasma en cantidades equivalentes.

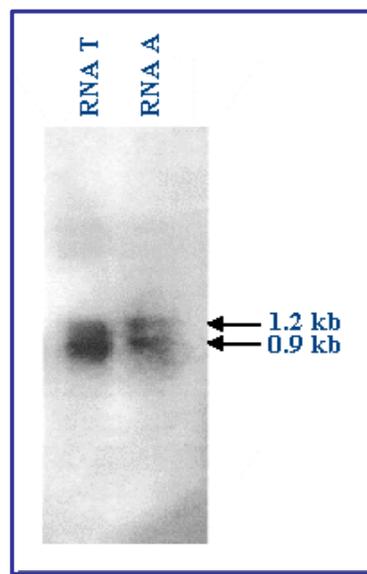


Figura 21. Análisis Northern blot de RNA poliadenilado de *L. braziliensis*. La electroforesis se realizó en gel de agarosa-formaldehído al 1 %. Se transfirió a membranas de nylon y se hibridó en condiciones de alta astringencia.

Estos resultados sugieren que los genes de la histona H1 codifican dos transcritos de diferente tamaño. Mientras que en otras especies de tripanosomátidos como en *T. cruzi* se han descrito numerosos mRNA poliadenilados que coemigran en una única banda de 650-750 nt de longitud; sin embargo, estudios de Northern blot del nivel de mensajeros para la H1 descrita en *L. major* muestran la presencia de un solo mensajero muy abundante, por lo que, los autores sugieren que podría tratarse de más de un mensajero que codifican la misma proteína.

La característica de que todos los mRNAs de la H1 están poliadenilados, podría explicar la discrepancia en cuanto al tamaño observado entre las unidades genómicas repetidas y el mRNA.⁸² La longitud del transcrito primario extendido entre el sitio aceptor del *spliced leader* y el sitio de poliadenilación es de 774 nt en el gen en estudio. Teniendo en cuenta los resultados del Northern y asumiendo que dicha longitud en otras especies como *T. cruzi*⁸² es de alrededor de 200 nt. y que el mini-exón (35 nt) está presente en el extremo 3', se podría deducir que el mensajero de 0.9 kb correspondería al transcrito primario del gen en estudio y que el mensajero de 1.2 kb correspondería al transcrito primario del otro gen que codifica la histona H1 en *L. braziliensis*, el cual podría tener un tamaño entre 1000 - 1100 nt.

Conclusiones

CONCLUSIONES

1. Las modificaciones realizadas y la puesta a punto del método de extracción de RNA, mejora sustancialmente acortando el tiempo y mejorando la calidad del producto obtenido, con respecto a los métodos ya existentes.
2. La genoteca de expresión de *Leishmania braziliensis* constituida por 14,000 clones, el 75 % de ellos poseen fragmentos cDNA, y a su vez el 50 % de estos tienen fragmentos mayores a 1 kb, por cuanto constituye una genoteca útil para estudios de aislamiento de genes codificantes de proteínas.
3. El clon de cDNA C8LB aislado de la genoteca de expresión de *Leishmania braziliensis*, mediante inmunosondeo, expresa una proteína recombinante con carácter antigénico.
4. El clon de cDNA C8LB' posee un fragmento de cDNA que codifica para la proteína Histona H1 de *Leishmania braziliensis*.
5. El gen codificante para la Histona H1 de *Leishmania braziliensis* está organizado en dos grupos, formados por dos copias similares agrupados en tándem con orientación cabeza-cola, separados por una región de 2.8 kb y localizados en dos cromosomas independientes.
6. Los genes H1 de *Leishmania braziliensis* presentan dos transcritos primarios que están constituidos por dos mRNAs de 0.9 kb y 1.2 kb de longitud respectivamente.

Bibliografia

REFERENCIAS

- Aslund L., Carlsson L., Henriksson J. Rydaker M., Toro G.C., Galanti N. and Pettersson U. (1994). A gene family encoding heterogeneous histone H1 proteins in *Trypanosoma cruzi*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 65, 317
- Agabian N. (1990). *Trans* splicing of nuclear pre mRNAs. *Cell.* 61, 1157.
- Alexander J. and Russell D.G. (1992). The interaction of *Leishmania* species with macrophages. *Adv. Parasitol.* 31, 176-231.
- Allan J., Harborne N., Rau D.C. and Gould H. (1982). Participation of core histone tails in the stabilization of the chromatin solenoid. *J. Cell. Biol.* 93, 285.
- Allan J., Hartman P.G., Crane-Robinson C. and Aviles F.X. (1980). The structure of histone H1 and the location in chromatin. *Nature.* 288, 675.
- Bender K., Betschart B. Schifaaller J. Kampfer U. and Hecker H. (1992). Sequence differences between histones of procyclic *Trypanosoma brucei brucei* and higher eukaryotes. *Parasitology.* 105, 97.
- Bender K., Betschart B., Marium C., Michalon P. and Hecker H. (1992). Structural differences between the chromatin of procyclic *Trypanosoma brucei brucei* and of higher eukaryotes as probed by immobilized trypsin. *Acta Tropica.* 52, 69.
- Benne R. (1994). RNA editing in trypanosomes. *Eur. J. Biochem.* 221, 9.
- Bereberich C., Requena J.M. and Alonso C. (1997). Cloning of genes and expression and antigenicity analysis of the *Leishmania infantum* KMP-11 protein. *Exp. Parasitol.* 85, 105.
- Bloch K.D. (1995). Restriction endonucleases and restriction mapping. En: Currents Protocols in Molecular Biology (Ausubel F.M., Brent R., Kingston R.E., Moore D.D., Seidman J.G., Smith J.A. and Struhi K. eds) pp 3.0.3-3.3.2, Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience, New-York.
- Blum B., Bakalara N. and Simpson L. (1990). A model for RNA editing in kinetoplastid mitochondria: guide RNA molecules transcribed from maxicircle DNA provide the edited information. *Cell.* 60, 189.

- Bontempi E.J., Porcel B.M., Henrikson J., Carlsson L., Rydaker M. Segura E.L., Ruiz A.M. and Pettersson U. (1995). Genes for histone H3 in *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem. Parasitol.* 66, 147.
- Borst P. (1986). Discontinuous transcription and antigenic variation in trypanosomes. *Annu. Rev. Biochem.* 55, 701.
- Borst P., Fowler F., Frasch F., Hoeijmakers J.H.J. and Weijers P.J. (1980). Characterization of DNA from *Trypanosoma brucei* and related trypanosomes by restriction endonuclease digestion. *Mol. Biochem. Parasitol.* 1, 221.
- Borst P., Hoeijmakers J. and Hajduk S. (1981). Structures, function and evolution of kinetoplast DNA. *Parasitology.* 82, 81-93.
- Borst P., Van der Ploeg M., Van Hoek J.F.M., Tas J. and James J. (1982). On the DNA content of trypanosomes. *Mol. Biochem. Parasitol.* 6, 13.
- Burri M., Schlime W., Betschart B., Kampf U., Schaller J. and Hecker H. (1993). Biochemical and functional characterization of histone H1-like proteins in the procyclic *Trypanosoma brucei brucei*. *Parasitol. Res.* 79, 649.
- Campetella A. Henriksson J. Aslund L. Frasch A.C.C., Pettersson U., and Cazzul J.J. (1992). The major cysteine proteinase (cruzipain) from *Trypanosoma cruzi* is encoded by multiple polymorphic tandemly organized genes located on different chromosomes. *Mol. Biochem. Parasitol.* 50, 225.
- Chabouti M. E., Chaubet N., Clement B., Gigot C. and Phillips G. (1988). Polyadenylation of histone H3 and H4 mRNAs in dicotyledonous plants. *Gene.* 71, 217.
- Chang K.P., Fong D. and Bray R.S. (1985). Biology of *Leishmania* and leishmaniasis. En: *Leishmaniasis* (Chang K.P. and Bray R.S., ed.). pp, 2-27. Elsevier. Amsterdam.
- Chomczynski P. (1992) One-hour downward alkaline capillary transfer for blotting of DNA and RNA. *Anal. Biochem.* 201, 134.
- Chomczynski P. and Sacchi N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate – phenol –chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 162, 156.
- Collart M.A. and Oliviero S. (1993) Preparation of yeast RNA by extraction with hot acidic phenol. En: *Current Protocols in Molecular Biology* (Ausubel F.M., Brent R., Kingston R.E., Moore

- D.D., Seidman J.G., Smith J.A. and Struhi K. eds) pp 13.12.1-13.12.5, Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience, New-York.
- Curotto M.A., Laban A. and Wirth D. (1992). Gene expression in *Leishmania*: analysis of essential 5' DNA sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 89, 2703.
- Darnell J., Lodish H. and Baltimore D. (1990). *Molecular Cell Biology*. pp, 1-1161. W.H. Freeman and Company, New York. USA.
- Englund P.T. (1981). Kinetoplast DNA. *Biochem. Phy. Prot.* pp, 51, 695.
- Englund P.T., Guilbride D.L., Hwa K-Y., Jhonson C.E., Li C., Rocco L.J. and Torri A.F. (1996). Kinetoplast DNA: structure and replication. En: *Molecular Biology of Parasitic Protozoa* (Smith D.F. and Parsons M., ed.). pp, 75-87. IRL Press. New York.
- Espinoza I., Toro G.C., Hellman U. and Galanti N. (1996). Histone H1 and core histones in *Leishmania* and *Crithidia*: comparison with *Trypanosoma*. *Exp. Cell. Res.* 224, 1.
- Evans D.(1989). Handbook on isolation characterization and cryopreservation of *Leishmania*. En: Special programme for research and training in tropical diseases. UNDP/WORLD BANK/WHO. pp 1-45
- Fahrner K., Yarger J. and Hereford L. (1980).Yeast histone mRNA is polyadenylated. *Nucleic. Acids. Res.*8, 5725.
- Fasel N.J. Robyr D.C., Mauel J. and Glaser T.A. (1994). Identification of a histone H1-like gene expressed in *Leishmania major*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 62, 321.
- Galanti N., Galindo M., Sabaj V., Espinoza I. and Toro G.C. (1998). Histone genes in trypanosomatids. *Parasitol. Today.* 14, 64.
- García-Salcedo J.A., Oliver J.L., Stock R.P. and González A. (1994). Molecular characterization and transcription of the histone H2B gene from the protozoan parasite *Trypanosoma cruzi*. *Mol. Microbiol.* 13, 1033.
- Genske J.E. Cairns B.R. Stack S.P. and Landfear S.M. (1991). Structure and regulation of histone H2B mRNA from *Leishmania enrietti*. *Mol. Cell. Biol.* 11, 240.

- Gibson W.C., Swinkels B.S. and Borst P. (1988). Post-transcriptional control of the differential expression of phosphoglycerate kinase genes in *Trypanosoma brucei*. *J. Mol. Biol.* 201, 315.
- Göringer H.U., Köller J. and Shu H.H. (1995). Multicomponent complexes involved in kinetoplastid RNA editing. *Parasitol. Today.* 11, 265.
- Graham S.V. (1995). Mechanisms of stage-regulated gene expression in kinetoplastida. *Parasitol. Today.* 11, 217.
- Guerra H. (1988). Distribución de *Leishmania* en Perú. En: Research on Control Strategies for the leishmaniasis (Walton B.C., Wijeyaratne P.M. and Modabber F., ed.). pp, 135-145. IDRC. Ottawa.
- Hajduk S.L. and Sabatini R.S. (1996). RNA editing: post-transcriptional restructuring of genetic information. En: Molecular biology of parasitic protozoa (Smith D.F. and Parsons M., ed.). pp, 134-158. IRL Press. New York.
- Hanahan D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.*, 166, 557.
- Heintz N. (1991). The regulation of histone gene expression during the cell cycle. *Biochem. Biophys. Acta.* 1088, 327.
- Hill C.S., Packman L.C. and Thomas J.O. (1990). Phosphorylation at clustered -Ser-Pro-X-Lys/Arg- motifs in sperm - specific histone H1 and H2B. *EMBO. J.* 9, 805.
- Huang J. and Van der Ploeg L.H.T. (1991). Maturation of polycistronic pre-mRNA in *trypanosoma brucei*: analysis of trans splicing and poly (A) addition at nascent RNA transcripts from the hsp 70 locus. *Mol. Cell. Biol.* 11, 3180.
- Hug M., Hotz H.R., Hartmann C. and Clayton C. (1994). Hierarchies of RNA-processing signals in a trypanosome surface antigen mRNA precursor. *Mol. Cell. Biol.* 14, 7428.
- Kyu-Min L. and Hayes J.J. (1998). Linker DNA and H1 dependent reorganization of histone-DNA interactions within the nucleosome. *Biochem.* 37, 8622.
- Larivière M., Beauvais B., Derouin F. and Traoré F. (1987). Parasitologie Medicale. pp, 55-62. Ellipses. Francia.
- Lehrach H., Diamond D., Wozney D.J.M. and Boedtke H. (1977). RNA molecular weight determinations by gel electrophoresis

- under denaturing conditions, a critical reexamination. *Biochem.* 16, 4743.
- López M., Inga R., Cangalaya M., Echevarria J., Llanos-Cuentas A., Orrego C. and Arévalo J. (1993). Diagnosis of *Leishmania* using the polymerase chain reaction: A simplified procedure for field work. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 49, 348-356.
- Maeder D.L. and Bohm L. (1991). The C-domain in the H1 histone is structurally conserved. *Biochem. Biophys. Acta.* 1076, 233.
- Marañón C., Puerta C., Alonso C. and López M.C. (1998). Control mechanisms of the H2A genes expression in *Trypanosoma cruzi*. *Mol. Biochem. Parasitol.*
- Markell E.K., Voge M. and John D. (1990). Parasitología Médica. pp, 104-150. Interamericana. McGraw-Hill. España.
- Marsden P.D. and Jones T.C. (1985). Clinical manifestations, diagnosis and treatment of leishmaniasis. En: leishmaniasis (Chang P.K. and Bray R.S., ed.). pp, 183-198. Elsevier. Amsterdam.
- Marzluff W.F. and Pandey N.B. (1988). Multiple regulatory steps control histone mRNA concentrations. *Trends. Biochem. Sci.* 13, 49.
- Maxson R., Cohn R. and Kedes L. (1983). Expression and organization of histone genes. *Annu. Rev. Genet.* 17, 239.
- Noll T.M., Desponds Ch., Belli S.I., Glaser T.A. and Fasel N.J. (1997). Histone H1 expression varies during the *Leishmania major* life cycle. *Mol. Biochem. Parasitol.* 84, 215.
- Nourbakhsh F., Uliana S. and Smith D. (1996). Characterization and expression of a stage-regulated gene of *Leishmania major*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 76, 201.
- Old R.W. and Woodland H.R. (1984). Histone genes: Not so simple after all. *Cell.* 38, 624.
- Osley M.A. (1991). The regulation of histone synthesis in the cell cycle. *Annu. Rev. Biochem.* 60, 827.
- Parsons M. (1990). Current concepts in stage-regulated gene expression in kinetoplastida. *Parasitol. Today.* 6, 244.
- Pays E. and Vanhamme L. (1996). Developmental regulation of gene expression in african trypanosomes. En: Molecular biology of parasitic protozoa (Smith D. and Parsons M., ed). pp, 88. IRL press.

- Puerta C., Martin J., Alonso C. and López M.C. (1994). Isolation and characterization of the gene encoding histone H2A from *Trypanosoma cruzi*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 64, 1.
- Rodríguez A.T., Perez L., Moran F., Montero F. and Suau P. (1991). Cooperative interaction of the C-terminal domain of histone H1 with DNA. *Biophys. Chem.* 39, 145.
- Ruiz-Carrillo A., affolter M. and Renaud J. (1983). Genomic organization of the genes coding for the six main histones of the chicken: Complete sequence of the H5 gene. *J. Mol. Biol.* 170, 84.
- Saito R.M., Elgort M.G. and Campbell D.A. (1994). A conserved upstream element is essential for transcription of the *Leishmania tarentolae* mini-exon gene. *EMBO. J.* 22, 5460.
- Sambrook J., Fritsch E.F. and Maniatis T. (1989). Molecular cloning: A laboratory manual (2nd ed.) Cold Spring Harbor, N.Y. Cold Spring Harbor Laboratory press.
- Sanger F., Nicklen S. and Coulson A.R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl. Acad. Sci. USA* 74, 5463
- Schmidt G.D. y Roberts L.S (1984). Fundamentos de parasitología. C.E.C.S.A. pp 63-90. México.
- Scholler J.K., Mc Ardle S., Reed S. and Karemoto R. (1989). Conservation of the 5' end of the medRNA in New World species of *Leishmania*. *Nucl. Acids. Res.* 17, 7999.
- Schwartz P. and Cantor C.R. (1984). Separation of yeast chromosome-sized DNAs by pulsed field gradient gel electrophoresis. *Cell.* 37, 67.
- Seiwert S.D. (1995). The ins and outs of editing RNA in kinetoplastids. *Parasitol. Today.* 11, 362.
- Shaw J.J. and Laison R. (1987). Recent advances in studies on the ecology and epidemiology of New world leishmaniasis. En: *Leishmaniasis in biology and medicine, Vol. I, Biology and Epidemiology* (Peters W. and Killick-Kendrick R., ed.). pp, 291-363. Academic Press, London.
- Shumperli D. (1988). Multilevel regulation of replication-dependent histone genes. *Trends. Genet.* 4, 187.
- Smith D.F. (1990). Trypanosomatid transfection: stable introduction of DNA into protozoa. *Parasitol. Today.* 6, 245.

- Sogin M.L., Elwood H.J. and Gunderson H.H. (1986). Evolutionary diversity of small-subunit rRNA genes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* pp, 83, 1383.
- Solari A.J. (1980). Function of the dense plaques during mitosis in *Trypanosoma cruzi*. *Exp. Cell. Res.* 127, 457.
- Soto M., Requena J.M., Gomez L.C., Navarrete I. and Alonso C. (1992). Molecular characterization of a *leishmania donovani infantum* antigen identified as histone H2A. *Eur. J. Biochem.* 205, 211.
- Soto M., Requena J.M. and Alonso C. (1993). Isolation, characterization and analysis of the expression of the *Leishmania* ribosomal PO protein genes. *Mol. Biochem. Parasitol.* 61, 265.
- Soto M., Requena J.M., Jimenez-Ruiz A. and Alonso C. (1991). The mRNA coding for the nucleosomal protein H2A of *Leishmania* is polyadenylate and has stem-loop at the 3' end. *Nucleic. Acid. Res.* 19, 4554.
- Soto M., Requena J.M., Muorales G. and Alonso C. (1994). The *Leishmania infantum* histone H3 possesses an extremely divergent N-terminal domain. *Biochem. Biophys. Acta.* 1219, 533.
- Suzuki, M. (1989). SPKK, a new nucleic acid-binding unit of protein found in histone. *EMBO. J.* 8, 797.
- Swindle J. and Tait A. (1996). Trypanosomatid genetics. En: *Molecular biology of parasitic protozoa* (Smith D.F. and Parsons M., ed.). pp, 6-34. IRL Press. New York.
- Swindle J., Ajioka J., Eisen H., Sanwal B. Jacquemot C., Browder Z. and Buck G. (1988). The genomic organization and transcription of the ubiquitin genes of *Trypanosoma cruzi*. *EMBO. J.* 7, 1121.
- Thomas M.C., Fernández A., Moro A., García J.A. y González A. (1993). Biología molecular de los tripanosomátidos. En: *Parasitología Molecular* (Rivas L. y López M.C., ed). pp, 135-143. CSIC. Madrid.
- Toro G.C., Wernstadt C., Medina C. Jaramillo M., Hellmann U. and Galanti M. (1992). Extremely divergent histone H4 sequence from *Trypanosoma cruzi*: evolutionary implications. *J. Cell. Biochem.* 49, 266.
- Tschudi C. and Ullu E. (1990). Destruction of U2, U4 o U6 small nuclear RNA blocks trans splicing in trypanosome cells. *Cell.* 61, 459.

- Ullu E., Tschudi C. and Günzi A. (1996). Trans-splicing in trypanosomatid protozoa. En: *Molecular Biology of Parasitic Protozoa* (Smith D. and Parsons M., de). pp, 115-133. IRL press.
- Wells D. and McBride C. (1989). A comprehensive compilation and alignment of histones and histone genes. *Nucleic. Acids. Res.* 17 (Suppl.), 311.
- Wells D. and Kedes L. (1985). Structure of a human histone cDNA: evidence that basally expressed histone genes have intervening sequences and encode polyadenylated mRNAs. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 82, 2834.
- WHO. (1993). The leishmaniasis. CTD/MIP/wP. 93. 8, WHO/HQ. Geneva.
- Wilde H.M. and Kaderbhai M.A. (1990). A simple single-step procedure for small-scale preparation of *Escherichia coli* plasmids. *Nucl. Acids. Res.* 18: 1660
- Wong A., Curotto M.A. and Wirth D. (1994). Identification of a cis-acting gene regulatory element from the *lemdr 1* locus of *Leishmania enriettii*. *J. Biol. Chem.* 42, 26497.
- Wu M., Allis C.D., Richman R., Cook R.G. and Gorovsky M.A. (1986). An intervening sequence in an unusual histone H1 gene of *Tetrahymena thermophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 83, 8674.
- Wu R.S., and Bonner W.M. (1981). Separation of basal histone synthesis from S-phase histone synthesis in dividing cells. *Cell.* 27, 321.
- Yancopoulos G.D. and Alt F. (1990). Preparation of cytoplasmic RNA. En: *Methods for Cloning Analysis of Eukariotic Genes.* (Bothwell A., Yancopoulos G.D. and Alt F. ed.). Jones and Bartlett Publisher, pp 18. Boston.