

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID**

**FACULTAD DE CIENCIAS  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR  
CENTRO DE BIOLOGÍA MOLECULAR “SEVERO OCHOA”**

**CONTROL DE LA EXPRESIÓN  
GÉNICA DE LAS HISTONAS DE  
*LEISHMANIA* ASOCIADO AL CICLO  
CELULAR.**

**DANIEL RUIZ ABÁNADES  
Madrid, 2008**



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID  
FACULTAD DE CIENCIAS  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR  
CENTRO DE BIOLOGÍA MOLECULAR “SEVERO OCHOA”

**CONTROL DE LA EXPRESIÓN  
GÉNICA DE LAS HISTONAS DE  
*LEISHMANIA* ASOCIADO AL CICLO  
CELULAR.**

Memoria presentada para optar al grado de Doctor en Biología Molecular por:

**Daniel Ruiz Abánades**

Director de Tesis:

Dr. Manuel Soto Álvarez

Madrid, 2008



aquellos malos momentos...

A mis padres, por



Daríá todo lo que sé, por la mitad de lo que ignoro.  
Renè Descartes





# ÍNDICE



ABSTRACT .....	1
ABREVIATURAS .....	3
INTRODUCCIÓN.....	5
1.- <i>Leishmania</i> .....	7
1.1.- Ciclo de vida .....	7
1.2.- La leishmaniosis.....	9
1.2.1.- La leishmaniosis en España.....	10
1.3.- Biología Molecular de <i>Leishmania</i> .....	11
1.3.1.- El genoma.....	11
1.3.2.- Expresión génica .....	13
1.3.3.- Regulación de la expresión génica.....	17
1.3.3.1.- Procesamiento de los ARNm.....	17
1.3.3.2.- Estabilidad de mensajeros .....	18
1.3.3.3.- Traducción de mensajeros.....	19
2.- El ciclo celular.....	21
2.1.- Control del ciclo celular .....	21
2.2.- Control de la expresión génica asociado a la fase S.....	23
3.- Las histonas.....	26
3.1.- Control de la expresión génica de las histonas.....	27
3.2.- Las histonas de <i>Leishmania</i> .....	29
3.2.1.- Organización génica de las histonas de <i>Leishmania</i> .....	31
3.2.2.- Expresión génica de las histonas de <i>Leishmania</i> .....	32
OBJETIVOS.....	35
MATERIALES Y MÉTODOS.....	39
1.- Cultivo de parásitos.....	41
2.- Tratamientos con Hidroxiurea y Actinomicina D.....	41
3.- Transfección de promastigotes.....	41
4.- Construcciones plasmídicas.....	42
5.- Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	46
6.- Mapeo de ARNm por RT-PCR.....	47
7.- Secuenciación de ADN.....	47
8.- Preparación de células competentes y transformación.....	47
9.- Aislamiento de ADN de plásmidos.....	48

10.- Aislamiento de ARN de <i>Leishmania</i> .....	48
11.- Análisis de la distribución de ARNm en polisomas por gradientes de sacarosa. ....	48
12.- Electroforesis de ARN y transferencia a membrana. ....	48
13.- Marcaje radiactivo de ADN de cadena doble. ....	49
14.- Marcaje radiactivo de Oligodesoxirribonucleótidos. ....	50
15.- Hibridación de filtros. ....	50
16.- Marcaje de proteínas de nueva síntesis. ....	51
17.- Aislamiento de núcleos. ....	51
18.- Inmunoprecipitaciones. ....	51
19.- Electroforesis de proteínas. ....	53
20.- Ensayos de <i>Western blot</i> . ....	53
21.- Citometría de flujo y análisis del ciclo celular.....	54
23.- Análisis de las bases de datos.....	55
RESULTADOS .....	57
1.- Análisis de la expresión del gen <i>H2A4</i> mantenido de forma episómica.....	59
2.- Estudio de la implicación de la región codificante y de las diferentes regiones no traducidas en el control traduccional de los genes de histonas de <i>L. infantum</i> .....	64
3.- Estudio del papel de las regiones 5'UTR y 3'UTR en el control por ciclo celular de la histona H2A de <i>L. infantum</i> .....	68
4.- Análisis de la presencia de los elementos HRE y CCRE en histonas y otros genes de expresión asociada a la fase S en <i>L. infantum</i> . ....	70
5.- Efecto de la delección del elemento HRE del gen <i>H2A4</i> de <i>L. infantum</i> .....	72
6.- Análisis del efecto de las delecciones parciales de HRE en la expresión asociada al ciclo celular del gen <i>6xhisH2A</i> . ....	75
7.- Análisis de la implicación de CCRE y HRE en la estabilidad del ARNm.....	80

8.- Búsqueda del elemento HRE en genes de histonas de otros tripanosomátidos. ....	82
9.- Análisis del comportamiento traduccional de otros genes de expresión asociada al ciclo celular.....	84
DISCUSIÓN.....	85
1.- La expresión del gen H2A mantenido como episoma mantiene el control de la expresión génica asociada al ciclo celular.....	87
2.- Implicación de las diferentes regiones génicas en el control de las histonas asociado al ciclo celular. ....	91
3.- HRE es esencial para la represión traduccional y la acumulación de los transcritos fuera de la fase S.....	94
4.- Modelo de acción de HRE y CCRE en la región 3'UTR de las histonas. ....	99
CONCLUSIONES.....	101
BIBLIOGRAFÍA.....	105



# **ABSTRACT**

Parasites of the genus *Leishmania* cause cutaneous, mucocutaneous, and visceral infections affecting approximately 1.5 million people each year of the 397 million that are at risk worldwide. Gene expression in *Leishmania* shares unique features that include polycistronic transcription of large RNA units and pre- RNA processing into monocistronic mRNAs through a post-transcriptional control mediated by *trans*-splicing and polyadenylation. There is no evidence for transcriptional activation of regulated genes, and mRNA abundance is determined exclusively by post-transcriptional mechanisms. These include differential RNA processing, control of mRNA decay, and regulation of mRNA translation. These post-transcriptional events are controlled by sequences present mainly in the 3' untranslated regions (3' UTRs), although sequences located at the 5' UTR and in some cases the intergenic regions (IR) has been also implicated.

In *Leishmania*, as it occurs in lower eukaryotes, the histone mRNAs are polyadenylated and histone gene transcription appears to be constitutive. In these parasites histone biosynthesis is regulated by a mechanism involving a translational control that is exerted on histone mRNAs coordinated with DNA synthesis along the cell cycle.

Given that regulated gene expression in *Leishmania* has been related with post-transcriptional events mainly involving sequences present in the 5' and 3' UTRs, in the present work we have analyzed the involvement of these regions in the cell cycle dependent expression of the *L. infantum* H2A genes. Our findings indicate that both, the 5' and the 3' UTRs contain sequence elements that contribute to the cell cycle expression of *L. infantum* H2A. The 3' UTR region is essential for the cell cycle dependent translation of the *L. infantum* H2A transcripts whereas the 5' UTR has a minor contribution in their S phase dependent translation. Moreover, in silico analysis of the *Leishmania* sequence database revealed the presence in almost every histone mRNAs of a single copy of the cell cycle conserved element present in other *Leishmania* genes (CAUAGA) followed by a U-rich region. In this work we directly addressed the involvement of this consensus element in the translational regulation of *L. infantum* H2A gene expression.





## ABREVIATURAS

ADN:	ácido desoxirribonucleico
ARN:	ácido ribonucleico
ARNr:	ARN ribosómico
ARNm:	ARN mensajero
BSA:	albúmina de suero bovino
CCRE:	Elemento Regulador del Ciclo Celular (del inglés " <i>Cell Cycle Regulatory Element</i> ")
cpm:	cuentas por minuto
EDTA:	ácido etilendiaminotetracético
h:	hora
HRE:	Elemento Regulador de Histonas (del inglés " <i>Histone Regulatory Element</i> ")
HU:	hidroxiurea
IPTG:	iso-propil-tiogalactósido
Kb:	kilobase
KDa:	kilodalton
LC:	Leishmaniosis cutánea
LCD:	Leishmaniosis cutánea difusa
LDPK:	Leishmaniosis dérmica post kala-azar
LMC:	Leishmaniosis mucocutánea
LV:	Leishmaniosis visceral
Mb:	megabases
min:	minuto
nm:	nanómetro
nt:	nucleótido
OMS:	Organización Mundial de la Salud
pb:	par de bases
PBS:	tampón fosfato salino
PCR:	reacción en cadena de la polimerasa (del inglés " <i>Polymerase Chain Reaction</i> ")
RT:	transcripción reversa
SDS:	dodecil sulfato sódico
UTR:	región no traducida (del inglés " <i>Untranslated Region</i> ")
UV:	ultravioleta
VIH:	virus de la inmunodeficiencia humana

Los términos sin clara traducción al castellano y de frecuente utilización en Biología Molecular se han escrito en cursiva.



# **INTRODUCCIÓN**



### **1.- Leishmania.**

Los protozoos parásitos del género *Leishmania* fueron descritos por primera vez a principios del siglo XX por dos investigadores de forma independiente: Leishman (1900) y Donovan (1903).

El género *Leishmania* se clasifica dentro del orden *Kinetoplastida*, grupo de organismos caracterizados por poseer una única mitocondria de gran tamaño denominada kinetoplasto, que contiene una compleja red de minicírculos y maxicírculos de ADN. A lo largo de su ciclo de vida *Leishmania* alterna dos estadios morfológicos: la forma flagelada, de aproximadamente 15-20  $\mu\text{m}$ , que se desarrolla dentro del mosquito vector, y se denomina promastigote y la forma amastigote, no flagelada y de aproximadamente 3-5  $\mu\text{m}$ , que se desarrolla en el interior de las células fagocíticas del sistema retículoendotelial.

En cuanto a su morfología general, sus principales características son la presencia del kinetoplasto, como única mitocondria, y una red de microtúbulos subpeliculares que dan a la célula un citoesqueleto particularmente rígido. En el promastigote destaca la presencia de un cuerpo basal conocido como bolsillo flagelar que forma una invaginación de la membrana. En términos funcionales, el flagelo y la red de microtúbulos constituyen el motor de la célula, mientras que el bolsillo flagelar está implicado en los procesos de exocitosis y endocitosis (Hommel, 1999).

#### **1.1.- Ciclo de vida**

El ciclo de vida de *Leishmania* se inicia cuando una hembra hematófaga del género *Phlebotomus* (en el Viejo Mundo) o *Lutzomyia* (en el Nuevo Mundo) porta en su tracto digestivo promastigotes en su forma procíclica. Tras un periodo de 7 – 8 días, sufren un proceso de maduración o metacicloogénesis que implica cambios en sus moléculas de superficie. Estos cambios provocan que los promastigotes se desprendan del epitelio donde están adheridos, permitiendo su ascenso hasta la probóscide del mosquito, donde se encuentran las formas metacíclicas de los promastigotes, que son altamente infectivas (Sacks & Perkins, 1984). Cuando el mosquito se alimenta succionando la sangre de un mamífero (normalmente cánidos y roedores, pero de forma

## INTRODUCCIÓN

frecuente también humanos), los promastigotes metacíclicos son inoculados en la piel, donde son fagocitados por macrófagos residentes. Como resultado de esta fagocitosis, el parásito es englobado en una vesícula parasitófora donde el descenso del pH, junto al aumento de la temperatura que supone el paso del insecto al mamífero, dispara el proceso de diferenciación a la forma amastigote (Rittig & Bogdan, 2000). La replicación de los amastigotes dentro del macrófago puede llegar a producir su lisis y la liberación de los amastigotes, que son capaces de reinfestar nuevas células fagocíticas y extender así la infección. El ciclo de vida concluye cuando una hembra del mosquito vector se alimenta del mamífero infectado llevándose consigo macrófagos infectados de amastigotes. El descenso de la temperatura y la subida del pH en el intestino del insecto vector desencadena el proceso de diferenciación a la forma promastigote procíclico; forma replicativa que se adhiere a las paredes del intestino medio (figura 1).

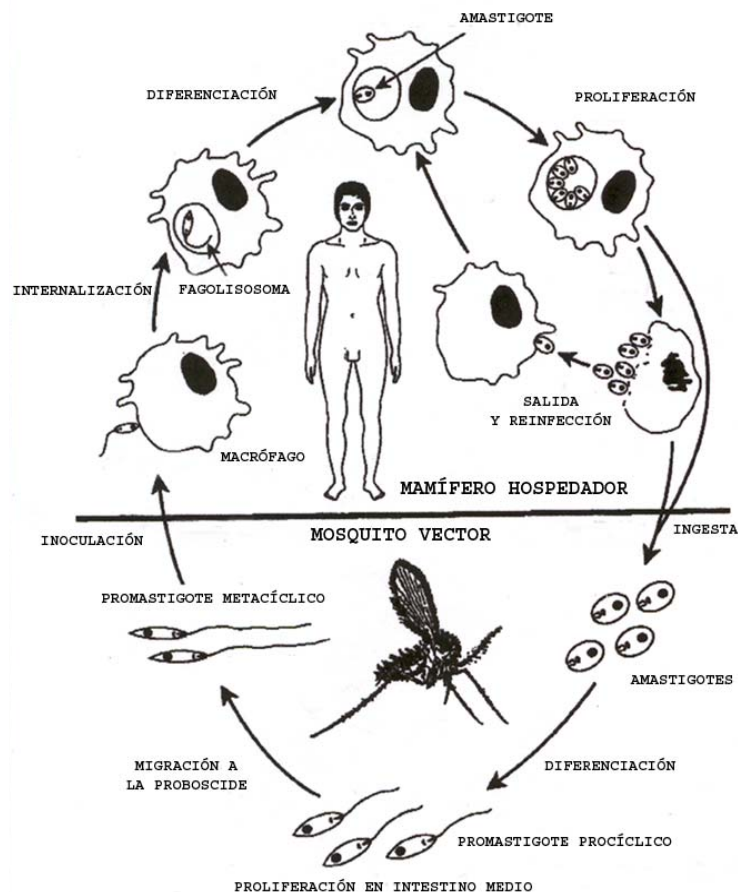


Figura 1. Ciclo de vida de *Leishmania*. (Adaptado de (Handman, 2000))

### 1.2.- La leishmaniosis

Se denomina leishmaniosis a la enfermedad producida por la infección de parásitos del género *Leishmania*. Existe un conjunto de síndromes causados por más de 20 especies de *Leishmania*, que son transmitidas por unas 30 especies de vectores de la subfamilia *Phlebotominae* (Ashford, 2000). La leishmaniosis es una zoonosis en las que el hombre es infectado accidentalmente, siendo los reservorios naturales más importantes de la enfermedad ciertos roedores y cánidos (Ashford, 1997). También se han descrito infecciones en felinos (Martin-Sanchez et al, 2007) y caballos (Vedovello Filho et al, 2008).

La enfermedad es endémica en 88 países de las regiones tropicales y subtropicales del planeta, con un total de 350 millones de personas en riesgo de contraer la infección. Se estima que hay 12 millones de personas infectadas en todo el mundo, y se producen 1,5-2 millones de nuevos casos anualmente (OMS, 2002).

De acuerdo con las manifestaciones clínicas y su gravedad, las leishmaniosis pueden clasificarse en cinco grupos:

1. Leishmaniosis visceral (LV) o *Kala-azar*: causada por *L. donovani* y *L. infantum* en el Viejo Mundo, y *L. chagasi* en el Nuevo Mundo. Es la forma más grave; suele ser mortal en el 75-95% de los casos si no se aplica tratamiento. La infección se mantiene asintomática en muchos casos pero cuando se desarrolla los enfermos presentan fiebre, caquexia severa, hepatoesplenomegalia, anemia e hipergammaglobulinemia. La gran mayoría de casos de LV se encuentran en Bangla Desh, Brasil, India y Sudán (OMS, 2002).
2. Leishmaniosis cutánea (LC) o Botón de Oriente: es producida por *L. major*, *L. tropica* y *L. aethiopica* en el Viejo Mundo, y por *L. mexicana*, *L. amazonensis* y *L. braziliensis* en el Nuevo Mundo. Es la forma más común y la menos grave. Cursa con lesiones cutáneas que habitualmente curan espontáneamente en pocos meses, aunque dejan cicatrices desfigurantes. Más del 90% de los casos de LC tienen lugar en Irán, Afganistán, Siria, Arabia Saudí, Brasil y Perú (OMS, 2002).

3. Leishmaniosis mucocutánea (LMC) o espundia: causada por *L. braziliensis*. Se localiza principalmente en América Latina. La LMC surge en ocasiones tras la aparente curación de la LC, incluso años más tarde, y se manifiesta como lesiones en la mucosa bucal y nasal, produciendo destrucción del tejido, lo que provoca graves desfiguraciones en el rostro. La mortalidad en este tipo de leishmaniosis es baja.
4. Leishmaniosis cutánea difusa (LCD): Causada por la infección de *L. amazonensis* y *L. mexicana*. Ocurre principalmente en América Central y la cuenca del Amazonas. La LCD produce lesiones diseminadas y crónicas en la piel similares a las de la lepra.
5. Leishmaniosis dérmica post kala-azar (LDPK): causada por *L. donovani* tras la curación de la LV. Se manifiesta con lesiones en la piel y se distribuye fundamentalmente en la India.

Tradicionalmente el tratamiento de la leishmaniosis se ha realizado con compuestos de antimonio pentavalente, como el estibogluconato de sodio (Pentostan<sup>®</sup>), y el antimoniato de meglumina (Glucantime<sup>®</sup>), y como fármacos de segunda elección, se emplean la anfotericina B y la pentamidina. Estos medicamentos, presentan numerosos inconvenientes por su forma de administración y sus efectos adversos (Herwaldt, 1999). Esto, asociado a la aparición de cepas resistentes a estos fármacos, hace de la búsqueda de nuevos compuestos y nuevas dianas terapéuticas una prioridad en la lucha contra la leishmaniosis (revisado por (Santos et al, 2008)).

### **1.2.1.- La leishmaniosis en España.**

En España y en toda la cuenca mediterránea, la especie presente es *L. infantum*. La OMS, en un informe del año 2000, declaró España como una de las zonas donde la leishmaniosis está emergiendo con mayor fuerza. De hecho, estudios más recientes indican que el número de hospitalizaciones por LV continua aumentando, estimándose la tasa de incidencia en un 0,4 por cada 100.000 habitantes al año, existiendo en un 42% de los casos coinfección con VIH. Según indica este mismo estudio, Madrid y Castilla La Mancha son las comunidades autónomas donde se presenta un mayor número de infecciones (Valcarcel et al, 2008).



La LV canina supone un importante problema veterinario en la Península Ibérica. El índice de parasitación en perro se encuentra en torno al 10% (Amela et al, 1995), suponiendo un importante reservorio para el parásito y facilitando la transmisión a humanos. Regiones que tradicionalmente se han considerado libres de leishmaniosis canina, como la zona Noroeste de la Península, resultan con elevados índices de seroprevalencia que en algunas localidades alcanzan el 26% (Amusatogui et al, 2004).

Por otra parte, datos de prevalencia de la infección en canidos salvajes, sugieren que existe un ciclo de transmisión silvestre independiente del perro, lo que da una nueva dimensión al problema y una mayor complejidad para su erradicación (Sobrino et al, 2008).

### **1.3.- Biología Molecular de *Leishmania*.**

Los tripanosomátidos, familia a la que pertenece el género *Leishmania*, son organismos que aparecieron muy pronto en la evolución de los eucariotas. Mediante análisis filogenéticos, se ha podido determinar que son unos de los primeros organismos que aparecen tras la adquisición de la mitocondria (Hannaert et al, 2003). Como reflejo de esta localización filogenética, estos parásitos presentan una serie de características muy peculiares tanto de organización como de regulación de la expresión génica.

#### **1.3.1.- El genoma**

*Leishmania* es un organismo diploide que se reproduce de forma asexual por fisión binaria. Su genoma tiene un tamaño aproximado de 35 Mb (Ivens et al, 1998) organizado en 34-36 cromosomas cuyo tamaño oscila entre 0,3 y 2,5 Mb (Wincker et al, 1996). Estos cromosomas, al igual que en otros protozoos, no aparecen condensados en ningún momento del ciclo celular. Por ello, para poderlos visualizar es necesario recurrir a técnicas como la electroforesis en campo pulsado (PFGE), o más recientemente PFGE bidimensional (2D-PFGE) (Hernandez-Rivas R, 1997). De los 36 cromosomas que posee, 32 de ellos están altamente conservados en las distintas especies de *Leishmania*, existiendo reorganizaciones génicas en los otros 4 cromosomas (Britto et al, 1998).

## INTRODUCCIÓN

---

El primer cromosoma secuenciado en *Leishmania* fue el cromosoma 1 de *L. major*. Tiene un tamaño de 285 Kb. En su región central se localizan 79 secuencias codificantes (257 Kb), organizadas en dos largas agrupaciones policistrónicas. Ambas agrupaciones están codificadas en diferentes hebras del ADN, y orientadas de tal forma que el ARNm es transcrito de forma divergente y hacia los telómeros (Myler et al, 1999). La finalización del proyecto genoma ha demostrado que lo observado en el cromosoma 1 puede ser extrapolado al resto de los cromosomas. En general, los genes en *Leishmania* están organizados en largas agrupaciones con una misma orientación transcripcional y situados en la misma hebra del ADN. Pueden existir uno o varios puntos de divergencia dentro de un cromosoma donde la orientación de los genes se invierte (Ivens et al, 2005).

Los genes de tripanosomátidos carecen de intrones, a excepción del gen de la poli(A) polimerasa (Mair et al, 2000). Algunos pueden presentarse como copia única en el genoma: el gen codificante para la proteína de unión a poli(A) *LmPABP1* (Bates et al, 2000), el gen de la hidroximetilglutaril-CoA reductasa *HMG-CoA* (Montalvetti et al, 2000), ambos de *L. major*, o el de la enzima 3' nucleotidasa-nucleasa de *L. mexicana* (Sopwith et al, 2002). Sin embargo, es habitual que los genes aparezcan en múltiples copias, localizados en agrupaciones dispuestas en tándem o dispersas por el genoma. Así, los genes de la amastina en *L. major*, presentan 55 copias repartidas en 7 cromosomas (Rochette et al, 2005). Otro ejemplo de agrupación génica, descrito en *L. mexicana*, son los tres genes que codifican para uno de los componentes de la proteína del segmento paraflagelar *PFR-2* (Moore et al, 1996). En el genoma de *Leishmania* también son muchos los genes que se agrupan en parejas, como el gen de la metionina adenosiltransferasa de *L. infantum* (Reguera et al, 2002) o los de las proteínas ácidas ribosomales del mismo organismo, *LiP2a*, *LiP2b* y *LiP0* (Soto et al, 1993b), (Soto et al, 1993a). Las regiones codificantes de los genes repetidos están muy conservadas mientras que las regiones 5'- o 3'- no traducidas 5' UTR o 3' UTR (del inglés: "Untranslated Región") pueden estar conservadas o presentar importantes diferencias en su secuencia. Las variaciones en las secuencias de estas regiones pueden estar relacionadas con la expresión diferencial de los genes. Como ejemplo, los genes que codifican por la cistein-proteasa de *L. donovani* presentan cinco copias con tres regiones 3' UTR diferentes. Dos de estas regiones producen una expresión constitutiva, mientras

que la tercera permite una expresión predominante en las formas promastigotes (Mundodi et al, 2002).

Finalmente, es necesario indicar que en *Leishmania* los procesos de amplificación génica tienen especial importancia tanto en la biología como en la evolución de estos organismos (revisado por (Beverley, 1991)). Existen numerosos casos de amplificación génica descritos en *Leishmania*, la mayoría de ellos relacionados con procesos de resistencia a drogas, aunque también hay algunos casos de amplificación en poblaciones salvajes. El caso de la amplificación del gen de la dihidrofolato reductasa-timidilato sintasa (DHFR-TS), descrita en aislados de *L. major* tratados con metotrexato, es uno de los ejemplos mejor estudiados (Ellenberger & Beverley, 1987), (Ellenberger et al, 1989). Por otra parte, parásitos resistentes a tunicamicina han mostrado tener diferentes amplificaciones génicas extracromosómicas, entre las que se incluye el gen de la glucosil-transferasa (Katakura et al, 1991). La estabilidad de estos amplificados varía dependiendo del caso. Normalmente, la estabilidad de las amplificaciones generadas en cepas resistentes a fármacos desciende rápidamente tras la retirada del fármaco (Wilson et al, 1991). Sin embargo, también está descrito que en algunos casos estos amplificados pueden mantenerse tras la retirada de la droga (Beverley et al, 1984). Entre los procesos de amplificación se han encontrado repeticiones en tándem de genes que codifican para productos esenciales requeridos en abundancia (como tubulina, ARNr o el miniexón), amplificaciones de fragmentos cromosómicos más o menos cortos de forma lineal o circular y cambios en la ploidía de determinados genes (revisado por (Victoir & Dujardin, 2002) y (Cruz et al, 1993)).

### **1.3.2.- Expresión génica**

Otra característica que presenta *Leishmania*, tan llamativa al menos como su organización génica, es la ausencia de secuencias promotoras en el genoma para la ARN polimerasa II (sensible a  $\alpha$ -amanitina), responsable de la transcripción de la mayor parte de los ARN mensajeros celulares. Como consecuencia, esta polimerasa puede transcribir cualquier ADN que sea incorporado al núcleo, aunque carezca de secuencias promotoras (revisado por (Clayton, 2002)). No obstante, en estudios recientes realizados sobre el cromosoma 1 de *L. major*, se ha observado que existe una región aproximadamente 100 pb por encima del primer gen de una de las agrupaciones, donde

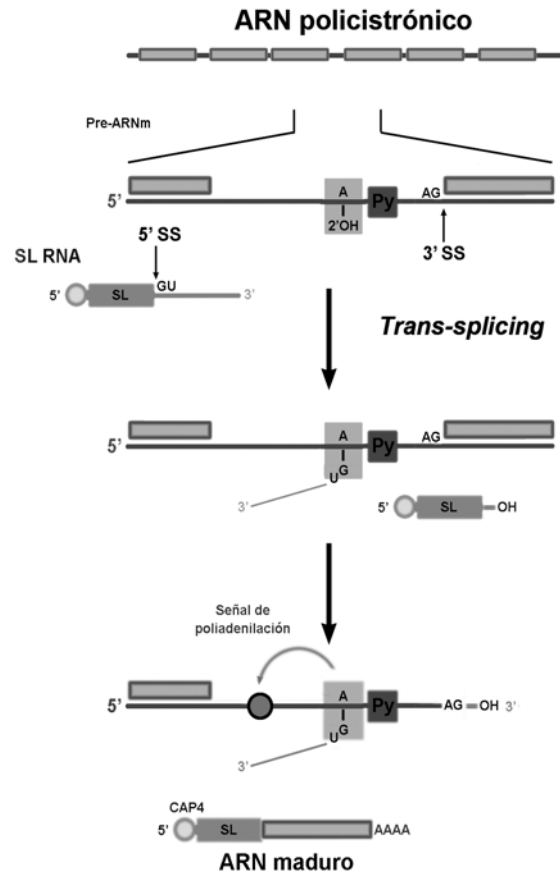
## INTRODUCCIÓN

---

parece iniciarse la transcripción, aunque no se ha podido determinar qué peculiaridad existe en esta región para favorecer la unión preferente de la polimerasa (Martinez-Calvillo et al, 2005). Esta falta de regulación del inicio de la transcripción, punto de control de la expresión génica más común en la mayoría de los organismos estudiados, hace que la expresión génica en *Leishmania* tenga que ser gobernada fundamentalmente a nivel post-transcripcional (Clayton & Shapira, 2007).

La ARN polimerasa II de *Leishmania* realiza una transcripción policistrónica de las unidades génicas presentes en sus cromosomas. Los policistrones son procesados mediante las reacciones de *trans-splicing* y poliadenilación para generar su forma traducible (monocistrónica) (figura 2). El *trans-splicing* consiste en la adición de 39 nt de ARN denominado miniexón o secuencia *líder* en el extremo 5' del ARN procesado. Este miniexón, común a todos los ARN mensajeros, es cedido por un ARNm (también denominado SL-RNA) a los mensajeros del policistrón (Perry K, 1991). El miniexón dota de estructura cap a la región 5' de todos los ARNm. Esta estructura se denomina cap4, y presenta además de la conservada 7-metilguanosa unida por enlaces 5'-5' trifosfato al primer nucleótido del ARNm, otras modificaciones en los primeros 4 nucleótidos que no están presentes en otros eucariotas, como la 2'-O metilación de las primeras cuatro ribosas, así como la metilación de la primera adenina y del cuarto uracilo. La nomenclatura para la estructura cap4 de tripanosomátidos es m<sup>7</sup>Gpppm<sub>3</sub><sup>6,6,2'</sup>Apm<sup>2'</sup>Apm<sup>2'</sup>Cpm<sub>2</sub><sup>3,2'</sup>U (Lewdorowicz et al, 2004). A pesar de esta variación en la estructura 5' CAP del ARNm, los transcritos de *Leishmania* son traducibles por la maquinaria traduccional de otros eucariotas, como ha sido demostrado por ensayos de traducción *in vitro*, usando tanto extractos de germen de trigo como lisado de reticulocito de ratón (Compagno et al, 1999).

El sitio de adición del miniexón está constituido por el dinucleótido AG, precedido de regiones ricas en pirimidinas (Huang & Van der Ploeg, 1991). El proceso es co-transcripcional y está asociado a la poliadenilación en 3' del gen precedente en el policistrón. En *Leishmania*, a diferencia de otros eucariotas, no se han encontrado secuencias consenso para la adición de la cola de poli(A). Ocurre entre 100 y 300 pb corriente arriba del sitio de adición del miniexón (Benz et al, 2005).



**Figura 2.-** Representación esquemática de la maduración de los ARN policistrónicos característica de tripanosomátidos. Se indica el sitio de adición del miniexón (3' SS) determinado por la posición del dímero AG localizado corriente abajo del grupo de pirimidinas (Py). El lugar de poliadenilación no presenta una secuencia consenso, sino que viene determinado por el sitio de adición del miniexón (100 – 300 nucleótidos corriente arriba). CAP4, es el nombre que recibe la estructura CAP característica de tripanosomátidos, diferente de la que presentan otros eucariotas.

Otro proceso relacionado con la maduración de transcritos en *Leishmania* es el *editing* de los ARNm mitocondriales. Este proceso consiste en la eliminación o adición de uridinas en el ARNm (revisado por (Stuart et al, 1997)). El primer caso descrito de *editing* fue en el transcrito de la subunidad II de la citocromo oxidasa (COII) de *L. tarentolae*, donde se observó que la secuencia codificada en el ADN del kinetoplasto no conservaba la fase de lectura a lo largo de la región codificante (de la Cruz et al, 1984). Posteriormente, se pudo demostrar que cuatro uridinas no codificadas en el ADN son incluidas en el transcrito, generando así un ARNm maduro funcional (Benne et al, 1986).

## INTRODUCCIÓN

---

Aunque no existen muchos datos en la bibliografía que indaguen sobre los mecanismos de transporte del ARNm procesado hasta los ribosomas, estudios realizados sobre la proteína de unión a poli(A) de *L. major* (LmPABP, del inglés “Poli(A) binding protein”) demostraron una interacción específica de esta proteína (localizada tanto en el núcleo como en el citoplasma) con el ARN poli(A)<sup>+</sup> (Bates et al, 2000).

La formación del complejo de inicio de la traducción en eucariotas, a excepción de la traducción mediada por secuencias IRES (del inglés “*Internal Ribosome Entry Sites*”), depende de la interacción de la estructura cap con eIF4E. Este factor está incluido en un complejo de proteínas denominado eIF4F del que forman también parte eIF4G, que actúa de soporte para los otros factores, y eIF4A, que presenta actividad helicasa. Este complejo escanea la región 5' UTR hasta el ATG iniciador, y es en este momento cuando se produce la unión de la subunidad grande del ribosoma y comienza la traducción (Gingras et al, 1999; Pestova et al, 2001). La interacción de eIF4F con la proteína de unión al poli(A) produce una circularización del ARNm que está siendo traducido, lo que se postula que favorece el proceso de traducción, por aproximar los ribosomas que han finalizado, al extremo 5' del ARNm traducido, para iniciar una nueva síntesis de la proteína (Preiss & Hentze, 1999).

No se conocen en profundidad los mecanismos moleculares responsables de la traducción en *Leishmania*. Mediante análisis de las bases de datos, se han identificado un conjunto de proteínas homologas a los factores de inicio de la traducción de eucariotas superiores que forman parte del complejo eIF4F. Del factor LeishIF4E (homologo a eIF4E), aislado de *L. major*, se ha demostrado su interacción con la estructura cap4 (Yoffe et al, 2004). En trabajos más recientes, y también a partir de la base de datos de *L. major*, se han aislado cuatro homólogos a eIF4E (*LmEIF4E1-4*). Sólo *LmEIF4E1*, que se corresponde con *LishIF4E* comentado anteriormente, ha mostrado capacidad de unión a 7-metil-GTP. Dos homólogos a eIF4A (*LmEIF4A1-2*) y cinco a eIF4G (*LmEIF4G1-5*) han sido aislados. Mediante ensayos de *pull-down* se ha demostrado la interacción específica de *LmEIF4G3* con *LmEIF4A1* (Dhalia et al, 2005).

### 1.3.3- Regulación de la expresión génica.

Dada la ausencia de secuencias promotoras, los mecanismos de regulación de la expresión génica en *Leishmania* han de actuar de forma post-transcripcional. Se han descrito diferentes mecanismos de control que pueden actuar de forma coordinada en la regulación de la expresión de diferentes familias génicas.

#### 1.3.3.1.- Procesamiento de los ARNm.

Aunque se han descrito muy pocos casos de genes regulados a este nivel en *Leishmania* y en otros kinetoplastidos, el primer punto de regulación de la expresión génica en *Leishmania* está relacionado con el procesamiento de los policistrones. Variaciones en las secuencias próximas al AG aceptor de *splicing* pueden alterar la eficiencia del proceso de adición del miniexón y, por tanto, alterar también la poliadenilación del gen precedente en el policistrón (LeBowitz et al, 1993). Una familia génica cuya expresión se regula a este nivel es la de los genes codificantes para las cisteín-proteasas B (CPB) de *L. mexicana*. Las copias *CPB1* y *CPB2* se expresan en promastigotes metacíclicos, mientras que el resto de variantes génicas se expresan en la forma amastigote. Su expresión diferencial está controlada en *cis* por un elemento de secuencia localizado en las regiones intergénicas de las copias de expresión en formas metacíclicas, denominado InS, que promueve una mejora del procesamiento del ARNm en esa fase del ciclo de vida (Brooks et al, 2001). También se ha descrito que el aumento en los niveles de diferentes proteínas de choque térmico en situación de estrés celular está controlado, entre otros mecanismos post-transcripcionales, por un mejor procesamiento de los transcritos tanto en *Leishmania* (Zilka et al, 2001) como en *Trypanosoma* (Muhich & Boothroyd, 1989). Por último, otro ejemplo de regulación de la expresión génica mediada por el *trans-splicing* ha sido observado en algunos genes de expresión asociada a la fase S del ciclo celular en el tripanosomátido *Crithidia fasciculata*. La presencia de un elemento de secuencia de 8 nucleótidos en la región intergénica se ha asociado con un mejor procesamiento del gen situado corriente abajo durante la fase S del ciclo celular (Mahmood et al, 2001). Este elemento se ha denominado CCRE (del inglés “*Cell Cycle Regulatory Element*”) y puede presentarse en otras localizaciones. Dependiendo de su localización, se ha relacionado con otros

procesos de regulación post-transcripcional, que de forma conjunta producen un aumento en los niveles de los ARNm de genes de expresión en fase S (Zick et al, 2005).

### 1.3.3.2.- Estabilidad de mensajeros

La estabilidad de los ARN mensajeros en *Leishmania* es uno de los puntos más importantes de regulación de la expresión génica en este parásito. Existen muchos trabajos en la bibliografía que establecen la estabilidad de transcritos como el punto fundamental del control de la expresión génica. Un claro ejemplo es el de los genes de expresión exclusiva en la forma amastigote. Pese a que estos genes se transcriben en ambas fases del ciclo de vida del parásito, sus ARNm sólo se presentan en la forma intracelular del parásito. Los más estudiados son los genes codificantes para las proteínas A2 y amastina. La expresión de los genes de ambas familias proteicas está mediada por un aumento en la estabilidad de los transcritos durante esa fase del ciclo de vida, de manera que sus ARNm se acumulan en la fase amastigote (Charest et al, 1996), (Wu et al, 2000). Se ha relacionado el aumento de estabilidad de estos ARNm con la presencia de una región de 450 nt localizada en la región 3' UTR. Esta región está presente en otros genes de expresión asociada a la forma amastigote (Rochette et al, 2005), (McNicoll et al, 2005). De la misma forma, las regiones 3' UTRs contienen elementos reguladores en los genes de expresión en la fase promastigote. Así, se ha definido un elemento de secuencia de 10 nucleótidos en la región 3' UTR de los genes codificantes para la proteína paraflagelar ROD de *L. mexicana*, responsable de la degradación de estos mensajeros en la forma amastigote (Mishra et al, 2003).

En el proceso de metaciclogénesis los cambios en la expresión de ciertas moléculas de superficie tienen una gran importancia para la virulencia del parásito. En el caso de la glicoproteína mayoritaria de superficie GP63, también denominada MSP (del inglés "*Major Surface Protease*"), existen diferentes copias que son expresadas diferencialmente durante el ciclo de vida. En *L. chagasi* existen distintas copias génicas que presentan diferencias en sus regiones 3' UTR. Mientras algunas de ellas son expresadas de forma constitutiva (*MSPC*), otras son específicas de la fase logarítmica (*MSPL*), y existen otras copias cuyos ARNm son estabilizados y acumulados únicamente en la forma metacíclica del parásito (*MSPS*) (Brittingham et al, 2001). La



expresión diferencial de estos genes está controlada de nuevo por secuencias presentes en cada una de las diferentes regiones 3' UTR (revisado por (Yao et al, 2003)).

La existencia de diferentes regiones 3' UTR en genes de la misma familia que presentan una expresión diferencial también ha sido descrito para la proteína de choque térmico HSP70. En el caso de la HSP70 de *L. infantum* existen dos tipos de genes denominados tipo I y tipo II, que se diferencian en las secuencias presentes en dichas regiones. Mientras que los niveles de los transcritos de la HSP70-II no sufren variaciones durante el choque térmico, los ARN mensajeros tipo I experimentan un proceso de acumulación en promastigotes mantenidos a esa temperatura. Se ha podido determinar la existencia de una secuencia de aproximadamente 100 nucleótidos en la región 3'UTR-I, imprescindible para esta acumulación (Quijada et al, 2000). Por el contrario, todos los ARNm codificantes para la HSP83 de *L. infantum* sufren una acumulación cuando los promastigotes son sometidos a temperaturas de 37 °C. Esta acumulación se ha relacionado con un fenómeno de aumento de la estabilidad de los transcritos en esas condiciones. En este caso, ambas regiones UTR (5' y 3') están implicadas en el control (Zilka et al, 2001), (Larreta et al, 2004).

Globalmente, todos estos resultados ponen de manifiesto la importancia de las regiones no traducidas en el control de la estabilidad de los mensajeros de este parásito.

### **1.3.3.3.- Traducción de mensajeros**

En los últimos años se ha descrito la existencia de genes cuya expresión se regula mediante el control de la traducción de sus ARNm. Un ejemplo representativo son los mensajeros de la amastina, que durante el proceso de diferenciación aumentan hasta 20 veces su tasa de traducción. La misma secuencia de 450 nt, localizada en la región 3' UTR, que fue implicada en el aumento de la estabilidad de los ARNm, es también responsable de este fenómeno (Boucher et al, 2002). En este caso coexisten dos mecanismos diferentes que controlan de forma post-transcripcional la expresión: un aumento de la estabilidad, comentado anteriormente, y este aumento de la traducción. Esto demuestra que los diferentes mecanismos de regulación no tienen por qué ser excluyentes. Otro claro ejemplo de regulación traduccional controla la expresión de los genes HSP70-II de *L. infantum*. Los ARNm de estos genes se encuentran acumulados

## INTRODUCCIÓN

---

en la célula sin ser traducidos hasta que, en condiciones de estrés térmico, se produce una activación de su traducción (Folgueira et al, 2005). La expresión de las histonas en *Leishmania* se encuentra regulada fundamentalmente a nivel traduccional (Soto et al, 2004).

El papel de las regiones no traducidas en el control traduccional en tripanosomátidos queda generalmente restringido a la región 3' UTR. La región 5' UTR queda relegada a un segundo plano, actuando únicamente de forma sinérgica con la región 3' UTR (revisado por (Clayton & Shapira, 2007)). Por ejemplo, la participación junto con la región 3' UTR en el control de la estabilización y traducción de los mensajeros de la proteína HSP83, comentado anteriormente (Zilka et al, 2001). Se ha demostrado que en el miniexón de los ARN mensajeros de *L. tarentolae* hay elementos que favorecen la unión a ribosomas (Zeiner et al, 2003). Además, existen algunos datos en la bibliografía que indican que ciertos tripletes localizados corriente arriba del ATG iniciador favorecen o afectan al inicio de la traducción (Lukes et al, 2006). Pero en ningún caso se han descrito en tripanosomátidos elementos de secuencia en la región 5' UTR responsables de controlar la traducción de los mensajeros.

### **2.- El ciclo celular**

El ciclo de división de la mayoría de las células consiste en la sucesión coordinada de cuatro procesos: crecimiento celular, replicación del ADN, distribución de los cromosomas duplicados a las células hijas y división celular. En las células eucariotas, el ciclo celular puede dividirse en cuatro etapas: la fase M, donde se produce la mitosis; la fase G<sub>1</sub>, entre mitosis y la replicación del ADN; a continuación, la fase de síntesis (S), en la que el ADN es replicado y, por último, la fase G<sub>2</sub>, en la que la célula continúa creciendo y preparándose para la mitosis.

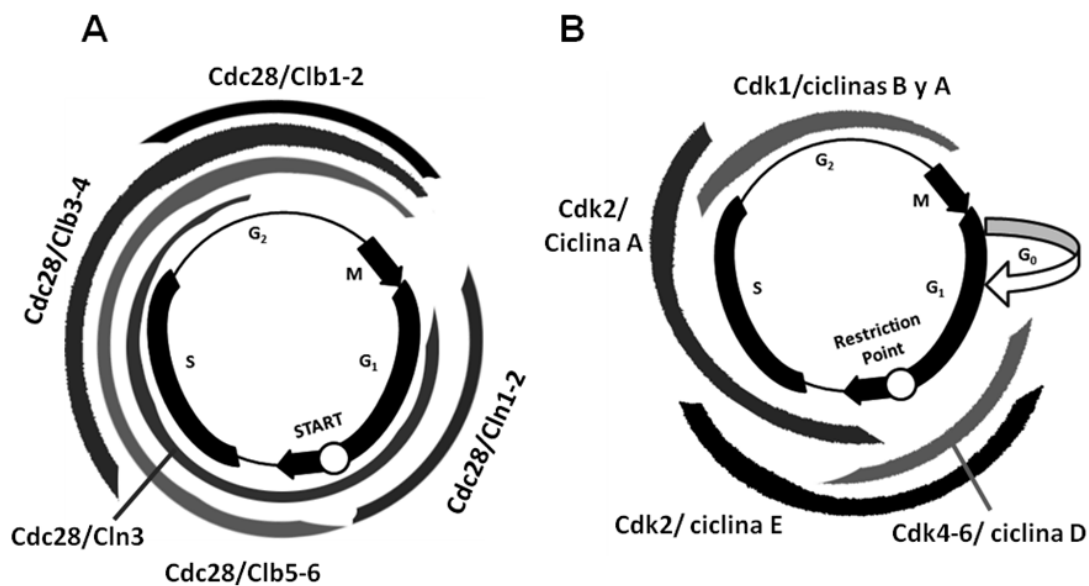
La progresión a través de estas fases se realiza por un mecanismo muy controlado, regulado por señales internas y externas a la célula. El principal punto de control se encuentra al final de la fase G<sub>1</sub> y controla la progresión entre las fases G<sub>1</sub> y S. En levaduras se denomina START y una vez atravesado la célula está comprometida para entrar en fase S y sufrir mitosis. La proliferación, en la mayoría de las células animales, está regulada en G<sub>1</sub> de forma similar. El punto de control en este caso se denomina “*restriction point*”, y el paso a través de este punto está regulado por factores de crecimiento (Alberts B, 2002a).

En los tripanosomátidos, la duplicación del material genético ocurre de forma sincronizada en el núcleo y en el kinetoplasto durante la fase S del ciclo celular (Ploubidou et al, 1999), mientras que en el resto de organismos estudiados, la replicación del ADN mitocondrial ocurre de forma desincronizada.

#### **2.1.- Control del ciclo celular**

Tanto las levaduras como los mamíferos mantienen mecanismos homólogos para controlar el paso de una fase del ciclo celular a otra. Estos mecanismos precisan de la activación de heterodímeros formados por una ciclina y una kinasa dependiente de ciclina (CDKs, del inglés “*Cyclin Dependent Kinase*”). En levaduras tan sólo existe una kinasa dependiente de ciclina (denominada Cdc2, en *Sacharomyces cerevisiae* y Cdc28, en *Schizosaccharomyces pombe*), (Nasmyth, 1993). La actividad de estas kinasas está controlada por su interacción con ciertas ciclinas que dan la especificidad del sustrato. Existen 3 ciclinas de fase G<sub>1</sub>, Cln1, Cln2 y Cln3. Cdc28 durante la fase S, interacciona

con las ciclinas tipo B (Clb5 y Clb6). Las otras cuatro ciclinas tipo B de levaduras (Clb1-Clb4) controlan la actividad de la kinasa durante el final de la fase S y la mitosis. Por otra parte, en mamíferos, se han identificado cinco CDKs: Cdk1, Cdk2, Cdk3, Cdk4 y Cdk6, y diez diferentes ciclinas (A1, A2, A3, B1, B2, D1, D2, D3, E1, E2 y F), que están directamente implicadas en los procesos de división de la célula (revisado por (Harper & Adams, 2001)). En la figura 3 se representa el momento de acción de los diferentes complejos CDK-Ciclina a lo largo del ciclo celular, tanto en mamíferos como en levaduras.



**Figura 3.-** Representación esquemática del momento de acción de los diferentes complejos CDK/ciclina que controlan el avance del ciclo celular. **A.** Levaduras, donde sólo existe la ciclina Cdc28 (o Cdc2). **B.** Mamíferos.

Por otro lado, la actividad de estas kinasas está no sólo controlada por la interacción con las ciclinas, sino que también existen factores implicados en la inhibición de dichas proteínas. Estos factores inhibidores de kinasas reciben el nombre de CKIs (del inglés “*CDK inhibitors*”), y son responsables, en gran medida, del control de la regulación del ciclo celular, actuando como reguladores positivos o negativos de la progresión de unas fases del ciclo a otras (revisado por (Sherr & Roberts, 1999)).

Se ha avanzado mucho en el conocimiento sobre los factores implicados en la regulación del ciclo celular en tripanosomátidos. Han sido caracterizadas siete ciclinas en *T. brucei*, CycE1-E4, CycB1-B3, y otras dos más recientemente rescatadas por

homología de secuencia de las bases de datos Cyc11 y Cyc12. Por su parte, doce diferentes CDKs han sido descritas en este mismo organismo (que se nombran CRK1-12) (revisado en (Gourguechon et al, 2007)). La mayor parte de estos factores han sido clonados y caracterizados también en *L. mexicana*, lo que sugiere que los mecanismos moleculares implicados en el control del ciclo celular están conservados en estos dos organismos (Mottram et al, 1993). También se conoce el momento de acción de algunas CRKs y la ciclina con la que interacciona. La ciclina 1 de *L. donovani* (LdCyc1) se asocia con CRK3 durante la fase S, existiendo evidencias para relacionarlo con la implicación de este dímero en diferentes actividades durante esta fase del ciclo celular (Banerjee et al, 2006). En *T. brucei* a la ciclina E1 se le han atribuido al menos tres funciones. Por un lado forma un complejo con CRK1 y promueve la transición entre G<sub>1</sub> y S, donde también interacciona con CRK2 controlando la posterior morfogénesis. Además, también está implicada, mediante su interacción con CRK3, en el avance durante la fase G<sub>2</sub>/M (Gourguechon et al, 2007). Mediante ensayos de ARN de interferencia (ARNi), la ciclina Cyc6 ha demostrado ser esencial para el desarrollo de la mitosis en *T. brucei*, y su interacción con CRK3 también ha sido demostrada (Hammarton et al, 2003).

### **2.2.- Control de la expresión génica asociado a la fase S**

La entrada en fase S es uno de los puntos más importante del control del ciclo celular. Las ciclinas E, D y A, en combinación con Cdk4 y Cdk2, promueven la entrada y desarrollo de la síntesis del ADN en mamíferos (Harper & Adams, 2001). Entre otras dianas fosforiladas por estos complejos se incluyen ciertas familias de inhibidores de factores de transcripción, fundamentalmente la familia de proteínas de retinoblastoma (Rp), que actúan inhibiendo la familia de factores de transcripción E2F. La fosforilación de Rp por el complejo ciclina E/Cdk2 produce su separación de los factores E2F, que interaccionan y activan ciertas regiones promotoras, lo que promueve la transcripción de genes relacionados con la fase S (revisado por (Pardee et al, 2004)). Entre otros genes que son activados transcripcionalmente se encuentra el de la ciclina A, encargada de la progresión de la replicación, así como otros factores de transcripción (NPAT, implicado en la transcripción de las histonas), enzimas implicados en la síntesis de desoxinucleótidos (dihidrofolato reductasa, timidina kinasa, etc.) y en la replicación del ADN (topoisomerasas, ADN polimerasas, etc.) (Ye et al, 2003). El control

transcripcional es el mecanismo más importante de regulación de la expresión asociada a la fase S tanto en levaduras (Breedon, 1988), (Koch & Nasmyth, 1994) como en mamíferos (Pardee et al, 2004). No obstante, existen algunos genes de expresión asociada a la fase S regulados exclusivamente a nivel post-transcripcional, como el caso de la timidilato sintasa de ratón, cuyos niveles de ARN mensajero aumentan hasta 20 veces durante la fase S, sin existir variaciones en su tasa de transcripción. Se ha demostrado un control a nivel de la eficiencia del proceso de *splicing* (Ke et al, 1996).

La ausencia de secuencias promotoras para la ARN polimerasa II característica de tripanosomátidos hace que, del mismo modo que ocurre para otros procesos, la regulación de la expresión génica asociada a la fase S en estos organismos esté gobernada exclusivamente a nivel post-transcripcional. La mayor parte de los estudios enfocados a esclarecer los mecanismos moleculares que regulan la expresión asociada al ciclo celular en tripanosomátidos han sido realizados sobre *C. fasciculata*. Mediante la sincronización de cultivos con hidroxiaurea (HU) se ha podido demostrar que los ARN mensajeros de genes relacionados con la replicación tanto del ADN nuclear, como del ADN del kinetoplasto, sufren una acumulación en sus niveles durante la fase S del ciclo celular, sin existir variación en su tasa de transcripción (Pasion et al, 1994). El análisis de las regiones UTRs de algunos de estos genes mostraron la presencia de un elemento de secuencia de 8 nucleótidos, portando un hexámero central altamente conservado (CATAGA) y denominado CCRE. Anteriormente se comentó la implicación de este elemento en la mejora del procesamiento del ARN de algunos genes a su forma madura, como el de la ADN topoisomerasa del kinetoplasto (*TOP2*), donde la presencia de CCRE en su región 5'UTR, parece estar reprimiendo el *trans-splicing* durante la fase G<sub>2</sub>/M, induciendo la degradación del transcrito durante esta fase (Pasion et al, 1996). Existen también trabajos donde se postula un papel desestabilizador de este elemento, como el caso del gen *RPA1*, que codifica para la proteína de replicación nuclear A (p51). En ambos casos el elemento se encuentra localizado en secuencias 5' UTR de los genes. Sin embargo, también se ha descrito su presencia en regiones 3' UTR, como en el caso del ARN mensajero de la proteína de unión al kinetoplasto 3 (KAP3) (Avliyakov et al, 2003). En todos los casos, este elemento ha sido implicado en la regulación negativa de los niveles de mensajero fuera de la fase S. Más recientemente, este mismo elemento ha sido utilizado para rescatar de la base de datos de *L. major* genes de expresión asociada a la fase S. Se ha observado que aquellos genes que lo

## INTRODUCCIÓN

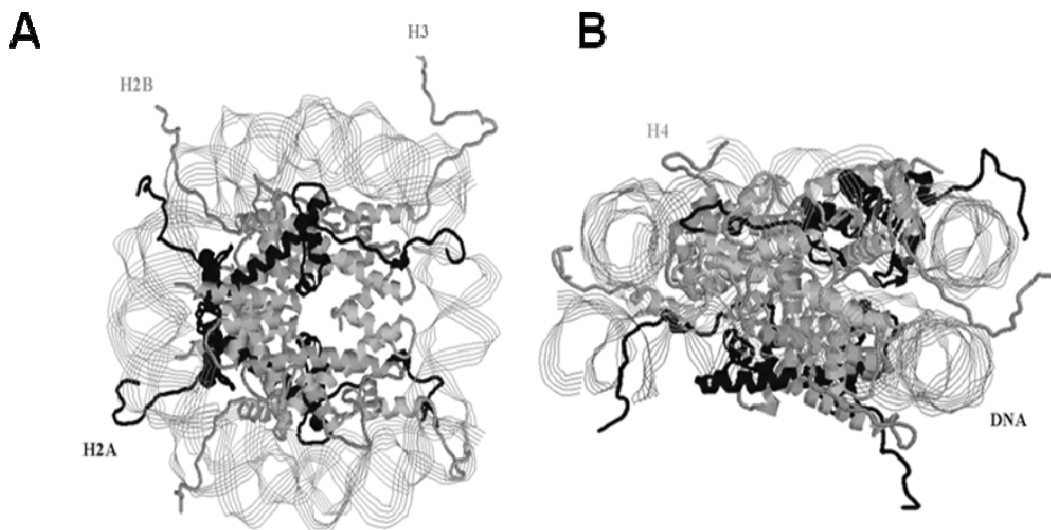
---

contienen presentan un aumento en los niveles de sus transcritos durante esta fase del ciclo celular (Zick et al, 2005). También en *T. brucei* la presencia de CCRE se ha relacionado con una regulación asociada a la fase S. Así, genes codificantes para proteínas implicadas en la replicación del ADN del kinetoplasto como *Tbp93*, fueron rescatados por presentar el elemento CCRE en su región UTR, demostrándose la acumulación de sus ARNm durante la fase S (Li et al, 2007).

Los factores en *trans* que interaccionan con esta secuencia también han sido aislados y caracterizados; son los denominados CSBP (del inglés “*Cycling Sequence Binding Protein*”). Existen dos complejos capaces de interaccionar específicamente con CCRE. El primero de estos complejos se aisló mediante columnas de afinidad portando moléculas de ARN incluyendo 6 copias del elemento. Está formado por dos proteínas CSBPA y CSBPB, formando hexámeros de la forma  $A_3B_3$ , con una masa molecular de 209 KDa. Además, se ha demostrado que este complejo mantiene la capacidad de unión a CCRE durante todo el ciclo celular, viéndose alterado el estado de fosforilación de ambas proteínas durante las diferentes fases (Mahmood et al, 2001; Mahmood & Ray, 1998). El segundo complejo de interacción con CCRE fue aislado siguiendo la misma técnica, usando extractos de parásitos doble deficientes para *CSBPA* y *CSBPB*. Este nuevo complejo, denominado CSBP II, está formado por 3 proteínas denominadas RBP68, RBP52 y RBP33. La primera pertenece a la familia de proteínas de unión al poli(A), mientras que las otras dos no han sido funcionalmente identificadas (Mittra & Ray, 2004; Mittra et al, 2003).

### 3.- Las histonas

Las histonas son las principales proteínas estructurales de los cromosomas eucariotas. Esta familia de proteínas, caracterizadas por su pequeño tamaño y su alto contenido en aminoácidos básicos (fundamentalmente lisinas y argininas), se pueden clasificar en dos grupos principales: las histonas nucleosomales (histonas H2A, H2B, H3 y H4) y la histona H1. Las primeras están entre las proteínas más conservadas que se conocen, fundamentalmente las histonas H3 y H4 (Malik & Henikoff, 2003). Su tamaño oscila entre los 100 y los 140 aminoácidos. Las histonas tienen un cuerpo globular de interacción con las otras histonas (donde se encuentra la mayor conservación evolutiva), y un dominio protuberante donde se concentran la mayor parte de los aminoácidos básicos de interacción con el ADN del nucleosoma. El nucleosoma se forma cuando 146 pb de ADN son empaquetados alrededor del multímero formado por la interacción de dos de cada una de estas proteínas, generando la cromatina o fibra de 11 nm (Luger et al, 1997) (Figura 4).



**Figura 4.-** Modelo del nucleosoma generado a partir de la estructura cristalográfica. **A** y **B** vista superior y lateral, respectivamente, del nucleosoma. En la figura se muestra la posición en el nucleosoma de las cuatro parejas de histonas y el ADN (obtenido de [www.pdb.org](http://www.pdb.org)).

Por otra parte, la histona H1 es generalmente de mayor tamaño y no presenta el grado de conservación de las anteriores. Presenta tres dominios, uno globular, central, que interacciona con el ADN saliente y entrante del nucleosoma, y los extremos amino y carboxilo terminal que interaccionan tanto con los fosfatos del ADN *linker*, que se



extiende entre dos nucleosomas, como con el extremo amino-terminal de las histonas del nucleosoma. De este modo, la histona H1 puede unir dos nucleosomas contiguos, generando un mayor grado de condensación del ADN, formando la denominada fibra de 30 nm; paso previo a la formación de los cromosomas (Alberts B, 2002b).

Además de este papel estructural, las histonas tienen una gran relevancia en la biología del ADN. Se han identificado gran cantidad de modificaciones post-traduccionales de las histonas, entre las que se incluyen acetilaciones, metilaciones, fosforilaciones, ADP-ribosilaciones y ubiquitinaciones. Muchas de estas modificaciones se han relacionado con el control transcripcional de algunas familias génicas y con la reestructuración de la cromatina. De hecho, se postula que estas modificaciones en las histonas confieren una información epigenética que puede ser propagada de una generación a otra (revisado por (Strahl & Allis, 2000)). Además de estas modificaciones, existen, tanto en levaduras como mamíferos, las denominadas histonas *variantes*. Estas proteínas, cuando son incluidas en los nucleosomas, pueden marcar ciertas regiones del genoma, lo que se ha demostrado también con implicación directa en la regulación génica de esas regiones (revisado por (Pusarla & Bhargava, 2005)).

Otra función atribuida a estas proteínas es su actividad anti-microbica, estando presentes, por ejemplo, en el líquido amniótico en humanos (Kornberg & Lorch, 1999).

### **3.1.- Control de la expresión génica de las histonas**

Los diferentes genes que codifican para las histonas, en el caso de eucariotas superiores, se encuentran normalmente asociados en tándem en un único cromosoma, existiendo un gran número de copias de dichas agrupaciones (entre 45 y 50 copias en *Xenopus* (van Dongen et al, 1981)). Por su parte, en levaduras existe un menor número de copias y éstas se presentan aisladas, existiendo, en el caso de *Schizosaccharomyces pombe*, una copia aislada de la histona H2A, una copia de la pareja H2A y H2B y tres copias del par H3-H4 (Matsumoto & Yanagida, 1985).

La síntesis de las histonas está altamente asociada con el ciclo celular, y ocurre concomitantemente con la replicación del ADN durante la fase S del ciclo celular. El aumento en los niveles de los ARNm de las histonas es el máximo responsable del

aumento en la síntesis (Jackson & Chalkley, 1985). Este patrón de expresión ha sido un atractivo modelo para el estudio del control de la expresión génica, siendo uno de los ejemplos mejor caracterizados de la regulación génica asociada al ciclo celular.

Tanto en mamíferos como en levaduras, y del mismo modo que ocurre para otros genes de expresión asociada a la fase S, los genes de las histonas presentan regulación transcripcional (Breedon, 1988), (Heintz, 1991). Existen secuencias promotoras que son reconocidas por factores de transcripción específicos que son activados durante la fase S. Como el caso de NPAT (p220) en mamíferos, diana de la ciclina E/Cdk2, que se ha demostrado esencial para la transcripción de los genes de histonas y para el mantenimiento de los *cuerpos de Cajal*, un pequeño orgánulo nuclear donde se produce la transcripción y el procesamiento de los mensajeros de las histonas (Ye et al, 2003). Se han descrito diferentes elementos de secuencias presentes en estas regiones promotoras, las cajas CCAAT, TATA y CAP, son algunas de las más conservadas en diferentes especies (revisado por (Hentschel & Birnstiel, 1981)).

No obstante, en el caso de eucariotas superiores, de las 35 veces que aumentan los niveles de ARNm de las histonas durante la fase S, el aumento de la actividad promotora tan sólo es responsable del aumento de los ARNm entre 3 y 5 veces. Por tanto, la mayor parte del aumento en los niveles de los transcritos es debido a procesos de control post-transcripcionales (Schumperli, 1988). En estos procesos de control está directamente implicada la estructura 3' final de los mensajeros, que presenta un *Stem-loop* de 16 nt altamente conservados, en ausencia de cola de poli(A). En el caso de algunas plantas y levaduras los genes de las histonas sí están poliadenilados y carecen de esta estructura en su región 3' UTR. Existe un factor denominado SLBP (del inglés "*Stem-Loop Binding Protein*") caracterizado como el elemento en *trans* responsable de estos procesos post-transcripcionales de control (revisado por (Marzluff & Duronio, 2002)). Entre sus funciones está la mejora del procesamiento de los transcritos mediante su interacción con U7 *snRNA* (del inglés "*Small Nuclear- RNA*"), facilitar su transporte y aumentar su estabilidad en el citoplasma (Erkman et al, 2005) supliendo la ausencia de la proteína de unión poli(A), y promover la unión del mensajero a ribosomas mediante su interacción con eIF4G y eIF3 (Ling et al, 2002), (Sanchez & Marzluff, 2002). La acción de esta proteína se restringe exclusivamente a controlar la expresión de

las histonas, habiéndose demostrado que la SLBP interacciona exclusivamente con los mensajeros de las histonas, y no con otros transcritos (Townley-Tilson et al, 2006).

En el caso de levaduras, donde no hay estructura *stem-loop* y sí cola de poli(A), la práctica totalidad del control está mediado por secuencias promotoras activadas durante la fase S (Moll & Wintersberger, 1976; Xu et al, 1992). No obstante, existen procesos de degradación específicos de mensajeros de histonas que controlan sus niveles fuera de esta fase (Reis & Campbell, 2007).

### **3.2.- Las histonas de *Leishmania***

Como ya se comentó anteriormente, las histonas formadoras del nucleosoma son unas de las proteínas más conservadas en la evolución. Este grado de conservación en su contenido de aminoácidos ha permitido que los procesos bioquímicos empleados para la purificación de estas proteínas en tripanosomátidos, hayan sido similares a los utilizados en otros organismos. No obstante, la separación de las histonas de acuerdo a sus propiedades hidrofóbicas, mediante sistemas de geles Tritón-Urea, permite diferenciar las histonas no sólo entre tripanosomátidos y eucariotas superiores, sino también entre diferentes especies de tripanosomátidos, e incluso entre diferentes estadios morfológicos de una misma especie, como en el caso de *T. brucei*. Este método ha sido empleado para resolver las histonas de *T. brucei*, *T. cruzi* y *C. fasciculata* (revisado por (Hecker et al, 1994)).

En general, las histonas de tripanosomátidos son las más divergentes conocidas (Malik & Henikoff, 2003), (Thatcher & Gorovsky, 1994), pudiéndose establecer una relación evolutiva entre las secuencias de histonas formadoras del nucleosoma de humanos, levaduras y tripanosomas. La mayor parte de las divergencias aparecen en el dominio amino terminal, región donde se producen la mayor parte de las modificaciones post-transcripcionales. Esto determina en gran medida la funcionalidad del nucleosoma y por tanto de la cromatina. Así por ejemplo, la ausencia de condensación de la cromatina a cromosomas durante la mitosis, característica de tripanosomátidos, se ha relacionado con la ausencia de fosforilación de la serina 10 de la histona H3 y/o con el pequeño tamaño de la histona H1 (revisado por (Alsford & Horn, 2004)). Otras modificaciones post-traduccionales de las histonas han sido descubiertas en

tripanosomátidos, algunas de ellas no observadas en otros eucariotas, como la mono-metilación de alaninas en el extremo amino terminal de las histonas H2A, H2B y H4 de *T. brucei* (Janzen et al, 2006). Estas variaciones en la estructura primaria de las histonas de tripanosomátidos respecto a eucariotas superiores, también afecta a la interacción histona-histona e histona-ADN. Así, está demostrado que estas interacciones son más fuertes en los nucleosomas de eucariotas superiores, donde se necesita una concentración salina de 2 M NaCl para disociarlos, que en tripanosomas, donde la disociación del nucleosoma se consigue a 1 M de NaCl (revisado por (Hecker et al, 1994)).

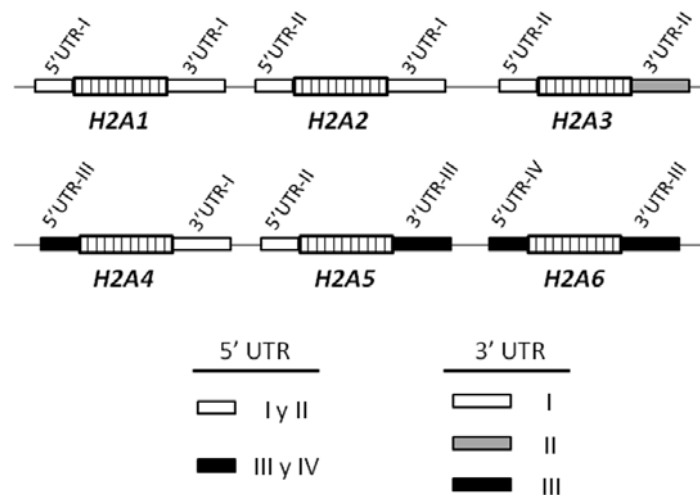
En las diferentes formas de leishmaniosis caninas y humanas, las histonas de *Leishmania* actúan como antígenos inmunodominantes. (revisado por (Requena et al, 2000)). Así, los genes codificantes para la histona H2A y H3 de *L. infantum* fueron caracterizados por primera vez tras el rastreo de genotecas de expresión con sueros de perros con LV, (Soto et al, 1992) (Soto et al, 1994) . Por otra parte, las histonas H2B y H4 son reconocidas por el 63% y 47% de los sueros de LV, mostrando el importante valor diagnóstico de estos antígenos (Soto et al, 1999). De hecho, diferentes vacunas empleando las histonas nucleosomales han sido ensayadas en infecciones experimentales, tanto de LC como de LV, mostrando interesantes resultados (Iborra et al, 2004), (Carrion et al, 2008).

La histona H1 es la que mayor grado de divergencia muestra tanto en secuencia como en tamaño entre los diferentes organismos. La atípica histona H1 presente en tripanosomátidos carece del dominio globular característico de estas proteínas, reduciendo considerablemente su tamaño respecto a otros organismos (Espinoza et al, 1996). Su función de regular la condensación de la cromatina en *Leishmania* ha sido demostrada (Masina et al, 2003). Además, se ha analizado el efecto de la sobreexpresión de esta histona en promastigotes, produciendo un retraso en el ciclo celular y una clara disminución en la infectividad del parásito (Smirlis et al, 2006).

**3.2.1.- Organización génica de las histonas de *Leishmania***

En tripanosomátidos, los diferentes genes de las histonas no aparecen agrupados en el genoma. Normalmente, existen diferentes copias de genes codificantes para cada histona. Estas copias pueden presentarse en uno o varios *clusters* (revisado por (Alsford & Horn, 2004)). En el caso de los genes codificantes para la histona H2A de *L. infantum*, por ejemplo, se han identificado 6 copias, organizadas en 2 *clusters* independientes localizados en los cromosomas 21 y 29, respectivamente. Los genes codificantes para la histona H2B de *L. enriettii* (Genske et al, 1991) se han localizado en dos cromosomas diferentes. De la misma forma, los genes codificantes para la H3 de *L. infantum* se encuentran localizados en los cromosomas 14 y 19. En este mismo organismo existen al menos siete copias de la histona H4 no agrupadas en un único *locus* (Soto et al, 1997).

Como es frecuente en estos organismos, las regiones codificantes de las diferentes copias están altamente conservadas, mientras que las regiones UTRs pueden presentar importantes variaciones en secuencia y longitud. En el caso de los genes *H2A* existen 4 tipos diferentes de regiones 5' UTR, aunque por homología de secuencia pueden agruparse en dos. Por su parte, existen tres diferentes regiones 3' UTR (figura 5). Todas estas copias presentan mensajeros en la forma promastigote, excepto la copia *H2A3* (Soto et al, 2003).



**Figura 5.-** Organización de los genes *H2A* de *L. infantum*. La similitud de secuencia entre las regiones UTRs de las diferentes copias permite agruparlos en diferentes tipos, que vienen representados por cajas blancas (para las regiones 3' UTR-I y -II, y 5' UTR-I), cajas negras (3' UTR-III y -IV, y 5' UTR-III), y la región 3' UTR-III, representa por la caja gris.

### 3.2.2.- Expresión génica de las histonas de *Leishmania*

En todos los estudios realizados sobre la expresión de los genes de las histonas en *Leishmania* y otros tripanosomátidos, no se han detectado variaciones en la tasa de transcripción a lo largo del ciclo celular (Soto et al, 2000), (Recinos et al, 2001). Los mensajeros de las histonas de kinetoplástidos están poliadenilados y carecen de la estructura en *Stem-loop* característica de eucariotas superiores. No obstante, en el caso de los mensajeros de la histona H2A de *L. infantum*, por ejemplo, existen al menos tres secuencias que podrían formar este tipo de estructuras (Soto et al, 1991), postulándose que podrían ser responsables de los procesos post-transcripcionales de control.

La expresión de los genes de las histonas durante la fase S ha sido extensamente estudiada en tripanosomátidos, aunque los mecanismos moleculares que gobiernan estos patrones de expresión aun no son conocidos. En general, y del mismo modo que sucede en el resto de organismos estudiados, la síntesis de histonas se ve restringida a la fase S del ciclo celular (Soto et al, 2000), (Sabaj et al, 1997), aunque, dependiendo del tripanosomátido, los mecanismos de regulación son diferentes. Así por ejemplo, los mensajeros de la histona H2A de *T. cruzi* apenas están presentes en formas no replicativas del parásito, existiendo una expresión transcripcional residual. Por otra parte, en las formas replicativas estos mensajeros son transcritos constitutivamente. Esta transcripción no está asociada a la síntesis del ADN, mientras que el aumento en los niveles de mensajero de las histonas y en los niveles de la proteína son procesos coordinados con la fase S, mediante un control que actúa de forma post-transcripcional (Maranon et al, 2000), (Sabaj et al, 2001), (Recinos et al, 2001).

Observaciones similares se han publicado para los genes de las histonas de *T. brucei*. Mediante FISH (del inglés "*Fluorescence In Situ Hybridization*") los mensajeros de las histonas sólo pudieron ser detectados durante la fase S de las formas replicativas del parásito (Ersfeld et al, 1996). Además, estudios posteriores realizados sobre la histona H2B han demostrado que la inhibición de la síntesis de ADN por HU promueve un descenso en los niveles de los transcritos de la histona, siendo este efecto dependiente de la síntesis de proteínas (Garcia-Salcedo et al, 1999).

Por su parte, los ARN mensajeros de las histonas de *L. infantum*, son el único caso que se conoce en el que la inhibición de la síntesis de ADN, no sólo no produce un descenso en los niveles de los mensajeros, sino que induce una acumulación de éstos. Así fue observado que los transcritos de las histonas H2A y H3 sufren un proceso de acumulación en ausencia de síntesis de ADN cuando ésta es inhibida mediante el tratamiento con HU (Soto et al, 1996). Lo mismo fue observado para los transcritos de la histona H4 mediante el empleo de HU y afidicolina (otro inhibidor de la síntesis de ADN) (Soto et al, 1997). En trabajos más recientes, ensayos de *run-on* demostraron que el tratamiento de parásitos con HU no produce variaciones en la tasa de transcripción de las histonas. No obstante, la síntesis de las histonas sigue estando asociada a la replicación del ADN, sin observarse acumulación de los transcritos durante esa fase del ciclo celular (Soto et al, 2000). Mediante ensayos de gradientes de polisomas realizados sobre parásitos en G<sub>1</sub> y S, sincronizados con HU, se observa una unión a ribosomas de los ARN mensajeros de histonas formadoras del nucleosoma en la fase S, no observándose esta unión durante la fase G<sub>1</sub>. Este comportamiento es reproducido por las cuatro histonas formadoras del nucleosoma, y se ha postulado que el inicio de la traducción es el punto fundamental de regulación de la expresión génica de las histonas de *Leishmania* (Soto et al, 2004).

Dada la importancia de los mecanismos post-transcripcionales en el control de la expresión génica en *Leishmania*, la búsqueda y caracterización funcional de elementos de secuencia presente en los ARN mensajeros resulta ser esencial para entender los mecanismos moleculares que gobiernan el control de la expresión génica en este patógeno. Existe un escaso conocimiento sobre los procesos implicados en controlar la síntesis de histonas durante el ciclo celular en protozoos. Además, dada la importancia de estas proteínas para la viabilidad del parásito, la búsqueda de elementos de secuencia y factores proteicos que gobiernen la expresión de estos transcritos puede facilitar el hallazgo de nuevas dianas terapéuticas para el control de la infección causada por este organismo.





## **OBJETIVOS**



## OBJETIVOS

---

Los protozoos de la familia *Trypanosomatidae* representan un grupo de eucariotas con un origen evolutivo muy temprano. Son agentes causantes de un gran número de enfermedades en animales y humanos que producen una gran morbilidad y mortalidad en todo el mundo. Debido a su origen evolutivo ancestral, presentan una serie de características moleculares de organización y expresión génica muy diferentes a las del resto de eucariotas.

Dentro de los tripanosomátidos, en los parásitos del género *Leishmania*, el modo de controlar la expresión de los genes de las histonas formadoras del nucleosoma durante el ciclo celular diverge de lo observado en otros eucariotas. La presencia de ARN mensajero de histonas durante todo el ciclo celular es un fenómeno exclusivo de *Leishmania*. La unión de estos mensajeros a los ribosomas sólo se produce durante la fase S del ciclo celular, siendo el punto fundamental en la regulación de su expresión. El objetivo del presente trabajo fue el de caracterizar las regiones génicas implicadas en esta regulación traduccional. Con ese objetivo general, se tomó como modelo los genes codificantes para la histona H2A de *L. infantum*. Los objetivos específicos planteados para este trabajo fueron:

- Desarrollo de líneas celulares transfectadas de forma estable con plásmidos de expresión, conteniendo las regiones reguladoras de los genes de la histona H2A.
- Análisis de la implicación de las regiones codificantes y las diferentes regiones 5' y 3' UTR de los genes de la histona H2A en el control traduccional.
- Implicación de diferentes secuencias consenso presentes en la región 3' UTR de los genes de la H2A en el control traduccional.



## **MATERIALES Y MÉTODOS**



### **1.- Cultivo de parásitos.**

Los promastigotes de *L. infantum* (BCN150) se cultivaron a 26°C en medio RPMI 1640 (Gibco, Paisley, Reino Unido) con 10% de suero fetal bovino inactivado por calor, durante 30 min a 56°C, estreptomycin (0,1 mg/ml) y penicilina (100 U/ml).

Para el mantenimiento de los cultivos se realizó el cambio de medio cada 7 días, cuando el cultivo se encuentra entre  $8-12 \times 10^6$  células/ml, impidiendo que los cultivos alcanzaran la fase estacionaria ( $15-20 \times 10^6$  células/ml).

### **2.- Tratamientos con Hidroxiurea y Actinomicina D.**

Para la sincronización de los parásitos se empleó hidroxiurea (HU) (Sigma-Aldrich, St. Louis.MO), compuesto inhibidor de la enzima ribonucleótido reductasa y que produce una depleción de los niveles de desoxirribonucleótidos por bloqueo de su síntesis. Esto impide la entrada de las células en fase S.

En ensayos previos del laboratorio se determinó que un tratamiento con 5 mM HU durante 16 horas producía una parada de aproximadamente el 90 % de las células en G1 (Soto et al, 2004).

Para analizar la vida media de los diferentes transcritos, se bloqueó la transcripción mediante el tratamiento de los cultivos con 20 µg/ml de actinomicina D (Sigma), como previamente se describió en (Quijada et al, 1997b).

### **3.- Transfección de promastigotes.**

Los ADN plasmídicos, utilizados en las transfecciones, se purificaron con el sistema "Plasmid Maxy Kit" (Qiagen, Hilden, Alemania), o MIDIPREP (Promega). Entre 10 y 20 µg de los diferentes plásmidos empleados fueron transfectados en  $10^8$  promastigotes de *L. infantum*. Se emplearon cubetas de 0,4 cm y dos pulsos de electroporación (1500 V; 250 µF) con un intervalo de 10 segundos (Robinson & Beverley, 2003), (de Andrade et al, 1992).

Para la selección de los parásitos transfectados se utilizó geneticina (Sigma-Aldrich, St. Louis.MO) a una concentración final de 20 µg/ml. La adición de la droga de selección se realizó 24 h tras la electroporación.

#### 4.- Construcciones plasmídicas.

En primer lugar, se generaron diferentes construcciones conteniendo las regiones reguladoras derivadas de los genes *H2A* de *L. infantum*, localizados en el locus 2 (genes *H2A4*, *H2A5*, *H2A6*; número de acceso AJ419627).

El clon pBls5'UTR-II contiene un fragmento de ADN que incluye desde la región 5' UTR del gen *H2A5* hasta la región 3' UTR del gen precedente en el *cluster* (*H2A4*). Este fragmento fue amplificado por PCR usando los siguientes cebadores: Directo, 5'-TCCCCCGGGTCCTCCGGCCTGACAGCGC-3' y reverso, 5'- GCGAT ATCCATGGTTGCGGAAAGGAGAG-3' (subrayadas se indican las dianas de restricción incluidas para el clonaje). El amplificado fue digerido con las enzimas *Cfr*9I y *EcoRV* y clonado en el vector pBluescript KS(-) (pBls).

El clon denominado pBls5'UTR-III, que contiene la región 5' UTR del gen *H2A4* mas secuencias corriente arriba (hasta 600 nt corriente arriba del AG acceptor de *splicing*), se obtuvo por amplificación mediante PCR usando los cebadores: Directo, 5'- GGAATTCAACAATGCA GGGAA-3' y reverso, 5'-GCGATATCCATGGCTGCGAT GGGTAGGT-3'. El resultado de la amplificación fue digerido por las enzimas de restricción *EcoRI* y *EcoRV* (subrayadas) y clonado en pBluescript.

La región 3' UTR y secuencias corriente abajo del gen *H2A5* se obtuvo por PCR usando los cebadores: Directo, 5'- CCCAAGCTTAGCACACCTACCCCTCTCTT-3' y reverso, 5'- GCGTCGACGGATCCCATGGCTGCGATGGGTAGGT-3'. El inserto de PCR fue digerido por las enzimas de restricción *HindIII* y *Sall* y clonado en pBls, obteniéndose el clon pBls3'UTR-III.

La región 3' UTR y secuencias localizadas corriente abajo del gen *H2A4*, fue obtenida por PCR usando los cebadores: Directo, 5'- CCATCGATGTCCTCCGGCCT GACAGCGC-3' y reverso, 5' GCGTCGACGGATCCCATGGTTGCGGAAAGGAGA



C-3' El amplificado fue digerido por las enzimas de restricción *ClaI* y *SaII* y clonado en pBluescript para obtener el clon denominado pBls3'UTR-I.

Como control de los ensayos, se utilizó la región 3' UTR+IR+5' UTR, localizada entre las regiones codificantes de los genes 1 y 2 del cluster *HSP83* de *L. infantum* (Angel et al, 1996). Para incluir esta región en nuestras construcciones se amplificó dicha región incluyendo en los extremos dianas de restricción. Así, para incluir esta región en posición 5' del gen reportero los oligodesoxirribonucleótidos empleados para la amplificación fueron: Directo, 5'- CGGGATCCCGCGCACTGCTC TTTACAT-3' y reverso, 5'-TGCCTGCAGCGTCTCCGTCATGGTTGCAG-3', incluyendo las dianas *BamHI* y *PstI*, usándose para su clonaje los mismos sitios del vector pBluescript (clon pBls5'UTR-HSP83). Cuando esta región fue amplificada para su inserción en posición 3' del gen reportero los oligodesoxinucleótidos usados para la amplificación fueron: Directo, 5'-CGAAAGCTTAGGTGGACTGAGCCG GTA-3' y reverso 5'-GCGTGCAGCGGATCCGCTCTCCGTCATGGTTGCAG- 3'. El producto de la PCR fue digerido por las enzimas *HindIII* y *SaII* y clonado en pBluescript, generándose el clon pBls3'UTR-HSP83. Ambos clones fueron cedidos generosamente por la Dra. Ruth Larreta.

Posteriormente, se realizaron construcciones en las cuales los insertos de los diferentes plásmidos descritos arriba fueron combinados para controlar la expresión del gen reportero *CAT*. Todas las construcciones obtenidas fueron primero generadas en el plásmido pBluescript conteniendo la región codificante del gen *CAT* (clon pBlsCAT (Larreta et al, 2004)) y, posteriormente, clonados por digestión *BamHI* en el vector de expresión en *Leishmania* pX63NEO (LeBowitz et al, 1991). Los insertos de ADN conteniendo el gen *CAT* y las regiones 5' y 3' reguladoras fueron clonados en orientación opuesta respecto al gen de selección *NEO* que contiene el plásmido pX63NEO, generándose las siguientes construcciones:

pXCAT5'III/3'I, en la cual el gen *CAT* está flanqueado por las regiones reguladoras del gen *H2A4*.

pXCAT5'III/3'III, donde *CAT* es flanqueado por regiones reguladoras 5' del gen *H2A4* y regiones 3' del gen *H2A5*.

pXCAT5'II/3'I, en donde el gen reportero *CAT* es controlado por las regiones 5' del gen *H2A5* y la región 3' del gen *H2A4*.

pXCAT5'II/3'III, en la cual la expresión de *CAT* está controlada por las regiones 5' y 3' reguladoras del gen *H2A5*.

pXCAT3'H2A, donde *CAT* es flanqueado por la región 5' del gen *HSP83* y la región 3' del gen *H2A4*.

pXCAT5'H2A, aquí la expresión de *CAT* está bajo el control de las regiones 5' del gen *H2A4* y la región reguladora del gen *HSP83*.

Por último, la construcción pXCATHSP83, utilizada como control en los ensayos, contiene el gen reportero flanqueado por las regiones reguladoras del gen *HSP83*.

Por otra parte, se ha sustituido el gen reportero *CAT* por la región codificante del gen *H2A* etiquetado con 6 histidinas en su extremo N-terminal. Dicha inserción se realizó mediante amplificación por PCR usando los cebadores: Directo, 5'-GCGATAT CATGCATCACCATCACCATCACGCTACTCCTCGCAGCCCAA-3' (en itálica se indica la secuencia codificante para las histidinas) y reverso, 5'-CCCAAGCTTACGCG CTCGGTGTCGCCC-3'. El inserto de PCR obtenido fue digerido con las enzimas *EcoRV* y *HindIII* y clonados en pBluescript, generando el clon pBlshisH2A.

Posteriormente, sobre este clon se incluyeron las regiones 5' UTR y 3' UTR contenidas en los clones pBls5'UTR-III y pBls3'UTR-I, respectivamente. Finalmente, y mediante digestiones *BamHI* de este plásmido, se obtuvo el inserto de ADN, que fue clonado en el vector pX63Neo en anti-sentido, respecto del gen de selección Neo.

Para la obtención de las distintas deleciones del elemento HRE, se utilizó el kit de mutagénesis dirigida (Stratagene®. USA), incluyendo como molde el plásmido pBls3'UTR-I. Siguiendo las indicaciones del fabricante, los oligodesoxirribonucleótidos diseñados para la eliminación total del elemento HRE ( $\Delta^{\text{HRE}}$ ) de la región 3' UTR, fueron: directo: 5'-GGCGCATCATACTCATGGCTTCTCAGATG-3'; reverso: 5'-CATCTGAGAAGCCATGAGGTATGATGCGCC-3'. Por otra parte, para las deleciones parciales de los diferentes elementos, los oligodesoxirribonucleótidos empleados fueron:

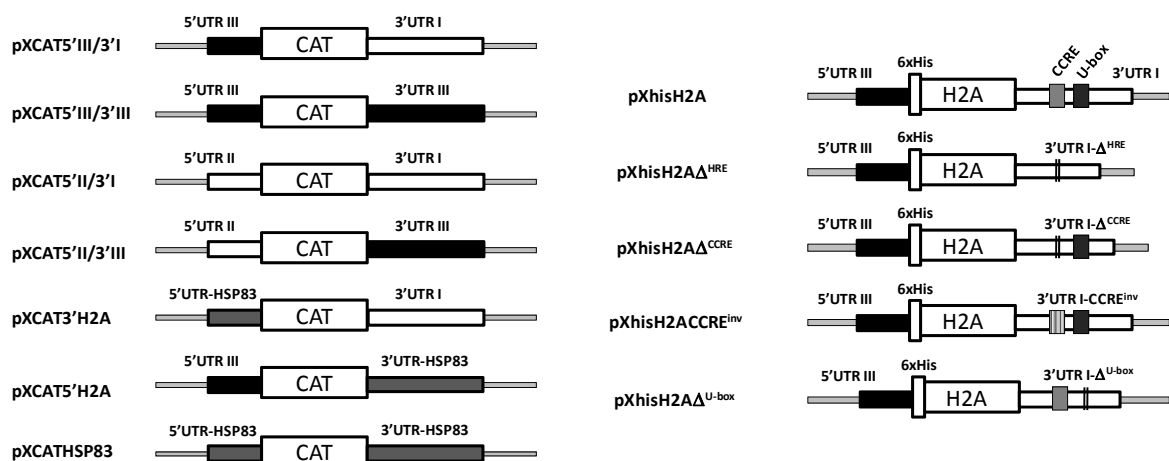
$\Delta^{Oct}$  (donde se ha eliminado los 8 nt que incluyen el hexámero CATAGA). Directo: 5'-GGCGCATCATACTCGACCCTATCTTTTG-3'; Reverso: 5'-CAAAAGATAGGGT CGAGGTATGATGCGCC-3'.

$Oct^{inv}$  (donde el octámero que incluye el hexámero se ha invertido). Directo: 5'-GCAT CATACTCAGATACGACCCTATCTTTTG -3'; Reverso: 5'-CAAAAGATAGGGTGC GTATCTGAGGTATGATGC -3'. Subrayadas se muestran las secuencias invertidas.

$\Delta^{U-box}$  (Se ha eliminado el grupo de timidinas localizado en posición 3' del hexámero). Directo: 5'-CATAGAGACCCTATCATGGCTTCTCAGATG-3'; Reverso: 5'-CATCT GAGAAGCCATGATAGGGTCTCTATG-3'. Obsérvese que en este caso se conserva intacto el octámero (secuencia subrayada).

Las regiones 3' UTR portando las diferentes deleciones fueron liberadas de los plásmidos pBl3'UTR-I mutantes por digestión *SalI* y *ClaI* y se clonaron en estos mismos sitios del plásmido pBlshisH2A, donde, por digestión *BamHI*, se liberó el gen completo recombinante y se clonó en pX63Neo, obteniéndose las construcciones: pXhisH2A $\Delta^{HRE}$ , pXhisH2A $\Delta^{oct}$ , pXhisH2A $Oct^{inv}$ , pXhisH2A $\Delta^{U-box}$ , todas ellas portando el gen completo en anti-sentido respecto al gen de selección *NEO*.

En la figura 6 se muestra un resumen de las construcciones utilizadas en las transfecciones realizadas para este trabajo.



**Figura 6.- Resumen de las diferentes construcciones analizadas en este trabajo.** Se conservó el código de colores usado anteriormente para diferenciar los diferentes tipos de regiones UTR de los genes de la histona *H2A*

## MATERIALES Y MÉTODOS

(ver introducción). Las cajas gris oscuro representan las regiones UTRs del gen *HSP83*. Las cajas blancas que incluyen (6xHis) H2A y CAT indican las regiones codificantes. Los extremos en gris claro representan las diferentes regiones intergénicas, también incluidas en todas las construcciones.

El clonaje de los diferentes fragmentos de ADN utilizados como sondas en los ensayos y no descritos previamente, se realizaron por amplificación mediante PCR, utilizando los oligodesoxirribonucleótidos mostrados en la tabla 1. Los amplificados se clonaron directamente en un vector-T (pBluescript digerido EcoRV y al que se le han adicionado timidinas en sus extremos 3', tal como se describe en (Jo & Jo, 2001)).

Nombre de gen amplificado	Nombre del clon	Nombre del oligorribodesoxinucleótido	Secuencia
Timidina kinasa	pBlsVt-TK	TKd	5' -ATGTTCCGCGGTTCGTATAGAGC-3'
		TKr	5' -GCACACCGCCGTCAGCTTATCC-3'
Antígeno nuclear de proliferación celular	pBlsVt-PCNA	PCNAd	5' -CCGAGTTCGCGAAGATTGTG-3'
		PCNAr	5' -CGACGTTGTCGATGCCGTAC-3'
Dihidrofolato reductasa-timidinato sintasa	pBlsVt-DHFR	DHFRd	5' -GGAGACGATCAAGGCCGAACC-3'
		DHFRr	5' -ACCTCCATGTCCGTTAACTC-3'

**Tabla 1. Cebadores para la amplificación y clonaje en vector-T.**

### 5.- Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Los oligodesoxirribonucleótidos empleados en las reacciones de PCR fueron suministrados por Isogen (Amsterdam, Holanda). Las reacciones se llevaron a cabo con condiciones estándar para la polimerasa AmpliTaq (Perkin-Elmer Cetus Corporation Norwalk, CT). Las temperaturas y tiempos de reacción fueron: 5 min a 94°C, 30 ciclos de 1 min a 94°C, 1 min a 55°C y 1 min a 72°C, y una extensión final de 5 min a 72°C.

En el caso de las reacciones de PCR utilizadas para la obtención de mutantes de delección o inserción, las condiciones fueron las recomendadas por el fabricante del kit utilizado (Stratagene®. USA).

### **6.- Mapeo de ARNm por RT-PCR.**

Para determinar el sitio de adición de la cola de poli(A) y del miniexón de los transcritos generados de las diferentes construcciones, el DNA copia de estos mensajeros fue generado por transcripción reversa usando como cebador un oligodesoxirribonucleótido de timidinas, que porta la diana *Hind*III en su extremo 5' (5'-CCCAAGCTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT-3'). La transcriptasa en reverso fue proporcionada por Perkin-Elmer Corp. Siguiendo las instrucciones del fabricante se utilizó 1 µg de ARN total por reacción. Para el mapeo de la región 5' se utilizó un cebador directo, complementario a la secuencia *lider* de los mensajeros de *Leishmania*: 5'-GCTATATAAGTATCAGTTTCTGTAC-3', y como reverso se empleó un cebador reverso y complementario a la región codificante del gen *CAT*: 5'-GTATTCCTCCAGAGCGATG-3'. Por su parte, para el mapeo del extremo 3' del mensajero se empleó como cebador directo un oligodesoxirribonucleótido diseñado a partir de la secuencia codificante del gen *CAT* (5'-ATCGCTCTGGAGTGAATACC-3'). Como cebador reverso el oligodesoxirribonucleótido de timidinas, mostrado anteriormente. Los productos de PCR, así obtenidos, fueron secuenciados directamente empleando los cebadores diseñados a partir de la secuencia codificante del gen *CAT*.

### **7.- Secuenciación de ADN.**

La secuenciación del ADN se llevó a cabo mediante el sistema "ABI PRISM BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit" (Perkin-Elmer, Foster City, EEUU), y fue realizada en el servicio de secuenciación del Servicio interdepartamental de investigación de la UAM (SIDI).

### **8.- Preparación de células competentes y transformación.**

Para la preparación de células competentes y transformación de las mismas con plásmidos se siguió el método de Inoue (Inoue et al, 1990).

En los clonajes sobre pBluescript las placas se trataron con una mezcla de 50 µl de X-Gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranosido) 50 mg/ml preparado en N,N-dimetilformamida, y 5 µl de IPTG 100 mM.

### **9.- Aislamiento de ADN de plásmidos.**

El ADN de plásmidos se extrajo mediante el método de lisis alcalina, empleando el sistema Jetquick® (Genomed).

### **10.- Aislamiento de ARN de *Leishmania*.**

El ARN de *L. infantum* se obtuvo mediante el sistema "Total Quick RNA Cells and Tissues" (Talent, Trieste, Italia), siguiendo las indicaciones del fabricante.

### **11.- Análisis de la distribución de ARNm en polisomas por gradientes de sacarosa.**

El fraccionamiento en gradiente lineal de sacarosa 15-40% (p/v) fue realizado como se describe en (Soto et al, 2004). Promastigotes de *L. infantum* ( $2,5 \times 10^8$ ) se recogieron por centrifugación y lavaron dos veces con PBS y posteriormente fueron resuspendidos en 1ml de tampón de lisis (10 mM Tris-HCl, pH 8.0; 150 mM NaCl; 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>; 0,5% Nonidet P40), suplementado con 240 unidades de SUPERase-In (Ambion, Austin, TX, EEUU). La lisis se facilitó pipeteando arriba y abajo diez veces. Después de la lisis, las muestras se microfugaron a 3000 x g durante 2 min a 4°C para sedimentar los núcleos. El sobrenadante fue suplementado con 0,6 mg/ml de heparina, 150 mg/ml de cicloheximida, 20 mM ditioneitol (DTT) y 1mM PMSF y microfugado a 13000 x g por 5 min a 4°C para retirar las mitocondrias. El sobrenadante se cargó sobre 11 ml de un gradiente de sacarosa y fue ultracentrifugado en un rotor SW41T a 170.000 x g durante 2 h a 4°C. Tras la centrifugación, se tomaron 15 fracciones de 800 µl suplementándose hasta 1% (p/v) SDS, 10 mM EDTA (pH 8.0) y 200 mg/ml de proteinasa K. Esta mezcla se incubó durante 30 min a 37°C y se extrajo con mezcla fenólica (fenol-cloroformo-isoamiloalcohol; 25:24:1). El ARN obtenido fue precipitado con etanol a -20°C.

### **12.- Electroforesis de ARN y transferencia a membrana.**

Para su electroforesis el ARN fue desnaturalizado mediante el método de formamida-formaldehído y fraccionado de acuerdo a su peso molecular en geles de agarosa al 1% y formaldehído al 6% (Lehrach et al, 1977). Para la electroforesis se

empleó el tampón MOPS (1× MOPS: MOPS 40 mM, NaAc 10 mM y EDTA pH 8, 1 mM).

Para la transferencia a membrana (Hybond-N) se usó el equipo Transphor Power Lid (Hofer, San Francisco, EEUU). Las condiciones de transferencia fueron: 30 min a 0,25 amperios, 30 min a 0,5 amperios y 1 hora a 1 amperio. Posteriormente el ARN fue fijado al filtro por exposición a luz UV durante 2 min.

### 13.- Marcaje radiactivo de ADN de cadena doble.

Las sondas de ADN fueron marcadas *in vitro* mediante traslación de la mella o *nick translation*, utilizando como nucleótido marcado [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]dCTP (3000 Ci/mmol, Amersham) (Rigby et al, 1977). Posteriormente, las sondas se purificaron en columnas de Sephadex G50 por centrifugación.

Sondas:

**Histona H4** : Obtenida por digestión *EcoRI* del plásmido pcDNA3-H4s (Iborra et al, 2004).

**Histona H2A**: Obtenida por digestión *EcoRI* del plásmido pcDNA3-H2As (Iborra et al, 2004).

**Tubulina**: Corresponde al gen de la TUBULINA de *Trypanosoma cruzi*. Se obtiene a partir del clon pTca3 mediante una digestión con *EcoRI* (Soares et al, 1989).

**Timidina Kinasa (TK)**: Por digestión del plásmido pBlsVt-TK, con las enzimas *EcoRI* y *HindIII*.

**Antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA)**: Por digestión del plásmido pBlsVt-PCNA con las enzimas de restricción *EcoRI* y *HindIII*.

**Dihidrofolato Reductasa-Timidilato Sintasa (DHFR-TS)**: Obtenida por digestión del plásmido pBlsVt-DHFR con las enzimas *EcoRI* y *HindIII*.

#### 14.- Marcaje radiactivo de Oligodesoxirribonucleótidos.

Para el marcaje radiactivo de oligodesoxirribonucleótidos se utilizó polinucleótido kinasa, siguiendo el protocolo descrito en (Quijada et al, 1997a). Se emplearon las siguientes sondas:

-CAT: 5'-TTACGCCCCGCCCTGCCACT-3' Reverso y complementario a región codificante del gen cloranfenicol acetil transferasa.

-6xhis: 5'-GTGATGGTGATGGTGATG 3' Reverso y complementario a la región codificante para seis histidinas.

#### 15.- Hibridación de filtros.

Las condiciones de hibridación, para los filtros de ARN, con sondas marcadas por *nick translation* fueron: prehibridación de 2 horas a 42°C, en una solución que contiene 10× Denhardt (BSA 0,2%, ficoll 400 0,2% y polivinilpirrolidona 0,2%), 6× SSC (NaCl 0,9 M, citrato sódico 0,09 M), SDS 1% y 360 µg/ml de ADN de esperma de salmón sonicado y desnaturalizado; hibridación a 42°C durante 16 horas en una solución cuya composición es: formamida 50%, SDS 1%, 6× SSC, 150 µg/ml de ADN de esperma de salmón sonicado y desnaturalizado, y sonda de ADN desnaturalizada (actividad específica aproximada de 10<sup>8</sup> cpm/µg). Tras la hibridación los filtros se lavaron con tres soluciones diferentes: 30 min a temperatura ambiente, en 10× SSC y SDS 1%, 45 min a 42°C, en 1× SSC y SDS 0,5%, y 45 min a 42 °C en 0,1× SSC y SDS 0,1%. Tras la retirada de este último lavado, el filtro se expuso a una película autorradiográfica.

Las hibridaciones de oligodesoxirribonucleótidos marcados por polinucleótido kinasa se realizaron durante 16 h a 55°C, usando como sonda 25 ng de oligonucleótido marcado (con una actividad específica de 10<sup>9</sup> cpm/µg) en una solución compuesta por NaCl 0,9 M; EDTA 6 mM; SDS al 0,5%; Tris-HCl 0,09 M; pH 7,5 y esperma de salmón sonicado y desnaturalizado a una concentración de 25 µg/ml. Tras la hibridación, se realizaron dos lavados a temperatura ambiente de 15 min en 6x SSC, seguido de 20 min de incubación en la misma solución a 65°C. Posteriormente, se



realizó un lavado más a temperatura ambiente también con 6x SSC. Finalmente, los filtros se expusieron durante un máximo de 3 días a una película autorradiográfica.

Para la deshibridación de los filtros y su posterior uso, independientemente del protocolo de hibridación, estos se hirvieron durante 20 min en presencia de 0,1% de SDS.

### **16.- Marcaje de proteínas de nueva síntesis.**

Para el marcaje de proteínas de nueva síntesis se partió de 10 ml de un cultivo, a una densidad celular de  $6 \times 10^6$  células/ml. Las células se resuspendieron en 100  $\mu$ l de medio DMEM sin metionina (Dulbecco's Modified Eagle Medium, Met -; Gibco Paisley, Reino Unido) con un 10% de suero fetal bovino inactivado y complementado con 100  $\mu$ Ci de [ $^{35}$ S]Met y [ $^{35}$ S]Cys (Amersham; Redivue Pro-mix L-[ $^{35}$ S] *in vitro* cell labelling mix, 1000 Ci/mmol). Una vez aplicado el tratamiento correspondiente a las células, el marcaje se realizó durante 1 h, a 26°C. Posteriormente, los parásitos se lavaron con PBS. Para determinar la cantidad de marca incorporada se empleó un contador de centelleo (Liquid Scintillation Counter, 1209 Rackbeta).

### **17.- Aislamiento de núcleos.**

Para la obtención de extractos de proteínas nucleares se partió de 10 ml de cultivos a una densidad de entre  $6-8 \times 10^6$  células/ml. Tras dos lavados en PBS el sedimento resultante de la segunda centrifugación fue resuspendido en 100  $\mu$ l de tampón de lisis conteniendo Tris-HCl 10 mM, pH 8,0; NaCl 150 mM; MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM y Nonidex NP-40 al 0,5% v/v). Para favorecer la lisis de la membrana celular sin dañar los núcleos se pipeteó arriba y abajo un total de diez veces. Posteriormente, la muestra fue centrifugada durante 2 min a 3000 x g y 4°C para precipitar los núcleos.

### **18.- Inmunoprecipitaciones.**

Para la inmunoprecipitación de CAT se partió de 10 ml de un cultivo de parásitos en fase logarítmica marcados metabólicamente. Los parásitos fueron lisados durante 30 min a 4°C en 100  $\mu$ l de tampón de lisis cuya composición es: Tris HCl 0,05

M pH 7,5; NaCl 0,15 M; PMSF 1 mM; Tritón X-100 1%; leupeptina 8 µg/ml; pepstatina 4 µg/ml y aprotinina 4 µg/ml. Posteriormente, las células se sonicaron en baño durante 10 min. Tras microcentrifugar (15 min), se recogieron 100 µl de sobrenadante, de los cuales 25 µl se emplearon para visualizar las proteínas totales y medir la cantidad de marca incorporada, y los 75 µl restantes se incubaron durante 16 horas con el anticuerpo policlonal anti-CAT (Sigma-Aldrich, St. Louis.MO). A la mezcla de proteínas y anticuerpo se le añadió después 15 µl de proteína A-agarosa (Sigma-Aldrich, St. Louis.MO) equilibrada en 50 µl de tampón de lisis, y se incubó 1 hora a 4°C. El lavado de las muestras se realizó en tres soluciones diferentes: tres lavados con Tris HCl 0,01 M pH 8; NaCl 0,03 M y tritón X-100 2%, dos lavados con Tris HCl 0,1 M; NaCl 0,05 M y tritón X-100 0,1%, y un lavado con Tris HCl 0,01 M pH 8 y tritón X-100 0,05%.

Para la inmunoprecipitación de 6xhisH2A los extractos nucleares obtenidos de parásitos marcados metabólicamente fueron incubados por 10 min en el tampón de lisis-SDS (SDS 1%; EDTA 10 mM pH 8; Tris HCl 50 mM pH 8; leupeptina 8 µg/ml; pepstatina 4 µg/ml y aprotinina 4 µg/ml). Posteriormente, las células se sonicaron en baño durante 45 min. Tras centrifugar 15 min a 12000 x g, se recogió el sobrenadante, separando 25 µl para analizar como control de proteínas totales. Sobre los 75 µl restantes, se añadieron 675 µl del tampón CHLP cuya composición es: SDS 0,01%; Tritón X-100 1,1%; EDTA 1,2 mM pH 8; Tris HCl 16,7 mM pH 8; NaCl 167 mM; leupeptina 8 µg/ml; pepstatina 4 µg/ml y aprotinina 4 µg/ml. Una vez rebajada la concentración de SDS, se adicionó 3 µl del anticuerpo monoclonal anti-6xHis (Sigma). Tras las 16 h de incubación, el complejo antígeno-anticuerpo fue precipitado empleando 15 µl de proteína G-agarosa, previamente equilibrada en 50 µl de tampón CHLP. Los lavados posteriores se realizaron, como se describió anteriormente, para la inmunoprecipitación de CAT.

Una vez completados los lavados, el sedimento resultante de la última centrifugación se resuspendió en 60 µl de tampón Laemmli para su posterior resolución en geles de acrilamida (SDS-PAGE).

### 19.- Electroforesis de proteínas.

Las proteínas fueron desnaturalizadas en presencia de tampón Laemmli y calentadas durante 5 min a 100°C. Las muestras se resolvieron mediante electroforesis monodimensional en geles de poliacrilamida, en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE), con un porcentaje de acrilamida en gradiente desde el 10-15%, utilizando el equipo Mini-Protean II de Bio-Rad. Las proteínas se visualizaron por tinción con azul de coomassie. La destinción de los geles se realizó por incubación en una solución de metanol-acético-agua (5:1:5).

### 20.- Ensayos de *Western blot*.

Las proteínas separadas en geles de SDS-PAGE se transfirieron a membranas de nitrocelulosa PROTRAN<sup>®</sup> (Schleider & Schuell GmbH, Dassel, Alemania) utilizando el sistema de electrotransferencia en líquido de Bio-Rad. El tampón de transferencia empleado está compuesto por Tris base 25 mM, glicina 192 mM y metanol 20%.

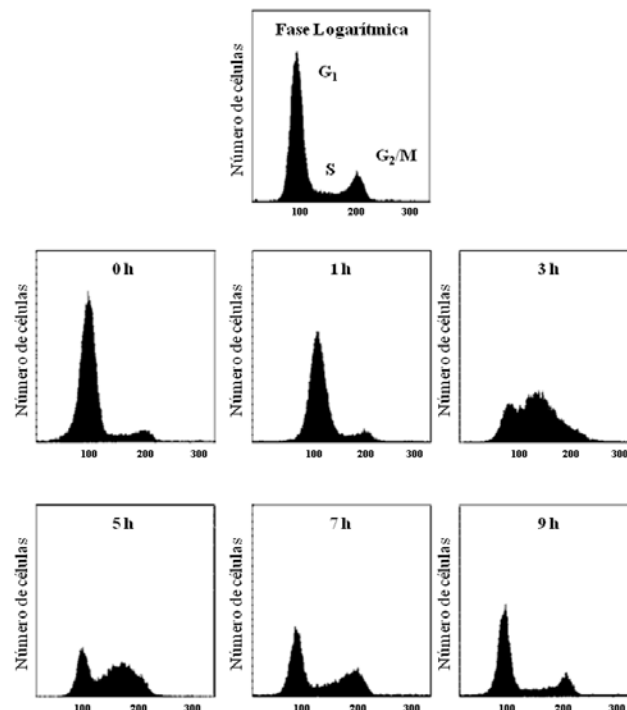
Una vez realizada la transferencia, se bloqueó la membrana con una solución de leche desnatada en polvo al 5% y tween-20 al 0,05% en PBS durante 1 hora. Las incubaciones con los anticuerpos se realizaron en la solución de bloqueo durante un tiempo mínimo de 2 horas. Entre las dos incubaciones (anticuerpo primario y secundario) se lavaron las membranas tres veces con tween-20 0,05% en PBS durante 10 min. El revelado se realizó con el sistema "ECL Western blotting analysis system" (Amersham).

Los anticuerpos empleados en este trabajo fueron:

- 1.-  **$\alpha$  CAT:** Suero policlonal de conejo (Sigma-Aldrich, St. Louis.MO)
- 2.-  **$\alpha$  6xHis:** Monoclonal anticuerpo de ratón (Sigma-Aldrich, St. Louis.MO)
- 3.-  **$\alpha$  H2A:** Obtenido a partir de sueros de perros infectados con *L. infantum* y purificados por columnas de afinidad sensibilizadas con H2A recombinante como se describe en (Soto et al, 1995).

## 21.- Citometría de flujo y análisis del ciclo celular.

Para determinar el contenido de ADN en los parásitos tratados con HU se utilizó el marcaje con yoduro de propídio. La alícuota de cultivo a analizar (aproximadamente  $6 \times 10^6$  parásitos) se lavó dos veces en PBS y se resuspendió en 1 ml de solución de fijación (30% PBS, 70% metanol), almacenándose un mínimo de 24 h a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Posteriormente a la fijación los parásitos fueron recogidos por centrifugación y resuspendidos en 500  $\mu\text{l}$  de tampón citrato (45 mM  $\text{MgCl}_2$ , 30 mM citrato sódico, 20 mM mops, pH7.0 y 0,1% tritón X-100), suplementado con 20  $\mu\text{g}$  de RNase A (Roche, Mannheim, Germany) y 50  $\mu\text{g}$  de yoduro de propídio (Sigma, St. Louis. MO. U.S.A) durante 20 min a  $37^{\circ}\text{C}$ . La fluorescencia se determinó por citometría de flujo en un FACsCalibur (Becton Dickinson, San Jose, CA, EEUU). El análisis de los datos se realizó como se describe en (Soto et al, 2004). En la figura 7 se muestra el resultado de uno de estos análisis donde se relaciona el número de células con la intensidad de fluorescencia para los diferentes tiempos, tras la retirada de la HU.



**Figura 7.- Determinación del contenido en ADN de los parásitos mediante citometría de flujo.** Representación de la intensidad de fluorescencia emitida por el yoduro de propídio en parásitos sincronizados con HU durante las 9 horas de la cinética. Para cada uno de los tiempos se analizaron un total de 10.000 células.

## **22.- Análisis cuantitativo.**

Las autorradiografías fueron escaneadas con un densitómetro láser (Image Quant<sup>TM</sup> versión 3.0; Molecular Dynamics). Las medidas se realizaron en condiciones en las que existía una relación lineal entre la cantidad de proteínas o ARNm y la intensidad de las bandas de la autorradiografía.

## **23.- Análisis de las bases de datos.**

Para la búsqueda de secuencias se utilizó la base de datos <http://www.genedb.org/>. El análisis de secuencia se realizó con los programas incluidos en <http://www.ebi.ac.uk/index.html>.



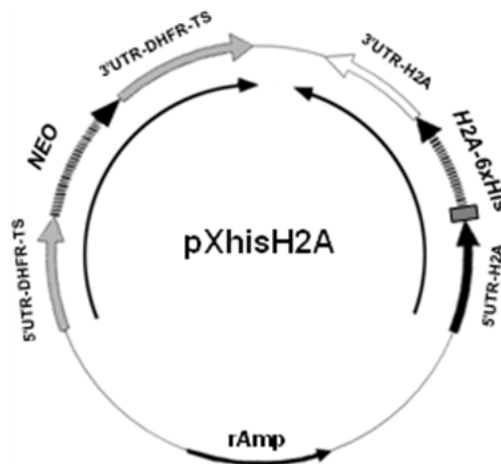
## **RESULTADOS**





**1.- Análisis de la expresión del gen *H2A4* mantenido de forma episómica.**

Con el fin de poder determinar que regiones de los genes de histonas son responsables del control de la expresión génica asociado al ciclo celular, se empleó como modelo el gen *H2A4*. En primer lugar se analizó la expresión episómica de este gen. Para ello, se desarrolló un clon en el vector de expresión en *Leishmania* pX63NEO que contenía el gen *H2A4*. Para poder distinguir este producto proteico del expresado por los genes cromosómicos, se incluyeron secuencias codificantes por 6 histidinas inmediatamente después del ATG iniciador (clon pXhisH2A). En la construcción se incluyeron las regiones 5' y 3' necesarias para asegurar la correcta expresión del gen, teniendo en cuenta las especiales características de expresión génica que presenta este parásito. Para evitar interferencias en la expresión del gen *H2A4* por parte del gen de resistencia a la geneticina (flanqueado por las secuencias del gen de expresión asociada al ciclo celular dihidrofolato reductasa-timidilato sintasa, *DHFR-TS*), la construcción se incluyó en antisentido respecto a dicho gen (figura 8).

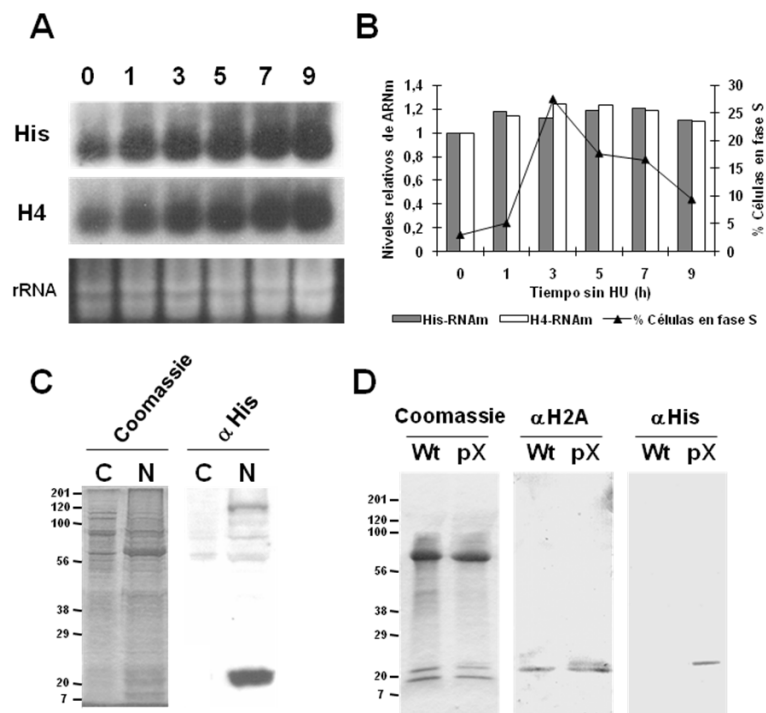


**Figura 8.- Representación esquemática del plásmido pXhisH2A.** Las flechas indican la dirección de transcripción para el gen de selección *NEO* y para el gen *6xhisH2A*.

Se analizó el producto expresado de la construcción tras ser transfectadas de forma estable en *L. infantum*. Las línea celular generada (LipXhisH2A) presentaba un único ARNm de 0.7 Kb, tamaño que coincide con el tamaño del ARNm de los genes endógenos (dato no mostrado). En primer lugar se analizaron los niveles del ARNm-*6xhisH2A* durante el ciclo celular. Como ocurre para los genes endógenos (Soto et al, 2004) los niveles de ARNm permanecen constantes a lo largo del ciclo celular del

## RESULTADOS

parásito (figura 9AB). En dicha línea se observaba una proteína de tamaño similar a la histona H2A con localización nuclear, reconocida por un anticuerpo anti-6×his (figura 9C). Esta proteína también presentaba reactividad cuando los mismos filtros se ensayaron con un anticuerpo anti-LiH2A purificado a partir del suero de perros infectados de forma natural por el parásito (figura 9D). El alto contenido en cargas positivas presentes en las histonas produce un descenso en su movilidad electroforética, observándose un aparente aumento de la masa molecular de estas proteínas en los gels de acrilamida (aprox. 23 KDa) respecto al tamaño predicho a partir de la secuencia (14 KDa). Puede observarse que con las condiciones empleadas la proteína recombinante 6xhisH2A presenta una movilidad electroforética reducida respecto a la proteína endógena, lo que permite diferenciar ambas proteínas por un análisis SDS-PAGE de los extractos de proteínas nucleares.

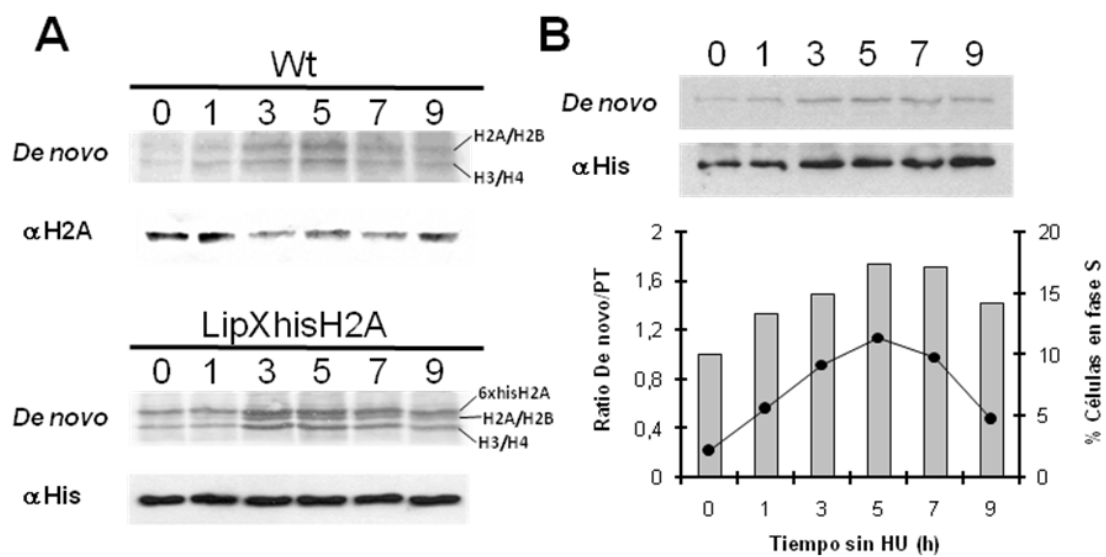


**Figura 9.- Expresión de la línea celular transformada de forma estable con pXhisH2A.** **A.** Resultado de *Northern-blot*, realizado sobre ARN total de promastigotes transfectados con la construcción pXhisH2A y sincronizados con HU. Sobre los paneles se indica el tiempo en horas tras la retirada de la droga. A la izquierda de los paneles se indica las sondas empleadas. El panel inferior muestra el gel teñido con bromuro de etidio antes de la transferencia. **B.** Cuantificación de los niveles de ARN indicados. Los porcentajes de células en fase S se determinaron por tinción con yoduro de propidio y FACs. **C.** Extractos citosólicos (C) y nucleares (N), extraídos de la línea pXhisH2A resueltos en gels en gradiente de acrilamida 10-15%. El panel de la izquierda muestra el gel teñido con azul de Coomassie y a la derecha un gel idéntico transferido e incubado con el anticuerpo

## RESULTADOS

monoclonal anti-6xHis. **D.** Extractos nucleares de la cepa parental (Wt) y la línea transfectada con pXhisH2A (pX), resueltos en geles de acrilamida 10-15%. A la izquierda, gel teñido con azul de coomassie. Los paneles de la derecha muestran el resultado de *Western-blot* realizado sobre geles idénticos al anterior e incubados con los anticuerpos anti-H2A (panel central) y anti-6xHis (panel derecho).

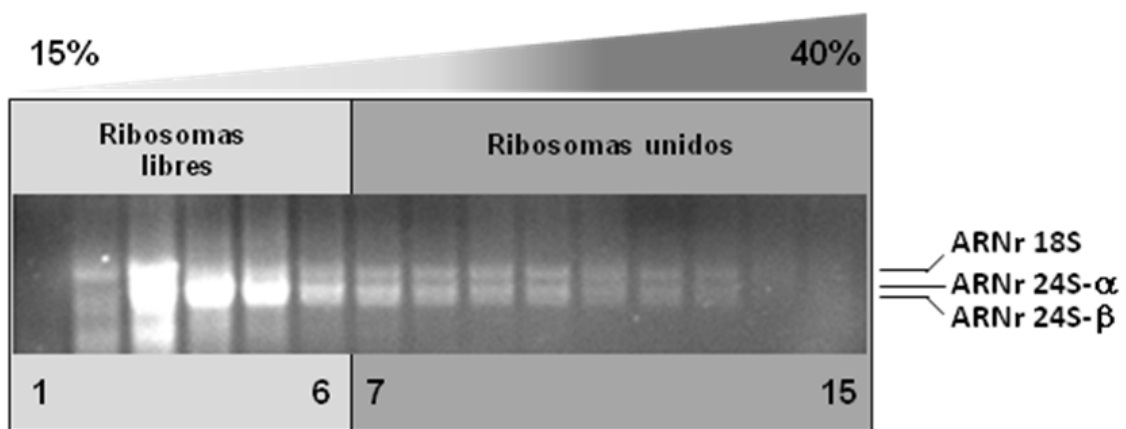
A continuación se determinó la síntesis *de novo* de la histona 6xhisH2A a lo largo del ciclo celular. Para ello, se realizó un marcaje metabólico con metionina-S<sup>35</sup> sobre promastigotes silvestres y promastigotes transfectados con el plásmido pXhisH2A (figura 10A). En ambos casos se detectó un aumento en el marcaje de las histonas en paralelo al aumento en el porcentaje de células en fase S (con un máximo entre las 3 y 5 horas tras la retirada de la droga). En la figura se indican los pares de histonas H2A/H2B, H3/H4 endógenos, así como la posición de la banda correspondiente a la histona marcada con histidinas. Además, mediante inmunoprecipitación de la proteína recombinante usando al anticuerpo monoclonal anti-6xhis se pudo cuantificar su acumulación (figura 10B).



**Figura 10.- Síntesis de la proteína recombinante 6xhis-H2A durante el ciclo celular.** **A.** Resultado de las autorradiografías obtenidas de filtros donde se transfirieron extractos totales de núcleos de parásitos sincronizados con HU y marcados con metionina-S<sup>35</sup> durante la última hora de tratamiento. Los paneles inferiores muestran el resultado de la incubación de esos filtros con los anticuerpos anti-H2A (sobre la línea Wt) y anti-6xHis (sobre la línea LipXhisH2A). También se indican las bandas correspondientes a los pares de histonas H2A/H2B, H3/H4, así como la posición de la proteína recombinante. **B.** Resultado de la inmunoprecipitación realizada sobre extractos nucleares de la línea transfectada. Se muestra la exposición autorradiográfica del filtro. Como control de cantidad se muestra el resultado de la incubación del filtro con el anticuerpo anti-6xHis. Bajo los paneles se muestra el resultado de la densitometría. Los porcentajes de células en cada punto de la cinética se determinaron por tinción con yoduro de propidio y FACS.

## RESULTADOS

El aumento en la síntesis de histonas asociado a la fase S del ciclo celular en *Leishmania* ha sido relacionado con un control sobre el inicio de la traducción, estando éste restringido a la fase S. Se ha postulado que la unión de los ARN mensajeros de las histonas a los ribosomas es el punto fundamental de esta regulación (Soto et al, 2004). Para comprobar que el gen recombinante y episómico, que se está expresando en parásitos transfectados con la construcción pXhisH2A conserva este mismo modo de regulación, extractos citosólicos de parásitos, obtenidos 0 y 3 horas tras la retirada de la HU, fueron tratados con cicloheximida y fraccionados en gradientes de sacarosa 15% – 40% mediante ultracentrifugación. De las 15 fracciones resultantes se realizó una extracción de ARN que fue a su vez resuelto en geles de agarosa al 1% en condiciones desnaturalizantes (ver Materiales y Métodos). En la figura 11 se muestra el gel teñido con bromuro de etidio tras la electroforesis realizada en estas condiciones. Obsérvese que sólo a partir de la sexta fracción existe un relación equimolar entre los ARNs ribosómicos 18S, 24S- $\alpha$  y 24S- $\beta$ , indicando que es a partir de esta fracción donde se localizarán los ARN mensajeros que están asociados a polirribosomas (Müllner, 1997).

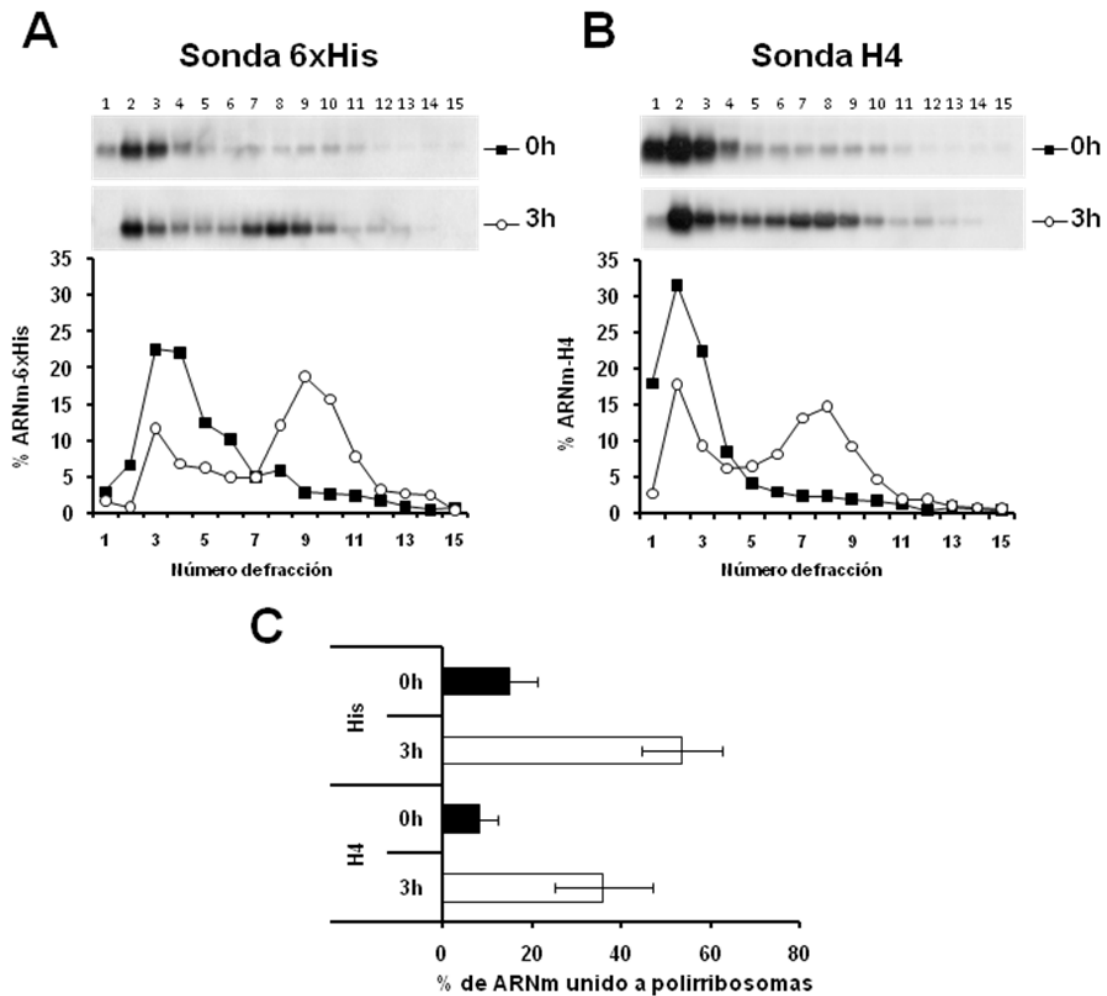


**Figura 11.-** Resultado de la electroforesis realizada sobre el ARN, extraído de los gradientes de sacarosa. Se muestra el gel de agarosa teñido con bromuro de etidio. A la derecha se indican las posiciones de los ARN ribosómicos. También se indica las fracciones donde no existe una relación equimolar entre los diferentes ARNr (ribosomas libres, fracciones de la 1 a la 6) y aquellas donde existe esa relación (ribosomas unidos, fracciones de la 7 a la 15).

Una vez que los geles fueron transferidos a nitrocelulosa los filtros se hibridaron con el oligodesoxirribonucleótido 6xhis (figura 12A). Como control del ensayo, esos mismos filtros fueron deshibridados e hibridados con la sonda H4 (figura 12B). En el

## RESULTADOS

gráfico se muestra el valor de promedio y desviación estándar de tres ensayos realizados de forma independiente (figura 12C).

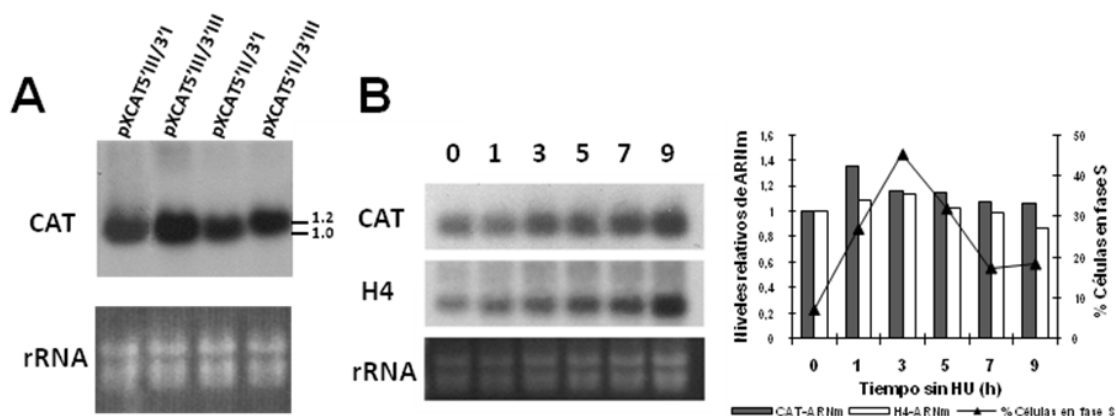


**Figura 12.- Análisis de la expresión de los mensajeros del gen *6xhisH2A* en la fase G1 y en la fase S del ciclo celular.** **A.** Northern-blot realizado sobre ARN obtenido del fraccionamiento de extractos citosólicos de parásitos de la línea LipXhisH2A, tratados con HU (paneles superiores) y 3 horas después de su retirada (paneles inferiores). Bajo los paneles se muestra la representación gráfica de los porcentajes de ARNm presente en cada fracción resultado de la hibridación de los filtros con la sonda 6xHis. **B.** Resultado de la rehibridación de los filtros con la sonda H4. **C.** Promedio del porcentaje de ARNm asociado a polirribosomas (contenidos entre las fracciones 7 y 15), calculado a partir de los resultados obtenidos en tres ensayos realizados de forma independiente.

**2.- Estudio de la implicación de la región codificante y de las diferentes regiones no traducidas en el control traduccional de los genes de histonas de *L. infantum*.**

Una vez comprobado que la expresión episómica del gen marcado con 6 histidinas no afecta al control traduccional asociado al ciclo celular, se decidió analizar el papel de las diferentes regiones génicas en el control. Con ese objetivo se realizaron diferentes construcciones. En primer lugar se sustituyó la región codificante de la construcción pXhisH2A por la región codificante del gen CAT (pXCAT5'III/3'I). Por otra parte, se combinaron las diferentes regiones UTRs de los genes de histonas que son expresados en promastigotes. Así, se generaron las construcciones, pXCAT5'III/3'III, pXCAT5'II/3'I y pXCAT5'II/3'III. Como se muestra en la figura 13A, promastigotes de *L. infantum*, portando de forma episómica estas construcciones, expresan un único transcrito reconocido por la sonda CAT y con tamaños coincidentes con los predichos a partir de las secuencias de procesamiento de los genes cromosómicos (Nº de acceso AJ419627). También mediante mapeo de las regiones 3' y 5' de estos transcritos se comprobó el correcto procesamiento de éstos. En el caso de los mensajeros que portan la región 5' UTR-III, la inclusión del miniexón se produjo en el nucleótido 1.611 de la secuencia reportada. Aquellos transcritos portando la región 5' UTR-II, la adición del miniexón se produjo en el nucleótido 2.609. Por su parte el mapeo de las regiones 3' UTR indicaron que los mensajeros portando la región 3' UTR-I la adición del poli(A) se produce en el nucleótido 2.288. Aquellas que portan la región 3' UTR-III, la inserción ocurre en la posición 3.418. Además, se comprobó que estos transcritos no sufren variaciones a lo largo del ciclo celular. En la figura 13B se muestra una de estas cinéticas realizadas sobre la línea LipXCAT3'III/5'I.

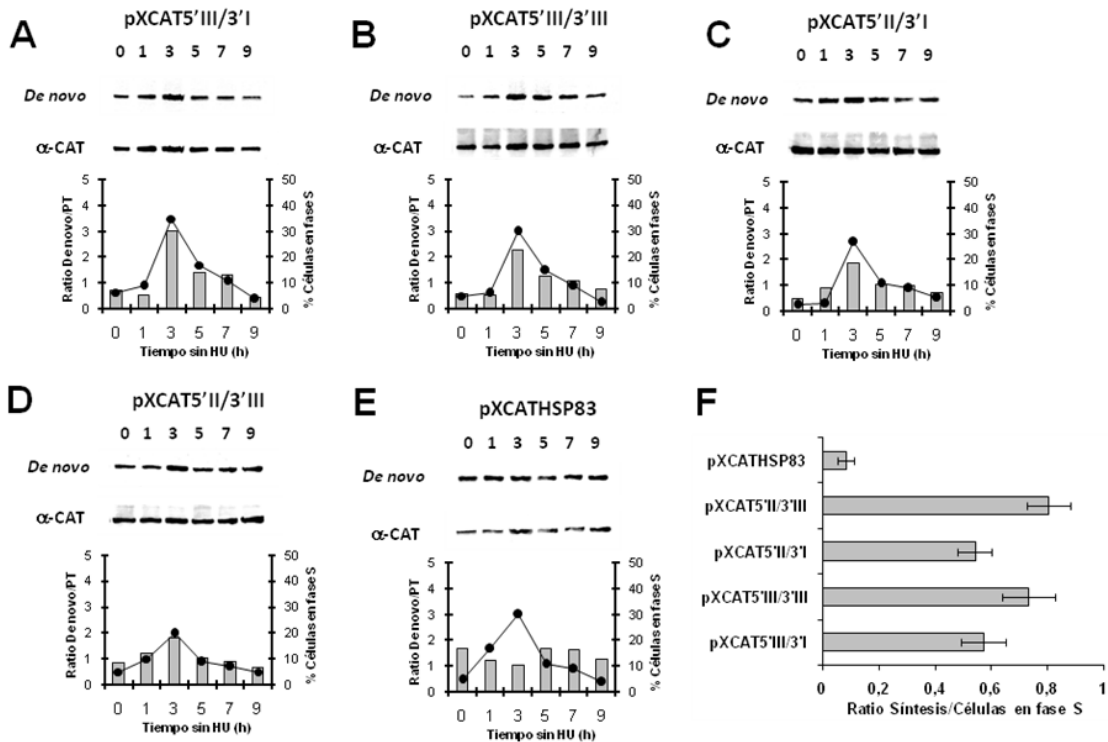
## RESULTADOS



**Figura 13.-** **A.** Northern-blot sobre ARN total extraído de las líneas transfectadas con los plásmidos indicados sobre el panel, e hibridado con el oligodesoxirribonucleótido CAT marcado con P<sup>32</sup>. A la derecha se muestra el tamaño de los transcritos. El panel inferior muestra el gel teñido con bromuro de etidio antes de la transferencia. **B.** Northern-blot de ARN total, obtenidos de parásitos de la línea LipXCATS'III/3'I a lo largo del ciclo celular. Sobre el panel se indican los tiempos analizados tras la retirada de la HU. A la izquierda de los paneles se indican las sondas empleadas. El panel inferior muestra el gel teñido con bromuro de etidio antes de la transferencia. A la derecha de las fotografías se muestra la representación de las variaciones en los niveles de los ARN mensajeros analizados, además de los porcentajes de células en fase S en cada punto determinado por tinción con yoduro de propidio y cuantificadas por FACs.

Para comprobar si estas nuevas líneas mantenían el control por ciclo celular de la síntesis de la proteína CAT, promastigotes transfectados con estas construcciones fueron sincronizados con HU. Se analizó la síntesis *de novo* de CAT mediante marcaje metabólico con metionina-S<sup>35</sup> e inmunoprecipitación con un anticuerpo anti-CAT. En la figura 14 se muestra el resultado de los diferentes ensayos. Como control se incluyó la línea LipXCATHSP83, que porta el gen *CAT* flanqueado por las regiones reguladoras del gen *HSP83* (un gen no relacionado con ciclo celular). En la figura 14F, se representa el grado de asociación entre el incremento en la síntesis de la proteína CAT producida entre las 0 y 3 horas de las cinéticas, con el aumento en el porcentaje de células en fase S en los cultivos en ese mismo periodo. Se puede ver que al representar el resultado obtenido con la construcción control (pXCATHSP83) no existe ninguna correlación entre ambas variables. Por su parte, el resto de construcciones que contienen las regiones reguladoras de las histonas muestran un aumento en la síntesis de CAT relacionado con el aumento de células en fase S.

## RESULTADOS

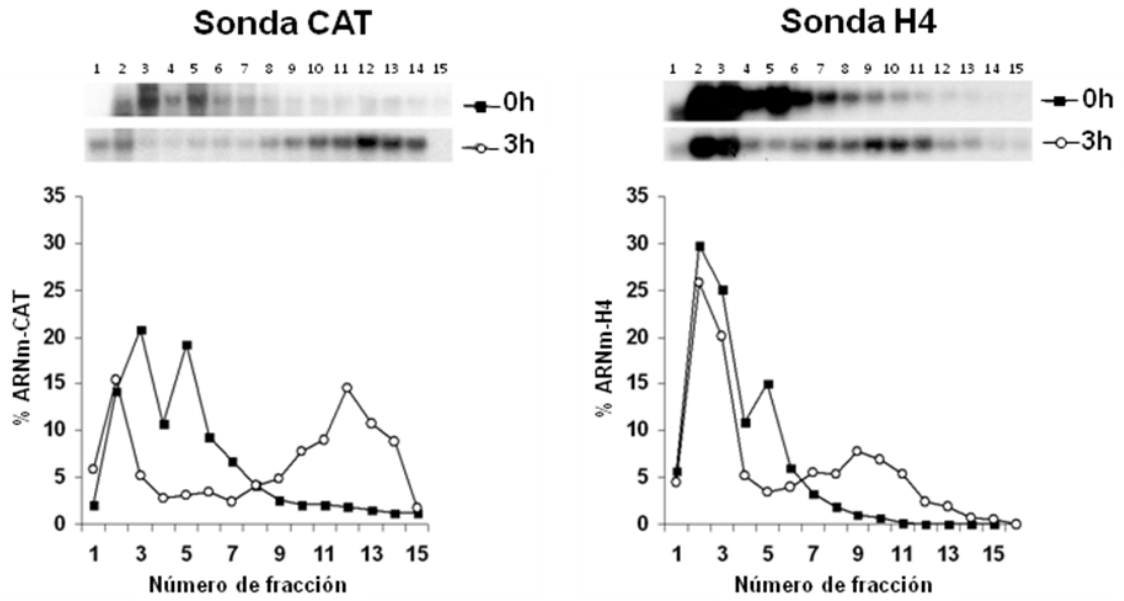


**Figura 14.- A-E.** Ensayos de inmunoprecipitación realizados con el anticuerpo policlonal anti-CAT sobre extractos obtenidos de promastigotes sincronizados con HU y portando de forma episómica las construcciones indicadas sobre los paneles. El marcaje metabólico se realizó durante la última hora de tratamiento con metionina- $S^{35}$ . Los paneles superiores muestran el resultado de las autorradiografías obtenidas de la exposición de los filtros (*De novo*) y los inferiores el resultado del *Western-blot*, realizado sobre los mismos filtros con el anticuerpo anti-CAT ( $\alpha$ -CAT). También se indican los tiempos tras la retirada de la HU. Bajo los paneles se representa el aumento relativo en los niveles de síntesis *de novo* normalizado con la proteína total detectada en cada caso y el porcentaje de células en fase S en cada momento de la cinética, cuantificado por tinción con yoduro de propidio y FACS. **F.** Resultado del análisis estadístico realizado sobre los datos obtenidos de tres ensayos realizados de forma independiente, donde se relaciona el aumento en la síntesis *de novo* y el porcentaje de células en fase S entre las 0 y 3 horas de las cinéticas.

Se comprobó si el aumento observado en la síntesis de CAT durante la fase S está relacionado con una mejor traducción de estos mensajeros. Para ello se utilizó la construcción pXCAT5'III/3'I para analizar los perfiles polisómicos de los ARN mensajeros obtenidos de promastigotes, tratados con HU a las 0 y 3 h tras la retirada de la droga. En la figura 15 se muestra el resultado de este estudio donde las diferentes fracciones obtenidas fueron analizadas con la sonda CAT y la sonda control H4.



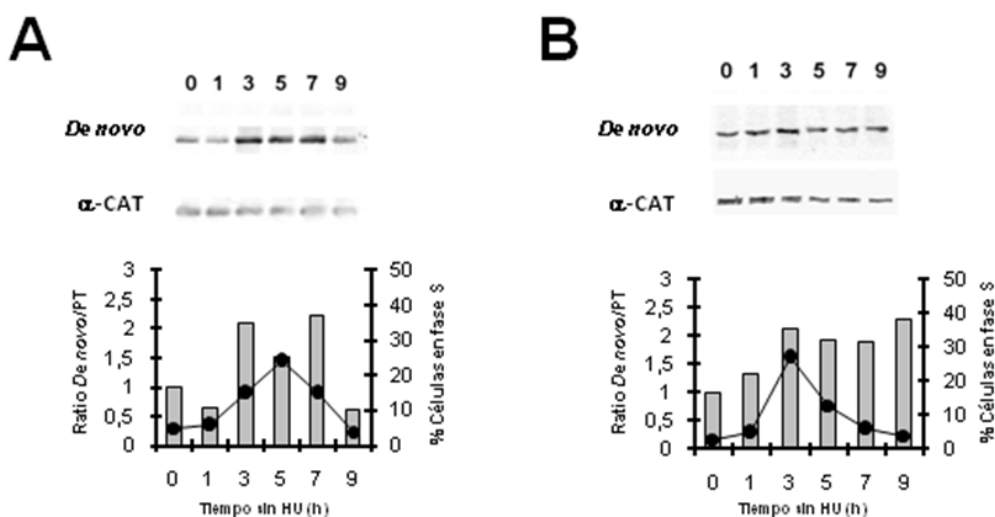
## RESULTADOS



**Figura 15.-** Resultados de *Northern-blot*, realizados sobre las fracciones citosólicas fraccionadas en gradientes de sacarosa 15-40% de la línea LipXCAT5'III/3'I sincronizados con HU. Tras 16 horas de tratamiento con HU (paneles superiores) y tres horas tras la retirada de la misma (paneles inferiores). Sobre las autorradiografías se indican las sondas empleadas en cada caso. Debajo se representan los porcentajes de ARN mensajero detectado en cada fracción.

### 3.- Estudio del papel de las regiones 5' UTR y 3' UTR en el control por ciclo celular de la histona H2A de *L. infantum*.

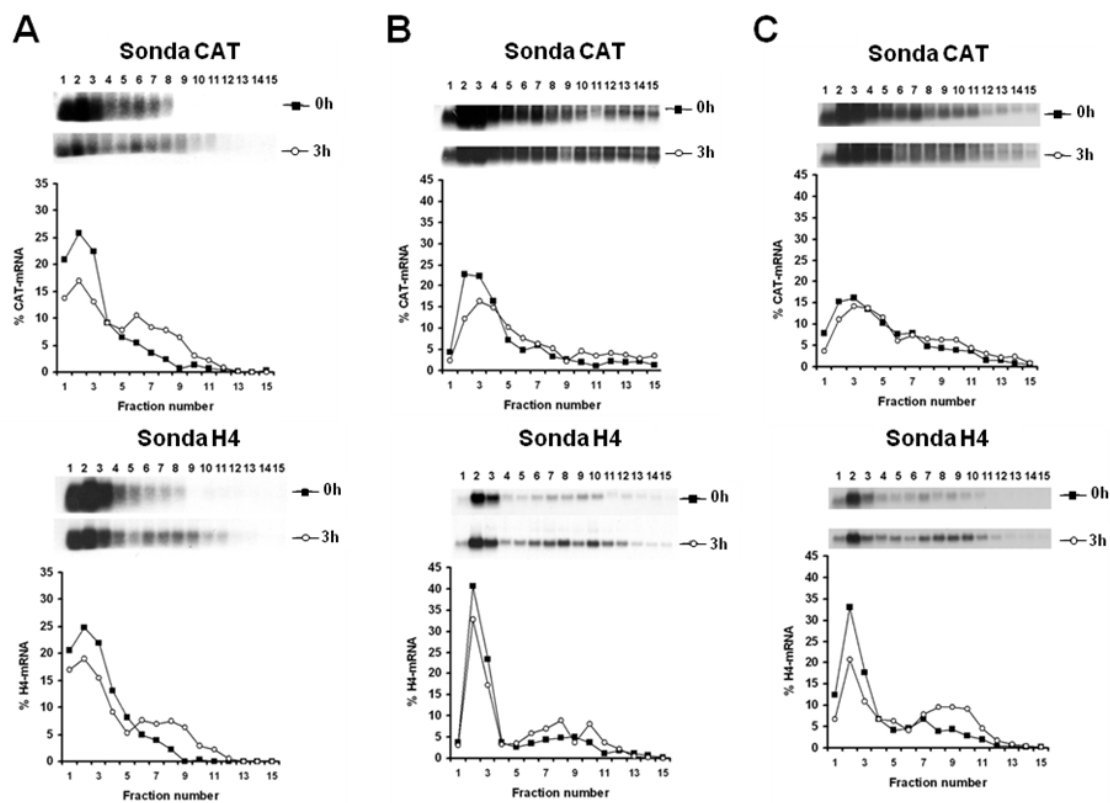
Dada la ausencia aparente de secuencias promotoras para ARN polimerasa II, las regiones 5' y 3' UTR son las máximas responsables del control de la expresión génica en este parásito (revisado por (Clayton, 2002)). Como se deduce de los ensayos mostrados en el apartado anterior, las diferentes regiones UTRs de la histona *H2A* son capaces de conferir regulación traduccional asociada al ciclo celular al gen *CAT*. Para analizar de forma independiente el papel de cada una de estas regiones se realizaron dos nuevas construcciones combinando las regiones 5' y 3' UTR del gen *H2A4*, con las de un gen no relacionado con ciclo celular (regiones UTRs del gen *HSP83*). Estas nuevas construcciones se denominaron pXCAT3'H2A (donde el gen *CAT* está flanqueado por la región 5' UTR del gen *HSP83* y la 3' UTR-I del gen *H2A4*) y pXCAT5'H2A (que porta la región 3' del gen *HSP83* y la 5' UTR-III del gen *H2A4*). En la figura 16, se muestran los resultados de los ensayos de inmunoprecipitación realizados sobre estas líneas usando el anticuerpo policlonal anti-CAT.



**Figura 16.-** Resultados de las inmunoprecipitaciones de la proteína CAT sobre extractos de parásitos de las líneas LipXCAT3'H2A (A) y LipXCAT5'H2A (B), sincronizados durante 16 h con HU y marcados durante la última hora de tratamiento con metionina-S<sup>35</sup>. Los paneles superiores muestran el resultado de la autorradiografía obtenidas de los filtros. Los paneles inferiores muestran el resultado de *Western-blot* realizados sobre esos mismos filtros con el anticuerpo anti-CAT. Sobre los paneles se indican los tiempos tras la retirada de la HU. Las gráficas bajo los paneles indican la relación obtenida entre las densitometrías de la síntesis *de novo* y la cantidad de proteína total y el porcentaje de células en fase S en cada momento de la cinética.

## RESULTADOS

En la figura 16 puede observarse que en las líneas celulares transfectadas con ambas construcciones se produce una acumulación de CAT en la fase S del ciclo celular. Sin embargo, en la línea celular LipXCAT5'H2A se observó una acumulación en la síntesis *de novo* de CAT en la fase G2/M. Se analizaron los niveles de los ARN mensajeros generados durante las cinéticas de 9h (tras la retirada de la HU), no observándose variaciones significativas en sus niveles en ninguna de las dos construcciones (datos no mostrados). Para analizar si los efectos observados en estas líneas celulares están relacionados con la capacidad de unión de sus mensajeros a ribosomas, se estudió el patrón de los perfiles polisómicos de ambas construcciones a las 0 y 3h tras la retirada de la HU. El resultado se muestra en la figura 17. Además, se incluye el resultado del fraccionamiento de polirribosomas obtenidos sobre la línea pXCATHSP83, usada como control.



**Figura 17.-** Análisis de los perfiles polisómicos realizados sobre las líneas LipXCAT3'H2A (A), LipXCAT5'H2A (B) y LipXCATHSP83 (C). Los paneles superiores muestran el resultado obtenido con la sonda CAT. Los inferiores muestran el resultado de hibridar esos mismos filtros con la sonda H4. Bajo las autorradiografías se representan los porcentajes de ARNm presente en cada fracción a las 0 h (cuadrados negros) y a las 3 h (círculos blancos).

#### **4.- Análisis de la presencia de los elementos HRE y CCRE en histonas y otros genes de expresión asociada a la fase S en *L. infantum*.**

Estudios realizados sobre *C. fasciculata* han demostraron la existencia de un elemento denominado CCRE responsable en *cis* del control post-transcripcional de la expresión asociada al ciclo celular (Avliyakov et al, 2003; Mahmood et al, 1999; Pasion et al, 1996). Este elemento está compuesto de una secuencia de 8 nucleótidos, conteniendo un hexámero central altamente conservado (CATAGA). Está presente tanto en las regiones intergénicas como en las secuencias 5' y 3' UTR de genes, cuya expresión se ve aumentada durante la fase S.

Datos presentados por la Dra. Ketty Soteriadou en el Congreso Internacional de Leishmaniasis (*LeishWorld*. Sicilia 2004) mostraron que, en el caso de las histonas de *L. infantum*, este elemento de secuencia aparece en la región 3' UTR de los genes de todas las histonas de *Leishmania*, asociado a un grupo de timidinas corriente abajo. Este nuevo elemento formado por CCRE y el grupo de timidinas lo denominamos HRE (del inglés "*Histone Regulatory Element*"). En la figura 18 se muestran alineamientos correspondientes a fragmentos de regiones UTRs de algunos genes de expresión asociada al ciclo celular que contienen CCRE (A) y fragmentos de las regiones 3' UTR de las histonas formadoras del nucleosoma de *L. infantum* conteniendo HRE (B). En la figura también se indica la posición de estos elementos en el ARNm. Obsérvese que en el caso de las histonas, a diferencia de otros genes de expresión en fase S, el elemento siempre aparece localizado en la región 3' UTR y con una única copia. Como se puede observar en la figura, existen grupos de timidinas en posición 3' respecto al elemento CCRE que pueden mostrar diferente longitud (siempre se localizan tres timidinas (Ts) con una posición altamente conservada). En esta búsqueda se encontró que algunas copias de los genes de histonas no portan ninguno de estos elementos, por ello, esos genes no son incluidos en el alineamiento, aunque sus códigos de acceso sí son indicados en el pie de la figura. Dado que la cepa de *L. infantum*, empleada como referencia para la secuenciación, no corresponde con la del laboratorio, la nomenclatura de las diferentes copias no corresponde con la mostrada previamente en la Introducción.

**A**

CCRE

PCNA: CCCTCAATTT**CATAGAC**CATAGAAAACCGCCTC (3' UTR)  
 DHFR-TS (A): CATTGGCAT**CATAGAG**ACGCGCGCGGTAGA (5' UTR)  
 DHRR-TS (B): CTCCACCCGT**CATAGAT**AGCTGAATAGCAGCC (5' UTR)  
 TK : CGCCTACCT**CATAGAC**CATAATCGGTCATCTC (5' UTR)  
 TOP2 (A): CCCATACAC**CATAGAC**CGTTATTGAAAGCATA (5' UTR)  
 TOP2 (B): ACAGGCGTT**CATAGAC**CGCTGCTCAGCGCAGC (5' UTR)  
 TOP2 (C): TCTGCATCAT**CATAGA**AGCTTTAACGACACGA (5' UTR)  
 KAP3 : TTTCCCGTG**CATAGAT**GCAGTGTGCGCATGT (3' UTR)

**B**

HRE

CCRE                      Ts

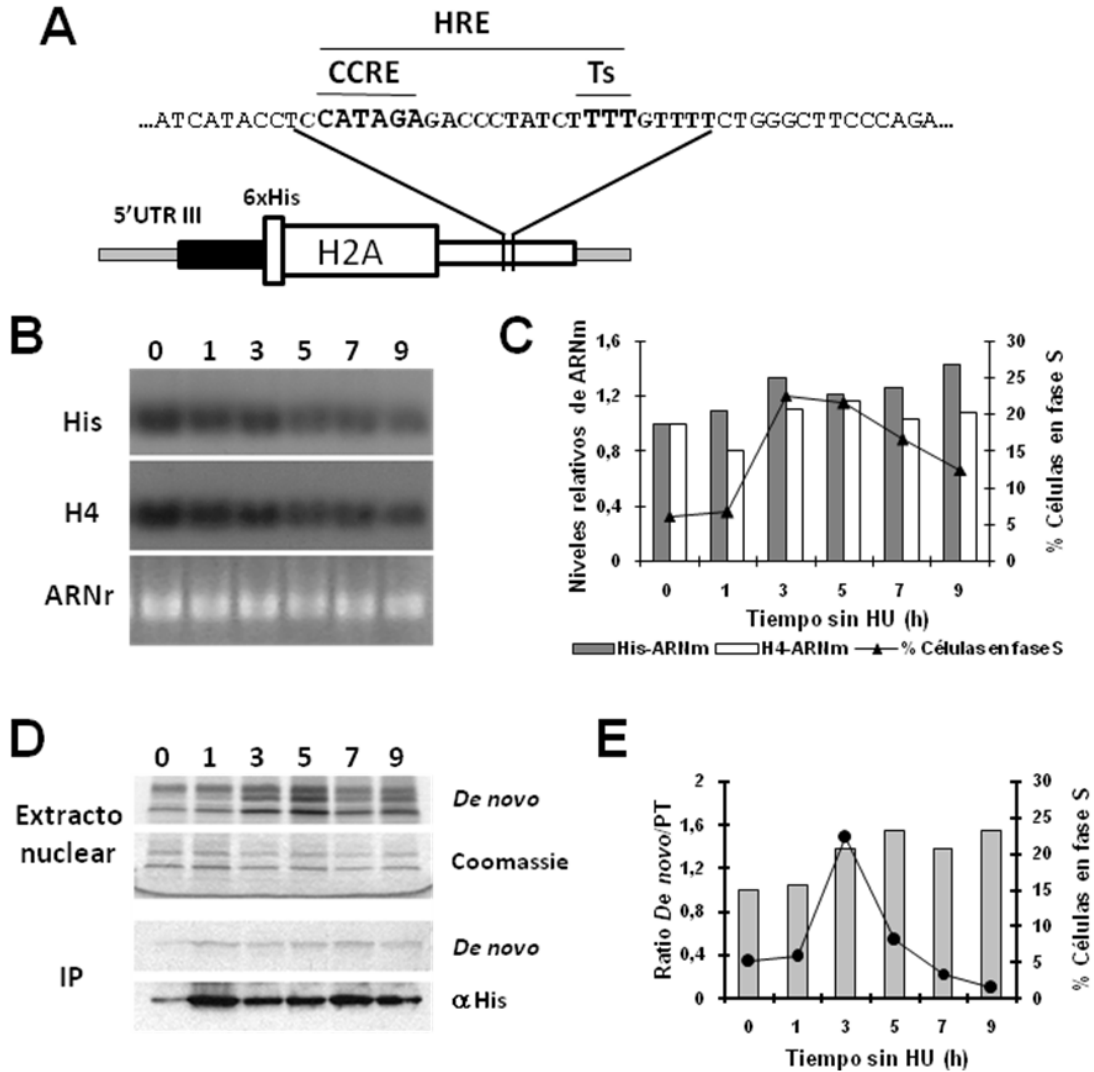
HISTONA H3<sub>1</sub>: TCCCCCCC**CATAGAT**ACCATGTT**TTT**GTTT (3' UTR)  
 HISTONA H3<sub>2</sub>: TCATGCGTAT**CATAGAT**GCCTTTCC**TTT**TTCC (3' UTR)  
 HISTONA H3<sub>3</sub>: ACACACACT**CATAGAT**GCTCTTCG**TTT**TCGA (3' UTR)  
 HISTONA H3<sub>4</sub>: CACGCCGTAT**CATAGAT**GCACTTCT**TTT**TTTT (3' UTR)  
 HISTONA H2B<sub>1</sub>: CGTGGGTTTT**CATAGAG**ATTTATTG**TTT**CTTT (3' UTR)  
 HISTONA H2B<sub>2</sub>: TCCTCCCTCT**CATAGAT**GCAAGTTTT**TTT**TTTA (3' UTR)  
 HISTONA H2B<sub>3</sub>: TCCTCCCTCT**CATAGAT**GCAAGTTTT**TTT**TCTC (3' UTR)  
 HISTONA H4<sub>1</sub>: GCTGCACACT**CATAGAT**ACACCTT**TTT**GTTC (3' UTR)  
 HISTONA H4<sub>2</sub>: GCTGCACACT**CATAGAT**ACACCTT**TTT**GTTC (3' UTR)  
 HISTONA H4<sub>3</sub>: CGTGTGCATT**CATAGATA**AAACTT**TTT**CTTC (3' UTR)  
 HISTONA H4<sub>4</sub>: GCTGCACACT**CATAGAT**ACACCTT**TTT**GTTC (3' UTR)  
 HISTONA H4<sub>5</sub>: GCTGCACACT**CATAGAT**ACACCTT**TTT**GTTC (3' UTR)  
 HISTONA H2A<sub>1</sub>: ATCATACCT**CATAGAG**ACCCTAT**TTT**TGTT (3' UTR)  
 HISTONA H2A<sub>2</sub>: ATCATACCT**CATAGAG**ACCCTAT**TTT**TCTT (3' UTR)  
 HISTONA H2A<sub>3</sub>: TCCCCCCC**CATAGAT**CCAGTCTT**TTT**GTTT (3' UTR)  
 HISTONA H2A<sub>4</sub>: TCTCCCCCT**CATAGAT**CCAGTCTT**TTT**CTTT (3' UTR)

**Figura 18.-** A. Alineamiento de diferentes secuencias de las regiones 3' y 5' UTR de algunos genes de expresión asociada al ciclo celular. Antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA, genedb: LinJ15.1410), Dihidrofolato reductasa-timidilato sintasa (DHFR-TS, genedb: LinJ06.0890), Timidina kinasa (TK, genedb: LinJ21.0880), Topoisomerasa II (TOP2, genedb: LinJ15.1220) y Proteína asociada al kinetoplasto III (KAP3, genedb: LinJ36\_V3.6100). Las letras entre paréntesis indican que en ese gen existe más de una copia del elemento. A la derecha se muestra la localización en el ARNm de la secuencia mostrada. B. Alineamiento de secuencias localizadas en 3' UTR (indicado a la derecha) de los mensajeros de las histonas, entre paréntesis se indicará el código de acceso de genedb: H3<sub>1</sub> (LinJ16\_V30610), H3<sub>2</sub> (LinJ16\_V30600), H3<sub>3</sub> (LinJ10\_V3.1070), H3<sub>4</sub> (LinJ10\_V3.0920), H2B<sub>1</sub> (LinJ09\_V3.1410), H2B<sub>2</sub> (LinJ19\_V3.0040), H2B<sub>3</sub> (LinJ19\_V3.0030), H4<sub>1</sub> (LinJ35\_V3.0020), H4<sub>2</sub> (LinJ21.1910), H4<sub>3</sub> (LinJ15\_V3.0010), H4<sub>4</sub> (LinJ31\_V3.3320), H4<sub>5</sub> (LinJ36\_V3.0020), H2A<sub>1</sub> (LinJ21\_V3.1160), H2A<sub>2</sub> (LinJ29\_V3.1870), H2A<sub>3</sub> (LinJ29\_V3.1850) y H2A<sub>4</sub> (LinJ29\_V3.1860). Otras histonas no incluidas en el alineamiento por no presentar copia del elemento HRE son: H3<sub>5</sub> (LinJ10\_V3.1050), H2B<sub>4</sub> (LinJ17.1340), H4<sub>5</sub> (LinJ35\_V3.1320), H4<sub>6</sub> (LinJ06\_V3.0010), H2A<sub>5</sub> (LinJ21\_V3.1170), H2A<sub>6</sub> (LinJ17.0310).

**5.- Efecto de la delección del elemento HRE del gen *H2A4* de *L. infantum*.**

Para analizar si el elemento HRE está relacionado con la expresión génica de las histonas se realizó una nueva construcción en la que se deleccionó esta secuencia de la región 3'UTR del gen *H2A4*. Esta nueva construcción se denominó pXhisH2A $\Delta$ <sup>HRE</sup>. En la figura 19A se muestra una representación esquemática de dicha construcción. El ARNm resultante de esta nueva construcción mantiene sus niveles a lo largo del ciclo celular sin sufrir cambios significativos cuando los parásitos son sincronizados con HU (figura 19BC). Para analizar el efecto de la delección sobre la síntesis de la proteína producida durante el ciclo celular, parásitos de la línea LipXhisH2A $\Delta$ <sup>HRE</sup>, sincronizados con HU, fueron marcados durante la última hora de tratamiento con metionina-S<sup>35</sup>. En la figura 19D se muestra el resultado del análisis de la síntesis *de novo* sobre extractos totales de núcleo. Mientras las bandas correspondientes a las histonas endógenas mantienen su síntesis asociada a la fase S, las bandas correspondientes a la proteína marcada con 6 histidinas mantienen una intensidad constante. El resultado de la densitometría realizada sobre la inmunoprecipitación se presenta en la figura 19E. Se puede concluir que la eliminación de HRE produce la pérdida del control de la expresión asociada al ciclo celular.

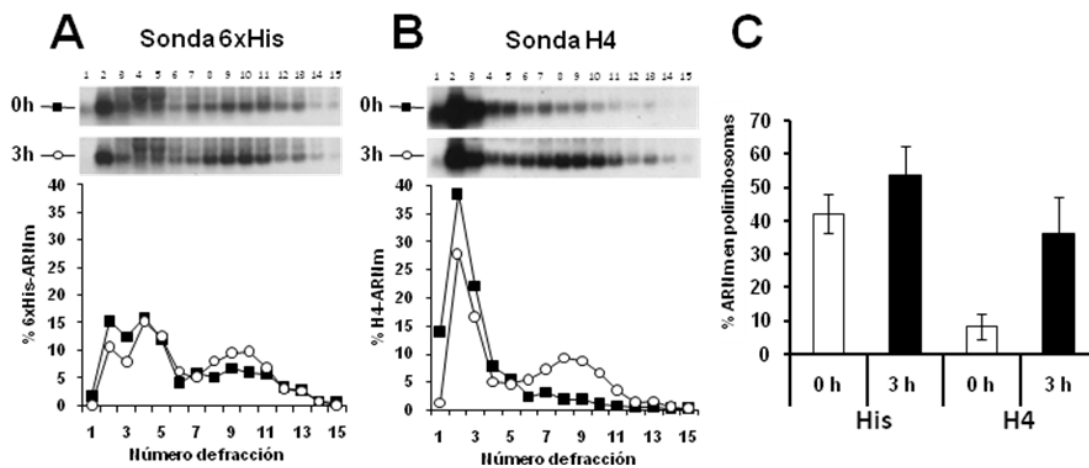
RESULTADOS



**Figura 19.-** A. Representación esquemática de la construcción pXhisH2A $\Delta$ <sup>HRE</sup>, donde se indica la secuencia de nucleótidos delecionada de la región 3'UTR. B. Northern-blot sobre ARN total de parásitos sincronizados con HU. Sobre los paneles se indican los tiempos tras la retirada de la droga. A la izquierda se muestran los nombres de las sondas empleadas. El panel inferior corresponde al gel teñido con bromuro de etidio antes de ser transferido. C. Representación de las densitometrías obtenidas de las autorradiografías mostradas en B, donde también se representan los porcentajes de células en fase S en cada momento de la cinética determinado por citometría de flujo. D. Análisis de la síntesis de proteína recombinante mediante marcaje metabólico con metionina-S<sup>35</sup> durante la última hora antes de la toma de la muestra. El tiempo en horas tras la retirada de la HU se muestra sobre las fotografías. Los paneles superiores muestran el resultado obtenido sobre extractos totales de núcleos resueltos en gels 10-15% de acrilamida. Los paneles inferiores corresponden el resultado de la inmunoprecipitación realizada sobre los extractos nucleares mostrados arriba. Se muestran los resultados de las autorradiografía (*De novo*), el gel teñido con azul de coomassie o el resultado del Western-blot realizado con anticuerpo anti-6xHis como controles de cantidad. E. Representación del aumento en síntesis *de novo* normalizado con la cantidad de proteína total de cada carril, calculado a partir de la densitometría realizada sobre la inmunoprecipitación mostrada en D. En la gráfica también se indican los porcentajes de células en fase S en cada momento de la cinética.

## RESULTADOS

Para estudiar si la falta de control observada en la síntesis de la proteína recombinante a lo largo del ciclo celular está relacionada con la capacidad de unión del ARNm a ribosomas, extractos citosólicos obtenidos de esta línea a las 0 y 3 horas tras la retirada de la HU, fueron analizados en gradientes de sacarosa. En la figura 20A se muestra el resultado. Se puede apreciar que los ARN mensajeros marcados con 6 histidinas permanecen constitutivamente unidos a polisomas. En la figura 20B se muestra el resultado obtenido de la hibridación de esos mismos filtros con la sonda H4 usada como control. Estos ensayos se realizaron tres veces y la media  $\pm$  SD obtenida se incluyen en la figura 20C.



**Figura 20.-** Resultado de *Northern-blot* realizado sobre las distintas fracciones de ARN, obtenidas tras la ultracentrifugación en gradientes de sacarosa del citoplasma obtenido de la línea LipXhisH2A $\Delta$ <sup>HRE</sup>. Los paneles superiores corresponden a cultivos mantenidos durante 16 horas en presencia de HU (0 h). Los inferiores se obtuvieron 3 horas después de la retirada de la droga. Bajo las autorradiografías se representan los porcentajes de ARNm presente en cada fracción. **A.** Resultado obtenido de la hibridación de los filtros con la sonda 6xHis. **B.** Resultado de la hibridación con la sonda H4. **C.** Representación gráfica de la media y desviación estándar de los porcentajes de ARNm asociado a polisomas (contenidos en las fracciones 7 a 15) correspondientes a tres experimentos independientes.

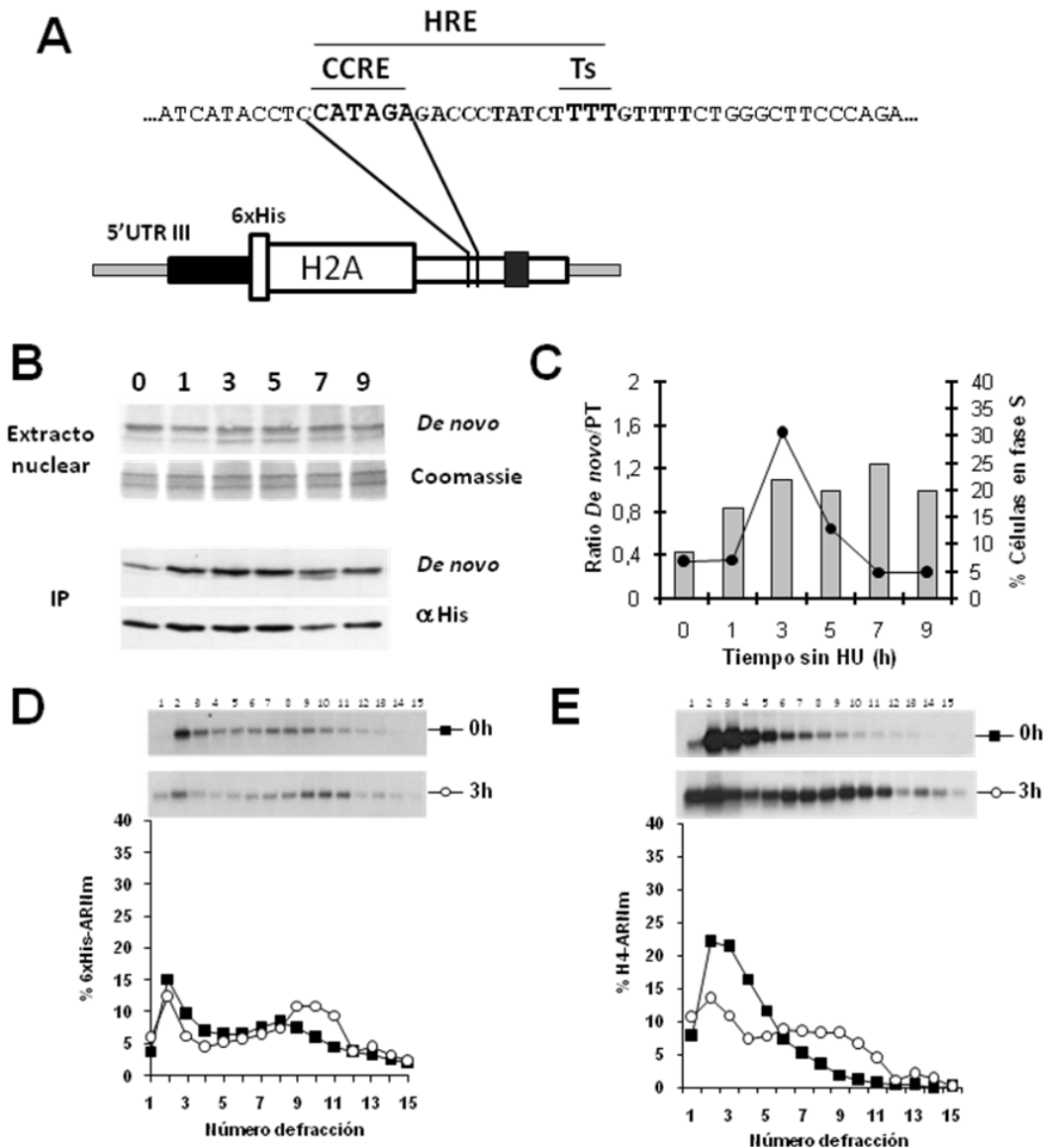


**6.- Análisis del efecto de las deleciones parciales de HRE en la expresión asociada al ciclo celular del gen *6xhisH2A*.**

A continuación se analizó el papel de los dos elementos presentes en HRE en la regulación de la expresión del gen *H2A4*.

En primer lugar se analizó el efecto de eliminar la región CCRE. Con este objetivo se elaboró una nueva construcción denominada pXhisH2A $\Delta$ <sup>CCRE</sup> (figura 21A). Como en los casos anteriores, primero se analizaron los niveles de ARNm generado en la línea LipXhisH2A $\Delta$ <sup>CCRE</sup> durante la cinética de 9 horas del cultivo sincronizado con HU. No se observó una variación significativa de los niveles de ARNm a lo largo del ciclo celular (datos no mostrados). Mediante marcaje metabólico con metionina-S<sup>35</sup>, se determinaron los niveles de síntesis de la proteína recombinante durante el ciclo celular. El análisis realizado sobre extractos totales nucleares y el resultado de la inmunoprecipitación de la proteína 6xhisH2A demostró una expresión constitutiva de esta proteína a lo largo del ciclo celular (figura 21BC). Estos resultados se correlacionan con los obtenidos tras el análisis del grado de traducción de los mensajeros en las fases G<sub>1</sub> y S del ciclo celular (Figura 21DE).

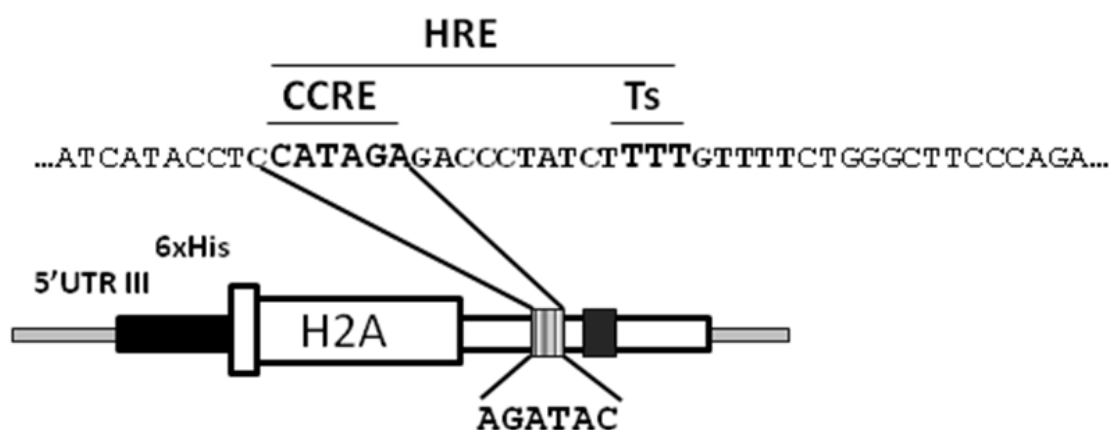
## RESULTADOS



**Figura 21.-** A. Representación esquemática de la construcción pXhiH2A $\Delta^{CCRE}$ , donde se indica la secuencia de nucleótidos delecionada de la región 3' UTR. B. Parásitos transfectados con esta construcción fueron sincronizados durante 16 h con HU. Tras la retirada de la droga se tomaron alícuotas del cultivo a diferentes tiempos (indicados sobre los paneles) que fueron marcadas durante 1 hora con metionina-S<sup>35</sup>. En la figura se muestra el resultado obtenido tras la exposición autorradiográfica tanto de los extractos totales de núcleo (paneles superiores) como sobre la inmunoprecipitación (IP) realizada con el anticuerpo anti-6xHis sobre esos mismos extractos (paneles inferiores). Como control de carga se incluye la foto del gel teñido con azul de coomassie (en extracto nuclear) y el resultado del Western-blot realizado con el anticuerpo anti-6xHis (en IP). C. Representación gráfica de los datos de la densitometría realizada sobre el resultado de la inmunoprecipitación mostrada en B, donde también se incluyen los porcentajes de células en fase S en cada punto. D. Northern-blot realizado sobre ARNm, obtenido del fraccionamiento en gradientes de sacarosa 15-40% de extractos citosólicos de la línea LipXhisH2A $\Delta^{CCRE}$  sincronizados durante 16 horas con HU (panel superior, 0 h) y tres horas tras la retirada de la droga (panel inferior, 3 h). Bajo las autorradiografías se representan los porcentajes de ARNm detectado en cada fracción. Se muestra el resultado de un ensayo repetido tres veces.

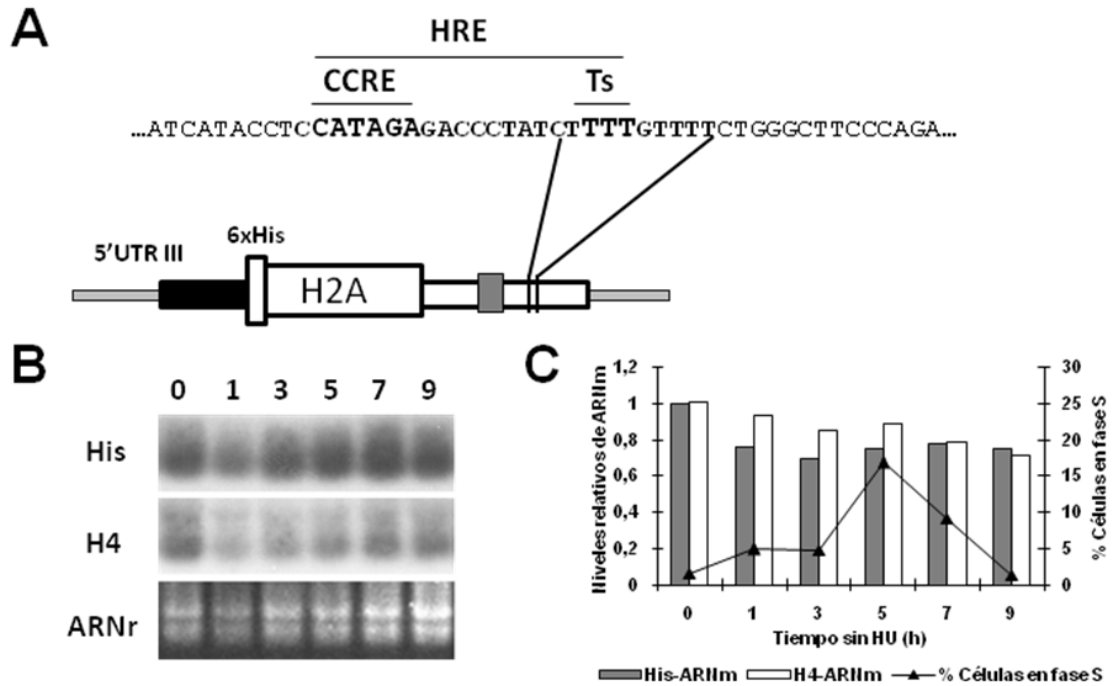
## RESULTADOS

Para descartar la posibilidad de que los efectos de pérdida de control observados en las líneas LipXhisH2A $\Delta^{\text{HRE}}$  y LipXhisH2A $\Delta^{\text{CCRE}}$  estén relacionados con una alteración de la estructura de la región 3' UTR y no a la eliminación del elemento de secuencia, se realizó una nueva construcción en la que se incluyó la secuencia CCRE de forma invertida (denominada pXhisH2ACCRE<sup>inv</sup>). En la figura 22 se muestra una representación esquemática de esta construcción. Todos los ensayos realizados, tanto niveles de ARNm, síntesis *de novo* como gradientes de polisomas, mostraron el mismo comportamiento que en las construcciones LipXhisH2A $\Delta^{\text{HRE}}$  y LipXhisH2A $\Delta^{\text{CCRE}}$ . Por ese motivo no se muestran los resultados obtenidos en esos ensayos.



**Figura 22.-** Representación esquemática de la construcción pXhisH2ACCRE<sup>inv</sup>. Se indica la secuencia de nucleótidos invertida. Obsérvese que en esta construcción no existe variación en el tamaño de la 3' UTR mutada.

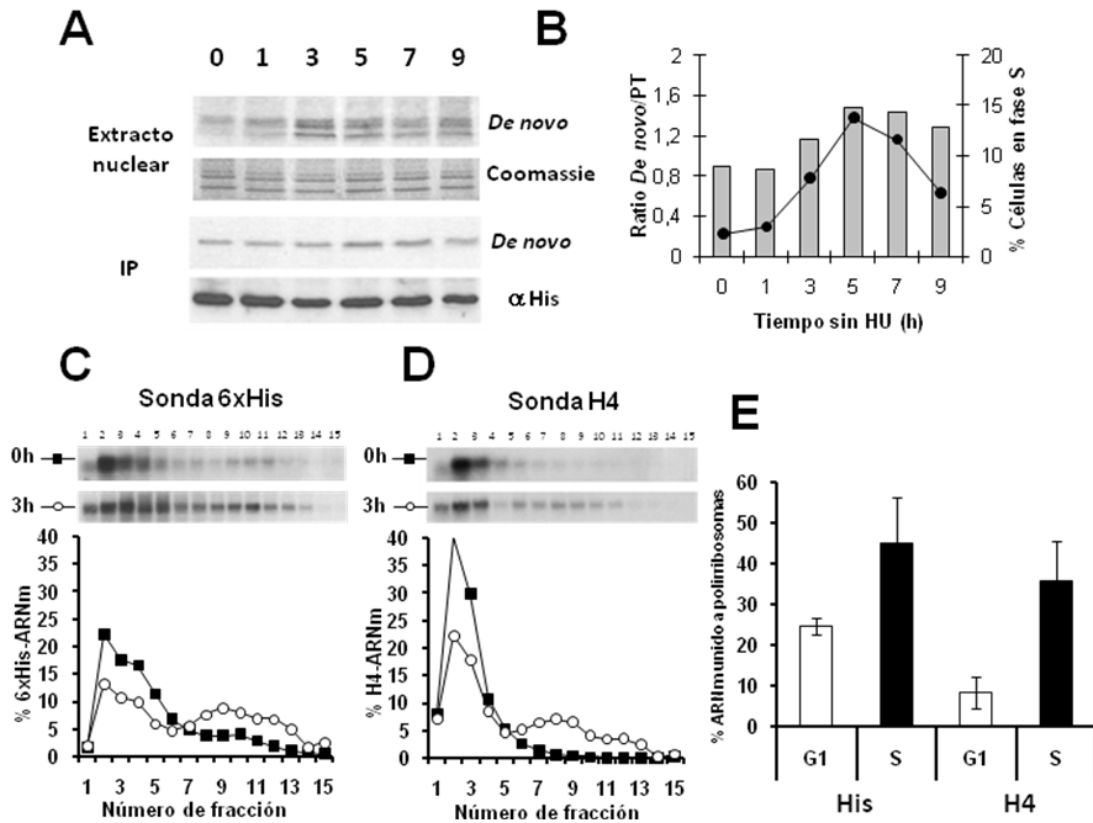
Finalmente, se analizó el efecto producido sobre la regulación por ciclo celular del gen *6xhisH2A* por la eliminación de la región rica en Ts presente en HRE. En la figura 23A se muestra un esquema de dicha construcción (pXhisH2A $\Delta^{\text{U-box}}$ ). La figura 23BC demuestra que no se observaron variaciones significativas en los niveles del ARNm *6xHisH2A* a lo largo del ciclo celular en esta línea celular.



**Figura 23.-** A. Representación esquemática de la construcción pXhisH2A $\Delta^{U-box}$ , donde se indica la secuencia de nucleótidos eliminada. B. Resultado del *Northern-blot*, realizado sobre ARN total de parásitos transfectados con esta construcción y tratados durante 16 h con HU. Sobre los paneles se indica el tiempo transcurrido tras la retirada de la droga, que corresponde con el momento de la toma de la muestra. A la izquierda se indican las sondas empleadas (oligodesoxirribonucleótido 6xHis, panel superior y sonda H4, panel central). El panel inferior muestra el gel teñido con bromuro de etidio antes de ser transferido. C. Representación de las densitometrías realizadas sobre las autorradiografías mostradas en B, donde también se indica el porcentaje de células en fase S.

Para analizar el efecto de esta nueva delección sobre la síntesis de la proteína recombinante a lo largo del ciclo celular, se realizaron ensayos de inmunoprecipitación sobre extractos nucleares de parásitos sincronizados con HU, durante las 9 horas posteriores a la retirada de la droga. El resultado obtenido muestra una acumulación de 6xhisH2A sintetizada *de novo*, que comienza en la fase S y se prolonga durante la fase G2/M del ciclo celular (figura 24AB). El aumento de síntesis de proteína en la fase S se correlacionó con una mejor traducción de los mensajeros (figura 24CD) observado en tres experimentos independientes (figura 24E).

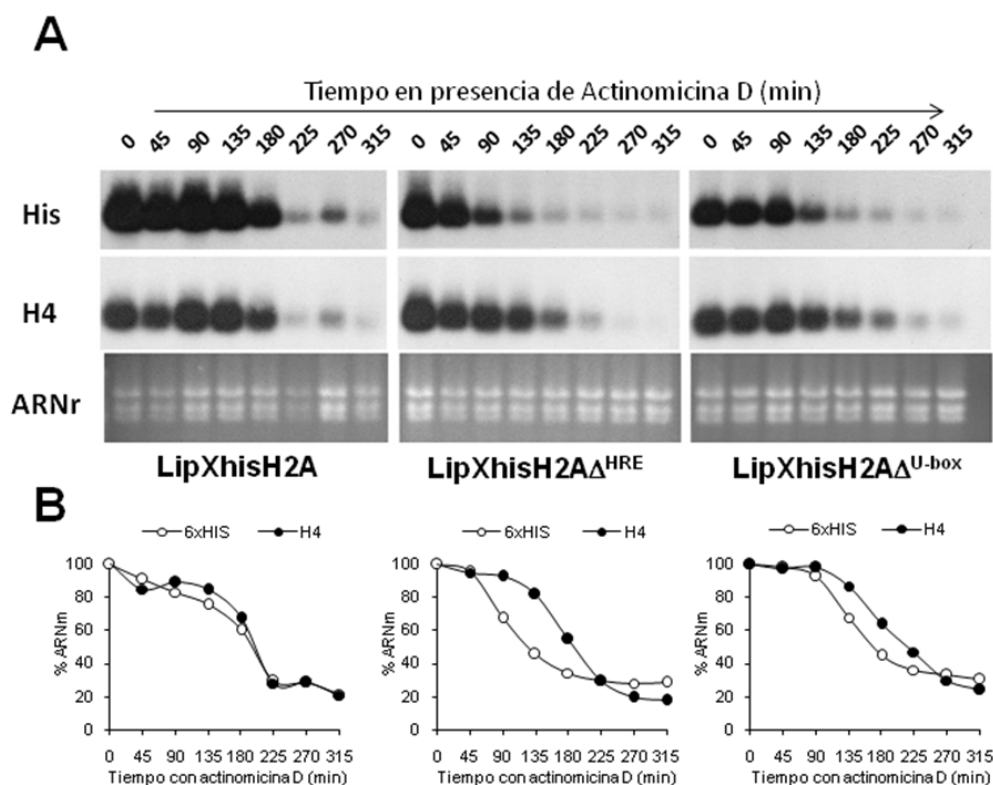
## RESULTADOS



**Figura 24.-** A. Resultado de la inmunoprecipitación realizada con el anticuerpo monoclonal anti-6xHis sobre extractos nucleares de la líneas LipXhisH2A $\Delta^{U-box}$ , tratados con HU y sometidos a marcaje metabólico con metionina-S<sup>35</sup> durante la última hora del ensayo. Sobre los paneles se muestran los tiempos tras la retirada de la HU. El panel superior muestra el resultado de la autorradiografía obtenida por la exposición del filtro. En el panel inferior se muestra el resultado del *Western-blot* realizado sobre ese mismo filtro con el anticuerpo anti-6xHis. B. Cuantificación del aumento en síntesis *de novo* normalizado con la cantidad de proteína total correspondiente a los paneles mostrados en A. Además, se incluyen los porcentajes de células en fase S. C. Resultado de *Northern-blot* realizado con ARN extraído de las 15 fracciones resultantes de la ultracentrifugación de extractos citosólicos, obtenidos de la misma línea a los tiempos 0 h (panel superior) y 3h (panel inferior), tras la retirada de la HU. El gráfico bajo las fotografías representa los porcentajes de 6xHis-ARNm detectado en cada fracción. D. Perfiles polisómicos obtenidos por la hibridación con la sonda H4 de los mismos filtros mostrados en C. E. Representación de las medias obtenidas de tres experimentos independientes, donde se cuantifica el porcentaje de ARNm asociado a polirribosomas en cada caso (fracciones entre la 7 y la 15).

**7.- Análisis de la implicación de CCRE y HRE en la estabilidad del ARNm.**

Los ARNm de las histonas de *Leishmania* están presentes a lo largo de todo el ciclo celular. El tratamiento de los parásitos con HU produce una acumulación de estos mensajeros en diferentes especies de *Leishmania* sin existir variación en su tasa de transcripción (Soto et al, 1996), (Genske et al, 1991). Estos datos parecen indicar una estabilización de los mensajeros de histonas durante la fase G<sub>1</sub> del ciclo celular. Por ese motivo se decidió analizar la estabilidad de los mensajeros de la histona H2A durante la fase G<sub>1</sub>, empleando las líneas celulares que contienen diferentes mutaciones de HRE. Parásitos de las líneas LipXhisH2A, LipXhisH2A $\Delta^{HRE}$  y LipXhisH2A $\Delta^{U-box}$  fueron tratados con HU durante 16 h y, posteriormente, fueron incubados en presencia del inhibidor de la síntesis de RNA actinomicina D. Se realizó un ensayo de determinación de la vida media de los ARNm de *6xhisH2A* extrayéndose ARN total a diferentes tiempos del tratamiento con la actinomicina D (figura 25AB). La vida media de cada uno de los mensajeros fue de: ARNm-pXhisH2A  $\approx$  190 min; ARNm-pXhisH2A $\Delta^{HRE} \approx$  100 min y ARNm-pXhisH2A $\Delta^{U-box} \approx$  150 min. Para el ARNm-H4 usado como control el tiempo de vida media fue de 190 min, coincidiendo con el tiempo calculado para el transcrito producido por la construcción pXhisH2A.



## RESULTADOS

---

**Figura 25.- A.** Resultado de *Northern-blot* realizado sobre ARN total extraído de las líneas indicadas bajo los paneles tras el tratamiento durante 16 horas con HU y la posterior adición de actinomicina D. El ARN fue extraído a los tiempos indicados sobre los paneles. En los paneles superiores se muestra el resultado obtenido con la sonda 6xHis. El resultado de hibridar esos mismos filtros con la sonda H4 se muestra en los paneles centrales. En los paneles inferiores se muestran los geles teñidos con bromuro de etidio antes de la transferencia.

**B.** Representación de los porcentajes de ARNm presente en cada momento del experimento, tanto para el ARNm-6xHis (círculos blancos) como para el ARNm-H4 (círculos negros).

**8.- Búsqueda del elemento HRE en genes de histonas de otros tripanosomátidos.**

La presencia del elemento HRE se ha correlacionado con la represión de la traducción y con la estabilización de los transcritos de la histona 6xhisH2A en la fase G<sub>1</sub> del ciclo celular. Como se indicó en la introducción, este fenómeno parece exclusivo de *Leishmania* y no está presente en otros kinetoplastidos. Se realizó una búsqueda en la base de datos de secuencias completas de diferentes kinetoplastidos (*L. major*, *L. infantum*, *L. braziliensis*, *T. cruzi* y *T. brucei*) para analizar la presencia de HRE en las regiones UTRs de los genes de histonas. En la tabla 3 se muestra el resumen de esta búsqueda donde se indica el número total de copias génicas para cada histona y el número de copias de HRE o CCRE encontrados en esas copias.

		H1	H2A	H2B	H3	H4
<i>L.major</i>	Total	4	7	5	6+1 <sup>Δ</sup>	7+2 <sup>□</sup>
	HRE	3	7	4	6/-	5/2
	CCRE	-	-	-	-/-	-/-
<i>L.infantum</i>	Total	3	6	4	5	8
	HRE	2	4	3	5	6
	CCRE	-	1	1	-	1*
<i>L.braziliensis</i>	Total	1	8	4+1 <sup>Δ</sup>	4+1 <sup>Δ</sup>	13
	HRE	1	5	3/1	4/-	8
	CCRE	-	1	-/-	2*/-	-
<i>T.cruzi</i>	Total	2	18	2	9	21
	HRE	-	4	-	7	-
	CCRE	-	-	-	1*	-
<i>T.brucei</i>	Total	-	14	14+1 <sup>Δ</sup>	8	11
	HRE	-	-	-/1	-	-
	CCRE	-	-	13/-	-	-

**Tabla 3.-** Resumen de la búsqueda realizada sobre las bases de datos accesibles desde [www.genedb.org](http://www.genedb.org), de todos los genes de histonas de tripanosomátidos con el genoma secuenciado completamente. La determinación de los genes de histonas se realizó usando la función *BlastP*, enfrentando la secuencia de aminoácidos de las histonas de *L. infantum* a las diferentes bases de datos consultadas. Se muestra el número total de copias de cada gen de histona, así como el número de esas copias que presentan HRE o CCRE en sus UTRs. Además, se indican las copias catalogadas como pseudogenes (●), variantes (●) o copias que presentan los dos elementos en su secuencia (\*). A continuación se indican los códigos de acceso de [genedb](http://www.genedb.org) de los genes incluidos en la tabla: ***L. major***, **histona H1:** LmjF09.0880, LmjF27.1605, LmjF27.1190, LmjF27.1240. **Histona H2A:** LmjF21.0915, LmjF21.0920, LmjF21.0930, LmjF29.1720, LmjF29.1730, LmjF29.1740, LmjF17.0280. **Histona H2B:**



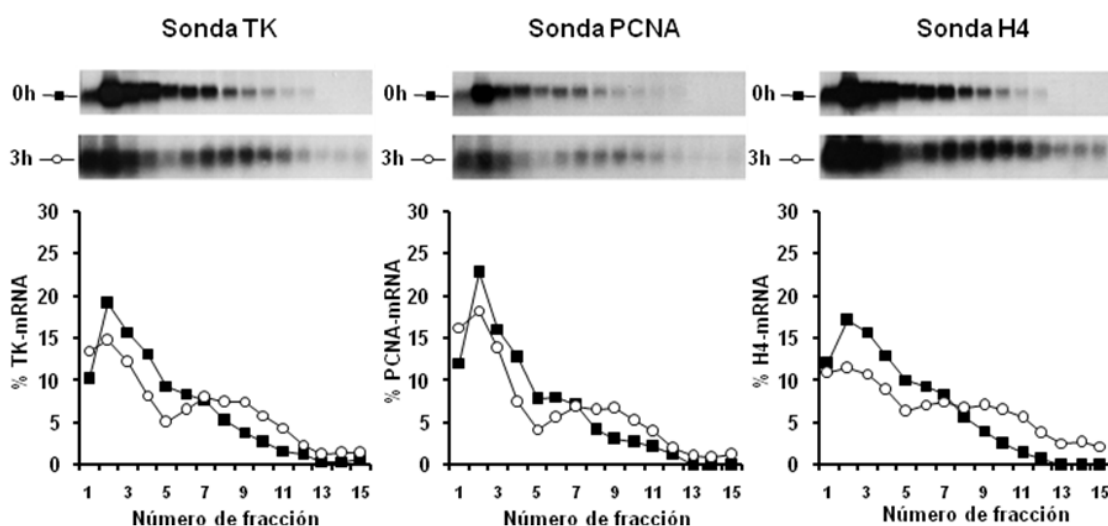
## RESULTADOS

---

LmjF19.0030, LmjF19.0040, LmjF19.0050, LmjF17.1220, LmjF09.1340. **Histona H3:** LmjF10.0990, LmjF10.0870, LmjF16.0570, LmjF16.0575, LmjF16.0600, LmjF16.0610, LmjF19.0630. **Histona H4:** LmjF35.1310, LmjF35.0015, LmjF02.0020, LmjF25.2450, LmjF15.0010, LmjF31.3180, LmjF36.0020, LmjF06.0010, LmjF21.0015. ***L. infantum*, histona H1:** LinJ27.0780, LinJ27.0830, LinJ09.0930. **Histona H2A:** LinJ29.2000, LinJ29.2010, LinJ29.2020, LinJ30.4420, LinJ30.4430, LinJ17.0310. **Histona H2B:** LinJ19.0040, LinJ17.1340, LinJ09.1400, LinJ29.0320. **Histona H3:** LinJ16.0580, LinJ16.0630, LinJ16.0640, LinJ10.1210, LinJ10.1330. **Histona H4:** LinJ35.0110, LinJ35.0020, LinJ35.1400, LinJ15.0010, LinJ06.0010, LinJ21.1910, LinJ31.3940, LinJ36.2650. ***L. braziliensis*, histona H1:** LbrM18\_V2.1510. **Histona H2A:** LbrM21\_V2.1140, LbrM21\_V2.1150, LbrM21\_V2.1160, LbrM17\_V2.0260, LbrM32\_V2.1260, LbrM32\_V2.1270, LbrM29\_V2.1810, LbrM29\_V2.1820. **Histona H2B:** LbrM09\_V2.1400, LbrM19\_V2.0340, LbrM19\_V2.0350, LbrM28\_V2.0220. **Histone H3:** LbrM10\_V2.0970, LbrM10\_V2.1070, LbrM10\_V2.1080, LbrM10\_V2.1090, LbrM19\_V2.0950. **Histona H4:** LbrM02\_V2.0020, LbrM02\_V2.0050, LbrM15\_V2.0010, LbrM21\_V2.0020, LbrM23\_V2.1830, LbrM29\_V2.2900, LbrM30\_V2.0450, LbrM31\_V2.3630, LbrM34\_V2.1230, LbrM35\_V2.0020, LbrM35\_V2.0050, LbrM35\_V2.0070, LbrM35\_V2.0130. ***T. cruzi*, histona H1:** Tc00.1 047053510225.10, Tc00.1047053506369.70. **Histona H2A:** Tc00.1047053511817.140, Tc00.10470 53511817.151, Tc00.1047053511817.161, Tc00.1047053511817.171, Tc00.1047053511817.180, Tc00.1 047053510525.80, Tc00.1047053510525.90, Tc00.1047053510525.100, Tc00.1047053510525.110, Tc00.10 47053509207.11, Tc00.1047053509207.20, Tc00.1047053511809.135, Tc00.1047053511809.140, Tc00.10 47053508321.11, Tc00.1047053508321.21, Tc00.1047053511323.40. **Histona H2B:** Tc00.10470 53511635.10, Tc00.1047053511635.20. **Histona H3:** Tc00.1047053509471.59, Tc00.1047053509471.68, Tc00.104705 3509471.77, Tc00.1047053509471.86, Tc00.1047053509471.95, Tc00.1047053507817.9, Tc00.10470535 07817.18, Tc00.1047053505931.40, Tc00.1047053505931.50. **Histona H4:** Tc00.10470 53511681.20, Tc00.1047053508203.20, Tc00.1047053508203.29 Tc00.1047053508203.38, Tc00.104705 3508203.47, Tc00.1047053508203.56, Tc00.1047053507941.150, Tc00.1047053507941.160, Tc00.104705 3507941.170, Tc00.1047053507943.10, Tc00.1047053507943.20, Tc00.1047053507943.30, Tc00.10470 53507943.40, Tc00.1047053508739.60, Tc00.1047053510351.11, Tc00.1047053510351.20, Tc00.10470535 10351.31, Tc00.1047053507601.150, Tc00.1047053507601.160, Tc00.1047053507601.170. ***T. brucei*, histona H2A:** Tb927.7.6360, Tb927.7.2820, Tb927.7.2830, Tb927.7.2840, Tb927.7.2850, Tb927.7.2860, Tb927.7.2870, Tb927.7.2880, Tb927.7.2890, Tb927.7.2900, Tb927.7.2910, Tb927.7.2920, Tb927.7.2930, Tb927.7.2940. **Histona H2B:** Tb11.02.5250, Tb10.406.0460, Tb10.406.0450, Tb10.406.0440, Tb10.406.0430, Tb10.406.0420, Tb10.406.0410 Tb10.406.0400, Tb10.406.0390, Tb10.406.0380, Tb10.406.0370, Tb10.406.0360 Tb10.40 6.0350, Tb10.406.0340, Tb10.406.0330. **Histona H3:** Tb10.61.1090, Tb927.1.2430, Tb927.1.2450, Tb927.1 .2470, Tb927.1.2490, Tb927.1.2510, Tb927.1.2530, Tb927.1.2550. **Histona H4:** Tb927.2.2670, Tb927.5.4170, Tb927.5.4180, Tb927.5.4190, Tb927.5.4200, Tb927.5.4210, Tb927.5.4220, Tb927.5.4230, Tb927.5.4240, Tb927.5.4250, Tb927.5.4260.

**9.- Análisis del comportamiento traduccional de otros genes de expresión asociada al ciclo celular.**

Los datos obtenidos en el apartado 6 demuestran que la presencia de CCRE en la región 3' UTR del gen *H2A4* genera un control traduccional en la expresión de dicho gen. Por ese motivo se decidió analizar si otros genes de expresión asociada a la fase S (no histonas) que portan CCRE en sus regiones UTRs presentan algún grado de control traduccional asociado al ciclo celular. Promastigotes de la cepa wt fueron tratados 16 horas con HU analizándose los perfiles polisómicos, obtenidos con sondas del gen timidina kinasa (que presenta una copia de CCRE en su región 5' UTR) y del gen codificante para el antígeno nuclear de proliferación celular (que presenta una copia de CCRE en la región 3' UTR) en la fase G<sub>1</sub> y en la fase S del ciclo celular (figura 26).



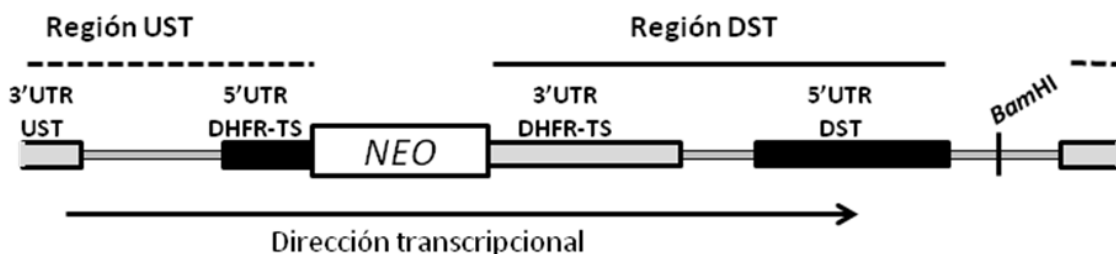
**Figura 26.-** Análisis de la unión de ARN mensajeros de genes de expresión asociada al ciclo celular (conteniendo CCRE) a polirribosomas. Promastigotes de *L. infantum* fueron tratados con HU durante 16 h. Los paneles superiores corresponden a las fracciones obtenidas antes de quitar la HU del cultivo (0 h). Los paneles inferiores corresponden a las fracciones obtenidas 3 h después de la retirada de la droga. Sobre los paneles se indica la sonda empleada en cada caso. Bajo los mismos se representan los porcentajes de ARNm presente en cada fracción.

## **DISCUSIÓN**



**1.- La expresión del gen H2A, mantenido como episoma, mantiene el control de la expresión génica asociada al ciclo celular.**

La transcripción promotor-independiente, policistrónica y bidireccional, que presentan los kinetoplastidos (Clayton, 2002), junto con la alta estabilidad de los fragmentos de ADN episómicos en el núcleo de estos organismos (Beverley, 1991), hace que el empleo de construcciones plasmídicas sea frecuentemente usado en los estudios realizados sobre estos protozoos. Con el fin de estudiar la implicación de las diferentes regiones presentes en los genes de las histonas en el control de la expresión génica por ciclo celular, se ha utilizado un sistema de expresión episómico basado en el plásmido pX63NEO (LeBowitz et al, 1991). Este vector utiliza las secuencias presentes en el locus de la *DHFR-TS* y fue diseñado como herramienta capaz de permitir la sobreexpresión génica en *Leishmania*. Como se indica en la figura 29, las regiones UTRs e intergénicas flanqueantes al gen *DHFR-TS* fueron conservadas (denominadas UST (del inglés “Upstream”) y DST (del inglés “Downstream”)), y la región codificante fue sustituida por el gen de resistencia a neomicina (*NEO*). A continuación se encuentra la diana de restricción *Bam*HI para la inserción de la región codificante que se quiera sobreexpresar. De esta forma la región DST permite la correcta adición del miniexón al transcrito del gen clonado y la poliadenilación del transcrito *NEO*. Por otra parte, la región UST permite el *trans-splicing* del transcrito *NEO* y la adición de la cola de poli(A) al transcrito a sobreexpresar. El sitio de adición del poli(A) de este transcrito no está bien definido en el vector, existiendo diferentes sitios crípticos para la inserción. Por lo tanto, es habitual que se generen diferentes mensajeros del gen sobreexpresado que varían en la longitud de la región 3’UTR (Quijada et al, 2000), (Larreta et al, 2004).



**Figura 29.- Esquema del vector de expresión en *Leishmania* pX63Neo.** Sobre el esquema se indica la secuencia presente corriente arriba (línea punteada, UST) y corriente abajo (línea continua, DST) del gen *DHFR-TS*. Se indican también las diferentes regiones 5’ y 3’ UTR. La caja blanca representa la región codificante del gen de resistencia a neomicina. También se incluye el sitio de clonaje (*Bam*HI) y la dirección de la transcripción.

Un problema derivado del empleo del vector pX63Neo para el estudio funcional de regiones génicas en *Leishmania*, es el hecho de que la presencia de las regiones reguladoras del gen de la *DHFR-TS* puede afectar a la expresión del gen incluido en el sitio *Bam*HI. Por ejemplo, se ha observado que la inclusión de la región codificante del gen reportero *CAT* en este vector produce variaciones en los niveles del mensajero durante el ciclo celular (datos del laboratorio no publicados).

Para evitar este efecto, se decidió clonar las diferentes construcciones en antisentido respecto al gen *NEO*. De esta forma ambos genes (el sobreexpresado y el de selección) están codificados en hebras distintas del ADN y, por tanto, son transcritos de forma independiente gracias a la transcripción independiente de promotor que existe en *Leishmania*. Siguiendo esta aproximación, se ensayó si la inclusión en antisentido permitía una correcta expresión de un gen completo. Se utilizó el gen *H2A4* (Soto et al, 2003) incluyendo sus regiones UTRs y las regiones intergénicas flanqueantes necesarias para el correcto procesamiento de sus ARNm. Para la localización de la histona H2A recombinante se incluyó, a continuación del ATG iniciador, la secuencia codificante para 6 histidinas. Esta construcción se denominó pXhisH2A. Mediante ensayos de *Northern-blot* se demostró que la línea celular LipXhisH2A presentaba un único transcrito de aproximadamente 0.7 Kb de longitud, tamaño que concuerda con un correcto procesamiento del transcrito (figura 9A). También se confirmó la presencia de la proteína recombinante (6xhisH2A) que presentaba una localización nuclear (figura 9C). Un hecho destacable es que la histona producida presenta un retraso en su movilidad electroforética causada por la presencia de las seis histidinas, lo que permite diferenciar esta proteína de la endógena en geles en gradiente de acrilamida 10-15% (figura 9D).

Todas las construcciones empleadas en este trabajo fueron realizadas siguiendo el mismo esquema y en todos los casos se obtuvieron ARN mensajeros del tamaño esperado (figura 13A), confirmándose mediante mapeo por RT-PCR el correcto procesamiento de las construcciones que contenían la región codificante del gen reportero *CAT*.

Para analizar la expresión de las construcciones a lo largo del ciclo celular, se hicieron dos tipos de abordajes experimentales: por un lado se estudió la síntesis de la

proteína a lo largo del ciclo celular y por otro la tasa de traducción de los mensajeros generados en fase G<sub>1</sub> y en fase S mediante gradientes de polisomas. Para el análisis de la síntesis *de novo* de la proteína, y aprovechando la diferencia de movilidad en geles SDS-PAGE de la proteína H2A recombinante respecto a la endógena, se analizaron los patrones totales de núcleo, donde puede observarse el comportamiento de ambas simultáneamente (ver figura 10A). Además, mediante ensayos de inmunoprecipitación, se cuantificó la variación en la síntesis de la proteína recombinante (figura 10B). En el caso de las construcciones que expresan la proteína CAT, el análisis de síntesis *de novo* de la proteína se realizó exclusivamente mediante inmunoprecipitación.

Por otra parte, y dependiendo de las líneas celulares empleadas, se usaron las sondas His o CAT en filtros donde se transfirieron los ARN mensajeros contenidos en las diferentes regiones de un gradiente de sacarosa, realizado a partir de extractos citosólicos de parásitos en la fase G<sub>1</sub> y S del ciclo celular. Posteriormente, y para poder comparar los diferentes análisis, los filtros se ensayaron con la sonda H4 como control de la expresión de una histona. En la figura 12 se muestra uno de estos ensayos realizados sobre la línea LipXhisH2A.

El empleo de HU para la sincronización de cultivos de *Leishmania* fue empleado por primera vez por (Galanti et al, 1994). Otros tripanosomátidos también han sido sincronizados con este compuesto, como *T. cruzi* (Mutomba & Wang, 1996) o *C. fasciculata* (Cosgrove et al, 1979). En estos trabajos se resalta que en tripanosomátidos las concentraciones de HU necesarias para producir la parada en G<sub>1</sub> son superiores a las empleadas en otros eucariotas, indicando una menor eficacia de esta droga en estos organismos. En los ensayos realizados en *L. infantum*, el empleo de HU ha permitido una sincronización parcial de los cultivos (figura 7), obteniéndose un grado variable de sincronización (entre un 20% y un 40%). Este bajo grado de sincronización, unido a la baja reproducibilidad entre los ensayos, ha dificultado en gran medida el análisis e interpretación de los resultados obtenidos.

Con estas herramientas se comprobó que la expresión del gen *H2A4*, mantenido de forma episómica, conserva el mismo modo de regulación que los genes de las histonas endógenas. Como se muestra en la figura 10, la proteína generada aumenta su síntesis durante la fase S, siguiendo la misma cinética que las histonas endógenas. Por

## DISCUSIÓN

---

otra parte, el transcrito *bxhisH2A* sólo está presente en fracciones traducidas durante la fase S, no observándose esa unión en G<sub>1</sub> presentando perfiles polisómicos similares a los de la histona H4 (figura 12).



## 2.- Implicación de las diferentes regiones génicas en el control de las histonas asociado al ciclo celular.

Existen datos en la bibliografía que relacionan la región codificante con un efecto sobre la capacidad de traducción de los ARNm (Lukes et al, 2006). Para analizar el papel de la región codificante de la histona H2A como posible elemento regulador en *cis* de la expresión asociada al ciclo celular, se sustituyó dicha secuencia por el gen reportero *CAT*. Mediante ensayos de inmunoprecipitación (figura 14A) y gradiente de polisomas (figura 15), realizados sobre la línea LipXCAT5'III/3'I, se pudo demostrar que las regiones no traducidas del gen *H2A4* son capaces de conferir control asociado al ciclo celular, y por tanto, son responsables del control. También se ensayaron las regiones UTRs del gen *H2A5*, demostrándose que dichas regiones también son capaces de conferir esta regulación (figura 14D). Además, se comprobó que la generación de genes quimera donde se combinaron las diferentes regiones no traducidas de estos dos genes, aun no existiendo en el genoma del parásito, también permiten conservar la expresión asociada al ciclo celular del gen *CAT* (figuras 14BC). Estos datos indican que la búsqueda de elementos de secuencia implicados en el control de la expresión génica de las histonas asociado al ciclo celular debe centrarse en estas regiones.

Cuando se analiza por separado el papel de estas regiones, combinándolas con las regiones 3' y 5' UTR del gen *HSP83* (requisito necesario para el procesamiento de los mensajeros), se observó que ambas regiones no traducidas son capaces de conferir control por ciclo celular al gen *CAT*. La cuantificación de la proteína *CAT*, sintetizada *de novo* en las líneas LipXCAT3'H2A y LipXCAT5'H2A, puso de manifiesto que en los dos casos se produce su acumulación en la fase S del ciclo celular (figura 16). Sin embargo, se pudo apreciar una importante diferencia y es que la síntesis de *CAT* no disminuyó en la fase G<sub>2</sub>/M en ausencia de la región 3' UTR (figura 16B). Por otra parte, los perfiles polisómicos de ambas líneas celulares resultaron ser completamente diferentes. En la línea LipXCAT3'H2A se observó que sólo hay unión de los mensajeros a los ribosomas en fase S (figura 17A). En la línea LipXCAT5'H2A se observó una ausencia de represión traduccional durante la fase G<sub>1</sub>, aunque se detectó un aumento de la unión de estos mensajeros a polisomas durante la fase S (figura 17B), lo que se correlaciona con el aumento observado en la síntesis de la proteína.

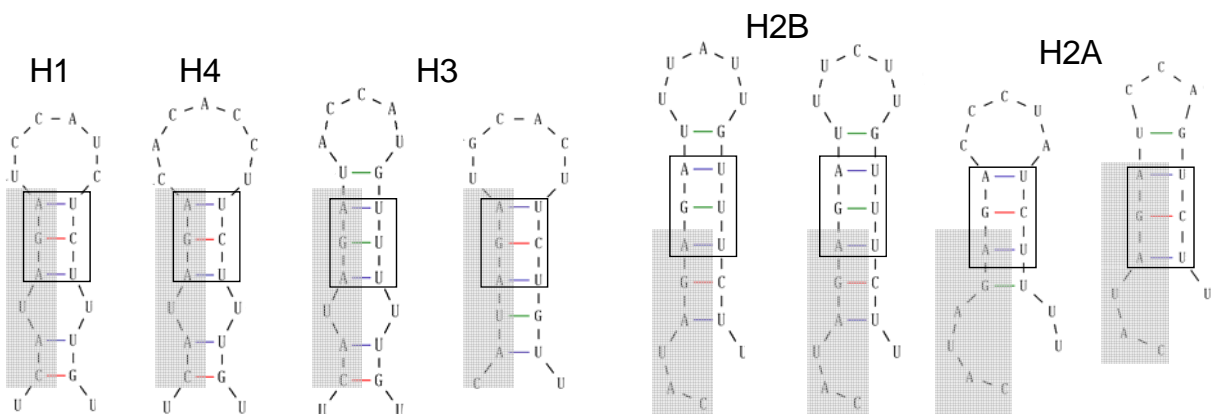
De estos ensayos se puede concluir que la región 3' UTR de la histona *H2A* porta secuencias responsables de la represión traduccional fuera de la fase S. Por lo tanto, en su ausencia los mensajeros se traducen a lo largo de todo el ciclo celular y no se impide su traducción en la fase G<sub>2</sub>/M. Sin embargo, no se puede descartar la existencia de secuencias activadoras en esta región que actúen durante la fase S. El papel de la región 5' UTR, menos evidente, parece estar produciendo una ligera mejora de la traducción en esa fase del ciclo celular, y en su ausencia, se observa una menor tasa de traducción de la histona recombinante respecto a la histona endógena en la fase S. Por lo tanto, ambas regiones actúan de forma coordinada para asegurar la presencia de histonas durante la fase S del ciclo celular.

A pesar de que estas construcciones realizadas con el gen reportero *CAT* han permitido reproducir el control asociado al ciclo celular característico de los genes de histonas, existe un fenómeno llamativo en los resultados obtenidos en los perfiles polisómicos. Como se puede ver en la figura 15, mientras que la represión traduccional sobre el ARNm-*CAT* en parásitos detenidos en G<sub>1</sub> es muy similar a la observada cuando el mismo filtro es hibridado con la sonda H4, la tasa de traducción del ARNm de *CAT* durante la fase S muestra un aumento respecto al transcrito de la histona endógena. Los porcentajes de ARNm, asociados a polisomas, son similares (50 – 60 %), pero la densidad que muestran dentro del gradiente es mayor, localizándose mayoritariamente entre las fracciones 11 y 14 (estando entre las fracciones 7 y 11 en el caso del mensajero de la histona H4). Este efecto concuerda con datos presentes en la bibliografía, que indican que mensajeros que portan la región codificante del gen *CAT* presentan una mayor unión a ribosomas, independientemente de las regiones UTRs que lo flanqueen (Folgueira & Requena, 2007), y que, por tanto, existen señales en esta secuencia que favorecen esta interacción entre los mensajeros *CAT* y los ribosomas. También existen trabajos que indican que variaciones en los nucleótidos adyacentes al ATG iniciador pueden alterar la tasa de traducción del transcrito (Lukes et al, 2006), (Requena et al, 2003). Por ello, en los ensayos realizados posteriormente se empleó la región codificante de la histona H2A, marcada con histidinas en su extremo N-terminal ya que, como demuestran los gradientes de la figura 12, en estas condiciones no se observa el fenómeno de aumento en la unión de ribosomas.

Las regiones UTRs, presentes en las diferentes copias de los genes de la histona *H2A*, a pesar de mostrar una alta divergencia en la secuencia (Soto et al, 2003), conservan la capacidad de conferir regulación por ciclo celular a estos genes. Además, el resto de regiones no traducidas, presentes en los genes codificantes para las otras histonas formadoras del nucleosoma de *Leishmania*, también son altamente divergentes respecto a las de la histona *H2A* (Soto et al, 1996), (Soto et al, 1997), (Genske et al, 1991). A pesar de la aparente falta de conservación de las secuencias, todos los genes de las histonas muestran el mismo modo de regulación de su expresión génica durante el ciclo celular. Estos datos resultan llamativos, teniendo en cuenta que en otras familias génicas de *Leishmania* la existencia de variaciones en las regiones UTRs confiere distintos modos de regulación. Ésto ha sido observado para el caso de los genes codificantes para la proteína de choque térmico HSP70, donde dos diferentes regiones 3' UTR han sido caracterizadas, mostrando diferencias significativas en los mecanismos de regulación de cada una de ellas (Folgueira et al, 2005). Por otro lado, genes que presentan dominios conservados dentro de sus secuencias UTRs pueden mostrar un mismo modo de regulación, como ocurre para diferentes genes de expresión en amastigote (Boucher et al, 2002). Casi todas las copias de los genes codificantes para las histonas de *Leishmania* presentan en común un pequeño elemento de secuencia al que hemos denominado HRE (figura 18B). Su implicación en el control de la expresión de los genes de histonas se discute a continuación.

**3.- HRE es esencial para la represión traduccional y la acumulación de los transcritos fuera de la fase S.**

El análisis de las secuencias presentes en las regiones UTRs de los genes de histonas ha permitido encontrar que los diferentes genes de histonas de *L. infantum* presentan en sus regiones 3' UTR un elemento previamente descrito en otros genes de expresión asociada a la fase S, tanto en *C. fasciculata* (Mahmood et al, 1999) como en *L. major* (Zick et al, 2005) o *T. brucei* (Li et al, 2007). Este elemento consiste en un octámero que porta un elemento central de seis nucleótidos altamente conservados (CATAGA), denominado CCRE. En el caso de las histonas siempre aparece asociado a un grupo de timidinas corriente abajo. Además, mediante análisis *in silico* se ha determinado que la combinación de dichas secuencias puede formar una estructura en horquilla en los ARN mensajeros (figura 30). Ensayos de retraso en gel han demostrado la existencia factores en el parásito capaces de interactuar específicamente con esa estructura (Soteriadou et al. *LeishWorld*. Sicilia 2004). En este trabajo se ha analizado el papel de HRE en el control de la traducción de los genes de histonas en *Leishmania*. Para ello, realizamos una delección completa del elemento mediante mutagénesis dirigida, generando la construcción pXhisH2A $\Delta^{HRE}$ . En las figura 19 y 20 se demuestra que la presencia de HRE resulta esencial para mantener el control traduccional asociado al ciclo celular.



**Figura 30.- Predicción de la estructura en horquilla formada por HRE en los transcritos de las histonas de *Leishmania*.** En sombreado se muestra la secuencia correspondiente a CCRE. Los cuadrados indican la zona de apareamiento con las uridinas.

Un fenómeno que diferencia el comportamiento de los ARN mensajeros de las histonas de *Leishmania* respecto a otros organismos, es el hecho de que estos transcritos permanecen presentes durante todo el ciclo celular sin sufrir una acumulación en la fase S (Soto et al, 2004). Los resultados obtenidos en los ensayos, en los que se analizó la vida media de los mensajeros, mediante el empleo de actinomicina D (figura 25), demuestran que la presencia de HRE se correlaciona con una mayor estabilidad de los transcritos en la fase G<sub>1</sub>. Su eliminación produce que la vida media de estos decaiga aproximadamente a la mitad. La ausencia de HRE en la mayoría de los genes codificantes para las histonas de otros protozoos del género *Trypanosoma* (tabla 3) podría explicar el hecho de que los mensajeros de sus histonas no se puedan detectar fuera de la fase S (Recinos et al, 2001), (Ersfeld et al, 1996). Al carecer de este elemento, se puede hipotetizar que la expresión de los genes de histonas de *T. cruzi* y *T. brucei* no se relaciona con los mecanismos mediados por HRE, que llevan a la estabilización de los transcritos fuera de la fase S en *Leishmania*. Sin embargo, se ha detectado la presencia de HRE en algunas copias de los genes codificantes para las histonas *H2A* y *H3* en *T. cruzi*. Por lo tanto, sería interesante analizar si en este organismo existe la maquinaria capaz de dar función a esta secuencia y comprobar si en este parásito pueden coexistir diferentes mecanismos de control de la expresión de los genes de histonas.

HRE es un elemento formado por dos secuencias bien diferenciadas. Por un lado el octámero CCRE, y por otro una secuencia rica en timidinas. Para determinar si ambas secuencias actúan de forma combinada o independiente, en los fenómenos atribuidos a HRE, se analizó el efecto de la delección de cada uno de ellas de forma separada.

La eliminación (pXhisH2A $\Delta$ <sup>CCRE</sup>) o inversión (pXhisH2A<sup>CCRE</sup><sup>inv</sup>) de la secuencia CATAGA, de la región 3'UTR del ARNm de la histona recombinante, provocó una pérdida total en la regulación, similar a la observada al eliminar todo el elemento. Tanto la síntesis *de novo* (en extractos nucleares y en la inmunoprecipitación) como los gradientes de polisomas muestran una expresión del gen recombinante no relacionada con el ciclo celular (figura 21). Estos resultados demuestran que la presencia del elemento CCRE en los ARNm de las histonas resulta esencial para mantenimiento de la regulación producida por HRE durante el ciclo celular.

## DISCUSIÓN

La presencia de una región rica en timidinas y la estructura que genera en el ARNm al interactuar con los nucleótidos conservados del elemento CCRE, parece estar relacionada con el papel diferencial de CCRE en el control traduccional de la expresión de histonas de *Leishmania*, respecto a su papel como elemento responsable de la acumulación de ARNm en la fase S del ciclo celular descrito en *C. fasciculata* (Pasion et al, 1996) y *L. major* (Zick et al, 2005). Para analizar el papel de las timidinas en el control se estudió la expresión de la histona H2A recombinante en la línea celular transfectada con la construcción pXhisH2A $\Delta^{U\text{-box}}$ . A diferencia de lo que sucedió cuando se eliminó o alteró (en el caso de la inversión) la secuencia CCRE, la eliminación de la región rica en timidinas no produce una pérdida total de la capacidad de controlar la expresión durante el ciclo celular (figura 24). El resultado de la inmunoprecipitación muestra que la síntesis de 6xhisH2A es específica de la fase S. El análisis de la distribución de ARN en polirribosomas demostró que este ARNm, en parásitos detenidos en G<sub>1</sub>, estaba siendo traducido. Como se recoge en la tabla 4, el grado de traducción de estos mensajeros en la fase G<sub>1</sub> es menor que el observado en las construcciones donde se ha producido una eliminación de CCRE. No así el grado de traducción durante la fase S, que resulta similar en todas las construcciones.

ARNm	G <sub>1</sub>	S
6xhisH2A	10%	50%
6xhisH2A $\Delta^{U\text{-box}}$	25%	50%
6xhisH2A $\Delta^{CCRE}$	40%	50%

**Tabla 4.- Porcentaje de ARNm asociado a ribosomas en las diferentes selecciones estudiadas.**

Podemos concluir que la alteración del elemento HRE y, por lo tanto, de la estructura en horquilla que puede generar en el ARNm de las histonas de *Leishmania* es capaz de modificar el patrón de expresión génica a lo largo del ciclo celular, asociado al grado de traducción de sus mensajeros. Sin embargo, los resultados obtenidos parecen indicar que la presencia de CCRE podría relacionarse con otros procesos de regulación traduccional independientes de HRE. Por este motivo, se analizaron los perfiles polisómicos de genes de *Leishmania* de expresión en fase S que presentan el elemento

CCRE en sus regiones no traducidas (figura 26). Los ARN mensajeros del gen timidilato kinasa (que presenta una copia del octámero en la región 5' UTR) o del gen codificante para el antígeno nuclear de proliferación nuclear (que lo porta en la región 3'UTR) muestran el mismo comportamiento en los gradientes de polisomas que el mensajero de la histona H4. Como ocurre en el caso de las histonas, la represión traduccional de los ARN mensajeros de estos genes es total en la fase G<sub>1</sub>, mientras que en la línea celular LipXhisH2AΔ<sup>U-box</sup> la represión es sólo parcial. Este dato puede ser tomado como una indicación de que otros elementos de secuencia presentes en la región 3' UTR de la histona H2A no permiten el correcto funcionamiento de CCRE. Alternativamente, pueden existir otros elementos ajenos a CCRE implicados en la regulación traduccional de genes codificantes para proteínas no histonas de expresión asociada a la fase S. El estudio del posible papel de CCRE en el control de la traducción de genes de tripanosomátidos puede ser un interesante campo de investigación en el futuro.

Datos obtenidos en *C. fasciculata* (Pasion et al, 1996) y *L. major* (Zick et al, 2005), demostraron que los ARN mensajeros de genes de expresión asociada a la fase S, que presentan el octámero CCRE en sus regiones UTRs, sufren una acumulación durante esa fase del ciclo celular. Sorprendentemente, cuando se analizaron los niveles de los transcritos de la línea LipXhisH2AΔ<sup>U-box</sup>, no se observaron variaciones en sus niveles a lo largo del ciclo celular (figura 23B). Esta ausencia de control sobre el nivel del ARNm mutante, que difiere de lo que está descrito para otros genes que portan el octámero, puede explicarse por diferentes motivos. En los ensayos realizados sobre *L. major* prácticamente el 90 % de los parásitos fueron sincronizados (Zick et al, 2005), mientras que en los ensayos aquí mostrados el grado de sincronización es menor. Esta notoria diferencia en el grado de sincronización de los cultivos podría explicar por qué no se observan variaciones en los niveles del ARNm. Por otro lado, en *C. fasciculata*, cuando una única copia de CCRE es incluida en un gen reportero, no se observa efecto sobre los niveles del transcrito durante el ciclo celular, y se precisa incluir 6 copias del elemento para conferir acumulación del transcrito reportero durante la fase S (Mahmood et al, 1999). Dado que existen genes que sólo portan una única copia de CCRE en su secuencia y presentan acumulación de transcritos en fase S, habría que pensar que las secuencias flanqueantes y/o la posición que ocupa dentro del mensajero donde se encuentra el elemento determina el efecto del hexámero CATAGA. Otro dato llamativo,

## DISCUSIÓN

---

relacionado con CCRE y la estabilidad de los transcritos, se obtuvo del ensayo realizado con actinomicina D, mostrado en la figura 25. En algunos trabajos realizados en *C. fasciculata* CCRE ha sido considerado una secuencia desestabilizadora fuera de la fase S (Mahmood et al, 1999). Sin embargo, los ARN mensajeros de la histona recombinante, que contienen únicamente el CCRE (línea celular LipXhisH2A $\Delta^{U\text{-box}}$ ), son más estables que los ARN mensajeros mutantes para todo el elemento HRE (línea celular LipXhisH2A $\Delta^{HRE}$ ) en la fase G<sub>1</sub> (figura 25).



#### 4.- Modelo de acción de HRE y CCRE en la región 3'UTR de las histonas.

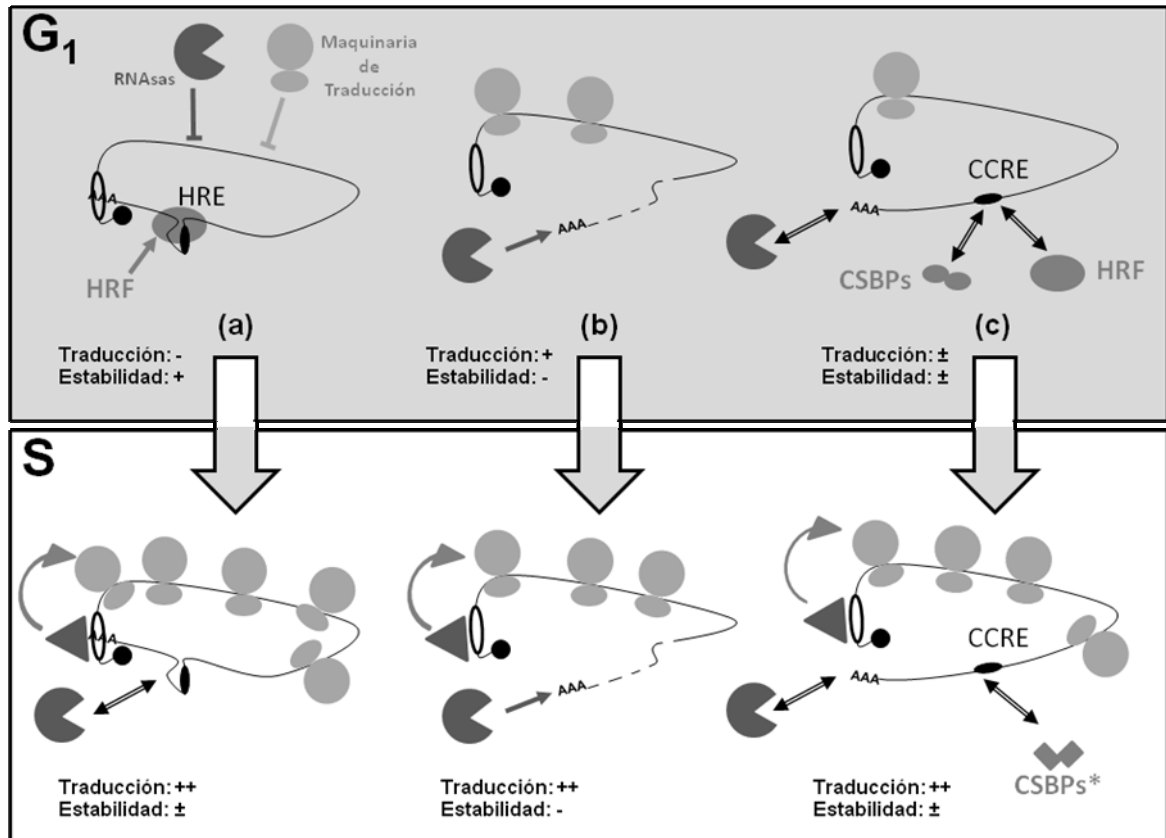
Con todo lo expuesto anteriormente, se puede elaborar un modelo general que explique la implicación de HRE en la regulación de la expresión génica asociada al ciclo celular de los genes de las histonas en *Leishmania* (figura 29). La presencia de HRE en la región 3' UTR de los genes de histonas genera una estructura que puede permitir la interacción de diferentes factores proteicos. Durante la fase G<sub>1</sub> la interacción de los factores podría permitir la generación de una ribonucleopartícula estable, no accesible a la maquinaria de degradación ni traducción. Llegada la fase S se producirá una modificación o una disociación de estos factores, permitiendo el ensamblaje del complejo de iniciación de la traducción. Esta iniciación parece favorecida por elementos de secuencia localizados en la región 5' UTR de estos mensajeros. A pesar de que en este trabajo no se han analizado los factores que pudieran interaccionar con HRE, resultados no publicados obtenidos por el grupo de trabajo de la Dra. Ketty Soteriadou (grupo con el que mantenemos una colaboración), han caracterizado factores proteicos del parásito que interaccionan con HRE en la fase G<sub>1</sub> y no interaccionan en la fase S del ciclo celular. Para elaborar este modelo, estos factores se denominarán HRF (del inglés “*Histone Regulatory Factors*”).

La eliminación completa de HRE, así como la delección o inversión de CCRE, induce una pérdida de la capacidad de represión traduccional durante la fase G<sub>1</sub>. La ausencia de secuencias para la interacción de HRF produce una expresión constitutiva durante el ciclo celular, mostrando únicamente un ligero aumento en la traducción de estos mensajeros llegada la fase S por la presencia de la región 5' UTR de la histona.

Por otra parte, la eliminación del grupo de timidinas y la conservación de CCRE en la región 3'UTR de la histona produce una pérdida parcial de la represión traduccional de estos mensajeros durante la fase G<sub>1</sub>. La unión de HRF, de una forma menos eficiente al mensajero (por la pérdida de la estructura en horquilla), podría explicar los efectos observados: una pérdida parcial de la represión traduccional en G<sub>1</sub>, manteniéndose la capacidad de traducción en la fase S, y una disminución de la vida media de los mensajeros en la fase G<sub>1</sub>, con respecto a los ARN mensajeros de histonas que contienen el elemento HRE completo. Alternativamente, la secuencia contenida en

## DISCUSIÓN

el elemento CCRE, en ausencia de la segunda señal que conforma la estructura de HRE, puede interactuar con otros factores proteicos, similares a los descritos en *C. fasciculata*, y cuyos genes están presentes en el genoma de *Leishmania*. Es destacable señalar que entre estos factores (denominados de forma genérica CSBPs) existe una proteína de unión a la cola poli(A), pudiéndose relacionar así el elemento CCRE con traducción.



**Figura 29.-** Modelo de la regulación de la expresión génica asociada al ciclo celular de las histonas de *Leishmania*. Los círculos negros representan la estructura 5' CAP. El asterisco en CSBPs representa modificación del estado de fosforilación de los factores. Los triángulos oscuros representan el activador traduccional que podría interactuar con la región 5' UTR.

## **CONCLUSIONES**



1. El clonaje en antisentido en el vector de expresión pX63NEO permite una correcta expresión de los genes de histonas de *Leishmania*. La regulación de la expresión de estos genes es similar a la de los genes con localización cromosómica.
2. Ambas regiones no traducidas están implicadas en el control traduccional. Las regiones 3' UTR son imprescindible para la represión de la traducción de los mensajeros de histonas de *Leishmania*, mientras que las regiones 5' UTR tienen un papel activador de la traducción en la fase S del ciclo celular.
3. El elemento HRE localizado en la región 3' UTR es esencial para el control traduccional asociado al ciclo celular de los genes de histonas en *Leishmania*. Su eliminación produce una pérdida total de dicho control. Además, es responsable de la estabilidad que manifiestan los ARN mensajeros de las histonas fuera de la fase S.
4. El elemento HRE está formado por dos secuencias conservadas en los genes de histonas de *Leishmania*, un hexámero CATAGA (denominado CCRE, presente en otros genes de expresión regulada por ciclo celular) y una secuencia rica en timidinas localizada corriente abajo. La presencia de ambas secuencias es imprescindible para el mantenimiento del control.
5. La presencia de la secuencia CCRE en la región 3' UTR de los ARN mensajeros de histonas produce un control traduccional asociado al ciclo celular, sin reprimir completamente la traducción en la fase G<sub>1</sub>. Por otra parte, la presencia del grupo de timidinas en ausencia de CCRE no produce una expresión asociada al ciclo celular.
6. HRE a diferencia de CCRE sólo se localiza en las regiones 3' UTR, y está presente en la mayor parte de las copias de los genes de histonas en *Leishmania*, mientras que en otros tripanosomátidos apenas está representado.



## **BIBLIOGRAFÍA**





- Alberts B BD, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson, J** (2002a) El ciclo de división celular. *En Biología Molecular de la Célula*, Omega (ed), Tercera edn, 17, pp 926-972. Barcelona
- Alberts B BD, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson, J** (2002b) El DNA cromosómico y su empaquetamiento. *En Biología Molecular de la Célula*, Omega (ed), 8, pp 361-370. Barcelona
- Alsford S, Horn D** (2004) Trypanosomatid histones. *Mol Microbiol* **53**(2): 365-372
- Alzate JF, Alvarez-Barrientos A, Gonzalez VM, Jimenez-Ruiz A** (2006) Heat-induced programmed cell death in *Leishmania infantum* is reverted by Bcl-X(L) expression. *Apoptosis* **11**(2): 161-171
- Amela C, Mendez I, Torcal JM, Medina G, Pachon I, Canavate C, Alvar J** (1995) Epidemiology of canine leishmaniasis in the Madrid region, Spain. *Eur J Epidemiol* **11**(2): 157-161
- Amusatogui I, Sainz A, Aguirre E, Tesouro MA** (2004) Seroprevalence of *Leishmania infantum* in northwestern Spain, an area traditionally considered free of leishmaniasis. *Ann N Y Acad Sci* **1026**: 154-157
- Angel SO, Requena JM, Soto M, Criado D, Alonso C** (1996) During canine leishmaniasis a protein belonging to the 83-kDa heat-shock protein family elicits a strong humoral response. *Acta Trop* **62**(1): 45-56
- Ashford RW** (1997) The Leishmaniases as model zoonoses. *Ann Trop Med Parasitol* **91**(7): 693-701
- Ashford RW** (2000) The Leishmaniases as emerging and reemerging zoonoses. *Int J Parasitol* **30**(12-13): 1269-1281
- Avliyakov NK, Hines JC, Ray DS** (2003) Sequence elements in both the intergenic space and the 3' untranslated region of the *Crithidia fasciculata* KAP3 gene are required for cell cycle regulation of KAP3 mRNA. *Eukaryot Cell* **2**(4): 671-677
- Banerjee S, Sen A, Das P, Saha P** (2006) *Leishmania donovani* cyclin 1 (LdCyc1) forms a complex with cell cycle kinase subunit CRK3 (LdCRK3) and is possibly involved in S-phase-related activities. *FEMS Microbiol Lett* **256**(1): 75-82
- Bates EJ, Knuepfer E, Smith DF** (2000) Poly(A)-binding protein I of *Leishmania*: functional analysis and localisation in trypanosomatid parasites. *Nucleic Acids Res* **28**(5): 1211-1220
- Benne R, Van den Burg J, Brakenhoff JP, Sloof P, Van Boom JH, Tromp MC** (1986) Major transcript of the frameshifted coxII gene from trypanosome mitochondria contains four nucleotides that are not encoded in the DNA. *Cell* **46**(6): 819-826
- Benz C, Nilsson D, Andersson B, Clayton C, Guilbride DL** (2005) Messenger RNA processing sites in *Trypanosoma brucei*. *Mol Biochem Parasitol* **143**(2): 125-134

- Beverley SM** (1991) Gene amplification in *Leishmania*. *Annu Rev Microbiol* **45**: 417-444
- Beverley SM, Coderre JA, Santi DV, Schimke RT** (1984) Unstable DNA amplifications in methotrexate-resistant *Leishmania* consist of extrachromosomal circles which relocalize during stabilization. *Cell* **38**(2): 431-439
- Boucher N, Wu Y, Dumas C, Dube M, Sereno D, Breton M, Papadopoulou B** (2002) A common mechanism of stage-regulated gene expression in *Leishmania* mediated by a conserved 3'-untranslated region element. *J Biol Chem* **277**(22): 19511-19520
- Breedem L** (1988) Cell cycle-regulated promoters in budding yeast. *Trends Genet* **4**(9): 249-253
- Brittingham A, Miller MA, Donelson JE, Wilson ME** (2001) Regulation of GP63 mRNA stability in promastigotes of virulent and attenuated *Leishmania chagasi*. *Mol Biochem Parasitol* **112**(1): 51-59
- Britto C, Ravel C, Bastien P, Blaineau C, Pages M, Dedet JP, Wincker P** (1998) Conserved linkage groups associated with large-scale chromosomal rearrangements between Old World and New World *Leishmania* genomes. *Gene* **222**(1): 107-117
- Brooks DR, Denise H, Westrop GD, Coombs GH, Mottram JC** (2001) The stage-regulated expression of *Leishmania mexicana* CPB cysteine proteases is mediated by an intercistronic sequence element. *J Biol Chem* **276**(50): 47061-47069
- Carrion J, Folgueira C, Alonso C** (2008) Immunization strategies against visceral leishmaniasis with the nucleosomal histones of *Leishmania infantum* encoded in DNA vaccine or pulsed in dendritic cells. *Vaccine*
- Clayton C, Shapira M** (2007) Post-transcriptional regulation of gene expression in trypanosomes and leishmanias. *Mol Biochem Parasitol* **156**(2): 93-101
- Clayton CE** (2002) Life without transcriptional control? From fly to man and back again. *Embo J* **21**(8): 1881-1888
- Compagno D, Lampe JN, Bourget C, Kutyavin IV, Yurchenko L, Lukhtanov EA, Gorn VV, Gamper HB, Jr., Toulme JJ** (1999) Antisense oligonucleotides containing modified bases inhibit in vitro translation of *Leishmania amazonensis* mRNAs by invading the mini-exon hairpin. *J Biol Chem* **274**(12): 8191-8198
- Cosgrove WB, Skeen MJ, Hajduk SL** (1979) Effects of hydroxyurea on *Crithidia fasciculata*. *J Protozool* **26**(4): 643-648
- Cruz AK, Titus R, Beverley SM** (1993) Plasticity in chromosome number and testing of essential genes in *Leishmania* by targeting. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**(4): 1599-1603

- Charest H, Zhang WW, Matlashewski G** (1996) The developmental expression of *Leishmania donovani* A2 amastigote-specific genes is post-transcriptionally mediated and involves elements located in the 3'-untranslated region. *J Biol Chem* **271**(29): 17081-17090
- de Andrade CR, Kirchhoff LV, Donelson JE, Otsu K** (1992) Recombinant *Leishmania* Hsp90 and Hsp70 are recognized by sera from visceral leishmaniasis patients but not Chagas' disease patients. *J Clin Microbiol* **30**(2): 330-335
- de la Cruz VF, Neckelmann N, Simpson L** (1984) Sequences of six genes and several open reading frames in the kinetoplast maxicircle DNA of *Leishmania tarentolae*. *J Biol Chem* **259**(24): 15136-15147
- Dhalia R, Reis CR, Freire ER, Rocha PO, Katz R, Muniz JR, Standart N, de Melo Neto OP** (2005) Translation initiation in *Leishmania major*: characterisation of multiple eIF4F subunit homologues. *Mol Biochem Parasitol* **140**(1): 23-41
- Ellenberger TE, Beverley SM** (1987) Reductions in methotrexate and folate influx in methotrexate-resistant lines of *Leishmania major* are independent of R or H region amplification. *J Biol Chem* **262**(28): 13501-13506
- Ellenberger TE, Wright JE, Rosowsky A, Beverley SM** (1989) Wild-type and drug-resistant *Leishmania major* hydrolyze methotrexate to N-10-methyl-4-deoxy-4-aminopteroate without accumulation of methotrexate polyglutamates. *J Biol Chem* **264**(27): 15960-15966
- Erkman JA, Sanchez R, Treichel N, Marzluff WF, Kutay U** (2005) Nuclear export of metazoan replication-dependent histone mRNAs is dependent on RNA length and is mediated by TAP. *RNA* **11**(1): 45-58
- Ersfeld K, Docherty R, Alford S, Gull K** (1996) A fluorescence in situ hybridisation study of the regulation of histone mRNA levels during the cell cycle of *Trypanosoma brucei*. *Mol Biochem Parasitol* **81**(2): 201-209
- Espinoza I, Toro GC, Hellman U, Galanti N** (1996) Histone H1 and core histones in *Leishmania* and *Crithidia*: comparison with *Trypanosoma*. *Exp Cell Res* **224**(1): 1-7
- Folgueira C, Quijada L, Soto M, Abanades DR, Alonso C, Requena JM** (2005) The Translational Efficiencies of the Two *Leishmania infantum* HSP70 mRNAs, Differing in Their 3'-Untranslated Regions, Are Affected by Shifts in the Temperature of Growth through Different Mechanisms. *J Biol Chem* **280**(42): 35172-35183
- Folgueira C, Requena JM** (2007) Pitfalls of the CAT reporter gene for analyzing translational regulation in *Leishmania*. *Parasitol Res* **101**(5): 1449-1452
- Galanti N, Dvorak JA, Grenet J, McDaniel JP** (1994) Hydroxyurea-induced synchrony of DNA replication in the Kinetoplastida. *Exp Cell Res* **214**(1): 225-230
- Garcia-Salcedo JA, Gijon P, Pays E** (1999) Regulated transcription of the histone H2B genes of *Trypanosoma brucei*. *Eur J Biochem* **264**(3): 717-723

**Genske JE, Cairns BR, Stack SP, Landfear SM** (1991) Structure and regulation of histone H2B mRNAs from *Leishmania enriettii*. *Mol Cell Biol* **11**(1): 240-249

**Gingras AC, Gygi SP, Raught B, Polakiewicz RD, Abraham RT, Hoekstra MF, Aebersold R, Sonenberg N** (1999) Regulation of 4E-BP1 phosphorylation: a novel two-step mechanism. *Genes Dev* **13**(11): 1422-1437

**Gourguechon S, Savich JM, Wang CC** (2007) The multiple roles of cyclin E1 in controlling cell cycle progression and cellular morphology of *Trypanosoma brucei*. *J Mol Biol* **368**(4): 939-950

**Hammarton TC, Clark J, Douglas F, Boshart M, Mottram JC** (2003) Stage-specific differences in cell cycle control in *Trypanosoma brucei* revealed by RNA interference of a mitotic cyclin. *J Biol Chem* **278**(25): 22877-22886

**Handman E** (2000) Cell Biology of *Leishmania*. *Advances in Parasitology* **44**: 3 - 39

**Hannaert V, Bringaud F, Opperdoes FR, Michels PA** (2003) Evolution of energy metabolism and its compartmentation in Kinetoplastida. *Kinetoplastid Biol Dis* **2**(1): 11

**Harper JW, Adams PD** (2001) Cyclin-dependent kinases. *Chem Rev* **101**(8): 2511-2526

**Hecker H, Betschart B, Bender K, Burri M, Schlimme W** (1994) The chromatin of trypanosomes. *Int J Parasitol* **24**(6): 809-819

**Heintz N** (1991) The regulation of histone gene expression during the cell cycle. *Biochim Biophys Acta* **1088**(3): 327-339

**Hentschel CC, Birnstiel ML** (1981) The organization and expression of histone gene families. *Cell* **25**(2): 301-313

**Hernandez-Rivas R SA** (1997) Separation and mapping of chromosomes of parasitic protozoa. *Mem Inst Oswaldo Cruz* **92**(6): 815-819

**Herwaldt BL** (1999) Leishmaniasis. *Lancet* **354**(9185): 1191-1199

**Hommel M** (1999) Visceral Leishmaniasis: biology of the parasite. *J Infect* **39**(2): 101-111

**Huang J, Van der Ploeg LH** (1991) Requirement of a polypyrimidine tract for trans-splicing in trypanosomes: discriminating the PARP promoter from the immediately adjacent 3' splice acceptor site. *EMBO J* **10**(12): 3877-3885

**Iborra S, Soto M, Carrion J, Alonso C, Requena JM** (2004) Vaccination with a plasmid DNA cocktail encoding the nucleosomal histones of *Leishmania* confers protection against murine cutaneous leishmaniasis. *Vaccine* **22**(29-30): 3865-3876

**Inoue H, Nojima H, Okayama H** (1990) High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* **96**(1): 23-28

**Ivens AC, Lewis SM, Bagherzadeh A, Zhang L, Chan HM, Smith DF** (1998) A physical map of the *Leishmania major* Friedlin genome. *Genome Res* **8**(2): 135-145

**Ivens AC, Peacock CS, Worthey EA, Murphy L, Aggarwal G, Berriman M, Sisk E, Rajandream MA, Adlem E, Aert R, Anupama A, Apostolou Z, Attipoe P, Bason N, Bauser C, Beck A, Beverley SM, Bianchetti G, Borzym K, Bothe G, Bruschi CV, Collins M, Cadag E, Ciarloni L, Clayton C, Coulson RM, Cronin A, Cruz AK, Davies RM, De Gaudenzi J, Dobson DE, Duesterhoeft A, Fazelina G, Fosker N, Frasch AC, Fraser A, Fuchs M, Gabel C, Goble A, Goffeau A, Harris D, Hertz-Fowler C, Hilbert H, Horn D, Huang Y, Klages S, Knights A, Kube M, Larke N, Litvin L, Lord A, Louie T, Marra M, Masuy D, Matthews K, Michaeli S, Mottram JC, Muller-Auer S, Munden H, Nelson S, Norbertczak H, Oliver K, O'Neil S, Pentony M, Pohl TM, Price C, Purnelle B, Quail MA, Rabbinowitsch E, Reinhardt R, Rieger M, Rinta J, Robben J, Robertson L, Ruiz JC, Rutter S, Saunders D, Schafer M, Schein J, Schwartz DC, Seeger K, Seyler A, Sharp S, Shin H, Sivam D, Squares R, Squares S, Tosato V, Vogt C, Volckaert G, Wambutt R, Warren T, Wedler H, Woodward J, Zhou S, Zimmermann W, Smith DF, Blackwell JM, Stuart KD, Barrell B, Myler PJ** (2005) The genome of the kinetoplastid parasite, *Leishmania major*. *Science* **309**(5733): 436-442

**Jackson V, Chalkley R** (1985) Histone synthesis and deposition in the G1 and S phases of hepatoma tissue culture cells. *Biochemistry* **24**(24): 6921-6930

**Janzen CJ, Fernandez JP, Deng H, Diaz R, Hake SB, Cross GA** (2006) Unusual histone modifications in *Trypanosoma brucei*. *FEBS Lett* **580**(9): 2306-2310

**Jo C, Jo SA** (2001) A simple method to construct T-vectors using XcmI cassettes amplified by nonspecific PCR. *Plasmid* **45**(1): 37-40

**Katakura K, Peng Y, Pithawalla R, Detke S, Chang KP** (1991) Tunicamycin-resistant variants from five species of *Leishmania* contain amplified DNA in extrachromosomal circles of different sizes with a transcriptionally active homologous region. *Mol Biochem Parasitol* **44**(2): 233-243

**Ke Y, Ash J, Johnson LF** (1996) Splicing signals are required for S-phase regulation of the mouse thymidylate synthase gene. *Mol Cell Biol* **16**(1): 376-383

**Koch C, Nasmyth K** (1994) Cell cycle regulated transcription in yeast. *Curr Opin Cell Biol* **6**(3): 451-459

**Kornberg RD, Lorch Y** (1999) Twenty-five years of the nucleosome, fundamental particle of the eukaryote chromosome. *Cell* **98**(3): 285-294

**Larreta R, Soto M, Quijada L, Folgueira C, Abanades DR, Alonso C, Requena JM** (2004) The expression of HSP83 genes in *Leishmania infantum* is affected by temperature and by stage-differentiation and is regulated at the levels of mRNA stability and translation. *BMC Mol Biol* **5**(1): 3

- LeBowitz JH, Coburn CM, Beverley SM** (1991) Simultaneous transient expression assays of the trypanosomatid parasite *Leishmania* using beta-galactosidase and beta-glucuronidase as reporter enzymes. *Gene* **103**(1): 119-123
- LeBowitz JH, Smith HQ, Rusche L, Beverley SM** (1993) Coupling of poly(A) site selection and trans-splicing in *Leishmania*. *Genes Dev* **7**(6): 996-1007
- Lehrach H, Diamond D, Wozney JM, Boedtker H** (1977) RNA molecular weight determinations by gel electrophoresis under denaturing conditions, a critical reexamination. *Biochemistry* **16**(21): 4743-4751
- Lewdorowicz M, Yoffe Y, Zuberek J, Jemielity J, Stepinski J, Kierzek R, Stolarski R, Shapira M, Darzynkiewicz E** (2004) Chemical synthesis and binding activity of the trypanosomatid cap-4 structure. *RNA* **10**(9): 1469-1478
- Li Y, Sun Y, Hines JC, Ray DS** (2007) Identification of new kinetoplast DNA replication proteins in trypanosomatids based on predicted S-phase expression and mitochondrial targeting. *Eukaryot Cell* **6**(12): 2303-2310
- Ling J, Morley SJ, Pain VM, Marzluff WF, Gallie DR** (2002) The histone 3'-terminal stem-loop-binding protein enhances translation through a functional and physical interaction with eukaryotic initiation factor 4G (eIF4G) and eIF3. *Mol Cell Biol* **22**(22): 7853-7867
- Luger K, Mader AW, Richmond RK, Sargent DF, Richmond TJ** (1997) Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature* **389**(6648): 251-260
- Lukes J, Paris Z, Regmi S, Breitling R, Mureev S, Kushnir S, Pyatkov K, Jirku M, Alexandrov KA** (2006) Translational initiation in *Leishmania tarentolae* and *Phytomonas serpens* (Kinetoplastida) is strongly influenced by pre-ATG triplet and its 5' sequence context. *Mol Biochem Parasitol* **148**(2): 125-132
- Mahmood R, Hines JC, Ray DS** (1999) Identification of cis and trans elements involved in the cell cycle regulation of multiple genes in *Crithidia fasciculata*. *Mol Cell Biol* **19**(9): 6174-6182
- Mahmood R, Mitra B, Hines JC, Ray DS** (2001) Characterization of the *Crithidia fasciculata* mRNA cycling sequence binding proteins. *Mol Cell Biol* **21**(14): 4453-4459
- Mahmood R, Ray DS** (1998) Nuclear extracts of *Crithidia fasciculata* contain a factor(s) that binds to the 5'-untranslated regions of TOP2 and RPA1 mRNAs containing sequences required for their cell cycle regulation. *J Biol Chem* **273**(37): 23729-23734
- Mair G, Shi H, Li H, Djikeng A, Aviles HO, Bishop JR, Falcone FH, Gavrilescu C, Montgomery JL, Santori MI, Stern LS, Wang Z, Ullu E, Tschudi C** (2000) A new twist in trypanosome RNA metabolism: cis-splicing of pre-mRNA. *RNA* **6**(2): 163-169

- Malik HS, Henikoff S** (2003) Phylogenomics of the nucleosome. *Nat Struct Biol* **10**(11): 882-891
- Maranon C, Thomas MC, Puerta C, Alonso C, Lopez MC** (2000) The stability and maturation of the H2A histone mRNAs from *Trypanosoma cruzi* are implicated in their post-transcriptional regulation. *Biochim Biophys Acta* **1490**(1-2): 1-10
- Martin-Sanchez J, Acedo C, Munoz-Perez M, Pesson B, Marchal O, Morillas-Marquez F** (2007) Infection by *Leishmania infantum* in cats: epidemiological study in Spain. *Vet Parasitol* **145**(3-4): 267-273
- Martinez-Calvillo S, Stuart K, Myler PJ** (2005) Ploidy changes associated with disruption of two adjacent genes on *Leishmania major* chromosome 1. *Int J Parasitol* **35**(4): 419-429
- Marzluff WF, Duronio RJ** (2002) Histone mRNA expression: multiple levels of cell cycle regulation and important developmental consequences. *Curr Opin Cell Biol* **14**(6): 692-699
- Masina S, M MG, Demotz SO, Fasel NJ** (2003) Protection against cutaneous leishmaniasis in outbred vervet monkeys using a recombinant histone H1 antigen. *J Infect Dis* **188**(8): 1250-1257
- Matsumoto S, Yanagida M** (1985) Histone gene organization of fission yeast: a common upstream sequence. *EMBO J* **4**(13A): 3531-3538
- McNicoll F, Muller M, Cloutier S, Boilard N, Rochette A, Dube M, Papadopoulou B** (2005) Distinct 3'-untranslated region elements regulate stage-specific mRNA accumulation and translation in *Leishmania*. *J Biol Chem* **280**(42): 35238-35246
- Mishra KK, Holzer TR, Moore LL, LeBowitz JH** (2003) A negative regulatory element controls mRNA abundance of the *Leishmania mexicana* Paraflagellar rod gene PFR2. *Eukaryot Cell* **2**(5): 1009-1017
- Mittra B, Ray DS** (2004) Presence of a poly(A) binding protein and two proteins with cell cycle-dependent phosphorylation in *Crithidia fasciculata* mRNA cycling sequence binding protein II. *Eukaryot Cell* **3**(5): 1185-1197
- Mittra B, Sinha KM, Hines JC, Ray DS** (2003) Presence of multiple mRNA cycling sequence element-binding proteins in *Crithidia fasciculata*. *J Biol Chem* **278**(29): 26564-26571
- Moll R, Wintersberger E** (1976) Synthesis of yeast histones in the cell cycle. *Proc Natl Acad Sci U S A* **73**(6): 1863-1867
- Montalvetti A, Pena-Diaz J, Hurtado R, Ruiz-Perez LM, Gonzalez-Pacanowska D** (2000) Characterization and regulation of *Leishmania major* 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase. *Biochem J* **349**(Pt 1): 27-34

- Moore LL, Santrich C, LeBowitz JH** (1996) Stage-specific expression of the *Leishmania mexicana* paraflagellar rod protein PFR-2. *Mol Biochem Parasitol* **80**(2): 125-135
- Mottram JC, Kinnaird JH, Shiels BR, Tait A, Barry JD** (1993) A novel CDC2-related protein kinase from *Leishmania mexicana*, LmmCRK1, is post-translationally regulated during the life cycle. *J Biol Chem* **268**(28): 21044-21052
- Müllner EWaG-S, J. A.** (1997) *Polysome gradients*. In *Manual of Immunology Methods*, Vol. 1, Lefkovits, I, ed. edn. London: Academic Press.
- Muhich ML, Boothroyd JC** (1989) Synthesis of trypanosome hsp70 mRNA is resistant to disruption of trans-splicing by heat shock. *J Biol Chem* **264**(13): 7107-7110
- Mundodi V, Somanna A, Farrell PJ, Gedamu L** (2002) Genomic organization and functional expression of differentially regulated cysteine protease genes of *Leishmania donovani* complex. *Gene* **282**(1-2): 257-265
- Mutomba MC, Wang CC** (1996) Effects of aphidicolin and hydroxyurea on the cell cycle and differentiation of *Trypanosoma brucei* bloodstream forms. *Mol Biochem Parasitol* **80**(1): 89-102
- Myler PJ, Audleman L, deVos T, Hixson G, Kiser P, Lemley C, Magness C, Rickel E, Sisk E, Sunkin S, Swartzell S, Westlake T, Bastien P, Fu G, Ivens A, Stuart K** (1999) *Leishmania major* Friedlin chromosome 1 has an unusual distribution of protein-coding genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(6): 2902-2906
- Nasmyth K** (1993) Control of the yeast cell cycle by the Cdc28 protein kinase. *Curr Opin Cell Biol* **5**(2): 166-179
- OMS.** (2002) Strategic direction for research in leishmaniasis. [www.who.int/tdr/diseases/leish/direction.html](http://www.who.int/tdr/diseases/leish/direction.html).
- Pardee AB, Li CJ, Reddy GP** (2004) Regulation in S phase by E2F. *Cell Cycle* **3**(9): 1091-1094
- Pasion SG, Brown GW, Brown LM, Ray DS** (1994) Periodic expression of nuclear and mitochondrial DNA replication genes during the trypanosomatid cell cycle. *J Cell Sci* **107** ( Pt 12): 3515-3520
- Pasion SG, Hines JC, Ou X, Mahmood R, Ray DS** (1996) Sequences within the 5' untranslated region regulate the levels of a kinetoplast DNA topoisomerase mRNA during the cell cycle. *Mol Cell Biol* **16**(12): 6724-6735
- Perry K AN** (1991) mRNA processing in the Trypanosomatidae. *Experientia* **47**(2): 118-128
- Pestova TV, Kolupaeva VG, Lomakin IB, Pilipenko EV, Shatsky IN, Agol VI, Hellen CU** (2001) Molecular mechanisms of translation initiation in eukaryotes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(13): 7029-7036



- Ploubidou A, Robinson DR, Docherty RC, Ogbadoyi EO, Gull K** (1999) Evidence for novel cell cycle checkpoints in trypanosomes: kinetoplast segregation and cytokinesis in the absence of mitosis. *J Cell Sci* **112** ( Pt **24**): 4641-4650
- Preiss T, Hentze MW** (1999) From factors to mechanisms: translation and translational control in eukaryotes. *Curr Opin Genet Dev* **9**(5): 515-521
- Pusarla RH, Bhargava P** (2005) Histones in functional diversification. Core histone variants. *FEBS J* **272**(20): 5149-5168
- Quijada L, Moreira D, Soto M, Alonso C, Requena JM** (1997a) Efficient 5'-end labeling of oligonucleotides containing self-complementary sequences. *Biotechniques* **23**(4): 658-660
- Quijada L, Soto M, Alonso C, Requena JM** (1997b) Analysis of post-transcriptional regulation operating on transcription products of the tandemly linked *Leishmania infantum* hsp70 genes. *J Biol Chem* **272**(7): 4493-4499
- Quijada L, Soto M, Alonso C, Requena JM** (2000) Identification of a putative regulatory element in the 3'-untranslated region that controls expression of HSP70 in *Leishmania infantum*. *Mol Biochem Parasitol* **110**(1): 79-91
- Recinos RF, Kirchhoff LV, Donelson JE** (2001) Cell cycle expression of histone genes in *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol* **113**(2): 215-222
- Reguera RM, Balana-Fouce R, Perez-Pertejo Y, Fernandez FJ, Garcia-Estrada C, Cubria JC, Ordonez C, Ordonez D** (2002) Cloning expression and characterization of methionine adenosyltransferase in *Leishmania infantum* promastigotes. *J Biol Chem* **277**(5): 3158-3167
- Reis CC, Campbell JL** (2007) Contribution of Trf4/5 and the nuclear exosome to genome stability through regulation of histone mRNA levels in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **175**(3): 993-1010
- Requena JM, Alonso C, Soto M** (2000) Evolutionarily conserved proteins as prominent immunogens during *Leishmania* infections. *Parasitol Today* **16**(6): 246-250
- Requena JM, Quijada L, Soto M, Alonso C** (2003) Conserved nucleotides surrounding the trans-splicing acceptor site and the translation initiation codon in *Leishmania* genes. *Exp Parasitol* **103**(1-2): 78-81
- Rigby PW, Dieckmann M, Rhodes C, Berg P** (1977) Labeling deoxyribonucleic acid to high specific activity in vitro by nick translation with DNA polymerase I. *J Mol Biol* **113**(1): 237-251
- Rittig MG, Bogdan C** (2000) *Leishmania*-host-cell interaction: complexities and alternative views. *Parasitol Today* **16**(7): 292-297

- Robinson KA, Beverley SM** (2003) Improvements in transfection efficiency and tests of RNA interference (RNAi) approaches in the protozoan parasite *Leishmania*. *Mol Biochem Parasitol* **128**(2): 217-228
- Rochette A, McNicoll F, Girard J, Breton M, Leblanc E, Bergeron MG, Papadopoulou B** (2005) Characterization and developmental gene regulation of a large gene family encoding amastin surface proteins in *Leishmania spp.* *Mol Biochem Parasitol* **140**(2): 205-220
- Sabaj V, Aslund L, Pettersson U, Galanti N** (2001) Histone genes expression during the cell cycle in *Trypanosoma cruzi*. *J Cell Biochem* **80**(4): 617-624
- Sabaj V, Diaz J, Toro GC, Galanti N** (1997) Histone synthesis in *Trypanosoma cruzi*. *Exp Cell Res* **236**(2): 446-452
- Sacks DL, Perkins PV** (1984) Identification of an infective stage of *Leishmania* promastigotes. *Science* **223**(4643): 1417-1419
- Sanchez R, Marzluff WF** (2002) The stem-loop binding protein is required for efficient translation of histone mRNA in vivo and in vitro. *Mol Cell Biol* **22**(20): 7093-7104
- Santos DO, Coutinho CE, Madeira MF, Bottino CG, Vieira RT, Nascimento SB, Bernardino A, Bourguignon SC, Corte-Real S, Pinho RT, Rodrigues CR, Castro HC** (2008) Leishmaniasis treatment a challenge that remains: a review. *Parasitol Res* **103**(1): 1-10
- Schumperli D** (1988) Multilevel regulation of replication-dependent histone genes. *Trends Genet* **4**(7): 187-191
- Sherr CJ, Roberts JM** (1999) CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes Dev* **13**(12): 1501-1512
- Smirlis D, Bisti SN, Xingi E, Konidou G, Thiakaki M, Soteriadou KP** (2006) *Leishmania* histone H1 overexpression delays parasite cell-cycle progression, parasite differentiation and reduces *Leishmania* infectivity in vivo. *Mol Microbiol* **60**(6): 1457-1473
- Soares CM, de Carvalho EF, Urmenyi TP, Carvalho JF, de Castro FT, Rondinelli E** (1989) Alpha- and beta-tubulin mRNAs of *Trypanosoma cruzi* originate from a single multicistronic transcript. *FEBS Lett* **250**(2): 497-502
- Sobrino R, Ferroglio E, Oleaga A, Romano A, Millan J, Revilla M, Arnal MC, Triscioglio A, Gortazar C** (2008) Characterization of widespread canine leishmaniasis among wild carnivores from Spain. *Vet Parasitol* **155**(3-4): 198-203
- Sopwith WF, Debrabant A, Yamage M, Dwyer DM, Bates PA** (2002) Developmentally regulated expression of a cell surface class I nuclease in *Leishmania mexicana*. *Int J Parasitol* **32**(4): 449-459

**Soto M, Iborra S, Quijada L, Folgueira C, Alonso C, Requena JM** (2004) Cell-cycle-dependent translation of histone mRNAs is the key control point for regulation of histone biosynthesis in *Leishmania infantum*. *Biochem J* **379**(Pt 3): 617-625

**Soto M, Quijada L, Alonso C, Requena JM** (1997) Molecular cloning and analysis of expression of the *Leishmania infantum* histone H4 genes. *Mol Biochem Parasitol* **90**(2): 439-447

**Soto M, Quijada L, Alonso C, Requena JM** (2000) Histone synthesis in *Leishmania infantum* is tightly linked to DNA replication by a translational control. *Biochem J* **346 Pt 1**: 99-105

**Soto M, Quijada L, Larreta R, Iborra S, Alonso C, Requena JM** (2003) *Leishmania infantum* possesses a complex family of histone H2A genes: structural characterization and analysis of expression. *Parasitology* **127**(Pt 2): 95-105

**Soto M, Requena JM, Alonso C** (1993a) Isolation, characterization and analysis of the expression of the *Leishmania* ribosomal P0 protein genes. *Mol Biochem Parasitol* **61**(2): 265-274

**Soto M, Requena JM, Garcia M, Gomez LC, Navarrete I, Alonso C** (1993b) Genomic organization and expression of two independent gene arrays coding for two antigenic acidic ribosomal proteins of *Leishmania*. *J Biol Chem* **268**(29): 21835-21843

**Soto M, Requena JM, Gomez LC, Navarrete I, Alonso C** (1992) Molecular characterization of a *Leishmania donovani infantum* antigen identified as histone H2A. *Eur J Biochem* **205**(1): 211-216

**Soto M, Requena JM, Jimenez-Ruiz A, Alonso C** (1991) The mRNA coding for the nucleosomal protein H2A of *Leishmania* is polyadenylated and has stem-loops at the 3' end. *Nucleic Acids Res* **19**(16): 4554

**Soto M, Requena JM, Morales G, Alonso C** (1994) The *Leishmania infantum* histone H3 possesses an extremely divergent N-terminal domain. *Biochim Biophys Acta* **1219**(2): 533-535

**Soto M, Requena JM, Quijada L, Alonso C** (1996) Organization, transcription and regulation of the *Leishmania infantum* histone H3 genes. *Biochem J* **318 ( Pt 3)**: 813-819

**Soto M, Requena JM, Quijada L, Garcia M, Guzman F, Patarroyo ME, Alonso C** (1995) Mapping of the linear antigenic determinants from the *Leishmania infantum* histone H2A recognized by sera from dogs with leishmaniasis. *Immunol Lett* **48**(3): 209-214

**Soto M, Requena JM, Quijada L, Perez MJ, Nieto CG, Guzman F, Patarroyo ME, Alonso C** (1999) Antigenicity of the *Leishmania infantum* histones H2B and H4 during canine visceral leishmaniasis. *Clin Exp Immunol* **115**(2): 342-349

- Strahl BD, Allis CD** (2000) The language of covalent histone modifications. *Nature* **403**(6765): 41-45
- Stuart K, Allen TE, Heidmann S, Seiwert SD** (1997) RNA editing in kinetoplastid protozoa. *Microbiol Mol Biol Rev* **61**(1): 105-120
- Thatcher TH, Gorovsky MA** (1994) Phylogenetic analysis of the core histones H2A, H2B, H3, and H4. *Nucleic Acids Res* **22**(2): 174-179
- Townley-Tilson WH, Pendergrass SA, Marzluff WF, Whitfield ML** (2006) Genome-wide analysis of mRNAs bound to the histone stem-loop binding protein. *RNA* **12**(10): 1853-1867
- Valcarcel Y, Bastero R, Anegon M, Gonzalez S, Gil A** (2008) [The epidemiology of hospital admissions due to Leishmaniasis in Spain (1999-2003)]. *Enferm Infecc Microbiol Clin* **26**(5): 278-281
- van Dongen W, de Laaf L, Zaal R, Moorman A, Destree O** (1981) The organization of the histone genes in the genome of *Xenopus laevis*. *Nucleic Acids Res* **9**(10): 2297-2311
- Vedovello Filho D, Jorge FA, Lonardoni MV, Teodoro U, Silveira TG** (2008) American cutaneous *Leishmaniasis* in horses from endemic areas in the north-central mesoregion of Parana state, Brazil. *Zoonoses Public Health* **55**(3): 149-155
- Victoir K, Dujardin JC** (2002) How to succeed in parasitic life without sex? Asking *Leishmania*. *Trends Parasitol* **18**(2): 81-85
- Wilson K, Collart FR, Huberman E, Stringer JR, Ullman B** (1991) Amplification and molecular cloning of the IMP dehydrogenase gene of *Leishmania donovani*. *J Biol Chem* **266**(3): 1665-1671
- Wincker P, Ravel C, Blaineau C, Pages M, Jauffret Y, Dedet JP, Bastien P** (1996) The *Leishmania* genome comprises 36 chromosomes conserved across widely divergent human pathogenic species. *Nucleic Acids Res* **24**(9): 1688-1694
- Wu Y, El Fakhry Y, Sereno D, Tamar S, Papadopoulou B** (2000) A new developmentally regulated gene family in *Leishmania* amastigotes encoding a homolog of amastin surface proteins. *Mol Biochem Parasitol* **110**(2): 345-357
- Xu H, Kim UJ, Schuster T, Grunstein M** (1992) Identification of a new set of cell cycle-regulatory genes that regulate S-phase transcription of histone genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **12**(11): 5249-5259
- Yao C, Donelson JE, Wilson ME** (2003) The major surface protease (MSP or GP63) of *Leishmania* sp. Biosynthesis, regulation of expression, and function. *Mol Biochem Parasitol* **132**(1): 1-16

**Ye X, Wei Y, Nalepa G, Harper JW** (2003) The cyclin E/Cdk2 substrate p220(NPAT) is required for S-phase entry, histone gene expression, and Cajal body maintenance in human somatic cells. *Mol Cell Biol* **23**(23): 8586-8600

**Yoffe Y, Zuberek J, Lewdorowicz M, Zeira Z, Keasar C, Orr-Dahan I, Jankowska-Anyszka M, Stepinski J, Darzynkiewicz E, Shapira M** (2004) Cap-binding activity of an eIF4E homolog from *Leishmania*. *Rna* **10**(11): 1764-1775

**Zeiner GM, Sturm NR, Campbell DA** (2003) The *Leishmania tarentolae* spliced leader contains determinants for association with polysomes. *J Biol Chem* **278**(40): 38269-38275

**Zick A, Onn I, Bezalel R, Margalit H, Shlomai J** (2005) Assigning functions to genes: identification of S-phase expressed genes in *Leishmania major* based on post-transcriptional control elements. *Nucleic Acids Res* **33**(13): 4235-4242

**Zilka A, Garlapati S, Dahan E, Yaolsky V, Shapira M** (2001) Developmental regulation of heat shock protein 83 in *Leishmania*. 3' processing and mRNA stability control transcript abundance, and translation is directed by a determinant in the 3'-untranslated region. *J Biol Chem* **276**(51): 47922-47929