



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

Identificación de proteínas asociadas a la
subunidad C82 de la RNA Polimerasa III de
Leishmania major

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGO

Presenta:

DANIEL EDUARDO VÉLEZ RAMÍREZ

Director de Tesis: Dr. Santiago Martínez Calvillo

Mayo, 2009





Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Dedicatoria

Esta tesis es la culminación de un camino muy largo y la antesala de uno todavía mayor, es decir, pasado, presente y futuro de mi vida. He aquí algunas de las personas que representaron, representan y representarán quizás, más que una ayuda, una sonrisa, una palabra de aliento, un regaño, un elogio, una duda y un momento, para que uno de mis más grandes logros se consumara:

Mi Papá, sin tu apoyo incondicional durante estos veintidós años que he tenido el privilegio de ser tu hijo, no habría logrado ni la ínfima parte de lo que he podido hacer hasta ahora. Mis logros pasados, este que ahora se materializa en tus manos y todos los logros de los años venideros te los dedico con un especial cariño. Es una retribución pequeña y efímera a tu esfuerzo, entrega y dedicación pero estoy seguro que la podré engrandecer si la vida me da la oportunidad. Gracias por el honor de ser tu hijo.

Mi Mamá, se que hay mejores maneras de expresar lo mucho que agradezco tu amor, ayuda, consuelo, dedicación, paciencia, perseverancia y entrega para conmigo. Permíteme hacerlo en esta ocasión con ochenta y cuatro páginas impresas en blanco y negro que son solo un reflejo de todo el trabajo que hice estando entre las cuatro paredes de mi laboratorio, exactamente cuando te preguntabas que estaría haciendo en ese momento. Gracias por enseñarme a vivir y más aún gracias por sembrar en mí la semilla de la ambición, de las ganas de seguir adelante a pesar de la adversidad y de las ganas de ser mejor día a día. Tu, más que a nadie, eres la responsable de la persona que soy ahora.

Mi Hermano, a pesar de que nunca fuiste mi ejemplo a seguir, quiero mencionar la profunda admiración que te tengo por ser la persona que eres. Quiero decirte que es un orgullo para mí poder decir que eres mi hermano y que tenemos la misma sangre y que estamos hechos de la misma manera y a pesar de eso somos muy diferentes. Tú fuiste quien me abrió paso por la vida, tú fuiste el que siempre me dio su amistad y consejo, tú eres la mitad de lo que yo soy.

Mi Hermana, tú eres la otra mitad; y aun que se que nos hemos distanciado mucho y el nexo que nos une a veces lo siento menguar, esta por demás decir que a pesar de todo te quiero muchísimo y que siempre voy a estar ahí para ti, sin importar que necesites y debo decirlo, a pesar de que tu no lo quieras. Me siento mal conmigo mismo al decirte que te darás cuenta de muchas cosas conforme crezcas; y te dije que me arrepiento por que sueno como esa gente que se dice adulta y que te sermonean como vivir y que hacer y sobre todo por esa fase celebre: “estas joven, todavía no sabes nada de la vida”, entonces yo digo que por que no nacemos adultos, amargados y aburridos, y nos ahorramos todo este numerito de la juventud. Pero bueno, eso es un tema de conversación con tu hermano para un domingo cualquiera por la tarde; como tu bien sabes: “no te tomes la vida tan en serio que de todos modos no vas a salir vivo de ella”.

Mis Amigos, los cuento con los dedos de una mano y los nombró en orden de aparición en mi vida: Ariadna, Elvira, Paco y Mirella. Estoy en deuda con todos ustedes, les debo días de

felicidad dentro y fuera de la facultad, dentro y fuera de la académico y dentro y fuera de lo cotidiano. **Ariadna**, gracias por brindarme una cara conocida cuando todo era nuevo para ambos, gracias por todo tu apoyo cuando ya no veía por donde estaba la salida, gracias por tener siempre un momento para escucharme. Tienes mi más sincera admiración y respeto, eres de las personas más inteligentes que conozco; yo solo supe sacar dijes en la carrera, pero tu estas a otro nivel. **Elvira**, gracias por esas platicas bohemias en las hablábamos de cualquier cosa, me sorprendió bastante poder tener a un interlocutor con el que pudiera intercambiar todo lo que me da vueltas en la cabeza, del tipo que te viene cuando uno se adentra demasiado en uno mismo y después ya no encuentra la salida. Pero no creas que tu amistad se limita a eso, te admiró como persona, te admiró como mujer, te admiró por pensadora y revolucionaria, que bueno que tuve la oportunidad de conocer a alguien así. **Paco**, se que al principio te caía más mal que bien, pero también se muy bien que para que se forjara la amistad que tenemos tanto tú como yo cambiamos, y yo creo que bastante. Gracias por tu amistad incondicional en el momento que más lo necesite, estuviste en el instante justo, en el lapso en el que más necesitaba a un canijo como tu. Si me preguntaran quién fue mi amigo de la universidad yo diré con mucha honra que fue un cuate que se llama Francisco Merchant, le gusta la cerveza, la trova, la vida y las mujeres. **Mireya**, gracias por la oportunidad de permitirme ser tu amigo, se que no cualquiera tiene el privilegio de poder decir eso y por tal motivo me siento alagado, ya que eres alguien muy especial. Si yo no sintiera que a veces nuestra amistad es frágil, no le tendría el cuidado que le tengo. Todos ustedes me ayudaron a que esto fuera más suave y fácil de llevar, todos ustedes influyeron en mí de diferente manera y en distintos tiempos, pero de lo que no me cabe la menor duda es que ustedes cuatro dejaron una huella profunda en mí. Se que los amigos van y vienen pero ustedes son de los pocos a los que voy a conservar con mucho cuidado.

Mi Novia, déjame decirte de la manera más objetiva posible que si hemos sido novios desde el 3 de Junio de 2007, más a menos como a las 20:30 hrs., a la fecha en la que escribo estas palabras, es decir, 12 de Mayo del 2009 a las 22:06 hrs. Si hay una persona que ha estado conmigo a lo largo de todo este proyecto de investigación, de casi dos años de duración, eres tú. Así que en cierto sentido tú contribuiste de manera directa, evidente e importante para que yo pudiera hacer todo esto; en otras circunstancias te correspondería el 50 %, pero no es el caso. Pero como siento que nada de lo que dije tiene sentido, ni para ti ni para mí, permíteme decírtelo de otra manera, y te pido me disculpes de antemano. Eres por sobre todas las cosas lo más valiosos que tengo, eres mi inspiración de todos los días, eres maravillosa en toda la extensión de la palabra, eres a quién amo con toda la fuerza con la que vivó día a día, eres por quién daría todo lo que tengo y lo que soy, eres la encarnación de un sueño, eres todo, y aun más para mí. Te amo, no encuentro otra forma más sencilla y directa de decir lo que siento por ti, aun que en realidad no hay otra. Cinco letras y dos palabras lo dicen todo. Ya se que no es nada nuevo para ti pero me gusta decírtelo cada vez que tengo la oportunidad, y esta es una de esas ocasiones. Por ese instante de eternidad en el que te dije que te amo, pero si suspiras se desvanece...

Agradecimientos

Se agradece la asesoría brindada a lo largo de la presente tesis de licenciatura al que fuese su director principal, Dr. Santiago Martínez Calvillo. El apoyo incondicional que mostró en cada una de las etapas de la investigación y en la escritura de la tesis, resultó vital para la conclusión de la misma.

Así mismo se agradece la ayuda a todos los miembros del comité tutorial:

Dr. Elías Piedra Ibarra, sus comentarios enriquecieron la calidad del trabajo y aportaron un punto de vista que no es abordado en muchas ocasiones, el evolutivo.

Dr. Ignacio Peñalosa Castro, la ayuda brindada en lo referente al área de su competencia fue sobresaliente, su experiencia en proteínas resultó invaluable para interpretar los datos obtenidos en ese rubro.

Dra. Emma Berta Gutiérrez Cirlos Madrid, sus amplios conocimientos en trabajo con proteínas, específicamente en lo referente a las técnicas analíticas, permitió interpretar los resultados y mejorar los procedimientos técnicos, a demás de que sus comentarios mejoraron el nivel del manuscrito final.

Dr. Roberto Velasco García, sus opiniones perfeccionaron en gran medida la calidad del manuscrito final y su experiencia en estructura terciaria de proteínas resultó enriquecedora; a pesar de no ser una cualidad directa de esta investigación, resulta evidente su importancia.

De manera relevante se agradece el apoyo excepcional del Técnico Académico del Laboratorio de Biología Molecular de Parásitos de la Unidad de Biomedicina de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala, Biol. Luis Enrique Florencio Martínez; su ayuda y experiencia para la realización de los diversos procedimientos en el trabajo de laboratorio permitieron que este proyecto se pudiera llevar a cabo.

Finalmente se agradece al Biol. Carlos Flores Pérez por su cooperación en el trabajo de laboratorio y el intercambio de ideas para la resolución de los problemas que surgieron a lo largo de todo el proyecto.

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

- A. Universidad Nacional Autónoma de México, de la que fuera la Dirección General de Estudios de Posgrado, ahora Coordinación de Estudios de Posgrado, particularmente de la Subdirección de Cooperación Académica y del Departamento de Movilidad Estudiantil, por concepto de beca de movilidad estudiantil para realizar una estancia académica y de investigación en la Universidad de California Los Angeles, E.U.A. en el período comprendido entre Enero de 2008 a Abril de 2008.

- B.** Universidad Nacional Autónoma de México, Dirección General de Asuntos del Personal Académico en su Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) en los proyectos: IN203606 y IN203909-3 por concepto de beca de tesis de licenciatura, durante los períodos comprendidos de Abril del 2008 a Septiembre del 2008 y de Enero del 2009 a Abril del 2009, respectivamente.
- C.** Gobierno Federal de los Estados Unidos Mexicanos, Secretaria de Educación Pública, específicamente al programa de Fortalecimiento del Programa de Becas, por concepto de Beca de Titulación.

Índice

Abreviaturas	X
Resumen	XI
1. Introducción	1
1.1 Biología del género Leishmania	1
1.1.1 Ciclo de Vida	1
1.2 Leishmaniasis	2
1.3 Transcripción en Eucariontes	4
1.3.1 RNA Polimerasa I (Pol I)	6
1.3.2 RNA Polimerasa II (Pol II)	7
1.3.3 RNA Polimerasa III (Pol III)	8
1.3.3.1 Promotores	8
1.3.3.2 Inicio de la transcripción	9
1.3.3.3 Elongación, Término y Reiniciación de la Transcripción	10
1.3.3.4 Subunidad C82 de Pol III	10
1.4 Transcripción en cinetoplastos	11
1.4.1 Organización Genómica y Transcripción Policistronica	12
1.4.2 Miniexón y Trans-splicing	13
1.4.3 Transcripción de Pol I	13
1.4.4 Transcripción de Pol III	15
1.5 Purificación por Afinidad en Tándem	15
1.6 Antecedentes	18
2. Objetivos	19
3. Materiales y Métodos	20
3.1 Generación de vectores	20
3.1.1 Obtención de pB6-PTP	20
3.1.2 Obtención de pGEM-C82	21
3.1.3 Obtención de pC82-PTP	21

3.1.4 Obtención de pC82-TAP	21
3.2 Electroforesis en geles de agarosa	22
3.3 Digestiones con enzimas de restricción	22
3.4 Purificación de DNA a partir de geles de agarosa	22
3.5 Desfosforilación	23
3.6 Extracción de DNA genómico (DNAg)	23
3.7 Ligaciones	23
3.8 Transformaciones	24
3.9 Análisis de las clonas por medio de PCR	24
3.10 Minipreparación de plásmidos	25
3.11 Midipreparación de plásmidos	25
3.12 Cultivo de promastigotes de <i>Leishmania</i>	25
3.13 Transfección de <i>Leishmania</i>	26
3.14 Clonación celular de <i>Leishmania</i>	26
3.15 Análisis de las clonas por medio de Western Blot	27
3.16 Purificación por Afinidad en Tándem	28
4. Resultados	30
4.1 Generación de pB6-PTP	30
4.2 Obtención de pGEM-C82	33
4.3 Clonación de C82 en los vectores PTP-tag y TAP-tag	37
4.4 Generación de pC82-PTP	37
4.5 Generación de pC82-TAP	39
4.6 Transfección y clonación de <i>L. major</i> y <i>L. mexicana</i> con pC82-PTP y pC82-TAP	43
4.7 Purificación de C82-PTP en <i>L. major</i> y <i>L. mexicana</i>	43
5. Discusión	50
5.1 Purificación por afinidad en tándem como técnica para la purificación de complejos proteicos	50
5.2 Obtención de la construcción pB6-PTP	51
5.3 Clonación y caracterización <i>Lmaj</i> /pC82-PTP y <i>Lmex</i> /pC82-PTP	53

5.4 Purificaciones por afinidad en tándem de <i>Lmaj</i> /C82-PTP y <i>Lmex</i> /C82-PTP	54
5.5 Análisis de las proteínas purificadas	56
6. Conclusiones	59
7. Referencias	60

Índice de Figuras y Tablas

Figura 1. Ciclo de vida de <i>Leishmania spp.</i>	3
Figura 2. Transcripción	5
Tabla 1. Composición de las tres RNA Polimerasas de Levadura (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)	6
Figura 3. Organización de los tres tipos de promotores empleados por Pol III	9
Figura 4. Modelo del Complejo de Inicio de la Transcripción de Pol III	11
Figura 5. Representación esquemática de la transcripción policistrónica y el trans-splicing	14
Figura 6. Purificación por Afinidad en Tándem	16
Figura 7. Reemplazo del péptido de unión a calmodulina (CBP) en la construcción pB6-TAP por un epítipo de ProtC para formar pB6-PTP	30
Figura 8. Digestión de pB6-TAP con <i>XbaI</i> y <i>NheI</i> y purificación de pB6-TAP sin ABC23	31
Figura 9. Hibridación de oligonucleótidos ProtC sentido y ProtC antisentido	32
Figura 10. Digestión de clonas putativas pB6-PTP con <i>BamHI</i>	32
Figura 11. Digestión de las clonas putativas pB6-PTP con <i>XbaI</i> y <i>NheI</i>	33
Figura 12. Mapa de pB6-PTP	34
Figura 13. Amplificación por PCR de C82	35
Figura 14. Digestión de las 10 clonas putativas pGEM-C82	35
Figura 15. Digestión de una clona putativa pGEM-C82	36
Figura 16. Mapa de pGEM-C82	36
Figura 17. Purificación del inserto C82	37
Figura 18. Purificación del cuerpo de vector pB6-PTP (sin ABC23)	38
Figura 19. Digestión de dos clonas putativas pC82-PTP	39
Figura 20. Digestión de una clona putativa pC82-PTP con <i>XbaI</i> y <i>XmaI</i>	40
Figura 21. Mapas de pC82-TAP y pC82-PTP	40
Figura 22. Digestión de pB6-TAP (Panel A) y purificación del cuerpo del vector pB6-TAP sin ABC23 (Panel B)	41
Figura 23. Análisis por PCR de colonia de las clonas putativas pC82-TAP	42

Figura 24. Análisis de restricción de la clona putativa pC82-TAP	42
Figura 25. Análisis tipo Western Blot de clonas de <i>L. major</i> y <i>L. mexicana</i> transfectadas con pC82-PTP y pC82-TAP	44
Figura 26. SDS-PAGE de las alícuotas tomadas a lo largo de la purificación de <i>Lmaj/C82-PTP</i>	45
Figura 27. Análisis tipo Western Blot de las muestras tomadas a lo largo de la purificación de <i>Lmaj/C82-PTP</i> y <i>Lmex/C82-PTP</i>	46
Figura 28. Eluidos finales de la purificación PTP-tag de <i>Lmaj/C82</i>	47
Figura 29. Alícuotas de las muestras finales concentradas, obtenidas de las purificaciones de C82-PTP en <i>L. major</i> (panel A) y en <i>L. mexicana</i> (Panel B)	49
Tabla 2. Correspondencia de las bandas identificadas en la purificación de <i>Lmex/C82-PTP</i> con subunidades de Pol III o TFIIB	57
Tabla 3. Correspondencia de las bandas identificadas en la purificación de <i>Lmaj/C82-PTP</i> con subunidades de Pol III o TFIIB	58

Abreviaturas

Amp	Gen de resistencia a Ampicilina
CBP	Péptido de unión a calmodulina
DHFR	Dihidrofolato reductasa
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DNAg	Acido Desoxirribonucleico genómico
GTF	Factor de transcripción general
HPC4	Anticuerpo que une específicamente a ProtC
<i>Lmaj/C82-PTP</i>	Clona de <i>Leishmania major</i> transfectada con pC82-PTP
<i>Lmex/C82-PTP</i>	Clona de <i>Leishmania mexicana</i> transfectada con pC82-PTP
Neo	Gen de resistencia a G418
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
Pol I	RNA polimerasa I
Pol II	RNA polimerasa II
Pol III	RNA polimerasa III
ProtA	Proteína A de <i>Staphylococcus aureus</i>
ProtC	Péptido derivado de la Proteína C
PTP	<u>ProtC-TEV-ProtA</u>
RNA	Ácido ribonucleico
RNAm	RNA mensajero
RNApn	RNA pequeño nuclear
RNAr	RNA ribosomal
RNAt	RNA de transferencia
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato sódico
TAP	Purificación por Afinidad en Tándem
TEV	Virus del tabaco
TF	Factor de Transcripción
Ufc	Unidad formadora de colonia

Resumen

Leishmania es un protozooario parásito de importancia médica y biológica, que presenta mecanismos atípicos de regulación de la expresión genética, particularmente a nivel de la transcripción. Nuestro grupo de trabajo está interesado en estudiar la transcripción de la RNA Polimerasa III (Pol III) en este parásito, la cual se encarga de sintetizar moléculas pequeñas de RNA que son esenciales para el crecimiento celular. Uno de nuestros intereses es la identificación de las subunidades que conforman a Pol III, y de los factores de transcripción que requiere dicha polimerasa, de lo cual se sabe muy poco en *Leishmania*. De esta manera, el presente trabajo versó sobre la purificación de proteínas asociadas a la subunidad C82 del complejo de transcripción de Pol III de *Leishmania major* y *Leishmania mexicana*, mediante la técnica de purificación por afinidad en tándem; en esta técnica se lleva a cabo el aislamiento de complejos proteicos mediante dos cromatografías de afinidad secuenciales. En el laboratorio contábamos ya con el vector pB6-TAP, diseñado para llevar a cabo este tipo de purificaciones, pues contiene dentro de su secuencia distintos epítopes de extracción (Proteína A, sitio de corte de proteasa TEV y péptido de unión a calmodulina o CBP, que en conjunto forman el llamado TAP-tag) que sirven para purificar a una proteína blanco y a las proteínas unidas a ésta. Dado que se ha reportado que el CBP del TAP-tag puede hacer el proceso de purificación de proteínas poco eficiente, se realizó la sustitución de CBP en pB6-TAP por el epítipo de Proteína C, con lo que se obtuvo el vector pB6-PTP. Posteriormente, para poder llevar a cabo la purificación de la subunidad C82 de Pol III y de las proteínas asociadas a ella fue necesario sustituir el gen de ABC23, presente en pB6-TAP y pB6-PTP, por el gen de C82, obteniéndose de esta manera las construcciones pC82-TAP pC82-PTP. Siguiendo con el proceso, estas construcciones se emplearon para transfectar promastigotes de *L. major* y *L. mexicana*. Una vez obtenida una población estable, se realizó una clonación celular y un análisis tipo Western Blot, que reveló que todas las clonas expresaban la proteína recombinante C82-TAP o C82-PTP. Empleando una clona de *L. major* y otra de *L. mexicana* se llevó a cabo la purificación de C82-PTP. La purificación consistió en preparar un extracto proteico crudo a partir de un cultivo en fase media de crecimiento logarítmico; dicho extracto se transfirió a una columna cromatográfica que contenía perlas de Sefarosa-IgG, a las cuales se unió C82-PTP por medio del epítipo de Proteína A. Después se realizó una digestión con la proteasa TEV para separar C82-PTP de las moléculas

de IgG; y este eluido se transfirió a una columna que contenía un anticuerpo que une de manera específica a Proteína C. Finalmente, para eluir C82-PTP de esta segunda columna se adicionó un quelante de iones divalentes. El análisis de las proteínas purificadas reveló la presencia de siete bandas diferentes en la purificación de *Lmaj*/C82-PTP y diecisiete en el caso de *Lmex*/C82-PTP. En la purificación de *Lmaj*/C82-PTP se lograron identificar cuatro proteínas diferentes que podrían corresponder con las subunidades de Pol III: C82-PTP, C34, C53 y C25. En el caso de *L. mexicana* se identificaron seis proteínas que se sospecha corresponden a las subunidades: C160, C128, C37, C82-PTP, C53 y C25. Adicionalmente, en *L. major* se encontró una proteína cuyo tamaño concuerda con el de Brf, y en *L. mexicana* se detectó una proteína que podría corresponder con TBP, ambas subunidades del factor de transcripción TFIIB.

1. Introducción

1.1 Biología del género *Leishmania*

Leishmania es un protozooario hemoflagelado con un tipo de vida parasitaria, agente causal de una amplia gama de enfermedades con diversas manifestaciones clínicas, denominadas de manera general como leishmaniasis (Prescott *et al.*, 2002). El género *Leishmania* es miembro de la familia Trypanosomatidae, la que a su vez se encuentra dentro del orden Kinetoplastida (Handman, 2000; Clark, 2005). Algunas particularidades de este orden incluyen: 1) la presencia de sólo una mitocondria (denominada cinetoplasto) (Motta, 2008), cuyo DNA presenta una organización particular (Lukeš *et al.*, 2005; Liu *et al.*, 2005); 2) la edición compleja del RNA mensajero mitocondrial (Simpson *et al.*, 2004); 3) la realización de la glucólisis en sitios altamente específicos (glucosomas) (Hannaert *et al.*, 2003; Besteiro *et al.*, 2005) y 4) la evasión de la respuesta inmune del organismo por medio de la variación en las moléculas de superficie que recubren la célula (Pays *et al.*, 2004). Muchos de los cinetoplástidos son parásitos y presentan varias formas celulares a lo largo de su ciclo de vida, en el que infectan tanto hospederos vertebrados como invertebrados (Handman, 2000; Burchmore & Barrett, 2001).

Leishmania, así como otros tripanosomátidos, posee un cuerpo basal flagelar que participa de manera activa en la endocitosis y la exocitosis (de Souza, 2002), y es el sitio donde se forma un flagelo que se repliega lateralmente a un costado de la célula, formando una membrana ondulante (Madigan *et al.*, 2004); tanto el flagelo como la membrana ondulante participan en la locomoción celular (Martínez-Pérez *et al.*, 2003). Sin embargo, el flagelo presenta una segunda función de adherencia al tracto digestivo del insecto vector (Bates, 2008). La alimentación de estos organismos es saprozoica y se reproducen asexualmente por fisión binaria o múltiple (Martínez-Pérez *et al.*, 2003; Ruppert & Barnes, 1996).

1.1.1 Ciclo de Vida

Leishmania presenta dos estadios diferentes en su ciclo de vida: el promastigote y el amastigote (Handman, 2000) (Fig. 1). Los promastigotes son formas móviles extracelulares que habitan en la luz del tracto digestivo del insecto vector, la hembra de la mosca de la arena (Phlebotomine) (Kamhawi, 2006). Los amastigotes son formas inmóviles intracelulares que

residen en el sistema fagolisosomal de macrófagos del hospedero mamífero, adaptados al pH bajo de estos compartimientos intracelulares (Bates, 2006).

El ciclo de vida de *Leishmania* inicia cuando un insecto transmisor se alimenta de la sangre de una persona infectada, ingiriendo macrófagos infectados con amastigotes; éstos se diferencian rápidamente a promastigotes procíclicos en el tracto digestivo medio, donde se dividen de forma activa. Posteriormente, se diferencian a promastigotes metacíclicos (altamente infectivos y móviles) en la luz del tracto digestivo anterior, donde se posicionan para ser transmitidos al hospedero mamífero cuando el vector se alimenta nuevamente (Fig. 1) (Pimenta *et al.*, 1992; Bates & Rogers, 2004). Una vez que se encuentran en el hospedero mamífero, los promastigotes son fagocitados por macrófagos e inicialmente residen en fagosomas, los cuales posteriormente se desarrollan a fagolisosomas. En éstos, los promastigotes se diferencian a amastigotes que son capaces de dividirse en el medio ácido de estas vesículas intracelulares, donde pueden persistir durante meses o años (Aebischer, 1994).

1.2 Leishmaniasis

El conjunto de manifestaciones clínicas que se pueden presentar debido a la infección por organismos del género *Leishmania*, recibe el nombre de leishmaniasis (Reguera *et al.*, 1998). Dichas manifestaciones son variadas, pudiéndose presentar úlceras cutáneas (leishmaniasis cutánea), inflamación destructiva en mucosas (leishmaniasis mucocutánea) e infección visceral diseminada (leishmaniasis visceral) (Herwalt, 1999). La epidemiología, inmunopatología y el desenlace de los casos son igualmente diversos (Desjeux, 2001; Desjeux, 2004).

La leishmaniasis es una enfermedad infecciosa prevalente en Asia, África, América y Europa, donde mata a miles y debilita a millones de personas cada año, con dos millones de casos nuevos cada año y 350 millones de personas en riesgo. La infección por *Leishmania* es un importante problema de salud a nivel global, a demás no hay una vacuna ni tratamiento eficiente (Peacock *et al.*, 2007; Simpson *et al.*, 2006). No obstante, al tratarse de una enfermedad que afecta principalmente a gente de escasos recursos, la investigación para el desarrollo de fármacos no ha recibido la atención requerida (Renslo & McKerrow, 2006). Muchos de los fármacos que actualmente se emplean tienen serias limitaciones (Croft *et al.*, 2006; Singh & Sivakumar 2004),

incluida la aparición de cepas resistentes (Croft *et al.*, 2006); por lo que la búsqueda de compuestos con actividad anti-leishmania continúa siendo un objetivo de vital importancia (Santos *et al.*, 2008).

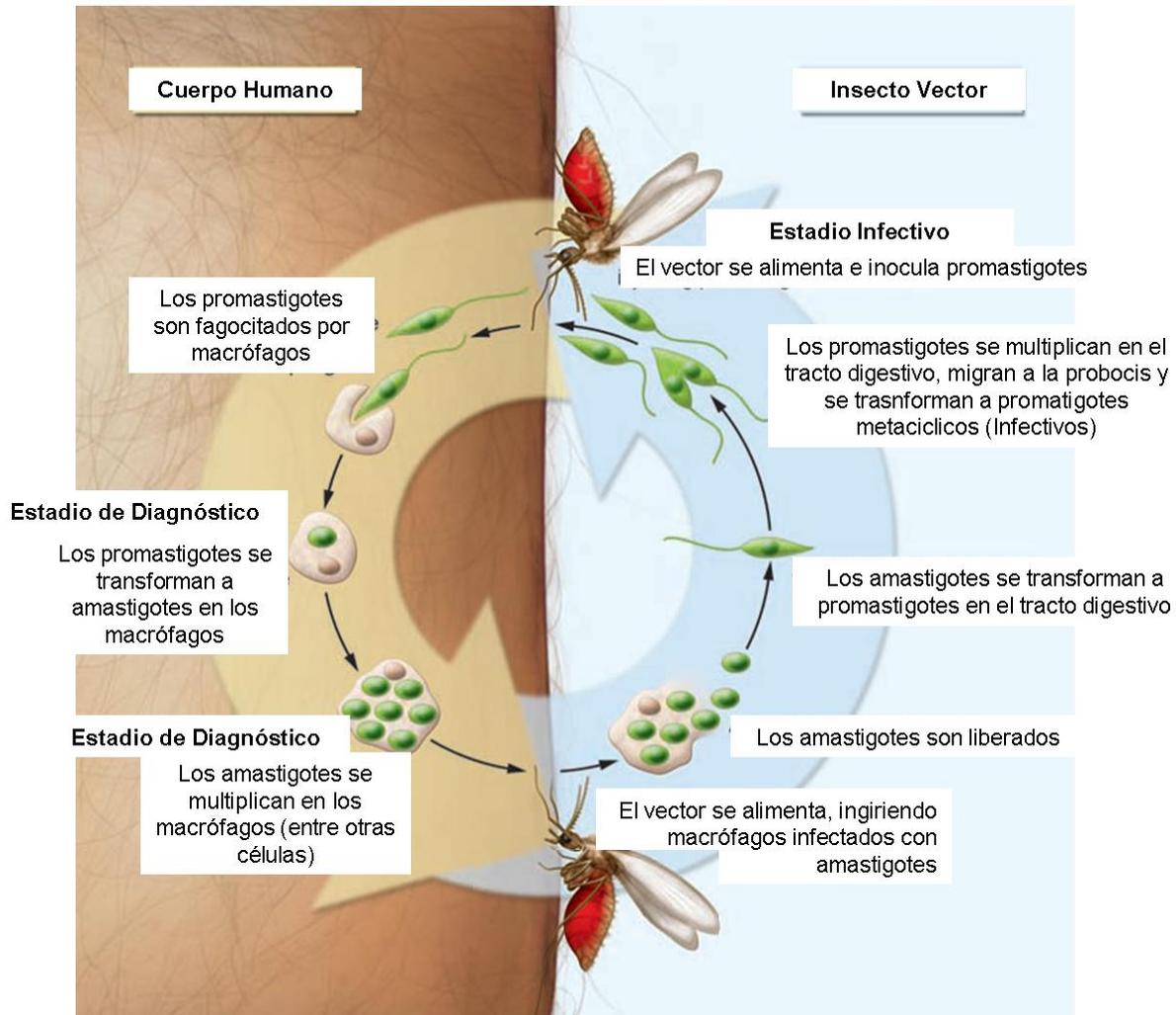


Figura 1. Ciclo de vida de *Leishmania* spp. El lado derecho de la imagen indica la parte del ciclo que se lleva a cabo en el insecto vector; mientras que el lado izquierdo muestra la que acontece en el vertebrado. Se señalan los nombre de los diferentes estadios por lo que atraviesa el parásito en ambos organismos. Tomado de Stuart, 2008.

Múltiples especies pueden producir leishmaniasis cutánea, principalmente *L. major*, *L. tropica*, *L. infantum* y *L. aethiopica* (en el Viejo Mundo); y *L. mexicana*, *L. amazonensis*, *L. braziliensis*, *L. panamensis*, *L. peruviana* y *L. guyanensis* (en el Nuevo Mundo). El primer signo de infección es una pápula en el sitio donde se alimentó el vector, la cual después se desarrolla a un nódulo y finalmente como una úlcera. Las especies que causan leishmaniasis mucocutánea en

el Nuevo Mundo son *L. braziliensis*, *L. panamensis* y *L. guyanensis*. La enfermedad comienza con un eritema y ulceraciones en la nariz y se desarrolla como lesiones inflamatorias destructivas en el tabique nasal. En el desenlace se puede obstruir la faringe o la laringe, y producir deformaciones faciales. Finalmente *L. donovani* es la especie que causa leishmaniasis visceral en India y África; mientras que *L. infantum* o *L. chagasi* en la región Mediterránea, el sudoeste y centro de Asia, y en Sudamérica. Otras especies, como *L. tropica* y *L. amazonensis*, también pueden desarrollar esta variedad de la enfermedad. Las manifestaciones clínicas son fiebre, debilidad, sudoración nocturna, anorexia y pérdida de peso; en infantes se presenta diarrea y retardo en el crecimiento. Otros signos incluyen: palidez, deterioro, crecimiento de hígado y bazo, oscurecimiento de la piel, anemia, leucopenia, trombocitopenia, hipergamaglobulinemia, caquexia, enfermedad multisistémica, sangrado por la trombocitopenia, susceptibilidad a infecciones secundarias y finalmente la muerte (Murray *et al.*, 2005).

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

1.3 Transcripción en Eucariontes

La transcripción es el primer paso en la expresión genética, se lleva a cabo por una enzima denominada RNA polimerasa dependiente de DNA, y el producto que deriva de la misma es una molécula de RNA sintetizada empleando una molécula de DNA como molde (Fig. 2). En eucariontes existen tres diferentes RNA Polimerasas y cada una transcribe un grupo diferente de genes. De manera general, la RNA Polimerasa I (Pol I) transcribe la mayor parte del RNA ribosomal (RNAr), la RNA Polimerasa II (Pol II) transcribe los RNA mensajeros (RNAm) y finalmente la RNA Polimerasa III (Pol III) transcribe los RNA de transferencia (RNAt) y el RNAr 5S (Lewis *et al.*, 2008), entre otros RNA pequeños con diversas funciones celulares.

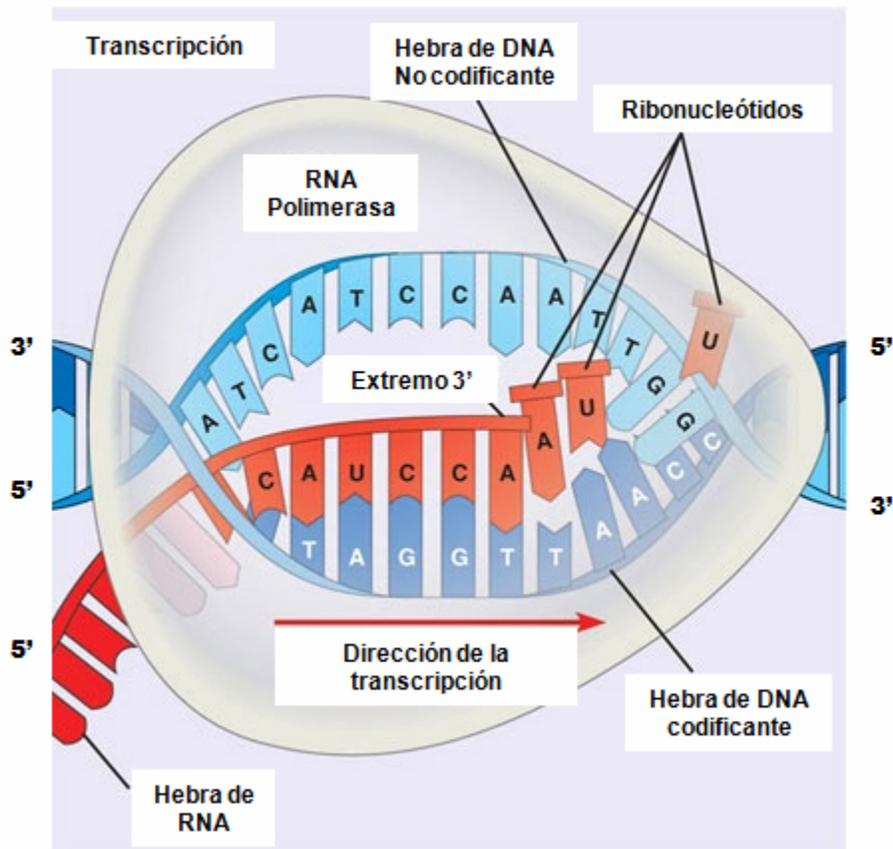


Figura 2. Transcripción. Se ilustra la polimerización de ribonucleótidos empleando como templado una cadena de DNA. Tomada de <https://eapbiofield.wikispaces.com/Transcription+and+Translation+KW>.

Las RNA Polimerasas, como muchos otros constituyentes celulares, son complejos proteicos, también conocidos como proteínas oligoméricas; es decir, están conformados por más de una cadena polipeptídica o subunidad (Cramer, 2002; Miernyk & Thelen, 2008). En levadura, el organismo eucarionte mejor estudiado, Pol II es la menos compleja de las tres RNA polimerasas, ya que únicamente se conforma de 12 subunidades, en comparación con las 14 que contiene Pol I y las 17 que se encuentran formando a Pol III. Cinco subunidades son compartidas por todas las RNA Polimerasas (ABC27, ABC23, ABC14.5, ABC10 α y ABC10 β); AC40 y AC19 son compartidas entre Pol I y Pol III, con homólogos (B44 y B12.5) en Pol II; otras cinco son subunidades homólogas (A135/B220/C160, A135/B150/C128, A43/B16/C25, A14/B32/C17 y A12/B12.6/C11). A49 y A34.5 son específicas de Pol I, mientras que C82, C53, C37, C34 y C31 son exclusivas de Pol III (Geiduscheck & Kassavetis, 2001; Hu *et al.*, 2002) (Tabla 1).

	Pol I	Pol II	Pol III
Núcleo del Complejo	A190	B220	C160
	A135	B150	C128
	AC40	B44	AC40
	AC19	B12.5	AC19
	ABC23	ABC23	ABC23
Compartidas	ABC27	ABC27	ABC27
	ABC14.5	ABC14.5	ABC14.5
	ABC10 α	ABC10 α	ABC10 α
	ABC10 β	ABC10 β	ABC10 β
Homólogas	A12.2	B12.6	C11
	A14	B32	C17
	A43	B16	C25
Específicas	A49		
	A34.5		
			C82
			C53
			C37
		C34	
		C31	

Tabla 1. Composición de las tres RNA Polimerasas de levadura (*Saccharomyces cerevisiae*). Los números corresponden al peso molecular aproximado en kDa.

1.3.1 RNA Polimerasa I (Pol I)

Pol I se encarga de la transcripción de los RNAr 18S, 5.8S y 28S, los cuales son transcritos como una unidad de transcripción policistrónica que posteriormente es procesada para dar origen a las tres moléculas de RNAr independientes. La transcripción y procesamiento ocurre dentro del nucléolo, que es el sitio en el que se llevan a cabo los primeros pasos de la biogénesis del ribosoma (Olson *et al.*, 2002; Hannan *et al.*, 1998). La transcripción de Pol I es casi totalmente especie específica (Grummt *et al.*, 1982), pues hay poca similitud en la secuencia de los promotores de RNAr de diferentes especies; sin embargo, la disposición general de los elementos del promotor está bien conservada (Moss & Stefanovsky, 1995). Múltiples copias de RNAr se encuentran en grupos repetidos generalmente arreglados en tándem. La mayor parte del

promotor se encuentra en la región espaciadora que separa a un gen del subsecuente; alrededor de 50 pb río arriba del inicio del gen es la parte del promotor necesaria y suficiente para llevar a cabo la transcripción en la mayoría de las especies (Reeder, 1984). En comparación con Pol II, Pol I requiere de pocos factores de transcripción para el inicio de este proceso. En la mayor parte de los sistemas basta esta polimerasa (posiblemente con uno o dos factores fuertemente asociados) y un factor de unión al promotor (Paule & White, 2000).

La transcripción de Pol I finaliza en una serie de terminadores encontrados dentro de los primeros 1000 pb río abajo de la secuencia codificadora del RNAr 28S (Pfleiderer *et al.*, 1990). El reinicio de la transcripción en Pol I es extremadamente eficiente ya que los factores de transcripción que permanecen en el promotor son completamente funcionales y pueden permitir la incorporación repetitiva de la polimerasa (Kahl *et al.*, 2000).

1.3.2 RNA Polimerasa II (Pol II)

Pol II es responsable de la síntesis de RNAm en eucariontes (Cramer *et al.*, 2001); se encuentra en el centro de una compleja maquinaria que cambia constantemente en el curso de la transcripción genética (Kornberg, 1999). Tan pronto como los seis Factores de Transcripción Generales (GTF, por sus siglas en inglés) se ensamblan junto con Pol II para reconocer el promotor y desenrollar la doble cadena del DNA (Lee & Young, 2000), un complejo multiproteico denominado mediador regula el proceso actuando bajo la influencia de activadores y represores (Roeder, 1996; Myers & Kornberg, 2000). Después de que da inicio la transcripción, proteínas reguladoras adicionales interactúan con Pol II durante la elongación del transcrito (Conaway & Conaway, 1999; Shilatifard, 1998), así como enzimas para la adición de la caperuza en el extremo 5', la eliminación de intrones y el empalme de exones, y la poliadenilación en el extremo 3' (Hirose & Manley, 2000; Proudfoot, 2000).

Cada uno de los GTF tiene un papel simple pero esencial en el inicio de la transcripción. El Factor de Transcripción D de Pol II (TFIID), que contiene a la Proteína de Unión a la Caja TATA (TBP, por sus siglas en inglés), es el primer factor de transcripción en establecer contacto con el promotor. Después, TFIIA se une al promotor, seguido de TFIIB; el dominio N-terminal de TFIIB lleva al DNA a un punto específico sobre la superficie de la polimerasa, determinado

por el espacio conservado entre la caja TATA y el sitio de inicio de la transcripción. TFIIF primero se asocia con Pol II y después se unen juntos al complejo de transcripción formado por TFIID, TFIIA y TFIIB, presente en el promotor. TFIIF contiene dos subunidades, una de las cuales tiene actividad de helicasa, por lo que tiene la capacidad de separar las dos hebras del DNA. TFIIE se une posteriormente al complejo de inicio de la transcripción, en la región río abajo del sitio de inicio. TFIIH y TFIIJ se unen después de TFIIE, pero su posición en el complejo es desconocida (Kornberg, 2007; Snustad & Simmons). La transcripción comienza con la síntesis de los primeros enlaces fosfodiéster de la molécula de RNA. En muchos sistemas se sintetizan cadenas de RNA de 3 a 10 pb de longitud, denominadas productos abortivos, antes de que inicie la transcripción (Luse & Jacob, 1987; Holstege *et al.*, 1997). Después de que se han sintetizado alrededor de 30 bases de RNA, Pol II se libera del contacto con el promotor y el resto de la maquinaria de inicio de la transcripción y entra al estado de elongación (Bentley, 2002).

1.3.3 RNA Polimerasa III (Pol III)

Pol III se encarga de la transcripción del RNAr 5S, los RNAt, los RNA pequeños nucleares (RNApn), el RNA 7SL y una variedad de RNA pequeños involucrados en el procesamiento de moléculas de RNA (Dieci *et al.*, 2007). En células HeLa la transcripción de Pol III se lleva a cabo en ± 2000 sitios del nucleoplasma, cada uno de los cuales tiene un tamaño de ± 40 nm y contiene en promedio 5 moléculas activas de Pol III (Pombo *et al.*, 1999). Se piensa que los transcritos son procesados cerca del sitio de síntesis. En lo que se refiere a los RNAt, parte de la vía de maduración se lleva a cabo en el nucléolo (Bertrand *et al.*, 1998), como también ocurre con el RNAr 5S (Schwarzacher & Wachtler, 1993).

1.3.3.1 Promotores

Existen tres clases diferentes de promotores de Pol III, a los cuales se les conoce como Tipo 1, Tipo 2 y Tipo 3 (Schramm & Hernández, 2002) (Fig. 3). Un ejemplo clásico del promotor Tipo 1 es el del RNAr 5S de *Xenopus laevis*, el cual requiere de tres elementos internos: una Caja A localizada entre +50 y +64, un elemento intermedio entre +67 y +72 y una Caja C de +80 a +97. Estos elementos están separados por regiones que no son esenciales para la transcripción, aunque el espacio que existe entre ellos es relativamente intolerante a cambios (Pieler *et al.*, 1987). Los promotores Tipo 2 se encuentran en los RNAt y consisten en dos

elementos altamente conservados, Caja A y Caja B, dentro de la secuencia codificadora. Las Cajas A de los promotores Tipo 1 y Tipo 2 son homólogas y algunas veces intercambiables (Ciliberto *et al.*, 1983), pero en los Tipo 2 se encuentran más cerca del sitio de inicio de la transcripción (Galli *et al.*, 1981). La localización de la Caja B es extremadamente variable, pues aunque generalmente se encuentra a una distancia de 30 a 60 pb de la Caja A, el espacio que puede existir entre estos elementos puede ser mayor a 365 pb (Fabrizio *et al.*, 1987). El mejor caracterizado de los promotores Tipo 3 corresponde al RNApn U6 humano. Las secuencias requeridas para una eficiente transcripción son: 1) una caja TATA entre -30 y -25 pb (Kunkel & Pederson, 1989); 2) un Elemento de Secuencia Proximal (PSE, por sus siglas en inglés) entre -66 y -47 pb (Kunkel & Pederson, 1988); y 3) un Elemento de Secuencia Distal (DSE, por sus siglas en inglés) entre -244 y -214 pb (Das *et al.*, 1988). Cabe aclarar que muchos de los genes transcritos por Pol III contienen promotores que no se pueden ubicar en ninguno de los tres tipos de promotores descritos previamente (Howe & Shu, 1998).

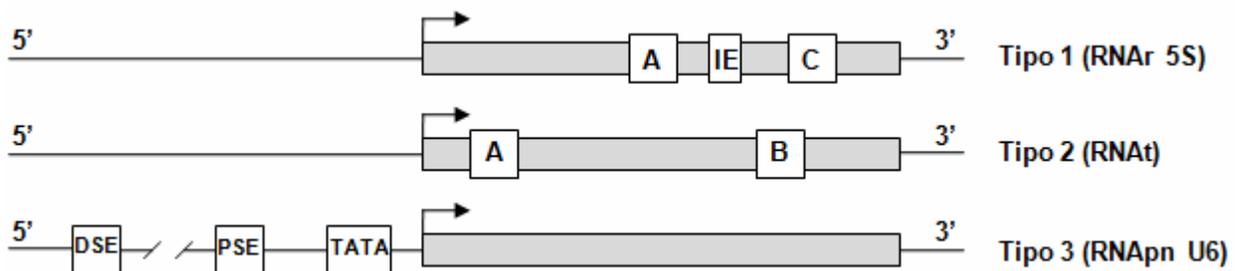


Figura 3. Organización de los tres tipos de promotores empleados por Pol III. Las flechas indican el sitio de inicio de la transcripción. A, B y C corresponden a las cajas A, B y C respectivamente. Los recuadros grises corresponden a los genes. IE (Elemento Intermedio); DSE (Elemento de Secuencia Distal) y PSE (Elemento de Secuencia Proximal).

1.3.3.2 Inicio de la transcripción

Las Cajas A y B son reconocidas por TFIIC, siendo la Caja B la que determina en mayor medida la afinidad de unión (Schultz *et al.*, 1989). Es notable que estos dos elementos sean reconocidos simultáneamente por un único factor de transcripción, ya que la separación que puede existir entre ambos puede variar sustancialmente de un gen a otro (Baker *et al.*, 1987). La unión de TFIIC al promotor de RNAr 5S requiere de la presencia TFIIIA (Engelke *et al.*, 1980), el cual funciona como adaptador, proveyendo una plataforma que permite la unión de TFIIC (el cual tienen menor afinidad por el promotor) (Braun *et al.*, 1992).

Sin importar de qué tipo de promotor se trate, la función primordial de TFIIC es la de unir a TFIIB en el sitio de inicio de la transcripción (Rüth *et al.*, 1996). Así, TFIIC y TFIIB contribuyen en la selección de dicho sitio. La Proteína TBP (subunidad de TFIIB) sondea la región que se encuentra alrededor de -30 pb y localiza el sitio óptimo para el inicio de la transcripción (Joazeiro *et al.*, 1996). Para que Pol III separe las dos hebras de la doble hélice del DNA alrededor del sitio de inicio de la transcripción se requiere también de la participación activa de TFIIB (Kassavetis *et al.*, 1998). A 20°C la Pol III de levadura lleva a cabo la elongación de la hebra de RNA a una velocidad promedio de ~20 nt/seg, la cual es similar a la velocidad que alcanza Pol II *in vivo*; sin embargo, la transcripción no procede a una velocidad constante (Matsuzaki *et al.*, 1994).

1.3.3.3 Elongación, Término y Reiniciación de la Transcripción

Un complejo de transcripción relativamente grande dentro de la región transcrita se esperaría que bloqueara la progresión de la polimerasa o la desplazara del sitio de transcripción. Sin embargo, el complejo de transcripción no es removido totalmente de las regiones de control interno (Bogenhagen *et al.*, 1982). Pol III desplaza transitoriamente a los factores de transcripción de su sitio de unión al momento en que se desplaza a través del gen; sin embargo, los factores de transcripción continúan asociados al complejo de inicio gracias a la presencia de interacciones no covalentes entre proteínas. La interacción de TFIIB con el DNA río arriba del sitio de inicio de la transcripción puede participar en la integridad de la maquinaria de transcripción, impidiendo que TFIIC y TFIIA se separen del templado al momento que Pol III transcribe a través del promotor interno (Paule & White, 2000). A su vez, esto hace que Pol III se mantenga unida al gen recién transcrito, evitando el lento paso inicial de reclutar a Pol III al promotor (Dieci *et al.*, 1996; Braun *et al.*, 1992). En contraste con Pol I y Pol II, Pol III puede reconocer sitios de terminación de manera precisa y eficiente sin la necesidad de otros factores (Cozzarelli *et al.*, 1983). En la mayoría de los genes transcritos por Pol III, grupos simples de cuatro o más timinas pueden servir como señales de terminación (Bogenhagen *et al.*, 1981).

1.3.3.4 Subunidad C82 de Pol III

En *S. cerevisiae*, todas las subunidades que conforman a Pol III, incluida C82, tienen una relación estequiométrica de una copia por cada complejo proteico de Pol III (Valenzuela *et al.*,

1976). Las subunidades C82, C34 y C31 forman un trímero estable *in vitro* (Wang & Roeder, 1997), que se une a Pol III a través de C160 (Wener *et al.*, 1992), y también por medio de la subunidad C17 (Schramm & Hernández, 2002). Estudios de microscopía electrónica revelaron que el trímero C82/C34/C31 está localizado a un lado del surco de unión al DNA (Fernández-Tornero *et al.*, 2007), topológicamente cerca del extremo 5' del complejo de transcripción (Bartholomew *et al.*, 1993). Las subunidades C82, C53, C34 y C31 se encuentran en preparaciones enzimáticamente activas de Pol III (Thuillier *et al.*, 1995); aunque mutaciones que afectan a C82 son suprimidas con la sobreexpresión de C31 (Chiannikulchai *et al.*, 1992b), todas las subunidades de Pol III son necesarias para la transcripción. El subcomplejo C82/C34/C31 se une a los factores TFIIC y TFIIB (Hsieh *et al.*, 1999). La interacción entre C82/34/31 y TFIIB es importante para la iniciación de la transcripción (Wener *et al.*, 1993), por lo que algunos autores denominan a este heterotrímero como el subcomplejo de inicio de la transcripción (Fig. 4).

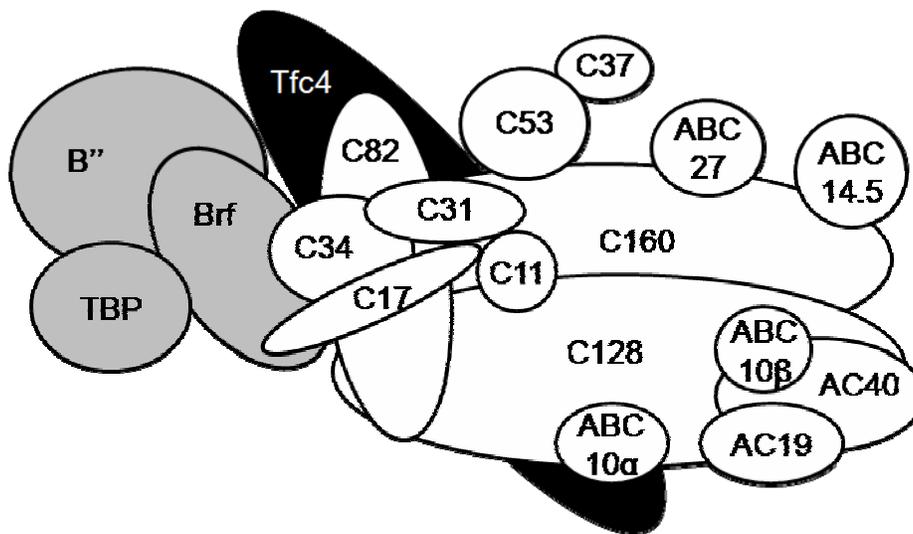


Figura 4. Modelo del Complejo de Inicio de la Transcripción de Pol III. Pol III se muestra en blanco, TFIIB en gris y TFIIC (sólo una subunidad) en negro. Tomada de Geiduschek & Kassavetis, 2001.

1.4 Transcripción en cinetoplastos

Leishmania spp. y otros tripanosomátidos rompen con muchos de los paradigmas establecidos para la transcripción en eucariontes; algunos ejemplos son: 1) la transcripción policistrónica; 2) el procesamiento de los RNAm por trans-splicing, proceso mediante el cual una secuencia denominada miniexón o spliced-leader es añadida al extremo 5' de los pre-RNAm (revisado por Campbell *et al.*, 2003); 3) la escasez de promotores para Pol II; 4) la aparente

ausencia en la regulación del inicio de la transcripción en la mayoría de los genes que codifican para proteínas, siendo el procesamiento del RNAm y su estabilidad los mecanismos que determinan en mayor grado los niveles de proteínas en las células; 5) la edición de los RNAm mitocondriales; 6) la transcripción por parte de Pol I de algunos genes que codifican para proteínas, incluidas las Glicoproteínas Variables de Superficie (VSG, por sus siglas en inglés); 7) la dependencia para la transcripción de RNApn de un gen de RNAt; 8) la síntesis de todos los RNAt mitocondriales en el núcleo (Rubio *et al.*, 2000).

1.4.1 Organización Genómica y Transcripción Policistronica

Resulta interesante que los genes en cinetoplástidos estén organizados en grupos grandes de genes localizados en una misma cadena de DNA, formando unidades policistronicas largas (100-300 kb) (Myler *et al.*, 2000). Los genes de una unidad policistronica son transcritos juntos, generándose transcritos primarios policistronicos. En *L. major* el tamaño del genoma es de 32.8 Mb y se encuentra organizado en 36 cromosomas que tienen un tamaño de entre 0.3 y 2.8 Mb; el contenido de G y C en el genoma es de 59.7 % y el número de genes encontrados es de 8298. La densidad de genes por Mb es de 252, con un tamaño promedio de los genes de 1894 pb; el número de genes de RNAt encontrados es 83, mientras que el número de genes de RNApn es 6 (Smith, 2007).

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

El cromosoma 3 de *L. major* presenta dos unidades policistrónicas convergentes de 67 y 30 genes. El análisis transcripcional reveló que la transcripción inicia únicamente río arriba del primer gen de cada unidad policistrónica, tal como se observó en el cromosoma 1. Entre las dos unidades policistrónicas convergentes se localiza un gen de RNAt (transcrito por Pol III). De manera interesante, se encontró que la transcripción (de Pol II) del cromosoma termina en la región que contiene dicho gen (Martínez-Calvillo *et al.*, 2004). Así, estos resultados mostraron que en *Leishmania* el número de regiones donde inicia la transcripción de Pol II es muy reducido (sólo unas cuantas regiones por cromosoma) (Martínez-Calvillo *et al.*, 2003; Martínez-Calvillo *et al.*, 2004). Teniendo lo anterior en consideración, el control de la abundancia de los transcritos debe de estar dado por elementos *cis* que afecten el procesamiento del RNA y/o su estabilidad (Wong *et al.*, 1994). La transcripción policistrónica de los genes que codifican para proteínas se lleva a cabo por una Pol II sensible a α -amanitina ($ID_{50} = 2-10 \mu\text{g/ml}$) (Horn, 2001). Cabe mencionar que los genes contenidos en los transcritos policistrónicos no tienen ninguna interrelación funcional (Campbell *et al.*, 2003).

1.4.2 Miniexón y Trans-splicing

Los genes del miniexón son transcritos por Pol II (Campbell *et al.*, 2000; Gilinger & Bellofatto, 2001). El miniexón posee en su extremo 5' una caperuza modificada (cap 4; $m^7\text{Gpppm}^{6,2}\text{AmpAmpCmpm}^3\text{Um}$) (Campbell, *et al.*, 2003). Al ser procesados los pre-RNAm por trans-splicing, el miniexón provee a los RNAm de dicha caperuza (Bangs *et al.*, 2003) (Fig. 5). Existen típicamente de 100 a 200 genes de miniexón agrupados en tándem dentro del genoma de los cinetoplastidos, cuya transcripción corresponde al 6 % del total de transcritos producidos dentro de la célula. Los promotores para la transcripción están río arriba del gen; y aunque la configuración varía de especie a especie, los elementos *cis* críticos consisten en dos secuencias ubicadas a -60 y -30, y en la mayoría de los casos también en un elemento a -5 (Yu *et al.*, 1998). En cuanto a la terminación de la transcripción, todos los genes de miniexón poseen una secuencia de >6 timinas que se ha propuesto sirve para tal efecto (Sturm *et al.*, 1999).

1.4.3 Transcripción de Pol I

Como en otros organismos eucariontes, en los tripanosomátidos Pol I transcribe los genes que codifican para el RNAr (18S, 5.8S y 28S). Sin embargo, en *Trypanosoma brucei* Pol I

sintetiza a demás los principales antígenos de superficie del parásito: prociclina cuando está en el insecto vector y los VSG dentro del hospedero vertebrado (Lee & Van der Ploeg, 1997); estas últimas tienen un papel importante en la evasión de la respuesta inmune (Vincendeau & Bouteille, 2006).

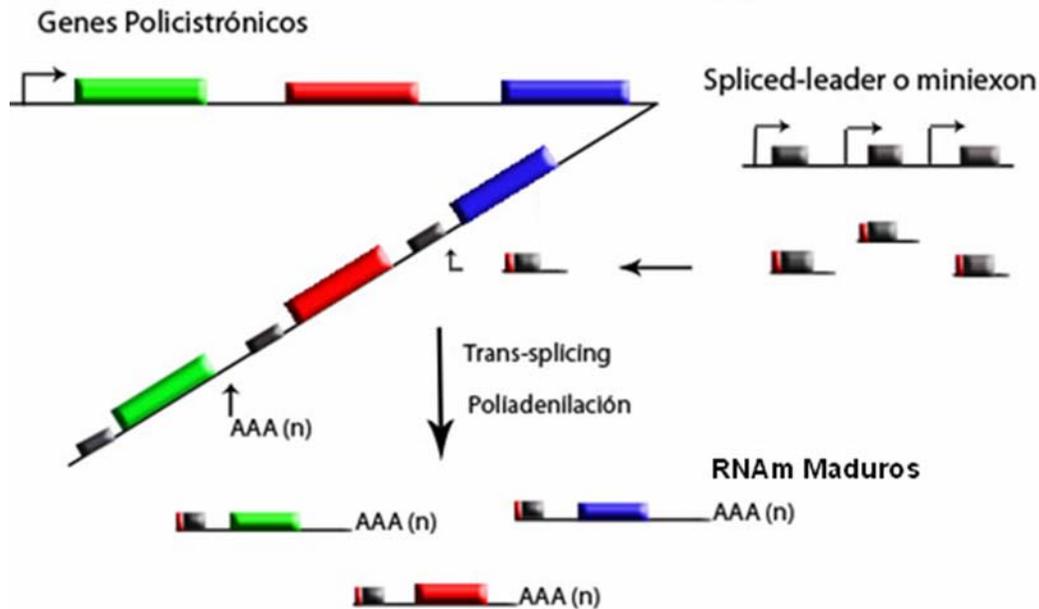


Figura 5. Representación esquemática de la transcripción policistrónica y el trans-splicing. A la izquierda se muestra la formación de un transcrito policistrónico; a la derecha, la transcripción y procesamiento de una repetición en tándem del gen del minixón. En el centro se ejemplifican el proceso de poliadenilación y trans-splicing, donde cada cistrón es escindido de la unidad policistrónica y se le incorpora en su extremo 5' un transcrito maduro del minixón, para generar RNAm maduros.

La cinética de la transcripción del RNAr en los tripanosomátidos es similar a otros eucariontes (Johnson *et al.*, 1987); sin embargo, el RNAr 28S muestra una fragmentación múltiple (Hernández *et al.*, 1993). En *T. brucei* el transcrito primario no presenta caperuza; 20 % de los extremos 5' poseen trifosfatos y el 80 % tienen un grupo hidroxilo (Bruderer *et al.*, 2003). La estructura general del promotor de los RNAr es una secuencia bipartita entre -70 y -10, río arriba del inicio de la transcripción (Yan *et al.*, 2002).

Únicamente un sitio de expresión VSG, dentro de un repertorio de veinte, es transcrito activamente (Borst & Ulbert, 2001); lo que determina la capacidad de evasión de la respuesta inmune en *T. brucei* (Pays *et al.*, 2001). El gen de las VSG expresado en tripomastigotes se

encuentra al final de una unidad transcripcional de ~50 kb que contiene de 8 a 10 genes (Berriman *et al.*, 2002). En cambio el gen que se expresa en tripomastigotes metacíclicos es monocistrónico (Alarcon *et al.*, 2002) y los genes de prociclinas son co-transcritos con otros 4 genes (Liniger *et al.*, 2001). Toda la evidencia sugiere que tanto los promotores de las VSG como la prociclina son constitutivos y muestran una regulación negativa de la transcripción en el estadio celular opuesto, y en 19 de los sitios de expresión de VSG (Horn & Cross, 1997; Clayton, 2002). Los niveles de expresión de VSG y prociclinas están controlados a nivel de la elongación de la transcripción, la estabilidad del RNAm y la eficiencia de la traducción (Hotz *et al.*, 1998). Sin embargo, los genes de VSG en tripomastigotes metacíclicos, los cuales son transcritos por un corto tiempo en el insecto vector y durante las primeras etapas de la infección, están regulados de una manera más convencional al inicio de la transcripción (Graham & Barry, 1995).

1.4.4 Transcripción de Pol III

En tripanosomátidos, Pol III transcribe todos los RNApn (U1 a U6) (Tschudi & Ullut, 2002), además de los RNAt, el RNAr 5S y el RNA 7SL. Esta polimerasa muestra una resistencia intermedia a la α -amanitina ($ID_{50} = 150\mu\text{g/ml}$). Análisis de secuencia de los genes de RNAt y del RNAr 5S han permitido la identificación de los dominios de control interno (cajas A, B y C), pero a la fecha no se ha caracterizado funcionalmente ningún promotor. En cambio, varios promotores de genes de RNApn y del gen del RNA 7SL han sido caracterizados en *T. brucei* y en *Leptomonas*. Estos genes tienen un gen de RNAt contiguo, hacia su extremo 5' y localizado en la cadena opuesta de DNA. Sorprendentemente, las cajas A y B del RNAt vecino son esenciales para la expresión del RNApn y del RNA 7SL. En la mayoría de casos, se requieren también elementos regulatorios intragénicos del RNApn y del RNA 7SL (Fantoni *et al.*, 1994; Nakaar *et al.*, 1995) para lograr un nivel de expresión óptimo.

1.5 Purificación por Afinidad en Tándem

El método de Purificación por Afinidad en Tándem (TAP, por sus siglas en inglés) es una herramienta que permite la purificación rápida de complejos proteicos bajo condiciones nativas, aun cuando éstos son expresados al nivel normal, además de que no se necesitan conocimientos previos de la composición del complejo proteico, actividad o función. La técnica requiere la fusión de un péptido o “tag” al extremo amino o carboxilo de una proteína blanco intrínseca del

complejo que permite el aislamiento del mismo, empleando columnas cromatográficas de afinidad. Combinado con espectrometría de masas, la Purificación por Afinidad en Tándem permite la identificación de proteínas que interactúan con una proteína blanco determinada (Rigaut *et al.*, 1999) (Fig. 6).

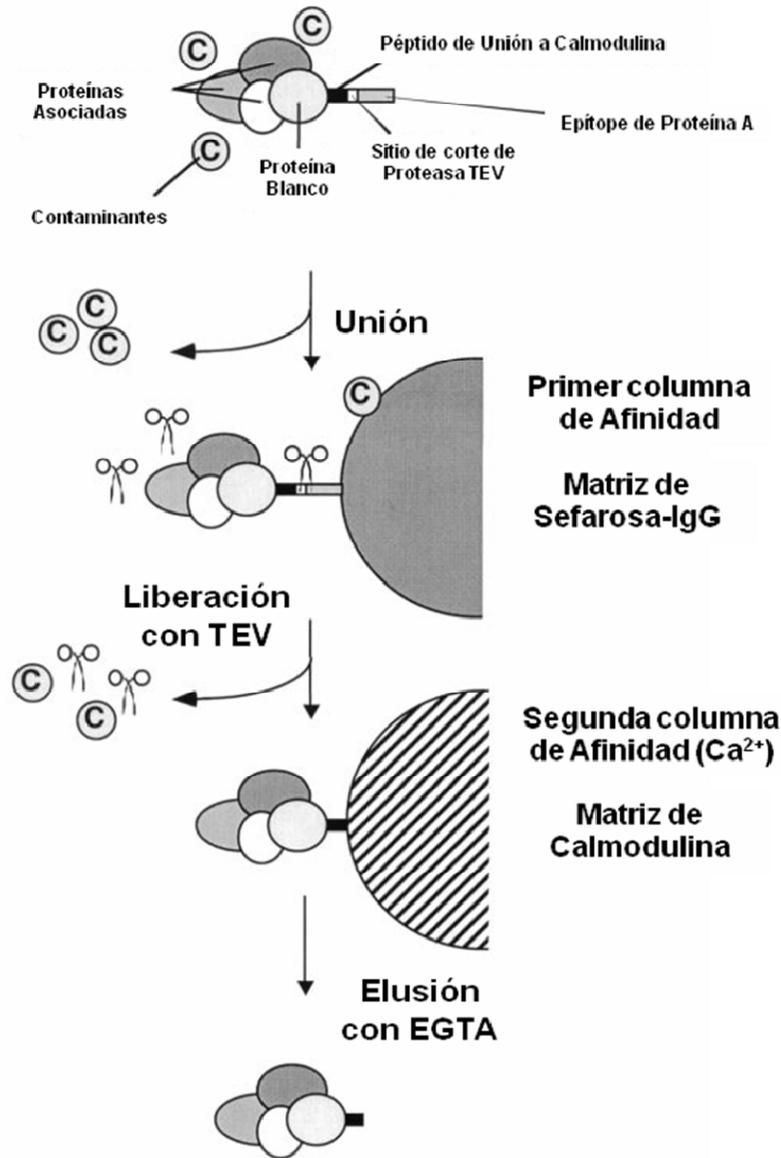


Figura 6. Purificación por Afinidad en Tándem. Perspectiva general de la purificación de complejos proteicos empleando la técnica de TAP tag. En la parte superior se ejemplifica un complejo proteico que se asocia a la proteína blanco. En segundo lugar, se muestra la unión de la proteína blanco, y consecuentemente la del complejo proteico, a través de la Proteína A (ProtA) del tag a la primera columna de afinidad, y la posterior digestión y liberación del complejo con la proteasa TEV. En tercer lugar, se ilustra la unión del complejo proteico a la columna de calmodulina. En la parte inferior se esquematiza la elución del complejo de la segunda columna, empleando el quelante de iones EGTA. Tomada de Puig, 2001.

El TAP-tag consiste en dos dominios de unión a IgG de la Proteína A (ProtA) de *Staphylococcus aureus* y un Péptido de Unión a Calmodulina (CBP, por sus siglas en inglés), separados por un sitio de corte de la proteasa TEV. El gen de la proteína debe de estar unido a la secuencia que codifica el tag y ambos deben de estar en un vector de expresión adecuado. Una vez obtenido el extracto crudo de las células, se procede a pasarlo por las columnas de afinidad. Primeramente, los dominios de ProtA se unen a una matriz de IgG contenida en una columna cromatográfica, y para poder eluir el complejo proteico es necesario hacer una digestión con la proteasa TEV. La elución recuperada se pasa a través de una columna de calmodulina en presencia de calcio, se realiza un lavado para eliminar contaminantes y moléculas de proteasa TEV, y finalmente se eluye el complejo con EGTA (Puig *et al.*, 2001) (Fig. 6).

Existen otras combinaciones de tag que se ha observado resultan más eficientes en la extracción de determinados complejos proteicos. Un ejemplo de éstas es la denominada PTP-tag, la cual consiste en un epítipo de 12 aminoácidos derivado de la Proteína C humana (ProtC) en vez del dominio CBP presente en TAP-tag; ProtC se une con alta afinidad al anticuerpo monoclonal HPC4 que se caracteriza por requerir de calcio para unir al antígeno, lo que permite eluir al complejo con un agente quelante de cationes divalentes. Esto hace que la eficiencia de la purificación se incremente, a demás de que proporciona otras alternativas de solventes para la elución, ya que en algunas ocasiones el EGTA puede inactivar a las proteínas. Esta combinación ha resultado muy eficiente para el aislamiento de complejos proteicos en *T. brucei* (Schimanski *et al.*, 2005a; Schimanski *et al.*, 2005b).

Dada la importancia de Pol III en la síntesis de diversas moléculas de RNA pequeñas que son esenciales para el crecimiento celular, uno de nuestros intereses de investigación es la caracterización de los complejos transcripcionales de Pol III en *Leishmania*. Bajo esta perspectiva, la técnica del TAP-tag es particularmente útil para la identificación de los componentes estructurales de complejos proteicos. En *T. brucei* la técnica ha sido usada, con algunas modificaciones en ciertos casos, para analizar el complejo del exosoma (Estevez *et al.*, 2001), identificar a los miembros del complejo de edición de RNAm mitocondrial (Panigrahi *et al.*, 2003), estudiar la composición de Pol I (Schimanski *et al.*, 2003; Walgraffe *et al.*, 2005; Nguyen *et al.*, 2006), así como también de Pol II (Devaux *et al.*, 2006; Das *et al.*, 2006), y

determinar la composición del RNAPn U1 (Palfi *et al.*, 2005). De manera similar, en *Leishmania tarentolae* se ha analizado el complejo del editosoma (Aphasizhev *et al.*, 2003).

1.6 Antecedentes

En *L. major* la técnica del TAP-tag se usó para identificar algunos de los componentes de los complejos transcripcionales de Pol II y Pol III (Martínez-Calvillo *et al.*, 2007). En ese trabajo se identificaron nueve subunidades que conforman a Pol II: B220, B150, B44, B16, B12.5, ABC27, ABC23, ABC14.5 y ABC10 β . Usando como blanco a ABC23, subunidad común de las tres RNA polimerasas, se confirmó la presencia de doce subunidades de Pol III en los complejos aislados por TAP-tag en *L. major*: C160, C128, C53, C82, C37, C34, C17, ABC27, ABC23, ABC14.5, AC40 y AC19. Entre las subunidades identificadas se encuentra C82, subunidad exclusiva de Pol III. A demás, se identificaron también proteínas de unión a RNA, histonas, helicasas, factores de elongación de la transcripción, probables ATPasas y otras proteínas con función desconocida (Martínez-Calvillo *et al.*, 2007).

Así, ya sea mediante el análisis de TAP-tag o por medio del análisis *in silico* de los genomas de los tripanosomátidos, ya han sido identificados los genes de la mayoría de las subunidades de las tres RNA polimerasas en este grupo de parásitos. Sin embargo, muy pocas subunidades de factores de transcripción han sido identificadas; este hecho podría interpretarse de varias maneras: 1) los factores de transcripción de estos organismos son muy distintos a los registrados para otros eucariontes; 2) existen otro tipo de proteínas que toman la función de los factores de transcripción; ó 3) la poca regulación que se observa en la transcripción hace innecesarios a los factores de transcripción (Palenchar & Bellofatto, 2006).

El uso de una subunidad exclusiva de Pol III (C82) en las purificaciones TAP, seguramente permitiría purificar otras subunidades de Pol III, así como probables factores de transcripción de dicha RNA polimerasa. A demás de incrementar nuestro conocimiento básico acerca de los procesos transcripcionales en *Leishmania* y otros tripanosomátidos, la caracterización del complejo de Pol III podría revelar la presencia de algún componente proteico exclusivo de *Leishmania*; dicha proteína podría usarse en estudios futuros como blanco para el diseño de fármacos contra el parásito.

2. Objetivos

2.1 Objetivo General

Identificar subunidades del complejo de transcripción de Pol III que se asocian a la subunidad C82, mediante la técnica de Purificación por Afinidad en Tándem.

2.2 Objetivos Particulares

- a) Generar la construcción pB6-PTP, reemplazando la secuencia de CBP en el vector pB6-TAP por el epítotope de Proteína C.
- b) Clonar el gen de la subunidad C82 de *L. major* en pB6-TAP y pB6-PTP, para obtener la construcción pC82-TAP y pC82-PTP, respectivamente.
- c) Transfectar promastigotes de *L. major* y *L. mexicana* con pC82-TAP y pC82-PTP y obtener clonas celulares que expresen de manera estable la proteína recombinante C82-TAP y C82-PTP.
- d) Aislar, mediante la técnica de Purificación por Afinidad en Tándem, complejos proteicos de Pol III en *L. major* y *L. mexicana*.

3. Materiales y Métodos

3.1 Generación de vectores

3.1.1 Obtención de pB6-PTP

Partiendo de la construcción pB6-TAP (Martínez-Calvillo *et al.*, 2007) se llevaron a cabo digestiones con las enzimas de restricción *Xba*I y *Nhe*I para retirar la secuencia CBP, la cual se encuentra ubicada río abajo de la secuencia de la subunidad ABC23, y obtener el cuerpo de vector que fue empleado para la ligación con un inserto que contenía la secuencia del epítipo de ProtC. El inserto en cuestión se generó mediante la hibridación de los oligonucleótidos ProtC sentido (CTAGAGGTTCCGACGGCGAAGATCAGGTGGATCCTCGTCTTATTGATGGGA AATATGATATTCCA ACTACTG) y ProtC antisentido (CTAGCAGTAGTTGGAATATCATA TTTCCCATCAATAAGACGAGGATCCACCTGATCTTCGCCGTCGGAACCT), siguiendo el siguiente protocolo: 1) ambos oligonucleótidos se llevaron a una concentración de 2.2 µg/µl con amortiguador TE (Tris 40 mM, pH 7.6; EDTA 1 mM pH 8.0; NaCl 15 mM); 2) se tomaron 10 µl de cada oligonucleótido, se depositaron en un tubo para microcentrífuga de 1.5 ml y se llevaron a un volumen final de 50 µl con amortiguador TE; 3) El tubo se colocó verticalmente en un baño de agua a 80 °C, por 5 min; 4) concluido ese tiempo, la mezcla se dejó enfriando dentro del baño, hasta que la temperatura descendió a 27 °C; 5) finalmente los oligonucleótidos fueron analizados en un gel de agarosa al 2 %.

Una vez obtenido el inserto de ProtC se realizó una ligación intermolecular con el vector pB6-TAP (sin CBP), empleando la DNA ligasa T4 (ver sección 3.7). Posteriormente, células competentes JM109 fueron transformadas con la mezcla de ligación (ver sección 3.8) y varias de las clonas obtenidas fueron analizadas mediante restricción y secuenciación, hasta encontrar una clona en la que el dominio de CBP fue reemplazado por el epítipo de ProtC. La determinación de la secuencia de las construcciones obtenidas se llevó a cabo en el Laboratorio de Bioquímica Molecular de la Unidad de Biotecnología y Prototipos de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala, UNAM. El método empleado fue “BIG DYE Terminador Fluorescente Based Sequencing”, con un equipo ABI 3100.

3.1.2 Obtención de pGEM-C82

Empleando DNA genómico (DNAg) como templado, se llevó a cabo la amplificación del gen correspondiente a la subunidad C82 de Pol III, utilizando los oligonucleótidos C82/*AgeI* 5' (ATACCGGTATATTTCTCCTCAGCCAGGACTC) y C82/*XbaI* 3' (ATTCTAGAAAAAACACAATCAGCAGC). Las condiciones de la amplificación fueron: un ciclo a 94°C por 2 min; 30 ciclos de desnaturalización (94°C por 1 min), alineamiento (50°C por 2 min y 30 seg) y amplificación (72°C por 2 min y 30 seg); y un ciclo a 72°C por 7 min. El producto de esta amplificación se desaló y clonó en el vector pGEM®-T Easy (Promega), se transformaron células competentes JM109 y las clonas obtenidas fueron analizadas mediante restricción con las enzimas *EcoRI*, *SacI*, *AgeI* y *XbaI*. Finalmente, las clonas se analizaron mediante secuenciación.

3.1.3 Obtención de pC82-PTP

Para clonar el gen de C82 en pB6-PTP, dicha construcción fue inicialmente digerida con *XbaI* y *XmaI* para remover el inserto que corresponde a ABC23, el cual se encuentra ubicado río arriba de la secuencia que codifica para los epítopes de extracción (PTP-tag). El gen de C82 fue obtenido de la construcción pGEM-C82 digiriendo con *AgeI* y *XbaI*. Una vez purificado el inserto de C82, se ligó con el cuerpo del vector pB6-PTP (sin ABC23); la mezcla de ligación se empleó para transformar células competentes JM109; las clonas obtenidas fueron analizadas mediante restricción con las enzimas *XbaI* y *XmaI* y por secuenciación. Cabe aclarar que los extremos cohesivos generados por *XmaI* y *AgeI* son compatibles, sin embargo cuando éstos sitios son ligados se genera una secuencia que ya no es reconocida por ninguna de las dos enzimas.

3.1.4 Obtención de pC82-TAP

Para clonar el gen de C82 en pB6-TAP, dicha construcción fue inicialmente digerida con *XbaI* y *XmaI* para remover el inserto que corresponde a ABC23, el cual se encuentra ubicado río arriba de la secuencia que codifican para los epítopes de extracción (TAP-tag). El gen de C82 fue obtenido de la construcción pGEM-C82 digiriendo con *AgeI* y *XbaI*. Una vez purificado el inserto de C82, se ligó con el cuerpo del vector pB6-TAP (sin ABC23); la mezcla de ligación se empleó para transformar células competentes JM109 y las clonas obtenidas fueron analizadas mediante PCR, por restricción con las enzimas *XbaI*, *XmaI*, *XhoI* y *NcoI* y por secuenciación.

3.2 Electroforesis en geles de agarosa

Las diversas electroforesis en geles de agarosa (Agarose D-1 low EEO, Pronadisa, Laboratorios Conda) al 0.8-2 % con amortiguador TBE 1x (Tris base 89 mM; ácido bórico 89 mM; EDTA 2 mM) y 0.1 µg/ml de bromuro de etidio, se corrieron inmersos en amortiguador TBE 1x. El voltaje al que fueron sometidos los geles para la separación de las bandas varió dependiendo de los resultados esperados. Si se deseaba la separación de algún inserto o cuerpo de vector para su posterior purificación, el voltaje escogido era generalmente de 50 volts. En cambio, si lo que se quería era únicamente visualizar un patrón de bandeo en algún análisis de restricción específico o si se quería determinar la cantidad y pureza de una muestra dada, el voltaje empleado fue generalmente mayor (75-100 volts.) De igual manera, el tiempo de corrida varió desde 30 min para observar algún patrón de bandeo; hasta 8 h, para la purificación de alguna molécula de DNA particular. Todas las muestras fueron resuspendidas en amortiguador de carga 1x (azul de bromofenol 0.25 %; xilen cianol 0.25 %; glicerol 30 %) y se corrieron paralelamente con un marcador de peso molecular (1 Kb DNA Ladder, Invitrogen™).

3.3 Digestiones con enzimas de restricción

Las digestiones con enzimas de restricción se llevaron a cabo con el amortiguador de reacción proporcionado y recomendado por el fabricante a una concentración final de 1x (cabe mencionar que todas las enzimas de restricción empleadas fueron de New England BioLabs®) y la temperatura de digestión fue de 37°C; en los casos donde se empleaba BSA, ésta se añadió a una concentración final de 1x. Los diversos análisis de restricción para caracterizar o confirmar la identidad de las clonas obtenidas se llevaron a cabo en un volumen de 20 µl, digiriendo ~1 µg de DNA. En cambio, si se deseaba procesar una construcción para obtener una cantidad relativamente abundante de inserto o de vector, se trabajaba con digestiones de volúmenes de 50 µl, digiriendo hasta 5 µg de DNA. La cantidad de enzima empleada en cada caso variaba dependiendo del número de unidades por microlitro que éstas presentaban.

3.4 Purificación de DNA a partir de geles de agarosa

Para realizar la purificación de insertos o de vectores se empleó una agarosa de bajo punto de fusión (Sigma®). El proceso consistió en remover con un escalpelo limpio la o las bandas que contenían el DNA de interés, procurando en todo momento limitar al mínimo la

cantidad de agarosa que se tomaba. Posteriormente se empleó el kit QIAEX® II Gel Extraction (QIAGEN®) o el NucleoSpin® Extract II (Macherey-Nagel), siguiéndose las instrucciones y recomendaciones especificadas por los fabricantes.

3.5 Desfosforilación

La desfosforilación se llevó a cabo empleando la enzima Fosfatasa Alcalina de Camarón (Promega). En la mezcla de reacción se agregaron 1.5 unidades de enzima (1.5 U/ μ l); las condiciones de la desfosforilación fueron a 37 °C por un lapso de 15 min. La enzima se inactivó a 65 °C por un tiempo de 15 min. El amortiguador usado en la reacción fue el proporcionado por el fabricante.

3.6 Extracción de DNA genómico (DNAg)

Para realizar la extracción de DNAg se centrifugaron $\sim 3 \times 10^8$ cels./ml a 3,000 g, durante 10 min a 4°C; posteriormente la pastilla celular se resuspendió en 5 ml de la siguiente solución: 5 ml de SSC 1x (NaCl 3 M; acetato de sodio 0.3 M pH 7.0), 4.5 ml de TNE (Tris 40 mM pH 7.6; EDTA 1 mM pH 8.0; NaCl 15 mM) y 0.5 ml de sarcosyl al 10 %; se adicionaron 100 μ g de proteinasa K (Invitrogen™), se agitó en vortex y se incubó a 55°C por 2 h. Posteriormente se adicionó un volumen de fenol: cloroformo: alcohol isoamílico (25: 24: 1), se agitó en vortex y se centrifugó a 1,500 g durante 8 min a 4°C. La fase acuosa se transfirió a un tubo para microcentrífuga de 1.5 ml y se precipitó el DNA con 0.1 volúmenes de acetato de sodio 3 M pH 5.5 y 2.5 volúmenes de etanol absoluto. Se incubó a -20°C por un mínimo de 12 h; se centrifugó a 7,000 g por 15 min a 4°C; se lavó la pastilla con etanol al 70 % y finalmente se resuspendió en amortiguador TE o agua desionizada estéril.

3.7 Ligaciones

Las ligaciones se llevaron a cabo empleando la enzima DNA Ligasa del fago T4 (Promega o Invitrogen™). En la mezcla de reacción se agregó una unidad de enzima (1 U/ μ l); las condiciones de la ligación fueron a temperatura ambiente por un lapso de 8 min. El amortiguador usado en la reacción fue el proporcionado por el fabricante. En el caso de que no se obtuvieran unidades formadoras de colonia (ufc) en las transformaciones donde se empleaba el producto de determinada ligación, las condiciones que se variaban eran: incrementar la cantidad

de DNA empleada en la ligación, reducir el volumen final de la reacción, o realizar la ligación a 4 ó 14°C por un mínimo de 12 h.

3.8 Transformaciones

Previo a la transformación, el DNA de la reacción de ligación fue precipitado con acetato de sodio 3M (pH 5.5), extraído con etanol absoluto y resuspendido en 5-10 µl de agua desionizada estéril. Se trabajó con diferentes cepas de células competentes y electrocompetentes, tanto comerciales como no comerciales, para realizar las transformaciones necesarias. En el caso de las células comerciales, se siguieron las indicaciones y recomendaciones marcadas por el fabricante. En lo que respecta a las células no comerciales, se siguieron las siguientes indicaciones: después de adicionar el DNA a las células, éstas se incubaron en hielo por 30 min; posteriormente se dio un choque térmico a 42°C por 40 seg, y se añadió medio SOC a un volumen final de 1 ml. Las células se incubaron por 1 hora a 37°C y se sembraron en placas de medio LB con ampicilina (0.1 mg/ml). Algunas de las células competentes comerciales empleadas fueron: DH5α (Invitrogen™), JM109 (Promega), SURE2® y XL10-Gold® (Stratagene).

3.9 Análisis de las clonas por medio de PCR

Antes de analizar cualquier clona en la que se hubiera clonado la secuencia que contenía el gen de C82, la clona en cuestión fue analizada mediante PCR, siguiendo el siguiente procedimiento: 1) con una punta de micropipeta se tomó una muestra de bacterias directamente de la ufc obtenida de la transformación; 2) se resuspendió en 20 µl de amortiguador TE, 3) se incubó en un baño de agua a 100°C por 2 min e inmediatamente después se incubó en hielo durante 1 min; 3) el lisado bacteriano se centrifugó por 1 min a velocidad máxima y se tomaron 10 µl de este clarificado como templado para llevar a cabo un PCR. La composición de la reacción de PCR fue la siguiente: 5 µl de amortiguador 10x; 1 µl de dNTPs 10 mM; 1 µl de cada uno de los oligonucleótidos (10 µM) empleados para la amplificación de C82 directamente del DNAg; 1 µl de DNA Polimerasa (REDTaq® DNA Polymerase, Sigma®); la reacción se realizó en un volumen final de 50 µl y la amplificación se llevó a cabo con las mismas condiciones descritas en la sección 3.1.2.

3.10 Minipreparación de plásmidos

Únicamente cuando se iba a realizar la secuenciación de una construcción determinada, ésta se obtenía mediante el uso de un kit comercial de purificación (QIAprep® Spin Miniprep Kit de QIAGEN® o NucleoSpin® Plasmid de Macherey-Nagel), siguiéndose las instrucciones y recomendaciones especificadas por el fabricante. Para otros procedimientos, como análisis de restricción o la obtención de material para purificar determinados segmentos de la construcción, se realizaron minipreparaciones mediante lisis alcalina. Para lo cual: un cultivo de 2-5 ml de LB inoculado con la clona deseada e incubado a 37°C por 12 h se centrifugó a velocidad máxima, durante 30-60 seg a 4°C y posteriormente se retiró el sobrenadante. La pastilla bacteriana se resuspendió en 100 µl de Sol. I (glucosa 50 mM; Tris-Cl 25 mM pH 8.0; EDTA 10 mM pH 8.0) con un vortex. Se adicionaron 200 µl de Sol. II preparada al momento (NaOH 0.2 N; SDS 1 %), se mezcló rápidamente invirtiendo 5 veces y se mantuvo en hielo. Se adicionaron 150 µl de Sol. III fría (60.0 ml de acetato de sodio 3 M pH 4.8; 11.5 ml de ácido acético glacial; 28.5 ml de H₂O), se mezcló invirtiendo varias veces, y se mantuvo en hielo 3-5 min. Se centrifugó a velocidad máxima por 5 min a 4°C y se pasó el sobrenadante a un tubo para microcentrífuga de 1.5 ml. Se añadió un volumen de fenol: cloroformo (1:1), se vortexeó y centrifugó a velocidad máxima 5 min a 4°C; posteriormente se pasó la fase líquida a un tubo nuevo. Se precipitó el DNA con dos volúmenes de etanol absoluto, se mezcló por vortex y se incubó en hielo por 2 min. Se centrifugó a velocidad máxima 5 min a 4°C y se retiró el sobrenadante. Se realizó un lavado con 1 ml de etanol al 70 %, se dejó secar la pastilla, se resuspendió en 50 µl de amortiguador TE con RNasa A (20 µg/µl) y se incubó a 37°C por 1 h.

3.11 Midipreparación de plásmidos

La obtención de los plásmidos que se emplearon para llevar a cabo la transfección de parásitos, se realizó con el kit QIAfilter™ Plasmid Midi Kit de QIAGEN®, siguiéndose las instrucciones y recomendaciones marcadas por el fabricante.

3.12 Cultivo de promastigotes de *Leishmania*

En lo referente al cultivo de parásitos, se emplearon promastigotes de la cepa *L. major* MHOM/IL/81/Friedlin (*LmjF*), que se crecieron en el medio de cultivo B/M (infusión cerebro-corazón 0.25x, medio 199 0.5x, Hepes 40 mM, hemina 0.01 mg/ml, biotina 0.02 %, biopterina

1.25, penicilina (100 u/ml) – estreptomina (0.1 mg/ml)), suplementado con suero fetal bovino (SFB) al 10 %. La temperatura de incubación fue de 25°C con agitación constante de 50 rpm. La cepa Bricaire de *L. mexicana* fue crecida en el medio de cultivo M199 (SFB 10 %, Medio 199 1x, Hepes 40 mM, hemina 4 µg/ml, penicilina (100 u/ml) – estreptomina (0.1 mg/ml), L-glutamina 2mM).

3.13 Transfección de *Leishmania*

Promastigotes de *L. major* fueron crecidos en medio B/M o M199 y cultivados en fase media logarítmica ($30-40 \times 10^6$ cels./ml) para llevar a cabo la transfección por medio de electroporación, de la siguiente manera: 1×10^8 células fueron centrifugadas a 2,500 g, por 12 min a 4°C; posteriormente se realizaron dos lavados empleando 10 ml de PBS-G (PBS pH 7.2 con 6 mM glucosa) y amortiguador cytomix pH 7.6 (Hepes 25 mM pH 7.6, KCl 120 mM, CaCl₂ 0.15 mM, K₂HPO₄ / KH₂PO₄ 10 mM pH 7.6, EDTA 2 mM y MgCl₂ 5 mM). La pastilla celular fue resuspendida en 400 µl de amortiguador cytomix y las células fueron transferidas a una cubeta de electroporación de 4 mm (Electroporation Cuvettes Plus™, BTX®); dentro de la misma cubeta se adicionaron 25 µg de pC82-PTP o pC82-TAP, se mezcló suavemente y se incubó 10 min en hielo. Para llevar a cabo la electroporación se empleó un equipo ECM Electro Cell Manipulator (BTX®); el pulso conferido fue de 1600 volts, 25 Ω y 50 µF; las células fueron transferidas inmediatamente a hielo y se incubaron por 10 min adicionales. Las células electroporadas fueron resuspendidas en 10 ml de medio; 24 h después se adicionó la droga de selección, G418, a la concentración de 25 µg/ml y 24 h después se agregó G418 a la concentración final total (50 µg/ml) (Kapler *et al.*, 1990). Diez días después de que se llevó a cabo la electroporación, se tomó una alícuota de 1 ml y se sembró en 4ml de medio de cultivo con G418 (50 µg/ml); este cultivo se mantuvo en observación, realizando resiembras periódicas hasta que se recuperó completamente.

3.14 Clonación celular de *Leishmania*

La clonación de células transfectadas se efectuó sembrando en placas de medio con agarosa al 0.8 % (SeaPlaque GTG, Cambrex®) (Yan *et al.*, 2002; Martínez-Calvillo *et al.*, 2005). Brevemente, después de llevar a cabo el conteo celular del cultivo transfectado, se realizaron diluciones de 100, 250, 500 y 1000 cels./ 0.5 ml de medio de cultivo, y se plaqueó en cajas

previamente preparadas. La técnica de plaqueo consistió en verter las células en la mayor extensión posible de la placa de cultivo, y posteriormente, ladear la placa ligeramente para que las células se esparcieran por toda la superficie. Las placas de cultivo se mantuvieron a 25°C con 5 % de CO₂. Durante las primeras 24 h las placas se incubaron invertidas, y a las 48 h se voltearon; a lo largo de la clonación se retiraron los residuos de medio de cultivo que se condensaban en la tapa de la placa de cultivo. Cuando aparecían colonias sobre el medio de cultivo (de una a dos semanas) éstas se picaban con una punta estéril de micropipeta y se resuspendían en 1 ml de medio de cultivo empleando un placa multipozo; se mantenían en observación, realizando resiembras cuando era necesario.

3.15 Análisis de las clonas por medio de Western Blot

La expresión de la proteína recombinante C82-PTP o C82-TAP se confirmó mediante un análisis tipo Western Blot; para esto, extracciones proteicas de las clonas transfectadas fueron fraccionadas por electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato sódico (SDS-PAGE, por sus siglas en inglés); después, las proteínas fueron transferidas a una membrana de PVDF de 0.2 µm (Immun-Blot™ PVDF Membrane for Protein Blotting, BIO-RAD). El anticuerpo correspondió al anticuerpo PAP (Sigma-Aldrich), el cual reconoce el epítoto de ProtA del PTP-tag o del TAP-tag. En algunos experimentos se usó un anticuerpo contra la subunidad C82 de *L. major* (encargado a Invitrogen™). Se empleó el sistema ECL™ Western Blotting Detection Reagents (GE Healthcare, Amersham) para el revelado (Martínez-Calvillo *et al.*, 2007).

La técnica electroforética empleada fue la de sistema discontinuo, en la que se empleó un gel separador de poliacrilamida (Promega) al 10 % y un gel concentrador de poliacrilamida al 3.9 %. El amortiguador para hacer el gel separador tenía la siguiente composición: Tris-HCl 1.9 M; SDS 0.5 %; TEMED 0.25 %; glicerol 25 %. El amortiguador para el gel concentrador tenía la siguiente composición: Tris-ácido fosfórico 160.6 mM pH 6.8; SDS 0.12 %; azul de bromofenol 0.55 %; TEMED 0.06 %. Las muestras de proteína fueron suspendidas en amortiguador Laemmli 2.5x (Tris-HCl 83 mM pH 6.8; SDS 118 mM; azul de bromofenol 99.5 µM; glicerol 33.3 %); paralelamente se cargó marcador de peso molecular (Broad Range Protein Molecular Weight Markers, Promega). Para realizar el fraccionamiento de la muestra se empleó amortiguador de corrida 1x (Tris base 24.76 mM; glicina 191.82 mM; SDS 3.54 mM); el voltaje empleado fue de

100 volts con 15 mA constantes por 2 h y media, aproximadamente. Para la tinción de las proteínas se empleó una solución de azul de Coomassie o un kit para tinción con plata (SilverQuest™, Silver Staining Kit, Invitrogen™), siguiendo las instrucciones del fabricante.

La transferencia de las proteínas fraccionadas mediante SDS-PAGE a la membrana de PVDF se realizó empleando amortiguador de transferencia 5x (Tris base 25 mM; glicina 191.82 mM; metanol 20 %) con pH 8.3 Las condiciones para la transferencia fueron: 90 volts, 500 mA, durante 2 h. La transferencia de las proteínas a la membrana de PVDF se confirmó mediante tinción con Rojo Ponceau.

3.16 Purificación por Afinidad en Tándem

Partiendo de un cultivo en fase media logarítmica ($30\text{--}40 \times 10^6$ cels./ml) de 3 litros, la pastilla celular se lavó con 200 ml de PBS-G y se resuspendió en 18 ml de IPP-150 (Tris-HCl 10 mM pH 8.0; NaCl 150 mM; NP40 al 0.1 %) suplementado con albúmina sérica bovina al 1 % e inhibidores de proteasas a una concentración final de 1.5x (Protease Inhibitor Cocktail for Plants and Tissue Extract, Sigma). Se adicionaron 2 ml de Triton X-100 al 10 % y las muestras fueron incubadas en hielo hasta que las células estuvieran completamente lisadas (~20 min); para aclarar el lisado celular se centrifugó a 12,000 g, durante 15 min a 4°C (Martínez-Calvillo *et al.*, 2007). El sobrenadante se adicionó a una columna de cromatografía desechable Econo-Pac® (BIO-RAD) de 20 ml conteniendo 350 µl de perlas de Sefarosa-IgG (IgG Sepharose™ 6 Fast Flow, Amersham Bioscience), y se incubó por 3 h a 4°C en rotación suave. La columna fue drenada por flujo de gravedad y lavada tres veces con 20 ml de IPP-150 frío. El complejo proteico fue digerido con 125 unidades de la proteasa AcTEV (AcTEV™ Protease, Invitrogen) en 1 ml de amortiguador de proteasa AcTEV (KCl 150 mM; Tris-HCl 20 mM pH 7.7; MgCl₂ 3 mM; DTT 0.5 mM; Tween 20 al 0.1 %; EDTA 0.5 mM) durante 3 h y media a 30°C, agitando la columna de manera circular cada 30 min. La columna se drenó por flujo de gravedad, se realizó un lavado con 350 µl de PC-150 (KCl 150 mM; Tris-HCl 20 mM pH 7.7; MgCl₂ 3 mM; DTT 0.5 mM; Tween 20 al 0.1 %; CaCl₂ 1 mM), equivalente al volumen muerto de las perlas de Sefarosa-IgG. Después se adicionaron 3 volúmenes de PC-150 y se agregó CaCl₂ a una concentración final de 2 mM, antes de adicionarlo a una columna de cromatografía desechable Econo-Pac® (BIO-RAD) de 5 ml conteniendo 250 µl de matriz de afinidad α-ProtC (HPC4, de Roche). La

columna se incubó 12 h a 4°C en rotación suave, luego de lo cual se drenó por flujo de gravedad y se lavó diez veces con 5 ml de PC-150. Finalmente se realizaron ocho eluciones, cada una con 250 µl de amortiguador de elución (5mM Tris-HCl pH 7.7; 10mM EGTA; 5mM EDTA). Las proteínas eluidas de la purificación por afinidad en tándem fueron concentradas empleando las columnas Microcon® YM-10 (Millipore), analizadas por SDS-PAGE y teñidas con plata. Se tienen contemplado realizar la tinción de los eluidos con SYPRO® Ruby (Invitrogen™, Molecular Probes™), posteriormente bandas individuales de los geles serán removidas con un escalpelo y las proteínas se someterán a digestión con tripsina y finalmente se efectuará un análisis de espectrometría de masas (Shevchenko *et al.*, 1996).

4. Resultados

4.1 Generación de pB6-PTP

La técnica de purificación por afinidad en tándem (TAP) ha sido usada en muchos organismos, incluidos tripanosomátidos, para aislar complejos proteicos. Reportes recientes indican que la substitución del TAP-tag por el PTP-tag en los vectores usados para las purificaciones incrementa la eficiencia del procedimiento (Shimanski *et al.*, 2005). Por ello, se decidió reemplazar el dominio de unión a calmodulina (CBP) por el dominio de ProtC en el vector pB6-TAP, usado en *L. major* para aislar complejos transcripcionales (Martínez-Calvillo *et al.*, 2007), para generar un vector con el PTP-tag. Se espera que el vector resultante, pB6-PTP, resulte útil para clonar genes de *Leishmania* y purificar diversos complejos proteicos del parásito.

Como primer paso para reemplazar la secuencia que corresponde a CBP en la construcción pB6-TAP, se realizaron digestiones con *Xba*I (que corta en el extremo 5' de CBP) y *Nhe*I (que corta en el extremo 3') (Fig. 7). La Figura 8 (panel A) muestra los dos fragmentos

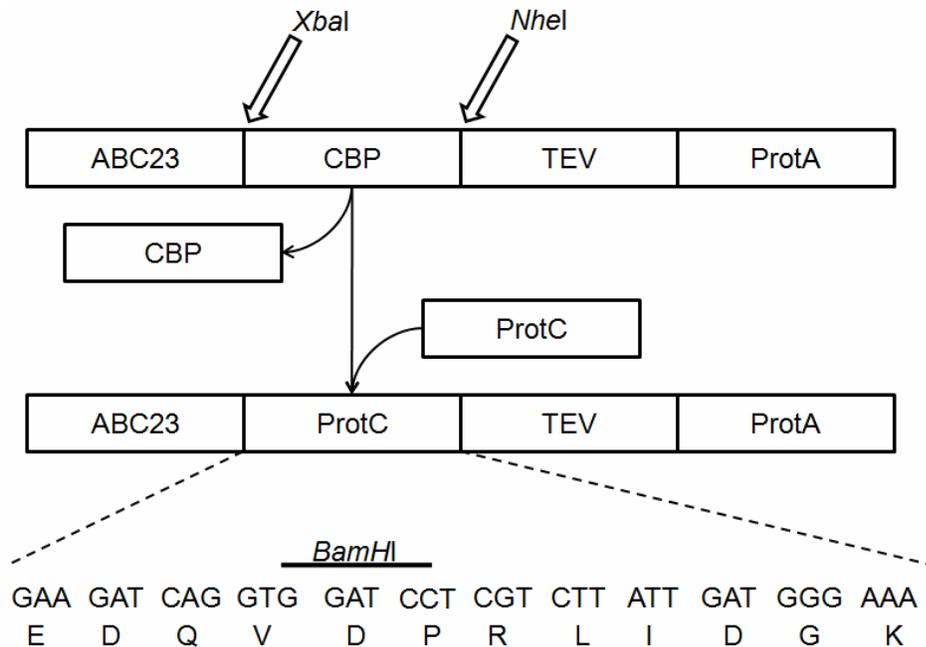


Figura 7. Reemplazo del péptido de unión a calmodulina (CBP) en la construcción pB6-TAP por un epítipo de ProtC para formar pB6-PTP. El esquema muestra la estrategia de clonación que se llevó a cabo para sustituir CBP por ProtC y convertir pB6-TAP en pB6-PTP. EL diagrama no se muestra a escala. Se presenta la secuencia de ProtC, indicándose el sitio de corte de *Bam*HI.

generados al llevar a cabo la digestión del plásmido: uno de 7116 pb (vector sin CBP) y otro de 123 pb (CBP). La banda correspondiente al vector pB6-TAP sin CBP se escindió del gel de agarosa, se purificó mediante un kit comercial y se sometió a una incubación con fosfatasa alcalina de camarón para evitar la ligación de los extremos cohesivos (Fig. 8, panel B, carril 2). En lo que se refiere al inserto ProtC, se diseñaron y mandaron a sintetizar dos oligonucleótidos de 72 pb que contenían la secuencia del epítipo de ProtC (Fig. 7). Dichos oligonucleótidos contenían un sitio de restricción de *Xba*I en su extremo 5' y uno de *Nhe*I en su extremo 3'. Los oligonucleótidos fueron hibridados para producir el inserto ProtC de doble cadena (Fig. 9, carril 3), el cual fue ligado con el cuerpo del vector pB6-TAP (sin CBP), empleando la DNA ligasa T4 y el producto de la ligación se empleó para transformar células competentes de *E. coli*.

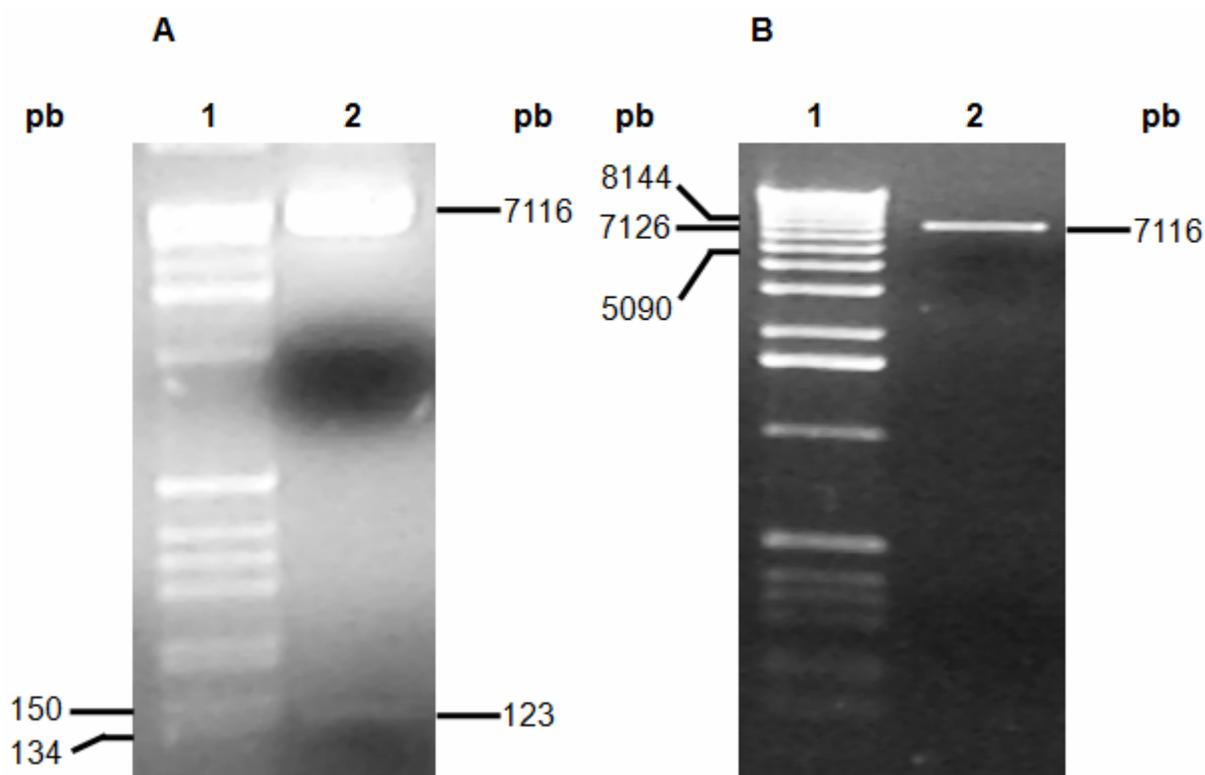


Figura 8. Digestión de pB6-TAP con *Xba*I y *Nhe*I y purificación de pB6-TAP sin ABC23. A) Gel de agarosa al 1.5 %. Carril 1: marcador de peso molecular de 1 kb. Carril 2: digestión de pB6-PTP con *Xba*I y *Nhe*I. B) Gel de agarosa al 0.8 %. Carril 1: marcador de peso molecular de 1 kb. Carril 2: vector de clonación pB6-TAP (s/CBP) purificado a partir de gel de agarosa.

Se obtuvieron 32 ufc de esta transformación, de las que se seleccionaron 20 de manera aleatoria para efectuar minipreparaciones de DNA plasmídico; dicho DNA fue digerido con

*Bam*HI para determinar si se había clonado el inserto de ProtC. Debido a que la secuencia ProtC presenta un sitio de corte interno para esta endonucleasa y que además el cuerpo del vector presenta un segundo sitio de corte se esperaba obtener dos bandas, una de 534 pb y otra de 6645 pb. La Figura 10 muestra el análisis de 10 de las 20 clonas obtenidas; de las 20 ufc analizadas, 19 mostraron el patrón de restricción esperado, confirmándose de esta manera la presencia del inserto de ProtC.

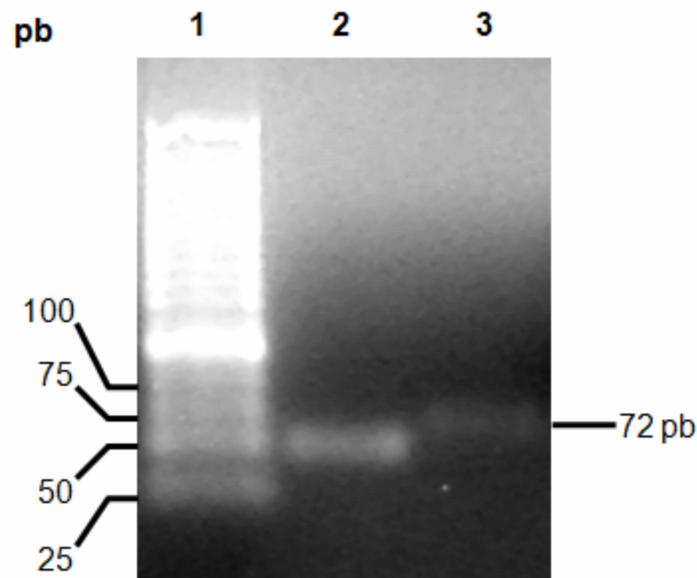


Figura 9. Hibridación de oligonucleótidos ProtC sentido y ProtC antisentido. Carril 1: marcador de peso molecular de 25 pb. Carril 2: oligonucleótido de cadena sencilla ProtC sentido. Carril 3: oligonucleótido de cadena doble ProtC. Gel de agarosa al 2.0 %.

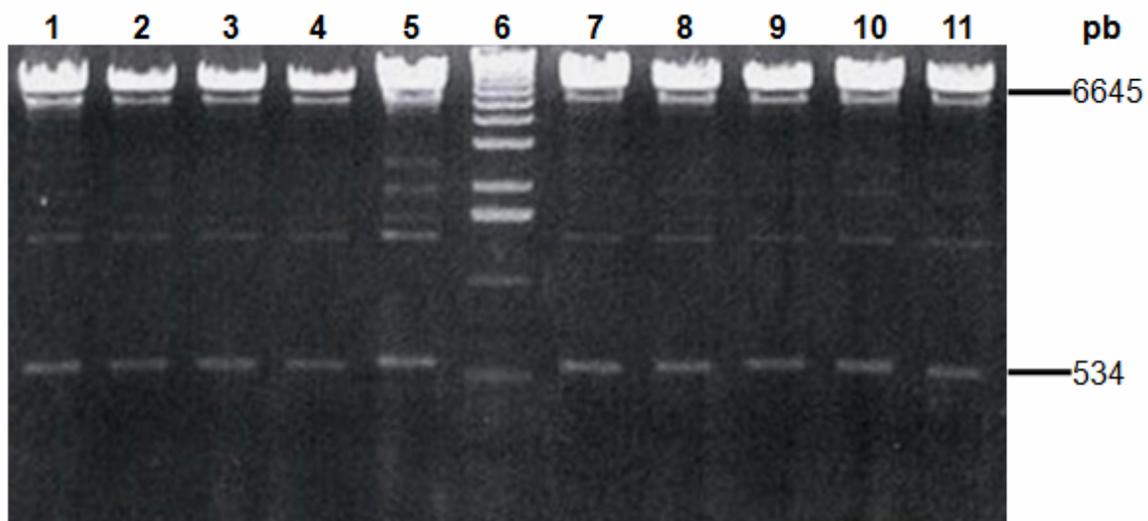


Figura 10. Digestión de clonas putativas pB6-PTP con *Bam*HI. Carriles 1 al 5 y 7 al 11: digestión de las clonas putativas pB6-PTP 1 al 10. Carril 6: marcador de peso molecular de 1 kb. Gel de agarosa al 0.8 %.

Para determinar la orientación del inserto, así como la integridad de los sitios de corte de *XbaI* y *NheI* (debido a la intercompatibilidad entre ambos), se realizaron digestiones con ambas enzimas a 8 de las 19 clonas positivas. Tres de las clonas se linearizaron al digerir con *XbaI* o *NheI* (Fig. 11), lo que indicó que en éstas el inserto se clonó en la orientación correcta. Finalmente las tres clonas fueron enviadas a secuenciar para confirmar el buen estado de las mismas. El análisis de las secuencias indicó que una de las clonas tenía dos copias del inserto ProtC, mientras que las otras dos clonas tenían sólo una copia, como esperábamos, obteniéndose así el vector pB6-PTP. Una de estas dos últimas clonas se seleccionó para prepararse a gran escala (Fig. 12).

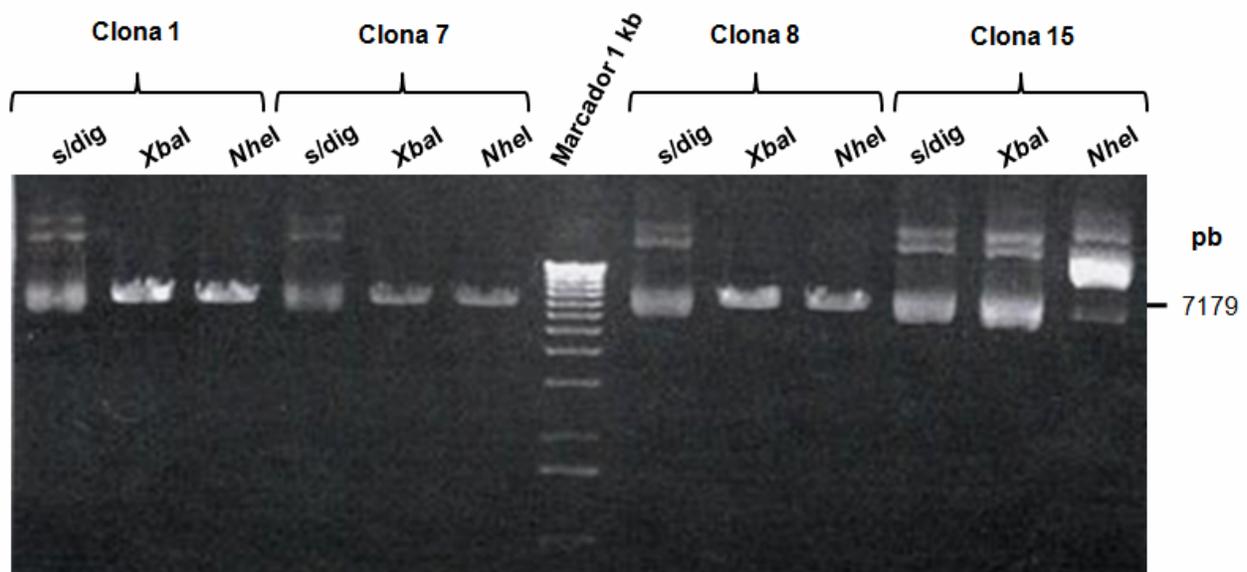


Figura 11. Digestión de las clonas putativas pB6-PTP con *XbaI* y *NheI*. Gel de agarosa al 0.8 %. s/dig: DNA de clonas sin digerir.

4.2 Obtención de pGEM-C82

Dado nuestro interés en aislar complejos transcripcionales de Pol III en *Leishmania*, seleccionamos como proteína blanco para las purificaciones por afinidad en tándem a C82, una subunidad exclusiva de Pol III. Antes de clonar el gen de C82 en los vectores TAP-tag y PTP-tag, se clonó en el vector comercial pGEM-T Easy (3015 pb). Para ello, el gen de C82 de *L. major* fue amplificado por PCR a partir de DNAg. Los oligonucleótidos que se usaron para la amplificación contenían sitios de restricción para las enzimas *AgeI* (oligonucleótido 5') y *XbaI* (oligonucleótido 3'); estos fueron usados para clonar C82 en los vectores PTP-tag y TAP-tag.

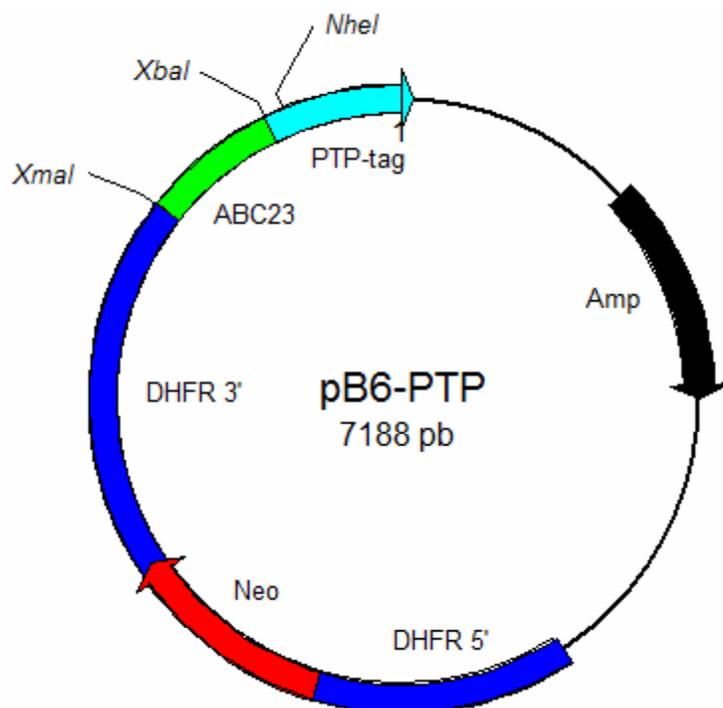


Figura 12. Mapa de pB6-PTP. Amp: marcador de ampicilina. DHFR 5' y 3': secuencias de procesamiento 5' y 3' del gen DHFR de *Leishmania*. Neo: marcador de G418. ABC23: gen de la subunidad ABC23 de Pol II de *Leishmania*. PTP-tag: secuencias de los epítopes de purificación por afinidad en tándem.

El producto de la amplificación se analizó en gel de agarosa y una vez confirmada la amplificación específica de un fragmento del tamaño esperado (1891pb) (Fig. 13, carril 2) el producto de PCR se purificó y ligó en pGEM-T Easy utilizando la DNA ligasa T4. La reacción de ligación se empleó para transformar células competentes y se obtuvieron 10 ufc. Las clonas fueron analizadas en primer lugar por restricción con *EcoRI* (cuyos sitios de corte flanquean a los insertos clonados en pGEM-T Easy) y 3 de las 10 clonas analizadas mostraron la liberación de un inserto que correspondió con el tamaño esperado para C82 (Fig. 14).

Continuando con el análisis de restricción, se seleccionó una de estas clonas y se realizaron tres digestiones adicionales con *SacI*, *AgeI* y *XbaI* para confirmar la presencia del inserto y para determinar la integridad de los sitios de clonación. Con *SacI* se esperaban dos bandas, una de 1438pb y otra de 3468pb (Fig. 15, carril 2); en el caso de *AgeI* (Fig. 15, carril 3) y *XbaI* (Fig. 15, carril 4) únicamente se esperaba que se linearizara la construcción (mediante cortes en el extremo 5' y 3' del gen, respectivamente). Los resultados de estas tres diferentes digestiones fueron los esperados, por lo que la construcción en cuestión se mandó a secuenciar y

se confirmó de esta manera la presencia del gen para la subunidad C82, obteniéndose de esta manera la construcción pGEM-C82 (Fig. 16).

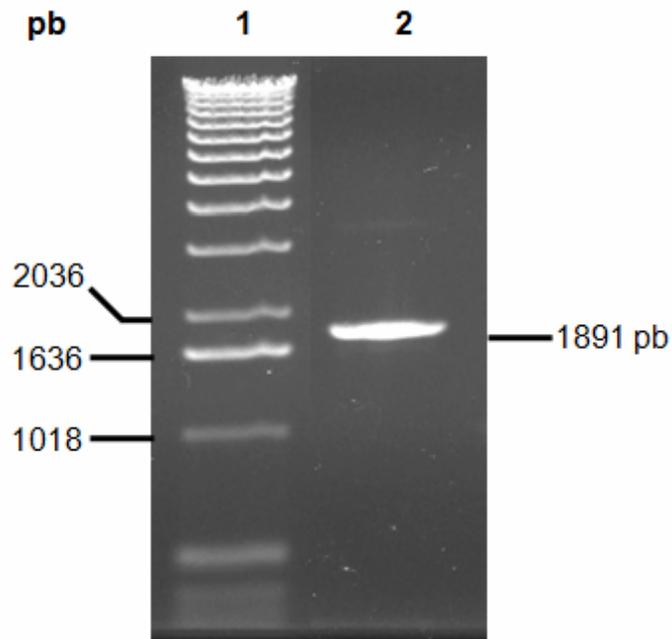


Figura 13. Amplificación por PCR de C82. Carril 1: marcador de peso molecular de 1 kb. Carril 2: producto de PCR de la amplificación de C82 a partir de DNAg de *L. major*. Gel de agarosa al 0.8 %.

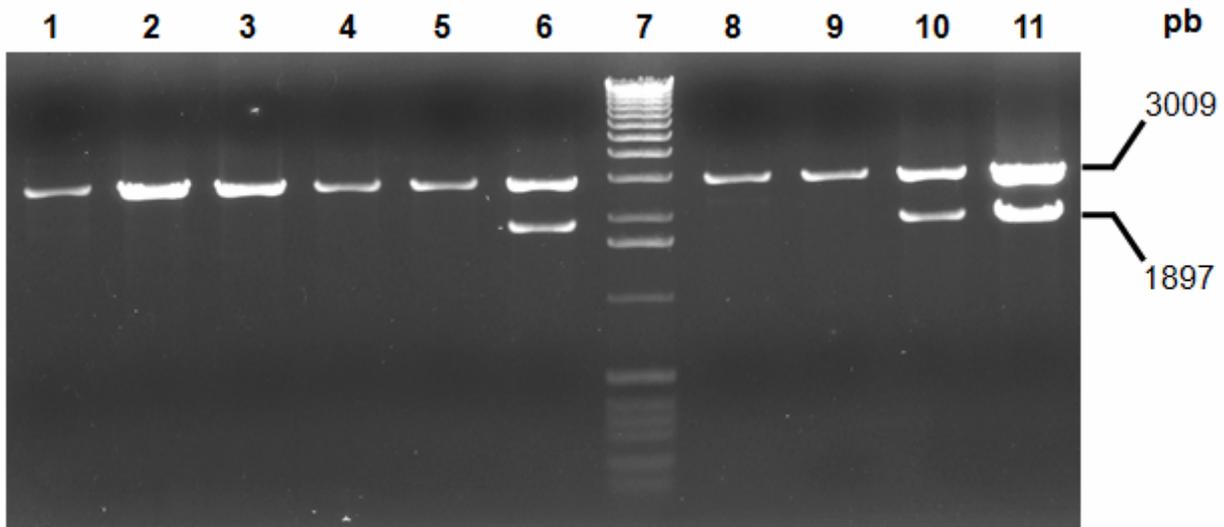


Figura 14. Digestión de las 10 clonas putativas pGEM-C82. Carriles 1 al 6 y 8 al 9: alícuotas de la digestión de las clonas putativas pGEM-C82 con *EcoRI*. Carril 7: marcador de peso molecular de 1 kb. Gel de agarosa al 0.8 %.

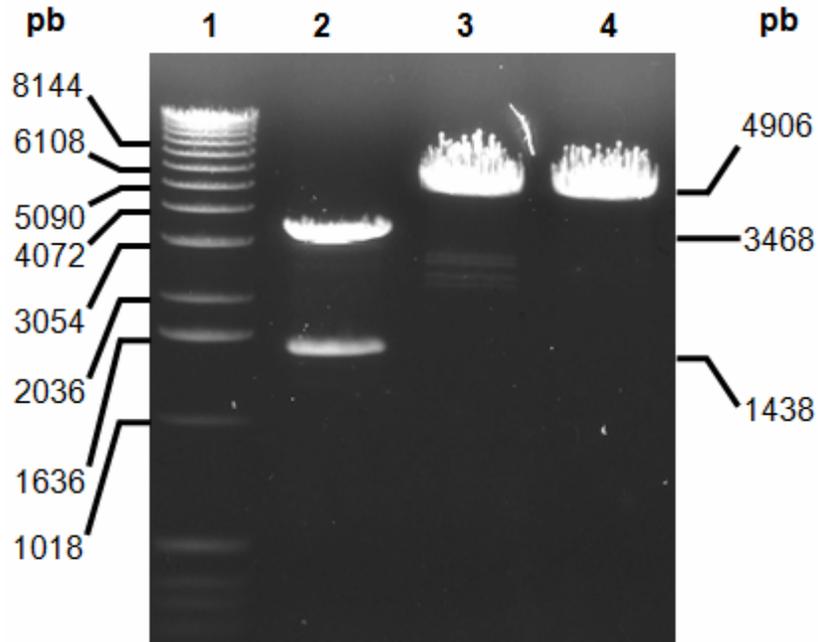


Figura 15. Digestiones de una clona putativa pGEM-C82. Carril 1: marcador de peso molecular de 1 kb. Carril 2: digestión con *SacI*. Carril 3: digestión con *AgeI*. Carril 4: digestión con *XbaI*. Gel de agarosa al 0.8 %.

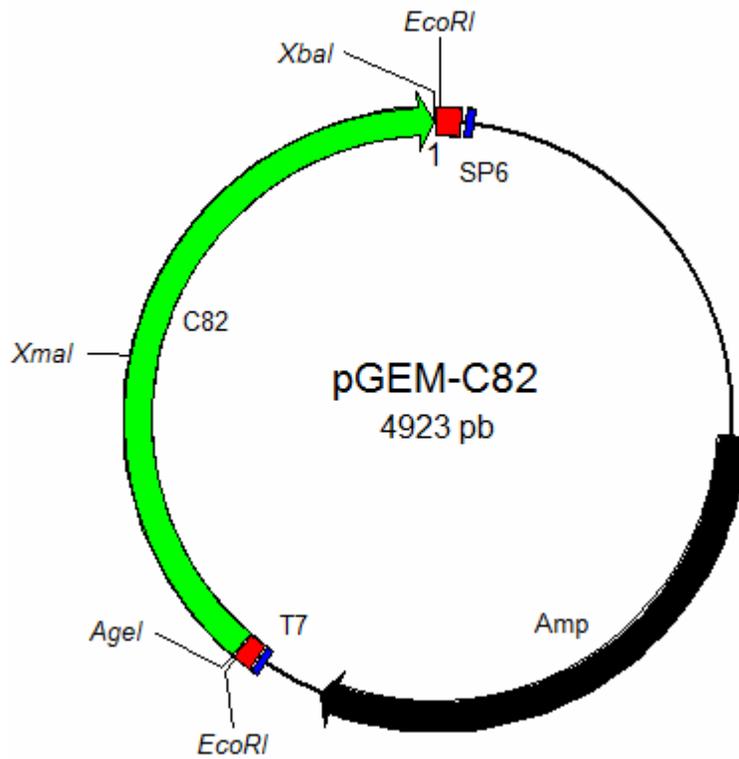


Figura 16. Mapa de pGEM-C82. Amp: marcador de ampicilina. T7: promotor de polimerasa T7. SP6: promotor de polimerasa SP6. C82: gen de la subunidad C82 de Pol III.

4.3 Clonación de C82 en los vectores PTP-tag y TAP-tag

Una vez que se clonó el gen de la subunidad C82 en el vector comercial pGEM-T Easy fue necesario realizar una subclonación de C82 en los vectores para purificación por afinidad en tándem. Así, en los vectores pB6-PTP y pB6-TAP el gen de ABC23 fue reemplazado por el gen de C82, para generar pC82-PTP y pC82-TAP. Estas construcciones fueron empleadas para transfectar promastigotes de *L. major* y *L. mexicana*, para posteriormente obtener clonas celulares seleccionando con G418. Estas clonas se emplearon para purificar a las proteínas recombinantes C82-TAP ó C82-PTP y las proteínas unidas a ellas, mediante dos cromatografías de afinidad.

4.4 Generación de pC82-PTP

La construcción pC82-PTP se obtuvo ligando el gen de C82 en el cuerpo del vector pB6-PTP, sin ABC23. El gen se obtuvo a partir de pGEM-C82, realizando dos digestiones secuenciales con *AgeI* y *XbaI* (que cortan en el extremo 5' y 3' del gen, respectivamente). Esta digestión se corrió en un gel de agarosa para separar el fragmento de C82 del cuerpo del vector pGEM-T Easy, y la banda correspondiente a C82 (1891 pb) se escindió del gel de agarosa y se purificó mediante un kit comercial (Fig. 17, carril 3).

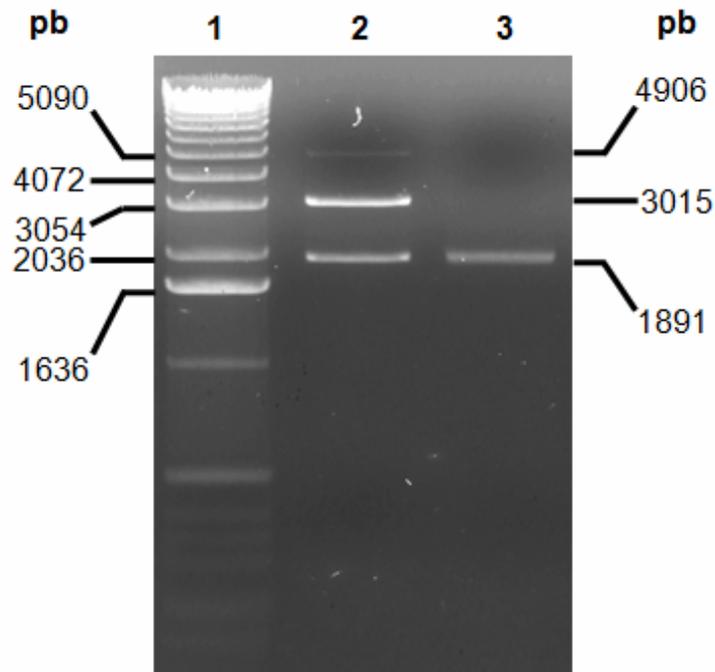


Figura 17. Purificación del inserto C82. Carril 1: marcador de peso molecular de 1 kb. Carril 2: digestión de pGEM-C82 con *AgeI* y *XbaI*. Carril 3: inserto C82 purificado. Gel de agarosa al 0.8 %.

Por otro lado, el vector pB6-PTP fue digerido con *XmaI* y *XbaI* para remover la secuencia de la subunidad ABC23. La digestión se corrió en un gel de agarosa y el cuerpo de vector pB6-PTP (6719 pb) se purificó empleando un kit comercial (Fig. 18, carril 3). Cabe mencionar que dentro del gen de C82 existe un sitio de corte de *XmaI* (Fig. 17), y por este motivo no pudo usarse este sitio para las clonaciones, utilizándose *AgeI* en substitución; existe compatibilidad entre los extremos cohesivos generados con *XmaI* y *AgeI*, aunque la secuencia resultante no es reconocida por ninguna de las dos enzimas; de esta manera, el extremo cohesivo *AgeI*-5' de C82 se ligó con el extremo cohesivo *XmaI*-5' de pB6-PTP (sin ABC23). Inserto y vector se ligaron y el producto de la ligación se empleó para transformar células competentes.

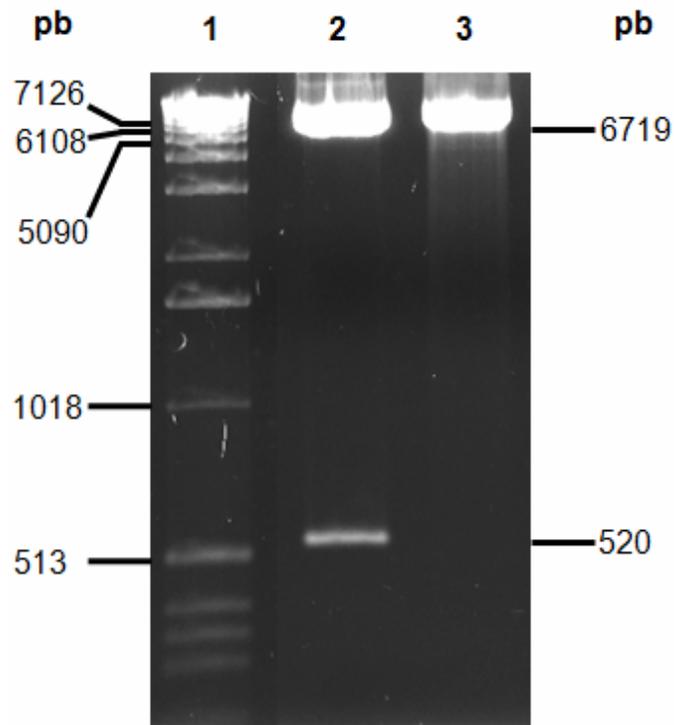


Figura 18. Purificación del cuerpo de vector pB6-PTP (sin ABC23). Carril 1: marcador de peso molecular de 1 kb. Carril 2: digestión con *XbaI* y *XmaI*. Carril 3: cuerpo de vector pB6-PTP (sin ABC23) purificado a partir del gel de agarosa. Gel de agarosa al 0.8 %.

De esta transformación se obtuvieron 15 ufc; se seleccionaron al azar dos de éstas y se digirieron de manera secuencial con *XbaI* y *XmaI*. De esta digestión se esperaban dos bandas (7415pb y 1144pb), pues cada enzima debería cortar una vez en el vector (*XmaI* corta dentro del gen de C82 y *XbaI* fue el sitio de clonación 3', que se debería conservar en el vector resultante). Al digerir inicialmente con *XbaI*, una de las clonas se descartó (Fig. 19, carril 2), ya que presentó el mismo patrón de restricción que el obtenido con un control que contenía únicamente al cuerpo

del vector pB6-PTP (sin ABC23) (Fig. 19, carril 4), por lo que se concluyó que no contenía el inserto de C82.

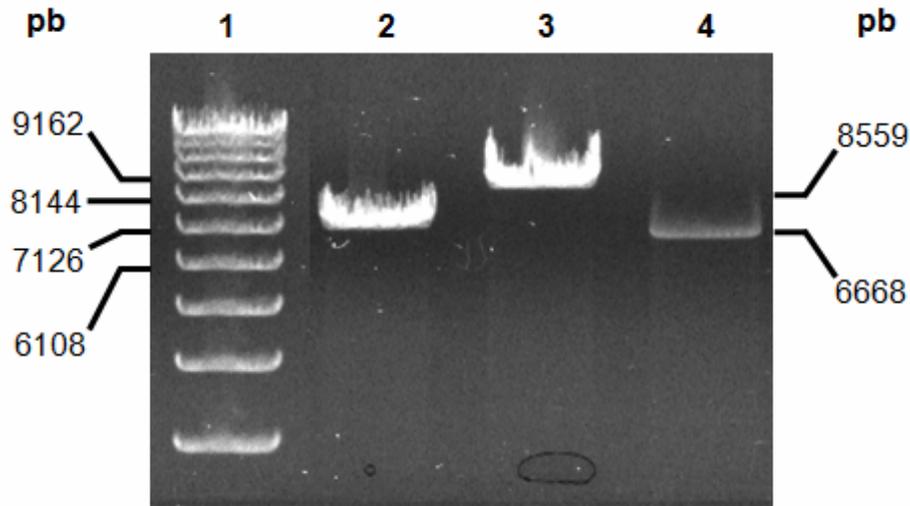


Figura 19. Digestión de dos clonas putativas pC82-PTP. Carril 1: marcador de peso molecular de 1 kb. Carriles 2 y 3: digestiones de las dos clonas con *Xba*I. Carril 4: alícuota del cuerpo del vector pB6-PTP (sin ABC23). Gel de agarosa al 0.8 %.

Sin embargo, la segunda clona sí mostró la presencia de un vector linearizado del tamaño esperado (8559 pb) (Fig. 19, carril 3). En adición, esta segunda clona mostró las dos bandas esperadas (7415pb y 1144pb) al realizarse la segunda digestión con *Xma*I (Fig. 20, carril 2). Esta construcción se mandó a secuenciar, resultando positiva para la secuencia de la subunidad C82 por lo que se realizó una midipreparación para obtener material suficiente de pC82-PTP y llevar a cabo la transfección de promastigotes de *L. major* y *L. mexicana* (Fig. 21).

4.5 Generación de pC82-TAP

Para construir pC82-TAP, se empleó el mismo inserto de C82 que fue usado para generar pC82-PTP. El cuerpo de vector pB6-TAP (sin ABC23) se obtuvo digiriendo con *Xba*I y *Xma*I. La digestión se corrió en un gel de agarosa (Fig. 22, panel A, carril 2) y la banda correspondiente al cuerpo del vector se escindió y purificó del gel (Fig. 22, panel B, carril 2). El inserto de C82 y el vector se ligaron empleando la DNA ligasa T4, y con la mezcla de ligación se transformaron células competentes de *E. coli*; de esta transformación se obtuvieron 10 ufc.

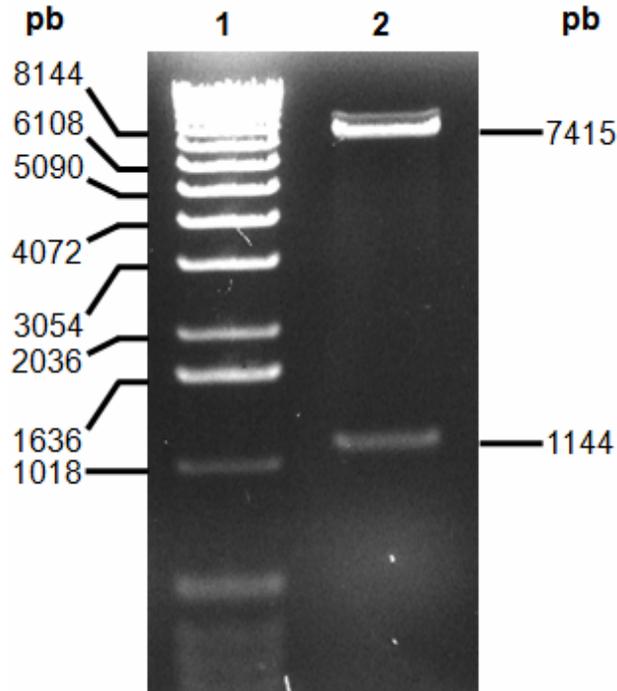


Figura 20. Digestión de una clona putativa pC82-PTP con *XbaI* y *XmaI*. Carril 1: marcador de peso molecular de 1 kb. Carril 2: alícuota de la digestión con *XbaI* y *XmaI*. Gel de agarosa al 0.8 %.

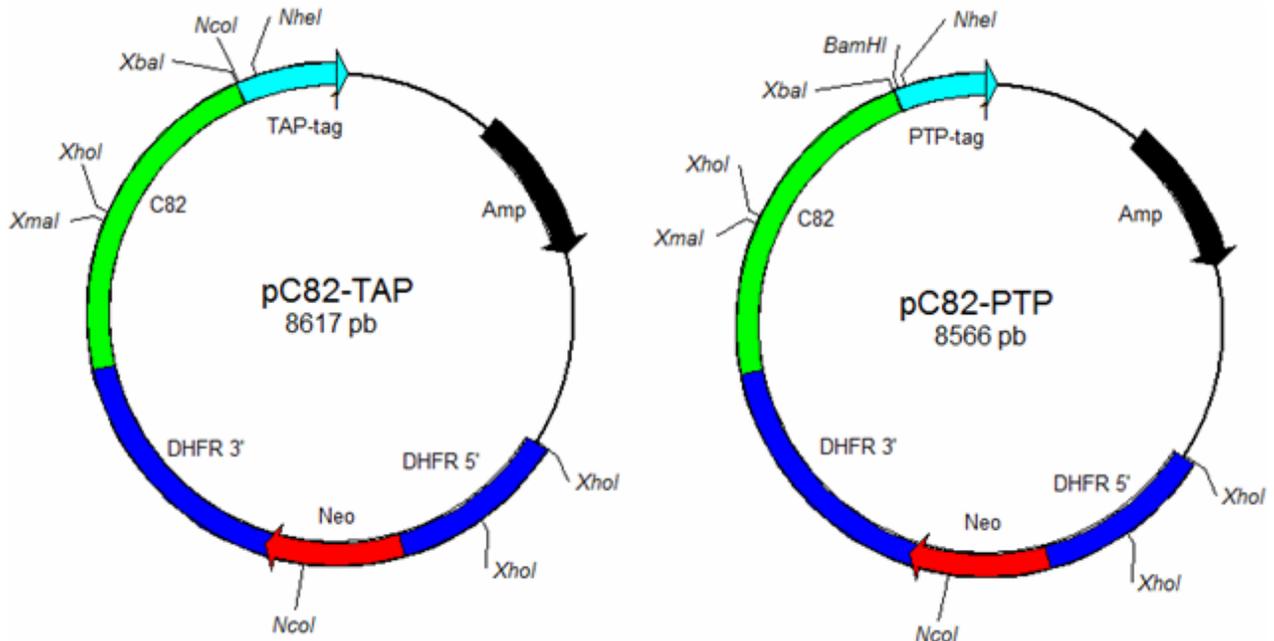


Figura 21. Mapas de pC82-TAP y pC82-PTP. Amp: marcador de ampicilina. DHFR 5' y 3': secuencias de procesamiento 5' y 3' del gen DHFR de *Leishmania*. Neo: marcador de G418. C82: gen de la subunidad C82 de Pol III de *Leishmania*. Se indica la posición del TAP-tag (pC82-TAP) y del PTP-tag (pC82-PTP).

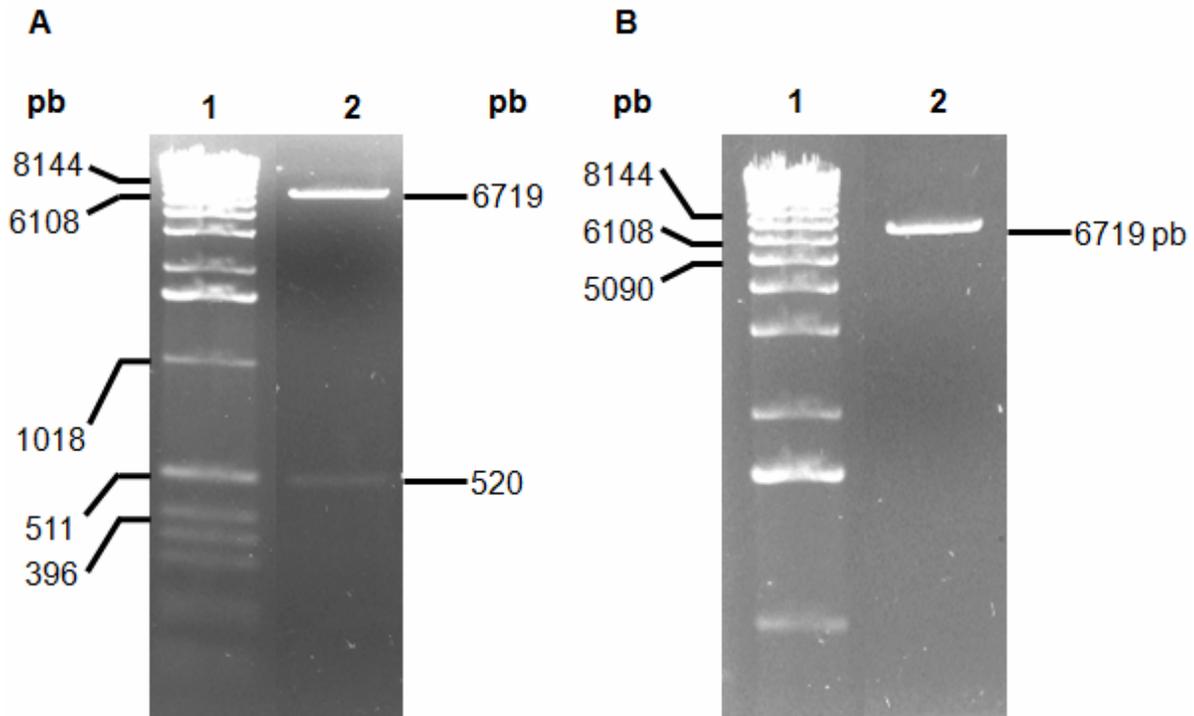


Figura 22. Digestión de pB6-TAP (Panel A) y purificación del cuerpo del vector pB6-TAP sin ABC23 (Panel B). A) Carril 1: marcador de peso molecular de 1 kb. Carril 2: alícuota de la digestión de pB6-TAP con *Xba*I y *Xma*I. B). Carril 1: marcador de peso molecular de 1 kb. Carril 2: cuerpo de vector pB6-TAP (sin ABC23) purificado. Ambas electroforesis se realizaron en geles de agarosa al 0.8 %.

Para iniciar con el análisis de estas clonas putativas pC82-TAP, se realizó un PCR de colonia empleando dos oligonucleótidos que reconocen secuencias internas de C82 y sirven para la amplificación de una región de 815 pb. Como control positivo se usó la construcción pC82-PTP. Los resultados se muestran en la Figura 23, donde se puede observar que únicamente una de las clonas putativas pC82-TAP presentó una banda del tamaño esperado (Fig. 23, carril 6), que también se observa en el control positivo (Fig. 23, carril 2).

La única clona putativa pC82-TAP se sometió a una serie de análisis de restricción con diferentes enzimas. Primero fue digerida con *Xba*I y *Xma*I (Fig. 24, carril 5) esperando dos bandas (7415pb y 1144 pb), *Xma*I corta dentro del gen de C82 y *Xba*I fue el sitio de clonación 3'. En segundo lugar fue digerida con *Xho*I (Fig. 24, carril 7), esperándose bandas de 533, 3870 y 4518 pb. Finalmente la clona también fue digerida con *Nco*I (Fig. 24, carril 9), que debería producir fragmentos de restricción de 3571 y 5046 pb. El análisis de las digestiones en un gel de agarosa reveló las bandas esperadas en todos los casos. Finalmente, para concluir con el análisis

de esta clona se llevó a cabo su secuenciación y los resultados arrojados confirmaron los resultados de restricción. Entonces, se realizó una midipreparación de la construcción pC82-TAP y con el material obtenido se transfectaron promastigotes de *L. major* y *L. mexicana*.

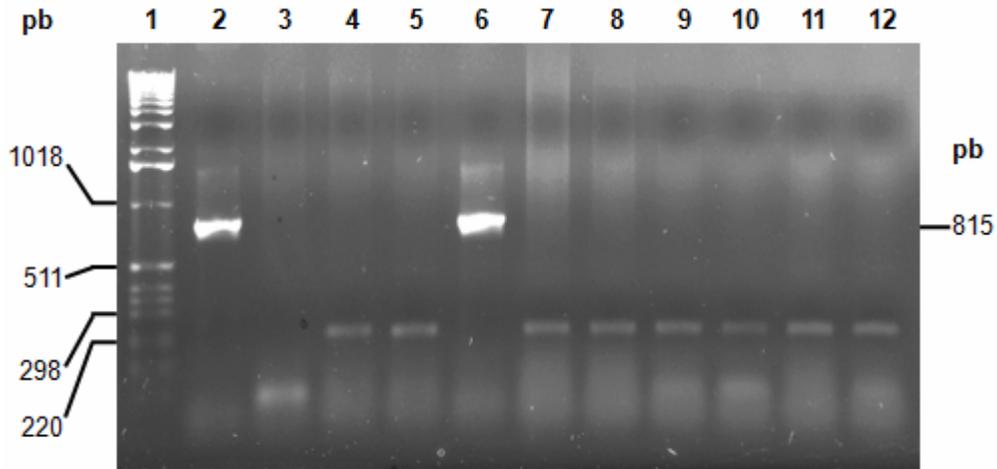


Figura 23. Análisis por PCR de colonia de las clonas putativas pC82-TAP. Carril 1: marcador de peso molecular de 1 kb. Carril 2: producto de PCR de la amplificación a partir de pC82-PTP. Carriles 3 a12: productos de PCR de las amplificaciones a partir de las clonas putativas pC82-TAP. Gel de agarosa al 0.8 %.

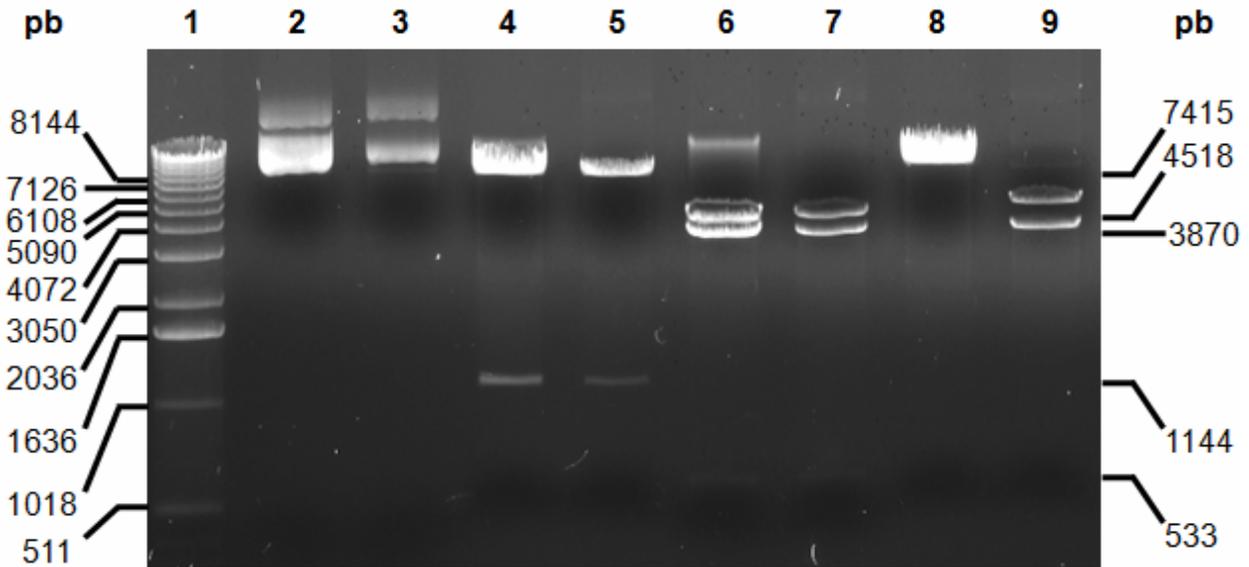


Figura 24. Análisis de restricción de la clona putativa pC82-TAP. Carril 5: digestión con *Xba*I y *Xma*I. Carril 7: digestión con *Xho*I. Carril 9: digestión con *Nco*I. Como control de digestión se digirió pC82-PTP con *Xba*I y *Xma*I (carril 4), con *Xho*I (carril 6) y con *Nco*I (carril 8). Los carriles 2 y 3 muestran pC82-PTP y pC82-TAP sin digerir, respectivamente. Gel de agarosa al 0.8 %.

4.6 Transfección y clonación de *L. major* y *L. mexicana* con pC82-PTP y pC82-TAP

pC82-PTP y pC82-TAP son construcciones diseñadas para expresar de manera episomal en células de *Leishmania* una proteína recombinante que consiste en la subunidad C82 de Pol III fusionada con epítopes de extracción para purificación por afinidad en tándem. Se espera que al purificar las proteínas recombinantes se aísle también a las proteínas nucleares que interactúan *in vivo* con la subunidad C82.

Promastigotes de *L. major* y *L. mexicana* fueron transfectados por electroporación, independientemente, con pC82-PTP y pC82-TAP. Las células que incorporaron el plásmido fueron seleccionadas con la droga G418. Una vez que se estableció una población estable, que se dividía de manera activa y que alcanzaba densidades celulares iguales o mayores a 40×10^6 cels./ml, se prosiguió con la obtención de clones celulares por medio del método de plaqueo en medio semisólido. Cuando aparecieron colonias en las cajas de cultivo se seleccionaron al azar ocho y se sembraron en medio líquido en cajas multipozo, hasta que alcanzaron un estado de división activa y una óptima densidad celular ($\geq 40 \times 10^6$ cels./ml).

Con el objetivo de determinar si las clones celulares seleccionadas expresaban la proteína recombinante (C82-PTP ó C82-TAP), se realizó un análisis tipo Western Blot empleando el anticuerpo PAP, el cual reconoce específicamente al epítipo de ProtA, presente tanto en el PTP-tag como en el TAP-tag. Se analizaron 5 clones de *L. major* pC82-PTP, y seis clones para *L. mexicana* pC82-PTP, *L. major* pC82-TAP y *L. mexicana* pC82-TAP. Además, como control se analizaron células silvestres. Como puede apreciarse en la Figura 25, en todas las clones analizadas se detectó la presencia de una proteína de ~80 kDa, que corresponde a C82-PTP (paneles de la izquierda) o a pC82-TAP (paneles de la derecha). En todas las clones analizadas también se detectó la presencia de otra proteína de ~40 kDa. Como se esperaba, en ningún caso se obtuvo señal con células silvestres (Fig. 25, carriles “S”).

4.7 Purificación de C82-PTP en *L. major* y *L. mexicana*

Con el fin de identificar a las subunidades de Pol III o a los factores de transcripción que se asocian a la subunidad C82, se llevó a cabo la purificación por afinidad en tándem de las proteínas recombinantes C82-PTP a partir de cultivos de 3 litros de la clona 4 de *L. major*

(*Lmaj*/C82-PTP) y la clona 1 de *L. mexicana* (*Lmex*/C82-PTP). Brevemente, el extracto proteico crudo obtenido de los cultivos lisados con Tritón X-100 se transfirió a una columna cromatográfica que contenía una matriz de Sefarosa-IgG. Se incubó por tres horas a 4°C y se digirió empleando la proteasa TEV por 30°C durante 2 h y media. El eluido obtenido de la primera columna se transfirió a otra columna cromatográfica que contenía la matriz HPC4. Se incubó por doce horas a 4°C y finalmente se eluyó con un amortiguador que contenía EGTA.

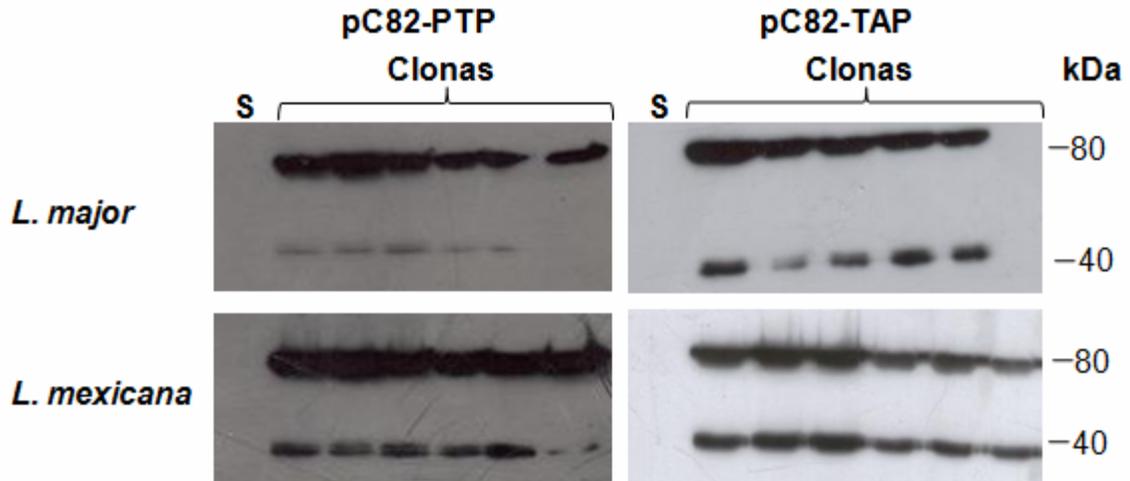


Figura 25. Análisis tipo Western Blot de clonas de *L. major* y *L. mexicana* transfectadas con pC82-PTP y pC82-TAP. Paneles superiores: *L. major*; paneles inferiores: *L. mexicana*. Los paneles de la izquierda corresponden a pC82-TAP, mientras que los de la derecha corresponden a pC82-PTP. S: control de células silvestres. Las muestras se fraccionaron en un gel de poliacrilamida al 10 %, se transfirieron a una membrana de PVDF y se trataron con el anticuerpo PAP.

Para llevar un monitoreo de la eficiencia de la purificación, es decir, la retención de C82-PTP en las columnas cromatográficas y su posterior elución, se tomaron alícuotas del material de partida, del material no unido a la columna de Sefarosa-IgG, del material eluido con la proteasa TEV, del material no unido a la columna HPC4 y de los eluidos finales de esta segunda columna. Las mencionadas alícuotas se analizaron mediante SDS-PAGE y se realizó una tinción con plata para visualizar las proteínas. En la Figura 26 se muestran los resultados de la purificación de *Lmaj*/C82-PTP; se observan numerosas bandas a lo largo de los carriles que contienen el material de partida (carril 2) y el material no unido a la columna de Sefarosa-IgG (carril 3). En el caso de la elución con la proteasa TEV (carril 4) se observa el incremento de ciertas proteínas, como una de ~35 kDa; sin embargo, también se ve la disminución de otras proteínas, como algunas de más

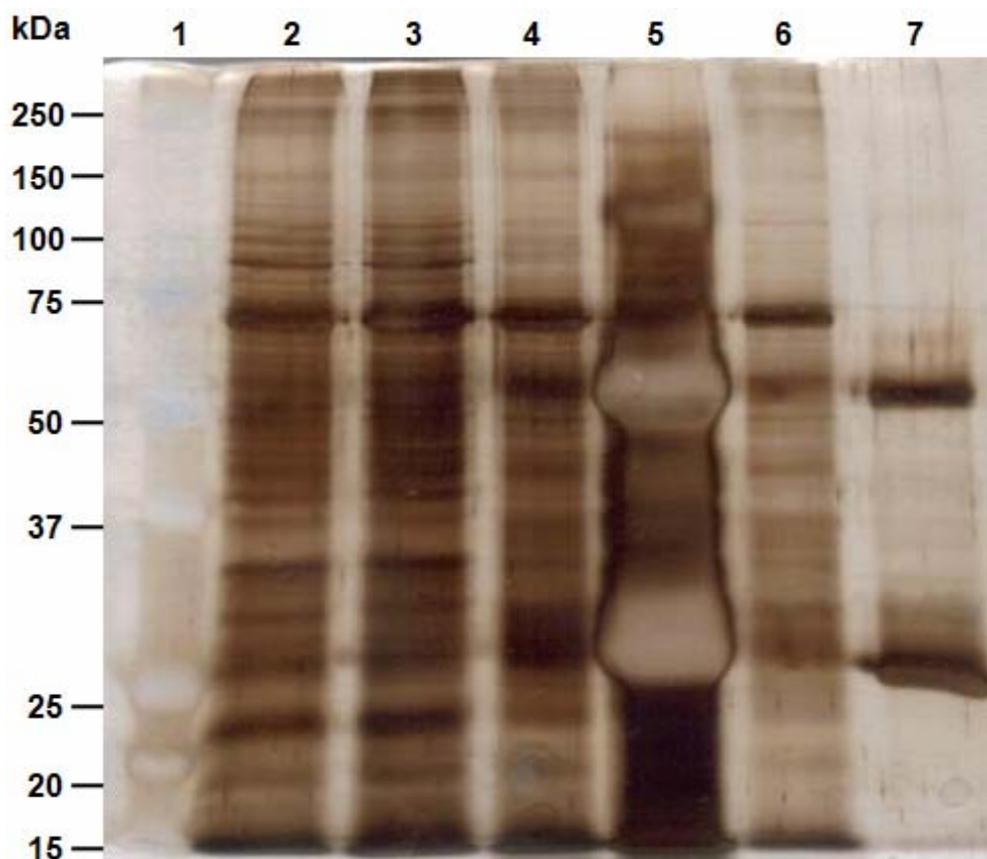


Figura 26. SDS-PAGE de las alícuotas tomadas a lo largo de la purificación de *Lmaj/C82-PTP*. Carril 1: marcador de peso molecular. Carril 2: material de partida. Carril 3: material no unido a la columna de IgG. Carril 4: elución con proteasa TEV. Carril 5: perlas de Sefarosa-IgG (de la primera cromatografía). Carril 6: material no unido a HPC4. Carril 7: perlas de HPC4 (de la segunda cromatografía). Gel de poliacrilamida al 10 %, teñido con plata.

de 74 kDa. La alícuota de material no unido a HPC4 (carril 6) presenta un menor número de bandas, lo que es un reflejo de que la mayor parte de las proteínas se van perdiendo paulatinamente a lo largo de los lavados y las diferentes eluciones. También se cargó una alícuota de las matrices de afinidad, con el objetivo de determinar si se podía observar alguna proteína que permaneciera asociada a la matriz y que no se hubiera eluido mediante los procedimientos descritos previamente. Las dos bandas de mayor intensidad que se observan en ambos casos corresponden con la cadena pesada (~50 kDa) y la cadena ligera (~25 kDa) que conforman a los anticuerpos de las matrices de afinidad (carriles 5 y 7). En la alícuota de la primer columna se observa además un barrido y algunas bandas relativamente tenues (como una de ~100 kDa) (carril 5); en la alícuota de la segunda columna prácticamente sólo se observan las cadenas pesada y ligera (carril 7). Resultados similares se obtuvieron al analizar las diferentes

muestras tomadas a lo largo de la purificación de *Lmex*/C82-PTP (datos no mostrados).

Con el objeto de analizar la presencia de la proteína recombinante C82 en los distintos pasos de la purificación por afinidad en tándem, se llevó a cabo un Western Blot con las muestras que se tomaron a lo largo del proceso de purificación, usando un anticuerpo específico para C82. Los resultados se presentan en la Figura 27. A manera de control se analizó de forma paralela un extracto proteico total de células de *L. major* silvestres.

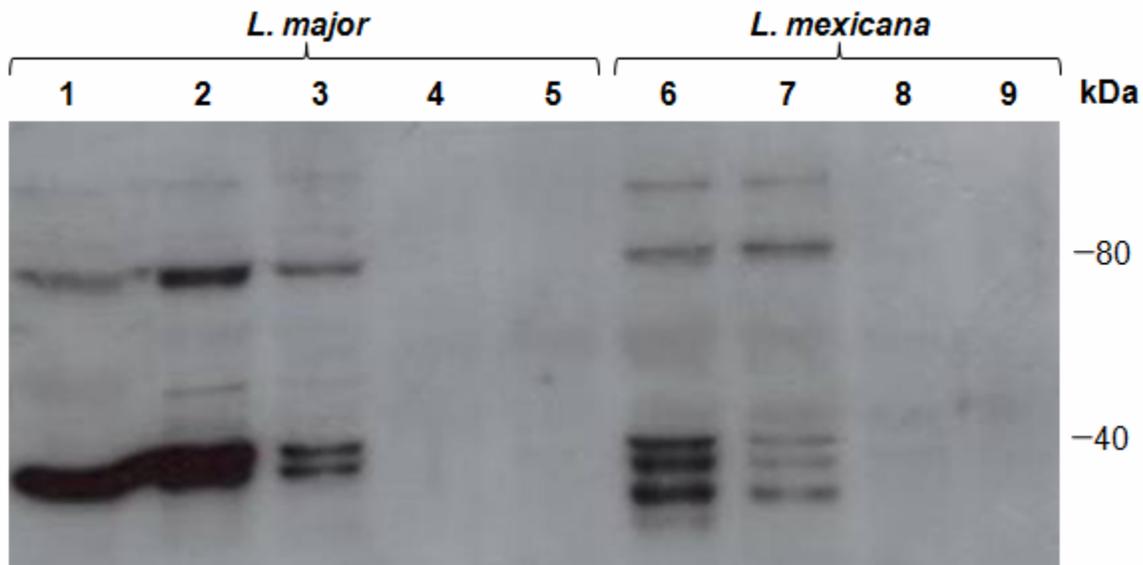


Figura 27. Análisis tipo Western Blot de las muestras tomadas a lo largo de la purificación de *Lmaj*/C82-PTP y *Lmex*/C82-PTP. Carril 1: control de extracto proteico total de *L. major* tipo silvestre. Carriles 2 y 6: material de partida. Carriles 3 y 7: material no unido a IgG. Carriles 4 y 8: elución con proteasa TEV. Carriles 5 y 9: material no unido a HPC4. Los carriles 2 a 5 corresponden a la purificación de *Lmaj*/C82-PTP. Los carriles 6 a 9 corresponden a la purificación de *Lmex*/C82-PTP. Gel de poliacrilamida al 10 %, transferido a membrana de PVDF. Se usó el anticuerpo contra C82.

En lo que se refiere a *Lmaj*/C82-PTP se observan tres bandas en la muestra de material de partida (carril 2); la superior (~80 kDa) correspondería a C82-PTP, mientras que las dos restantes corresponderían a C82' (ver Discusión) y a algún producto de degradación de C82. La muestra de material no unido a IgG (carril 3) presenta las mismas tres bandas, únicamente que se aprecian de menor intensidad, lo que es un indicativo de que una parte de la proteína recombinante se unió a la matriz de Sefarosa-IgG, como se esperaba. En las otras dos muestras, eluido con la proteasa TEV (carril 4) y material no unido a HPC4 (carril 5) no se detectó ninguna señal, debido quizá a la baja cantidad de proteína recombinante que contenían estas muestras. En lo referente a *Lmex*/C82-PTP, en la muestra de material de partida se observan tres bandas

intensas de ~40 kDa y dos bandas adicionales de mayor tamaño (≥ 80 kDa) (carril 6). La banda de ~80 kDa corresponde con C82-PTP y las tres bandas de menor tamaño podrían ser productos de degradación de dicha proteína. Haciendo la comparación de la intensidad de la señal obtenida con la muestra de material de partida y la de proteína no unida a IgG (carril 7) se puede observar una disminución en la señal, que como el caso de *L. major*, es una evidencia de que se presenta retención de la proteína recombinante en la columna cromatográfica. Como ocurrió en *L. major*, con las últimas muestras de *L. mexicana* (carriles 8 y 9) no se observó ninguna señal.

Una muestra de los eluidos finales de *Lmaj/C82-PTP*, que se obtienen de la segunda columna de afinidad (con HPC4), y donde en teoría se recupera el complejo proteico, se analizó mediante electroforesis en un gel de poliacrilamida (Fig. 28).

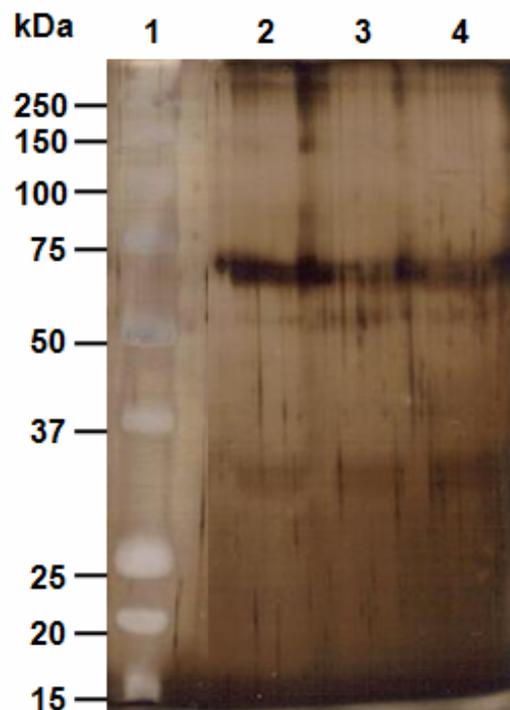


Figura 28. Eluidos finales de la purificación PTP-tag de *Lmaj/C82*. Las muestras corresponden a los eluidos 1, 2 y 3 de la columna de HPC4 (carriles 2-4). Carril 1: marcador de peso molecular. Gel de poliacrilamida al 10 % teñido con plata.

Como se observa en los carriles 2-4, que corresponden a los eluidos 1-3, se obtuvieron ~7 diferentes bandas a lo largo de los carriles. En estos eluidos se detectan dos bandas intensas, de

~69 y ~65 kDa, y alguna de ellas podría corresponder a la proteína *Lmaj/C82-PTP*. En lo referente a las eluciones finales de la purificación de *Lmex/C82-PTP*, se obtuvo un patrón de bandeado similar al obtenido con *L. major* (datos no mostrados).

A pesar de que el análisis de espectrometría de masas requiere cantidades pequeñas de proteínas para llevar a cabo su identificación, a mayor cantidad de proteínas se incrementa la posibilidad de identificación de las mismas. Por ello se decidió concentrar todos los eluidos de la purificación de *Lmaj/C82-PTP* y todos los eluidos *Lmex/C82-PTP*. Una alícuota de las eluciones concentradas fue analizada en un gel de poliacrilamida (Fig. 29).

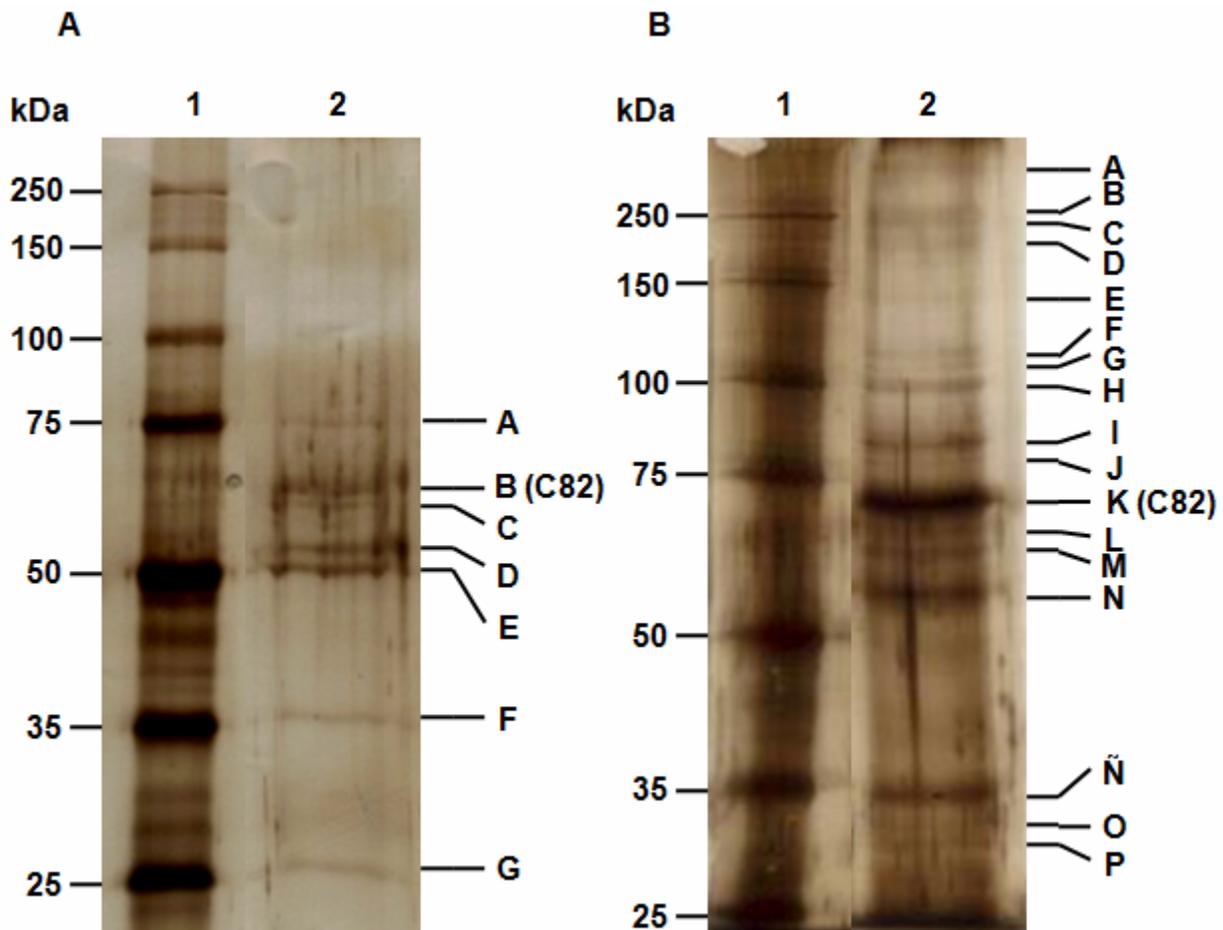


Figura 29. Alícuotas de las muestras finales concentradas, obtenidas de las purificaciones de C82-PTP en *L. major* (panel A) y en *L. mexicana* (Panel B). Carriles 1: marcador de peso molecular. Los eluidos finales fueron concentrados empleando las columnas Microcon® YM-10 (Millipore). Gels de poliacrilamida al 10 % teñidos con plata. En los gels de poliacrilamida que se presentan fueron corridas otras muestras entre el carril del marcador y el carril de las muestras concentradas; dichas muestras fueron eliminadas de la figura, con el objeto de presentar en carriles contiguos las dos muestras de interés. En ambos paneles se indica la banda que podría corresponder con C82-PTP.

Tanto en la muestra de *L. major* (panel A) como en la de *L. mexicana* (panel B) se pudo apreciar una mayor intensidad de las bandas correspondientes a las proteínas purificadas (comparando con las muestras antes de concentrar). Se obtuvo el peso molecular aproximado de las bandas observadas y se determinó a qué subunidades de Pol III o TFIIB podrían corresponder (ver Discusión). En ambas muestras se encontró una proteína cuyo tamaño es similar al esperado para C82-PTP (Fig. 29). Las muestras concentradas serán enviadas a analizar por espectrometría de masas para identificar cada una de las proteínas purificadas.

5. Discusión

5.1 Purificación por afinidad en tándem como técnica para aislar complejos proteicos

En el presente trabajo se usó la técnica de purificación por afinidad en tándem para aislar proteínas asociadas a la subunidad C82 de la RNA polimerasa III de *L. major* y *L. mexicana*. Esta técnica es una de las más empleadas para purificar complejos proteicos de todo tipo; consiste en la fusión de un epítipo de ProtA y CBP, separados por un sitio de reconocimiento para la proteasa TEV, al extremo N-terminal o C-terminal de una proteína blanco que se sabe o se sospecha forma parte del complejo proteico que se quiere purificar. Estos epítopes sirven para la purificación de la proteína blanco, empleando columnas cromatográficas de afinidad. En primer lugar, un lisado celular se incuba con una matriz de afinidad de IgG que reconoce y une al epítipo de ProtA; posteriormente se realiza una incubación con la proteasa TEV para que la proteína blanco se liberé de la matriz de afinidad. El siguiente paso consiste en la incubación del eluido de la primer columna en una segunda columna cromatográfica que contiene calmodulina inmovilizada, que en presencia de calcio, permite la unión de CBP, y por ende de la proteína blanco a la columna; finalmente la elución de la proteína blanco se lleva a cabo empleando un quelante de iones que captura al calcio y provoca la elución de la proteína de la segunda columna (Rigaut *et al.*, 1999).

Esta técnica de purificación presenta ventajas en comparación con otros procedimientos:

- a. El volumen de cultivo empleando es ~25 veces menor (Puig *et al.*, 2001 y Chamberlain *et al.*, 1998).
- b. Se pueden identificar complejos macromoleculares con niveles bajos de falsos positivos o falsos negativos (Puig *et al.*, 2001).
- c. Debido a que las condiciones de la purificación son poco astringentes (pH cercano a la neutralidad, posibilidad de llevar a cabo el procedimiento de extracción a 4°C, relativamente corto tiempo de duración, etc.) se puede purificar complejos proteicos funcionales para una diversidad de análisis *in vitro* (Puig *et al.*, 2001).
- d. Se emplea la proteasa TEV, lo que tiene las siguientes ventajas: alto nivel de especificidad. insensibilidad a la mayoría de los inhibidores de proteasas empleados rutinariamente en la

purificación de proteínas, fácil separación de la proteasa y del tag del resto de la muestra de interés (Parks *et al.*, 1994).

- e. El procedimiento puede realizarse en su totalidad en un tiempo relativamente corto y a un costo relativamente bajo (Rigaut *et al.*, 1999).
- f. La técnica es altamente versátil debido al arreglo modular que tienen los componentes del péptido de extracción (CBP, ProtA, ProtC y sitio de corte de la proteasa TEV). Esto permite fusionar CBP a una proteína blanco, y ProtA (con el sitio de corte de la proteasa TEV) a otra proteína blanco y realizar purificación de proteínas que forman parte de complejos proteicos independientes (método subtractivo). En contraste, si se fusionan dos mitades funcionales del tag en dos proteínas diferentes del mismo complejo (ProtA y el sitio para la proteasa TEV están fusionados a una proteína, y CBP esta fusionado a otra proteína) se puede realizar la purificación de complejos proteicos que presenten las dos proteínas dadas, aunque solamente una pequeña fracción de la proteína esté asociada formando el complejo (“Split tag”) (Puig *et al.*, 2001).
- g. Permite el análisis funcional de complejos mutantes (Fortes *et al.*, 1999); así como el estudio de modificaciones post-traduccionales (Lee & Lee, 2004), que pueden cambiar la conformación estructural de una proteína modificando sus patrones de interacción (Abu-Farha *et al.*, 2008).
- h. La técnica no se limita a la identificación de interacciones proteína-proteína, sino también se pueden identificar ligandos (Rigaut *et al.*, 1999).

5.2 Obtención de la construcción pB6-PTP

A pesar de las ventajas de la técnica de purificación por afinidad en tándem, detalladas anteriormente, la técnica presenta también algunas desventajas:

- a. Si la proteína blanco con los epítopes de extracción no se expresa a un nivel similar que el observado con la proteína nativa, se corre el riesgo de que la proteína blanco interactúe de manera inespecífica con componentes del complejo proteico o con proteínas celulares que no tienen relación con la proteína blanco (Swaffield *et al.*, 1996).
- b. El tag puede interferir con el correcto plegamiento de la proteína o puede alterar la asociación con otras proteínas del complejo proteico (Puig *et al.*, 2001).

- c. La técnica no es aplicable si la proteína blanco contienen un sitio de corte para la proteasa TEV; sin embargo, esto es no frecuente (Dougherty *et al.*, 1989).
- d. Puede ser que los epítopes de extracción no estén lo suficientemente expuestos para que se pueda llevar a cabo la unión de la proteína a las columnas de extracción (Puig *et al.*, 2001).
- e. La calmodulina endógena puede unirse al CBP del TAP-tag de la proteína blanco, lo que puede impedir la unión de esta última a la columna cromatográfica que contiene las perlas con calmodulina, perdiéndose de esta manera la muestra en las subsecuentes eluciones. Sin embargo, esto puede ser prevenido agregando EGTA durante la primer cromatografía de afinidad con IgG (Puig *et al.*, 2001).

La ineficiencia que suele presentarse durante la columna de afinidad de calmodulina, usando el TAP-tag, llevó al grupo de A. Günzl a desarrollar el PTP-tag (Shimanski *et al.*, 2005); en éste, un epítipo de la Proteína C humana (ProtC) reemplaza al dominio CBP. El epítipo de ProtC se une de manera específica al anticuerpo monoclonal HPC4 y el sistema tienen la característica de necesitar calcio para el reconocimiento del antígeno. Cuando se comparó la eficiencia del PTP-tag contra la del TAP-tag se encontró que la eficiencia en la primera columna de afinidad de IgG entre TAP-tag y PTP-tag era bastante similar. Sin embargo, cuando se realizó la comparación de los resultados obtenidos en la columna de CBP (TAP-tag) y la columna de HPC4 (PTP-tag) se observó que en la primera se obtuvo una eficiencia de recuperación menor que la obtenida con HPC4. Otras ventajas que ofrecería el PTP-tag con respecto al TAP-tag son:

- a. Se pueden realizar detecciones altamente específicas empleando el anticuerpo HPC4 a lo largo de la purificación (Schimanski *et al.*, 2005a);
- b. Es posible emplear un péptido de ProtC para eluir el complejo proteico de la segunda columna en vez del quelante EGTA, lo que abre la posibilidad de poder hacer análisis funcionales. Sin embargo, la elución con péptidos sintéticos no es muy eficiente (Schimanski *et al.*, 2005a y Nguyen *et al.*, 2006).

Dadas las ventajas que representaría el sistema PTP-tag en *Leishmania*, se decidió generar un vector PTP-tag para este parásito, a partir de la construcción pB6-TAP. El procedimiento consistió en remover de pB6-TAP la secuencia correspondiente a CBP y clonar en

esa región una secuencia que codificara un epítipo de ProtC, obteniendo de esta manera la construcción pB6-PTP.

Considerando que uno de nuestros intereses de investigación está dirigido al estudio de complejos proteicos involucrados en los procesos transcripcionales en *Leishmania*, el vector con el PTP-tag será de mucha utilidad para la identificación de subunidades de las tres RNA Polimerasas (Pol III, en el caso del presente trabajo), factores de transcripción, y complejos involucrados en la elongación y término de la transcripción. También podrán identificarse complejos proteicos que participen en procesamiento y transporte de diferentes tipos de RNA, así como complejos involucrados en traducción.

5.3 Clonación y caracterización *Lmaj*/pC82-PTP y *Lmex*/pC82-PTP

La obtención de pC82-TAP y pC82-PTP se llevó a cabo mediante el reemplazo del gen de ABC23, localizado río arriba de los epítopes de extracción TAP o PTP, por el gen de la subunidad C82 de Pol III de *L. major*. Las construcciones pC82-PTP y pC82-TAP se emplearon para transfectar parásitos y obtener líneas celulares que expresaran la proteína recombinante C82-TAP o C82-PTP, a partir de este elemento episomal. La transfección se realizó mediante la técnica de electroporación, manteniéndose en observación la población de transfectantes hasta que se recuperó completamente. Las células sobrevivientes fueron aquellas que lograron incorporar pC82-TAP o pC82-PTP al núcleo, donde el marcador de resistencia a G418 (Neo) se expresa y le confiere a las células la habilidad de crecer y dividirse en un medio que contenga esta droga de selección.

Una vez que se obtuvo la población estable de células transfectantes, se prosiguió con la clonación para obtener líneas celulares que derivaran de una sola célula. Lo anterior debido a la problemática que representaría trabajar con una población de células heterogénea, donde no todas expresan de la misma manera a la proteína recombinante. Por ejemplo, puede ser que algunas células no expresen la proteína recombinante en absoluto, únicamente el marcador de resistencia; otras células podrían expresar la proteína en una tasa muy elevada, lo que ocasionaría la formación de complejos aberrantes; otra posibilidad es que algunas células degraden de manera activa a la proteína, una vez que esta ha sido sintetizada.

La clonación de la población obtenida se llevó a cabo mediante la técnica de plaqueo en medio semisólido. Una vez que se obtuvieron colonias, se procedió a tomar una muestra de las mismas y se resembró en un volumen reducido, el cual fue escalado paulatinamente hasta que se obtuvo un cultivo estable. Finalmente, con el objetivo de determinar si las clonas expresaban la proteína recombinante en cuestión se procedió a realizar un análisis de extractos celulares totales, donde se buscó la presencia de la proteína recombinante mediante la identificación del epítipo de extracción de ProtA presente tanto en las células que fueron transfectadas con pC82-TAP como en aquellas transfectadas con pC82-PTP. El hecho de que todas las clonas analizadas hayan presentado una proteína del tamaño esperado, refleja la eficiencia del método de transfección y selección. En los inmunoblots (Fig. 26) se observa una proteína de ~80 kDa que corresponde con el tamaño de C82-TAP (86 kDa) o C82-PTP (84.3 kDa). Esto es una prueba de que la construcción está presente en las células, que se está llevando a cabo la transcripción del gen que codifica para C82-PTP o C82-TAP, que el transcrito está siendo procesado por la maquinaria interna del parásito y que se está llevando a cabo la traducción del RNAm para sintetizar nuestra proteína recombinante.

Adicionalmente a la banda de ~80 kDa, en ambas especies y con ambas construcciones, se detectó una segunda banda de ~40 kDa. Tomando en consideración que esta banda está siendo detectada con el anticuerpo PAP (que reconoce al epítipo de ProtA, presente únicamente en la proteína recombinante), dicha banda probablemente represente un subproducto de la proteólisis de C82-PTP o C82-TAP. Quizá la sobreexpresión de C82 en las clonas celulares conduzca a la degradación de la proteína recombinante. De cualquier manera, el análisis tipo Western Blot reveló la presencia de la proteína recombinante esperada, por lo que prosiguió con la purificación por afinidad en tándem.

5.4 Purificaciones por afinidad en tándem de *Lmaj*/C82-PTP y *Lmex*/C82-PTP

En lo que respecta a la purificación por afinidad en tándem de *Lmaj*/C82-PTP, las muestras tomadas a lo largo del proceso aportan la siguiente información acerca de la eficiencia de la técnica: 1) la similitud en cantidad de proteína y número de bandas detectadas entre el material de partida y el material no unido a IgG, indica que la gran mayoría de las proteínas

pasan a través de esta columna, como es de esperarse, pues no contienen en su secuencia algún epítoto que pueda ser reconocido por IgG (comparar carriles 2 y 3 en Fig. 27). Las proteínas recombinantes, por el contrario, presentan el epítoto de ProtA y se unen a IgG. La elución con la proteasa TEV (Fig. 27, carril 4) muestra una reducción en el número de bandas, así como en la cantidad de proteína que es recuperada; en teoría, en este punto recuperaríamos a la proteína recombinante, las proteínas asociadas a ésta y otras proteínas celulares que hayan interactuado con la matriz de Sefarosa-IgG mediante interacciones inespecíficas. La muestra de la matriz de afinidad de Sefarosa-IgG (Fig. 27, carril 5) no arrojó ninguna información útil, ya que únicamente se observa un barrido que enmascara las posibles bandas que pudieron haberse detectado. En la muestra de material no unido a HPC4 (Fig. 27, carril 6), se observa una notoria disminución en el número de bandas, así como en la cantidad de proteína. Finalmente en la muestra de la matriz de HPC4 (Fig. 27, carril 7) únicamente se detectaron la cadena ligera y pesada del anticuerpo (HPC4); sin embargo, la ausencia de otras bandas revela que la elución de las proteínas asociadas a esta segunda matriz de afinidad fue eficiente. De manera general, los resultados obtenidos con *L. mexicana* presentaron un comportamiento similar a los obtenidos con *L. major*.

El análisis de las muestras tomadas a lo largo del proceso de purificación con el anticuerpo específico para C82 mostró que desde el material de partida se está detectando a la proteína recombinante C82-PTP, tanto en *L. major* como en *L. mexicana* (Fig. 28). Sin embargo, se observan dos bandas adicionales en la purificación de *Lmaj/C82-PTP* y tres bandas en la purificación de *Lmex/C82-PTP*, todas de ≤ 40 kDa. Tanto en *L. major* como en *L. mexicana* una de esas bandas aparentemente corresponde a la que se había detectado previamente durante la caracterización de las clonas con el anticuerpo PAP. Las bandas adicionales corresponderían a otros productos de degradación de C82 (que no contienen el dominio de ProtA, por lo que no fueron reconocidos con el anticuerpo PAP) o a uniones inespecíficas. En un trabajo realizado por Martínez-Calvillo *et al.* (2007) se identificó en el genoma de *L. major* una copia truncada de C82 (C82'), la cual presenta una deleción grande en el extremo 5', y una extensión pequeña en el extremo 3', y que había sido considerada como un pseudogen. El tamaño predicho de la proteína que codificaría C82' es de 41.4 kDa, el cual concuerda con el tamaño de las bandas adicionales que se detectaron con el anticuerpo contra C82. Sería posible la detección de C82', ya que el

epítoto que reconoce el anticuerpo contra C82 está también presente en C82'. Así, nuestros resultados sugieren que C82' es un gen funcional, que produce una proteína abundante. De hecho, la señal de C82' es más intensa que la que se observa con C82 en células silvestres de *L. major* (Fig. 28, carril 1); pero a la fecha desconocemos cual podría ser la función de C82'. Resulta interesante el hecho de que dicho gen no se presenta en ninguna otra especie, incluidos *T. brucei* y *T. cruzi*.

5.5 Análisis de las proteínas purificadas

La subunidad C82 de Pol III en *S. cerevisiae* forma parte del subcomplejo de inicio de la transcripción, junto con C34 y C31. Dicho subcomplejo interactúa directamente con TFIIB al inicio de la transcripción de Pol III. Si se presentara un modelo similar en *Leishmania*, se esperaría que C82 se asociara únicamente con C34, ya que no se ha logrado identificar un ortólogo para C31 en el genoma de *L. major*. En este sentido, C34 sería una de las primeras proteínas que se podría identificar con el análisis de espectrometría de masas y probablemente alguna proteína que llevara a cabo alguna función similar a la que tiene C31 en levadura, pero que mostrara mucha divergencia en su secuencia. Siendo que este subcomplejo de inicio de la transcripción interactúa con TFIIB, es probable que a demás se logren identificar componentes de TFIIB, como lo sería Brf (77.2 kDa), B'' (44 kDa) y TBP (31.1 kDa). Otras de las proteínas que podríamos identificar son las subunidades C160 y C17, con quienes interactúa directamente el subcomplejo de C82 en levadura. También se podría identificar cualquier otra subunidad de Pol III y otros factores de transcripción o proteínas reguladoras de la transcripción.

En los eluidos de la columna de HPC4 de la purificación de *Lmaj/C82-PTP* se detectaron siete diferentes bandas (Fig. 29, panel A) y en la purificación *Lmex/C82-PTP* se identificaron diecisiete (Fig. 29, panel B). Se llevó a cabo una regresión logarítmica para calcular el peso molecular aproximado de estas proteínas. Los resultados se muestran en las Tablas 2 y 3 para *L. mexicana* y *L. major*, respectivamente. En ellas se indica el tamaño calculado de las bandas identificadas, y la subunidad de Pol III o del factor TFIIB con la que podrían corresponder. En la purificación de *L. mexicana* se identificaron seis proteínas con pesos moleculares de (~193, 137, 71, 68, 34 y 30 kDa), que se sospecha corresponden a las subunidades C160 (173.6 kDa), C128 (126.8 kDa), C37 (76.5 kDa), C82-PTP (68.8 kDa), C53 (37.9 kDa) y C25 (27 kDa),

respectivamente (Tabla 2). En el caso de *Lmaj*/C82-PTP se identificaron cuatro diferentes proteínas (~67, 52, 34 y 26.5 kDa) que podrían corresponder con las subunidades C82-PTP (68.8 kDa), C34 (48.1 kDa) C53 (37.9 kDa) y C25 (27 kDa), respectivamente (Tabla 3). En lo referente a TFIIB, en *L. mexicana* se detectó una proteína de 32.5 kDa que corresponde a TBP (31.1 kDa) y en *L. major* se encontró una proteína de 77 kDa que concuerda con el tamaño de Brf (77.2 kDa).

Banda	Peso molecular calculado (kDa)	Correspondencia con subunidades de Pol III	Correspondencia con subunidades de TFIIB	Peso molecular reportado (kDa)
A	>250			
B	250			
C	220			
D	193	C160		173.6
E	137	C128		126.80
F	112			
G	105			
H	96			
I	81			
J	71	C37		76.50
K	68	C82-PTP		68.80
L	66			
M	61			
N	56			
Ñ	34	C53		37.9
O	32		TBP	31.1
P	30	C25		27.00

Tabla 2. Correspondencia de las bandas identificadas en la purificación de *Lmex*/C82-PTP con subunidades de Pol III o TFIIB.

Banda	Peso molecular calculado (kDa)	Correspondencia con subunidades de Pol III	Correspondencia con subunidades TFIIB	Peso molecular reportado (kDa)
A	77		Brf	77.2
B	67	C82-PTP		68.8
C	64			
D	56			
E	52	C34		48.1
F	34	C53		37.9
G	26	C25		27

Tabla 3. Correspondencia de las bandas identificadas en la purificación de *Lmaj/C82-PTP* con subunidades de Pol III o TFIIB.

Las muestras están por enviarse al análisis de espectrometría de masas, lo que nos permitirá determinar con exactitud a qué proteínas del parásito corresponden las bandas purificadas. Así, estaremos en posibilidades de comparar nuestros hallazgos con lo reportado en otros eucariontes. También se tiene contemplado realizar la purificación mediante la técnica de TAP, para comparar los resultados obtenidos entre ambos procedimientos.

6. Conclusiones

- A. Se realizó la sustitución de CBP en pB6-TAP por el epítipo de ProtC, con lo que se obtuvo el vector pB6-PTP.
- B. Se realizó la subclonación del gen C82 de pGEM-C82 a los vectores pB6-PTP y pB6-TAP, obteniéndose de esta manera las construcciones pC82-TAP y pC82-PTP.
- C. pC82-PTP y pC82-TAP se emplearon para transfectar promastigotes de *L. major* y *L. mexicana*. Se obtuvieron y caracterizaron clonas que expresaban la proteína recombinante C82-TAP o C82-PTP.
- D. Se llevó a cabo la purificación por afinidad en tándem de C82-PTP, y proteínas asociadas a ella, en *L. major* y en *L. mexicana*.
- E. Se detectaron siete diferentes bandas en la purificación de *L. major* y alrededor de diecisiete bandas en el caso de *L. mexicana*.
- F. En las dos especies de *Leishmania* se aisló una proteína cuyo tamaño corresponde al de C82-PTP. A demás se purificaron otras proteínas que podrían corresponder a algunas otras subunidades de Pol III o a subunidades del factor TFIIB.
- G. Los resultados obtenidos indican que C82' no es un pseudogen, sino que se expresa y genera una proteína de ~40 kDa.

7. Referencias

- Abu-Farha, M., F. Elisma & D. Figeys. 2008. Identification of Protein-Protein Interactions by Mass Spectrometry Coupled Techniques. *Adv. Biochem. Engin./Biotechnol.* 110: 67-80.
- Aebischer, T. 1994. Recurrent cutaneous leishmaniasis: a role for persistent parasites. *Parasitol. Today.* 10(1): 25-28.
- Alarcon, C. M., H. S. Son, T. Hall & J. E. Donelson. A monocistronic transcript for a trypanosome variant surface glycoprotein. *Mol. Cell Biol.* 14(8): 5579-5591.
- Aphasizhev, R., Aphasizheva & L. Simpson. 2003. A tale of two TUTases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 100(19): 10583-10584.
- Baker, R. E., S. Camier, A. Sentenac & B. D. Hall. 1987. Gene size differentially affects the binding of yeast transcription factor tau to two intragenic regions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 84(24): 8768-8772.
- Bangs, J. D., P. F. Crain, T. Hashizume, J. A. McCloskey & J. C. Boothroyd. 2003. Mass spectrometry of mRNA cap 4 from trypanosomatids reveals two novel nucleosides. *J. Biol. Chem.* 267(14): 9805-9816.
- Bartholomew, B., D. Durkovich, G. A. Kassavetis & E. P. Geiduschek. 1993. Orientation and Topography of RNA polymerase III in Transcription Complexes. *Mol. Cell. Biol.* 13(2): 942-952.
- Bates, P. A. & M. E. Rogers. 2004. New insights into the developmental biology and transmission mechanisms of *Leishmania*. *Curr. Mol. Med.* 4(6): 601-609.
- Bates, P. A. 2006. Housekeeping by *Leishmania*. *TRENDS in Parasitol.* 22(10): 447-448.
- Bates, P. A. 2008. *Leishmania* sand fly interaction: progress and challenges. *Curr. Opin. in Microbiol.* 11(4): 340-344.
- Bentley, D. 2002. The mRNA assembly line: transcription and processing machines in the same factory. *Curr. Opin. Cell Biol.* 14(3): 336-342.
- Berriman, M., N. Hall, K. Shearer, F. Bringaud, B. Tiwari, T. Isobe, S. Bowman, C. Corton, L. Clark, G. A. M. Cross, M. Hoek, T. Zanders. M. Berberof, P. Borst & G. Rudenko. 2002. The architecture of variant surface glycoprotein gene expression sites in *Trypanosoma brucei*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 122(2): 131-140.
- Bertrand, E., F. Houser-Scott, A. Kendall, R. H. Singer & D. R. Engelke. 1998. Nucleolar

- localization of early tRNA processing. *Genes & Dev.* 12(16): 2463-2468.
- Besteiro, S., M. P. Barrett, L. Rivière & F. Bringaud. 2005. Energy generation in insect stages of *Trypanosoma brucei*: metabolism in flux. *TRENDS in Parasitol.* 21(4): 185-191.
- Bogenhagen, D. F., W. M. Wormington & D. D. Brown. 1982. Stable transcription complexes of *Xenopus* 5S RNA genes: A means to maintain the differentiated state. *Cell.* 28(2): 413-421.
- Bogenhagen, D. F. & D. D. Brown. 1981. Nucleotide sequences in *Xenopus* 5S DNA required for transcription termination. *Cell.* 24(2):261-270.
- Borst, P. & S. Ulbert. 2001. Control of VSG gene expression sites. *Mol. Biochem. Parasitol.* 114(1): 17-27.
- Braun, B. R., B. Bartholomew, G. A. Kassavetis & E. P. Geiduschek. 1992. Topography of Transcription Factor Complexes on the *Saccharomyces cerevisiae* 5 S RNA Gene. *J. Mol. Biol.* 228(4): 1063-1077.
- Braun, B. R., G. A. Kassavetis & E. P. Geiduschek. 1992. Bending of the *Saccharomyces cerevisiae* 5S rRNA Gene in Transcription Factor Complexes. *J. Biol. Chem.* 267(31): 22562-22569.
- Bruderer, T., L.-C. Tu & M. G.-S. Lee. 2003. The 5' end structure of transcripts derived from the rRNA gene and the RNA polymerase I transcribed protein coding genes in *Trypanosoma brucei*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 129(1): 69-77.
- Burchmore, R. J. S. & M. P. Barrett. 2001. Life in vacuoles – nutrient acquisition by *Leishmania* amastigotes. *Int. J. of Parasitol.* 31(12): 1311-1320.
- Campbell, D. A., N. R. Sturm & M. C. Yu. 2000. Transcriptional of the Kinetoplastid Spliced Leader RNA Gene. *Parasitol. Today.* 16(2): 2000.
- Campbell, D. A., S. Thomas & N. R. Sturm. 2003. Transcription in Kinetoplastid protozoa: why be normal?. *Microbes and Infection.* 5(13):1231-1240.
- Chamberlain, J. R., Y. Lee, W. S. Lane & D. R. Engelke. 1998. Purification and characterization of nuclear RNase P holoenzyme complex reveals extensive subunit overlap with RNase MRP. *Genes & Dev.* 12(11): 1678-1690.
- Chiannikulchai, N., R. Stalder, M. Riva, C. Carles, M. Wener & A. Sentenac. 1992. RPC82 Encodes the Highly Conserved, Third-Largest Subunit of RNA Polymerase C (III) from *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 12(10): 4433-4440.

- Ciliberto, G., S. Raugei, F. Constanzo, L. Dente & R. Cortese. 1983. Common and interchangeable elements in the promoters of genes transcribed by RNA polymerase III. *Cell*. 32(3):725-733.
- Clayton, C. 2002. Life without transcriptional control? From fly to man and back again. *EMBO J*. 21(8): 1881-1888.
- Conaway, J. W. & R. C. Conaway. 1999. Transcription Elongation and Human Disease. *Annu. Rev. Biochem.* 68: 301-319.
- Cozzarelli, N. R., S. P. Berrard, M. Schlissel, D. D. Brown & D. F. Bogenhagen. 1983. Purified RNA polymerase III accurately and efficiently terminates transcription of 5S RNA genes. *Cell*. 34(3): 829-835.
- Cramer, P. 2002. Multisubunit RNA polymerases. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 12(1): 89-97.
- Cramer, P., D. A. Bushnell & R. D. Kornberg. 2001. Structural Basis of Transcription: RNA Polymerase II at 2.8 Ångstrom Resolution. *Science*. 292(5523): 1863-1875.
- Croft, S. L., K. Seifert & V. Yardley. 2006. Current scenario of drug development for leishmaniasis. *Indian J. Med. Res.* 123(3): 399-410.
- Croft, S. L., S. Sundar & A. H. Fairlamb. 2006. Drug Resistance in leishmaniasis. *Clinical Microbiology Reviews*. 19(1): 111-126.
- Das, A., H. Li, T. Lui & V. Bellofatto. 2006. Biochemical characterization of *Trypanosoma brucei* RNA polymerase II. *Mol. Biochem. Parasitol.* 150(2):201-210.
- Das, A., Q. Zhang, J. B. Palechar, B. Chatterjee, G. A. Cross & V. Bellofatto. 2005. Trypanosomal TBP functions with the multisubunit transcription factor tSNAP to direct spliced-leader RNA gene expression. *Molecular and Cellular Biology*. 25(16):7314-7322.
- Das, G., D. Henning, D. Wright & R. Reddy. 1988. Upstream regulatory elements are necessary and sufficient for transcription of a U6 RNA gene by RNA polymerase III. *EMBO J*. 7(2): 503-512.
- de Souza, W. 2002. Special organelles of some pathogenic protozoa. *Parasitol. Res.* 88(12): 1013-1025.
- Desjeux, P. 2001. The increase in risk factors for leishmaniasis Worldwide. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 95(3): 239-243.
- Desjeux, P. 2004. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. *Comp. Immunol.*

- Microbiol. Infect. Dis.* 27(5): 305-318.
- Devaux, S., L. Lecordier, P. Uzureau, D. Walgraffe, J. F. Dierick, P. Poelvoorde, E. Pays & L. Vanhamme. 2006. Characterization of RNA polymerase II subunits of *Trypanosoma brucei*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 148(1):60-68.
- Dieci, G. & A. Sentenac. 1996. Facilitated Recycling Pathway for RNA Polymerase III. *Cell.* 84(2): 245-252.
- Dieci, G., G. Fiorino, M. Castelnuovo, M. Teichmann & A. Pagano. 2007. The expanding RNA polymerase III transcriptome. *TRENDS in Genetics.* 23(12): 614-622.
- Dougherty, W. G., S. M. Cary & T. D. Parks. 1989. Molecular genetic analysis of a plant virus polyprotein cleavage site: a model. *Virology.* 171(2): 356-364.
- Engelke, D. R., S.-Y. Ng, B. S. Shastry & R. G. Roeder. 1980. Specific interaction of a purified transcription factor with an internal control region of 5S RNA genes. *Cell.* 19(3): 717-728.
- Estevez, A. M., T. Kempf & C. Clayton. 2001. The exosome of *Trypanosoma brucei*. *EMBO Journal.* 20(14):3831-3839.
- Fabrizio, P., A. Coppo, P. Fruscoloni, P. Benedetti, G. Di Segni & G. P. Tocchini-Valentini. 1987. Comparative mutational analysis of wild-type and stretched tRNA³(Leu) gene promoters. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 84(24): 8763-8767.
- Fantoni, A., A. O. Dare & C. Tschudi. 1994. RNA polymerase III-mediated transcription of the trypanosome U2 small nuclear RNA gene is controlled by both intragenic and extragenic regulatory elements. *Molecular and Cellular Biology.* 14(3): 2021-2028.
- Fernández-Tornero C., B. Böttcher, M. Riva, C. Carles, U. Steuerwald, R. W. H. Ruigrok, A. Sentenac, C. W. Müller & G. Schoehn. 2007. Insights into Transcription Initiation and Termination from Electron Microscopy Structure of Yeast RNA Polymerase III. *Cell Press, Molecular Cell.* 25(6): 813-823.
- Fortes, P., D. Bilbao-Cortés, M. Fornerod, G. Rigaut, W. Raymond, B. Sépahrin & I. W. Mattaj. 1999. Luc7p, a novel yeast U1 snRNP protein with a role in 5' splice site recognition. *Genes & Dev.* 13(18): 2425-2438.
- Geiduscheck, E. P. & G. A. Kassavetis. 2001. The RNA polymerase III transcription apparatus. *J. Mol. Biol.* 310(1): 1-26.
- Gilinger, G. & V. Bellofatto. Trypanosome spliced leader RNA genes contain the first identified

- RNA polymerase II gene promoter in these organisms. *Nucleic Acids Res.* 29(7): 1556-1564.
- Graham, S. V. & J. D. Barry. 1995. Transcriptional regulation of metacyclic variant surface glycoprotein gene expression during the life cycle of *Trypanosoma brucei*. *Mol. Cell. Biol.* 15(11): 5945-5956.
- Grummt, I., E. Roth & M. R. Paule. 1982. Ribosomal RNA transcription *in vitro* is species specific. *Nature.* 296(5853): 173-174.
- Handman, E. 2000. Cell Biology of *Leishmania*. *Advances in Parasitology.* 44:1-39.
- Hannaert, V., F. Bringaud, F. R. Opperdoes & P. A. M. Michels. 2003. Evolution of energy metabolism and its compartmentation in Kinetoplastida. *Kinetoplastid. Biol. Dis.* 2(1): 11-41.
- Hannan, K. M., R. D. Hannan & L. I. Rothblum. 1998. Transcription by RNA polymerase I. *Front. Biosci.* 3: d376-398.
- Hernández, R., S. Martínez-Calvillo, R. Hernández-Rivas & E. Gómez. 1993. *Trypanosoma cruzi* ribosomal RNA genes: a review. *Biol. Res.* 26(1-2): 109-114.
- Herwalt, B.L. 1999. Leishmaniasis. *Lancet.* 354(9185):1191-1199.
- Hirose Y. & J. L. Manley. 2000. RNA polymerase II and the integration of nuclear events. *Genes & Dev.* 14(12): 1415-1429.
- Holstege, F. C. P., U. Fiedler & H. T. M. Timmers. 1997. Three transitions in the RNA polymerase II transcription complex during initiation. *EMBO J.* 16(24): 7468-7480.
- Horn, D. & G. A. M. Cross. Position-dependent and promoter-specific regulation of gene expression in *Trypanosoma brucei*. *EMBO J.* 16(24): 7422-7431.
- Horn, D. 2001. Nuclear gene transcription and chromatin in *Trypanosoma brucei*. *Int. J. Parasitol.* 31(11): 1157-1165.
- Hotz, H.-R., S. Biebinger, J. Flaspohler & C. Clayton. 1998. PARP gene expression: control at many levels. *Mol. Biochem. Parasitol.* 91(1): 131-143.
- Howe, J. G. & M.-D. Shu. 1989. Epstein-Barr virus small RNA (EBER) genes: Unique transcription units that combine RNA polymerase II and III promoter elements. *Cell.* 57(5): 825-834.
- Hsieh, Y.-J., T. K. Kundu, Z. Wang, R. Kovelman & R. G. Roeder. 1999. The TFIIC90 Subunit of TFIIC Interacts with Multiple Components of the RNA Polymerase III Machinery and

- Contains a Histone-Specific Acetyltransferase Activity. *Molecular and Cellular Biology*. 19(11): 7697-7704.
- Hu, P., S. Wu, Y. Sun, C. C. Yuan, R. Kobayashi, M. P. Myers, & N. Hernandez. 2002. Characterization of human RNA polymerase III identifies orthologues for *Saccharomyces cerevisiae* RNA polymerase III subunits. *Mol. Cell. Biol.* 22(22): 8044-8055.
- Joazeiro, C. A. P., G. A. Kassavetis & E.P. Geiduschek. 1996. Alternative outcomes in assembly of promoter complexes: the roles of TBP and a flexible linker in placing TFIIB on TRNA genes. *Genes & Dev.* 10(6): 725-739.
- Johnson, P. J., J. M. Kooter & P. Borst. 1987. Inactivation of transcription by UV irradiation of *T. brucei* provides evidence for a multicistronic transcription unit including a VSG gene. *Cell.* 52(2): 273-281.
- Kahl, B. F., H. Li & M. R. Paule. 2000. DNA melting and promoter clearance by eukaryotic RNA polymerase I. *J. Mol. Biol.* 299(1): 75-89.
- Kamhawi, S. 2006. *Phlebotomine* sand flies and *Leishmania* parasites: friends or foes?. *TRENDS in Parasitology.* 22(9): 439-445.
- Kapler, G. M., C. M. Coburn & S. M. Beverley. 1990. Stable Transfection of the Human Parasite *Leishmania major* Delineates a 30-Kilobase Region Sufficient for Extrachromosomal Replication and Expression. *Molecular and Cellular Biology.* 10 (3): 1084-1094.
- Kassavetis, G. A., A. Kumar, G. A. Letts & E. P. Geiduschek. 1998. A post-recruitment function for the RNA polymerase III transcription-initiation factor IIIB. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 95(16): 9196-9201.
- Kornberg R. D. 1999. Eukaryotic transcriptional control. *Trends. Cell Biol.* 9(12): M47-M49.
- Kornberg, R. D. 2007. The molecular basis of eukaryotic transcription. *PNAS.* 104(32): 12955-12961.
- Kunkel, G. R. & T. Pederson. 1988. Upstream elements required for efficient transcription of a human U6 RNA gene resemble those of U1 and U2 genes even though a different polymerase is used. *Genes & Dev.* 2(2): 196-204.
- Kunkel, G. R. & T. Pederson. 1989. Transcription of a human U6 small nuclear RNA gene in vivo withstands deletion of intragenic sequences but not of an upstream TATATA box. *Nucleic Acids Res.* 17(18): 7371-7379.
- Lee, M. G.S. & L. H. T. Ploeg. 1997. Transcription of protein-coding genes in trypanosomes by

- RNA polymerase I. *Annu. Rev. Microbiol.* 51: 463-489.
- Lee, T. I. & R. A. Young. 2000. Transcription of Eukaryotic Protein-Coding Genes. *Annu. Rev. Genet.* 34: 77-137.
- Lee, W.-C. & K. H. Lee. 2004. Applications of Affinity Chromatography in proteomics. *Anal. Biochem.* 324(1): 1-10.
- Lewis, P.J., G. P. Doherty & J. Clark. 2008. Transcription factor dynamics. *Microbiology.* 154(Pt 7): 1837-1844.
- Liniger, M., K. Bodenmüller, E. Pays, S. Gallato & I. Roditi. Overlapping sense and antisense transcription units in *Trypanosoma brucei*. *Mol. Microbiol.* 40(4): 869-878.
- Liu, B., Y. Liu, S. A. Motyka, E. E. C. Agbo & P. T. Englund. 2005. Fellowship of the rings: the replication of kinetoplast DNA. *TRENDS in Parasitol.* 21(8): 363-369.
- Lukeš, J., H. Hashimi & A. Zíková. 2005. Unexplained complexity of the mitochondrial genome and transcriptome in kinetoplastid flagellates. *Curr. Genet.* 48(5): 277-299.
- Luse, D. S. & G. A. Jacob. Abortive initiation by RNA polymerase II in vitro at the adenovirus 2 major late promoter. *J. Biol. Chem.* 262(31):14990-14997.
- Martínez-Calvillo, S., A. Saxena, A. Green, A. Leland & P. J. Myler. 2007. Characterization of the polymerase II and III complexes in *Leishmania major*. *Int. J. of Parasitol.* 37(5): 491-502.
- Martínez-Calvillo, S., D. Nguyen, K. Stuart & P. J. Myler. 2004. Transcription Initiation and Termination on *Leishmania major* Chromosome 3. *Eukaryotic Cell.* 3(2): 506-517.
- Martínez-Calvillo, S., S. Yan, D. Nguyen, M. Fox, K. Stuart & P. J. Myler. 2003. Transcription of *Leishmania major* Friedlin Chromosome 1 Initiates in Both Directions within a Single Region. *Molecular Cell.* 11(5): 1291-1299.
- Martínez-Pérez, J. A., M. Elías-Gutiérrez & D. E. Varona-Graniell. 2003. Protozoología: Aspectos Morfofuncionales. UNAM, FES Iztacala. México.
- Matsuzaki, H., G. A. Kassavetis & E. P. Geiduschek. 1994. Analysis of RNA Chain Elongation and termination by *Saccharomyces cerevisiae* RNA Polymerase III. *J. Mol. Biol.* 235(4): 1173-1192.
- Miernyk, J. A. & J. J. Thelen. 2008. Biochemical approaches for discovering protein-protein interactions. *Plant J.* 53(4): 597-609.
- Moss, T. & V. Y. Stefanovsky. 1995. Promotion and regulation of ribosomal transcription in

- eukaryotes by RNA polymerase I. *Prog. Nucleic Acids Res. Mol. Biol.* 50: 25-66.
- Motta, M. C. 2008. Kinetoplast as a potential chemotherapeutic target of trypanosomatids. *Curr. Pharm. Des.* 14(9): 847-854.
- Murray, H. W., J. D. Berman, C. R. Davies & N. G. Saravia. 2005. Advances in leishmaniasis. *Lancet.* 366(9496):1561-77.
- Myers, L. C. & R. D. Kornberg. 2000. Mediator of Transcriptional Regulation. *Annu. Rev. Biochem.* 69: 729-749.
- Myler, P. J., E. Sick, P. D. McDonagh, S. Martinez-Calvillo, A. Schnauffer, S. M. Sunkin, S. Yan, R. Madhubala, A. Ivens & K. Stuart. 2000. Genomic organization and gene function in *Leishmania*. *Biochem. Soc. Trans.* 28(5):527-531.
- Nakaar, V., C. Tschudi & E. Ullu. 1995. An unusual liaison: small nuclear and cytoplasmatic RNA genes team up with tRNA genes in trypanosomatid protozoa. *Parasitology Today.* 11(6): 225-228.
- Nguyen, T. N., B. Schimanski, A. Zahn, B. Klumpp & A. Günzl. 2006. Purification of an eight subunit RNA polymerase I complex in *Trypanosoma brucei*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 149(1): 27-37.
- Olson, M. O., K. Hingorani & A. Szebeni. 2002. Conventional and nonconventional roles of the nucleolus. *Int. Rev. Cytol.* 219: 199-266.
- Palenchar, J. B. & V. Bellofatto. 2006. Gene transcription in trypanosomes. *Molecular & Biochemical Parasitology.* 146(2):135-41.
- Palfi, Z., B. Schimanski, A. Günzl, S. Lucke & A. Bindereif. 2005. U1 small nuclear RNP from *Trypanosoma brucei*: a minimal U1 snRNA with unusual protein components. *Nucleic Acids Res.* 33(8): 2493-2503.
- Parks, T. D., K. K. Leuther, E. D. Howard & S. A. Johnson. 1994. Release of Proteins and Peptides from Fusion Proteins Using a Recombinant Plant Virus Proteinase. *Analytical Biochemistry.* 216(2): 413-417.
- Paule, M. R. & R. J. White. 2000. Transcription by RNA polymerases I and III. *Nucleic Acids Res.* 28(6): 1283-1298.
- Pays, E., L. Vanhamme & D. Pérez-Morga. 2004. Antigeneic variation in *Trypanosoma brucei*: facts, challenges and mysteries. *Curr. Opin. Microbiol.* 7(4): 369-374.
- Pays, E., S. Lips, D. Nolan, L. Vanhamme & D. Pérez-Morga. The VSG expression sites of

- Trypanosoma brucei*: multipurpose tools for the adaption of the parasite to mammalian hosts. *Mol. Biochem. Parasitol.* 114(1): 1-16.
- Peacock, C. S., K. Seeger, D. Harris, L. Murphy, J. C. Ruiz, M. A. Quail, N. Peters, E. Adlem, A. Tivey, M. Aslett, A. Kerhornou, A. Ivens, A. Fraser, M. A. Rajandream, T. Carver, H. Norbertczak, T. Chillingworth, Z. Hance, K. Jagels, S. Moule, D. Ormond, S. Rutter, R. Squares, S. Whitehead, E. Rabbinowitsch, C. Arrowsmith, B. White, S. Thurston, F. Bringaud, S. L. Baldauf, A. Faulconbridge, D. Jeffares, D. P. Depledge, S. O. Oyola, J. D. Hilley, L. O. Brito, L. R. Tosi, B. Barrell, A. K. Cruz, J. C. Mottram, D. F. Smith & M. Berriman. 2007. Comparative genomic analysis of three *Leishmania* species that cause diverse human disease. *Nature, Genetics.* 39(7): 839-847.
- Pfleiderer, C., A. Smid, I. Bartsch & I. Grummt. 1990. An undecamer DNA sequence directs termination of human ribosomal gene transcription. *Nucleic Acids Res.* 18(16): 4727-4736.
- Pieler, T., J. Hamm & R. G. Roeder. 1987. The 5S gene internal control region is composed of three distinct sequence elements, organized as two functional domains with variable spacing. *Cell.* 48(1): 91-100.
- Pimenta, P. F. P., S. J. Turco, M. J. McConville, P. J. Lawyer, P. V. Perkins & D. L. Sacks. 1992. Stage-specific adhesion of *Leishmania* promastigotes to the sand fly midgut. *Science.* 256(5065): 1812-1815.
- Pombo, A., D. A. Jackson, M. Hollinshead, Z. Wang, R. G. Roeder & P. R. Cook. 1999. Regional specialization in human nuclei: visualization of discrete sites of transcription by RNA polymerase III. *The EMBO J.* 18(8): 2241-2253.
- Proudfoot, N. 2000. Connecting transcription to Messenger RNA processing. *Trends. Biochem. Sci.* 25(6): 290-293.
- Puig, O., F. Caspary, G. Rigaut, B. Rutz, E. Bouveret, E. Bragado-Nilsson, M. Wilm & B. Séraphin. 2001. The Tandem Affinity Purification (TAP) Method: A General Procedure of Protein Complex Purification. *Methods.* 24(3): 218-229.
- Reeder, R. H., 1984. Enhancers and ribosomal gene spacers. *Cell.* 38(2): 349-351.
- Reguera, R. M., J. C. Cubría & D. Ordóñez. 1998. The Pharmacology of Leishmaniasis. *Gen. Pharmac.* 30(4): 435-443.
- Renslo, A. R. & J. H. McKerrow. 2006. Drug discovery and development for neglected parasitic

- diseases. *Nature Chemical Biology*. 2(12): 701-710.
- Rigaut, G., A. Shevchenko, B. Rutz, M. Wilm, M. Mann & B. Séraphin. 1999. A generic protein purification method for protein complex characterization and proteome exploration. *Nature, Biotechnology*. 17(10): 1030-1032.
- Rubio, M. A., X. Liu, H. Yuzawa, J. D. Alfonzo & L. Simpson. 2000. Selective importation of RNA into isolated mitochondria from *Leishmania tarentolae*. *RNA*. 6(7): 988-1003.
- Rüth, J., C. Conesa, G. Dieci, O. Lefebvre, A. Düsterhöft, S. Ottonello & A. Sentenac. 1996 A suppressor of mutations in the class III transcription system encodes a component of yeast TFIIB. *EMBO J*. 15(8): 1941-1949.
- Ruppert, E. E. & R. D. Barnes. 1996. Zoología de los Invertebrados. 6a ed. Mc Graw Hill. México.
- Santos, D. O. 2008. Leishmaniasis treatment-a challenge that remains: a review. *Parasitol. Res*. 103(1): 1-10.
- Schimanski, B., B. Klumpp, G. Laufer, R. J. Marhofer, P. M. Selzer & A. Günzl. 2003. The second largest subunit of *Trypanosoma brucei*'s multifunctional RNA polymerase I a unique N-terminal extension domain. *Mol. Biochem. Parasitol*. 126(2): 193-200.
- Schimanski, B., T. N. Nguyen & A. Günzl. 2005a. Highly Efficient Tandem Affinity Purification of Trypanosome Protein Complexes Based on a Novel Epitope Combination. *Eukaryotic Cell*. 4(11): 1942-1950.
- Schimanski, B., T. N. Nguyen & A. Günzl. 2005b. Characterization of a multisubunit transcription factor complex essential for spliced-leader RNA gene transcription in *Trypanosoma brucei*. *Mol. Cell. Biol*. 25(16): 7303-7313.
- Schramm, L & N. Hernandez. 2002. Recruitment of RNA polymerase III to its target promoters. *Genes & Dev*. 16(20): 2593-2620.
- Schultz, P., N. Marzouki, C. Marck, A. Ruet, P. Oudet & A. Sentenac. 1989. The two DNA-binding domains of yeast transcription factor τ as observed by scanning transmission electron microscopy. *The EMBO J*. 8(12):3815-3824.
- Schwarzacher, H. G. & F. Wachtler. 1993. The nucleolus. *Anat. Embryol (Berl)*. 188(6): 515-536.
- Shevchenko, A., O. N. Jensen, A. V. Podtelejnikov, F. Sagliocco, M. Wilm, O. Vorm, P. Mortensen, A. Shevchenko & H. Boucherie. 1996. Linking genome and proteome by

- mass spectrometry: Large-scale identification of yeast proteins from two dimensional gels. *Proc. Natl. Acad.* 93(25): 14440-14445.
- Shilatifard, A. Factors regulating the transcriptional elongation activity of RNA polymerase II. *FASEB J.* 12(14): 1437-1446.
- Simpson, A. G. B., J. R. Stevens & J. Lukes. 2006. The evolution and diversity of kinetoplastid flagellates. *TRENDS in Parasitol.* 22(4): 168-174.
- Simpson, L., R. Aphasizhev, G. Gao & X. Kang. 2004. Mitochondrial proteins and complexes in *Leishmania* and *Trypanosoma* involved in U-insertion/deletion RNA editing. *RNA.* 10(2): 159-170.
- Singh, S. & R. Sivakumar. 2004. Challenges and new discoveries in the treatment of leishmaniasis. *J. Infect. Chemother.* 10(6): 307-315.
- Smith, D. F., C. S. Peacock & A. K. Cruz. 2007. Comparative genomics: From genotype to disease phenotype in the leishmaniasis. *Int. J. of Parasitol.* 37(11): 1173 – 1186.
- Stuart, K., R. Brun, S. Croft, A. Fairlamb, R. E. Güther, J. McKerrow, S. Reed & R. Tarleton. 2008. Kinetoplastids: related protozoan pathogens, different diseases. *J. Clin. Invest.* 118(4): 1301-1310.
- Sturm, N. R., M. C. Yu & D. A. Campbell. 1999. Transcription termination and 3'-End processing of the spliced leader RNA in kinetoplastids. *Mol. Cell. Biol.* 19(2): 1595-1604.
- Thuillier, V., S. Stettler, A. Sentenac, P. Thuriaux & M. Wener. 1995. A mutation in the C31 subunit of *Saccharomyces cerevisiae* RNA polymerase III affects transcription initiation. *The EMBO J.* 14(2): 351-359.
- Tschudi, C. & E. Ullut. 2002. Unconventional rules of small nuclear RNA transcription and cap modification in trypanosomatids. *Gene Expr.* 10(1-2): 3-16.
- Valenzuela, P., G. L. Hager, F. Weinberg & W. J. Rutter. 1976. Molecular structure of Yeast RNA polymerase III: Demonstration of the tripartite transcriptive system in lower eukaryotes. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 73(4): 1024-1028.
- Vincendeau, P & B. Bouteille. 2006. Immunology and immunopathology of African trypanosomiasis. *An. Acad. Bras. Cienc.* 78(4): 645-665.
- Walgraffe, D., S. Devaux, L. Lecordier, J. F. Dierick, M. Dieu, A. J. Van Den, E. Pays & L. Vanhamme. 2005. Characterization of subunits of the RNA polymerase I complex in

- Trypanosoma brucei*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 139(2): 249-260.
- Wang, Z. & R. G. Roeder. 1997. Three human RNA polymerase III-specific subunits form a subcomplex with selective function in specific transcription initiation. *Genes & Dev.* 11(10): 1315-1326.
- Wener, M., N. Chaussivert, I. M. Willis & A. Sentenac. 1993. Interaction between a Complex of RNA Polymerase III Subunits and the 70-kDa Component of Transcription Factor IIIB. *J. Biol. Chem.* 266(28): 20721-20724.
- Wong, A. K., M. A. Curotto de Lafaille & D. F. Wirth. Identification of a cis-acting gene regulatory element from the *lemdr1* locus of *Leishmania enriettii*. 269(42): 26497-26502.
- Yan, S., S. Martínez-Calvillo, A. Schnauffer, S. Sunkin, P. J. Myler & K. Stuart. 2002. A low-background inducible promoter system in *Leishmania donovani*. *Molecular & Biochemical Parasitology.* 119(2): 217-223.
- Yu, M. C., N. R. Sturm, R. M. Satio, T. G. Roberts & D. A. Campbell. 1998. Single nucleotide resolution of promoter activity and protein binding for the *Leishmania tarentolae* spliced leader RNA gene. *Mol. Biochem. Parasitol.* 94(2): 265-281.