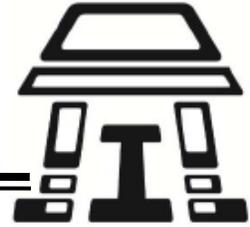




**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**



Facultad de Estudios Superiores Iztacala

**Participación de BRF1 en la transcripción de la
RNA Polimerasa III en *Leishmania major***

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I Ó L O G A

Presenta:

MONDRAGÓN ROSAS FABIOLA



Asesor: Dr. Santiago Martínez Calvillo
Los Reyes Iztacala, Estado de México 2018



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México, por ser mi segundo hogar todos estos años, y por las innumerables horas llenas de aprendizaje y crecimiento.

Al Dr. Santiago Martínez Calvillo, por abrirme las puertas de su laboratorio y permitirme ser parte de su grupo de trabajo, por su paciencia, su apoyo y por guiarme durante la realización de este proyecto.

A mis compañeros del Laboratorio 1 de la UBIMED, en especial al biólogo Luis Enrique Florencio Martínez, por su apoyo técnico y su paciencia al enseñar.

A mis revisores: el Dr. Felipe Vaca Paniagua, el Dr. Roberto Eduardo López Urrutia, la Dra. Martha Ofelia Salcedo Álvarez y el Dr. Tomás Nepomuceno Mejía, por sus valiosas aportaciones a este proyecto.

Este proyecto de investigación fue financiado por el donativo 251831 de CONACyT y por los donativos IN214715 e IN207118 de PAPIIT (DGAPA, UNAM), otorgados al Dr. Santiago Martínez Calvillo.

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

A mis padres, por su amor y apoyo incondicional, por creer en mí incluso cuando yo no lo hacía y por todos los sacrificios que han hecho para que termine la carrera. Son mi motivación y mi ejemplo a seguir. Sin ustedes no habría llegado hasta donde estoy y siempre estaré inmensamente agradecida.

A mi hermana y mejor amiga, Daniela, por escucharme, darme consejos, y, sobre todo, por ser mi cómplice de toda la vida y estar conmigo siempre. A mi hermano Carlos, porque, a tu manera, has estado conmigo y sé que puedo contar contigo para lo que necesite. Son los mejores hermanos mayores que pude haber tenido.

A toda mi familia, por estar siempre a mi lado y por toda una vida llena de enseñanzas, regaños, risas y mucho amor.

A Paulina. ¡Qué suerte tuve de encontrarte! Gracias por dejarme entrar a tu casa y a tu familia, por tu amistad, por confiar en mí, por las noches de películas y las risas interminables, por dejarme estar contigo en tus momentos más felices y en los más difíciles, y por estar conmigo en los míos, porque cuando todo lo demás va mal sé que te tengo a ti y espero que sea así siempre.

A Itzel, si alguien me ha visto crecer y cambiar durante la carrera has sido tú, podría llenar hojas con todo lo que tu amistad significa para mí, gracias por estar conmigo, por confiar en mí, por las pláticas, por entenderme y nunca juzgarme, aunque me hayas visto en mis peores momentos.

A Fernanda, desde CCH hasta la universidad, me alegra mucho que sigas siendo de mis mejores amigas, gracias por hacerme reír cuando más lo necesito y por tu apoyo incondicional. A Daniela, Mara, aunque últimamente no nos vemos ni hablamos como antes, tu amistad sigue siendo de las más importantes para mí, gracias por estar conmigo y por apoyarme en todo. A Oscar, eres de las mejores personas que he conocido, gracias por todo lo que compartimos y todo lo que

vivimos juntos, podemos dejar de hablarnos por años, pero una amistad como la nuestra no se olvida. A Alexia, somos dos personas tan diferentes que es increíble lo cercanas que llegamos a ser, tú me viste crecer desde el primer día de CCH y eres una de las personas que mejor me conoce. Con todos ustedes viví una de las mejores etapas de mi vida, muchas gracias.

A Mariana, nos hemos vuelto tan cercanas en tan poco tiempo, el último año no habría sido lo mismo sin ti. Gracias por tus consejos, por tus palabras de aliento, y por todas las aventuras y experiencias que me ha brindado tu amistad. A Frida, gracias por todas las tardes llenas de risas y de pláticas interesantes, gracias por motivarme y por nunca dudar de mí. A Melisa, gracias por siempre hacerme reír, por escucharme y estar conmigo siempre. A Cristofer, Cristo, eres una de las personas más divertidas que conozco, muchas gracias por siempre escucharme cuando lo necesito.

A Andrés, mi paso por la universidad no habría sido el mismo sin ti, Andrew, muchas gracias por todas las pláticas, las risas y los consejos. A Luis Alberto, muchas gracias por hacerme reír, por confiar en mí y por dejarme confiar en ti, aunque a veces también me hagas enojar. Sin duda estar en el mismo laboratorio nos unió y esta experiencia no habría sido la misma sin ustedes, hemos aprendido mucho juntos, y nos hemos visto en los mejores y en los peores momentos. Los quiero mucho.

A Fiordaliso, muchas gracias por enseñarme tanto, dentro y fuera del laboratorio, gracias por estar conmigo en los momentos más estresantes y ayudarme a superarlos, me alegra mucho haberte conocido. A Gabriela, aunque hayamos estado muy poco tiempo juntas, te agradezco mucho todas las enseñanzas y la paciencia que tuviste conmigo, así como los consejos y las pláticas dentro y fuera del laboratorio.

DEDICATORIA

A mi mamá, Ma. Antonieta

A mi papá, Daniel

A mis hermanos, Daniela y Carlos

*“Nothing happens in contradiction to nature, only in contradiction to what we know
of it”*

The X files

ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS Y TABLAS	III
ABREVIATURAS	VI
RESUMEN	VIII
1. INTRODUCCIÓN	
1.1 Generalidades de <i>Leishmania</i>	1
1.1.1 Ciclo de vida	2
1.1.2 Clasificación taxonómica	4
1.1.3 Epidemiología	4
1.2 Transcripción en eucariontes	8
1.2.1 Transcripción de la RNA polimerasa I.....	10
1.2.2 Transcripción de la RNA polimerasa II.....	11
1.2.3 Transcripción de la RNA polimerasa III.....	12
1.2.3.1 TFIIB.....	15
1.2.3.1 BRF1	16
1.3 Expresión genética en tripanosomátidos	17
1.3.1 Organización genómica	17
1.3.2 Transcripción policistrónica.....	19
1.2.3 Trans-splicing y poliadenilación	20
1.2.4 Antecedentes	21
2. OBJETIVOS	23
2.1 Objetivo general.....	24
2.2 Objetivos particulares.....	24
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	25
3.1 Cultivo y conteo de organismos	25

3.2 Extracción de proteína	25
3.3 Electroforesis en gel de poliacrilamida	25
3.4 Ensayos Western blot	26
3.5 Diseño de oligonucleótidos	27
3.6 Extracción de DNA genómico	27
3.7 Electroforesis en geles de agarosa	28
3.8 PCR punto final	28
3.9 Inmunoprecipitación de la cromatina.....	30
3.10 PCR cuantitativo (qPCR)	31
3.11 Inmunofluorescencia indirecta.....	32
4. RESULTADOS	33
4.1 Verificación de la expresión de la proteína recombinante BRF1-PTP.....	33
4.2 Selección de las regiones a analizar mediante ensayos CHIP	35
4.3 Estandarización de condiciones de amplificación	38
4.4 Inmunoprecipitación de la cromatina.....	40
4.5 Localización celular de BRF1	43
5. DISCUSIÓN	51
6. CONCLUSIONES	57
7. REFERENCIAS	58

LISTA DE FIGURAS Y TABLAS

Figura 1. Esquema de la morfología de los tripanosomátidos	2
Figura 2. Ciclo de vida de <i>Leishmania</i>	3
Figura 3. Taxonomía de <i>Leishmania</i>	5
Figura 4. Distribución de los tres tipos de leishmaniasis en México por número de casos.....	7
Figura 5. Esquema de las fases de la transcripción	9
Figura 6. Elementos del promotor de la RNA polimerasa I.....	10
Figura 7. Elementos del promotor de la RNA polimerasa II.....	12
Figura 8. Elementos de los tres tipos de promotores de la RNA polimerasa III....	14
Figura 9. Diferentes complejos de iniciación de los tres tipos de promotores, reclutando diferentes factores de transcripción.....	14
Figura 10. Esquema de las tres subunidades de TFIIB.....	15
Figura 11. Regiones conservadas entre BRF1 y TFIIB	17
Figura 12. Transcripción policistrónica, <i>trans-splicing</i> y poliadenilación en los tripanosomátidos.	20
Figura 13. Análisis electroforético de proteínas extraídas con buffer RIPA.....	33
Figura 14. Western blot utilizando proteínas purificadas con el buffer RIPA y el anticuerpo anti-proteína C.....	34
Figura 15. Western blot utilizando extractos proteicos crudos y el anticuerpo anti-proteína C.....	35
Figura 16. Regiones transcritas por Pol III seleccionadas para analizar mediante qPCR.....	37

Figura 17. Regiones transcritas por Pol I y Pol II seleccionadas para el análisis qPCR.....	37
Figura 18. Análisis por PCR utilizando un gradiente de temperatura: región intergénica entre LmjF.11.0930 y el rRNA 5S, LmjF.11.0930, rRNA 18S y promotor rRNA	38
Figura 19. Análisis por PCR utilizando un gradiente de temperatura: U2 tRNA like, snRNA U2, U4 tRNA like y snRNA U4	39
Figura 20. Análisis por PCR utilizando un gradiente de temperatura: rRNA 24S α , rRNA 24S β , tRNA-Ala y tRNA-Met.....	39
Figura 21. Análisis por PCR: región intergénica entre LmjF.11.0930 y el rRNA 5S, LmjF.11.0930, promotor rRNA, rRNA 18S, rRNA 24S α , RNA 24S β , tRNA-Ala, tRNA-Met, SSR, U4 tRNA like, snRNA U4, U2 tRNA like, α -Tubulina, <i>Spliced leader</i> región intergénica, <i>Spliced leader</i> promotor, rRNA 5S, snRNA U2	40
Figura 22. Patrón de sonicación obtenido utilizando células <i>L. major</i> /BRF1-PTP	41
Figura 23. Gráfica de los resultados obtenidos de los experimentos CHIP-qPCR.	42
Figura 24. Gráfica de los resultados obtenidos de los experimentos CHIP-qPCR utilizando células silvestres (primeras tres barras) y células <i>L. major</i> /BRF1-PTP (últimas tres barras)	43
Figura 25. Análisis de inmunofluorescencia de la línea celular <i>L. major</i> /BRF1-PTP	44
Figura 26. Análisis de inmunofluorescencia con células silvestres.....	45
Figura 27. Análisis de inmunofluorescencia de la línea celular <i>L. major</i> /BRF1-PTP, utilizando anticuerpo anti Proteína C.....	46

Figura 28. Análisis de inmunofluorescencia con células silvestres, utilizando anticuerpo anti Proteína C.....	47
Figura 29. Análisis de inmunofluorescencia doble utilizando los anticuerpos anti Proteína C y anti Nop 56 en la línea celular <i>L. major</i> /BRF1-PTP	48
Figura 30. Análisis de inmunofluorescencia doble con células silvestres, utilizando los anticuerpos anti Proteína C y anti Nop56	49
Tabla 1. Regiones que se analizaron mediante PCR de punto final y qPCR.....	30

ABREVIATURAS

BRE	Elemento de reconocimiento de TFIIIB
ChIP	Inmunoprecipitación de la cromatina
CL	Leishmaniasis cutánea
CP	Núcleo del promotor o <i>core promoter</i>
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DPE	Elemento del promotor río abajo
DSE	Elemento de secuencia distal
ICR	Región de control interna
IE	Elemento intermedio
MCL	Leishmaniasis mucocutánea
mRNA	RNA mensajero
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PTP	Proteína C – TEV – Proteína A
PSE	Elemento de secuencia proximal
qPCR	PCR de tiempo real
RNA	Ácido ribonucleico
RNAi	RNA de interferencia
RNA Pol	RNA polimerasa
rRNA	RNA ribosomal
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecyl sulfato sódico

snRNA	RNA pequeño nuclear
TAF	Factor asociado a TBP
TBP	Proteína de unión a TATA
tRNA	RNA de transferencia
UBF	Upstream binding factor
UCE	Elemento de secuencia anterior
VL	Leishmaniasis visceral
WHO	Organización Mundial de la Salud

RESUMEN

Leishmania, agente causal de la Leishmaniasis, es un protozoo flagelado que se incluye en la familia de los tripanosomátidos. Este organismo también es de interés biológico-molecular, ya que presenta mecanismos de expresión genética que difieren del resto de los eucariontes. En nuestro laboratorio estamos interesados en el estudio de la transcripción de la RNA polimerasa III (Pol III), encargada de la síntesis de RNAs pequeños esenciales para la viabilidad celular, como los tRNAs, el rRNA 5S y todos los snRNAs. Para que se lleve a cabo la transcripción de Pol III se necesita de tres factores de transcripción principales: TFIIIA, TFIIIB y TFIIIC. El factor de transcripción TFIIIB es el único que se requiere para la transcripción de todos los genes, sin importar su tipo de promotor y está formado por tres subunidades conocidas como TBP, BDP1 y BRF1. En este trabajo se estudió la subunidad BRF1 de *L. major*, evaluando su interacción con las diferentes regiones promotoras de Pol III mediante ensayos de inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP) y qPCR. Nuestros resultados demostraron que BRF1 se une a las regiones promotoras de los genes del rRNA 5S y tRNA de metionina, así como a la región codificante del snRNA U2, y en menor abundancia al tRNA de alanina y al tRNA-like asociado a éste. En el caso del gen del snRNA U4, se encontró un mayor enriquecimiento en la región de tRNA-like asociado a él que en la región codificadora. De manera interesante, se observó enriquecimiento de BRF1 en la unidad del rRNA, transcrita por Pol I. También se determinó la localización celular de BRF1 mediante ensayos de inmunofluorescencia indirecta, en los que se encontró que tiene una localización preferentemente en la periferia nuclear, y que generalmente no se encuentra asociada con el nucléolo.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Generalidades de *Leishmania*

Los organismos del género *Leishmania* son protozoos flagelados pertenecientes a la familia Trypanosomatidae, del orden Kinetoplastida, al igual que otros parásitos de interés médico como *Trypanosoma cruzi*, causante de la enfermedad de Chagas, y *Trypanosoma brucei*, causante de la tripanosomiasis africana o enfermedad del sueño (Figuroa-Angulo et al., 2012). Los tripanosomátidos poseen una mitocondria única cuyo DNA, conocido como cinetoplasto, se localiza en la base del flagelo y está constituido por una compleja red de moléculas circulares (Figura 1). En este organelo se lleva a cabo la edición del RNA, un proceso que involucra la adición o delección de residuos de uridina que pueden duplicar el tamaño del transcrito y son esenciales para generar marcos de lectura abiertos, proceso descrito por primera vez en un estudio realizado en *T. brucei* (Padilla-Mejía et al., 2013; Benne et al., 1986).

Los glicosomas son un organelo exclusivo de *Leishmania* y otros tripanosomátidos; es una estructura rodeada por una sola membrana que contiene enzimas involucradas en varias rutas metabólicas, incluyendo la glucólisis, observados por primera vez en *T. brucei* (Opperdoes y Borst, 1977). Otra característica importante son los microtúbulos subpeliculares, una capa de microtúbulos que corre longitudinalmente por debajo de la membrana plasmática. La remodelación de este citoesqueleto facilita los cambios morfológicos de los diferentes estadios de desarrollo de *Leishmania* (Figura 1) (Padilla-Mejía et al., 2013). *Leishmania* presenta un ciclo de vida que involucra un hospedero vertebrado y uno invertebrado, alternando entre estadios replicativos no infectivos y estadios no replicativos infectivos (Martínez-Calvillo et al., 2012). Este parásito es el agente causal de la leishmaniasis, una enfermedad que se caracteriza por

presentar diversas manifestaciones clínicas, dependiendo de la especie que cause la infección (Montalvo et al., 2012).

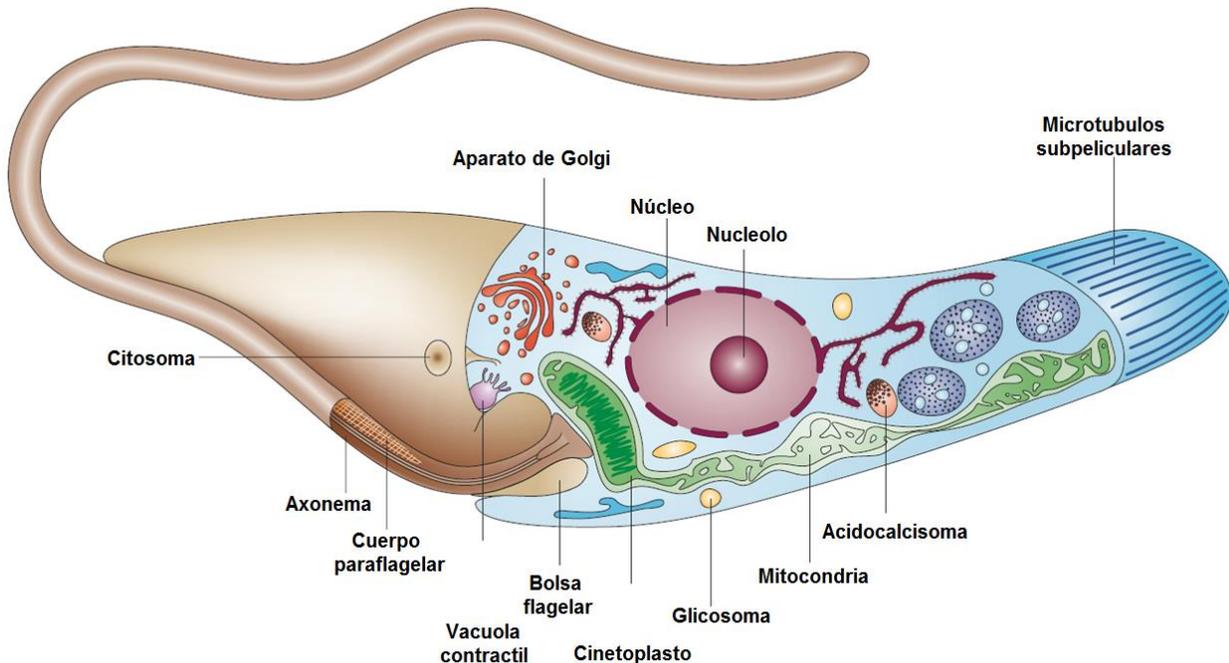


Figura 1. Esquema de la morfología de los tripanosomátidos. Tomado de Docampo et al., 2005.

1.1.1 Ciclo de vida

Todas las especies de *Leishmania* son transmitidas por la mosca de arena, perteneciente a los géneros *Phlebotomus* o *Lutzomyia*. El ciclo de vida comienza con la picadura de una mosca infectada, con la que se transmiten al hospedero mamífero los promastigotes metacíclicos, que son las formas infectivas del parásito (Figura 2). Éstas son fagocitadas por los macrófagos, residiendo inicialmente en fagosomas. Éstos son después modificados mediante la fusión con los lisosomas, resultando en la formación del fagolisosoma o vacuola parasitófora, la cual contiene enzimas hidrolíticas en un ambiente ácido favorable a la cinética digestiva. Es este cambio en las condiciones el que desencadena la

diferenciación a amastigotes, con la pérdida del flagelo, el cierre de la bolsa flagelar y una disminución en el tamaño (Figura 2) (Martínez-Calvillo et al., 2012; Handman, 2000). Al final de la diferenciación los amastigotes se dividen y son los responsables de la invasión de otros tejidos del mamífero, al ser liberados por lisis celular. Se ha reportado que *Leishmania* puede permanecer latente durante décadas o durante toda la vida del mamífero (Cohen-Freue et al., 2007).

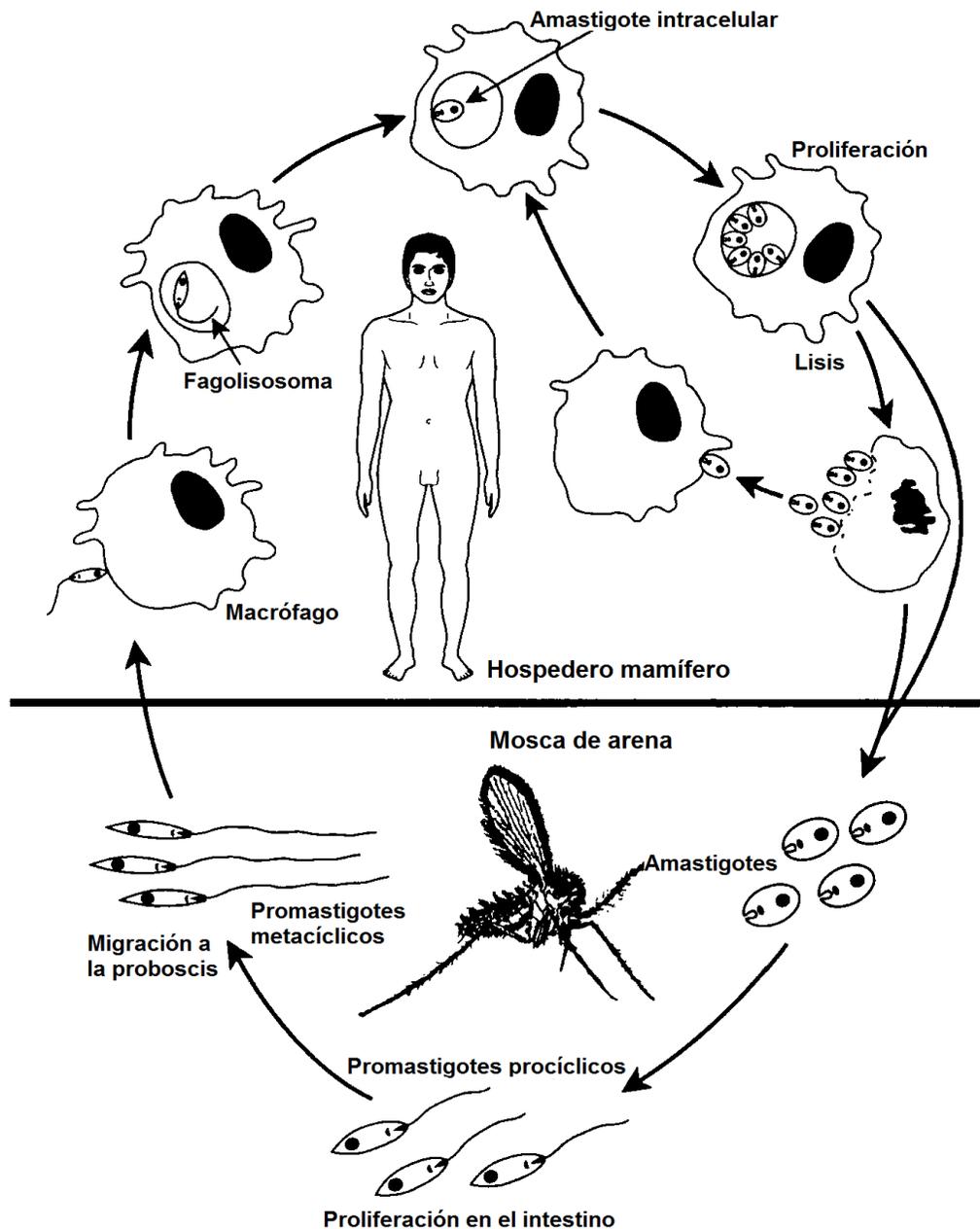


Figura 2. Ciclo de vida de *Leishmania*. Tomado de Handman, 2000.

Cuando otra mosca pica a una persona infectada puede tomar los amastigotes presentes en la sangre, y en su intestino, éstos se transforman en promastigotes procíclicos, las formas replicativas. Los promastigotes procíclicos se unen a la pared del intestino medio y después migran al aparato bucal de la mosca, donde se diferencian en promastigotes metacíclicos, que son las formas infectivas (Figura 2) (Martínez-Calvillo et al., 2012).

Leishmania ha evolucionado para sobrevivir en dos ambientes hospederos diferentes, en los cuales normalmente se destruyen agentes patógenos, por lo que ha tenido que desarrollar mecanismos para evadir la respuesta inmune, como el sistema del complemento en mamíferos y mecanismos de defensa dentro del macrófago (Cohen-Freue et al., 2007).

1.1.2 Clasificación taxonómica

Leishmania fue descrita por primera vez en 1903 por William Leishman y Charles Donovan. Hasta la fecha se han identificado más de 30 especies del género *Leishmania*, el cual se divide a su vez en tres subgéneros: El subgénero *Leishmania*, cuyas especies producen leishmaniasis cutánea y visceral; el subgénero *Viania*, que causa leishmaniasis cutánea y mucocutánea; y por último el subgénero *Sauroleishmania*, que sólo infecta a reptiles (Figura 3).

Al igual que el resto de los tripanosomátidos, los organismos del género *Leishmania* divergieron tempranamente del linaje principal eucarionte, como consecuencia presentan características inusuales a nivel citológico, genético y bioquímico (Padilla-Mejía et al., 2013).

1.1.3 Epidemiología

De las más de 30 especies de *Leishmania* descritas hasta la fecha, al menos 20 causan alguna enfermedad en el humano. La leishmaniasis es un grupo

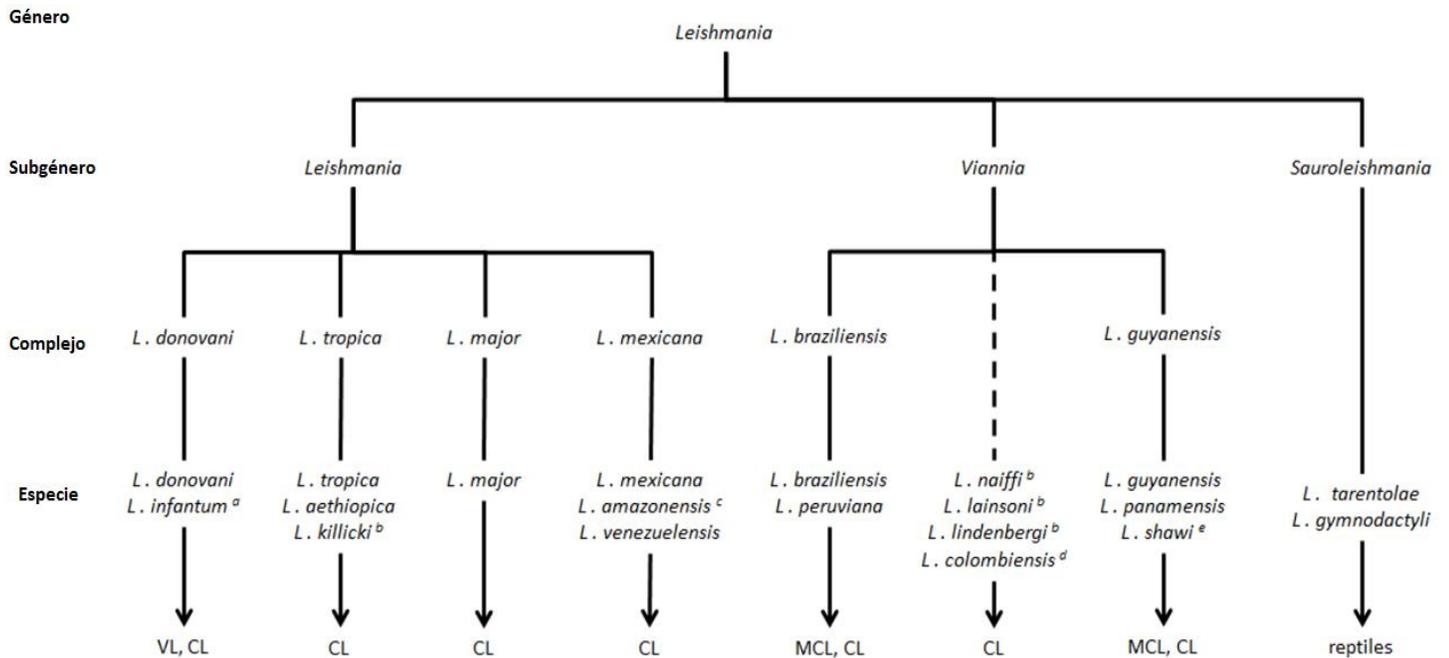


Figura 3. Taxonomía de *Leishmania*. Las especies diferentes están organizadas en tres subgéneros y varios complejos. Las variaciones clínicas producidas por las diferentes especies están señaladas: VL, leishmaniasis visceral; CL, leishmaniasis cutánea; MCL, leishmaniasis mucocutánea. Tomada de Padilla-Mejía et al., 2013.

de enfermedades que presenta manifestaciones clínicas muy diversas, dependiendo de la especie que sea responsable de la infección, y se divide en tres tipos principales: cutánea, mucocutánea y visceral (Desjeux, 2004).

La **leishmaniasis cutánea** es la más común de las tres variedades y se caracteriza por la presencia de úlceras en el sitio de picadura del insecto transmisor, y es causada por *L. major* y *L. mexicana*, entre otras especies. Más del 50% de los casos sanan sin tratamiento a los 6 meses de la infección (Hailu et al., 2016).

Las lesiones causadas por la **leishmaniasis mucocutánea** son las más desfigurantes, ya que son producto de la destrucción de las membranas mucosas de la nariz y boca, y de tejidos periféricos. Ésta es causada principalmente por *L. braziliensis*. El tratamiento para ambos tipos de leishmaniasis puede ser local o con compuestos antimoniales, dependiendo de la gravedad de las lesiones (Hailu et al, 2016).

El tercer tipo de leishmaniasis, la **leishmaniasis visceral**, es caracterizada por fiebre, pérdida de peso e inflamación de órganos como bazo e hígado, y puede llegar a ser mortal. Este tipo de leishmaniasis también es tratado con compuestos antimoniales, aunque éstos no siempre son efectivos para curarla. Diversos factores influyen en la eficacia del tratamiento, incluyendo la especie de *Leishmania* que infecte (que puede ser *L. donovani* o *L. infantum*) y el grado de avance de la enfermedad. Debido a la resistencia al tratamiento se han realizado estudios para evaluar la efectividad de la terapia combinada (Tovar y Yasnot, 2017).

Los factores que determinan las diversas manifestaciones clínicas y la severidad de la leishmaniasis han sido estudiados ampliamente. Se sabe que la especie del parásito que inicia la infección es importante, así como la susceptibilidad genética del hospedero mamífero (Handman, 2000). La leishmaniasis es endémica en 98 países, y se estima que actualmente hay más de 12 millones de personas infectadas con *Leishmania*, presentando cerca de 1.5 millones de casos nuevos anualmente y alrededor de 50,000 muertes (WHO, 2010).

En México se han reportado casos de los tres tipos de leishmaniasis (Figura 4). La leishmaniasis cutánea, producida por *L. mexicana*, se distribuye principalmente en las regiones del sur del país, como la península de Yucatán, Veracruz y Oaxaca, aunque también hay reportes en estados del centro y norte del país (Figura 4B). La leishmaniasis mucocutánea es muy escasa y se ha reportado en los estados de Oaxaca, Veracruz, Tabasco y Campeche, donde es generada por *L. braziliensis* (Figura 4C). La leishmaniasis visceral ha sido reportada en el estado de Guerrero desde 1952, pero actualmente es más abundante en Chiapas, con 141 casos entre 1981 y 2010 y un promedio de 8 a 15 casos al año, resultando en un 90% del total de los casos de leishmaniasis visceral en México (Figura 4A) (Alvar et al., 2012). Esta variedad es producida por

L. infantum, anteriormente conocida como *L. chagasi* en México (Alvar et al., 2012; Monroy-Ostria y Sanchez-Tejada, 2002).

Además de su importancia médica, los parásitos del género *Leishmania* y el resto de los tripanosomátidos son de interés en el ámbito de la biología molecular debido a los mecanismos de expresión genética que presentan, los cuales son distintos a los de otros eucariontes (Martínez-Calvillo et al., 2012). Nuestro grupo de trabajo está interesado en el estudio de la transcripción en esta familia de organismos eucariontes que se han considerado de divergencia temprana.

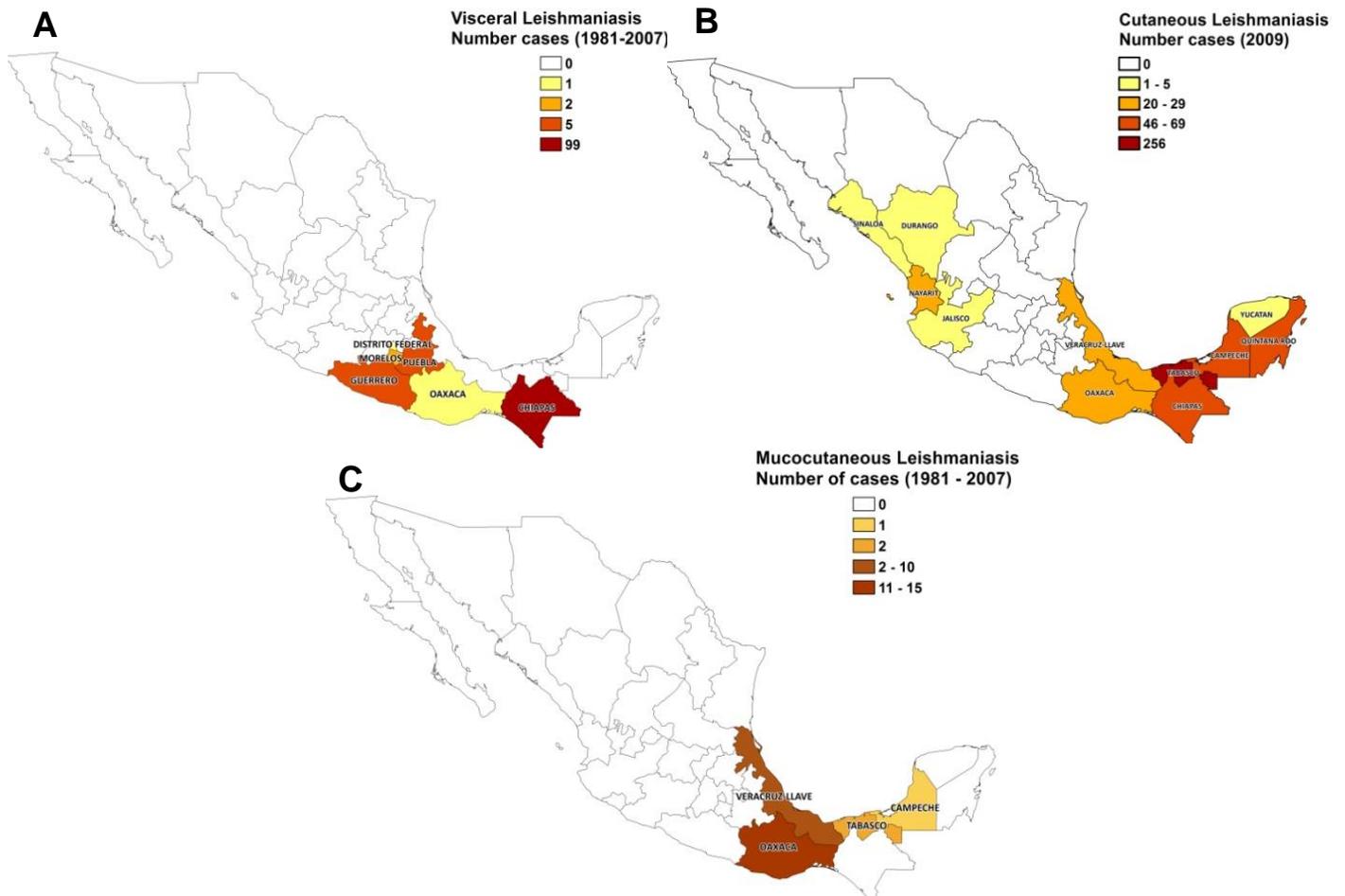


Figura 4. Distribución de los tres tipos de leishmaniasis en México por número de casos. A, leishmaniasis visceral. B, Leishmaniasis cutánea. C, Leishmaniasis mucocutánea. Tomado de Alvar et al., 2012.

1.2 Transcripción en eucariontes

La transcripción es un proceso biológico fundamental mediante el cual se sintetiza una molécula de RNA usando como molde al DNA (Das et al., 2008). La síntesis de RNA es catalizada por la enzima RNA polimerasa y consta de tres etapas: iniciación, elongación y término (Figura 5). En la iniciación, la RNA polimerasa reconoce y se une al promotor que se encuentra al inicio del gen (complejo cerrado), para después separar la doble hélice de DNA (complejo abierto). La iniciación finaliza cuando los primeros nucleótidos de la cadena de RNA han sido unidos. En la elongación, después de que varios nucleótidos han sido polimerizados, la RNA polimerasa se separa del promotor y se mueve a lo largo de la cadena molde agregando un nucleótido a la vez al extremo 3' de la cadena de RNA naciente. La RNA polimerasa mantiene aproximadamente 14 pares de bases separadas de la cadena de DNA, formando la llamada burbuja de transcripción. En la terminación, la molécula de RNA completa o transcrito primario se libera de la polimerasa y ésta se separa del DNA (Figura 5) (Lodish, 2004). Además de la RNA polimerasa, se necesitan factores de transcripción para la síntesis del RNA. Se conoce como factor de transcripción a cualquier proteína necesaria para el inicio de la transcripción que no forma parte de la RNA polimerasa. Muchos factores de transcripción actúan reconociendo sitios específicos en el DNA, aunque también pueden reconocer otros factores o a la RNA polimerasa misma (Lewin, 2004).

El producto inmediato de la transcripción se conoce como transcrito primario, el cual consiste de RNA que se extiende desde el promotor hasta la secuencia terminadora, y es casi siempre inestable. Los transcritos primarios derivados de los genes codificadores de proteínas contienen secuencias llamadas intrones, las cuales deben ser eliminados para producir los RNA mensajeros (mRNAs) maduros. La eliminación de los intrones del pre-mRNA se denomina *splicing* (Lewin, 2004).

El *splicing* ocurre en el núcleo, y está asociado a otras modificaciones de los RNAs, como la unión de un *cap* o casquete al extremo 5', que consta de una base de guanina en dirección inversa del resto de los nucleótidos, y la unión de la cola de adeninas (poli-A) de aproximadamente 200 nucleótidos, estos procesos ocurren cuando el RNA está siendo sintetizado, es decir, son co-transcripcionales. Después el RNA es transportado a través del complejo del poro nuclear hacia el citoplasma donde se encuentra disponible para la traducción (Lewin, 2004; Alberts et al., 2014).

Iniciación

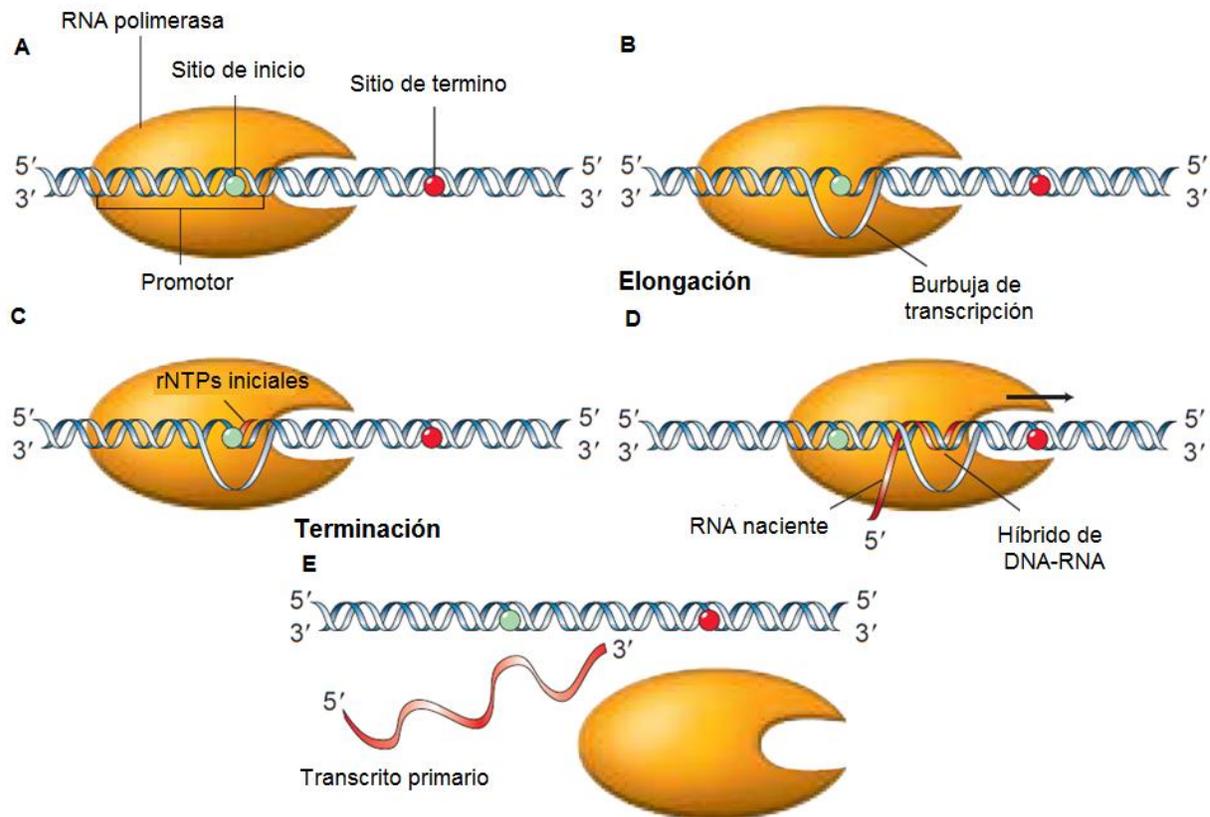


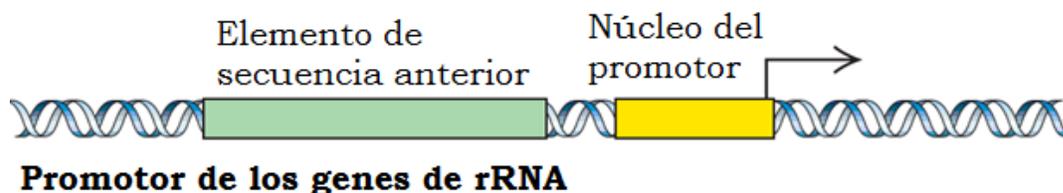
Figura 5. Esquema de las fases de la transcripción. Iniciación: A, Unión de la polimerasa al promotor generando el complejo cerrado. B, Apertura de la doble cadena de DNA en el sitio de inicio de la transcripción, formando el complejo abierto. C, unión de los primeros nucleótidos (rNTPs). Elongación: D, síntesis de la cadena de RNA. Terminación: E, En el sitio de termino, la RNA polimerasa libera a la cadena de RNA completa o transcrito primario y se separa del DNA. Tomado de Lodish, 2004.

En eucariontes existen tres tipos de RNA polimerasas: Pol I, II y III, cada una responsable de sintetizar diferentes tipos de RNA. Pol I se encarga de la síntesis de los RNAs ribosomales (rRNA) 18S, 5.8S y 28S, mientras que Pol II sintetiza los mRNAs y los RNAs pequeños nucleares (snRNAs). Pol III es la encargada de sintetizar moléculas pequeñas de RNA esenciales, como los RNAs de transferencia (tRNAs), el rRNA 5S y el snRNA U6. Los tRNA participan en la síntesis de proteínas, acarreando los aminoácidos al ribosoma. Por su parte, el rRNA 5S es un constituyente estructural y funcional de la subunidad mayor ribosomal, por lo que también participa en la síntesis de proteínas. El snRNA U6 es un componente del *spliceosoma*, cuya función es el procesamiento del pre-mRNA en el núcleo (Muller-Esterl, 2008).

Pol I, II y III tienen 14, 12 y 17 subunidades, respectivamente. Las tres comparten un núcleo de 12 subunidades compuesto por cinco polipéptidos en común (Rpb5, Rpb6, Rpb8, Rpb10 y Rpb12) y otros siete componentes parálogos. Esta estructura está presente, con algunas variaciones, en todos los linajes eucarióticos (Kwapisz et al., 2008).

1.2.1 Transcripción de la RNA polimerasa I

La RNA polimerasa I (Pol I) es una enzima muy especializada y de alta sensibilidad, ya que en la mayoría de los eucariontes sólo se encarga de la síntesis de los rRNAs 18S, 5.8S y 28S. Los genes de estos rRNAs se encuentran



Promotor de los genes de rRNA

Figura 6. Elementos del promotor de la RNA polimerasa I. Se muestra el elemento de secuencia anterior (UCE) en verde y el núcleo del promotor en amarillo. La flecha marca el sitio de inicio de la transcripción. Tomada de Lodish et al., 2004.

ordenados en tándem y son transcritos con eficiencia para cubrir las necesidades metabólicas y la demanda de ribosomas en la célula. Así, la transcripción por Pol I determina la producción de los ribosomas y el crecimiento y la proliferación celular. La secuencia del promotor de esta RNA polimerasa varía entre organismos, pero comparten una organización que comprende dos elementos: el núcleo del promotor o *core promoter* (CP) y un elemento de control anterior (UCE) (Figura 6) (Grummt, 2016).

Para que se lleve a cabo el inicio de la transcripción, se requiere de un complejo multiproteico que contiene a Pol I, además de otros factores de transcripción basales. El complejo de preiniciación se compone del *upstream binding factor* (UBF) y el factor de selectividad del promotor (nombrado TIF-IB en humanos y SL1 en ratones). UBF genera un doblez en el DNA, acercando el elemento de secuencia anterior al núcleo del promotor, y también es el encargado de reclutar a Pol I. La especificidad de unión al promotor la brinda TIF-IB/SL1, un complejo multiproteico que contiene a la proteína de unión a TATA (TBP), además de tres factores asociados a TBP específicos de Pol I (Grummt, 2016).

1.2.2 Transcripción de la RNA polimerasa II

La RNA polimerasa II (Pol II) es la encargada de la transcripción de los genes codificadores de proteínas, así como algunos snRNAs y microRNAs. Los genes transcritos por esta polimerasa generalmente tienen un núcleo del promotor o *core promoter*, que es reconocido por los factores de transcripción generales, y elementos específicos en el DNA que son reconocidos por factores reguladores, que pueden modificar la función de los factores generales (Roeder, 1996). El núcleo del promotor incluye regiones que pueden extenderse hasta 35 pares de bases (pb) río arriba o abajo del sitio de inicio de la transcripción. La mayoría de los elementos del núcleo del promotor interactúan directamente con los componentes de la maquinaria basal de la transcripción.

Los elementos principales del núcleo del promotor se definen como las regiones de DNA necesarias para que se lleve a cabo el inicio de la transcripción de Pol II, y son la caja TATA, el elemento de inicio (Inr), el elemento de promotor río abajo (DPE) y el elemento de reconocimiento de TFIIB (BRE), entre otros (Figura 7) (Smale, 2003). Se han identificado seis factores de transcripción generales para esta polimerasa: TFIIA, TFIIB, TFIID, TFIIE, TFIIF y TFIIH. El factor TFIID es el encargado del reconocimiento del promotor, y está compuesto por la proteína de unión a la caja TATA (TBP) y otras doce subunidades conocidas como TAFs. TFIIA estabiliza la unión de TBP y TAFs al DNA. TFIIB selecciona el sitio de inicio de la transcripción, mientras que TFIIF recluta a Pol II al promotor. TFIIE lleva a cabo el reclutamiento de TFIIH. Por último, TFIIH facilita el inicio de la transcripción mediante su actividad de helicasa, y al fosforilar a Pol II para activarla (Roeder, 1996).

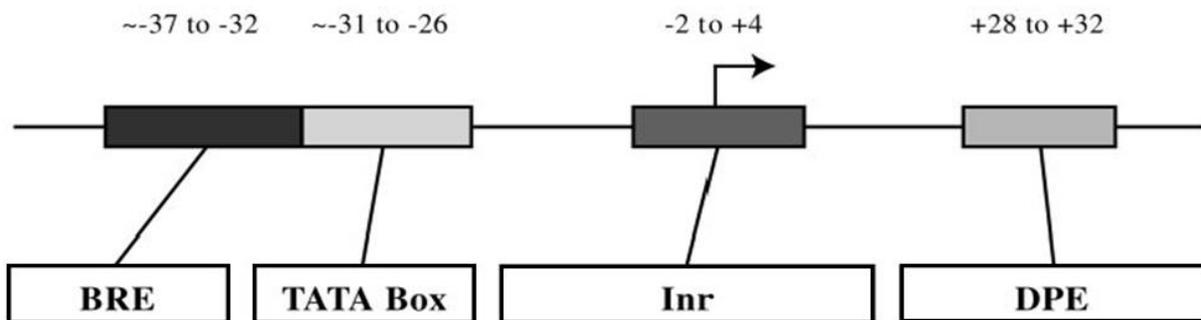


Figura 7. Elementos del promotor de la RNA polimerasa II: BRE: Elemento de reconocimiento de TFIIB. TATA box: caja TATA. Inr: elemento de inicio. DPE: Elemento del promotor río abajo. La flecha marca el sitio de inicio de la transcripción. Tomada de Smale, 2003.

1.2.3 Transcripción de la RNA polimerasa III

De las tres RNA polimerasas, Pol III es la más grande, ya que cuenta con un mayor número de subunidades. Además de transcribir a los tRNAs, al rRNA 5S y al snRNA U6, Pol III es la encargada de la síntesis de otros RNAs pequeños esenciales. Entre éstos se encuentran el componente de RNA de la RNasa P, una

endoribonucleasa encargada de procesar el extremo 5' de los tRNAs; el RNA 7SL, que forma parte del complejo ribonucleoproteico SRP o partícula de reconocimiento del péptido señal; y los RNAs bóveda, que forman parte de las bóvedas, ribonucleoproteínas citoplasmáticas implicadas en la resistencia a medicamento en tumores de humanos y se piensa que están involucradas en el ensamble y transporte de macromoléculas (Dieci et al., 2007).

Los promotores de Pol III se han dividido en tres clases principales (denominados tipos 1, 2 y 3), dependiendo de la clase de elementos que los conforman (Figura 8). El promotor del rRNA 5S es el único ejemplo de los promotores de tipo 1, siendo un promotor intragénico que consiste de una caja A, un elemento intermedio (IE) y una caja C; juntos estos elementos son parte de la llamada región de control interna (ICR) y están conservados en los promotores de diferentes especies. Los promotores de tipo 2 corresponden a los tRNAs y consisten de una caja A y una caja B localizadas dentro de la secuencia del gen. Los promotores de tipo tres se identificaron por primera vez en los genes del snRNA U6 en mamíferos, y a diferencia de los promotores de tipo 1 y 2, los elementos que los conforman se localizan río arriba del sitio de inicio de la transcripción. Éstos contienen un elemento de secuencia proximal (PSE), que es a su vez el núcleo del promotor, una caja TATA y un elemento de secuencia distal (DSE) (Figura 8) (Schramm y Hernandez, 2002).

Al igual que el resto de las RNA polimerasas, Pol III requiere de factores de transcripción para unirse a sus promotores, conocidos en este caso como TFIIIA, TFIIIB y TFIIIC. Cada tipo de promotor tiene requerimientos diferentes de factores de transcripción (Figura 9) (Geiduschek y Kassavetis, 2001). TFIIIA es específico de los genes del rRNA 5S, se une directamente a la región de control interno y es necesario para el reclutamiento de TFIIIC en este tipo de promotor. TFIIIC es capaz de reconocer el complejo TFIIIA-ICR en los promotores de tipo 1 y a las cajas A y B en los promotores de tipo 2, mientras que TFIIIB es indispensable para la transcripción de los tres tipos de promotores (Geiduschek y Kassavetis, 2001).

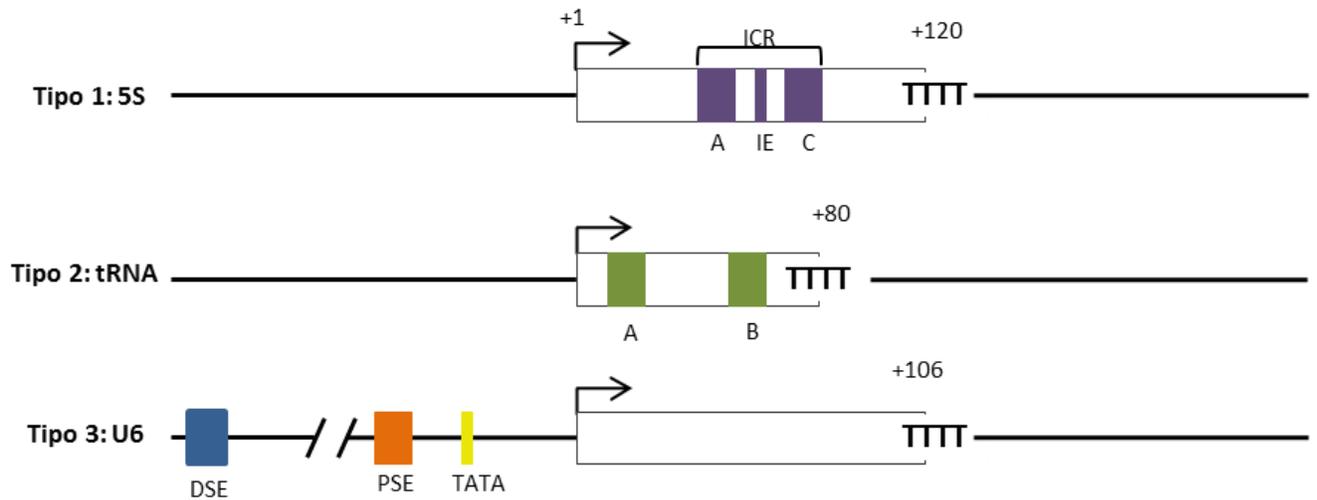


Figura 8. Elementos de los tres tipos de promotores de la RNA polimerasa III. Tipo 1: ICR, región de control interno. A, caja A. B, Caja B. IE, elemento intermedio. Tipo 2: A, caja A. B, caja B. Tipo 3: DSE, elemento de secuencia distal. PSE, elemento de secuencia proximal. TATA, caja TATA. Tomada de (Schramm y Hernandez, 2002).

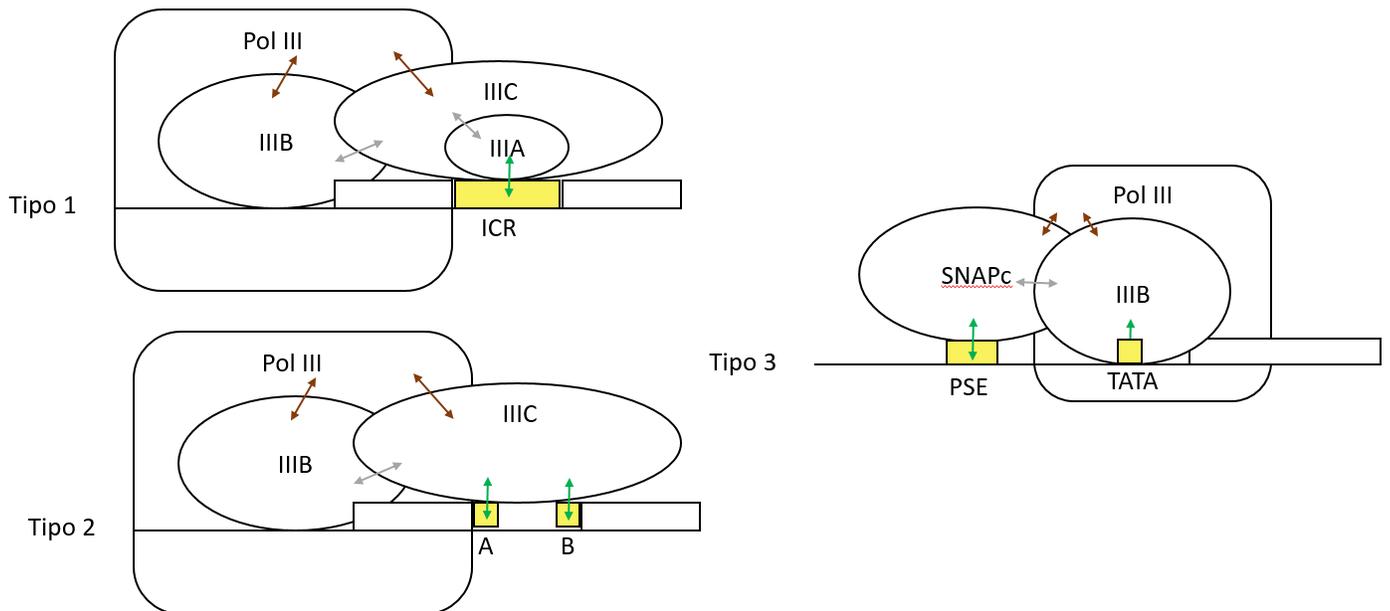


Figura 9. Diferentes complejos de iniciación de los tres tipos de promotores, reclutando diferentes factores de transcripción. Las flechas verdes indican interacciones DNA-proteína, las flechas azules indican interacciones entre factores de transcripción y las flechas marrones indican interacciones entre factores de transcripción y Pol III. Tomada de (Schramm y Hernandez, 2002).

1.2.3.1 TFIIB

TFIIB es un factor de transcripción compuesto por tres subunidades: la proteína de unión a la caja TATA (TBP), BRF1 y BDP1 (Figura 10). Este factor es indispensable para la transcripción de los tres tipos de promotores, ya que es el encargado de reclutar a la RNA polimerasa al sitio de inicio de la transcripción, para que se lleve a cabo la apertura de la burbuja de transcripción (Schramm y Hernandez, 2002).

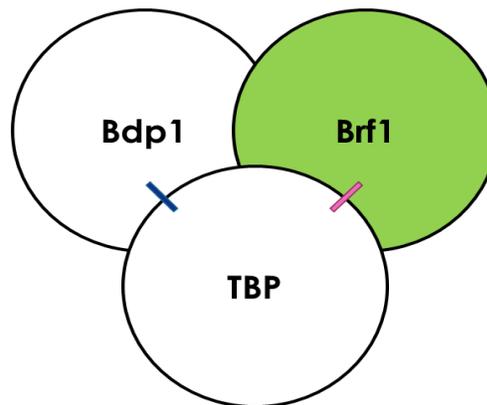


Figura 10. Esquema de las tres subunidades de TFIIB (Schramm y Hernandez, 2002).

El primer paso para el reclutamiento de TFIIB es su unión a TFIIC y el reconocimiento de la caja TATA por la proteína TBP, en el caso de los promotores de tipo 3. En los promotores de tipo 1 y 2, TBP se une a la región aledaña al sitio de inicio de la transcripción. Posteriormente el complejo formado entre estos componentes es reconocido por BRF1. Después BDP1 se asocia con el complejo ya formado mediante interacciones proteína-proteína (con BRF1 y TBP) y proteína-DNA (interactuando con la caja TATA o secuencias cercanas al sitio de inicio) (Schramm y Hernandez, 2002). Mediante interacciones del dominio C-terminal de BRF1 con la subunidad C34 de la RNA polimerasa III se lleva a cabo el reclutamiento de Pol III al sitio de inicio de la transcripción. La subunidad C34 de Pol III contiene un dominio *winged helix*, con el que interactúa con el DNA y participa, junto con C82, en la apertura del DNA (Lesniewska y Boguta, 2017).

1.2.3.2 BRF1

En *S. cerevisiae* BRF1 es la subunidad más grande del factor TFIIB de la RNA polimerasa III. Se trata de un polipéptido formado por 596 aminoácidos, con un peso aproximado de 70 kDa. Obtiene su nombre, *TFIIB-related factor 1* (BRF1), debido a las similitudes que presenta su dominio N-terminal con el factor de transcripción TFIIB de Pol II (Kassavetis y Geiduschek, 2006). BRF1 contiene, al igual que TFIIB, un dominio de unión a zinc en su región N-terminal, y un “dominio núcleo” que consiste de dos secuencias repetidas imperfectas (Figura 11). El dominio de unión a zinc es necesario para la apertura del promotor (Hahn y Roberts, 2000), mientras que las secuencias repetidas están involucradas en las interacciones de BRF1 con TBP y BDP1 (Kassavetis y Geiduschek, 2006).

Otra similitud entre TFIIB y BRF1 es que se unen a posiciones análogas en sus respectivos promotores (Geiduschek y Kassavetis, 2001). Así, los factores relacionados a TFIIB comparten varias funciones, pues son requeridos para el reclutamiento de las polimerasas al promotor y pueden unirse a TBP y al DNA (Vannini y Cramer, 2012).

BRF1 tiene un dominio C-terminal que está ausente en TFIIB (Figura 11) (Schramm y Hernandez, 2002). La secuencia de esta región de BRF1 es poco conservada. Sin embargo, en varias especies de levaduras y en humano se han identificado tres secuencias relativamente conservadas, llamadas bloques de homología I-III, cuya función no ha sido todavía dilucidada (Khoo et al., 2014).

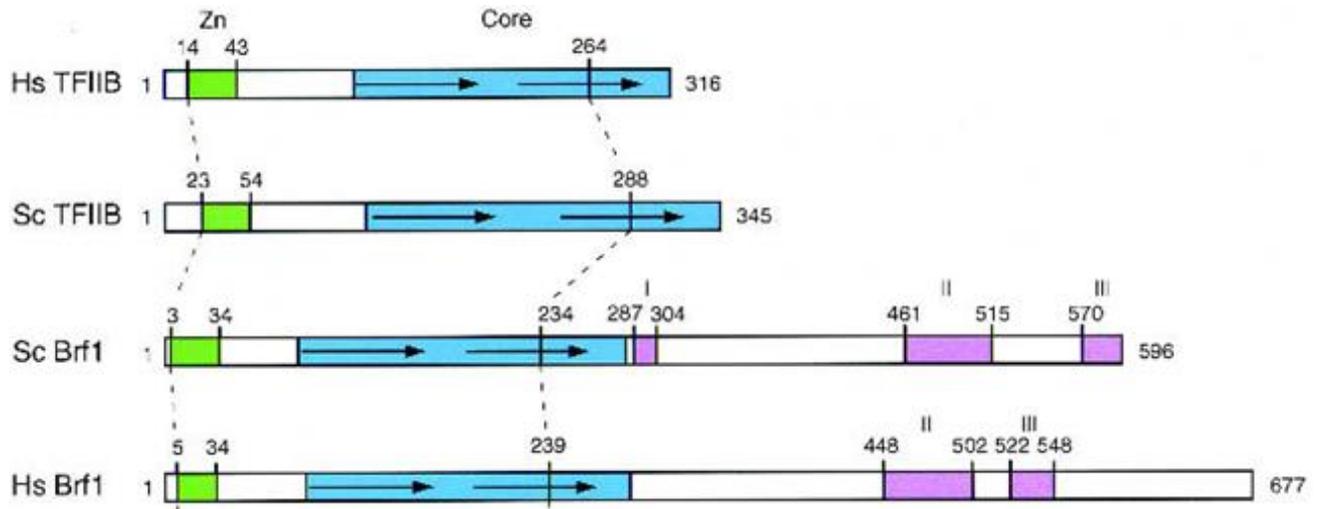


Figura 11. Regiones conservadas entre BRF1 y TFIIB en *Saccharomyces cerevisiae* (Sc) y *Homo sapiens* (Hs). El dominio *zinc binding* se muestra en verde y los repetidos se muestran con las flechas en azul. Los bloques de homología I-III se presentan en violeta. Tomada de (Schramm y Hernandez, 2002).

1.3 Expresión genética en tripanosomátidos

Los tripanosomátidos, además de ser organismos de interés médico, son de interés biológico-molecular debido a la muy particular organización de sus genes y a los mecanismos atípicos de expresión genética que presentan, incluyendo la transcripción policistrónica y el procesamiento de sus mRNAs mediante *trans-splicing*.

1.3.1 Organización genómica

En *Leishmania*, al igual que en el resto de los tripanosomátidos, los genes se encuentran organizados en grupos grandes en una misma cadena de DNA, llamados unidades policistrónicas (Martínez-Calvillo et al., 2012). Esta organización fue observada por primera vez en el cromosoma 1 de *L. major*, que contiene 85 genes organizados en dos unidades policistrónicas divergentes (Martínez-Calvillo et al., 2003). La publicación del genoma completo de *L. major* reveló que la gran mayoría de los genes están organizados de esta manera (Ivens

et al., 2005). El genoma de *L. major* está compuesto por 32.8 megabases (Mb) distribuidas en 36 cromosomas que tienen un tamaño de 0.28 a 2.8 Mb (Martínez-Calvillo et al., 2010). Cuenta con 8,421 genes codificadores de proteínas, de los cuales 14 son específicos de esta especie y codifican proteínas de función desconocida (Padilla-Mejía et al., 2013). Los genes codificadores de proteínas se encuentran separados por regiones intergénicas relativamente cortas, con un promedio de 2045 bp.

Los genes de la unidad del rRNA están organizados en tándem entre dos unidades policistrónicas del cromosoma 27. En *L. major*, los 11 genes del rRNA 5S se encuentran dispersos en el genoma, a diferencia de *T. brucei* y *T. cruzi*, en los que están organizados en tándem (Martínez-Calvillo et al., 2010). Los 83 genes de tRNA de *L. major* están distribuidos en 31 *loci*, en 19 cromosomas, y la mayoría están organizados en grupos de 2 a 10 genes que pueden contener otros genes transcritos por Pol III (Ivens et al., 2005). La distribución de éstos no parece ser al azar, como en otros organismos, ya que se encuentran confinados a un grupo de cromosomas (Martínez-Calvillo et al., 2010).

El genoma de las diferentes especies de *Leishmania* muestra una conservación notable en el orden de sus genes (sintenia), con hasta un 99% de similitud en *L. major*, *L. infantum* y *L. braziliensis*. El tamaño de los genomas de las especies de este género va de las 31.9 Mb a 32.8 Mb, mostrando además similitud en el número de genes codificadores de proteínas (Padilla-Mejía et al., 2013).

En estudios realizados para determinar si hay genes que permitan la supervivencia de *Leishmania* en los diferentes ambientes en los que desarrolla su ciclo de vida, se demostró que la expresión de la mayoría de sus genes no es diferencial, es decir, su expresión no es específica de un estadio de desarrollo durante el ciclo de vida. No se ha identificado una vía específica, ya sea en amastigotes o promastigotes, que permita la supervivencia en los diferentes hospederos. El genoma de *Leishmania* es expresado constitutivamente, y por lo

tanto puede estar adaptado para cualquiera de sus hospederos. Una alternativa para esta adaptación a los diferentes ambientes son las modificaciones post-transcripcionales y eventos de procesamiento que pueden modificar la estabilidad del RNA (Cohen-Freue et al., 2007).

En cuanto al DNA mitocondrial, éste se encuentra organizado en una red condensada en una estructura con forma de disco, posicionada cerca del cuerpo basal flagelar. Está compuesta de dos clases de moléculas de DNA circular, los maxicírculos y los minicírculos. Cada mitocondria tiene aproximadamente 50 copias de maxicírculos, con un tamaño entre 20 y 40 kb, que contienen los genes de 18 proteínas (componentes de la cadena respiratoria), 2 rRNAs y algunos RNAs guías, que participan en la edición del RNA, un proceso que involucra la inserción y delección específica de residuos de uridina que pueden duplicar el tamaño del transcrito primario y son esenciales para la generación de marcos abiertos de lectura. En cuanto a los minicírculos, hay de 5,000 a 10,000 copias de aproximadamente 2 kb de tamaño y cada uno codifica de uno a cinco RNAs guía (Liu et al., 2005; Lukes et al., 2002).

1.3.2 Transcripción policistrónica

Los genes en los tripanosomátidos se encuentran organizados en unidades policistrónicas, grupos grandes de genes localizados en la misma cadena de DNA (Figura 12). La mayoría de los cromosomas tienen al menos dos unidades policistrónicas, que pueden tener una transcripción convergente (alejándose de los telómeros) o divergente (hacia los telómeros). La transcripción, a diferencia de la mayoría de los eucariontes, es policistrónica, en la que se forman transcritos primarios largos que contienen información para la síntesis de varias proteínas. Los genes en una unidad policistrónica no codifican proteínas con funciones relacionadas y todos son transcritos al mismo nivel. Sin embargo, genes que se encuentran en una misma unidad pueden mostrar concentraciones diferentes de mRNAs maduros o pueden sólo expresarse en un estadio de desarrollo; esto se

debe a que la expresión genética en tripanosomátidos es regulada principalmente a nivel post-transcripcional (Martínez-Calvillo et al., 2010).

1.3.3 *Trans-splicing* y poliadenilación

El procesamiento de los transcritos primarios se lleva a cabo mediante *trans-splicing* y poliadenilación (Figura 12). El *trans-splicing* fue observado por primera vez en tripanosomátidos, al descubrir que todos los mRNAs de las diferentes glicoproteínas variables de superficie en *T. brucei* tenían una secuencia común de 39 bases, nombrada *spliced leader* o miniexón, en su extremo 5'. Después fue descubierto que todos los mRNAs de todos los tripanosomátidos maduran por *trans-splicing* (Liang et al., 2003; Boothroyd y Cross, 1982).

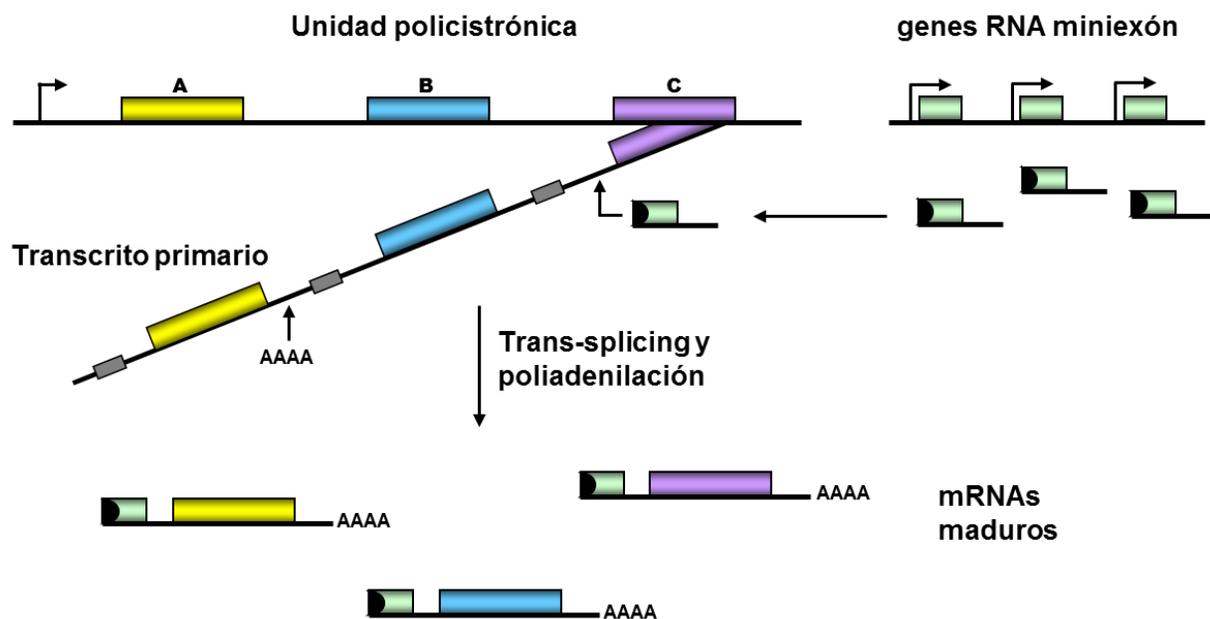


Figura 12. Transcripción policistrónica, *trans-splicing* y poliadenilación en los tripanosomátidos. Tomada de Martínez-Calvillo et al., 2012

El miniexón se agrega en un sitio aceptor en el pre-mRNA que se encuentra de 30 a 70 bases río arriba del sitio de inicio de la traducción (Agabian, 1990). Además del sitio aceptor, es importante una región rica en pirimidinas, ubicada río arriba de éste, que también es necesaria para el proceso de poliadenilación de la

secuencia codificante río arriba (Martínez-Calvillo et al., 2012). En general hay entre 100 y 400 bases entre el sitio de poliadenilación del gen río arriba y el sitio donde se lleva a cabo el *trans-splicing* del gen río abajo (Blumenthal, 1998). La secuencia del miniexón contiene el cap en su extremo 5', que es necesario para brindar estabilidad a los mRNAs (Blumenthal, 1998).

Los procesos de *trans-splicing* y *splicing* están relacionados. Se ha demostrado que homólogos de las ribonucleoproteínas pequeñas nucleares (snRNP) que catalizan el *splicing* en eucariontes superiores (U1, U2, U4, U5 y U6) funcionan en el *trans-splicing* de tripanosomátidos (Blumenthal, 1998). Sin embargo, a diferencia del *splicing*, en el que se forma una estructura intermediaria conocida como lazo, en el *trans-splicing* se forma una estructura con forma de "Y" (Martínez-Calvillo et al., 2012). La mayoría de los genes de los tripanosomátidos no tienen intrones. De hecho, sólo se ha encontrado un gen con un intrón en el que se lleva a cabo *splicing*, lo que indica que el *trans-splicing* y el *splicing* coexisten en estos organismos (Liang et al., 2003).

1.3.4 Antecedentes

En *Leishmania*, como en otros organismos, Pol III se encarga de la síntesis de RNAs pequeños esenciales como el rRNA 5S y los tRNAs. Sin embargo, a diferencia de otros organismos, en tripanosomátidos Pol III se encarga de sintetizar todos los snRNAs (no sólo el snRNA U6). De manera interesante, los genes de snRNAs tienen un tRNA contiguo en su extremo 5' y se ha demostrado que las cajas A y B de estos tRNAs son esenciales para la expresión de los snRNAs (Nakaar et al., 1994).

En el caso del snRNA U2 de *L. major*, al caracterizar su promotor se confirmó la importancia de cajas A y B contenidas en un tRNA-like y tRNA asociados a éste. Aunque se desconoce cómo actúan estas secuencias, se ha propuesto que las cajas A y B de estos tRNAs pueden regular la expresión de los

snRNAs mediante un mecanismo indirecto que involucra la unión de factores de transcripción al gen de tRNA, resultando en cambios en la estructura de la cromatina que permiten la transcripción del snRNA (Rojas-Sánchez et al., 2016).

Los promotores de los otros genes transcritos por Pol III, como el 5S y los tRNAs, no han sido caracterizados, pero análisis de sus secuencias demostraron que contienen las regiones de control interno típicas de otros eucariontes (Padilla-Mejía et al., 2009).

Se sabe muy poco sobre los factores de transcripción de la Pol III en tripanosomátidos. De los tres factores de transcripción generales, TFIIIA, TFIIIB y TFIIIC, sólo TFIIIB ha sido identificado.

En un estudio realizado por Vélez-Ramírez y colaboradores (2015), se reportó la presencia de un ortólogo de la subunidad BRF1 de TFIIIB en *T. brucei* (TbBRF1). TbBRF1 presenta los dominios típicos de los ortólogos de BRF1: el dominio de unión a zinc y los dos repetidos de ciclina en la región N-terminal, así como el primer bloque de homología en la región C-terminal de la proteína. Con líneas celulares *knock down* de TbBRF1 generadas mediante RNA de interferencia (RNAi) se demostró que es esencial para viabilidad celular, ya que después de dos días de la inducción del RNAi las células dejaron de crecer y se produjo una reducción considerable en los transcritos de Pol III, con lo que se demostró que TbBRF1 participa en la transcripción de ésta, además de estar localizado en el núcleo.

Para continuar con el estudio de BRF1 en los parásitos tripanosomátidos, en el presente trabajo se realizaron ensayos de inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP) para confirmar la unión de BRF1 a los promotores de Pol III en *L. major*. Para estos experimentos se empleó una línea celular que expresa a la proteína BRF1 fusionada a la bandera PTP (Flores, 2011). Esta bandera consiste en dos epítomos de proteína A, uno de proteína C y un sitio de corte de la

proteínasa TEV. Los ensayos ChIP se llevaron a cabo con un anticuerpo que reconoce el epítipo de ProtA presente en la bandera PTP. También se realizaron ensayos de inmunofluorescencia indirecta para determinar la localización celular de BRF1 en promastigotes de *L. major*.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo general

- Demostrar que BRF1 se une a las regiones promotoras de la RNA Polimerasa III en promastigotes de *L. major*.

2.2 Objetivos particulares

- Verificar la expresión de la proteína recombinante BRF1-PTP.
- Analizar la unión de BRF1 a regiones promotoras de Pol III mediante ensayos CHIP y qPCR.
- Demostrar la localización nuclear de BRF1 por medio de experimentos de inmunofluorescencia indirecta.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Cultivo y conteo de organismos

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

El conteo de los organismos se realizó con la cámara de Neubauer, empleando 10 µL de una dilución 1:10 del cultivo con formaldehído al 2%, contando el número de parásitos en los cuadros en diagonal de cada cuadrante. El resultado se multiplicó por 10⁴, para obtener el número de parásitos por mL.

3.2 Extracción de proteínas

Se realizó la extracción de proteínas empleando el buffer RIPA, para lo que se partió de una muestra de 500×10⁶ de células de las líneas celulares *L. major*/BRF1-PTP, *L. major*/Elp3b-PTP y *L. major* silvestre, las cuales fueron centrifugadas a 4000 rpm por 10 min y lavadas con 500 µL de PBS frío dos veces. Se adicionó el volumen necesario de buffer RIPA, preparado con buffer TEN (Tris/EDTA/NaCl), NP40 1%, deoxicolato 0.5%, SDS 0.1% e inhibidores de proteasas 1×; para que la concentración final fuera de 5×10⁶ células por µL. Las muestras se incubaron en hielo por 30 min agitando con vórtex cada 5 min, y se centrifugaron 14,000 rpm durante 20 min a 4°C. La fracción soluble se almacenó a -70°C y se cuantificó la proteína por el método de Bradford.

3.3 Electroforesis en gel de poliacrilamida

Para verificar la concentración y la integridad de las proteínas obtenidas se realizó una electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE), en la cual se emplea un gel separador de poliacrilamida (Promega) al 10% con Tris-HCl 1.9 M, SDS 0.5%, TEMED 0.25% y glicerol 25%; y un gel concentrador de poliacrilamida al 3.9% con Tris-ácido fosfórico 160.6 mM pH 6.8, SDS 0.12%, azul de bromofenol 0.55% y TEMED 0.06%. El gel fue teñido con azul de comassie y se empleó el marcador de peso molecular CSL-BBL Blue eye de Cleaver Scientific.

3.4 Ensayos Western blot

Se realizó una electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE), como se describió anteriormente.

Las muestras se prepararon con 20×10^6 células cada una, se centrifugaron a 5000 rpm y las pastillas se lavaron con PBS, para ser resuspendidas en PBS + buffer Laemmli 1× (Tris-HCl 83 mM pH 6.8, SDS 118 mM, azul de bromofenol 99.5 μ M, glicerol 33.3%). Las líneas celulares empleadas fueron: *L. major*/BRF1-PTP, *L. major*/ELP3-PTP como control positivo y *L. major* silvestre como control negativo. También se utilizaron 20 μ g de las proteínas extraídas anteriormente y se resuspendieron en PBS + buffer Laemmli para obtener un volumen final de 20 μ L. Además de las muestras, se cargó el marcador de peso molecular CSL-BBL Blue eye de Cleaver Scientific.

Se llevó a cabo la transferencia a membranas de PVDF (Immun-Blot™ PVDF, BIO-RAD) utilizando buffer de transferencia (Tris base 25 mM, glicina 191.8 mM, metanol 20%) con pH 8.3. La membrana fue bloqueada con una solución de leche descremada al 5% y PBS Tween 0.1% toda la noche a 4°C. El anticuerpo utilizado fue Anti-Proteína C (Delta biolabs), que reconoce al epítipo de Proteína C de la bandera PTP, con una dilución 1:3000.

Se empleó el kit de detección Immobilon Western de Millipore para el revelado.

3.5 Diseño de oligonucleótidos

Se seleccionaron 17 regiones génicas a analizar, de las cuales 8 son regiones transcritas por Pol III y 9 son regiones transcritas por Pol I y Pol II que se utilizaron como controles negativos (Figuras 16 y 17). Las secuencias de las diferentes regiones se obtuvieron de la base de datos del genoma de *L. major* (TritrypDB: <http://tritrypdb.org/tritrypdb/>).

Para amplificar por PCR cada una de las regiones seleccionadas fueron diseñados oligonucleótidos, con un tamaño de 15 a 25 pb y un contenido de G-C no mayor a un 55 %, para amplificar fragmentos de entre 100 y 200 pb.

3.6 Extracción de DNA genómico

Se emplearon 3×10^8 células de *L. major* silvestre y se llevó a cabo la extracción del DNA con el método de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico, para lo que se centrifugaron las células a 5,000 rpm durante 10 min a 4°C y se resuspendió la pastilla en 5 mL de buffer de lisis, preparado con 5 µL de SSC 1× (NaCl 3M y citrato de sodio 0.6 M), 5 mL de TNE pH 8.0 (Tris 40 mM, EDTA 1mM y NaCl 15 mM), sarcosyl 0.5% y 100 µg de proteinasa K. Se agitó las muestras utilizando un vórtex (Daigger Genie 2) y se mantuvieron a 55°C por 2 h.

Posteriormente se adicionó 0.5 volúmenes de fenol y 0.5 volúmenes de cloroformo y se centrifugó a 4,000 rpm durante 10 min a 4°C. La fase superior acuosa se transfirió a un tubo nuevo y se precipitó con 0.1 volúmenes de acetato de sodio 3 M y 2.5 volúmenes de etanol absoluto a -20°C toda la noche. Al día siguiente se centrifugó la muestra a 9,000 rpm durante 15 min a 4°C y se lavó la pastilla dos veces con etanol al 70%. El DNA se resuspendió en 300 µL de Tris-

EDTA pH 7.8 (Tris-HCl 10 mM y EDTA 0.2 mM). La concentración del DNA obtenido se evaluó mediante espectrofotometría a 260 nm y electroforesis en geles de agarosa al 1%.

3.7 PCR punto final

Para verificar que los oligonucleótidos de las regiones seleccionadas amplificaran una sola banda, se realizaron múltiples ensayos de PCR utilizando diferentes temperaturas de hibridación para estandarizar las condiciones de la reacción. En todas las reacciones se utilizaron 100 ng de DNA genómico de la línea celular *L. major* wild type como molde y se llevaron a cabo en tubos de PCR, con buffer KAPA Tap PCR con MgCl₂ 2 mM (1×), mezcla de dNTPs (200 μM), oligonucleótidos sentido y antisentido (200 μM) y 1 unidad de DNA polimerasa KAPA Taq (Promega), en un volumen final de 50 μL.

Todas las reacciones se realizaron con 40 ciclos que incluyeron el paso de desnaturalización a 96°C por un min, la hibridación, en la que se emplearon gradientes de 50°C a 65°C dependiendo de la región a analizar, durante 30 segundos y la extensión a 72°C por 30 segundos. Se realizaron en un termociclador Bio-Rad T100. Las regiones que se analizaron y la secuencia de los oligonucleótidos utilizados se muestran en la tabla 1.

3.8 Electroforesis en geles de agarosa

Los productos de las reacciones de PCR y de la extracción de DNA genómico fueron analizados en geles de agarosa (Agarose D-1 low EEO PRONADISA) preparados a una concentración de 1.2% con buffer TBE 0.5× (Tris-base-HCl 5.4%, ácido bórico 2.74% y EDTA 0.46%) y teñido con Midori Green

RNA polimerasa	Región amplificada	Secuencia del oligonucleótido	Tamaño del producto
Pol I	Promotor rRNA	TTGTTTGGGTGGAGGTGAGA	111 pb
		CAAATCATCAAACCCGTTC	
Pol I	18S rRNA	CATGCATGCCTCAGAATCAC	116 pb
		CGTTTCGCCAAGTTATCCAA	
Pol I	24S α rRNA	GGGCTCATTCTCGATACGTG	112 pb
		GTGGATTCCGTTGGTGAGTTG	
Pol I	24S β rRNA	TTCCGGAGTCTTGTTCGAG	113 pb
		GAGATTTCTGTTCCCACTGAGC	
Pol II	α -Tubulina	GGTCGTAGATGGCCTCATTG	146 pb
		AGAAGTCCAAGCTCGGCTACAC	
Pol II	LmjF.11.0930	AGCAGCAGTTCATTGAGGCT	111 pb
		GCCGATCATCATCCTCTAAG	
Pol II	Promotor <i>Spliced leader</i>	GAGCGCGGTGGGCATGACA	98 pb
		AAGCCATCACCACCGCAGC	
Pol II	<i>Spliced leader</i> región intergénica	TGTGCGTGCGTGTGGTGGT	93 pb
		CGGGCGCACCCCTTGCAGT	
Pol II	Región SSR del cromosoma 1	AATCACAGCACGCATACACG	107 pb
		GCGTCATGGCTTCACTAACAG	
Pol III	5S rRNA	GAGTACGACCACACTTGAGTG	118 pb
		TGAAAACACCATATCCCGT	
Pol III	U4 tRNA-like	GAAAAAAGGAGCGCCGCCCA	189 pb
		CGCAAGGCTTGCCTTGGGTGT	
Pol III	U4	AAGCCTTGCGCAGGGAGATGT	130 pb
		ATCTAGAGACAAAAAGTGTTCCCCACC	
Pol III	tRNA alanina	ATTGGGACGTTACCGCGTCCG	130 pb
		ATTGCGGCCAGGCCTTTCA	
Pol III	U2 tRNA-like	CCGAGAAGATATGTTAGTACCACC	192 pb
		AGGAAAAGATGCTTTCGACGAG	

Pol III	U2	AAACGTGGAACTCCAAGGAA	127 pb
		TATCTTCTCGGCTATTTAGC	
Pol III	tRNA metionina	AAAGTTTGCACCGGTGAG	101 pb
		CACAACTTTCACCTCGTAGCCG	
	Región intergénica entre la proteína 11.0930 y el rRNA 5S	GAACTTGGGAATGCCTTCTG	121 pb
		GCAAGAAGAATGTGGAACGG	

Tabla 1. Regiones que se analizaron mediante PCR de punto final y qPCR. Los controles negativos corresponden a las regiones codificadas por las RNA polimerasas I y II.

Advance. La polimerización de los geles tomó 20 min y se corrieron con TBE 0.5× en una cámara de electroforesis Gel XL Ultra V-2 Labnet, durante 25 min a 100 V. Las muestras se prepararon con buffer de carga 6×, y se empleó un marcador de peso molecular (1Kb plus de Invitrogen). Los geles fueron fotografiados en un sistema de documentación de geles Bio Sens SC645 con el software PS Remote V 1.6.3 y analizados con el programa Bio Sens Image System V 1.7.6.

3.9 Inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP)

Se usaron 120×10^6 células de *L. major*/BRF1-PTP que fueron lavadas con PBS frío, empastilladas por centrifugación y fijadas con PBS-formaldehído al 1% por 5 min a 37°C. Esta reacción fue detenida adicionando glicina (125 mM), y las células fueron lavadas con PBS y empastilladas por centrifugación. Después, las células se resuspendieron en buffer de lisis (10mM Tris-HCl pH 7.5, 3mM CaCl₂, 2 mM MgCl₂) con inhibidores de proteasas 1× (Sigma), la lisis de las células se llevó a cabo usando un sonicador tipo politrón (Sonics Vibra Cell VCX130) (15 s on/off, 40% amplitud) por 5 min. Los núcleos fueron limpiados usando un colchón de sacarosa (340 mM) y se empastillaron a 4°C. La pastilla fue resuspendida en buffer de sonicación (1% SDS, 10 mM EDTA, 50 mM Tris-HCl pH 8.1). La cromatina fue sonicada para obtener un tamaño promedio de DNA de entre 200 y 500 pb usando un sonicador bioruptor (Diagenode Bioruptor UCD-200) (30 s

on/off, high intensity) por 40 ciclos. Posteriormente, la cromatina fue diluida en buffer de dilución (0.01% SDS, 1.1% Tritón X-100, 1.2 mM EDTA, 16.7 mM Tris-HCl pH 8.1, 167 mM NaCl) con inhibidores de proteasas 1× (Sigma y Roche). El material sonificado fue preclareado con agarosa con proteína A/G (Santa Cruz Biotechnology) por 1 h a 4°C en rotación, para disminuir cualquier interacción inespecífica entre la agarosa y el DNA. El 10% de la cromatina fue tomado como INPUT. Se utilizaron 20 µg de anticuerpo anti-ProtA (Sigma-Aldrich) y fue incubado en rotación toda la noche a 4°C con la cromatina. Los complejos proteína-DNA fueron incubados por 1 h usando agarosa con proteína A/G (Santa Cruz Biotechnology) y se adicionó DNA de espermatozoos de salmón sonificado y se lavó con los siguientes buffers: Low Salt Wash Buffer (0.1% SDS, 1% Tritón X-100, 2 mM EDTA, 20 mM Tris-HCl pH 8.0, 150 mM NaCl); High Salt Wash Buffer (0.1% SDS, 1% Tritón X-100, 2 mM EDTA, 20 mM Tris-HCl pH 8.0, 500 mM NaCl); LiCl Wash Buffer (10 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM EDTA, 1% NP-40, 1% Deoxycolate, 250 mM LiCl) y TE Buffer (10 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM EDTA). Los complejos fueron eluidos de las perlas después de lavar con Elution Buffer (1% SDS, 100 mM NaHCO₃) y se revirtió el cross-link con NaCl (200 mM) a 65°C por toda la noche. Finalmente, se hizo un tratamiento con RNasa A, el DNA fue precipitado y purificado usando acetato de sodio y etanol absoluto para ser cuantificado. El experimento fue realizado por duplicado.

3.10 PCR cuantitativo (qPCR)

Se analizó el material inmunoprecipitado mediante PCR de tiempo real, analizando los materiales inmunoprecipitados y el INPUT con los oligonucleótidos enlistados en la tabla 1, en la que las regiones transcritas por Pol I y Pol II sirvieron como controles negativos. Estos experimentos se llevaron a cabo con el kit Platinum SYBR Green qPCR Super-Mix-UDG (Invitrogen) con las siguientes condiciones de reacción: 2 ng de DNA inmunoprecipitado como templado, 7.5 µL de la solución Super-Mix, 0.3 µL de cada uno de los oligonucleótidos sentido y antisentido (10 µM), en un volumen final de 15 µL. Se utilizó un termociclador

Corbett Research Rotor Gene 3000. Todas las reacciones se realizaron por duplicado y la especificidad de la amplificación fue analizada con las curvas de desnaturalización. El método utilizado para conocer las veces de enriquecimiento fue $2^{-\Delta\Delta Cq}$ (Livak y Schmittgen, 2001).

3.11 Inmunofluorescencia indirecta

Para los experimentos de inmunofluorescencia se utilizaron 7×10^6 células *L. major*-BRF1-PTP y *L. major* silvestre. Las células fueron lavadas en PBS y empastilladas, para después ser adheridas a portaobjetos tratados con Poly-L-Lisina por 15 min. Posteriormente fueron fijadas por 30 min a 4°C usando PBS con paraformaldehído al 4% y se lavaron con PBS. Las células fueron permeabilizadas con 0.1% Tritón X-100 por 10 min y bloqueadas usando PBS-BSA 2% por 30 min. Las diluciones de los anticuerpos fueron las siguientes: Histona H4 1:400 (Abcam ab7311), Nop56 1:100 y Proteína C (Delta biolabs) 1:25; la incubación fue por 2 h y se hicieron lavados con PBS. Los anticuerpos secundarios fueron Goat Anti-Rabbit Alexa 488 (Lifetechnologies) y Anti-Mouse Alexa 568 (Thermo Fisher scientific) ambos con una dilución 1:500. Las imágenes se obtuvieron con un microscopio de fluorescencia Carl Zeiss Axio Vert.A1 y se utilizó el software Zen de Carl Zeiss para el procesamiento de las imágenes.

4. RESULTADOS

4.1 Verificación de la expresión de la proteína recombinante BRF1-PTP

En nuestro laboratorio fue generada previamente una línea celular de *L. major* que expresa la proteína BRF1 fusionada a la bandera PTP (Flores, 2011). Para confirmar que dicha línea celular continua expresando de forma eficiente la proteína recombinante BRF1-PTP se procedió a la realización de un experimento Western blot. Para ello se efectuó la extracción de proteína total de la línea celular *L. major*/BRF1-PTP con el buffer RIPA. Además, para usar como control, también se extrajo proteína total de un cultivo de *L. major* silvestre (*wild type*) y de un cultivo de *L. major* que expresa la proteína recombinante ELP3-PTP. Alrededor de

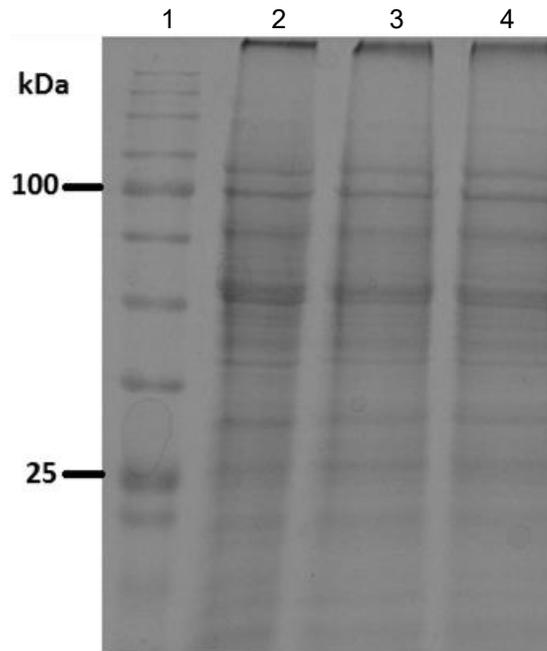


Figura 13. Análisis electroforético de proteínas extraídas con buffer RIPA. En el carril 2 se encuentra *L. major* wild type, en el carril 3 *L. major*/BRF1-PTP y en el carril 4 *L. major*/ELP3-PTP. Gel de poliacrilamida al 10% teñido con azul de comassie. En el carril 1 se muestra el marcador de peso molecular, que corresponde a CSL-BBL Blue eye de Cleaver Scientific.

20 µg de cada muestra proteica fueron analizados en un gel de poliacrilamida, observándose en los tres casos la integridad de las muestras (Figura 13). También se purificó proteína total de cultivos de *T. brucei* silvestre y *T. brucei*/TbZ5-PTP, los cuales también serían usados como controles (datos no mostrados).

Posteriormente se realizaron ensayos para estandarizar las condiciones de los Western blot en los que se probaron diferentes soluciones de bloqueo (BSA y leche descremada) y tiempos de exposición. Además, se probaron 3 diferentes anticuerpos que reconocen la bandera PTP: anti-Proteína A, anti-Proteína C y PAP (datos no mostrados). El anticuerpo que dio un mejor resultado fue anti-proteína C, por lo que se decidió utilizarlo en los ensayos posteriores.

Se utilizó un total de 20 µg de proteínas purificadas de cada línea celular (Figura 14) y también se llevó a cabo un ensayo utilizando extractos proteicos crudos (20×10^6 células lisadas) (Figura 15). Las muestras se corrieron en gels de poliacrilamida al 10%. En ambos casos se utilizó leche al 5% como solución de bloqueo y anticuerpo anti-Proteína C.

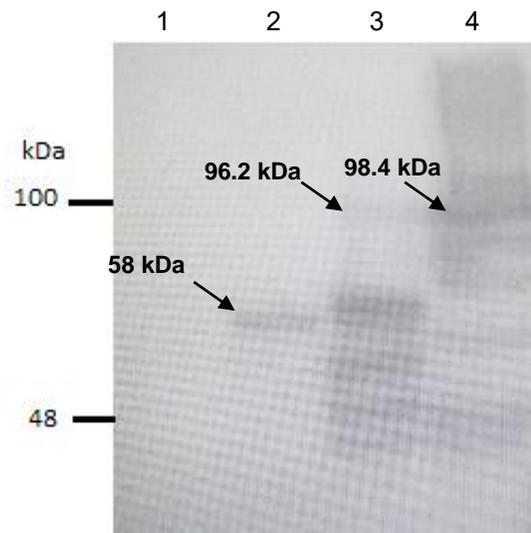


Figura 14. Western blot utilizando proteínas purificadas con el buffer RIPA y el anticuerpo anti-proteína C. Se utilizó leche al 5% como solución de bloqueo. Los pesos moleculares se encuentran a la izquierda. En el carril 1 se encuentra *T. brucei* wild type (control negativo), en el carril 2 *T. brucei*/TbZ5-PTP; en el carril 3 se encuentra la línea celular *L. major*/BRF1-PTP y en el carril 4 *L. major*/ELP3-PTP.

Los pesos moleculares predichos de las proteínas de interés son de 77.1 kDa y 79.3 kDa para BRF1 y ELP3, respectivamente. Al estar unidas a una bandera PTP, la cual tiene un peso molecular de 19.1 kDa, las bandas que se esperan son de 96.2 kDa para BRF1-PTP y 98.4 kDa para ELP3-PTP. El caso del control de *T. brucei*/TbZ5-PTP, se espera una banda con un tamaño de 58 kDa, incluyendo la bandera PTP.

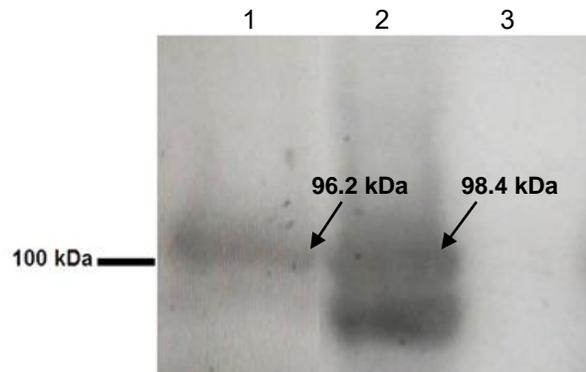


Figura 15. Western blot utilizando extractos proteicos crudos y el anticuerpo anti-proteína C. Se utilizó leche al 5% como solución de bloqueo. El peso molecular se encuentra a la izquierda. En el carril 1 se encuentra *L. major*/BRF1-PTP y en el carril 2 *L. major*/ELP3-PTP. *L. major wild type* se utilizó como control negativo (carril 3).

En todos los casos, incluido BRF1-PTP se logró ver la banda de la proteína de interés (Figuras 14 y 15). En algunos carriles se observaron bandas adicionales de menor tamaño las cuales pueden ser productos de degradación. Con estos experimentos pudimos concluir que nuestra línea celular de estudio expresa de manera correcta la proteína recombinante BRF1-PTP. Entonces se procedió a la realización de los ensayos ChIP.

4.2 Selección de las regiones a analizar mediante ensayos ChIP

Se seleccionaron 16 regiones a analizar mediante ensayos ChIP, de las cuales siete son transcritas por Pol III y nueve por Pol I o Pol II. Si bien en otros organismos BRF1 participa sólo en la transcripción de Pol III, no podemos

descartar que BRF1 también participe en la transcripción de las otras dos RNA polimerasas en *L. major*, tomando en cuenta que en ese parásito la transcripción es atípica.

Para los genes transcritos por Pol III se seleccionaron regiones que representan a los tres tipos de promotores: genes del rRNA 5S (tipo 1), genes de tRNA de metionina (tRNA-Met) y alanina (tRNA-Ala) (tipo 2), y genes de los snRNAs U2 y U4 (tipo 3) (Figura 16). Los genes del rRNA 5S están distribuidos en 11 *loci* de 6 cromosomas diferentes (5, 9, 11, 15, 21 y 23), y se diseñaron oligonucleótidos para la amplificación de todas las copias del gen (Tabla 1), cuya secuencia es casi idéntica. Con respecto a los genes de tipo 2, el tRNA-Met se localiza en el cromosoma 11, y el tRNA-Ala en el cromosoma 31. La mayoría de los genes de tRNA en *L. major* están organizados en grupos de 2 a 10 genes, que pueden contener otros genes transcritos por Pol III y generalmente se encuentran flanqueando las unidades policistrónicas (Martínez-Calvillo et al., 2010). En *L. major* la expresión de los genes de los snRNA está regulada por genes de tRNA o tRNA-like que se localizan en las inmediaciones de los snRNA (Ivens et al., 2005; Rojas-Sánchez et al., 2016). Por ello además de las regiones codificadoras de los snRNA U4 (ubicado en el cromosoma 36) y snRNA U2 (cromosoma 31), se decidió analizar las regiones tRNA-like contiguas (Figura 16).

Una característica de los genes de rRNA en tripanosomátidos es la fragmentación del rRNA tipo 28S en seis moléculas independientes (24S α , 24S β , S1, S2, S4 y S6) (Martínez-Calvillo et al., 2009). Como secuencias representativas de Pol I se seleccionaron los genes de los rRNA 18S, 24S α y 24S β del cromosoma 27, así como la región promotora de éstos, que se encuentra 1043 pb río arriba del sitio de inicio de la transcripción (Figura 17) (Martínez-Calvillo et al., 2001).

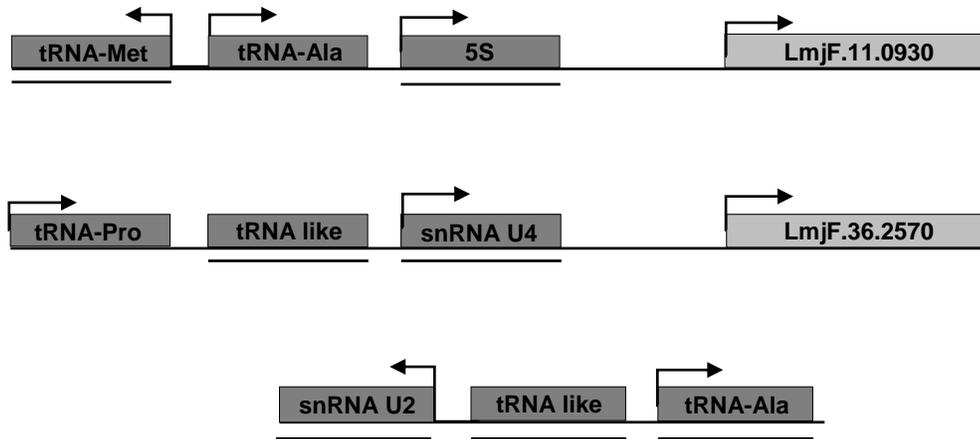


Figura 16. Regiones transcritas por Pol III seleccionadas para analizar mediante qPCR. En gris oscuro se muestran los genes transcritos por Pol III. Las líneas debajo de los genes indican las regiones amplificadas. Las flechas indican la dirección de la transcripción.

Como regiones transcritas por Pol II fueron seleccionados dos genes codificadores de proteínas (la proteína hipotética LmjF.11.0930, localizada en el cromosoma 11 y α -Tubulina, localizada en el cromosoma 13) (Figura 17). También se eligieron dos regiones promotoras: la región SSR del cromosoma 1 y el promotor del gen del *spliced leader* en el cromosoma 2 (Figura 17).

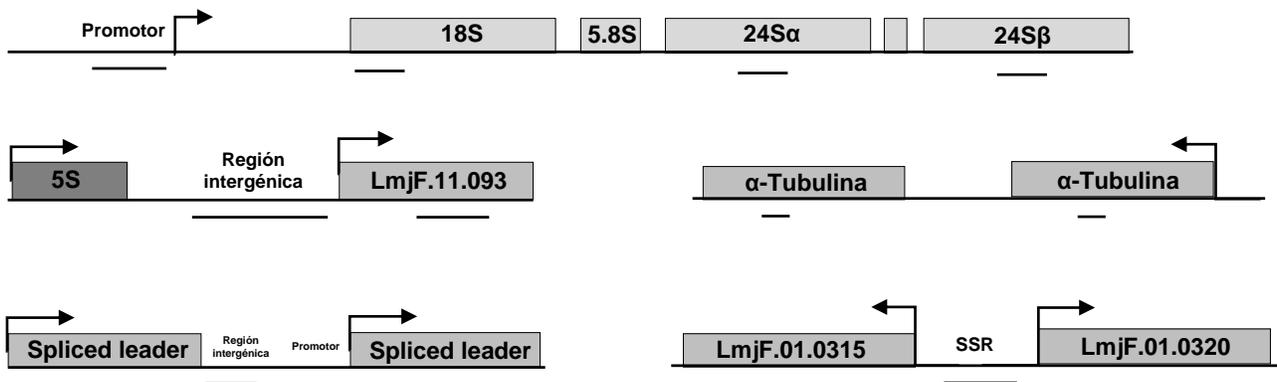


Figura 17. Regiones transcritas por Pol I y Pol II seleccionadas para el análisis qPCR. Se muestra la unidad de rDNA transcrita por Pol I, las regiones promotoras y los genes codificadores de proteínas transcritos por Pol II y la región intergénica. Las líneas debajo de los genes indican las regiones amplificadas. Las flechas indican la dirección de la transcripción.

Adicionalmente se seleccionó como control negativo una región intergénica que se encuentra en el cromosoma 11 entre los genes del rRNA 5S y la proteína hipotética LmjF.11.0930 (Figura 17).

4.3 Estandarización de condiciones de amplificación

Se realizaron diversos ensayos de PCR de punto final para estandarizar las condiciones de amplificación de los fragmentos. En la tabla 1 se muestran los tamaños esperados para cada fragmento amplificado. Los primeros ensayos se llevaron a cabo empleando un gradiente de temperatura, dependiendo de las diferentes temperaturas de hibridación de cada par de oligonucleótidos. En la mayoría de los casos fue necesario modificar el gradiente de temperatura para obtener una banda única con la intensidad esperada. Como ejemplos se muestran los gradientes de amplificación de la región intergénica río arriba de LmjF.11.0930, gen LmjF.11.0930, 18S rRNA y promotor de los genes del rRNA (Figura 18); tRNA like de U2, snRNA U2, tRNA-like de U4 y snRNA U4 (Figura 19); así como de los rRNA 24S α y 24S β , y los tRNA-Met y tRNA-Ala (Figura 20).

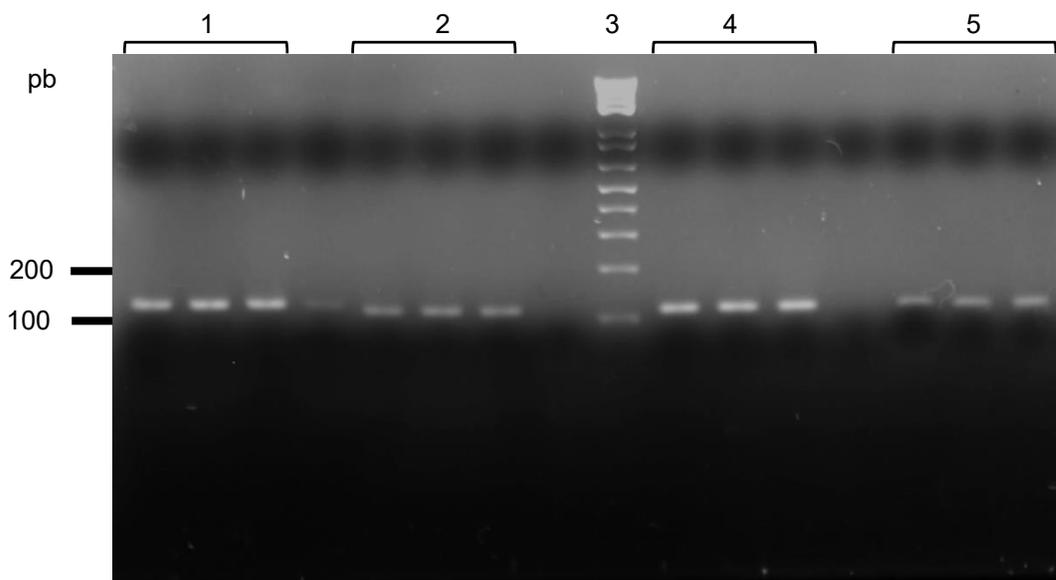


Figura 18. Análisis por PCR utilizando un gradiente de temperatura (50°C, 52°C y 55°C): 1) región intergénica entre LmjF.11.0930 y el rRNA 5S, 2) LmjF.11.0930, 4) rRNA 18S y 5) promotor rRNA. Gel de agarosa al 1.2%, 3) marcador de peso molecular 1 Kb plus de Invitrogen.

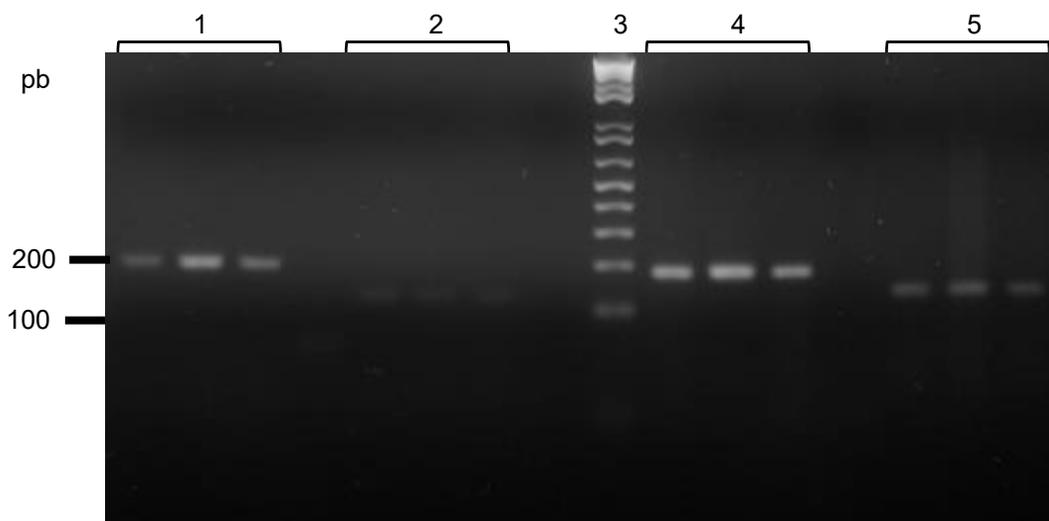


Figura 19. Análisis por PCR utilizando un gradiente de temperatura (55°C, 58°C y 59°C): 1) U2 tRNA like 2) snRNA U2, 4) U4 tRNA like y 5) snRNA U4. Gel de agarosa al 1.2%, 3) marcador de peso molecular 1 Kb plus de Invitrogen.

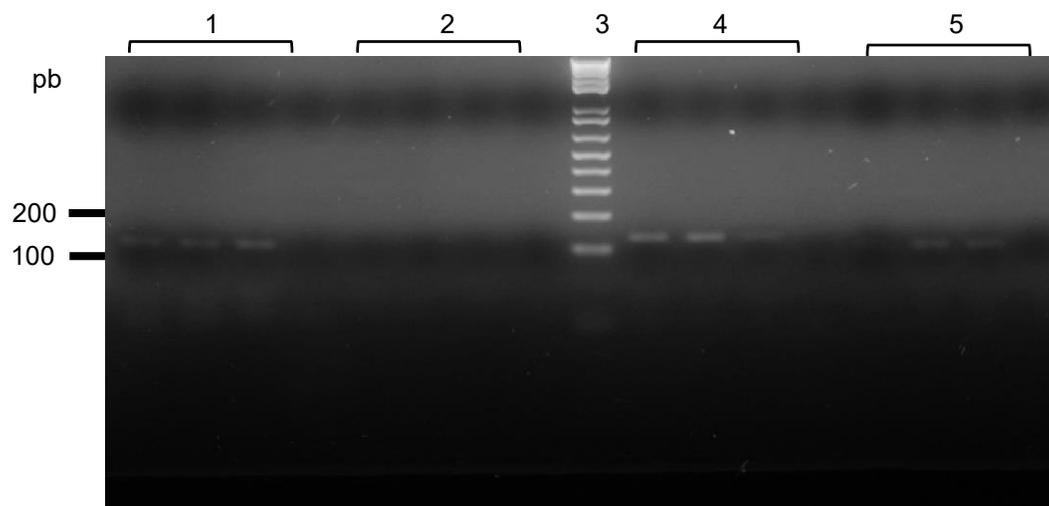


Figura 20. Análisis por PCR utilizando un gradiente de temperatura: 1) rRNA 24S α (50°C, 52°C y 55°C) 2) rRNA 24S β (50°C, 52°C y 55°C), 4) tRNA-Ala (55°C, 57°C y 59°C) y 5) tRNA-Met (50°C, 52°C y 55°C). Gel de agarosa al 1.2%, 3) marcador de peso molecular 1 Kb plus de Invitrogen.

La temperatura a la que todos los fragmentos mostraron una amplificación óptima fue a 55°C, por lo que en los ensayos siguientes se utilizó esta temperatura. En la Figura 21 se muestra la amplificación de todos los fragmentos

seleccionados, observándose en todos los casos la banda del tamaño esperado. Se procedió entonces con los ensayos ChIP

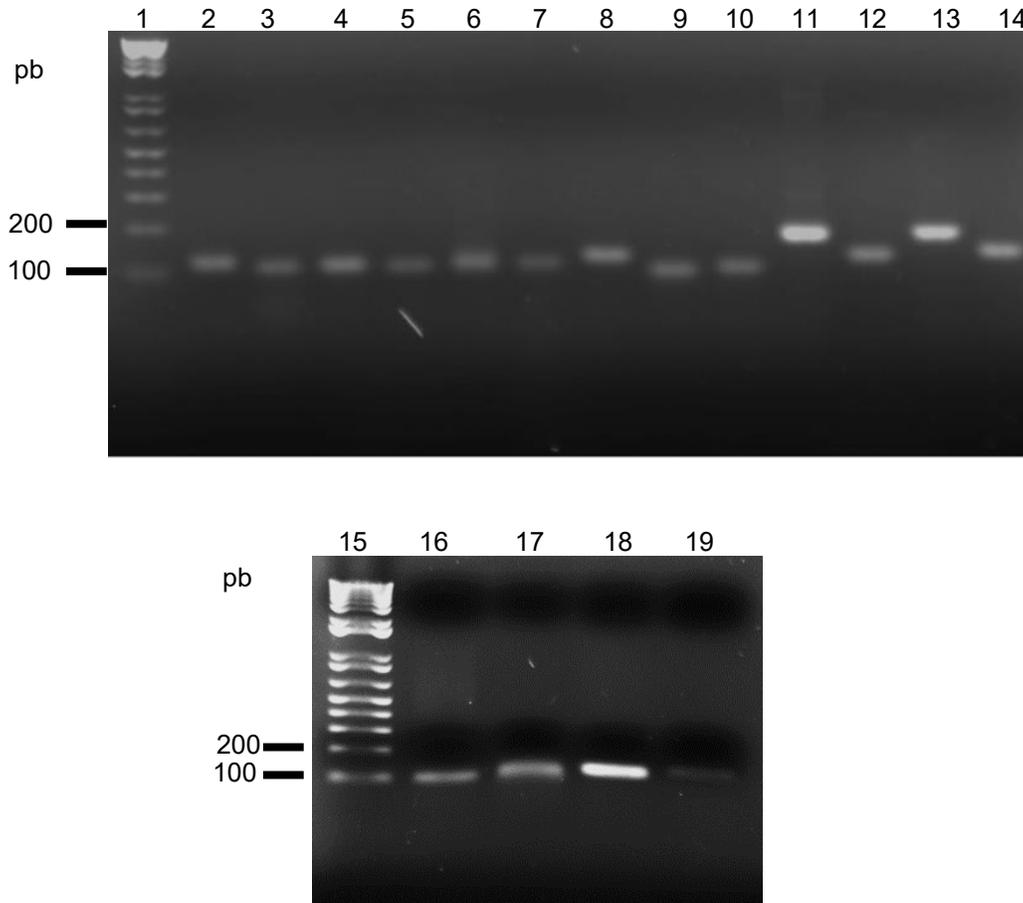


Figura 21. Análisis por PCR (55°C): 2) región intergénica entre LmjF.11.0930 y el rRNA 5S, 3) LmjF.11.0930, 4) promotor rRNA, 5) rRNA 18S, 6) rRNA 24S α , 7) rRNA 24S β , 8) tRNA-Ala, 9) tRNA-Met, 10) SSR, 11) U4 tRNA like, 12) snRNA U4, 13) U2 tRNA like, 14) α -Tubulina, 16) *Spliced leader* región intergénica, 17) *Spliced leader* promotor, 18) rRNA 5S, 19) snRNA U2. Gel de agarosa al 1.2%. Los carriles 1 y 15 corresponden al marcador de peso molecular 1 Kb plus de Invitrogen.

4.4 Inmunoprecipitación de la cromatina

Para determinar las regiones de DNA a las que se une BRF1 en *L. major*, se llevaron a cabo ensayos de inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP), en los que se utilizó un anticuerpo que reconoce al epítipo de Proteína A de la bandera

PTP. Para esto se llevó a cabo la sonicación del DNA contenido en los núcleos de los parásitos. Después de realizar varios ensayos en los que se cambió el número de células y el tiempo de sonicación de los núcleos, se logró obtener la cantidad de DNA y el tamaño de los fragmentos deseados, de entre 200 y 500 pb (Figura 22).

Se utilizaron 20 μg de anticuerpo anti-ProtA para llevar a cabo la inmunoprecipitación, y como control negativo se incubó la cromatina con suero de conejo. Después de revertir los enlaces covalentes que se generaron al fijar las células, se purificó el DNA inmunoprecipitado y se analizó mediante qPCR.

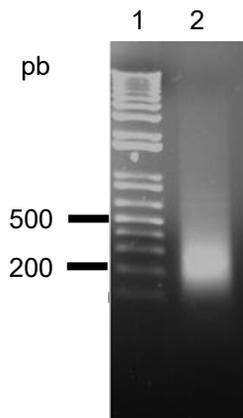


Figura 22. Patrón de sonicación obtenido utilizando células *L. major*/BRF1-PTP (carril 2). Gel de agarosa al 1.8%. En el carril 1 se muestra el marcador de peso molecular 1 Kb plus de Invitrogen.

Se analizó la mayoría de las regiones ya mencionadas (Tabla 1 y Figuras 16 y 17) utilizando el método el $2^{-\Delta\Delta Cq}$ para conocer las veces de enriquecimiento de BRF1 sobre el control negativo. Se muestra el promedio de dos experimentos independientes, cada uno realizado por duplicado (Figura 23). El análisis mostró que, como era de esperarse, BRF1 está altamente enriquecido en los genes del rRNA 5S y tRNA-Met que poseen regiones promotoras que se encuentran dentro del gen. En el caso del snRNA U4, no hubo enriquecimiento en el gen, pero sí en el tRNA-like que está asociado a éste, que forma parte de su región promotora. En el caso del snRNA U2 el resultado fue el contrario, ya que se obtuvo

enriquecimiento en el gen y no en el tRNA-like asociado. De la misma manera, el tRNA-Ala presente en el *locus* del snRNA U2 mostró un bajo enriquecimiento de BRF1. En general, estos resultados demostraron que BRF1 se une a las regiones transcritas por Pol III en *L. major*. En las regiones transcritas por Pol II que se analizaron (promotor del *spliced leader*, región intergénica y LmjF.11.0930) no se observó enriquecimiento de BRF1 (Figura 23).

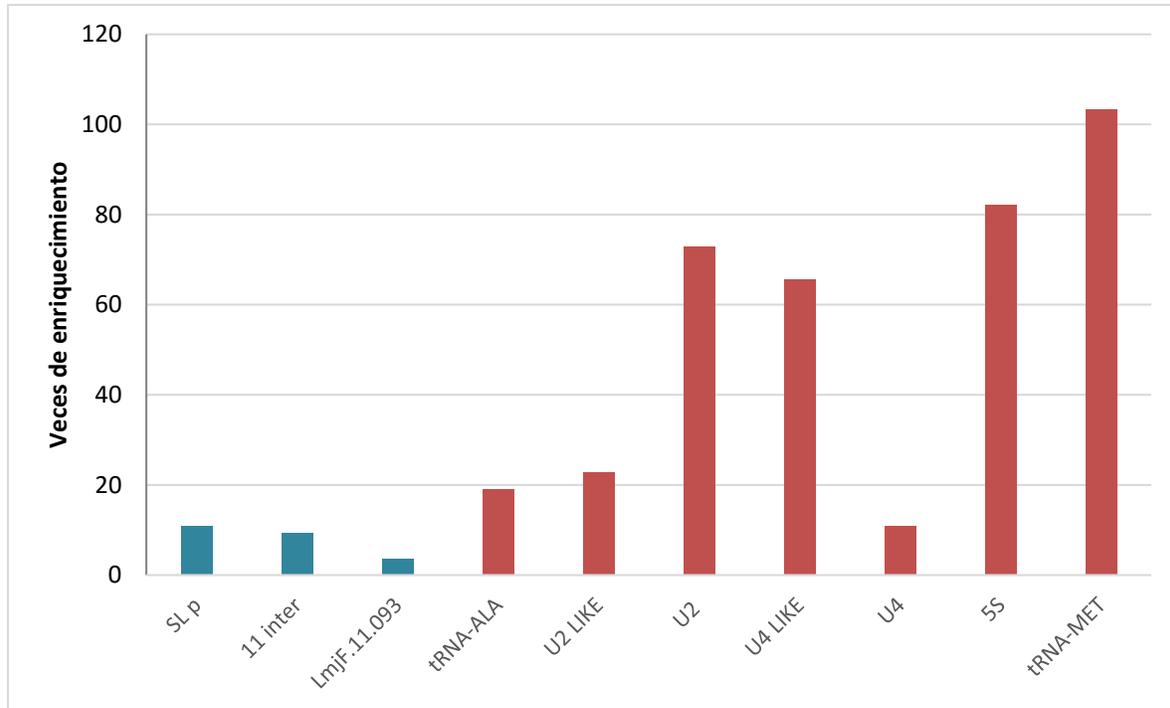


Figura 23. Gráfica de los resultados obtenidos de los experimentos ChIP-qPCR. Se muestran las veces de enriquecimiento de BRF1-PTP sobre el control negativo en las diferentes regiones seleccionadas. Se muestra el promedio de dos experimentos independientes. Promedio de dos experimentos, cada uno por duplicado.

De manera interesante, se obtuvo un muy elevado enriquecimiento de BRF1 en el promotor de los rRNAs y en el rRNA 18S (Figura 24). Este fue un resultado inesperado, pues no se ha reportado la participación de BRF1 en la transcripción de Pol I. Para descartar la unión inespecífica del anticuerpo a estas regiones se decidió realizar un experimento ChIP utilizando células silvestres. Como se muestra en la figura 24 (primeras 3 barras), no se obtuvo

enriquecimiento en ninguna región utilizando células silvestres. Así nuestros resultados demostraron la unión de BRF1 al *locus* del rRNA en *L. major*.

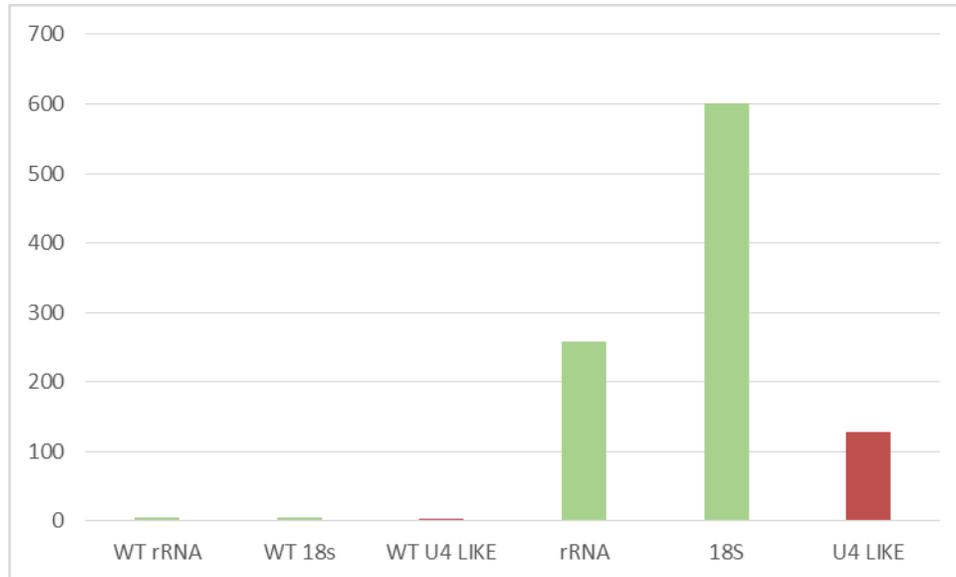


Figura 24. Gráfica de los resultados obtenidos de los experimentos ChIP-qPCR utilizando células silvestres (primeras tres barras) y células *L. major*/BRF1-PTP (últimas tres barras). Se muestran las veces de enriquecimiento de BRF1-PTP sobre el control negativo en las regiones transcritas por Pol I: promotor del rRNA (rRNA) y rRNA 18S (18S). También se analizó el tRNA-like asociado al snRNA U4 (U4 Like), transcrito por Pol III. Promedio de dos experimentos, cada uno por duplicado.

4.5 Localización celular de BRF1

Para determinar la localización celular de BRF1 en *L. major* se llevaron a cabo ensayos de inmunofluorescencia indirecta. Para estandarizar la técnica, se realizaron inicialmente experimentos control con anticuerpos que reconocen a la histona H4 y a la proteína nucleolar Nop56. En estos ensayos se tiñó el DNA del núcleo y el cinetoplasto con DAPI. Como se esperaba, con el anticuerpo contra la histona H4 se observó señal en el núcleo tanto en la línea celular *L. major*/BRF1-PTP (Figura 25A) como en células de *L. major* silvestres (Figura 26A). Asimismo, con el anticuerpo contra Nop56 se observó la señal esperada en el nucléolo con la línea celular *L. major*/BRF1-PTP (Figura 25B) y con células de *L. major* silvestres (Figura 26B).

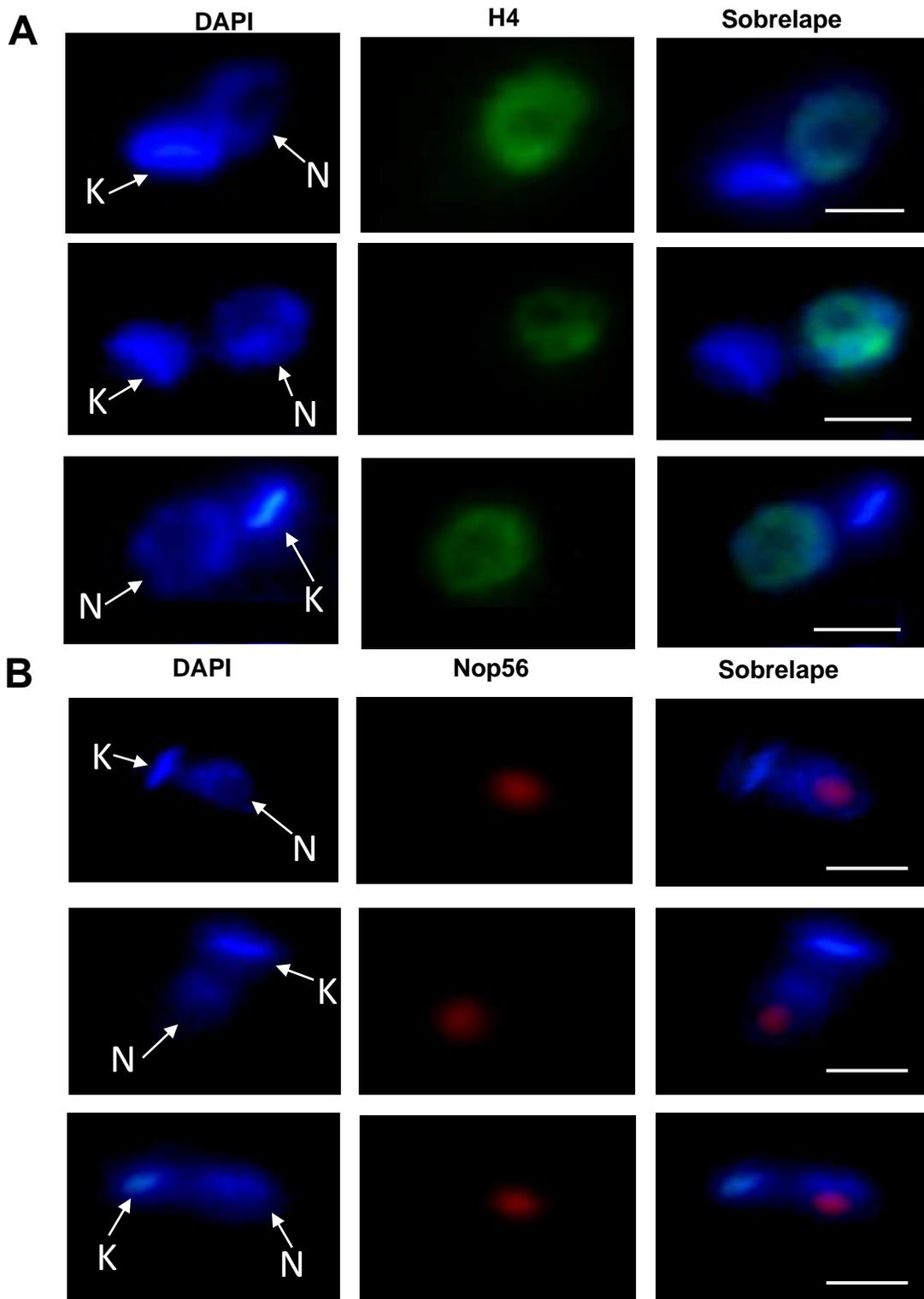


Figura 25. Análisis de inmunofluorescencia de la línea celular *L. major*/BRF1-PTP. A) Anticuerpo anti H4 (verde). B) Anticuerpo anti Nop56 (rojo). El DNA del núcleo (N) y el cinetoplasto (K) se tiñó con DAPI (azul). La barra de escala representa 10 μm.

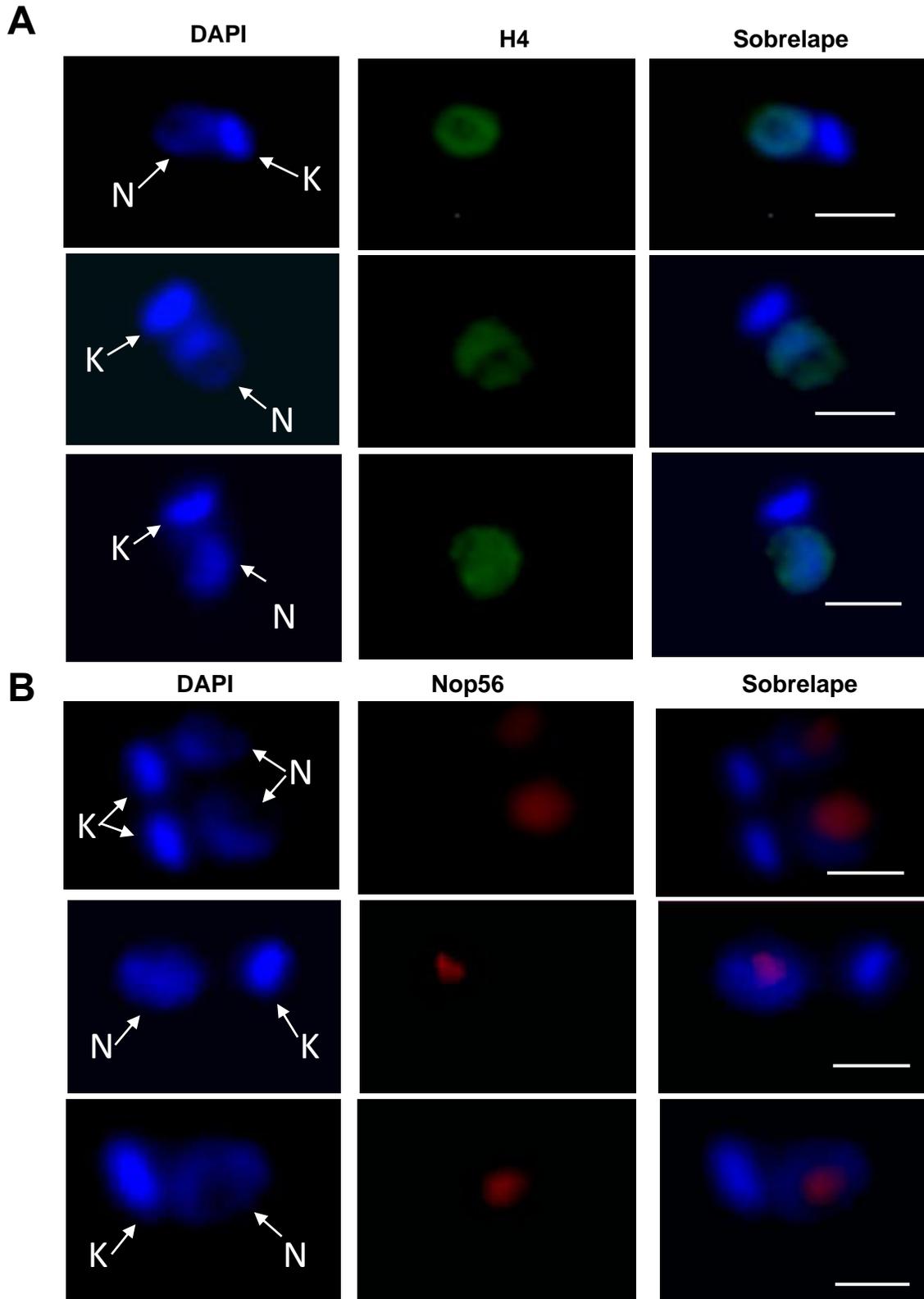


Figura 26. Análisis de inmunofluorescencia con células silvestres. A) Anticuerpo anti H4 (verde). B) Anticuerpo anti Nop56 (rojo). El DNA del núcleo (N) y el cinetoplasto (K) se tiñó con DAPI (azul). La barra de escala representa 10 μm .

Para localizar a BRF1 se utilizó el anticuerpo anti Proteína C, que reconoce a la bandera PTP de la proteína recombinante. Las imágenes claramente mostraron que BRF1 se localiza en el núcleo en la línea celular *L. major*/BRF1-PTP, pues la señal colocaliza con la tinción con DAPI del DNA nuclear (Figura 27). Como se esperaba, con las células *L. major* silvestres se tiñó con DAPI el núcleo y el cinetoplasto, pero no se observó ninguna señal con el anticuerpo anti Proteína C (Figura 28).

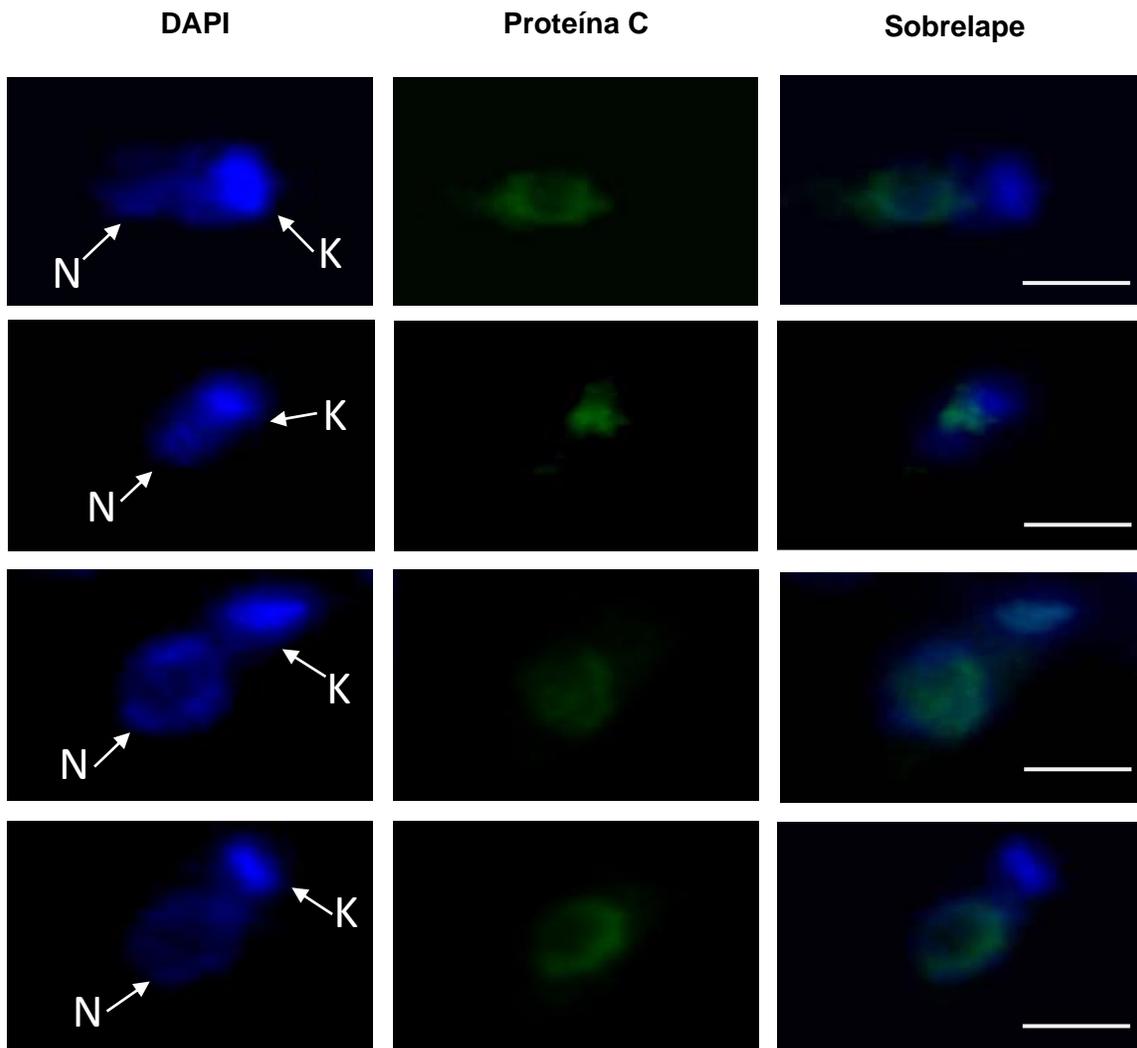


Figura 27. Análisis de inmunofluorescencia de la línea celular *L. major*/BRF1-PTP, utilizando anticuerpo anti Proteína C (verde). El DNA del núcleo (N) y el cinetoplasto (K) se tiñó con DAPI (azul). La barra de escala representa 10 μ m.

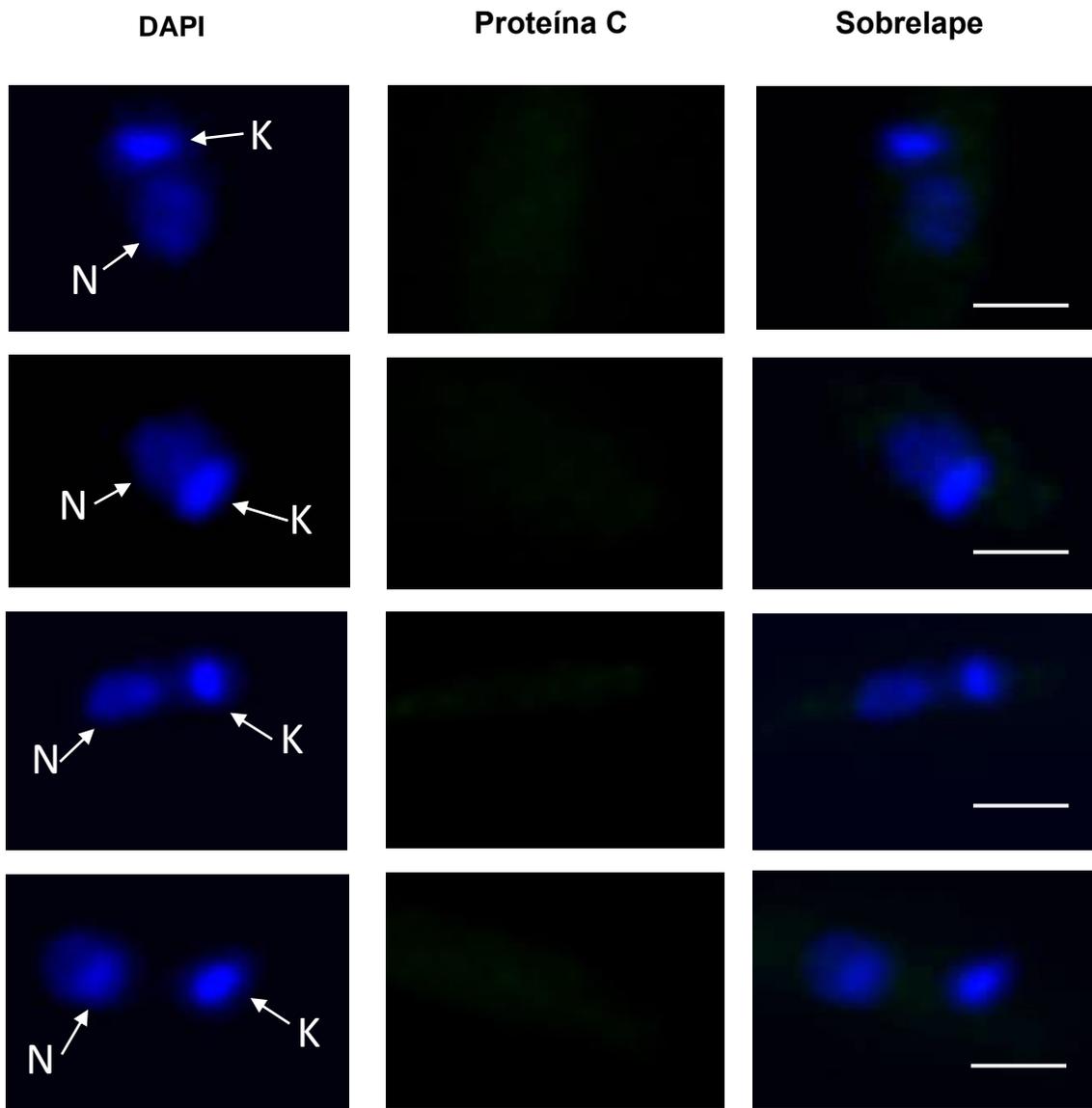


Figura 28. Análisis de inmunofluorescencia con células silvestres, utilizando anticuerpo anti Proteína C (verde). El DNA del núcleo (N) y el cinetoplasto (K) se tiñó con DAPI (azul), la barra de escala representa 10 μ m.

Con el objetivo de determinar la localización de BRF1 en relación con el nucléolo, se realizó una inmunofluorescencia doble, utilizando los anticuerpos anti-Proteína C y anti Nop56 (Figura 29). Se pudo observar que la señal de BRF1 (en verde) se localiza en casi todo el núcleo, excepto por una región ubicada en las cercanías del centro nuclear. De manera interesante, esta región cercana al centro del núcleo corresponde con el nucléolo (señal roja obtenida con Nop56) (Figura

29). Estos resultados indican que BRF1 se localiza en casi todo el núcleo (preferentemente en la periferia nuclear), pero no se encuentra presente en el nucléolo. No obstante, en algunos casos sí se observó un pequeño solapamiento entre BRF1 y Nop56.

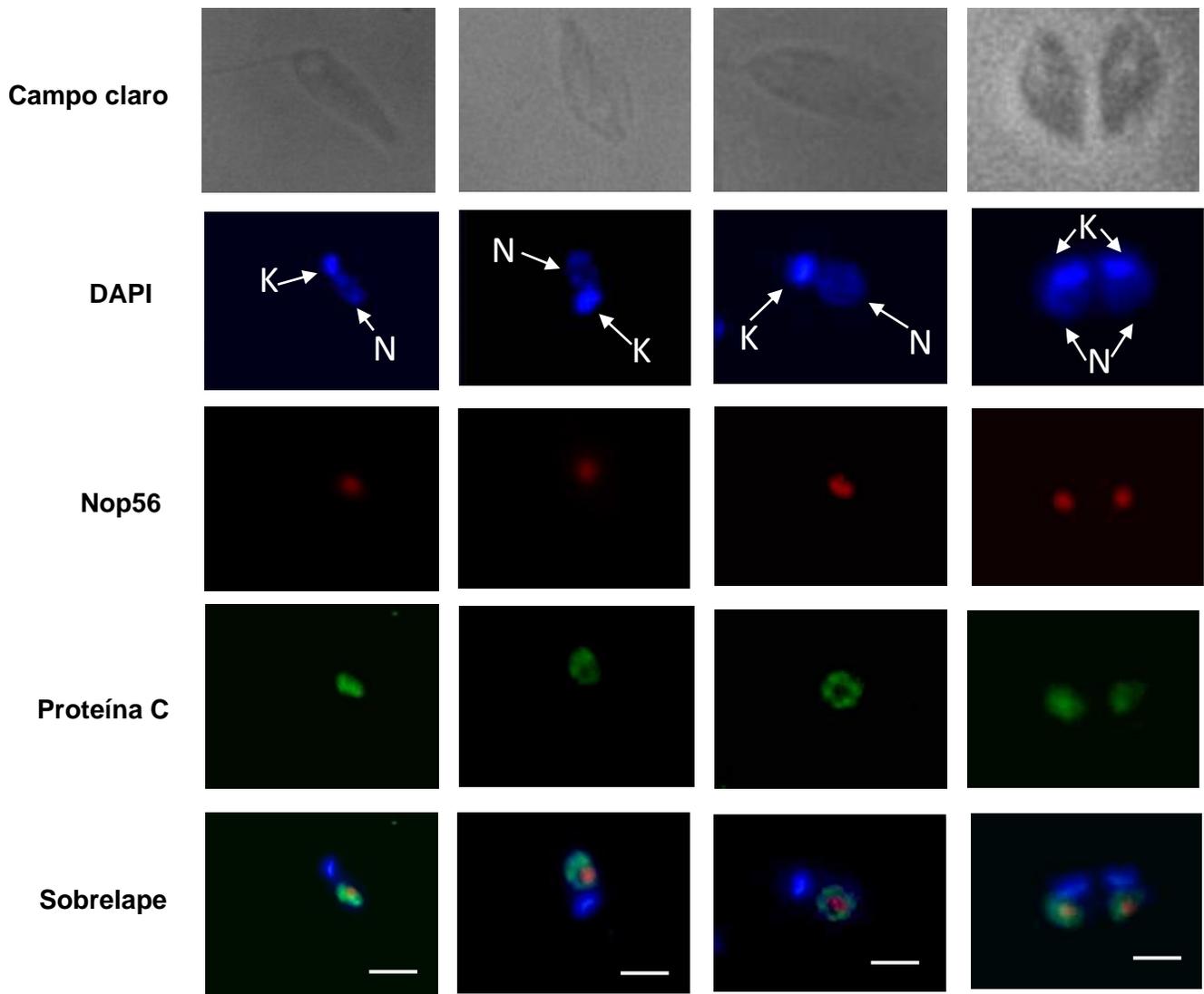


Figura 29. Análisis de inmunofluorescencia doble utilizando los anticuerpos anti Proteína C (verde) y anti Nop 56 (rojo) en la línea celular *L. major*/BRF1-PTP. El DNA del núcleo (N) y el cinetoplasto (K) se tiñó con DAPI (azul). La barra de escala representa 10 μ m.

En el experimento control con células silvestres de *L. major* se obtuvo el resultado esperado, pues se observó señal roja con Nop56 en el nucléolo, pero ninguna señal verde con anti-Proteína C (Figura 30).

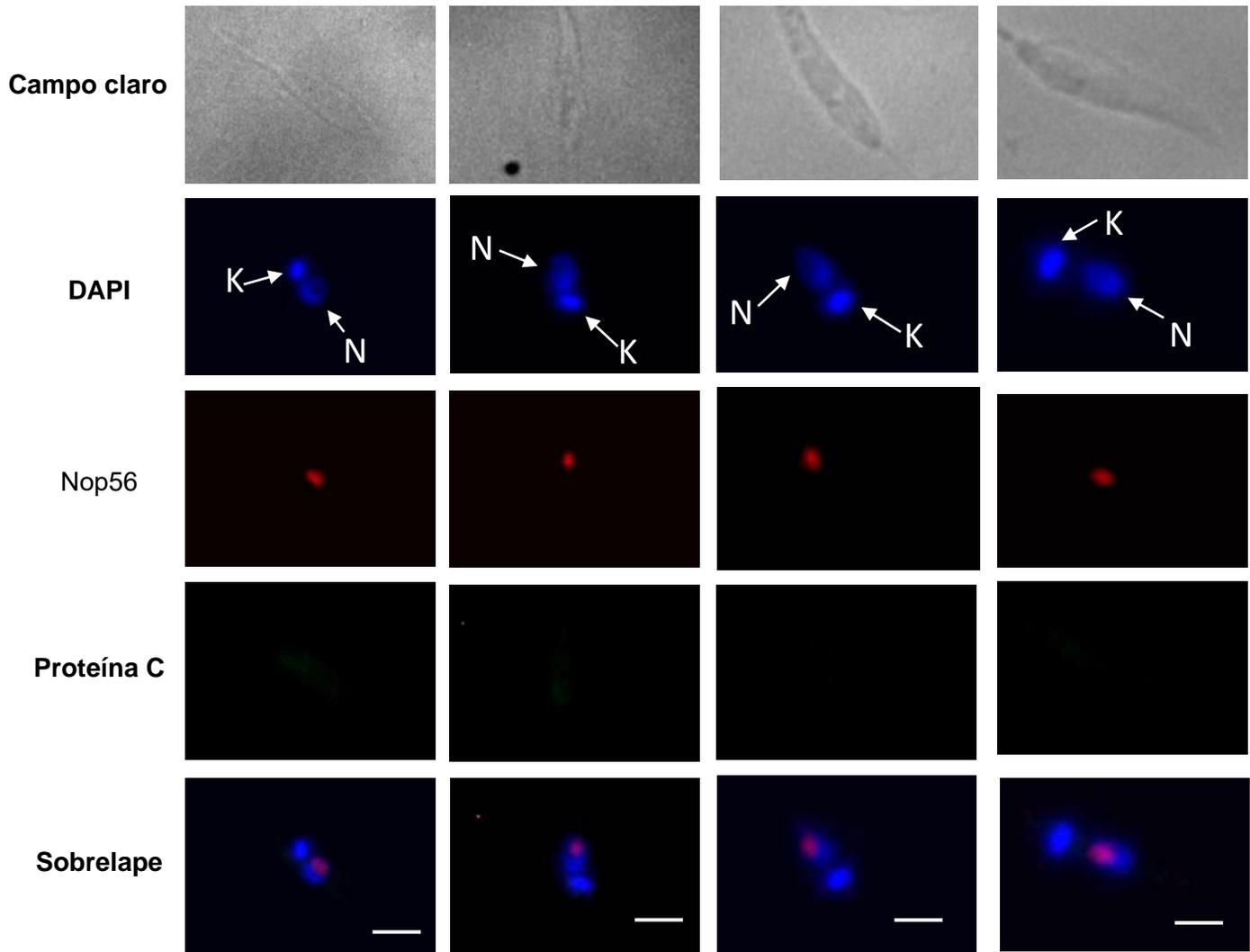


Figura 30. Análisis de inmunofluorescencia doble con células silvestres, utilizando los anticuerpos anti Proteína C (verde) y anti Nop56 (rojo). El DNA del núcleo (N) y el cinetoplasto (K) se tiñó con DAPI (azul). La barra de escala representa 10 μ m.

En resumen, los experimentos de inmunofluorescencia indirecta demuestran que BRF1 es una proteína nuclear en promastigotes de *L. major*. La señal de BRF1 se localiza preferentemente en la periferia nuclear. Aunque en la mayoría de las imágenes no se observó localización nucleolar, en algunos casos

sí se apreció cierta colocalización con la proteína nucleolar Nop56, lo que sugeriría que una fracción de BRF1 podría estar presente en el nucléolo.

5. DISCUSIÓN

La enzima Pol III es de gran importancia para la célula, ya que se encarga de la síntesis de RNAs pequeños que son esenciales para la viabilidad celular, como los tRNAs, el rRNA 5S y, en el caso de los tripanosomátidos, todos los snRNAs. Aunque estos son los RNAs más estudiados, Pol III también se encarga de transcribir otras moléculas de RNA cortas que realizan funciones muy diversas, como el componente de RNA de la RNasa P, una endoribonucleasa que se encarga de procesar los extremos 5' de los pre-tRNAs; el RNA 7SL, que forma parte del complejo ribonucleoproteico SRP o partícula de reconocimiento del péptido señal; los RNAs "Y", que forman parte de las ribonucleoproteínas Ro, que funcionan como autoantígenos; y los RNAs bóveda, que forman parte de las bóvedas, ribonucleoproteínas citoplasmáticas implicadas en la resistencia a medicamentos en tumores humanos y se piensa que están involucradas en el ensamble y transporte de macromoléculas (Dieci et al., 2007). Para que se lleve a cabo esta transcripción, Pol III necesita de diferentes factores de transcripción, siendo los tres factores principales TFIIIA, TFIIIB y TFIIIC. Entre éstos, TFIIIB es el único requerido para la transcripción de todos los genes, independientemente de su tipo de promotor, pues es el factor encargado de reclutar a Pol III al sitio de inicio de transcripción. TFIIIB está compuesto por tres subunidades: TBP, BDP1 y BRF1. A la fecha no se han identificado ortólogos de TFIIIA y TFIIIC en los tripanosomátidos. Esto resulta muy interesante, considerando que estos dos factores están presentes en todos los organismos analizados. Además, tanto TFIIIA como TFIIIC son esenciales para el crecimiento celular. En contraste, las tres subunidades de TFIIIB han sido identificadas en *Leishmania* y otros tripanosomátidos. Al ser TFIIIB, aparentemente, el único factor general de transcripción presente en los tripanosomátidos, su estudio resulta indispensable para ahondar nuestro conocimiento de la transcripción de Pol III en este grupo de parásitos que divergió tempranamente del linaje principal de los eucariontes.

Para continuar con la caracterización de este factor de transcripción en tripanosomátidos, se llevó a cabo el estudio de la subunidad BRF1 en *L. major*, mediante ensayos de inmunoprecipitación de la cromatina para determinar a qué regiones de DNA se une, analizando los tres tipos de promotores de Pol III y otras regiones transcritas por Pol I y II. Se utilizó una línea celular que expresa la proteína BRF1 unida a una bandera PTP, con anticuerpos que reconocen el epítipo de proteína A presente en ésta.

En un estudio realizado por Vélez-Ramírez y colaboradores (2015) del ortólogo de BRF1 en *T. brucei*, se demostró que éste es indispensable para la viabilidad celular. Mediante ensayos de run-on nuclear determinaron los transcritos que se verían afectados con el *knock-down* de BRF1, lo que resultó en una disminución importante de los transcritos de Pol III, dentro de los que se encuentra el rRNA 5S, el snRNA U2, RNA 7SL y varios tRNAs. En *L. major* se obtuvo un resultado similar, en cuanto a la unión de BRF1 a las regiones de rRNA 5S y snRNA U2, en las que se obtuvo un enriquecimiento muy alto de esta proteína (Figura 23).

El promotor de tipo 1 corresponde al rRNA 5S. Se ha reportado la posible presencia de una región de control interno en el gen del rRNA 5S en *T. brucei*, así como la presencia de los elementos convencionales de control interno de Pol III, las cajas A y C, en *T. cruzi* (Cordingley, 1985; Hernández-Rivas et al., 1992). A diferencia de *T. cruzi* y *T. brucei*, que presentan cientos de genes de rRNA 5S organizados en tándem, en *L. major* existen sólo 11 copias de este gen localizadas en 6 cromosomas diferentes (Ivens et al., 2005). Para su análisis se utilizaron oligonucleótidos que amplifican la región interna de todas las copias del gen, que tienen secuencias casi idénticas. Como era de esperarse, el enriquecimiento de BRF1 fue muy alto en esta región (Figura 23), lo que confirma la unión directa de BRF1 a los genes del rRNA 5S de *L. major*.

Los genes de tRNA se encuentran generalmente asociados a genes de snRNA o en grupos con otros tRNAs. Campbell y colaboradores (1989) reportaron la presencia de las regiones promotoras de Pol III convencionales en genes de tRNA de glicina y leucina en *T. brucei*. Posteriormente se confirmó la presencia de cajas A y B en todos los tRNAs de *T. cruzi* y *L. major* (Padilla-Mejía et al., 2009). En este trabajo seleccionamos los genes del tRNA-Ala y tRNA-Met, observando en ambos genes enriquecimiento de BRF1. Sin embargo, el enriquecimiento en el gen de tRNA-Met fue mucho mayor que el del tRNA-Ala (Figura 23). Resulta interesante que el tRNA-Ala se encuentra asociado al gen del snRNA U2 (Figura 16) y que la síntesis del snRNA U2 dependa de la transcripción del tRNA-Ala (Rojas-Sánchez et al., 2016).

Los promotores de tipo 3, presentes en los snRNAs, son los únicos que están conformados por elementos río arriba del sitio de inicio de la transcripción. En diversas publicaciones se ha demostrado que en tripanosomátidos estos genes están asociados a un tRNA o a un tRNA-like, necesario para su transcripción. En un estudio realizado por Nakaar y colaboradores (1994), se demostró que en *T. brucei* los genes de los snRNAs U6 y U3, y el 7SL RNA están asociados a genes de tRNA. Deleciones de las cajas A y B de los tRNAs correspondientes resultaron en una disminución considerable de los transcritos de los snRNAs, demostrando que estos elementos son indispensables para su transcripción. De igual manera, Rojas-Sánchez y colaboradores (2016) realizaron la caracterización de la región promotora del snRNA U2 en *L. major*, demostrando que no sólo el tRNA adyacente a éste y el gen de tRNA-like, son indispensables para la transcripción del snRNA, sino que también los primeros nucleótidos del gen son necesarios para que ésta se lleve a cabo. Nuestros resultados obtenidos con el *locus* del gen del snRNA U2 concuerdan con lo reportado, ya que se obtuvo enriquecimiento en el tRNA-Ala y tRNA like asociados al gen (Figura 23). De manera interesante, el enriquecimiento dentro del gen del snRNA U2 fue mucho mayor que el de estas dos regiones, indicando que los primeros nucleótidos del gen son muy importantes para la unión de BRF1.

En el caso del snRNA U4 el resultado fue diferente, ya que se obtuvo enriquecimiento en el tRNA-like asociado a éste, pero no en la región interna (Figura 23), lo que indica una diferencia entre las regiones promotoras de estos snRNAs. Djikeng y colaboradores (2001) realizaron un estudio en el que demostraron que en *T. brucei* el gen del snRNA U1 está asociado a un gen de tRNA-like y que éste es necesario para la transcripción. Sin embargo, no se encontraron secuencias internas al gen que fueran necesarias para la transcripción, lo que apoya la idea de que los promotores de los snRNA son diferentes en cada gen.

Un resultado interesante fue la unión de BRF1 a la región promotora de los rRNA y al gen del rRNA 18S, transcritos por Pol I. En *L. major* estos genes se encuentran organizados en tándem localizados en el cromosoma 27, y su región promotora se encuentra 1043 pb río arriba del sitio de inicio de la transcripción (Ivens et al., 2005; Martínez-Calvillo et al., 2001).

La unión de BRF1 a estas regiones puede deberse a distintos factores. Uno de ellos es la unión de BRF1 con TBP ya que, mediante estudios ChIP-chip, se ha reportado la unión de TBP y SNAP50 a la región codificante del rRNA 18S en *L. major*. Este fue un resultado inesperado, ya que SNAP50 es una proteína perteneciente a SNAPc, un complejo involucrado en la transcripción de los snRNAs, ya sea por Pol II o Pol III, pero nunca se había visto involucrado en la transcripción de Pol I (Thomas et al., 2009). Estudios previos han demostrado que existe una fuerte unión entre TBP y BRF1 (Kassavetis y Geidushek, 2006). Al haberse demostrado la unión de TBP a los genes del rRNA, una fracción de BRF1 podría estarse uniendo a estas moléculas de TBP, resultando en la presencia de BRF1 en los genes del rRNA. Desconocemos si esta unión es funcionalmente significativa.

Al igual que BRF1 en Pol III, en el sistema de Pol I se ha reportado la presencia de factores de transcripción con homología a TFIIIB: Rrn7 en levadura y TAF1B en humano. Los extremos N-terminal de estos factores presentan homología con la región N-terminal de TFIIIB y de BRF1. Aunque sus secuencias sólo presentan un 16% de homología, se ha demostrado que estas subunidades tienen estructuras y funciones similares. Al igual que BRF1, TAF1B tiene un extremo C-terminal extendido, aunque no se ha encontrado homología entre ellos. Se ha reportado que Rrn7 tiene interacciones directas con Pol I, pero aún no se tiene claro si las funciones de estos factores son similares a las de BRF1 y TFIIIB en cuanto al reclutamiento de la RNA Polimerasa (Knutson y Hahn, 2011; Naidu et al., 2011). Los mecanismos de regulación de la transcripción de Pol I aún no son claros en tripanosomátidos, por lo que no se puede descartar la posibilidad de que BRF1 participe en ésta. Tampoco se puede descartar que el enriquecimiento de BRF1 en estas regiones se deba a uniones inespecíficas.

Se determinó la localización celular de BRF1 en *L. major* mediante ensayos de inmunofluorescencia indirecta utilizando como blanco el epítipo de proteína C que contiene la bandera PTP. Estos ensayos demostraron que BRF1 es una proteína nuclear, ya que la señal se localiza preferentemente en la periferia del núcleo. Estos resultados concuerdan con lo reportado por Vélez-Ramírez y colaboradores (2015), que determinaron la localización de BRF1 en *T. brucei*. En un estudio realizado por Noma y colaboradores (2006) en *Schizosaccharomyces pombe* se estudiaron las regiones límite entre los dominios de eucromatina y heterocromatina, encontrando que los elementos de secuencias invertidas repetidas o elementos IR pueden servir como barrera para la heterocromatina, y que contienen múltiples cajas B, conocidas por ser el sitio de unión del factor de transcripción TFIIIC, un factor de transcripción necesario para Pol III y que interactúa directamente con BRF1. También demostraron que estas cajas reclutan a TFIIIC en la periferia nuclear, pero no a Pol III.

BRF1 se localizó preferentemente en la periferia nuclear, y en la mayoría de las imágenes obtenidas no se observó localización nucleolar. Sin embargo, en algunos casos sí se apreció una cierta colocalización con Nop56, una proteína nucleolar (Figura 29), lo que podría deberse a la unión de BRF1 a los genes de rDNA transcritos por Pol I. En algunos organismos como *S. cerevisiae* se ha reportado que el gen del rRNA 5S tiene una localización nucleolar, ya que se encuentra junto a los repetidos de rDNA. En *L. major* la organización de estos genes es diferente ya que el gen rRNA 5S se encuentra en 11 *loci* en 6 cromosomas diferentes, normalmente asociados a otros genes transcritos por Pol III (Bell et al., 1977; Ivens et al., 2005). En organismos en los que los genes del rRNA 5S no se encuentran asociados a los repetidos de rDNA, se ha propuesto que una proximidad física entre estos genes puede tomar parte en su regulación, facilitando el acceso de proteínas reguladoras, factores de transcripción e incluso la RNA Polimerasa. Por ello, una manera de regular la transcripción podría ser una proximidad entre los genes de rRNA transcritos por Pol I y los genes de rRNA 5S transcritos por Pol III, lo que podría explicar que en algunos casos se haya observado cierta asociación entre BRF1 y los genes de rRNA transcritos por Pol I (Haeusler y Engelke, 2006).

CONCLUSIONES

- BRF1 de *L. major* se une a las regiones promotoras del rRNA 5S y el tRNA de metionina.
- En el *locus* del gen del snRNA U2, BRF1 se une en mayor proporción a la región codificadora que al tRNA de alanina y el tRNA like asociados al gen.
- En el *locus* del gen del snRNA U4, BRF1 se une en mayor abundancia al tRNA like asociado al gen que a la región codificadora.
- BRF1 parece unirse a la región promotora de los rRNA, así como al gen del rRNA 18S, aunque se desconoce si esta unión es funcionalmente significativa.
- BRF1 se localiza preferentemente en la periferia del núcleo celular, y generalmente no se asocia con el nucléolo. Sin embargo, en algunos casos sí se apreció una cierta colocalización con la proteína nucleolar Nop56.

REFERENCIAS

- Agabian, N. 1990. Trans splicing of nuclear pre-mRNAs. *Cell*. 61 (7): 1157-1160.
- Alberts, B., Bray, D., Hopkin, K., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. y Walter, P. 2014. *Essential Cell Biology*. USA. Garland Science.
- Alvar, J., Vélez, I. D., Bern, C., Herrero, M., Desjeux, P., Cano, J., Jannin, J. y Boer, M. 2012. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. *PLoS ONE*. 7 (5): e35671.
- Bell, G. L., DeGennaro, L. J., Gelfand, D. H., Bishop, R. J., Valenzuela, P. y Rutter, W. J. 1977. Ribosomal RNA genes of *Saccharomyces cerevisiae*. I. Physical map of the repeating unit and location of the regions coding for 5 S, 5.8 S, 18 S, and 25 S ribosomal RNAs. *The Journal of Biological Chemistry*. 252 (22): 8118-8125.
- Benne, R., Van den Burg, J., Brakenhoff, J. P. J., Sloof, P., Van Boom, J. H. y Tromp, M. C. 1986. Major transcript of the frameshifted *coxII* gene from trypanosome mitochondria contains four nucleotides that are not encoded in the DNA. *Cell*. 46 (6): 819-826.
- Blumenthal, T. 1998. Gene clusters and polycistronic transcription in eukaryotes. *BioEssays*. 20 (6): 480-487.
- Boothroyd, J. C. y Cross, G. A. 1982. Transcripts coding for variant surface glycoproteins of *Trypanosoma brucei* have a short, identical exon at their 5' end. *Gene*. 20 (2): 281-289.
- Campbell, D. A., Suyama, Y. y Simpson, L. 1989. Genomic organisation of nuclear tRNA^{gly} and tRNA^{leu} genes in *Trypanosoma brucei*. *Molecular and Biochemical Parasitology*. 37 (2): 257-262.
- Cohen-Freue, G., Holzer, T. R., Forney, J. D. y McMaster, W. R. 2007. Global gene expression in *Leishmania*. *International Journal of Parasitology*. 37 (10): 1077-1086.

- Cordingley, J. S. 1985. Nucleotide sequence of the 5S ribosomal RNA gene repeat of *Trypanosoma brucei*. *Molecular and Biochemical Parasitology*. 17 (3): 321-330.
- Das, A., Banday, M. y Bellofatto, V. 2008. RNA polymerase transcription in Trypanosomes. *Eukaryotic Cell*. 7 (3): 429-434.
- Davies, C. R., Kaye, P., Croft, S. L. y Sundar, Shyam. 2003. Leishmaniasis, new approaches to disease control. *Biomedical Journey*. 326: 377-382.
- Desjeux, P. 2004. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. *Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases*. 27 (5): 305-318.
- Dieci, G., Fiorino, G., Castelnuovo, M., Teichmann, M. y Pagano, A. 2007. The expanding RNA polymerase III transcriptome. *Trends in Genetics*. 23 (12): 614-622.
- Djikeng, A., Ferreira, L., D'Angelo, M., Dolezal, P., Lamb, T., Murta, S., Triggs, V., Ulbert, S., Villarino, A., Renzi, S., Ullu, E. y Tschudi C. 2001. Characterization of a candidate *Trypanosoma brucei* U1 small nuclear RNA gene. *Molecular and Biochemical Parasitology*. 113 (1): 109-115.
- Docampo R., de Souza W., Miranda K., Rohloff P. y Moreno S. N. 2005. Acidocalcisomes- conserved from bacteria to man. *Nature Reviews Microbiology*. 3 (3):251-61.
- Figueroa-Angulo, E. E., Vélez-Ramírez, D. E., Romero-Meza, G. y Martínez-Calvillo, S. 2012. *Trypanosoma brucei*: Mecanismos atípicos de expresión génica y variación antigénica. En M. E. Alvarez-Sánchez, y E. Azuara, *Genómica de parásitos, aspectos moleculares, genómicos, proteómicos y de virulencia* (pp. 80 – 113). Editorial Académica Española.
- Flores, P. C. 2011. Identificación de los componentes proteicos del complejo transcripcional de la RNA polimerasa III en *Leishmania major* (tesis de maestría). Universidad Nacional Autónoma de México, México.
- Geiduschek, E. P. y Kassavetis, G. A. 2001. The RNA polymerase III transcription apparatus. *Journal of Molecular Biology*. 310 (1): 1- 26.

- Grummt, I. 2016. Life on a planet of its own: regulation of RNA polymerase I transcription in the nucleolus. *Genes & Development*. 17 (14): 1691-1702.
- Haeusler, R. A. y Engelke, D. R. 2006. Spatial organization of transcription by RNA polymerase III. *Nucleic Acids Research*. 34 (17): 4826-4836.
- Hahn, S. y Roberts, S. 2000. The zinc ribbon domains of the general transcription factors TFIIB and Brf: conserved functional surfaces but different roles in transcription initiation. *Genes & Development*. 14 (16): 719-730.
- Hailu, A., Argaw, D. D. y Boelaert, M. 2016. Leishmaniasis. En *Neglected tropical diseases – Sub-Saharan Africa* (pp. 87 - 112). Editorial Springer.
- Handman, E. 2000. Cell biology of *Leishmania*. *Advances in parasitology*. 44: 1-39.
- Hernández-Rivas, R., Martínez-Calvillo, S., Romero, M. y Hernández, R. 1992. *Trypanosoma cruzi* 5S rRNA genes: molecular cloning, structure and chromosomal organization. *FEMS Microbiology Letters*. 71 (1): 63-7.
- Ivens A. C., Peacock C. S., Worthey E. A., Murphy L., Aggarwal G., Berriman M., Sisk E., Rajandream M. A., Adlem E., Aert R., Anupama A., Apostolou Z., Attipoe P., Bason N., Bauser C., Beck A., Beverley S. M., Bianchetti G., Borzys K., Bothe G., Bruschi C. V., Collins M., Cadag E., Ciarloni L., Clayton C., Coulson R. M., Cronin A., Cruz A. K., Davies R. M., De Gaudenzi J., Dobson D. E., Duesterhoeft A., Fazelina G., Fosker N., Frasch A. C., Fraser A., Fuchs M., Gabel C., Goble A., Goffeau A., Harris D., Hertz-Fowler C., Hilbert H., Horn D., Huang Y., Klages S., Knights A., Kube M., Larke N., Litvin L., Lord A., Louie T., Marra M., Masuy D., Matthews K., Michaeli S., Mottram J. C., Müller-Auer S., Munden H., Nelson S., Norbertczak H., Oliver K., O'neil S., Pentony M., Pohl T. M., Price C., Purnelle B., Quail M. A., Rabinowitsch E., Reinhardt R., Rieger M., Rinta J., Robben J., Robertson L., Ruiz J. C., Rutter S., Saunders D., Schäfer M., Schein J., Schwartz D. C., Seeger K., Seyler A., Sharp S., Shin H., Sivam D., Squares R., Squares S., Tosato V., Vogt C., Volckaert G., Wambutt R., Warren T., Wedler H., Woodward J., Zhou S., Zimmermann W., Smith D.

- F., Blackwell J. M., Stuart K. D., Barrell B. y Myler P. J. 2005. The genome of the kinetoplastid parasite, *Leishmania major*. *Science*. 309 (5733): 436-442.
- Kassavetis, G. A. y Geiduschek, E. P. 2006. Transcription factor TFIIB and transcription by RNA polymerase III. *Biochemical Society Transactions*. 34 (6): 1082-1087.
 - Khoo, S. K., Wu, C. C., Lin, Y. C., Lee, J. C. y Chen, H. T. 2014. Mapping the protein interaction network for TFIIB-Related factor Brf1 in the RNA Polymerase III preinitiation complex. *Molecular and Cellular Biology*. 34 (3): 551-559.
 - Knuston, B. A. y Hahn, S. 2011. Yeast and human TAF1 are TFIIB-related RNA polymerase I general transcription factors. *Science*. 333 (6049): 1637-1640.
 - Kwapisz, M., Beckouët F. y Thuriaux P. 2008. Early evolution of eukaryotic DNA-dependent RNA polymerases. *Trends in Genetics*. 24 (5): 211-215.
 - Lesniewska, E. y Boguta, M. 2017. Novel layers of RNA polymerase III control affecting tRNA gene transcription in eukaryotes. *Open Biology*. 7 (2).
 - Lewin, B. 2004. *Genes IX*. Upper Saddle River, New Jersey. Pearson Prentice Hall.
 - Liang, X., Haritan, A., Uliel, S. y Michaeli, S. 2003. Trans and cis splicing in Trypanosomatids: Mechanism, Factors, and Regulation. *Eukaryotic cell*. 2 (5): 830-840.
 - Liu, B., Liu, Y., Motyka, S. A., Agbo, E. E. y Englund, P. T. 2005. Fellowship of the rings: the replication of kinetoplast DNA. *Trends in Parasitology*. 21 (8): 363 -369.
 - Livak, K. J. y Schmittgen, T. D. 2001. Analysis of relative gene expression data using Real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method. *Methods*. 25 (4): 402-408.
 - Lodish, H., Berk, A., Kaiser, C., Krieger, M., Bretscher, A., Ploegh, H., Amon, A. y Martin, K. 2004. *Molecular Cell Biology*. New York: W.H. Freeman and Company.

- Lukes, J., Guilbride, D. L., Votýpka, J., Zíková, A., Benne, R. y Englund, P. T. 2002. Kinetoplast DNA network: Evolution of an improbable structure. *Eukaryotic Cell*. 1 (4): 495 -502.
- Martínez-Calvillo, S., Yan, S., Nguyen, D., Fox, M., Stuart, K. y Myler, P. J. 2003. Transcription of *Leishmania major* Friedlin chromosome 1 initiates in both directions within a single region. *Molecular Cell*. 11 (5): 1291-1299.
- Martínez-Calvillo, S., Sunkin, S. M., Yan, S. F., Fox, M., Stuart, K. y Myler, P. J. 2001 Genomic organization and functional characterization of the *Leishmania major* Friedlin ribosomal RNA gene locus. *Molecular and Biochemical Parasitology*. 116 (2): 147-157.
- Martínez-Calvillo, S., Vizuet-de-Rueda, J. C., Florencio-Martínez, L. E., Manning-Cela, R. G. y Figueroa-Angulo, E. E. 2010. Gene expression in Trypanosomatid parasites. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. 2010: 1-15.
- Martínez-Calvillo, S., Florencio-Martínez, L. E., Rojas-Sánchez, S., Moreno-Campos, R., Vizuet-de-Rueda, J., Padilla-Mejía, N. E., Román-Carraro, F. C., Flores-Pérez, C., Manning-Cela, R. G. y Figueroa-Angulo, E. E. 2012. Estructura genómica y regulación de la expresión genética en *Leishmania major* y *Trypanosoma cruzi*. En M. E. Alvarez-Sánchez, y E. Azuara, Genómica de parásitos, aspectos moleculares, genómicos, proteómicos y de virulencia (pp. 47 – 79). Editorial Académica Española.
- Montalvo, A. M., Fraga, J., Monzote, L., García, M. y Fonseca, L. 2012. Diagnóstico de la leishmaniasis: de la observación microscópica del parásito a la detección del ADN. *Revista Cubana de Medicina Tropical*. 64 (2): 108-131.
- Monroy-Ostria, A. y Sanchez-Tejada, G. 2002. Molecular probes and the polymerase chain reaction for detection and typing of *Leishmania* species in Mexico. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 1: 101- 104.
- Muller-Esterl, W. 2008. Bioquímica. Fundamentos para medicina y ciencias de la vida. Reverte. P 680.

- Naidu, S., Friedrich, J. K., Russell, J. y Zomerdiik, J. C. B. M. 2011. TAF1B is a TFIIB-like component of the basal transcription machinery for RNA polymerase I. *Science*. 333 (6049): 1640-1642.
- Nakaar, V., Dare, A. O., Hong, D., Ullu, E. y Tschudi, C. 1994. Upstream tRNA genes are essential for expression of small nuclear and cytoplasmic RNA genes in trypanosomes. *Molecular and Cellular Biology*. 14 (10): 6736-6742.
- Noma, K., Cam, H. P., Maraia, R. J. y Grewal, S. I. S. 2006. A role for TFIIIC transcription factor complex in genome Organization. *Cell*. 125 (5): 859-872.
- Oppendoes, F. R. y Borst, P. 1977. Localization of nine glycolytic enzymes in a microbody-like organelle in *Trypanosoma brucei*: The glycosome. *FEBS Letters*. 80 (2): 360-364.
- Padilla-Mejía, N. E., Florencio-Martínez, L. E., Figueroa-Angulo, E. E., Manning-Cela, R. G., Hernández-Rivas, R., Myler, P. J. y Martínez-Calvillo, S. 2009. Gene organization and sequence analyses of transfer RNA genes in Trypanosomatid parasites. *BMC Genomics*. 10 (232).
- Padilla-Mejía, N. E., Gómez-Hurtado, C. M., Sánchez-Santamaría, I. I., Florencio-Martínez, L. E., Manning-Cela, R. G. y Martínez-Calvillo, S. 2013. Comparative genomics of *Leishmania* parasites. En C. López-Camarillo y L. A. Marchat, *Comparative genomics in neglected human parasites* (pp. 59-80). Nova Biomedical.
- Roeder, R. G. 1996. The role of general initiation factors in transcription by RNA polymerase II. *Trends in Biochemical Sciences*. 21 (9): 327-335.
- Rojas-Sánchez, S., Figueroa-Angulo, E., Moreno-Campos, R., Florencio-Martínez, L. E., Manning-Cela, E. G. y Martínez-Calvillo, S. 2016. Transcription of *Leishmania major* U2 small nuclear RNA gene is directed by extragenic sequences located within a tRNA-like and a tRNA-Ala gene. *Parasites & Vectors*. 9 (1):401.
- Schramm, L. y Hernandez, N. 2002. Recruitment of RNA Polymerase III to its target promoters. *Genes and Development*. 16 (20): 2593–2620.

- Smale, S. T. y Kadonaga, J. T. 2003. The RNA polymerase II core promoter. *Annual Review of Biochemistry*. 72: 449-479.
- Tovar, C. y Yasnot, M. 2016. Visceral Leishmaniasis in Latin America and therapy perspectives. *MVZ Córdoba*. 22: 6075-6088.
- Vannini, A. y Cramer, P. 2012. Conservation between the RNA Polymerase I, II, and III transcription initiation machineries. *Molecular cell*. 45 (4):439 - 446.
- Vélez-Ramírez, D. E., Florencio-Martínez, L. E., Romero-Meza, G., Rojas-Sánchez, S., Moreno-Campos, Arroyo, R., Ortega-López, J., Manning-Cela, R., y Martínez-Calvillo, S. 2015. BRF1, a subunit of RNA polymerase III transcription factor TFIIIB, is essential for cell growth of *Trypanosoma brucei*. *Parasitology*. 142 (13): 1563-1573.
- WHO. 2010. Control of the leishmaniasis, technical report series. 949.