



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

**ANÁLISIS FUNCIONAL DEL ORTÓLOGO DE LA SUBUNIDAD BDP1 DEL
FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN TFIIB EN *LEISHMANIA MAJOR***

TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE
DOCTORA EN CIENCIAS

PRESENTA:
FIORDALISO CAROLINA ROMÁN CARRARO

DIRECTOR DE TESIS
DR. SANTIAGO MARTÍNEZ CALVILLO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA
COMITÉ TUTOR
DRA. ANA MARÍA CEBALLOS GAOS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS
DRA. YOLANDA IRASEMA CHIRINO LÓPEZ
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

Los Reyes Iztacala, Tlalnepantla, Estado de México., 2019
Octubre



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 ACADÉMICOS

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

Agradezco al CONACYT la beca otorgada para mis estudios de Doctorado (Becario 294812).

Agradezco al Dr. Santiago Martínez Calvillo por todo su apoyo en el presente trabajo.

Este trabajo fue financiado por los donativos 251831 de CONACYT; IN214715 e IN207118 de PAPIIT (DGAPA, UNAM), otorgados al Dr. Santiago Martínez Calvillo.

De igual manera, agradezco la asesoría de los miembros del Comité Tutor hacia mi proyecto de doctorado, y a mis sinodales de examen de grado por la revisión de mi tesis:

- Dr. Santiago Martínez Calvillo (tutor principal).
- Dra. Ana María Cevallos Gaos.
- Dra. Yolanda Irasema Chirino López.
- Dra. Bertha Josefina Espinoza Gutiérrez.
- Dr. Roberto Hernández Fernández.
- Dra. Rosaura Hernández Rivas.
- Dr. Roberto Coria Ortega.

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

A la Dra. Norma Padilla, compañera y amiga, por tus valiosos consejos científicos y personales. Me motivas a seguir tus pasos en la investigación.

A la Dra. Gabriela Romero, por tu ayuda experimental y por esos momentos de diversión en el laboratorio.

A la Biól. Lourdes Mejía, por tu amistad y confianza en todo momento.

Al Dr. Rodrigo Campos, por tu amistad y por compartir ese entusiasmo y amor por la ciencia.

Al Dr. Daniel Vélez, por tu amistad y honestidad.

Al Biól. Adrián Chaveste, por esas pláticas interesantes, con pancito, de las RNA polys.

A los nuevos integrantes del laboratorio 1 que comienzan una nueva etapa en la ciencia, la Biól. Fabiola Mondragón, el Biól. Andrés Cano y el Biól. Luis Alberto Barocio. Gracias por todo su apoyo, confianza y amor.

DEDICATORIAS

A mi mamá Maricela Carolina Carraro Zanella, por enseñarme a ser fuerte ante los problemas y a seguir adelante. Siempre serás una inspiración para mí y para todos los que te conocen.

A mi papá Pedro Román Prieto, por todo el amor y la paciencia que me has tenido desde que era niña, y cuando me guardabas en tu bolsillo.

A José Manuel Román Carraro, que con tu muy admirable presencia, carácter y apoyo incondicional, me haces sentir feliz de tenerte como hermano.

A mi abuelita Victoria Zanella Islas, por todo tu amor y dulzura. Siempre has estado conmigo y me has cuidado desde que tengo memoria.

A mi amigo Arturo Siliceo, que con tus extensas pláticas y enseñanzas me motivas a ser mejor persona.

A mi mejor amigo y esposo Rodrigo Herrera Mávil, tú eres mi máxima inspiración. Desde que te conocí me has apoyado y llenado de ese amor único con el que todos soñamos. Te amo mucho y me siento muy afortunada de tenerte como mi pareja de vida.

ÍNDICE

LISTA DE TABLAS	i
LISTA DE FIGURAS	i
ABREVIATURAS	iii
RESUMEN	1
ABSTRACT	2
1 INTRODUCCIÓN	3
1.1 Leishmaniasis	3
1.1.1 Leishmaniasis cutánea	5
1.1.2 Leishmaniasis mucocutánea	7
1.1.3 Leishmaniasis visceral	8
1.1.4 Tratamientos para la leishmaniasis	9
1.1.5 Historia de la leishmaniasis	10
1.2 Taxonomía de <i>Leishmania</i>	12
1.3 Biología celular	14
1.4 Morfología	16
1.5 Ciclo de vida	18
1.6 Transcripción en eucariontes	21
1.6.1 RNA polimerasas	23
1.6.2 Evolución de las RNA polimerasas	24
1.6.3 RNA polimerasa I	27
1.6.4 RNA polimerasa II	28
1.6.5 RNA polimerasa III	33
1.6.5.1 TFIIB	39
1.6.5.2 Bdp1	40
1.6.5.3 Regulación de la transcripción de la RNA Pol III	43
1.7 Expresión genética en tripanosomátidos	45
1.7.1 Organización genómica	45
1.7.2 Plasticidad genómica en <i>Leishmania</i>	47
1.7.3 Transcripción policistrónica	48
1.7.4 Maduración de los mRNAs por <i>trans-splicing</i> y poliadenilación	48
1.7.5 Promotores de las RNA polimerasas	50
1.7.6 RNA polimerasas y factores de transcripción	51
2. ANTECEDENTES	53
3. OBJETIVOS	55
3.1 Objetivo general	55
3.2 Objetivos particulares	55
4. METODOLOGÍA	57
4.1 Análisis <i>In silico</i>	57
4.2 Cultivos y conteo de promastigotes de <i>L. major</i>	57
4.3 Clonación en pGEMT-Easy y ligación con la T4 ligasa	58
4.4 Transformación de células competentes <i>E.coli</i> JM109	59
4.5 Obtención de vectores	59
4.5.1 LmBdp1-PTP	59
4.5.2 pΔBdp1- pac y pΔBdp1-hyg	60
4.5.3 Vectores para los ensayos de <i>run-on</i> nuclear	61
4.6 Transfección por electroporación en <i>L. major</i>	62
4.7 Ensayos tipo <i>Western-blot</i>	63

4.8	Ensayos de inmunofluorescencia indirecta en <i>L. major</i>	65
4.9	Ensayos de PCR punto final para la caracterización de <i>L. major</i> KOD+1	65
4.10	Ensayos tipo <i>Southern-blot</i> para la caracterización de <i>L. major</i> KOD+1	66
4.11	Marcaje radioactivo	67
4.12	Ensayos de <i>run-on</i> nuclear de <i>L. major</i> KOD+1	67
4.13	Inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP) en <i>L. major</i>	69
4.14	Análisis cuantitativo de PCR en tiempo real (qPCR)	70
5.	RESULTADOS	72
5.1	Análisis <i>in silico</i> de LmBdp1	72
5.2	Identificación de posibles sitios de fosforilación en LmBdp1	80
5.3	Localización celular de LmBdp1 en <i>L. major</i>	82
5.4	Efecto del <i>knock-out</i> de LmBdp1 en <i>L. major</i>	84
5.5	Análisis de <i>run-on</i> nuclear en el cultivo <i>L. major</i> KOD+1	94
5.6	Ensayos ChIP usando la línea <i>L. major</i> Bdp1-PTP	97
6.	DISCUSIÓN	101
7.	CONCLUSIONES	109
8.	PERSPECTIVAS	110
9.	REFERENCIAS	111
10.	APÉNDICE: artículo de investigación derivado del proyecto	123

LISTA DE TABLAS

Tabla I: Diversidad de las subunidades de las RNA polimerasas en los tres dominios de la vida	23
Tabla II: RNAs transcritos por la RNA Pol III	35
Tabla III: Peso molecular de diferentes ortólogos de Bdp1	72
Tabla IV: Porcentajes de identidad en la secuencia de aminoácidos entre ortólogos de Bdp1	73
Tabla V: Porcentajes de identidad del dominio SANT extendido y el N-linker de diferentes ortólogos	75
Tabla VI: Predicción de residuos fosforilables en LmBdp con base en el programa PhosTryp	81
Tabla VII: Peso molecular de las subunidades de TFIIIB entre <i>L. major</i> , <i>S. cerevisiae</i> y <i>H. sapiens</i>	102

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: La leishmaniasis es un término que define a un conjunto de enfermedades con cuadros clínicos muy variables	4
Figura 2: Distribución geográfica de la leishmaniasis cutánea (LC)	7
Figura 3: Distribución geográfica de la leishmaniasis visceral (LV)	9
Figura 4: Taxonomía de <i>Leishmania</i>	12
Figura 5: Representación esquemática de la composición celular de <i>L. major</i> en su estadio de promastigote	15
Figura 6: Morfologías adoptadas por los tripanosomátidos	16
Figura 7: Cambios en la morfología de <i>Leishmania</i> durante su ciclo celular	17
Figura 8: Ciclo de vida de <i>Leishmania</i>	20
Figura 9: La transcripción es un proceso cíclico	22
Figura 10: Evolución de las RNA polimerasas en los tres dominios de la vida	26
Figura 11: Organización genérica de las unidades transcripcionales de los genes de los rRNA	28
Figura 12: Los niveles de fosforilación del CTD de la RNA Pol II cambian durante la transcripción	30
Figura 13: Terminación dependiente de Poli-A en humano	31
Figura 14: <i>Looping-gen</i> o circulamiento del gen para el reinicio de la transcripción por la RNA Pol II en levadura	32
Figura 15: La RNA Pol III se conforma de 17 subunidades	34
Figura 16: Tipos de promotores reconocidos por la maquinaria transcripcional de la RNA Pol III	37
Figura 17: Arquitectura del PIC de la RNA Pol III y Pol II	40
Figura 18: Representación de la estructura secundaria del dominio SANT extendido en humano	41
Figura 19: Interacciones del N-linker y de la tercera hélice del dominio SANT extendido son características distintivas de Bdp1	42
Figura 20: La RNA Po III puede ser inhibida por la acción de Maf1	44
Figura 21: Regulación de la activación o inhibición de las subunidades de TFIIIB	45

Figura 22: Cromosoma 1 de <i>L. major</i>	47
Figura 23: Transcripción de genes codificadores de proteína en tripanosomátidos	49
Figura 24: Representación esquemática de las regiones promotoras de los tripanosomátidos	51
Figura 25: Análisis de la secuencia y estructura del dominio SANT extendido y del N-linker	74
Figura 26: Alineamiento del N-linker y del dominio SANT extendido en el género <i>Leishmania</i>	76
Figura 27: Análisis de la secuencia y estructura secundaria de las regiones conservadas en Bdp1	78
Figura 28: Estructuras en 3D del <i>tether</i> , N-linker, dominio SANT extendido y <i>long arm</i>	79
Figura 29: Predicción de residuos fosforilables en LmBdp1 con Phos Tryp	81
Figura 30: Análisis de restricción del vector LmBdp1-PTP	82
Figura 31: Vector pLmBdp1-PTP	83
Figura 32: Localización celular de LmBdp1	84
Figura 33: Clonación y purificación de las regiones fUTR5' y fUTR3 del gen LmBdp1 en el vector pGEMT Easy	86
Figura 34: Obtención de los genes de puromicina (pac) e higromicina (hyg) y del vector pBluescript II SK	87
Figura 35: Mapa de restricción de los vectores pΔBdp1-pac y pΔBdp1-hyg	88
Figura 36: Purificación de los <i>cassettes</i> de pac e hyg	89
Figura 37: Representación esquemática del <i>knock-out</i> de LmBdp1	90
Figura 38: Análisis de PCR de la líneas KOS y KOD+1	91
Figura 39: Análisis <i>Southern-blot</i> de células <i>knock-out</i> de <i>L. major</i>	92
Figura 40: Curva de crecimiento y análisis de <i>Western-blot</i> de la línea KOD+1	93
Figura 41: Análisis de <i>run-on</i> nuclear de la líneas WT, KOS y KOD+1	95
Figura 42: Análisis de <i>run-on</i> nuclear del 24Sβ rRNA en la línea KOD+1	96
Figura 43: Sonicación de la cromatina	97
Figura 44: Análisis de la inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP) de LmBdp1	99

ABREVIATURAS

°C	Grados Celsius
µg	Microgramos
µl	Microlitros
Bdp1	B doble prima 1 o B" 1
Brf1	Factor 1 relacionado a TFIIIB
CDK9	Cinasa dependiente de ciclina 9
ChIP	Inmunoprecipitación de la cromatina
CK2	Caseína cinasa 2
CNV	Variaciones en el número de copias de genes
CTD	Dominio C terminal
CTP	Citocina trifosfato
DSE	Elemento distal
ETD	Enfermedad tropical desatendida
Erk	Cinasa regulada por señales extracelulares
FE	Fase estacionaria
FISH	Ensayo de hibridación fluorescente <i>in situ</i>
FML	Fase media logarítmica
FTs	Factores de transcripción
fUTR	Fragmento de la UTR
GSK-3	Cinasa glucógeno sintasa 3
h	Horas
HYG	Gen de resistencia a higromicina
IF	Inmunofluorescencia
Ig	Inmunoglobulina
JNK	Cinasa c-Jun N-terminal
Kb	Kilo bases
kDa	Kilo daltones
Kns1	Cinasa homóloga 1
KOD+1	<i>Knock-out</i> doble con copia adicional del gen
KOS	<i>Knock-out</i> sencillo (de sólo un alelo)
LC	Leishmaniasis cutánea
LmBdp1	Bdp1 de <i>L. major</i>
LMC	Leishmaniasis mucocutánea
LV	Leishmaniasis visceral
Mb	Mega bases
Mck1	Cinasa reguladora del centrómero y la meiosis
min	Minutos
ml	Mililitros
mM	Milimolar
mRNA	RNA mensajero

NTPs	Nucleótidos trifosfatados
ON	Incubación de toda la noche (<i>overnight</i>)
P53	Proteína de 53 kDa
PAC	Gen de resistencia a puromicina
Pb	Pares de bases
PGC	Grupo de genes policistrónicos
PIC	Complejo de pre inicio
PIK1	Cinasa fofatidilinositol-4
PKA	Proteína cinasa A
Poli-A	Poli adeninas
PP4	Proteína fosfatasa 4
PSE	Elemento proximal
PTEN	Fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato 3-fosfatasa
qPCR	PCR cuantitativo
Rb	Proteína del retinoblastoma
RNA Pol I	RNA polimerasa I
RNA Pol II	RNA polimerasa II
RNA Pol III	RNA polimerasa III
Rpm	Rotaciones por minuto
rRNA	RNA ribosomal
SANT	Siglas de <u>S</u> WI-SNF, <u>A</u> da, <u>N</u> -CoR y <u>I</u> FIIB
Sch9	Serina/treonina proteína cinasa 9
SIT	Sitio de inicio de la transcripción
SL	<i>Spliced leader</i> (miniexón)
snRNA	RNA pequeño nuclear
SSR	Región de cambio de hebra
TA	Temperatura ambiente
TAFs	Factores de transcripción asociados
TBP	Proteína de unión a la caja TATA
TFIIIA	Factor de transcripción III A
TFIIB	Factor de transcripción III B
TFIIC	Factor de transcripción III C
TOR	Blanco del fármaco rapamicina
tRNA	RNA de transferencia
UCR	Región de control río arriba
UTR	Region no traducida
VSG	Glicoproteínas variables de superficie
WT	Cepa silvestre

RESUMEN

Leishmania major es un protozooario parásito que exhibe mecanismos inusuales en su expresión genética. En este organismo se sabe muy poco acerca de los factores de transcripción involucrados en la síntesis del 5S rRNA, los tRNAs y los snRNAs, moléculas esenciales para la viabilidad celular que son sintetizadas por la RNA Pol III. Es por ello que en este trabajo hemos identificado y caracterizado funcionalmente a la subunidad Bdp1 del factor de transcripción TFIIB en *L. major* (LmBdp1). En otros organismos se ha demostrado que Bdp1 es indispensable para el inicio de la transcripción, al participar en el reclutamiento de la RNA Pol III y en la apertura del promotor. Diversos análisis *in silico* demostraron que LmBdp1 contiene el típico dominio SANT extendido, así como otras regiones conservadas en Bdp1. Sin embargo, LmBdp1 también mostró algunas características distintivas como la presencia de un único residuo aromático en el N-linker. No se lograron obtener mutantes nulas (*knock-out* doble) de LmBdp1 por recombinación homóloga, pues aunque la línea celular obtenida (llamada KOD+1) mostró el correcto reemplazo de los dos alelos endógenos, presentó una copia adicional de LmBdp1. Este resultado sugiere fuertemente que LmBdp1 es esencial para la viabilidad de promastigotes de *L. major*. De manera interesante, la línea mutante KOD+1 mostró niveles reducidos de la proteína LmBdp1 (70%), y su crecimiento se redujo significativamente (hasta cinco veces) en comparación con la línea silvestre. Ensayos de *run-on* nuclear demostraron que la transcripción de la RNA Pol III se vio afectada en la línea mutante KOD+1, y experimentos de CHIP mostraron que LmBdp1 se une a genes del 5S rRNA, tRNAs y snRNAs. Por lo tanto, nuestros resultados indican que LmBdp1 es esencial para la viabilidad del parásito, al ser requerida para la transcripción de la RNA Pol III.

ABSTRACT

Leishmania major is a flagellated parasite that diverged early from the main eukaryotic lineage. It is characterized by the presence of atypical mechanisms of gene expression. In this organism, little is known about the transcription factors involved in the synthesis of tRNA, 5S rRNA and snRNAs, transcribed by RNA Polymerase III (RNA Pol III). For this reason, we identified and characterized the TFIIIB subunit Bdp1 in *L. major* (LmBdp1). In other organisms, Bdp1 plays key roles in RNA Pol III transcription initiation, as it is involved in RNA Pol III recruitment and promoter opening. *In silico* analysis shows that LmBdp1 contains the typical extended SANT domain as well as other Bdp1 conserved regions. However, LmBdp1 also exhibits unique features, including the presence of only one aromatic residue in the N-linker region. We were not able to produce null mutants of LmBdp1 by homologous recombination, as the obtained double replacement cell line contained an extra copy of LmBdp1, indicating that LmBdp1 is essential for the viability of *L. major* promastigotes. Remarkably, the mutant cell line showed reduced levels of the LmBdp1 protein (70%), and its growth was significantly reduced (five times lower) in comparison to wild-type cells. Nuclear run-on assays demonstrated that RNA Pol III transcription was affected in the mutant cell line, and ChIP experiments showed that LmBdp1 binds to 5S rRNA, tRNA and snRNA genes. Consequently, our results indicate that LmBdp1 is an essential protein required for RNA Pol III transcription in *L. major*.

1 INTRODUCCIÓN

Leishmania major es un protozooario parásito obligado responsable de ocasionar una grave enfermedad zoonótica conocida como leishmaniasis cutánea (LC). Ésta es transmitida por la picadura de una mosca de la arena hembra del género *Phlebotomus* portadora del parásito, y su diagnóstico clínico se basa principalmente en la detección de lesiones epidérmicas ulcerativas. Existen otras variantes de la leishmaniasis, como lo son la mucocutánea (LM) y la visceral (LV), que son causadas por otras especies de *Leishmania* como *L. brasiliensis* y *L. donovani* respectivamente.

Además de su importancia médica, *L. major* es un excelente modelo de estudio para abordar cuestiones moleculares y evolutivas debido a que posee particularidades en su expresión genética, como la presencia de pocas regiones promotoras, una transcripción policistrónica, y el *trans-splicing* como parte del proceso de maduración de todos los RNA mensajeros (mRNA). Por otro lado, el estudio de este parásito incrementa la posibilidad de encontrar y caracterizar nuevos blancos terapéuticos que podrían ayudar a combatir a la leishmaniasis de una manera más eficiente, ya que en la actualidad los tratamientos más utilizados como los antimoniales, tienen importantes efectos secundarios, altos costos y baja eficacia (López-Carvajal *et al*, 2016).

1.1 Leishmaniasis

El término “leishmaniasis” hace referencia a un conjunto de enfermedades con cuadros clínicos muy variable que se agrupan en tres formas principales que son, la leishmaniasis cutánea (LC), la mucocutánea (LM), y la visceral (LV) (Fig. 1). Es catalogada por la OMS como una enfermedad tropical desatendida (ETD) con

una prevalencia mundial de 12 millones de personas infectadas, un índice anual de 1.2 a 2 millones de nuevos casos y de 20 000 a 40 000 defunciones al año. La leishmaniasis es ocasionada por diversas especies de protozoos de la subfamilia Leishmaniinae (Jirků *et al*, 2012; Espinosa *et al*, 2016; Maslov *et al*, 2018), y son transmitidas al hospedero mamífero mediante la picadura de un vector díptero de la subfamilia Phlebotominae, conocido comúnmente como mosca de la arena.



Leishmaniasis cutánea
(L. major)



Leishmaniasis mucocutánea
(L. braziliensis)



Leishmaniasis visceral
(L. donovani)

Figura 1: La leishmaniasis es un término que define a un conjunto de enfermedades con cuadros clínicos muy variables. Éstos se desarrollan dependiendo de la especie de *Leishmania* infectante y del estado inmunológico de la persona. La leishmaniasis cutánea puede ser ocasionada por *L. major*, la mucocutánea por *L. braziliensis* y la visceral por *L. donovani*. (Imágenes de Navarrete-Dechent *et al*, 2018 y Pizzariello *et al*, 2013. <http://www.dermatolarg.org.ar/index.php/dermatolarg/rt/metadatos/918/0>).

La leishmaniasis tiene una amplia distribución a nivel mundial, afectando a más de 98 países en cuatro de los cinco continentes (América, Europa, Asia y África), siendo las regiones tropicales y subtropicales las que tienen una mayor ocurrencia. Únicamente en Nueva Zelanda y en el Pacífico sur no existen reportes de dichas enfermedades en el humano (Steverding, 2017). En México los estados del sureste como Quintana Roo y Tabasco son los estados más afectados por este padecimiento (Sosa *et al*, 2014). Las formas clínicas de la leishmaniasis se vinculan con determinadas especies de *Leishmania*, sin embargo el estado inmunológico del paciente es lo que predominantemente determina el desarrollo de los cuadros clínicos (Pizzarielo *et al*, 2013; Gonzalez y Zerpa, 2004). Los síntomas van desde lesiones epidérmicas papulosas, verrugosas o ulcerativas, hasta daños estructurales irreversibles, inflamación de órganos internos, e incluso la muerte.

1.1.1 Leishmaniasis cutánea

Epidemiología

Esta variante de leishmaniasis es la de mayor prevalencia. Se reportan de 600 000 a un millón de nuevos casos por año (OMS), en donde el 75% de éstos ocurre prevalentemente en diez países: Afganistán, Argelia, Brasil, Colombia, República Islámica de Irán, República Árabe Siria, Etiopía, Norte de Sudan, Costa Rica y Perú (Fig. 2) (Alvar *et al*, 2012). En México la LC es endémica en los estados de Campeche, Chiapas, Tamaulipas, Coahuila, Jalisco, Michoacán, Nayarit, Nuevo León, Oaxaca, Quintana Roo, Tabasco, Veracruz, Yucatán, Sinaloa y Durango (Pérez-Vega *et al*, 2009).

Sintomatología

La enfermedad de la leishmaniasis cutánea puede ser localizada (LCL) o difusa (LCD), dependiendo del nivel de propagación de las lesiones. La LCL es conocida también como botón de Oriente y se hace notar por la aparición de una pápula en el sitio de la mordedura de la mosca que tiende a ulcerarse en el centro con un borde sobre elevado e hiperpigmentado (Fig. 1). Las úlceras pueden ser secas o exudativas y suelen aparecer en un par de semanas o meses posteriores al contagio. No se reporta dolor sistémico o localizado, y pueden curarse espontáneamente dejando una cicatriz. La complicación más frecuente es la sobreinfección bacteriana que puede ocasionar dolor y secreción purulenta (Del Rosal Rabes *et al*, 2010). Las especies de *Leishmania* relacionadas en el Viejo Mundo (Europa, Asia y África) son *L. major* y *L. tropica*.

En el Nuevo Mundo (América) se reconocen los subgéneros *Leishmania* (que incluye las especies *L. mexicana*, *L. amazonensis* y *L. chagasi*); y *Viannia* (incluye *L. panamensis*, *L. braziliensis* y *L. guyanensis*) (Del Rosal Rabes *et al*, 2010). La especie *L. braziliensis* puede producir tanto la forma cutánea como la mucocutánea. La leishmaniasis cutánea difusa es una forma clínica rara con una incidencia que va en aumento debido a estados de inmunosupresión provocados por el VIH y la desnutrición (Blum-Domínguez *et al*, 2015). Un ejemplo de esto ocurre en Venezuela, en donde el 10% de los casos de LC evolucionan a LCD, siendo *L. mexicana* (19%) y *L. amazonensis* (81%) los agentes etiológicos responsables. En etapas tempranas, la enfermedad se caracteriza clínicamente por la aparición de pápulas, placas o nódulos eritematosos o color de la piel, que no tienden a ulcerarse a menos que sufran traumatismos (Zerpa y Convit, 2009).

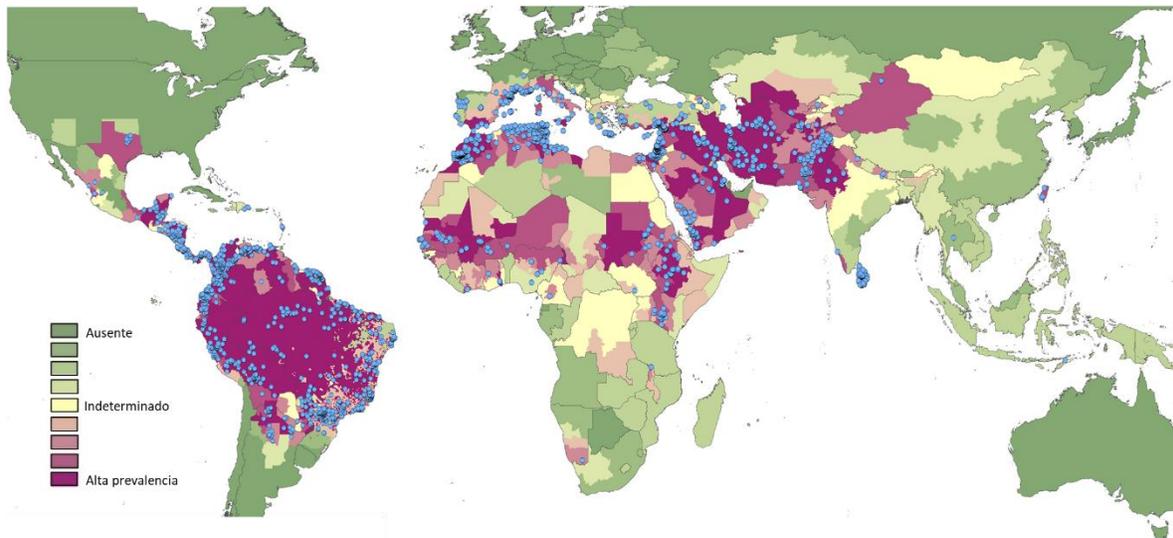


Figura 2: Distribución geográfica de la leishmaniasis cutánea (LC). La prevalencia va acorde al abanico de colores desde el verde oscuro (completa ausencia) hasta el morado oscuro (alta prevalencia). Los puntos azules representan los casos reportados (Pigott *et al*, 2014).

1.1.2 Leishmaniasis mucocutánea

Epidemiología

Es endémica en más de 70 países, pero el 90% de los casos ocurre en Arabia Saudita, Irán, Afganistán, Brasil y Perú. En México es endémica en los estados de Tabasco y Chiapas (Pérez-Vega *et al*, 2009).

Sintomatología

Suele presentarse como estadio tardío de la afectación cutánea tras una diseminación hematogena o linfática, siendo raro que coincidan lesiones cutáneas y mucosas. Las lesiones mucosas aparecen más frecuentemente en el área

otorrinolaringológica con lesiones destructivas crónicas y mutilantes de difícil tratamiento (González *et al*, 2009). Se ha reportado que en pacientes inmunocompetentes la mucosa oral es la segunda localización más frecuente. A pesar de ello la afectación oral como manifestación inicial y única es extremadamente rara (Martín *et al*, 2017). Esta variedad de leishmaniasis es casi exclusiva de Sudamérica, donde es provocada por *L. braziliensis* (Del Rosal Rabes *et al*, 2010).

1.1.3 Leishmaniasis visceral

Epidemiología

La LV es la variante más severa puesto que el 95% de los casos no tratados terminan en defunciones. Se registran de 0.2 a 0.4 millones de nuevos casos por año, en donde el 90% ocurre en seis países: India, Bangladesh, Sudan, Sur de Sudan, Brasil y Etiopia (Fig. 3). En la India la LV recibió el nombre de *kala-azar* que significa enfermedad negra debido a la coloración grisácea de la piel que es adquirida por habitantes con este padecimiento (Sundar, 2015).

Sintomatología

Es una enfermedad sistémica aguda o crónica, que afecta principalmente al hígado, bazo y ganglios linfáticos. Existen casos raros en donde se puede llegar a comprometer el sistema digestivo, riñones y el sistema nervioso. Los síntomas que se presentan son fiebre, esplenomegalia, leucopenia, hipergammaglobulemia y debilidad (Sánchez *et al*, 2008). Alrededor del 50 y 10% de los pacientes en Sudán y la India respectivamente llega a desarrollar un tipo de leishmaniasis cutánea posterior a la recuperación de la LV que se caracteriza por la aparición de lesiones

nodulares y maculares, llamada leishmaniasis dérmica post kala-azar (LDPK) (Zijlstra *et al*, 2003). Los agentes causantes son especies del complejo *L. donovani* (*L. donovani*, *L. infantum*/*L. chagasi*) y *L. tropica*. En México la LV se produce por *L. chagasi* (*L. infantum*) y se presenta predominantemente en Chiapas, pero también es endémica en Guerrero, Morelos, Puebla y Oaxaca (Pérez-Vega *et al*, 2009; Cruz-Hernández *et al*, 2013).

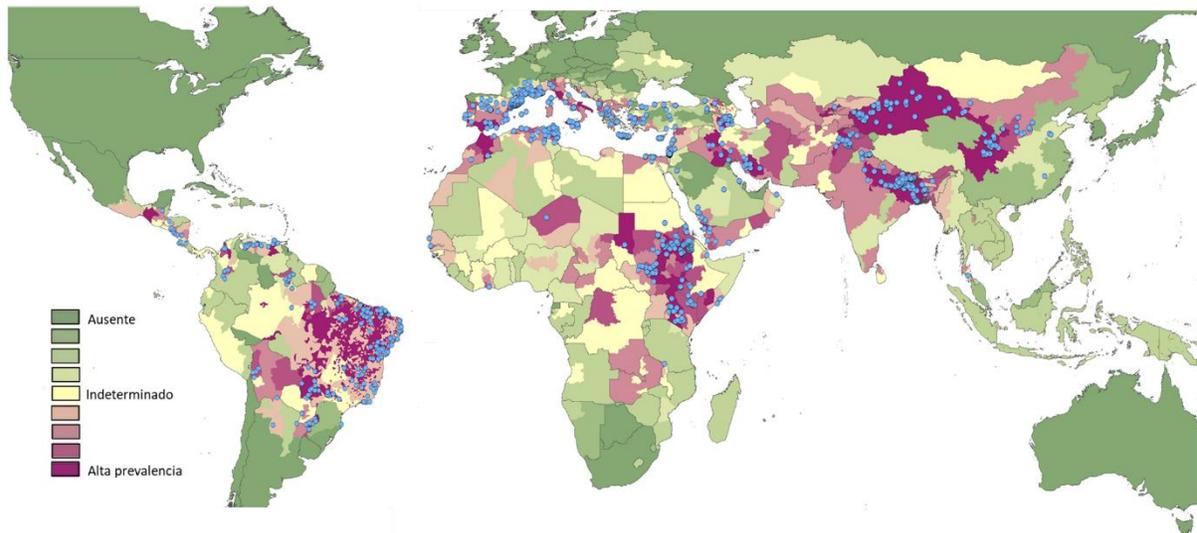


Figura 3: Distribución geográfica de la leishmaniasis visceral (LV). La prevalencia va acorde al abanico de colores desde el verde oscuro (completa ausencia) hasta el morado oscuro (alta prevalencia). Los puntos azules representan los casos reportados (Pigott *et al*, 2014).

1.1.4 Tratamientos para la leishmaniasis

Los tratamientos para combatir la leishmaniasis son limitados, caros y con índices de efectividad variables, incluso entre la misma variante de la enfermedad. Los antimoniales pentavalentes como el estibogluconato de sodio (Pentostam) y el antimoniato de meglumina (Glucantime) son los más utilizados para combatir todas las variantes de la leishmaniasis. Se administran vía endovenosa o intramuscular y ayudan a sanar rápidamente las lesiones, previniendo su reaparición y

diseminación. De igual manera se utiliza la Anfotericina B, la paromomicina y el isetionato de pentamicina (Pentam 30). Los efectos adversos más importantes que desarrollan dichos tratamientos son la cardiotoxicidad con bradicardia y aumento del intervalo QT, hepatotoxicidad y pancreatitis (Lockwood y Moore, 2010). La Miltefosina (hexadecilfosfocolina) es un fármaco oral con muy buenas expectativas debido a su buena efectividad, bajos costos y accesibilidad en territorios con altos índices de pobreza. Pero también se ha relacionado con algunos efectos adversos como problemas gastrointestinales en un 65% de los casos, e insuficiencia renal en un 10-15% de los casos, entre otros (Sunyoto *et al*, 2018).

1.1.5 Historia de la leishmaniasis

Los análisis genéticos de momias egipcias que datan de 2500 años AC revelaron la presencia del parásito *L. donovani*, indicando que la enfermedad ha acompañado al ser humano por miles de años. En Sudamérica, también existen reportes antiguos de lesiones ocasionadas por la LC en Ecuador y Perú, durante el periodo Inca, conocida entonces como “enfermedad del valle” o “lepra blanca” (Zink *et al*, 2006). Rusell en 1756 fue el primero en describir la enfermedad del *kala-azar* en la India y ocho años después Cosme Bueno relacionó a la mosca de la arena con la transmisión de la enfermedad en el Nuevo Mundo (Akhoudi *et al*, 2017). Sin embargo, no fue hasta 1885 que *Leishmania* fue observada por primera vez por el médico escocés David Douglas Cunningham en un forúnculo infectado; sin embargo, no logró vincular al parásito con la enfermedad. En 1898 el cirujano ruso Piotr Fokich Borovsky determinó por primera vez que el agente causal de la “úlceras orientales” (LC) era un protozoo, pero su descubrimiento pasó desapercibido debido a que lo publicó en una revista rusa no reconocida. En 1900 el patólogo escocés Sir William Boog Leishman, quien servía al ejército británico en la India, observó que los cuerpos ovalados presentes en un frotis de un bazo de un soldado que había muerto por esplenomegalia (agrandamiento del bazo) eran “tripanosomas degenerados”. En 1903 publicó sus hallazgos, relacionando la “fiebre dum dum” (LV) con un tipo de

tripanosomiasis (Leishman, 1903). Días después el médico irlandés Charles Donovan publicó hallazgos similares de muestras *in vivo* y *post mortem* de pacientes de la India que presentaban fiebres altas y crecimiento del bazo, sin embargo, no estaba seguro de que fueran tripanosomas. Durante el mismo año el médico británico Ronald Ross, quien investigaba el *Kala-Azar* en la India, publicó que ésta era una enfermedad ocasionada por un nuevo género de protozoarios que ya había sido identificado por Leishman y Donovan, proponiendo así el nombre de *Leishmania donovani*. Poco después el patólogo americano James Homer Wright describió por primera vez a *Helcosoma tropica*, posteriormente llamada *Leishmania tropica*. En 1909, Adolpho Carlos Lindenberg (del Instituto Bacteriológico de San Pablo, Brasil), Antonio Carini y Ulises Paranhos (del Instituto Pasteur), identificaron por primera vez y de manera simultánea a los hallazgos en la India, al parásito *Leishmania* en lesiones de la piel llamadas “úlceras Bauru”, y en membranas mucosas de boca y nariz de obreros infectados. El médico Gaspar de Oliveira Vannia, al estudiar diversas lesiones epidérmicas de pacientes en Minas Gerais, concluyó que el parásito era diferente al observado en Armenia (*L. tropica*) por lo que la nombró *L. braziliensis* (Steverding, 2017).

Evidencia fósil

La existencia de especies de protozoos tipo-*Leishmania* (*Leishmania*-like) asociadas a un vector artrópodo en épocas prehistóricas está evidenciada por el descubrimiento de dos piezas de resina de árbol fosilizadas (ámbar). Una de ellas, encontrada en el sudeste de Asia con una antigüedad de 100 millones de años, conservó a una mosca de la arena ya extinta (*Palaeomyia burmitis*) con parásitos de tipo-*Leishmania*. Se hallaron parásitos en sus formas de promastigote y amastigote, y fueron descritos y agrupados en un nuevo género llamado *Paleoleishmania*, con el nombre de *P. proterus* (Poinar y Poinar, 2004). El segundo ámbar, que fue hallado en la República Dominicana, data de unos 10 a 20 millones de años, y alojó a otra mosca de la arena extinta distinta (*Lutzomyia adiketis*) que

también tenía especies tipo-*Leishmania* nombradas *Paleoleishmania neotropicum* (Poinar Jr, 2008; Steverding, 2017). Estos descubrimientos revelaron que desde hace 100 millones de años ya existían parásitos tipo-*Leishmania* y que además ya eran especies dixénicas teniendo como vector a la mosca de la arena.

1.2 Taxonomía de *Leishmania*

Leishmania es un género de protozoarios parásitos uniflagelados y dixénicos que junto con otros 21 géneros (muchos de éstos recientemente descritos), entre ellos *Trypanosoma*, constituyen a la familia Trypanosomatidae (Fig. 4) (Votypka *et al*, 2015; Maslov *et al*, 2018).

Reino	Protista (Hackel, 1886)
<i>Phylum</i>	Euglenozoa (Cavalier-Smith, 1981)
<i>Clase</i>	Kinetoplastea (Honigberg, 1963; Vickerman, 1976)
<i>Subclase</i>	Metakinetoplastina (Vickerman, 2004)
<i>Orden</i>	Trypanosomatida (Kent, 1880; Hollande, 1952)
<i>Familia</i>	Trypanosomatidae (Doflein, 1951)
<i>Subfamilia</i>	Leishmaniinae (Jirku <i>et al</i> , 2012)
<i>Género</i>	<i>Leishmania</i> (Ross, 1908)

Figura 4: Taxonomía de *Leishmania* (Jirku *et al*, 2012; Maslov *et al*, 2013; Espinosa *et al*, 2016; Maslov *et al*, 2018).

Inicialmente, durante la década de los 80s, la taxonomía de las especies de *Leishmania* era determinada y modificada por sus características epidemiológicas como la distribución geográfica, la especificidad del vector y las manifestaciones clínicas. Ahora, con el uso de marcadores genéticos como el rRNA 18S, gGAPDH, y la morfometría por microscopía electrónica se ha complementado y actualizado mayormente a razón de su filogenia molecular. Con ello, se han identificado 53

especies diferentes de *Leishmania* de las cuales 21 han resultado ser patógenas para el ser humano (Akhoundi *et al*, 2016). Debido al descubrimiento de nuevas especies de *Leishmania*, y el análisis de sus características infectivas y filogenéticas, diversos investigadores han propuesto algunas modificaciones para su taxonomía. Con base en eso, Maslov y colaboradores en el 2018 presentan una compilación de dichas propuestas que está dirigida a la complementación de la sistemática de *Leishmania* y de otros tripanosomátidos. Como resumen se proponen seis sub familias dentro de la familia Trypanosomatidae que son: Leishmaniinae, Phytomonadinae, Strigomonadinae, Blechomonadinae, Trypanosomatinae y Paratrypanosomatinae. El género *Trypanosoma* se encuentra independiente dentro de la sub familia Trypanosomatinae (Maslov *et al*, 2018).

Por otro lado, Espinosa y colaboradores en el 2016 propusieron una clasificación dentro de la sub familia Leishmaniinae basándose en los análisis moleculares de la RNA Pol II, V7V8 SSU rDNA y gGAPDH. Establecen entonces cuatro géneros principales dentro de dicha sub familia que son *Leishmania*, *Porcisa*, *Endotrypanum* y *Zelonia*. Para el género *Leishmania* dispusieron además de cuatro sub géneros que son (i) *Leishmania*, (ii) *Viannia*, (iii) *Sauroleoshmania* y (iv) *Mundinia*.

- *Leishmania* se conforma de los complejos *L. major* (LCL), *L. tropica* (LCL y LCD), *L. donovani* (LV) y *L. mexicana* (LCL y LCD), y se localiza tanto en el Viejo Mundo como en el Nuevo Mundo.
- *Viannia* contiene a los complejos *L. braziliensis* (LC y LM), *L. panamiensis* y *L. naiffi*, y está confinado en el Nuevo Mundo.
- *Saurolesihmania* parasita únicamente reptiles y se limita al Viejo Mundo.
- *Mundinia* incluye a *L. orientalis*, especie recientemente descrita en el 2018 por Jariyapan y cols, que se vincula con la LCL en Tailandia (Jariyapan *et al*, 2018; Stevens *et al*, 2001). *L. enrietti* y *L. martiniquensis* parasitan roedores histicomorfos (como puercoespines, chinchillas y cuyos), mientras que *L. macropodum* causa leishmaniasis cutánea en macrópodos en Australia (Dougall *et al*, 2009).

1.3 Biología celular

Leishmania muestra una compleja organización intracelular conformada por organelos y estructuras canónicas de eucariontes, como la membrana plasmática, el núcleo, el retículo endoplasmático y el aparato de Golgi. Así también presenta estructuras especializadas como un citoesqueleto sub pelicular, un cinetoplasto, glicosomas y un flagelo que, en conjunto, le permiten al parásito adaptarse, sobrevivir y reproducirse en los ambientes existentes dentro de sus hospederos (Fig. 5). El citoesqueleto subpelicular, ubicado inmediatamente por debajo de la membrana plasmática, le da forma a la célula, participa en su motilidad y en el transporte intracelular. Consiste en una malla conformada por microtúbulos predominantemente de α/β tubulina, que recubre casi en su totalidad a la célula, siendo el bolsillo flagelar el único sitio en donde puede ocurrir la endocitosis y exocitosis. El bolsillo flagelar es una invaginación ubicada en la base del flagelo, que además juega un rol esencial en la morfogénesis, viabilidad e infectividad del parásito (Wheeler *et al*, 2016). El flagelo es una estructura que provee de movilidad, quimiotaxis y anclaje. Se conforma de un axonema canónico 9+2 y una estructura filamentosa llamada barra paraflagelar (PFR) que se ubica a lo largo del axonema (Gadelha *et al*, 2013). Ambos cumplen con la función de orientar correctamente a los microtúbulos que conforman al flagelo (Portman y Gull, 2010). Otra característica distintiva de *Leishmania* (y otros cinetoplastidos) es la presencia de un DNA mitocondrial inusual llamado cinetoplasto (kDNA), que representa el 30% del DNA en la célula. Bajo el microscopio electrónico se observa como una red concatenada constituida por dos tipos de DNA circular, los mini círculos (de 10 000 a 20 000) y maxi círculos (de 30 a 50) (Fig. 5). Todas las proteínas mitocondriales típicas, como el citocromo b, las subunidades de la NADH deshidrogenasa, y algunos RNA guías (gRNA) son codificadas en los maxi círculos. Los mini círculos codifican gRNAs (Ogbadoyi *et al*, 2003).

La posición del cinetoplasto y del flagelo es determinante para diferenciar los estadios celulares de los tripanosomátidos (Ogbadoyi et al, 2003). La compartimentalización de las enzimas que participan en la glucólisis en organelos llamados glicosomas es otra particularidad de los tripanosomátidos. Éstos son peroxisomas especializados que comparten una estructura y función similar pero que son específicos para la glucólisis y por lo tanto son esenciales para la supervivencia del parásito (Bauer y Morris, 2017). También encontramos los acidocalcisomas, que son compartimentos que albergan iones de calcio, pirofosfato, magnesio, sodio y en algunos casos zinc, y son importantes para la regulación de pH y la osmoregulación (Vannier-Santos, 2002).

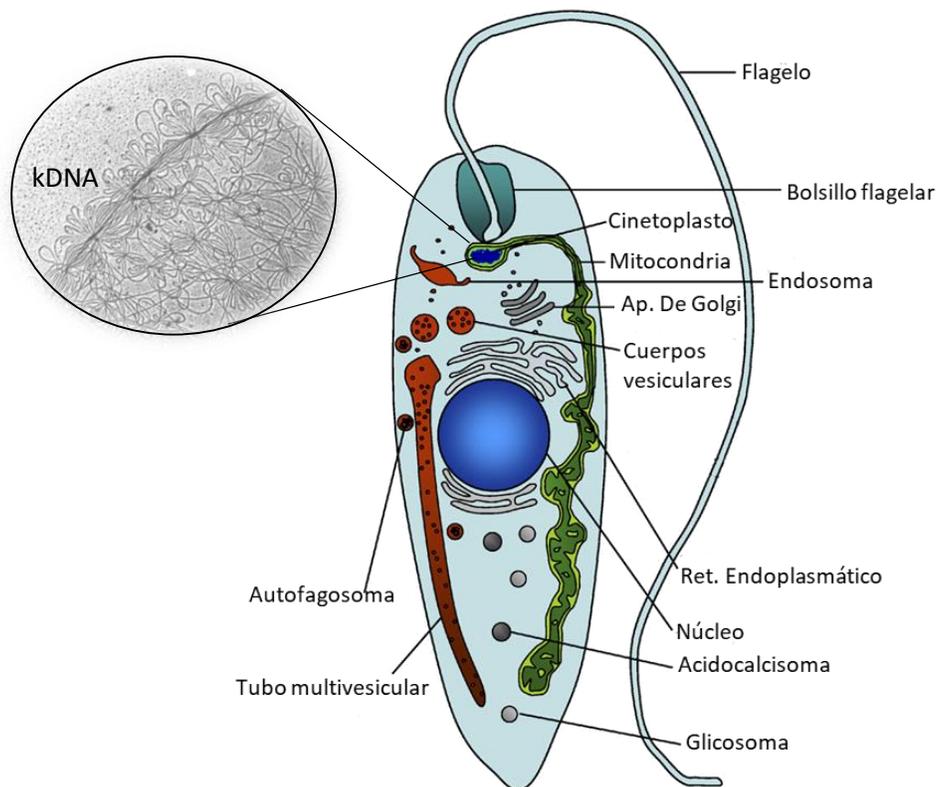


Figura 5: Representación esquemática de la composición celular de *L. major* en su estadio de promastigote. Del lado izquierdo se muestra una imagen de microscopía electrónica del kDNA (Ogbadoyi et al, 2003; Besteiro et al, 2007).

1.4 Morfología

La morfología de los tripanosomátidos está íntimamente relacionada con su patogenicidad, es por eso que cambia y se adapta dependiendo del ambiente en el que se encuentre. Existen ocho formas celulares (o estadios) adoptadas por los tripanosomátidos: Amastigote, Coanomastigote, Epimastigote, Endomastigote, Ophistomastigote, Opistomorfo, Promastigote y Tripomastigote (Fig. 6) (Maslov *et al*, 2013).

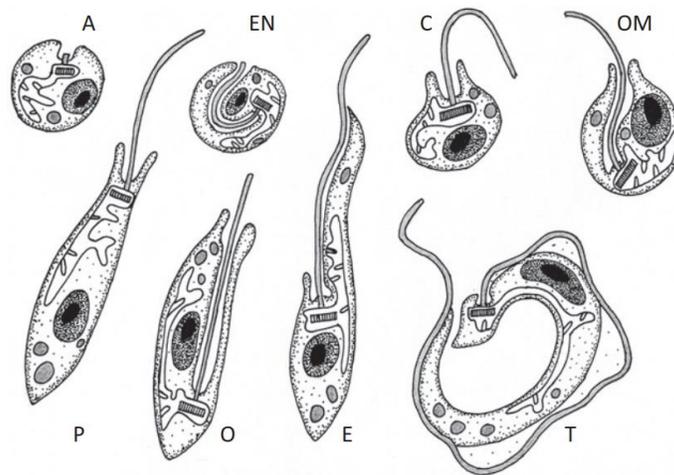


Figura 6: Morfologías adoptadas por los tripanosomátidos. Son ocho formas, Amastigote (A), Coanomastigote (C), Epimastigote (E), Endomastigote (EN), Ofistomastigote (O), Opistomorfo (OM), Promastigote (P) y Tripomastigote (T) (Maslov *et al*, 2013).

Leishmania presenta dos estadios celulares principales, el promastigote (que puede ser procíclico o metacíclico) y el amastigote. El cambio de promastigote procíclico (estadio replicativo, pero no infectivo) a promastigote metacíclico (estadio no replicativo, pero infectivo) se le llama metaciclogénesis y ocurre en el vector insecto (Fig. 7). Existen además otras formas celulares intermediarias como las de promastigote nectomonadido y promastigote leptomonadido previas al estadio metacíclico, entre otras. En el estadio promastigote, el parásito presenta un cuerpo alargado ovodíe de entre 10 y 20 μm , con un flagelo móvil que se extiende fuera del

bolsillo flagelar, con un axonema de 9+2. El promastigote puede estar en su forma procíclica que únicamente se presenta en el intestino de la mosca, o en su forma metacíclica que es la infectiva para el vertebrado, localizada en la probóscide del insecto (Fig. 8). El estadio amastigote se desarrolla dentro del macrófago del hospedero vertebrado, y se caracteriza por presentar una morfología pequeña y redondeada que le permite reducir el área de exposición al ambiente ácido que existe dentro de la vacuola parasitófora del macrófago (Fig. 7). Presenta un flagelo muy corto, no móvil, y con un axonema de 9+0. De igual manera el cuello del bolsillo flagelar se reduce para atenuar el intercambio molecular y el daño que pudieran causar algunas lipoproteínas de alta densidad (HDL) con factores tripanolíticos (TLF) como ApoL-1 y Hpr. La morfología de los amastigotes entre especies de *Leishmania* está ampliamente conservada (Sunter y Gull, 2017; Samanovic *et al*, 2009).

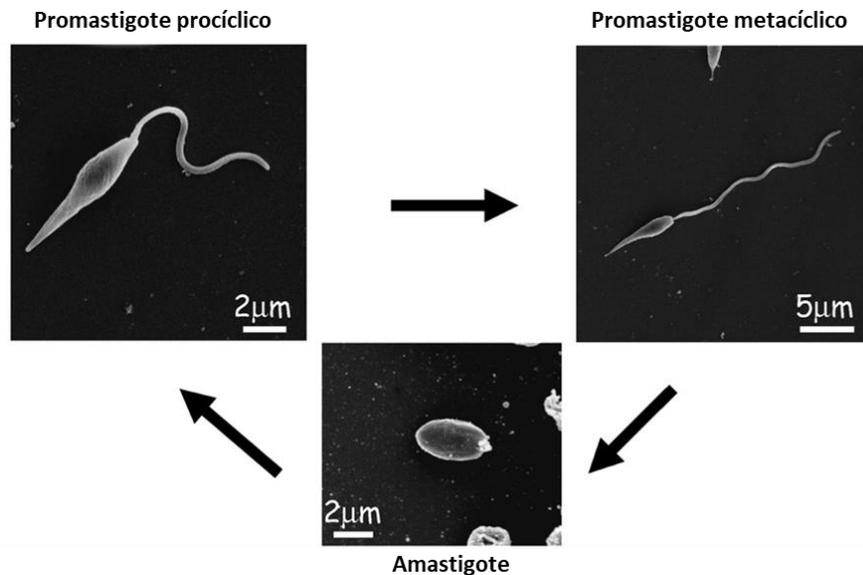


Figura 7: Cambios en la morfología de *Leishmania* durante su ciclo celular. Imágenes de microscopía electrónica en donde se aprecia el tamaño y la forma del promastigote procíclico, metacíclico y del amastigote (Besteiro *et al*, 2007).

1.5 Ciclo de vida

Los tripanosomátidos se pueden tipificar de acuerdo con el número de hospederos requeridos para completar su ciclo de vida. Por ejemplo, los géneros *Leptomonas* y *Crithidia* son monoxénicos, es decir, que requieren únicamente de un hospedero insecto. Por otro lado, los géneros *Trypanosoma* y *Leishmania* son dixénicos, lo que significa que tienen dos hospederos distintos en donde uno de ellos es un insecto y el otro es un vertebrado, pudiendo ser el humano (Kaufer *et al*, 2017). Cuando una mosca de la arena de la subfamilia Phlebotominae, infectada de *Leishmania*, muerde a algún vertebrado no infectado, la lesión y los proteofosfoglicanos liberados por el parásito dentro del insecto, promueven el reclutamiento de células de sistema inmunitario como macrófagos y neutrófilos en la zona de infección. *Leishmania*, que está en su estadio de promastigote metacíclico, ingresa al cuerpo donde busca ser fagocitada por los neutrófilos y macrófagos. Se cree que el flagelo de la *Leishmania* cumple un rol esencial para su fagocitosis en el macrófago (Suter y Gull, 2017). Debido al daño generado en la membrana del macrófago por el movimiento del promastigote metacíclico, éste es confinado a una vacuola parasitófora en donde persiste un ambiente ácido y con hidrolasas. Es aquí en donde *Leishmania* cambia al estadio de amastigote, lo que le permite sobrevivir y replicarse por fisión binaria dentro del macrófago hasta reventarlo y liberar más parásitos. En los neutrófilos *Leishmania* no logra diferenciarse a amastigote pero puede sobrevivir hasta que el neutrófilo entra en apoptosis, liberando así al parásito para poder ser fagocitado por un macrófago que es la célula predilecta para la infección (Podinovskia y Descoteaux, 2015). *Leishmania* es reconocida por diversos receptores en el macrófago, como el receptor del complemento (CRs), de manosa, de fibronectina y Fc γ (Fc γ Rs). Se piensa que el receptor activado por *Leishmania* determina el camino de la infección, promoviendo o no las condiciones favorables para el parásito. Por ejemplo, los receptores de fibronectina generan un ambiente pro inflamatorio, lo que desfavorece el desarrollo de *Leishmania* (Podinovskia y Descoteaux, 2015). Cuando una mosca de la arena hembra se alimenta de un vertebrado infectado, ingiere la forma de

amastigote. En el intestino medio del insecto, *Leishmania* se diferencia a promastigote procíclico por los cambios de pH y temperatura. En este proceso, el flagelo del amastigote se elonga para que el parásito en primera instancia se pueda escapar de la matriz peritrófica y pueda unirse a las microvellosidades del epitelio del tracto digestivo del insecto, mediante interacciones del tipo glicoproteína-lectina, para que no pueda ser desechado. En *L. major*, el lipofosfoglicano (LPG) es importante para dicha unión en ciertas especies de *Phlebotomus*.

El estadio de promastigote procíclico cumple con la función de replicación por fisión binaria. Después los parásitos se movilizan hacia el tracto digestivo superior en un tipo celular conocido como promastigote nectomonadido que es una forma móvil que no se replica. Posteriormente cambia al tipo celular de leptomonadido en ciertas especies para una segunda etapa de replicación, para finalmente diferenciarse en promastigote metacíclico (Gossage *et al*, 2003).

En menor medida se han encontrado otras dos formas celulares que son haptomonadido y paramastigote (Rogers *et al*, 2002). La metaciclogénesis está determinada por la presencia de nucleósidos, especialmente adenosina (Serafim *et al*, 2012). Altos niveles de promastigotes metacíclicos se ubican en el tracto digestivo superior del insecto produciendo proteofosfoglicanos que promueve la regurgitación durante la alimentación del insecto. Cuando la mosca infectada se alimenta de un vertebrado el ciclo de infección se repite (Fig. 8).

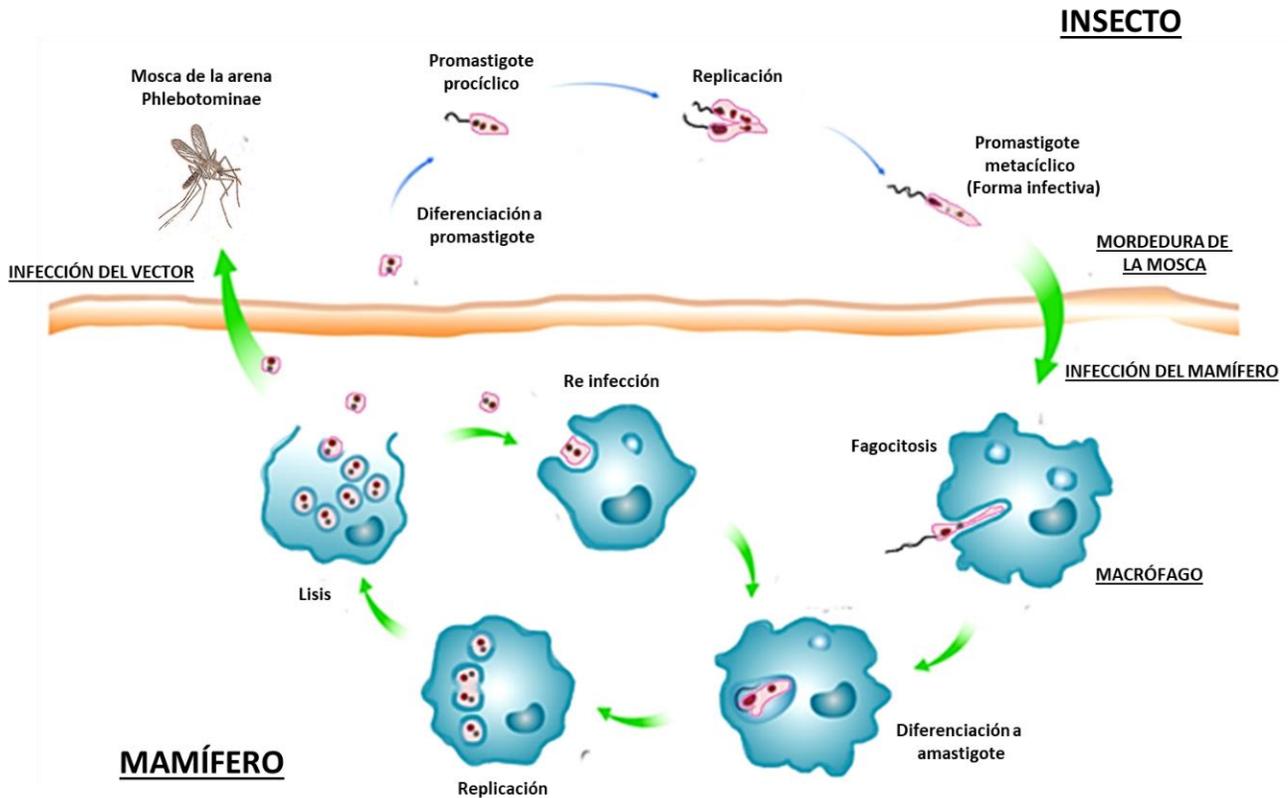


Figura 8: Ciclo de vida de *Leishmania*. *Leishmania* es un parásito dixénico, por lo que dispone de dos hospederos para completar su ciclo de vida. Uno de ellos es un insecto (mosca de la arena) que funge como vector de parásito, y el mamífero (como el ser humano) que puede ser infectado por el vector, corriendo el riesgo de sufrir la enfermedad. Cuando el parásito en su forma infectiva (promastigote metacíclico) ingresa al cuerpo del mamífero, es fagocitado por macrófagos en donde puede diferenciarse a su forma de amastigote. Éste se divide hasta lisis a la célula para poder propagarse e infectar a otros macrófagos. Cuando una mosca de la arena se alimenta de un mamífero infectado, ingiere los amastigotes, los cuales se diferencian en promastigotes procíclicos en su intestino. Éstos se dividen y migran a la probóscide para finalmente diferenciarse a promastigotes metacíclicos.

La capacidad patógena de *Leishmania* depende en buena medida de su habilidad de sobrevivir en distintos ambientes dentro del vector insecto y del hospedero mamífero. Esta supervivencia está íntimamente ligada a la estricta regulación de la expresión de sus genes en las diversas condiciones de crecimiento. Esto incluye la transcripción de genes, así como la estabilidad de sus mRNAs y otros tipos de regulación post transcripcional.

1.6 Transcripción en eucariontes

La transcripción es un proceso molecular esencial para la viabilidad celular, y representa el primer paso de la expresión genética como lo dicta el dogma central de la biología molecular. En eucariontes ocurre dentro del núcleo y en procariontes en el citoplasma. Posterior a la transcripción, los RNA mensajeros (mRNAs) pueden salir del núcleo al citoplasma y ser traducidos a proteína por complejos ribonucleoprotéicos conocidos como ribosomas. Las enzimas encargadas de la transcripción se les conoce como RNA polimerasas (RNA Pol) y están constituidas por una o varias subunidades proteicas. La transcripción es un proceso cíclico que se divide en tres eventos: Iniciación, elongación y terminación (Fig. 9). Cada uno de estos se conforman de múltiples pasos que pueden ser abordados como puntos de regulación independientes.

Durante la iniciación, la RNA polimerasa se une a el complejo de pre inicio o PIC junto con otras proteínas llamadas factores de transcripción (FTs) que pueden potencializar la síntesis de RNA, detenerla por un momento o incluso abortarla (Berg *et al*, 2007). Al primer nucleótido transcrito se le asigna la posición +1 y al primero anterior a éste se le asigna la posición -1; estas asignaciones corresponden a la hebra codificante del DNA, es decir la que se está transcribiendo. Existen promotores que se les denomina “fuertes” debido a que el gen asociado se transcribe en un lapso corto (por ejemplo cada dos segundos), y también existen promotores denominados como “débiles” que se transcriben en un lapso incluso de minutos; esto refleja una regulación en la expresión de genes a nivel transcripcional que depende de las necesidades celulares. Ya establecido el PIC en el promotor, la RNA polimerasa y algunos FTs desnaturalizan la hebra de DNA para formar la burbuja de transcripción la cual se mantendrá durante toda la fase elongación. Se ha registrado que la burbuja de transcripción se desplaza a una velocidad promedio de 50 nucleótidos por segundo, una velocidad vista como relativamente lenta en

comparación con la síntesis de DNA durante la replicación que es de 1000 nucleótidos por segundo (Berg *et al*, 2007).

Posterior a la elongación llega la terminación de la transcripción que ocurre cuando la RNA pol y el RNA naciente se liberan del templado debido al reconocimiento de secuencias específicas por parte de la maquinaria transcripcional y de factores adicionales. Asimismo, se ha visto recientemente que la terminación de la transcripción actúa también como un mecanismo de regulación de la expresión de genes, mediando la continuidad de la transcripción misma, la vida media del transcrito y su degradación a través de la asociación de enzimas de degradación que interactúan con los factores de terminación (Porrua y Libri, 2015).

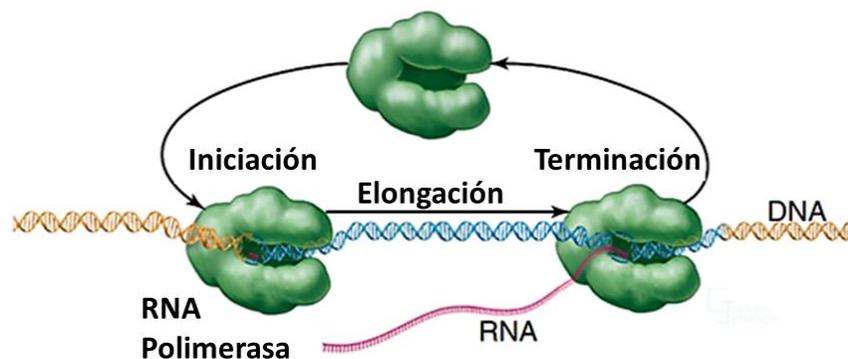


Figura 9: La transcripción es un proceso cíclico. Es realizada por una RNA polimerasa y consiste en sintetizar una molécula de RNA complementaria al templado de DNA pasando por tres fases, la de iniciación, la de elongación y la de terminación. En cada fase ocurre una regulación específica siendo favorable o desfavorable para la expresión del gen (Berg *et al*, 2007).

1.6.1 RNA polimerasas

A diferencia de las células procariotas, las eucariotas tienen diferentes RNA polimerasas que transcriben genes específicos. Existen tres RNA polimerasas principales, que son las RNA Pol I, II y III. En plantas se encuentran además las RNA Pol IV y V (Zhou y Law, 2015). Todas comparten un “core” de cinco subunidades que es homólogo a la RNA Pol de bacterias (Tabla I). La RNA Pol III es la enzima más grande, conformada por 17 subunidades, mientras que las RNA Pol I y II tienen 14 y 12 subunidades, respectivamente. En arqueas únicamente existe una RNA Pol que tiene 12 subunidades y se parece más a la RNA Pol II. Un dato muy interesante es que todas las RNA polimerasas mantienen un alto nivel de conservación en su estructura y mecanismos de catálisis. Sin embargo, a lo largo de la evolución, éstas han ido adquiriendo nuevos componentes que les confieren ciertas diferencias, como por ejemplo las subunidades que conforman al tallo o *stalk*, que está presente en arquea y eucariontes, pero no en bacterias.

Tabla I: Diversidad de las subunidades de las RNA polimerasas en los tres dominios de la vida.

<u>Bacteria</u>	<u>Arquea</u>	<u>RNA Pol II</u>	<u>RNA Pol III</u>	<u>RNA Pol I</u>	<u>RNA Pol IV</u>	<u>RNA Pol V</u>
Subunidad B´	Rpo1 (RpoA)	RPB1	C160	A190	NRPD1	NRPE1
Subunidad B´´	Rpo2 (RpoB)	RPB2	C128	A135	NRPD/E2	NRPD/E2
Subunidad-α	Rpo3 (RpoD)	RPB3	AC40	AC40	RPB3	RPB3
Subunidad-α	Rpo11 (RpoL)	RPB11	AC19	AC19	RPB11	RPB11
Subunidad-ω	Rpo6 (RpoK)	RPB6	RPB6(ABC23)	RPB6	RPB6	RPB6
	Rpo5 (RpoH)	RPB5	RPB5 (ABC27)	RPB5	RPB5	NRPE5
	Rpo8 (RpoG)	RPB8	RPB8 (ABC 14.5)	RPB8	RPB8	RPB8
	Rpo10 (RpoN)	RPB10	RPB10 (ABC10α)	RPB10	RPB10	RPB10
	Rpo12 (RpoP)	RPB12	RPB12 (ABCβ)	RPB12	RPB12	RPB12
		RPB9	C11 N-ribbon	A12.2 N-ribbon	NRPD9b	RPB9
	Rpo7 (RpoE)	RPB7	C25	A43	NRPD7	NRPE7
	Rpo4 (RpoF)	RPB4	C17	A14	NRPD/E4	NRPD/E4

		TFIIF α	C53	A49 N-terminal		
		TFIIF β	C37	A34.5		
	TFE α	TFIIE α	C82			
	TFE β	TFIIE β	C34	A49 C-terminal		
			C31			
	TFS	TFIS	C11 C-ribbon	A12.2 C-ribbon		

Los subunidades universalmente conservadas se resaltan en verde, las específicas en arquea y eucariontes en naranja, en azul las subunidades que conforman el tallo. En amarillo se resaltan los factores de transcripción de la RNA pol II y de arquea que muestran homologías con subunidades de la RNA Pol I y Pol III. Se utilizó la nomenclatura de *S. cerevisiae*.

1.6.2 Evolución de las RNA polimerasas

Las polimerasas constituyen una clase de proteínas ancestrales que divergieron para dar origen a diferentes familias enzimáticas con actividades y propiedades diferentes: las DNA polimerasas (DNA Pols), las RNA polimerasas (RNA Pols) y las transcriptasas reversas (TRs). Las RNA polimerasas son enzimas que sintetizan una molécula de RNA a partir del DNA templado, y para ello normalmente requieren de la intervención de FTs para ubicarse en el sitio de inicio de la transcripción, separar la hebra de DNA, regular la elongación y también la terminación (Chen y Romesberg, 2014).

Existen dos clases de RNA polimerasas, las RNA Pol tipo fago que constan de únicamente una subunidad, como ocurre en el bacteriófago T7 o en los plástidos en *Arabidopsis* (Börner *et al*, 2015); y las que están constituidas por múltiples subunidades como las RNA Pol de eucariontes o la RNA Pol de arqueas y bacterias. Estas enzimas se han estudiado y caracterizado en los tres niveles de vida (bacterias, arqueas y eucariontes) llegando al supuesto de que el LUCA (último ancestro común universal) tenía una RNA polimerasa similar a la encontrada en

bacterias, la cual se conforma de cinco subunidades, donde β' y β'' son las que consolidan el sitio catalítico, y junto con α^I , α^{II} y ω adoptan una forma de pinza de cangrejo. En eucariontes y arqueas encontramos cinco subunidades homólogas a éstas, por lo que son reconocidas como componentes universales de las RNA polimerasas (tabla I). En eucariontes y arqueas hay además otras cinco subunidades que conforman el *core* catalítico teniendo un total de 10 subunidades (Kwapisz *et al*, 2008; Viktorovskaya y Schneider, 1015; Khatter *et al*, 2017). Las RNA Pol en eucariontes comparten varias de sus subunidades. Algunas otras son subunidades homólogas, o incluso subunidades específicas. Por ejemplo, la RNA Pol III se conforma del *core* catalítico con la 10 subunidades homólogas presentes en todas las RNA polimerasas en eucariontes y arqueas; dos subunidades son compartidas sólo con la RNA Pol I (AC40 y AC19), y cinco son exclusivas de ésta (C53, C37, C82, C34 y C31), aunque se les han encontrado ciertas similitudes con algunos FTs de la RNA Pol II (tabla I) (Teichmann *et al*, 2010). Por otro lado existen subunidades en arqueas y eucariontes que no están en bacterias, reflejando una mayor relación evolutiva entre éstas, además de un aumento en la complejidad de la conformación de las RNA polimerasas a lo largo de la evolución. Un ejemplo de esto son las subunidades que conforman el tallo o *stalk*, el cual es necesario para la formación del complejo abierto, facilita la acción de factores de transcripción como de TFE en arqueas, guía al transcrito durante la elongación y permite la correcta terminación de la transcripción. Además, representa la diferencia estructural más prominente entre eucariontes y arqueas con relación a bacterias, porque estas últimas no lo presentan (Fig. 10) (Werner y Grohmann, 2011).

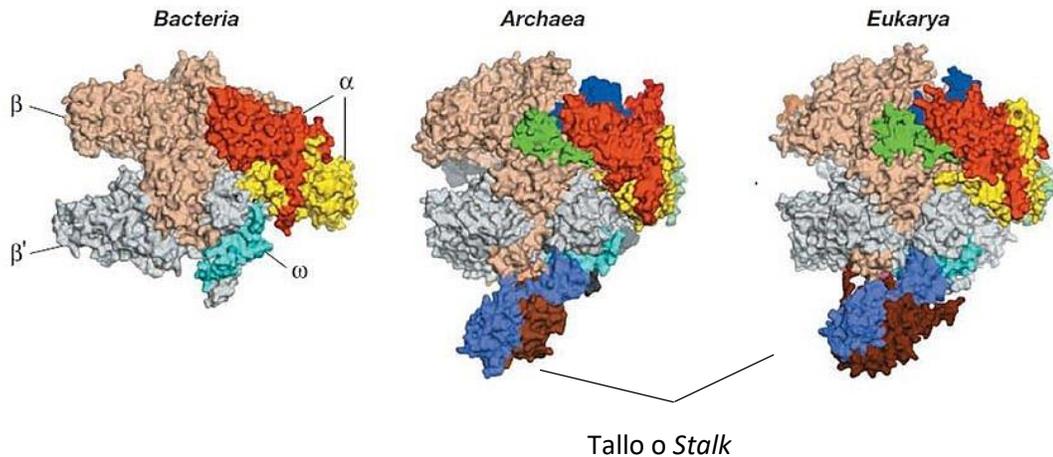


Figura 10: Evolución de las RNA polimerasas en los tres dominios de la vida. Todas las RNA polimerasas comparten subunidades que forman parte del *core* catalítico, las cuales adoptan una forma de pinza de cangrejo. Las RNA Pols en algunos casos incrementaron su número de componentes que se fueron acomodando en la periferia de la enzima formando nuevas estructuras, como el tallo que no está presente en bacterias, pero sí en arqueas y eucariontes. (https://www.researchgate.net/figure/Structure-of-Bacterial-Archaeal-and-Eukaryotic-RNA-Polymerase-enzyme-complexes_fig7_274708754)

Al caracterizar a las RNA polimerasas y determinar su estructura, se descubrió que requieren obligatoriamente de proteínas llamadas factores de transcripción (FTs) que las reclutan a los sitios de inicio de la transcripción. En la mayoría de los casos, la estructura y función de estos factores están muy conservadas en los tres dominios de la vida. En algunos casos los FTs forman complejos que se incorporan en tiempos determinados, como por ejemplo el factor sigma (σ) en bacterias que le da especificidad a la RNA polimerasa sobre determinados promotores. Otros FTs forman parte de la enzima misma, como ocurre con la RNA Pol III, en donde el subcomplejo C37/C53 que forma parte de ésta, es homólogo al factor TFIIF el cual es reclutado al sistema de la RNA Pol II para formar el PIC y posteriormente es removido durante la elongación (Carter y Drouin, 2009; Kassavetis *et al*, 2009).

1.6.3 RNA polimerasa I

La RNA polimerasa I se constituye de 14 subunidades, tiene un peso molecular de 589 kDa, y se encarga de transcribir los RNAs ribosomales (rRNA) 18S, 28S y el 5.8S rRNA (Cramer *et al*, 2008). Diversos estudios cristalográficos han mostrado que existen dos formas o estados de la RNA Pol I, que son la dimérica que es la forma inactiva de la enzima, y la monomérica que es la forma activa y lista para la transcripción (Kostrewa *et al*, 2015). Esta activación depende de la participación de un factor de iniciación llamado Rrn3 en levadura y TIF-IA en humano, que interactúa con la subunidad A43. De igual manera Rrn3 es importante en la unión de otros factores como el factor *core* o CF (Rrn6, Rrn7 y Rrn11), SL1 y UAF (Rrn5, Rrn9 y Rrn10) (Pils *et al*, 2016). La actividad de la RNA Pol I constituye el 60% del total de la transcripción en la célula. Se reportan aproximadamente 200 repetidos de rDNA en levadura y 400 repetidos en humano, acomodados en tándem y separados por espaciadores intergénicos llamados IGS que tienen secuencias terminadoras, potencializadoras o enhancers, promotores básicos como el UPE y el *core*, entre otros, dependiendo la especie (Fig. 11). Los promotores ribosomales tienen dos elementos importantes: el promotor “*core*” que contiene el iniciador ribosomal (rInr), que está ubicado a ~50 pb del SIT; y el elemento de control río arriba (UCE o UPE en levadura) ubicado de -156 a -107 en relación al SIT. Estos promotores son suficientes para la transcripción basal de la RNA Pol I (Paule y White, 2000). La activación de los genes depende de los estados de la cromatina, la organización topológica y la localización sub-nucleolar. Existen moléculas activadoras como el factor UBF (*upstream binding factor*) que se une al promotor, generando cambios en la topología del DNA, permitiendo así la transcripción. También encontramos al factor SL1 que se constituye de TBP y cinco proteínas asociadas a TBP llamadas TAFs (TBP-associated factors). La elongación de la RNA Pol I se interrumpe al reconocer los elementos de terminación llamados Sal-boxes con la asociación del factor Reb1 a éstos. En mamíferos se han encontrado tres Sal-boxes (R1, R2 y R3) que se acomodan en tándem, pero predominantemente la

transcripción termina en el R1 (Denissov *et al*, 2011). En mamíferos la RNA Pol I genera un pre rRNA 47S que se procesa para generar los rRNA 18S, 5.8S y 28S maduros, esenciales en la formación y catálisis de los ribosomas (Goodfellow y Zomerdijk, 2012). El 5S rRNA es transcrito por la RNA Pol III, pero su ensamblaje ocurre en el nucléolo al igual que el resto de los rRNA.

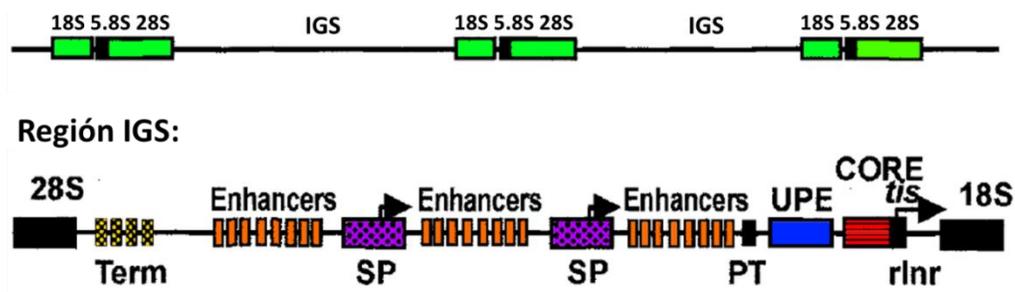


Figura 11: Organización genérica de las unidades transcripcionales de los genes de los rRNA. Las unidades del rRNA transcritas por la RNA Pol I contienen los genes de los rRNA 18S, 5.8S y 28S, las cuales están separadas por regiones espaciadoras intergénicas (IGSs) que contienen una serie de elementos que varían entre especies, y permiten el inicio, la elongación, regulación y el término de la transcripción por la RNA Pol I. Encontramos entonces a los elementos promotores como el promotor río arriba (UPE en *S. cerevisiae*), y al promotor CORE que es indispensable para la transcripción el cual incluye el rlnr; a las secuencias terminadoras (Term) o Sal-boxes descritas tanto en humano como en *S. cerevisiae*; los *enhancers* que en el caso de levadura sólo se observa uno; el terminador proximal (PT) que también se ha visto en levadura y el promotor espaciador (SP) descrito en metazoarios. Tis se refiere al sitio de inicio de la transcripción (Paule y White, 2000).

1.6.4 RNA polimerasa II

La RNA Pol II se localiza en el núcleo, se compone de 12 subunidades y tiene un peso molecular de 514 kDa (Cramer *et al*, 2008). Se encarga de transcribir todos los RNA mensajeros (mRNA) y algunos RNA no codificantes como snoRNAs, snRNAs y miRNAs. Su actividad depende de la acción adicional de factores de transcripción para su iniciación, elongación y terminación, en donde la regulación de la iniciación es un mecanismo clave para el control de la expresión genética. Primero se forma el PIC en el promotor en un estado de “complejo cerrado” debido

a que el DNA no se ha desnaturalizado aún. Este complejo consiste en el “core” de 10 subunidades junto con el subcomplejo RPB4/7 y los FTs TFIID (que tiene a TBP y algunos TAFs), TFIIA, TFIIB, TFIIE, TFIIF y TFIIH. El cambio del complejo cerrado al complejo abierto involucra la separación del DNA para formar la burbuja transcripcional que ocurre por la presencia de nucleósidos trifosfato (NTPs). Esto permite el posicionamiento de la hebra templado del DNA en el sitio activo de la RNA Pol II. Posteriormente se forma el complejo de inicio de la transcripción que inicialmente produce pequeños RNAs debido a inicios abortivos. En el momento en que la molécula de RNA tiene aproximadamente 10 nt, diversos factores del complejo de inicio (como TFIIB, TFIIE, TFIIF y TFIIH) se liberan para dar lugar al complejo de elongación, el cual está altamente regulado durante los primeros pasos antes de que comience una elongación realmente productiva (Cheung y Cramer, 2012; Zawel *et al*, 1995). Durante el inicio de la elongación la RNA Pol II se puede “pausar” a 30 ó 60 nt del SIT por la acción de los factores NELF y DSIF con el objetivo de regular la actividad transcripcional. Para liberar a la RNA Pol II de su pausa se recluta el complejo P-TEFb, que se compone de CDK9, y fosforila el CTD en la serina 2 y a NELF y DSIF. Reconstrucciones cristalográficas de rayos X y cryo-EM han revelado que existen tres factores que se incorporan al complejo de elongación tanto en eucariontes como en arquea: Spt4/5, Elf1 y TFIIIS. Éstos modifican la superficie de la RNA Pol II que se asocian a la cromatina para establecer un ambiente funcional para la elongación. Spt4/5 y Elf1 refuerzan o renuevan el camino de las hebras de DNA y RNA, remodelando el túnel de salida del RNA para prevenir la interacción entre el DNA y el RNA que puede promover una terminación prematura. Los factores DSIF y NELF en conjunto actúan como un componente de pausado de la elongación (Ehara y Sekine, 2018).

Rpb1, que es la subunidad más grande de la RNA Pol II, tiene un dominio C-terminal (CTD) que se conforma de repetidos en tándem de la secuencia Tyr-Ser-Pro-Th-Ser-Pro-Ser (T¹S²P³T⁴S⁵P⁶S⁷), presentándose 26 repetidos en levadura y 52 en vertebrados. El CTD cumple un rol importante durante la elongación de la

transcripción debido a que es modulado por la fosforilación en diferentes aminoácidos. CDK7, componente de TFIIH, fosforila a las Ser 5 y 7; CDK9 y CDK12/13 fosforilan a la Ser 2. De igual manera el CTD puede ser desfosforilado por diversas fosfatasas como Fcp1, Ssu72 y Rtr1. Estudios CHIP han mostrado que el patrón de fosforilación del CTD corresponde en general a la posición de la RNA Pol II a lo largo del gen transcrito, es decir, al inicio de la transcripción el CTD es fosforilado en las Ser 5 y 7, mientras que la Ser 5 es gradualmente desfosforilada durante la elongación y en la Ser 2 y la Thr 4 los niveles de fosforilación aumentan cuando la RNA Pol II avanza a lo largo del gen (Fig. 12) (Hsin *et al*, 2014).

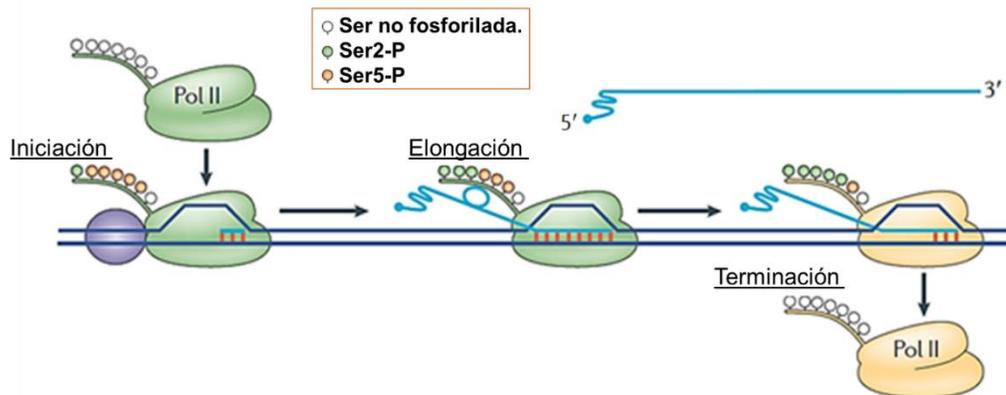


Figura 12: Los niveles de fosforilación del CTD de la RNA Pol II cambian durante la transcripción. El CTD presenta diferentes estados de fosforilación en diversos residuos, lo que promueve la elongación del complejo, viéndose que la Ser 5 está fosforilada al inicio y se va desfosforilando durante la elongación, mientras que la Ser 2 se va fosforilando hasta llegar a la región de término (Kuehner *et al*, 2011).

Durante la transcripción, el mRNA es modificado en el primer nucleótido de su extremo 5' con la adición de un caperuza o CAP 5' que consiste en la incorporación de una guanósina metilada en la posición 7, y que está unida al mRNA mediante un enlace trifosfato 5'-5'. El CAP 5' estabiliza y protege al mRNA evitando que sea degradado por exonucleasas. También se ha visto que influye en la transcripción, el *splicing*, la poliadenilación, la exportación del mRNA y la traducción (Cowling, 2010). La terminación de la transcripción de la RNA Pol II en humanos

inicia aproximadamente a 1500 nucleótidos río abajo del sitio de poliadenilación (PAS) que es una secuencia hexamérica muy conservada, rica en adeninas (AAUAAA), que es reconocida en el pre-mRNA por el factor CPSF (CPF en levadura) para pausar la transcripción. Con esto, el factor CstF (CFIA en levadura) que interactúa con el CTD, se une río abajo de una región rica en GU que funge también como señal de término. CPSF se une con CstF y es cuando ocurre la escisión en el pre-mRNA, liberando a la RNA Pol II de su estado de pausa. Cabe mencionar que hay otros factores involucrados en la terminación en humano (y en levadura) como XRN2 (Rat), DOM3Z (Rai1), Senatexina (Sen1) y CFII_m (Pcf11) (Fig. 13). El transcrito es procesado por endonucleasas y protegido en su extremo 3' de la degradación mediante la adición de una cola de poli adeninas (Poli-A) de 70 a 200 nt, dependiendo del organismo. En levadura este proceso lo realizan alrededor de 20 proteínas organizadas en subcomplejos, mientras que en mamíferos participan más de 80 proteínas (Kuehner *et al*, 2011).

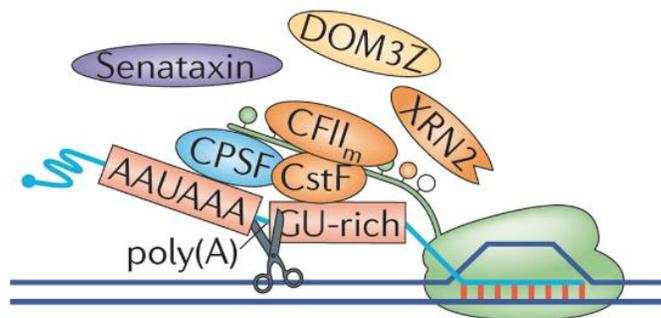


Figura 13: Terminación dependiente de Poli-A en humano. El factor CPSF pausa la transcripción al reconocer a la secuencia de término AAUAAA en el transcrito. CstF al reconocer al tracto rico en GUs desplaza a CPSF y se induce el corte en el sitio de poliadenilación (Kuehner *et al*, 2011).

Estudios recientes han mostrado que los factores de iniciación de la RNA Pol II y los involucrados en la terminación están más vinculados de lo que se pensaba.

En levadura el factor de transcripción TFIIB que inicialmente participa en la formación PIC y que durante la elongación se separa del complejo, se vuelve a asociar a la RNA Pol II durante la terminación interactuando con los factores CPF y CFIA, contribuyendo a la yuxtaposición del promotor y del terminador a través de un proceso llamado circulamiento del gen o *gene looping* (Fig. 14). Esta interacción se conserva en mamíferos y sirve para dar pie al reinicio de la transcripción (Hampsey *et al*, 2011).

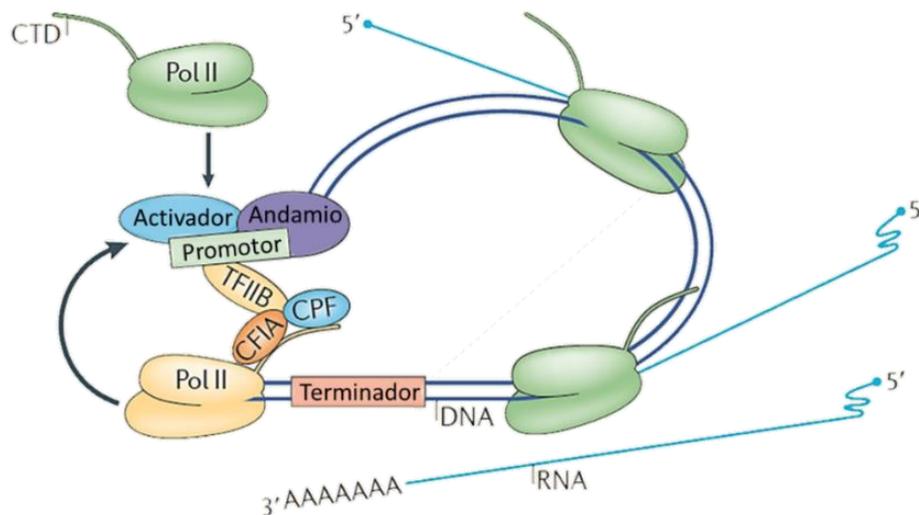


Figura 14: *Looping-gen* o circulamiento del gen para el reinicio de la transcripción por la RNA Pol II en levadura. TFIIB interactúa con CPF, actuando como puente entre las maquinarias de pre-inicio y de terminación, contribuyendo así con la yuxtaposición del promotor y del terminador para poder reciclar a la RNA Pol II (Kuehner *et al*, 2011).

Enseguida de la transcripción ocurre el *splicing*, un proceso de maduración de los precursores de los mRNA en el que se unen las secuencias codificantes (exones) y se eliminan secuencias no codificantes (intrones). Éste es un paso crucial en la expresión genética y es llevado a cabo por el empalmosoma (*spliceosoma*), un complejo ribonucleoprotéico conformado por los RNA pequeños nucleares (snRNA)

U1, U2, U4, U5 y U6, y alrededor de 200 proteínas, entre ellas las Sm. El *splicing* sucede en dos reacciones de transesterificación que median la escisión del intrón y la unión de los exones (Rojas-Sánchez *et al*, 2016).

1.6.5 RNA polimerasa III

La RNA Pol III es la más grande de las RNA polimerasas, con un peso molecular de 693 kDa (Cramer *et al*, 2008). Tiene 17 subunidades de las cuales 10 forman el *core* catalítico presente en todas las RNA polimerasas de eucariontes (C160, C128, AC40, AC19, RPB6, RPB5, RPB8, RPB10, RPB12 y C11) (Fig. 15). Las subunidades AC40 y AC19 son compartidas con la RNA Pol I únicamente, y cinco (C53, C37, C82, C34 y C31) son específicas de la RNA Pol III, aunque estudios cristalográficos recientes han demostrado que tienen cierta homología posicional con factores de transcripción de la RNA Pol II.

El *core* catalítico adopta la forma de pinza de cangrejo vista en bacterias, en donde las subunidades más grandes, C160 y C128, conforman el sitio catalítico (Fig. 15). C11 está involucrado en la terminación de la transcripción. Las subunidades C17 y C25 conforman al tallo o *stalk*; C37 y C53 forman un heterodímero que participa en el inicio y la terminación de la transcripción y se coloca en el mismo sitio que TFIIF en el complejo de pre-inicio de la RNA Pol II. Las subunidades C82, C34 y C31 forman un heterotrímero que tiene homología con TFIIE, conecta a las subunidades del tallo y al heterodímero C37/C53, y participa en el reclutamiento de TFIIIB (Hoffmann *et al*, 2015; Khatter *et al*, 2017).

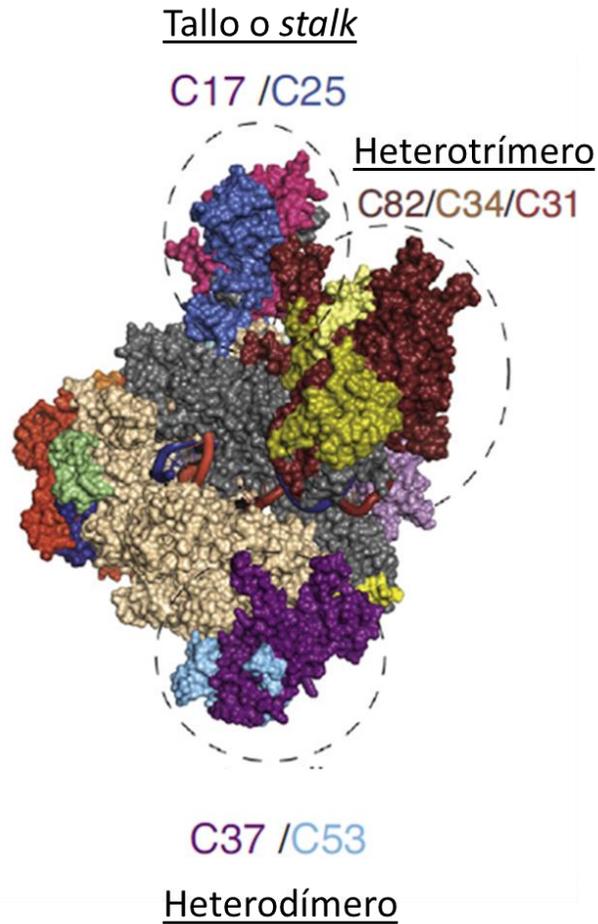


Figura 15: La RNA Pol III se conforma de 17 subunidades. 10 subunidades forman el core catalítico (C160, C128, AC40, AC19, RPB6, RPB5, RPB8, RPB10, RPB12 y C11) presente en todas las RNA Pols de eucariontes; las subunidades C37/C53 interactúan para formar un heterodímero que participa tanto en el inicio como en el término de la transcripción; las subunidades C82/C34/C31 forman un heterotrímero que interactúa con TFIIIB. C17/C25 constituyen el tallo o *stalk* (Khatter *et al*, 2017).

La RNA Pol III sintetiza pequeñas moléculas de RNA que son esenciales para la viabilidad celular, y cuyas funciones se resumen en la tabla II (Guffanti *et al*, 2006; Parrott *et al*, 2007; Deininger, 2011; Lee *et al*, 2011; Dieci *et al*, 2012; Turowsky y Tollervey, 2016).

Tabla II: RNAs transcritos por la RNA Pol III.

RNA	Función que desempeña
tRNAs	Acarrean a los aminoácidos hacia los ribosomas durante la traducción.
5S rRNA	Forma parte de la subunidad mayor del ribosoma.
U6 snRNA	Componente del empalmosoma que se encarga de madurar a los mRNAs.
SnR52	Participa en la modificación de otras moléculas de RNA, principalmente rRNAs.
RPR1	Forma parte de la RNasa P que se encarga de procesar el extremo 5' de los precursores de los tRNAs.
7SL	Componente de la SRP que participa en el transporte de proteínas en la célula.
Vault	Ensamblaje y transporte molecular. Resistencia a drogas.
Y RNA	Influyen en la localización y función de las partículas nucleoprotéicas Ro.
7SK	Regulación de la RNA Pol II.
Mir886	Micro RNA que modula negativamente a la cinasa PKR.
VAI	Necesario para la traducción eficiente de mRNAs virales.
SNAR-A	Se asocia con NF90 que participa en el metabolismo de RNAs en vertebrados.
Alu	Influyen en la expresión genética mediante eventos de inserción.

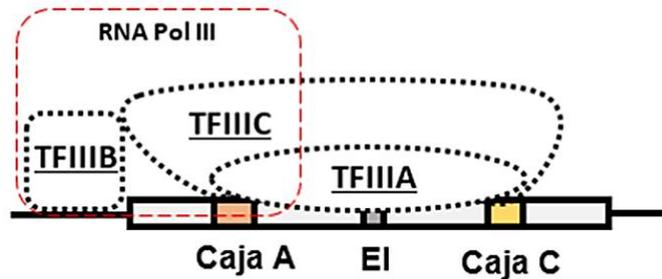
Los genes transcritos por esta enzima se clasifican en tres tipos dependiendo del promotor que poseen (Fig. 16).

El promotor tipo I se conforma de la caja A, el elemento intermedio (EI) y la caja C. El gen del 5S rRNA es el único con este tipo de promotor y es inicialmente reconocido por TFIIA que recluta a TFIIC para actuar como plataforma de TFIIB y así pueda reclutar y posicionar a la RNA Pol III en el SIT (Martinez-Calvillo *et al*, 2010).

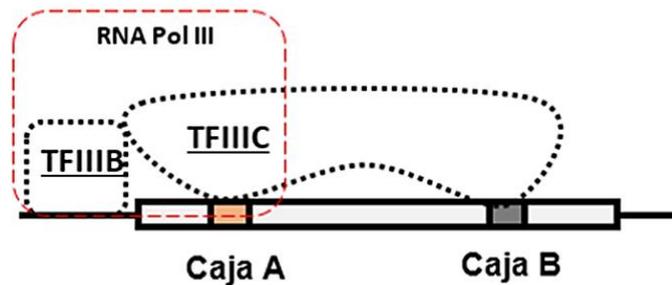
El promotor tipo II consiste en una caja A, que es la misma que la del tipo I, y una caja B, y lo encontramos en todos los genes de tRNAs, excepto en el de selenocisteína (Sec) que tiene una combinación del tipo II y del III. Aquí TFIIC, sin la intervención de otro FT, puede reconocer y posicionarse sobre el promotor para que de igual manera posicione a TFIIB y auxilie a la RNA Pol III en establecerse en el SIT (Martinez-Calvillo *et al*, 2010).

El promotor tipo III lo encontramos en el gen del U6 snRNA, y es muy similar al de los genes transcritos por la RNA Pol II, ya que tiene secuencias río arriba del SIT como el DSE (Elemento distal) y el PSE (Elemento proximal), además de una caja TATA (Fig. 16). En este tipo de promotor, la subunidad TBP de TFIIB tiene la capacidad de reconocer la caja TATA, sin necesidad de TFIIA y TFIIC. El DSE tiene un efecto de *enhancer* (potencializador) y es reconocido por los factores Oct-1 y Staf que activan la transcripción en parte por la unión de otro FT conocido como SNAPc que reconoce al PSE y aporta estabilidad al complejo transcripcional (Faresse *et al*, 2012).

Tipo 1: 5S rRNA



Tipo 2: tRNAs



Tipo 3: U6 snRNA

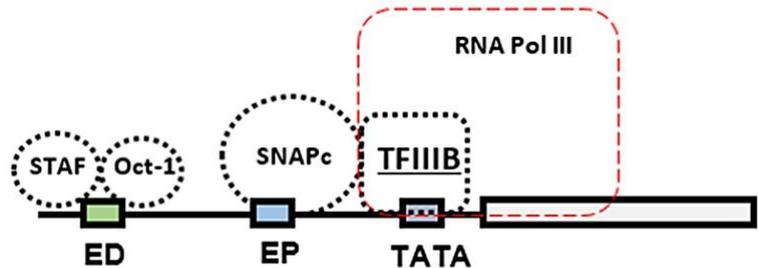


Figura 16: Tipos de promotores reconocidos por la maquinaria transcripcional de la RNA Pol III. En el tipo 1 encontramos únicamente al gen del 5S rRNA el cual requiere de TFIIIA, TFIIB y TFIIC. En el tipo 2 están todos los tRNAs excepto el de selenocisteína (Sec) que es una combinación entre el tipo 2 y el tipo 3. Aquí sólo se necesitan a TFIIC y TFIIB. Y el tipo 3 donde está el gen del U6 snRNA, se necesita a TFIIB y otros FT como STAF, Oct-1 y SNAPc para situar a la RNA Pol III en el SIT.

Como se mencionó antes, para que la RNA Pol III pueda posicionarse en el SIT y transcribir los genes correctamente, necesita de la participación de tres factores de transcripción principales, que son TFIIIA, TFIIB y TFIIC.

TFIIIA es una proteína que se compone predominantemente de nueve dedos de zinc del tipo Cys2-His2. En mamíferos y anfibios, TFIIIA contiene un TAS, que es una señal de activación de la transcripción en la C-terminal entre el dedo 8 y 9. También posee una secuencia de localización nuclear (NLS) en algunos vertebrados como el ser humano y en *S. cerevisiae*. Diversos experimentos han mostrado que TFIIIA es específico al 5S rRNA de cada especie, es decir, el ortólogo de *Xenopus* se une con poca eficiencia en el 5S rRNA de levadura y viceversa, aunque el promotor esté relativamente conservado (Layat *et al*, 2012). Cabe mencionar que TFIIIA muestra una baja homología a nivel de secuencia entre ortólogos, y es por eso que a veces resulta complicado identificarlo en algunas especies, como por ejemplo en *Plasmodium falciparum* donde se encontró que TFIIIA, llamado pTRS, tiene nueve motivos de zinc del tipo Cys2-His2 con los cuales se puede unir al gen del 5S rRNA y regular positivamente su expresión (Bertschi *et al*, 2017).

TFIIIC está conformado por 6 subunidades esenciales que forman dos complejos llamados τ A y τ B. El subcomplejo τ A está constituido por τ 131 (Tfc4), τ 95 (Tfc1) y τ 55 (Tfc7), mientras que τ B está formado por τ 138 (Tfc3), τ 91 (Tfc6) y τ 60 (Tfc8). Es un factor conservado desde levadura hasta humano, siendo τ 95 y τ 138 las subunidades que se unen directamente con el DNA. Los complejos de τ A y τ B se caracterizan por tener la suficiente flexibilidad que les permite reconocer y acoplarse a las cajas A y B separadas por distancias muy variables. Esto se debe a una región desordenada llamada τ IR de τ 138 que tiene interacción con el dominio TPR de τ 131. Diversos estudios *in vitro* han mostrado que TFIIIC, durante la transcripción, es únicamente requerido para posicionar a TFIIIB y que éste reclute a la RNA polimerasa III, posteriormente TFIIIC es removido del gen. Sin embargo se han encontrado casos en los que TFIIIC se mantiene unido al complejo, regulando la velocidad de la transcripción (Ciesla *et al*, 2018).

1.6.5.1 TFIIIB

La transcripción de la RNA Pol III no puede ocurrir sin la participación de TFIIIB debido a que es el encargado de reclutarla, ubicarla en el SIT y extender la burbuja de transcripción. Sus tres subunidades son TBP, BRF1 (BRF2 en mamíferos) y Bdp1. TBP es una proteína que conforma al complejo de pre inicio (PIC) de todas las RNA Pols de eucariontes y arqueas, cumpliendo en todos los casos con la misma función de unión al DNA e interacción con diversas subunidades. En el sistema de la RNA Pol III, TBP reconoce a la caja TATA en el promotor del gen del U6 snRNA, que es un gen tipo III, por lo que éste establece el sitio en donde se formará el PIC junto con las otras subunidades de TFIIIB y la RNA Pol III (Kramm *et al*, 2019). Los tRNAs y el 5S rRNA, que son genes tipo II y I, no presentan la caja TATA río arriba del SIT, y es por eso que TFIIIA y TFIIIC cumplen con la función de reconocer otras secuencias promotoras como son las cajas A y B que se ubican dentro de los genes para posicionarse sobre ellos y reclutar en primera instancia a Brf1, luego a TBP y finalmente a Bdp1. Brf1 es miembro de la familia de los factores de transcripción TFIIIB-*like* junto con TFIIIB, Rrn7 y TFB (de la RNA Pol II, RNA Pol I y la RNA Pol de arqueas, respectivamente). Todos tienen en su extremo N-terminal tres dominios que son un *Zn-ribbon* y dos repetidos de ciclina. Brf1 presenta además una extensión C-terminal que mantiene interacciones específicas con TBP y la RNA Pol III (Vélez-Ramírez *et al*, 2015).

TFIIIB ha sido estudiado extensamente en los últimos años, principalmente en levadura, pero no fue hasta el 2017 cuando Gouge y colaboradores publicaron la primera cristalografía del complejo completo de TFIIIB de humano que incluye a TBP, Brf2 y el dominio más conservado de Bdp1 (dominio SANT extendido), asociado al gen U6 snRNA. Con esto se ha logrado comprender mejor el modo en que el complejo interactúa con el resto de la maquinaria transcripcional y su importancia para ésta (Gouge *et al*, 2017; Abascal-Palacios *et al*, 2018).

1.6.5.2 Bdp1

La subunidad Bdp1 o B doble prima (B´) 1 es un componente totalmente exclusivo de la maquinaria transcripcional de la RNA Pol III, al que no se le han encontrado homólogos en las otras RNA polimerasas. Sin embargo, gracias a imágenes 3D obtenidas a partir de estudios cristalográficos durante los últimos dos años, se ha determinado que la posición que ocupa Bdp1 en el complejo de la RNA Pol III es similar a la posición de TFIIA y TFIIF en el complejo de la RNA Pol II (Gouge *et al*, 2017; Vorlander *et al*, 2018) (Fig. 17) con la diferencia de que las funciones que realizan estos factores son muy distintas. Bdp1 es la última subunidad que se incorpora al PIC de genes transcritos por la RNA Pol III, generando cambios conformacionales importantes, estabilizando el complejo transcripcional para finalmente reclutar a la RNA Pol III y realizar múltiples rondas de transcripción.

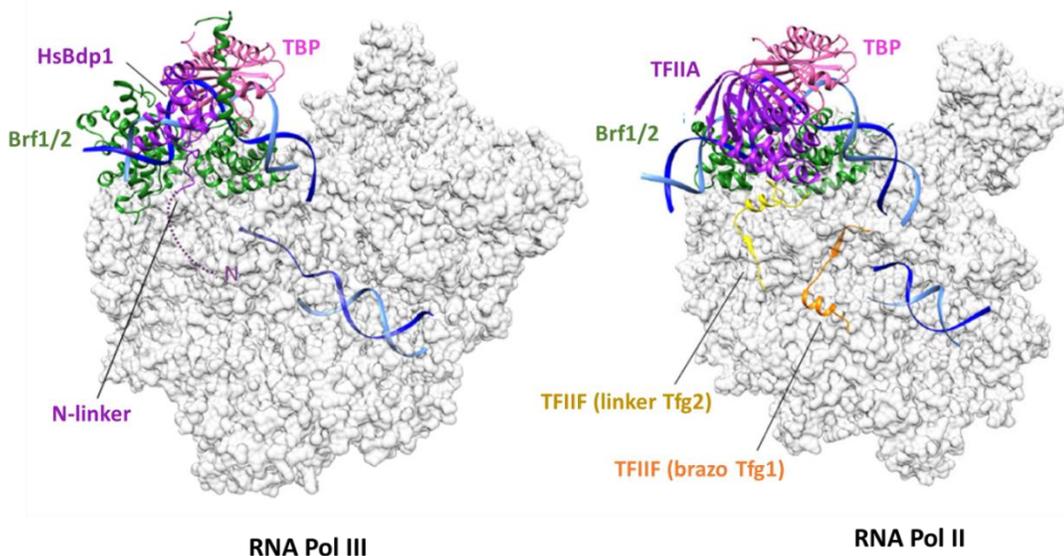


Figura 17: Arquitectura del PIC de las RNA Pol III y Pol II. Existen ciertas similitudes, a nivel de posición, entre la subunidad Bdp1 de la RNA Pol III y los factores TFIIA y TFIIF (N-linker) en el sistema de la RNA Pol II (Gouge *et al*, 2017).

Bdp1 es una proteína que muestra una alta divergencia entre ortólogos, siendo el dominio SANT extendido (Fig. 18) la única región conservada que lo define y diferencia de otras proteínas que contienen el dominio SANT clásico. Este dominio fue definido por primera vez por Aasland en 1996 al encontrar similitudes en la secuencia de un dominio de ~ 50 aa en proteínas remodeladoras de la cromatina como SWI-SNF, ADA, N-CoR, y demás en una subunidad de TFIIB, recibiendo así el acrónimo de SANT, caracterizado por presentar únicamente 3 alfa hélices. Durante 20 años, Bdp1 se describió como una proteína con un dominio SANT clásico, pero gracias a diversos alineamientos entre ortólogos, y la obtención de cristales para determinar su estructura terciaria y cuaternaria, se ha definido su propio dominio SANT extendido que posee características especiales, como la presencia de 5 alfa hélices, siendo las tres primeras las más conservadas del dominio (Fig. 18). Antes del dominio SANT extendido se localiza una región llamada N-linker, que en humano (286-302 aa) invade el surco menor de DNA y se inserta entre los dos repetidos de ciclina de Brf2. Una característica muy conservada en el N-linker es que está enriquecido con residuos aromáticos como Y299, F294 y Y291 (Fig. 19).

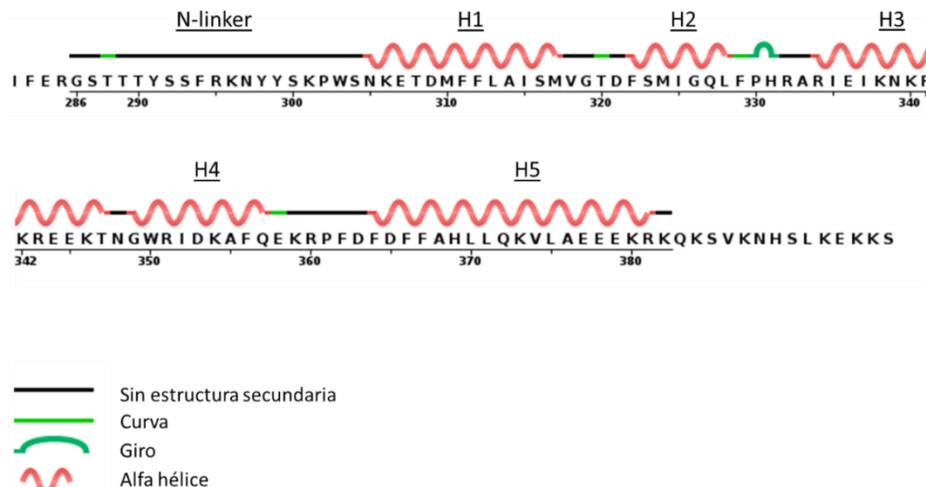


Figura 18: Representación de la estructura secundaria del dominio SANT extendido y el N-linker en humano. El dominio SANT extendido está constituido por cinco alfas hélices. Este dominio está precedido por una región llamada N-linker.

La tercera alfa hélice tiene interacción con el DNA a través de los residuos R334, K338, K342 y E345, que están conservados en ortólogos de humano (*H. sapiens*), ratón (*M. musculus*), planta (*A. thaliana*), mosca (*D. melanogaster*) y levadura (*S. cerevisiae*) (Fig. 19). De igual manera, los residuos W303, E307 y R332 se identificaron como importantes para darle la orientación correcta al dominio SANT extendido en humano, pero se conservan en todos los ortólogos, lo que indica que son de gran relevancia para la proteína (Gouge *et al*, 2017).

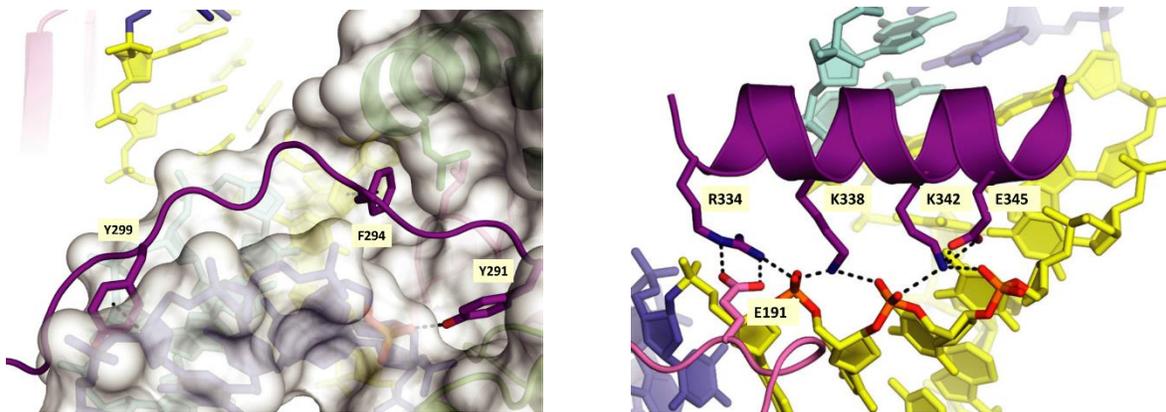


Figura 19: El N-linker y la tercera alfa hélice del dominio SANT extendido son características distintas de Bdp1. El N-linker es una región rica en residuos aromáticos, que participa en la extensión de la burbuja transcripcional (izq). La tercera alfa hélice del dominio SANT extendido está muy conservada entre especies y presenta sitios de interacción directa con el DNA como el R334, K338, K342 y E345 (der) (Gouge *et al*, 2017).

Vorlander y cols. en el 2018 publicaron el cristal del PIC de la RNA Pol III del U6 snRNA en *S. cerevisiae*, encontrando el mismo dominio SANT extendido que reportó Gouge, pero con regiones adicionales en Bdp1, como una alfa hélice básica ubicada a 293-320 aa, una región de atadura o *Tether* (360-398 aa) localizada antes del N-linker del dominio SANT extendido, y una sexta alfa hélice muy larga llamada *long arm* (498-536 aa) después de dominio SANT extendido. La región *Tether* se

caracteriza por presentar cuatro betas plegadas y una alfa hélice en levadura, conservada en humano y en mosca, pero no en plantas. Esta región tiene interacción con C37 que participa en el inicio y terminación de la transcripción y C34 (WH2 y WH1). La hélice *long arm* interactúa con el dominio de homología 2 de Brf1 y con C34 (WH2 y WH3). Todas estas interacciones entre Bdp1 y el resto de la maquinaria transcripcional generan un complejo muy compacto que es estable alrededor de la caja TATA del gen del U6 snRNA de levadura, de donde salen dos extensiones, una pequeña formada por el *Tether* y otra larga formada por la hélice *long arm* y el dominio homólogo II de Brf1 (Vorlander *et al*, 2018). Cabe mencionar que en humano no se reporta la hélice *long arm* de Bdp1.

1.6.5.3 Regulación de la transcripción de la RNA Pol III

La transcripción por la RNA Pol III es un proceso sensible a señales de estrés y de daño, teniendo como consecuencia su inhibición. En levadura se sabe que Maf1 es un regulador negativo, mientras que en mamíferos existen además otros componentes que la inhiben como Myc, P53 y Rb. La acción de Maf1 se regula mediante fosforilación, y cuando es fosforilada por las cinasas TORC1, Sch9 dependiente de TOR y CK2, es exportada por la carioferina Msn5 al citoplasma en donde las cinasas PKA y Sch9 también la fosforilan y la inhiben (Fig. 20). De igual manera, Maf1 puede ser desfosforilada por la fosfatasa PP4 y ser importada al núcleo en donde se puede unir con la RNA Pol III, afectando el arreglo de C82/34/31 y evitando que la RNA Pol III pueda ser reclutada por TFIIIB (Vannini *et al*, 2010). TFIIIB además es un blanco de diversas proteínas oncogénicas y supresoras de tumores y la expresión de los genes de sus subunidades está

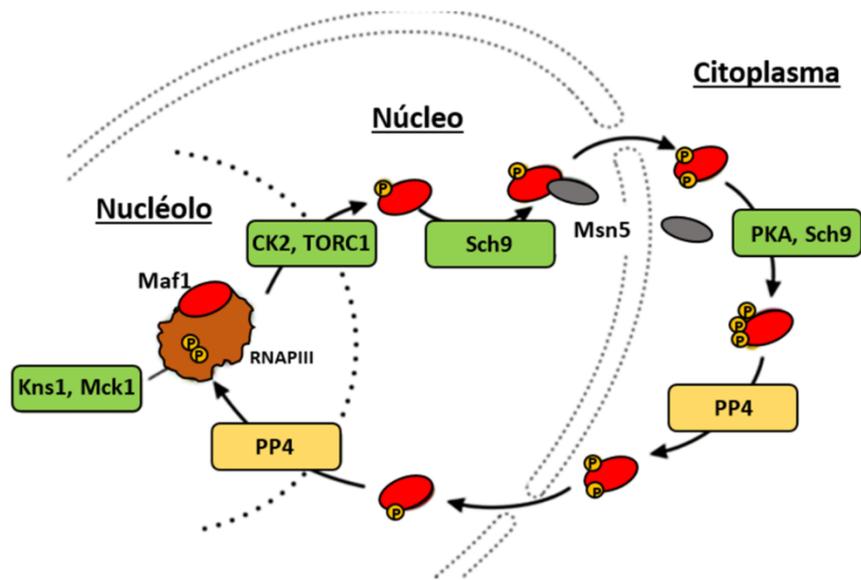


Figura 20: La RNA Pol III puede ser inhibida por la acción de Maf1. Maf1 es fosforilada, y por lo tanto inhibida. En situaciones de estrés, Maf1 es desfosforilada por PP4 para regresar al núcleo y regular negativamente la transcripción de la RNA Pol III. Maf1 puede ser fosforilada por TORC1, Sch9 y CK2 y así ser exportada por Msn5 nuevamente al citoplasma donde PKA y Sch9 continúan fosforilándola y por lo tanto inhibiéndola (Turowsky y Tollervey, 2016).

La subunidad C53 es fosforilada por Kns1 (miembro de la familia LAMMER/Cdc) y Mck1 (miembro de la familia GSK-3) bajo situaciones de estrés. C82 es fosforilado por CK2 y cuando es desfosforilado genera cambios en el heterotrímero y promueve la unión de Maf1 y por lo tanto la inhibición de la transcripción. TBP es fosforilado por CK2 bajo condiciones normales de crecimiento (Ghavidel y Schultz, 2001). Bdp1 es una fosfoproteína que es fosforilada por PKA, Sch9 y CK2, *in vitro*, para que la transcripción del tRNA por la RNA Pol III ocurra en levadura. Sin embargo, durante la mitosis en humano se ha visto que Bdp1 es hiper fosforilada por CK2 para inactivarla y liberarla del promotor (Hu *et al*, 2004). Esto nos dice que Bdp1 durante la mitosis en humanos se fosforila en ciertos residuos como T437 y S446 y que en condiciones de crecimiento exponencial en levadura también se fosforila, pero en otros sitios que en lugar de inactivarla la activan. Estos

niveles de fosforilación los determinan diversas cinasas y fosfatasa como se muestra en la figura 21.

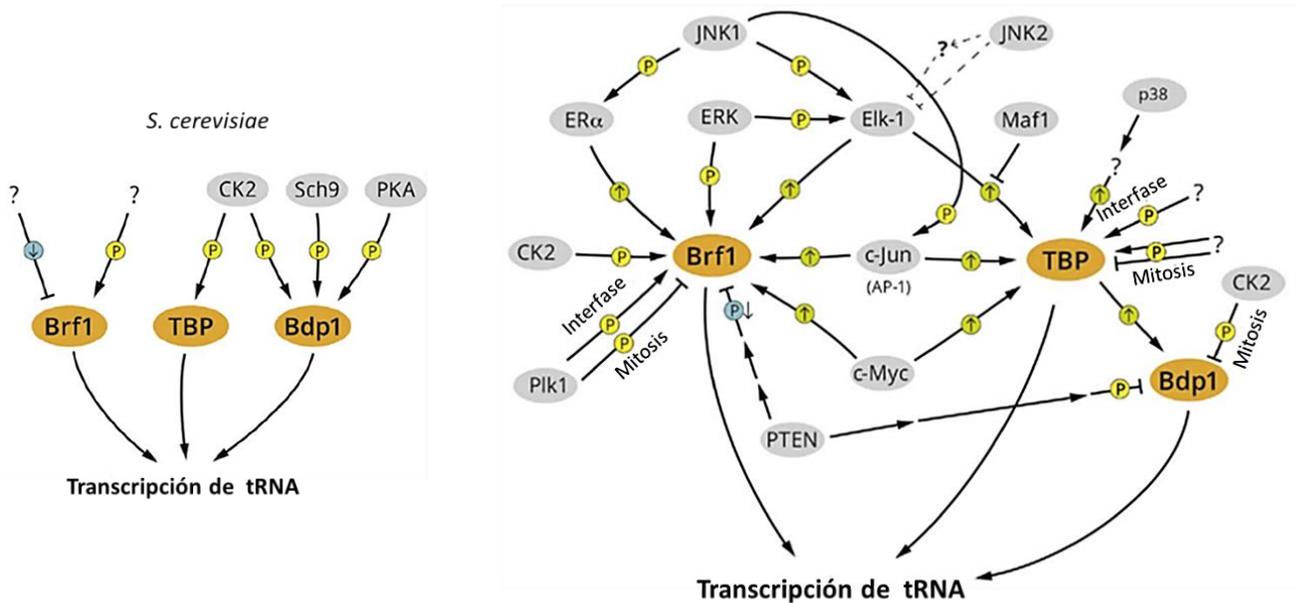


Figura 21: Regulación de la activación o inhibición de las subunidades de TFIIB. Brf1, TBP y Bdp1 son componentes que pueden ser fosforilados y desfosforilados en diferentes residuos para activar o reprimir la transcripción de la RNA Pol III. Esto es realizado por diferentes cinasas y fosfatasa que responden al estrés del ambiente (Graczik *et al*, 2018).

1.7 Expresión genética en tripanosomátidos

1.7.1 Organización genómica

Las diversas especies de *Leishmania* presentan genomas de diferentes tamaños que van desde las 29 megabases (Mb) (en *L. amazonensis*), hasta las 33 Mb (en *L. major*, *L. infantum* y *L. braziliensis*). El número de cromosomas depende de cada especie, pues *L. major*, *L. infantum* y *L. donovani* tienen 36 cromosomas, mientras que *L. braziliensis* cuenta con 35 y *L. mexicana* con 34. La variación en el

número de cromosomas se debe a eventos de fusión entre cromosomas. En *L. braziliensis* se fusionaron los cromosomas 20 y 34, mientras que en *L. mexicana* ocurrieron dos eventos de fusión, uno entre los cromosomas 8 y 29, y otro entre los cromosomas 20 y 36 (Rogers *et al.*, 2011). Aun con estas diferencias, los genomas muestran un alto grado de conservación con relación al contenido y orden de genes (sintenia), incluso con *L. tarentolae* que divergió del género tempranamente (hace entre 20 y 100 millones de años) (Raymond *et al.*, 2012; Cantacessi *et al.*, 2015). *T. cruzi* por su lado, muestra un genoma de 60.3 Mb el cual se organiza en 41 cromosomas, mientras que *T. brucei*, con un genoma de 26 Mb, cuenta con 11 cromosomas largos (Martínez-Calvillo *et al.*, 2010). Los tripanosomátidos se caracterizan por presentar particularidades en su expresión genética. A nivel de genoma hay ausencia de intrones, pocas regiones promotoras y todos sus genes se encuentran agrupados en unidades policistrónicas largas llamadas PGCs por las siglas en inglés de *Polycistronic Gene Clusters*. Este inusual arreglo, no visto en otros eucariontes, fue descrito por primera vez en el cromosoma 1 de *L. major*, el cual contiene dos PGCs divergentes, una con 32 genes, y la otra con 53 genes que no están relacionados entre sí (Fig. 22) (Myler *et al.*, 1999). Posteriormente, la publicación en el 2005 del genoma completo de *L. major*, y de *T. brucei* y *T. cruzi* reveló que dicha organización genómica es una característica presente en todos los cromosomas de todos los tripanosomátidos (Berriman *et al.* 2005; El-Sayed *et al.* 2005; Ivens *et al.* 2005). En *L. major* se han identificado 8272 genes codificadores de proteínas, 39 pseudo genes y 911 genes de RNA (Kazemi *et al.*, 2011).

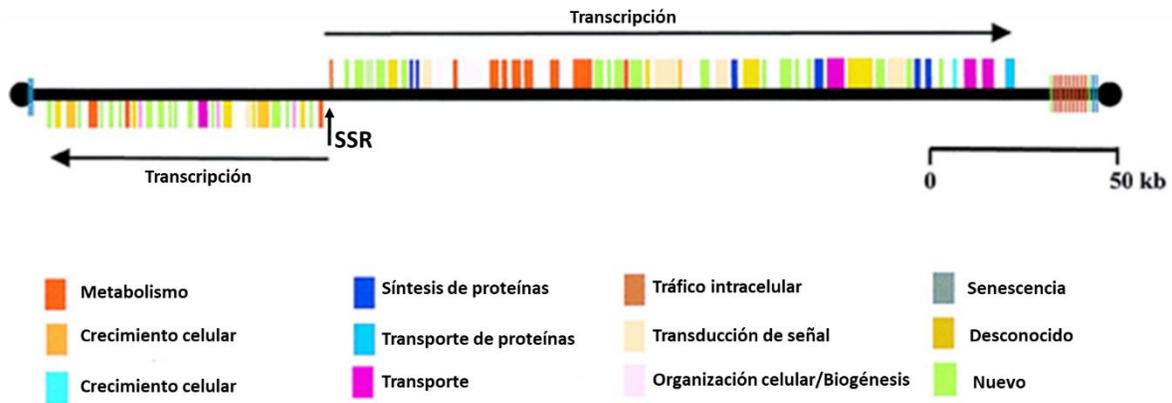


Figura 22: Cromosoma 1 de *L. major*. Se compone de dos unidades policistrónicas divergentes (es decir que la transcripción se dirige hacia los telómeros) con 32 y 53 genes que no están relacionados entre sí. Las PGCs están separadas por el SSR, una región rica en guaninas en donde se posiciona la RNA Pol II. Las funciones de los genes se indican con diferentes colores (Donelson *et al*, 1999).

1.7.2 Plasticidad genómica en *Leishmania*

La secuenciación de los genomas de diferentes especies y líneas celulares de *Leishmania* ha revelado la existencia de extensas aneuploidías (cambio en el número de cromosomas) y variaciones en el número de copias de genes (CNV) que surgen como respuesta a los cambios ambientales a los que se expone el parásito dentro de los hospederos. En *L. donovani* se observó que líneas celulares filogenéticamente cercanas mostraban variaciones en la ploidía de siete cromosomas: el 2, 8, 11, 12, 14, 20 y 33. Ensayos de hibridación fluorescente *in situ* (FISH) mostraron que diferentes cepas de *L. major*, incluyendo *L. major* Friedlin, son predominantemente diploides pero que a su vez tienen aneuploidias en ciertos cromosomas que varían entre célula y célula de una misma población, siendo los cromosomas 1, 5 y 17 los que pueden comportarse como trisómicos, el cromosoma 2 como monosómico y el 31 como tetrasómico. El resto de los cromosomas estudiados aparecen como disómicos en todos los casos (Sterkers *et al*, 2012). Esta

plasticidad en el genoma de *Leishmania* se ha relacionado fuertemente con su habilidad de adaptación a diferentes ambientes.

1.7.3 Transcripción policistrónica

Los tripanosomátidos son organismos utilizados como modelos de estudio para abordar cuestiones moleculares y evolutivas debido a las particularidades que poseen en su arreglo genómico y expresión genética. Todos los cromosomas poseen al menos dos PGCs, que se conforman de decenas o cientos de genes, que pueden ubicarse tanto en la hebra positiva como negativa y pueden ser convergentes o divergentes. Su transcripción depende de que la RNA Pol II se posicione en las SSR o *strand swich regions*, para después sintetizar un transcrito primario largo que incluye a todos los genes de la unidad policistrónica (Ivens *et al*, 2005). Posteriormente, el transcrito primario es procesado por *trans-splicing* y poliadenilación para que los mRNAs puedan ser generados y regulados de manera independiente a nivel post transcripcional (Fig. 23). Un dato interesante es que varias regiones SSR convergentes contienen genes de tRNAs, snRNAs y 5S rRNA, que son transcritos por la RNA Pol III, y que están relacionados con el término de la transcripción de la RNA Pol II (Martínez-Calvillo *et al*, 2004; Padilla *et al*, 2009)

1.7.4 Maduración de los mRNAs por *trans-splicing* y poliadenilación

El *trans-splicing* en tripanosomátidos es un mecanismo nuclear basal en la maduración de todos los mRNAs y consiste en la adición de un pequeño RNA de 39 nt llamado miniexón o *spliced leader* (SL) que es incorporado en el extremo 5' del mRNA, confiriéndole estabilidad y protección (Fig. 23) (Martínez-Calvillo *et al*, 2010). El miniexón es codificado en un gen que tiene de 250 a 500 copias organizadas en tándem en un locus específico (en el cromosoma 2 en *L. major*), que es transcrito por la RNA Pol II para generar un RNA donador de 140 nt que

debe ser procesado previo a su adición en el mRNA (Rojas, 2016). El miniexón contiene un *cap* hiper modificado llamado *cap* 4 conformado por el M⁷G típico en eucariontes, pero además tiene los cuatro nucleótidos subsecuentes (AACU) modificados por metilación (m⁷Gpppm⁶₂AmAmCm³U). La poliadenilación en tripanosomátidos no depende de una secuencia de término, como lo visto en el resto de los eucariontes, sino que el sitio de poliadenilación se establece río arriba del tracto de polipirimidinas asociado al sitio aceptor del *trans-splicing* del gen contiguo río abajo (Myler *et al*, 2008). Los sitios de *trans-splicing* y poliadenilación delimitan las regiones no traducidas (UTRs) que pueden ser de 6 pb hasta más de 1 Kb. Estas regiones son importantes en la regulación y estabilidad del mRNA (Román, 2012). La adición del miniexón en el extremo 5' del mRNA es un proceso realizado por un complejo ribonucleoprotéico llamado empalmosoma o *spliceosome* que se conforma por aproximadamente 200 proteínas y los snRNAs U1, U2, U4, U5 y U6 (Rojas-Sánchez, 2016).

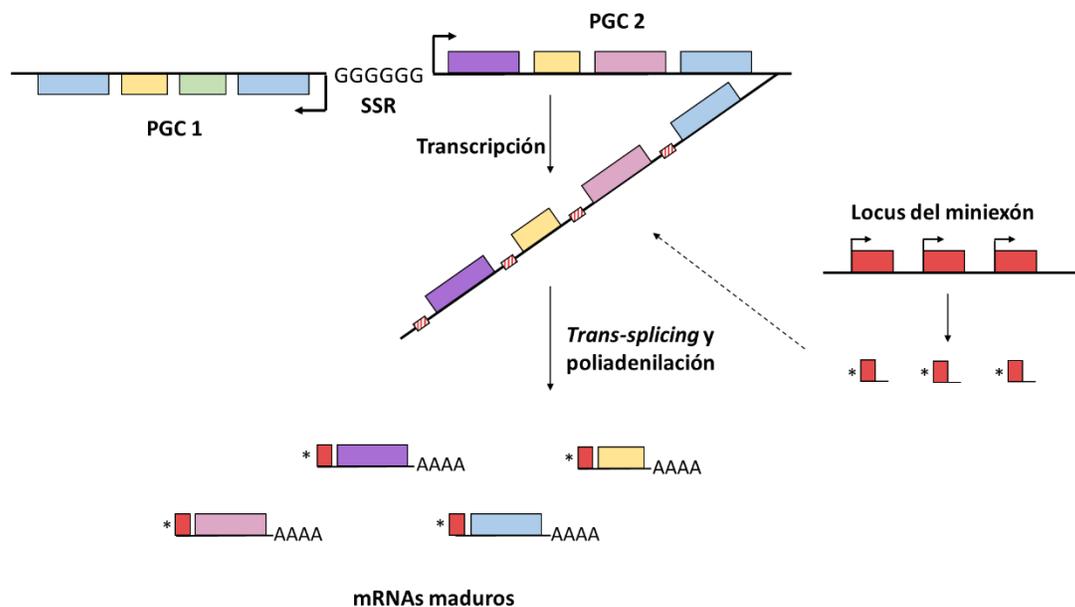


Figura 23: Transcripción de genes codificadores de proteína en tripanosomátidos. Los genes están agrupados en unidades policistricas o PGCs que son transcritas por la RNA Pol II para generar un transcrito primario largo que es procesado por *trans-splicing* y poliadenilación para producir los mRNAs, que son regulados individualmente de manera post transcripcional. El miniexón es transcrito desde otro sitio del genoma, es procesado y adicionado en el extremo 5' del mRNA.

1.7.5 Promotores de las RNA polimerasas

La peculiar organización genómica de los tripanosomátidos explica el porqué de la existencia de pocas regiones promotoras, siendo el SSR un sitio predominante de interacción y posicionamiento de la RNA Pol II para la transcripción de todos los PGCs. Por otro lado, el miniexón es codificado por el único gen que tiene un promotor específico e independiente para la RNA Pol II, el cual se conforma de dos dominios río arriba llamados elemento -30 y elemento -60 en *Leishmania* (Saito *et al*, 1994; Zeiner *et al*, 2003). Los genes del los rRNA 18S, 5.8S y 28S-like forman unidades repetidas en tándem con secuencias promotoras río arriba cada una. En *T. brucei*, su promotor está conformado por un dominio bipartito (I y II), el dominio distal (III) y una región de control río arriba (UCR).

Estas unidades ribosomales están separadas por las regiones espaciadoras, como en otros eucariontes. Sin embargo, una diferencia que tienen es la fragmentación del gen 28S-like en seis moléculas independientes, que son el 24S α , 24S β , S1, S2, S4 y S6. Los genes transcritos por la RNA Pol III, como el 5S rRNA y los tRNAs mantienen los promotores canónicos de eucariontes. Sin embargo en *L. major* todos los genes del 5S rRNA (excepto el LmjF.21.5SrRNA.02) presentan un gen de tRNA a ~ 60 nt río arriba del SIT, cuyas cajas A y B muy probablemente cumplan con una función promotora, como lo visto en el U2 snRNA de *L. major*, en donde las cajas A y B de un tRNA-like (y en menor medida las del tRNA de alanina), resultan indispensables para su transcripción (Fig. 24) (Rojas *et al*, 2016).

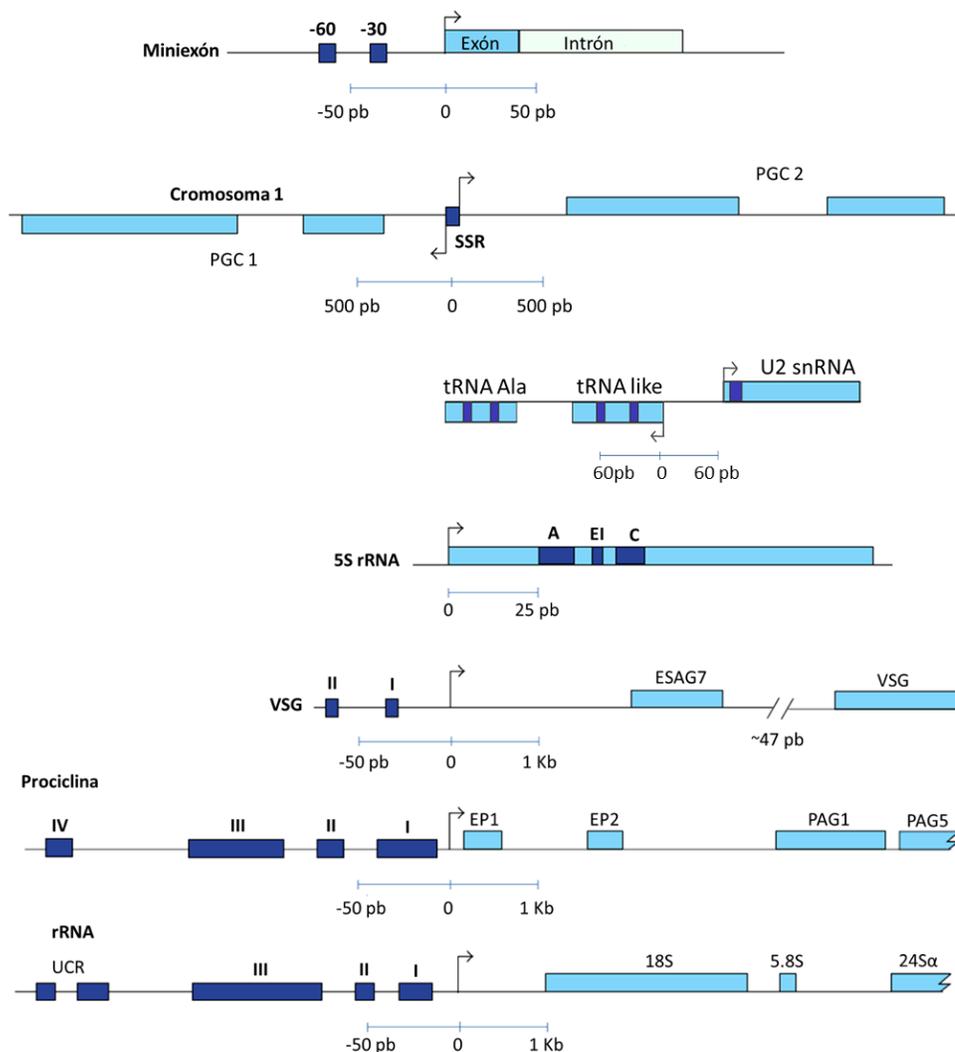


Figura 24: Representación esquemática de las regiones promotoras de los tripanosomátidos. Los sitios de inicio de la transcripción se indican con flechas. Los elementos promotores requeridos para el inicio de la transcripción se denotan con bloques de color azul marino. La región codificante se muestra en azul claro (modificado de Martínez-Calvillo *et al*, 2010).

1.7.6 RNA polimerasas y factores de transcripción

Los tripanosomátidos poseen las tres RNA polimerasas típicas: RNA Pol I, RNA Pol II y RNA Pol III. Sin embargo, éstas muestran importantes diferencias en su actividad transcripcional en comparación con otros eucariontes. *T. brucei* tiene a

la única RNA Pol I que además de transcribir los rRNAs, es capaz de sintetizar los mRNAs de las glicoproteínas variables de superficie (VSG), que representan el 20% de la proteína total de la célula, y que permiten la evasión de la respuesta inmunológica del hospedero (Horn, 2014). De igual manera, la RNA Pol I transcribe genes de prociclinas EP/GPEET, que son otras proteínas que protegen al parásito de proteasas y ayudan a su tropismo en el insecto vector (Vassella *et al*, 2009). La RNA Pol II, a diferencia de otros eucariontes, transcribe unidades policistrónicas largas tras posicionarse en la región SSR, por lo que no presenta los promotores canónicos para dicha maquinaria. Otra diferencia es que la RNA Pol III transcribe todos los genes snRNAs, a diferencia del resto de los eucariontes, en donde sólo transcribe al U6 snRNA. Mediante análisis *in silico* y ensayos de purificación por afinidad en tándem se han encontrado a todas las subunidades que conforma a la RNA Pols, salvo algunas subunidades específicas (Martínez-Calvillo *et al*, 2010).

La búsqueda de los factores de transcripción en tripanosomátidos ha resultado ser un trabajo difícil porque éstos muestran una alta divergencia en comparación con sus ortólogos. El primer FT caracterizado fue SNAPc, conformado por tres subunidades, el cual forma un complejo con TBP (TFR4), y las dos subunidades de TFIIA (TFIIA1 y TFIIA2) (Schimanski *et al*, 2005). Después se logró purificar a TFIIIB, TFIIH, TFIIE y el complejo mediador (Med-T), conformado por nueve subunidades exclusivas y conservadas en tripanosomátidos (Lee *et al*, 2010). Recientemente se purificó y caracterizó a TFIIIF en *T. brucei*, con lo que se concluye que los tripanosomátidos poseen el juego completo de factores generales de transcripción que reclutan a la RNA Pol II (Srivastava *et al*, 2017).

2. ANTECEDENTES

En nuestro laboratorio estamos interesados en estudiar los mecanismos involucrados en la transcripción de la RNA Pol III en *L. major*. Como se mencionó anteriormente, esta enzima está presente en todas las células eucariotas y se encarga de transcribir genes de RNA pequeños no codificantes que son esenciales para la viabilidad celular, como el 5S rRNA, los tRNAs y el U6 snRNA. Para que la RNA Pol III pueda transcribir estos genes, requiere de la participación de tres FTs principales: TFIIIA, TFIIIB y TFIIIC. TFIIIB, a su vez, se conforma de tres subunidades llamadas TBP, Brf1 y Bdp1.

En *L. major* se ha identificado 12 de las 17 subunidades de la RNA Pol III (C160, C128, C82, C53, C37, C34, C17, AC19, AC40, ABC27, ABC23 y ABC14.5) usando como blanco a ABC23 (Martínez-Calvillo, 2007). De manera interesante, ni TFIIIA ni TFIIIC fueron identificados en las bases de datos de los tripanosomátidos. Sin embargo, en nuestro laboratorio identificamos recientemente a la subunidad $\tau 95$ de TFIIIC mediante ensayos de purificación por afinidad en tándem (datos no publicados). Por otro lado, se han logrado caracterizar las subunidades TBP (TFR4) y BRF1 de TFIIIB en *T. brucei*, revelando que cumplen con la función canónica en eucariontes (Ruan *et al*, 2004; Vélez-Ramírez, 2015).

Bdp1 es la tercera subunidad de TFIIIB, y tiene la función de estabilizar el complejo de pre inicio de la transcripción, ya que su incorporación genera cambios conformacionales importantes y esenciales que permiten el reclutamiento y posicionamiento de la RNA Pol III al SIT. Durante mi trabajo de licenciatura se reveló que Bdp1 en *L. major* (LmBdp1) (LmjF36.6530) es un gen de copia única, con alta divergencia, teniendo porcentajes de identidad bajos con relación a otros ortólogos que incluso no están tan alejados evolutivamente, como por ejemplo con *S. cerevisiae* (8.4% de identidad) (Román, 2012). La única región que se identificó

como conservada fue el dominio SANT. Mediante ensayos *Northern-blot* se caracterizó el mRNA de LmBdp1, el cual mostró un tamaño de ~3.8 Kb, y mediante ensayos de RT-PCR se identificó el sitio aceptor del miniexón y la región de poliadenilación. Con la identificación de los sitios de procesamiento se delimitaron las regiones UTR 5´ y 3´ de LmBdp1, que se conforman de 1064 pb y 1102 pb respectivamente. De igual manera se determinó la vida media del mRNA en fase media logarítmica (1 h) y en fase estacionaria (2 h) (Román, 2012).

Considerando que se sabe poco acerca de la maquinaria transcripcional de la RNA Pol III en estos parásitos, nosotros estamos interesados en caracterizar sus diferentes componentes para lograr un mejor entendimiento de sus mecanismos de expresión y regulación genética, así como también de la evolución del proceso transcripcional en el linaje eucarionte. El análisis funcional de LmBdp1 nos ayudará a comprender el rol de dicha subunidad, y por ende del factor TFIIIB, en la transcripción de la RNA Pol III en *L. major*.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo general

Estudiar la participación de la subunidad Bdp1 de TFIIIB en la expresión de los diferentes tipos de genes transcritos por la RNA Pol III, como el 5S rRNA, tRNAs y snRNAs, en el parásito protozoario *Leishmania major*.

3.2 Objetivos particulares

- ❖ Analizar *in silico* la secuencia y estructura de LmBdp1 utilizando programas de bio-informática.
- ❖ Generar los vectores p Δ Bdp1-pac y p Δ Bdp1-hyg para el *knock-out* de LmBdp1 mediante el reemplazo de sus dos alelos, de manera secuencial, por genes de resistencia a puromicina (pac) e higromicina (hyg).
- ❖ Obtener la línea celular en la que un alelo del gen de LmBdp1 haya sido eliminada (*knock-out* sencillo o KOS). Asimismo, generar y caracterizar la línea celular en la que se hayan eliminado los dos alelos de LmBdp1 (*knock-out* doble o KOD).
- ❖ Analizar el efecto del reemplazo de los alelos endógenos de LmBdp1 en el crecimiento celular y en la transcripción de la RNA Pol III.
- ❖ Clonar el gen de LmBdp1 en un vector de expresión con la bandera PTP. Transfectar y obtener líneas celulares que expresen de manera estable la proteína recombinante LmBdp1-PTP.

- ❖ Determinar la localización celular de LmBdp1-PTP.
- ❖ Analizar las interacciones *in vivo* entre LmBdp1 y los distintos tipos de genes transcritos por la RNA Pol III (5S rRNA, tRNAs y snRNAs)

4. METODOLOGÍA

4.1 Análisis *In silico*

Las secuencias de los ortólogos de Bdp1 de eucariontes superiores y levadura se obtuvieron de la base de datos de NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Para las especies del género *Trypanosoma* y *Leishmania* se consultaron las bases de datos TriTrypDB (release 40) (<https://tritrypdb.org/tritrypdb/>) y GeneDB (<https://www.genedb.org/>). Los alineamientos se hicieron en ClustalΩ (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) y la búsqueda de sitios fosforilables en PhosTryp (<http://phostryp.bio.uniroma2.it/>). Las estructuras 3D del dominio SANT extendido obtenidas por cristalografía (Gouge *et al*, 2017; Vorlander *et al*, 2018) se descargaron desde Protein Data Bank (<https://www.rcsb.org/>), y se utilizaron los programas de Swiss-PDB viewer (<http://www.expasy.org/spdbv/>) y PyMol v 2.1.1 para modelar las estructuras de humano (ID: 5n9g), levadura (6F41) y las predicciones arrojadas por el programa SWISS-MODEL (<https://swissmodel.expasy.org/>) para LmBdp1, TbBdp1 y TcBdp1, en formato pdb. Para predecir la estructura secundaria se utilizó PSIPRED Protein Sequence Analysis Workbench (<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/>). Para revisar las modificaciones post traduccionales en HsBdp1 se visitó la página Phosphosite plus (<https://www.phosphosite.org/proteinAction.action?id=15956&showAllSites=true>).

4.2 Cultivos y conteo de promastigotes de *L. major*

Se crecieron células de promastigotes de la cepa *L. major* MHOM/IL/81/Friedlin (LSB-132.1) en medio BM (Medio M199, pH 7.2, suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB) previamente inactivado a 50°C, 9.5 g/L de infusión cerebro-corazón (BHI), HEPES 40 mM, hemina 0.01mg/ml, biotina 0.0002%, penicilina 100 IU/ml, estreptomicina 100 µg/ml y L-glutamina 1×) a 26°C, en agitación suave, hasta alcanzar la fase media logarítmica (FML) que se

logra a una densidad aproximada de 30×10^6 cels/ml, y se caracteriza por tener células con un cuerpo corto, con mucha movilidad y sin formación de rosetas (cúmulos de células). Para las resiembras, se tomó una alícuota del cultivo crecido y se transfirió a una nueva caja que se adicionó con lo correspondiente de medio BM para que quedara a una concentración final de 5×10^6 cels/ml. Si las células efectivamente estaban en FML, a las 24 h se llegaba nuevamente a 30×10^6 cels/ml aproximadamente. Para determinar la densidad celular se tomaron 50 μ l del cultivo en crecimiento y se diluyeron en 450 μ l de formaldehído al 2% en un tubo eppendorf de 1.5 ml. De esta dilución se tomaron 10 μ l y se colocaron en una cámara de Neubauer para el conteo de células.

4.3 Clonación en pGEMT-Easy y ligación con la T4 ligasa

Diversas regiones de interés fueron amplificadas por PCR de punto final a partir de DNA genómico de *L. major* WT. Se diseñaron oligonucleótidos específicos para cada región, y se les adicionó una adenina (A) en su extremo 5' para asegurar la clonación del amplicón en el vector pGEMT-Easy. Las muestras de PCR se transfirieron a las columnas del kit NucleoSpin Extract II (Macherey Nagel) y se centrifugaron a 11,000 g para remover sales, enzimas y dNTPs. El DNA purificado se ligó al plásmido pGEMT-Easy en una reacción con 1 μ l de la T4 ligasa 3U/ μ L (Promega), 5 μ l del buffer Rapid Ligation 2 \times y 1 μ l de pGEMT-Easy (50 ng), llevando a un volumen final de 10 μ l con agua desionizada. Las reacciones de ligación se incubaron primero 1 h a TA y luego a 4°C por 16 h. Posteriormente las construcciones se transformaron por choque térmico en células competentes de *E. coli* JM109.

4.4 Transformación de células competentes *E.coli* JM109

El producto de la ligación se transfirió al fondo de un tubo de polipropileno estéril (Falcon) previamente enfriado en hielo por 10 min, y se adicionaron 50 µl de células competentes JM109 de alta eficiencia (Promega). El tubo se dejó en hielo por 20 min y luego se sometió a un choque térmico a 42°C por 45 segundos exactos. Inmediatamente después se puso en hielo por 2 min, luego se añadió 1 ml de medio SOC (triptona 2%, extracto de levadura 0.5%, NaCl 1%, KCl 2.4 mM, MgCl₂ y glucosa 2%) y se incubó por hora y media a 37°C a 200 rpm. A continuación, las células se centrifugaron a 13,000 g y la pastilla se re suspendió en 100 µl de medio SOC para resembrarlas en cajas Petri con medio LB agar (peptona de caseína 1%, extracto de levadura 0.5%, NaCl 0.5% y agar bacteriológico al 1.2 %) suplementado con ampicilina a una concentración final de 100 µg/ml, IPTG (Isopropil β-D-1-tiogalactopiranosido) 100 mM y X-Gal (5-Bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranosido) 50 mg/ml. Las placas se incubaron a 37°C durante 16 h y luego se revisaron para aislar colonias blancas, las cuales se analizaron por PCR, restricción enzimática y secuenciación. Las colonias azules no fueron consideradas, ya que su color revela que no hay inserto en el vector transformado.

4.5 Obtención de vectores

4.5.1 LmBdp1-PTP

Para generar el vector LmBdp1-PTP, que se ocupó para los ensayos de inmunofluorescencia (IF) y de inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP), el vector pB6-PTP se digirió con las enzimas de restricción *Xma*I y *Xba*I para liberar el gen RPB6 clonado y purificar el vector linearizado que contiene la bandera PTP con el kit NucleoSpin Gel Extraction (Macherey-Nagel). El gen LmBdp1 (LmjF36.6530) se amplificó por PCR a partir de DNA genómico de *L. major* WT con los oligos B''-*Xma*I-5' (5'-ATCCCGGGATGGACGACAACGAGTTCGAA) y B''-*Xba*I-3' (5'-ATTCTAGAC

TCAAACGAGAAGTCCGAGTC). Éstos contienen los sitios de corte *Xma*I y *Xba*I en los extremos para poderlo clonar en el vector PTP previamente digerido con las mismas enzimas. Un dato importante es que el inserto no contiene el codón de paro de LmBdp1 (TGA) para que pueda clonarse en marco con la bandera PTP. Finalmente el vector PTP linearizado y el gen de LmBdp1 sin el codón de paro se sometieron a una reacción de ligación con la T4 ligasa, luego se transformaron en células competentes de *E. coli* JM109 y se extrajo DNA plasmídico por maxiprep con el kit NucleoSpin Plasmid (Macherey-Nagel). El vector LmBdp1-PTP contiene genes de resistencia a ampicilina (Amp) y a G418, además de secuencias intergénicas del locus de DHFR para el procesamiento de los mRNAs. en *L. major*.

4.5.2 pΔBdp1- pac y pΔBdp1-hyg

Para generar el plásmido pΔBdp1-pac para *knock-out* sencillo (KOS) en *L. major*, primero se obtuvo el gen de resistencia a puromicina (pac) de 1.7 Kb tras la digestión del vector pΔ75-pac con las enzimas *Eco*RI y *Sac*I. El inserto se purificó posterior a la electroforesis de un gel de agarosa al 0.8% con el kit NucleoSpin Gel Extraction (Macherey-Nagel) siguiendo las instrucciones del fabricante. Un fragmento de 566 pb de la UTR 5' de LmBdp1 (fUTR5') se amplificó por PCR punto final con los oligonucleótidos Bdp1-5-for-*Xba*I (5' ATCTAGAGTCGGCC GTTGCGCTTCTC) y Bdp1-5-rev-*Eco*RI (5' AGAATTTCGGCTCCACCGGT GCGTATC); y de igual manera otro fragmento de 550 pb se amplificó pero ahora de la UTR 3' (fUTR3') con los oligonucleótidos Bdp1-3-for-*Sac*I (5'-AGAGCTCCGGTAGAACCAAAAAGTTTCG) y Bdp1-3-rev-*Xho*I (5'-ACTCGAGTA TAAGTCCGACAGCGAAGA). Para el vector pΔBdp1-hyg utilizado para el *knock-out* doble (KOD), el gen de resistencia a higromicina (hyg) de 1.8 Kb se obtuvo tras la digestión del vector pΔ75-hyg con las enzimas *Spe*I y *Sac*I. La misma región fUTR5' utilizada para el vector pΔBdp1-pac se amplificó por PCR pero con el sitio de corte para *Spe*I en su extremo 3' con los oligonucleótidos Bdp1-for-*Xba*I y Bdp1-5-rev-*Spe*I (5' AACTAGTGGCTCCACCGGTGCGTATC). Y el fUTR3' es el mismo

que el utilizado para el plásmido pΔBdp1-pac. Los productos de PCR se desalaron y clonaron en el vector pGEMT-Easy de manera independiente para después transformar células competentes de *E. coli* JM109 y extraer DNA plasmídico por maxiprep con el kit NucleoSpin Plasmid (Macherey-Nagel). Posteriormente, el DNA fue digerido con las diferentes enzimas según el sitio de corte añadido en sus extremos con la finalidad de purificar los insertos fUTRs y ligar los tres fragmentos (fUTR 5', fUTR 3' y el gen de resistencia) en el vector pBluescript II SK- previamente digerido con las enzimas *Xba*I y *Xho*I. Las regiones de las fUTR5' y fUTR3' inducen el reemplazo de los alelos de LmBdp1 por los genes de resistencia a pac o hyg por recombinación homóloga. Para que esto ocurra, los parásitos se transfectan con los *cassettes* pac e hyg de manera secuencial, provenientes de la digestión de los vectores pΔBdp1- pac y pΔBdp1- hyg con las enzimas *Xba*I y *Xho*I.

4.5.3 Vectores para los ensayos de *run-on* nuclear

Para los ensayos de *run-on* nuclear se amplificaron por PCR punto final diversos genes que son transcritos por las tres RNA polimerasas (RNA Pol I, II y III) y se clonaron en el vector pGEMT-Easy. Cabe mencionar que la mayoría de los plásmidos ya se habían obtenido previamente (Padilla, 2014). El gen 24Sβ rRNA (*LmjF.27.rRNA.26*; 113 pb) se amplificó con los oligonucleótidos 24Sbeta-F (5'-TTCCGGAGTCTTGTTCGAG) y 24Sbeta-R (5'-GAGATTTCTGTTCCCACTGAGC); y el 18S rRNA gene (*LmjF.27.rRNA.01*; 370 pb) con los oligonucleótidos Lm-rRNA18S 5' (5'-CGGCCTCTAGGAATGAAGG) y LmrRNA18S 3' (5'-CCCCTGAGACTGTAACCTC). El gen de alfa tubulina (*LmjF.13.0330*; 338 pb) se amplificó con los oligonucleótidos alfa-tub-5' (5'-AGAAGTCCAA GCTCGGCTACAC) y alfa-tub-3' (5'-GTAGTTGATGCCGCACTTGA AG); el gen del miniexón (*LmjF.02.SLRNA.0010*; 303 pb) con los oligonucleótidos LmjF-SL-promF (5'-GAGCGCGGTGGGCATGACA) y LmjF-SL-InterR (5'-ACTGCAAGGGTGCCG CCG). El gen *LmjF.06.0370* (521 pb) se amplificó con los oligonucleótidos Lm06-0370-5' (5'-GAAGCGATGGACTGTTCTGG) y Lm06-0370-3' (5'-CGGTCCTTGCT

GCGAA TATC); el gen *LmjF.06.0210* (503 pb) con los oligonucleótidos Lm06-0210-5' (5-GCCGGAGACATTTGCGTAC) y Lm06-0210-3' (5'-CTATGGCGAC GGGATCATC). El gen *LmjF.06.0200* (547 pb) se amplificó con los oligonucleótidos Lm06-0200-5' (5'-CCATCCCATGACAAGAGC) y Lm06-0200-3' (5'TGTAGTCGC TGTACTCGC); y el gen de tRNA-Phe (*LmjF.09.TRNAPHE.01*; 338 pb) con los oligonucleótidos Lm09-TRNAPHE-5' (5'-TTCATCCGCGCAAAGAGG) y Lm09-TRNAPHE-3' (5'-GGCCTTCCACGTATTTTCG). El gen de tRNA-Tyr (*LmjF.36.TRNATYR.01*; 316 pb) se amplificó con los oligonucleótidos Lm36-TRNATYR-5' (5'-AGTGCCGAGAAGTTCGACG) y Lm36-TRNATYR-3' (5'-TCGTCTCCGTTCTGTTGC); y el gen del 5S rRNA (*LmjF.15.5SrRNA.01*; 344 pb) con los oligonucleótidos Lm15-rRNA5S-5' (5'-GAAAGCATCTCTGTG GGTTCGA) y Lm15-rRNA5S-3' (5'CCCGGGGTCCTGCA AATG). El gen del U2 snRNA (*LmjF.31.snRNA.01*; 127 pb) se amplificó con los oligonucleótidos U2-5' (5'-AAACGTGGAACTCCAAGGAA) y U2-3' (5'-TATCTTCTCGGCTATTTAGC); y el gen del tRNA-Sec (524 pb) con los oligonucleótidos Lm-TRNASEC524-5' (5'-CCGGCTGCCTTCATCAACTC) y Lm-TRNASEC524-3' (5'-GCGCATACTTT CGGAGTCC). Los vectores se transformaron en células competentes de *E.coli* JM109, el DNA plasmídico fue purificado con columnas del kit NucleoSpin plasmid (Macherey-Nagel) y se mandaron a secuenciar con los primers T7 y SP6.

4.6 Transfección por electroporación en *L. major*

Para generar la línea de *L. major* que expresa a la proteína recombinante LmBdp1-PTP, promastigotes en fase media logarítmica de *L. major* WT fueron electroporados con el vector LmBdp1-PTP que contiene un gen de resistencia al antibiótico G418. Para esto 4×10^7 células se lavaron con PBS-G (PBS y glucosa 2%) dos veces y luego se re suspendieron en 0.4 ml de buffer de electroporación Cytomix (HEPES 25 mM, KCl 120 mM, CaCl₂ 0.15 mM, MgCl₂ 5 mM, KH₂PO₄ 10 mM, K₂HPO₄ 10 mM, EDTA 2 mM, a pH 7,6). Posteriormente, las células se transfirieron a una cubeta de electroporación de 4 mm y transfectaron con 10 µg de

DNA circular de LmBdp1-PTP a 1600 V, 50 μ F y 25 Ω (BTX Electro Square Porator ECM 830). El cultivo se dejó crecer por 24 h y se plaqueó en cajas de medio BM con agarosa sea *plaque* GTG al 0.7% (FMC Bioproducts) y G418 [50 μ g/ml]. Se seleccionaron algunas colonias para futuros análisis. Las mismas condiciones de electroporación se usaron para la transfección de los *cassettes* *pac* e *hyg* para inducir el *knock-out* genético, pero utilizando 5 μ g de DNA linealizado.

4.7 Ensayos tipo *Western-blot*

Con el objetivo de medir los niveles de proteína de LmBdp1-PTP en la línea LmBdp1-PTP, y de LmBdp1 en las líneas *L. major* *WT*, y KOD+1, se realizaron ensayos tipo *Western-blot* utilizando en todos los casos la proteína total de las líneas celulares de interés. Con el objetivo de medir los niveles de proteína de LmBdp1-PTP en la línea LmBdp1-PTP, y de LmBdp1 en las líneas *L. major* *WT*, y KOD+1, se realizaron ensayos tipo *Western-blot* utilizando en todos los casos la proteína total obtenida de las líneas celulares de interés, las cuales se lavaron dos veces con PBS-G y después se resuspendieron en buffer RIPA (Tris 50 mM pH 7.4, NaCl 150 mM, EDTA 5 mM, NP-40 1%, Deoxicolato 0.5%, SDS 0.1%, Inhibidores de proteasas) por 30 min, agitando cada 5 min, para lisar las células. Posteriormente, el lisado se centrifugó a velocidad máxima por 20 min y se recuperó el sobrenadante. De 50 a 80 μ g de proteína se trataron con buffer Laemmli (2-mercaptoetanol 0.1%, azul de bromofenol 0.0005%, glicerol 10%, SDS 2%, Tris-HCl 63 mM pH 6.8) y se desnaturalizaron por 10 min en agua hirviendo. Posteriormente la muestra se puso en hielo por 2 min y finalmente se les dio un *spin* en la centrífuga para poderla cargarla en un gel SDS-PAGE y realizar la electroforesis a 90 V por 2 h aproximadamente. Los geles SDS-PAGE consisten en dos fases, una fase concentradora (acrilamida-bisacrilamida al 3.9%, Tris 0.375 M pH 6.8, SDS 0.1%, PSA 0.05%, TEMED 0.005%) y una fase separadora (acrilamida-bisacrilamida al 10%, Tris 0.375 M pH 8.8, SDS 0.1%, persulfato de amonio 0.05%, TEMED 0.005%). El buffer utilizado en la cámara para la corrida de las proteínas se

compone de glicina 14.4 g, Tris 3 g, 10 ml de SDS 10% en un volumen final de 1 L (buffer de corrida). Después, se hizo la transferencia de las proteínas a una membrana PVDF (Immun-Blot® PVDF Membrane For Protein Blotting de Bio-Rad) previamente activada con metanol. El buffer de transferencia se compone de Tris 25 mM, glicina 192 mM, SDS 3.5 mM y metanol al 20%. Después de aproximadamente 2 h de transferencia a 90 V, la membrana ya pudo ser utilizada para los ensayos de *western-blot*. Previo a cualquier exposición con anticuerpos, la membrana se sometió a un proceso de bloqueo con leche en polvo libre de grasa (svelty) al 5%, por dos horas a TA o durante toda la noche (ON) a 4°C. Ya bloqueada la membrana se incubó con el anticuerpo primario en una solución de PBS-Tween 20 al 0.05% y leche al 1%, a una dilución de 1: 3000 por una hora a TA para el anti-Prot C, y a una dilución de 1:50 ON a 4°C para el anti-LmBdp1 (ratón). Posteriormente, la membrana se lavó mínimo tres veces, 10 minutos con PBS-tween 20 al 0.05% cada lavado, y luego se incubó con el anticuerpo secundario por dos horas a TA. Para analizar la expresión de LmBdp1-PTP, el cual es reconocido inicialmente por el anti Prot C, se utilizó el HRP anti-conejo IgG (BioLegend) secundario a una dilución de 1:3000; y para LmBdp1 se utilizó HRP de ratón IgG, (BioLegend) a una dilución de 1:3000. Después, la membrana se lavó tres veces, durante 15 minutos con PBS-twee 20 al 0.05% a TA y terminando éste paso la membrana se expuso a la soluciones del kit ECL (Amersham™ ECL™ Western Blotting Detection Reagents de GE Healthcare) para producir la señal que sería reconocida por las placas Amersham Hyperfilm™ MP de GE Healthcare, utilizando las soluciones de revelado de Kodak.

Para poder determinar los niveles de la proteína LmBdp1 en la línea KOD+1 fue necesario generar un anticuerpo contra ella. Para ello el gen completo de LmBdp1 se amplificó por PCR y se clonó en el vector pCold donde se le fusionó una bandera de histidinas (6×Hist tag). La proteína recombinante LmBdp1r se expresó en *E. coli*, posteriormente fue purificada mediante cromatografías por afinidad a níquel, y se usaron 50 µg para inocular subcutáneamente a ratones machos BALB-

C de 6 semanas, junto con el coadyuvante TiterMax Gold (Sigma) a una concentración de 1:1. Posteriormente el suero de los ratones se colectó seis semanas después de la inmunización y se utilizó en los experimentos *western-blot*.

4.8 Ensayos de inmunofluorescencia indirecta en *L. major*

Para determinar la localización de LmBdp1-PTP en *L. major*, 1.5×10^6 de promastigotes de *L. major* Bdp1-PTP se lavaron dos veces con PBS frío y se distribuyeron sobre un portaobjetos previamente tratado con Poli-L-Lisina. Las células se fijaron con paraformaldehído al 4% por 30 min a 4°C. Luego se lavaron suavemente con PBS a TA para después permeabilizarlas con 50 μ l de Tritón X-100 al 0.1% durante 5 min también a TA. Se hicieron cuatro lavados suaves con PBS y posteriormente las células se bloquearon con BSA 1 h al 2% dentro de una cámara húmeda a TA. Luego se incubaron con el primer anticuerpo anti-ProtC (Delta Biolabs) a una dilución de 1:20 por 1 h a TA. Éste reconoce a la bandera PTP fusionada a la proteína recombinante LmBdp1-PTP. Se lavaron tres veces con PBS frío y luego dos veces con PBS-tween al 0.05%. Posteriormente las células se incubaron con el segundo anticuerpo anti-conejo (Life Technologies) acoplado a un fluoróforo (Alexa fluor 488), a una dilución de 1:400, en una cámara húmeda en oscuridad por 1 h a TA. Se hicieron los mismos lavados con PBS y PBS-tween al 0.05% para después dejar secar la muestra en oscuridad, luego se cubrió con Vectashield-DAPI (Vector Laboratories INC). Las laminillas se observaron en un microscopio de epifluorescencia Zeiss 216 Axio Vert.A1, y las imágenes se analizaron con el software ZEN 2012 (Blue 217 edition).

4.9 Ensayos de PCR punto final para la caracterización de *L. major* KOD+1

Como primer análisis de las líneas *knock-out* se realizaron ensayos de PCR punto final para determinar si el reemplazo de los alelos ocurrió de manera correcta.

Para esto se usaron los oligonucleótidos PAC-LOC3'-REV (5'-GTGGGCTTGACTCGGTCATGG) y Bdp1-for-upstream (5'-TGTTGGCAACTTGCCACCGT) que reconocen secuencias río arriba del sitio de recombinación y dentro de los *cassettes* pac. También se usó el oligonucleótido PACDHFR-3'-REV para confirmar la integración del *cassette*-pac. De igual manera, para identificar el reemplazo del segundo alelo se ocuparon los oligonucleótidos Bdp1-3-rev-hyg (5'-GTCGGAGACGCTGTCGAACT) y Bdp1-for-upstream. Si hay amplificación, significa que la recombinación fue exitosa y que además ocurrió en el locus esperado.

4.10 Ensayos tipo *Southern-blot* para la caracterización de *L. major* KOD+1

La eliminación de los alelos de LmBdp1 por los *cassettes* pac e hyg se corroboró mediante ensayos tipo *Southern-blot* utilizando el DNA total de las líneas *L. major* KOS, KOD+1 y WT. Para analizar a *L. major* KOS se digirieron 5 µg de DNA genómico con *Xho*I y *Sac*I de manera independiente. Para analizar a *L. major* KOD+1 la misma cantidad de DNA se digirió pero con la enzima *Pst*I. El DNA se desnaturalizó en baño maría por 10 min, posteriormente se colocó en hielo por 2 min e inmediatamente fue separado por electroforesis en geles de agarosa al 0.8%, y transferido a membranas de Hybondn-NC (GE Healthvcare) por capilaridad. Las membranas ya preparadas fueron hibridadas con una sonda marcada radioactivamente con [³²P] dCTP, utilizando el sistema de marcaje High Prime labelling system (Roche). Esta sonda reconoce a la región fUTR 5' de 566 pb ubicada en el extremo 5' del *cassette* pac e hyg. Es importante recordar que dicha región fUTR5' también se encuentra en el locus de LmBdp1. La hibridación se realizó en una solución de formamida al 50%, SSC 5×, SDS al 0.2% y solución Dendharts al 4×, a 42°C. Luego, las membranas se lavaron a 68°C en SSC al 0.2% y SDS al 0.1% y se dejaron secar para después escanearlas con el equipo Fuji FLA-3000.

4.11 Marcaje radioactivo

El marcaje de las sondas se realizó con el kit High Prime DNA Labelling Kit de Roche, siguiéndose las instrucciones señaladas por el fabricante. Los nucleótidos no incorporados se removieron con columnas de sephadex G-50 (ProbeQuant™ G-50 Micro Columns de GE Healthcare), siguiendo las instrucciones del fabricante. La cuantificación de la sonda se realizó en un contador de centelleo 1450 MicroBeta de Perkin Elmer.

4.12 Ensayos de *run-on* nuclear de *L. major* KOD+1

Preparación de muestras

2µg de DNA plasmídico se transfirieron a un tubo eppendorf y se adicionó NaOH y EDTA a concentraciones finales de 10 mM y 1 mM, respectivamente. Posteriormente las muestras se desnaturalizaron en agua hirviendo por 5 min, se pusieron en hielo por 2 min y se les dio un *spin* en la centrífuga para usarlas en la preparación de las membranas.

Preparación de las membranas de nylon

Antes de iniciar con la extracción de núcleos es importante contar con las membranas de nylon Hybond N⁺ (GE Healthcare) ya listas. Para esto se usó el dispositivo *Bio-dot* (Bio-Rad) donde se colocó una hoja gruesa de papel Whatman (o tres delgadas) previamente humedecida y sobre de ésta se apiló la membrana Hybond previamente humedecida. Posteriormente se terminó de ensamblar el *Bio-dot* ajustando los tornillos y se conectó al vacío. Las muestras de DNA ya desnaturalizadas (ver la sección de preparación de muestras) se vertieron en cada uno los pozos con una micropipeta y después se abrió el vacío a una intensidad

suave. A continuación, los pozos se lavaron con 500 μ l de NaOH 0.4 M, y nuevamente se abrió el vacío. Finalmente se desensambló el *Bio-dot* y las membranas se lavaron en solución SSC (NaCl 3 M, Acetato de sodio 0.3 M) por 10 min en agitación suave. Posterior a esto, las membranas se dejaron secar al aire y se sometieron al *cross-linking* con luz UV en el Stratalinker (Stratagene) a 120 mJoules/cm² para fijar el DNA. Las membranas se guardaron a 4°C cubiertas con aluminio.

Marcaje del RNA naciente

Para la extracción y marcaje del RNA naciente, 2×10^8 células se lavaron dos veces con PBS-G frío, y se resuspendieron en 4 ml de buffer de lisis (Tris-HCl pH 7.5 10 mM, CaCl₂ 3 mM, MgCl₂ 2 mM) frío. Luego se adicionó NP-40 para que quedara a una concentración final de 0.5% y las células se transfirieron a un homogenizador *Dounce* para lisarlas manualmente con 30 o 40 golpes. Para verificar que las células se hubieran lisado se revisó en el microscopio la liberación de los núcleos. A continuación, se colectaron los núcleos por centrifugación a 1,400 g y se lavaron con buffer de lisis. Finalmente los núcleos se resuspendieron en 100 μ l del buffer de *run-on* MIX: Tris HCl pH 7.5 100 mM, glicerol 25%, espermina 0.15 mM, espermidina 0.5 mM, DTT 2 mM, RNasin 40 U (Promega), MgCl₂ 2 mM, rUTP 2 mM, rCTP 10 μ M y 250 μ Ci de [α -³²P]-CTP (3000 Ci/mmol, Amersham). Los núcleos se incubaron por 6 min a 26°C para dar lugar a la elongación de los transcritos nacentes en presencia del [α -³²P]-CTP. Terminando el tiempo, se adicionaron 10 U de DNAsal y se continuó con la incubación por 5 minutos a 37°C. Posteriormente se detuvo la reacción al adicionarle el buffer de paro (Tris-HCl 10 mM, pH 7.5, EDTA 10 mM, SDS 1% y proteinasa K 100 μ g/ml) y dejando incubar por 15 min a 37°C. Después se extrajo RNA con 200 μ l de fenol-cloroformo:isoamílico. Para separar los nucleótidos radioactivos sobrantes, se usaron las columnas sefadex G-50 (GE Healthcare). Con esto se obtuvo el RNA naciente marcado radioactivamente, el cual se usó para hibridar membranas preparadas por *dots* con

2 µg de DNA plasmídico. Las hibridaciones se mantuvieron por 48 h a 50°C en solución de hibridación (formamida 50 %, SSC 5×, SDS 0.2%, solución Denhardt 4× y DNA esperma de salmón 100 µg/ml). Luego, las membranas se lavaron con SSC 0.1× y SDS 0.1% a 65°C y se escanearon con el equipo Fuji FLA-3000. La densitometría se llevó a cabo con el programa Multi-Gauge 3.0 (Fujifilm)⁸¹. Se usó la señal de α-tubulina (TUB) para normalizar.

4.13 Inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP) en *L. major*

Para estos experimentos 2×10^8 promastigotes en FML se lavaron con PBS-G frío dos veces y se fijaron con formaldehído al 1% por 5 min a 37°C. De este modo las interacciones entre moléculas se refuerzan, como por ejemplo las uniones de los FTs con diversas regiones de la cromatina. La reacción se detuvo con 110 µl de glicina 1.25 M a TA por 5 min. Después se utilizó el sonicador Vibra-Cell VCX130 (Sonics) 15 seg on/off, 40% de amplitud, de 5 a 8 min para lisar las células y liberar los núcleos. Para deshacernos del *debris* celular la muestra se colocó sobre un gradiente de sacarosa 0.34 M y se centrifugó a 16, 000 g. La elución se colectó y se resuspendió en buffer de sonicación (SDS 1%, EDTA 10 mM y Tris-HCl pH 8.1). En seguida la muestra se sometió a una segunda sonicación con el equipo Bioruptor Standard sonication (Diagenode) por 30 ciclos de 10 segundos con 30 s on y 30 off, en nivel alto, a 4°C. Esto con la finalidad de fragmentar la cromatina en tamaños de entre 150 y 400 pb. Al concluir con los ciclos, la muestra se centrifugó a 16,000 g por 10 min a 4°C y se re suspendió con buffer de dilución de la cromatina (SDS 0.01%, Tritón X-100 1%, EDTA 1.2 mM, Tris 16.7 mM pH 8, NaCl 167 mM, inhibidores de proteasa).

A continuación se agregaron las perlas de agarosa de proteína A/C (Santa Cruz Biotechnology) y se dejó incubar en rotación constante por 1 h a 4°C. Al concluir el tiempo, se centrifugó a 6,000 g por 1 min a 4°C y se recuperó el

sobrenadante el cual se incubó con 2.5 µl del anticuerpo anti-Prot A de conejo (Sigma) por 20 h en rotación a 4°C. Después se le adicionó nuevamente las perlas de proteína A/G y 2 µl de DNA esperma de salmón sonicado (Invitrogen) y se incubaron a 4°C durante 2 h. Los complejos formados por perlas-anticuerpo-DNA se lavaron por 5 minutos en rotación, con los siguientes buffers: Buffer *Low salt immune complex wash* (SDS 0.1%, tritón X-100 1%, EDTA 2 mM pH 8.0, Tris 20 mM pH 8.0, NaCl 150 mM); Buffer *High salt immune complex wash* (SDS 0.1%, Tritón X-100 1%, EDTA 2 mM pH 8.0, Tris 20 mM pH 8.0, NaCl 500 mM); Buffer *LiCl immune complex wash* (LiCl 0.25 M, NP-40 1%, Deoxicolato 1%, EDTA 1 mM pH 8.0, Tris-HCl 10 mM pH 8.0). Finalmente se lavó dos veces con buffer TE (Tris 10 mM pH 8.0, EDTA 1 mM pH 8.0). Entre lavados se centrifugó a 6,000 g a 4°C por un minuto. Para eluir los complejos se adicionaron 100 µl de buffer de elución (SDS 1%, NaHCO₃ 100 mM) y se incubaron a TA por 15 minutos. Posteriormente, se centrifugaron a 6,000 g por un minuto y se recuperó el sobrenadante. Para revertir el *cross-linking* por el formaldehído, la muestra se incubó a 65°C por 20 h con 8 µl de NaCl 5M. Concluido el tiempo se incubó con 1U de RNAsa A (Invitrogen) a 37°C por una hora. Luego se adicionaron 4 µl de proteinasa K [10mg/ml] y se incubó a 45°C por una hora más. Se extrajo el DNA inmunoprecipitado con fenol-cloroformo y se re suspendió en 20 µl de agua desionizada.

4.14 Análisis cuantitativo de PCR en tiempo real (qPCR)

El DNA inmunoprecipitado por LmBdp1-PTP se cuantificó y diluyó de tal manera de que quedara a una concentración de 5 ng/µl. Para el ensayo de qPCR se preparó la reacción de la siguiente manera: 5 ng del DNA inmunoprecipitado, 0.3 µl de cada oligonucleótido sentido y anti sentido [10 µM], 7.5 µl de la solución qPCR Super-Mix-UDG (Invitrogen) del kit Platinum SYBR Green y agua desionizada estéril para tener un volumen final de 15 µl. Es importante preparar las reacciones bajo la menor cantidad de luz posible. Los parámetros establecidos para el termociclador Corbett Research Rotor Gene 3000 fueron los siguientes: Un único ciclo de 50°C

por 2 min y luego un único ciclo de 95°C por 2 min. Luego, 40 ciclos de: 95°C por 15 seg, 55°C por 30 seg y 72°C por 30 seg. La especificidad de la amplificación se analizó con las curvas de desnaturalización, y el método estadístico utilizado fue $2^{-\Delta\Delta Cq}$ para obtener la relación de los niveles de enriquecimiento entre las muestras inmunoprecipitadas.

5. RESULTADOS

5.1 Análisis *in silico* de LmBdp1

El análisis bioinformático reveló que Bdp1 es una proteína con una alta divergencia a lo largo de la evolución en el linaje eucarionte. Dicha divergencia refleja importantes variaciones en el tamaño de la proteína de los ortólogos, y por ende en los pesos moleculares, siendo *T. brucei* la especie aquí analizada con el ortólogo más pequeño (de 34 kDa), y *H. sapiens* con el ortólogo más grande (de 294.88 kDa) (Tabla III). Esta divergencia se observa incluso entre organismos cercanamente relacionados, como *L. major* y *T. cruzi*, que son especies de la misma familia y tienen sólo un 35% de identidad (Tabla IV). Entre *L. major* y *H. sapiens* se presenta un 19% de identidad (Tabla IV).

Tabla III: Peso molecular de diferentes ortólogos de Bdp1.

<u>Especie</u>	<u>Nombre oficial</u>	<u>Tamaño de la proteína (aa)</u>	<u>Peso molecular (kDa)</u>
<i>T. brucei</i>	Tb927.10.7840	298 aa	34
<i>T. cruzi</i>	TcCLB.506247	315 aa	35.58
<i>L. major</i>	LmjF36.6530	397 aa	44
<i>S. cerevisiae</i>	NP_014359	594 aa	66
<i>A. thaliana</i>	AT4G39160	624 aa	69.95
<i>D. melanogaster</i>	CG9305 (IsoF A)	695 aa	78.25
<i>M. musculus</i>	Q571C7 (IsoF 1)	2467 aa	270.79
<i>H. sapiens</i>	A6H8Y1.3 (IsoF 1)	2624 aa	293.88

La degradación del color rosado hace referencia a los distintos pesos entre ortólogos.

Tabla IV: Porcentajes de identidad en la secuencia de aminoácidos entre ortólogos de Bdp1.

	<i>Lm</i>	<i>Tb</i>	<i>Tc</i>	<i>Sc</i>	<i>At</i>	<i>Dm</i>	<i>Mm</i>	<i>Hs</i>
<i>Lm</i>	100	28.57	35.35	22.80	21.09	19.88	20.46	19.74
<i>Tb</i>		100	44.29	23.14	20.33	19.84	16.89	16.81
<i>Tc</i>			100	22.75	23.58	20.53	16.10	16.46
<i>Sc</i>				100	25.11	18.72	24.60	24.72
<i>At</i>					100	15.99	21.13	21.67
<i>Dm</i>						100	21.72	20.59
<i>Mm</i>							100	56.85

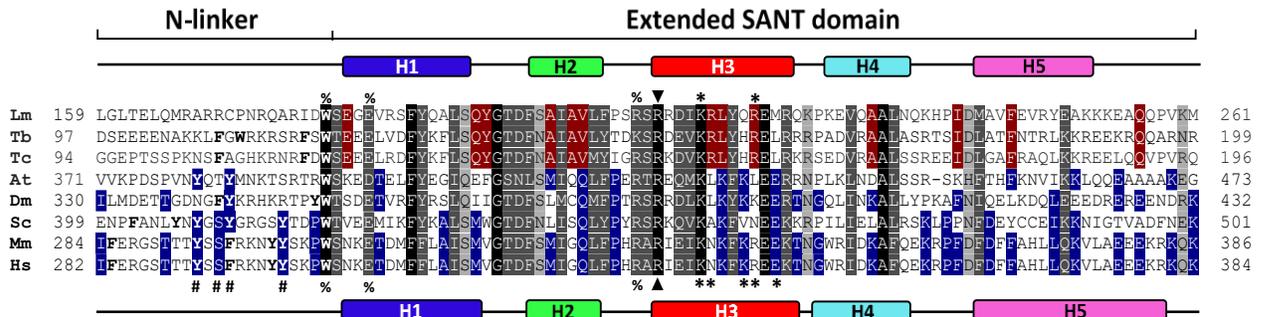
Se resalta en rojo el porcentaje de identidad más alto y más bajo con relación al ortólogo de *L. major*. Se resalta con negritas y subrayado el porcentaje de identidad más alto y más bajo de toda la tabla. *L. major* (Lm), *T. brucei* (Tb), *T. cruzi* (Tc), *S. cerevisiae* (Sc), *A. thaliana* (At), *D. melanogaster* (Dm), *M. musculus* (Mm) y *H. sapiens* (Hs).

Para determinar la presencia de regiones conservadas en la proteína Bdp1 de *L. major* (LmBdp1), se realizaron alineamientos con las secuencias de aminoácidos de los ortólogos de Bdp1 de *S. cerevisiae* (Sc), *S. pombe* (Sp), *A. thaliana* (At), *D. melanogaster* (Dm), *M. musculus* (Mm) y *H. sapiens* (Hs). De igual manera se analizaron los ortólogos de otras especies del género *Leishmania* y *Trypanosoma*. Lo primero que se delimitó fue el dominio SANT, el cual recientemente ha sido caracterizado en humano y levadura mediante la obtención de estructuras en 3D a partir de la generación de cristales (Gouge *et al*, 2017; Vorlander *et al*, 2018). Como resultado, se reconoció un dominio SANT específico de Bdp1, conocido como “Dominio SANT extendido”, el cual se conforma de cinco alfa hélices, y no de tres como antes se pensaba (Fig. 25).

El dominio SANT extendido mostró porcentajes de identidad mayores a los obtenidos con la proteína completa, que van desde el 20% (como ocurre entre *T. brucei* y *H. sapiens*), hasta incluso el 100% (como lo visto entre *H. sapiens* y *M.*

musculus). El dominio SANT extendido de *L. major* mostró un porcentaje de identidad del 41% con *T. cruzi* y del 39% con *T. brucei* (Tabla V).

A



B

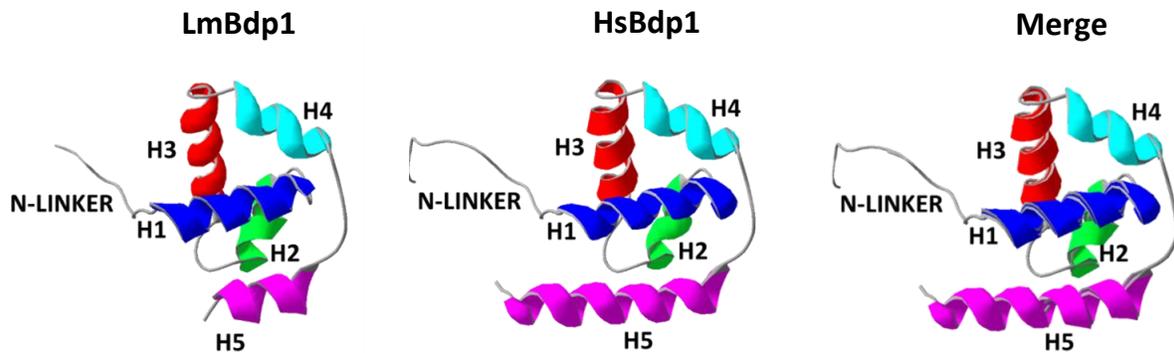


Figura 25: Análisis de la secuencia y estructura del dominio SANT extendido y del N-linker.

(A) Alineamiento múltiple de secuencia de aminoácidos del N-linker y el dominio SANT extendido de diferentes especies de eucariontes: *L. major* (Lm), *T. brucei* (Tb), *T. cruzi* (Tc), *A. thaliana* (At), *D. melanogaster* (Dm), *S. cerevisiae*, (Sc), *M. musculus* (Mm) y *H. sapiens* (Hs). Los residuos idénticos están sombreados en negro con letras blancas, la sustitución conservada en gris oscuro con letras blancas y la semiconservada en gris claro con letras negras. Los residuos aromáticos en el N-linker se resaltan en negritas. Por debajo de la secuencia de Hs, el símbolo # representa los residuos que interactúan con el surco menor DNA, el símbolo % representa los aminoácidos que participan en acomodo de dominio SANT extendido por interacciones con el N-linker, y el triángulo (▲) se refiere al aminoácido R334 que está altamente conservado en eucariontes y que forma un puente de sal con E191 de TBP y con el DNA. Los asteriscos (*) representan los aminoácidos que interactúan con el surco mayor del DNA. Las alfa hélices se representan con rectángulos (H1 al H5), mostrando las estructuras de LmBdp1 arriba del alineamiento y las de HsBdp1 abajo del alineamiento. (B) Con

base en la estructura obtenida de HsBdp1 (5n9g) se obtuvo una predicción del N-linker y del dominio SANT extendido de LmBdp1.

Tabla V: Porcentajes de identidad del dominio SANT extendido y el N-linker de diferentes ortólogos de Bdp1.

	Lm	Tb	Tc	Sc	At	Dm	Mm	Hs
Lm	100	39.42	41.35	23.08	22.33	25.00	25.96	25.96
Tb		100	61.54	28.85	24.27	23.08	<u>20.19</u>	<u>20.19</u>
Tc			100	28.85	23.30	24.04	22.12	22.12
Sc				100	29.13	29.81	32.69	32.69
At					100	25.24	29.13	29.13
Dm						100	30.77	30.77

Se resalta en rojo el porcentaje de identidad más alto y el más bajo con relación al ortólogo de *L. major*. Se resalta con negritas y subrayado los porcentajes de identidad más alto y más bajo de toda la tabla. *L. major* (Lm), *T. brucei* (Tb), *T. cruzi* (Tc), *S. cerevisiae* (Sc), *A. thaliana* (At), *D. melanogaster* (Dm), *M. musculus* (Mm) y *H. sapiens* (Hs).

Si bien el dominio SANT extendido es la región más conservada de Bdp1, también se han identificado otras regiones importantes como el N-linker que consta de ~22 aa y que se caracteriza por ser una región rica en residuos aromáticos, como lo observado en *H. sapiens* que tiene cinco (Y291, F294, Y298, Y299 y W303), y *S. cerevisiae* que tiene seis (F402, Y406, Y408, Y411, Y416 y W420) (Fig. 25).

De manera interesante, en el N-linker de *L. major* no se observa más que un único residuo aromático (W180) que se conserva en todos los eucariontes aquí analizados (Fig. 25). *T. brucei* y *T. cruzi* poseen cuatro (F108, W110, F116 y W118) y tres residuos aromáticos (F105, F113 y W115), respectivamente. Para determinar si la ausencia de residuos aromáticos es una característica del género *Leishmania*, se hizo un alineamiento con nueve especies diferentes de *Leishmania*. Como se

observa en la Figura 26, la mayoría de las especies analizadas contienen sólo un aminoácido aromático, presentándose un segundo residuo aromático (F) en sólo tres especies (*L. tropica*, *L. tarentolae* y *L. mexicana*). Además se observa una muy elevada conservación de secuencia en el dominio SANT extendido, y una menor conservación en el N-linker.

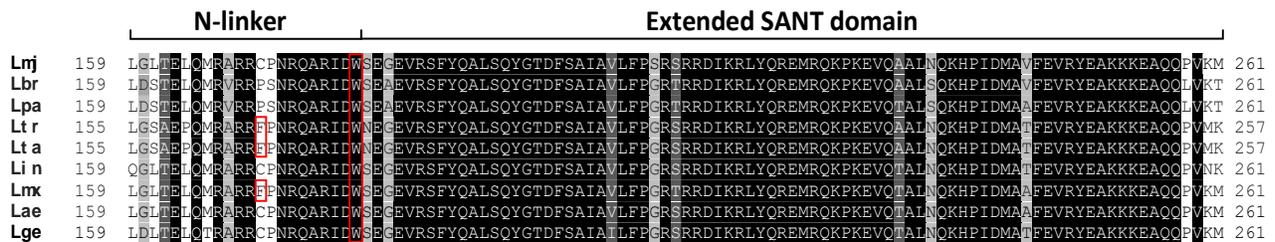


Figura 26: Alineamiento del N-linker y del dominio SANT extendido en el género *Leishmania*. Alineamiento de la secuencia de aminoácidos de nueve especies diferentes de *Leishmania*: *L. major* (Lmj), *L. braziliensis* (Lbr), *L. panamensis* (Lpa), *Leishmania tropica* (Ltr), *L. tarentolae* (Lta), *L. infantum* (Lin), *L. mexicana* (Lmx), *L. aeothiopica* (Lae) y *L. gerbilli* (Lge). Los residuos idénticos están sombreados en negro con letras blancas, la sustitución conservada en gris oscuro con letras blancas y la semiconservada en gris claro con letras negras. Los residuos aromáticos en el N-linker se resaltan con un recuadro rojo.

Estudios recientes en *S. cerevisiae* revelaron además otras dos regiones importantes en Bdp1: una ubicada antes del N-linker conocida como *tether* (de ~39 aa) que tiene como particularidad la formación de cuatro betas plegadas; y una sexta alfa hélice larga llamada *long arm*, ubicada después del dominio SANT extendido (Fig. 27). La región *tether* se conserva entre eucariontes superiores y levadura, mostrando algunas diferencias como la presencia de una alfa hélice en *S. cerevisiae* y *D. melanogaster*. En *A. thaliana* no hubo predicción de estructuras secundarias en dicha región. Para el caso de *L. major*, *T. brucei* y *T. cruzi*, no se encontraron betas plegadas en la región *tether*, pero sí una alfa hélice pequeña (Fig. 27). La sexta alfa hélice (*long arm*), que interactúa con Brf1 y C34 en levadura, sí

está presente tanto en *Leishmania* como en *Trypanosoma*, aunque no se predice en *H. sapiens* (Fig. 27).

Para poder visualizar las regiones conservadas de LmBdp1 se hizo un modelaje en 3D utilizando los programas Swiss-model y PyMol, empleando como templado los cristales de humano (5n9g) y de levadura (6f41). Las estructuras predichas mostraron claramente que las cinco alfa hélices del dominio SANT extendido de LmBdp1 se pliegan de manera muy similar a las del dominio SANT extendido de Bdp1 de humano (Fig. 25B) y de levadura (Fig. 28).

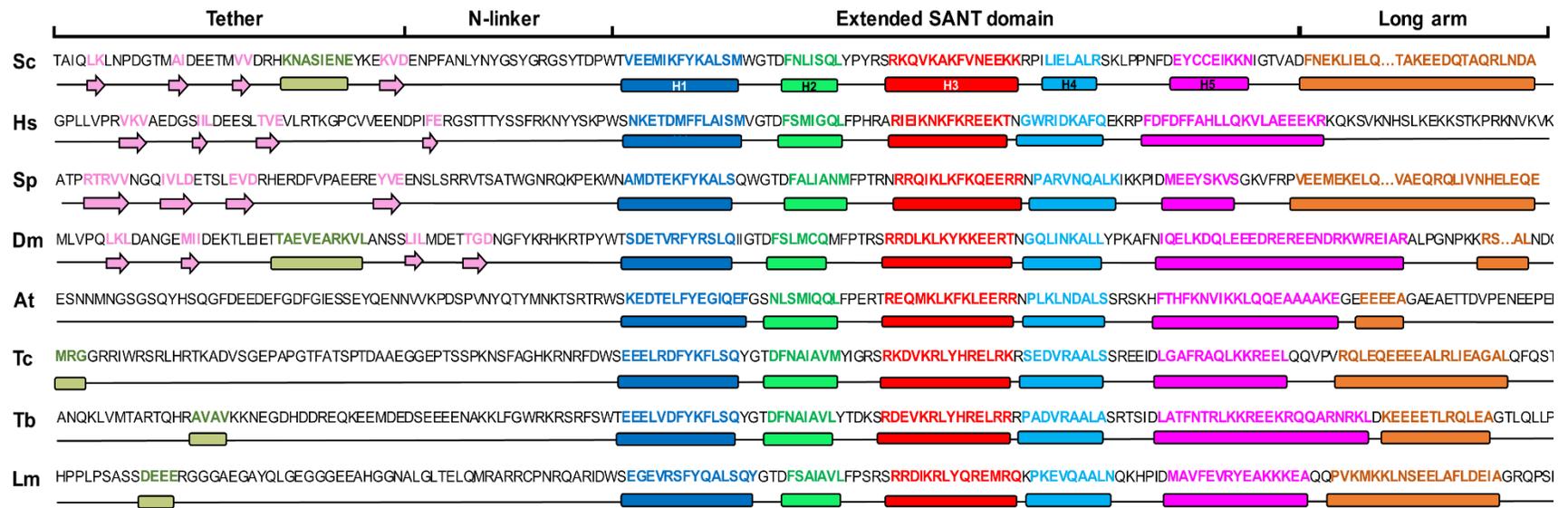


Figura 27: Análisis de la secuencia y estructura secundaria de las regiones conservadas en Bdp1. Se muestran las secuencias del *tether*, N-linker, el dominio SANT extendido y la hélice *long arm* de *S. cerevisiae* (Sc), *H. sapiens* (Hs), *S. pombe* (Sp), *D. melanogaster* (Dm), *A. thaliana* (At), *T. cruzi* (Tc), *T. brucei* (Tb) y *L. major* (Lm). Las predicciones de las estructuras secundarias se muestran por debajo de las secuencias. Las betas plegadas se representan con flechas rosas, mientras que las alfas hélices con rectángulos de diferentes colores. Las cinco alfas hélices está marcadas como H1, H2, H3 H4 y H5.

De igual manera, el *long arm* de LmBdp1 muestra una arquitectura similar a la región homóloga en levadura (Fig. 28).

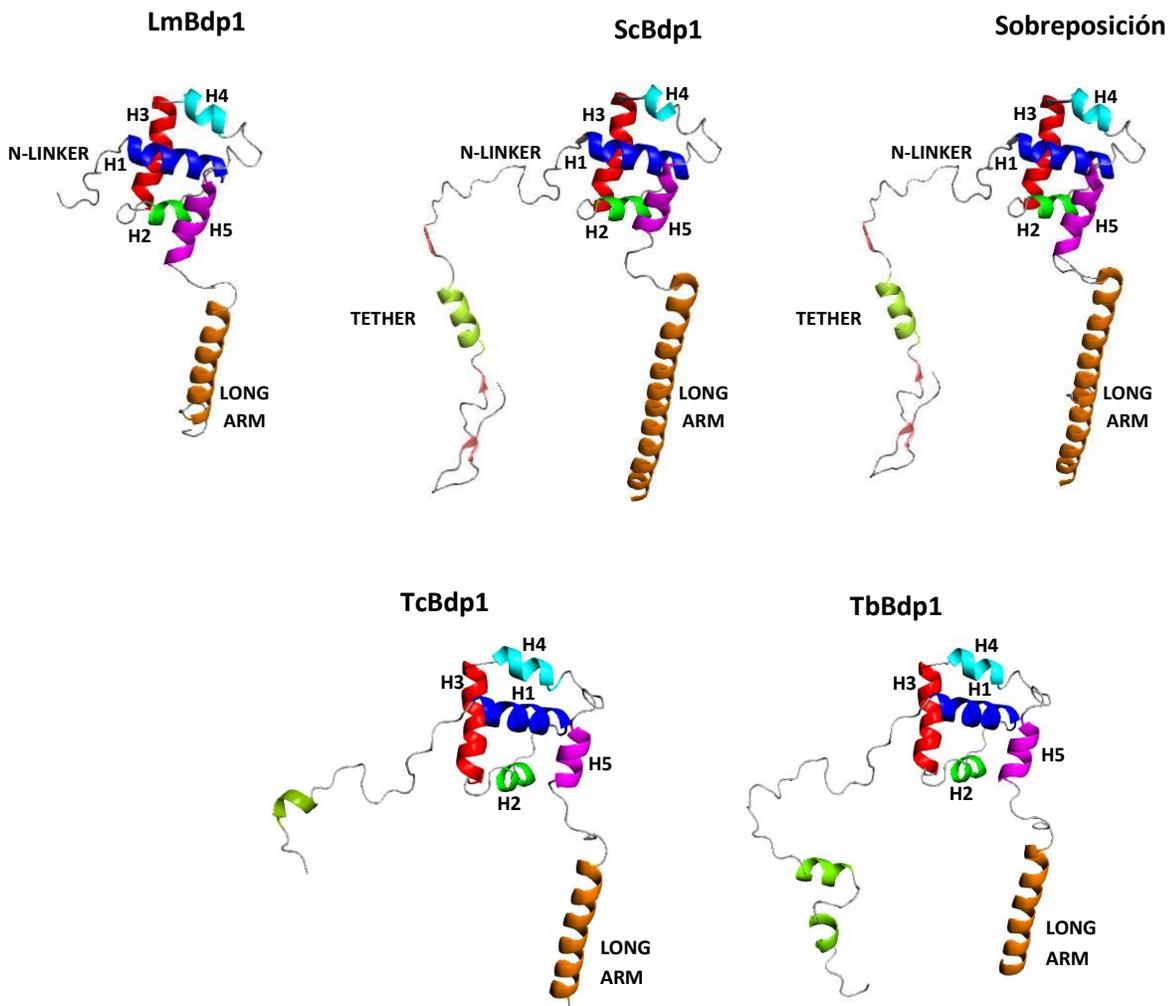


Figura 28: Estructuras en 3D del *tether*, N-linker, dominio SANT extendido y *long arm*. Con base en la estructura obtenida de ScBdp1 (6f41) se obtuvieron predicciones de la estructura en 3D de algunas regiones de Bdp1 en *L. major* (LmBdp1), *T. cruzi* (TcBdp1) y *T. brucei* (TbBdp1). Las alfas hélices del dominio SANT extendido se etiquetan como H1-H5. Además se señalan el N-linker y el *long arm*. Se muestra también la sobreposición entre las estructuras de LmBdp1 y ScBdp1.

En el *tether* de *T. cruzi* y *T. brucei* se predice, con el programa Swiss-model, una y dos alfas hélices pequeñas, respectivamente, que podrían relacionarse con la alfa hélice presente en Bdp1 de levadura (Figs. 27 y 28). Dentro del dominio SANT extendido, la alfa hélice tres (H3) es la que muestra mayor conservación en todas las especies (Fig. 25), y en humano contiene residuos significativamente importantes para la unión con el DNA y con las otras subunidades de TFIIIB. Tal es el caso de R334, un aminoácido que forma un puente de sal con el aminoácido E191 de TBP y que al mismo tiempo interactúa con la hebra templado del DNA (Gouge *et al*, 2017). R334 está altamente conservado en eucariontes, incluso en *L. major* (R211), al igual que E307 (E184 en *L. major*), el cual participa esencialmente en la orientación del dominio SANT extendido junto con R332 (R209), S300 y E336 (Fig. 25). La quinta alfa hélice del dominio SANT extendido es la que muestra mayor divergencia entre ortólogos.

5.2 Identificación de posibles sitios de fosforilación en LmBdp1

Tanto en levadura como en humano, Bdp1 se reporta como una proteína que es fosforilada a diferentes niveles por diversas cinasas como CK2 (Hu *et al*, 2004). Para determinar los sitios probables de fosforilación en LmBdp1 hicimos uso del programa PhosTryp, el cual nos mostró al menos diez sitios con potencial de ser fosforilados, de los cuales la treonina 308 (T308) y la serina 129 (S129) tienen el *score* más alto con 0.933 y 0.905 respectivamente, como se muestra en la tabla VI.

Tabla VI: Predicción de residuos fosforilables en LmBdp1 con base en el programa PhosTryp.

Secuencia	Posición	Score
GVEEATAAPPS	308	0.933
PLPSASSDEEE	129 ★	0.905
THQADSEDGPE	327	0.841
LPSASSDEEER	130 ★	0.830
HPPLPSASSDE	127 ★	0.791
PRPSASVAPLP	97	0.765
AGRQPS ^S ESAMH	281	0.752
RLHQQS ^S PTHSP	111	0.723
PVPAATLGGVE	300	0.651
KRPRGTHQADS	322	0.646

En cada secuencia, se señala en rojo el residuo con potencial a ser fosforilado. Los residuos con mayor score son la T308 y la S129. Tres residuos fosforilables que se localizan muy cerca uno del otro se señalan con estrellas.

Tres de los sitios con un score más alto se ubican muy cerca uno del otro, abarcando la secuencia **SASS** (resaltada con estrellas en la Fig. 29), la cual se ubica en la región del *tether* (mostrada en color naranja en la Fig. 29) cerca de una alfa hélice predicha por el programa PSIPRED (Fig. 27). Esto nos indica que dicha región SASS tiene una muy alta probabilidad de ser fosforilada.

```

1   MDDNEFEFFPPDQLDDVVANRLSPYQTVMPSPRLRTPFAYPAANLPLSMLAQ 50
51  IPLEHLPPPTQKPNQNFSIGQVLRGALSTSHMRAPPGGSRMPRPSASVAP 100
101 LPHSQRLHQQSPTHSPYLSAGHPPLPSASSDEEERGGGAEGAYQLGEGGG 150
151 EEAHGGNALGLTELQMRARRCPNRQARIDWSEGEVRSFYQALSQYGTDFS 200
201 AIAVLFPSRSRRDIKRLYQREMRQKPKQEVQAALNQKHPIDMAVFEVRYEA 250
251 KKKEAQQPVKMKKLNSEELAFLDEIAGRQPSSESAMHMKGEELEVPVPAAT 300
301 LGGVEEATAPPSRLRKRPRGTHQADSEDGPESKRATKEIPPAADDDDFDM 350
351 EQESFFDMVVRHEREDNAPLDMLFAAQLEQQQQHLLAALEDSDFSFE 397

```

Figura 29: Predicción de residuos fosforilables en LmBdp1 con Phos Tryp. En la secuencia se resalta la región *tether* en naranja, el N-linker en azul con letras blancas, el dominio SANT extendido en amarillo y la alfa hélice *long arm* en verde. Con letras rojas se resaltan los 10 residuos con mayor

score según la herramienta Phos Tryp. Los dos residuos con mayor score (T308 y S129) se recuadran. La secuencia SASS se resalta con estrellas.

5.3 Localización celular de LmBdp1 en *L. major*

Bdp1 es un componente del factor TFIIIB que participa en la transcripción de la RNA Pol III, por lo que se localiza predominantemente en el núcleo. Para determinar la distribución de LmBdp1 en promastigotes de *L. major*, se desarrollaron experimentos de inmunofluorescencia indirecta (IF). Para estos experimentos se generó el vector pLmBdp1-PTP, en el que el gen de LmBdp1 se fusionó a la bandera PTP. Para ello se amplificó el gen LmBdp1 sin el codón de paro y se clonó en el vector PTP previamente digerido con las enzimas *Xma*I y *Xba*I. Se transformaron células competentes con el producto de ligación y se extrajo el DNA plasmídico, el cual se analizó por restricción con *Xba*I y *Xma*I, observándose las bandas esperadas de 1.2 kb (gen LmBdp1) y 6.6 kb (vector PTP) (Fig. 30). El vector fue enviado a secuenciar, confirmándose su integridad.

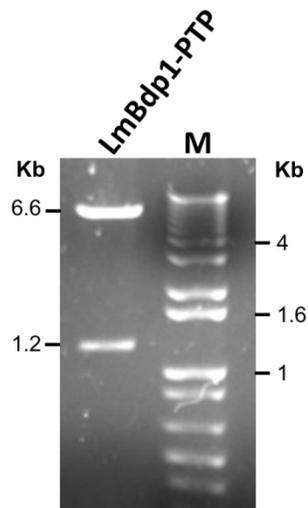


Figura 30: Análisis de restricción del vector LmBdp1-PTP. Se clonó el gen LmBdp1 sin el codón de paro en el vector PTP. Se transformaron células competentes y se extrajo DNA plasmídico que

se analizó por restricción enzimática con *Xba*I y *Xma*I. El vector LmBdp1 tiene un tamaño de 7.8 Kb. El marcador de peso molecular corresponde a la escalera de 1 Kb (Invitrogen).

El vector de expresión pLmBdp1-PTP se transfirió en *L. major* WT para crear una línea celular que expresara constitutivamente la proteína LmBdp1 fusionada a la bandera PTP, la cual se constituye de un epítipo de la proteína A, un sitio de corte de la proteasa TEV y un epítipo de la proteína C (Fig. 31). El vector de expresión contiene también un gen de resistencia al antibiótico G418.

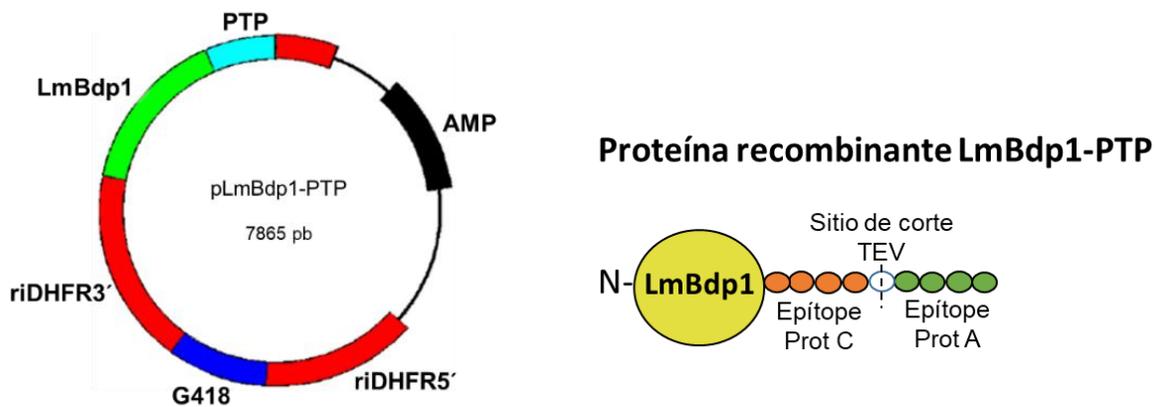


Figura 31: Vector pLmBdp1-PTP. El vector de expresión se conforma del gen LmBdp1 sin el codón de paro fusionado a bandera PTP, para generar a la proteína recombinante LmBdp1-PTP. La bandera PTP consiste en un epítipo de la proteína C, un sitio de corte de la proteasa TEV y un epítipo de la proteína A. Secuencias intergénicas del locus de DHFR proporcionan los sitios de procesamiento de los transcritos.

La expresión de la proteína recombinante LmBdp1-PTP se confirmó mediante *Western-blot* utilizando el anticuerpo anti-Prot C (Fig. 32A). A continuación, se realizaron los ensayos de IF con el mismo anticuerpo, obteniendo

como resultado que efectivamente LmBdp1 se localiza en el núcleo de la célula (Fig. 32B).

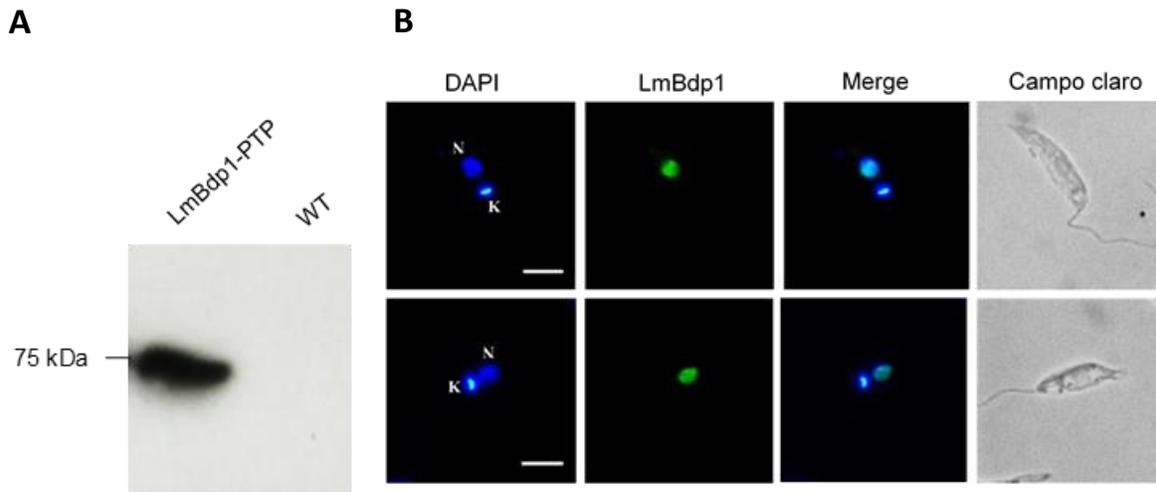


Figura 32: Localización celular de LmBdp1. Análisis *Western blot* de proteína total de la línea celular LmBdp1-PTP(A). Se usó el anticuerpo monoclonal anti-Prot C. Células WT también se analizaron con el mismo anticuerpo para fungir como control negativo. La localización de LmBdp1 unido a PTP se determinó por IF indirecta utilizando el anticuerpo anti-Prot C y posteriormente el anticuerpo secundario conjugado con Alexa-Fluor 488 (B). El núcleo (N) y el cinetoplasto (K) se tiñeron con DAPI. La barra representa 5 μ M.

5.4 Efecto del *knock-out* de LmBdp1 en *L. major*

Con el objetivo de analizar los efectos de la eliminación de LmBdp1 en el crecimiento celular y en los niveles de transcripción en promastigotes de *L. major*, se intentó generar una mutante *knock-out* de LmBdp1 a través del reemplazo de sus dos alelos por genes de resistencia a antibióticos (pac e hyg) mediante recombinación homóloga. *L. major* se describe como un organismo predominantemente diploide que llega a presentar aneuploidias bajo condiciones de estrés. Sin embargo, el cromosoma 36 donde se localiza la única copia del gen

LmBdp1, se reporta con un alto nivel de estabilidad en su número de copias (dos) en diversos estudios enfocados al análisis de dichas aneuploidias. Por lo tanto, se generaron dos vectores para reemplazar a los dos alelos de LmBdp1 de manera secuencial: pΔBdp1-pac para el *knock-out* sencillo (KOS) y pΔBdp1-hyg para el *knock-out* doble (KOD) (Fig. 35).

Obtención de los vectores pΔBdp1-pac y pΔBdp1-hyg

Para la construcción del vector pΔBdp1-pac se diseñaron oligonucleótidos que amplifican fragmentos de aproximadamente 500 pb de regiones localizadas río arriba y río abajo del gen LmBdp1. A estos fragmentos se les llamó fUTR5' y fUTR3' debido a que forman parte de las UTRs del gen de interés. A los oligonucleótidos se les adicionaron los sitios de restricción *Xba*I y *Eco*RI para la región fUTR5', y los sitios *Sac*I y *Xho*I para la región fUTR3'. Para la construcción pΔBdp1-hyg, se usó la misma región fUTR3' que para el vector con puromicina; sin embargo, fUTR5' fue amplificada con oligonucleótidos que contenían los sitios de restricción *Xba*I y *Spe*I para generar un fragmento idéntico al del vector con puromicina, pero con un sitio de *Spe*I en su extremo 3'. Esto es porque los genes de resistencia (pac e hyg) difieren en los sitios de restricción de sus extremos 5' (*Eco*RI para pac y *Spe*I para hyg), mientras que el sitio de restricción en el extremo 3' es el mismo (*Sac*I) en los dos genes. Utilizando la técnica de PCR de punto final, se amplificaron los tres fragmentos requeridos: fUTR3'/*Sac*I-*Xho*I (550 pb, para los dos vectores), fUTR5'/*Xba*I-*Eco*RI (566 pb, para el vector con puromicina) y fUTR5'/*Xba*I-*Spe*I (566 pb, para el vector con higromicina). Estos fueron clonados de manera independiente en el vector pGEMT-Easy (Fig. 33A), y secuenciados para confirmar su identidad. Los vectores resultantes fueron digeridos con las enzimas correspondientes para purificar los tres fragmentos (Fig. 33B).

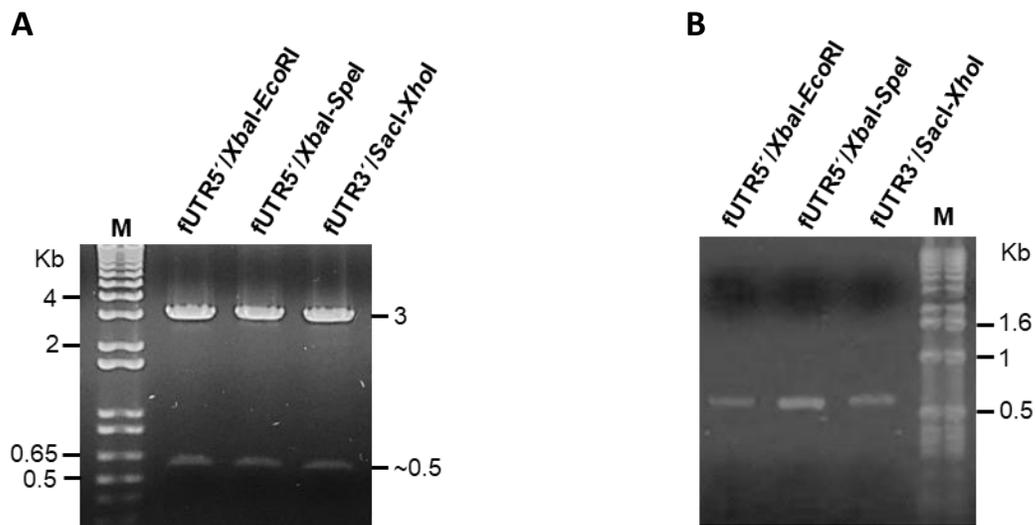


Figura 33: Clonación y purificación de las regiones fUTR5' y fUTR3 del gen LmBdp1 en el vector pGEMT Easy: (A) Los fragmentos UTR 5' y 3' (fUTR5' y fUTR3') de LmBdp1 (LmjF36.6530) se clonaron en el vector pGEMT Easy. Posteriormente los vectores se analizaron por restricción con las enzimas correspondientes a los extremos de los fragmentos amplificados. Los tres vectores liberaron el inserto esperado de aproximadamente 500 pb. (B) Los tres fragmentos fueron purificados y analizados en un gel de agarosa al 1%. El marcador de peso molecular (M) corresponde a la escalera de 1 Kb de Invitrogen.

Por otro lado, los genes de resistencia a puromicina e higromicina se obtuvieron de los vectores p Δ 75-pac y p Δ 75-hyg (Martínez-Calvillo *et al*, 2007) digiriendo con las enzimas *EcoRI* y *SacI*, y *SpeI* y *SacI*, respectivamente (Fig. 34A). Además, el vector pBluescript II SK fue digerido con las enzimas *XbaI* y *XhoI* y purificado (Fig. 34B).

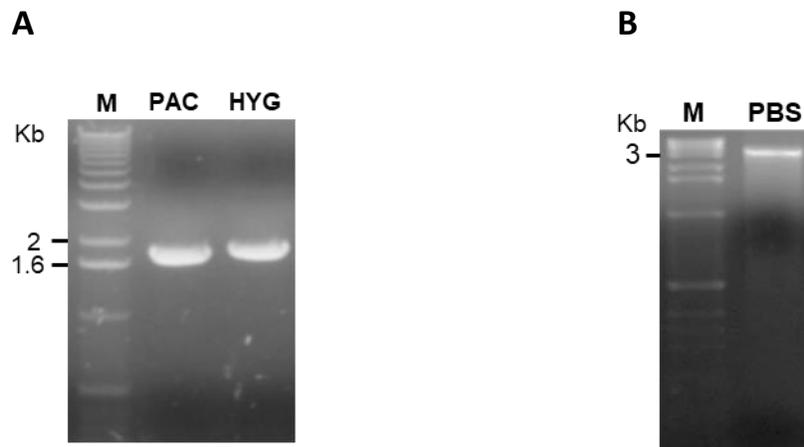


Figura 34: Obtención de los genes de puromicina (pac) e higromicina (hyg) y del vector pBluescript II SK. (A) Digestión y purificación de Insertos de pac (1.7 Kb) e hyg (1.8 Kb). (B) Purificación del vector pBluescript II SK digerido con las enzimas *Xba*I y *Xho*I. Geles de agarosa al 1%. El marcador de peso molecular corresponde a la escalera de 1 Kb (Invitrogen).

Una vez que se contó con todos los fragmentos requeridos para la construcción de los plásmidos p Δ Bdp1-pac y p Δ Bdp1-hyg, se procedió a realizar las ligaciones de los tres fragmentos y el vector en un solo paso. Para el vector p Δ Bdp1-pac, fueron ligadas al vector pBluescript II SK las regiones UTR 5´/*Xba*I-*Eco*RI, UTR 3´/*Sac*I-*Xho*I y el gen de resistencia a puromicina (Fig. 35A). Para el vector p Δ Bdp1-hyg, se ligaron en el vector pBluescript II SK las regiones UTR 5´/*Xba*I-*Spe*I, UTR 3´/*Sac*I-*Xho*I y gen de resistencia a higromicina (Fig. 35C). En dichos vectores, la digestión con las enzimas *Xba*I y *Xho*I liberaría los *cassettes* pac (Fig. 35B) e hyg (Fig. 35D). Considerando que el tamaño de los *cassettes* (~2.8 kb) es muy parecido al tamaño del vector (3 kb), para purificar los *cassettes* fue necesario incluir en las digestiones una tercera enzima que cortara el vector en dos fragmentos. Así, el plásmido p Δ Bdp1-pac fue cortado con *Xba*I, *Xho*I y *Scal*I (Fig. 36A) para poder purificar el *cassette* pac (Fig. 36B). Asimismo, el vector p Δ Bdp1-hyg fue digerido con *Xba*I, *Xho*I y *Xmn*I (Fig. 36C) para purificar el *cassette* hyg (Fig. 36D).

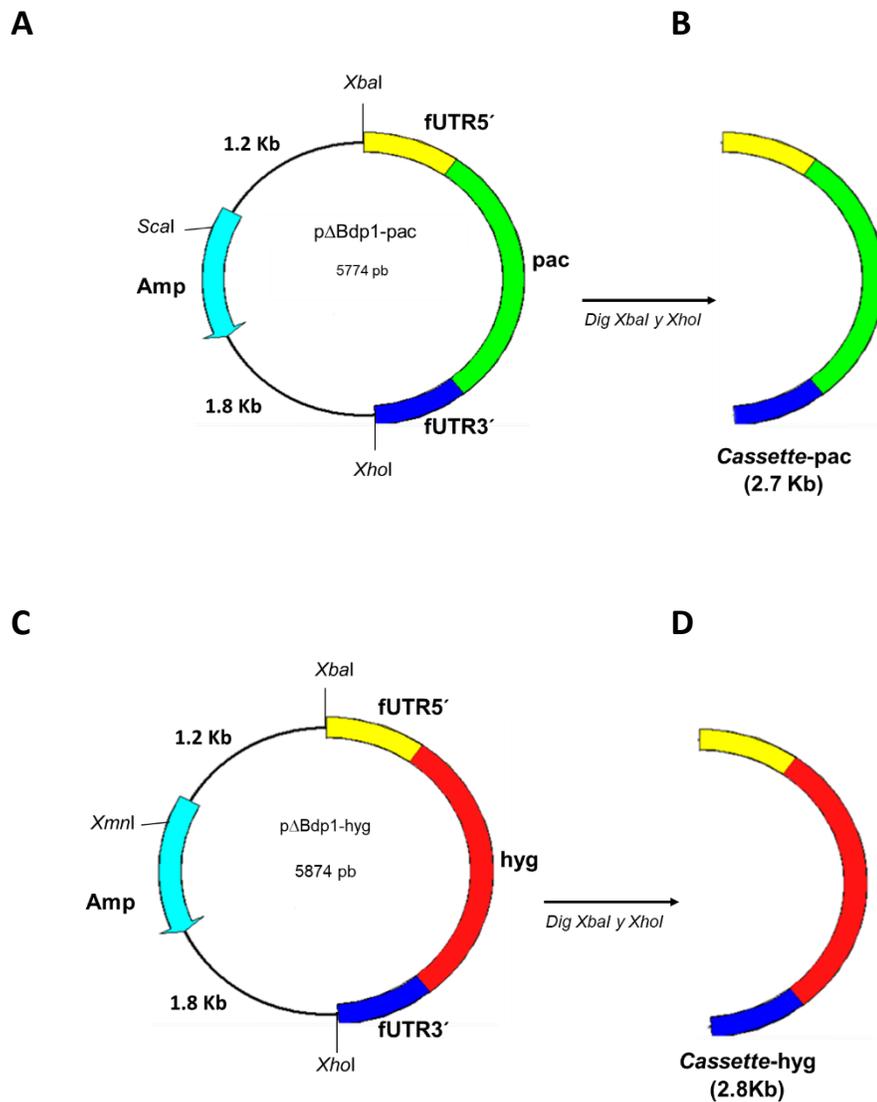


Figura 35: Mapa de restricción de los vectores pΔBdp1-pac y pΔBdp1-hyg. (A) Vector pΔBdp1-pac con sus sitios de corte *XbaI*, *XhoI* y *ScaI*. (B) *Casette-pac* proveniente de la digestión del vector pΔBdp1-pac con las enzimas *XbaI*, *XhoI* y *ScaI*. El sitio *ScaI* ayuda a digerir el cuerpo del vector ya que su tamaño es similar al del *casette* (~3 Kb). (C) Vector pΔBdp1-hyg con sus sitios de corte *XbaI*, *XhoI* y *XmnI*. (D) *Casette-hyg* proveniente de la digestión del vector pΔBdp1-hyg con las enzimas *XbaI*, *XhoI* y *XmnI*. El sitio *XmnI* ayuda a digerir el cuerpo del vector ya que su tamaño es similar al del *casette* (~3 Kb). Las regiones fUTR5' de LmjF36.6530 se muestran en color amarillo. Las regiones fUTR3' se muestran de color azul oscuro. El gen de resistencia a puromicina (*pac*) se muestra en color verde. El gen de resistencia a higromicina (*hyg*) se encuentra de color rojo. El gen de ampicilina está en color azul claro.

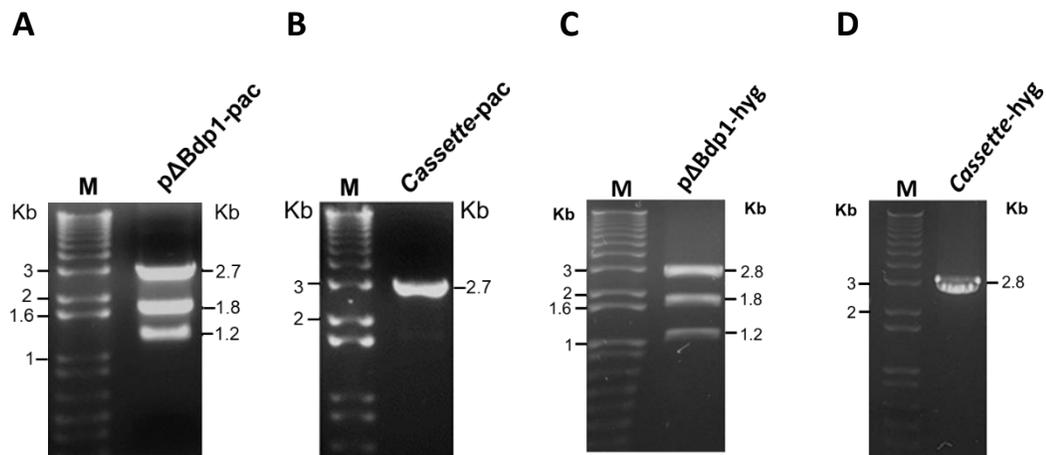


Figura 36: Purificación de los cassettes de pac e hyg. (A) Digestión de la construcción pΔBdp1-pac con las enzimas *XbaI*, *XhoI* y *ScaI* para liberar el inserto de interés de 2.7 Kb que corresponde al *cassette-pac*. (B) Purificación del *cassette-pac*. (C) Digestión de la construcción pΔBdp1-hyg con las enzimas *XbaI*, *XhoI* y *XmnI* para liberar el inserto de interés de 2.8 Kb que corresponde al *cassette-hyg*. (D) Purificación del *cassette-hyg*. Geles de agarosa al 1%. El marcador de peso molecular (M) corresponde a la escalera de 1 Kb (Invitrogen plus).

Los *cassettes* contienen los genes de resistencia de puomicina (*pac*) e higromicina (*hyg*) flanqueados por las regiones fUTR5' y fUTR3', las cuales promueven la recombinación homóloga que lleva al reemplazo de LmBdp1 por los genes *pac* e *hyg* (Fig. 37).

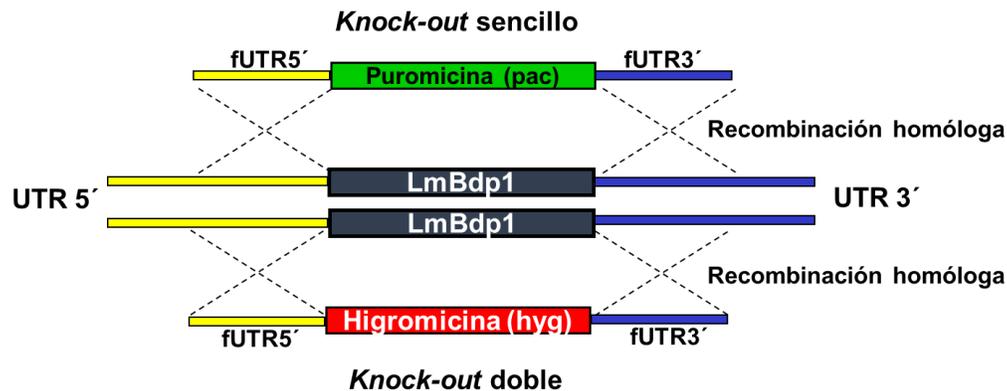


Figura 37: Representación esquemática del *knock-out* de LmBdp1. Se buscó el reemplazo por recombinação homóloga de ambos alelos de LmBdp1 en *L. major* (diploide) por los genes de resistencia a puromicina e higromicina para eliminar el gen y así determinar su relevancia en el crecimiento y la transcripción. Las regiones fUTR5 y fUTR3' de los *cassettes* recombinan con sus secuencias homólogas en el locus de LmBdp1 para favorecer el reemplazo génico.

Para obtener el cultivo *knock-out* sencillo (KOS), promastigotes de *L. major* fueron transfectados con el *cassette-pac*. Posterior a la transfección, las células se seleccionaron con puromicina y se realizó la clonación celular. Mediante PCR se demostró la presencia e integración del gen de pac en el locus de LmBdp1 (bandas de 585 y 900 pb en Fig. 38A). El correcto reemplazo de una copia de LmBdp1 por el gen de pac se confirmó mediante ensayos de *Southern-blot*, usando como sonda la región fUTR5' (Fig. 39). En las digestiones con *XhoI* y *SacI* se observaron las bandas del tamaño esperado de 6.2 y 2.5 kb, que corresponden al alelo en el que pac substituyó a LmBdp1, y de 2.6 y 1.7 kb que corresponden al gen intacto de LmBdp1 (Fig. 39). Una vez confirmada la eliminación de uno de los genes de LmBdp1 en el cultivo KOS, se procedió a tratar de obtener el cultivo *knock-out* doble. Para ello, el cultivo KOS fue transfectado con el *cassette-hyg* y seleccionado con puromicina e higromicina.

Posteriormente fueron obtenidas clonas celulares, las que al analizarse mediante PCR mostraron la correcta integración del gen de hyg (banda de 633 pb

en Fig. 38A). Sin embargo, de manera inesperada, estas clonas también mostraron la presencia del gen de LmBdp1 (Fig. 38B). Análisis de tipo *Southern-blot* con la enzima *Pst*I mostró una banda de 5.1 kb que corresponde al gen *pac*, una banda de 2.8 kb que corresponde a la sustitución del segundo alelo de LmBdp1 por el gen de *hyg*, y una tercera banda de 4.6 Kb que refleja la existencia de una tercera copia del gen LmBdp1.

Estos resultados indicaron que al tratar de eliminar el segundo gen de LmBdp1 se generó una copia adicional de este gen en el cultivo transfectado, por lo que fue nombrado cultivo *knock-out* doble +1 (KOD+1). Estos datos sugieren fuertemente que LmBdp1 es un gen esencial en promastigotes de *L. major*.

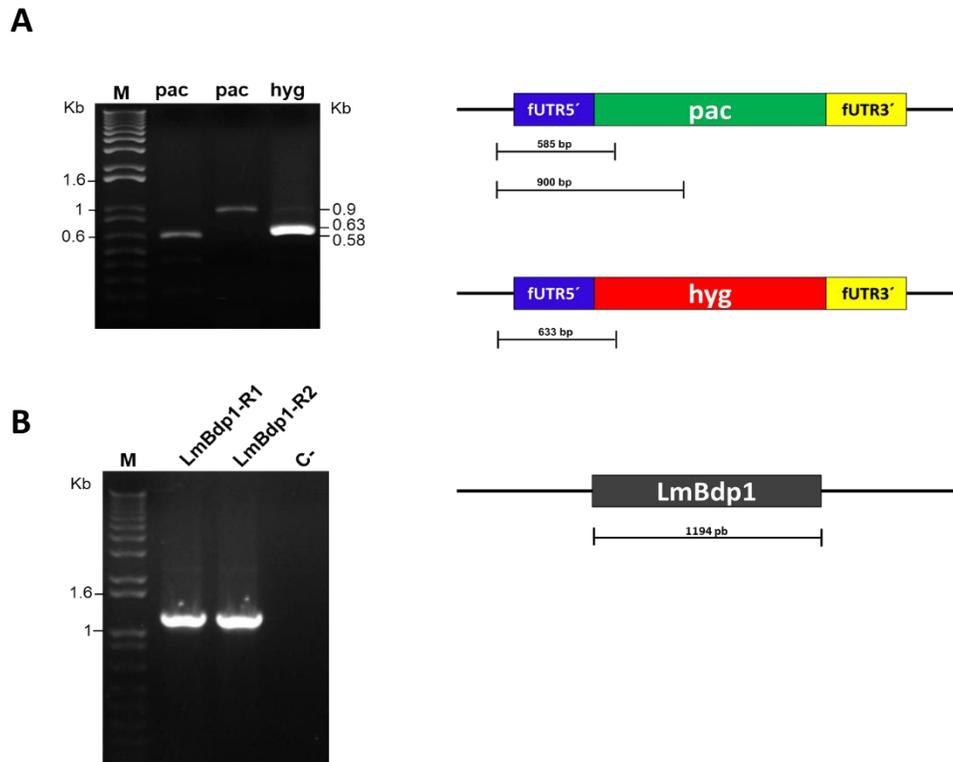


Figura 38: Análisis de PCR de las líneas KOS y KOD+1. (A) El DNA genómico extraído de la línea KOS se usó como templado para amplificar el gen de *pac* con dos juegos de oligonucleótidos (carriles *pac*). El DNA genómico extraído de la línea KOD+1 se usó para amplificar el gen de *hyg* (carril *hyg*). En ambos casos, los oligonucleótidos empleados reconocen la secuencia codificadora de los genes *pac* o *hyg*, y una región río arriba de los cassettes. Se lograron amplificar las bandas de interés,

corroborando que ambos alelos fueron reemplazados. (B) De igual manera se logró amplificar el gen LmBdp1 en la línea celular KOD+1. Se hicieron dos réplicas de amplificación (R1 y R2) del mismo DNA de KOD+1, y se puso un control negativo (C-) con agua. El marcador de peso molecular (M) corresponde a la escalera de 1 Kb (Invitrogen plus)

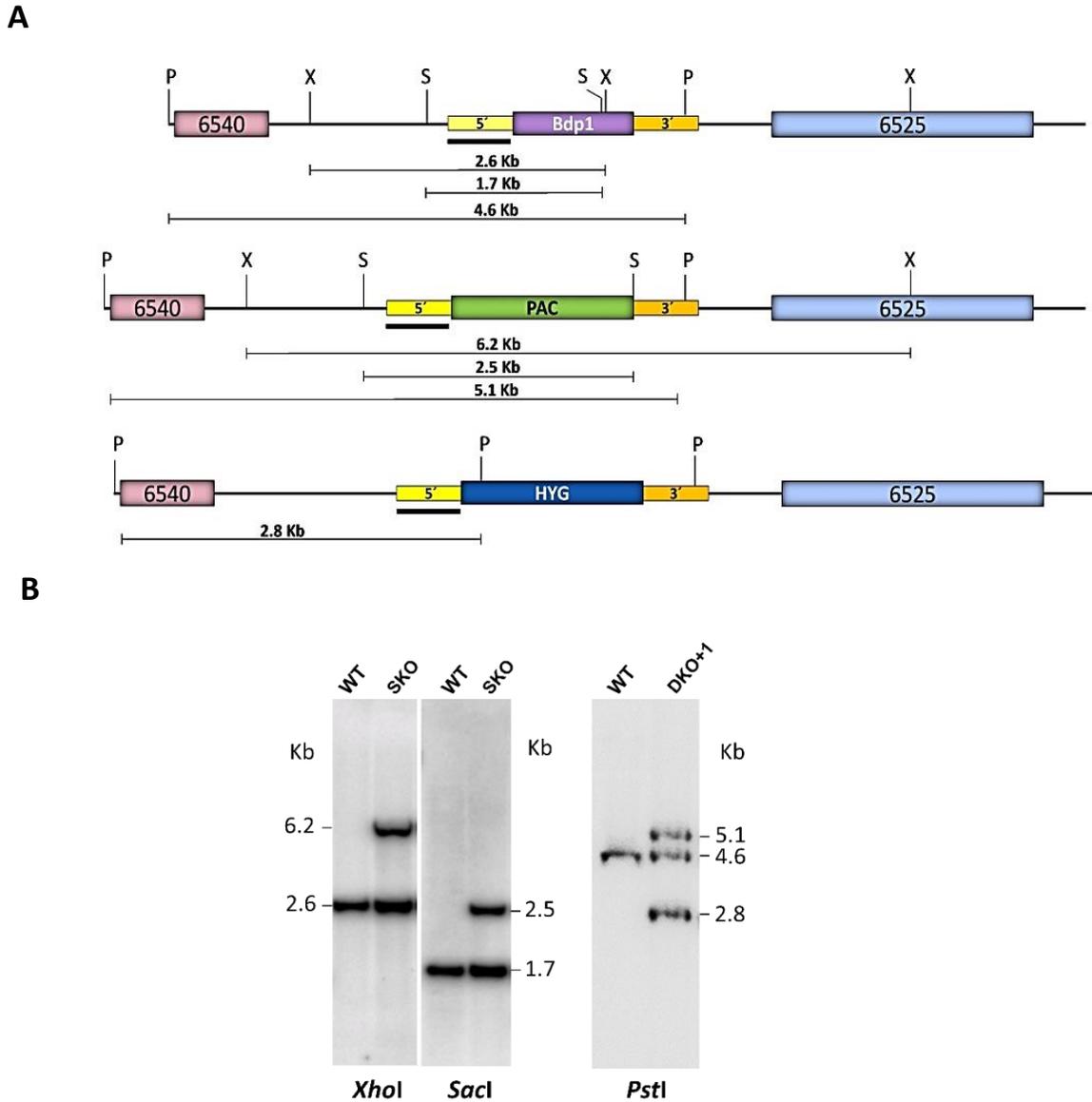
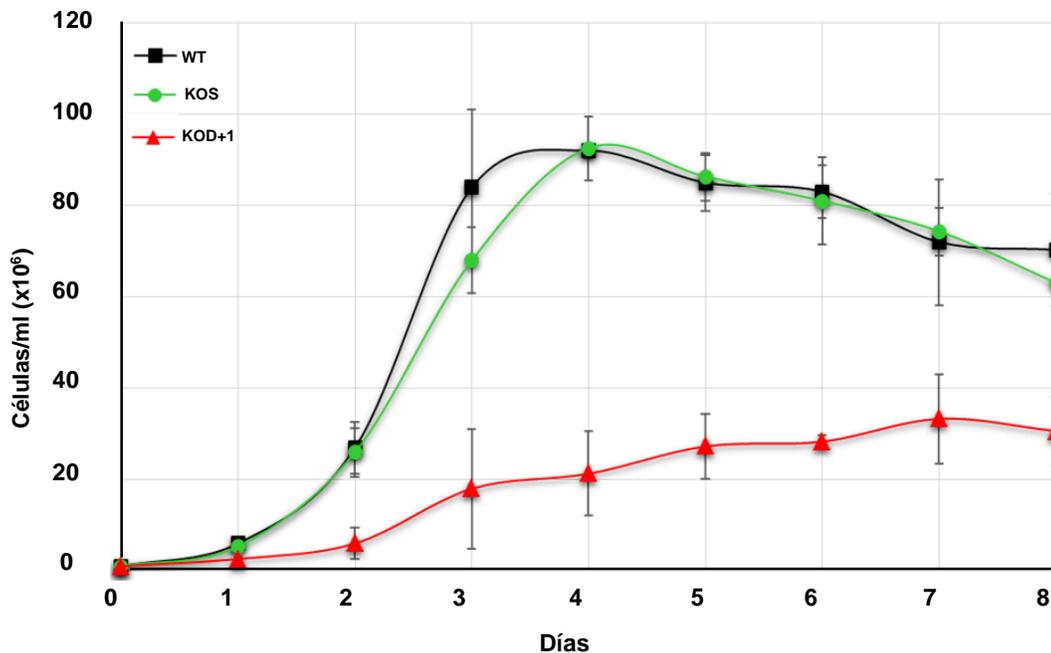


Figura 39: Análisis Southern-blot de células knock-out de *L. major*. (A) Mapas de restricción del locus de LmBdp1 WT (arriba) y de los loci mutados con los genes pac (en medio) e hyg (abajo). Los sitios de restricción para *XhoI*, *SacI* y *PstI* se indican con las letras X, S y P, respectivamente. Los tamaños de los fragmentos se muestran bajo los mapas, y la sonda radioactiva utilizada para el ensayo se denota con la barra negra bajo la UTR 5'. (B) Del lado izquierdo se muestra el análisis Southern-blot realizado con el DNA genómico de células KOS digerido con *XhoI* y *SacI*, y del lado

derecho se muestra el análisis con DNA de células KOD+1 digerido con *Pst*I. Se utilizó el fUTR5' de 533 aa como sonda.

Desde su obtención, la línea KOD+1 reveló una importante disminución en el crecimiento celular, siendo que en el día dos de la curva de crecimiento la línea WT mostró una densidad cinco veces mayor a la del KOD+1. Para analizar con más detalle este defecto en el crecimiento, se obtuvieron curvas de crecimiento de las líneas celulares KOD+1, KOS y WT. Como es evidente en la figura 40A, la línea KOD+1 mostró un crecimiento más lento y alcanzó densidades celulares más bajas que los cultivos KOS y WT. Ensayos de *Western-blot* utilizando el anticuerpo policlonal dirigido contra LmBdp1 reveló una considerable disminución de la proteína (70%) en el cultivo KOD+1, en relación con el cultivo WT (Fig. 40B). Entonces, a pesar de la presencia de una copia del gen de LmBdp1 en la línea celular KOD+1, ésta mostró una disminución substancial en la cantidad de la proteína LmBdp1.

A



B

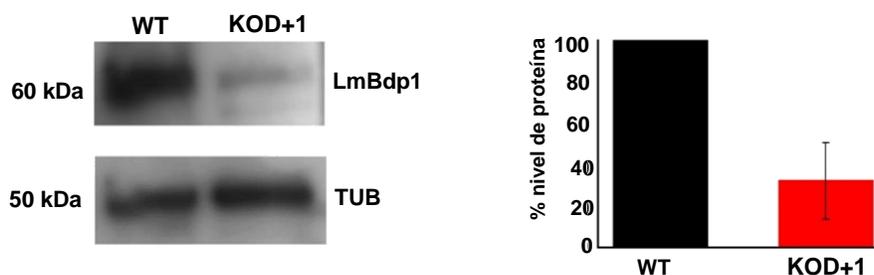


Figura 40: Curva de crecimiento y análisis de *Western-blot* de la línea KOD+1. (A) Conteo de células a partir de un millón por ml durante 8 días de las líneas de *L. major* WT, KOS y KOD+1. (B) Análisis de *Western-blot* para determinar la abundancia de la proteína LmBdp1 en cultivos WT y KOD+1, viéndose una disminución de hasta un 70% en la línea KOD+1. Se utilizó como control de carga a α -tubulina. Ambas gráficas muestran la desviación estándar de tres réplicas biológicas.

5.5 Análisis de *run-on* nuclear en el cultivo *L. major* KOD+1

Para determinar si la disminución de la proteína LmBdp1 afectó los niveles de transcripción, se realizaron experimentos de *run-on* nuclear usando promastigotes de *L. major*, WT y KOD+1. Los genes analizados fueron tRNA-Phe, tRNA-Tyr, 5S rRNA, y U2 snRNA (transcritos por la RNA Pol III); tRNA-Sec (transcrito por las RNA Pol II y III); α -tubulina, LmjF.06.0200, LmjF.06.0210, y LmjF.06.0370 (transcritos por la RNA Pol II); y el 18S rRNA (transcrito por la Pol I). Las señales de hibridación obtenidas de tres réplicas biológicas independientes fueron cuantificadas con el programa MultiGouge estableciendo como 100% la señal obtenida en células WT. La normalización se realizó con α -tubulina. Como se anticipaba, se observó que la transcripción de la RNA Pol III disminuyó en la línea KOD+1, donde el U2 snRNA, el 5S rRNA, el tRNA-Phe y el RNA-Tyr mostraron una disminución del 67%, 53%, 51% y 42% respectivamente. La señal para el tRNA-Sec disminuyó un 22% y LmjF.06.0200, LmjF.06.0210, y LmjF.06.0370, que son genes del cromosoma 6, se vieron afectados muy ligeramente. De manera inesperada, el 18S rRNA mostró una disminución del 45% en la línea KOD+1 (Fig. 41).

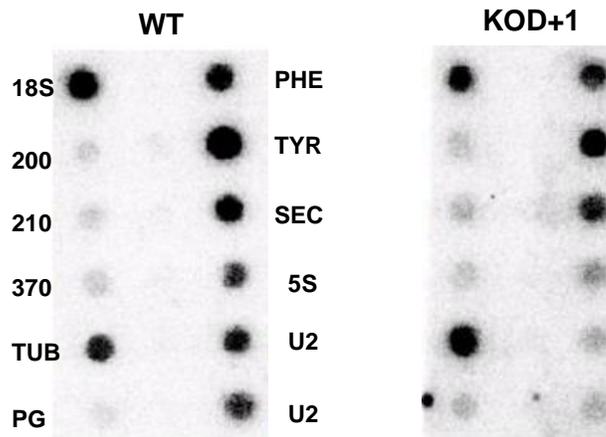
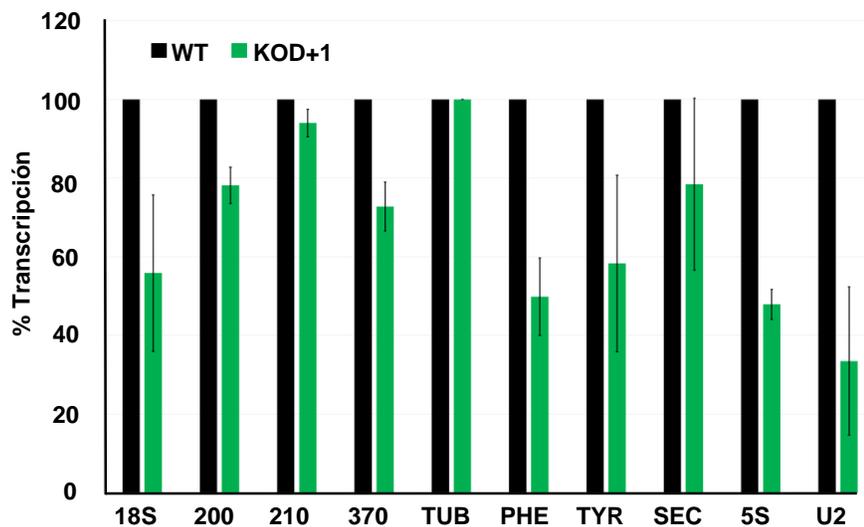
A**B**

Figura 41: Análisis de *run-on* nuclear de las líneas WT y KOD+1. (A) El RNA naciente obtenido de los núcleos aislados de las líneas WT y KOD+1 se usó como sonda para hibridar membranas con *dots* de diversos genes clonados en el vector pGEMT-Easy. Como gen representativo de la transcripción de la RNA Pol I se usó al 18S rRNA (18S); para la RNA Pol II se usaron los genes *LmjF.06.0200* (200), *LmjF.06.0210* (210), *LmjF.06.0370* (370) y α -tubulina (TUB); y para la RNA Pol III se usó el tRNA-Phe (PHE), el tRNA-Tyr (TYR), el tRNA-Sec (SEC), el 5S rRNA (5S) y el U2 snRNA (U2). Como control se usó el vector pGEMT-Easy vacío (PG). (B) Las señales obtenidas de cada gen (3 ensayos independientes) se cuantificaron y graficaron, considerando la señal de la línea WT como el 100%. Los datos se normalizaron con respecto a α -tubulina.

Para determinar si en el cultivo KOD+1 también se observaba disminución de algún otro rRNA, se realizaron otros ensayos de *run-on* nuclear pero ahora usando al 24S β rRNA, además del 18S rRNA (Fig. 42). Cabe señalar que los genes de ambos rRNAs forman parte de la unidad ribosomal que es transcrita por la RNA Pol I. De igual manera se analizó la transcripción de α -tubulina (TUB) y del miniexón (SL), siendo este último un control adicional de la transcripción de la RNA Pol II. Lo que se observó fue que el 24S β rRNA mostró una reducción de aproximadamente un 60% en su transcripción naciente, lo que corrobora que la transcripción de la RNA Pol I se ve comprometida en esta línea KOD+1. Como se esperaba, la transcripción del SL no se vio afectada (Fig. 42).

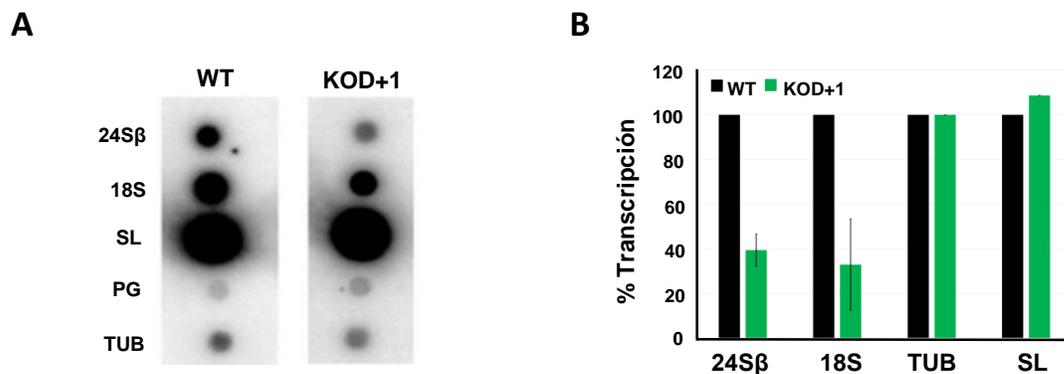


Figura 42: Análisis de *run-on* nuclear del 24S β rRNA en la línea KOD+1. (A) El RNA naciente obtenido de los núcleos aislados de las líneas WT y KOD+1 se usó como sonda para hibridar membranas con *dots* de diversos genes clonados en el vector pGEMT-Easy. Para representar la transcripción de la RNA Pol I se usó al 18S rRNA (18S) y el 24S β rRNA (24S β). Para evaluar la transcripción de la RNA Pol II se usaron los genes del SL RNA (SL) y α -tubulina (TUB). Como control se usó el vector pGEMT-Easy vacío (PG). (B) Las señales obtenidas de cada gen (3 ensayos independientes) se cuantificaron y graficaron, considerando la señal de la línea WT como el 100%. Los datos se normalizaron con respecto a α -tubulina.

5.6 Ensayos ChIP usando la línea *L. major* Bdp1-PTP

Para determinar si la proteína LmBdp1 se une a promotores de la RNA Pol III se realizaron ensayos de inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP) utilizando la línea celular que expresa la proteína recombinante LmBdp1-PTP. Las células se fijaron con formaldehído para mantener las interacciones entre moléculas (*cross-linking*), después se sonicó la cromatina y se extrajo el DNA de una alícuota para verificar que se hubiesen obtenido fragmentos de entre 150 y 400 pb (Fig. 43).

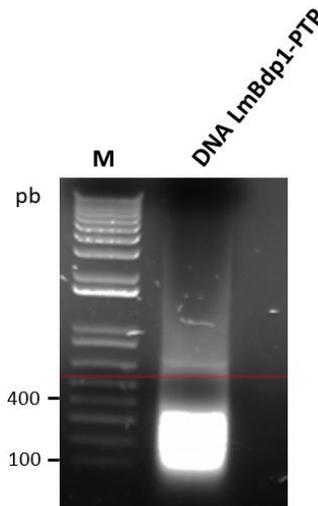


Figura 43: Sonicación de la cromatina. Posterior a la sonicación de la cromatina, se extrajo el DNA de una alícuota para determinar si la sonicación produjo fragmentos pequeños de entre 150 y 400 pb. El marcador de peso molecular (M) corresponde a la escalera de 1 Kb. (Con una línea roja se delimita la banda de 500 pb)

Corroborada la fragmentación del DNA en los tamaños deseados, se inmunoprecipitó el material con el anticuerpo anti-Prot A, que se une al epítipo de la proteína A en la bandera PTP. Posteriormente, se extrajo el DNA y se utilizó como templado para realizar ensayos de PCR de tiempo real (qPCR) con oligonucleótidos

específicos para diversas regiones del genoma de *L. major*. Para analizar la unión de LmBdp1 a genes transcritos por la RNA Pol I, se usaron los oligonucleótidos que reconocen la región promotora del rRNA (18S) (Fig. 42A); para la RNA Pol II se usó el promotor del SL (SLp) y una región interna del gen de α -tubulina (α -tub); y para la RNA Pol III se analizó el gen 5S rRNA, el U2 snRNA, el U2 tRNA-like, el U4 snRNA, el tRNA-Ala y tRNA-Met (Fig. 44A). Datos obtenidos de tres experimentos independientes demostraron que la proteína LmBdp1 se encuentra enriquecida en los genes del 5S rRNA, tRNA-Ala y tRNA-Met (que contienen promotores internos) y en las regiones promotoras de los snRNAs U2 y U4 (secuencias tRNA-like) (Fig. 44B).

Asimismo, se observó enriquecimiento en el gen del snRNA U2, el cual contiene un elemento promotor interno (adicional a los elementos contenidos en el tRNA-like). De esta manera, estos resultados confirman la unión de LmBdp1 a los promotores de la RNA Pol III. Como se anticipaba, LmBdp1 no se une al promotor del SL RNA. De manera interesante, no hubo enriquecimiento en el promotor de la unidad del rRNA (18S), lo que indica que la reducción en la transcripción de los rRNA 18S y 24S que se observó en los ensayos de *run-on* nuclear es un efecto indirecto.

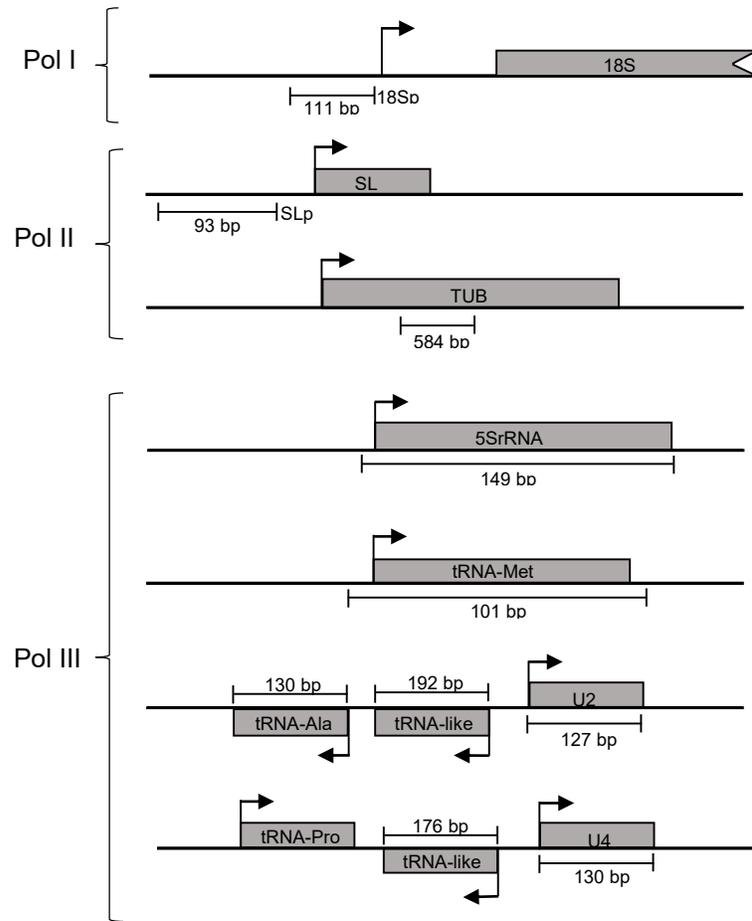
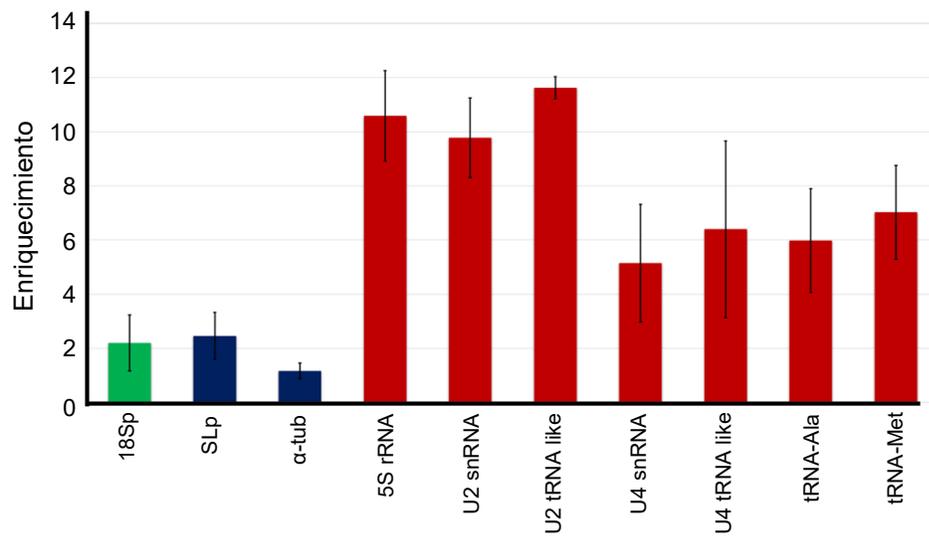
A**B**

Figura 44: Análisis de la inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP) de LmBdp1. (A) Representación esquemática de los genes y sus regiones promotoras examinadas en los experimentos ChIP. (B) Gráfica de enriquecimiento de LmBdp1 en las diferentes regiones analizadas de la cromatina inmunoprecipitada con el anticuerpo anti-Prot A. El DNA de tres réplicas independientes se analizó por qPCR. Se muestra la desviación estándar. Los resultados están representados como veces de enriquecimiento sobre el control negativo.

6. DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en este trabajo demuestran que el gen LmjF36.6530 es el ortólogo de la subunidad Bdp1 del factor de transcripción TFIIB en el protozoo parásito *L. major* (LmBdp1). El análisis de su secuencia reveló la presencia del dominio característico de la proteína Bdp1, denominado recientemente como dominio SANT extendido, mostrando algunas diferencias con los ortólogos de otros eucariontes. Mediante diferentes experimentos se determinó que LmBdp1 es esencial para la viabilidad del parásito y que participa en la transcripción de la RNA Pol III.

Bdp1 es la tercera subunidad que conforma al factor de transcripción TFIIB, el cual se posiciona a ~40 pb río arriba del gen que se va a transcribir, para reclutar y colocar a la RNA Pol III en el SIT. Cuando Bdp1 se incorpora al PIC se generan cambios conformacionales esenciales que le confieren a TFIIB la estabilidad necesaria para reclutar a la RNA Pol III y dar pie a múltiples rondas de transcripción (Han *et al*, 2018). La presencia de Bdp1 en estos protozoarios primitivos, nos sugiere que los mecanismos básicos de regulación transcripcional de la RNA Pol III se establecieron muy tempranamente en la evolución de los eucariontes.

Análisis bioinformáticos

Al analizar la secuencia de LmBdp1 y la de sus ortólogos observamos que la proteína exhibe una alta divergencia, lo que refleja grandes variaciones en su peso molecular, como se observa en la Tabla III. Este nivel de divergencia no se observa en las otras subunidades de TFIIB (TBP y Brf1), que muestran un peso molecular similar aún entre especies filogenéticamente lejanas. Por ejemplo, TBP en *L. major* tiene un peso predicho de 31.1 kDa, mientras que en humano es de 37.6 kDa (Tabla

VII). Una situación similar se presenta con Brf1. En cambio, Bdp1 en *L. major* tiene un peso predicho de 44 kDa mientras que en *S. cerevisiae* es de 67.6 kDa y en humano incluso se reporta una isoforma de 293.88 kDa.

Tabla VII: Peso molecular de las subunidades de TFIIIB entre *L. major*, *S. cerevisiae* y *H. sapiens*.

	TBP (kDa)	Brf1 (kDa)	Bdp1 (kDa)
Lm	31.15	77.25	44
Sc	27.00	66.90	67.68
Hs	37.69	73.84 (Isof1)	293.88 (Isof1)

Bdp1 muestra mayor divergencia a lo largo del linaje eucarionte que TBP y Brf1. Iso1 se refiere a isoforma 1.

Diversos alineamientos multiespecie revelaron que los porcentajes de identidad entre Bdp1 de *L. major* y sus ortólogos están en un rango del 19.7% (con *S. cerevisiae*) al 22.8% (con *H. sapiens*) (Tabla IV). Se observó un valor mayor en los porcentajes de identidad entre *L. major* y otros tripanosomátidos como *T. brucei* y *T. cruzi*, con un 28.57% y un 35.35%, respectivamente (Tabla IV). Estos porcentajes refuerzan el hecho de que LmBdp1 es la subunidad de TFIIIB más divergente, ya que los porcentajes de identidad de TBP y Brf1 de *L. major* con *T. brucei* y *T. cruzi* están en un rango del 48 al 54.6% (Vélez, 2012). Por otro lado, el resultado obtenido entre *L. major* y *T. cruzi* coincide con lo reportado para Brf1, en donde el porcentaje de identidad entre estas dos especies es mayor (54.67%) que con *T. brucei* (Vélez, 2015). Como era de esperarse, los porcentajes de identidad del dominio SANT extendido y del N-linker entre ortólogos resultaron ser más altos, alcanzando incluso el 100% para *H. sapiens* y *M. musculus* (Tabla V), siendo que de las proteínas completas tienen una identidad del 56.85 %.

Entre distintas especies del género *Leishmania*, la similitud entre ortólogos de Bdp1 es alta, observándose porcentajes de identidad desde el 79.7% (entre *L. major* y *L. panamensis*) hasta el 96.9% (entre *L. major* y *L. gerbilli*). Como se observa en la figura 26, el dominio SANT extendido en *Leishmania* está altamente conservado, a diferencia del N-linker, el cual muestra variaciones a medida que se aleja del dominio SANT extendido. El N-linker es una región de ~22 aminoácidos que se caracteriza por estar enriquecida en los residuos aromáticos fenilalanina (F), tirosina (T) y triptofano (W). Esta región fue descrita recientemente en Bdp1 de humano y levadura, encontrándose cinco y seis residuos aromáticos respectivamente (Gouge *et al*, 2017; Vorlander *et al*, 2018). Análisis de secuencia revelaron que en *T. brucei* existen cuatro residuos aromáticos en el N-linker, y tres en *T. cruzi*. Lo interesante es que *L. major* presenta uno sólo residuo aromático, el W180, que se ubica al borde del dominio SANT extendido y se conserva en un 100% de las especies analizadas. Esto le confiere al N-linker de *L. major* una característica distintiva en relación a cualquier otra especie. Por otro lado, en humano se reportan cinco aminoácidos que tienen interacción con el DNA, ubicados en la alfa hélice 3 (H3) del dominio SANT extendido. En *L. major* se conservan tres de éstos (Figura. 25). De igual manera, LmBdp1 conserva la arginina 211 (R211), homóloga a la R344 que en humano interactúa con TBP a través de un puente de sal. De manera complementaria, en *S. cerevisiae* se encontraron otras estructuras como el *tether* que se localiza antes del N-linker y se conforma de tres betas plegadas principalmente; y la alfa hélice *long arm* ubicada posterior al dominio SANT extendido. Predicciones de estructura terciaria demostraron que en los tripanosomátidos la región que equivaldría al *tether* no incluye betas plegadas, como en la mayoría de los eucariontes (Figura 27). La alfa hélice *long arm* se logró predecir en los tres tripanosomátidos. De hecho se predice en todas las especies aquí analizadas excepto en humano, como se observa en la figura 27 (Vorlander *et al*, 2018; Han *et al*, 2018). Esta alfa hélice *long arm* interactúa con el dominio II de Brf1 y con el dominio 2 y 3 de la alfa hélice alada de C34 en levadura.

Todos estos datos nos sugieren que LmBdp1 conserva muchas de las estructuras e interacciones documentadas en las regiones recién encontradas de Bdp1 en humano y levadura, como el N-linker, el dominio SANT extendido y la alfa hélice *long arm* (Figs. 25 y 28). Esto a su vez nos indica que el dominio SANT extendido es la región más ancestral y conservada de la proteína Bdp1, ya que esta región y el N-linker constituyen las secuencias mínimas necesarias para consolidar al complejo de TFIIB en el promotor del U6 snRNA en humano (Gouge *et al*, 2017). Cabe resaltar que el N-linker muestra una alta divergencia en comparación con el dominio SANT extendido.

Fosforilación de LmBdp1

Utilizando el programa PhosTryp se predijeron al menos 10 sitios potencialmente fosforilados en LmBdp1 (Tabla III y Fig. 29). El residuo con mayor *score* (0.93) es una treonina en la posición 308 (T308), pero además nos llamó la atención que tres serinas con un *score* de entre 0.90 y 0.79 se localizan una cerca de la otra abarcando la secuencia SASS, dentro la región que equivaldría al *tether*. Mutaciones en *S. cerevisiae* revelaron cuatro fosfositos para Bdp1 durante la fase de crecimiento logarítmico, de los cuales tres se ubican a cientos de residuos antes del *tether*, y uno posterior a la alfa hélice *long arm*, siendo todos residuos de serina (S49, S164, S178 y S586). Estos son fosforilados por las cinasas PKA, CK2 y Sch9 (Lee *et al*, 2015). Si consideramos que en tripanosomátidos el *tether* no cumple con las características observadas con el resto de los eucariontes, la secuencia SASS podría considerarse una región con una alta probabilidad de ser fosforilada al igual que la T308 ubicada después de la alfa hélice *long arm*. Además, las cinasas CK2 y PKA se reportan como presentes en *Leishmania* (Genestra *et al*, 2004; Dutra *et al*, 2009). Esto nos sugiere que los sitios de fosforilación se encuentran en la periferia de la proteína, lejos del dominio SANT extendido. En humano se ha visto que la proteína Bdp1 es fosforilada por CK2 para liberarla del promotor del U6 snRNA y evitar la transcripción durante la mitosis (Hu *et al*, 2004). En la página

Phosphosite plus observamos que en HsBdp1 el dominio SANT extendido no es fosforilado pero se señala que puede ser ubiquitinado y metilado. Todas estas modificaciones en Bdp1 (ya sea comprobadas o predichas) revelan que es una subunidad de TFIIIB muy regulada, lo que resalta su importancia en la transcripción de la RNA Pol III, puesto que si llegase a ser removida del complejo, la transcripción simplemente se detiene.

LmBdp1 participa en la transcripción de la RNA Pol III en *L. major*

Utilizando la línea celular LmBdp1-PTP que expresa de manera constitutiva a la proteína recombinante Bdp1-PTP, se determinó que la localización de LmBdp1 en *L. major* es predominantemente nuclear (Fig. 32B) como ya se ha reportado en fibroblastos de humano y en células HeLa (Kelter *et al*, 2000). Esta localización nuclear es la esperada para un factor de transcripción.

Para determinar si el gen de LmBdp1 es esencial se intentó eliminar ambos alelos sustituyéndolos por genes de resistencia a antibióticos, como se muestra en la figura 37. Al llevar a cabo el reemplazo del primer alelo, las clonas KOS no mostraron diferencias en su tasa de crecimiento, en relación con las células WT. Sin embargo, al reemplazar el segundo alelo las clonas de KOD+1 exhibieron una considerable reducción en la tasa de crecimiento (Fig. 40), además de la presencia parásitos con cuerpos redondeados y formando rosetas (datos no mostrados). Mediante ensayos tipo *Southern-blot* se corroboró la correcta substitución de cada *cassette* en los *loci* deseados. Sin embargo, se observó la presencia de una copia adicional de LmBdp1, lo cual sugiere fuertemente que LmBdp1 es esencial en promastigotes de *L. major*. En *Leishmania*, es común que al intentar eliminar genes esenciales se produzca un aumento en el número de copias del gen, ya sea por la amplificación específica del gen, por un aumento en el número de copias del cromosoma donde se localiza el gen, o por cambios en el juego completo de

cromosomas del parásito (Balaña-Fouce et al, 2008; Roberts, 2011; Mukherjee et al, 2009). Posteriormente se buscó restaurar los niveles de expresión de LmBdp1 en la línea KOD+1, transfectándola con el vector LmBdp1-PTP, que tiene el gen de LmBdp1 ligado a la bandera PTP, esperando compensar la carga génica. Se realizaron varios intentos de obtener parásitos transfectados, pero no tuvimos éxito debido a la imposibilidad de la línea celular KOD+1 de alcanzar densidades celulares óptimas para la electroporación y a su incapacidad de tolerar el proceso de selección.

Los experimentos de *run-on* nuclear revelaron que la línea celular de *L. major* KOD+1 muestra una reducción en los niveles de transcripción naciente de la RNA Pol III, pues se afectaron los niveles del 5S rRNA, los tRNAs y el U2 snRNA (Fig. 41). Como se anticipaba, no se detectó un cambio significativo en los niveles de RNAs transcritos por la RNA Pol II. Sin embargo, de manera inesperada se observó una reducción considerable de la transcripción naciente de los genes de los rRNA 18S y 24S β , sintetizados por la RNA Pol I (Figs. 41 y 42). No obstante, los ensayos ChIP no mostraron una interacción entre LmBdp1 y el promotor de los genes del rRNA (Fig. 43). Entonces, estos resultados sugieren que la disminución de la transcripción de la RNA Pol I observada en los ensayos de *run-on* nuclear es un efecto indirecto de la reducción en los niveles de LmBdp1. Es posible que la disminución del 5S rRNA actúe como una señal de regulación negativa de la biogénesis de ribosomas a través de la vía de TOR, como se ha observado en levadura bajo condiciones desfavorables de crecimiento. Como consecuencia de dicha señal negativa disminuiría la abundancia de todos los componentes del ribosoma. En *Leishmania* y otros tripanosomátidos se han reconocido tres diferentes cinasas TOR que pudieran estar participando en la coordinación de la transcripción de las tres RNA Pols (Silva et al, 2010).

LmBdp1 se asocia a promotores transcritos por la RNA Pol III

Utilizando nuevamente la línea que expresa a la proteína recombinante LmBdp1-PTP se demostró que LmBdp1 se asocia a genes transcritos por la RNA Pol III, como tRNAs, snRNAs y el 5S rRNA (Fig. 44). No se observó enriquecimiento en el promotor ribosomal (18Sp) ni en el del SL (SLp) ni tampoco en el gen de tubulina (TUB). En la gráfica de la figura 44 podemos observar que existe un mayor enriquecimiento en el gen U2 snRNA y en el 5S rRNA, lo cual concuerda con lo observado en los ensayos de *run-on* nuclear, en donde los genes más comprometidos fueron estos mismos. Estos resultados concuerdan en parte con lo visto en el *knock-down* de Brf1 en *T. brucei*, en donde la reducción de Brf1, la otra subunidad de TFIIB, afectó la transcripción naciente principalmente del U2 snRNA, del 7SL, de los tRNAs de arginina, fenilalanina y tirosina; y también del 5S rRNA pero en menor medida (Vélez, 2015). Esto puede significar que LmBdp1 tiene diferentes niveles de ocupación en los genes que transcribe la RNA Pol III, al igual que Brf1, como un método de regulación transcripcional en donde se le da preferencia a ciertos genes como los tRNAs y en menor medida al 5S rRNA y al U2 snRNA bajo condiciones de estrés.

Bdp1 y tRNAs

Diversos estudios han demostrado que Bdp1 es una proteína muy vinculada a los genes de tRNAs en levadura. Se ha visto que participa en la maduración del extremo 5' de los tRNAs mediante la interacción con la ribonucleasa RNAsa P, aunque actualmente se desconoce el mecanismo (Ishiguro *et al*, 2002). De igual manera, Bdp1 ha mostrado tener interacción con Iswi2, un remodelador de la cromatina que modula a los nucleosomas río arriba de los genes de tRNA, de tal manera que permite la integración de Ty1, un transposón LTR que podría causar problemas si se llegara a insertar dentro del gen o en otras regiones importantes (Bachman *et al*, 2005). Mediante ensayos de CHIP se determinó que además Bdp1

interactúa con Hmt1, una metiltransferasa que inhibe la transcripción de los tRNAs a través de la metilación de algún componente aún no identificado de la maquinaria transcripcional de la RNA Pol III (Milliman *et al*, 2012). Estos estudios muestran que Bdp1 actúa como un componente predominante en la protección, expresión, modulación y maduración de los tRNAs en levadura. Sin embargo, es necesario que se realicen estudios adicionales para entender de mejor manera estos datos. Además, sería muy interesante determinar si Bdp1 lleva a cabo funciones similares en los tripanosomátidos, lo que apoyaría la existencia de una relación ancestral entre Bdp1 y los tRNAs.

7. CONCLUSIONES

Los resultados y análisis de datos revelan en primera instancia que LmBdp1 es el ortólogo de Bdp1 en *L. major*, ya que cumple con todas las características que lo definen como tal, como la presencia del típico dominio SANT extendido y la alfa hélice *long arm*. Además, en LmBdp1 se conservan aminoácidos importantes para la interacción con el DNA en la alfa hélice 3 (H3), y para la unión con TBP, como la R211 (R344 en humano). Experimentalmente se comprobó que es un gen esencial al intentar un KO genético de sus dos alelos, lo cual generó una línea KOD+1 que presentó una reducción en la tasa de crecimiento y en la abundancia de la proteína LmBdp1, en comparación con la línea WT. La línea KOD+1 además mostró una disminución en la transcripción nascente de genes de la RNA Pol III, como el U2 snRNA, el 5S rRNA y tRNAs. Por otro lado, se determinó que LmBdp1 es una proteína nuclear, y que se asocia a promotores de genes transcritos exclusivamente por la RNA Pol III como el U2 snRNA, 5S rRNA y tRNAs. Con esto llegamos a la conclusión de que LmBdp1 cumple con las características conservadas en Bdp1 a nivel de secuencia y estructura, y que además funcionalmente se comporta de manera canónica durante la transcripción de la RNA Pol III al ser indispensable para ésta y por lo tanto para el crecimiento y la viabilidad celular. Al mismo tiempo LmBdp1 muestra algunas particularidades, como que el N-linker posee únicamente un residuo aromático (W180) a diferencia del resto de los eucariontes, y que la alfa hélice *long arm* es más corta que lo observado en levadura.

8. PERSPECTIVAS

- ❖ Analizar de los niveles de fosforilación de LmBdp1 para la determinación de los estados de activación e inactivación de la RNA Pol III en *L. major* y otros tripanosomátidos.
- ❖ Identificar otras proteínas asociadas a la maquinaria transcripcional de la RNA Pol III en *L. major* mediante ensayos de purificación por afinidad en tándem o por *pull-down* utilizando el promotor del gen del 5S rRNA o del U2 snRNA como templado para la conformación del PIC, con la finalidad de caracterizar la maquinaria transcripcional en estos parásitos.
- ❖ Determinar si LmBdp1 participa en la maduración del extremo 5' de los precursores de los tRNAs.
- ❖ Determinar las regiones esenciales en LmBdp1 mediante mutaciones y delimitar las zonas de mayor importancia en la proteína para comprender su funcionalidad y evolución.

9. REFERENCIAS

- Abascal-Palacios, G., Ramsay, E. P., Beuron, F., Morris, E., & Vannini, A. (2018). Structural basis of RNA polymerase III transcription initiation. *Nature*, 553(7688), 301-306. doi:10.1038/nature25441
- Akhoundi, M., Downing, T., Votýpka, J., Kuhls, K., Lukeš, J., Cannet, A., Ravel, C., Marty, P., Delaunay, P., Kasbari, M., Granouillac, B & Sereno, D. (2017). *Leishmania* infections: Molecular targets and diagnosis. *Molecular Aspects of Medicine*, 57, 1-29. doi:10.1016/j.mam.2016.11.012
- Akhoundi, M., Kuhls, K., Cannet, A., Votýpka, J., Marty, P., Delaunay, P., & Sereno, D. (2016). A Historical overview of the classification, evolution, and dispersion of *Leishmania* parasites and sandflies. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 10(3). doi: 10.1371/journal.pntd.0004349
- Alvar, J., Vélez, I. D., Bern, C., Herrero, M., Desjeux, P., Cano, J., Jannin, J., & Boer, M. D. (2012). Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. *PLoS ONE*, 7(5). doi:10.1371/journal.pone.0035671
- Bachman, N. (2005). TFIIIB subunit Bdp1p is required for periodic integration of the Ty1 retrotransposon and targeting of *lsw2p* to *S. cerevisiae* tDNAs. *Genes & Development*, 19(8), 955-964. doi:10.1101/gad.1299105
- Balaña-Fouce, R., García-Estrada, C., Pérez-Pertejo, Y., & Reguera, R. M. (2008). Gene disruption of the DNA topoisomerase IB small subunit induces a non-viable phenotype in the hemoflagellate *Leishmania major*. *BMC Microbiology*, 8(1), 113. doi:10.1186/1471-2180-8-113
- Bauer, S., & Morris, M. T. (2017). Glycosome biogenesis in trypanosomes and the de novo dilemma. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 11(4). doi:10.1371/journal.pntd.0005333
- Berg, J. M., Tymoczko, J. L., & Stryer, L. (2007). Biochemistry. *Jeremy M. Berg, John L. Tymoczko, Lubert Stryer*. New York: W.H. Freeman & Co.
- Berriman, M. (2005). The Genome of the African Trypanosome *Trypanosoma brucei*. *Science*, 309(5733), 416-422. doi:10.1126/science.1112642
- Bertschi, N. L., Toenhake, C. G., Zou, A., Niederwieser, I., Henderson, R., Moes, S., Jenoe, P., & Voss, T. S. (2017). Malaria parasites possess a telomere repeat-binding protein that shares ancestry with transcription factor IIIA. *Nature Microbiology*, 2(6). doi:10.1038/nmicrobiol.2017.33
- Besteiro, S., Williams, R. A., Coombs, G. H., & Mottram, J. C. (2007). Protein turnover and differentiation in *Leishmania*. *International Journal for Parasitology*, 37(10), 1063-1075. doi:10.1016/j.ijpara.2007.03.008

- Blum-Domínguez, S., Martínez-Vázquez, A., Núñez-Oreza, L.A., Martínez-Hernández, F., Villalobos G., & Tamay-Segovias, P. (2015). Leishmaniasis cutánea difusa (LCD) y visceral (LV) concurrentes con cáncer: Presentación de un caso. *Gaceta Médica de México*, (153), 121-4.
- Börner, T., Aleynikova, A. Y., Zubo, Y. O., & Kusnetsov, V. V. (2015). Chloroplast RNA polymerases: Role in chloroplast biogenesis. *Biochimica Et Biophysica Acta (BBA) Bioenergetics*, 1847(9), 761-769. doi:10.1016/j.bbabi.2015.02.004
- Cantacessi, C., Dantas-Torres, F., Nolan, M. J., & Otranto, D. (2015). The past, present, and future of *Leishmania* genomics and transcriptomics. *Trends in Parasitology*, 31(3), 100-108. doi:10.1016/j.pt.2014.12.012
- Carter, R., & Drouin, G. (2009). Structural differentiation of the three eukaryotic RNA polymerases. *Genomics*, 94(6), 388-396. doi:10.1016/j.ygeno.2009.08.011
- Chen, T., & Romesberg, F. E. (2013). Directed polymerase evolution. *FEBS Letters*, 588(2), 219-229. doi:10.1016/j.febslet.2013.10.040
- Cheung, A., & Cramer, P. (2012). A Movie of RNA Polymerase II Transcription. *Cell*, 149(7), 1431-1437. doi:10.1016/j.cell.2012.06.006
- Cieśla, M., Skowronek, E., & Boguta, M. (2018). Function of TFIIIC, RNA polymerase III initiation factor, in activation and repression of tRNA gene transcription. *Nucleic Acids Research*, 46(18), 9444-9455. doi:10.1093/nar/gky656
- Cowling, V. (2010). Regulation of mRNA cap methylation. *Biochemical Journal*, 425(2), 295-302. doi:10.1042/bj20091352
- Cramer, P., Armache, K., Baumli, S., Benkert, S., Brueckner, F., Buchen, C., Damsma, G. E., Dengl, S., Geiger, S. R., Jasiak, A. J., Jawhari, A., Jennebach, S., Kamenski, T., Kettenberger, H., Kuhn, C. D., Lehmann, E., Leike, K., Sydow, J. F., & Vannini, A. (2008). Structure of eukaryotic RNA polymerases. *Annual Review of Biophysics*, 37(1), 337-352. doi:10.1146/annurev.biophys.37.032807.130008
- Cruz-Hernández, V., León-Tapia, S., Cruz-Reyes, A., Sosa-López R., Aragon-Díaz, A., & González-Sánchez, E. (2013). Leishmaniasis visceral, reporte de cuatro casos y revisión de la bibliografía. *Medicina Interna México. Caso clínico*, 29, 204-209
- Deininger, P. (2011). Alu elements: Know the SINEs. *Genome Biology*, 12(12), 236. doi:10.1186/gb-2011-12-12-236
- Del Rosal Rabes, T., Baquero-Artiga, F., & García Miguel, M.J. (2010). Leishmaniasis cutánea. *Revista Pediatría Atención Primaria*, 12, 263-271.
- Denissov, S., Lessard, F., Mayer, C., Stefanovsky, V., Driel, M. V., Grummt, I., Moss, T., & Stunnenberg, H. G. (2011). A model for the topology of active ribosomal RNA genes. *EMBO Reports*, 12(3), 231-237. doi:10.1038/embor.2011.8

- Dieci, G., Conti, A., Pagano, A., & Carnevali, D. (2013). Identification of RNA polymerase III-transcribed genes in eukaryotic genomes. *Biochimica Et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms*, 1829(3-4), 296-305. doi:10.1016/j.bbagr.2012.09.010
- Donelson, J. E., Gardner, M. J., & El-Sayed, N. M. (1999). More surprises from Kinetoplastida. *proceedings of the national academy of sciences*, 96(6), 2579-2581. doi:10.1073/pnas.96.6.2579
- Dougall, A., Shilton, C., Choy, J. L., Alexander, B., & Walton, S. (2009). New reports of australian cutaneous leishmaniasis in northern australian macropods. *Epidemiology and Infection*, 137(10), 1516-1520. doi:10.1017/s0950268809002313
- Dutra, P. M., Vieira, D. P., Meyer-Fernandes, J. R., Silva-Neto, M. A., & Lopes, A. H. (2009). Stimulation of *Leishmania tropica* protein kinase CK2 activities by platelet-activating factor (PAF). *Acta Tropica*, 111(3), 247-254. doi:10.1016/j.actatropica.2009.05.002
- Ehara, H., & Sekine, S. (2018). Architecture of the RNA polymerase II elongation complex: New insights into Spt4/5 and Elf1. *Transcription*, 9(5), 286-291. doi:10.1080/21541264.2018.1454817
- El-Sayed, N. M. (2005). The Genome Sequence of *Trypanosoma cruzi*, Etiologic Agent of Chagas Disease. *Science*, 309(5733), 409-415. doi:10.1126/science.1112631
- Espinosa, O. A., Serrano, M. G., Camargo, E. P., Teixeira, M. M., & Shaw, J. J. (2016). An appraisal of the taxonomy and nomenclature of trypanosomatids presently classified as *Leishmania* and *Endotrypanum*. *Parasitology*, 145(4), 430-442. doi:10.1017/s0031182016002092
- Faresse, N. J., Canella, D., Praz, V., Michaud, J., Romascano, D., & Hernandez, N. (2012). Genomic Study of RNA Polymerase II and III SNAPc-Bound Promoters Reveals a Gene Transcribed by Both Enzymes and a Broad Use of Common Activators. *PLoS Genetics*, 8(11). doi:10.1371/journal.pgen.1003028
- Gadelha, A. P., Cunha-E-Silva, N. L., & Souza, W. D. (2013). Assembly of the *Leishmania amazonensis* flagellum during cell differentiation. *Journal of Structural Biology*, 184(2), 280-292. doi:10.1016/j.jsb.2013.09.006
- Genestra, M., Cysne-Finkelstein, L., & Leon, L. (2004). Protein kinase A activity is associated with metacyclogenesis in *Leishmania amazonensis*. *Cell Biochemistry and Function*, 22(5), 315-320. doi:10.1002/cbf.1107
- Ghavidel, A., & Schultz, M. C. (2001). TATA binding protein-associated CK2 transduces DNA damage signals to the RNA polymerase III transcriptional machinery. *Cell*, 106(5), 575-584. doi:10.1016/s0092-8674(01)00473-1
- González, U., Pinart, M., Rengifo-Pardo, M., Macaya, A., Alvar, J., & Tweed, J. A. (2009). Interventions for american cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. *Cochrane Database of Systematic Reviews*. doi:10.1002/14651858.cd004834.pub2

- González, F & Zerpa, O. (2004). Leishmaniasis cutánea en la infancia. *Dermatología Pediátrica Latinoamericana*, 2 (2), 97-108.
- Goodfellow, S. J & Zomerdijk, J. C. (2012). Basic mechanisms in RNA polymerase I transcription of the ribosomal RNA genes. *Subcellular Biochemistry Epigenetics: Development and Disease*, 211-236. doi:10.1007/978-94-007-4525-4_10
- Gossage, S. M., Rogers, M. E., & Bates, P. A. (2003). Two separate growth phases during the development of *Leishmania* in sand flies: Implications for understanding the life cycle. *International Journal for Parasitology*, 33(10), 1027-1034. doi:10.1016/s0020-7519(03)00142-5
- Gouge, J., Guthertz, N., Kramm, K., Dergai, O., Abascal-Palacios, G., Satia, K., Cousin, P., Nouria, H., Grohmann, D & Vannini, A. (2017). Molecular mechanisms of Bdp1 in TFIIIB assembly and RNA polymerase III transcription initiation. *Nature Communications*, 8(1). doi:10.1038/s41467-017-00126-1
- Graczyk, D., Cieśla, M., & Boguta, M. (2018). Regulation of tRNA synthesis by the general transcription factors of RNA polymerase III TFIIIB and TFIIIC, and by the MAF1 protein. *Biochimica Et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms*, 1861(4), 320-329. doi:10.1016/j.bbagr.2018.01.011
- Guffanti, E., Ferrari, R., Preti, M., Forloni, M., Harismendy, O., Lefebvre, O., & Dieci, G. (2006). A minimal promoter for TFIIIC-dependent in vitro transcription of snoRNA and tRNA genes by RNA polymerase III. *Journal of Biological Chemistry*, 281(33), 23945-23957. doi:10.1074/jbc.m513814200
- Hampsey, M., Singh, B. N., Ansari, A., Lainé, J., & Krishnamurthy, S. (2011). Control of eukaryotic gene expression: Gene loops and transcriptional memory. *Advances in Enzyme Regulation*, 51(1), 118-125. doi:10.1016/j.advenzreg.2010.10.001
- Han, Y., Yan, C., Fishbain, S., Ivanov, I., & He, Y. (2018). Structural visualization of RNA polymerase III transcription machineries. *Cell Discovery*, 4(1). doi:10.1038/s41421-018-0044-z
- Hoffmann, N. A., Jakobi, A. J., Moreno-Morcillo, M., Glatt, S., Kosinski, J., Hagen, W. J., Sachse, N & Müller, C. W. (2015). Molecular structures of unbound and transcribing RNA polymerase III. *Nature*, 528(7581), 231-236. doi:10.1038/nature16143
- Horn, D. (2014). Antigenic variation in African trypanosomes. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 195(2), 123-129. doi:10.1016/j.molbiopara.2014.05.001
- Hsin, J., Xiang, K., & Manley, J. L. (2014). Function and control of RNA Polymerase II C-terminal domain phosphorylation in vertebrate transcription and RNA Processing. *Molecular and Cellular Biology*, 34(13), 2488-2498. doi:10.1128/mcb.00181-14
- Hu, P., Samudre, K., Wu, S., Sun, Y., & Hernandez, N. (2004). CK2 phosphorylation of Bdp1 executes cell cycle-specific RNA Polymerase III Transcription Repression. *Molecular Cell*, 16(1), 81-92. doi:10.1016/j.molcel.2004.09.008

- Ishiguro, A., Kassavetis, G. A., & Geiduschek, E. P. (2002). Essential roles of Bdp1, a subunit of RNA polymerase III Initiation factor TFIIIB, in transcription and tRNA processing. *Molecular and Cellular Biology*, 22(10), 3264-3275. doi:10.1128/mcb.22.10.3264-3275.2002
- Ivens, A. C. (2005). The Genome of the kinetoplastid parasite, *Leishmania major*. *Science*, 309(5733), 436-442. doi:10.1126/science.1112680
- Jariyapan, N., Daroontum, T., Jaiwong, K., Chanmol, W., Intakhan, N., Sor-Suwan, S., Siriyasatien, P., Somboom, P., Bates, M. D & Bates, P. A. (2018). *Leishmania* (Mundinia) orientalis n. sp. (*Trypanosomatidae*), a parasite from Thailand responsible for localised cutaneous leishmaniasis. *Parasites & Vectors*, 11(1). doi:10.1186/s13071-018-2908-3
- Jirků, M., Yurchenko, V. Y., Lukeš, J., & Maslov, D. A. (2012). New species of insect trypanosomatids from Costa Rica and the proposal for a new subfamily within the *Trypanosomatidae*. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 59(6), 537-547. doi:10.1111/j.1550-7408.2012.00636.x
- Kassavetis, G. A., Prakash, P., & Shim, E. (2009). The C53/C37 Subcomplex of RNA polymerase III lies near the active site and participates in promoter opening. *Journal of Biological Chemistry*, 285(4), 2695-2706. doi:10.1074/jbc.m109.074013
- Kazemi B. (2011). Genomic organization of leishmania species. *Iranian Journal of Parasitology*, 6(3), 1–18.
- Kaufer, A., Ellis, J., Stark, D., & Barratt, J. (2017). The evolution of trypanosomatid taxonomy. *Parasites & Vectors*, 10(1). doi:10.1186/s13071-017-2204-7
- Kelter, A., Herchenbach, J., & Wirth, B. (2000). The transcription factor-like nuclear regulator (TFNR) contains a novel 55-amino-acid motif repeated nine times and maps closely to SMN1. *Genomics*, 70(3), 315-326. doi:10.1006/geno.2000.6396
- Khatter, H., Vorländer, M. K., & Müller, C. W. (2017). RNA polymerase I and III: Similar yet unique. *Current Opinion in Structural Biology*, 47, 88-94. doi:10.1016/j.sbi.2017.05.008
- Kostrewa, D., Zeller, M. E., Armache, K., Seizl, M., Leike, K., Thomm, M., & Cramer, P. (2009). RNA polymerase II–TFIIB structure and mechanism of transcription initiation. *Nature*, 462(7271), 323-330. doi:10.1038/nature08548
- Kramm, K., Engel, C., & Grohmann, D. (2019). Transcription initiation factor TBP: Old friend new questions. *Biochemical Society Transactions*, 47(1), 411-423. doi:10.1042/bst20180623
- Kuehner, J. N., Pearson, E. L., & Moore, C. (2011). Unravelling the means to an end: RNA polymerase II transcription termination. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 12(5), 283-294. doi:10.1038/nrm3098

- Kwapisz, M., Beckouët, F., & Thuriaux, P. (2008). Early evolution of eukaryotic DNA-dependent RNA polymerases. *Trends in Genetics*, 24(5), 211-215. doi:10.1016/j.tig.2008.02.002
- Layat, E., Probst, A. V., & Tourmente, S. (2013). Structure, function and regulation of transcription factor IIIA: From *Xenopus* to *Arabidopsis*. *Biochimica Et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms*, 1829(3-4), 274-282. doi:10.1016/j.bbagrm.2012.10.013
- Lee, J. H., Cai, G., Panigrahi, A. K., Dunham-Ems, S., Nguyen, T. N., Radolf, J. D., Asturias, F. J., & Gunzl, A. (2010). A TFIIH-associated mediator head is a basal factor of small nuclear spliced leader RNA gene transcription in early-diverged trypanosomes. *Molecular and Cellular Biology*, 30(23), 5502-5513. doi:10.1128/mcb.00966-10
- Lee, J., Moir, R. D., & Willis, I. M. (2015). Differential phosphorylation of RNA polymerase III and the Initiation factor TFIIIB in *Saccharomyces cerevisiae*. *Plos One*, 10(5). doi:10.1371/journal.pone.0127225
- Lee, K., Kunkeaw, N., Jeon, S. H., Lee, I., Johnson, B. H., Kang, G., Bang, J. K., Park, H. S., Leelayuwat, C., & Lee, Y. S. (2011). Precursor miR-886, a novel noncoding RNA repressed in cancer, associates with PKR and modulates its activity. *RNA*, 17(6), 1076-1089. doi:10.1261/rna.2701111
- Leishman, W. B. (1903). On the possibility of the occurrence of trypanosomiasis in India. *Br Med J*, 1, 1252-1254
- Lockwood, D., & Moore, E. (2010). Treatment of visceral leishmaniasis. *Journal of Global Infectious Diseases*, 2(2), 151. doi:10.4103/0974-777x.62883
- López-Carvajal, L., Cardona-Arias, J. A., Zapata-Cardona, M. I., Sánchez-Giraldo, V., & Vélez, I. D. (2016). Efficacy of cryotherapy for the treatment of cutaneous leishmaniasis: Meta-analyses of clinical trials. *BMC Infectious Diseases*, 16(1). doi:10.1186/s12879-016-1663-3
- Martin, I. R., Nieto, M. M., Fernandez, P. L., & Rodriguez, I. Z. (2018). Leishmaniasis mucocutánea en paciente inmunocompetente: a propósito de un caso. *Revista Española De Cirugía Oral y Maxilofacial*, 40(1), 41-43. doi:10.1016/j.maxilo.2017.07.001
- Martínez-Calvillo, S., Nguyen, D., Stuart, K., & Myler, P. J. (2004). Transcription initiation and termination on *Leishmania major* Chromosome 3. *Eukaryotic Cell*, 3(2), 506-517. doi:10.1128/ec.3.2.506-517.2004
- Martínez-Calvillo, S., Saxena, A., Green, A., Leland, A., & Myler, P. J. (2007). Characterization of the RNA polymerase II and III complexes in *Leishmania major*. *International Journal for Parasitology*, 37(5), 491-502. doi:10.1016/j.ijpara.2006.11.019

- Martínez-Calvillo, S., Vizuet-De-Rueda, J. C., Florencio-Martínez, L. E., Manning-Cela, R. G., & Figueroa-Angulo, E. E. (2010). Gene Expression in Trypanosomatid Parasites. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2010, 1-15. doi:10.1155/2010/525241
- Maslov, D. A., Votýpka, J., Yurchenko, V., & Lukeš, J. (2013). Diversity and phylogeny of insect trypanosomatids: All that is hidden shall be revealed. *Trends in Parasitology*, 29(1), 43-52. doi:10.1016/j.pt.2012.11.001
- Maslov, D. A., Opperdoes, F. R., Kostygov, A. Y., Hashimi, H., Lukeš, J., Yurchenko, V. (2018). Recent advances in trypanosomatid research: genome organization, expression, metabolism, taxonomy and evolution. *Parasitology*, 146, 1–27. <https://doi.org/10.1017/S0031182018000951>
- Milliman, E. J., Hu, Z., & Yu, M. C. (2012). Genomic insights of protein arginine methyltransferase Hmt1 binding reveals novel regulatory functions. *BMC Genomics*, 13(1), 728. doi:10.1186/1471-2164-13-728
- Mukherjee, A., Roy, G., Guimond, C., & Ouellette, M. (2009). The γ -glutamylcysteine synthetase gene of *Leishmania* is essential and involved in response to oxidants. *Molecular Microbiology*, 74(4), 914-927. doi:10.1111/j.1365-2958.2009.06907.x
- Myler, P. J., Audleman, L., Devos, T., Hixson, G., Kiser, P., Lemley, C., Magness, C., Rickel, E., Sisk, E., Sunkin, S., Swartxell, S., Westlake, T., Bastien, P., Fu, G., Ivens, A., & Stuart, K. (1999). *Leishmania major* Friedlin chromosome 1 has an unusual distribution of protein-coding genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(6), 2902-2906. doi:10.1073/pnas.96.6.2902
- Myler, P. J. (2008). Searching the Tritryp Genomes for Drug Targets. *Advances In Experimental Medicine And Biology Drug Targets in Kinetoplastid Parasites*, 133–140. doi: 10.1007/978-0-387-77570-8_11
- Navarrete-Dechent, C., Cevallos, C., Jercic, M. I., Saldias-Fuentes, C., González, S., & Labarca, J. (2018). Leishmaniasis cutánea causada por *Leishmania braziliensis* y uso de anfotericina B liposomal. Comunicación de un caso clínico importado. *Revista Chilena De Infectología*, 35(5), 612-616. doi:10.4067/s0716-10182018000500612
- Ogbadoyi, E. O., Robinson, D. R., & Gull, K. (2003). A high-order trans-membrane structural linkage is responsible for mitochondrial genome positioning and segregation by flagellar basal bodies in trypanosomes. *Molecular Biology of the Cell*, 14(5), 1769-1779. doi:10.1091/mbc.e02-08-0525
- Padilla-Mejía, N. E., Florencio-Martínez, L. E., Figueroa-Angulo, E. E., Manning-Cela, R. G., Hernández-Rivas, R., Myler, P. J., & Martínez-Calvillo, S. (2009). Gene organization and sequence analyses of transfer RNA genes in trypanosomatid parasites. *BMC Genomics*, 10(1), 232. doi:10.1186/1471-2164-10-232

- Padilla-Mejía, N. E., Florencio-Martínez, L. E., Moreno-Campos, R., Vizuet-De-Rueda, J. C., Cevallos, A. M., Hernández-Rivas, R., Manning-Cela, R., & Martínez-Calvillo, S. (2014). The selenocysteine tRNA gene in *Leishmania major* is transcribed by both RNA polymerase II and RNA polymerase III. *Eukaryotic Cell*, *14*(3), 216–227. doi:10.1128/ec.00239-14
- Parrott, A. M., & Mathews, M. B. (2007). Novel rapidly evolving hominid RNAs bind nuclear factor 90 and display tissue-restricted distribution. *Nucleic Acids Research*, *35*(18), 6249-6258. doi:10.1093/nar/gkm668
- Paule, M. R & White, J.R. (2000). SURVEY AND SUMMARY Transcription by RNA polymerases I and III. *Nucleic Acids Research*, *28*(6), 1283-1298. doi:10.1093/nar/28.6.1283
- Pérez-Vega, J.H., López-Moreno, Y.C., López-Valenzuela, J.A., Rendón-Maldonado, J.G & López-Moreno, H.S. (2009). Leishmaniasis cutánea causada por *Leishmania mexicana* en Durango, México. Informe del primer caso clínico. *Gaceta Médica México*, *145* (5), 433-435
- Pigott, D. M., Bhatt, S., Golding, N., Duda, K. A., Battle, K. E., Brady, O. J., Messina, J. P., Balard, Y., Bastien, P., Pratlong, F., Browstein, J. S., Freifeld, C. C., Mekaru, S. R., Gething, P. W., George, D. B., Myers, M. F., Reithinger, R., & Hay, S. I. (2014). Global distribution maps of the leishmaniasis. *ELife*, *3*. doi:10.7554/elife.02851
- Pilsl, M., Crucifix, C., Papai, G., Krupp, F., Steinbauer, R., Griesenbeck, J., Milkereit, P., Tschochner, H., & Schultz, P. (2016). Structure of the initiation-competent RNA polymerase I and its implication for transcription. *Nature Communications*, *7*(1). doi:10.1038/ncomms12126
- Pizzariello, G., Uranga, A., Olivares, L & Maronna, E. (2013) Leishmaniasis cutánea diseminada, una forma clínica emergente. *Dermatología Argentina*, *19*(1), 44-47.
- Podinovskaia, M., & Descoteaux, A. (2015). Leishmania and the macrophage: A multifaceted interaction. *Future Microbiology*, *10* (1), 111-129. doi:10.2217/fmb.14.103
- Poinar, G., & Poinar, R. (2004). Paleoleishmania proterus n. gen., n. sp., (Trypanosomatidae: Kinetoplastida) from Cretaceous Burmese Amber. *Protist*, *155*(3), 305-310. doi:10.1078/1434461041844259
- Poinar, G. (2008). Lutzomyia adiketis sp. n. (Diptera: Phlebotomidae), a vector of Paleoleishmania neotropicum sp. n. (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) in Dominican amber. *Parasites & Vectors*, *1*(1), 22. doi:10.1186/1756-3305-1-22
- Porrua, O., & Libri, D. (2015). Transcription termination and the control of the transcriptome: Why, where and how to stop. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *16*(3), 190-202. doi:10.1038/nrm3943

- Portman, N., & Gull, K. (2010). The paraflagellar rod of kinetoplastid parasites: From structure to components and function. *International Journal for Parasitology*, 40(2), 135-148. doi:10.1016/j.ijpara.2009.10.005
- Raymond, F., Boisvert, S., Roy, G., Ritt, J., Légaré, D., Isnard, A., Stanke, M., Olivier, M., Tremblay, M. J., Papadopoulou, B., & Corbeil, J. (2011). Genome sequencing of the lizard parasite *Leishmania tarentolae* reveals loss of genes associated to the intracellular stage of human pathogenic species. *Nucleic Acids Research*, 40 (3), 1131-1147. doi:10.1093/nar/gkr834
- Roberts, S. C. (2011). The genetic toolbox for *Leishmania* parasites. *Bioengineered Bugs*, 2(6), 320-326. doi:10.4161/bbug.2.6.18205
- Rogers, M. B., Hilley, J. D., Dickens, N. J., Wilkes, J., Bates, P. A., Depledge, D. P., Harris, D., Her, Y., Herzyk, P., Imamura, H., Otto, T. D., Sanders, K., Dujardin, J. C., Berriman, M., Smith, D. F., Hertz-Flower, C., & Mottram, J. C. (2011). Chromosome and gene copy number variation allow major structural change between species and strains of *Leishmania*. *Genome Research*, 21(12), 2129-2142. doi:10.1101/gr.122945.111
- Rogers, M., Chance, M., & Bates, P. (2002). The role of promastigote secretory gel in the origin and transmission of the infective stage of *Leishmania mexicana* by the sandfly *Lutzomyia longipalpis*. *Parasitology*, 124(5), 495-507. doi:10.1017/s0031182002001439
- Rojas, S. S. (2016). Análisis funcional del promotor del gen RNA pequeño nuclear U2 en *Leishmania major*. Tesis de doctorado. Facultad de Estudios Superiores, Iztacala. UNAM, México
- Rojas-Sánchez, S., Figueroa-Angulo, E., Moreno-Campos, R., Florencio-Martínez, L. E., Manning-Cela, R. G., & 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). doi:10.1186/s13071-016-1682-3
- Román, C.F.C. (2012). Caracterización molecular de BDP1, subunidad del factor de transcripción TFIIIB, en *Leishmania major*. Tesis de licenciatura. Facultad de Estudios Superiores, Iztacala. UNAM, México
- Ruan, J., Arhin, G. K., Ullu, E., & Tschudi, C. (2004). Functional characterization of a *Trypanosoma brucei* TATA-binding protein-related factor points to a universal regulator of transcription in trypanosomes. *Molecular and Cellular Biology*, 24(21), 9610-9618. doi:10.1128/mcb.24.21.9610-9618.2004
- Saito, R., Elgort, M., & Campbell, D. (1994). A conserved upstream element is essential for transcription of the *Leishmania tarentolae* mini-exon gene. *The EMBO Journal*, 13(22), 5460-5469. doi:10.1002/j.1460-2075.1994.tb06881.x

- Samanovic, M., Molina-Portela, M. P., Chessler, A. C., Burleigh, B. A., & Raper, J. (2009). Trypanosome lytic factor, an antimicrobial high-density lipoprotein, ameliorates leishmania infection. *PLoS Pathogens*, 5(1). doi:10.1371/journal.ppat.1000276
- Sánchez, M. C., García, Y. A., & Jaén, G. R. (2008). Leishmaniasis visceral en paciente inmunocompetente. Diagnóstico diferencial de la fiebre de origen desconocido. *SEMERGEN - Medicina De Familia*, 34(6), 303-307. doi:10.1016/s1138-3593(08)71908-7
- Schimanski, B., Nguyen, T. N., & Günzl, A. (2005). Highly efficient tandem affinity purification of trypanosome Protein Complexes Based on a Novel Epitope Combination. *Eukaryotic Cell*, 4(11), 1942-1950. doi:10.1128/ec.4.11.1942-1950.2005
- Serafim, T. D., Figueiredo, A. B., Costa, P. A., Marques-Da-Silva, E. A., Gonçalves, R., Moura, S. A., Gontijo N, F., da Silva, S. M., Michalick, M. S., Meyer-Fernades, J. R., de Carvalho, R. P., Uliana, S. R., & Afonso, L. C. (2012). Leishmania metacyclogenesis is promoted in the absence of purines. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 6(9). doi:10.1371/journal.pntd.0001833
- Silva, L. M., & Beverley, S. M. (2010). Expansion of the target of rapamycin (TOR) kinase family and function in Leishmania shows that TOR3 is required for acidocalcisome biogenesis and animal infectivity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(26), 11965-11970. doi:10.1073/pnas.1004599107
- Sosa, A. E. J., Caro, L. J y Zúñiga, C. I. R. (2014). Perfil epidemiológico de la leishmaniasis: Una enfermedad olvidada en México. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología*, 34(1), 31-36
- Srivastava, A., Badjatia, N., Lee, J. H., Hao, B., & Günzl, A. (2017). An RNA polymerase II-associated TFIIIF-like complex is indispensable for SL RNA gene transcription in *Trypanosoma brucei*. *Nucleic Acids Research*, 46(4), 1695-1709. doi:10.1093/nar/gkx1198
- Stevens, J.R., Noyes, H.A., Schofield, C.J & Gibson W. (2001). The molecular evolution of *Trypanosomatidae*. 48:1-56
- Sterkers, Y., Lachaud, L., Bourgeois, N., Crobu, L., Bastien, P., & Pagès, M. (2012). Novel insights into genome plasticity in eukaryotes: Mosaic aneuploidy in Leishmania. *Molecular Microbiology*, 86(1), 15-23. doi:10.1111/j.1365-2958.2012.08185.x
- Steverding, D. (2017). The history of leishmaniasis. *Parasites & Vectors*, 10(1). doi:10.1186/s13071-017-2028-5
- Sundar, S., Singh, A., Chakravarty, J., & Rai, M. (2015). Efficacy and safety of miltefosine in treatment of post-kala-azar dermal leishmaniasis. *The Scientific World Journal*, 2015, 1-6. doi:10.1155/2015/414378

- Sunter, J., & Gull, K. (2017). Shape, form, function and *Leishmania* pathogenicity: From textbook descriptions to biological understanding. *Open Biology*, 7(9), 170165. doi:10.1098/rsob.170165
- Sunyoto, T., Potet, J., & Boelaert, M. (2018). Why miltefosine—a life-saving drug for leishmaniasis—is unavailable to people who need it the most. *BMJ Global Health*, 3(3). doi:10.1136/bmjgh-2018-000709
- Sánchez, M. C., García, Y. A., & Jaén, G. R. (2008). Leishmaniasis visceral en paciente inmunocompetente. Diagnóstico diferencial de la fiebre de origen desconocido. *SEMERGEN - Medicina De Familia*, 34(6), 303-307. doi:10.1016/s1138-3593(08)71908-7
- Teichmann, M., Dieci, G., Pascali, C., & Boldina, G. (2010). General transcription factors and subunits of RNA polymerase III. *Transcription*, 1(3), 130-135. doi:10.4161/trns.1.3.13192
- Turowski, T. W., & Tollervey, D. (2016). Transcription by RNA polymerase III: Insights into mechanism and regulation. *Biochemical Society Transactions*, 44(5), 1367-1375. doi:10.1042/bst20160062
- Vannier-Santos, M., Martiny, A., & Souza, W. (2002). Cell Biology of *Leishmania spp.*: Invading and Evading. *Current Pharmaceutical Design*, 8(4), 297-318. doi:10.2174/1381612023396230
- Vannini, A., Ringel, R., Kusser, A. G., Berninghausen, O., Kassavetis, G. A., & Cramer, P. (2010). Molecular basis of RNA Polymerase III transcription repression by Maf1. *Cell*, 143(1), 59-70. doi:10.1016/j.cell.2010.09.002
- Vassella, E., Oberle, M., Urwyler, S., Renggli, C. K., Studer, E., Hemphill, A., Fragoso, C., Bütikofer, P., Brun, R., & Roditi, I. (2009). Major surface glycoproteins of insect forms of *Trypanosoma brucei* are not essential for cyclical transmission by tsetse. *PLoS ONE*, 4 (2). doi:10.1371/journal.pone.0004493
- Viktorovskaya, O. V., & Schneider, D. A. (2015). Functional divergence of eukaryotic RNA polymerases: Unique properties of RNA polymerase I suit its cellular role. *Gene*, 556(1), 19-26. doi:10.1016/j.gene.2014.10.035
- Vorländer, M. K., Khatter, H., Wetzell, R., Hagen, W. J., & Müller, C. W. (2018). Molecular mechanism of promoter opening by RNA polymerase III. *Nature*, 553(7688), 295-300. doi:10.1038/nature25440
- Votýpka, J., D'Avila-Levy, C. M., Grellier, P., Maslov, D. A., Lukeš, J., & Yurchenko, V. (2015). New approaches to systematics of *Trypanosomatidae*: Criteria for Taxonomic (Re) description. *Trends in Parasitology*, 31(10), 460–469. doi:10.1016/j.pt.2015.06.015
- Vélez-Ramírez, D. E., Florencio-Martínez, L. E., Romero-Meza, G., Rojas-Sánchez, S., Moreno-Campos, R., Arroyo, R., Ortega-López, J., Manning-Cela, R., & 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. doi:10.1017/s0031182015001122

Werner, F., & Grohmann, D. (2011). Evolution of multisubunit RNA polymerases in the three domains of life. *Nature Reviews Microbiology*, 9(2), 85-98. doi:10.1038/nrmicro2507

Wheeler, R. J., Sunter, J. D., & Gull, K. (2016). Flagellar pocket restructuring through the *Leishmania* life cycle involves a discrete flagellum attachment zone. *Journal of Cell Science*, 129(4), 854-867. doi:10.1242/jcs.183152

Zawel, L., Kumar, K. P., & Reinberg, D. (1995). Recycling of the general transcription factors during RNA polymerase II transcription. *Genes & Development*, 9(12), 1479-1490. doi:10.1101/gad.9.12.1479

Zijlstra, E., Musa, A., Khalil, E., Hassan, I. E., & El-Hassan, A. (2003). Post-kala-azar dermal leishmaniasis. *The Lancet Infectious Diseases*, 3(2), 87-98. doi:10.1016/s1473-3099(03)00517-6

Zeiner, G. M., Sturm, N. R., & Campbell, D. A. (2003). The *Leishmania tarentolae* spliced leader contains determinants for association with polysomes. *Journal of Biological Chemistry*, 278(40), 38269-38275. doi:10.1074/jbc.m304295200

Zhou, M., & Law, J. A. (2015). RNA Pol IV and V in gene silencing: Rebel polymerases evolving away from Pol IIs rules. *Current Opinion in Plant Biology*, 27, 154-164. doi:10.1016/j.pbi.2015.07.005

Zink, A. R., Spigelman, M., Schraut, B., Greenblatt, C. L., Nerlich, A. G., & Donoghue, H. D. (2006). Leishmaniasis in Ancient Egypt and Upper Nubia. *Emerging Infectious Diseases*, 12(10), 1616-1617. doi:10.3201/eid1210.060169

Zerpa, O & Convit, J. (2009). Leishmaniasis cutánea difusa en Venezuela. *Gaceta Médica da Bahia*. 79(3), 30-34

10. APÉNDICE: artículo de investigación derivado del proyecto

Sobretiro del artículo de investigación derivado del proyecto.

Referencia completa:

Román-Carraro, F., Florencio-Martínez, L. E., Romero-Meza, G., Nepomuceno-Mejía, T., Carrero, C. J., Arroyo, R., Ortega-López, J., Manning-Cela, R. G & Martínez-Calvillo, S. (2019). TFIIB subunit Bdp1 participates in RNA Polymerase III transcription in the protozoan parasite *Leishmania major*. *BioMed Research International*, vol. 2019, Article ID 1425281, 14 pages. <https://doi.org/10.1155/2019/1425281>.

Research Article

TFIIIB Subunit Bdp1 Participates in RNA Polymerase III Transcription in the Protozoan Parasite *Leishmania major*

Fiordaliso C. Román-Carraro,¹ Luis E. Florencio-Martínez,¹ Gabriela Romero-Meza,¹ Tomás Nepomuceno-Mejía ¹, Julio C. Carrero ², Rossana Arroyo ³, Jaime Ortega-López ⁴, Rebeca G. Manning-Cela ⁵, and Santiago Martínez-Calvillo ¹

¹Unidad de Biomedicina, Facultad de Estudios Superiores Iztacala, Universidad Nacional Autónoma de México, Av. de Los Barrios 1, Col. Los Reyes Iztacala, Tlalnepantla, Estado de México, CP 54090, Mexico

²Departamento de Inmunología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México, CP 04510, Mexico

³Departamento de Infectómica y Patogénesis Molecular, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN, Av. IPN 2508, Ciudad de México, CP 07360, Mexico

⁴Departamento de Biotecnología y Bioingeniería, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN, Av. IPN 2508, Ciudad de México, CP 07360, Mexico

⁵Departamento de Biomedicina Molecular, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN, Av. IPN 2508, Ciudad de México, CP 07360, Mexico

Correspondence should be addressed to Santiago Martínez-Calvillo; scalv@unam.mx

Received 1 December 2018; Accepted 13 March 2019; Published 1 April 2019

Academic Editor: Terry K. Smith

Copyright © 2019 Fiordaliso C. Román-Carraro et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Leishmania major, a protozoan parasite that diverged early from the main eukaryotic lineage, exhibits unusual mechanisms of gene expression. Little is known in this organism about the transcription factors involved in the synthesis of tRNA, 5S rRNA, and snRNAs, transcribed by RNA Polymerase III (Pol III). Here we identify and characterize the TFIIIB subunit Bdp1 in *L. major* (LmBdp1). Bdp1 plays key roles in Pol III transcription initiation in other organisms, as it participates in Pol III recruitment and promoter opening. *In silico* analysis showed that LmBdp1 contains the typical extended SANT domain as well as other Bdp1 conserved regions. Nevertheless, LmBdp1 also displays distinctive features, including the presence of only one aromatic residue in the N-linker region. We were not able to produce null mutants of LmBdp1 by homologous recombination, as the obtained double replacement cell line contained an extra copy of LmBdp1, indicating that LmBdp1 is essential for the viability of *L. major* promastigotes. Notably, the mutant cell line showed reduced levels of the LmBdp1 protein, and its growth was significantly decreased in relation to wild-type cells. Nuclear run-on assays demonstrated that Pol III transcription was affected in the mutant cell line, and ChIP experiments showed that LmBdp1 binds to 5S rRNA, tRNA, and snRNA genes. Thus, our results indicate that LmBdp1 is an essential protein required for Pol III transcription in *L. major*.

1. Introduction

In eukaryotic cells, transcription of nuclear DNA is carried out by three different classes of RNA polymerases (Pol): Pol I, II, and III. Each of these enzymes transcribes a specific group of genes, and each depends on transcription factors to bind its promoter regions. Pol I produces 18S, 5.8S, and 28S rRNAs [1], while Pol II generates mRNAs and most microRNAs and

snRNAs [2]. Pol III transcribes genes encoding 5S rRNA, tRNAs, U6 snRNA, 7SL RNA, and other small essential RNA molecules [3, 4]. Pol III promoters have been divided into three main types: 5S rRNA genes possess a type 1 promoter, composed of three gene-internal elements (boxes A and C and intermediate element); type 2 promoters are present on tRNA genes, and they consist of two gene-internal sequences (boxes A and B); and U6 snRNA genes contain type 3

promoters, which are constituted by three small sequence elements located upstream of the genes (TATA box, proximal sequence element, and distal sequence element) [5].

General transcription factors TFIIA, TFIIB, and TFIIC are required for accurate initiation of Pol III transcription [6]. TFIIB is needed to form a transcriptionally active preinitiation complex (PIC) at all three types of promoter regions, as it participates in Pol III recruitment and promoter opening [7]. TFIIB consists of three subunits: the TATA-binding protein (TBP), the TFIIB-related factor 1 (Brf1), and B double prime 1 (Bdp1) [8]. Notably, Bdp1 is specific to Pol III transcription, since it does not show homology with any of the general transcription factors of other RNA polymerases. Early studies showed that Bdp1 contains a SANT (S*wi*3, A*da*2, N-*Cor*, and T*FIIB*) domain, which is a highly conserved ~50-amino acid motif present in several proteins involved in transcriptional regulation [9]. However, recent analysis established that the SANT domain present in Bdp1 from human and yeast is actually larger and possesses other distinguished features, and accordingly it was renamed extended SANT domain [10–12]. In yeast, the Bdp1 extended SANT domain is essential for cell viability, as it is needed for Pol III PIC assembly and stability [13]. The extended SANT domain interacts directly with DNA and with subunits Brf1 and TBP [14, 15]. Other regions of Bdp1 associate with subunits C128, C37, and C34 of Pol III [11, 13, 16] and subunit Tfc4 of TFIIC [17, 18]. Thus, Bdp1 establishes an intricate network of interactions within the Pol III PIC.

The trypanosomatid parasite *Leishmania major* is the etiological agent of cutaneous leishmaniasis in Asia and Africa [19]. The parasite is transmitted to humans through the bite of infected sandflies of the genus *Phlebotomus*. In addition to their medical importance, *L. major* and other trypanosomatid protozoa, such as *Trypanosoma brucei* and *Trypanosoma cruzi*, are relevant because they express their genes by uncommon processes, including Pol II polycistronic transcription and trans-splicing [20–22].

Little is known in trypanosomatids about either the DNA sequences or the proteins that participate in Pol III transcription initiation. Unlike other organisms, all snRNA genes are transcribed by Pol III in these parasites [23]. Notably, snRNA expression in *T. brucei* and *L. major* is controlled by extragenic boxes A and B located within tRNA or tRNA-like sequences [24, 25]. Although 5S rRNA genes contain the characteristic gene-internal elements, their promoter activity has not been proven [26]. Neither TFIIA nor TFIIC has been identified in trypanosomatids [27]. However, orthologues of TFIIB subunits TBP and Brf1 have been studied in *T. brucei*. TBP, which participates in transcription by all three RNA polymerases, has been primarily investigated in the context of Pol II transcription of the spliced-leader (SL) RNA genes [28, 29]. On the other hand, knockdown analysis by RNA interference demonstrated that Brf1 is indeed involved in Pol III transcription and that it is indispensable for cell survival of procyclic forms of *T. brucei* [30]. Another protein that participates in the regulation of Pol III transcription in *T. brucei* is Maf1, which inhibits tRNA and snRNA transcription by associating with their promoter regions [31].

Here we identified and characterized the TFIIB subunit Bdp1 in *L. major* (LmBdp1). Bioinformatic analysis shows that LmBdp1 possesses the characteristic extended SANT domain and other conserved regions that flank this domain. Attempts to generate null mutants produced a cell line with an additional copy of LmBdp1. Nevertheless, Western blot analysis showed that the levels of LmBdp1 were considerably diminished in the mutant cell line. Notably, the growth of this cell line was significantly reduced in relation to wild-type cells. Nuclear run-on assays demonstrated that Pol III transcription was affected in the mutant cell line, and ChIP experiments showed that LmBdp1 binds to 5S rRNA, tRNA, and snRNA genes.

2. Materials and Methods

2.1. In Silico Analyses. Sequences were obtained from TriTrypDB database (release 40) (<http://tritrypdb.org/tritrypdb/>), from the National Center for Biotechnology Information (NCBI) database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), and from Universal Protein Resource (UniProt). Multiple sequence alignments were made with the Clustal Omega program (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) and shaded manually. To predict the protein secondary structure, the PSIPRED Protein Sequence Analysis Workbench (<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/>) was used. Homology modeling was performed with SWISS-MODEL v 3.7 (<http://swissmodel.expasy.org/interactive>), Swiss-PDB Viewer program (<http://www.expasy.org/spdbv/>), and PyMOL v 2.1.1 (<https://pymol.org/2/>) using the crystallographic structure of human extended SANT domain (PDB id: 5n9g) and yeast Bdp1 (PDB id: 6F41) as templates. Phosphorylated residues were predicted with PhosTryp (<http://phostryp.bio.uniroma2.it/>), which was developed for the specific identification of phosphorylated residues in Trypanosomatid proteins, as the method has been trained using phosphoproteomic data from *Leishmania*, *T. brucei*, and *T. cruzi* [32].

2.2. Cell Culture and Transfection. Promastigotes from *L. major* MHOM/IL/81/Friedlin (LSB-132.1) were grown in BM medium (1× M199 medium pH 7.2 containing 10% heat-inactivated fetal bovine serum, 9.5 g/l brain heart infusion, 40 mM HEPES, 0.01 mg/ml hemin, 0.0002% biotin, 100 IU/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin, and 1× L-glutamine) at 26°C and harvested in the mid-log phase. To generate the *L. major* cell line that expresses LmBdp1 fused to a PTP tag, wild-type promastigotes were transfected by electroporation with the LmBdp1-PTP vector. Briefly, 4 × 10⁷ promastigotes in 0.4 ml electroporation buffer (25 mM HEPES, 120 mM KCl, 0.15 mM CaCl₂, 5 mM MgCl₂, 10 mM KH₂PO₄, 10 mM K₂HPO₄, 2 mM EDTA, pH 7.6) were transfected with 10 µg of LmBdp1-PTP by electroporation at 1600 V, 50 µF, and 25 Ω (BTX Electro Square Porator ECM 830). Cells were grown for 24 h before spreading on plates containing 0.7% Seaplaque GTG agarose (FMC Bioproducts) in BM medium with 50 µg/ml G418. Some of the isolated colonies were selected for further analysis. The same electroporation conditions were used for transfections with the *pac* and *hyg* targeting cassettes, for the generation of knockout parasites.

2.3. Plasmid Constructs. To generate the LmBdp1-PTP vector, for immunofluorescence and ChIP assays, the RPB6 gene from the pB6-PTP plasmid [26] was substituted with the LmBdp1 gene. To that end, pB6-PTP was digested with *Xma*I and *Xba*I and the RBP6 gene was eliminated by agarose gel electrophoresis. The LmBdp1 gene (*LmjF36.6530*) (without the terminal codon) was amplified by PCR using primers Bdp1PTP-for-*Xma*I (5'-ACCCGGGATGGACGACAACGAGTTCGA) and Bdp1PTP-rev-*Xba*I (5'-ATCTAGACTCAACGAGAAGTCCGAGT). The PCR product was cloned into pGEM-T Easy vector, digested with *Xma*I and *Xba*I, and ligated into the pB6-PTP backbone. To produce plasmid pΔBdp1-pac for knockout experiments, the *pac*-gene insert (1.7 kb) was obtained by digesting pΔ75-pac [33] with *Eco*RI and *Sac*I. The 5' targeting region from LmBdp1 (566 bp) was amplified by PCR with oligonucleotides Bdp1-for-*Xba*I (5'-ATCTAGAGTCGGCCGTTGCGCTTCTC) and Bdp1-rev-*Eco*RI (5'-AGAATTCGGCTCCACCGGTGCGTATC). The 3' targeting region (550 bp) was amplified with primers Bdp1-for-*Sac*I (5'-AGAGCTCCGGTAGAACCAAAAAGTTCG) and Bdp1-rev-*Xho*I (5'-ACTCGAGTATAAGTCCGACAGCGAAGA). To produce vector pΔBdp1-hyg, the *hyg*-gene fragment (1.8 kb) from pΔ75-hyg [33] was obtained after *Spe*I and *Sac*I digestion. The 5' targeting region was amplified with primers Bdp1-for-*Xba*I and Bdp1-rev-*Spe*I (5'-AACTAGTGGCTCCACCGGTGCGTATC); and the 3' targeting region was amplified with oligonucleotides Bdp1-for-*Sac*I and Bdp1-rev-*Xho*I. The PCR products from 5' and 3' targeting regions were digested with the restriction enzymes indicated in the name of each oligonucleotide. For both knockout vectors, the selectable-marker gene and the two flanking regions were cloned into pBluescript II KS (digested with *Xba*I and *Xho*I), by a single four-fragment ligation step. To obtain the targeting cassettes, pΔBdp1-pac and pΔBdp1-hyg were digested with *Xba*I and *Xho*I. For nuclear run-on experiments, fragments of *L. major* genes transcribed by the three different RNA polymerases were amplified by PCR and cloned into the pGEM-T Easy vector. The 24Sβ rRNA gene (*LmjF.27.rRNA.26*; 113 bp) was amplified with primers LmrRNA24Sβ-5' (5'-TTCCGGAGTCTTGTTCGAG) and LmrRNA24Sβ-3' (5'-GTGGATTCGGTTGGTGAGTTG); and the 18S rRNA gene (*LmjF.27.rRNA.01*; 370 bp) was amplified with oligonucleotides Lm-rRNA18S-5' (5'-CGGCCTCTAGGAATGAAGG) and LmrRNA18S-3' (5'-CCCCTGAGACTGTAACCTC). The α-tubulin gene (*LmjF.13.0330*; 338 bp) was amplified with primers alfa-tub-5' (5'-AGAAGTCCAAGCTCGGCTACAC) and alfa-tub-3' (5'-GTAGTTGATGCCGCACTTGAAG); and the spliced-leader RNA gene (*LmjF.02.SLRNA.0010*; 303 bp) was amplified with primers SL-5' (5' GAGCGCGGTGGGCATGACA) and SL-3' (5'-ACTGCAAGGGTGCGCCCG). The *LmjF.06.0370* gene (521 bp) was amplified with oligonucleotides Lm06-0370-5' (5'-GAAGCGATGGACTGTTCTGG) and Lm06-0370-3' (5'-CGGTCCTTGCTGCGAATATC); and the *LmjF.06.0210* gene (503 bp) was amplified with primers Lm06-0210-5' (5'-GCCGGAGACATTTGCGTAC) and Lm06-0210-3' (5'-CTATGGCGACGGGATCATC). The *LmjF.06.0200* gene

(547 bp) was amplified with primers Lm06-0200-5' (5'-CCATCCCATGACAAGAGC) and Lm06-0200-3' (5'-TGT-AGTCGCTGTACTCGC); and the tRNA-Phe gene (*LmjF.09. TRNAPHE.01*; 338 bp) was amplified with oligonucleotides Lm09-TRNAPHE-5' (5'-TTCATCCGCGCAAAGAGG) and Lm09-TRNAPHE-3' (5'-GGCCTTCCACGTATTTTCG). The tRNA-Tyr gene (*LmjF.36. TRNATYR.01*; 316 bp) was amplified with primers Lm36-TRNATYR-5' (5'-AGTGCCGAGAAG-TTCGACG) and Lm36-TRNATYR-3' (5'-TCGTCTCCG-TTCCTGTTGC); and the 5S rRNA gene (*LmjF.15.5SrRNA.01*; 344 bp) was amplified with oligonucleotides Lm15-rRNA5S-5' (5'-GAAAGCATCTCTGTG GGTTCGA) and Lm15-rRNA5S-3' (5'-CCC GGGGTCCTGCAAATG). The U2 snRNA gene (*LmjF.31.snRNA.01*; 127 bp) was amplified with primers U2-5' (5'-AAACGTGGA ACTCCAAGGAA) and U2-3' (5'-TATCTTCTCGGCTATTTAGC); and the tRNA-Sec gene (524 bp) was amplified with primers Lm-TRNASEC524-5' (5'-CCGGCTGCCTTCATCAACTC) and Lm-TRNASEC524-3' (5'-GCGCATACGTTTCGGAGTCC). After transformation of JM109 competent cells, plasmid DNA was purified with NucleoSpin plasmid columns (Macherey-Nagel) as specified by the supplier. The identity of each insert was confirmed by sequencing using the T7 and SP6 primers.

2.4. Indirect Immunofluorescence Assays. The cellular localization of LmBdp1 labeled with a PTP tag was determined by indirect immunofluorescence, as previously described [26, 34]. For these assays, 1.5×10^7 mid-log promastigotes were incubated with a rabbit anti-Prot C polyclonal antibody (Delta Biolabs) and a secondary goat anti-rabbit antibody conjugated with Alexa-Fluor 488 (Life Technologies). Images were obtained with a Zeiss Axio Vert.A1 epifluorescence microscope and analyzed with the ZEN 2012 software (Blue edition).

2.5. Southern Blot and PCR Analyses. For Southern blot experiments, 5 μg of genomic DNA was digested with *Xho*I and *Sac*I (for analysis of single-knockout parasites), or *Pst*I (for examination of double-knockout cells). The DNA was separated by electrophoresis on 0.8% agarose gels and transferred to Hybond-NC membranes (GE Healthcare) by capillary action. Blots were hybridized with the 5' targeting region from LmBdp1 (566 bp) labeled with [α - 32 P]dCTP using the High Prime labeling system (Roche). Hybridizations were performed in 50% formamide, 5× SSC, 0.2% SDS, and 4× Denhardt's reagent at 42°C. Filters were washed at 68°C in 0.2× SSC and 0.1% SDS. To verify the replacement of the LmBdp1 gene with the *pac* gene, PCR analysis was carried out with oligonucleotides PAC-LOC3'-REV (5'-GTGGGCTTGTACTCGGTCATGG) and Bdp1-for-upstream (5'-TGTTGGCAACTTGCCACCGT) which recognizes sequences located upstream of the 5' targeting region; and primers PAC-DHFR-3'-REV (5'-GGAGGG-AGGAATGAGGTGAGCT) and Bdp1-for-upstream. The correct integration of the *hyg* gene was confirmed by PCR with primers HYG-rev (5'-GTCGGAGACGCTGTCGAACT) and Bdp1-for-upstream.

2.6. Generation of *LmBdp1* Polyclonal Antibody. Competent cells of *Escherichia coli* BL21 (DE3) were transformed with plasmid pCold-*LmBdp1*. Expression of *LmBdp1* recombinant protein (*LmBdp1r*) was induced with 1 mM isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) at 37°C for 18 h. Affinity chromatography with Ni-Sepharose 6 Fast Flow matrix (GE Healthcare) was carried out to purify the *LmBdp1r* protein, according to the manufacturer's specifications. Around 50 μ g/animal of purified *LmBdp1r* was employed to inoculate subcutaneously six-week-old male BALB-C mice in TiterMax Gold adjuvant (Sigma) at a 1:1 ratio. Pre-immune normal mouse serum was collected before inoculation. Serum was collected six weeks after antigen immunization. Western blot analyses against *LmBdp1r* and protein extracts from promastigotes were performed to confirm the specificity of the anti-*LmBdp1* polyclonal antibody.

2.7. Western Blot Analysis. Whole-cell protein extracts were obtained by standard protocols [35]. Briefly, 2×10^8 parasites were lysed in RIPA buffer (150 mM NaCl, 0.5% sodium deoxycholate, 0.1% SDS, 50 mM Tris pH 7.4, and 1 \times protease inhibitors). The extract was incubated for 30 min on ice and mixed every ten minutes and then centrifuged at 1500 \times g for 10 min. The supernatant was recovered and stored at -70°C. For Western blot analysis, 50 μ g of total protein was fractionated by 10% SDS-PAGE and blotted onto PVDF membranes (Bio-Rad). Membranes were incubated with rabbit Peroxidase Anti-Peroxidase (PAP) (1:1600 dilution, Sigma), polyclonal anti-*LmBdp1* antiserum (1:100 dilution), or polyclonal human β -tubulin antibody (1:500, Invitrogen). Proteins were detected with a horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody and developed using an ECL kit (GE Healthcare).

2.8. Nuclear Run-On Experiments. These assays were performed as described before [30, 36] with isolated nuclei from 2×10^8 mid-log promastigotes. Labeled nascent RNA was hybridized to Hybond-N+ membranes (GE Healthcare) containing dots of 2 μ g of plasmid DNA. These plasmids possess fragments of genes transcribed by Pol I (18S and 24S β rRNA), Pol II (α -tubulin, spliced-leader RNA, *LmjF.06.0200*, *LmjF.06.0210*, and *LmjF.06.0300*), Pol III (5S rRNA, U2 snRNA, tRNA-Phe, and tRNA-Tyr), and by both Pol II and III (tRNA-Sec). Hybridization was performed for 48 h at 50°C in 50% formamide, 5 \times SSC, 0.2% SDS, 4 \times Denhardt's reagent, and 100 μ g/ml salmon sperm DNA. Filters were washed to a final stringency of 0.1 \times SSC and 0.1% SDS at 65°C. RNA hybridization signals were quantified by densitometry using the MultiGauge software.

2.9. Chromatin Immunoprecipitation Assays. The ChIP procedures were performed as previously described [31]. Briefly, 2×10^8 promastigotes were cross-linked with formaldehyde (final concentration of 1%) for 5 min at 37°C. A Vibra-Cell VCX130 ultrasonic processor (Sonics) was employed to lyse the cells (15 s on/off, 40% amplitude, for 5 min). Nuclei were pelleted and resuspended in sonication buffer (1% SDS, 10 mM EDTA, 50 mM Tris-HCl pH 8.1). Chromatin was

sonicated to an average DNA size of about 200 to 500 bp with a BioRuptor UCD-200 (Diagenode) (30 s on/30 s off, high intensity) for 30 cycles. The sonicated material was pre-cleared by adding protein A/G plus-agarose beads (Santa Cruz Biotechnology) and mixing for 1 h at 4°C. Chromatin samples were incubated overnight at 4°C with rabbit anti-Prot A antibody (Sigma) or nonspecific rabbit immune serum (negative control). Protein-DNA complexes were incubated for 1 h with protein A/G plus-agarose beads and 200 ng of sonicated salmon sperm DNA and washed as previously described [37]. Cross-links were reversed with 200 mM NaCl at 65°C overnight. Samples were treated with RNase A and proteinase K. DNA was precipitated with sodium acetate and ethanol and quantified. Each ChIP experiment was performed at least three times.

2.10. Quantitative Real-Time PCR Experiments. The Platinum SYBR Green qPCR Super Mix-UDG kit (Invitrogen) was employed to examine around 5 ng of immunoprecipitated DNA by quantitative real-time PCR. The results were analyzed by the $2^{-\Delta\Delta C_q}$ method, as reported previously [30, 37]. Reactions were carried out with optimized conditions that produce a single amplicon of the correct size, in triplicate. Results are presented as fold enrichment over negative control precipitations. The promoter region of the 18S rRNA gene (*LmjF.27.rRNA.01*) was amplified with primers 18Sp-for (5'-TTGTTTGGGTGGAGGTGAGA) and 18Sp-rev (5'-CAAAATCATCAAACCCCGTTC). The promoter of the spliced-leader RNA gene (*LmjF.02.SLRNA.0010*) was amplified with oligonucleotides LmjF-SL-PromF (5'-GAGCGCGGTGGGCATGACA) and LmjF-SL-PromR (5'-AAGCCATCACCACCGCAGC). The α -tubulin gene (*LmjF13.0330*) was amplified with primers TUB-for (5'-AGAAGTCCAAGCTCGGCTACAC) and TUB-rev (5'-GTA-GTTGATGCCGCACTTGAAG). The 5S rRNA gene (*LmjF.11.5SRRNA.03*) was amplified with primers 5S-for (5'-GAAAGCATCTCTGTGGGTTCGA) and 5S-rev (5'-AACCTGAGTGCCGTACTC). The U2 snRNA gene (*LmjF.31.snRNA.01*) was amplified with oligonucleotides U2-for (5'-TATCTTCTCGGCTATTTAGC) and U2-rev (5'-AAACGTGGAAGTCCAAGGAA). The tRNA-Ala gene (*LmjF.31.TRNAALA.01*) was amplified with primers Ala-for (5'-ATTGGGACGTTACCGCGTCG) and Ala-rev (5'-ATTGCGGCCAGGCCTTTCA). The tRNA-like associated to the U2 snRNA gene was amplified with primers Like-for (5'-CCGAGAAGATATGTTAGTACCACC) and Like-rev (5'-AGGAAAAGATGCTTTTCGACGAG). The tRNA-Met gene (*LmjF.11.TRNAMET.01*) was amplified with oligonucleotides tRNAmet-F (5'-AAAGTTTGCACCGGTGAG) and tRNAmet-R (5'-CACAACTTTCACCTCGTAGCCG). The U4 snRNA (*LmjF.36.snRNA.01*) was amplified with primers U4-5' (5'-AAGCCTTGCGCAGGGAGATGT) and 5'U4Lmjend (5'-GACAAAAAGTAGTCCCCACCC). The tRNA-like associated to the U4 snRNA was amplified with oligonucleotides U4tRNA-like 5' (5'-GAAAAAAGGAGC-GCCGCCCA) and U4tRNA-like 3' (5'-CGCAAGGCT-TGCCTTGGGTGT).

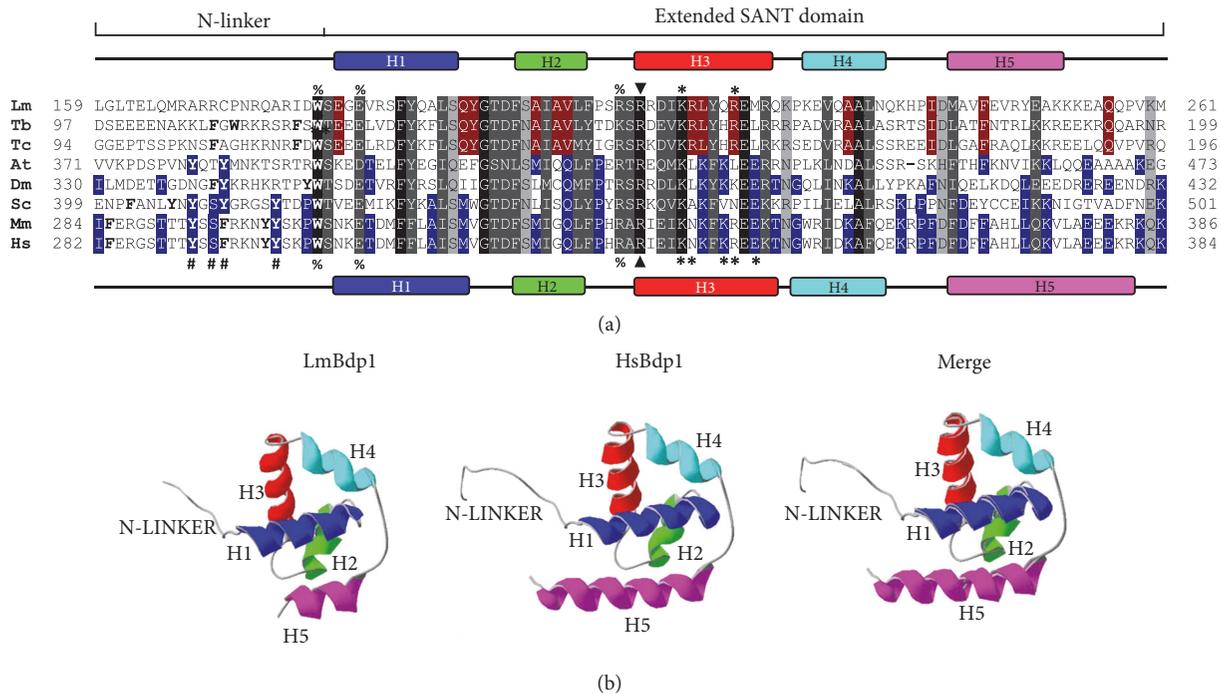


FIGURE 1: Sequence and structure analyses of the extended SANT and N-linker domains from LmBdp1. (a) Multiple sequence alignment of the N-linker and extended SANT domains from *L. major* (Lm), *T. brucei* (Tb), *T. cruzi* (Tc), *A. thaliana* (At), *D. melanogaster* (Dm), *S. cerevisiae* (Sc), *M. musculus* (Mm), and *H. sapiens* (Hs). Identical residues in all species are indicated by black shading. Conserved substitutions are denoted by dark-grey shading with white lettering and semiconserved substitutions are indicated by light-grey shading with black lettering, according to the Clustal Ω program. Trypanosomatid-specific conserved residues are shaded in red with white letters. Conserved amino acids in at least three species different from trypanosomatids (At, Dm, Sc, Mm, and Hs) are shaded in blue with white lettering. In the N-linker, aromatic residues are denoted in bold. Below the Hs sequence, the hash characters (#) indicate conserved residues that interact with the DNA minor groove (Y291, S293, F294, and Y299 in human Bdp1). The percent sign (%) indicates highly conserved amino acids (W303, E307, and R332 in human Bdp1) involved in the interaction between the N-linker and the extended SANT domain. The triangle symbol (\blacktriangle) shows the invariably conserved R334 that forms a salt bridge with residue E191 from TBP and also interacts with the template DNA strand. Asterisks (*) indicate conserved amino acids K338, N339, K342, R343, and E345 that contact both faces of the major groove of the DNA. Symbols above the Lm sequence indicate conserved residues in LmBdp1. Predicted α -helices are denoted by rectangles (H1 to H5) for LmBdp1 (above the alignment) and human Bdp1 (below the alignment). (b) Predicted three-dimensional structure of the N-linker and extended SANT domain of LmBdp1 by homology-modeling using the crystal structure of human Bdp1 (HsBdp1) as a template. The colors of the five α -helices are conserved in panels (a) and (b).

3. Results

3.1. LmBdp1 Possesses the Extended SANT Domain and Other Conserved Regions. Based on the presence of the SANT domain, gene *LmjF36.6530* was identified as a potential orthologue of Bdp1 in *L. major* (LmBdp1) [20]. However, as SANT domains are also present in other proteins, including the subunits of many chromatin-remodeling complexes [9], we further analyzed the sequence and structure of LmBdp1 to verify its identity. Sequence alignments with Bdp1 orthologues from several species showed that LmBdp1 indeed contains the typical extended SANT domain, characterized by the presence of five α -helices (Figure 1(a)). Moreover, two sequences that flank the extended SANT domain, the N-linker and the long arm [11, 12], are conserved or semi-conserved in LmBdp1. The N-linker, involved in the binding to the minor groove of the DNA, is distinguished by the occurrence of aromatic residues, including the invariably

conserved tryptophan (W) residue that is present in LmBdp1 (Figure 1(a)). Nevertheless, LmBdp1 does not contain other conserved aromatic residues (Y291, F294, and Y299) that are important for the interaction Bdp1-DNA (Figure 1(a)) [10]. The long arm [11], also known as helix C [16] or Bdp1 stem [12], which participates in interactions with Brf1 and subunit C34 of Pol III, is also present in LmBdp1 (Supplementary Figure 1(a)). The tether region, located N-terminally to the N-linker (Supplementary Figure 1), interacts with Pol III subunits C128, C37, and C34 and in most Bdp1 orthologues contains several β -sheet structures [11]. However, unlike most species, the tether region in LmBdp1 is not predicted to fold into β -sheet structures (Supplementary Figure 1). Other amino acids that are important for the function of human Bdp1 are conserved in LmBdp1. These include R334 (R211 in LmBdp1), K338 (K215 in LmBdp1) and R343 (R220 in LmBdp1) (Figure 1(a)). R334 interacts with TBP, while K338 and R343 contact the major groove of the DNA [10].

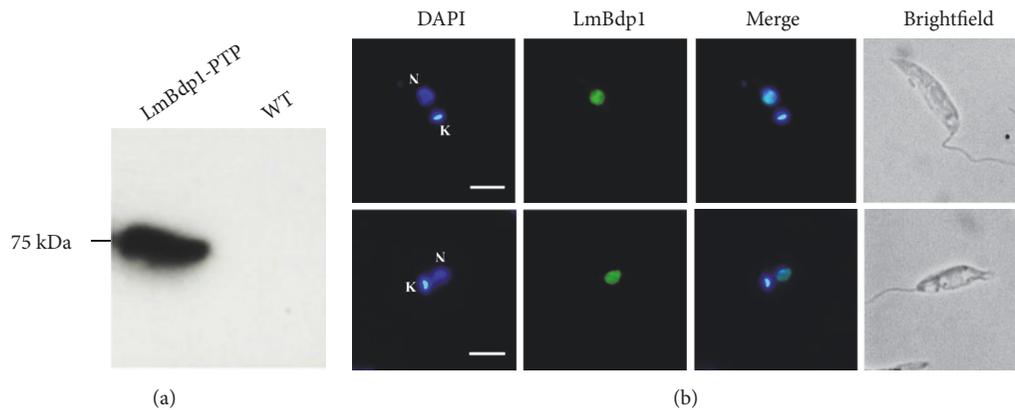


FIGURE 2: Nuclear localization of LmBdp1. (a) Western blot analysis with proteins isolated from the *L. major* cell line that expresses the LmBdp1-PTP recombinant protein, using an anti-Prot C monoclonal antibody. Wild-type parasites were also analyzed as control. (b) The location of LmBdp1 labeled with a PTP tag was determined by indirect immunofluorescence assays using anti-Prot C monoclonal antibody and an Alexa-Fluor 488 conjugated secondary antibody. Nucleus (N) and kinetoplast (K) are stained with DAPI. Size bars represent 5 μ m.

The extended SANT domain is also conserved in Bdp1 orthologues in *T. brucei* and *T. cruzi* (Figure 1(a)), as well as in other species of *Leishmania* (Supplementary Figure 2).

To further study the structure of the extended SANT domain present in LmBdp1, its predicted three-dimensional structure was generated by homology modeling, using as templates the crystal structures of Bdp1 from human (Figure 1(b)) and yeast (Supplementary Figure 1(b)). The architectures of the obtained three-dimensional structures for the extended SANT domain of LmBdp1 are very similar to the ones reported for human and yeast [10–12], showing a conserved distribution of the five α -helices and the long arm. Thus, these results and the functional data showed below demonstrate that *LmjF36.6530* is indeed the orthologue of Bdp1 in *L. major*.

3.2. LmBdp1 Is a Nuclear Protein. In order to determine the cellular distribution of LmBdp1 in *L. major*, we performed indirect immunofluorescence experiments. To that end, a cell line where LmBdp1 was labeled with a C-terminal PTP tag was generated. The PTP tag is constituted by Protein A (Prot A) and Protein C (Prot C) epitopes separated by a tobacco etch virus (TEV) protease cleavage site [38]. The expression of the recombinant LmBdp1-PTP protein was confirmed by Western blot analysis with an anti-Prot C antibody (Figure 2(a)). Immunofluorescence experiments were carried out on fixed and permeabilized promastigotes with the same antibody. The images obtained demonstrated that LmBdp1 localizes to the nucleus, as anticipated for a protein that regulates transcription (Figure 2(b)). The observed dotted pattern is similar to that obtained with Brf1 in *T. brucei* [30].

3.3. Targeted Gene Replacement of LmBdp1. To analyze the effects of the elimination of LmBdp1 on cell growth and transcription in promastigotes of *L. major*, we intended to generate LmBdp1 null mutant parasites by targeted gene

replacement. Although *L. major* Friedlin is a diploid organism, some chromosomes are aneuploid [39]. However, it has been shown that this strain possesses two copies of chromosome 36 [40], where the LmBdp1 gene is located. Consequently, two sequential rounds of targeted gene disruption were planned to obtain null mutants of LmBdp1, using plasmids that contain *puromycin* (*pac*) and *hygromycin* (*hyg*) resistance genes. In these plasmids, the selectable marker genes are bounded by 5' and 3' flanking regions of LmBdp1.

The single-knockout cell line for LmBdp1 was generated by transfecting wild-type promastigotes with the targeting cassette from p Δ LmBdp1-*pac*, and clones were selected with puromycin. Southern blot analysis using the 5' flanking region as a probe showed a 6.2 kb band, expected from targeted gene replacement, with genomic DNA from a single-knockout clone digested with *Xho*I, in addition to the 2.6 kb band that corresponds to the undisrupted gene (Figure 3). The expected bands of 2.5 kb (gene replacement) and 1.7 kb (undisrupted gene) were also observed with *Sac*I-digested genomic DNA. Moreover, the *pac* gene was amplified by PCR from the single-knockout clone (Supplementary Figure 3). Thus, these results demonstrate that one copy of LmBdp1 was replaced with the *pac* gene.

To obtain the double-knockout cell line for LmBdp1, the single-knockout clone was transfected with the targeting cassette from vector p Δ LmBdp1-*hyg*, and cells were selected with puromycin and hygromycin. The obtained transfected clones showed growth defects (see below). Southern blots of *Pst*I-digested genomic DNA from the double-knockout cell line showed that the second allelic copy of LmBdp1 was replaced with the *hyg* gene (2.8 kb band) (Figure 3). The expected band of 5.1 kb (*pac* gene) was also observed. However, a band of 4.6 kb that corresponds to the undisrupted LmBdp1 gene was also detected (Figure 3). PCR analysis also showed the presence of coding sequences for *hyg* and *pac* in the cell line (Supplementary Figure 3). These results indicated that an additional copy of LmBdp1 was present in the mutant cell line,

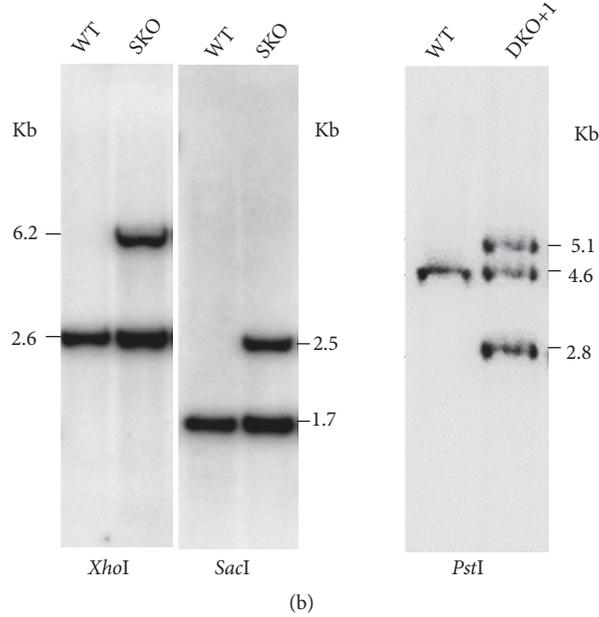
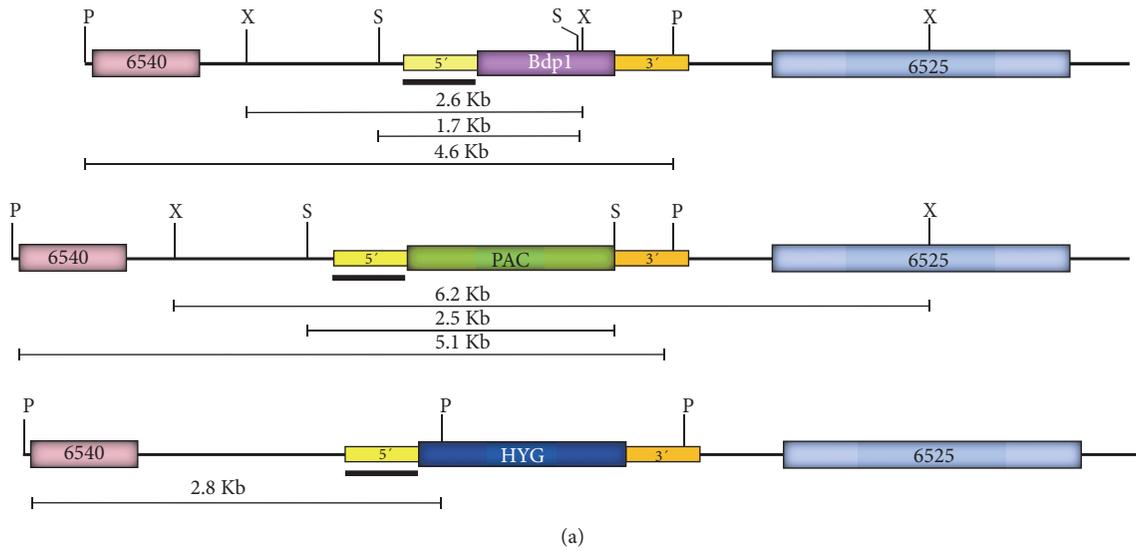


FIGURE 3: Southern blot analysis of LmBdp1 knockout parasites. (a) Restriction maps of the wild-type LmBdp1 locus (top map) and mutant loci with a copy of LmBdp1 substituted with the *pac* gene (middle map) or replaced with the *hyg* gene (bottom map). Restriction sites for *XhoI*, *SacI*, and *PstI* are indicated. Sizes of predicted restriction fragments are shown. The location of the fragment employed as a probe (5' targeting region) in the Southern blot experiments is denoted with a black bar. (b) Southern blot analysis with genomic DNA isolated from the LmBdp1 single-knockout (SKO) clone digested with *XhoI* and *SacI* (left figures); and with genomic DNA isolated from the double-knockout +1 (DKO+1) clone digested with *PstI* (right figure). The 5' flanking region was used as a probe.

which was named double-knockout +1 (DKO+1). Thus, these data strongly suggest that LmBdp1 is an essential gene.

3.4. *The Amount of the LmBdp1 Protein Was Reduced in the Mutant Parasites.* To further analyze the growth defect in the mutant cells, growth curves of the DKO+1 cell line were obtained and compared to growth curves of LmBdp1 single-knockout and wild-type parasites (Figure 4(a)). The data showed that the DKO+1 cell line is strongly impaired in growth, as it multiplies more slowly and to a lower

stationary-phase cell density than single-knockout and wild-type promastigotes (Figure 4(a)). Growth curves of the single-knockout clone and wild-type parasites did not reveal significant differences (Figure 4(a)).

To determine the level of the LmBdp1 protein in the DKO+1 cell line, recombinant LmBdp1 (LmBdp1r) protein was obtained to produce antibodies against it. To that end, the complete LmBdp1 gene was amplified by PCR and cloned into the pColdI vector, where it was fused to a 6×His tag. The LmBdp1r protein was expressed in *E. coli*, purified by nickel affinity chromatography, and used as antigen for polyclonal

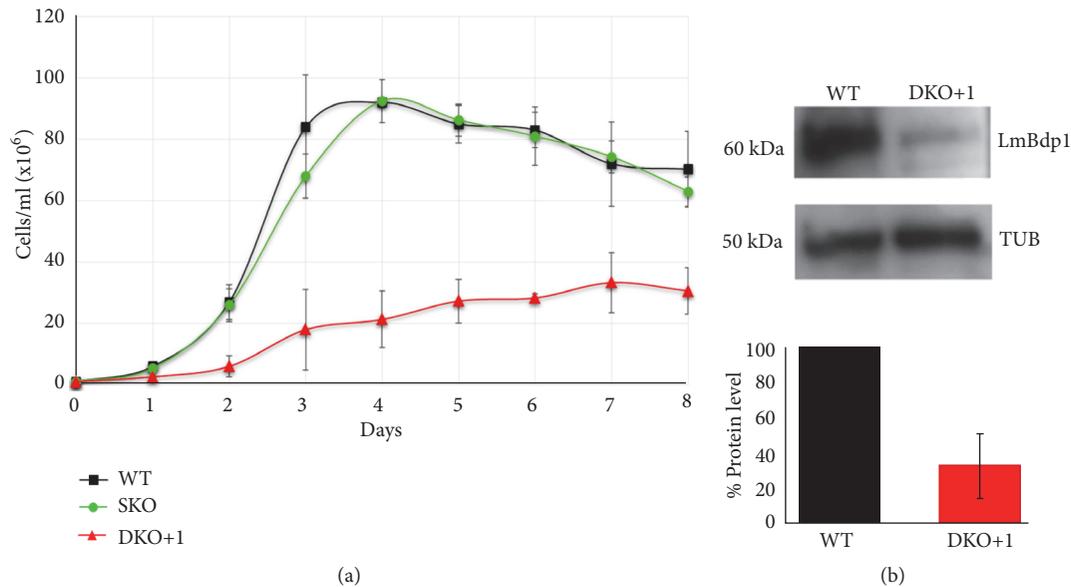


FIGURE 4: Growth curves and Western blot analysis of LmBdp1 knockout parasites. (a) Growth of promastigotes from wild-type (WT), single-knockout (SKO), and double-knockout +1 (DKO+1) cell lines. Values represent means of three experiments. Standard deviation bars are shown. (b) Western blot analysis of LmBdp1 in wild-type (WT) and double-knockout +1 (DKO+1) parasites using the LmBdp1 antibody. The bands shown here and from two more independent assays were quantified and plotted (lower graph). Protein levels of LmBdp1 were normalized to the amount of α -tubulin, which was used as loading control. Standard deviation bars are shown.

antibody production in mice (data not shown). Western blot analysis with the LmBdp1 polyclonal antiserum showed that, comparing to wild-type cells, the amount of LmBdp1 protein was decreased by $\sim 70\%$ in the DKO+1 cell line (Figure 4(b)). Thus, in spite of the presence of an additional copy of the LmBdp1 gene in the DKO+1 parasites, the expression of the LmBdp1 protein is considerably diminished.

3.5. Pol III Transcription Is Affected in the Mutant Cell Line.

To determine if the reduced levels of LmBdp1 have an effect on Pol III transcription, run-on experiments were performed with isolated nuclei from the DKO+1 cell line and wild-type promastigotes (Figure 5). The genes analyzed were tRNA-Phe, tRNA-Tyr, 5S rRNA, and U2 snRNA (transcribed by Pol III); tRNA-Sec (transcribed by Pol II and Pol III); α -tubulin, *LmjF.06.0200*, *LmjF.06.0210*, and *LmjF.06.0370* (transcribed by Pol II); and the 18S rRNA (transcribed by Pol I). The hybridization signals observed in Figure 5(a) and two more independent experiments were quantitated, setting to 100% the transcription signal obtained with wild-type cells (Figure 5(b)). Normalization was performed with α -tubulin. As anticipated, Pol III transcription was decreased in the DKO+1 cell line, since signal from U2 snRNA, 5S rRNA, tRNA-Phe, and tRNA-Tyr was reduced to 33, 47, 49, and 58% of the control value, respectively (Figures 5(a) and 5(b)). Thus, the nuclear run-on data corroborate the involvement of LmBdp1 in Pol III transcription. Signal of the tRNA-Sec, transcribed by both Pol II and Pol III, was diminished to 78% of the control value. Pol II transcription of α -tubulin, *LmjF.06.0200*, *LmjF.06.0210*, and *LmjF.06.0370* was slightly affected. Interestingly, 18S rRNA signal was reproducibly

reduced to $\sim 55\%$ of the control (Figures 5(a) and 5(b)). To further analyze this unexpected result, the 24S β rRNA gene was included in new nuclear run-on experiments. As shown in Figures 5(c) and 5(d), similarly to the 18S rRNA, transcription of the 24S β rRNA gene was reduced to 39% in the DKO+1 cell line. Transcription of the spliced-leader (SL) RNA was not affected (Figures 5(c) and 5(d)), supporting the previous results that indicate that LmBdp1 does not participate in Pol II transcription.

3.6. LmBdp1 Binds to Pol III Promoters.

To determine whether LmBdp1 associates to Pol III promoter regions *in vivo*, chromatin immunoprecipitation (ChIP) experiments were carried out, using the *L. major* cell line that expresses LmBdp1 fused to the PTP tag. Immunoprecipitations were conducted with a ChIP-grade anti-Prot A antibody, which recognizes the two Prot A domains present in the PTP tag [41], and with a nonspecific mouse immune serum as negative control. To assess the binding of LmBdp1-PTP to the *L. major* genome, qPCR assays were performed with the purified DNA. Data obtained from three independent experiments showed that LmBdp1 is enriched in the 5S rRNA, tRNA-Ala, tRNA-Met, and the promoter regions from the U2 and U4 snRNAs (tRNA-like sequences) (Figure 6). Enrichment was also detected within the U2 snRNA gene, which contains an internal promoter element [25]. Thus, these results confirm the binding of LmBdp1 to Pol III promoters. As anticipated, enrichment was not observed with the α -tubulin gene and the SL RNA promoter region (Figure 6). Notably, we did not find association of LmBdp1 with the promoter region of the rRNA transcription unit, which suggests that the reduction

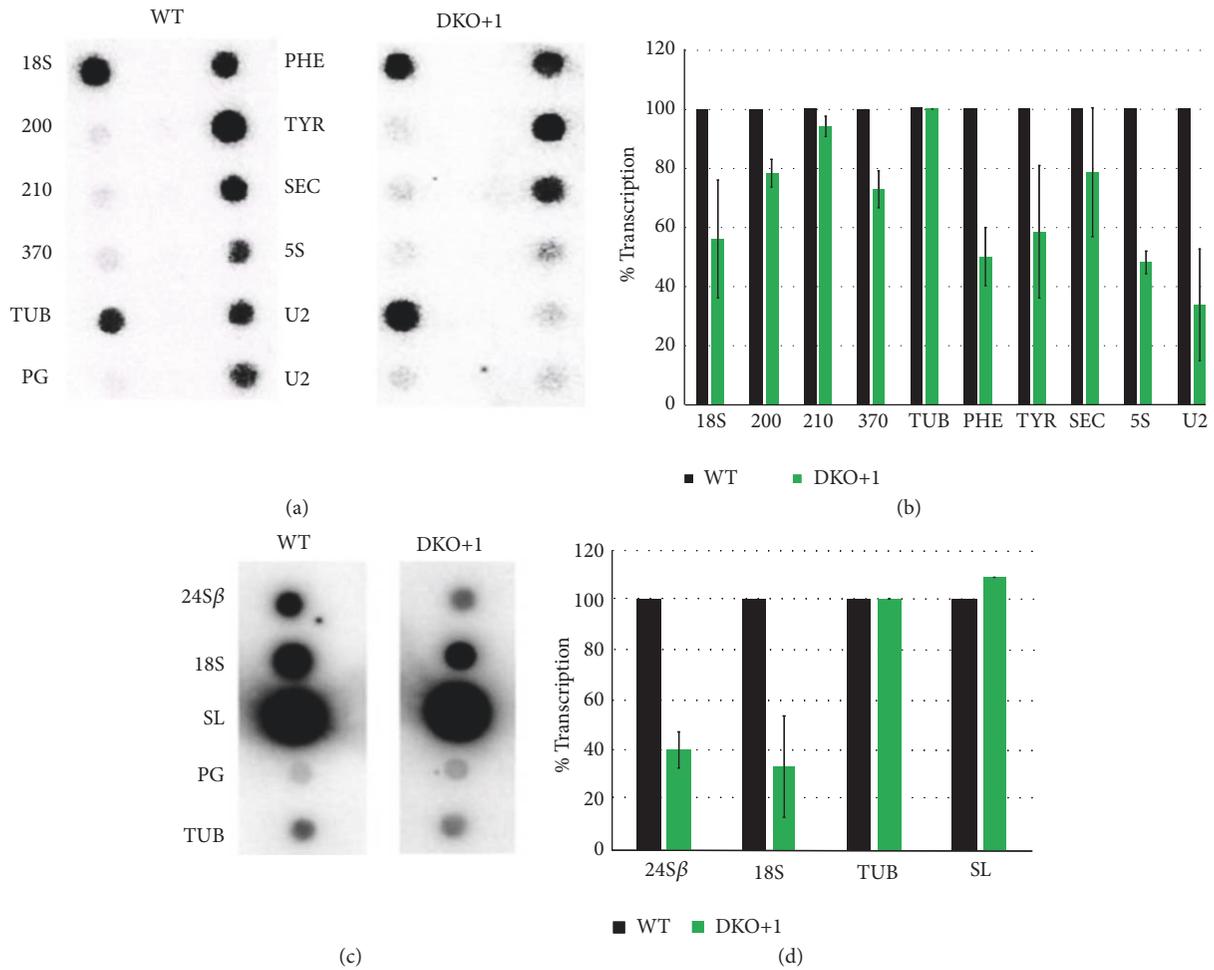


FIGURE 5: Nuclear run-on analyses with the LmBdp1 double-knockout +1 cell line. (a) Labeled nascent RNA from isolated nuclei from the LmBdp1 double-knockout +1 cell line (DKO+1) and wild-type (WT) parasites was hybridized to dot blots of double-stranded DNAs (2 μg) cloned into pGEM-T Easy. The 18S rRNA gene (18S) was tested as a representative Pol I gene. The Pol II genes analyzed were *LmjF.06.0200* (200), *LmjF.06.0210* (210), *LmjF.06.0370* (370), and α -tubulin (TUB). The Pol III genes examined were tRNA-Phe (PHE), tRNA-Tyr (TYR), 5S rRNA (5S), and the U2 snRNA (U2), which was examined in duplicate dots. The tRNA-Sec (SEC), transcribed by both Pol II and Pol III, was also analyzed. As control, an empty vector was assessed (PG). (b) The signals obtained for each gene in panel (a) and from two more independent experiments were quantified and plotted, considering as 100% the signal obtained with wild-type promastigotes. Values represent means of the three experiments. Standard deviation bars are shown. RNA levels were normalized to the level of α -tubulin. (c) Nuclear run-on analysis performed as indicated in panel (a). The Pol I genes analyzed were 24Sβ rRNA (24Sβ) and the 18S rRNA (18S). The Pol II genes examined were SL RNA (SL) and α -tubulin (TUB). As control, an empty vector was also analyzed (PG). (d) The signals obtained for each gene in panel (c) and from two more independent experiments were quantified and plotted, as indicated in panel (b).

in 18S and 24Sβ rRNA transcription that was observed in the LmBdp1 DKO+1 cell line (Figure 5) is an indirect effect.

4. Discussion

In this work, we characterized the orthologue of the Bdp1 subunit of transcription factor TFIIIB in *L. major*. The presence of Bdp1 in this ancient protozoan parasite indicates that the basic mechanisms of regulation of Pol III transcription were established early in the evolution of the eukaryotic lineages. Notably, the molecular mass of Bdp1 varies considerably across evolution. Whereas the predicted weights of isoforms 1 of Bdp1 in *Homo sapiens* and *Mus musculus* are 293.8 and 270.1 kDa, respectively, Bdp1 is predicted to be a ~34.1 kDa

protein in *T. brucei* and a ~44 kDa protein in *L. major*. Molecular masses of 67.7 and 78.2 are predicted for Bdp1 in *Saccharomyces cerevisiae* and *Drosophila melanogaster* (isoform A), respectively. Sequence identity of LmBdp1 ranges from 19.8 to 22.8% for the yeast and human orthologues, respectively; higher identities were observed with Bdp1 from *T. brucei* (28.5%) and *T. cruzi* (35.3%) (Figure 1(a)). As expected, LmBdp1 is very similar to its orthologues in other species of *Leishmania*, showing identities that range from 79.7% (with *Leishmania panamensis*) to 95.9% (with *Leishmania gerbilli*) (Supplementary Figure 2).

In spite of molecular mass and sequence variations, Bdp1 orthologues share the extended SANT domain and other conserved sequences, including the N-terminal region, the

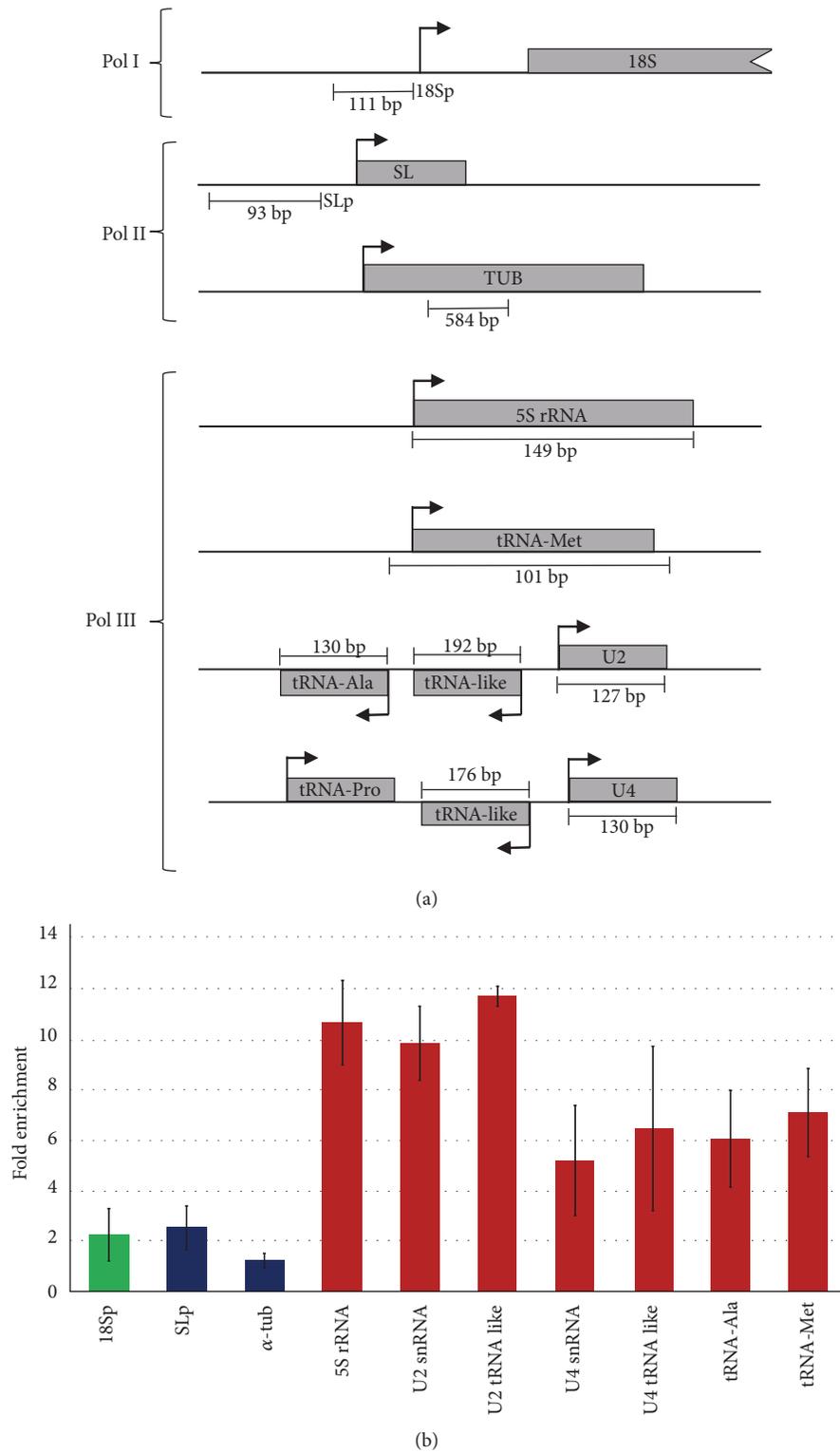


FIGURE 6: Chromatin immunoprecipitation analysis of LmBdp1. (a) Schematic representation of the genes and promoter regions examined by ChIP experiments. (b) Chromatin from a cell line that expresses the recombinant protein LmBdp1-PTP was precipitated with a ChIP-grade anti-Prot A antibody. Precipitated DNA was analyzed by qPCR. The results from three independent ChIP experiments, each analyzed by three qPCR reactions, are shown. Error bars indicate standard deviations. Results are presented as fold enrichment over negative control precipitations.

long arm, and the tether region. LmBdp1 possesses the characteristic extended SANT domain, predicted to fold into five α -helices (Figure 1). Similarly to Bdp1 from yeast, a sixth α -helix that comprises the long arm is present in LmBdp1 (Supplementary Figure 1). Interestingly, the long arm is predicted to be present in all the Bdp1 orthologues that we analyzed, with the exception of the human protein (Supplementary Figure 1) [10]. In yeast, the long arm forms a coiled-coil structure with Brf1 homology domain II and ends next to winged helix domains 2 and 3 from Pol III subunit C34 [11]. The N-linker region is characterized by the presence of 3-6 aromatic amino acids (W, F, and Y) (Figure 1(a)). However, only the conserved W that is located at the end of the N-linker is present in LmBdp1 (Figure 1(a)). Since the missing aromatic residues anchor the N-linker to the major groove of the DNA through aromatic-sugar interactions with the DNA backbone [11], a different type of contacts should occur between the LmBdp1 N-linker and the promoter DNA. The Bdp1 tether, involved in interactions with some Pol III subunits, is folded into several β -sheet structures in *S. cerevisiae*, *H. sapiens*, *Schizosaccharomyces pombe*, and *D. melanogaster* (Supplementary Figure 1) [11, 12]. Nonetheless, in *L. major* and other trypanosomatid parasites this region is not predicted to fold into β -sheets (Supplementary Figure 1). Thus, LmBdp1 shares several characteristics with other Bdp1 orthologues, but it also shows some distinctive features.

Our data demonstrate that LmBdp1 participates in Pol III transcription, as the DKO+1 cell line showed reduced levels of tRNAs, 5S rRNA, and U2 snRNA in nuclear run-on experiments (Figure 5). The association of LmBdp1 with genes transcribed by Pol III was demonstrated by ChIP analysis (Figure 6). While nuclear run-on assays exhibited a reduction in the transcription levels of 18S and 24S β rRNAs, ChIP analysis did not reveal the binding of LmBdp1 to the promoter region of the ribosomal transcription unit. Thus, the observed decrease in 18S and 24S β rRNA transcription is most likely a secondary effect caused by the reduction of 5S rRNA, as cells coordinate the expression levels of all rRNA species to regulate ribosome biogenesis [42]. The target of rapamycin (TOR) signal-transduction pathway is a key regulator of this process [43]. Interestingly, while most eukaryotes possess one or two TOR kinases, *L. major* and other trypanosomatids have three different TOR kinases [44] that might coordinate transcription by all nuclear RNA polymerases.

We were unable to generate null mutants of LmBdp1, as the DKO+1 cell line contained an extra copy of LmBdp1 (Figure 3). It is possible that this additional copy was generated while trying to delete the second endogenous gene of LmBdp1, as attempts to knockout essential genes in *Leishmania* commonly produce alteration in gene copy number, either by gene amplification or changes in ploidy [33, 45–47]. Thus, this result strongly suggests that LmBdp1 is essential for the growth of *L. major* promastigotes, as has been reported in yeast [17]. Regardless of the moment when the extra LmBdp1 copy was produced, the growth of the DKO+1 cell line is strongly impaired and the expression of LmBdp1 is reduced by 70% (Figure 4). We tried to restore the expression levels of LmBdp1 in the DKO+1 cell line by transfecting it with

the pLmBdp1-PTP vector (data not shown). However, several attempts to obtain transfected parasites were unsuccessful due to the inability of the DKO+1 cell line to reach the optimal cell densities for electroporation and to tolerate the drug selection process. As an alternative approach, we transfected the LmBdp1 single-knockout parasites with the pLmBdp1-PTP vector and then tried to knockout the second LmBdp1 allele (data not shown). Nevertheless, we were not capable of deleting the second endogenous copy of LmBdp1, which suggests that the expression of the recombinant LmBdp1-PTP protein in the resultant cell line was not high enough to allow the elimination of the second allelic copy of LmBdp1.

The function of Bdp1 is regulated by phosphorylation of specific amino acids. In logarithmically growing yeast cells, four Bdp1 residues (S49, S164, S178, and S586) are phosphorylated by PKA, Sch9, and CK2 kinases; and Bdp1 is dephosphorylated under conditions that reduce Pol III transcription [48]. Human Bdp1, by contrast, is phosphorylated by CK2 during mitosis to inhibit U6 snRNA transcription [49]. An *in silico* search allowed us to identify several potential phosphorylation sites in LmBdp1, including T308 (PhosTryp score of 0.933), S129 (score of 0.905), and S327 (score of 0.841) (Supplementary Figure 4). Notably, PKA [50] and CK2 [51] are present in *Leishmania*. Thus, similarly to yeast and human, the activity of LmBdp1 could be controlled by phosphorylation. This is supported by the fact that Western blot analysis of LmBdp1 often showed two or more bands (Figure 4(b) and Supplementary Figure 5) that might correspond to different phosphorylation states of the protein.

Besides its role in Pol III transcription initiation, Bdp1 is also involved in maturation of tRNAs by interacting with RNase P, the enzyme required for the site-specific cleavage of the 5' leader sequence of precursor tRNAs [17]. Also, Bdp1 participates in the integration of Ty1, a long terminal repeat retrotransposon, upstream of tRNA genes in *S. cerevisiae* [52]. Moreover, Bdp1 also interacts with Hmt1, a protein arginine methyltransferase from yeast that inhibits tRNA transcription by methylating an unknown factor of the Pol III complex [53]. Bdp1 seems to also participate in Pol II transcription termination of noncoding RNAs in the vicinity of tRNA genes [54]. It remains to be determined whether Bdp1 also performs multiple functions in *L. major* and other trypanosomatids.

5. Conclusions

In the present study, we show that LmBdp1 shares several sequence and structural features with Bdp1 orthologues from other species, such as the presence of the extended SANT domain and the long arm. But some differences were also observed, including the occurrence of only one aromatic residue in the N-linker and the lack of predicted β -sheet structures in the tether region of LmBdp1. Our data also demonstrate that LmBdp1 localizes to the nucleus, where it regulates the Pol III transcription of tRNAs, 5S rRNA, and U2 snRNA by associating with their promoter regions. Targeted gene replacement analysis strongly suggests that LmBdp1 is essential for the growth of promastigotes of *L. major*. Thus,

LmBdp1 could be considered a suitable candidate for drug development against *Leishmania*.

Data Availability

The data used to support the findings of this study are available from the corresponding author upon request.

Conflicts of Interest

The authors have no conflicts of interest to declare.

Acknowledgments

This work was supported by grant 251831 from CONACyT, by grants IN214715 and IN207118 from UNAM-PAPIIT to S. Martínez-Calvillo, and by grant 240086 from CONACyT to Rebeca G. Manning-Cela. The authors thank Ana M. Cevallos and Yolanda I. Chirino-López for fruitful discussions and Leticia Ávila-González and Claudia I. Flores-Pucheta for technical assistance. This work is one of the requirements to obtain the PhD degree in Posgrado en Ciencias Biomédicas (UNAM) for Fiordaliso C. Román-Carraro, who was the recipient of a doctoral fellowship from CONACyT (Fellowship 294812, CVU 549461).

Supplementary Materials

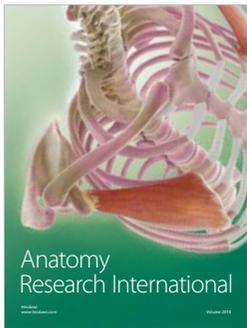
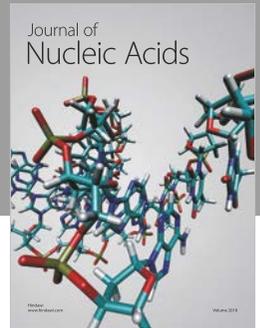
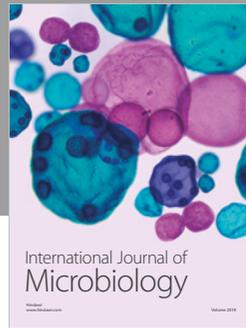
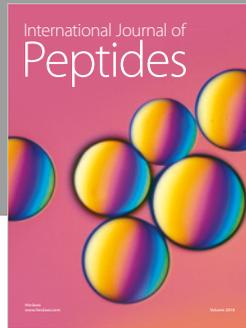
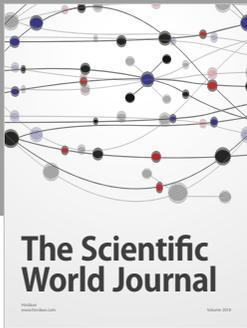
Supplementary Figure 1: sequence and structure analyses of conserved regions of Bdp1. Supplementary Figure 2: sequence alignment of the N-linker and extended SANT domain in different species of *Leishmania*. Supplementary Figure 3: PCR analysis of LmBdp1 single- and double-knockout +1 parasites. Supplementary Figure 4: predicted phosphorylated residues in LmBdp1 using the PhosTryp web tool. Supplementary Figure 5: Western blot analysis of LmBdp1. (Supplementary Materials)

References

- [1] I. Grummt, "Life on a planet of its own: Regulation of RNA polymerase I transcription in the nucleolus," *Genes & Development*, vol. 17, no. 14, pp. 1691–1702, 2003.
- [2] X. Liu, D. A. Bushnell, and R. D. Kornberg, "RNA polymerase II transcription: structure and mechanism," *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms*, vol. 1829, pp. 2–8, 2013.
- [3] G. Dieci, G. Fiorino, M. Castelnuovo, M. Teichmann, and A. Pagano, "The expanding RNA polymerase III transcriptome," *Trends in Genetics*, vol. 23, no. 12, pp. 614–622, 2007.
- [4] E. Leśniewska and M. Boguta, "Novel layers of RNA polymerase III control affecting tRNA gene transcription in eukaryotes," *Open Biology*, vol. 7, 2017.
- [5] G. Dieci, M. C. Bosio, B. Fermi, and R. Ferrari, "Transcription reinitiation by RNA polymerase III," *Biochimica et Biophysica Acta*, vol. 1829, pp. 331–341, 2013.
- [6] E. P. Geiduschek and G. A. Kassavetis, "The RNA polymerase III transcription apparatus," *Journal of Molecular Biology*, vol. 310, pp. 1–26, 2001.
- [7] G. A. Kassavetis, S. Han, S. Naji, and E. P. Geiduschek, "The Role of Transcription Initiation Factor IIIB Subunits in Promoter Opening Probed by Photochemical Cross-linking," *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 278, no. 20, pp. 17912–17917, 2003.
- [8] J. Huet, C. Conesa, N. Manaud, N. Chaussivert, and A. Sentenac, "Interactions between yeast TFIIB components," *Nucleic Acids Research*, vol. 22, no. 16, pp. 3433–3439, 1994.
- [9] L. A. Boyer, R. R. Latek, and C. L. Peterson, "The SANT domain: a unique histone-tail-binding module?" *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, vol. 5, no. 2, pp. 158–163, 2004.
- [10] J. Gouge, N. Guthertz, K. Kramm et al., "Molecular mechanisms of Bdp1 in TFIIB assembly and RNA polymerase III transcription initiation," *Nature Communications*, vol. 8, p. 130, 2017.
- [11] M. K. Vorländer, H. Khatler, R. Wetzel, W. J. Hagen, and C. W. Müller, "Molecular mechanism of promoter opening by RNA polymerase III," *Nature*, vol. 553, no. 7688, pp. 295–300, 2018.
- [12] G. Abascal-Palacios, E. P. Ramsay, F. Beuron, E. Morris, and A. Vannini, "Structural basis of RNA polymerase III transcription initiation," *Nature*, vol. 553, no. 7688, pp. 301–306, 2018.
- [13] H. Hu, C. Wu, J. Lee, and H. Chen, "A Region of Bdp1 Necessary for Transcription Initiation That Is Located within the RNA Polymerase III Active Site Cleft," *Molecular and Cellular Biology*, vol. 35, no. 16, pp. 2831–2840, 2015.
- [14] G. A. Kassavetis, R. Driscoll, and E. P. Geiduschek, "Mapping the Principal Interaction Site of the Brf1 and Bdp1 Subunits of *Saccharomyces cerevisiae* TFIIB," *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 281, no. 20, pp. 14321–14329, 2006.
- [15] S. K. Khoo, C. C. Wu, Y. C. Lin, J. C. Lee, and H. T. Chen, "Mapping the protein interaction network for TFIIB-related factor Brf1 in the RNA polymerase III preinitiation complex," *Molecular and Cellular Biology*, vol. 34, pp. 551–559, 2014.
- [16] Y. Han, C. Yan, S. Fishbain, I. Ivanov, and Y. He, "Structural visualization of RNA polymerase III transcription machineries," *Cell Discovery*, vol. 4, 2018.
- [17] A. Ishiguro, G. A. Kassavetis, and E. P. Geiduschek, "Essential Roles of Bdp1, a Subunit of RNA Polymerase III Initiation Factor TFIIB, in Transcription and tRNA Processing," *Molecular and Cellular Biology*, vol. 22, no. 10, pp. 3264–3275, 2002.
- [18] Y. Liao, I. M. Willis, and R. D. Moir, "The Brf1 and Bdp1 Subunits of Transcription Factor TFIIB Bind to Overlapping Sites in the Tetratricopeptide Repeats of Tfc4," *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 278, no. 45, pp. 44467–44474, 2003.
- [19] S. E. von and S. Tenzer, "Cutaneous leishmaniasis: Distinct functions of dendritic cells and macrophages in the interaction of the host immune system with *Leishmania major*," *International Journal of Medical Microbiology*, 2017.
- [20] A. Gunzl, L. Vanhamme, and P. J. Myler, "Transcription in trypanosomes: a different means to the end," in *Trypanosomes: after the Genome*, J. D. Barry, R. McCulloch, J. C. Mottram, and A. Acosta-Serrano, Eds., pp. 177–208, Horizon Bioscience, Wymondham, UK, 2007.
- [21] S. Martínez-Calvillo, J. C. Vizuet-de-Rueda, L. E. Florencio-Martínez, R. G. Manning-Cela, and E. E. Figueroa-Angulo, "Gene expression in trypanosomatid parasites," *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, Article ID 525241, 2010.
- [22] C. Clayton, "The regulation of trypanosome gene expression by RNA-binding proteins," *PLoS Pathogens*, vol. 9, article e1003680, 2013.
- [23] V. Nakaar, A. O. Dare, D. Hong, E. Ullu, and C. Tschudi, "Upstream tRNA genes are essential for expression of small

- nuclear and cytoplasmic RNA genes in trypanosomes,” *Molecular and Cellular Biology*, vol. 14, no. 10, pp. 6736–6742, 1994.
- [24] V. Nakaar, A. Günzl, E. Ullu, and C. Tschudi, “Structure of the *Trypanosoma brucei* U6 snRNA gene promoter,” *Molecular and Biochemical Parasitology*, vol. 88, no. 1-2, pp. 13–23, 1997.
- [25] S. Rojas-Sanchez, E. Figueroa-Angulo, R. Moreno-Campos, L. E. Florencio-Martinez, R. G. Manning-Cela, and S. Martinez-Calvillo, “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*, vol. 9, p. 401, 2016.
- [26] R. Moreno-Campos, L. E. Florencio-Martínez, T. Nepomuceno-Mejía et al., “Molecular characterization of 5S ribosomal RNA genes and transcripts in the protozoan parasite *Leishmania major*,” *Parasitology*, vol. 143, no. 14, pp. 1917–1929, 2016.
- [27] A. C. Ivens, C. S. Peacock, E. A. Worthey et al., “The genome of the kinetoplastid parasite, *Leishmania major*,” *Science*, vol. 309, no. 5733, pp. 436–442, 2005.
- [28] J. Ruan, G. K. Arhin, E. Ullu, and C. Tschudi, “Functional Characterization of a *Trypanosoma brucei* TATA-Binding Protein-Related Factor Points to a Universal Regulator of Transcription in Trypanosomes,” *Molecular and Cellular Biology*, vol. 24, no. 21, pp. 9610–9618, 2004.
- [29] A. Das, Q. Zhang, J. B. Palenchar, B. Chatterjee, G. A. Cross, and V. Bellofatto, “Trypanosomal TBP Functions with the Multisubunit Transcription Factor tSNAP To Direct Spliced-Leader RNA Gene Expression,” *Molecular and Cellular Biology*, vol. 25, no. 16, pp. 7314–7322, 2005.
- [30] D. E. Velez-Ramirez, L. E. Florencio-Martinez, G. Romero-Meza et al., “BRF1, a subunit of RNA polymerase III transcription factor TFIIB, is essential for cell growth of *Trypanosoma brucei*,” *Parasitology*, vol. 142, Article ID S0031182015001122, pp. 1563–1573, 2015.
- [31] G. Romero-Meza, D. E. Vélez-Ramírez, L. E. Florencio-Martínez et al., “Maf1 is a negative regulator of transcription in *Trypanosoma brucei*,” *Molecular Microbiology*, vol. 103, no. 3, pp. 452–468, 2017.
- [32] A. Palmeri, P. F. Gherardini, P. Tsigankov et al., “PhosTryp: A phosphorylation site predictor specific for parasitic protozoa of the family trypanosomatidae,” *BMC Genomics*, vol. 12, p. 614, 2011.
- [33] S. Martínez-Calvillo, K. Stuart, and P. J. Myler, “Ploidy changes associated with disruption of two adjacent genes on *Leishmania major* chromosome 1,” *International Journal for Parasitology*, vol. 35, no. 4, pp. 419–429, 2005.
- [34] T. Nepomuceno-Mejía, L. E. Florencio-Martínez, and S. Martínez-Calvillo, “Nucleolar division in the promastigote stage of *leishmania major* parasite: A Nop56 point of view,” *BioMed Research International*, vol. 2018, article 1641839, 2018.
- [35] H. Ji, “Lysis of cultured cells for immunoprecipitation,” *Cold Spring Harbor Protocols*, vol. 2010, 2010.
- [36] N. E. Padilla-Mejía, L. E. Florencio-Martínez, R. Moreno-Campos et al., “The Selenocysteine tRNA Gene in *Leishmania major* Is Transcribed by both RNA Polymerase II and RNA Polymerase III,” *Eukaryotic Cell*, vol. 14, no. 3, pp. 216–227, 2015.
- [37] J. C. Vizuet-de-Rueda, L. E. Florencio-Martínez, N. E. Padilla-Mejía, R. Manning-Cela, R. Hernández-Rivas, and S. Martínez-Calvillo, “Ribosomal RNA Genes in the Protozoan Parasite *Leishmania major* Possess a Nucleosomal Structure,” *Protist*, vol. 167, no. 2, pp. 121–135, 2016.
- [38] B. Schimanski, T. N. Nguyen, and A. Günzl, “Highly efficient tandem affinity purification of trypanosome protein complexes based on a novel epitope combination,” *Eukaryotic Cell*, vol. 4, no. 11, pp. 1942–1950, 2005.
- [39] Y. Sterkers, L. Lachaud, L. Crobu, P. Bastien, and M. Pagès, “FISH analysis reveals aneuploidy and continual generation of chromosomal mosaicism in *Leishmania major*,” *Cellular Microbiology*, vol. 13, no. 2, pp. 274–283, 2011.
- [40] M. B. Rogers, J. D. Hilley, N. J. Dickens et al., “Chromosome and gene copy number variation allow major structural change between species and strains of *Leishmania*,” *Genome Research*, vol. 21, no. 12, pp. 2129–2142, 2011.
- [41] J. H. Lee, G. Cai, A. K. Panigrahi et al., “A TFIIB-Associated Mediator Head Is a Basal Factor of Small Nuclear Spliced Leader RNA Gene Transcription in Early-Diverged Trypanosomes,” *Molecular and Cellular Biology*, vol. 30, no. 23, pp. 5502–5513, 2010.
- [42] C. Mayer and I. Grummt, “Ribosome biogenesis and cell growth: mTOR coordinates transcription by all three classes of nuclear RNA polymerases,” *Oncogene*, vol. 25, no. 48, pp. 6384–6391, 2006.
- [43] C. K. Tsang, H. Liu, and X. S. Zheng, “mTOR binds to the promoters of RNA polymerase I- and III-transcribed genes,” *Cell Cycle*, vol. 9, no. 5, pp. 953–957, 2014.
- [44] S. L. Madeira da and S. M. Beverley, “Expansion of the target of rapamycin (TOR) kinase family and function in *Leishmania* shows that TOR3 is required for acidocalcisome biogenesis and animal infectivity,” in *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 107, pp. 11965–11970, 2010.
- [45] A. K. Cruz, R. Titus, and S. M. Beverley, “Plasticity in chromosome number and testing of essential genes in *Leishmania* by targeting,” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 90, no. 4, pp. 1599–1603, 1993.
- [46] J. C. Mottram, B. P. McCready, K. G. Brown, and K. M. Grant, “Gene disruptions indicate an essential function for the LmmCRK1 cdc2-related kinase of *Leishmania mexicana*,” *Molecular Microbiology*, vol. 22, no. 3, pp. 573–582, 1996.
- [47] R. Balana-Fouce, C. Garcia-Estrada, Y. Perez-Pertejo, and R. M. Reguera, “Gene disruption of the DNA topoisomerase IB small subunit induces a non-viable phenotype in the hemoflagellate *Leishmania major*,” *BMC Microbiology*, vol. 8, p. 113, 2008.
- [48] J. Lee, R. D. Moir, and I. M. Willis, “Differential Phosphorylation of RNA Polymerase III and the Initiation Factor TFIIB in *Saccharomyces cerevisiae*,” *PLoS ONE*, vol. 10, article e0127225, 2015.
- [49] P. Hu, K. Samudre, S. Wu, Y. Sun, and N. Hernandez, “CK2 Phosphorylation of Bdp1 Executes Cell Cycle-Specific RNA Polymerase III Transcription Repression,” *Molecular Cell*, vol. 16, no. 1, pp. 81–92, 2004.
- [50] M. Genestra, L. Cysne-Finkelstein, and L. Leon, “Protein kinase A activity is associated with metacyclogenesis in *Leishmania amazonensis*,” *Cell Biochemistry & Function*, vol. 22, no. 5, pp. 315–320, 2004.
- [51] P. M. L. Dutra, D. P. Vieira, J. R. Meyer-Fernandes, M. A. C. Silva-Neto, and A. H. Lopes, “Stimulation of *Leishmania tropica* protein kinase CK2 activities by platelet-activating factor (PAF),” *Acta Tropica*, vol. 111, no. 3, pp. 247–254, 2009.
- [52] N. Bachman, M. E. Gelbart, T. Tsukiyama, and J. D. Boeke, “TFIIB subunit Bdp1p is required for periodic integration of the Tyl retrotransposon and targeting of Isw2p to *S. cerevisiae* tDNAs,” *Genes & Development*, vol. 19, no. 8, pp. 955–964, 2005.

- [53] E. J. Milliman, Z. Hu, and M. C. Yu, "Genomic insights of protein arginine methyltransferase Hmt1 binding reveals novel regulatory functions," *BMC Genomics*, vol. 13, no. 1, p. 728, 2012.
- [54] K. Roy, J. Gabunilas, A. Gillespie, D. Ngo, and G. F. Chanfreau, "Common genomic elements promote transcriptional and DNA replication roadblocks," *Genome Research*, vol. 26, no. 10, pp. 1363–1375, 2016.



Hindawi

Submit your manuscripts at
www.hindawi.com

