



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

**Estudio molecular de E1p3, proteína asociada a la regulación de la transcripción, en
Leishmania major.**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

LUIS ALBERTO BAROCIO RODRÍGUEZ

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: Dr. Santiago Martínez Calvillo
Facultad de Estudios Superiores Iztacala, UNAM
COMITÉ TUTOR: Dr. Roberto Hernández Fernández
Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM
Dr. Julio César Carrero Sánchez
Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM

Los Reyes Iztacala, Tlalnepantla
Estado de México, Noviembre, 2020



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

COORDINACIÓN DEL POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA
OFICIO CPCB/668/2020
ASUNTO: Oficio de Jurado

M. en C. Ivonne Ramírez Wence
Directora General de Administración Escolar, UNAM
P r e s e n t e

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Subcomité de Ecología y Manejo Integral de Ecosistemas Biología Evolutiva y Sistemática, del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día **22 de junio de 2020** se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** en el campo de conocimiento de **Biología Experimental** del estudiante **BAROCIO RODRÍGUEZ LUIS ALBERTO**, con número de cuenta **310239428** con la tesis titulada **“Estudio molecular de Elp3, proteína asociada a la regulación de la transcripción, en *Leishmania major*.”**, realizada bajo la dirección del **DR. SANTIAGO MARTÍNEZ CALVILLO**, quedando integrado de la siguiente manera:

Presidente: DRA. INGEBORG DOROTHEA BECKER FAUSER
Vocal: DR. LUIS ENRIQUE ARIAS ROMERO
Secretario: DR. JULIO CÉSAR CARRERO SÁNCHEZ
Suplente: DRA. REBECA GEORGINA MANNING CELA
Suplente: DRA. EMMA CECILIA SAAVEDRA LIRA

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”
Cd. Universitaria, Cd. Mx., a 15 de octubre de 2020

COORDINADOR DEL PROGRAMA



DR. ADOLFO GERARDO NAVARRO SIGÜENZA



Agradecimientos Académicos

Al posgrado en Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Autónoma de México por la formación recibida.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, por la beca otorgada para cursar mis estudios de maestría (No. de CVU 924579).

A la Coordinación de Estudios de Posgrado (CEP) de la Universidad Nacional Autónoma de México por el apoyo otorgado mediante su "programa de becas de posgrado en la UNAM, no. de cta.: 310239428.

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

Al Dr. Santiago Martínez Calvillo, por la dirección del presente trabajo.

Al Dr. Roberto Hernández Fernández y al Dr. Julio César Carrero Sánchez, por la asesoría brindada durante el transcurso de mis estudios de maestría como miembros de mi comité tutor.

Índice

• Lista de tablas y figuras	
• Lista de abreviaturas	
Resumen	1
1. Introducción	3
1.1. Tripanosomátidos	3
1.1.2. Generalidades	3
1.1.3. Agentes patógenos y enfermedades	3
1.1.4. Biología celular	5
1.1.5. Clasificación taxonómica	6
1.2. Leishmania	8
1.2.1. Ciclo de vida	8
1.2.2. Distribución	9
1.2.3. Sistemática	11
1.2.4. Manifestaciones clínicas y enfermedades	12
1.2.4.1. Leishmaniasis cutánea (LC)	12
1.2.4.2. Leishmaniasis mucocutánea (LMC)	13
1.2.4.3. Leishmaniasis visceral (LV)	14
1.3. Transcripción	15
1.3.1. Mecanismos de regulación de la transcripción	17
1.3.2. Promotores y factores de transcripción de Pol II en eucariontes ...	19
1.3.3. Elongación de la transcripción de Pol II	20
1.3.4. Elp3 y el Complejo Elongador	22
1.3.5. Transcripción mediada por Pol I	25
1.3.6. Transcripción mediada por la RNA Pol III	26
1.4. Genómica de Tripanosomátidos	27
1.4.1. <i>Trans-splicing</i> y poliadenilación	30
1.4.2. Transcripción en tripanosomátidos	32
1.4.3. Isoformas de Elp3 en tripanosomátidos	33
2. Objetivos	34
2.1. Objetivo general	34
2.2. Objetivos particulares.....	34
3. Materiales y Métodos	35
3.1. Análisis <i>in silico</i>	35
3.2. Cultivo y conteo de parásitos	35
3.3. Extracción de DNA genómico	36
3.4. Amplificación de los genes por medio de reacción en cadena de polimerasa (PCR)	37

3.5. Ligación al vector pGEMT-Easy	38
3.6. Transformación de células competentes de <i>E. coli</i>	39
3.7. Purificación de plásmidos por minipreps	40
3.8. Subclonación en el vector pB6-PTP	40
3.9. Transfección de <i>Leishmania</i> por electroporación	41
3.9.1. Obtención de clonas celulares	42
3.10. Análisis de la expresión de la proteína recombinante	42
3.11. Purificación por afinidad en tándem	43
3.11.1 Concentración de las muestras para la espectrometría	45
4. Resultados	46
4.1. Análisis bioinformáticos	46
4.1.2. Análisis de la secuencia de Elp3a y Elp3a de <i>L. major</i>	46
4.1.3. Predicción de la estructura secundaria y tridimensional de Elp3 en <i>L. major</i>	54
4.2. Obtención de la línea celular Elp3a-PTP	56
4.2.1. Clonación de Elp3a en el vector pGEM-T Easy	56
4.2.2 Clonación de Elp3a en el vector pB6-PTP	58
4.3. Purificaciones por afinidad en tándem con la línea celular LmjF/Elp3b-PTP	63
4.4. Ensayo de purificación por afinidad en tándem con la línea LmjF/Elp3a-PTP	68
5. Discusión	73
6. Conclusiones y logros	81
6. Perspectivas	82
7. Referencias	83

Lista de tablas y figuras

Fig. 1.	Enfermedad del sueño o tripanosomiasis africana	4
Fig. 2.	Enfermedad de Chagas o tripanosomiasis americana.	4
Fig. 3.	Leishmaniasis.	5
Fig. 4.	Representación esquemática de la sección longitudinal de un epimastigote de <i>T. cruzi</i>	6
Fig. 5.	Clasificación taxonómica clásica de Tripanosomátidos.	7
Fig. 6.	Clasificación taxonómica de kinetoplastidios.	7
Fig. 7.	Las seis clases principales de morfotipos de los tripanosomátidos.	8
Fig. 8.	Ciclo de vida de <i>Leishmania</i>	9
Fig. 9.	Distribución global de la leishmaniasis.	10
Fig. 10.	Esquema de la clasificación de <i>Leishmania</i> que ilustra los tres subgéneros.	11
Fig. 11.	Leishmaniasis cutánea.	12
Fig. 12.	Leishmaniasis mucocutánea.	14
Fig. 13.	Paciente con leishmaniasis visceral.	14
Fig. 14.	RNA polimerasa de procariontes.	16
Fig. 15.	Características de las RNA polimerasas eucariotas.	17
Fig. 16.	Factores generales de la transcripción	18
Fig. 17.	Modelo de la regulación del reclutamiento y liberación de SWI/SNF	19
Fig. 18.	Modelo de la formación del complejo de pre-inicio (PIC) en el core del promotor de RNA Pol II.	21
Fig. 19.	Complejo de inicio de la elongación.	22
Fig. 20.	Complejo Elongador.	24
Fig. 21.	Roles biológicos desempeñados por el Complejo Elongador	25
Fig. 22.	Factores de inicio de la transcripción de Pol I.	26
Fig. 23.	Diagrama esquemático de la una porción de un cromosoma de <i>T. brucei</i>	29
Fig. 24.	Mecanismo de <i>trans-splicing</i>	31
Fig. 25.	Esquema de la cámara de Neubauer.	36
Fig. 26.	Mapa del vector PGEMT-Easy y sus puntos de referencia	39
Fig. 27.	Alineamiento de la secuencia de aminoácidos de Elp3a y Elp3b de <i>L. major</i>	47
Fig. 28.	Alineamiento de la secuencia de aminoácidos de Elp3a y Elp3b de <i>L. major</i> con Elp3 de otros organismos.	48
Fig. 29.	Alineamiento de la secuencia de aminoácidos de Elp3b de <i>L. major</i> con otros tripanosomátidos	51
Fig. 30.	Alineamiento de la secuencia de aminoácidos de	

Elp3a de <i>L. major</i> con otros tripanosomátidos.	53
Fig. 31. Esquematación de los dominios conservados de Elp3	54
Fig. 32. Predicción de la estructura tridimensional de las dos isoformas de Elp3 de <i>L. major</i>	55
Fig. 33. Modelo tridimensional de Elp3 de <i>D. mccartyi</i>	55
Fig. 34. Sobreposición de los tres modelos: Elp3a y b de <i>L. major</i> y Elp3 de <i>D. mccartyi</i>	55
Fig. 35. Amplificación por PCR del gen Elp3a de <i>L. major</i> ...	57
Fig. 36. Ensayo de restricción de la clona 8 con el vector pGLmElp3a	58
Fig. 37. Mapa del vector pGELmElp3a	58
Fig. 38. Mapa del vector pB6-PTP.	59
Fig. 39. Ensayo de restricción del vector Pb6-PTP	60
Fig. 40. Región purificada del vector pB6-PTP/ Gen Elp3 purificado del vector pGELmElp3a	60
Fig. 41. Ensayo de restricción del vector pLmElp3a-PTP	61
Fig. 42. Secuencia de nucleótidos y de aminoácidos de Elp3a unida a la bandera PTP.....	61
Fig. 43. Mapa del vector pLmElp3a-PTP	62
Fig. 44. Ensayo de Western-blot de la línea celular de LmjF/Elp3a-PTP	63
Fig. 45. Eluido final de la purificación por afinidad en tandem de LmjF/Elp3b-PTP	64
Fig. 46. Eluido final de la purificación por afinidad en tandem de LmjF/Elp3a-PTP	65
Fig. 47. Eluido final de la purificación por afinidad en tandem De LmjF/Elp3a-PTP por una sola columna	68
Tabla 1. Oligonucleótidos empleados para la amplificación del gen Elp3a en <i>L. major</i>	37
Tabla 2. Porcentajes de identidad entre ortólogos de Elp3... ..	49
Tabla 3. Porcentajes de identidad entre ortólogos de Elp3b en tripanosomátidos	50
Tabla 4. Porcentajes de identidad entre ortólogos de Elp3a en tripanosomátidos	52
Tabla 5. Proteínas identificadas en la purificación por afinidad en tandem con la línea celular LmjF/Elp3b-PTP	67
Tabla 6. Proteínas identificadas en la purificación por afinidad en tandem con la línea celular LmjF/Elp3a-PTP	70

Abreviaturas

CITFA	Factor de transcripción clase A
CPSF	Factor específico de corte y poliadenilación
CTD	Extremo carboxilo terminal
CYP	Ciclofilina
kDa	kilodalton
dNTPs	Desoxinucleótidos trifosfato
EDTA	Ácido etilendiaminotetracético
DPE	Elemento promotor río abajo
DUF	Dominio de función desconocida
eEF	Factor de elongación de la traducción eucariota
eIF	Factor de iniciación de la traducción eucariota
Elp3	Proteína elongadora 3
GNAT	Familia de N-acetiltransferasas asociadas a GCN5
HAT	Histona acetiltransferasa
Hsp	Proteína <i>heat-shock</i>
Inr	Elemento iniciador
kb	Kilobases
LC	Leishmaniasis cutánea
LMC	Leishmaniasis mucocutánea
LV	Leishmaniasis visceral
mcm5	5-metoxicarbonometil
METK	S-adenosilmetionania sintasa
mRNA	RNA mensajero
ncm5	5-carbonometil

NORs	Regiones organizadoras nucleolares
NTF	Factor de exportación nuclear
N-TEF	Factores de elongación negativos de la transcripción
NUP	Proteína nuclear
PABP	Proteína de unión a Poli-A
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PGC	<i>clusters</i> de genes policistrónicos
Pol I	RNA Polimerasa I
Pol II	RNA Polimerasa II
Pol III	RNA Polimerasa III
P-TEF	Factores de elongación positivos de la transcripción
PTP	ProtC-TEV-ProtA
RNA	Ácido ribonucleico
rRNA	RNA ribosomal
SAM	S-adenosilmetionina
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida con duodecil sulfato sódico
SL	<i>Spliced-leader</i>
SNAPc	Complejo proteico activador de snRNA
snRNA	RNA pequeño nuclear
SSR	Región de cambio de hebra
TAF 1	Factor asociado a proteína de unión a caja TATA 1
TBP	Proteína de unión a caja TATA
TCTP	Proteína tumoral controlada por traducción
TF	Factor de transcripción

tRNA	RNA de transferencia
TXN	Triparedoxina
UBF	Factor de unión río arriba
Ufc	Unidad formadora de colonia
UTP	Uridina-5'-trifosfato
UTR	Región no traducida
VSG	Glucoproteína variante de superficie
WHO	Organización Mundial de la Salud

Resumen

El Complejo Elongador participa en diversos procesos, incluyendo la regulación de la transcripción de la RNA Pol II a través de la acetilación de histonas, y la modificación de tRNAs. Dicho complejo se compone de 6 subunidades, Elp1-Elp6, siendo Elp3 la subunidad catalítica. De manera interesante, en *Leishmania* y otros tripanosomátidos sólo se encuentran ortólogos de Elp3, y no del resto de las subunidades del complejo. Este grupo de organismos se caracteriza porque todos sus miembros son protozoos parásitos unicelulares y por presentar una expresión génica atípica. Los tripanosomátidos son los únicos organismos con dos isoformas de la subunidad Elp3, llamadas Elp3a y Elp3b. En *T. brucei* se reportó que la isoforma Elp3b se localiza en el nucleolo y participa como un regulador negativo de la transcripción de RNA Pol I, mientras que de Elp3a sólo se ha determinado su localización nuclear. En nuestro laboratorio estamos interesados en el estudio de la transcripción y los factores que la regulan, por esta razón nos interesa dilucidar el papel que juegan Elp3a y Elp3b en la regulación génica de *L. major*.

En el presente trabajo se inició con el estudio de estas proteínas en el parásito, realizando un análisis *in silico* que reveló que Elp3a y Elp3b sólo guardan un 38% de identidad. No obstante, ambas isoformas presentan las dos secuencias características de ortólogos de Elp3: el dominio HAT y el dominio radical SAM. Asimismo, Elp3a y Elp3b de *L. major* presentan estructuras tridimensionales predichas muy parecidas entre sí, que además están muy conservadas en comparación con la estructura 3D reportada para Elp3 de *D. mccartyi*. Posteriormente se continuó con el estudio de Elp3a y Elp3b de *L. major* a través del uso de purificaciones por afinidad en tándem en donde se identificarían los complejos proteicos con los que interaccionan. Para ello, los genes de Elp3a y Elp3b se clonaron en un vector que contiene una bandera PTP. Los plásmidos obtenidos se electroporaron en células de *L. major*. Una vez obtenidas las poblaciones estables, se obtuvieron clones celulares y se confirmó la expresión de las proteínas recombinantes Elp3a-PTP y Elp3b-PTP por *Western-blot*. Se seleccionó una clona para cada vector y se comenzó con los ensayos de purificación por afinidad en tándem. Los complejos proteicos obtenidos se analizaron por espectrometría de masas. Ambas isoformas presentaron interacciones probables con una amplia cantidad de proteínas implicadas en diversas funciones, incluyendo la modificación de tRNAs (adenosilmetionina sintasa), la biogénesis ribosomal y la regulación de la transcripción (proteínas ribosomales S3 y L21, UTP1), la reparación del daño al DNA, y el procesamiento de mRNAs (Ku70, proteína ribosomal S3, proteínas con dominios ALBA), y la motilidad celular (tubulinas). Nuestros resultados sugieren que Elp3a y Elp3b podrían participar en múltiples funciones en *L. major*.

Abstract

The Elongator Complex participates in several processes, including the regulation of RNA polymerase II transcription through histone acetylation, and the modification of tRNAs. This complex consists of six subunits, Elp1-Elp6, being Elp3 the catalytic subunit. Interestingly, *Leishmania* and other trypanosomatids seem to have only Elp3 orthologs, as the other subunits of the complex have not been identified. All the members of this group are unicellular protozoan parasites that show atypical mechanisms of gene expression. The trypanosomatids are the only organisms that possess two isoforms of Elp3, named Elp3a and Elp3b. It was reported that the Elp3b isoform of *T. brucei* is located in the nucleolus and participates as a negative regulator of the transcription of RNA Pol I. Regarding Elp3a, it is only known that it is a nuclear protein. In our laboratory we are interested in elucidating the roles that Elp3a and Elp3b play in *L. major*. An *in silico* analysis revealed that Elp3a and Elp3b share only 38% sequence identity. However, both isoforms have the two characteristic sequences of the Elp3 orthologs: the HAT domain and the SAM radical domain. Likewise, Elp3a and Elp3b of *L. major* have very similar predicted three-dimensional structures, which are also highly conserved when compared to the 3D structure of Elp3 in the archaea *D. mccartyi*. To identify the proteins that interact with Elp3a and Elp3b of *L. major*, we performed tandem affinity purification experiments. To that end, the Elp3a and Elp3b genes were cloned into a vector containing a PTP flag, and the obtained plasmids were electroporated into *L. major* cells. Once the stable populations were generated, cell clones were obtained and the expression of the recombinant proteins Elp3a-PTP and Elp3b-PTP was assessed by Western blotting. A clone was selected for each vector and the purification experiments were performed. The protein complexes obtained were analyzed by mass spectrometry. Both isoforms exhibited probable interactions with a wide number of proteins involved in several cellular processes including modification of tRNAs (adenosylmethionine synthase), ribosomal biogenesis and regulation of transcription (ribosomal proteins S3 and L21, UTP1), DNA damage repair and the processing of mRNAs (Ku70, ribosomal protein S3, proteins with ALBA domains), and cell motility (tubulins). Therefore, our results suggest that Elp3a and Elp3b could participate in multiple functions in *L. major*.

1. Introducción

1.1. Tripanosomátidos

1.1.1. Generalidades

Los tripanosomátidos son protozoos flagelados, unicelulares y parásitos, que pertenecen a la familia *Trypanosomatidae*, del orden *Kinetoplastida* (Hamilton *et al.*, 2004). Los miembros de este orden se distinguen por la presencia de una mitocondria única y alargada que contiene DNA concatenado, formado por maxicírculos y minicírculos, conocido como cinetoplasto (Stuart *et al.*, 2008). Considerados como importantes agentes causantes de enfermedades en humanos y animales, incluido el ganado de importancia económica, todos los miembros de la familia *Trypanosomatidae* son parásitos obligados e incluyen a los patógenos responsables de la enfermedad del sueño africana (*Trypanosoma brucei*), la enfermedad de Chagas (*Trypanosoma cruzi*) y la leishmaniasis (*Leishmania* spp.) (Lukes *et al.*, 2018). Estos parásitos son transmitidos a un hospedero vertebrado por un insecto vector pero presentan diferentes dinámicas en sus estrategias de supervivencia y ciclos de vida. Los insectos hematófagos que participan como vectores de estos organismos son la mosca tse-tsé (*T. brucei*), el triatoma (*T. cruzi*) y la mosca de arena (*Leishmania*). Además de su importancia médica, los tripanosomátidos muestran numerosas particularidades metabólicas y funcionales que resultan de gran importancia científica (Stuart *et al.*, 2008).

1.1.2. Agentes patógenos y enfermedades

Los tripanosomátidos presentan una amplia distribución a lo largo del mundo, principalmente en las zonas tropicales y subtropicales, provocando diversas enfermedades en el humano, lo cual los ha colocado como organismos de gran importancia desde el punto de vista de la salud pública. La tripanosomiasis africana o enfermedad del sueño, como se le conoce comúnmente, se transmite al ser humano por la picadura de la mosca tse-tsé, del género *Glossina*. Dicha enfermedad es causada por el parásito *T. brucei*, particularmente por las subespecies *T. brucei gambiense* y *T. brucei*

rhodesiense. Cuando el parásito es introducido al torrente sanguíneo a través de la picadura de la mosca, prolifera hasta invadir el sistema nervioso central (Kennedy, 2004) (**Figura 1**).



Fig. 1. Enfermedad del sueño o tripanosomiasis africana. Modificado de Simo *et al.*, 2020; Kaba *et al.*, 2014.

La tripanosomiasis americana o enfermedad de Chagas se extiende por toda América Latina. Afecta principalmente a personas cuya vivienda proporciona hábitat para los insectos de la familia *Reduviidae*, comúnmente llamadas “chinchas besuconas”, que actúan como vector del parásito *T. cruzi*, causante de dicha enfermedad (**Figura 2**). Existen muchos mamíferos que funcionan como reservorios del parásito, ya sea animales domésticos o silvestres (Benchimol, 2006). La infección con *T. cruzi* también puede ser el resultado de una transfusión sanguínea, trasplante de órganos, transmisión vertical y por la ingestión de alimentos o bebidas contaminados (Camandaroba *et al.*, 2002).

Se estima que cerca del 30% de las personas infectadas con *T. cruzi* desarrollan la enfermedad de Chagas de manera clínica, que se manifiesta como una enfermedad cardíaca o como un agrandamiento intestinal patológico (Stuart, 2008).



Fig. 2. Enfermedad de Chagas o tripanosomiasis americana. Modificado de Costa, *et al.*, 2013; Lima, *et al.*, 2015.

Leishmania spp. es el agente causal de la leishmaniasis, enfermedad que se presenta en diversas partes del mundo debido a la amplia distribución de su agente etiológico (Grevelink & Lerner, 1996) (**Figura 3**). Dicha enfermedad es comúnmente transmitida al humano a través de la picadura de la mosca de la arena provocando diversos tipos de leishmaniasis: leishmaniasis cutánea (LC), leishmaniasis visceral (LV; también conocida como kala-azar) y la leishmaniasis mucocutánea (LM) (Stuart, 2008).



Fig. 3. Leishmaniasis. Modificado de Trájer & Sebestyén 2019; Hailu, *et al.*, 2005; Davies, *et al.* 2003

1.1.3. Biología celular

Dentro del grupo de los tripanosomátidos todos los organismos comparten muchos aspectos de su biología celular. Por ejemplo, todos son protozoos móviles con un flagelo que se origina en la bolsa flagelar, cerca del cinetoplasto (**Figura 4**). Por otro lado, los tripanosomátidos también poseen características particulares que los diferencian de otros eucariotas, por ejemplo, típicamente se reproducen asexualmente por fisión binaria; y durante la división celular su membrana nuclear no se disuelve ni sus cromosomas se condensan. Además, sus peroxisomas están modificados para llevar a cabo la glucólisis, por lo que reciben el nombre de glicosomas (**Figura 4**). Además, su citoesqueleto está constituido por una capa de microtúbulos que se localizan bajo la membrana celular, y su superficie celular se encuentra cubierta por proteínas específicas que son críticas para su supervivencia (Handman, 1999).

Los tripanosomátidos poseen una masa de DNA mitocondrial llamado cinetoplasto, característico del orden *Kinetoplastida*. El cinetoplasto, como se mencionó anteriormente, contiene un cúmulo de DNA concatenado formado por

decenas de maxicírculos y cientos de minicírculos que se encuentran unidos formando una red. Dentro del cinetoplasto se lleva a cabo la edición de mRNA mediante la inserción y deleción de residuos de uridinas en sitios específicos del RNA naciente, lo cual conduce a la creación de marcos de lectura correctos (Simpson, 1987).

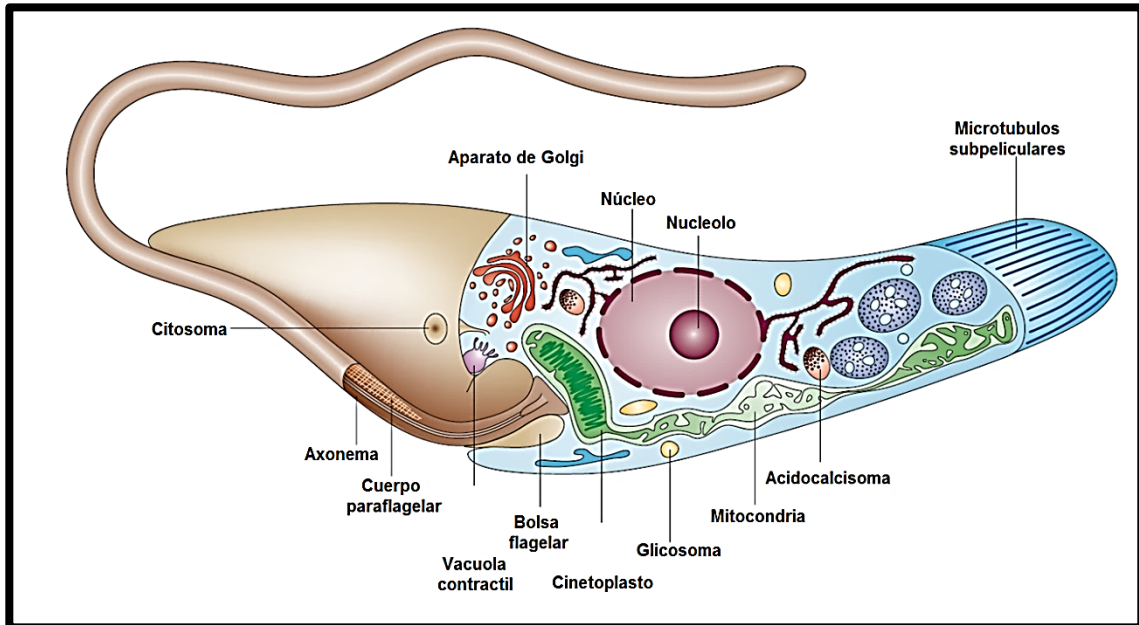


Fig. 4. Representación esquemática de la sección longitudinal de un epimastigote de *T. cruzi*. Muestra las principales estructuras internas y organelos encontrados en todos los tripanosomátidos. Modificado de Lopes, *et. al.* 2010.

1.1.4. Clasificación taxonómica

Los tripanosomátidos son un grupo diverso de parásitos protozoarios evolutivamente exitosos, ya que se encuentran en casi todo el planeta y parasitan a gran cantidad de mamíferos, invertebrados y plantas (Lopes *et. al.*, 2010). La mayoría de los tripanosomátidos son predominantemente monoxenos; sin embargo, algunos tripanosomátidos ocupan un nicho heteroxeno, tal es el caso de *Phytomonas*. Pero dentro de los tripanosomátidos destacan los géneros *Trypanosoma* y *Leishmania*, ya que poseen ciclos de vida zoonóticos y antroponóticos, y se transmiten por insectos hematófagos (Kaufer *et al.*, 2017).

En el esquema clásico, los tripanosomátidos se sitúan en el filo Sarcomastigophora, clase Zoomastigophora y orden kinetoplastidia (**Figura 5**). Actualmente nuevas técnicas moleculares han promovido modificaciones

importantes en el esquema de la clasificación taxonómica clásica de los tripanosomátidos. Fue en el 2005 cuando Adl y colaboradores propusieron una nueva clasificación donde se incluyeron organismos considerados por Cavalier-Smith en 1998, además de estar basada en evidencias moleculares que colocan a seis nuevos súper grupos: Amebozoa, Chromalveolata, Archaeplastida, Excavata, Opisthokonta y Rhizaria (Adl *et al.* 2007).

Taxonomía	
Reino	Protista
Subreino	Protozoa
Phylum	Sarcomastigofora
Subphylum	Mastigofora
Clase	Zoomastigofora
Orden	Kinetoplastida
Familia	Trypanosomatidae (Doflein, 1901)

Fig. 5. Clasificación taxonómica clásica de tripanosomátidos (Simpson *et al.*, 1987).

Dentro de esta clasificación los tripanosomátidos se sitúan en el súper grupo “Excavata” que se caracteriza por incluir algunos grupos de organismos considerados como antecesores del linaje eucariota, que anteriormente carecían de mitocondria (**Figura 6**) (Keeling *et al.* 2005).

Súper Grupo	Primer Clado	Segundo Clado
Excavata	Fornicata, Malawimonas Parabasalia Preaxostyla Jakobida Heterolobosea <u>Euglenozoa</u>	Carpediemonas, Eopharyngia Cristamonadida, Spirotrichonymphida, Trichomonadida Trichonymphida Oxymonadida, Trimastix Histionidae, Jakobacrasidae, Gruberellidae, Vahlkampfiidae Euglenida, Diplonemea, <u>Kinetoplastea</u>

Fig. 6. Clasificación taxonómica de kinetoplastidios (Keeling *et al.* 2005).

1.2. *Leishmania*

1.2.1. Ciclo de vida

Los tripanosomátidos presentan ciclos de vida bastante complejos que involucran varios estadios de desarrollo, ya sea en el insecto vector o en el hospedero mamífero. Dependiendo del estadio en donde se encuentren,

presentan diversas morfologías que varían en cuanto a dimensión, forma y sitio donde emerge el flagelo (Lopes, *et. al.* 2010) (**Figura 7**).

Leishmania es un parasito digénico, lo que significa que parte de su ciclo de vida lo realiza en el tubo digestivo de un hospedero invertebrado (en forma flagelar o promastigote) y otra parte en el hospedero mamífero (en forma aflagelar o amastigote) (Morales, 2002).

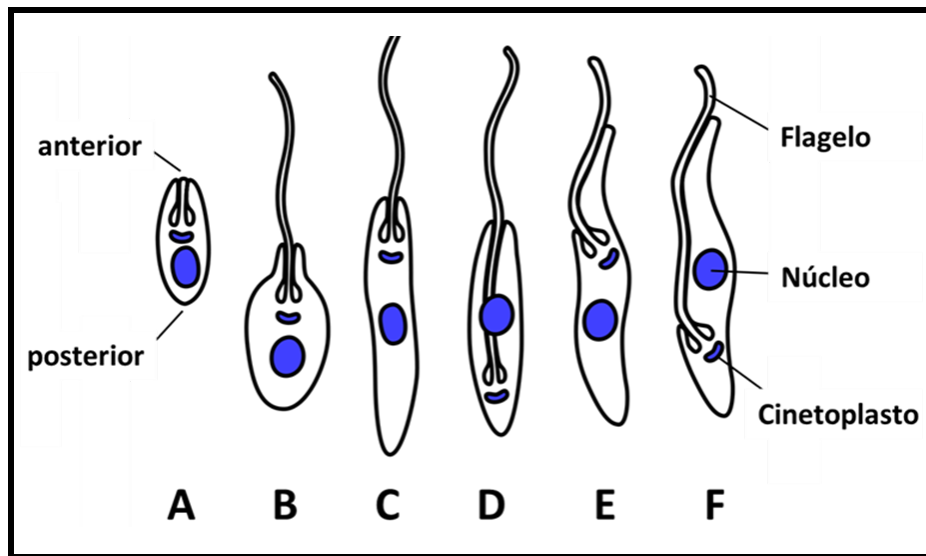


Fig. 7. Las seis clases principales de morfotipos de los tripanosomátidos. A Amastigote. **B** Coanomastigote. **C** Promastigote. **D** Opistomastigote. **E** Epimastigote. **F** Tripomastigote (Kaufer *et al.* 2017).

Como se mencionó anteriormente, el ciclo de vida de *Leishmania* requiere la alternancia entre un hospedero mamífero y un hospedero artrópodo, conocido comúnmente como mosca de arena de los géneros *Phlebotomus* y *Lutzomyia* (**Figura 8**). El ciclo de vida de *Leishmania* inicia cuando la forma infecciosa del parásito, el promastigote metacíclico, es transmitido a un hospedero vertebrado por la picadura de la mosca de arena (Bates & Rogers, 2004). Estas formas son fagocitadas por los macrófagos y dentro de los fagolisosomas se diferencian en amastigotes intracelulares, los que se multiplican por división simple y pueden invadir otros tejidos del hospedero al lisar al macrófago por carga parasitaria (Gossage, *et al.* 2003). Posteriormente los amastigotes presentes en la sangre son tomados por el insecto al alimentarse del organismo infectado, donde se diferencian en promastigotes procíclicos, siendo esta una forma replicativa. Éstas se unen a la pared del intestino medio y migran al aparato bucal de la

mosca, diferenciándose en promastigotes metacíclicos infectivos (**Figura 8**) (Handman, 1999).

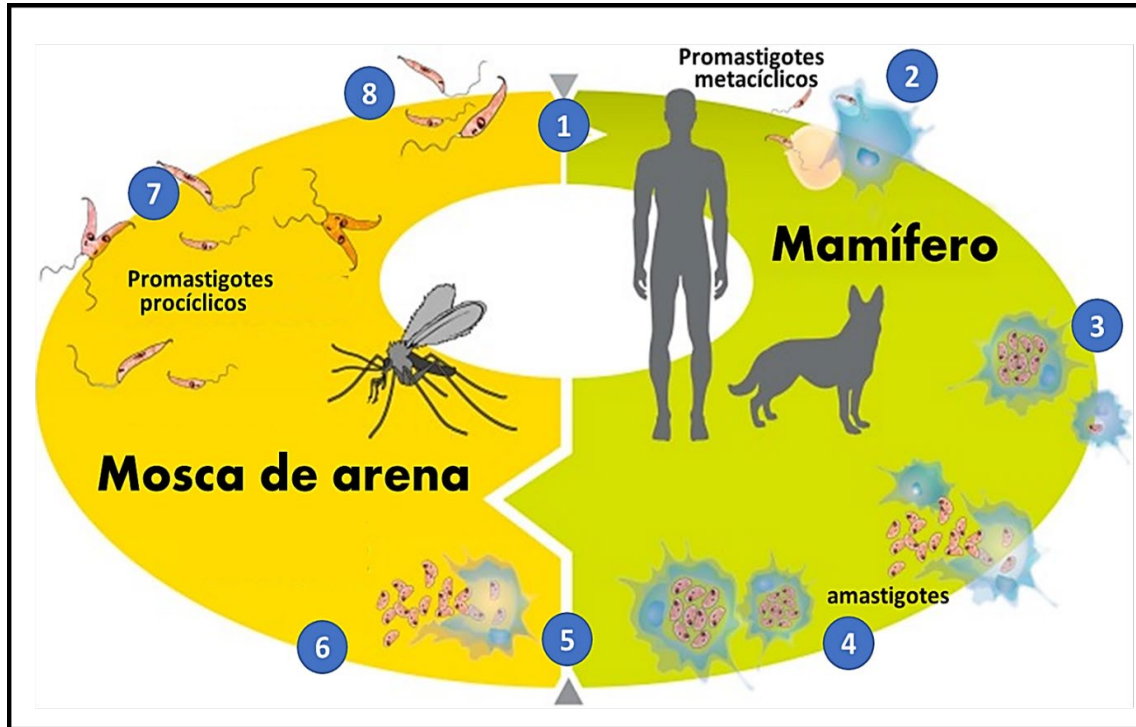


Fig. 1. Ciclo de vida de *Leishmania*. 1) Los promastigotes metacíclicos son transmitidos al hospedero mamífero a través de la picadura de la mosca de arena. 2) Los promastigotes alcanzan la herida de punción y son fagocitados por macrófagos. 3) Dentro de los fagolisosomas los promastigotes se diferencian en amastigotes. 4) Los amastigotes se multiplican por división simple, lisan al macrófago y proceden a infectar otras células fagocíticas mononucleares. 5) Una mosca puede ingerir los amastigotes al alimentarse de la sangre del mamífero infectado. 6) Dentro de la mosca de arena los amastigotes viajan de la probóscide al estómago. 7) En el intestino de la mosca los amastigotes se transforman en promastigotes procíclicos, forma replicativa. 8) Los promastigotes procíclicos migran a la probóscide del mosquito diferenciándose en promastigotes metacíclicos. Modificado de Veras & Bezerra de Menezes, 2016.

1.2.2. Distribución

La leishmaniasis es una enfermedad que representa un importante problema de salud pública a nivel mundial, ya que es endémica de 98 países en los cinco continentes, teniendo mayor prevalencia en África, América del sur y Medio Oriente (**Figura 9**). Existen alrededor de 20 especies de parásitos protozoarios del género *Leishmania* que se sabe que son patógenas para el ser humano. La distribución geográfica de cada especie determina el tipo de enfermedad que ocurre en cada región, así como su gravedad.

Se estima que actualmente existe un promedio de 12 millones de infectados, y 0.9-1.6 millones de nuevos casos emergentes por año. Los casos han ido en

aumento debido a los cambios climáticos (WHO, 2006). Más del 90% de la leishmaniasis visceral (LV) a nivel global ocurre en seis países: Bangladesh, Brasil, Etiopía, India, Sudán del Sur y Sudán. Además, los países con los recuentos de casos estimados más altos para la forma cutánea (LC) de la enfermedad son: Afganistán, Argelia, Colombia, Costa Rica, Etiopía, Irán, Perú, Sudán y Siria, que en conjunto representan del 70% al 75% de la incidencia global estimada de la leishmaniasis cutánea (Alvar *et al.*, 2012; WHO, 2016). Los casos de leishmaniasis mucocutánea se concentran en un 90% en Bolivia, Brasil y Perú, y son producidos por *L. braziliensis*.

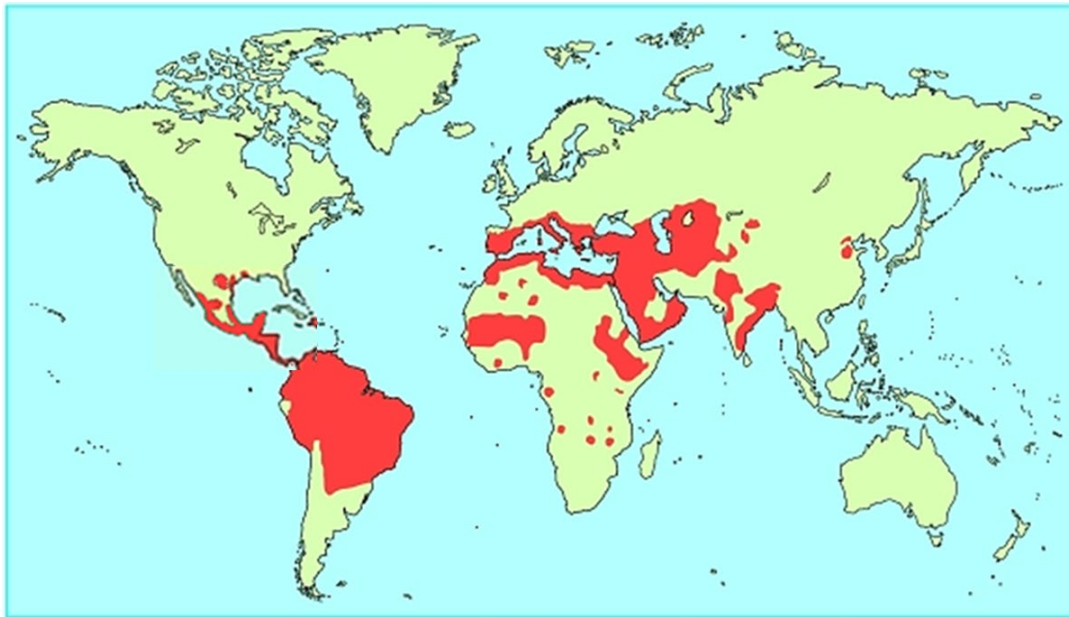


Fig. 2. Distribución global de la leishmaniasis. La enfermedad se presenta en zonas tropicales y subtropicales de casi todo el mundo. Las áreas resaltadas en color rojo representan zonas de casos reportados de personas infectadas con este parásito (Davies, *et al.* 2003).

En México se han reportado tres especies de *Leishmania*: *L. mexicana*, *L. infantum* y *L. braziliensis*. La leishmaniasis cutánea, producida por *L. mexicana*, se presenta principalmente en la región del suroeste del país (Campeche, Yucatán, Quintana Roo, Tabasco y Chiapas), donde es conocida comúnmente como “úlceras de los chicleros”. Por otro lado, los estados donde se han registrado casos de leishmaniasis visceral son: Puebla, Guerrero, Chiapas, Oaxaca y Morelos (Trejo *et al.*, 1993). Este tipo de leishmaniasis es causado por *L. infantum*.

1.2.3. Sistemática

La clasificación del género *Leishmania* se basó inicialmente en criterios ecobiológicos como el vector, la distribución geográfica, el tropismo, las propiedades antigénicas y la manifestación clínica. El género *Leishmania* es un grupo monofilético con tres subgéneros distintos: *Leishmania*, *Viannia*, y *Sauroleishmania* (**Figura 10**) (Lainson & Shaw, 1987). Las especies del subgénero *Leishmania* producen leishmaniasis cutánea y visceral y se encuentran presentes en el Viejo y Nuevo Mundo, mientras que las especies del subgénero *Viannia* son causantes de leishmaniasis cutánea y/o mucocutánea sólo en el Nuevo Mundo. Los subgéneros *Leishmania* y *Viannia* se separan en función a la ubicación del parásito en el intestino del vector. Por otro lado, las especies que pertenecen al subgénero *Sauroleishmania* no son patógenas para el humano, ya que sólo infectan reptiles (Bates, 2007).

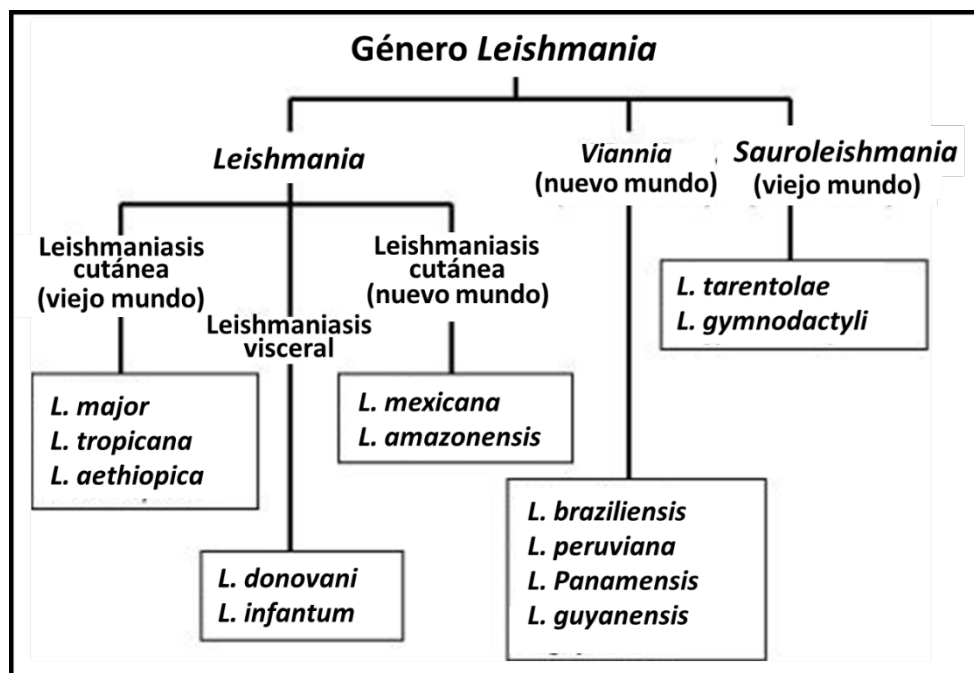


Fig. 10. Esquema de clasificación de *Leishmania* que ilustra los tres subgéneros. Se muestran las especies más conocidas y que representan el foco en la investigación biomédica. Los parásitos en los subgéneros *Leishmania* y *Viannia* infectan a los mamíferos, mientras que los *Sauroleishmania* infectan a los reptiles como sus hospederos vertebrados. Modificado de Bates, 2007.

1.2.4. Manifestaciones clínicas y enfermedades

Se sabe que la especie de *Leishmania* determina el tipo de leishmaniasis en el hospedero. Sin embargo, esto depende de diversos factores que incluyen: la saliva del mosquito, la genética del hospedero y la inmunosupresión (Fantoni *et al.*, 1994). Por otro lado, se conocen más de 90 especies de flebotominos transmisores de *Leishmania*. La enfermedad se presenta en tres formas principales:

1.2.4.1. Leishmaniasis cutánea (LC)

La leishmaniasis cutánea es la forma más frecuente de leishmaniasis, y produce lesiones cutáneas en las regiones expuestas del cuerpo, sobre todo ulcerosas, que dejan cicatrices de por vida y pueden llegar a ser causa de discapacidad grave (**Figura 11**) (Arevalo *et al.*, 2007). La lesión comienza como una pequeña zona de eritema en el lugar de la picadura que evoluciona a pápula y aumenta de tamaño. Posteriormente, puede ulcerarse en el centro y presentar un borde sobreelevado, bien definido e hiperpigmentado (Markle & Makhoul, 2004). Las úlceras pueden ser secas o exudativas. En otras ocasiones la lesión no se ulcera, pero puede desarrollar hiperqueratosis o evolucionar a una forma nodular. Son frecuentes las lesiones satélites. La mayoría de las veces se ven afectadas las zonas expuestas y no hay dolor local. Pueden aparecer adenopatías regionales. La complicación más frecuente es la sobreinfección bacteriana (Rosal-Rabes *et al.*, 2010)



Fig. 11. Leishmaniasis cutánea. Niño sirio diagnosticado con leishmaniasis cutánea que presenta múltiples lesiones nodulares en la mejilla derecha. Tomado de Inci *et al.*, 2015.

La manera directa y más fácil para el diagnóstico de la leishmaniasis cutánea es la obtención de muestras de piel, ya sea por raspado o biopsia en la lesión, así

como el aspirado. Por otro lado, también se pueden realizar distintas tinciones para identificar la presencia de amastigotes en las lesiones, así como realizar cultivos celulares de al menos 4 semanas para observar la presencia del parásito.

La leishmaniasis cutánea tiende a curarse espontáneamente en 6-12 meses y dejan cicatriz (Reithinger *et al.*, 2007). El tratamiento farmacológico mejora la cicatrización y previene la diseminación parasitaria y las recaídas. Suele indicarse en casos persistentes (duración superior a 6 meses), y en lesiones múltiples o de gran tamaño. Los antimoniales pentavalentes, parenterales o intralesionales, han sido durante décadas el único tratamiento disponible, pero en los últimos años han aparecido nuevas alternativas: anfotericina B, pentamidina, miltefosina y termoterapia (Khatami *et al.*, 2007).

1.2.4.2. Leishmaniasis mucocutánea (LMC)

La leishmaniasis mucocutánea se debe sobre todo a la infección por *L. braziliensis*, pero en ocasiones por otras especies de *Leishmania* como *L. major* (Normohamadpur & Ghaedi, 2008). Se estima que la leishmaniasis mucocutánea se desarrolla como una complicación de leishmaniasis cutánea en 5-20% de los pacientes no tratados que viven en áreas donde la leishmaniasis es endémica (Ahluwalia *et al.*, 2004). Se cree que los parásitos se diseminan desde la lesión cutánea inicial a través de los vasos linfáticos y la sangre hacia los tejidos nasofaríngeos. Los signos y síntomas de la leishmaniasis mucosa generalmente se desarrollan meses o años después de la aparición de la lesión cutánea. Conduce a la destrucción parcial o completa de las membranas mucosas de la nariz, la boca y la garganta. Más del 90% de los casos de leishmaniasis mucocutánea se producen en Brasil, Bolivia, Etiopía y Perú (Ruoti *et al.*, 2013).

La leishmaniasis mucosa comienza con una úlcera que cicatriza espontáneamente (**Figura 12**); las lesiones mucosas progresivas podrían no evidenciarse hasta meses o años después e incluso los síntomas de dicha enfermedad pueden presentarse hasta después de 20 años de haber adquirido el parásito a través de la picadura del vector (WHO, 2016).

Por lo general, los pacientes tienen congestión nasal, secreción y dolor. Con el tiempo, la infección puede progresar, dando como resultado la mutilación de la nariz, el paladar, o la cara (Bains *et al.*, 2016).



Fig. 12. Leishmaniasis mucocutánea. Tomado de Bosch-Nicolau *et al.*, 2019.

1.2.4.3. Leishmaniasis visceral (LV)

La leishmaniasis visceral (LV), también conocida como enfermedad de Kala-azar, es causada en América por *L. infantum* (Maurício *et al.*, 2000) y en el Viejo Mundo por *L. donovani* y *L. infantum* (Piscopo & Mallia 2006). Estas especies, conocidas como viscerotrópicas, infectan preferentemente los macrófagos y las células dendríticas en los intestinos, y los parásitos se localizan rápidamente en el hígado, el bazo y la médula ósea (**Figura 13**) (Wilson *et al.*, 2005).



Fig. 13. Leishmaniasis visceral. Paciente de Uganda infectado con LV. Tomado de Chappuis *et al.*, 2007.

Es una enfermedad crónica y sistémica que afecta principalmente a niños menores de cinco años; puede estar asociada a la desnutrición y a otras condiciones de inmuno supresión como VIH-SIDA. Si no se instaura un tratamiento adecuado en

forma oportuna, puede evolucionar hacia la muerte en más del 90% de los casos (Davies *et al.*, 2000).

El período de incubación puede oscilar entre 10 días y 24 meses, con una media de 2 a 6 meses. La infección se caracteriza por un amplio espectro clínico, que puede variar desde manifestaciones clínicas leves (oligosintomáticas), hasta moderadas y graves (Ready, 2014).

Las manifestaciones clásicas de la LV son: fiebre que puede ser constante o irregular, pérdida de peso, esplenomegalia que se manifiesta en la gran mayoría de los pacientes, hepatomegalia que puede o no estar presente, palidez causada por anemia grave, leucopenia, trombocitopenia y pérdida de peso que ocurre de forma lenta y progresiva (Flores *et al.*, 2004). Otros signos y síntomas secundarios incluyen trastornos respiratorios o gastrointestinales, como vómitos y diarrea. En los casos graves hay desnutrición y edema de miembros inferiores, que puede progresar a anasarca. Otros signos importantes son hemorragias (gingival, epistaxis), petequias, ictericia y ascitis. En estos pacientes, la muerte es determinada generalmente por infección bacteriana o sangrado.

El diagnóstico de la LV se lleva a cabo a través de ensayos inmunológicos o a través de la detección del parásito en tejidos infectados principalmente a través de la aspiración de médula, por otro lado, también el diagnóstico se puede llevar a cabo usando técnicas moleculares como PCR para la detección de *Leishmania*, y al igual que en los demás tipos de leishmaniasis el tratamiento más recomendado es el uso de antimoniales (Kumar *et al.*, 2020).

1.3. Transcripción

En nuestro laboratorio estamos interesados en analizar el proceso de transcripción genica, proceso fisiológico fundamental que muestra características únicas en este organismo de divergencia temprana.

La transcripción es un proceso que consiste en la síntesis de RNA usando como molde DNA y significa el paso de información contenida en el DNA hacia RNA. La transferencia de la información del DNA al RNA se realiza siguiendo las reglas de complementariedad de bases nitrogenadas. El RNA producido recibe el nombre de transcrito. Dicho proceso es mediado por enzimas llamadas RNA polimerasas dependientes de DNA (Decker & Hinton, 2013).

El proceso de transcripción en eucariontes y procariontes difiere en varios aspectos, por lo que se estudian por separado. En procariontes existe solamente una RNA polimerasa que es capaz de sintetizar todos los tipos de RNA. Dicha polimerasa está formada por varios polipéptidos, el núcleo central de la enzima tiene dos cadenas tipo α y dos β . Además, la enzima completa u holoenzima tiene la subunidad σ que es necesaria para la transcripción (**Figura 14**). Una vez iniciada la transcripción, la subunidad σ (o factor σ) se libera y el núcleo central continúa con la elongación (Browning & Busby, 2016).

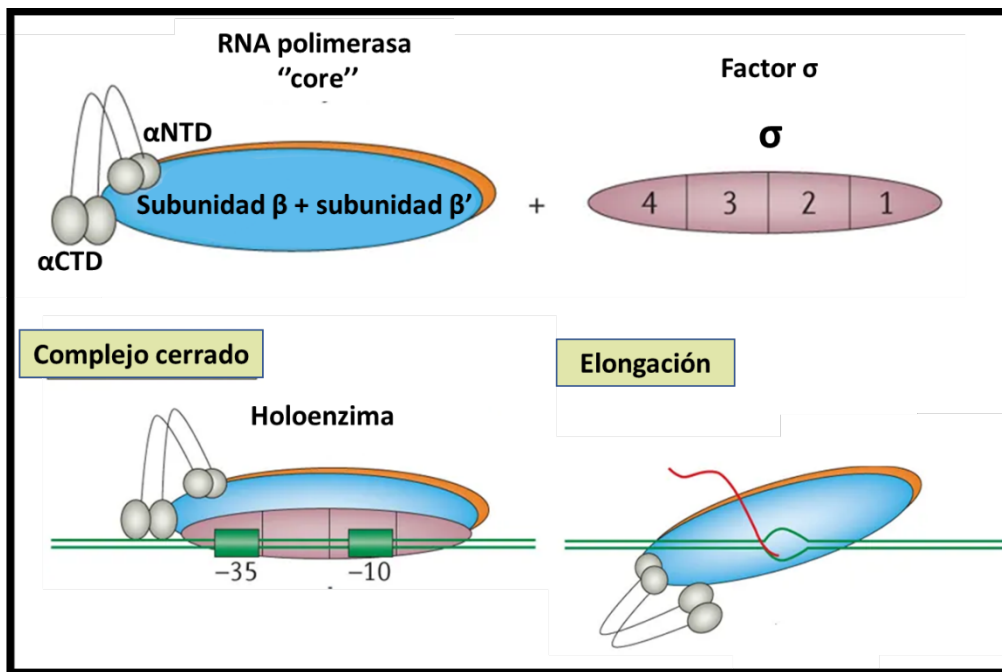


Fig. 14. Transcripción en procariontes. Se esquematiza el *core* enzimático de la RNA polimerasa (subunidad β y β' , y las dos subunidades α) y el factor σ , así como la holoenzima, la cual comprende tanto al *core* como al factor σ . También se muestra la polimerasa en su fase de elongación en donde no está presente la holoenzima, ya que ocurrió el escape del factor σ . Modificado de Browning & Busby, 2016.

La transcripción en eucariontes es bastante compleja ya que depende de muchas proteínas, incluidos los factores de transcripción (FT), los remodeladores de cromatina y los componentes de las diferentes RNA polimerasas. Las tres RNA polimerasas codificadas en el núcleo se enumeran como Pol I, Pol II y Pol III, en función del orden en el que éstas eluyen cuando se realiza una cromatografía de intercambio iónico con un extracto nuclear (Cramer *et al.*, 2008).

Enzima	Localización	Copias/cél	Producto	Actividad de la polimerasa	Sensibilidad a α -amanitina
RNA Pol I	Nucleolo	40,000	pre-rRNA (35-47s)	50-70%	Ninguna
RNA Pol II	Nucleoplasma	40,000	hnRNA snRNA (U1,U2,U4,U5)	20-40%	Alta
RNA Pol III	Nucleoplasma	20,000	rRNA 5S tRNA snRNA U6 RNA 7SL Otros RNA de < 300 pb	~10%	Específica de especie

Fig. 15. Características de las RNA polimerasas eucariotas (Conaway *et al.*, 1994).

Las tres Pol transcriben distintos genes, se localizan en diferentes compartimentos, son susceptibles a distintos inhibidores y tienen un tamaño en torno a 600 kDA.

Pol I sintetiza los precursores de RNA ribosomales (rRNA), mientras que Pol II produce los RNA mensajeros (mRNAs) y la mayoría de los RNA pequeños nucleares (snRNA), entre otras moléculas de RNA. Por otro lado, Pol III es responsable de la síntesis del rRNA 5S, los RNAs de transferencia (tRNA) y de U6 snRNA, entre otros (Conaway *et al.*, 1994) (**Figura 15**).

Una característica importante que diferencia a las polimerasas de eucariontes es que no se fijan directamente al DNA para proceder a la transcripción, sino que lo hacen mediante factores proteicos adicionales. Las proteínas necesarias para la iniciación de la transcripción, pero que no forman parte como tal de la RNA polimerasa, se definen como factores de transcripción (FT). Muchos factores de transcripción actúan reconociendo sitios activos en *cis* que se clasifican como parte de los promotores o como *enhancers*. Sin embargo, la unión directa al DNA no es el único medio de acción de un factor de transcripción, pues éstos pueden interactuar con otro factor o con la RNA polimerasa (Dieci *et al.*, 2007).

Existe otra diferencia en la transcripción en eucariontes con respecto a procariontes, y es el hecho de que, una vez transcrito el mRNA, este debe ser

procesado y escindir intrones de la molécula para posteriormente unir exones, en un proceso que se conoce como "splicing" (Conaway, 1994).

1.3.1. Mecanismos de regulación de la transcripción

La transcripción es un proceso altamente regulado en sus diferentes fases: iniciación, elongación y término. Dicho proceso se regula a diferentes niveles, siendo los factores de transcripción los reguladores de la expresión génica por excelencia, pues estimulan o reprimen la tasa transcripcional de sus genes blanco al unirse a regiones promotoras específicas o a otros factores. Esto activa o desactiva cascadas de señalización intracelular (Ji *et al.*, 2018).

Existen dos tipos de factores de transcripción: los basales o generales y los regulatorios o específicos. Los primeros pertenecen a un grupo mínimo de proteínas requeridas para la iniciación de la transcripción; en contraste a éstos, los factores de transcripción regulatorios o específicos se unen de manera directa o indirecta al aparato de transcripción basal y actúan ya sea como factores constitutivos o inducibles (Smid *et al.*, 1995) (**Figura 16**).

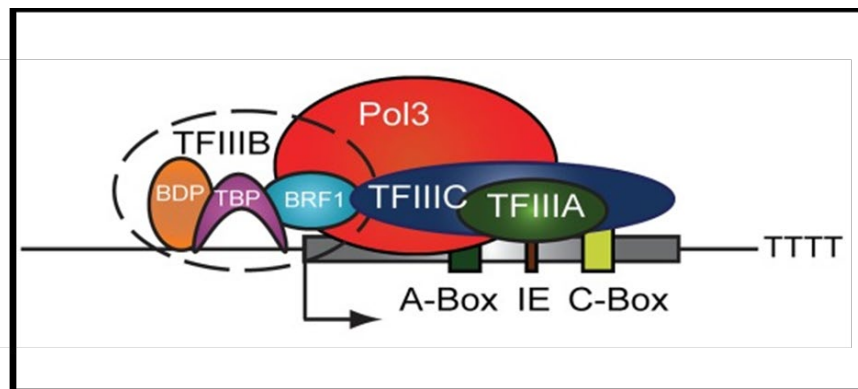


Fig. 16. Factores generales de la transcripción. Se muestra la estructura típica de un promotor tipo I (promotor de rRNA 5S), transcrita por Pol III y los factores generales de la transcripción necesarios para el inicio de la transcripción: TFIIA, TFIIIC y TFIIIB, este último con sus respectivas subunidades. Modificado de Alla & Cairns, 2014.

Por otro lado, existe otro tipo de regulación que tiene que ver con el hecho de que los nucleosomas son entidades dinámicas en donde su posición o estructura

en la molécula de DNA puede, o debe, alterarse durante la regulación transcripcional, proceso denominado como remodelación de la cromatina. Uno de los primeros complejos remodeladores de la cromatina descrito fue SWI/SNF, capaz de alterar la estructura de los nucleosomas utilizando la energía liberada por la hidrólisis de ATP. También existen moléculas capaces de generar modificación en la cromatina como la metilación o las modificaciones postraduccionales de los extremos amino y carboxilo terminales de las histonas, todas ellas regulando de algún modo el proceso de transcripción (Dutta *et al.*, 2014) (**Figura 17**).

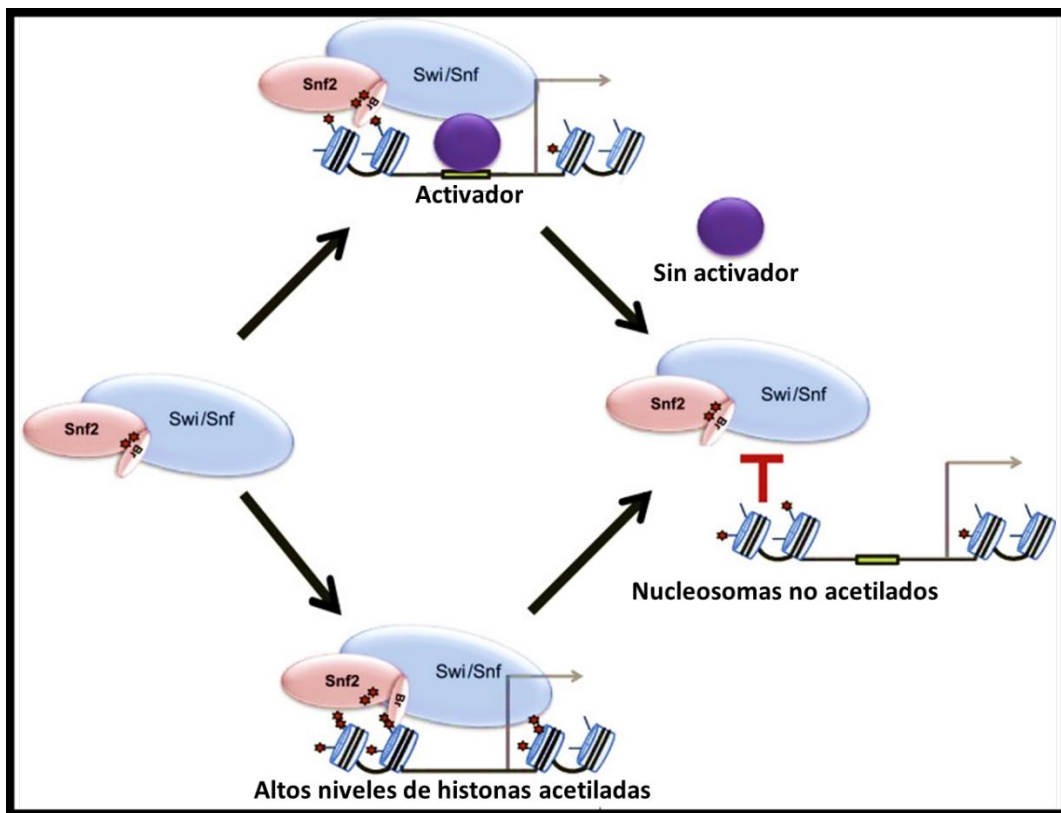


Fig. 17. Modelo de la regulación del reclutamiento y liberación de SWI/SNF. SWI/SNF puede ser reclutado a genes mediante activadores y por la acetilación de histonas. Los altos niveles de acetilación de histonas ayudan a competir contra la acetilación de Snf2, lo que permite la interacción con el bromodominio. Actuando simultáneamente o en paralelo, el activador promueve el reclutamiento de SWI/SNF ya que puede estabilizar aún más la ocupación de SWI/SNF. Cuando los genes se desactivan, los activadores se liberan rápidamente de los promotores de genes. Tomado de Dutta *et al.*, 2014.

1.3.2. Promotores y factores de transcripción de Pol II en eucariontes

RNA Pol II es responsable de la síntesis de todos los mRNA en eucariontes. La transcripción de Pol II es el primer paso en la expresión génica y un punto focal en la regulación celular. Pol II fue descrita por primera vez en levadura y se compone de 12 subunidades. Por otro lado, las regiones promotoras de Pol II comprenden típicamente ~40 bases y contienen subregiones funcionales llamadas promotores basales. Estos elementos incluyen a la caja TATA, el iniciador (Inr) y el elemento promotor río abajo (DPE) (**Figura 18**). Para que se pueda dar inicio a la transcripción por parte de Pol II se requiere del montaje del complejo de preinicio (PIC, por sus siglas en inglés), el cual comprende los factores de transcripción basales, TFIIA, TFIIB, TFIID, TFIIIE, TFIIF y TFIIH, así como el complejo coactivador mediador (Roy *et al.*, 2011). El complejo de iniciación comprende ~70 polipéptidos y tiene un peso molecular de ~ 4 MDa. La iniciación de la transcripción implica tres etapas principales: 1) la formación de un complejo promotor cerrado, 2) la apertura del DNA y la formación de un complejo promotor abierto, y 3) el inicio de la síntesis de RNA, dando lugar a un complejo de inicio de la transcripción. Durante la formación del complejo cerrado, se reconoce primero el promotor, y esto se consigue mediante TFIIA, -B y -D, que forman un conjunto río arriba. El conjunto río arriba entonces recluta el complejo Pol II-TFIIF. La unión de TFIIIE y TFIIH facilita la apertura del promotor y la formación del complejo abierto. Cuando el RNA crece más allá de una longitud crítica, el complejo de iniciación se desmonta y se forma un complejo de elongación, que es responsable de la síntesis del mRNA (Hantsche & Cramer, 2017) (**Figura 18**).

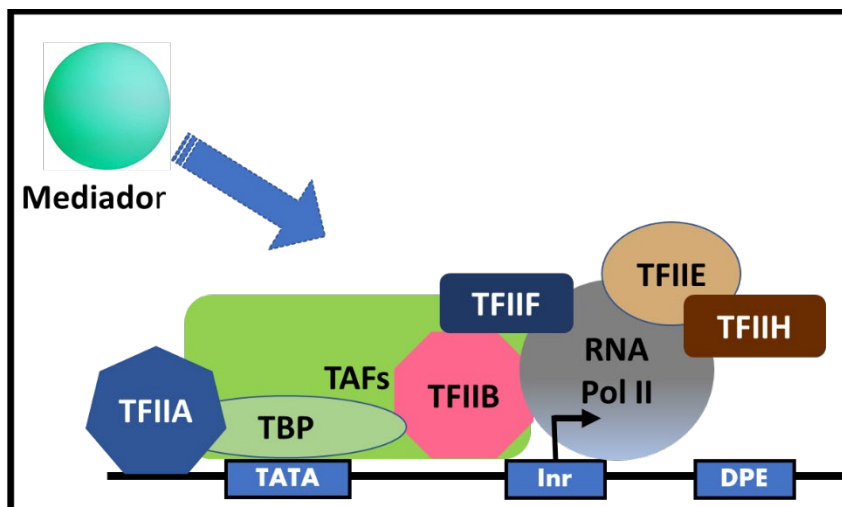


Fig. 18. Modelo de formación del complejo de pre-iniciación (PIC) en el core del promotor de RNA Pol II. El core del promotor contiene elementos TATA, Inr y DPE. El complejo de preiniciación mínimo contiene a Pol II y los seis factores de transcripción basales (TFIIA, TFIIB, TFIID, TFIIE, TFIIF y TFIIH), así como al elemento mediador. Modificado de Roy *et al.*, 2011.

1.3.3. Elongación de la transcripción por Pol II

Es bien sabido que el reclutamiento de la Pol II no es el único punto de regulación transcripcional. La transición entre el inicio y la elongación de la transcripción es un proceso de varios pasos que puede regularse para lograr una expresión génica adecuada. Poco después de la iniciación, Pol II se encuentra bajo el control de factores negativos de elongación de la transcripción, generalmente denominados N-TEF (*negative transcription elongation factors*), que intervienen en la formación de transcritos abortivos. Durante la fase de post-iniciación de la elongación sólo se generan transcritos cortos y prematuros, y no es hasta la salida de los factores N-TEF y la unión de al menos uno de los factores de regulación positivos llamados P-TEFb (*positive transcription elongation factors*) (que comprende a la ciclina T1 y a la cinasa dependiente de ciclina CDK9), que se permite la transición hacia la elongación productiva, generando transcripciones largas de las que se derivan los mRNAs (**Figura 19**). La eficiencia de la elongación puede estar influenciada por factores adicionales, incluyendo S-II, TFIIF y ELL (Price, 2000).

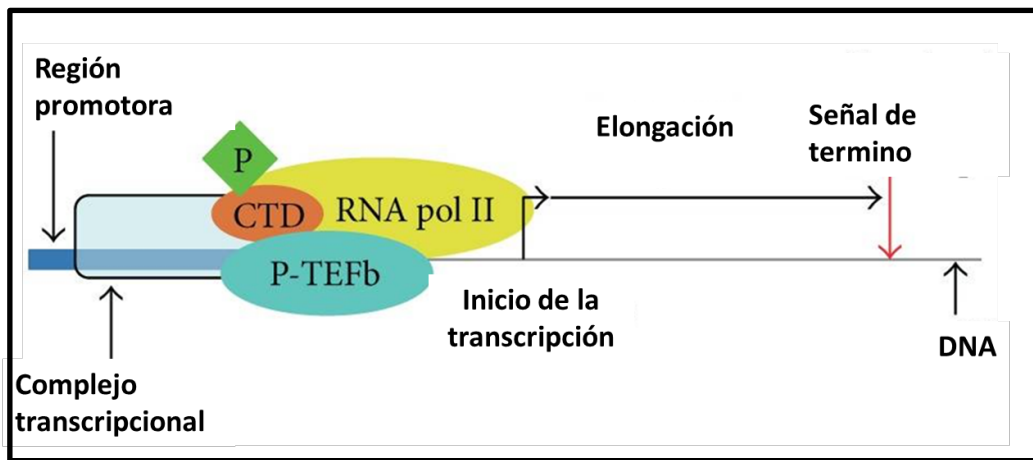


Fig. 19. Complejo de inicio de la elongación. Se muestra P-TEFb unido a Pol II como un complejo potenciador de la elongación, así como el CTD (dominio C-terminal) de la subunidad mayor de Pol II fosforilado, permitiendo la formación de transcritos largos (pre-mRNA) no abortivos (Romano, 2013).

Curiosamente, el proceso de elongación que se lleva a cabo después de la liberación de Pol II del promotor y de sus factores de regulación positivos y negativos es más complejo de lo que se pensaba. Las tasas de elongación pueden variar entre genes y parecen jugar un papel importante en procesos como el *splicing* y la terminación de la transcripción. Múltiples elementos pueden regular la tasa de elongación, tales como las marcas de histonas y las características de los genes, así como el número de exones (Jonkers & Lis, 2015).

Por otra parte, también se ha relacionado la fosforilación del dominio C-terminal (CTD) de la subunidad mayor de Pol II con la regulación de la elongación, ya que el CTD se fosforila durante el ciclo de transcripción en un momento coincidente con el inicio de la elongación. De igual manera se demostró el papel de TFEb como un agente promotor de la elongación al fosforilar el CTD. Otro factor importante para la elongación de Pol II es el complejo Elongador (Karlsborn *et al.*, 2014).

1.3.4. Elp3 y el Complejo Elongador

El Complejo Elongador se identificó por primera vez en *Saccharomyces cerevisiae* como un complejo que co-purificó con la RNA Pol II. El complejo consiste en seis subunidades diferentes (**Figura 20**). Está constituido por dos subcomplejos, el primero, formado por las subunidades Elp1-Elp3 y el segundo por las subunidades Elp4-Elp6. El Complejo Elongador con sus seis subunidades

ya ha sido identificado en humano mientras que, en levadura, mutantes del Complejo Elongador mostraron fenotipos pleiotrópicos en múltiples procesos celulares, incluyendo la transcripción de Pol II y la exocitosis (Nguyen *et al.*, 2009).

En eucariontes que presentan el Complejo Elongador se ha visto que su función está estrechamente relacionada con la regulación de la elongación de RNA Pol II a través de la modificación de la cromatina. Se sabe que en eucariontes el genoma se empaqueta en un complejo de nucleoproteínas llamado cromatina, a través del cual se regulan varios procesos celulares incluyendo la transcripción, la división celular, la replicación y la reparación del DNA. Las propiedades de la cromatina pueden alterarse por modificaciones postraduccionales de histonas, incluyendo la ubiquitinación, metilación, fosforilación y acetilación. Es en estas modificaciones donde entra en juego el Complejo Elongador, y particularmente la subunidad Elp3, la cual contiene un dominio de histona acetil transferasa (HAT) en la región C-terminal, que participa en la modificación de histonas, ya que se ha visto que los niveles de acetilación de histonas están disminuidos en células mutantes de Elp3. Esto indica que Elp3 juega un papel importante como modificador de la cromatina y de esa manera regula la fase de elongación de la transcripción en Pol II (Chinenov, 2002) (**Figura 20**).

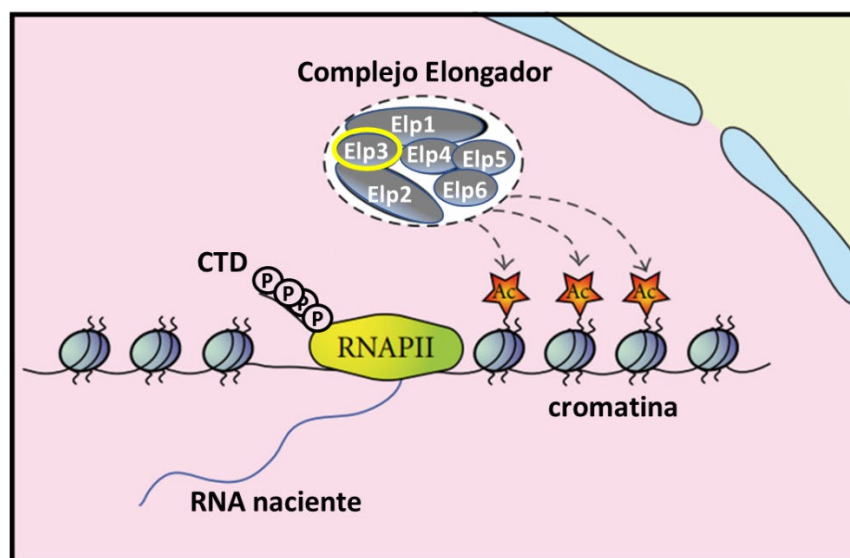


Fig. 20. Complejo Elongador. El Complejo Elongador media la acetilación de las histonas contribuyendo a la elongación de la transcripción; además interactúa con el CTD de la subunidad mayor de la RNA Pol II (Creppe & Buschbeck, 2011).

Elp3 está altamente conservada, ya que se encuentra presente desde arqueas hasta eucariontes superiores, confirmando así el rol central de esta subunidad. Los análisis de secuencias adicionales revelaron la presencia de un segundo dominio putativo en esta subunidad, conocido como radical S-adenosilmetionina (rSAM). Este dominio se encuentra presente en un gran número de secuencias bacterianas y se caracteriza por la presencia de un *cluster* de hierro-azufre (Fe_4S_4), además de la presencia de un sitio de unión a S-adenosilmetionina, el cual se caracteriza por ser una región rica en glicinas (Wang & Frey, 2007).

Una observación crucial de la función del Complejo Elongador fue el descubrimiento del papel de este complejo en la formación de 5-carbonometil (ncm5) y 5-metoxicarbonometil (mcm5) en algunas uridinas de los tRNAs. Cuando se eliminan ncm5 y mcm5 de las uridinas, las especies de tRNA correspondientes actúan de manera menos eficiente en la traducción. Esto indica que el Complejo Elongador, además de participar en la elongación de la transcripción de Pol II, lleva a cabo otras funciones celulares relacionadas a la modificación de tRNAs, regulando así la fase de traducción (Bento-Abreu *et al.*, 2018).

La regulación de la elongación de la transcripción de Pol II y la modificación de tRNAs para una óptima traducción son las funciones principales que lleva a cabo el complejo Elongador, siendo la subunidad Elp3 su núcleo enzimático, pero existen otras funciones que se han descrito en donde Elp3 cumple un papel esencial, tales como la migración celular a través de la acetilación de α -tubulina, (Creppe *et al.*, 2009) regula la organización de la actina en la célula (Nguyen *et al.*, 2009) y la exocitosis, en donde algunas subunidades del Complejo Elongador interactúan con las vesículas regulando su velocidad (Solinger *et al.*, 2010) (**Figura 21**). Finalmente, a través de inmunoprecipitaciones, se ha descrito la interacción del Complejo Elongador con el mRNA naciente; aunque aún no se ha descrito una relación funcional con el mismo, se cree que podría participar en su maduración (Gilbert *et al.*, 2004).

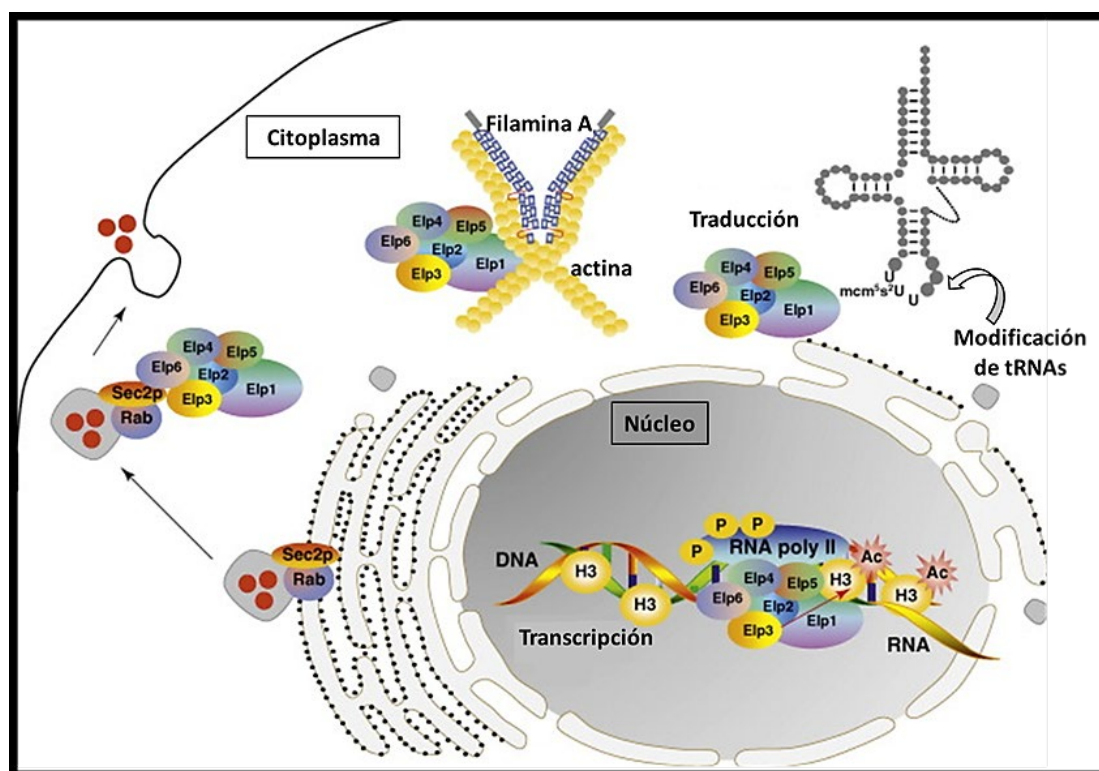


Fig. 21. Roles biológicos desempeñados por el Complejo Elongador. En el núcleo, el Complejo Elongador con sus seis subunidades (Elp1-6) está asociado con la RNA Pol II hiperfosforilada y es necesario para la acetilación de la histona H3 a través de las regiones transcritas de múltiples genes, incluyendo a genes que codifican para la motilidad celular. El Complejo Elongador también presenta unión a Filamina A en el citoplasma, la cual regula la organización de la actina. Una interacción entre Elp1 y Sec2, un regulador de la activación de Rab, también regula negativamente la exocitosis. Además, el Complejo Elongador está involucrado en la regulación de la traducción generando modificaciones en tRNAs en el citoplasma. Tomado de Nguyen *et al.*, 2009.

1.3.5. Transcripción mediada por Pol I

El ribosoma es una maquinaria macromolecular compleja, compuesta por RNA ribosomal (rRNA) y proteínas ribosomales, que se encarga de llevar a cabo la traducción de mRNA maduros a polipéptidos funcionales. La biogénesis del ribosoma comienza con la síntesis de un precursor de rRNA (pre-rRNA) por la RNA Pol I. Los eucariontes tienen gran cantidad de copias casi idénticas de genes de rRNA, que son transcritos en el nucléolo por la Pol I. Estos genes se agrupan en arreglos largos en tándem en sitios conocidos como regiones organizadoras nucleolares (NORs). Los transcritos primarios de rRNA varían en tamaño, desde 35S a 48S dependiendo de la especie, y una vez que son procesados a través de eventos de corte se generan los rRNA 28S, 18S y 5.8S

maduros, los cuales son núcleos catalíticos en la síntesis de proteínas (Chandrasekhara *et al.*, 2016).

El sistema de iniciación de la transcripción de Pol I difiere substancialmente del de Pol II. En general se ha observado que Pol I requiere solamente de dos factores de transcripción para iniciar la síntesis del pre-rRNA: UBF y SL1 (**Figura 22**) (Engel *et al.*, 2017). De manera interesante, una de las subunidades que conforman a SL1 es la proteína de unión a la caja TATA (TBP), que participa también en la transcripción mediada por las otras dos RNA polimerasas.

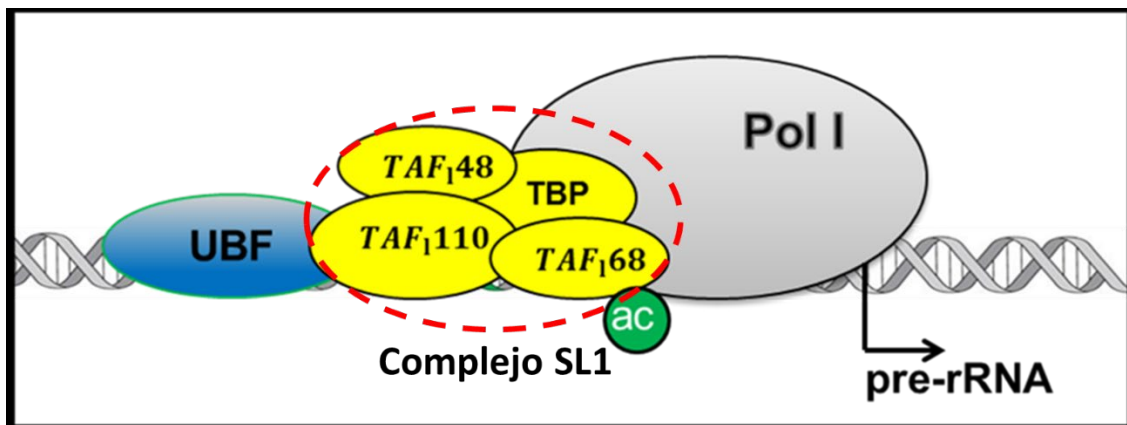


Fig. 22. Factores de inicio de la transcripción de Pol I. Se muestran los dos factores principales de Pol I: UBF y el complejo SL1 (formado por las subunidades TAF₁₆₈, TAF₁₄₈, TAF₁₁₀ y TBP) (Voit *et al.*, 2015).

1.3.6. Transcripción mediada por RNA Pol III

La RNA Pol III es la más grande de las RNA polimerasas, con un peso molecular de 693 kDa. 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). Las subunidades AC40 y AC19 son compartidas con la RNA Pol I únicamente, y C53, C38, C82, C34 y C31 son específicas de la RNA Pol III, aunque otros estudios han demostrado que tienen cierta homología con algunos factores de transcripción de Pol II (Teichmann *et al.*, 2010).

Pol III transcribe genes que codifican una variedad de RNAs pequeños (generalmente menos de 300 bases) y estables que no se traducen. Muchos de estos RNAs como el snRNA U6, el rRNA 5S y los tRNAs cumplen funciones

esenciales en el metabolismo celular, ya que participan en la síntesis y transporte de proteínas, y en el procesamiento del mRNA (Schröder *et al.*, 2003).

Los promotores de los genes transcritos por Pol III contienen elementos de secuencia específicos, que dirigen el reclutamiento de factores de transcripción y a la RNA Pol III, existiendo así 3 tipos de promotores basales. Los promotores tipo 1 son exclusivos del gen del rRNA 5S y se conforman de la caja A, el elemento intermedio (EI) y la caja C. Dicho promotor es inicialmente reconocido por TFIIIA que recluta a TFIIIC para actuar como plataforma de TFIIIB y así pueda reclutar y posicionar a la RNA Pol III en el sitio de inicio de la transcripción (Schramm & Hernández, 2002).

El promotor tipo 2 consiste en una caja A, que es la misma que la del tipo 1, 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 2 y del 3. Aquí TFIIIC, sin la intervención de otro factor de transcripción, puede reconocer y posicionarse sobre el promotor para que de igual manera posicione a TFIIIB y auxilie a la RNA Pol III para establecerse en el sitio de inicio de la transcripción (Schramm & Hernández, 2002).

El promotor tipo 3 se encuentra en el gen de snRNA U6, y es muy similar al de los genes transcritos por la RNA Pol II, ya que tiene secuencias río arriba del sitio de inicio como el elemento distal (DSE) y el elemento proximal (PSE), además de una caja TATA. En este tipo de promotor, la subunidad TBP (*TATA binding protein*) de TFIIIB tiene la capacidad de reconocer a la caja TATA, sin necesidad de TFIIIA y TFIIIC. El DSE tiene efecto de *enhancer* (potenciador) y es reconocido por los factores Oct-1 y Staf que activan la transcripción en parte por la unión de otro factor de transcripción conocido como SNAPc que reconoce PSE y aporta estabilidad al complejo transcripcional (Margottin *et al.*, 1991).

1.4. Genómica y expresión genética en Tripanosomátidos

Los tripanosomátidos divergieron de otros linajes eucarióticos hace al menos 500 millones de años (Cayla *et al.*, 2019) y, por lo tanto, proporcionan un modelo valioso desde el punto de vista evolutivo. Estos organismos exhiben una biología fascinante en términos de su arquitectura nuclear y nucleosomal, transcripción, segregación organular, replicación de DNA, biología del desarrollo

y motilidad. La última década ha sido testigo de una revolución en nuestra comprensión de los genomas eucariotas a través de la realización de un número creciente de proyectos de secuenciación del genoma para diversos eucariotas. Éstos han incluido a los tripanosomátidos de mayor importancia en la investigación biomédica: *T. brucei*, *T. cruzi* y *Leishmania major* (El-Sayed *et al.*, 2005). Este importante avance ha otorgado una herramienta poderosa para el estudio de la biología de estos organismos.

Se sabe que *T. brucei* presenta 11 pares de cromosomas y ~100 minicromosomas y ~5 cromosomas de tamaño intermedio, mientras *L. major* y *T. cruzi* albergan ~36 y ~28 pares de cromosomas, respectivamente. A través de estudios de comparación entre estos organismos donde se ha observado que los tres genomas comparten 6,158 genes que codifican proteínas. Además, se encontró que los genomas de las tres especies son altamente sinténicos, esto es, que el orden de los genes es altamente conservado.

Los genomas de los tripanosomátidos y sus mecanismos de expresión génica difieren en varios aspectos importantes de otros organismos eucariotas (Erben *et al.*, 2014). Los genes codificadores de proteínas se organizan en grandes grupos de genes llamados *clusters* o DGC (*directional gene clusters*) y su transcripción policistrónica no se regula generalmente en la iniciación. Los DGCs pueden ser convergentes (su transcripción se dirige hacia un punto central) o divergentes (se transcriben en direcciones opuestas). Las regiones que separan dos DGC se denominan regiones de cambio de cadena o SSR (*strand switch regions*) (**Figura 23**). La transcripción policistrónica está también presente en otros eucariotas, como *Caenorhabditis elegans*. Sin embargo, mientras que solo el 15% de los genes codificadores de proteínas se encuentran en *clusters* en *C. elegans*, los genes codificadores de proteínas en los tripanosomátidos están organizados en *clusters* a escala de todo el genoma, y dichos *clusters* se componen de decenas de genes (Daniels & Wickstead, 2010).

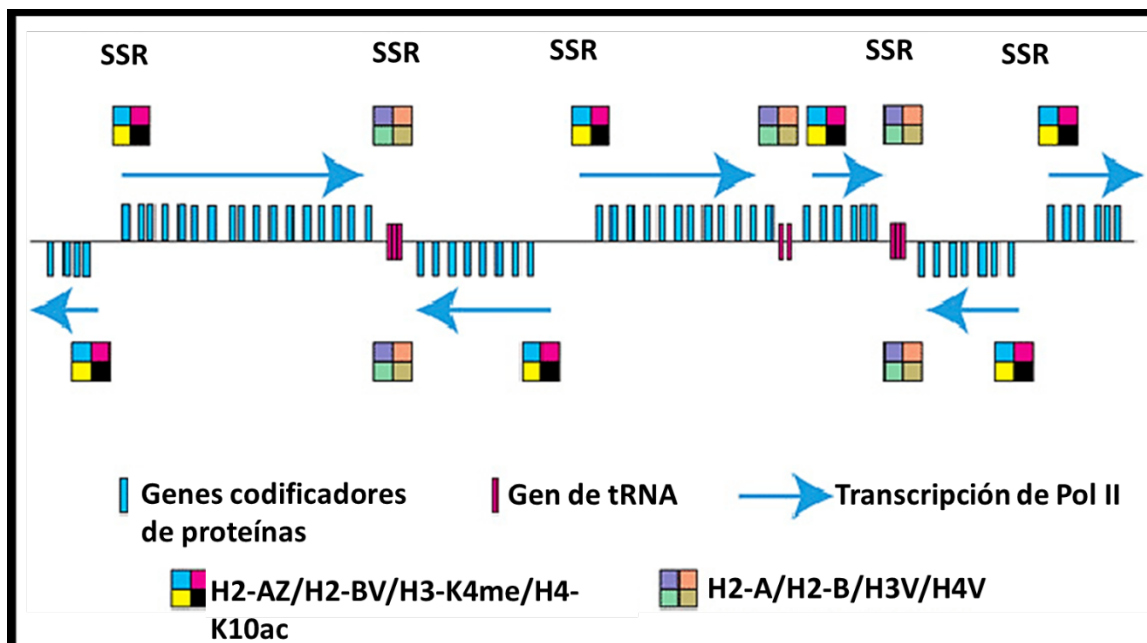


Fig. 23. Diagrama esquemático de una porción de un cromosoma de *T. brucei*. La transcripción policistrónica de genes se produce a partir de sitios SSR (**strand switch region**) divergentes y termina en SSR convergentes, que a menudo presentan genes de tRNA. La incorporación de nucleosomas con histonas tipo: H2-AZ/H2-BV/H3-K4me/H4-K10ac se produce en los sitios de inicio de la transcripción putativos y la incorporación de H2-A/H2-B/H3V/H4V se produce en sitios de terminación de la transcripción (Erben *et al.*, 2014).

El genoma nuclear de *L. major* (32.8 Mb) se encuentra distribuido en 36 cromosomas diploides de tamaño relativamente pequeño (de 0.28 a 2.8 Mb). Se han predicho 8272 genes codificadores de proteína (de los cuales sólo al 36% se le ha descrito una función putativa), 911 genes de RNA y 39 pseudogenes. Aunque los genomas de *L. major*, *T. brucei* y *T. cruzi* codifican un repertorio muy similar de genes de RNA, su organización difiere entre *L. major* y las dos especies de tripanosomas. Por ejemplo, los genes de los rRNA 28S, 18S y 5.8S se encuentran en un arreglo sencillo en tándem en *L. major*, pero en distintos loci en varios cromosomas en *T. brucei* y *T. cruzi*. Por otro lado, *L. major* posee sólo 11 genes del rRNA 5S, los cuales están distribuidos en todo el genoma (Moreno-Campos *et al.*, 2016); en cambio, *T. brucei* y *T. cruzi* presentan cientos de genes del rRNA 5S organizados en tándem (Berriman *et al.*, 2005). La transcripción policistrónica de los genes codificadores de proteínas de cada unidad genera transcritos primarios largos que se procesan rápidamente en unidades monocistrónicas de mRNAs por *trans-splicing* y poliadenilación.

1.4.1. *Trans-splicing* y poliadenilación

Como se mencionó anteriormente, en los tripanosomátidos, los genes que codifican proteínas se organizan en unidades de transcripción policistrónicas largas de hasta 100 marcos de lectura abiertos. La transcripción por la RNA Pol II frecuentemente comienza en las denominadas regiones de cambio de cadena (SSR) y continúa bidireccionalmente (El-Sayed et al., 2005; Martínez-Calvillo et al., 2003). Los pre-mRNAs policistrónicos se transcriben de estos grupos de genes, y los mRNA maduros se liberan posteriormente mediante *splicing* y poliadenilación (LeBowitz et al., 1993).

El procesamiento de los mRNAs en tripanosomátidos difiere notablemente de la mayoría de los eucariontes, ya que la maduración de los mRNAs en estos organismos se lleva a cabo por *trans-splicing*, en donde una secuencia de 39 nucleótidos transcrita por la RNA Pol II, llamada mini exón o *spliced leader* (SL), se une en el extremo 5' del mRNA (**Figura 24**). Durante el *trans-splicing* el SL cumple dos funciones primordiales; primero, actúa como sustrato de *splicing* eliminando una parte del pre-mRNA; y segundo, ayuda a completar la biogénesis del mRNA exportándolo al citoplasma para llevar a cabo la traducción (Preußner & Bindereif, 2012). Además, el SL aporta el cap al mRNA, protegiéndolo de la degradación.

El *splicing* es catalizado por el empalmosoma, un gran complejo que consta de cinco RNAs pequeños nucleares (snRNA; U1, U2, U4, U5 y U6) y más de 150 componentes proteicos. Los componentes proteicos de estas ribonucleoproteínas del empalmosoma se agrupan en proteínas específicas y proteínas generales, estas últimas forman un núcleo de siete polipéptidos llamados proteínas Sm (Ambrósio et al., 2007).

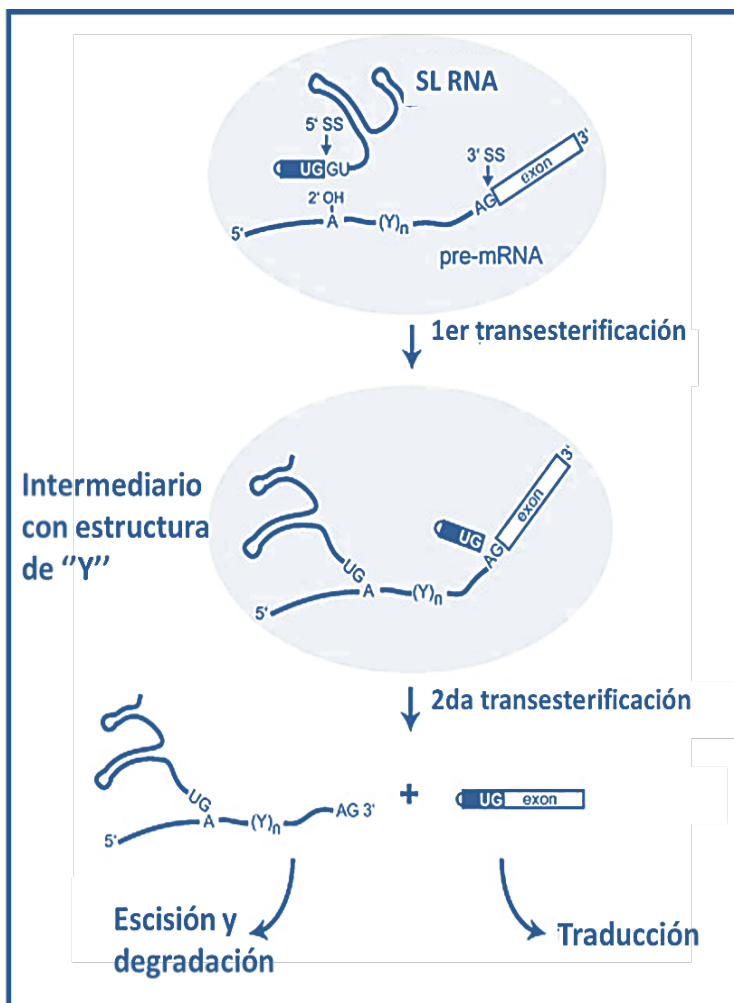


Fig. 24. Mecanismo de trans-splicing. Se representa al *spliced leader* (SL) y un pre-mRNA, así como la adenina conservada presente en el punto de ramificación, el tracto de pirimidinas (Y_n) y el exón que codifica a la proteína. También se muestra parte de las secuencias consenso en los sitios de *splicing* 5' y 3'. El primer paso de transesterificación implica un ataque nucleofílico del 2'-OH de la adenosina del punto de ramificación en el sitio de *splicing* 5'. Después se forma el intermediario con la denominada estructura en forma de "Y" con el enlace fosfodiéster 2'-5'. En el segundo paso, el 3'-OH libre del mini exón ataca el sitio de *splicing* 3' del exón que codifica la proteína. Como resultado los primeros 39 nucleótidos (mini exón) del RNA SL y el RNA codificador de proteínas se unen, produciendo un mRNA maduro, y el intrón se libera en forma de "Y", el cual sufre escisión y degradación (Preußner & Bindereif, 2012).

Además del *trans-splicing*, también se ha reportado que en dos genes codificadores de proteínas de *T. brucei* se lleva a cabo el *splicing* convencional o *cis-splicing*, un gen que codifica para una PAP (poly-A polimerasa) y el otro para una helicasa, en donde dichos genes contienen un intrón que es escindido y hay unión de sus exones (Mair *et al.*, 2000).

Por otro lado, en tripanosomátidos la mayoría de los componentes individuales de la maquinaria de poliadenilación permanecen conservados, aunque sólo tres subunidades del complejo CPSF (CPSF30, CPSF73 y Fip1) han sido identificadas como ortólogos de sus homólogos de mamíferos. Además, la señal de poliadenilación está poco definida en tripanosomátidos, puesto que no se conservan los dos elementos canónicos de acción *cis*: AAUAAA y la secuencia rica en U / GU. Estudios recientes demuestran una correlación estrecha en el proceso de poliadenilación por componentes del empalmosoma, en particular entre el factor de poliadenilación CPSF73 y el snRNA U1 (Koch *et al.*, 2016).

1.4.2. Transcripción en tripanosomátidos

A diferencia de la mayoría de los organismos eucariotas, en tripanosomátidos se sabe poco sobre transcripción. Como se mencionó antes, la transcripción de genes codificadores de proteínas en tripanosomátidos es policistrónica. La transcripción de Pol II inicia río arriba del primer gen de una unidad policistrónica, en las regiones SSR. De manera interesante, estas regiones no contienen caja TATA ni ningún otro elemento promotor típico de Pol II. Varios factores generales de la transcripción de Pol II se han identificado en tripanosomátidos, incluyendo TFIIA, TFIIB y TFIIH (Martínez-Calvillo *et al.*, 2010).

Otra característica importante en *Leishmania* y otros tripanosomátidos es que el rRNA 28S se encuentra fragmentado en 6 moléculas de rRNA independientes: 28S α , β , γ , δ , ϵ y ζ . *L. major* contiene alrededor de 12 copias de la unidad rRNA, localizadas en tándem en el cromosoma 27. El sitio de inicio de la transcripción de Pol I en la unidad de rRNA de *L. major* se localiza a 1043 pb río arriba del gen del rRNA 18S. Una región promotora pequeña que abarca hasta la base -183 (en relación con el sitio de inicio de la transcripción) se identificó (Martínez-Calvillo *et al.*, 2001). Además, se observó que varias marcas epigenéticas relacionadas con la activación de la transcripción están enriquecidas en dicha región promotora (Vizuet-de-Rueda *et al.*, 2016). En tripanosomátidos no se han identificado los factores de transcripción UBF y SL1, esenciales para el reclutamiento de la Pol I. Sin embargo, en *T. brucei* se identificó y caracterizó un factor de transcripción de Pol I, llamado CITFA, que parece ser exclusivo de los tripanosomátidos. Por otro lado, se han identificado las 12 subunidades que componen a Pol I en *T. brucei* y se ha determinado la existencia de una subunidad específica de tripanosomátidos, llamada RPA31, la cual es esencial para la transcripción *in vitro* de Pol I y la viabilidad celular (Das *et al.*, 2008).

Las especies de tripanosomátidos africanos albergan la única Pol I conocida que transcribe no sólo genes de rRNA sino también genes codificantes de proteínas. Es importante destacar que estos genes codificadores de proteínas incluyen los que codifican las glicoproteínas variables de superficie (VSG), que cubren la superficie de la célula de las formas sanguíneas, y también la prociclina, la

principal proteína de superficie del estadio en mosca tsetse. De esta manera, la transcripción de Pol I en tripanosomas africanos está íntimamente ligada a la diferenciación entre las etapas del ciclo de vida y también a la supervivencia en el hospedero mamífero (Daniels *et al.*, 2010).

1.4.3. Isoformas de Elp3 en tripanosomátidos

Se sabe muy poco del proceso de elongación de la transcripción en *Leishmania* y otros tripanosomátidos. En relación con el Complejo Elongador, en tripanosomátidos sólo se ha identificado la subunidad Elp3 (Alonso & Serra, 2012). De hecho, existen dos isoformas relacionadas con Elp3 en este grupo de organismos: Elp3a y Elp3b (Alsford & Horn, 2011). De manera interesante, se ha demostrado que en *T. brucei* Elp3b juega un papel muy importante en la regulación de la elongación de Pol I. Esta conclusión es apoyada por el aumento de la transcripción de los genes de rRNA en líneas celulares donde se redujo la expresión de Elp3b. De igual manera, se comprobó que Elp3b controla selectivamente la transcripción de rRNA, y no la de las VSG y las prociclinas, lo que indica una capacidad para distinguir entre diferentes unidades de transcripción de Pol I. Además, se definió a Elp3b como una proteína nucleolar. Considerando que Elp3b también se localiza en el nucléolo en *L. major* (Moreno-Campos *et al.*, 2016), es muy probable que participe en la regulación transcripcional de los genes del rRNA. Por otro lado, la función de Elp3a no se ha analizado, aunque se ha determinado que se localiza en la periferia nuclear en *T. brucei* (Alsford & Horn, 2011). En este trabajo se inició la caracterización molecular de ambas isoformas de Elp3 en *L. major*.

2. Objetivos

2.1. Objetivo general

- Identificar las proteínas con las que interactúan Elp3a y Elp3b en promastigotes de *L. major*.

2.2. Objetivos particulares

- Realizar un análisis *in silico* de la secuencia y estructura de Elp3a y Elp3b.
- Generar y caracterizar clonas celulares en las que se exprese una copia episomal de Elp3a unida a la bandera PTP.
- Determinar las interacciones proteína-proteína que establecen Elp3a y Elp3b mediante experimentos de purificación por afinidad en tándem y espectrometría de masas.

3. Materiales y Métodos

3.1. Análisis *in silico*

Las secuencias de Elp3a y Elp3b de *L. major* y sus ortólogos en otros tripanosomátidos se obtuvieron de las bases de datos de TriTrypDB (<http://tritrypdb.org/tritrypdb>), mientras que las secuencias de otros eucariontes se obtuvieron de NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Éstas se compararon en términos de secuencia de aminoácidos con Clustal ω 1.82 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2>). Para la predicción de la estructura secundaria se hizo uso del programa bioinformático Phyre² (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/~phyre2/html/page.cgi?id=index>) mientras que la predicción tridimensional se hizo a través de SWISS-MODEL (<https://swissmodel.expasy.org/>) y Pymol 2.2 (<https://pymol.org/2/>). Finalmente, las estructuras tridimensionales obtenidas fueron evaluadas usando la plataforma ModFold 4.0 (https://www.reading.ac.uk/bioinf/ModFOLD/ModFOLD_form_4_0.html).

3.2. Cultivo y conteo de parásitos

Se crecieron promastigotes procíclicos de la cepa *L. major* Friedlin en medio líquido BM (suero fetal bovino 10%, infusión de cerebro-corazón 0.25×, medio 199 0.5×, HEPES 40 mM, hemina 0.01 mg/mL, biotina 0.02%, biopterina 1.25×, penicilina 100 U/mL, estreptomycin 0.1 mg/mL, pH de 7.4) a 27°C hasta alcanzar la fase logarítmica media. Para mantener a los parásitos en dicha fase, los cultivos se iniciaron con 5×10^6 cel/mL, llevando a 5 mL con medio BM fresco, y resembrando cada 24 horas.

Para el conteo se tomaron 50 μ L de cultivo, diluyéndolos en 450 μ L de PBS-Formaldehído al 2%. De la dilución se tomaron 10 μ L y se colocaron en una cámara de Neubauer, contando los parásitos ubicados en los cuadros en diagonal de cada uno de los cuadrantes de la esquina (**Figura 25**). Posteriormente, el resultado se multiplicó por 10^6 para así obtener el número total de parásitos por mililitro.

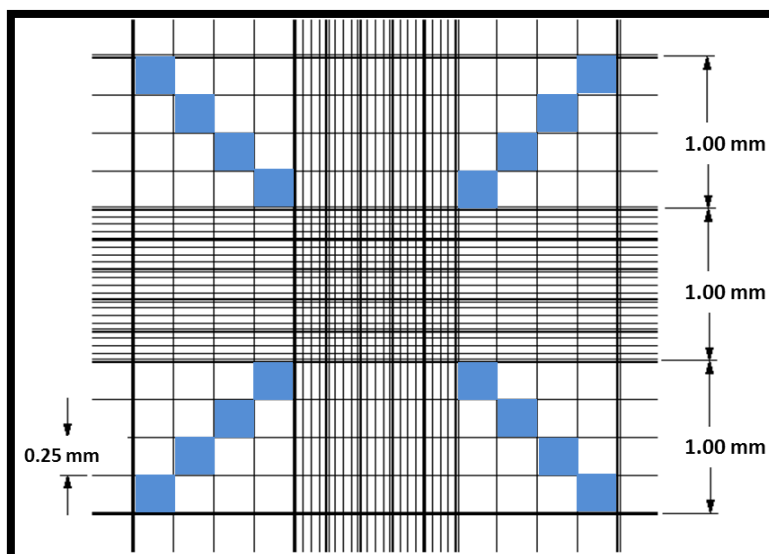


Fig. 25. Esquema de la cámara de Neubauer. Se señalan en azul las áreas que se tomaron en cuenta para realizar el conteo de parásitos.

Para su mantenimiento a largo plazo, los cultivos se congelaron en nitrógeno líquido. Para ello, 8×10^7 células en fase logarítmica media se centrifugaron a 4,000 rpm durante 12 minutos a 4°C ; la pastilla se resuspendió en 2 mL de suero fetal bovino con 10% de dimetilsulfoxido. Las células se transfirieron a un criovial y se mantuvieron a -70°C durante toda la noche. Finalmente, los crioviales se etiquetaron y almacenaron en un tanque con nitrógeno líquido.

3.3. Extracción de DNA genómico

La extracción de DNA se realizó a partir de un total de 3×10^8 promastigotes en fase logarítmica media empleando el método convencional de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico, para el cual los parásitos se centrifugaron a 5,000 rpm durante 10 minutos. Posteriormente la pastilla se resuspendió en 5 mL de una solución de lisis que contiene 5 μL de SSC $1 \times$ (NaCl 3 M y citrato de sodio 0.6 M), 5 mL de TNE pH 8.0 (Tris 40 mM, EDTA 1 mM y NaCl 15 mM), sarcosyl 0.5% y 100 μg de proteinasa K. Las muestras se agitaron en vortex (Daigger Genie 2) y se mantuvieron a 55°C durante 2 horas. Posteriormente se adicionaron 0.5 volúmenes de fenol y 0.5 volúmenes de cloroformo, se mezcló en vortex y se centrifugó a 4,000 rpm durante 10 minutos a 4°C ; se transfirió la fase superior acuosa a un tubo nuevo y se precipitó con 0.1 volúmenes de acetato de sodio 3 M y 2.5 volúmenes de etanol absoluto a -20°C toda la noche. Al día siguiente se centrifugó a 9,000 rpm durante 15 minutos a 4°C y la pastilla

se lavó dos veces, la primera con etanol al 70% y la segunda con etanol absoluto. Finalmente, el DNA se resuspendió en 300 µL de Tris-EDTA pH 7.8 (Tris-HCl 10 mM y EDTA 0.2 mM). La calidad y concentración del DNA se evaluó por espectrofotometría a 260 nm (1 D. O. a 260 nm= 50 µg/mL) y por electroforesis en geles de agarosa al 0.8% con amortiguador TBE 1× y Midori Green Advance como agente intercalante para visualizar los ácidos nucleicos con luz UV; dichos geles se observaron y fotografiaron en un sistema de documentación de geles Bio Sens SC645 con el software PSRemote V 1.6.3.

3.4. Amplificación de los genes por medio de reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Para la amplificación de las secuencias específicas de DNA que codifican para el gen de Elp3a en *L. major*, se efectuaron múltiples reacciones de PCR. Las reacciones se llevaron a cabo en tubos de PCR, donde se adicionó buffer de reacción con MgCl₂ 2 mM (1×), mezcla de dNTPs 200 µM, oligonucleótidos sentido y antisentido (200 µM), el DNA molde (100 ng) y de 1 a 3 U de Pfx DNA polimerasa (Invitrogen), la cual es una polimerasa de alta fidelidad, llevando a un volumen final de 50 µL con agua destilada. El perfil térmico empleado consistió en 30 ciclos, incluyendo desnaturalización a 95°C durante 1 minuto, la hibridación entre 50-60°C durante 1 minuto, la extensión a 72°C durante 1-3 minutos y un ciclo de extensión final a 72°C durante 7 minutos. Dichas reacciones se realizaron en el termociclador. En la **Tabla 1** se muestran la secuencia de oligonucleótidos empleados en las amplificaciones.

Tabla 1. Oligonucleótidos empleados para la amplificación del gen de Elp3a de *L. major*, así como una región interna del gen que fue usada para la secuenciación.

Oligonucleótido	Secuencia	Tamaño del amplificado	Región amplificada
Elp3a-5'-for-Hpal	GTAAAC GCGGTGTGCCCGTCATGTCC	2,315 pb	Región codificante del gen Elp3a
Elp3a-3'-rev-Xbal	TCTAGAC AGAGTGCGCGCTGCTGC		
Elp3a-5'-for-Int	GCTGCCAGTGGAAGTGT	955 pb	Región interna del gen de Elp3a
Elp3a-3'-rev-Int	GACTTCAGCTT CTCCGTGA		

En amarillo se resaltan los sitios respectivos de corte integrados a la secuencia de cada oligonucleótido.

3.5. Ligación al vector pGEMT-Easy

El DNA obtenido de la amplificación se precipitó con 0.1 volúmenes de acetato de sodio ($C_2H_3NaO_2$) 3 M y 2.5 volúmenes de etanol absoluto, se centrifugó y posteriormente la pastilla se resuspendió en un volumen final de 30 μ L de agua destilada y se separó en un gel de agarosa al 0.8% por ~2 horas a 100 voltios. Con ayuda de un transiluminador UVP (M-26), se identificó la banda de interés y con un escalpelo se cortó el fragmento de gel que la contenía. Se determinó la masa del fragmento, se colocó en tubos Eppendorf de 1.5 mL y se purificó con el kit NucleoSpin Gel and PCR clean-up extract II (Macherey-Nagel) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Con el DNA purificado, se realizaron reacciones de adición de A-terminal usando 210 ng de DNA adicionando 1 μ L (1 U) de DNA Pol Taq (Kapa Biosystems), buffer Kapa Taq 1 X, y 1 μ L de dATP 2 mM en un volumen final de 10 μ L, durante 30 minutos, a una temperatura de 70°C. El DNA se adeniló con el fin de permitir la posterior ligación en el plásmido pGEM-T Easy (Promega) (**Figura 26**). Este vector se utiliza para la clonación directa de productos de PCR y posee dos genes de selección para bacterias transformadas (resistencia a ampicilina y el gen LacZ, que codifica para la enzima β -galactosidasa). Este plásmido se usó para la ligación de las secuencias Elp3a de *L. major*. Las reacciones para la ligación se realizaron con 100-200 ng de inserto, 37.5 ng del vector pGEM-T Easy, 1 μ L de DNA ligasa T4 (3U/ μ L) y 5 μ L de buffer Rapid Ligation 2 \times , llevándolo a un volumen final de 10 μ L con agua desionizada e incubando a 4°C toda la noche. Obteniendo finalmente los vectores pGE-LmElp3a y pGE-LmElp3b.

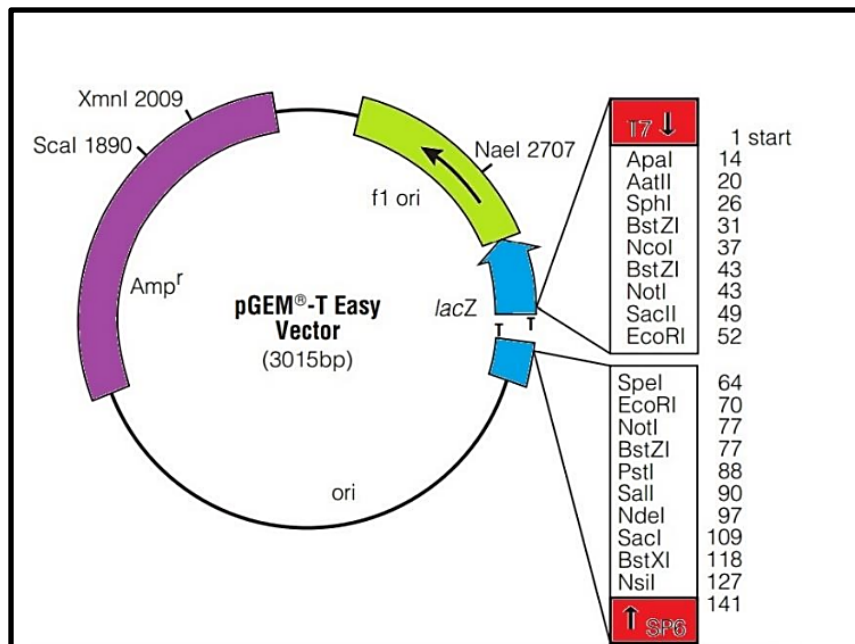


Fig. 26. Mapa del vector pGEM-T Easy y sus puntos de referencia.

3.6. Transformación de células competentes de *E. coli*

Para la transformación se utilizaron 200 μL de células competentes de *E. coli* JM109 ($1 > 10^7$ ufc/ μg de DNA, Promega), las cuales se transfirieron al fondo de un tubo cónico de 15 mL y se mezclaron con los productos de ligación, incubando en hielo por 20 minutos. Posteriormente se efectuó un choque térmico durante 45 s en un baño de agua a 42°C , para después colocar en hielo nuevamente por 2 minutos. Enseguida se adicionaron 800 μL de medio SOC (triptona 2%, extracto de levadura 0.5%, NaCl 1%, KCl 2.4 mM, MgCl_2 1% y glucosa 2%) y se incubó a 37°C con una agitación constante de 200 rpm durante 1.5 horas. Finalmente, las células se centrifugaron durante 2 minutos a 7000 rpm, la pastilla se resuspendió en 100 μL de medio SOC, para posteriormente ser esparcidas en cajas Petri con medio LB agar (peptona de caseína 1%, extracto de levadura 0.5% y NaCl 0.5%) suplementado con ampicilina 0.01%, IPTG (50 mg/mL). Finalmente, las células se dejaron crecer toda la noche a 37°C .

3.7. Purificación de plásmidos por minipreps

Para la purificación de los plásmidos a pequeña escala, fue necesaria la selección de colonias de *E. coli* blancas, es decir, resistentes a ampicilina y sin la capacidad de degradar X-Gal. Dichas colonias se emplearon para inocular 5 mL de medio LB con ampicilina (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) en tubos de ensayo, los cuales se

incubaron a 37°C con agitación suave de 220 rpm toda la noche. Para la purificación se empleó el kit NucleoSpin Plasmid (Macherey Nagel), siguiendo las indicaciones del fabricante. Para ello se centrifugaron las células a 11,000 × g durante 30 s para eliminar el medio LB, después se añadieron 250 µL del buffer de resuspensión A1 y se agitó en vortex; luego se agregaron 250 µL del buffer de lisis A2 y se mezcló, posteriormente se incubó a temperatura ambiente por 5 minutos y se adicionó el buffer neutralizador A3 para después centrifugar a 11,000 × g durante 10 minutos a temperatura ambiente. Por otro lado, se colocó una columna con la membrana de sílica en un tubo colector y se le agregó la mezcla anterior, se centrifugó a 11,000 × g por 1 minuto y se eliminó la descarga que quedó en el tubo colector. Se volvió a colocar la columna en el tubo colector y se adicionó buffer de lavado A4 para centrifugar a 11,000 × g durante 1 minuto. Finalmente, la columna se colocó en un tubo eppendorf estéril de 1.5 mL y se adicionaron 50 µL de buffer de elución AE y se centrifugó a 11,000 × g por 1 minuto obteniendo así el plásmido purificado.

La secuenciación de las construcciones obtenidas se realizó en la unidad de secuenciación de DNA del Laboratorio de Bioquímica Molecular de la Unidad de Biotecnología y Prototipos de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala, UNAM. El método empleado fue BIG DYE Terminator Fluorescent Based Sequencing, con un equipo ABI 3100. De esta manera se generaron y caracterizaron los vectores pGE-LmElp3a y pGE-LmElp3b.

3.8. Subclonación en el vector pB6-PTP

Se procedió a subclonar los insertos LmElp3a y LmElp3b en el vector PTP. Para ello, el vector pB6-PTP se digirió para generar dos fragmentos: El gen RPB6 (507 pb) y el vector PTP de 6.7 kb. Los insertos de LmElp3 se obtuvieron mediante digestiones de los vectores pGE-LmElp3a y pGE-LmElp3b con las respectivas enzimas de restricción. Los insertos y el vector PTP se purificaron a partir de gel de agarosa al 0.8% haciendo uso del kit NucleoSpin Gel and PCR clean-up.

Las ligaciones del vector PTP con los insertos se realizaron con 100-200 ng del inserto y 37.5 ng del vector. A cada reacción se adicionó 1U de enzima T4 DNA ligasa (Promega) y buffer de ligación 1× en un volumen final 10 µL, las reacciones se incubaron toda la noche a 4°C. El producto de ligación se empleó para

electroporar células de *E. coli* electrocompetentes ElectroMax DH5αE (Invitrogene®). Las células transformadas se plaquearon en LB agar con ampicilina 100 µg/mL. Posteriormente, se seleccionaron 2 UFC y se hizo el análisis mediante la extracción de su DNA plasmídico (miniprep), realizando digestiones con enzimas de restricción para finalmente mandar a secuenciar el vector.

3.9. Transfección de *Leishmania* por electroporación

Promastigotes de *L. major* en fase logarítmica media ($20\text{-}25 \times 10^6$ células/mL) se crecieron en medio B/M. Para la transfección por medio de la electroporación, 1×10^8 células se centrifugaron a 4,000 rpm durante 10 minutos a 4°C. Posteriormente, se realizó un lavado con 10 mL de PBS-G (NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM, Na₂HPO₄ 10 mM, KH₂PO₄ 2 mM, complementado con 6 mM de glucosa, pH 7.4) y se centrifugó nuevamente, la pastilla se resuspendió en 10 mL de amortiguador cytomix (HEPES 25 mM pH 7.6, KCl 120 mM, CaCl₂ 0.15 mM, K₂HPO₄/ KH₂PO₄ 10 mM pH 7.6, EDTA 2 mM, MgCl₂ 5 mM). Las células fueron centrifugadas y resuspendidas en 400 µL de amortiguador cytomix y se transfirió a una cubeta de electroporación de 4 mm (Electroporation Cuvettes Plus™, BTX®) previamente enfriada. Dentro de la misma cubeta se adicionaron 25 µg de DNA de plásmido LmElp3a-PTP. Se mezcló suavemente y se incubó en hielo por 10 minutos. Se aplicó un pulso de 1600 voltios, 25 ohms y 50 µF en un equipo ECM Electro Cell Manipulator (BTX®); inmediatamente después se colocaron en hielo por 10 minutos.

Una vez electroporados los cultivos se transfirieron a tubos cónicos de 50 mL conteniendo 10 mL de medio B/M y se incubaron a 40 rpm y 27°C. A las 24 horas se agregó la droga G418 a una concentración de 25 µg/mL. 24 horas después se agregó más G418 a una concentración final de 50 µg/mL. Los cultivos se monitorearon hasta su recuperación y se pasaron a cajas de cultivo de 25 cm², para obtener así las poblaciones transfectantes estables.

3.9.1. Obtención de clonas celulares

Después de dos resiembras de los cultivos transfectados se prosiguió a la obtención de clonas celulares en medio B/M con agarosa al 0.8% (SeaPlaque GTG, Cambrex®). Brevemente, después de llevar a cabo el conteo celular se

prepararon diluciones de 2000, 1000, 500, 250 y 100 células de las poblaciones transfectantes en 0.5 mL de medio. Las células diluidas se sembraron en cajas Petri que contenían el medio de cultivo semisólido (medio B/M, SFB 20%, agarosa SeaPlaque GTG al 0.8% y G418 50 µg/mL) y se expandieron de manera homogénea sobre la superficie de éstas. La temperatura de incubación fue de 27°C con 5% de CO₂. Los cultivos se monitorearon hasta la aparición de las primeras colonias (aprox. 10 días), las cuales se transfirieron a cajas multipozo con medio B/M más G418. Una vez que alcanzaron una densidad celular óptima ($4-5 \times 10^7$ células/mL) se transfirieron a cajas de cultivo de 25 cm² y se crecieron a 27°C.

Para la crio-preservación de las líneas celulares, se tomaron 1×10^8 células, se centrifugaron a 4,000 rpm durante 10 minutos a 4°C. Las células se resuspendieron en 1 mL de suero fetal bovino con 10% de glicerol y se transfirieron a un criovial se almacenó a -70°C por 24 horas, para después colocarlo en un tanque con nitrógeno líquido. Cuando fue necesario, los crioviales se descongelaron y se diluyeron con 4 mL de medio B/M sin drogas de selección. 24 horas después se les agregó la mitad de la concentración de drogas y 48 horas después el resto para completar la concentración final de cada droga.

3.10. Análisis de la expresión de la proteína recombinante

El análisis de expresión de las proteínas recombinantes en poblaciones y clonas celulares se confirmó por análisis tipo Western Blot mediante la detección de la bandeta PTP. Para esto, se realizó la extracción de proteínas empleando el buffer RIPA. Inicialmente se partió de una muestra de 500×10^6 células de las líneas celulares LmElp3a-PTP y LmElp3b-PTP así como células silvestres de *L. major*, fueron centrifugadas a 4,000 rpm por 10 minutos y se lavaron con 500 µL de PBS frío dos veces. Se resuspendieron en 500 µL de buffer RIPA (Tris 50 mM, EDTA 5 mM, NaCl 150 mM, NP40 1%, deoxicolato de sodio 0.5%, SDS 0.1% e inhibidores de proteasas 1×); para que la concentración final fuera de 1×10^6 células por µL. Las muestras se incubaron en hielo por 30 minutos agitando con vórtex cada 5 minutos, y se centrifugaron a 14,000 rpm durante 20 minutos a 4°C.

Se desnaturalizaron las proteínas extraídas adicionándoles 25 µL de muestra

con buffer Laemmli 1× (Tris-HCl 22 mM pH 6.8, SDS 2%, azul de bromofenol 0.02%, glicerol 10% y β-Mercaptoetanol 5%), se colocaron en tubos de 1.5 mL y se mantuvieron durante 10 minutos en agua en ebullición, posteriormente se transfirieron a hielo durante 5 minutos. Las muestras se fraccionaron en un gel de poliacrilamida con dodecil sulfato sódico (SDS- PAGE, por sus siglas en inglés) donde se involucra un sistema discontinuo con dos geles: uno concentrador de poliacrilamida al 4 % (Tris-HCl 133 mM pH 6.8, SDS 0.1%, persulfato de sodio 0.1% y TEMED 0.2%), y un gel separador de poliacrilamida al 10% (Tris-HCl 375 mM, SDS 0.1%, persulfato de sodio 0.1% y TEMED 0.2%). De esta forma, las proteínas migrarían de acuerdo únicamente a su masa molecular. La electroforesis se realizó con buffer de corrida 1× (Tris 24.76 mM, glicina 191.82 mM, SDS 0.1%) a 80 voltios hasta que el frente de corrida entrara al gel separador (~30 minutos) y posteriormente a 100 voltios por ~1.5 horas.

Transcurrida la electroforesis en gel, las proteínas fraccionadas se transfirieron a membranas de PVDF (Immun-Blot™ PVDF, BIO-RAD) con buffer de transferencia 1× (Tris 24.76 mM, glicina 191.82 mM, metanol 20%). La transferencia se llevó a cabo a 100 voltios durante 2 horas a 4°C.

La membrana fue bloqueada con una solución de leche descremada al 5% en PBS/Tween-20 0.05% toda la noche a 4°C. Posteriormente se adicionó el anticuerpo primario Anti-Proteína C (Delta Biolabs), que reconoce al epítipo de Proteína C de la bandera PTP, con una dilución 1:3000. Se incubaron durante una hora a temperatura ambiente, después se realizaron 3 lavados de 10 minutos con PBS/Tween-20 0.05% y se incubó con el anticuerpo secundario HRP anti-conejo (dilución 1:3000) durante una hora. Finalmente, se repitieron los lavados de la misma forma. Para el revelado se utilizó el kit de detección Immobilon™ Western (Millipore).

3.11. Purificación por afinidad en tándem

Para los experimentos de purificación por afinidad en tándem se usaron cultivos en fase media logarítmica ($20\text{-}25 \times 10^6$ células/mL) de 3 litros. Como paso inicial, los cultivos se centrifugaron a 6000 rpm por 10 minutos a 4°C. Se lavó la pastilla con 200 mL de PBS-G y se resuspendió en 18 mL de buffer IPP-150 (Tris-HCl 10 mM pH 8.0, NaCl 150 mM, NP-40 al 0.1%) frío complementado con

inhibidores de proteasas 2× (Protease Inhibitor Cocktail for Plants and Tissue Extract, Sigma). Se homogeneizó por inversión y se adicionó 3.5 mL de Triton X-100 al 10% y se homogeneizó nuevamente por inversión. Se incubó en hielo hasta que las células estuvieran completamente lisadas (~20 minutos). Posteriormente se dieron 50 golpes manualmente en un homogenizador de 30 ml (marca Wheaton) hasta observar la completa lisis celular. Para aclarar el lisado celular se centrifugó a 10,000 rpm, durante 15 minutos a 4°C.

El sobrenadante se colocó en una columna de cromatografía desechable Econo-Pac® (BIO-RAD) de 20 mL conteniendo 350 µL de perlas de Sefarosa- IgG (IgG Sepharose™ 6 Fast Flow", Amersham) previamente equilibradas, y se incubó por 3 horas a 4°C en rotación suave. La columna se drenó por flujo de gravedad y se lavó tres veces con 20 mL de solución IPP-150 fría. El complejo proteico fue digerido con 100 unidades de la proteasa TEV (SIGMA ALDRICH) en 1 mL de amortiguador de proteasa AcTEV (KCl 150 mM, Tris-HCl 20 mM pH 7.7, MgCl₂ 3 mM, DTT 0.5 mM, Tween 20 al 0.1%, EDTA 0.5 mM) durante toda la noche a 4°C, agitando la columna de manera circular. La columna se dejó eluir por flujo de gravedad, la resina se lavó con 350 µL de solución PC-150 (KCl 150 mM, Tris-HCl 20 mM pH 7.7, MgCl₂ 3 mM, DTT 0.5 mM, Tween 20 al 0.1 %; CaCl₂ 1 mM), equivalente al volumen muerto de las perlas de Sefarosa-IgG. Posteriormente, el eluido conteniendo los complejos proteicos se llevó a un volumen final de 6 mL con buffer PC-150 más CaCl₂ a una concentración final de 3 mM, e inhibidores de proteasas a una concentración final de 2×, antes de adicionarlo a una columna de cromatografía Econo-Pac® (BIO-RAD®) de 5 mL conteniendo 250 µL de matriz de afinidad α- Prot C (HPC4II, Roche®) previamente equilibrada. La columna se incubó 4 horas a 4°C en rotación suave, y se drenó por flujo de gravedad, lavando 6 veces con 5 mL de PC-150. Finalmente, se realizaron ocho eluciones, cada una con 250 µL de buffer de elución (Tris-HCl pH 7.75 mM, EGTA 10 mM, EDTA 5 mM e inhibidores de proteasas 2×). Todos los reactivos utilizados durante este estudio cumplían con grado biología molecular.

3.11.1 Concentración de las muestras para la espectrometría

Para la concentración de las proteínas purificadas se juntaron los eluidos y se transfirió el material (~4 mL) a columnas Amicon® Ultra 0.5 mL Ultracel 3K (Millipore) y se centrifugó a 14,000 g a 4°C por 30 minutos hasta concentrar el volumen a ~40 µL. La muestra concentrada se pasó a un tubo eppendorf de 1.5 mL y se procesó en un equipo *speed vac* hasta reducir a 20 µL el volumen final. Para su análisis, 5 µL de las proteínas concentradas se separaron por electroforesis en un gel prefabricado de gradiente de poliacrilamida (4-15%) (Mini-PROTEAN® TGX™). Después de la electroforesis, el gel se incubó dos veces en solución de fijación (metanol 50%, ácido acético 7%) en agitación suave durante 30 minutos. Se retiró la solución y se incubó durante 12 horas en solución SYPRO® Ruby Protein Gel Stain (Invitrogen™, Molecular Probes™). Posterior a esto se transfirió el gel a un contenedor nuevo y se incubó en agitación suave con solución de lavado (metanol 10%, ácido acético 7%). Finalmente, se lavó por 5 minutos en agua bidestilada.

El gel se analizó en un fotodocumentador (BioSens SC 645). Finalmente, el resto de la proteína se corrió en un gel de poliacrilamida al 10 % preparado con soluciones filtradas y se dejó ingresar la muestra aproximadamente 1 cm al gel. Posteriormente se tiñó con GelCode Blue Stain Reagent (Pierce) durante 2 horas a temperatura ambiente y se lavó con agua destilada durante 2 horas. Las bandas del gel que correspondían a las proteínas purificadas se cortaron en dos fragmentos que contenían las proteínas de bajo peso molecular o las de alto peso molecular. Las bandas se analizaron por espectrometría de masas en la Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigación y a la Industria (USAII), UNAM. Los péptidos obtenidos se identificaron comparando su secuencia con la base de datos del genoma de *L. major*. Algunas de las proteínas anotadas como hipotéticas se analizaron con el programa HHPred (<https://toolkit.tuebingen.mpg.de/tools/hhrepid>) para tratar de identificar dominios funcionales.

4. Resultados

4.1. Análisis bioinformáticos

Los análisis bioinformáticos de Elp3a y Elp3b de *L. major* siguieron la lógica de la estructura de las proteínas. Primero se estudió su estructura primaria, realizando alineamientos de las secuencias de aminoácidos para la identificación de residuos y dominios conservados. Posteriormente se predijo la estructura secundaria y finalmente se modeló, por homología, la estructura terciaria o tridimensional de ambas isoformas.

4.1.2. Análisis de la secuencia de Elp3a y Elp3b de *L. major*

En primera instancia se realizaron alineamientos de las dos isoformas de Elp3 (Elp3a y Elp3b) presentes en *L. major* para definir sus similitudes y diferencias (**Figura 27**). Elp3a tiene un tamaño de 763 aa, mientras que Elp3b tiene 704 aa; esto es, Elp3a es 59 residuos más grande que Elp3b. El porcentaje de identidad observado entre ambas proteínas es de sólo 38% (**Tabla 2**). Las principales diferencias se encuentran al inicio y al final de las secuencias. No obstante, la estructura secundaria predicha es relativamente conservada entre las dos isoformas (**Figura 27**).

Posteriormente, con el fin de determinar si Elp3b y Elp3a de *L. major* poseen los dominios característicos de Elp3 en otros organismos (los dominios HAT y SAM), se realizó un alineamiento multiespecie con las secuencias de aminoácidos de algunos ortólogos de organismos eucariontes (*Homo sapiens*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Arabidopsis thaliana*, *Caenorhabditis elegans*, *Xenopus laevis* y *Drosophila melanogaster*) y un organismo procarionte (*Dehalococcoides mccartyi*) (Figura 27). Las secuencias se obtuvieron de las bases de datos NCBI y de TriTrypDB para ser alineadas con Clustal Ω .

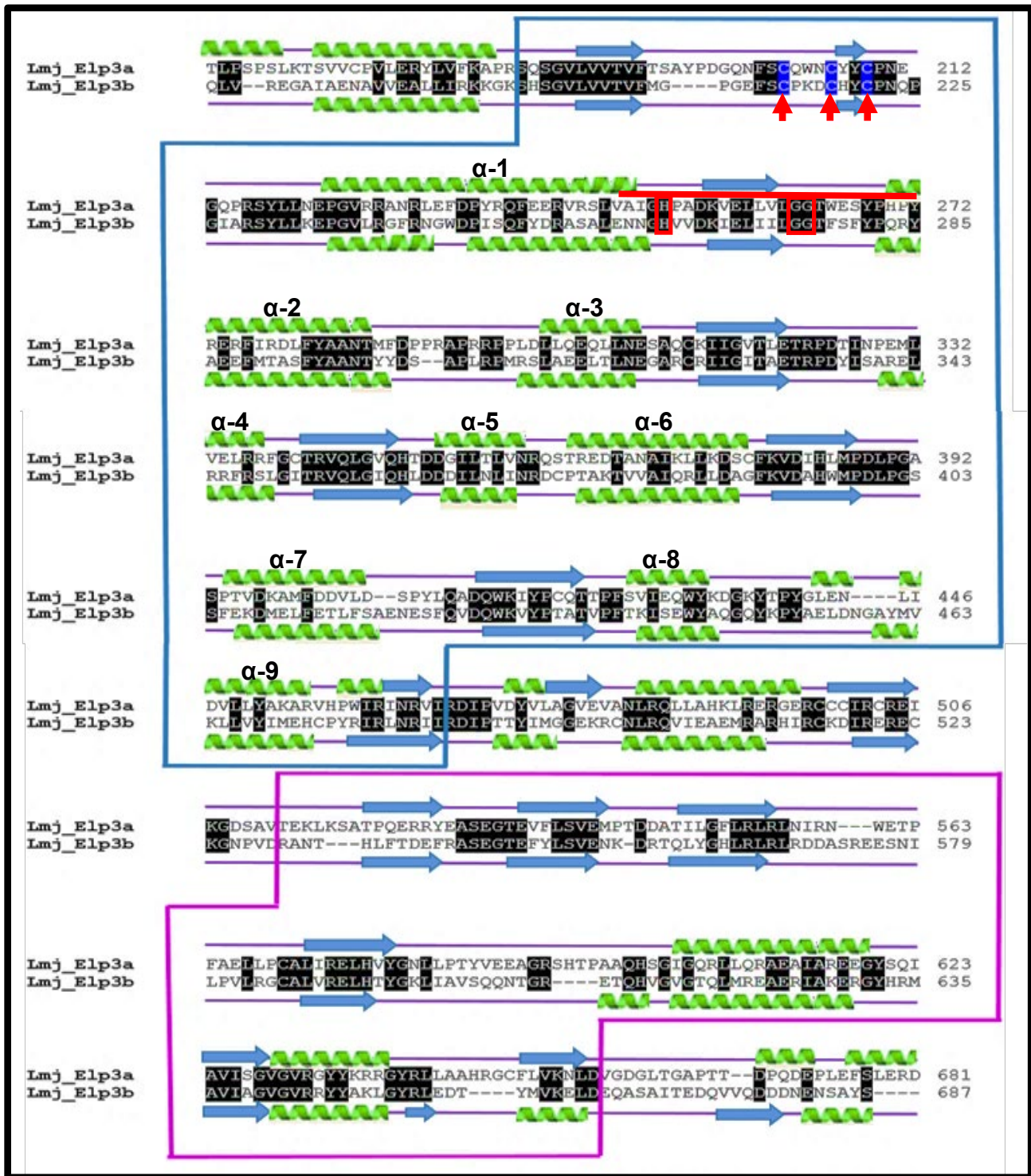


Fig. 27. Alineamiento de la secuencia de aminoácidos de Elp3a y Elp3b de *L. major*. Se comparan las secuencias de aminoácidos de Elp3b (LmjF.23.1350) y Elp3a (LmjF.16.0240) de *L. major* (Lmj). Se observan residuos altamente conservados sombreados de negro y se señala el dominio radical SAM (caja azul) y el dominio HAT (caja rosa). También se indica la estructura secundaria predicha para ambas isoformas de *L. major*. Las espirales indican α -hélices (se marcan las 9 α -hélices que son características del dominio SAM) y las flechas denotan láminas β -plegadas. Las flechas rojas verticales señalan las cisteínas conservadas que conforman el *cluster* Fe₄S₄ mientras que la barra roja horizontal señala el posible sitio de unión de S-adenosilmetionina, el cual se caracteriza por poseer varias glicinas.

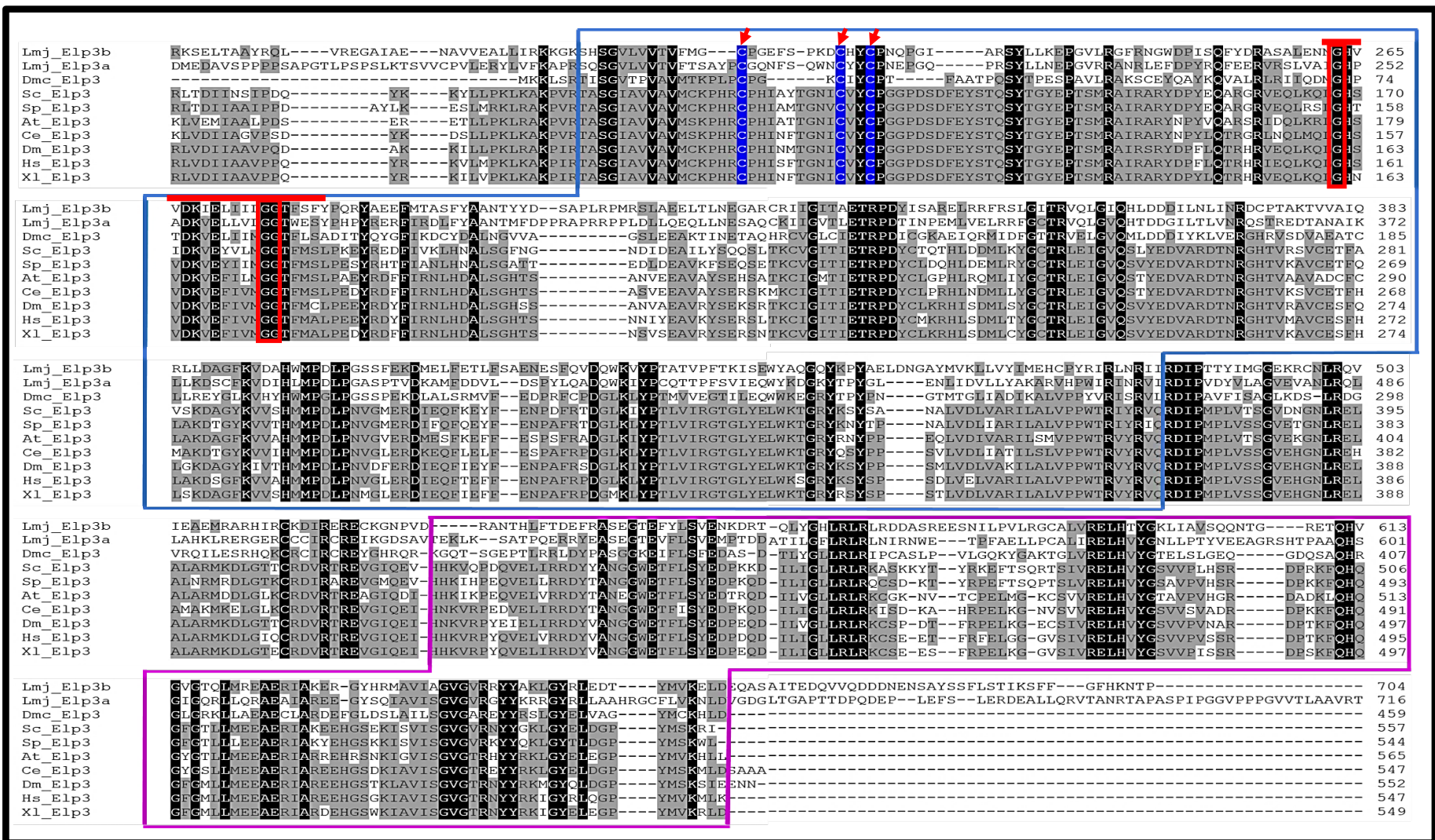


Fig. 28. Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de Elp3a y Elp3b de *L. major* con Elp3 de otros organismos. Se comparan las secuencias de aminoácidos de *D. mccartyi* (Dmc) (CAI82774), *H. sapiens* (Hs) (BAB14138), *S. cerevisiae* (Sc) (NP_015239), *A. thaliana* (At) (CAI79647), *S. pombe* (Sp) (CAB10146), *C. elegans* (Ce) (NP_506055), *X. laevis* (Xl) (AAH88956) y *D. melanogaster* (Dm) (AAF51012). Se observan residuos altamente conservados sombreados de negro y de gris los residuos que coinciden al menos cuatro organismos. También se señala el radical SAM (caja azul) y el dominio HAT (caja rosa). Las flechas rojas verticales señalan las cisteínas conservadas que conforman el cluster Fe₄S₄, mientras que la barra roja horizontal señala el posible sitio de unión de S-adenosilmetionina, el cual se caracteriza por poseer varias glicinas.

Este alineamiento nos permitió determinar que, a pesar de que la secuencia de Elp3a y Elp3b de *L. major* no está altamente conservada, sí presenta los dos dominios característicos de todos los ortólogos de Elp3: el dominio radical SAM (con su típico *cluster* de hierro-azufre, Fe₄S₄) y el dominio de histona acetiltransferasa (HAT). Estos dos dominios justamente corresponden a las dos regiones más conservadas de la proteína. La secuencia más parecida a Elp3a y Elp3b de *L. major* resultó ser el ortólogo de *D. mccartyi*, con porcentajes de identidad de 39.9 y 38.5% respectivamente (**Tabla 2**). La identidad entre las dos isoformas de Elp3 en *L. major* fue de 38%, siendo menor a la observada entre cada isoforma y *D. mccartyi* (38.5 y 39.9%). El alineamiento también reveló que en general la secuencia de Elp3 está medianamente conservada. Por ejemplo, la identidad entre los ortólogos de humano y de *X. laevis* es de 74.6%, mientras que entre *S. cerevisiae* y *S. pombe* es de 74.3% (**Tabla 2**).

Tabla 2. Porcentajes de identidad entre ortólogos de Elp3.

	Lm Elp3b	Lm Elp3a	Dmc	Hs	Sc	At	Sp	Ce	XI	Dm
Lm Elp3b	100	38	38.5	32.4	34	33	32.5	33.7	34.5	33.5
Lm Elp3a	-	100	39.9	32	35.4	34.3	34.1	32.7	34.5	33.8
Dmc	-	-	100	41	43.1	42.2	44.2	42	42	43.3
Hs	-	-	-	100	77.7	68.4	71.8	73.5	74.6	74.8
Sc	-	-	-	-	100	70.2	74.3	73.4	73.9	74.7
At	-	-	-	-	-	100	73.6	71.7	72.9	72.1
Sp	-	-	-	-	-	-	100	77.8	79	80.6
Ce	-	-	-	-	-	-	-	100	82.2	81.9
XI	-	-	-	-	-	-	-	-	100	89.2
Dm	-	-	-	-	-	-	-	-	-	100

L. major (Lm), *H. sapiens* (Hs), *S. cerevisiae* (Sc), *A. thaliana* (At), *C. elegans* (Ce), *X. laevis* (XI), *D. melanogaster* (Dm) y *D. mccartyi* (Dmc). Se resalta el porcentaje de identidad entre Elp3a y Elp3b (38%) de *L. major* y también el porcentaje de identidad de estas dos isoformas con *D. mccartyi*.

Con el fin de determinar la presencia de los genes de Elp3a y Elp3b en otros tripanosomátidos, se llevaron a cabo búsquedas de tipo BLAST en las bases de datos de: *Leishmania donovani*, *Leishmania infantum*, *Leishmania mexicana*, *Leishmania panamensis*, *Leishmania braziliensis*, *Trypanosoma brucei* y *Trypanosoma cruzi*. Así, se encontró que el gen de Elp3b se localiza en el cromosoma 23 en todas las especies de *Leishmania*. La comparación de las secuencias reveló una muy alta conservación de Elp3b en tripanosomátidos (**Figura 29 y Tabla 3**). Como se esperaba, Elp3b de *L. major* es más parecido al ortólogo de *L. donovani* y *L. infantum* (96.3% de identidad) que a los ortólogos de *T. cruzi* y *T. brucei* (72.7 y 72.6%, respectivamente) (**Tabla 3**). Los dominios SAM y HAT son particularmente conservados entre Elp3b de los tripanosomátidos (**Figura 29**).

Tabla3. Porcentajes de identidad entre ortólogos de Elp3b en tripanosomátidos.

Elp3b	Lmj	Ldv	Lif	Lmx	Lgy	Lpm	Lbz	Tb	Tc
Lm	100	96.3	96.3	95.8	90.7	93.5	93.5	72.6	72.7
Ldv	-	100	99.7	96.1	90.6	93.5	93.5	73.4	73.4
Lif	-	-	100	96.3	90.6	93.3	93.3	73.4	73.3
Lmx	-	-	-	100	90.4	93.6	93.6	73.3	73.2
Lgy	-	-	-	-	100	99.8	99.6	73.8	73.7
Lpm	-	-	-	-	-	100	99.8	76.7	76.3
Lbz	-	-	-	-	-	-	100	76.7	76.3
Tb	-	-	-	-	-	-	-	100	79.3
Tc	-	-	-	-	-	-	-	-	100

Se comparan las secuencias de *L. major* (Lm), *L. donovani* (Ldv), *L. infantum* (Lif), *L. mexicana* (Lmx), *L. panamensis* (Lpm), *L. braziliensis* (Lbz), *T. brucei* (Tb) y *T. cruzi* (Tc). Se muestra un alto porcentaje de identidad entre *L. major* y *L. donovani* (96.3%).

Por su parte, el gen de Elp3a se localiza en el cromosoma 16 en todas las especies de *Leishmania* y la comparación de las secuencias reveló una muy alta conservación en tripanosomátidos (**Figura 30**). Como se observó con Elp3b, Elp3a de *L. major* es más parecido al ortólogo de *L. donovani* y *L. infantum* (94.07% de identidad) que a los ortólogos de *T. cruzi* y *T. brucei* (62.06 y 63.38%, respectivamente) (**Tabla 4**). Los dominios SAM y HAT están particularmente conservados, así como las cisteínas características del dominio radical SAM (**Figura 30**). De esta manera se puede concluir que todas las especies de tripanosomátidos analizadas poseen las dos isoformas de Elp3 y que su secuencia es altamente conservada. La **Figura 31** muestra un esquema general que compara el tamaño y los dominios presentes en Elp3a y Elp3b de *L. major* y otros organismos.

Elp3a	Lm	Ldv	Lif	Lmx	Lpm	Lbz	Tb	Tc
Lm	100	94	94	92.1	83.2	82.9	63.3	62
Ldv	-	100	99.6	93	84.1	83.8	63.6	61.9
Lif	-	-	100	93	83.8	83.6	63.8	62
Lmx	-	-	-	100	82.7	82.3	64.1	62.3
Lpm	-	-	-	-	100	99.2	63.2	61.5
Lbz	-	-	-	-	-	100	63.2	61.2
Tb	-	-	-	-	-	-	100	73.3
Tc	-	-	-	-	-	-	-	100

Tabla 4. Porcentajes de identidad entre ortólogos de Elp3a en tripanosomátidos. Se comparan las secuencias de *L. major* (Lm), *L. donovani* (Ldv), *L. infantum* (Lif), *L. mexicana*, *L. panamensis* (Lpm), *L. braziliensis* (Lbz), *T. brucei* (Tb) y *T. cruzi* (Tc) (XP_805799). Se resalta el porcentaje de identidad entre Elp3a de *L. major* con *L. donovani* y *L. infantum*, siendo los porcentajes de identidad más alto.

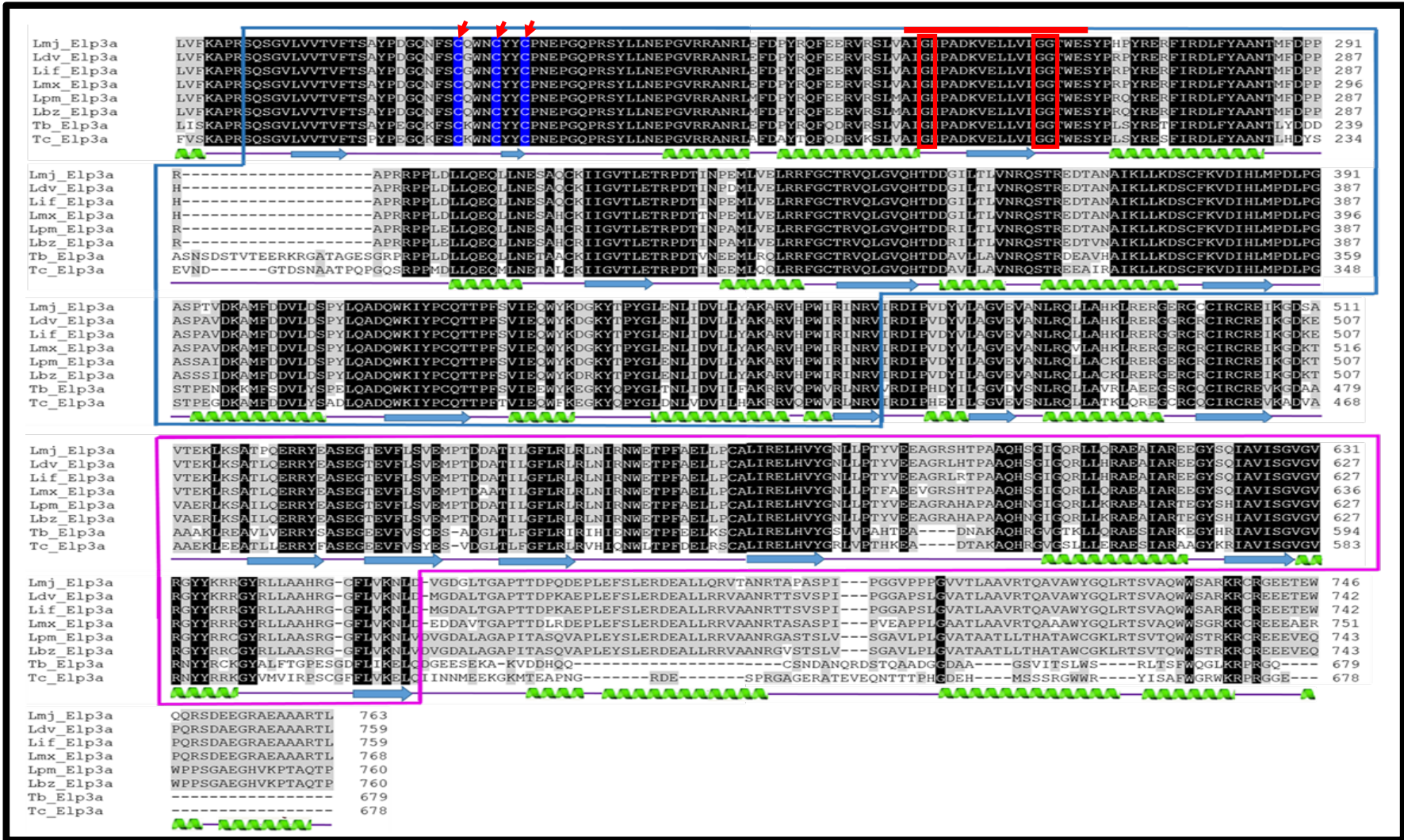


Fig. 30. Alineamiento de la secuencia de aminoácidos de Elp3a de *L. major* con otros tripanosomátidos. Se comparan las secuencias de aminoácidos de Elp3a (LmjF.23.1350) de *L. major* (Lmj) con Elp3b de *L. donovani* (Ldv) (XP_003860154.1), *L. infatum* (Lif) (XP_001465835.1), *L. mexicana* (Lmx) (XP_003875777.1), *L. guyanensis* (Lgy) (CCM15869.1), *L. panamensis* (Lpm) (XP_010699307.1), *L. barzilienzis* (Lbz) (XP_001565219.1), *T. brucei* (Tb) (XP_847162.1) y *T. cruzi* (Tc) (XP_814999.1). Se observan residuos altamente conservados sombreados de negro y de gris los residuos que coinciden al menos en cuatro ortólogos. También señala el radical SAM (caja azul) y el dominio HAT (caja rosa). También se indica la estructura secundaria predicha para Elp3a de *L. major*. Las espirales indican α -hélices y las flechas denotan laminas β -plegadas. Las flechas rojas verticales señalan las cisteínas conservadas que conforman el *cluster* Fe₄S₄ mientras que la barra roja horizontal señala el posible sitio de unión de S-adenosilmetionina, el cual se caracteriza por la presencia de glicinas.

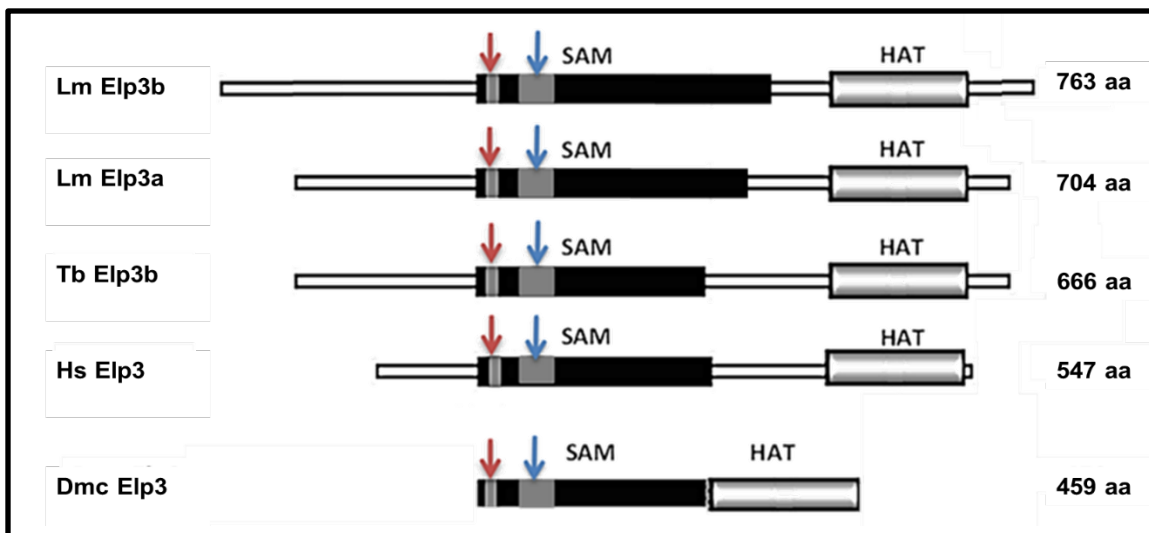


Figura 31. Esquematación de los dominios conservados en Elp3. Se muestra al radical SAM con su característico *cluster* de Fe_4S_4 (flecha roja) y el posible sitio de unión a S-adenosilmetionina (flecha azul), así como el dominio HAT en *L. major* (Lm), *T. brucei* (Tb), *H. sapiens* (Hs) y *D. mccartyi* (Dmc). Se indica el respectivo tamaño de cada proteína.

4.1.3. Predicción de la estructura secundaria y tridimensional de Elp3 en *L. major*

La estructura secundaria predicha de Elp3a y Elp3b de *L. major* se generó con el programa bioinformático Phyre² (**Figura 27**). En el dominio radical SAM de ambas isoformas se presentaron nueve α -hélices y cuatro laminas β -plegadas, lo cual coincide con reportes que indican que este dominio se caracteriza por la presencia de nueve α -hélices y varias laminas β -plegadas (Frey *et al.*, 2008). Por otro lado, el dominio HAT presentó dos α -hélices, de manera similar a lo reportado para otros dominios HAT (Clements *et al.*, 1999). Asimismo, para obtener la probable estructura tridimensional de los dominios SAM y HAT de ambas isoformas de Elp3 de *L. major* (**Figura 32**) se usó el programa Swiss-model, empleando como templado el cristal de Elp3 de *D. maccartyi* (Glatt *et al.*, 2016) (PDB: <https://www.ebi.ac.uk/pdbe/entry/pdb/5l7j>) (**Figura 33**).

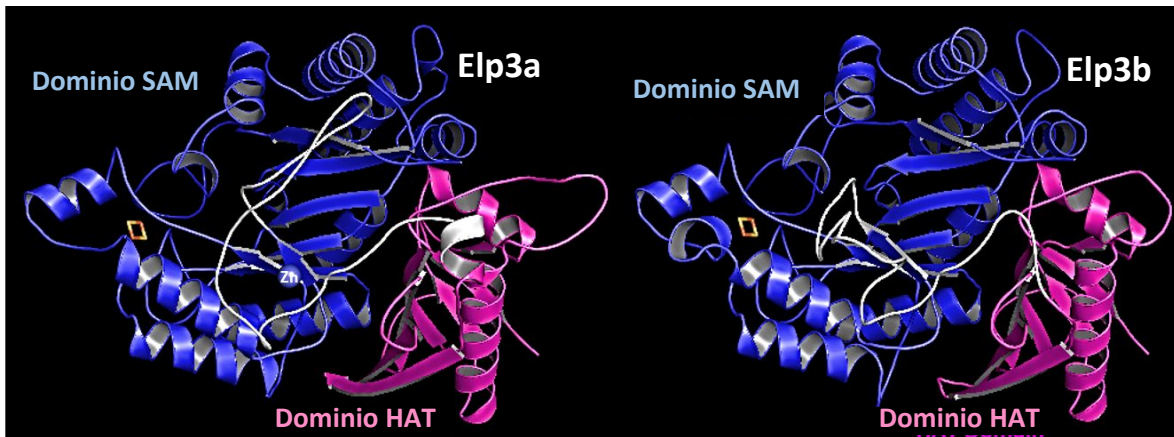


Figura 32. Predicción de la estructura tridimensional de las dos isoformas de Elp3 de *L. major*. El modelado por homología se realizó comparando con el cristal de Elp3 de *D. mccartyi*. En ambos modelos se reconoce al dominio radical SAM (azul) y al dominio HAT (rosa) y un rombo de color amarillo y naranja que corresponde al *cluster* de Fe₄S₄ característico del dominio radical SAM.

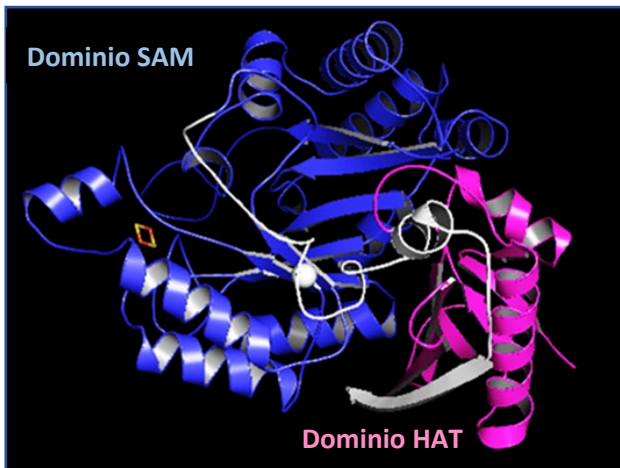
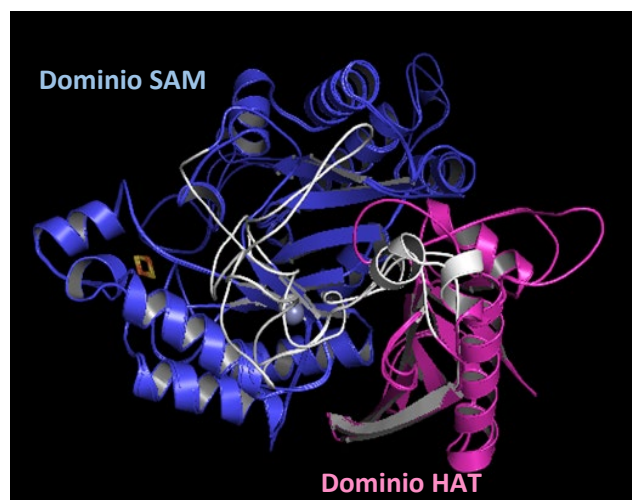


Figura 33. Modelo tridimensional de Elp3 de *D. mccartyi*. Se muestra la estructura tridimensional de Elp3 de *D. mccartyi* a partir de un [cristal](#) donde se puede observar la presencia del dominio SAM (azul) y al dominio HAT (rosa).

Figura 34. Sobreposición de los tres modelos: Elp3a y b de *L. major*, y Elp3 de *D. mccartyi*. Se muestran los tres modelos sobrepuestos en una imagen para ejemplificar la similitud estructural que guardan.



Las estructuras tridimensionales de Elp3a y Elp3b fueron casi idénticas entre sí (**Figura 32**) y muy parecidas a la de Elp3 de *D. maccartyi* (**Figura 33**), como se observa en la sobreposición de las tres estructuras (**Figura 34**). Con la finalidad de validar el modelaje tridimensional generado para Elp3a y Elp3b en *L. major*, se hizo uso de una plataforma digital (ModFold) para determinar qué tanta similitud presentan dichos modelos en relación con la proteína templado. Dicho *score* maneja un intervalo de 0 a 1, donde 1 es 100% de similitud con la proteína templado. El modelo tridimensional de Elp3a arrojó un *score* de 0.92, mientras que el del modelo de Elp3b de 0.91, lo cual nos indica que la estructura tridimensional de ambas proteínas es muy parecida a la de la proteína templado (**Figura 34**).

4.2. Obtención de la línea celular Elp3a-PTP

Las proteínas con las que interaccionan Elp3a y Elp3b de *L. major* se identificaron mediante ensayos de purificación por afinidad en tándem. Para ello era necesario contar con líneas celulares que expresaran a las dos isoformas de Elp3 fusionadas a la bandera PTP. Como se mencionó anteriormente, en el laboratorio se generó previamente la línea celular que expresa a la proteína recombinante Elp3b-PTP (Moreno-Campos *et al.*, 2016). Entonces, la siguiente parte del trabajo consistió en la obtención y caracterización de la línea celular que expresara la proteína de fusión Elp3a-PTP. Como primer paso, el gen de Elp3a se clonó en el vector pGEM-T Easy y se subclonó en el plásmido pB6-PTP. Con el vector PTP resultante se transfectaron cultivos de *L. major*, seleccionando con G418. El cultivo transfectado establemente que se obtuvo se analizó por *Western-blot* para verificar que expresara a la proteína recombinante. Después se procedió a la realización de los ensayos de purificación por afinidad en tándem y a la identificación de las proteínas aisladas por espectrometría de masas.

4.2.1. Clonación de Elp3a en el vector pGEM-T Easy

La región codificadora de Elp3a se amplificó por PCR usando los oligonucleótidos Elp3a-5'-For y Elp3a-3'-Rev, los cuales poseen sitios de restricción para las enzimas *HpaI* y *XbaI* (**Figura 35**).

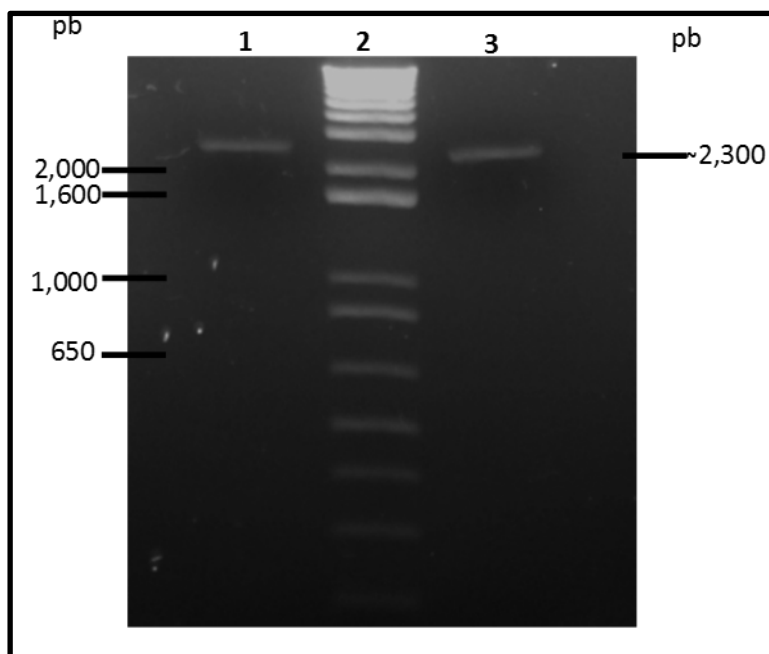


Figura 35. Amplificación por PCR del gen Elp3a de *L. major*. Se muestran las bandas que corresponden al gen Elp3a amplificado con los oligonucleótidos Elp3a-5'-For y Elp3a-3'-Rev (carriles 1 y 3), el cual tiene un tamaño de ~2,300 pb. En el carril 1 se amplificó el gen con Herculasa y en el carril 3 con Pfx, ambas son polimerasas de alta fidelidad para evitar la aparición de mutaciones por errores de la enzima. El marcador corresponde a la escalera 1 kb plus Invitrogen™. Gel de agarosa al 0.8%.

Posteriormente el gen Elp3a se amplificó por PCR y la secuencia purificada se clonó en el vector pGEM-T Easy, un vector utilizado para la clonación directa de productos de PCR. Para la transformación se utilizaron células competentes de *E. coli* JM109, las cuales se mezclaron con los productos de ligación y se esparcieron en cajas Petri con medio LB suplementado con ampicilina e IPTG. Finalmente, las células se dejaron crecer toda la noche a 37°C.

Se eligieron varias colonias blancas de *E. coli*, es decir, colonias resistentes a ampicilina y sin la capacidad de degradar X-Gal y se analizaron mediante ensayos

de restricción para corroborar la presencia del plásmido. Finalmente se eligió la clona 8, ya que ésta presentó el inserto debidamente clonado, pues se observaron las bandas esperadas de ~2,300 pb (gen de Elp3a) y ~3,000 pb (vector pGEM-T Easy) (**Figura 36**). La clona fue enviada a secuenciar, confirmando la integridad del gen de Elp3a. De esta forma se obtuvo el vector pGE-LmElp3a (**Figura 37**).

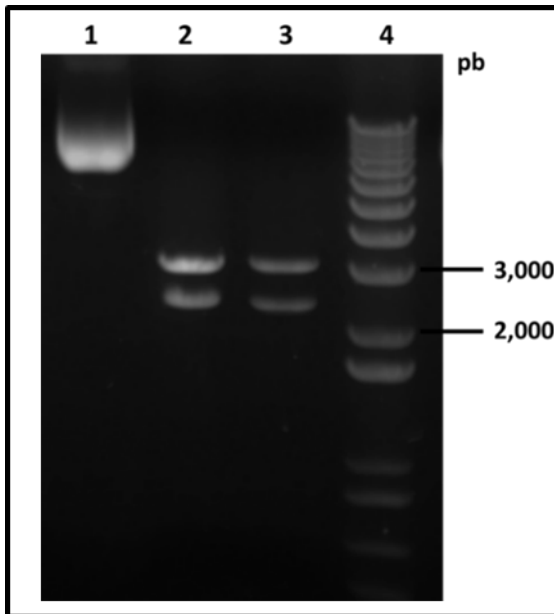
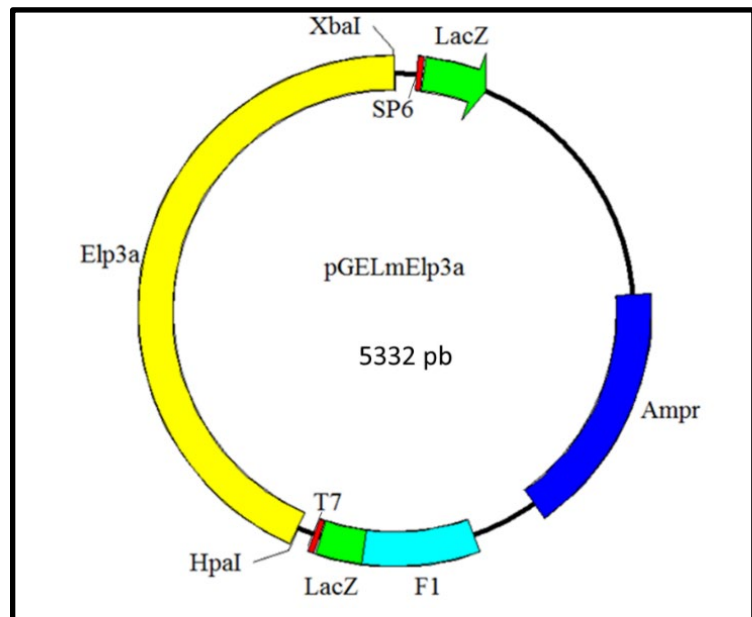


Figura 36. Ensayo de restricción de la clona 8 con el vector pGELmElp3a. Se muestra el ensayo de restricción para confirmar la presencia del inserto, el cual tiene un tamaño de de ~2,300 pb. En el carril 1 está el vector sin digerir, en el carril 2 el vector digerido con *EcoRI*, en el carril 3 el vector digerido con las enzimas *HpaI* y *XbaI*, y en el carril 4 el marcador. Para los carriles 3 y 4 se observa el inserto (~2,300 pb) y el cuerpo del vector (~3,000 pb). El marcador corresponde a la escalera 1 kb plus Invitrogen™. Gel de agarosa al 0.8%.

Figura 37. Mapa del vector pGELmElp3a. Se indica el gen de Elp3a de *L. major* (2,308 pb) y el gen de resistencia a ampicilina. El vector tiene un tamaño de 5,332 pb.



4.2.2 Clonación de Elp3a en el vector pB6-PTP

Para la clonación del gen de Elp3a al vector pB6-PTP, primero se procedió a la digestión del vector pB6-PTP (**Figura 38**), escindiendo la región que corresponde a RPB6 (**Figura 39**). El vector pB6-PTP sin la región RPB6 (**Figura 40A**), con los respectivos sitios de corte, se ligó posteriormente con el gen Elp3a purificado previamente del vector pGELmElp3a (**Figura 40B**). Para la transformación se utilizaron células competentes de *E. coli* JM109, las cuales se mezclaron con los productos de ligación. Se eligieron varias colonias resistentes a ampicilina. De dichas colonias se purificó el plásmido, el cual se analizó mediante restricción. Finalmente se eligió la clona 1, ya que ésta presentó el inserto debidamente clonado, pues se observaron las bandas esperadas de ~5, ~3.4 y ~1.1 kb en la restricción con las enzimas *Xba*I, *Sma*I y *Nco*I (**Figura 41**). La construcción correcta del vector se verificó mediante secuenciación, confirmándose que el gen de Elp3a se encuentra en marco con la bandera PTP (**Figura 42**). De esta forma, se obtuvo el vector pLmElp3a-PTP (**Figura 43**).

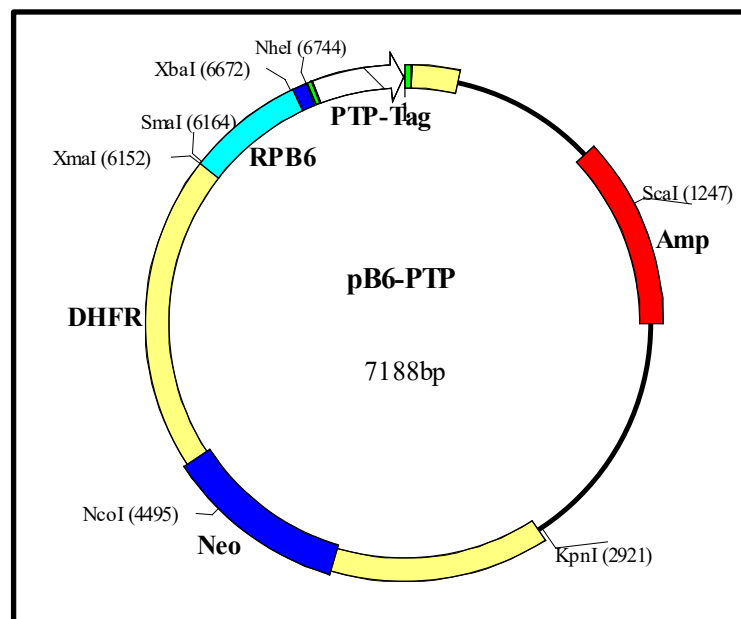


Figura 38. Mapa del vector pB6-PTP. Se indica el gen RPB6 fusionado al PTP-tag. También se muestra el gen de resistencia a G418 (Neo). En amarillo se señalan las regiones intergénicas del locus de DHFR de *L. major*, las cuales proporcionan las señales de procesamiento de los mRNAs. El gen RPB6 tiene un tamaño de 518 pb y el cuerpo del vector, que incluye la bandera PTP, tiene un tamaño de ~6,670 pb, por lo que el vector tiene un tamaño de 7,188 pb.

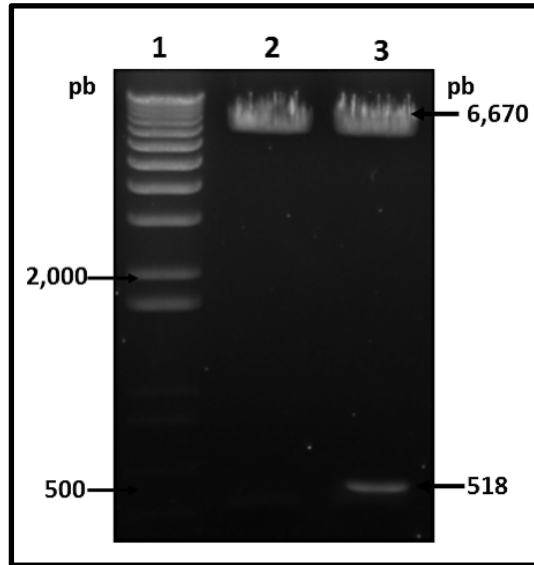


Figura 39. Ensayo de restricción del vector pB6-PTP. En el carril 1 está el marcador (escalera 1 kb plus Invitrogen™) y en el carril 2 se muestra el vector sin digerir. En el carril 3 se presenta el vector digerido con las enzimas *Sma*I y *Xba*I, observándose el cuerpo del vector pB6-PTP de nuestro interés (~6,670 pb) y la región RPB6 (~518 pb). Gel de agarosa al 0.8%.

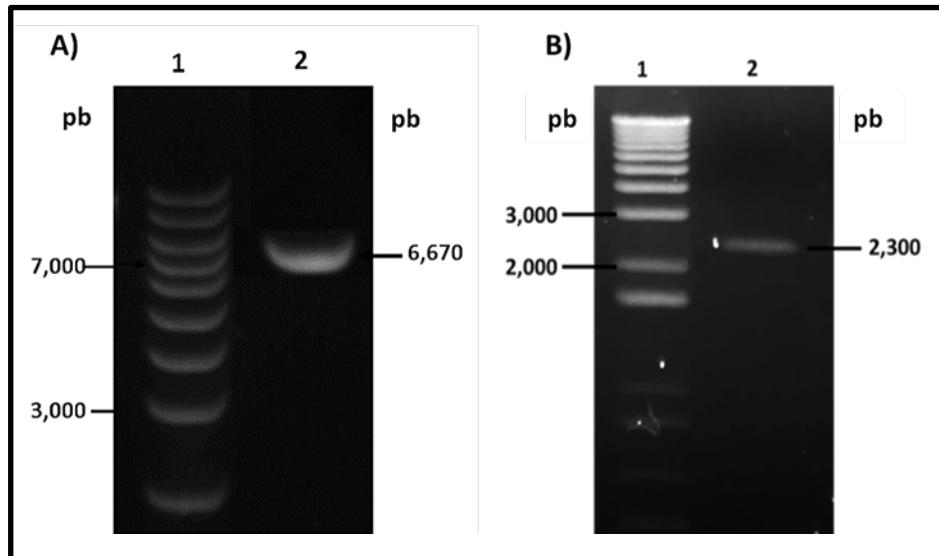


Figura 40. A) Región purificada del vector pB6-PTP. Se muestra la región que corresponde al vector pB6-PTP sin RPB6 la cual tiene un tamaño de ~6,670 pb. **B) Gen Elp3a purificado del vector pGELmElp3a.** Tiene un tamaño de ~2,300 pb. En ambos paneles el marcador (carril 1) corresponde a la escala 1 kb plus Invitrogen™. Geles de agarosa al 0.8%.

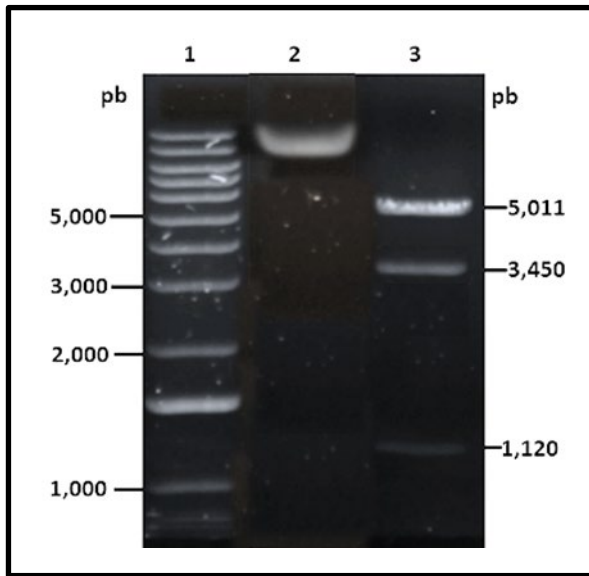


Figura 41. Ensayo de restricción del vector pLmElp3a-PTP. En el carril 2 está el vector pLmElp3a-PTP sin digerir, en el carril 3 está el vector digerido con *Xba*I, *Sma*I y *Nco*I y en el carril 1 el marcador (escalera 1 kb plus Invitrogen™). En el carril 3 se observan insertos de ~5,011, ~3,450 y ~1,120 pb. Gel de agarosa al 0.8%.

1	ACCGAGTGGCAGCAGCGGAGCGACGAGGAGGGACGCGCTGAAGCAGCAGCGCGCACTCTG
1	T E W Q Q R S D E E G R A E A A A R T L
61	TCTAGAGGITCCGACGGCGAAGATCAGGTGGATCCCTCGICTTATTGATGGGAAATATGAT
21	S R G S D G E D Q V D P R L I D G K Y D
121	ATTCCAACACTACTGCTAGCGAGAATTTGTATTTTCAGGGTGAGCTCAAAAACCGCGGCTCTT
41	I P T T A S E N L Y F Q G E L K T A A L
181	GCGCAACACGATGAAGCCGTGGACAACAATTCACAAAGAACAACAAAACGCGTCTAT
61	A Q H D E A V D N K F N K E Q Q N A F Y
241	GAGATCTTACATTACCTAACTTAAACGAAGAACAACGAAACGCCCTTCATCCAAAGTTTA
81	E I L H L P N L N E E Q R N A F I Q S L
301	AAAGATGCCCAAGCCAAAGCGCTAACCTTTTAGCAGAAGCTAAAAAGCTAAATGATGCT
101	K D D P S Q S A N L L A E A K K L N D A
361	CAGGCGCCGAAAGTAGACAACAATTCACAAAGAACAACAAAACGCGTCTATGAGATC
121	Q A P K V D N K F N K E Q Q N A F Y E I
421	TTACATTTACCTAACTTAAACGAAGAACAACGAAACGCCCTTCATCCAAAGTTTAAAGAT
141	L H L P N L N E E Q R N A F I Q S L K D
481	GACCCAAGCCAAAGCGCTAACCTTTTAGCAGAAGCTAAAAAGCTAAATGGTGCTCAGGCG
161	D P S Q S A N L L A E A K K L N G A Q A
541	CCGAAAGTAGACGCGAATTCGCGGGGAAGTCAACCCAATGGATTATAAAGATGATGAT
181	P K V D A N S A G K S T Q L D Y K D D D
601	GATAAATAA
201	D K *

Figura 42. Secuencia de nucleótidos y de aminoácidos de Elp3a unida a la bandera PTP. A partir de la secuencia del vector pLmElp3a-PTP se predijo la secuencia de aminoácidos. En color amarillo se representa el extremo C-terminal de Elp3a, en verde el epítipo de Prot C, en rosa el sitio de corte de la proteasa TEV y en azul los dos epítipos de Prot A. Se observa que la secuencia Elp3a se encuentra en marco con la bandera PTP.

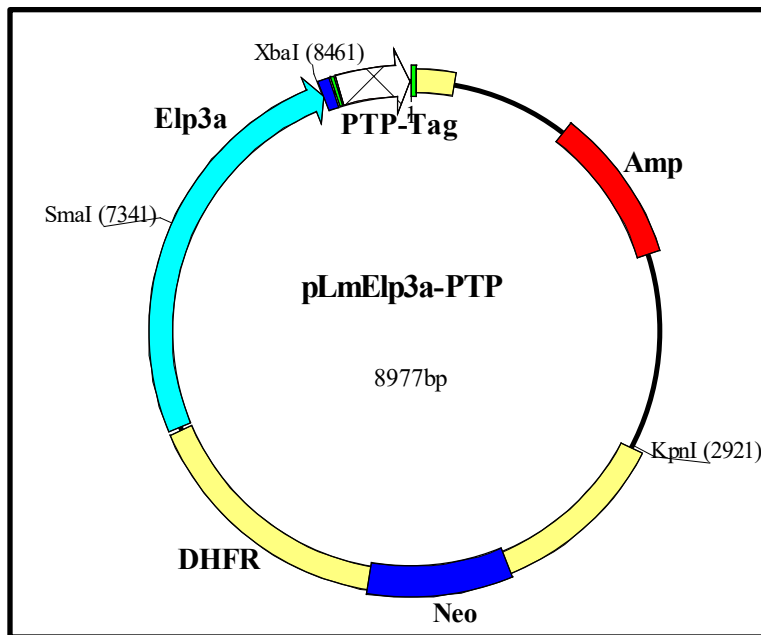


Figura 43. Mapa del vector pLmElp3a-PTP. Se indica el gen de Elp3a de *L. major* fusionado al PTP-Tag y los genes de resistencia a neomicina y ampicilina. En amarillo se señalan las regiones intergénicas del locus de DHFR de *L. major*, las cuales proporcionan las señales de procesamiento de los mRNAs.

4.2.3. Electroporación y caracterización de la línea LmjF/Elp3a-PTP

El vector pLmElp3a-PTP se preparó a gran escala por maxiprep. Posteriormente se realizaron transfecciones de promastigotes de *L. major*, usando 25 µg del plásmido. Las células se seleccionaron con el fármaco G418, se monitorearon hasta la aparición de células en división, aproximadamente dos semanas posteriores a la transfección. Después de la tercera resiembra se procedió a la caracterización de la población para confirmar la expresión de la proteína recombinante Elp3a unida a la bandera PTP. De esta manera se hicieron ensayos de *Western-blot* con el anticuerpo anti Prot C (el cual reconoce la región de Prot C de la bandera PTP), en donde se observó la presencia de la proteína recombinante Elp3a-PTP con el tamaño esperado de ~115 kDa (**Figura 44, carril 1**).

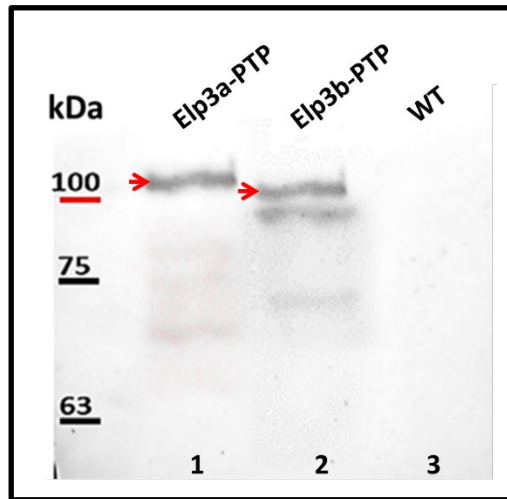


Figura 44. Ensayo de Western-blot de la línea celular LmjF/Elp3a-PTP. En el carril 1 se encuentra la línea LmjF/Elp3a-PTP donde se observa una banda que corresponde a la proteína recombinante Elp3a-PTP de ~115 kDa. En el carril 2 está la línea celular LmjF/Elp3b-PTP en donde se observa una banda de ~105 kDa que corresponde a la proteína recombinante Elp3b-PTP. Ambas proteínas recombinantes están marcadas con una flecha. En el carril 3 se encuentran células silvestres de *L. major*. Se utilizó el anticuerpo anti Prot C con una dilución 1:3000.

En estos ensayos también se analizó la línea celular LmjF/Elp3b-PTP, para confirmar que siguiera expresando la proteína recombinante Elp3b-PTP. Como se anticipaba, se observó la banda esperada de ~105 kDa (**Figura 44, carril 2**). Las bandas menores que se distinguieron en la autorradiografía podrían corresponder a productos de degradación de la proteína de fusión. Como control negativo se analizaron células silvestres, con las que no se obtuvo ninguna señal (**Figura 44, carril 3**).

4.3. Purificaciones por afinidad en tándem con la línea celular LmjF/Elp3b-PTP

Para aislar complejos proteicos de Elp3b, se llevaron a cabo experimentos de purificación por afinidad en tándem con células de *L. major* transfectadas con el vector pLmElp3b-PTP, es decir, con la línea LmjF/Elp3b-PTP obtenida y caracterizada previamente en el laboratorio. Para ello se prepararon 3 litros de cultivo de células transfectadas en fase logarítmica media. A continuación el extracto proteico crudo obtenido de los cultivos lisados con Triton X-100 se transfirió

a una columna cromatográfica que contenía una matriz de sefarosa/IgG y se incubaron por un periodo de 3 h a 4°C. Posteriormente, se liberaron de la matriz mediante incubación con la proteasa TEV y el eluido obtenido se transfirió a una nueva columna cromatográfica con una matriz con afinidad a Prot C. Finalmente, los complejos proteicos se liberaron de las columnas mediante el uso de agentes quelantes. Los eluidos finales de la purificación se concentraron, y una fracción (~1/4 parte del total) se analizó en un gel de poliacrilamida (**Figura 45**). En el gel se observaron aproximadamente 10 bandas, una de las cuales tiene el tamaño esperado para Elp3b (~83.5 KDa, considerando que Elp3b-PTP tiene un tamaño predicho de ~80 kDa, mas ~3.56 kDa adicionales otorgados por el dominio de la proteína C del epitope de extracción).

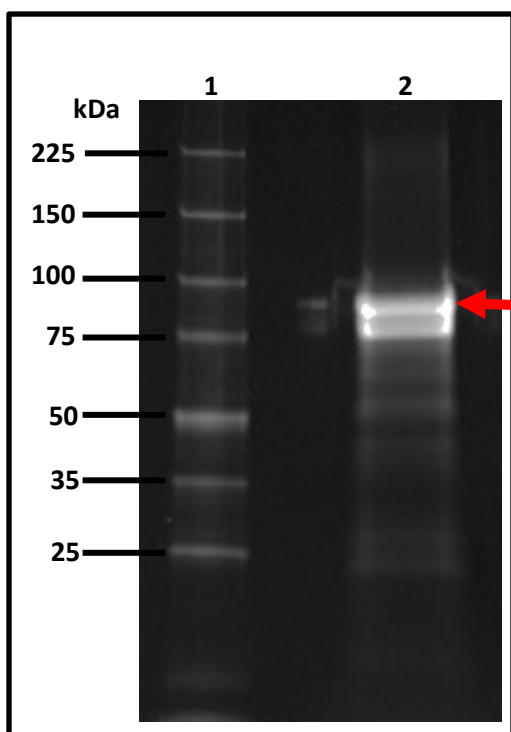


Figura 45. Eluido final de la purificación por afinidad en tándem de LmElp3b-PTP (carril 2). La muestra corresponde a una alícuota del material final concentrado. Gel de gradiente (4-15%) de poliacrilamida (Mini-PROTEAN[®] TGX[™] Precast Gel) teñido con SYPRO Ruby. La flecha indica a la proteína blanco probable, Elp3b-PTP. Marcador Broad Range Protein Molecular Weight Markers PROMEGA (carril 1).

Con el objeto de identificar proteínas purificadas en el experimento de afinidad en tándem, el eluido final concentrado se analizó por espectrometría de masas. Para ello, se procedió a introducir la muestra en un gel de poliacrilamida de manera que sólo entraran las proteínas en el gel aproximadamente 1 cm; después se tiñó con GelCode Blue Stain Reagent. La banda observada se cortó y dicho fragmento se

envió a analizar a la Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigación y a la Industria (USAI), de la UNAM. Los péptidos obtenidos se identificaron comparando su secuencia con la base de datos del genoma de *L. major*.

El análisis de las muestras confirmó la presencia de la proteína blanco LmElp3b y sólo otras 4 proteínas: La proteína UTP1 (factor que promueve la biogénesis del pre-rRNA 18S), una proteína de unión al flagelo (FAZ), el factor de elongación 1 α y β -tubulina. Debido a la poca cantidad de proteínas que arrojó la espectrometría se decidió hacer otra purificación, pero en esta ocasión usando sólo una columna, la que contenía la matriz de perlas de Sefarosa-IgG, para capturar aquellas proteínas que poseen una unión más débil con la proteína blanco (**Figura 46**). En dicha purificación se obtuvieron más bandas que en el experimento pasado (~25 bandas) con pesos moleculares que varían de ~25 a ~150 kDa (**Figura 46**). De igual manera se puede observar un enriquecimiento en la región que correspondería a Elp3b-PTP (~83.5 kDa).

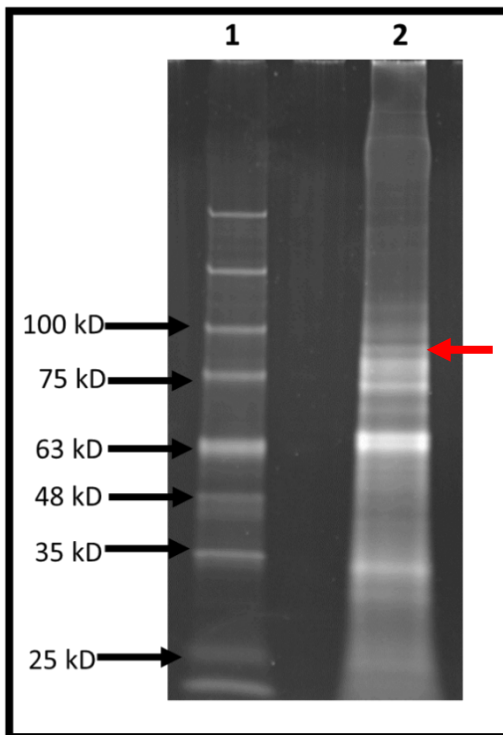


Figura 46. Eluido final de la purificación por afinidad en tándem de LmjF/Elp3b-PTP por una sola comuna (Carril 2). La muestra corresponde a una alícuota del material final concentrado. Gel de gradiente (4-15%) de poliacrilamida (Mini-PROTEAN® TGX™ Precast Gel) teñido con SYPRO Ruby. La flecha roja indica a la proteína blanco, Elp3b-PTP con un peso de ~83.5 kDa. Marcador Broad Range Protein Molecular Weight Markers PROMEGA (Carril 1).

El eluido final concentrado de la purificación de Elp3b-PTP por una columna se analizó por espectrometría de masas. Para ello, la muestra se trató como se indicó antes. Los péptidos obtenidos se identificaron comparando su secuencia con la base de datos del genoma de *L. major*.

El análisis de las muestras confirmó la presencia de la proteína blanco LmElp3b, además de otras proteínas que pudieran tener interacción con LmElp3b (**Tabla 5**). Algunas de ellas, no obstante, podrían corresponder a proteínas contaminantes.

Las proteínas obtenidas de este estudio se pueden dividir por su función biológica en las siguientes categorías:

- **Proteínas relacionadas directamente con Elp3:** S-adenosilmetionina sintasa.
- **Biogénesis ribosomal y traducción:** proteína 40S ribosomal SA, factor de elongación de la traducción EF2, factor de iniciación eucariótico 4a, proteína 40S ribosomal S3A, factor de elongación de la traducción 1- β , factor de elongación de la traducción 1- α , proteína ribosomal L1a, proteína 60S ribosomal L21, proteína 60S ribosomal L5 y proteína UTP1.
- **Proteínas nucleares:** proteína de complejo nuclear del poro Nup155.
- **Maduración del mRNA:** proteína de unión a poli-A (PABP2) y la proteína de unión al punto de ramificación (BBP).
- **Proteínas estructurales y flagelares:** α -tubulina, una proteína de la zona de unión del flagelo (FAZ) y β -tubulina.
- **Proteínas antioxidantes:** triparedoxina peroxidasa (TRYP7) y superóxido dismutasa.
- **Plegamiento de proteínas:** proteína heat shock 70, la proteína heat shock Hsp83, proteína heat shock Hsp70 y proteína heat shock DNAJ.
- **Establecimiento del parásito en el hospedero:** Leishmaniolisina (GP63) y ciclofilina A.

Tabla 5. Proteínas identificadas en la purificación por afinidad en tándem con la línea celular Lmjf/Elp3b-PTP. Se muestran las proteínas con al menos 5 péptidos identificados o con una cobertura de al menos el 15%.

ID	Proteína	Cobertura (%)	Péptidos	Peso molecular (kDa)
Proteínas relacionadas directamente con Elp3:				
LmjF.23.1350	Proteína Elp3b	33	31	79.3
LmjF.30.3520	S-adenosilmetionina sintasa METK2	26.7	15	42.9
Biogénesis ribosomal y traducción:				
LmjF.36.5120	Proteína 40S ribosomal SA	32.5	20	27.4
LmjF.36.0180	Factor de elongación de la traducción EF2	30.7	39	94
LmjF.01.0770	Factor de iniciación eucariótico 4 ^a	26.3	10	45.2
LmjF.35.0420	Proteína 40S ribosomal S3A	26.8	8	29.9
LmjF.34.0840	Factor de elongación de la traducción 1- β	21.9	4	2.6
LmjF.17.0084	Factor de elongación de la traducción 1- α	16.9	13	49
LmjF.29.1070	Proteína ribosomal L1a	16.3	5	40.9
LmjF.16.0460	Proteína 60S ribosomal L21	15	2	18
LmjF.35.1890	Proteína 60S ribosomal L5	12.8	6	36.5
LmjF.30.3020	Proteína UTP1	7.4	7	36
Proteínas nucleares				
<u>LmjF.29.1030</u>	Proteína del complejo nuclear del poro Nup155	9.6	4	23.8
Maduración del mRNA:				
LmjF.36.5420	Proteína de unión al punto de ramificación (BBP)	23.1	26	32.8
LmjF.35.4130	Proteína de unión a poly-A 2 (PABP2)	20.5	20	65.3
Proteínas flagelares y estructurales:				
LmjF.13.0310	α -Tubulina	51.4	23	49.7
LmjF.36.5420	Proteína de unión al flagelo (FAZ)	23.1	20	32.8
LmjF.08.1230	β -Tubulina	10.1	26	49.6
Proteínas antioxidantes:				
<u>LmjF.15.1160</u>	triparedoxina peroxidasa (TRYP7)	12	2	22.1
<u>LmjF.32.1820</u>	Superoxido dismutasa	61	10	21.4
Plegamiento de proteínas:				
LmjF.28.2770	Proteína heat shock Hsp70	55.6	98	71.6
LmjF.33.0336	Proteína heat shock Hsp83	23.2	45	80.4
LmjF.26.1240	Proteína heat shock 70 relacionada a Hsp70	22.4	17	70.5
Establecimiento del parásito en el hospedero:				
<u>LmjF.25.0910</u>	Ciclofilina A (CYPA)	64.4	11	18.8
<u>LmjF.10.0460</u>	Leishmaniolisina GP63	25.7	13	63.8

Se subrayaron los ID de aquellas proteínas que están anotadas en las bases de datos como proteínas hipotéticas, pero que fueron identificadas a través del programa HHPred.

4.4. Ensayo de purificación por afinidad en tándem con la línea LmjF/Elp3a-PTP

Para aislar complejos proteicos de Elp3a-PTP, se llevó a cabo un experimento de purificación por afinidad en tándem con células de *L. major* de la línea LmjF/Elp3a-PTP, empleando sólo la columna de cromatografía que contenía la matriz de perlas de Sefarosa-IgG. El eluido final se concentró, y una fracción (~1/4 parte total) se analizó en un gel de poliacrilamida (**Figura 46**).

En dicha purificación se obtuvieron ~15 bandas con pesos moleculares que varían de ~25 a ~150 kDa (**Figura 47**). De igual manera se pudo observar un enriquecimiento en la región que correspondería a Elp3a-PTP (~88.5 kDa), considerando que Elp3a-PTP tiene un tamaño predicho de ~85 kDa, mas 3.56 kDa adicionales otorgados por el dominio de la proteína C del epitope de extracción.

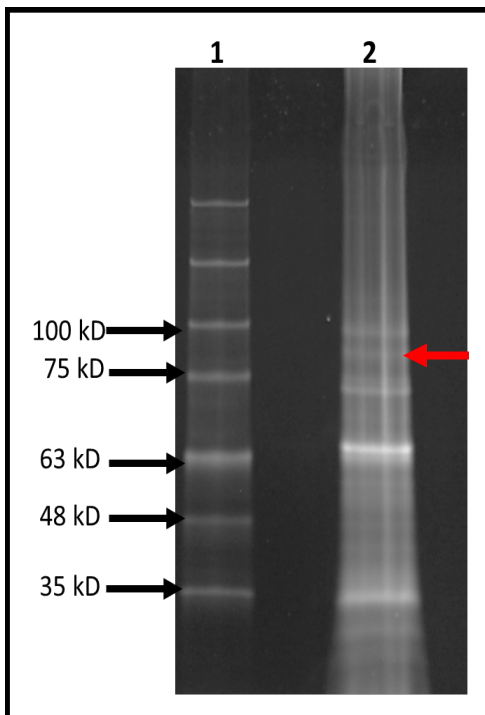


Figura 47. Eluido final de la purificación por afinidad en tándem de LmjF/Elp3a-PTP por una sola columna (Carril 2). La muestra corresponde a una alícuota del material final concentrado. Gel de gradiente (4-15%) de poliacrilamida (Mini-PROTEAN® TGX™ Precast Gel) teñido con SYPRO Ruby. La flecha roja indica a la proteína blanco, Elp3a-PTP con un peso de ~88 kDa. Marcador Broad Range Protein Molecular Weight Markers PROMEGA (Carril 1).

El eluido final concentrado fue analizado por espectrometría de masas. Los péptidos obtenidos se identificaron comparando su secuencia con la base de datos del genoma de *L. major*.

El análisis de las muestras confirmó la presencia de la proteína blanco LmElp3a, además de otras proteínas que pudieran tener interacción con LmElp3a (**Tabla 6**). Algunas de ellas, no obstante, podrían corresponder a proteínas contaminantes.

Las proteínas identificadas se clasificaron de acuerdo con su función biológica en las siguientes categorías:

- **Proteínas asociadas con la función de Elp3:** Elp3b, S-adenosilmetionina sintasa, Proteína con dominio DUF59 y la proteína de especificidad enzimática de restricción tipo 1.
- **Proteínas nucleares:** factor de exportación nuclear de RNA 2 (NTF-2), Proteína del complejo del poro nuclear NUP155, proteína 2 asociada al núcleo y al huso (NuSAP) y NUP 55.
- **Proteínas asociadas con la replicación del DNA y el ciclo celular:** protein timeless homolog y proteína de división celular (ZAPB).
- **Proteínas asociadas con la reparación del DNA:** proteína TFb5 y proteína KU70.
- **Proteínas con dominios de unión a RNA:** proteína de unión a RNA (LmjF.32.0750), proteína de unión a RNA (LmjF.35.2200) y una proteína de dedos de zinc.
- **Proteínas relacionadas con la biogénesis ribosomal y traducción:** factor de elongación 1- β , factor de elongación 1- α , proteína 60S ribosomal P2, factor de elongación 1- β , proteína 60s ribosomal L9, factor de elongación 2 (eEF2), proteína 60S ribosomal L23, proteína 40S ribosomal S2, factor de inicio 5 (eIF5), proteína 40S ribosomal S15A, proteína 40S ribosomal S12, proteína 40S ribosomal SA, proteína 40S ribosomal S3A, proteína 60S ribosomal P2, proteína 40S ribosomal S18, proteína 40S ribosomal S24e, proteína 40S ribosomal S19, subunidad ribosomal 60S, proteína 60S ribosomal L27A, factor de iniciación 4A (eIF4A), proteína 60S ribosomal L12, factor de iniciación 5 (eIF5), proteína 60S ribosomal L7A, proteína 60S ribosomal L13, proteína 40S ribosomal S15, proteína 40S ribosomal S8, proteína 60S ribosomal L31, proteína 60S ribosomal L10, proteína 60S ribosomal L14, proteína 40S ribosomal S6, proteína 40S ribosomal S5, proteína 60S ribosomal L13a, factor de inicio (eIF2), proteína 60S ribosomal L19, proteína ribosomal L1a, proteína 60S ribosomal L6, proteína 40S

ribosomal S9, proteína ribosomal S20, proteína 40S ribosomal S16 y proteína 60S ribosomal L28.

- **Proteínas asociadas con la motilidad y migración celular:** proteína de miristoilacion 3, cofilina, β -Tubulina y α -Tubulina.
- **Proteínas relacionadas con el plegamiento de proteínas:** la proteína *heat-shock* 70, la proteína TCTP, la proteína *heat-shock* hsp70, la proteína *heat-shock* DNAJ, la proteína chaperona HSP60, la proteína *heat-shock* putativa, la proteína *heat-shock* 20, la proteína *heat-shock* HSP83, la proteína *heat-shock* 110 y la proteína co-chaperona P23.
- **Proteínas asociadas antioxidantes:** triparedoxina peroxidasa (Trip3), tioredoxina, triparedoxina 1 (TXN1), triparedoxina peroxidasa y superóxido dismutasa.
- **Proteínas asociadas con el establecimiento del parásito en el hospedero:** ciclofilina A (CypA), factor inhibidor de macrófagos, ciclofilina 40 (Cyp40), ciclofilina 4 (Cyp4), Leishmaniolisina GP63, ciclofilina 2 (Cyp2) y proteína de unión a FK506 (FKBP).
- **Proteínas con dominio ALBA:** proteína de ALBA y proteína con dominio ALBA 3.

Tabla 6. Proteínas identificadas en purificación por afinidad con la línea celular LmjF/Elp3a-PTP. Se muestran las proteínas con al menos 5 péptidos identificados o con una cobertura de al menos el 15%.

ID	Proteína	Cobertura (%)	péptidos	Peso molecular (kDa)
Proteínas relacionadas con Elp3:				
LmjF.16.0240	Proteína Elp3a	68.7	119	85.5
LmjF.30.3500	S-adenosilmetionina sintasa (METK1)	29.3	13	42.9
LmjF.07.1010	Proteína con dominio DUF59	18.8	4	26.9
Proteínas nucleares:				
<u>LmjF.21.0430</u>	Factor de exportación nuclear de RNA 2 (NTF-2)	16.6	6	44.6
<u>LmjF.12.0340</u>	NUP 55	7.5	16	227.4
Proteínas relacionadas con la reparación del DNA:				
<u>LmjF.29.1050</u>	Proteína KU70	16.9	21	98.7
Proteínas con dominios de unión a RNA:				
LmjF.32.0750	Proteína de unión a RNA	32.7	8	25.1
LmjF.35.2200	Proteína de unión a RNA	27.7	9	30.2
LmjF.36.1635	Proteína de dedos de zinc	18.4	3	21
biogénesis ribosomal y traducción				
LmjF.36.1430	Factor de elongación 1- β	60.8	12	23.2
LmjF.17.0086	Factor de elongación 1- α	60.3	40	49

LmjF.30.3730	Proteína 60S ribosomal P2	57.6	8	12.8
LmjF.24.1510	Factor de elongación 1-β	51.6	14	23.2
LmjF.21.1050	Proteína 60S ribosomal L9	51	11	21.5
LmjF.36.0190	Factor de elongación 2 (eEF2)	50.5	60	94.0
LmjF.35.3790	Proteína 60S ribosomal L23	48.9	8	14.9
LmjF.32.0450	Proteína 40S ribosomal S2	48.1	22	28.6
LmjF.25.0730	Factor de inicio 5 (eIF5)	47.5	12	17.8
LmjF.11.1190	Proteína 40S ribosomal S15A	46.1	7	14.6
LmjF.13.0570	Proteína 40S ribosomal S12	45.3	7	15.5
LmjF.36.5120	Proteína 40S ribosomal SA	45.1	10	27.4
LmjF.35.0420	Proteína 40S ribosomal S3A	41.6	16	29.9
LmjF.15.1207	Proteína 60S ribosomal P2	41.4	3	10.9
LmjF.36.0940	Proteína 40S ribosomal S18	38.5	7	17.3
LmjF.36.2860	Proteína 40S ribosomal S24e	37.2	4	15.7
LmjF.34.2780	Proteína 40S ribosomal S19	36.6	6	19.3
LmjF.27.1390	Proteína 60S ribosomal ácida P0	35.2	11	34.7
LmjF.35.3780	Proteína 60S ribosomal L27A	35.1	8	16
LmjF.01.0770	Factor de iniciación 4a (eIF4A)	33.7	22	45.2
LmjF.24.2210	Proteína 60S ribosomal L12	33.5	3	17.5
LmjF.34.0350	Factor de iniciación 5 (eIF5)	33.3	12	42.8
LmjF.07.0510	Proteína 60S ribosomal L7A	29.5	9	29.7
LmjF.29.2470	Proteína 60S ribosomal L13	29	8	24.7
LmjF.22.0460	Proteína 40S ribosomal S15	28.2	2	17.4
LmjF.24.2070	Proteína 40S ribosomal S8	25.9	5	24.9
LmjF.35.3290	Proteína 60S ribosomal L31	25.5	6	21.2
LmjF.04.0950	Proteína 60S ribosomal L10	24.8	5	24.5
LmjF.22.1560	Proteína 60S ribosomal L14	24.5	9	19.8
LmjF.35.2010	Proteína 40S ribosomal S6	22.8	10	28.2
LmjF.11.0960	Proteína 40S ribosomal S5	22.6	5	21.2
LmjF.15.0200	Proteína 60S ribosomal L13a	21.1	4	25.4
LmjF.06.0410	Proteína 60s ribosomal L19	19.4	7	30.4
LmjF.29.1070	Proteína ribosomal L1a	18.7	8	40.9
LmjF.15.1000	Proteína 60s ribosomal L6	18.4	3	21
LmjF.07.0680	Proteína 40s ribosomal S9	17.3	4	22.1
LmjF.28.1030	Proteína ribosomal S20	17.2	2	13
LmjF.26.0890	Proteína 40s ribosomal S16	16.7	3	16.6
LmjF.11.1110	Proteína 60s ribosomal L28	16.3	2	16.2
Motilidad y migración celular:				
LmjF.29.0510	Cofilina	64.7	12	15.7
LmjF.14.0850	Proteína de miristoilacion 3	74.7	8	12.9
LmjF.33.0804	β-Tubulina	49.2	27	49.7
LmjF.13.0390	α-Tubulina	44.5	28	49.7
Plegamiento de proteínas:				
LmjF.30.2480	Proteína Heat-shock 70	60.8	55	71.8
LmjF.24.1510	Proteína TCTP	57.6	31	19.4
LmjF.28.2770	Proteína Heat-shock hsp70	54.25	55	71.6

<u>LmjF.27.2400</u>	Proteína Heat-shock DNAJ	48.2	22	43.5
<u>LmjF.36.2030</u>	Proteína chaperona HSP60	46.2	35	59.2
<u>LmjF.26.0620</u>	Proteína Heat-shock putativa	42	5	10.6
<u>LmjF.30.2480</u>	Proteína Heat-shock 70	60.8	55	71.8
<u>LmjF.29.2450</u>	Proteína Heat-shock 20	36.7	8	17.4
<u>LmjF.33.0336</u>	Proteína Heat-shock HSP83	34.7	34	80.4
<u>LmjF.18.1370</u>	Proteína Heat-shock 110	32.4	25	91.7
<u>LmjF.35.4470</u>	Proteína co-chaperona P23	33.6	8	21.5
Proteínas antioxidantes:				
<u>LmjF.15.1080</u>	Triparedoxina peroxidasa (Trip3)	79.8	27	22.1
<u>LmjF.14.0190</u>	Tiorredoxina	56.7	15	22.3
<u>LmjF.29.1160</u>	Triparedoxina 1 (TXN1)	46.8	6	16.5
<u>LmjF.23.0040</u>	Triparedoxina peroxidasa	43.8	11	25.3
<u>LmjF.32.1820</u>	Superoxido dismutasa	30.2	6	21.4
Establecimiento del parásito en el hospedero:				
<u>LmjF.25.0910</u>	Ciclofilina A (CypA)	55.3	12	18.8
<u>LmjF.33.1750</u>	Factor inhibidor de macrófagos	53.9	7	12.5
<u>LmjF.35.4770</u>	Ciclofilina 40 (Cyp40)	37.2	14	38.3
<u>LmjF.33.1630</u>	Ciclofilina 4 (Cyp4)	35	4	24
<u>LmjF.10.0460</u>	Leishmanolisina GP63	30.3	17	63.8
<u>LmjF.06.0120</u>	Ciclofilina 2 (Cyp2)	24.5	5	20.3
<u>LmjF.19.1530</u>	Proteína de unión a FK506 (FKBP)	22.6	11	47.6
Proteínas con dominio ALBA:				
<u>LmjF.13.0450</u>	Proteína con dominio ALBA	21.4	5	13.3
<u>LmjF.34.2580</u>	Proteína con dominio ALBA 3	40.9	10	22.5

Se subrayaron los ID de aquellas proteínas que están anotadas en las bases de datos como proteínas hipotéticas, pero que fueron identificadas a través del programa HHPred.

5. Discusión

El Complejo Elongador se identificó por primera vez en levadura como un complejo que copurificó con la Pol II fosforilada en su dominio CTD (Otero *et al.*, 1999). El Complejo Elongador consiste en 6 subunidades diferentes, organizadas en dos subcomplejos: el primero está conformado por las subunidades Elp1-Elp3, mientras que el segundo subcomplejo está formado por Elp4-Elp6. La subunidad Elp3 constituye el núcleo enzimático de dicho complejo, pues gracias a su dominio HAT tiene la capacidad de acetilar histonas y de esa manera promover la fase de elongación de la transcripción para Pol II. La delección de la subunidad Elp3 en levadura generó fenotipos que presentaban deficiencias relacionadas con la transcripción, particularmente en la fase de elongación (Wittschieben *et al.*, 1999; Otero *et al.*, 1999). De manera interesante en *L. major* y otros tripanosomátidos sólo se encuentran ortólogos de Elp3, y no del resto de las subunidades del complejo. Además, los tripanosomátidos, incluyendo a *L. major*, son los únicos organismos con dos isoformas de la subunidad Elp3, llamadas Elp3a y Elp3b. Todos los ortólogos de Elp3, incluyendo a Elp3a y Elp3b en tripanosomátidos, presentan dominios bien conservados que están altamente relacionados con su función, así como con la interacción con otras proteínas. Estos dominios corresponden a la secuencia HAT, que pertenece a la familia de las GNAT acetiltransferasas, y al radical SAM, el cual presenta un *cluster* de Fe₄S₄ que se une a una secuencia bien definida de cisteínas altamente conservadas (CXXXCXXC), y un sitio de unión a S-adenosilmetionina (Paraskevopoulou *et al.*, 2006).

La primera observación obtenida al realizar los alineamientos de secuencias de aminoácidos entre Elp3a y Elp3b de *L. major* es que existe sólo un 38% de identidad entre ambas isoformas, y que Elp3a es más grande que Elp3b por 59 aminoácidos. Al comparar ambas isoformas con otros ortólogos, ya sea de bacterias, protozoos o vertebrados, se observó una divergencia considerable en el número de residuos, siendo las isoformas de *L. major* las de mayor tamaño (763 y 704 aminoácidos) y el ortólogo de Elp3 en *D. mccartyi* el de menor tamaño (459 aminoácidos) (Figuras 28 y 29). Al comparar la secuencia de aminoácidos entre

Elp3a y Elp3b de *L. major* y sus ortólogos en otros tripanosomátidos, se encontró que el mayor porcentaje de identidad corresponde a *L. donovani* con 94% y 96.3% respectivamente, como era de esperarse. La comparación con *T. brucei* y *T. cruzi* reveló porcentajes de identidad de 63.3% y 62% para Elp3a y 72.6% y 72.7% para Elp3b, siendo estos dos tripanosomátidos los que exhibieron el menor porcentaje de identidad para ambas isoformas. Por otro lado, al comparar a Elp3a y a Elp3b de *L. major* con otras especies no cercanas filogenéticamente, se observó que *H. sapiens* exhibe el porcentaje de identidad más bajo (32% y 32.4%). Cabe resaltar que hay más residuos conservados en las regiones que corresponden a los dominios SAM y HAT que en el resto de la secuencia, lo que indica que estos dominios son esenciales para la función de ambas isoformas. En particular, para el dominio radical SAM se identificó la secuencia que coordina el *cluster* de Fe₄S₄, que consiste en tres residuos de cisteína (CXXXCXXC) altamente conservados en todas las especies analizadas. Además, se identificó una probable secuencia de unión a S-adenosilmetionina, formada por una región rica en glicinas. En su estado reducido, el *cluster* de Fe₄S₄ transfiere un electrón a S-adenosilmetionina, induciendo el corte de ésta en metionina y radical 5'-desoxiadenosilo. Este radical es un agente fuertemente oxidante que actúa en diversas reacciones implicadas en múltiples funciones, como la transcripción y la traducción (Layer *et al.*, 2003). Por otro lado, al comparar la estructura secundaria predicha de Elp3a y Elp3b, compuesta por una serie de α -hélices y β -plegadas regularmente alternadas (Figura 27), se observó una alta similitud entre ambas isoformas, resaltando la presencia de 9 láminas α -hélices que también son evidentes en la estructura terciaria y que corresponden al radical SAM, así como las 2 α -hélices del dominio HAT (Frey *et al.*, 2008).

En el modelaje tridimensional de ambas isoformas de *L. major* se usó como templado la estructura cristalizada de *D. mccartney* (Glatt *et al.*, 2016). Como se observa en la Figura 31, los dos modelos son muy parecidos, ya que ambos presentaron una alta similitud en la disposición de cada dominio, así como la presencia del *cluster* de Fe₄S₄, lo que sugiere una alta conservación en cuanto a estructura terciaria entre las dos isoformas de *L. major*. Al comparar la estructura

globular de Elp3a y Elp3b de *L. major* con la de *D. mccartney*, se observó una alta similitud estructural con esta última (Figura 34), lo que sugiere una alta conservación estructural entre las dos isoformas y otros ortólogos. Lo anterior se confirmó al evaluar la similitud que presentan los modelos globulares de Elp3a y Elp3b en relación con la proteína templado (*D. mccartney*). El modelo tridimensional de Elp3a arrojó un *score* de 0.92, mientras que el del modelo de Elp3b de 0.91, lo cual nos indica que la estructura tridimensional de ambas proteínas es muy parecida a la de la proteína templado.

En el presente trabajo se inició con el estudio de Elp3a y Elp3b en *L. major* a través de ensayos de purificación por afinidad en tándem con la finalidad de identificar las proteínas que interactúan con cada una de las isoformas y de esa manera dilucidar las probables funciones en las que Elp3a y Elp3b de *L. major* puedan estar implicadas en este organismo. Algunas de las proteínas identificadas (Tablas 5 y 6) son muy abundantes en la célula, y podrían ser proteínas contaminantes o tener uniones inespecíficas con Elp3a y Elp3b. Sin embargo, muchas de ellas podrían representar ligandos reales, como se discute en los siguientes párrafos.

Se ha reportado que diversos ortólogos de Elp3 participan en la regulación de la traducción promoviendo un mejor empalme codón-anticodón a través de la modificación de tRNAs (Bento-Abreu *et al.*, 2018). Una proteína encontrada en la purificación por afinidad en tándem de Elp3b fue la S-adenosilmetionina sintasa o METK1 (LmjF.30.3520), que se relaciona directamente con el dominio radical SAM de Elp3b. Dicho dominio se encarga de escindir a la S-adenosilmetionina para la formación de diversos grupos funcionales como 5-metoxicarbonometil (mcm5) y 5-carbonometil (ncm5), agregándolos a ciertas uridinas de algunos tRNAs para promover la interacción codón-anticodón más eficientemente, como se mencionó anteriormente (Layer *et al.*, 2003; Bento-Abreu *et al.*, 2018). Esto sugeriría la posible participación de Elp3b en la modificación de tRNAs.

Actualmente se ha demostrado que Elp3b juega un papel muy importante en la regulación de la elongación de Pol I en *T. brucei*, donde se localizó en el nucléolo (Alsford & Horn, 2011). Esta conclusión se sustenta por el aumento de la

transcripción de los genes de rRNA en líneas celulares donde se redujo la expresión de Elp3b. De igual manera se comprobó que Elp3b controla selectivamente la transcripción de rRNA, y no la de las VSG y las prociclinas, lo que indica una capacidad para distinguir entre diferentes unidades de transcripción de Pol I (Alsford & Horn, 2011).

Considerando que Elp3b también se localiza en el nucléolo en *L. major* (Moreno-Campos *et al.*, 2016), podríamos esperar que esta isoforma participe también en la regulación de la transcripción de Pol I en *Leishmania*. En apoyo a esta hipótesis, en la purificación por afinidad en tándem para Elp3b de *L. major* que se realizó en este trabajo se identificaron diversas proteínas relacionadas con el nucléolo, como proteínas ribosomales y factores de traducción (Tabla 5). Entre éstas se encuentran la proteína 60S ribosomal L21 (LmjF.16.0460) y la proteína 40S ribosomal S3A (LmjF.35.0420). Múltiples reportes han revelado la participación de proteínas ribosomales, o incluso ribosomas aparentemente completos, en el control de la transcripción. Yanofsky en el 2000 reportó que algunos ribosomas pueden unirse a ciertas regiones de DNA durante la transcripción, teniendo el papel de atenuadores, impidiendo la formación de regiones de término. De igual manera, se ha reportado que la proteína ribosomal S10, esencial para la sobrevivencia celular, puede interactuar de manera individual con ciertas regiones génicas durante la transcripción y atenuar el término de esta (Mason, 1992; Das, 1991). Es interesante que S10 también interactúa con la RNA Pol en *E. coli* (Mason, 1992). Además de S10, ya se han identificado otras proteínas ribosomales que participan en la regulación de la transcripción, tales como S4, L3, L4 y L13, que se han denominado como anti-terminadores de la transcripción, y que de igual manera interactúan con la RNA Pol en *E. coli* (Torres *et al.*, 2001). En eucariontes también se ha reportado regulación de la transcripción por parte de proteínas ribosomales. Para *S. pombe* se ha reportado la presencia de complejos ribonucleoproteicos que incluyen a L11, L7 y L25 que se unen a regiones codificantes de tRNAs y otras más abundantes en los centrómeros (De *et al.*, 2011). En linfocitos T de humano se observó que la proteína ribosomal S3 puede influir en la regulación génica a través de NF- κ B al interactuar con la misma, y de esa manera promover la transcripción de ciertos

genes (Wan *et al.*, 2007). Otra proteína involucrada en la regulación de la transcripción es L22, la cual puede unirse a histonas y presenta co-localización con cromatina compacta (Ni *et al.*, 2006). La sobreexpresión de L22 generó una disminución en la transcripción, mientras que su disminución aumentó la misma, regulando así el proceso de transcripción en *D. melanogaster* (Ni *et al.*, 2006). Entonces, existe la posibilidad de que las proteínas ribosomales estén involucradas en la regulación de la transcripción en *L. major*, como ocurre en otros organismos. En dicho escenario, estas proteínas ribosomales se unirían a factores de transcripción, incluido Elp3b, para controlar la expresión de los genes del rRNA en el nucléolo.

Adicionalmente, Elp3b podría participar procesamiento del pre-rRNA y en el ensamblaje de las subunidades del ribosoma en el nucléolo, considerando la presencia de la proteína UTP1, que participa en la biogénesis del ribosoma en otras especies, en los complejos purificados con Elp3b (Tabla 5). Así, indirectamente Elp3b podría estar involucrado en la regulación de la traducción. Entre las proteínas que posiblemente interactúan con Elp3b se encontró a la proteína del complejo nuclear del poro NUP155 (LmjF.29.1030). Esta asociación podría darse de manera indirecta, a través de alguna partícula pre-ribosomal que fuese a ser exportada al citoplasma.

Varias proteínas ribosomales, incluyendo S3, están involucradas en procesos como la reparación del daño al DNA y la apoptosis (Kim *et al.*, 2009). La interacción de Elp3b con la proteína ribosomal S3 (Tabla 5) podría sugerir la participación de Elp3b en estos procesos en *L. major*.

Se ha demostrado la interacción de Elp3 y el complejo Elongador en levadura con mRNA naciente (Gilbert *et al.*, 2004). En los experimentos de purificación con Elp3b también se encontró la unión de dos proteínas relacionadas con la maduración de mRNAs: la proteína de unión al punto de ramificación (BBP) (LmjF.36.5420) y la proteína de unión a poly-A 2 (PABP2) (LmjF.35.4130). Esto sugiere una posible participación de Elp3b en el procesamiento de mRNA en *L. major*. Por otro lado, también se encontraron proteínas antioxidantes como la triparedoxina peroxidasa

(LmjF.15.1160) y la superóxido dismutasa (LmjF.32.1820), las cuales están relacionadas con la eliminación de radicales libres y reparación del DNA; lo anterior está relacionado con lo ya reportado por Alsford y Horn en 2011, donde demostraron la capacidad antígenotóxica de Elp3b en *T. brucei* al utilizar 6-azauracil, una toxina catalogada como análogo de pirimidinas y que además se ha demostrado que inhibe la transcripción.

Las proteínas α -tubulina y β -tubulina también se identificaron en los experimentos de purificación, relacionando así a Elp3b con la regulación en la motilidad y migración celular, tal y como reportaron Creppe *et al.* en 2009, donde demostraron el papel de Elp3, como parte del Complejo Elongador, en la acetilación de α -tubulina, lo que favorece la migración de células neuronales. Lo anterior no define la localización de Elp3b como citoplasmática, ya que Schwarzerová *et al.*, en 2019 reportaron la presencia de tubulina en el núcleo celular, la cual es exportada por la vía exportina1/CRM1 (Schwarzerová *et al.*, 2019).

Por otro lado, se encontraron proteínas relacionadas con el establecimiento del parásito en el hospedero mamífero, como la leishmanolisina o glicoproteína de membrana gp63 (LmjF.10.0460), proteína importante en la evasión del sistema inmune (Olivier *et al.*, 2012), la cual al ser una proteína de superficie podría considerarse, hasta el momento, como un contaminante ya que no existe alguna evidencia que la relación directa o indirectamente con Elp3b de *L. major*.

Otros elementos encontrados fueron proteínas *heat-shock* (Tabla 5), las cuales participan en la regulación postraduccional y plegamiento de las proteínas. También se ha reportado que algunas proteínas *heat-shock* interactúan con proteínas ribosomales, tal es el caso de Hsp70, la cual interacciona con S3 para así evitar la ubiquitinación y degradación de las formas libres de S3, por lo que Hsp70 regula la estabilidad de S3 en la célula, permitiendo el ensamble ribosomal (Wittschieben *et al.*, 1999). De esta manera, Elp3b podría estar relacionada no sólo con la transcripción, sino con la modificación postraduccional de algunas proteínas y con el ensamble ribosomal a través de su interacción con Hsp70.

Los experimentos de purificación para la isoforma Elp3a también arrojaron resultados interesantes, observando en primera instancia la presencia del mismo grupo de proteínas encontradas en la purificación de Elp3b: proteínas relacionadas con la función del dominio radical SAM de Elp3 (S-adenosilmetionina sintasa), la biogénesis ribosomal y traducción, el establecimiento del parásito en el hospedero, el plegamiento de las proteínas (*heat-shock*), proteínas nucleares, proteínas antioxidantes, y proteínas relacionadas con la migración y motilidad celular (Tabla 5). Esto sugiere una fuerte asociación estructura-función entre ambas isoformas de Elp3 en *L. major*. En *T. brucei*, Elp3a se localiza en todo el núcleo, y no sólo en el nucléolo como Elp3b (Alsford & Horn, 2011). Esto sugiere que mientras estas proteínas podrían compartir algunas funciones, cada isoforma llevaría a cabo algunas funciones específicas. Una situación similar podría suceder en *L. major*.

Entre las proteínas relacionadas con la función del dominio radical SAM de Elp3, además de la S-adenosilmetionina sintasa, también se observó la interacción de Elp3a con una proteína que posee un dominio DUF59 (LmjF.07.1010), el cual podría participar en la formación del *cluster* de Fe₄S₄, esencial para la modificación de tRNAs (Mashruwala *et al.*, 2019). Una categoría presente sólo en los resultados de la purificación de Elp3a fue el de las proteínas con dominio ALBA (Tabla 6), las cuales tienen la característica de ser proteínas con una alta plasticidad funcional gracias a dicho dominio. En arqueas se ha demostrado que las proteínas ALBA tienen interacción con el DNA, mientras que en levadura y humano están implicadas en el procesamiento del mRNA (Aravind *et al.*, 2003). Así, Elp3a de *L. major* podría interactuar con las proteínas con dominio ALBA para asociarse al DNA o para participar en el procesamiento de mRNAs. La asociación de Elp3a con la proteína ribosomal S3 y con Ku70 (Tabla 6) sugiere que Elp3a también podría participar en la reparación al daño al DNA.

En resumen, el presente trabajo representó una primera aproximación hacia la identificación de las proteínas que se asocian a Elp3a y Elp3b en *L. major*. Será necesario repetir estos experimentos de purificación por afinidad en tándem, así como el análisis de un control negativo en donde se evalúe el sistema sin la proteína

anzuelo. De igual manera, será necesario complementar los experimentos antes mencionados con otras estrategias experimentales, para confirmar las interacciones proteicas de las dos isoformas de Elp3 en este parásito. Trabajos futuros ayudarán a determinar las funciones que estas proteínas realizan en *Leishmania* y otros tripanosomátidos de importancia médica.

6. Conclusiones y logros

- Las isoformas Elp3a y Elp3b de *L. major* poseen los dos dominios típicos, presentes en otros ortólogos de Elp3: el dominio radical SAM y el dominio HAT. El dominio radical SAM presenta una región con tres cisteínas que coordina el *cluster* Fe4S4, además de presentar un posible sitio de unión de S-adenosilmetionina, el cual se caracteriza por poseer varias glicinas conservadas.
- La estructura secundaria predicha para Elp3a y Elp3b reveló que el dominio SAM se compone de una serie de β plegadas y α -hélices conservadas, mientras que el dominio HAT está conformado por las dos α -hélices típicas.
- El modelo tridimensional de Elp3a y Elp3b reveló una estructura globular muy parecida entre ambas y con la estructura reportada para Elp3 de *D. mccartyi*.
- Se generaron dos líneas celulares de *L. major* que expresan a Elp3a y Elp3b de manera episomal (LmElp3a-PTP y LmElp3b-PTP, respectivamente).
- Elp3a y Elp3b parecen asociarse con una amplia variedad de proteínas, lo que sugiere una alta plasticidad funcional de ambas isoformas. Entre los probables ligandos se encontró a S-adenosilmetionina sintasa o METK1, proteínas que participan en la biogénesis ribosomal y traducción que además están implicadas en la regulación de la transcripción, proteínas involucradas en la reparación del daño al DNA y en el procesamiento de mRNAs, así como proteínas que participan en la migración y motilidad celular.

7. Perspectivas

- Continuar con el estudio de Elp3 en *L. major* a través de más repeticiones de ensayos purificación por afinidad en tándem incorporando sus respectivos controles.
- Determinar, a partir de los resultados de espectrometría de masas, las interacciones que guardan ambas isoformas e identificar sus posibles funciones.
- Diseñar mecanismos experimentales, como la sobreexpresión o el *knock-down* de estas isoformas, para continuar su estudio en estos parásitos y su implicación en distintos procesos celulares.
- Determinar la ubicación celular de Elp3a en *L. major*.
- Implementar ensayos que permitan conocer si estas isoformas presentan unión a secuencias codificantes o reguladoras que nos ayuden a determinar si tienen un papel regulatorio en la expresión génica.
- Estudiar la posible participación de Elp3 en las modificaciones postranscripcionales en los tRNA en *L. major*.

8. Referencias

1. Adl, S.M., Leander, B.S., Simpson, A.G., Archibald, J.M., Anderson, O.R., Bass, D., Bowser, S.S., Brugerolle, G., Farmer, M.A. & Karpov, S. (2007). Diversity nomenclature and taxonomy of protists. *Systematic Biology* 56(4), 684-689.
2. Ahluwalia, S., Lawn, S. D., Kanagalingam, J., Grant, H. & Lockwood, D. N. (2004). Mucocutaneous leishmaniasis: an imported infection among travellers to central and South America. *BMJ (Clinical research ed.)* 329(7470), 842–844.
3. Alla, R. K. & Cairns, B. R. (2014). RNA polymerase III transcriptomes in human embryonic stem cells and induced pluripotent stem cells, and relationships with pluripotency transcription factors. *PLoS one* 9(1), e85648.
4. Alsford, S. & Horn, D. (2011). Elongator Protein 3b Negatively Regulates Ribosomal DNA Transcription in African Trypanosomes. *Molecular and Cellular Biology* 31, 1822-1832.
5. Alonso, V. L. & Serra, E. C. (2012). Lysine Acetylation: Elucidating the Components of an Emerging Global Signaling Pathway in Trypanosomes. *Journal of Biomedicine and Biotechnology* 2012, 822–831.
6. Alvar, J., Vélez, I. D., Bern, C., Herrero, M., Desjeux, P. & Cano, J. (2012). Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. *PLoS one* 7(5), e35671.
7. Ambrósio D. L. & Silva M. T. A., Cicarelli R. M. B. (2007). Cloning and molecular characterization of *Trypanosoma cruzi* U2, U4, U5, and U6 small nuclear RNAs. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 102(1), 97-106.
8. Aravind, L., Iyer, L. M., & Anantharaman, V. (2003). The two faces of Alba: the evolutionary connection between proteins participating in chromatin structure and RNA metabolism. *Genome Biology* 4(10), R64.
9. Arevalo, I., Tulliano, G., Quispe, A., Spaeth, G., Matlashewski, G., Llanos-Cuentas, A., & Pollack, H. (2007). Role of imiquimod and parenteral meglumine antimoniate in the initial treatment of cutaneous leishmaniasis. *Clinical Infectious Diseases* 44(12), 1549-1554.
10. Bates, A. P. & Rogers, M. E. (2004). New insights into the developmental biology and transmission mechanisms of *Leishmania*. *Current Molecular Medicine* 4(6), 601-609.
11. Bates, P.A. (2007). Transmission of *Leishmania* metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies. *International Journal for Parasitology* 37(10), 1097-1106.
12. Bains, A., Vedant, D., Gupta, P., & Tegta, G. R. (2016). Unusual presentation of mucocutaneous leishmaniasis in HIV-infected patient. *Indian Journal of Sexually Transmitted Diseases and AIDS* 37(2), 193–196.
13. Benchimol, B. P. R. (2006). The oral transmission of Chagas disease: A cute form of infection responsible for regional outbreak. *International Journal of Cardiology* 112(1), 132-133.
14. Bento-Abreu, A., Jager, G., Swinnen, B., Rué, L., Hendrickx, S., Jones, A. & Robberecht, W. (2018). Elongator subunit 3 (ELP3) modifies ALS through tRNA modification. *Human Molecular Genetics* 27(7), 1276–1289.

15. Berriman, M., Ghedin, E., Hertz-Fowle, C., Blandin, G., Renauld, H., Bartholomeu, D.C., Lennard, N.J., Caler, E., Hamlin, N.E., Haas, B., Böhme, U., Hannick, L., Aslett, M.A., Shallom J., Marcello L., Hou L., Wickstead, B., Alsmark, U.C., Arrowsmith, C., Atkin, R.J., Barron, A.J., Bringaud, F., Brooks, K., Carrington, M., Cherevach, I., Chillingworth, T.J., Churcher, C., Clark, L.N., Corton, C.H., Cronin, A., Davies, R.M., Doggett, J., Djikeng, A., Feldblyum, T., Field, M.C., Fraser, A., Goodhead, I., Hance, Z., Harper, D., Harris, B.R., Hauser, H., Hostetler, J., Ivans, A., Jagels, K., Johnson, D., Johnson, J., Jones, K., Kerhornou, A.X., Koo, H., Larke, N., Landfear, S., Larkin, C., Leech, V., Line, A., Lord, A., Macleod, A., Mooney, P.J., Moule, S., Martin, D.M., Morgan, G.W., Mungall, K., Norbertczak, H., Ormond, D., Pai, G., Peacock, C.S., Peterson, J., Quail, M.A., Rabbinowitsch, E., Rajandream, M.A., Reitter, C., Salzberg, S.L., Sanders, M., Schobel, S., Sharp, S., Simmonds, M., Simpson, A.J., Tallon, L., Turner, C.M., Tait, A., Tivey, A.R., Van Aken, S., Walker, D., Wanless, D., Wang, S., White, B., White, O., Whitehead, S., Woodward, J., Wortman, J., Adams, M.D., Embley, T.M., Gull, K., Ullu, E., Barry, J.D., Fairlamb, A.H., Opperdoes, F., Barrell, B.G., Donelson, J.E., Hall, N., Fraser, C.M., Melville, S.E. & El-Sayed, N.M. (2005). The genome of the African trypanosome *Trypanosoma brucei*. *Science* 15, 416-22.
16. Bosch-Nicolau, P., Ubals, M., Salvador, F., Sánchez-Montalvá, A., Aparicio, G., Erra, A. & Molina, I. (2019). Leishmaniasis and tumor necrosis factor alpha antagonists in the Mediterranean basin. A switch in clinical expression. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 13(8), e0007708.
17. Browning, D. & Busby, S. (2016). Local and global regulation of transcription initiation in bacteria. *Nature Reviews Microbiology* 14, 638–650.
18. Camandaroba, E. L., Pinheiro, C. M. & Andrade, S. G. (2002). Oral transmission of Chagas disease: importance of *Trypanosome cruzi* biotome in the intragastric experimental infection. *Revista del Instituto de Medicina Tropical de Sao Pablo* 44 (2), 97-103.
19. Cayla, M., Rojas, F., Silvester, E., Venter, F. & Matthews, K. R. (2019). African trypanosomes. *Parasites & vectors* 12(1), 190.
20. Chandrasekhara, C., Mohannath, G., Blevins, T., Pontvianne, F. & Pikaard, C. S. (2016). Chromosome-specific NOR inactivation explains selective rRNA gene silencing and dosage control in *Arabidopsis*. *Genes and Development* 30, 177-190.
21. Chappuis, F., Sundar, S., Hailu, A., Ghalib, H., Rijal, S., Peeling, R. W., Alvar, J. & Boelaert, M. (2007). Visceral leishmaniasis: What are the needs for diagnosis, treatment and control? *Nature Reviews Microbiology* 5(11), 873-882.
22. Costa, J., Correia, N.C., Neiva, V.L., Gon-alves, T.C. & Felix, M. (2013) Revalidación y descripción de *Triatoma brasiliensis macromelasoma Galvao*. *Revista brasileira de enfermedades tropicales y malaria*. 108(6), 785-789.
23. Cramer, P., Armache, K. J., Baumli, S., Benkert, S., Brueckner, F., Buchen, C., Damsma, G., Dengl, S., Geiger, S., Jasiak, A., Jennebach, S., Kamenski, T., Kettenberger, H., Kuhn, C., Lehmann, E., Leike, K., Sydow, J. & Vannuni, A. (2008). Estructura de polimerasas de ARN eucariota. *Annu. Biophys* 37, 337-352.

24. Creppe, C. & Buschbeck, M. (2011). Elongator: An Ancestral Complex Driving Transcription and Migration through Protein Acetylation. *Journal of Biomedicine and Biotechnology* 2011, 924898.
25. Creppe, C., Malinouskaya, L., Volvert, M. L., Gillard, M., Close, P., Malaise, O., Laguesse, S., Cornez, I., Rahmouni, S., Ormenese, S., Belachew, S., Malfrange, B., Chapelle, J., Siebenlist, U., Moonen, G., Chariot, A. & Nguyen, L. (2009). Elongator controls the migration and differentiation of cortical neurons through acetylation of α -tubulin. *Cell* 136(3), 551-564.
26. Chinenov, Y. (2002) A second catalytic domain in the E1p3 histone acetyltransferases: a candidate for histone demethylase activity? *Trends in Biochemical Sciences* 27, 115–117.
27. Conaway, R.C. & Conaway, J. W. (1994). *Transcription: Mechanisms and Regulation*. Raven Press Series on Molecular and Cellular Biology 3, 123-134.
28. Daniels, J. P., Gull, K. & Wickstead, B. (2010). Cell biology of the trypanosome genome. *Microbiology and Molecular Biology Reviews: MMBR* 74(4), 552–569.
29. Das, A. (1993). Control of transcription termination by RNA-binding proteins. *Annual Review of Biochemistry* 62(1), 893-930.
30. Das, A., Banday, M. & Bellofatto, V. (2008). RNA Polymerase Transcription Machinery in Trypanosomes. *Eukariotic Cell* 7, 429-434.
31. Davies, C., Reithinger, R., Campbell-Lendrum, D., Feliciangeli, D., Borges, R. & Rodríguez, N. (2000). The epidemiology and control leishmaniasis in Andean countries. *Cadernos de Saude* 16(4), 925-950.
32. Davies, C. R., Kaye, P., Croft, S. L. & Sundar, S. (2003). Leishmaniasis: new approaches to disease control. *The British Medical Journal* 15, 377–382.
33. De, S., Varsally, W., Falciani, F., & Brogna, S. (2011). Ribosomal proteins' association with transcription sites peaks at tRNA genes in *Schizosaccharomyces pombe*. *RNA* 17(9), 1713-1726.
34. Decker, K.B. & Hinton, D.M. (2013). Transcription regulation at the core: Similarities among bacterial, archaeal, and eukaryotic RNA polymerases. *Annual Review of Microbiology* 67, 113–39.
35. Dieci, G., Fiorino, G., Castelnuovo, M., Teichmann, M. & Pagano, A. (2007). The expanding RNA polymerase III transcriptome. *TRENDS in Genetics* 23, 614-622.
36. Dutta, A., Gogol, M., Kim, J. H., Smolle, M., Venkatesh, S., Gilmore, J., Florens, L., Washburn, M. P. & Workman, J. L. (2014). Swi/Snf dynamics on stress-responsive genes is governed by competitive bromodomain interactions. *Genes & Development* 28(20), 2314–2330.
37. El-Sayed, N. M., Myler, P. J., Blandin, G., Berriman, M., Crabtree, J. & Aggarwal, G., (2005). Comparative Genomics of Trypanosomatid Parasitic Protozoa. *Science* 309, 404-409.
38. Engel, C., Gubbey, T., Neyer, S., Sainsbury, S., Oberthuer, C., Baeje, C., Bernecky, C. & Cramer, P. (2017). Structural Basis of RNA Polymerase I Transcription Initiation. *Cell* 1469, 120-131.
39. Erben, E., Chakraborty, C. & Clayton, C. (2014). The CAF1-NOT complex of trypanosomes. *Frontiers in Genetics* 4, 299.
40. Flores, C. M. D., Bastrenta, B., Postigo, I. J. R., Mendoza, N. M., Cruz, I. & Alvar, E. J. (2004). Leishmaniasis visceral subclínica en 123 individuos de un cantón de

- la provincia Caranavi-La Paz: study in 123 individuals. *Revista chilena de pediatría* 75(3), 285-293.
41. Grevelink, S. A. & Lerner, E. A. (1996). Leishmaniasis. *Journal of the American Dermatology Academy* 34(1), 257-72.
 42. Gilbert, C., Kristjuhan, A., Winkler, G. S. & Svejstrup, J. Q. (2004). Elongator interactions with nascent mRNA revealed by RNA immunoprecipitation. *Molecular Cell* 14(4), 457-464.
 43. Glatt, S., Zabel, R., Kolaj-Robin, O., Onuma, O., Baudin, F., Graziadei, A., Taverniti, V., Lin, T., Baymann, B., Breuning, K. y Müller, C. (2016). Structural basis for tRNA modification by Elp3 from *Dehalococcoides mccartyi*. *Nature Structural and Molecular Biology* 23, 794-802.
 44. 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.
 45. Hailu, A., Musa, A. M., Royce, C., & Wasunna, M. (2005). Visceral leishmaniasis: new health tools are needed. *PLoS Medicine*, 2(7), e211.
 46. Hamilton, P. B., Stevens, J. R., Gaunt, M. V., Gidley, J., Y. & Gibson, W. C. (2004). Trypanosomes are monophyletic evidence from genes for glyceraldehyde phosphate dehydrogenase and small subunit ribosomal RNA. *International Journal for Parasitology* 34, 1394-1404.
 47. Hantsche, M. & Cramer, P. (2017). Conserved RNA polymerase II initiation complex structure. *Current Opinion in Structural Biology* 47, 17-22.
 48. Handman, E. (1999). Cell Biology of *Leishmania*. *Advances in Parasitology* 44, 1-32.
 49. Inci, R., Ozturk, P., Mulayim, M. K., Ozyurt, K., Alatas, E. T. & Inci, M. F. (2015). Effect of the Syrian Civil War on Prevalence of Cutaneous Leishmaniasis in Southeastern Anatolia, Turkey. *Medical Science Monitor: International Medical Journal of Experimental and Clinical Research* 21, 2100–2104.
 50. Ji, Z., He, L., Rotem, A., Janzer, A., Cheng, C. S., Regev, A. & Struhl, K. (2018). Genome-scale identification of transcription factors that mediate an inflammatory network during breast cellular transformation. *Nature Communications* 9(1), 2068.
 51. Jonkers, I. & Lis, J. T. (2015). Getting up to speed with transcription elongation by RNA polymerase II. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 16(3), 167–177.
 52. Kaba, D., Zacarie, T., M'pondi, A. M., Njiokou, F., Bosson-Vanga, H., Kr'ber, T., McMullin, A., Mihok, S. & Guerin, P. M. (2014). Estandarización de dispositivos de control visual para moscas tsetsé: Especies de frica central y occidental *Glossina palpalis palpalis*. *PLoS Neglected Tropical Disease*, 8(1), e2601.
 53. Karlsborn, T., Tükenmez, H., Mahmud, A. K. M. F., Xu, F., Xu, H. & Byström, A, S. (2014). Elongator, a conserved complex required for wobble uridine modifications in Eukaryotes. *RNA Biology Journal* 11, 1519-1528.
 54. Kaufer, A., Ellis, J., Stark, D. & Barratt, J. (2017). The evolution of trypanosomatid taxonomy. *Parasites and Vectors* 10(1), 287-298.
 55. Khatami, A., Firooz, A., Gorouhi, F. & Dowlati, Y. (2007). Treatment of acute old world cutaneous leishmaniasis: a systematic review of the randomized controlled trials. *Journal of the American Academy of Dermatology* 57(2), 335-e1.

56. Kim, T. S., Kim, H. D., Shin, H. S., & Kim, J. (2009). Phosphorylation status of nuclear ribosomal protein S3 is reciprocally regulated by protein kinase C δ and protein phosphatase 2A. *Journal of Biological Chemistry* 284(32), 21201-21208.
57. Keeling, P.J., Burger, G., Durnford, D.G. Lang, B.F., Lee, R.W. Pearlman, R.E., Roger, A.J. & Gray, M.W. (2005). The tree of Eucaryotes. *Trends in Ecology and Evolution* 20(2), 670-676.
58. Kennedy P. G. (2004). Human African trypanosomiasis of the CNS: current issues and challenges. *The Journal of Clinical Investigation* 113(4), 496–504.
59. Koch, H., Raabe, M., Urlaub, H., Bindereif, A. & Preußner, C. (2016). The polyadenylation complex of *Trypanosoma brucei*: Characterization of the functional poly(A) polymerase. *RNA Biology* 13, 221-231.
60. Kumar, A., Saurabh, S., Jamil, S. & Kumar, V. (2020). Intensely clustered outbreak of visceral leishmaniasis (kala-azar) in a setting of seasonal migration in a village of Bihar, India. *BMC Infectious Diseases* 20(1), 10.
61. Lainson, R. & Shaw, J. J. (1987). Evolution, classification and geographical distribution. Editorial Killick-Kendrick, Academic Press 1, 1-20.
62. LeBowitz, J. H., Smith, H. Q., Rusche, L. & Beverley, S. M. (1993). Coupling of poly (A) site selection and trans-splicing in *Leishmania*. *Genes & Development* 7(6), 996-1007.
63. Lima, L., Espinosa-Alvarez, O., Pinto, C. M., Cavazzana, M., Jr, Pavan, A. C., Carranza, J. C., Lim, B. K., Campaner, M., Takata, C. S., Camargo, E. P., Hamilton, P. B., & Teixeira, M. M. (2015). Nuevas perspectivas sobre la evolución del clado *Trypanosoma cruzi* proporcionado por una nueva especie de tripanosoma estrechamente ligada a los murciélagos de *Pteronotus neotropicales* y relacionada con un linaje australiano de tripanosomas. *Parásitos y vectores* 7(8), 657-664.
64. Lopes, H. A., Souto-Padróni, T., Diaz, A. F., Gomez, T. M. Rodriguez, C. G. Zimmermann, T. L., Alves, L.T. Y. & Vermelho, B.A. (2010). Trypanosomatids: Odd organisms, devastating diseases. *The Open Parasitology Journal* 4(1), 30-59.
65. Lukes, J., Butenko, A., Hashimi, H., Maslov, D. A., Votýpka, J. & Yurchenko, V. (2018). Trypanosomatids Are Much More than Just Trypanosomes: Clues from the Expanded. *Trends in Parasitology* 34(6), 466-480.
66. Mani, J., Güttinger, A., Schimanski, B., Heller, M., Acosta-Serrano, A., Pescher, P., Späth, G., & Roditi, I. (2011). Alba-domain proteins of *Trypanosoma brucei* are cytoplasmic RNA-binding proteins that interact with the translation machinery. *PloS one* 6(7), e22463.
67. Mair, G., Shi, H., Li, H., Djikeng, A., Aviles, H.O., Bishop, J.R., Falcone, F.H.C., Gavrilescu, C., Montgomery, J.L., Santori, M.I., Stern, L.S., Wang, Z., Ullu, E. & Tschudi, C. (2000). A new twist in trypanosome RNA metabolism: cis-splicing of pre-mRNA. *RNA* 6(2), 163-169.
68. Markle, W. H. & Makhoul, K. (2004). Cutaneous leishmaniasis: recognition and treatment. *American Family Physician* 69(6), 1455-1464.
69. Margottin F., Dujardin, G., Gerard, M., Egly, J. M., Huet, J. & Sentenac, A. (1991) Participation of the TATA factor in transcription of the yeast U6 gene by RNA polymerase. *Science* 251, 424–426.

70. Martínez-Calvillo, S., Sunkin, S. M., Yan, S.-F., Fox, M., Stuart, K. & Myler, P. J. (2001). Genomic organization and functional characterization of the *Leishmania major* Friedlin ribosomal RNA gene locus. *Molecular and Biochemical Parasitology* 116, 147-157.
71. Martínez-Calvillo, S., Yan, S., Nguyen, D., Fox, M., Stuart, K. & Myler, P. J. (2003). Transcription of *Leishmania major* Friedlin chromosome 1 initiates in both directions within a single region. *Molecular Cell* 11(5), 1291-1299.
72. 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, 525241.
73. Mashruwala, A. A., Eilers, B. J., Fuchs, A. L., Norambuena, J., Earle, C. A., van de Guchte, A., Tripet, B. P., Copié, V., & Boyd, J. M. (2019). The ClpCP Complex Modulates Respiratory Metabolism in *Staphylococcus aureus* and Is Regulated in a SrrAB-Dependent Manner. *Journal of Bacteriology* 201(15), e00188-19.
74. Mason, S. W., Li, J., & Greenblatt, J. (1992). Direct interaction between two *Escherichia coli* transcription antitermination factors, NusB and ribosomal protein S10. *Journal of Molecular Biology* 223(1), 55-66.
75. Maurício, I. L., Stothard, J. R. & Miles, M. A. (2000). The strange case of *Leishmania chagasi*. *Parasitology Today* 16(4), 188–189.
76. Morales, M. (2002). Epidemiología molecular de la coinfección por “*Leishmania*”- VIH. Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Complutense de Madrid, España.
77. Nguyen, L., Humbert, S., Saudou, F. & Chariot, A. (2009). Elongator -an emerging role in neurological disorders. *Trends in Molecular Medicine* 16, 1-6.
78. Ni, J. Q., Liu, L. P., Hess, D., Rietdorf, J., & Sun, F. L. (2006). *Drosophila* ribosomal proteins are associated with linker histone H1 and suppress gene transcription. *Genes & development* 20(14), 1959-1973.
79. Normohamadpur, P. & Ghaedi, F. (2018). An Atypical Presentation of Disseminated Mucocutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania major* in Iran. *Iranian Journal of Parasitology* 13(1), 156–160.
80. Olivier, M., Atayde, V. D., Isnard, A., Hassani, K., & Shio, M. T. (2012). *Leishmania* virulence factors: focus on the metalloprotease GP63. *Microbes and Infection* 14(15), 1377-1389.
81. Otero, G., Fellows, J., Li, Y., de Bizemont, T., Dirac, A. M., Gustafsson, C. M., Erjument-Bromaje, H., Tempst, P. & Svejstrup, J. Q. (1999). Elongator, a multisubunit component of a novel RNA polymerase II holoenzyme for transcriptional elongation. *Molecular Cell* 3(1), 109-118.
82. Piscopo, T.V. & Mallia, A.C. (2006). Leishmaniasis. *Postgraduate Medical Journal* 82(976), 649–657.
83. Preußner, C., Jaé, N. & Bindereif, A. (2012). mRNA splicing in trypanosomes. *International Journal of Medical Microbiology*, 302(4-5), 221-224.
84. Price, D. H. (2000). P-TEFb, a Cyclin-Dependent Kinase Controlling Elongation by RNA Polymerase II. *Molecular and Cellular Biology* 20, 2629-2634.
85. Ready, P. D. (2014). Epidemiology of visceral leishmaniasis. *Clinical Epidemiology* 6, 147–154.

86. Reithinger R, Dujardin JC, Louzir H, Pirmez C, Alexander B & Brooker S. (2007). Cutaneous leishmaniasis. *The Lancet Infectious Diseases* 7(2), 581-96.
87. Romano, G. (2013). Deregulations in the Cyclin-Dependent Kinase-9-Related Pathway in Cancer: Implications for Drug Discovery and Development. *International Scholarly Research Notices of Oncology* 2013, 305371.
88. Rosal-Rabes, T. del, Baquero-Artigao, F. & García-Miguel, M.J. (2010). Leishmaniasis cutánea. *Pediatría Atención Primaria* 12(46), 263-271.
89. Roy, A. L., Sen, R. & Roeder, R. G. (2011). Enhancer-promoter communication and transcriptional regulation of Igh. *Trends in Immunology* 32(11), 532–539.
90. Ruoti, M., Oddone, R., Lampert, N., Orué, E., Miles, M. A., Alexander, N. & Krentel, A. (2013). Mucocutaneous leishmaniasis: knowledge, attitudes, and practices among paraguayan communities, patients, and health professionals. *Journal of Tropical Medicine* 2013, 538629.
91. Schramm, L. & Hernandez, N. (2002). Recruitment of RNA polymerase III to its target promoters. *Genes & Development* 16(20), 2593-2620.
92. Schröder, O., Bryant, G. O., Geiduschek, E. P., Berk, A. J. & Kassavetis, G. A. (2003). A common site on TBP for transcription by RNA polymerases II and III. *The EMBO Journal* 22(19), 5115–5124.
93. Schwarzerova, K., Bellinvia, E., Martinek, J., Sikorová, L., Dostál, V., Libusová, L., Bokvaj, P., Fischer, L., Schmit, C. & Nick, P. (2019). Tubulin is actively exported from the nucleus through the Exportin1/CRM1 pathway. *Scientific reports*, 9(1), 1-13.
94. Simo, G., Magang, E., Mewamba, E. M., Farikou, O., Kamga, R., Tume, C., Solano, P., & Ravel, S. (2020). Identificación molecular de los tripanosomas resistentes al aceturato de diminazene en moscas tsetsé de Yoko en la región centro de Camerún y sus implicaciones epidemiológicas. *Epidemiología y control de parásitos*, 9, e00135.
95. Simpson, L. (1987). The mitochondrial genome of kinetoplastid protozoa: genomic organization, transcription, replication, and evolution. *Annual Review of Microbiology* 41, 363-82.
96. Smid, A., Riva, M., Bouet, F., Sentenac, A. & Carles, C. (1995). The association of three subunits with yeast RNA polymerase is stabilized by A14. *Journal of Biological Chemistry* 270, 13534-13540.
97. Solinger, J. A., Paolinelli, R., Klöss, H., Scorza, F. B., Marchesi, S., Sauder, U. & Cassata, G. (2010). The *Caenorhabditis elegans* Elongator complex regulates neuronal alpha-tubulin acetylation. *PLoS Genetics* 6(1), e1000820.
98. Stuart, K., Brun, R., Croft, S., Fairlamb, a., Gürtler, R. E., McKerrow, J., Reed, S. & Tarleton, R. (2008). Kinetoplastids: related protozoan pathogens, different diseases. *The Journal of Clinical Investigation* 118(4), 1301–1310.
99. Teichmann, M., Dieci, G., Pascali, C. & Boldina, G. (2010). General transcription factors and subunits of RNA polymerase III: Paralogs for promoter- and cell type-specific transcription in multicellular eukaryotes. *Transcription* 1(3), 130–135.
100. Torres, M., Condon, C., Balada, J. M., Squires, C., & Squires, C. L. (2001). Ribosomal protein S4 is a transcription factor with properties remarkably similar to NusA, a protein involved in both non - ribosomal and ribosomal RNA antitermination. *The EMBO Journal* 20(14), 3811-3820.

101. Trájer, A. J., & Sebestyén, V. (2019). The changing distribution of *Leishmania infantum* Nicolle, 1908 and its Mediterranean sandfly vectors in the last 140 yrs. *Scientific reports*, 9(1), 1-15.
102. Trejo, P. J., Miranda, N. M., Solorzano, S. F., Cabrera, M. L., & Díaz, P. H. (1993). Kal-azar in Mexico: report of 2 cases. *Boletín médico del hospital infantil de México* 50(9), 662-665.
103. Veras, P. S. & Bezerra de Menezes, J. P. (2016). Using Proteomics to Understand How *Leishmania* Parasites Survive inside the Host and Establish Infection. *International Journal of Molecular Sciences* 17(8), 1270.
104. Voit, R., Seiler, J. & Grummt I. (2015). Cooperative Action of Cdk1/cyclin B and SIRT1 Is Required for Mitotic Repression of rRNA Synthesis. *PLOS Genetics* 11, e1005246.
105. Vizuet-de-Rueda, J. C., Florencio-Martínez, L. E., Padilla-Mejía, N. E., Manning-Cela, R., Hernández-Rivas, R. & Martínez-Calvillo, S. (2016). Ribosomal RNA Genes in the Protozoan Parasite *Leishmania major* Possess a Nucleosomal Structure. *Protist* 167, 121-135.
106. Wan, F., Anderson, D. E., Barnitz, R. A., Snow, A., Bidere, N., Zheng, L., Hegde, V., Lam, L. T., Staudt, L. M., Levens, D., Deutsch, W. A. & Lenardo, M. J. (2007). Ribosomal protein S3: a KH domain subunit in NF- κ B complexes that mediates selective gene regulation. *Cell* 131(5), 927-939.
107. Wang, S. C. & Frey, P. A. (2007). S-adenosylmethionine as an oxidant: the radical SAM superfamily. *TRENDS in Biochemical Sciences* 32, 101-110.
108. WHO. (2016). Control of Leishmaniases, Technical Report Series 949. (Geneva: World Health Organization).
109. Wilson, M. E., Jerônimo, S.M. & Pearson, R.D. (2005). Immunopathogenesis of infection with the visceralizing *Leishmania* species. *Microbial Pathogenesis* 38(4), 147–160.
110. Wittschieben, B. Ø., Otero, G., de Bizemont, T., Fellows, J., Erdjument-Bromage, H., Ohba, R., Li, Y., Allis, C. D., Tempst, P. & Svejstrup, J. Q. (1999). A novel histone acetyltransferase is an integral subunit of elongating RNA polymerase II holoenzyme. *Molecular Cell* 4(1), 123-128.
111. Yanofsky, C. (2000). Transcription attenuation: once viewed as a novel regulatory strategy. *Journal of Bacteriology* 182(1), 1-8.