



Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Estudios Superiores Iztacala



**Identificación de proteínas que se asocian con la
proteína “La” en el protozoo parásito *Leishmania major***

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGO

Presenta:

SERGIO GARCÍA DE LA CRUZ

Director de tesis

DR. SANTIAGO MARTÍNEZ CALVILLO



Los Reyes Iztacala, Tlalnepantla de Baz, Estado de México 2022



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Agradecimientos

Al Dr. Santiago Martínez Calvillo por permitirme estar en su laboratorio y aprender demasiado de todos sus integrantes, también por su apoyo y aportaciones durante el desarrollo de este proyecto. Muchas gracias.

A los compañeros del Laboratorio 1 por su ayuda y por sus consejos, al biólogo Luis Enrique Florencio por todo el conocimiento que me compartió acerca del trabajo de laboratorio, así como por sus observaciones al proyecto, al Dr. Tomás Nepomuceno por asistirme siempre que lo requerí y por sus comentarios y observaciones, así como también muchas gracias al Dr. Luis Enrique Arias y al Dr. Juan Carlos Vizuet por su revisión, por sus sugerencias y aportes.

Este proyecto de investigación fue financiado por el donativo IN214221 de PAPIIT (DGAPA, UNAM) otorgado al Dr. Santiago Martínez Calvillo.

Agradecimientos personales

A mis padres por siempre priorizar nuestra educación ante cualquier cosa y por dejarnos ser quienes hemos querido ser. Este logro también es de ustedes.

Hay tantas personas que de no conocerlas las cosas serían tan distintas, y en el punto de inflexión se encuentra el profesor Arnulfo. Gracias por hacerme ver la biología con otros ojos.

De cada profesor que he tenido me llevo lo bueno y también aprendo de lo malo. Gracias a cada uno de ellos.

A los compañeros y amigos que han hecho esta travesía más amena, especialmente estos últimos años. Son una de las cosas que más he aprendido a valorar conforme pasa el tiempo.

Índice

RESUMEN	8
INTRODUCCIÓN	9
Los tripanosomátidos.....	9
Generalidades de <i>Leishmania</i>	11
La leishmaniasis.....	13
Diagnóstico y tratamiento de la leishmaniasis	14
La transcripción en eucariontes	15
Transcripción de Pol II.....	15
Transcripción de Pol I.....	17
Transcripción de Pol III.....	18
Proteína “La”	21
Expresión genética en los tripanosomátidos	22
Transcripción de Pol III en <i>Leishmania</i>	25
“La” en tripanosomátidos	26
OBJETIVOS.....	28
Objetivo general:.....	28
Objetivos particulares:	28
MATERIALES Y MÉTODOS.....	29
Análisis <i>in silico</i>	29
Cultivo de promastigotes de <i>L. major</i>	29
Extracción de proteínas	30
SDS-PAGE	30
Western Blot	30
Inmunofluorescencias indirectas	31
Purificación por afinidad en tándem usando la bandera PTP.....	31
RESULTADOS	34
DISCUSIÓN.....	47
CONCLUSIONES.....	53
REFERENCIAS	54

Lista de tablas y figuras

Figura 1	Morfología de las dos formas principales de <i>Leishmania amazonensis</i>	9
Figura 2	Microscopía de fuerza atómica de una red aislada de kDNA	10
Tabla 1	Especies de <i>Leishmania</i> , distribución y tipos de leishmaniasis	11
Figura 3	Ciclo de vida de <i>Leishmania</i>	12
Figura 4	Tipos de Leishmaniasis	13
Figura 5	Distribución mundial de la leishmaniasis	14
Figura 6	Organización de un promotor de Pol II típico de humano	16
Figura 7	Inicio de la transcripción mediada por Pol II	17
Figura 8	Transcripción de Pol I	18
Figura 9	Organización de los tres tipos de promotores de Pol III	19
Figura 10	RNA Polimerasa III	20
Figura 11	La proteína “La”	21
Figura 12	Organización de los genes de los rRNA	24
Figura 13	Organización de genes transcritos por Pol III en <i>L. major</i>	25
Figura 14	Región promotora del U2 snRNA de <i>L. major</i>	26
Figura 15	Esquematación de la técnica de purificación por afinidad en tándem	33
Figura 16	Alineamiento de las secuencias del gen de “La” entre eucariontes	35
Figura 17	Alineamiento de las secuencias de la proteína “La” entre los eucariontes	36
Tabla 2	Matriz de porcentajes de identidad entre eucariontes	36
Figura 18	Alineamiento de las secuencias del gen de “La” de los tripanosomátidos	37
Figura 19	Alineamiento de las secuencias de la proteína “La” entre tripanosomátidos	38
Tabla 3	Matriz de porcentajes de identidad entre tripanosomátidos	39
Figura 20	Modelo de la estructura secundaria predicha de la proteína “La” en <i>L. major</i>	39
Figura 21	Estructura 3D predicha para la proteína “La” de <i>L. major</i>	40
Figura 22	Estructura 3D de la proteína “La” de <i>L. major</i> y la interacción con su sustrato	41
Figura 23	Estructura tridimensional del dominio RRM y del módulo La de <i>L. major</i>	42
Figura 24	Estructura tridimensional del dominio RRM2 de <i>L. major</i>	42
Figura 25	Western Blot de la línea celular La-PTP	43
Figura 26	Localización subcelular de la proteína “La” en <i>L. major</i>	44
Figura 27	Análisis de las proteínas que co-purificaron con la proteína “La”	45
Tabla 4	Lista de proteínas identificadas que co-purificaron con LmLa-PTP	46

Lista de abreviaturas

BRE	Elemento de reconocimiento de TFIIB
ChIP	Inmunoprecipitación de la cromatina
CITFA	Factor de transcripción clase I A
CTD	Extremo carboxilo terminal
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DPE	Elemento promotor río abajo
DSE	Elemento de secuencia distal
dT	Desoxitimas
EF	Factor de elongación
GTF	Factor de transcripción general
HSP	Proteína de choque térmico
IE	Elemento intermedio
kDa	kilo Daltons
kDNA	DNA de cinetoplasto
KSRP	Proteína ribosomal específica de kinetoplastidos
LARP	Proteína relacionada con La
lncRNA	RNA largo no codificante
miRNA	Micro RNA
mRNA	RNA mensajero
MTE	Elemento motivo diez
NLS	Señal de localización nuclear
NMR	Resonancia magnética nuclear
NPC	Complejo del poro
npLa	Proteína “La” no fosforilada
NTD	Extremo amino terminal
PABP	Proteína de unión a la cola poli-A

PGC	Unidad policistrónica
PIC	Complejo de preinicio
Pol	RNA Polimerasa
PSE	Elemento de secuencia proximal
RNA	Ácido Ribonucleico
RNAi	RNA de interferencia
RNP	Ribonucleoproteína
RRM	Motivo de reconocimiento a RNA
rRNA	RNA ribosomal
SBM	Motivo Básico Corto
SDS PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida
SINEs	Elementos nucleares dispersos cortos
SL RNA	RNA <i>Spliced Leader</i>
SNAPc	Complejo activador del snRNA
snRNA	RNA pequeño nuclear
snRNP	Ribonucleoproteína pequeña nuclear
SSR	Región de cambio de cadena
TAFs	Factores asociados a TBP
TBP	Proteína de unión a caja TATA
TF	Factor de transcripción
TRF	Factor relacionado a TBP
tRNA	RNA de transferencia
Us	Uridinas
USE	Elemento bipartito río arriba
VSG	Glicoproteína variante de superficie

RESUMEN

Alrededor de 1 millón de casos nuevos de leishmaniasis son reportados cada año en el mundo. Esta enfermedad, causada por protozoos del género *Leishmania*, es transmitida a los humanos por la mosca de la arena en regiones tropicales y subtropicales del mundo. *Leishmania* y otros tripanosomátidos son de interés como modelo de estudio en la biología molecular, ya que tienen mecanismos de expresión genética atípicos, como la transcripción policistrónica y el trans-splicing. La RNA polimerasa III (Pol III) sintetiza moléculas de RNA esenciales, como los tRNAs y el 5S rRNA. En levadura y humano la proteína “La” se une a los extremos UUU-OH-3’ de los transcritos de Pol III, protegiéndolos de la degradación, promoviendo su plegamiento y su exportación al citoplasma. Otras funciones incluyen su participación en la traducción y en la biogénesis ribosomal. A pesar de su relevancia, la proteína “La” no ha sido estudiada en *Leishmania*, por lo que en el presente trabajo se inició su caracterización molecular. El análisis *in silico* mostró la presencia de los dos dominios característicos del extremo N-terminal de esta proteína: el módulo La y RRM. Además, se encontraron posibles dominios RRM2 y SBM en el extremo C-Terminal. Modelaje por homología reveló que la estructura tridimensional predicha de la proteína “La” de *L. major* está muy conservada en relación con los ortólogos de humano y *Trypanosoma brucei*. Usando una línea celular de *L. major* que expresa a “La” unida a la bandera PTP en el extremo C-Terminal (La-PTP) se realizaron experimentos de inmunofluorescencia indirecta. Éstos demostraron que “La” se localiza en el núcleo de los parásitos, aunque también se encontró cierta señal en el nucleolo y, en menor medida, en el citoplasma. Con esta misma línea celular se llevó a cabo un ensayo de purificación por afinidad en tándem para determinar las proteínas que interactúan con “La”. Entre las proteínas identificadas por espectrometría de masas y análisis bioinformático se encontraron proteínas que se unen a tRNAs para modificarlos, como metiltransferasas, una pseudouridina sintasa y la RNasa P. Además, se identificaron proteínas que regulan la traducción (incluido el factor de inicio de la traducción eIF4A-1), y varias proteínas que participan en la biogénesis de las subunidades de los ribosomas, como P34/37 y Cbf5. Estos resultados indican que, como se ha reportado en otros organismos, la proteína “La” de *L. major* está involucrada en muy diversas funciones.

El cinetoplasto es una red de miles de moléculas concatenadas de DNA circular (kDNA) que representa hasta el 30% del material genético de los tripanosomátidos (Fig. 2), y es un carácter que permite discernir entre diferentes estadios en su ciclo de vida. Dentro del kDNA es posible identificar dos tipos de moléculas, los maxicírculos y los minicírculos. Los maxicírculos tienen un tamaño de entre 20-40 kb, son relativamente escasos, idénticos en secuencia y homólogos al DNA mitocondrial de eucariontes superiores, pues codifican rRNA y proteínas de la cadena respiratoria. Por otro lado, los minicírculos presentan un tamaño variable entre especies que ronda entre las 0.5 y 10 kb, son mucho más numerosos y heterogéneos en secuencia y codifican RNAs pequeños conocidos como RNAs guía (gRNAs) que participan en el proceso de edición, que consiste en la adición o remoción de residuos de uridina de los transcritos de los maxicírculos (Cavalcanti & Souza, 2018).

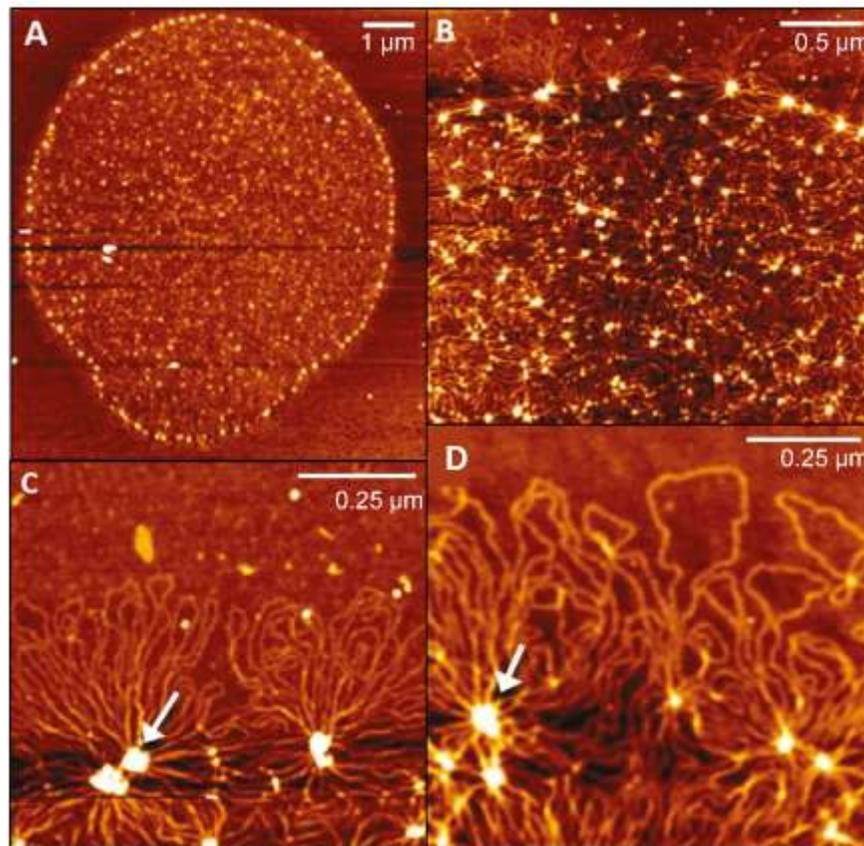


Figura 2. Microscopía de fuerza atómica (AFM) de una red aislada de kDNA. Red completa de kDNA (A). Detalles de la red en B, C y F, donde con flechas se señalan los agrupamientos de DNA en forma de rosetas. A-C corresponden a *C. fasciculata* y D corresponde a *A. deanei* (Modificado de Cavalcanti & Souza, 2018).

Generalidades de *Leishmania*

El protozoo parásito *Leishmania* se descubrió en 1900 por W. B Leishman y C. Donovan quienes observaron cuerpos ovales en frotis de sujetos que habían muerto por adelgazamiento, fiebre y esplenomegalia. Sin embargo, fue Ronald Ross en 1903 quien determinó que estos cuerpos eran un protozoo no descrito al que llamó *Leishmania donovani* en honor a sus descubridores (Steverding, 2017). Actualmente se han descrito más de 20 especies del género *Leishmania* (Tabla 1), 90 de vectores dípteros y hasta 70 de mamíferos que actúan como reservorios, incluido el humano (WHO, 2021).

Tabla 1. Especies de *Leishmania*, distribución y tipos de leishmaniasis (Traducido de Steverding, 2017). (NM) Nuevo Mundo, (VM) Viejo Mundo, (LCL) Leishmaniasis Cutánea Localizada, (LCD) Leishmaniasis Cutánea Difusa, (LMC) Leishmaniasis Mucocutánea, (LV) Leishmaniasis Visceral, (PKLD) Leishmaniasis Dérmica Post-Kala azar.

Subgénero	Especie	NM/ VM	Tipo de leishmaniasis	Distribución
<i>Leishmania</i>	<i>L. aethiopica</i>	V	LCL, LCD	Este de África
	<i>L. amazonensis</i>	N	LCL, LCD, LMC	Sudamérica
	<i>L. donovani</i>	V	LV, LDPK	África central, sur de Asia, Medio Oriente, India, China
	<i>L. infantum</i>	V y N	LC, LV	Mediterráneo, sureste de Europa, Medio Oriente, Asia Central, Norte, Centro y Sudamérica
	<i>L. major</i>	V	LC	Norte y Centro de África, Medio Oriente y Asia central
	<i>L. mexicana</i>	N	LCL, LCD	Norte, Centro y Sudamérica
	<i>L. tropica</i>	V	LCL, LV	Norte y Centro de África, Medio Oriente, Asia Central e India.
	<i>L. venezuelensis</i>	N	LCL	Norte de Sudamérica
	<i>L. waltoni</i>	N	LCD	República Dominicana
<i>Viannia</i>	<i>L. braziliensis</i>	N	LCL, LMC	Cuenca Amazónica Oriental, Sudamérica
	<i>L. guyanensis</i>	N	LCL, LMC	Norte de Sudamérica
	<i>L. lainsoni</i>	N	LCL	Brasil, Bolivia y Perú
	<i>L. lindenbergi</i>	N	LCL	Brasil
	<i>L. naiffi</i>	N	LCL	Brasil, Guyana Francesa
	<i>L. panamensis</i>	N	LC, LMC	Centro y Sudamérica
	<i>L. peruviana</i>	N	LC, LMC	Perú, Bolivia
	<i>L. shawi</i>	N	LCL	Brasil
<i>Mundinia</i>	<i>L. martiniquensis</i>	V y N	LCL, LV	Martinique, Tailandia

Leishmania es transmitida por dípteros del género *Phlebotomus* en el Viejo Mundo y *Lutzomyia* en el Nuevo Mundo. Su ciclo de vida inicia cuando los promastigotes metacíclicos son depositados en el sitio

de la picadura del insecto, donde son fagocitados por macrófagos en una vacuola parasitófora (Fig. 3). Dentro de ésta se diferencian en amastigotes, los cuales adquieren una forma oval y reestructuran su flagelo a uno más corto y con un rol sensorial que detecta señales ambientales (Sunther & Gull, 2017). Dos tipos de vacuolas han sido observadas según la presencia de uno o múltiples amastigotes, dependiendo la especie de *Leishmania*. En la vacuola comienzan a replicarse hasta lisis la célula e infectar a otros macrófagos. Un mosquito que pique a un vertebrado infectado puede ingerir hasta 3,200 amastigotes por cada 1.6 µl de sangre ingerida, y tras 5 días pueden encontrarse dentro del díptero hasta 35,000 promastigotes en distintas etapas. Cambios de pH, temperatura y señales químicas promueven la diferenciación hacia el estadio procíclico, que se adhieren con su flagelo a las microvellosidades del intestino medio, donde se replican. Después migran al aparato bucal para diferenciarse en promastigotes metacíclicos capaces de infectar a un mamífero (Fig. 3) (Muskus & Marín-Villa, 2002; Martínez-Calvillo, 2016; Sunther & Gull, 2017).

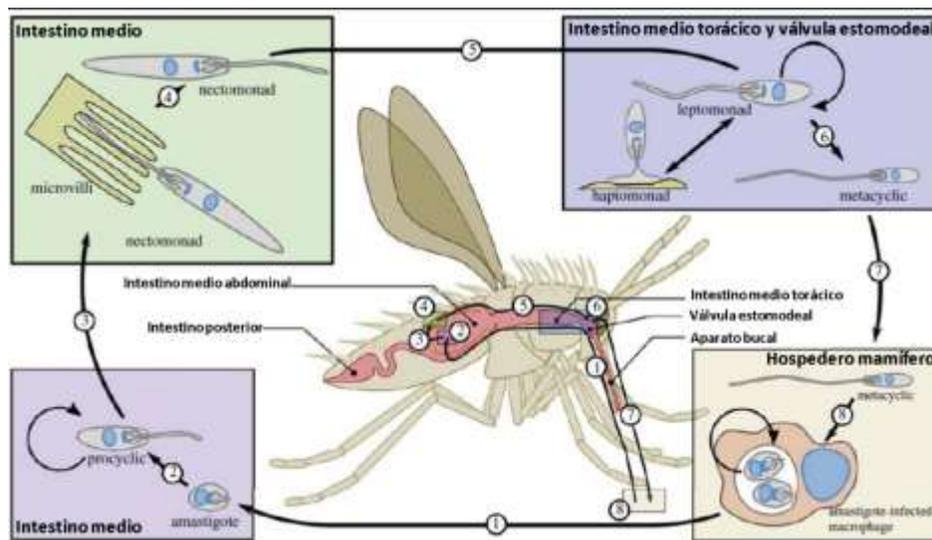


Figura 3. Ciclo de vida de *Leishmania*. Se observan las diferentes formas que adopta el parásito según el hospedero en el que se encuentre. El díptero succiona la sangre infectada del hospedero (1), los amastigotes dentro de su tracto digestivo se diferencian en promastigotes procíclicos y se adhieren mediante su flagelo a las microvellosidades del intestino (2-4), éstos tienen una alta tasa de replicación y después migran al aparato bucal (5) donde se diferencian en promastigotes metacíclicos infectivos poco replicativos (6). Los promastigotes metacíclicos son fagocitados por los macrófagos del hospedero (7). Dentro de su vacuola parasitófora se diferencian en amastigotes y se replican hasta lisis la célula, donde los amastigotes liberados son capaces de seguir infectando a otros macrófagos (8). Traducido de Sunther & Gull, 2017.

La leishmaniasis

Hay tres tipos principales de leishmaniasis en humanos, cuyas manifestaciones clínicas dependen de la especie de *Leishmania* con la que se haya infectado: leishmaniasis cutánea, mucocutánea y visceral. La leishmaniasis cutánea puede ser localizada (Fig. 4A) (producida por *L. major*, *L. mexicana*, *L. braziliensis*, *L. panamensis* y *L. tropica*, entre otras) o difusa (Fig. 4B) (*L. mexicana*, *L. ethiopica*, *L. waltoni* y *L. amazonensis*). En la zona de la picadura se desarrolla una pápula eritematosa de 1-10 mm que después de 2 días evoluciona a una ampolla que al romperse forma una úlcera con bordes gruesos. Éstas comúnmente sanan sin tratamiento dentro de 3-5 meses, sin embargo, hay casos que duran hasta 20 años. En la variedad cutánea difusa hay una falta de respuesta inmune que facilita la dispersión de las úlceras en toda la piel (Torres-Guerrero *et al*, 2017).

Del 1-10% de los casos de leishmaniasis cutánea localizada, causados principalmente por *L. amazonensis* y *L. braziliensis*, evolucionan a la variedad mucocutánea dentro de 5 años post-infección. En esta variedad de la leishmaniasis ocurre una invasión y destrucción lenta de las mucosas oronasofaríngeas que causan desfiguraciones, infecciones secundarias y obstrucción de la vía aérea que puede conllevar a la muerte (Fig. 4C). Finalmente, la leishmaniasis visceral o kala-azar (causada por *L. donovani*, *L. infantum*, *L. amazonensis* y *L. tropica*) se desarrolla de 3-8 meses, afectando principalmente a niños menores de 10 años, y personas inmunocomprometidas o desnutridas. Los síntomas más característicos son linfadenopatía, leucopenia, trombocitopenia, debilidad, anemia, palidez, fiebre, esplenomegalia, hepatomegalia, entre algunos otros. Cuando no es tratada ocurre una falla multiorgánica, caquexia, infecciones oportunistas, hemorragias y finalmente la muerte (Fig. 4D) (Martínez-Calvillo, 2016; Torres-Guerrero *et al*, 2017).



Figura 4. Tipos de Leishmaniasis. A y B muestran la leishmaniasis cutánea localizada y difusa respectivamente. C presenta la leishmaniasis mucocutánea y D la forma visceral (Modificado de Martínez-Calvillo *et al*, 2016 y Torres-Guerrero *et al*, 2017).

Leishmania se distribuye en zonas tropicales y subtropicales de cerca de 100 países alrededor del mundo (Fig. 5). En 2018 se estimaron de 600,000 a 1 millón de nuevos casos de leishmaniasis cutánea y de 50,000 a 90,000 en su forma visceral, la cual es mortal en el 95% de los casos (WHO, 2021). En México la enfermedad se conocía desde la época prehispánica. Actualmente afecta principalmente a las personas de áreas rurales en la zona Neotropical del sureste del país (Tabasco, Veracruz, Oaxaca, Chiapas, Campeche, Quintana Roo y Yucatán), donde se conoce como úlcera del chiclero, aunque se ha reportado en al menos 22 estados. La gran mayoría de casos se debe a infecciones cutáneas causadas por *L. mexicana* y *L. braziliensis*. Sin embargo, también se han reportado casos de leishmaniasis visceral por *L. infantum* (también conocida como *L. chagasi*) (Hampshire-Lopes *et al*, 2010; Martínez-Calvillo, 2016; Torres-Guerrero *et al*, 2017).



Figura 5. Distribución mundial de la leishmaniasis. Tomado de (Hampshire-Lopes *et al*, 2010).

Diagnóstico y tratamiento de la leishmaniasis

Para el diagnóstico de leishmaniasis cutánea o mucocutánea, además de las lesiones evidentes y síntomas, se pueden realizar frotis, biopsias o cultivos para visualizar amastigotes. Para el tipo visceral también se pueden buscar anticuerpos anti-leishmania en sangre, detectar el DNA del parásito por PCR, o realizar un análisis de isoenzimas. Para su tratamiento los medicamentos parenterales más usados son antimoniales pentavalentes, anfotericina B y pentamidina. Las opciones orales incluyen miltefosano y antifúngicos azólicos como ketoconazol y fluconazol, aunque existe un riesgo de hepatotoxicidad (Aronson *et al*, 2017).

Por todo lo expuesto anteriormente, es evidente la importancia de *Leishmania* y otros tripanosomátidos en el campo de la medicina. Sin embargo, este grupo de protozoos flagelados es también muy importante

en el área de la biología molecular, ya que su genoma y sus mecanismos de expresión genética son diferentes a los que se observan en otros organismos eucariontes. Entre estos mecanismos se encuentra la transcripción policistronica y el procesamiento de los mRNAs por trans-splicing. De estos temas se hablará más adelante. Antes se revisará cómo se lleva a cabo la transcripción en organismos eucariontes modelos, como levadura y vertebrados.

La transcripción en eucariontes

La transcripción es el proceso por el cual se sintetiza una molécula de RNA a partir de un molde de DNA. Las enzimas encargadas de llevar a cabo esta síntesis son las RNA polimerasas (Pol), de las cuales existen tres principales tipos en eucariontes, nombradas con los números romanos I, II y III (Brooker, 2015). Para iniciar la transcripción se debe formar el complejo de preinicio (PIC), el cual consta de una RNA polimerasa, una secuencia promotora y factores de transcripción generales (GTFs). En este paso, además de reclutar a todas las proteínas participantes, se abre la doble hélice para que la RNA polimerasa pueda iniciar la transcripción (Kornberg, 2017).

Transcripción de Pol II

La RNA polimerasa II (Pol II) se encarga de transcribir RNA mensajeros (mRNAs) y varios tipos de RNAs no codificantes, como los RNA largos no codificantes (lncRNAs), los RNA pequeños nucleares (snRNAs) y los micro RNAs (miRNAs) (Dieci *et al*, 2007). Pol II actúa en conjunto con seis GTFs: TFIIA, TFIIB, TFIIE, TFIID, TFIIF y TFIIH, que entre otras funciones reconocen la secuencia promotora y reclutan a Pol II para formar el PIC, indispensable para iniciar la síntesis de RNA. Adicionalmente a estos elementos, un complejo de otras 20 proteínas llamado Mediador interactúa directamente con proteínas activadoras o represoras unidas a secuencias *enhancers* o *silencers* respectivamente para regular la transcripción (Kornberg, 2017).

Los promotores son regiones genómicas que dirigen la transcripción al servir como una plataforma de unión para la maquinaria transcripcional. Por sí solo el promotor puede dirigir el inicio de la transcripción, pero con una baja actividad, por lo que también requiere de los GTFs para optimizar la transcripción. El elemento promotor más estudiado es la caja TATA, localizada entre las bases -31 a -24 en relación con el sitio de inicio de la transcripción (nucleótido +1 ó TSS), y su secuencia consenso

completa es TATAWAWR (W= A o T) (Fig. 6). A pesar de ser el elemento más estudiado, sólo se encuentra en el 5% de las secuencias promotoras en *Drosophila* y 20% en *Homo sapiens*. Otro elemento promotor bien caracterizado es el “Iniciador” (Inr), que es más abundante que la caja TATA pero no es universal y está menos conservado; la secuencia consenso en *Drosophila* es TCAGTY (Y= C o T), ubicado en -5 a +2 por lo que se sobrepone con el TSS (Fig. 6) (Haberle & Stark, 2018).

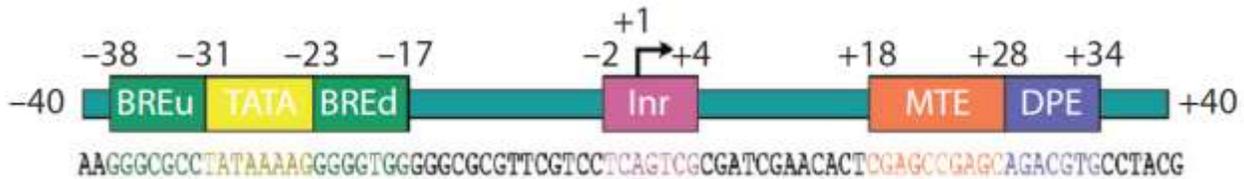


Figura 6. Organización de un promotor de Pol II típico de humano. La caja TATA, Inr, MTE (*Motif Ten Element*) y DPE (*Downstream Promoter Element*) suelen ser los sitios de unión para TFIID. BREu y BREd (*B Recognition Element*) interactúan con TFIIB. Las interacciones DNA-Proteína se visualizan fácilmente en la figura 7. Tomado de Nogales *et al*, 2017.

TFIID es un complejo proteico que sufre varios rearrreglos durante el ensamblaje del PIC y el inicio de la transcripción. Se compone de TBP (*TATA Binding Protein*) y 13 TAFs (*TBP-Associated Factors*). TBP se une fuertemente a la caja TATA cuando TFIIA induce un rearrreglo en la estructura de TFIID que permite la unión TBP-DNA, mientras que los TAFs como TAF1 y TAF2 suelen unirse con menos fuerza a otros elementos promotores centrales como Inr y DPE. La unión de TBP a la caja TATA provoca una torsión de $\sim 90^\circ$ en la doble hélice (Fig. 7). TFIIB se une posteriormente al extremo opuesto de TBP, donde recluta al complejo Pol II-TFIIF. Posteriormente TFIIE se une y finalmente se recluta TFIIH, el cual media la formación del complejo abierto y el escape del promotor. TFIIH es el GTF más grande y complejo, pues consta de 10 subunidades y es casi del tamaño de Pol II (Watson *et al*, 2014; Schier & Taatjes, 2020).

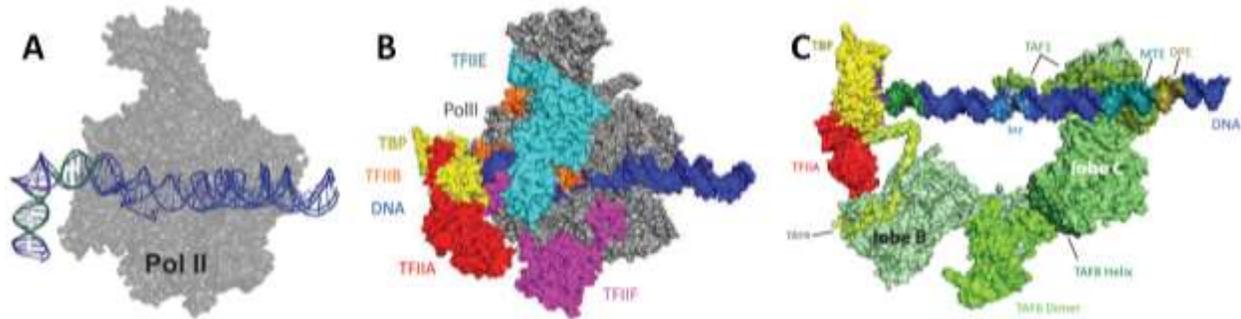


Figura 7. Inicio de la transcripción mediada por Pol II. A) Torsión de 90° del DNA por la unión de TBP. B) Acomodo de los factores de transcripción en el complejo de pre-inicio (Se omite TFIID y TFIIH). C) Disposición de TFIID y TFIIA en la secuencia promotora. Tomado de (Schier & Taatjes, 2020).

Seguido de la formación del PIC, sigue el “escape del promotor”, una fase en donde Pol II sintetiza de 20 a 120 nucleótidos hasta entrar en pausa. Para su posterior reincorporación a una fase de elongación activa requiere de la interacción con Factores de elongación (EFs) como P-TEFb, TFIIS, Elongina A y ELL. Este control de la expresión génica mediante el paro de la polimerasa se asocia a factores tanto ambientales como del desarrollo embrionario (Chen *et al*, 2018).

Finalmente, la terminación de la transcripción de Pol II involucra el paro en la síntesis del RNA y su liberación de la hebra molde de DNA. En la Pol II, esta etapa es significativamente más compleja que en las otras polimerasas y no ocurre en una secuencia específica. En mamíferos ocurre desde solo algunas bases hasta kilobases río abajo del extremo 3’ del mRNA maduro. La terminación esta influenciada tanto por la estructura de la cromatina, la fosforilación del extremo carboxilo-terminal (CTD) de la Pol II, interacciones con el *spliceosoma* y el procesamiento del extremo 3’ del mRNA. Tan solo el último involucra un complejo de 14 proteínas, de 1 MDa en total, que se encarga del corte y poliadenilación del extremo 3’ (Richard & Manley, 2009; Kuehner *et al*, 2011).

Transcripción de Pol I

Pol I está encargada exclusivamente de transcribir el precursor del RNA ribosomal (rRNA), el cual representa hasta el 60% de la actividad transcripcional. En mamíferos, el pre-rRNA 47S es procesado para generar los rRNAs 18S, 5.8S y 28S (Fig. 8), que después son ensamblados con múltiples proteínas y el rRNA 5S para formar los ribosomas. Su actividad, así como el ensamblaje de sus transcritos a los ribosomas, es realizada en el nucleolo, en donde se localizan los genes del rRNA en arreglos en tándem.

En humanos se han encontrado hasta 400 copias de rDNA en células diploides, aunque sólo el 50% es transcrito. Cada repetición de rDNA mide 43 kb, a pesar de que la región que contiene al pre-rRNA 47S sólo mide 13 kb. Además, cada copia contiene elementos reguladores como promotores, *enhancers* y terminadores dentro de un espaciador intergénico de 30 kb (Goodfellow & Zomerdijk, 2012).

Para formar el PIC se requiere de un complejo formado por TBP y por lo menos cuatro TAFs específicos de Pol I (TAF1A, TAF1B, TAF1C y TAF1D), que en conjunto se denominan Factor de Selectividad 1 (SL1). El SL1 se asocia al elemento *Core* y junto con el factor UBF y TIF-A inician la transcripción de Pol I (Vannini, 2013; Goodfellow & Zomerdijk, 2012).

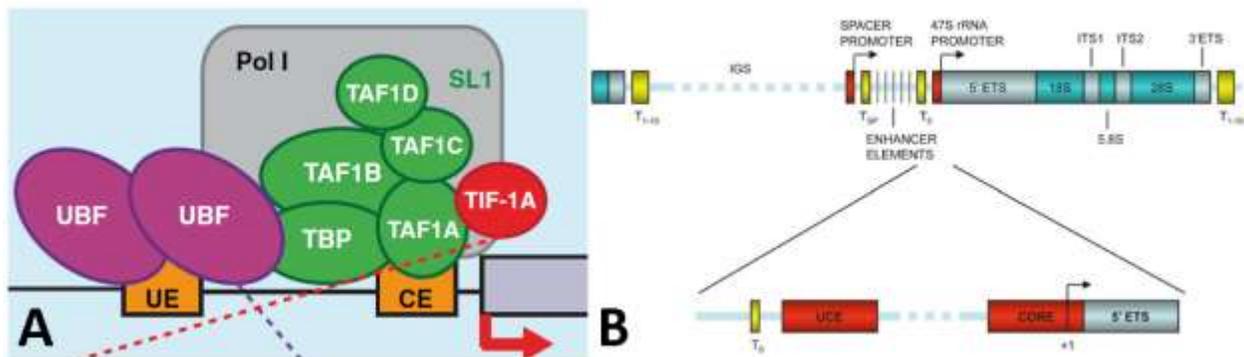


Figura 8. Transcripción de Pol I. En A) se muestra el PIC de Pol I. El factor UBF (en morado) actúa de manera dimérica, el factor SL1 se encuentra en verde y TIF-1A en rojo. Tomado de Vannini, 2013. En B) se muestra la unidad del rDNA, que comprende los genes del 18S, 5.8 S y 28S. El espaciador intergénico (IGS) contiene la región promotora y otros elementos reguladores. Tomado de Goodfellow & Zomerdijk, 2012.

Transcripción de Pol III

Pol III se encarga de la síntesis de diversos RNAs pequeños (~100 a ~522 nts) principalmente los RNA de transferencia (tRNAs) y el rRNA 5S, los cuales son necesarios para la traducción. Otros RNAs transcritos por Pol III han sido involucrados en la transcripción (7SK, Alu RNAs), el procesamiento de RNA (U6 snRNA, RNAsa P y RNAsa MRP), translocación (7SL), entre otros procesos (Vault RNAs, Y RNAs, SINEs) (Dieci *et al*, 2007; Durrieu-Gaillard *et al*, 2018).

La ubicación de los promotores de Pol III varía entre los genes que transcribe, al igual que el requerimiento de factores de transcripción; sin embargo, se pueden clasificar en tres tipos principales (Fig. 9). Los promotores tipo I, presentes exclusivamente en el rRNA 5S, constan de las cajas A y C y un

elemento intermedio (IE), localizados dentro de la región transcrita. Los promotores de tipo II, característicos de los tRNAs, están formados por cajas A y B que también se localizan dentro del gen. Los promotores de tipo III, presentes en los genes del U6 snRNA, contienen tres dominios localizados río arriba del gen: una caja TATA (-30), un elemento de secuencia proximal (PSE) (-20 de la caja TATA) y un elemento de secuencia distal (DSE) (Fig. 9). La transcripción mediada por Pol III requiere de tres factores de transcripción generales, llamados TFIIB, TFIIC y TFIID. En el caso del snRNA U6 se requiere además de SNAPc, el cual tiene sitios de unión al DSE (Dieci *et al*, 2007; White, 2011).

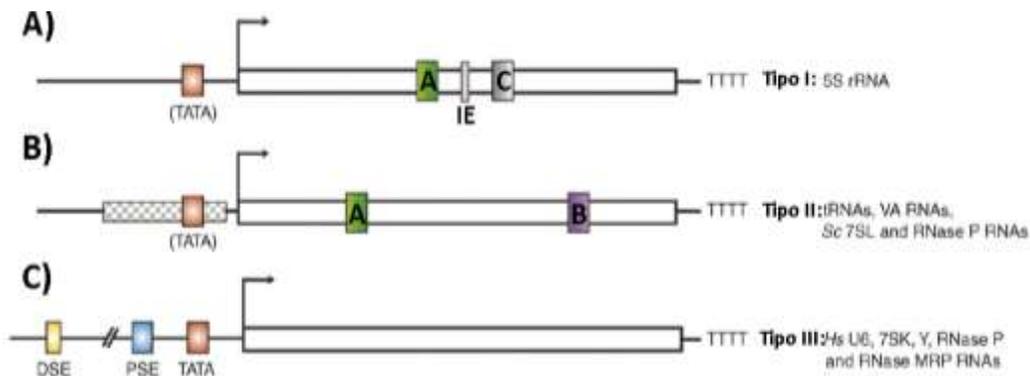


Figura 9. Organización de los tres tipos de promotores de Pol III. Los promotores tipo I están presentes en los genes del rRNA 5S (A). Los promotores tipo II se localizan en los genes de tRNA (B) y los promotores tipo III están presentes en los genes del snRNA U6 (C). Los paréntesis indican que la caja TATA puede o no estar presente. Modificado de Dieci, 2007.

TFIIIA está formado por una sola proteína que participa en la transcripción del gen del rRNA 5S, uniéndose al IE y facilitando el reclutamiento de TFIIC. En promotores tipo II, TFIIC se une directamente a las cajas A y B e incorpora a TFIIB. Éste se compone de Brf1, Bdp1 y TBP, y recluta a Pol III, además de participar en la apertura del promotor. TFIIC se ha relacionado con la reiniciación de Pol III y se ha sugerido que también está involucrado en la remodelación de la cromatina. Es el factor de transcripción más grande de Pol III, pues se compone de seis subunidades (Vannini, 2013; Turowski & Tollervey, 2016).

Pol III está compuesta por 17 subunidades (Fig. 10), por lo que es la más grande de las tres RNA polimerasas. Consta de un centro enzimático (*core*) de 10 subunidades y un pie (*stalk*) de 2 subunidades que están conservados entre las tres polimerasas. Adicionalmente tiene 5 subunidades organizadas en los subcomplejos RPC3/RPC6/RPC7 (C82/34/31 en *S. cerevisiae*) para el reclutamiento por TFIIB y

apertura del promotor, y RPC5/RPC4 (C53/37) involucrado en la iniciación y terminación (Abascal-Palacios *et al*, 2018).

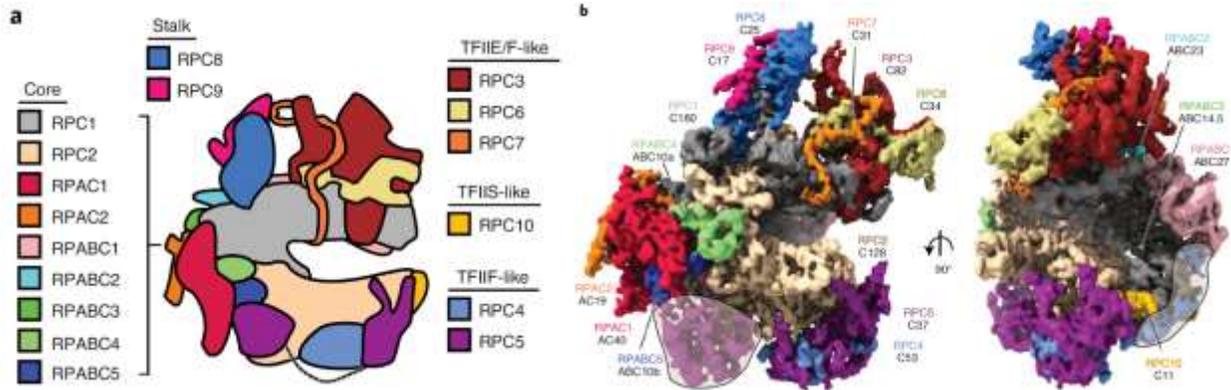


Figura 10. RNA Polimerasa III. A) Esquema de las subunidades de la RNA polimerasa III. B) CryoEM en dos ángulos distintos. Tomada de (Girbig *et al*, 2021).

La señal de termino de Pol III consta de una secuencia oligo dT, con un número mínimo de residuos dT que varía entre especies. Por ejemplo, en vertebrados cuatro Ts actúan como un terminador eficiente, mientras que en *S. cerevisiae* se requieren al menos seis residuos. Como consecuencia de esto los transcritos de Pol III terminan en residuos de uridinas en el extremo 3' (oligo Us). También se ha identificado que las subunidades involucradas en el reconocimiento del terminador oligo dT son RPC5 y RPC4 (C37/C53), las cuales se asocian a Pol III mediante RPC10 (C11) (Arimbasseri *et al*, 2013; Turowski & Tollervey, 2016).

El único represor de Pol III descrito hasta el momento es la proteína Maf1, la cual es desfosforilada bajo condiciones de estrés celular y migra del citoplasma al núcleo donde se une al heterotrímero RPC3/RPC6/RPC7 (C82/C34/C31) de Pol III, induciendo un rearrreglo de sus dominios Hélice alados (WH), particularmente de RPC6. Este rearrreglo dificulta la unión de Pol III con la subunidad Brf1 de TFIIIB, inhibiendo su interacción con el promotor. Maf1 también se une a Pol III durante la fase de elongación, permitiendo que se mantenga activa, pero evitando su reciclamiento (Vannini *et al*, 2010; Boguta, 2013).

Proteína “La”

Otro factor implicado en la regulación de la expresión de los transcritos de Pol III es la proteína “La”, descrita por primera vez en humanos como un autoantígeno en el síndrome de Sjögren y en el lupus sistémico eritematoso. Los primeros experimentos mostraron que “La” se une a RNAs nacientes como pre-tRNAs y pre-rRNAs 5S. Posteriores experimentos en *S. cerevisiae* encontraron que “La” está altamente confinada al núcleo, tanto en el nucleoplasma como en el nucleolo; aunque en algunas ocasiones, como infecciones virales por Poliovirus, “La” puede pasar al citoplasma (Wolin & Cedervall, 2002).

Los dominios identificados en el extremo N-terminal de la proteína “La” son el motivo “La” y el motivo RRM (*RNA Recognition Motif*), denominados “Módulo La”, los cuales están altamente conservados y son los encargados de reconocer y unirse al extremo UUU-OH-3' conjuntamente (Fig. 11). El extremo C-terminal es muy variable en tamaño y estructura entre especies, aunque puede contener un segundo motivo RRM (RRM2) (hasta el momento sólo confirmado en “La” de humano) el cual se ha observado que disminuye la afinidad de unión hasta 20 veces. Además, puede presentarse un motivo básico corto (SBM) que se ha sugerido que participa en la dimerización de esta proteína, y una secuencia de localización nuclear (NLS) (Fig. 11). Asimismo, la proteína “La” presenta múltiples sitios de fosforilación que afectan tanto su afinidad por el RNA como su localización celular (Ohndorf *et al*, 2001; Jacks *et al*, 2003; Marrella, 2017). La estructura secundaria del motivo “La” se asemeja a la de una hélice alada y el motivo RRM tiene un patrón de $\beta\alpha\beta\alpha\beta$.

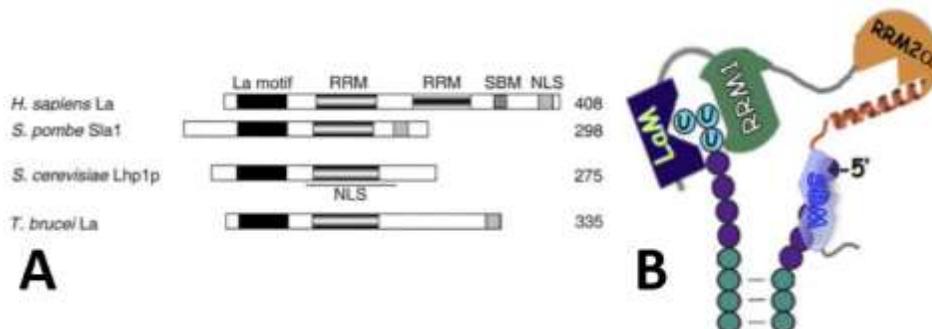


Figura 11. La proteína “La”. En A) se muestran los dominios presentes en “La” de *H. sapiens*, *S. pombe*, *S. cerevisiae* y *T. brucei*. Modificado de Wolin & Cedervall, 2002. En B) se representa la interacción de los dominios de “La” de *H. sapiens* con los extremos 3' y 5' de los pre-tRNA. “La” y RRM interactúan con el extremo UUU-OH-3', y SBM con el extremo 5'. Modificado de Blewett & Maraia, 2018.

Entre las funciones de la proteína “La” que se conocen actualmente están las de estabilizar los transcritos primarios de Pol III uniéndose a la región UUU-OH-3’ de los mismos (Fig. 11), determinar el orden y la manera en la que los extremos 5’ y 3’ de los pre-tRNA son removidos durante su maduración (Van Horn *et al*, 1997), retener en el núcleo a los transcritos nacientes a los que se une, y presentar actividad de chaperona de RNA (Pannone *et al*, 1998). También se ha sugerido su participación en la iniciación y terminación de la transcripción de Pol III, regulación de la traducción de algunos mRNAs, *splicing* de los pre-tRNA y su participación en el ciclo de replicación de algunos virus (Blewett & Maraia, 2018; Wolin & Cederwall, 2002; Bayfield *et al*, 2010).

Estudios *in vitro* donde se ha eliminado a “La” han demostrado una reducción de hasta el 99% de la actividad transcripcional de genes dependientes de Pol III (Gottlieb & Steitz, 1989a) y un estancamiento de los complejos de transcripción (Gottlieb & Steitz, 1989b), por lo que se ha sugerido que participa en la reiniciación de Pol III, pues su afinidad por los extremos UUU-OH-3’ facilita la salida del transcrito naciente, así como la disociación de Pol III de la hebra molde para su posterior reincorporación a otra ronda de transcripción (Maraia, 1996). También se ha estudiado la función del dominio SBM, observándose que tras su eliminación o sustitución con aminoácidos ácidos la proteína mantiene su función protectora pero no participa en la transcripción (Goodier *et al*, 1997). Sin embargo, otros estudios *in vitro* en ovocitos de *Xenopus laevis* y células HEK de *H. sapiens* no han encontrado diferencias en la eficiencia de la transcripción o terminación de Pol III en complejos de transcripción reducidos hasta en menos de 5% de “La” (Weser *et al*, 2000; Lin-Marq & Clarkson, 1998), por lo que su participación directa en la transcripción de Pol III aún es debatida. Ensayos de ChIP *in vivo* en células HeLa han demostrado que la forma no fosforilada de “La” (npLa) se encuentra unida específicamente a genes transcritos por Pol III en todas las fases del ciclo celular (Fairley *et al*, 2005).

Expresión genética en los tripanosomátidos

Los tripanosomátidos tienen ciertas características muy peculiares, como el arreglo de su genoma en agrupaciones de decenas a cientos de genes codificantes de proteínas dentro de una misma hebra de DNA llamadas unidades policistrónicas (PGC, por sus siglas en inglés). A diferencia de los operones presentes en bacterias, estas proteínas no tienen una relación funcional. Entre las PGC se encuentran arreglos en tándem de genes de rRNA. Asimismo, agrupaciones de 2-10 genes de tRNAs se encuentran

en los límites de las PGCs, en los cuales también se pueden encontrar otros genes transcritos por Pol III. Otras características distintivas de los tripanosomátidos son el *trans-splicing*, la participación de Pol I en la transcripción de mRNAs, y la ausencia de intrones en genes que codifican proteínas (Martínez-Calvillo *et al*, 2010 Clayton, 2019).

El cromosoma 1 de *L. major*, el primero en ser secuenciado en los tripanosomátidos, presenta dos PGCs, con 29 y 50 genes cada una. Se demostró que la región que separa las dos PGCs, denominada *Strand-Switched Region* (SSR), es la única parte del cromosoma donde inicia la transcripción de Pol II, de manera bidireccional (Martínez-Calvillo *et al*, 2003). Resulta interesante que esta región SSR, al igual que todas las SSR de todos los cromosomas de los tripanosomátidos, no contiene cajas TATA, ni ningún otro dominio típico de los promotores eucariontes de Pol II. Sin embargo, una característica común en las regiones SSR es la presencia de secuencias ricas en CG, que parecen inducir una curvatura en el DNA (Martínez-Calvillo *et al*, 2003).

Los transcritos policistrónicos son procesados mediante *trans-splicing* y poliadenilación para producir los mRNA individuales. El trans-splicing consiste en la adición de una secuencia de 39 nucleótidos llamada miniexón o *Spliced Leader* (SL RNA) al extremo 5' de todos los mRNA maduros. El miniexón porta un cap en su extremo 5', lo que proporciona estabilidad a los mRNA. El trans-splicing se identificó primero en tripanosomátidos y luego fue reportado en otros organismos. Las snRNPs necesarias para el trans-splicing son esencialmente las mismas que para el splicing convencional (U2, U4, U5 y U6), con la diferencia de que la snRNP del SL RNA substituye a la snRNP U1. El SL RNA requiere una alta tasa de transcripción, que es llevada a cabo por Pol II. Se han encontrado hasta 200 copias del gen del SL RNA por genoma y se calcula que se renueva cada ~4 min. De igual manera que con el splicing convencional, el trans-splicing puede dar origen a nuevas funciones mediante trans-splicing alternativo, donde se puede inhibir la traducción omitiendo el codón AUG, señales blanco, elementos reguladores o cambiar el marco de lectura (Preußner *et al*, 2012; Clayton, 2019).

El único promotor de Pol II que ha sido caracterizado en los tripanosomátidos es el del SL RNA, el cual consta de un elemento bipartito río arriba (USE) y un Iniciador. Los factores de transcripción que se

han asociado a la transcripción del SL RNA son TRF4 (TBP-Related Factor 4), SNAPc y ortólogos de TFIIA, TFIIB, TFIIE, TFIIF y TFIIH (Palenchar *et al*, 2006; Lee *et al*, 2007).

Transcripción atípica de Pol I en los tripanosomátidos

En *T. brucei* los genes que codifican a las glicoproteínas variables de superficie (VSGs) y prociclinas EP y GPEET son peculiarmente transcritos por Pol I. En el caso de las VSGs, éstas cubren aproximadamente el 90% de la superficie celular en la forma sanguínea dentro del hospedero y están involucradas directamente en la evasión del sistema inmune al tener una variación cíclica del alelo que expresan en un determinado momento (variación antigénica). Las prociclinas EP y GPEET de igual manera recubren la superficie celular, pero de una manera menos densa y están asociadas a la etapa (formas procíclicas) dónde el parásito se encuentra en vectores del género *Glossina sp.* o mosca Tsetse (Hernández & Cevallos, 2014; Martínez-Calvillo *et al*, 2010).

Otra particularidad de *Leishmania* y otros tripanosomátidos es que el gen del rRNA 28S, también transcrito por Pol I, se encuentra fragmentado en dos RNAs largos y cuatro pequeños (Fig. 12). En el caso de *L. major*, el gen distal del rRNA ϵ se encuentra repetido (Fig. 12). Para la transcripción de los genes de Pol I mencionados anteriormente se ha observado la participación de un factor de transcripción de clase I llamado CITFA (*Class I Transcription Factor A*), el cual consta de 6 subunidades únicas y una cadena ligera de dineína (Hernández & Cevallos, 2014). A la fecha, es el único factor de transcripción de Pol I descrito en los tripanosomátidos.

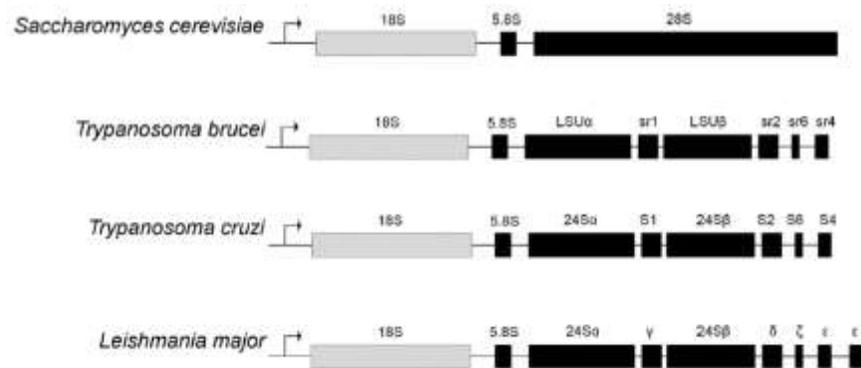


Figura 12. Organización de los genes de los rRNA en tripanosomátidos y en levadura. Tomado de Hernández & Cevallos, 2014.

Transcripción de Pol III en *Leishmania*

En *Leishmania* y otros tripanosomátidos se conoce muy poco sobre la transcripción de Pol III. En estos organismos todos los snRNAs son transcritos por Pol III (no sólo el U6 snRNA), además de los tRNAs y el rRNA 5S, entre otros. Los genes de los tRNAs en *L. major*, a diferencia con otros eucariotes, presentan un arreglo no azaroso pues el 45.2% de los loci tienden a agruparse en *clusters* de 2 a 10 genes al término de PGCs convergentes, donde además se localizan otros genes dependientes de Pol III, como el rRNA 5S (Fig. 13) (Padilla-Mejía *et al*, 2009). Una situación similar se presenta en el genoma de *T. brucei*. Asimismo, mientras que otros eucariotas tienen de 100 a 1000 genes del rRNA 5S, en *Leishmania* solo se encuentran 11, los cuales están dispersos en el genoma, mayormente en la periferia del núcleo y no parecen estar asociados al nucleolo. En contraste, en *T. brucei* los genes del rRNA 5S no se encuentran dispersos, sino en arreglos en tándem con alrededor de 1500 copias, algunas asociadas al gen del SL RNA. Debido a la cercanía de los tRNAs y del rRNA 5S se ha hipotetizado que las cajas A y B de los primeros puedan tener un efecto regulador en la transcripción del 5S, como se ha observado en el caso de los snRNAs asociados a tRNAs o secuencias tipo-tRNA (Moreno-Campos *et al*, 2016; Rojas-Sánchez *et al*, 2016).

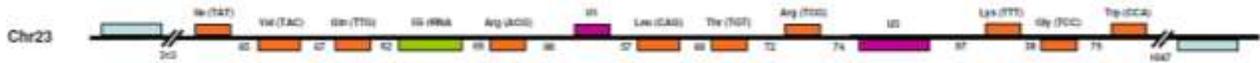


Figura 13. Ejemplo de la organización de genes transcritos por Pol III entre dos unidades policistrónicas del cromosoma 23 en *L. major*. Casos similares se encuentran en todos los cromosomas y también en *T. brucei*. El gen del rRNA 5S se muestra en verde, los snRNAs en morado, los tRNAs en anaranjado y los genes codificadores de proteínas en azul. Tomado de Padilla-Mejía *et al*, 2009.

En relación con las regiones promotoras reconocidas por Pol III, se ha observado que los genes de tRNA y del rRNA 5S en estos parásitos contienen secuencias parecidas a las de los elementos promotores internos (cajas A, B y C, y el EI) encontrados en otras especies. Sin embargo, estas regiones promotoras no han sido caracterizadas funcionalmente. De manera interesante, los promotores de los snRNAs son muy diferentes a los reportados en otros eucariotes. Por ejemplo, la transcripción del gen del U2 snRNA de *L. major* es regulada por cajas A y B tanto de un gen de tRNA-Ala como de una secuencia tipo-tRNA (tRNA-like), localizadas río arriba y en orientación opuesta al snRNA (Fig. 14) (Rojas-Sánchez *et al*, 2016)

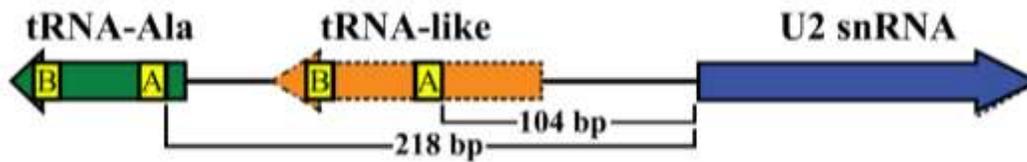


Figura 14. Región promotora del U2 snRNA de *L. major*. La transcripción del U2 snRNA es controlada por cajas A y B presentes en el tRNA-Ala y un tRNA-like contiguos. Este promotor es atípico comparándolo con el de los snRNAs de otros eucariontes (Tomado de Rojas-Sánchez *et al*, 2016).

De manera interesante, de los tres factores generales de Pol III, no se ha identificado TFIIIA en tripanosomátidos. En estos organismos ya fueron caracterizadas las tres subunidades de TFIIIB (TBP, Brf1 y Bdp1). En *L. major* se observó que Bdp1 es notablemente más pequeña que el ortólogo de humano (44 kDa vs 293 kDa) y comparte características como el dominio SANT extendido con los ortólogos de otros eucariontes. No obstante, se encontraron diferencias en el plegamiento predicho de las regiones que interactúan con subunidades de Pol III y en la presencia de algunos residuos aromáticos (Román-Carrano *et al*, 2019). La función y estructura de Brf1 fue caracterizada en *T. brucei*, donde se observó que era esencial para el crecimiento (Vélez-Ramírez *et al*, 2015). Ensayos de ChIP demostraron que Brf1 en *L. major*, además de unirse a genes de Pol III, también se asocia con genes del rRNA (transcritos por Pol I), y con la SSR del cromosoma 1 y el gen del SL RNA (transcritos por Pol II). Además, la subunidad Tau131 de TFIIIC fue co-purificada con Brf1 en *L. major* mediante ensayos de purificación por afinidad en tándem (Florencio-Martínez *et al*, 2021). También se ha estudiado la participación del represor Maf1 en la regulación de la transcripción de Pol III, uniéndose a las regiones promotoras de los tRNA y snRNA para inhibir su transcripción (Romero-Meza *et al*, 2017).

“La” en tripanosomátidos

En *T. brucei* se ha estudiado la proteína “La”, encontrándose que el módulo “La” está altamente conservado (Westerman & Weber, 2000). También se ha reportado que el *knock-down* mediante RNA de interferencia (RNAi) de “La” detiene completamente la división celular en *T. brucei*, y se observó una acumulación de intermediarios de tRNA-Tyr y otros RNAs nacientes. En este mismo estudio se trató de identificar la participación de “La” en el procesamiento del SL RNA, pero solamente se logró identificar su unión, pero no su participación en el procesamiento, lo que sugiere que su función podría ser de transporte entre el núcleo y el citoplasma (Foldynová-Trantírková *et al*, 2004). En un estudio

reciente se determinó con resonancia magnética nuclear (NMR) la estructura terciaria del dominio RRM de “La” en *T. brucei* y se encontró la presencia de una α hélice extra en el extremo C-terminal ($\beta\alpha\beta\beta\alpha\beta\alpha$) (Shan *et al*, 2019). También reportaron su unión a las proteínas P34/P37, L5 y SA, relacionadas con la maduración y plegamiento del rRNA 5S y la biogénesis del ribosoma. Además, se confirmó la participación sinérgica del motivo “La” y RRM, la estimulación de la actividad de la telomerasa y su retención nuclear (Shan *et al*, 2019).

En nuestro laboratorio hemos iniciado el estudio de la proteína “La” en *L. major*, generando una línea celular que expresa a la proteína recombinante “La” fusionada a la bandera PTP (Flores-Pérez, 2011) Esta etiqueta está formada por un dominio de unión a la proteína A de *Staphylococcus aureus* y un epítotope de la proteína C, separados por un sitio de corte de la proteasa TEV (Fig. 15) (Günzl & Schimanski, 2009). Con esta línea celular, en el presente trabajo se llevaron a cabo experimentos de purificación por afinidad en tándem para identificar las proteínas con las que se asocia la proteína “La” en *L. major*. También se realizaron ensayos de inmunofluorescencia indirecta para determinar la localización subcelular de la proteína “La” en el parásito.

OBJETIVOS

Objetivo general:

Determinar las proteínas con las que interactúa la proteína “La” en *L. major*.

Objetivos particulares:

1. Analizar *in silico* la secuencia y estructura de la proteína “La” de *L. major*.
2. Confirmar la expresión de la proteína recombinante La-PTP en la línea celular Lm/La-PTP.
3. Localizar subcelularmente a la proteína La-PTP en la línea celular Lm/La-PTP.
4. Identificar las proteínas con las que se asocia la proteína recombinante “La” en promastigotes de *L. major*

MATERIALES Y MÉTODOS

Análisis *in silico*

Las secuencias de nucleótidos y aminoácidos de tripanosomátidos se obtuvieron de la base de datos de TriTrypDB (<https://tritrypdb.org/tritrypdb/app>), mientras que las de los otros eucariontes se obtuvieron en la base de datos de NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Los alineamientos de secuencias y los porcentajes de identidad se obtuvieron con ClustalΩ (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>), el sombreado de aminoácidos conservados y semiconservados se realizó manualmente. Las estructuras secundarias se obtuvieron en PSIPRED (<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/>), la estructura terciaria se obtuvo en SWISS-MODEL (<https://swissmodel.expasy.org>) y se le hicieron modificaciones de color en Chimera (<https://www.cgl.ucsf.edu/chimera/>). Los motivos conservados se identificaron con ayuda de BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/BlasTcgi>) y con artículos donde se ha estudiado la estructura de “La” en humano y levaduras. La identidad de las proteínas que co-purificaron con Lm-LaPTP en los experimentos de purificación por afinidad en tándem se realizó con HHPred (<https://toolkit.tuebingen.mpg.de/tools/hhpred>) y la base de datos de TriTrypDB (<https://tritrypdb.org/tritrypdb/app>).

Cultivo de promastigotes de *L. major*

Los promastigotes en fase procíclica de la línea celular *L. major* cepa Friedlin se mantuvieron a 28 °C, resemebrando cada 24 horas a una densidad de 5×10^6 células, asegurando que se encontraran en la fase logarítmica de crecimiento. Para esto se utilizó medio BM (Medio M199 0.5×, bicarbonato de sodio 1.1 g/L, infusión de cerebro corazón 0.25×, suero fetal bovino descomplementado al 10%, HEPES 40 mM, hemina 0.01 mg/mL, biotina 2 mg/L, penicilina 100 U/mL y estreptomycin 0.1 mg/mL) para la línea silvestre (WT) y medio BM + 50 µg/mL de G418 para las líneas recombinantes La-PTP y Maf1-PTP. El conteo de células se llevó a cabo en la cámara de Neubauer preparando diluciones 1:10 de cultivo con PBS-formaldehído 2% (50 µL de cultivo en 450 µL de PBS-formaldehído 2%).

Extracción de proteínas

Para la extracción de proteínas totales, se centrifugaron promastigotes en fase logarítmica de las líneas celulares WT, LmLa-PTP y LmMaf1-PTP a 5,000 rpm por 10 min. Posteriormente se realizaron 2 lavados con PBS y se empastilló a 5,000 rpm por 10 min, para terminar resuspendiendo las células con buffer RIPA (Tris-HCl 50 mM, EDTA 5 mM, NaCl 150 mM, NP40 1%, Deoxicolato de sodio 0.5%, SDS 0.1%, inhibidores de proteasas 1X) a una proporción de 1 μ L de buffer RIPA por 1×10^6 células. Después se incubó en hielo por 30 min agitando en el vortex por 5 segundos cada 5 min. Finalmente se centrifugaron las muestras a 14,000 rpm por 20 min, se recuperó el sobrenadante y se almacenó a -70 °C. La proteína total se cuantificó por el método de Bradford y se verificó su integridad en un gel de acrilamida al 10% (SDS-PAGE) teñido con azul de Coomasie.

SDS-PAGE

Los extractos proteicos fueron desnaturalizados con buffer Laemmli 1 \times (Tris-HCl 83 mM pH 6.8, SDS 118 mM, azul de bromofenol 99.5 μ M, 5% de 2-Mercapto etanol y glicerol 33.3%) y puestos en baño maría a 96 °C por 10 min. Las muestras fueron cargadas junto con un marcador de peso molecular pre-teñido en un gel discontinuo compuesto por una parte concentradora (acrilamida-bisacrilamida al 4%, Tris-HCl 0.133 M pH 6.8, SDS 0.1%, persulfato de amonio 0.1%, TEMED 0.2%) y una parte separadora (acrilamida-bisacrilamida al 10%, Tris-HCl 0.374 M pH 8.8, SDS 0.1%, persulfato de amonio 0.1% y TEMED 0.2%) en una cámara de electroforesis con buffer de corrida 1 \times (Tris 24 mM, glicina 191 mM, SDS 0.1%) a un voltaje de 80v por \sim 30 min (hasta que las bandas entraron al gel separador) y posteriormente a 100v por \sim 90 min (cuando comenzó a salir el frente de azul de bromofenol).

Western Blot

Para el Western Blot se realizó una SDS-PAGE y las proteínas en el gel se transfirieron a una membrana de Fluoruro de polivinilideno (Inmunoblot PVDF, BioRad) en una cámara con buffer de transferencia 1 \times (25 mM Tris base, 192 mM Glicina, 20% metanol, pH 8.3) a 100v por 120 min. Posteriormente la membrana fue bloqueada en una solución de leche (BioRad) al 5% + PBS-Tween 20 0.05% toda la noche. El anticuerpo primario anti-Prot C (Delta biolabs) de conejo se incubó por 90 min en una proporción 1:3000 en PBS+Tween 20 0.05% y leche 1%. Se realizaron 3 lavados con PBS+Tween 20 0.05% por 10 min y posteriormente el anticuerpo secundario HRP anti-conejo se incubó bajo las mismas

condiciones y tiempo que el anterior. Se volvieron a realizar 3 lavados con PBS-Tween 20 0.05% y las bandas se visualizaron en placas fotográficas aplicando una dilución 1:5 de la solución de revelado luminol y peróxido Immobilon™ Western (Millipore). Posteriormente la membrana se desnudó con 20 mL de solución de stripping (Pierce) durante 30 min, se lavó con PBS-Tween 20 0.05% y se volvió a bloquear con leche 5% + PBS-Tween 20 0.05%. Se incubó con el anticuerpo anti- α/β tubulina (Cell Signal) en proporción 1:1000 toda la noche y se reveló como se describió anteriormente.

Inmunofluorescencias indirectas

Se sembraron células a una densidad de 5×10^6 cada 24 horas, durante 3 días, una vez las células se encontraron en fase media logarítmica se cosecharon centrifugando a 5,000 rpm por 5 min y se lavaron 2 veces con PBS filtrado, para terminar resuspendiéndolas a una densidad de 75,000 células por μL en PBS. Se colocaron 20 μL por pozo en un portaobjetos tratado con poli L-lisina y se dejaron adherir por 20 min para después fijarlas con 40 μL de paraformaldehído (PFA) al 6% por 30 min. Se retiró el PFA con ayuda de vacío y se realizaron 3 lavados con PBS filtrado por 5 min. Se bloqueó con PBS-BSA 2% por 30 min y posteriormente se incubaron los anticuerpos primarios anti-Prot C (Delta biolabs) de conejo y anti-Nop56 (proteína nucleolar 56) de ratón en proporciones 1:50 y 1:25 respectivamente en una solución con PBS-BSA al 2% por 1 hora. Se realizaron 3 lavados con PBS por 5 min y se incubaron los anticuerpos secundarios Alexa Fluor 488 anti-conejo y Alexa Fluor 568 anti-ratón (BioLegend), ambos en proporciones 1:300 en PBS-BSA 2% por 1 hora. Se realizaron 4 lavados con PBS intercalando con PBS-Tween 20 0.02% y finalmente se colocaron 15 μL de Vectashield-DAPI por pozo. Las células se visualizaron en un microscopio de epifluorescencia y las imágenes capturadas se procesaron en el programa Zen 3.6 (Blue edition).

Purificación por afinidad en tándem usando la bandera PTP

Se cosecharon 2.5 L de cultivo de la línea Lm/La-PTP a una densidad de 30×10^6 células/mL. Las células se centrifugaron a 4,500 rpm por 10 min a 4 °C y se lavaron con PBS-G (Buffer fosfato salino, glucosa 2%). La lisis se realizó adicionando buffer IPP-150 (Tris-HCl 10 mM pH 8.1, NaCl 150 mM, NP-40 0.1%), inhibidores de proteasas 2.5 \times y Tritón X-100 10%. Se dejó incubando en hielo por 40 min y se le dieron 40 golpes con un homogenizador. Se verificó la lisis al microscopio óptico y se centrifugó el lisado a 10,000 rpm 15 min a 4 °C, rescatando el sobrenadante.

Se empacaron 500 μL de resina con perlas de sefarosa IgG (IgG Sepharose™ 6 Fast Flow", Amersham) en la columna desechable Econo-Pac (BIO-RAD) de 20 mL y se equilibró con buffer IPP-150 agitando vigorosamente y lavando a 4 °C por 5 min; el líquido se drenó y se colocaron 22 mL del lisado celular incubando en rotación 4 horas a 4 °C. Posteriormente se drenó el líquido y se realizaron 3 lavados con buffer IPP-150 frío. Se equilibró la columna con buffer Ac TEV (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), se drenó el líquido y se colocaron 2 mL de este mismo buffer con 20 μL (10 U/ μL) de proteasa AcTEV (Sigma Aldrich). Se incubó a 4 °C por toda la noche en agitación a un ángulo de 45°. Después se eluyó el líquido y se lavó la columna con buffer PC-150 (Tris-HCl 20 mM pH 7.7, KCl 150 mM, MgCl₂ 3 mM, DTT 0.5 mM, Tween 20 0.1%, CaCl₂ 0.5 mM e inhibidores de proteasas 1 \times), a este eluido se añadieron inhibidores de proteasas y CaCl₂ a una concentración final de 2 \times y 3 mM, respectivamente.

Se empacaron 150 μL de resina anti-proteína C (HPC4, Roche) en una columna Econo-Pac (BIO-RAD) de 5 mL y se equilibró con buffer PC-150 agitando vigorosamente y lavando por 5 min a 4 °C. Después se drenó y se agregó el eluido incubando por 4 horas a 4 °C. Se drenó el líquido y se realizaron 6 lavados con buffer PC-150. Las proteínas se eluyeron con buffer de elución EGTA/EDTA (Tris-HCl pH 7.75 mM, EGTA 10 mM, EDTA 5 mM e inhibidores de proteasas 2 \times) y se almacenaron a -70°C.

Posteriormente se concentró la proteína en 15 μL mediante columnas de ultrafiltración (Amicon® Ultra-0.5ml Ultracel 3K, Millipore) centrifugando a 14,000 rpm a 4 °C y el uso del *Speed Vac* por 40 min. 3 μL de muestra y marcador molecular no teñido (Promega) se separaron por SDS-PAGE usando un gel de gradiente (Mini-PROTEAN TG, 4%-15%) que fue teñido con SYPRO Ruby (Invitrogen, Molecular Probes). Para el análisis por espectrometría de masas, los 12 μL de muestra restante fueron cargados en el gel concentrador por SDS PAGE, se tiñó con azul de Coomassie y se cortaron las bandas para mandarlas a analizar a la Unidad de Proteómica de la Universidad de Siracusa, Nueva York, Estados Unidos.

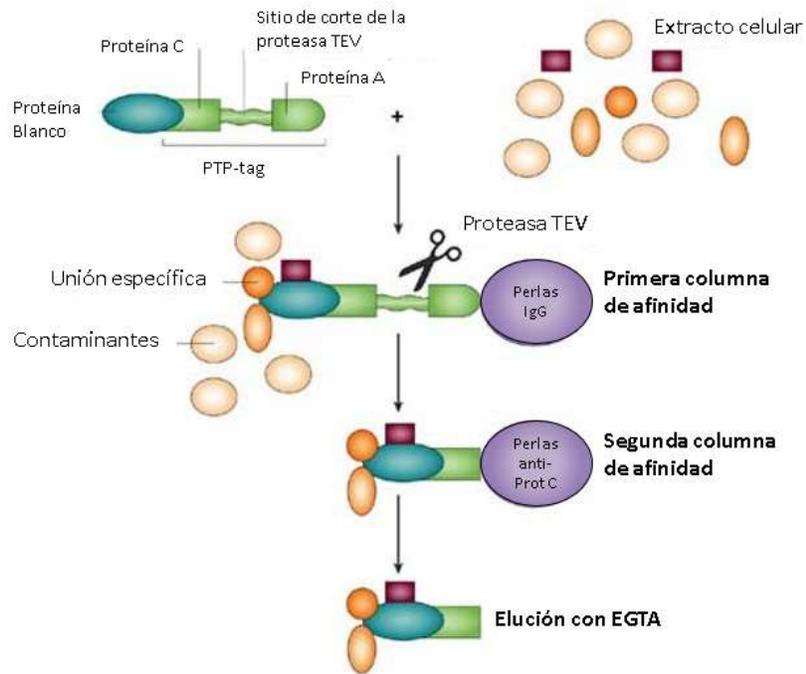


Figura 15. Esquematización de la técnica de purificación por afinidad en tándem. Modificado de Huber, 2003.

RESULTADOS

En *L. major*, el gen que codifica para la proteína “La” (LmjF.21.0540) se localiza en el cromosoma 21. El alineamiento de la secuencia de nucleótidos de este gen con sus ortólogos en *S. cerevisiae*, *S. pombe*, *H. sapiens* y *D. melanogaster* mostró muy poca conservación en la secuencia (Fig. 16). Las pocas bases conservadas entre las 5 especies están marcadas con un asterisco y un sombreado negro en la Fig. 16. Además, la comparación reveló que el tamaño del gen (sin incluir los intrones) varía considerablemente entre especies, pues va desde 828 nucleótidos en *S. cerevisiae* hasta 1650 nucleótidos en *H. sapiens*.

Sc	-----ATGTCGTGAAAAACCACAAC	19
Sp	ATGTCAACTGAAGAACAGAAAGAAATTAAGGACATCTCATCTAAGCAGGAGAATCTTCAGAGGTTCCCAAGGCCGAGGAAGCTGGAAAAGTAGTAGAAAGTCAAA--AAGATACTAC	119
Hs	-----ATCTTCTTGGAGCGCTTTAGGCTGGCCGGCG--GCGCTGGAGGT--GGAGTGTGTTGCTGTCTGTTGTG--AGCCTGTGGCCGGCTTCTGT-----G	90
Lm	-----	0
Dm	-----ATGGCCGAAGTTGCTGAAACCCCGAGTGTGGAAGCCAG--GAAGAGGTAGCACAGCCCGCAGG--CGCAGTGTGGAGGCCAAGA-----A	86
Sc	AAGAGGAGCAA--GAGAAACCACAATCAAGACGTAATTCATTTGCTGTGATTGAATTTACTCCAGAAGTCTTGGACAGATGTTTAAAGCAAGTTCGAACTCTAATTTCTTCAATTC	137
Sp	TAGTGAAGAAAAAGGAGGAAACTACTGAAAAGAAGGAAGATGATGGAAAAAAGATTTATCTTTTGTAGAGCTGAAGTTTAAAGCAAGTTCGAACTCTAATTTCTTCAATTC	239
Hs	GGCCGGAACCTTAAAGAT----AGCCGCAATGGCTGAAATGGTATAATGAAAGATGGCTGCCCTGGAGGCCAAAATCTGTCAATCAATTCGATTAATTTGGGCACTTCAATTT	204
Lm	-----ATGTCCAATCTCCCGATAAGATCCGCCGACAGGTTCGAACTCTAATTTCAAGGACGTGACCT	62
Dm	CGCGCAGCCAAAGAGGA-----CCCGGCTCCCGCAGCAGAGGAAGCCGCTGGCGGCTTCAACAACAGGAGCCGCATAATCCGGCAGGTTCGAACTCTAATTTCAAGGACGTGACCT	200
* * * * *		
Sc	TCCATATGACAGGTTCTTCGCGACAACAGCGGAAAA---AAACGATGGATGGGTCCCATCAGCACCATCGCCCATTCACACCTATGAGAAATATAGAC-----	235
Sp	ACCCCATGATAAATTTTATGACTACTTCTCAAAA---AAATGATGGATGGGTCCCATTCACAAATGCTAATTCACACCTATGCGTCGTTTTAGC-----	337
Hs	GCCACGGGACAACTTCTTAAAGGAACAGATAAACT---GGATGAGGCTGGGTACCTTTGGAGATAAATGATAAATTCACACCTTGAACCCGCTAACACAGACTTTAATGTAATGTT	321
Lm	CGCCAAGGATGCTTCTCAAGTCAAAGATGGCCGAGGACCCGAGGCTTCAATTCGCGTGGAGGTGCTCACTCCCTCAACCTTCGACACGCTCACGAGGACCCGAAGGTGCTGCG	182
Dm	GAATCGGACAAAGTTCTTCGCGCAGCAGATCGGAAGAACGAGGAGGCTGGGTCCCGTTCGTTCCCTCAAGGATTCGCTCCCTGTCACCGACTTATCTGAGATCGT	320
* * * * *		
Sc	-----	235
Sp	-----	337
Hs	GGAAGCATTGAGCAAAATCCAAGGCAGAACTCATGAAATCAGTGAAGATAAACTAAAATCAGAAGTCTCCAAGCAAACCCCTACCTGAAGTACTGATGAGTATAAAAAATGATGTAAA	441
Lm	CGAGGCGCTCGCCAGCAGCACAACCTCGTCATGAAC----AAGGACGGCTGTCCGTGCGCCCAAGGACGCCCTGCCGAGTCCATCCAAACCGATGAGCAGACGGTGTACGTGAA	296
Dm	GGCTGCCCTGAACAAATCCGAGGAGGGCCTCGTGAGATTAGCGAAGACAACCTTAGCCTGCGTCCCATCCGGAGCGTCTATTCCAGAGCACAAAGAGCGGCCGAAGGAGATCCA	440
Sc	-----	235
Sp	-----	337
Hs	AAACAGATCTGTTTTATATAAAGGTTCCCAACTGATGCAACTCTTATGACATAAAAGAAATGGTTAGAAGATAAAGGTCAAGTAC-----TAAATATTCAGATGAGAA-----	545
Lm	GCCGTTGCCGCGCACGGCCTCGCT--GGAGCAGCTGCAGGAATCTTTAGCCTCACGGCACTGTTCTGGCGGTGGCGCCGCTACTTCCAGGTTGGCAGCA-----AGGACGCACCGG	409
Dm	GGAGCGGACCCGATACGCCAAGGG--CTTCCCCTA-----GATTCCGAGATTAGCGAACTGTCTGACTTTG--CTGCCAATCAGCAAAAGTGGTCAACCTGACCATGCGCAAGCACT	550
Sc	-----	235
Sp	-----	337
Hs	-----GAACATTGCATAAAGCATTTAAGGGATCAATTTTTGTGTTGTTTATAGCATTGAATCTGCTAAGAAATTTGTAGAGACCCCTGGCCAGAAGTACAAGAAACAGACCTGC	656
Lm	TGGAGAGCGCCAGCCGCTCC-----GTGTTCTGGTCTTTGCCAGCAAGGAGGATCCGAGAGGTTTGTGCGCGCCGCG--CTTCCAGGTTGGCAGCA-----AGGACGCACCGG	511
Dm	ATGACAAGCCCAAGTCTGACAAGTTCAAGGGCAGCATCTCCTTACTTTTCGAGACCAAGGACCAAGGCAAGGCCCTTCTCGAACAGGAGAAGATCGTTTTATAAGGAGCGCGAGCTGC	670
Sc	-----	235
Sp	-----	337
Hs	TAATACTTTTCAAGGACGATTACTTTGCCAAAAAATGAAGAAAGAAAACAAAATAAAGTGAAGCTAAAATTAAGAGCTAAACAGGAGCAAGAGCAAAAACAAAAGTTAGAAGAAGATG	716
Lm	GCCGCGAGATGAGACGACGTACTTGGAGGGGAGCGGTGCAG-----ATGGCTCCCAAGAAACCCGAAAGCTGTGCGCGAGGACGGTGTAG--GACGGGG	607
Dm	TGCTAAATGGCAGGTGGACTACTTAAAGGAAGAGCAGGAGGAA-----TAGCCCAAGAAACGAGAGGCCAAGAAACA-----AAAAGGAG--GCCAAGC	760
Sc	-----	235
Sp	-----	337
Hs	CTGAAATGAAATCTCTAGAAGAAAAGATTGGATGCTTGTGAAATTTTCGGGTGATTTAG--ATGATCAGACCTGTAGAGAAGATTTACACATACTTTTCTCAAA---CATGGTGAATA	892
Lm	GTGCGCGTCTGT---CCGCGGCC---CCCGCACGCCGCTATG-----CCCAACAACAGTAGTACCGCATCTCCGGATGGCGCGGATCGAGAAATTTCTCCGAGGT	704
Dm	CTGAGCTGCGT---TCGAGTCTG---CCAAGAAGCCATTTGTTGTTTCGAGGGCCCTCCGGAGACATCTAGCCGAGGAAATTCG-----GAAGCCTTCGAGAAGATCAAGGACT	869
Sc	-----	265
Sp	-----CAGTGC-----ATAAGTTATCGAAGCACTACGTA--	369
Hs	AAATGATAGACTTCTGTCAGAGGACAAAAG---AGGGATAAATCTATTTAAAGAAAAGCCAAAGGACATTGGGTAAGCCAAACATGCAAAATATGGTAACTTCAATTAAGGAAC	1009
Lm	AAAGGGGCTGTGCCCGGGAGGAGCAGAGAGGCGTGCCTACGTGTACATGCCAAC---AA-----GGAGAGGCTCTCATCTCTTCAGGACGCCGAGACAGC	803
Dm	CGAG-----GTGGCTACATAGTTCGCCAAG-----GGCGAA-----ACCAAGGCTCTGTGC--GGTACGAGGCGGATGCGGC	941
Sc	-----	324
Sp	-----CAGTGC-----ATAAGTTATCGAAGCACTACGTA--GTTCTCAAAATTTGGAAGTATCTCTGATGGAGAAAGCTCAAGAGACGTGTTCTTTG	429
Hs	-----AAGCCATTTGTAATGCTCTTCGCAAGAGTCTTCAACTCTTGAAGTCTGATCAAGTGGCGAAAATCTACGCTGTATGATCTCTTA	1063
Lm	-----AA-----GGAGAGGCTCTCATCTCTTCAGGACGCCGAGCAGCCGAGATGCTGAGTCCGTCAGACCCGTCGGCGGCTTCGAGGCA---GCAGC	860
Dm	-----GGCGAA-----ACCAAGGCTCTGTGC--GGTACGAGGCGGATGCGGC	1001
Sc	-----	384
Sp	-----GTTCTCAAAATTTGGAAGTATCTCTGATGGAGAAAGCTCAAGAGACGTGTTCTTTGGACATACTGCTGCCAGAAATGCCAGAATGAGCAAAACCAAGGCTTTGGCTGTAATG	477

```

Hs AAAGAACTGACTGGGAAGTACTCAAGG-----AGACCTGGAAAAAGAACACTGAAGAAAATAATAGAAGACCAACAAGATCCCTAA-----ACAAATGGAACTCAAAAGGTCGTA 1118
Lm CGAGAAATGTCGAGTCCGTCAACACCCCGTGCGGCGACCTGCAGGGCAA--GCAGCCCGAGGTGACGAAGCTCAGTGAGGAAGATGAG-----AAGACGCTCATAGCGAAGCTAGAG 915
Dm CGAAAATGACTATGCGCAAGGTGGAAGGCAAGCTCACTTCAAGATGAGGTTCTCTCTGCTGCGAAAGGCCACCGAGGAGGAGGAG-----AAGGAGTTCATGCAAGGCCATA 1056

Sc AATTTCCACATGAG-----GACGTTGAAGCT-----TCCC-----A-----AATTCCTGAATTGCAGGAGAACTTGAAGCCTTTTTTC---AA 455
Sp GGTTCGGTGATGAA-----AAAGATGACAC-----TCAAATTCGCTTGGAAAAATCTTTGAAGA 533
Hs GATTAAAGGAAAGGAAAGGTAATAAAGCT-GCCAGCCTGGGTCTGGTAAAGGAAAAGTACAGTTTCAGGGCAAGAAAACGAAATTTGCTAGTGATGATCAACATGAT-GAACATGA 1236
Lm AAGGAGATCTCCAGCGTCCGGCGCAGCACGGCAGCCGCGTGGACGTGGCGGTGCGCG-----TGGCCGCGTCCCGCGGT-GGCCGCGC 1001
Dm GAATTCATGAAGPAGCGACGCGATTTCACCAGGAACAAGGGCAAGCGCTTCAATCGCAA-----GGCCACGGGC*GAACGAC-CACAAACA 1142

Sc AAAATTAAGTGAATCAACCAAGTGCCTTTGAGAAGAGATCACAGAAAACAAGAAATTTAATGGTACGGTCTTGGTGGAAATTAAGACAATTCAGAAATGTGAAGCTT-TTTGAAATCGT 574
Sp AAATGCTGGTCCCATTAGTGTGTCCGTATGAGAAGGATGACG--ATAAAAAATTAAGGGAAGCGTATTTGTTGAATCAAGGAACCCGATGTTGCTAATAAATTTCTTGAGAAAGT 650
Hs TGAAATGGTGCACCTGGACCTGTGAAAGAGCAAGAGAAGAACAGACAAAGAAAGAACCTGCATCCAAACAACAGAAAACAGAAAATGGTGTGGAGACCAGTAGTTTAGTAAACCAAT 1356
Lm TGGCGGTGGTCACTACTAA-----TGGCGCGGTCCCGCGGT-----TGGCGCGGTCCCGCGGT-----TGGCGCGGT----- 1020
Dm TGGCGGTGGTAAAGAGCGCGTGGGGATTAA-----TGGCGCGGT-----TGGCGCGGT-----TGGCGCGGT----- 1173

Sc ATTCCAATGACG-----ATGAGTCCAACGAAATTTGTATATGAAGGTAAGAAACTGAGTGTTTGACGAAAAACAGTTTGATTTACAGAGAGAGGCCCTC-----GAAGTCCAA 680
Sp -----CAAACCTGCACCTTTGAAATGGGGCGAGGACGAGCTCACTATAATGAGCAAAAAGGAGTATGTTGACATGAAAGCTGAATTACATAAAAACGATCCACC 749
Hs TTTTATTCATTTTAAATAGGTTTTAAACGACTTTTGTTCG-----GGGTTTTAAAGGAAAACCGAATTAGTCCACTTCAATGTCCACCTGTG---AGAAAGGAAA 1460
Lm -----TGGCGGT-----TGGCGGT-----TGGCGGT-----TGGCGGT-----TGGCGGT----- 1020
Dm -----TGGCGGT-----TGGCGGT-----TGGCGGT-----TGGCGGT-----TGGCGGT----- 1173

Sc AAACCTCAGCGGTAGATCAAGATCCTTTAAGCGCCATAAGAAGAAAACCTTG-CC-----TAAATCCCAA-----AAATAAGAAGAAAACCGCAAGGAAGAGT 775
Sp AAAGTTTAGCAGCAAAACGACAGCTTTTGAAGCTTTTAAAGAGATGGATCGT-CA---CGCTCCTGGTAAATATAGTAACAGAGGAAGAAAATTAAGAAGCAAAGGTCATCTAAGCCTT 865
Hs ATTTTTTGTGTTTAACTTGTCTTTTGTGTTATG-CAAATGAGATTTCTTTGAATGATTTGTTCTGTTTG-TGTTATTCAGATGATTCAAATATCAAAGGAAGATTCCTCCATTAAT 1578
Lm -----TGGCGGT-----TGGCGGT-----TGGCGGT-----TGGCGGT-----TGGCGGT----- 1020
Dm -----TGGCGGT-----TGGCGGT-----TGGCGGT-----TGGCGGT-----TGGCGGT----- 1173

Sc CAAAAGAGGACTCTCTGCC-----ATTGCCGATGACGATGAGGAGCACAAAGGAGTGA----- 828
Sp CTGAAGAGAGCCCTTCGGCC-----GCTTCGGAGTAA----- 897
Hs TGCCCTTGTAAATATGAGAATGTATAGTACAACTAACTAATAAAATATATACTATATGAAAAGACAAAA 1650
Lm -----TGGCGGT-----TGGCGGT-----TGGCGGT-----TGGCGGT-----TGGCGGT----- 1020
Dm -----TGGCGGT-----TGGCGGT-----TGGCGGT-----TGGCGGT-----TGGCGGT----- 1173

```

Figura 16. Alineamiento de las secuencias de nucleótidos del gen de “La” entre eucariontes: *S. cerevisiae* (NC_001136.10:363952-364779), *S. pombe* (NC_003424.3:c1383592-1382408), *H. sapiens* (NM_003142.5), *L. major* (LmjF.21.0540), y *D. melanogaster* (NM_057666.5:89-1261). Las pocas bases conservadas entre las 5 especies están marcadas con un asterisco y un sombreado negro.

El alineamiento de la secuencia de aminoácidos de “La” (Fig. 17) mostró una conservación mayor que a nivel de DNA, lo cual puede ser explicado por la degeneración del código genético. En primera instancia, el alineamiento permitió demostrar que el módulo “La” está muy conservado en la secuencia de *L. major*, mientras que en la región RRM se observó menor similitud (Fig. 17). En general, se observó que el extremo N-terminal está más preservado, como ya se había descrito anteriormente (Wolin & Cederwall, 2002; Blewett & Maraia, 2018). Hacia el extremo C-terminal la secuencia se vuelve desordenada. En esta región se identificó el motivo básico corto (SBM) en *L. major* previamente descrito en *H. sapiens*, el cual también está presente en *D. melanogaster*. Las secuencias de *S. cerevisiae* y *S. pombe* sí contienen el dominio SBM, aunque éste no se encuentra alineado con el SBM de las otras secuencias debido a que en estas dos especies la proteína “La” es más corta.

En general, la proteína “La” está poco conservada a lo largo de la escala evolutiva, como lo indican los bajos porcentajes de identidad observados entre las diferentes especies (Tabla 2). La proteína de *L. major* es más parecida a la de *S. pombe*, con un 30.8% de identidad. *S. cerevisiae* y *S. pombe* tienen las

secuencias de la proteína “La” más cortas y similares, con un 38.62% de identidad. Las proteínas de *D. melanogaster* y *S. cerevisiae* son las menos similares, con sólo un 23.48% de identidad (Tabla 2).

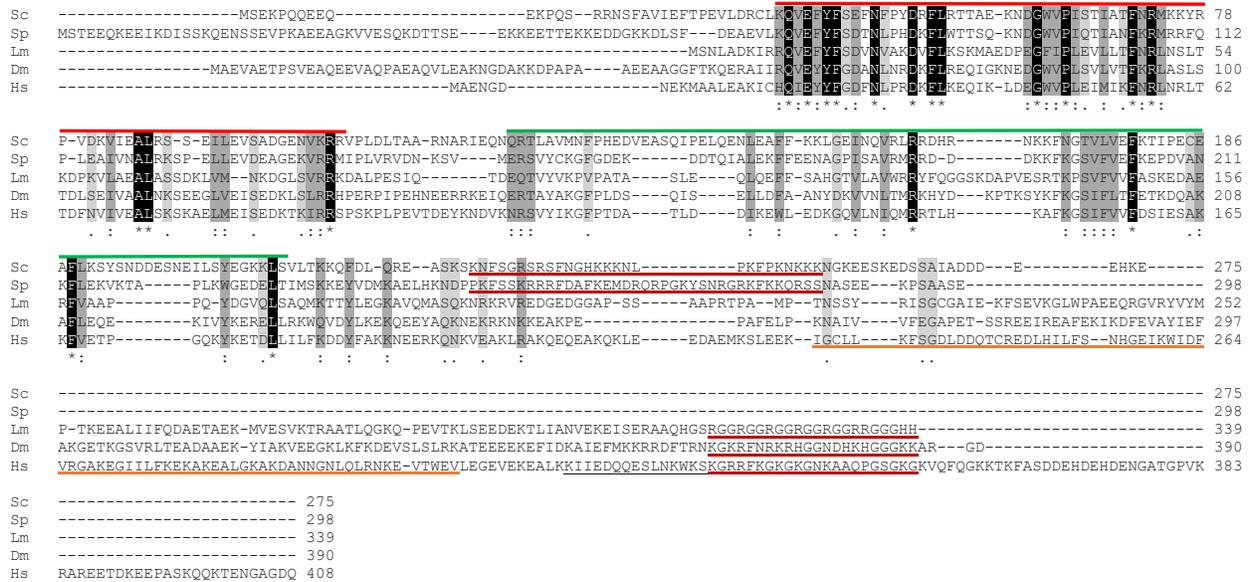


Figura 17. Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de la proteína “La” entre los eucariontes: *Saccharomyces cerevisiae* (ONH71135.1), *Schizosaccharomyces pombe* (CAB08173.1), *Homo sapiens* (AAA51885.1), *Leishmania major* (LmjF.21.0540), y *Drosophila melanogaster* (NP_477014.1). Los aminoácidos que se han conservado están sombreados en negro, en los que ocurrió una sustitución conservativa el sombreado es gris oscuro y en los cuales la sustitución fue semiconservativa el sombreado es gris claro. Los dominios de la proteína “La” están marcados con las barras de colores en la parte superior al alineamiento: dominio “La” (rojo) y dominio RRM (verde). El dominio RRM2 de humano se muestra en color naranja, y el dominio SBM se muestra subrayado en cada secuencia. En humano además se indica la secuencia de localización nuclear subrayada en negro.

Tabla 2. Matriz de porcentajes de identidad en la secuencia de aminoácidos de la proteína “La” entre diferentes especies.

	<i>S. cerevisiae</i>	<i>S. pombe</i>	<i>H. sapiens</i>	<i>L. major</i>	<i>D. melanogaster</i>
<i>S. cerevisiae</i>	100.00	38.62	25.00	24.69	23.48
<i>S. pombe</i>		100.00	25.59	30.28	31.70
<i>H. sapiens</i>			100.00	25.54	27.13
<i>L. major</i>				100.00	34.88
<i>D. melanogaster</i>					100.00

Posteriormente se comparó la secuencia del gen “La” entre *L. major* y otros tripanosomátidos (Fig. 18). Como se anticipaba, el alineamiento de nucleótidos mostró que la secuencia de *L. major* es más parecida

a la de los otros tripanosomátidos, que a la secuencia de otros eucariontes (Fig. 16). La similitud se presenta prácticamente a lo largo de todo el gen.

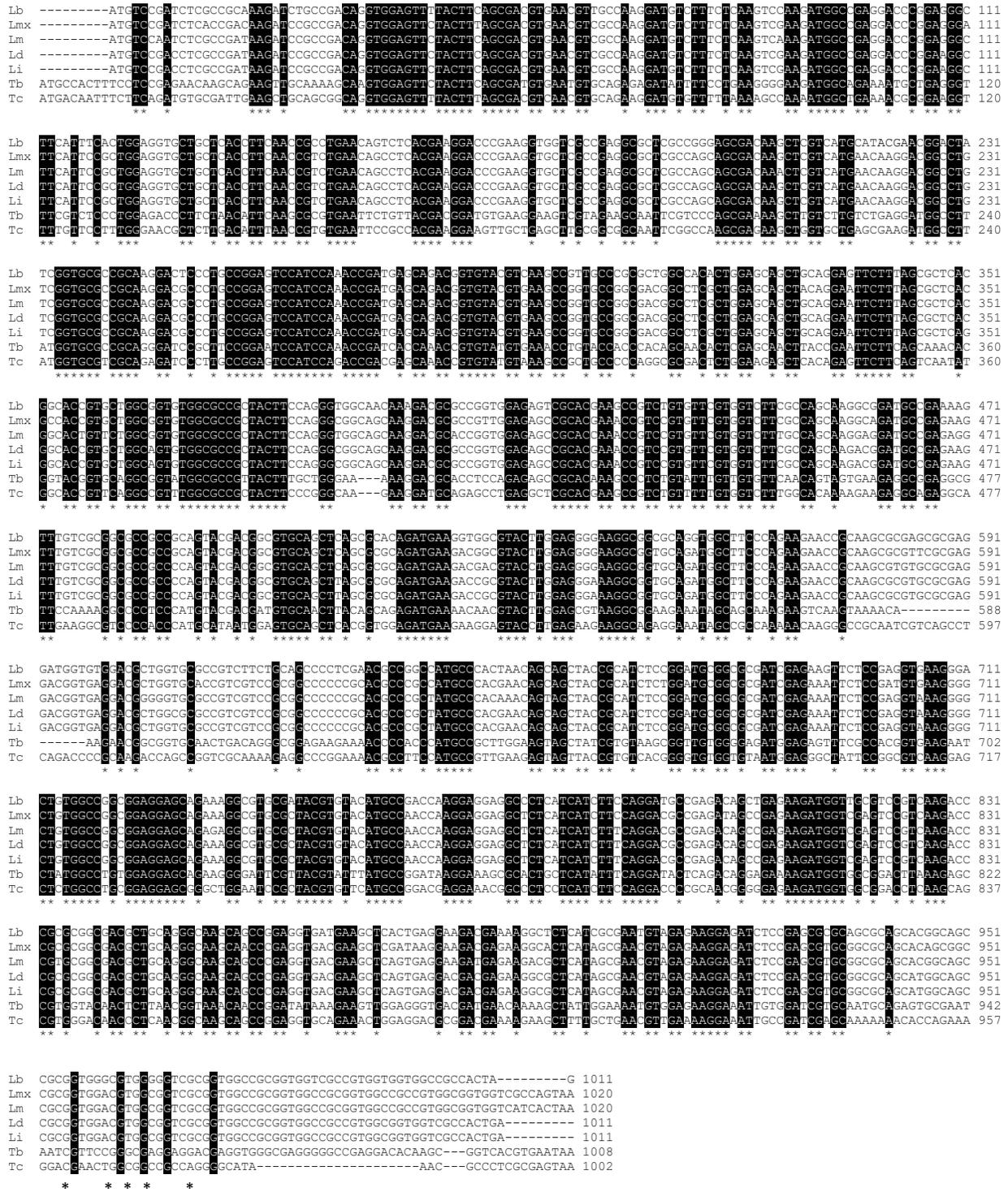


Figura 18. Alineamiento de las secuencias de nucleótidos del gen de “La” de los tripanosomátidos *L. braziliensis* (Lb, NC_009313.2:c166392-165382), *L. mexicana* (Lmx, LmxM.21.0540), *L. major* (Lm, LmjF.21.0540), *L.*

donovani (Ld, LdBPK_210600.1), *L. infantum* (Li, NC_009405.2:c170196-169186), *T. brucei* (Tb, NC_007283.1:606492-607499) y *T. cruzi* (Tc, NW_001849493.1:c36642-35641). Las bases conservadas en todas las especies se encuentran sombreadas y marcadas con un asterisco.

Como se esperaba, todas las secuencias de aminoácidos de los ortólogos de “La” en los tripanosomátidos son muy parecidas (Fig. 19). Las secuencias más similares fueron las de *L. donovani* y *L. infantum*, con una identidad del 99.7%, seguido de *L. donovani* y *L. major* con un 97.32%. Las menos parecidas fueron *T. cruzi* y *L. mexicana* con 58.36% de identidad (Tabla 3). En este caso es menos evidente la pérdida en la conservación hacia el extremo C-terminal, siendo apenas evidente en el dominio SBM, al final de las secuencias. El alineamiento reveló una región conservada después del dominio RRM, la cual podría corresponder al segundo dominio RRM (RRM2) presente en humanos.

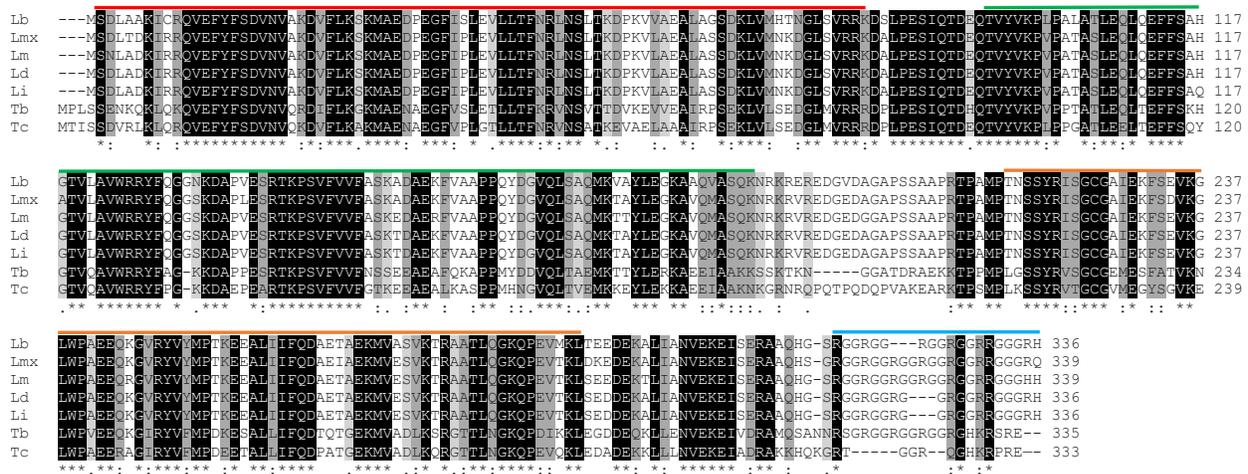


Figura 19. Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de la proteína “La” entre distintas especies de tripanosomátidos. Se comparan las secuencias de *L. braziliensis* (Lb, LbrM.21.0600:mRNA), *L. mexicana* (Lmx, LmxM.21.0540), *L. major* (Lm, LmjF.21.0540:mRNA), *L. donovani* (Ld, LdBPK_210600.1.1), *L. infantum* (Li, XP_001465365.1), *T. brucei* (Tb, XP_822491.1), y *T. cruzi* (Tc, XP_819416.1). Los aminoácidos conservados están sombreados en negro, en los que ocurrió una sustitución conservativa el sombreado es gris oscuro y en los cuales la sustitución fue semiconservativa el sombreado es gris claro. Los dominios están marcados con las barras de colores en la parte superior al alineamiento: dominio “La” (rojo), dominio RRM (verde), dominio RRM2 extrapolado de humano a *L. major* (naranja), dominio SBM (azul).

Tabla 3. Matriz de porcentajes de identidad en la secuencia de aminoácidos de la proteína “La” entre los tripanosomátidos.

	<i>L. braziliensis</i>	<i>L. mexicana</i>	<i>L. major</i>	<i>L. donovani</i>	<i>L. infantum</i>	<i>T. brucei</i>	<i>T. cruzi</i>
<i>L. braziliensis</i>	100.00	91.07	91.37	93.11	92.81	62.80	58.41
<i>L. mexicana</i>		100.00	94.69	96.43	96.13	62.54	58.36
<i>L. major</i>			100.00	97.32	97.02	63.75	58.66
<i>L. donovani</i>				100.00	99.70	63.11	58.41
<i>L. infantum</i>					100.00	62.80	58.41
<i>T. brucei</i>						100.00	71.65
<i>T. cruzi</i>							100.00

Posteriormente se realizó un análisis de las estructuras secundarias predichas para la proteína “La” de *L. major* y *H. sapiens* usando el programa PSIPRED (Fig. 20). A este nivel se observa que la gran mayoría de α -hélices y β -plegadas se encuentran conservadas entre las dos secuencias. De manera interesante, el patrón característico del RRM2 de humano ($\beta\alpha\beta\alpha\beta\beta$) (Jacks *et al*, 2003) está altamente conservado en la secuencia de *L. major*, con excepción de la primera α hélice, lo que sugiere fuertemente que este dominio sí se encuentra presente en “La” de *L. major*.

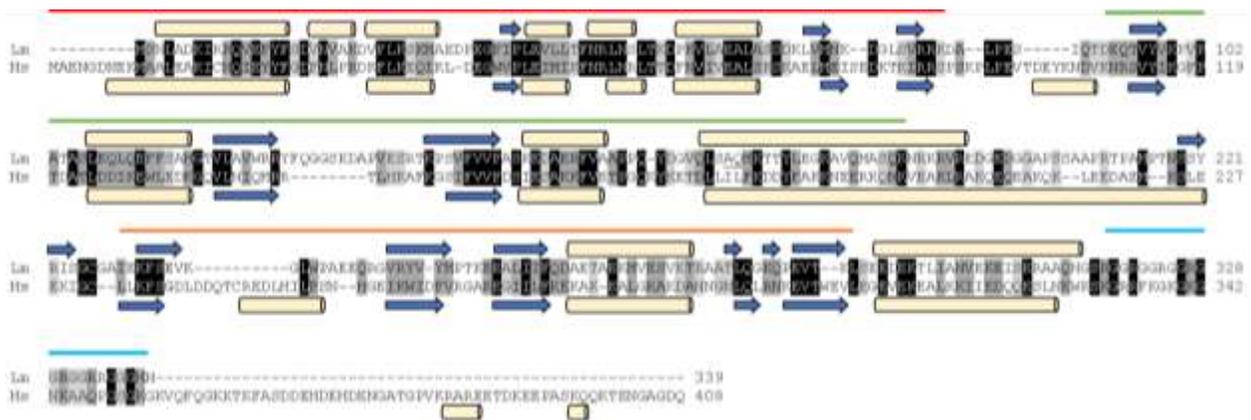


Figura 20. Modelo de la estructura secundaria predicha de la proteína “La” en *L. major* (Lm). Se compara con la estructura predicha de humano (Hs). Las α hélices se señalan con las barras amarillas y las hojas β con las flechas azules. Las barras superiores indican los dominios identificados con la misma coloración de las figuras anteriores.

Para finalizar el análisis *in silico* de “La” en *L. major*, se procedió a obtener la estructura tridimensional predicha de la proteína mediante modelado por homología. El modelo tridimensional se obtuvo comparando con el cristal de la proteína “La” de humano. Sólo fue posible obtener la estructura del módulo “La”, hasta el aminoácido 183 (Fig. 21), pues hasta el momento no se ha obtenido la estructura tridimensional de la proteína completa de humano mediante métodos experimentales. En la estructura predicha de “La” de *L. major* se observan claramente los dos dominios presentes en el extremo N-terminal de la proteína: el módulo La (en amarillo) y el dominio RRM (en naranja) (Fig. 22). En general se observó que la estructura predicha para *L. major* es muy parecida a la reportada para el ortólogo de humano (Fig. 21), observándose el plegamiento del dominio “La” en una estructura tipo “hélice alada”, y el patrón $\beta\alpha\beta\alpha\beta\alpha$ en el dominio RRM. La similitud entre las estructuras de *L. major* y humano es de 36.99%, con un valor de QMEAN de 0.62 (el cuál va de 0 a 1, siendo 1 el valor para dos estructuras idénticas). Los modelos de superficie (Figs. 22-B y 21-C) permitieron predecir cómo interactúa el módulo “La” con las secuencias UUU-OH-3’ presentes en los transcritos de Pol III.

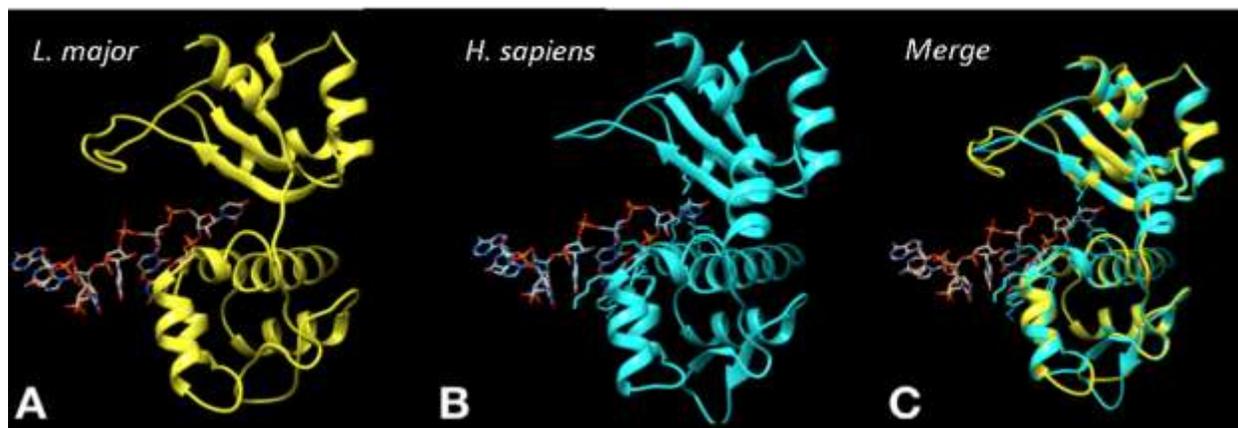


Figura 21. Estructura tridimensional predicha para la proteína “La” de *L. major*. Modelos de listones comparando en A el modelo de homología obtenido para “LmLa” hasta el aminoácido 183, en B el modelo de *H. sapiens* y el sobrelape o *merge* para observar la similitud en C (37.36% de acuerdo con Swiss model, QMEAN = 0.62 ± 0.06). La secuencia de RNA AUAUUU-OH-3’ se muestra representada con un modelo de varillas.

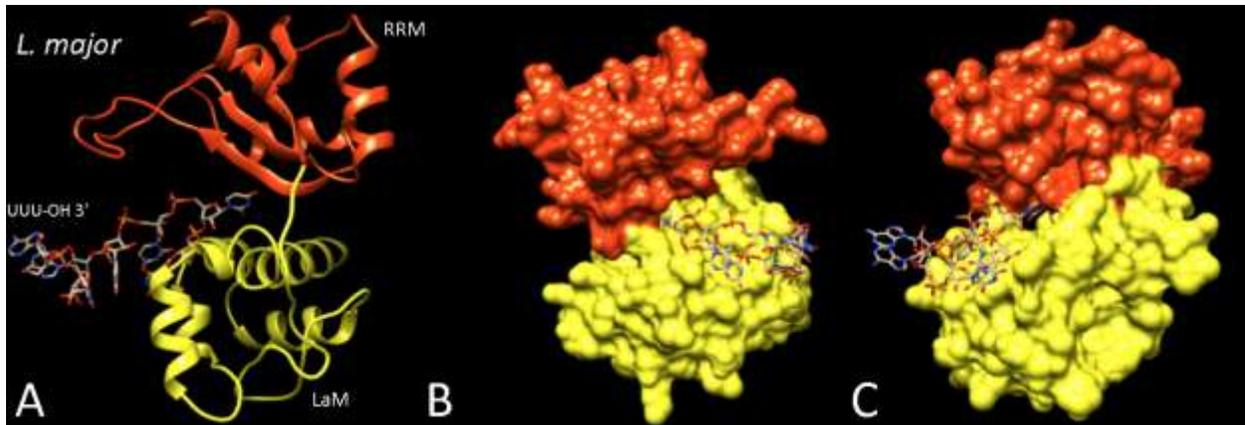


Figura 22. Predicción de la estructura 3D de la proteína “La” de *L. major* y la interacción con su sustrato. En el panel A se muestran los dominios “La” y RRM en amarillo y anaranjado, respectivamente. Los paneles B y C muestran el modelo de superficie en dos ángulos distintos con el objetivo de observar la interacción de “La” con su sustrato. El sustrato observado en todos los modelos es una secuencia de RNA AUAUUU-OH-3’ representada con un modelo de varillas.

Adicionalmente, se analizaron las secuencias de los dos dominios de la proteína “La” de manera independiente, pues de esta forma el programa generó modelos comparando con los cristales de la proteína “La” de *T. brucei*, en vez de *H. sapiens*, obteniendo estructuras tridimensionales más precisas. En el caso del motivo La (Fig. 23, estructura inferior), se obtuvo un porcentaje de identidad del 75% y un valor QMEAN de 0.8. Por su parte, con el dominio RRM (Fig. 23, estructura superior) se observó un porcentaje de identidad del 60% y un valor QMEAN de 0.86. De manera interesante, al analizar la secuencia del probable dominio RRM2 de *L. major*, el programa generó un modelo que se basó justamente en un cristal del dominio RRM2 de *H. sapiens* (Fig. 24). Aunque el valor de QMEAN no fue muy alto (0.47), este resultado demuestra la presencia del dominio RRM2 en la proteína “La” de *L. major* (Fig. 24).

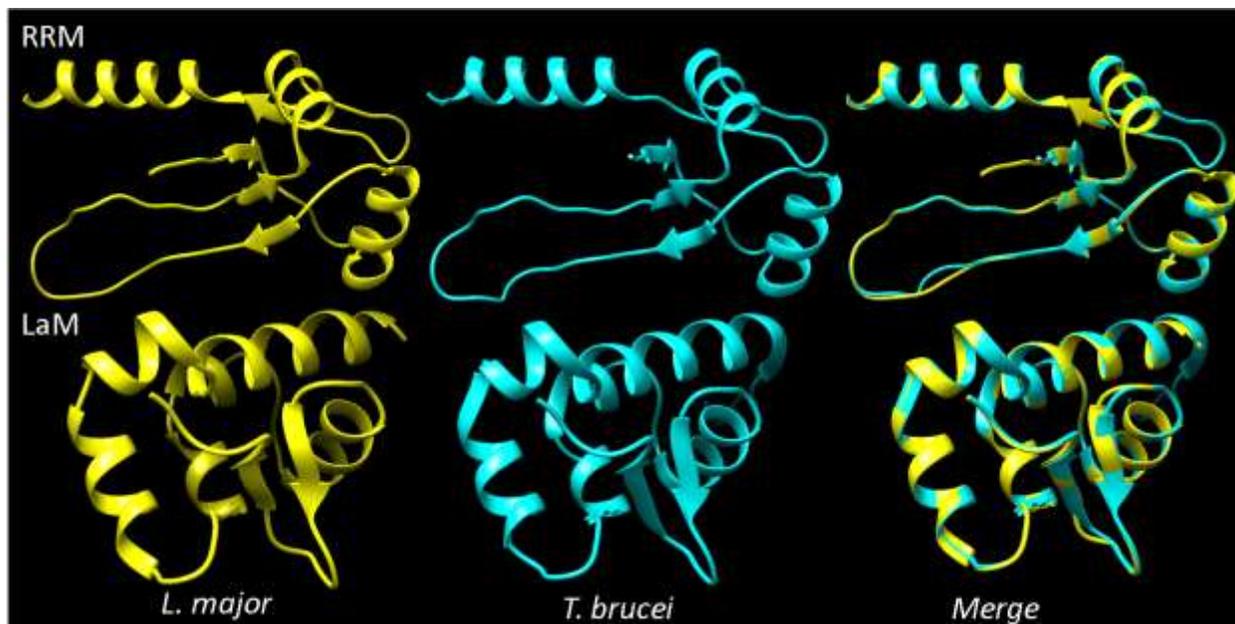


Figura 23. Estructura tridimensional del dominio RRM y del módulo La de *L. major*. Modelos generados mediante la introducción de las secuencias de los dominios de manera independiente, usando como templado las estructuras de *T. brucei*. Se puede observar mediante el porcentaje de similitud (LaM 75%, RRM 60%,) y el valor de QMEAN (LaM 0.8 ± 0.09 , RRM 0.86 ± 0.09) que se obtienen modelos tridimensionales más precisos que introduciendo la secuencia completa.

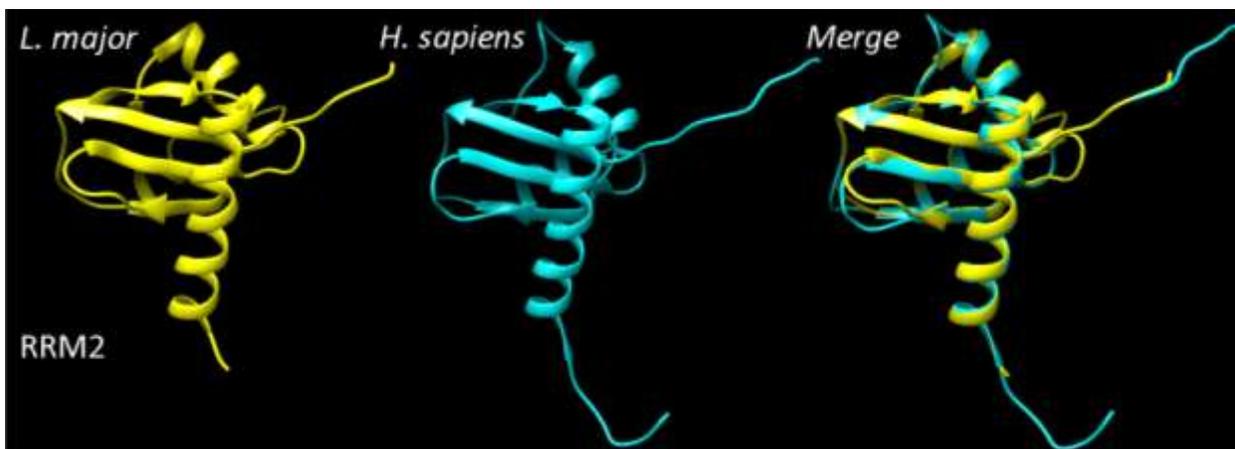


Figura 24. Estructura tridimensional del dominio RRM2 de *L. major*. Modelo del segundo dominio RRM generado al introducir la secuencia de *L. major* alineada con el RRM2 de humano. El modelo tuvo un 15.63% de similitud y un valor de QMEAN de 0.47 ± 0.08 .

En nuestro laboratorio se obtuvo anteriormente una línea celular de *L. major* que expresa a la proteína recombinante La-PTP (Flores-Pérez, 2011). Dicha línea celular fue analizada mediante Western blot para confirmar la correcta expresión de la proteína La-PTP. En este ensayo se usó un anticuerpo que reconoce el dominio de Prot C presente en la bandera PTP, observándose una banda del tamaño

esperado de 58 kDa (38 kDa de “La” + 20 kDa de la bandera PTP) (Fig. 25). Además, se apreciaron algunas bandas más tenues que podrían corresponder a degradación de la proteína La-PTP. Como control positivo se analizaron células que expresan a la proteína Maf1-PTP, en donde se observó la banda esperada de aproximadamente 50 kDa (así como una banda de degradación de 40 kDa). Como se anticipaba, no se observó señal con células silvestres. El control de carga con anti- α/β tubulina nos indicó que se analizó prácticamente la misma cantidad de proteína en los tres carriles (Fig. 25). De esta manera se demostró que la línea celular Lm-LaPTP está expresando a la proteína “La-PTP”, por lo que se pudo continuar con los siguientes experimentos.

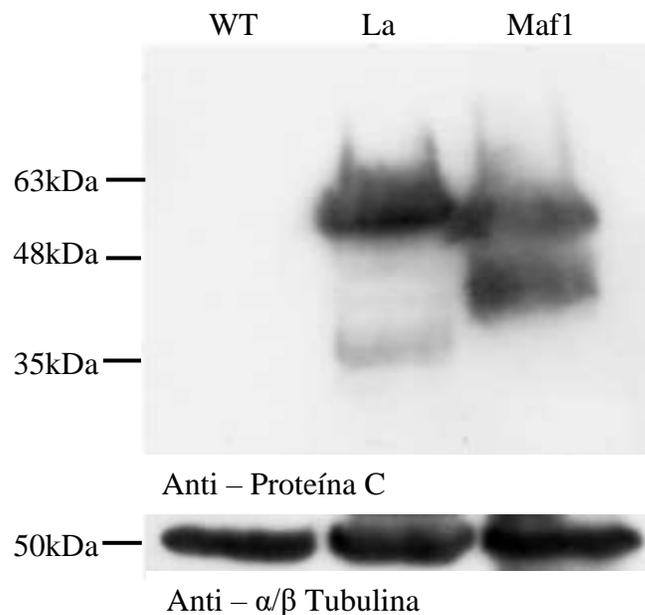


Figura 25. Western Blot de la línea celular La-PTP. Se usó el anticuerpo anti Prot C. Como controles se analizaron células WT y Maf1-PTP. En La-PTP se observa una banda principal de cerca de 58 kDa, así como una banda de degradación de 35 kDa. En Maf1-PTP de igual manera se observa la banda esperada de Maf1 de cerca de 50 kDa, así como una banda de degradación de cerca de 40 kDa. Como control de carga, se usó un anticuerpo anti- α/β tubulina, que se visualiza en las bandas de 50 kDa.

Para determinar la localización subcelular de la proteína “La”, se llevaron a cabo ensayos de inmunofluorescencia indirecta con la línea celular La-PTP. Las imágenes de microscopía de fluorescencia obtenidas demostraron que la proteína recombinante La-PTP (en verde) tiene una localización principalmente nuclear (especialmente en la periferia del núcleo), pues se sobrelapa con gran parte del área teñida con DAPI que corresponde al núcleo. Además, parte de la señal de La-PTP parece sobrelapar (en amarillo) con la señal de la proteína nucleolar 56 (Nop56) (en rojo), lo que

indicaría que también se localiza en regiones del nucleolo (Fig. 26). Se observó una ligera localización citoplásmica similar a lo que se había observado en *T. brucei* (Shan *et al*, 2019).

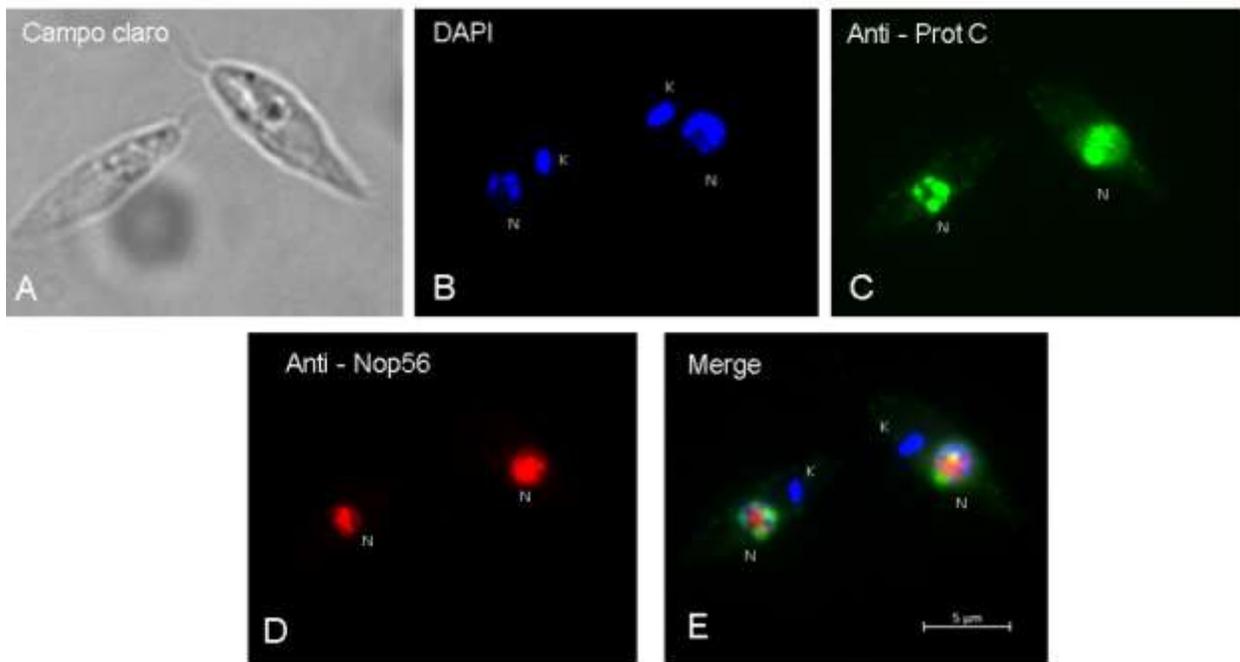


Figura 26. Localización subcelular de la proteína “La” en *L. major*. Se llevó a cabo Inmunofluorescencia indirecta de la línea La-PTP con un anticuerpo anti-Prot C (panel C, en verde). En A se muestran 2 células en campo claro. En B las mismas células con el DNA teñido con DAPI, donde se visualiza el núcleo (N) y el cinetoplasto (K). En D se tiñó el nucleolo con un anticuerpo contra Nop56. En E se muestra el sobrelape (merge) de los paneles B, C y D.

Con el objetivo de identificar las proteínas con las que se asocia “La” en *L. major* para realizar sus funciones, se llevó a cabo un ensayo de purificación por afinidad en tándem con la línea celular La-PTP. Para el experimento se crecieron 2.5 L de cultivo de células transfectantes en fase media logarítmica ($20\text{-}25 \times 10^6$ células/mL). Después, el extracto proteico crudo obtenido de los cultivos lisados con Tritón X-100 se transfirió a una columna cromatográfica que contenía una matriz de Sefarosa-IgG y se incubaron por 4 horas a 4 °C. Posteriormente, se liberaron de la matriz mediante la incubación con la proteasa TEV durante toda la noche a 4 °C. El eluido obtenido se transfirió a una nueva columna cromatográfica con una matriz de afinidad de Prot C. Finalmente, los complejos proteicos se liberaron de las columnas mediante el uso de agentes quelantes. Los eluidos finales de la purificación fueron concentrados, y una fracción ($\sim 1/4$ parte del total) fue analizada por SDS-PAGE (Fig. 27). En el gel se observaron alrededor de 11 bandas cuyos pesos moleculares están en un rango de 15 a 110 kDa. Entre éstas está una banda de ~ 41 kDa que parece corresponder a La-PTP, considerando que “La” tiene un

tamaño predicho de 37.9 kDa, más 3.5 kDa adicionales otorgados por el dominio de la proteína C del epítipo de extracción. Este resultado nos indicó que la purificación fue exitosa por lo que la muestra restante fue acondicionada para analizarla por espectrometría de masas.

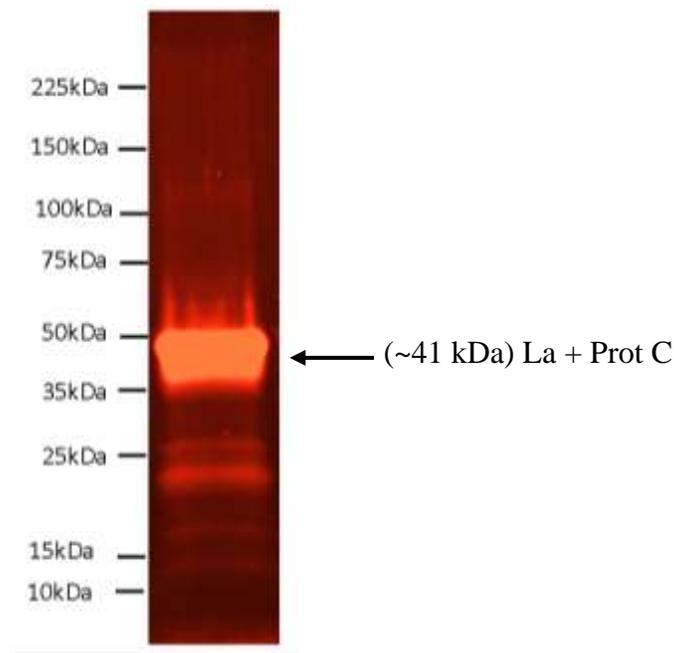


Figura 27. Análisis de las proteínas que co-purificaron con la proteína recombinante La-PTP. SDS-PAGE en un gel de gradiente teñido con SYPRO Ruby y usando el marcador de peso molecular Broad Range Protein (Promega). Por el tamaño (~41 kDa) y abundancia de la proteína “La”, se puede suponer que ésta es la que más sobresale y se indica con una flecha.

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, y se tiñó con GelCode Blue Stain Reagent. De la banda observada se cortó un fragmento de poliacrilamida que contenían todas las proteínas de la muestra, la cual fue enviada a analizar a la Unidad de Proteómica de la Universidad de Siracusa, en Nueva York, Estados Unidos. Los péptidos obtenidos se identificaron comparando su secuencia con la base de datos del genoma de *L. major*, TriTrypDB.

El análisis por espectrometría de masas permitió la identificación de varias proteínas, que fueron clasificadas en las siguientes categorías: proteínas de unión a RNA, proteínas nucleolares, proteínas de choque térmico, proteínas ribosomales, y otras funciones (Tabla 4). La mayoría de las proteínas co-purificadas pertenecen a las categorías de “proteínas de unión a RNA” y “proteínas ribosomales”. Como se esperaba, la proteína “La” fue la de mayor número de péptidos identificados, seguida de la proteína

de choque térmico HSP70 y una proteína anotada como *Nuclear RNA binding domain*. En otras especies, ya se ha reportado que algunas de estas proteínas se asocian con la proteína “La” (ver Discusión). El experimento debe ser repetido al menos una vez más para confirmar los resultados.

Tabla 4. Lista de proteínas identificadas que co-purificaron con LmLa-PTP

Nombre oficial	Función	Peso molecular (kDa)	# Péptidos
Proteínas de unión a RNA			
LmjF.21.0540	Proteína “La”	37.2	120
LmjF.32.0750	Nuclear RNA binding domain (P34/P37)	25.2	16
LmjF.20.1710	(Uracil-5-)-metiltransferasa, putative	65	12
LmjF.11.0470	Pumillio protein 10, putative	81	4
LmjF.29.2540	NOL1/NOP2/sun RNA metiltransferasa	69.6	4
LmjF.35.4130	Polyadenylate-binding protein 2	65.3	3
LmjF.11.0530	Probable tRNA pseudouridina sintasa	87.4	3
LmjF.07.0870	Splicing factor ptrs1-like protein	41.9	2
LmjF.25.0080	Poly(A)-binding protein 3	60.9	2
LmjF.35.5090	Proteína de la RNasa P	65.4	2
Proteínas nucleolares			
LmjF.21.1760	Cbf5, pseudouridina sintasa	58.4	5
LmjF.10.0210	Nop56	52.7	3
LmjF.15.1380	Nop58	66.05	3
LmjF.22.0210	Nop168	170.6	2
Proteínas de choque térmico			
LmjF.28.2780	Heat-shock protein hsp70	71.6	17
LmjF.30.2470	Heat shock 70-related protein 1	71.8	6
Proteínas ribosomales			
LmjF.35.0410	40S ribosomal protein S3A	30	9
LmjF.36.3760	60S ribosomal protein L10a	25.4	8
LmjF.27.1390	60S acidic ribosomal protein P0	34.8	8
LmjF.36.5010	40S ribosomal protein SA	27	8
LmjF.07.0500	60S ribosomal protein L7a	29.7	7
LmjF.32.3130	Ribosomal protein L3	47.5	7
LmjF.35.0600	60S ribosomal protein L18a	20.8	6
LmjF.35.2010	40S ribosomal protein S6	28.3	6
LmjF.33.0720	60S ribosomal protein L6	21	6
LmjF.13.0570	40S ribosomal protein S12	15	5
LmjF.35.1670	60S ribosomal protein L26	16.2	5
LmjF.35.1900	60S ribosomal protein L5	34	4
LmjF.19.0060	40S ribosomal protein S2	28	4
LmjF.22.0030	60S ribosomal protein L11	21.6	1
Otras funciones			
LmjF.30.1120	Importina alfa	58.1	9
LmjF.28.1200	Luminal binding protein 1 (BiP)	51	9
LmjF.01.0780	Eukaryotic initiation factor 4A-1	45.3	3

DISCUSIÓN

En el presente trabajo se inició el estudio de “La” en el protozoo parásito *L. major*. En primera instancia se llevó a cabo un análisis *in silico* de la secuencia de nucleótidos y de aminoácidos de “La”. El alineamiento del gen de “La” de *L. major* con el ortólogo de otros eucariontes (Fig. 16) reveló que hay muy poca conservación en las secuencias, lo cual no es una sorpresa debido a la gran divergencia evolutiva que tienen estos organismos entre sí, y a la degeneración del código genético. En cambio, y como era de esperarse, al comparar la secuencia del gen de “La” entre diferentes miembros de la familia Trypanosomatidae se observó cierta conservación a lo largo de toda la secuencia (Fig. 18).

La comparación de las secuencias de aminoácidos mostró que la proteína “La” está poco conservada a lo largo de la escala evolutiva, pues se observaron porcentajes de identidad relativamente bajos entre las especies analizadas (Tabla 2). Por ejemplo, los ortólogos de *S. cerevisiae* y *S. pombe* tienen 38.62% de identidad, mientras que entre *D. melanogaster* y *S. cerevisiae* hay 23.48% de identidad. La proteína “La” de *L. major* mostró mayor similitud con el ortólogo de *S. pombe* (30.8% de identidad). En el alineamiento entre tripanosomátidos la conservación es mucho mayor debido a su cercanía filogenética (Fig. 19). Por ejemplo, entre *L. donovani* y *L. major* hay 97.32% de identidad (Tabla 3).

A pesar de la baja conservación en la secuencia proteica de “La” entre eucariontes, los alineamientos revelaron que la proteína “La” de *L. major* presenta los dominios característicos de esta proteína: el dominio “La”, la región RRM y la región SBM. Además, como se discutirá más adelante, la secuencia de *L. major* parece contener también el segundo dominio RRM. La mayor parte de los aminoácidos idénticos y conservados entre las diferentes especies de eucariontes se encontraron en la región N-terminal, correspondiente al módulo “La”, tal como ya se había reportado en otros estudios (Wolin & Cederwall, 2002). Debido a la poca conservación del extremo C-terminal, en este alineamiento particularmente no fue posible determinar si el dominio RRM2 está también presente en *L. major*. Asimismo, no fue posible identificar una secuencia de localización nuclear en *L. major*, pues éstas muestran poca conservación y son difíciles de identificar en los tripanosomátidos (Romaniuk *et al*, 2016). El dominio SBM de “La” de *L. major* contiene una agrupación de aminoácidos GR, GK y H, característica de esta región (Blewett & Maraia, 2018), por lo que su función podría estar conservada.

Este dominio fue identificado en todas las especies, aunque en *S. cerevisiae* y *S. pombe* se encuentra desalineado en relación con las otras secuencias, debido a que la proteína “La” es más corta en estas especies (pues carece del dominio RRM2) (Fig. 17).

La estructura secundaria predicha para la proteína “La” de *L. major* está, en general, muy conservada en comparación con la reportada en la literatura para el ortólogo de humano (Fig. 20). El número y la posición de las α -hélices y las β -plegadas predichas es prácticamente igual entre las dos especies tanto en el módulo “La” como en el dominio RRM. Resulta interesante el hecho de que el patrón característico del RRM2 de humano ($\beta\alpha\beta\beta\alpha\beta$) está muy conservado en la secuencia de *L. major*, en donde está ausente sólo la primera α hélice, lo cual indica que el dominio RRM2 sí está presente en “La” de *L. major*. En apoyo a esta observación, al obtener la estructura tridimensional predicha de este probable dominio RRM2 de *L. major*, el programa generó un modelo basado precisamente en el cristal del dominio RRM2 de humano (Fig. 24), lo que demuestra la presencia del dominio RRM2 en la proteína “La” de *L. major*. Cabe destacar también que esta secuencia está muy conservada entre los tripanosomátidos (Fig. 19).

En la estructura 3D predicha del módulo “La” y el dominio RRM de *L. major* se observa claramente la separación de estos dos dominios presentes en el extremo N-terminal de la proteína (en amarillo y en naranja, respectivamente, en la Fig. 22). Esta estructura tridimensional está muy conservada en relación con el modelo de *H. sapiens* (Fig. 21) y de *T. brucei* (Fig. 23). Una observación importante de la estructura tridimensional es que se predice que la interacción que tienen ambos dominios con el tracto UUU-OH-3' presente en los transcritos de Pol III es muy parecida a la reportada en otros organismos, donde se ha visto una actividad sinérgica de los dominios “La” y RRM (Shan *et al*, 2019). Así, es posible que la proteína “La” en *L. major* se una a las moléculas de RNA de una manera parecida a lo reportado en humano. Finalmente, la obtención de los modelos de homología de los 3 dominios de la proteína “La”, al introducir sus secuencias por separado, permitió dilucidar su estructura tridimensional completa y de forma más precisa (Figs. 23 y 24).

Mediante ensayos de Western blot confirmamos la correcta expresión de la proteína “La” recombinante en la línea celular *L. major*/La-PTP, observando la banda esperada de cerca de 58 kDa (Fig. 25). En la

placa también se observó una banda tenue de aproximadamente 35 kDa que muy probablemente corresponde a un producto de degradación. A este respecto, algunos artículos reportan que “La” en *H. sapiens* es propensa a ser degradada por proteasas en el extremo C-Terminal, perdiendo su señalización nuclear y siendo exportada al citoplasma (Berndt *et al*, 2021a; Berndt *et al*, 2021b). Una situación similar podría presentarse en *L. major*. Así, después de verificar la expresión de esta proteína recombinante se procedió a realizar los experimentos de inmunofluorescencia indirecta y de purificación por afinidad en tándem.

Los ensayos de inmunofluorescencia indirecta revelaron que en *L. major* “La” está mayoritariamente confinada al núcleo, particularmente en el nucleoplasma y en partes del nucleolo (Fig. 26). Una localización similar ha sido reportada en otras especies como *S. cerevisiae* y *H. sapiens* (Wolin & Cederwall, 2002). Cabe señalar que en células humanas, “La” puede localizarse también en el citoplasma, dependiendo del estado redox de la proteína (Berndt *et al*, 2021a). En *L. major* no se observó una evidente localización citoplásmica bajo condiciones óptimas de crecimiento; inmunofluorescencias con parásitos bajo estrés oxidativo permitirán determinar si bajo esas condiciones la proteína “La” se enriquece en el citoplasma. En general, estos resultados concuerdan con el contexto de que la función canónica de “La” es la de proteger los transcritos de Pol III de la degradación dentro del núcleo, particularmente de los tRNAs, desde su síntesis, maduración y exportación al citoplasma (Wolin & Cederwall, 2002; Blewett & Maraia, 2018). Dado que también se ha reportado la existencia de virus que infectan a tripanosomátidos (Grybchuk *et al*, 2018) y que el estado infectivo de las células también induce la exportación de “La” al citoplasma en células murinas y humanas (Petz *et al*, 2012), éste podría ser otro enfoque para la determinación de funciones no canónicas de la proteína “La” en tripanosomátidos, en estudios futuros.

El ensayo de purificación por afinidad en tándem, acoplado a espectrometría de masas, permitió la identificación de varias proteínas que interaccionan con “La” en *L. major* (Tabla 4). Considerando que la principal función de la proteína “La” es la de proteger de la degradación a los transcritos de Pol III durante su procesamiento hasta su exportación al citoplasma (Blewett & Maraia, 2018), esperábamos identificar otras proteínas de unión a los transcritos de Pol III. Y efectivamente, entre las proteínas que copurificaron con La-PTP está una (Uracil-5-)-metiltransferasa y una probable tRNA pseudouridina

sintasa, las cuales podrían metilar y generar pseudouridinas, respectivamente, en los tRNAs. También se identificó una RNA metiltransferasa de la familia NOL1/NOP2/sun, que incluye enzimas que metilan tRNAs y rRNAs (Li *et al*, 2022). En otros organismos se ha reportado que la metilación de ciertos nucleótidos y la presencia de pseudouridinas son esenciales para la estructura y función de los tRNAs y los ribosomas (Jackman & Alfonzo, 2013). Asimismo, identificamos el componente proteico de la RNAsa P, la cual es esencial para la formación del extremo 5' maduro de los tRNAs.

La proteína “La” también está involucrada en el control de la traducción de algunos mRNAs (Zhu *et al*, 2001). De manera interesante, entre las proteínas que co-purificaron con La-PTP está un factor de inicio de la traducción (eIF4A-1), el factor de splicing ptrs-1, y una proteína con dominio pumilio (relacionado con la unión a moléculas de RNA). Estos resultados sugieren que la proteína “La” de *L. major* también podría participar en la regulación de la traducción. En este contexto, también identificamos dos proteínas de unión a la cola de poli-A, PABP2 y PABP3. Se ha sugerido que “La” en humano, así como los parálogos LARP1 y LARP4, se pueden unir a la cola poli A de los mRNAs mediante el módulo La, aunque hasta ahora sólo se ha confirmado la unión de estas dos LARPs con las PABPs (Mattijssen *et al*, 2021).

Para tener una localización nuclear “La” debe ser importada al núcleo a través del complejo del poro (NPC), proceso que es mediado por un grupo de proteínas llamadas “carioferinas” que reconocen la NLS y posteriormente son reconocidas por proteínas del complejo del poro nuclear para su transporte al núcleo (Canela-Pérez *et al*, 2019). La importina alfa es una carioferina que fue detectada en nuestro experimento (Tabla 4), y que muy probablemente participe en el transporte de “La” al núcleo en *L. major*. Aunque una NLS no es evidente al analizar la secuencia de “La” en este organismo (debido a su baja conservación en los tripanosomátidos), experimentalmente ya se demostró la presencia de la NLS de “La” en *T. brucei* (Marchetti *et al*, 2000).

Resulta interesante el hecho de que fueron identificadas algunas proteínas nucleolares que participan en la maduración (metilación y pseudouridilación) del rRNA, como Cbf5, Nop56 y Nop58 (Tabla 4). La detección de proteínas nucleolares apoyarían la idea de que “La” es localizada en ciertas regiones del nucleolo, lo cual también es sugerido por las inmunofluorescencias que obtuvimos (Fig. 26). En *H.*

sapiens fue reportado que la isoforma no fosforilada de “La” (npLa) puede tener localización nucleolar, particularmente en el componente fibrillar denso, donde se procesa el rRNA. En el nucleolo, npLa se uniría a la proteína nucleolina ayudando en el plegamiento del rRNA y la biogénesis ribosomal (Intine *et al*, 2004).

Al analizar con el programa HHPred la secuencia de la proteína anotada en TriTrypDB como *Nuclear RNA Binding Domain* (LmjF.32.0750), encontramos que corresponde a una proteína ya estudiada en los tripanosomátidos llamada P34/P37, también conocida como *Kinetoplastid Specific Ribosomal Protein* (KSRP). Esta proteína es exclusiva de los tripanosomátidos, y no solo participa en la biogénesis de la subunidad 40S del ribosoma, sino que forma parte estructural del ribosoma maduro (Brito-Querido *et al*, 2017). De manera interesante, cuando analizaron mediante espectrometría de masas los complejos purificados de la subunidad ribosomal 40S en *T. cruzi*, la proteína “La” fue identificada como una de las proteínas no ribosomales co-purificadas (Brito-Querido *et al*, 2017). Además, en otros trabajos se reportó que P34/P37 interactúa con las proteínas ribosomales L5 y L11, y con el rRNA 5S para formar la RNP 5S (Jaremko *et al*, 2019; Rink & Williams, 2019; Umaer & Williams, 2015), por lo que era de esperarse que también co-purificara en nuestro experimento. También se encontró que “La” en *T. brucei* participa en la biogénesis de la RNP 5S al interactuar mediante su dominio RRM con P34/P37, L5 y SA (Shan *et al*, 2019). L5, SA y L11 fueron identificadas en nuestro ensayo, al igual que otras proteínas ribosomales como S3A, L10a y P0, que forman parte tanto de la subunidad 40S como de la 60S (Tabla 4). Considerando toda la literatura que relaciona a la proteína “La” con la biogénesis de las subunidades ribosomales, creemos que las proteínas ribosomales que identificamos sí interactúan *in vivo* con “La” en *L. major*, ya sea directa o indirectamente. Sin embargo, no descartamos la posibilidad de que algunas de ellas sean contaminantes.

Comparando con experimentos de purificación por afinidad en tándem que previamente se han llevado a cabo en nuestro laboratorio con otras proteínas (Florencio-Martínez *et al*, 2021; Nepomuceno-Mejía *et al*, 2022), el número de proteínas identificadas con La-PTP es relativamente bajo. A pesar de ello, gran parte de las proteínas co-purificadas corresponden a funciones previamente descritas para “La” en otros organismos, como procesamiento de tRNAs, regulación de la traducción y biogénesis ribosomal. Esto indica que la proteína “La” de *L. major* lleva a cabo las mismas funciones que los ortólogos en otras

especies. Cabe mencionar que no se encontraron proteínas relacionadas con la transcripción de Pol III, a pesar de que se ha sugerido que “La” tendría un papel en el reciclamiento de esta RNA polimerasa (Fairley *et al*, 2005); y considerando también que “La” fue co-purificada en experimentos de purificación por afinidad en tándem en los que se usó como blanco a la subunidad Brf1 de TFIIB en *L. major* (Florencio-Martínez *et al*, 2021). Una posible explicación a esto es que la bandera PTP esté obstaculizando la unión de “La” con estas proteínas, siendo una de las desventajas que se han reportado usando esta técnica (Günzl & Schimanski, 2009). Es necesario repetir nuestros experimentos para confirmar las interacciones encontradas y para tratar de identificar nuevas proteínas que se asocian con “La” en *L. major*.

CONCLUSIONES

- La proteína “La” en *L. major* presenta los principales dominios conservados: “La”, RRM y SBM, además de que hay evidencia de que RRM2 también está presente.
- Como se anticipaba, la secuencia de la proteína “La” de *L. major* presenta mayores porcentajes de identidad con los ortólogos de otros tripanosomátidos, que con los ortólogos de otros eucariontes. La conservación está presente principalmente en el módulo “La”.
- Las estructuras secundaria y terciaria de “La” están conservadas en general, por lo que se presume que su función también.
- La línea celular Lm/La-PTP expresa correctamente la proteína recombinante “La-PTP”.
- La proteína “La-PTP” se localizó principalmente en el núcleo. Específicamente en el nucleoplasma y partes del nucleolo.
- La proteína “La” de *L. major* interactúa, directa o indirectamente, con proteínas involucradas en el procesamiento de tRNAs, la biogénesis de los ribosomas, la traducción y la importación al núcleo.

REFERENCIAS

1. Abascal-Palacios, G., Ramsay, E. P., Beuron, F., Morris, E., & Vannini, A. (2018). Structural basis of RNA polymerase III transcription initiation. *Nature*, 553(7688), 301–306. <https://doi.org/10.1038/nature25441>
2. Arimbasseri, A. G., Rijal, K., & Maraia, R. J. (2013). Transcription termination by the eukaryotic RNA polymerase III. *Biochimica et biophysica acta*, 1829(3-4), 318–330. <https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2012.10.006>
3. Aronson N., Herwaldt B. L., Libman M., Pearson R., Lopez-Velez R., Weina P., Carvalho E., Ephros M., Jeronimo S. & Magill A. (2017). Diagnosis and Treatment of Leishmaniasis: Clinical Practice Guidelines by the Infectious Diseases Society of America (IDSA) and the American Society of Tropical Medicine and Hygiene (ASTMH). *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 96(1), 24–45. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.16-84256>
4. Bayfield, M. A., Yang, R., & Maraia, R. J. (2010). Conserved and divergent features of the structure and function of La and La-related proteins (LARPs). *Biochimica et biophysica acta*, 1799(5-6), 365–378. <https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2010.01.011>
5. Berndt, N., Bippes, C. C., Michalk, I., Bachmann, D., Bachmann, J., Puentes-Cala, E., Bartsch, T., Loureiro, L. R., Kegler, A., Bergmann, R., Gross, J. K., Gross, T., Kurien, B. T., Scofield, R. H., Farris, A. D., James, J. A., Schmitz, M., Fahmy, K., Feldmann, A., Arndt, C., Bachmann, M. P. (2021)b. Two Be or Not Two Be: The Nuclear Autoantigen La/SS-B Is Able to Form Dimers and Oligomers in a Redox Dependent Manner. *International journal of molecular sciences*, 22(7), 3377. <https://doi.org/10.3390/ijms22073377>
6. Berndt, N., Bippes, C. C., Michalk, I., Bartsch, T., Arndt, C., Puentes-Cala, E., Soto, J. A., Loureiro, L. R., Kegler, A., Bachmann, D., Gross, J. K., Gross, T., Kurien, B. T., Scofield, R. H., Farris, A. D., James, J. A., Bergmann, R., Schmitz, M., Feldmann, A., & Bachmann, M. P. (2021a). And Yet It Moves: Oxidation of the Nuclear Autoantigen La/SS-B Is the Driving Force for Nucleo-Cytoplasmic Shuttling. *International journal of molecular sciences*, 22(18), 9699. <https://doi.org/10.3390/ijms22189699>
7. Blewett, N. H., & Maraia, R. J. (2018). La involvement in tRNA and other RNA processing events including differences among yeast and other eukaryotes. *Biochimica et biophysica*

- acta. Gene regulatory mechanisms, 1861(4), 361–372.
<https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2018.01.013> .
8. Boguta M. (2013). Maf1, a general negative regulator of RNA polymerase III in yeast. *Biochimica et biophysica acta*, 1829(3–4), 376–384.
<https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2012.11.004>
 9. Brito-Querido, J., Mancera-Martínez, E., Vicens, Q., Bochler, A., Chicher, J., Simonetti, A., & Hashem, Y. (2017). The cryo-EM Structure of a Novel 40S Kinetoplastid-Specific Ribosomal Protein. *Structure* (London, England : 1993), 25(12), 1785–1794.e3.
<https://doi.org/10.1016/j.str.2017.09.014>
 10. Brooker R.J. (2015). *Genetics. Analysis and principles*. McGraw Hill Education. New York. 287–290.
 11. Canela-Pérez, I., López-Villaseñor, I., Cevallos, A. M., & Hernández, R. (2020). *Trypanosoma cruzi* Importin α : ability to bind to a functional classical nuclear localization signal of the bipartite type. *Parasitology research*, 119(11), 3899–3907.
<https://doi.org/10.1007/s00436-020-06885-z>
 12. Canela-Pérez, I., López-Villaseñor, I., Mendoza, L., Cevallos, A. M., & Hernández, R. (2019). Nuclear localization signals in trypanosomal proteins. *Molecular and biochemical parasitology*, 229, 15–23. <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2019.02.003>
 13. Cavalcanti D. P y De Souza W. (2018). The Kinetoplast of Trypanosomatids: From Early Studies of Electron Microscopy to Recent Advances in Atomic Force Microscopy. *Hindawi Scanning*. vol. 2018. ID 9603051. <https://doi.org/10.1155/2018/9603051>.
 14. Chen, F. X., Smith, E. R., & Shilatifard, A. (2018). Born to run: control of transcription elongation by RNA polymerase II. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 19(7), 464–478.
<https://doi.org/10.1038/s41580-018-0010-5>
 15. Clayton C. (2019). Regulation of gene expression in trypanosomatids: living with polycistronic transcription. *Open biology*. 9(6), 190072.
<https://doi.org/10.1098/rsob.190072>
 16. Dieci, G., Fiorino, G., Castelnuovo, M., Teichmann, M., & Pagano, A. (2007). The expanding RNA polymerase III transcriptome. *Trends in genetics*. 23(12); 614–622.
<https://doi.org/10.1016/j.tig.2007.09.001>

17. Durrieu-Gaillard S., Dumay-Odelot H., Boldina G., Tourasse N. J., Allard D., André F., Macari F., Choquet A., Lagarde P., Drutel G., Leste-Lasserre T., Petitet M., Lesluyes T., Lartigue-Faustin L., Dupuy J. W., Chibon F., Roeder R. G., Joubert D., Vagner S. & Teichmann M. (2018). Regulation of RNA polymerase III transcription during transformation of human IMR90 fibroblasts with defined genetic elements. *Cell cycle*. 17(5); 605–615. <https://doi.org/10.1080/15384101.2017.1405881>
18. Fairley J.A., Kantidakis T., Kenneth N.S., Intine R.V., Maraia R.J., White R.J. (2005). Human La is found at RNA polymerase III-transcribed genes in vivo. *PNAS*.102(51):18350-18355. <https://doi.org/10.1073/pnas.0506415102>.
19. Florencio-Martínez, L. E., Cano-Santiago, A., Mondragón-Rosas, F., Gómez-García, M., Flores-Pérez, C., Román-Carraro, F. C., Barocio-Rodríguez, L. A., Manning-Cela, R. G., Nepomuceno-Mejía, T., & Martínez-Calvillo, S. (2021). Participation of TFIIB Subunit Brf1 in Transcription Regulation in the Human Pathogen *Leishmania major*. *Genes*, 12(2), 280. <https://doi.org/10.3390/genes12020280>
20. Flores-Pérez, C., (2011). Identificación de los componentes proteicos del complejo transcripcional de la RNA polimerasa III en *Leishmania major* (Tesis de Maestría) Universidad Nacional Autónoma de México
21. Foldynová-Trantírková, S., Paris, Z., Sturm, N. R., Campbell, D. A., & Lukes, J. (2005). The *Trypanosoma brucei* La protein is a candidate poly(U) shield that impacts spliced leader RNA maturation and tRNA intron removal. *International journal for parasitology*, 35(4), 359–366. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2004.12.012>
22. Girbig M., Misiaszek A. D., Vorländer M. K., Lafita A., Grötsch H., Baudin F., Bateman A., & Müller C. W. (2021). Cryo-EM structures of human RNA polymerase III in its unbound and transcribing states. *Nature structural & molecular biology*. 28(2); 210–219. <https://doi.org/10.1038/s41594-020-00555-5>
23. Goodfellow, S. J., & Zomerdijk, J. C. (2013). Basic mechanisms in RNA polymerase I transcription of the ribosomal RNA genes. *Sub-cellular biochemistry*, 61, 211–236. https://doi.org/10.1007/978-94-007-4525-4_10

24. Goodier J.Fan H. y Maraia R.J. (1997). A carboxy-terminal basic region controls RNA polymerase III transcription factor activity of human La protein. *Molecular and cellular biology*, 17(10), 5823–5832. <https://doi.org/10.1128/MCB.17.10.5823>
25. Gottlieb, E., & Steitz, J. A. (1989a). The RNA binding protein La influences both the accuracy and the efficiency of RNA polymerase III transcription in vitro. *The EMBO journal*, 8(3), 841–850. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1989.tb03445.x>
26. Gottlieb, E., & Steitz, J. A. (1989b). Function of the mammalian La protein: evidence for its action in transcription termination by RNA polymerase III. *The EMBO journal*, 8(3), 851–861. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1989.tb03446.x>.
27. Grybchuk, D., Kostygov, A. Y., Macedo, D. H., d'Avila-Levy, C. M., & Yurchenko, V. (2018). RNA viruses in trypanosomatid parasites: a historical overview. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 113(4), e170487. <https://doi.org/10.1590/0074-02760170487>
28. Günzl, A. and Schimanski, B. (2009), Tandem Affinity Purification of Proteins. *Current Protocols in Protein Science*, 55: 19.19.1-19.19.16. <https://doi.org/10.1002/0471140864.ps1919s55>
29. Haberle, V., & Stark, A. (2018). Eukaryotic core promoters and the functional basis of transcription initiation. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 19(10), 621–637. <https://doi.org/10.1038/s41580-018-0028-8>
30. Hampshire-Lopes A., Souto-Padrón T., Días F. A., Gomes M. T., Rodrigues G. C., Zimmermann M. T., Silva T. L. y Vermelho A. B. (2010). Trypanosomatids: Odd Organisms, Devastating Diseases. *The Open Parasitology Journal*. 4. <https://doi.org/10.2174/1874421401004010030>.
31. Hernández, R., & Cevallos, A. M. (2014). Ribosomal RNA gene transcription in trypanosomes. *Parasitology research*, 113(7), 2415–2424. <https://doi.org/10.1007/s00436-014-3940-7>
32. Huber L. A. (2003). Is proteomics heading in the wrong direction? *Nature reviews. Molecular cell biology*, 4(1), 74–80. <https://doi.org/10.1038/nrm1007>
33. Intine, R. V., Dundr, M., Vassilev, A., Schwartz, E., Zhao, Y., Zhao, Y., Depamphilis, M. L., & Maraia, R. J. (2004). Nonphosphorylated human La antigen interacts with nucleolin at

- nucleolar sites involved in rRNA biogenesis. *Molecular and cellular biology*, 24(24), 10894–10904. <https://doi.org/10.1128/MCB.24.24.10894-10904.2004>
34. Jackman, J. E., & Alfonzo, J. D. (2013). Transfer RNA modifications: nature's combinatorial chemistry playground. *Wiley interdisciplinary reviews. RNA*, 4(1), 35–48. <https://doi.org/10.1002/wrna.1144>
 35. Jacks, A., Babon, J., Kelly, G., Manolaridis, I., Cary, P. D., Curry, S., & Conte, M. R. (2003). Structure of the C-terminal domain of human La protein reveals a novel RNA recognition motif coupled to a helical nuclear retention element. *Structure (London, England: 1993)*, 11(7), 833–843. [https://doi.org/10.1016/s0969-2126\(03\)00121-7](https://doi.org/10.1016/s0969-2126(03)00121-7)
 36. Jaremko, D., Ciganda, M., Christen, L., & Williams, N. (2019). *Trypanosoma brucei* L11 Is Essential to Ribosome Biogenesis and Interacts with the Kinetoplastid-Specific Proteins P34 and P37. *mSphere*, 4(4), e00475-19. <https://doi.org/10.1128/mSphere.00475-19>
 37. Kaufer, A., Ellis, J., Stark, D., & Barratt, J. (2017). The evolution of trypanosomatid taxonomy. *Parasites & vectors*, 10(1), 287. <https://doi.org/10.1186/s13071-017-2204-7>
 38. Kornberg R. D. (2017). The molecular basis of eukaryotic transcription. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 104(32): 12955-12961. <https://doi.org/10.1073/pnas.0704138104>
 39. Kuehner, J. N., Pearson, E. L., & Moore, C. (2011). Unravelling the means to an end: RNA polymerase II transcription termination. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 12(5), 283–294. <https://doi.org/10.1038/nrm3098>
 40. Lee, J. H., Nguyen, T. N., Schimanski, B., & Günzl, A. (2007). Spliced leader RNA gene transcription in *Trypanosoma brucei* requires transcription factor TFIIH. *Eukaryotic cell*, 6(4), 641–649. <https://doi.org/10.1128/EC.00411-06>
 41. Li, M., Tao, Z., Zhao, Y., Li, L., Zheng, J., Li, Z., & Chen, X. (2022). 5-methylcytosine RNA methyltransferases and their potential roles in cancer. *Journal of translational medicine*, 20(1), 214. <https://doi.org/10.1186/s12967-022-03427-2>
 42. Lin-Marq, N., & Clarkson, S. G. (1998). Efficient synthesis, termination and release of RNA polymerase III transcripts in *Xenopus* extracts depleted of La protein. *The EMBO journal*, 17(7), 2033–2041. <https://doi.org/10.1093/emboj/17.7.2033>

43. Maraia R. J. (1996). Transcription termination factor La is also an initiation factor for RNA polymerase III. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(8), 3383–3387. <https://doi.org/10.1073/pnas.93.8.3383>
44. Marchetti, M. A., Tschudi, C., Kwon, H., Wolin, S. L., & Ullu, E. (2000). Import of proteins into the trypanosome nucleus and their distribution at karyokinesis. *Journal of cell science*, 113 (Pt 5), 899–906. <https://doi.org/10.1242/jcs.113.5.899>
45. Marrella S. (2017). Human La's nuclear retention element functions in La-RNA target discrimination (Tesis de Maestría). York University. Toronto, Ontario.
46. Martínez-Calvillo S., Moreno-Campos R., Romero-Meza G., Rojas-Sanchez S., Vélez-Ramírez D. E., Manning-Cela R. G. y Florencio-Martínez L. E. (2016). Leishmaniasis. En *Parasitosis Más Comunes en la Población Mexicana*. Editorial Universitaria UANL. Monterrey, Nuevo León. 413-443.
47. 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 & biotechnology*, 2010, 525241. <https://doi.org/10.1155/2010/525241> .
48. 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. [https://doi.org/10.1016/s1097-2765\(03\)00143-6](https://doi.org/10.1016/s1097-2765(03)00143-6)
49. Mattijssen, S., Kozlov, G., Fonseca, B. D., Gehring, K., & Maraia, R. J. (2021). LARP1 and LARP4: up close with PABP for mRNA 3' poly(A) protection and stabilization. *RNA biology*, 18(2), 259–274. <https://doi.org/10.1080/15476286.2020.1868753>
50. Moreno-Campos, R., Florencio-Martínez, L. E., Nepomuceno-Mejía, T., Rojas-Sánchez, S., Vélez-Ramírez, D. E., Padilla-Mejía, N. E., Figueroa-Angulo, E., Manning-Cela, R., & Martínez-Calvillo, S. (2016). Molecular characterization of 5S ribosomal RNA genes and transcripts in the protozoan parasite *Leishmania major*. *Parasitology*, 143(14), 1917–1929. <https://doi.org/10.1017/S0031182016001712>
51. Muskus C. E. y Marín-Villa M. (2002). Metaciclologénesis: un proceso fundamental en la biología de *Leishmania*. En Programa de estudio y control de enfermedades tropicales.

- Universidad de Antioquia Medellín Colombia. 167-177.
<https://doi.org/10.7705/biomedica.v22i2.1156>
52. Nepomuceno-Mejía, T., Florencio-Martínez, L. E., Pineda-García, I., & Martínez-Calvillo, S. (2022). Identification of factors involved in ribosome assembly in the protozoan parasite *Leishmania major*. *Acta tropica*, 228, 106315.
<https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2022.106315>
53. Nogales E., Louder R. K. & He Y. (2017). Structural Insights into the Eukaryotic Transcription Initiation Machinery. *Annual review of biophysics*. 46; 59–83.
<https://doi.org/10.1146/annurev-biophys-070816-033751>
54. Ohndorf, U. M., Steegborn, C., Knijff, R., & Sondermann, P. (2001). Contributions of the individual domains in human La protein to its RNA 3'-end binding activity. *The Journal of biological chemistry*, 276(29), 27188–27196. <https://doi.org/10.1074/jbc.M102891200>
55. Padilla-Mejía, N. E., Florencio-Martínez, L. E., Figueroa-Angulo, E. E., Manning-Cela, R. G., Hernández-Rivas, R., Myler, P. J., & Martínez-Calvillo, S. (2009). Gene organization and sequence analyses of transfer RNA genes in Trypanosomatid parasites. *BMC genomics*, 10, 232. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-10-232>
56. Palenchar, J. B., Liu, W., Palenchar, P. M., & Bellofatto, V. (2006). A divergent transcription factor TFIIB in trypanosomes is required for RNA polymerase II-dependent spliced leader RNA transcription and cell viability. *Eukaryotic cell*, 5(2), 293–300.
<https://doi.org/10.1128/EC.5.2.293-300.2006>
57. Pannone, B. K., Xue, D., & Wolin, S. L. (1998). A role for the yeast La protein in U6 snRNP assembly: evidence that the La protein is a molecular chaperone for RNA polymerase III transcripts. *The EMBO journal*, 17(24), 7442–7453.
<https://doi.org/10.1093/emboj/17.24.7442>
58. Petz, M., Them, N., Huber, H., Beug, H., & Mikulits, W. (2012). La enhances IRES-mediated translation of laminin B1 during malignant epithelial to mesenchymal transition. *Nucleic acids research*, 40(1), 290–302. <https://doi.org/10.1093/nar/gkr717>
59. Preußner, C., Jaé, N., & Bindereif, A. (2012). mRNA splicing in trypanosomes. *International journal of medical microbiology*. 302(4-5); 221–224.
<https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2012.07.004>

60. Richard, P., & Manley, J. L. (2009). Transcription termination by nuclear RNA polymerases. *Genes & development*, 23(11), 1247–1269. <https://doi.org/10.1101/gad.1792809>
61. Rink, C., & Williams, N. (2019). Unique Interactions of the Nuclear Export Receptors TbMex67 and TbMtr2 with Components of the 5S Ribonuclear Particle in *Trypanosoma brucei*. *mSphere*, 4(4), e00471-19. <https://doi.org/10.1128/mSphere.00471-19>
62. Rojas-Sánchez, S., Figueroa-Angulo, E., Moreno-Campos, R., Florencio-Martínez, L. E., Manning-Cela, R. G., & Martínez-Calvillo, S. (2016). Transcription of *Leishmania major* U2 small nuclear RNA gene is directed by extragenic sequences located within a tRNA-like and a tRNA-Ala gene. *Parasites & vectors*, 9(1), 401. <https://doi.org/10.1186/s13071-016-1682-3>
63. Román-Carraro, F. C., Florencio-Martínez, L. E., Romero-Meza, G., Nepomuceno-Mejía, T., Carrero, J. C., Arroyo, R., Ortega-López, J., Manning-Cela, R. G., & Martínez-Calvillo, S. (2019). TFIIB Subunit Bdp1 Participates in RNA Polymerase III Transcription in the Protozoan Parasite *Leishmania major*. *BioMed research international*, 2019, 1425281. <https://doi.org/10.1155/2019/1425281> .
64. Romaniuk, M. A., Cervini, G., & Cassola, A. (2016). Regulation of RNA binding proteins in trypanosomatid protozoan parasites. *World journal of biological chemistry*, 7(1), 146–157. <https://doi.org/10.4331/wjbc.v7.i1.146>
65. Romero-Meza, G., Vélez-Ramírez, D. E., Florencio-Martínez, L. E., Román-Carraro, F. C., Manning-Cela, R., Hernández-Rivas, R., & Martínez-Calvillo, S. (2017). Maf1 is a negative regulator of transcription in *Trypanosoma brucei*. *Molecular microbiology*, 103(3), 452–468. <https://doi.org/10.1111/mmi.13568>
66. Schier A. C. & Taatjes D. J. (2020). Structure and Mechanism of the RNA Polymerase II Transcription Machinery. *Genes & Development*. 34; 465-488. <https://doi.org/10.1101/gad.335679.119>
67. Shan, F., Mei, S., Zhang, J., Zhang, X., Xu, C., Liao, S., & Tu, X. (2019). A telomerase subunit homolog La protein from *Trypanosoma brucei* plays an essential role in ribosomal biogenesis. *The FEBS journal*, 286(16), 3129–3147. <https://doi.org/10.1111/febs.14853>
68. Steverding D. (2017). The history of leishmaniasis. *Parasites & vectors*, 10(1), 82. <https://doi.org/10.1186/s13071-017-2028-5>

69. Sunther J. y Gull K. (2017). Shape, form, function and *Leishmania* pathogenicity: from textbook descriptions to biological understanding. *Open Biology*. 7: 170165. <http://doi.org/10.1098/rsob.170165>
70. Teixeira, D. E., Benchimol, M., Rodrigues, J. C., Crepaldi, P. H., Pimenta, P. F., & de Souza, W. (2013). The cell biology of Leishmania: how to teach using animations. *PLoS pathogens*, 9(10), e1003594. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003594>
71. Torres-Guerrero, E., Quintanilla-Cedillo, M. R., Ruiz-Esmenjaud, J., & Arenas, R. (2017). Leishmaniasis: a review. *F1000Research*, 6, 750. <https://doi.org/10.12688/f1000research.11120.1>
72. Turowski, T. W., & Tollervey, D. (2016). Transcription by RNA polymerase III: insights into mechanism and regulation. *Biochemical Society transactions*, 44(5), 1367–1375. <https://doi.org/10.1042/BST20160062>
73. Umaer, K., & Williams, N. (2015). Kinetoplastid Specific RNA-Protein Interactions in *Trypanosoma cruzi* Ribosome Biogenesis. *PloS one*, 10(6), e0131323. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0131323>
74. Van Horn, D. J., Yoo, C. J., Xue, D., Shi, H., & Wolin, S. L. (1997). The La protein in *Schizosaccharomyces pombe*: a conserved yet dispensable phosphoprotein that functions in tRNA maturation. *RNA (New York, N.Y.)*, 3(12), 1434–1443.
75. Vannini A. (2013). A structural perspective on RNA polymerase I and RNA polymerase III transcription machineries. *Biochimica et biophysica acta*. 1829(3-4); 258–264. <https://doi.org/10.1016/j.bbagrm.2012.09.009>
76. Vannini, A., Ringel, R., Kusser, A. G., Berninghausen, O., Kassavetis, G. A., & Cramer, P. (2010). Molecular basis of RNA polymerase III transcription repression by Maf1. *Cell*, 143(1), 59–70. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.09.002>
77. Vélez-Ramírez, D. E., Florencio-Martínez, L. E., Romero-Meza, G., Rojas-Sánchez, S., Moreno-Campos, R., Arroyo, R., Ortega-López, J., Manning-Cela, R., & Martínez-Calvillo, S. (2015). BRF1, a subunit of RNA polymerase III transcription factor TFIIB, is essential for cell growth of *Trypanosoma brucei*. *Parasitology*, 142(13), 1563–1573. <https://doi.org/10.1017/S0031182015001122>

78. Watson, J. D., Baker, T. A., Bell, S. P., Gann, A., Levine, M., & Losick, R. M. (2004). Mechanisms of Transcription. En *Molecular biology of the gene*. Pearson. 448-463.
79. Weser, S., Bachmann, M., Seifart, K. H., & Meissner, W. (2000). Transcription efficiency of human polymerase III genes in vitro does not depend on the RNP-forming autoantigen La. *Nucleic acids research*, 28(20): 3935–3942. <https://doi.org/10.1093/nar/28.20.3935>
80. Westermann, S., & Weber, K. (2000). Cloning and recombinant expression of the La RNA-binding protein from *Trypanosoma brucei*. *Biochimica et biophysica acta*, 1492(2-3), 483–487. [https://doi.org/10.1016/s0167-4781\(00\)00113-5](https://doi.org/10.1016/s0167-4781(00)00113-5) .
81. White R. J. (2011). Transcription by RNA polymerase III: more complex than we thought. *Nature reviews. Genetics*, 12(7), 459–463. <https://doi.org/10.1038/nrg3001>
82. WHO. 2021. Leishmaniasis. Fecha de consulta: 08-10-21. <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis>
83. Wolin, S. L., & Cedervall, T. (2002). The La protein. *Annual review of biochemistry*, 71, 375–403. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.71.090501.150003>
84. Zhu, J., Hayakawa, A., Kakegawa, T., & Kaspar, R. L. (2001). Binding of the La autoantigen to the 5' untranslated region of a chimeric human translation elongation factor 1A reporter mRNA inhibits translation in vitro. *Biochimica et biophysica acta*, 1521(1-3), 19–29. [https://doi.org/10.1016/s0167-4781\(01\)00277-9](https://doi.org/10.1016/s0167-4781(01)00277-9)