



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

Identificación de las proteínas que interactúan con el represor de la transcripción Maf1 en cultivos de *Leishmania major* sometidos a estrés celular

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

Aldo Rodrigo Hernández Zamarripa

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: Dr. Santiago Martínez Calvillo

Facultad de Estudios Superiores Iztacala, UNAM

COMITÉ TUTOR: Dra. Rebeca Manning Cela

CINVESTAV, IPN

Dr. Luis Enrique Arias Romero

Facultad de Estudios Superiores Iztacala, UNAM

Los Reyes Iztacala, Tlalnepantla, Estado de México, junio 2023



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

Identificación de las proteínas que interactúan con el represor de la
transcripción Maf1 en cultivos de *Leishmania major* sometidos a estrés
celular

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

Aldo Rodrigo Hernández Zamarripa

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: Dr. Santiago Martínez Calvillo

Facultad de Estudios Superiores Iztacala, UNAM

COMITÉ TUTOR: Dra. Rebeca Manning Cela

CINVESTAV, IPN

Dr. Luis Enrique Arias Romero

Facultad de Estudios Superiores Iztacala, UNAM

Los Reyes Iztacala, Tlalnepantla, Estado de México, junio 2023

COORDINACIÓN DEL POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

OFICIO CPCB/338/2023

ASUNTO: Oficio de Jurado

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

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día **27 de febrero de 2023** se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** en el campo de conocimiento de **(Biología Experimental)** del estudiante **HERNÁNDEZ ZAMARRIPA ALDO RODRIGO**, con número de cuenta **312239912** con la tesis titulada **“Identificación de las proteínas que interactúan con el represor de la transcripción Maf1 en cultivos de *Leishmania major* sometidos a estrés celular.”**, realizada bajo la dirección del **DR. SANTIAGO MARTÍNEZ CALVILLO**, quedando integrado de la siguiente manera:

Presidente: DRA. BERTHA JOSEFINA ESPINOZA GUTIÉRREZ
Vocal: DR. JULIO CÉSAR CARRERO SÁNCHEZ
Vocal: DRA. LAILA GUTIÉRREZ KOBEH
Vocal: DR. JUAN CARLOS VIZUET DE RUEDA
Secretario: DRA. REBECA GEORGINA MANNING CELA

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

ATENTAMENTE
“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”
Ciudad Universitaria, Cd. Mx., a 17 de abril de 2023

COORDINADOR DEL PROGRAMA



DR. ADOLFO GERARDO NAVARRO SIGÜENZA



Agradecimientos institucionales

Al Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, por haberme otorgado la beca nacional para realizar los estudios de posgrado.

Al PAPIIT (DGAPA, UNAM) por financiar este proyecto de investigación con los donativos IN207118 e IN214221 otorgados al Dr. Santiago Martínez Calvillo.

Al Dr. Santiago Martínez Calvillo por permitirme ser parte de su grupo de trabajo, por sus enseñanzas y apoyo incondicional durante la dirección de este trabajo.

A los miembros del Comité Tutor, la Dra. Rebeca Manning Cela y el Dr. Luis Enrique Arias Romero, por sus sugerencias y enriquecedoras aportaciones.

Agradecimientos personales

A mis compañeros del Laboratorio 1 de la UBIMED, en especial al Biólogo Luis Enrique Florencio Martínez, por su apoyo técnico en la fase experimental.

A mis revisores: la Dra. Bertha Josefina Espinoza Gutiérrez, el Dr. Julio César Carrero Sánchez, la Dra. Laila Gutiérrez Kobeh, el Dr. Juan Carlos Vizuet De Rueda y la Dra. Rebeca Georgina Manning Cela por sus valiosas aportaciones a este proyecto.

A mis padres y mi hermano, por su apoyo eterno en toda instancia.

A Abril, por su ayuda en la revisión de este trabajo y por su ayuda en incontables aspectos de mi vida a lo largo de varios años, agradecido de por vida.

A Gino, Jorge, Brito, Brenda Montaña, Brendita Carranza, Violeta, entre otros amigos y personas que espero perdonen mi memoria al no quedar plasmadas en estas palabras, que han cruzado su camino con el mío y han dejado palabras de aliento y enseñanzas valiosas.

Índice

1	Resumen.....	1
2	Abstract.....	3
3	Introducción	5
3.1	Características generales del género <i>Leishmania</i>	5
3.2	Leishmaniasis	8
3.2.1	Formas clínicas	9
3.3	Ciclo de vida de <i>Leishmania</i>	13
3.4	Transcripción en eucariontes	15
3.4.1	RNA polimerasa III	19
3.4.2	Promotores y factores de transcripción de la RNA Pol III	21
3.4.3	Reguladores de la transcripción de la RNA Pol III	25
3.4.4	Maf1 es un regulador negativo de la transcripción de la RNA Pol III	26
3.4.5	Modificaciones post-traduccionales de Maf1	28
3.4.6	Localización celular de Maf1	31
3.5	Expresión y control génico en <i>Leishmania</i>	32
3.5.1	Promotores en tripanosomátidos.....	35
3.6	Purificación de complejos proteínicos en tripanosomátidos.....	38
3.7	Antecedentes directos	40
4	Objetivos	42
4.1	Objetivo general	42
4.2	Objetivos particulares.....	42
5	Estrategia experimental.....	43
6	Materiales y Métodos	44
6.1	Análisis <i>in silico</i>	44
6.2	Cultivo de promastigotes	44
6.3	Viabilidad celular de promastigotes de <i>L. major</i>	45
6.4	Verificación de la expresión de la proteína recombinante LmMaf1-PTP	46
6.5	Purificaciones por afinidad en tándem con condiciones óptimas de crecimiento y condiciones estresantes	47
6.6	Preparación de las muestras proteicas para su análisis por espectrometría de masas	49

6.7	Inmunofluorescencia indirecta	50
7	Resultados.....	52
7.1	Maf1 se conserva entre eucariontes	52
7.2	Análisis de la línea celular que expresa la proteína LmMaf1-PTP.....	56
7.3	Maf1 interactúa con una gran diversidad de proteínas con distintas funciones biológicas en condiciones favorables de crecimiento	58
7.4	Análisis de enriquecimiento funcional	72
7.5	Localización subcelular de LmMaf1.....	75
8	Discusión	77
9	Conclusiones.....	87
10	Perspectivas.....	88
11	Referencias bibliográficas.....	89

Índice de figuras y tablas

Fig. 1 Esquema de la morfología de los tripanosomátidos. Tomado de Docampo et al., 2005	5
Fig. 2 DNA mitocondrial. Tomado de Klingbeil & Englund, 2004.....	6
Fig. 3 Morfología de las formas parasitarias de <i>Leishmania</i> . Figura adaptada de Besteiro et al., 2007.....	7
Fig. 4 Distribución geográfica de las principales especies de <i>Leishmania</i> con su respectivo reservorio fundamental (Abadías-Granado, et al., 2021).	8
Fig. 5 Manifestaciones clínicas de leishmaniasis. Tomado de WHO, 2021.	9
Fig. 6 Distribución de leishmaniasis en México. Tomado de Correa & Romero, 2022.	12
Fig. 7 Ciclo de vida de <i>Leishmania</i> . Tomado de Ruíz, 2011.....	13
Fig. 8 Transcripción de dos genes. Tomado de Griffiths et al., 2000.....	16
Fig. 9 Estructuras de alta resolución de los complejos de preinicio (PIC) de las RNA polimerasas I, II y III. Tomado de Hanske et al., 2018.	17
Fig. 10 Estructura cristalina de la RNA polimerasa I de levadura. Modificada de Fernández-Tornero et al., 2013.	18
Fig. 11 Modelo tridimensional de la RNA pol II. Modificada de Bushnell & Kornberg, 2003.	19
Fig. 12 Vista superior y frontal de la RNA pol III. Modificada de Hoffman <i>et al.</i> , 2015.	20
Fig. 13 Tipos de promotores de RNA polimerasa III en humanos. Modificado de Teichmann <i>et al.</i> , 2010.....	22
Fig. 14 Resumen esquemático de la organización de dominios de factores transcripcionales generales de la RNA pol III de <i>H. sapiens</i> . Tomado de Wang <i>et al.</i> , 2022.	23
Fig. 15 Estructura de la proteína Maf1. Extraído de Khanna, <i>et al.</i> , 2015.....	26
Fig. 16 Mecanismo de acción de Maf1. Tomado de Oler & Cairns, 2012	29

Fig. 17 Representación esquemática de la maduración del mRNA mediante <i>trans-splicing</i> y poliadenilación. Tomado de Docampo, <i>et al.</i> , 2011.....	33
Fig. 18 Mecanismo de <i>cis-splicing</i> y <i>trans-splicing</i> . Tomado de Michaeli, 2011.	35
Fig. 19 Bandera de extracción PTP. Tomada de Flores, 2011.	39
Fig. 20 Análisis de secuencia y estructura secundaria de LmMaf1 y HsMaf1.....	53
Fig. 21 Predicción de estructura terciaria de LmMaf1.	55
Fig. 22 Análisis de <i>western blot</i> de la línea celular recombinante LmMaf1-PTP.....	57
Fig. 23 Curvas de crecimiento de la línea celular recombinante (naranja) y <i>wt</i> (verde) en condiciones favorables de crecimiento, resemebrándose cada 24 h.....	58
Fig. 24 Eluido final de la purificación por afinidad en tándem en condiciones favorables de LmMaf1-ptp (panel a) y la línea <i>wt</i> (panel b).....	60
Fig. 25 Curvas de crecimiento de la línea celular recombinante (LmMaf1-ptp) y la línea <i>wt</i> (LmjFfWT) en condiciones de estrés por choque térmico a 37°C.	67
Fig. 26 Purificación por afinidad en tándem con células <i>L. major</i> en condiciones de choque térmico, que expresan LmMaf1-ptp y de la línea celular <i>wt</i>	68
Fig. 27 Diagramas de proteínas purificadas.....	72
Fig. 28 GO funcional de las proteínas que interaccionan con Maf1 en condiciones favorables y de estrés.	74
Fig. 29 Localización celular de LmMaf1-PTP..	75

Abreviaturas

Amp ^r	Gen de resistencia a ampicilina
CBP	Péptido de unión a calmodulina (<i>Calmodulin Binding Peptide</i>)
CK2	Caseína cinasa 2
DNA	Ácido desoxirribonucleico
G418	Neomicina
Kb	Kilobases
KDa	Kilodaltones
MAPK	Proteína cinasa activada por mitógeno (<i>Mitogen-Activated Protein</i>)
Neo ^r	Gen de resistencia a neomicina
NLS	Secuencia de localización nuclear (<i>Nuclear Localization Sequence</i>)
pb	Pares de bases
PBS	Amortiguador de fosfatos (<i>Phosphate Buffered Saline</i>)
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)
PKA	Proteína cinasa A
PTP	Péptido de extracción con dominios Prot A-TEV-Prot C
Prot A	Dominio de proteína A
Prot C	Dominio de proteína C
RNA Pol I	RNA polimerasa I
RNA Pol II	RNA polimerasa II

RNA Pol III	RNA polimerasa III
RNA	Ácido ribonucleico
mRNA	RNA mensajero
rRNA	RNA ribosomal
snRNA	RNA pequeño nuclear
RNP	Ribonucleoproteína
SL RNA	RNA <i>spliced leader</i>
SNAPc	Complejo proteínico activador de snRNA
snoRNA	RNA pequeño nucleolar
SUMO	<i>Small Ubiquitin-related Modifier</i>
TAP	Purificación por afinidad en tándem (<i>Tandem Affinity Purification</i>)
TBP	Proteína de unión a caja TATA (<i>TATA Binding Protein</i>)
TOR	Diana de rapamicina (<i>Target of Rapamicin</i>)
TORC	Diana del complejo de rapamicina (<i>Target of Rapamicin Complex</i>)
tRNA	RNA de transferencia
UFC	Unidad(es) formadora(s) de colonia
UPS	Sistema de proteosoma de ubiquitina (<i>Ubiquitin-Proteasome System</i>)

1 Resumen

Leishmania es un parásito flagelado de la familia de los tripanosomátidos, caracterizados por presentar mecanismos de expresión génica diferentes a los de otros eucariontes. Nuestro equipo está interesado en estudiar la transcripción de la RNA polimerasa III (RNA Pol III), que se encarga de transcribir moléculas esenciales para la supervivencia celular, como tRNAs y 5S rRNA. Maf1 es un regulador negativo de la transcripción de la RNA Pol III que está conservado a lo largo de la línea evolutiva eucarionte. En este trabajo se estudió Maf1 en *L. major* (LmMaf1). Mediante análisis *in silico* se determinó que LmMaf1 posee las tres secuencias típicas de los ortólogos de Maf1. También se predijo que LmMaf1 presenta una estructura globular muy parecida a la de Maf1 de humano. Para identificar las proteínas con las que se asocia LmMaf1 para realizar sus funciones, se realizaron experimentos de purificación por afinidad en tándem con una clona celular de *L. major* que expresa la proteína LmMaf1 fusionada a la bandera PTP. Las proteínas purificadas se identificaron mediante espectrometría de masas y análisis bioinformático. De manera interesante, se identificaron proteínas con una gran diversidad de funciones, como subunidades de RNA polimerasas, reguladores de la transcripción, proteínas de unión a RNA, y proteínas involucradas en metabolismo de lípidos, ubiquitinación e interacción con el proteosoma. Esto sugiere que Maf1 participa en múltiples roles en *Leishmania*, como se ha reportado en otros organismos. Entre las proteínas que copurificaron con LmMaf1 encontramos varias cuya asociación con Maf1 ya fue establecida en otras especies. Además, identificamos proteínas novedosas no reportadas previamente, como TIP120, Elp3B y Los1. Considerando que la función de Maf1 se afecta en condiciones de estrés celular, determinamos también las proteínas que se unen a LmMaf1 bajo estrés de calor. En general, en esta condición se copurificaron las mismas proteínas que en condiciones óptimas de crecimiento, aunque muchas de ellas cambiaron su concentración

relativa, al alza o a la baja. El cambio más notable, y como se anticipaba, fue el incremento en los niveles de las proteínas *heat shock*. Además, la proteína cinasa NIMA, involucrada en el control del ciclo celular, se identificó únicamente en esta condición, lo que sugiere su participación en la modulación de la función de LmMaf1 en condiciones adversas de crecimiento. Finalmente, ensayos de inmunofluorescencia indirecta mostraron que la proteína LmMaf1-PTP es predominantemente citoplásmica en condiciones favorables y bajo estrés. Esto difiere de lo observado en levadura, donde Maf1 se enriquece en el núcleo bajo condiciones de estrés celular.

2 Abstract

Leishmania is a flagellated parasite of the trypanosomatid family, characterized by presenting gene expression mechanisms different from those of other eukaryotes. Our team is interested in studying the transcription of RNA polymerase III (RNA Pol III), which is responsible for transcribing essential molecules for cell survival, such as tRNAs and 5S rRNA. Maf1 is a negative regulator of RNA Pol III transcription that is conserved throughout the eukaryotic evolutionary line. In this work, Maf1 in *L. major* (LmMaf1) was studied. Through *in silico* analysis it was determined that LmMaf1 possesses the three typical sequences of Maf1 orthologs. LmMaf1 was also predicted to have a globular structure very similar to that of human Maf1. To identify the proteins with which LmMaf1 associates to perform its functions, tandem affinity purification experiments were performed with an *L. major* cell clone expressing the LmMaf1 protein fused to the PTP flag. Purified proteins were identified by mass spectrometry and bioinformatic analysis. Interestingly, proteins with a wide variety of functions were identified, such as RNA polymerase subunits, regulators of transcription, RNA-binding polypeptides, and proteins involved in lipid metabolism, and ubiquitination and interaction with the proteasome. This suggests that Maf1 is involved in multiple roles in *Leishmania*, as has been reported in other organisms. Among the proteins that copurified with LmMaf1 we found several whose association with Maf1 has already been established in other species. But we also identified novel proteins, not previously reported, such as TIP120, Elp3B and Los1. Considering that Maf1 function is affected under conditions of cellular stress, we also determined the proteins that bind to LmMaf1 under heat shock stress. In general, the same proteins were copurified in this condition as in optimal growth conditions, although many of them changed their relative abundance, either upwards or downwards. The most notable change, and as anticipated, was the rise in the levels of heat shock proteins. In addition, the NIMA protein kinase, involved in cell cycle control, was

only identified in this condition, suggesting its involvement in the modulation of LmMaf1 function under adverse growth conditions. Finally, indirect immunofluorescence assays showed that the LmMaf1-PTP protein is predominantly cytoplasmic under favorable conditions and under stress. This differs from yeast, where Maf1 is enriched in the nucleus under cellular stress conditions.

3 Introducción

3.1 Características generales del género *Leishmania*

Los organismos del género *Leishmania* son protozoos parásitos unicelulares que pertenecen a la familia *Trypanosomatidae*, del orden *Kinetoplastida* (Momen, 2003). Los miembros de este orden se caracterizan por la presencia de un DNA mitocondrial muy particular, llamado cinetoplasto (Figura 1), el cual se encuentra formado por una red compleja de moléculas circulares (Figura 2) (Maslov *et al.*, 2001; Liu *et al.*, 2005). En este organelo se lleva a cabo la edición del RNA, un proceso que involucra la adición o delección de residuos de uridina que pueden duplicar el tamaño del transcrito y son esenciales para generar marcos de lectura abiertos, proceso descrito por primera vez en un estudio realizado en *Trypanosoma brucei* (Benne *et al.*, 1986). Otra característica importante de los tripanosomátidos son los microtúbulos subpeliculares, una capa de microtúbulos que corre longitudinalmente por debajo de la membrana plasmática (Figura 1). La remodelación de este citoesqueleto facilita los cambios morfológicos de los diferentes estadios de desarrollo de *Leishmania* (Padilla-Mejía *et al.*, 2009).

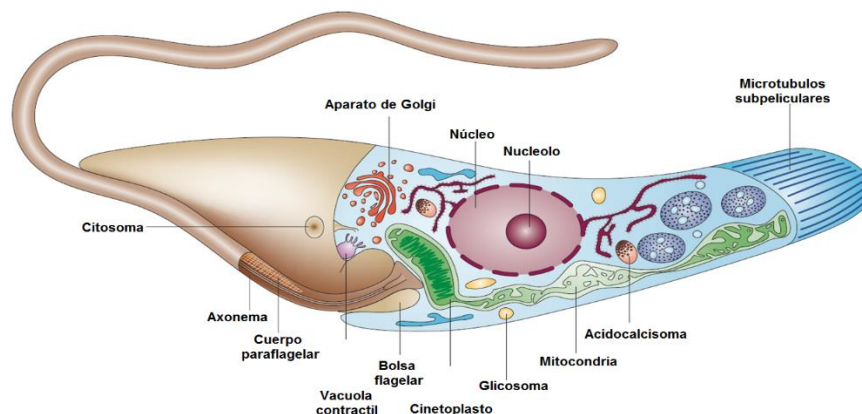


Fig. 1 Esquema de la morfología de los tripanosomátidos. Tomado de Docampo *et al.*, 2005.

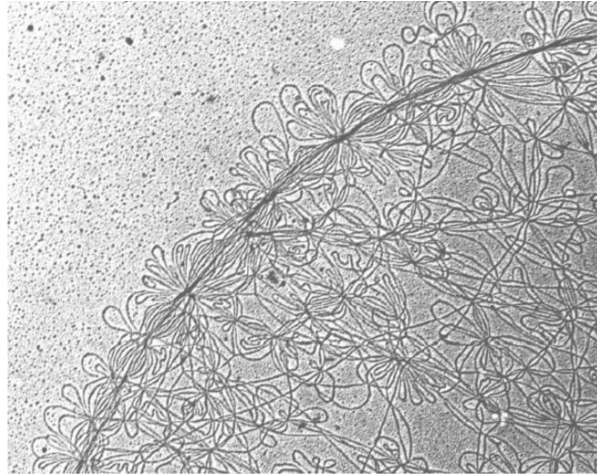


Fig. 2 DNA mitocondrial. Fotografía tomada con microscopio electrónico de un segmento del DNA de cinetoplasto del tripanosomátido *Crithidia fasciculata*, donde se observa el arreglo de los mini círculos. Tomado de Klingbeil & Englund, 2004.

Muchos de los tripanosomátidos provocan graves enfermedades de importancia médica y veterinaria que se encuentran dentro del grupo de enfermedades tropicales desatendidas señaladas por la Organización Mundial de la Salud (OMS). Entre éstas se encuentran la tripanosomiasis africana y la enfermedad de Chagas, causadas por *T. brucei* y por *T. cruzi*, respectivamente. La leishmaniasis (o leishmaniosis) es causada por un protozoo parásito del género *Leishmania*, que cuenta con más de 20 especies diferentes.

Los organismos pertenecientes a esta familia pueden tener ciclos de vida mono o digenéticos que se caracterizan por una sucesión de diferentes formas adaptadas a medios ambientes diversos, alternando estadios replicativos y no replicativos, infectivos y no infectivos (Stevens *et al.*, 2001). En particular, *Leishmania* es un organismo obligado dimórfico, cuyos estadios de desarrollo en su ciclo de vida son el promastigote y el amastigote. El promastigote tiene forma fusiforme o alargada (de ~15 a 30 μm de largo), con un núcleo central y un flagelo largo que emerge de la parte anterior de la célula (Figura 3). El amastigote tiene forma redondeada u ovalada, mide 2 - 4 μm , carece de membrana ondulante y posee un flagelo muy pequeño que no emerge de la célula, por lo cual es

inmóvil. Reside y se multiplica en los fagolisosomas dentro de los fagocitos mononucleares de los hospederos, aunque también se ha reportado que puede infectar neutrófilos y fibroblastos en lesiones de piel (Laskay, *et al.* 2003).

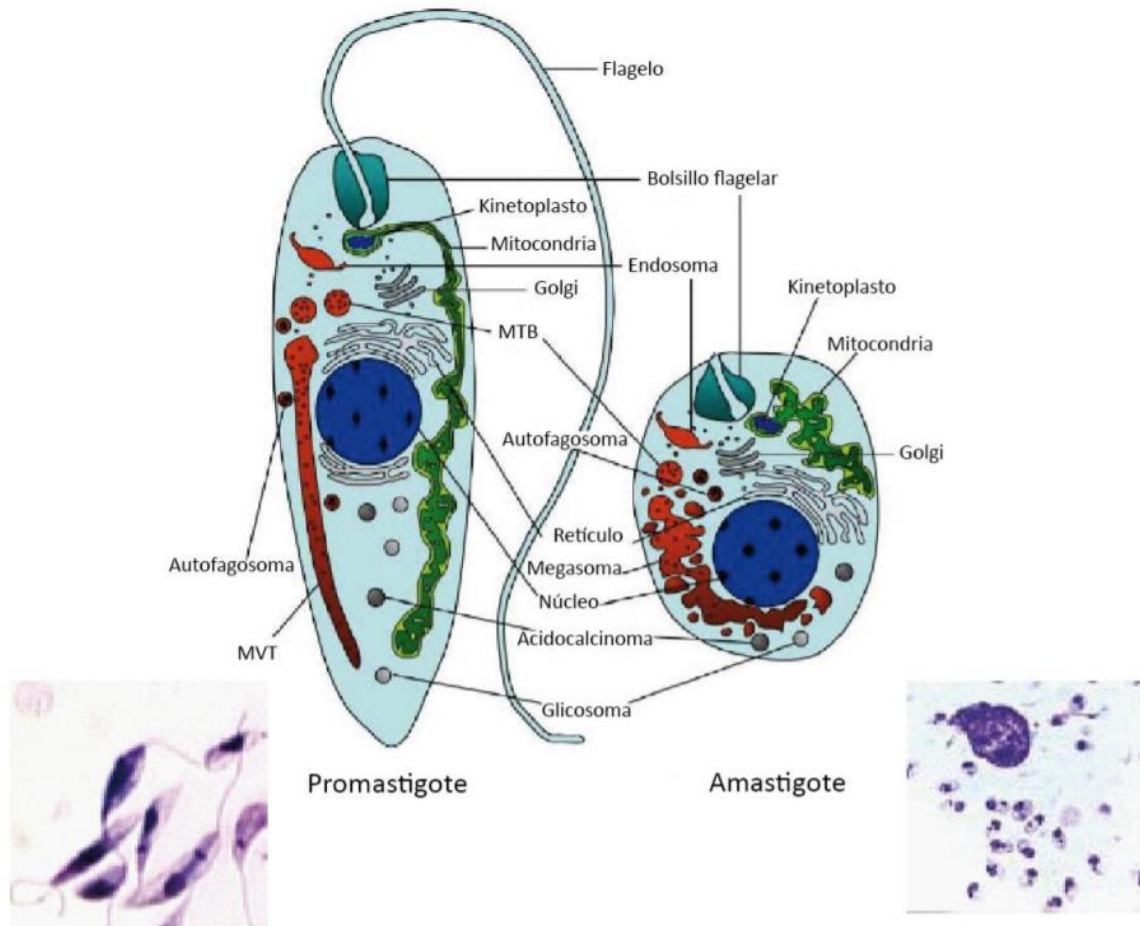


Fig. 3 Morfología de las formas parasitarias de *Leishmania*. El promastigote (izquierda), forma extracelular, es alargado, flagelado de 15 a 30 μm ; mientras que el amastigote (derecha), forma intracelular, es redondeado de 2 a 6 μm . Se señalan los principales orgánulos intracelulares. El bolsillo flagelar marca el extremo anterior del parásito. MVT; Túbulo multivesicular, MVB; cuerpos multivesiculares. Figura adaptada de Besteiro *et al.*, 2007.

3.2 Leishmaniasis

La leishmaniasis es una enfermedad fundamentalmente zoonótica. Hay unas 70 especies animales, entre ellas el ser humano, que son reservorios naturales del parásito *Leishmania* (WHO, 2021), siendo los cánidos y los roedores los reservorios principales, con la excepción de *L. donovani* y *L. tropica*, cuyo reservorio principal es el ser humano (Figura 4). La leishmaniasis comprende un grupo amplio de enfermedades que exponen diferentes manifestaciones clínicas en humanos. Las variedades de la enfermedad dependen no sólo de la especie que infecta, sino también de la salud general y la estructura genética del hospedero (Alexander *et al.*, 1999). Se estima que cada año se producen entre 700 000 y 1 millón de nuevos casos y entre 20 000 y 30 000 defunciones (WHO, 2021).

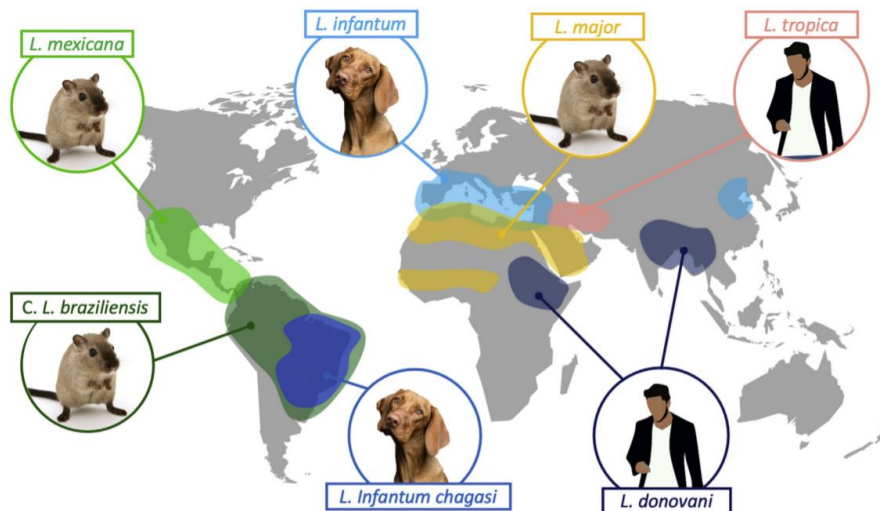


Fig. 4 Distribución geográfica de las principales especies de *Leishmania* con su respectivo reservorio fundamental (Abadías-Granado, *et al.*, 2021).

Leishmania es transmitida a los humanos por la picadura de la hembra de un insecto díptero conocido como flebótomo o mosca de la arena. Se conocen más de 90 especies de

flebótomos transmisores de *Leishmania*. La epidemiología de la leishmaniasis depende de las características de las especies del parásito y de los flebótomos, de las características ecológicas de los lugares donde se transmite, de la exposición previa y actual de la población humana al parásito y del comportamiento humano.

3.2.1 Formas clínicas

La leishmaniasis se divide en tres tipos principales: cutánea, mucocutánea y visceral (Figura 5).

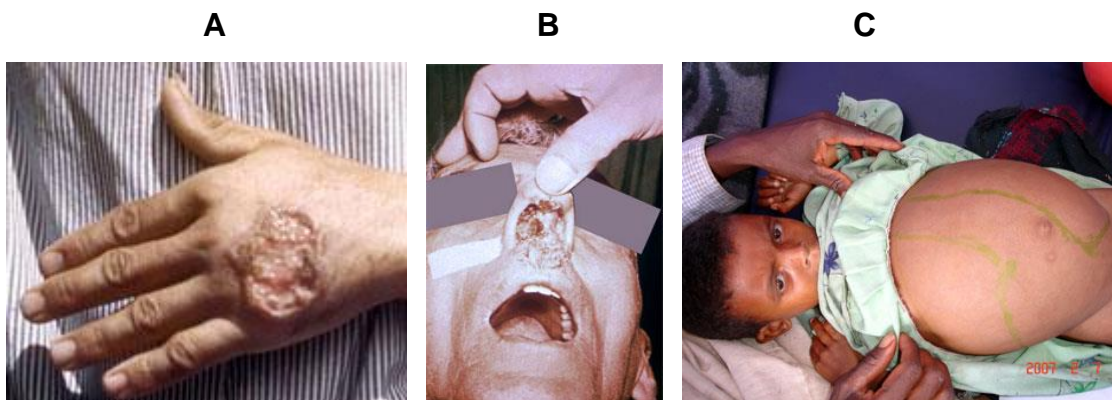


Fig. 5 Manifestaciones clínicas de leishmaniasis. **A)** Ulceración en la mano por leishmaniasis cutánea. **B)** Leishmaniasis mucocutánea. Lesión conocida como "nariz de tapir". **C)** Leishmaniasis visceral en niña. Tomado de WHO, 2021.

La **leishmaniasis cutánea** es la más común de las tres variedades y se caracteriza por la presencia de úlceras en el sitio de la picadura del insecto transmisor (Figura 5A). Es causada por *L. major* y *L. mexicana*, entre otras especies. Frecuentemente aparece en sitios expuestos, como la cara o las extremidades. Un ejemplo es la úlcera del chiclero, lesión ulcerada que aparece en el pabellón auricular de los recolectores de goma del árbol

del chicle en México y América Central (Abadías-Granado *et al.*, 2021). Más del 50% de los casos sanan sin tratamiento a los 6 meses de la infección (Hailu *et al.*, 2016). Un tercio de los casos ocurre en cada una de las siguientes regiones epidemiológicas: América Latina, los países alrededor del Mar Mediterráneo y en Asia (desde Medio Oriente hasta Asia Central). Los diez países que reportan la mayor cantidad de casos, con un estimado del 70-75% global, son: Afganistán, Argelia, Colombia, Brasil, Irán, Siria, Etiopía, Sudán del norte, Costa Rica y Perú (Alvar *et al.*, 2012).

Se consideran dos cuadros clínicos cutáneos: leishmaniasis cutánea localizada (LCL), generalmente circunscrita al sitio de inoculación gracias a una respuesta inmune celular protectora (Gitari, *et al.*, 2018); y leishmaniasis cutánea diseminada (LCD) caracterizada por una pobre respuesta inmune celular, que permite la propagación no controlada en la piel (Alvar *et al.*, 2012, Handler *et al.*, 2015).

La **leishmaniasis mucocutánea** puede coexistir con la variedad cutánea o aparecer tras la resolución de ésta, incluso años después. La vía de diseminación puede ser hemática o linfática. En los países endémicos, la prevalencia de afectación mucosa puede ser de hasta el 20%. La mayoría de los casos se producen por *L. braziliensis*, aunque también se puede provocar por *L. amazonensis*, *L. guyanensis* y *L. panamensis*. Las mucosas más frecuentemente afectadas son la nasal (Figura 5B) y la oral, aunque las lesiones pueden extenderse hasta la orofaringe y la laringe, con posible afectación del cartílago y las cuerdas vocales (Marra *et al.*, 2014). La destrucción del tejido en este caso puede ser muy severa (Bates, 2007). Aparece en forma de lesiones ulceradas, que pueden ser desfigurantes, y es potencialmente mortal, por lo que el tratamiento es fundamental para el control de la infección.

El tercer tipo de leishmaniasis, **la leishmaniasis visceral**, está asociada comúnmente con *L. donovani* y *L. infantum*. Estudios epidemiológicos indican que la infección en el humano con uno de estos parásitos puede tomar dos cursos: en la mayoría de los individuos ocurre una infección subclínica con pocos síntomas, sólo evidentes por el desarrollo de una respuesta frente a los antígenos de *Leishmania* (Zijlstra & Hassan, 2001); en otros casos, la infección produce una enfermedad sistémica caracterizada por fiebre, pérdida de peso e inflamación de órganos como bazo e hígado, la cual es fatal si no es tratada. El parásito invade los macrófagos de todos los tejidos linfoides del cuerpo, particularmente la médula ósea. Como se mencionó antes, los órganos más afectados son el hígado y el bazo, donde la infección de los macrófagos viene acompañada de un infiltrado de linfocitos y de necrosis. Esta enfermedad, también conocida por el nombre de kala-azar, es endémica en varias partes de África, India y Latinoamérica; ocurre esporádicamente en China, costas del Mediterráneo y el suroeste de Asia (Guerin, 2002).

En México se han reportado casos de los tres tipos de leishmaniasis (Figura 6). La enfermedad es ocupacional y afecta principalmente a hombres en edad productiva de 15 a 44 años, quienes por motivos de trabajo o turismo se adentran a las áreas selváticas donde habita el vector, exponiéndose a su picadura. La mayor parte de la población expuesta vive en áreas rurales (cafetales, cacaotales y cerca o dentro de bosques y selvas en los que se explota la madera). La residencia o el turismo en áreas de transmisión y los frecuentes movimientos migratorios propician la dispersión del padecimiento, aumentando los estados que reportan casos autóctonos e importados. La leishmaniasis cutánea, producida por *L. mexicana*, se distribuye principalmente en la región del sur del país, como la península de Yucatán, Veracruz y Oaxaca, aunque también hay reportes en estados del centro y norte del país. La leishmaniasis mucocutánea es muy escasa y se ha reportado en los estados de Oaxaca, Veracruz, Tabasco y Campeche, donde es generada por *L. braziliensis*. La

leishmaniasis visceral ha sido reportada en el estado de Guerrero desde 1952, pero actualmente es más abundante en Chiapas, con 141 casos entre 1981 y 2010 y un promedio de 8 a 15 casos al año, resultando en un 90% del total de los casos de leishmaniasis visceral en México (Alvar *et al.*, 2012). Esta variedad es producida por *L. infantum*, anteriormente conocida como *L. chagasi* en México (Alvar *et al.*, 2012; Monroy-Ostria & Sanchez-Tejada, 2002).

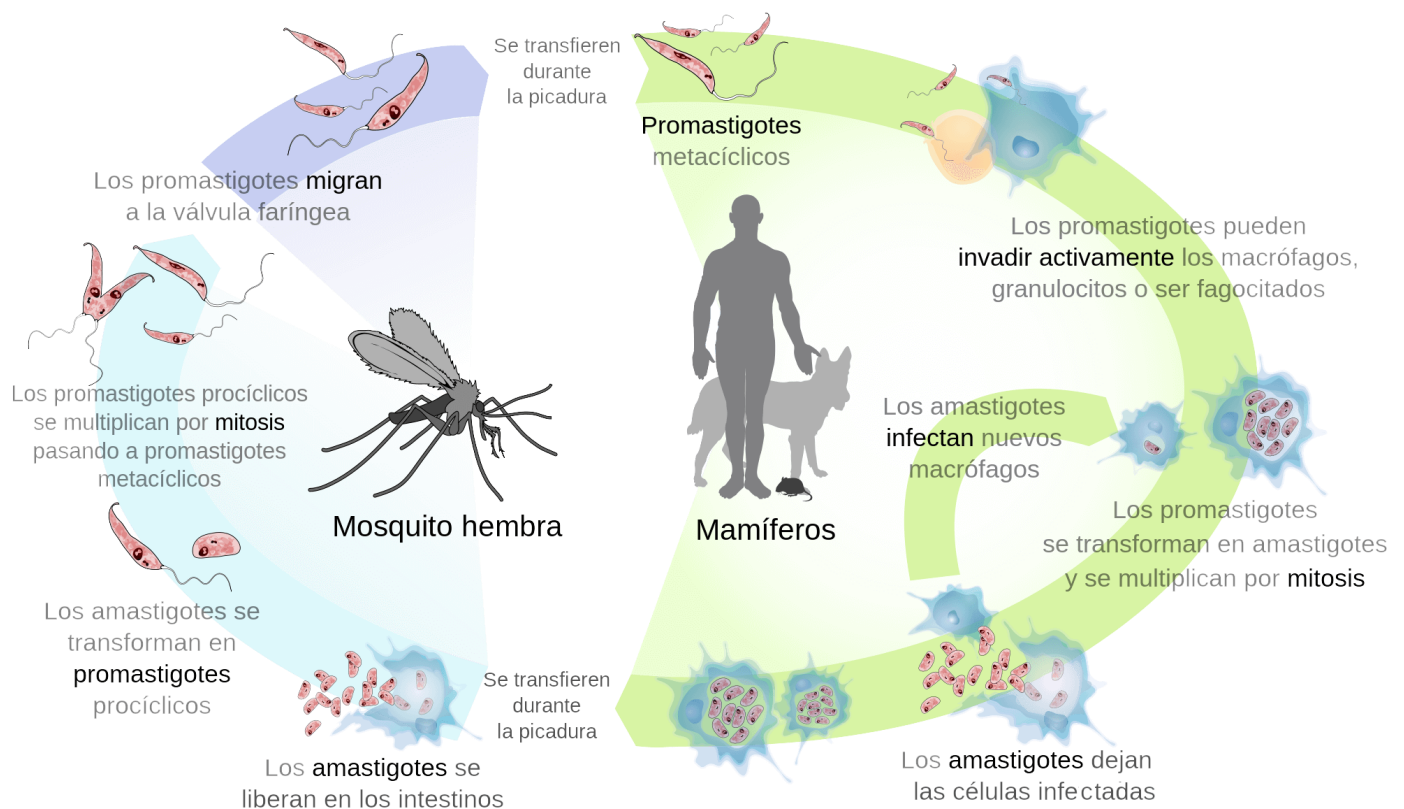


Fig. 6 Distribución de leishmaniasis en México. Tomado de Correa & Romero, 2022.

Los distintos tipos de leishmaniasis son tratados con compuestos antimoniales, los cuales no siempre son eficaces y generan efectos secundarios severos, comprometiendo la función de riñones, hígado y corazón (Hailu *et al.*, 2016). Diversos factores influyen en la eficacia del tratamiento, incluyendo la especie de *Leishmania* que infecte y el grado de avance de la enfermedad. Debido a la resistencia al tratamiento, se han realizado estudios para evaluar la efectividad de terapias combinadas que se enfocan en inhibir distintas vías metabólicas del parásito (Tovar & Yasnot, 2017).

3.3 Ciclo de vida de *Leishmania*

Todas las especies de *Leishmania* son transmitidas por la mosca de la arena, perteneciente a los géneros *Phlebotomus* o *Lutzomyia*. El ciclo de vida comienza con la



picadura de una mosca infectada, con la que se transmiten al hospedero mamífero los promastigotes metacíclicos, que son las formas infectivas del parásito (Figura 7).

Fig. 7 Ciclo de vida de *Leishmania*. Tomado de Ruíz, 2011.

Los promastigotes metacíclicos son fagocitados por los macrófagos, residiendo inicialmente en fagosomas, los que son después modificados mediante la fusión con los lisosomas, resultando en la formación del fagolisosoma o vacuola parasitófora, que contiene enzimas hidrolíticas en un ambiente ácido favorable a la cinética digestiva de

dichas enzimas. Este cambio en las condiciones desencadena la diferenciación a amastigotes, con la pérdida del flagelo, el cierre de la bolsa flagelar y una disminución en el tamaño (Figura 7) (Handman, 1999).

Los amastigotes se dividen repetidamente y son los responsables de la invasión de otros tejidos del mamífero, al ser liberados por lisis celular. Se ha reportado que *Leishmania* puede permanecer latente durante décadas o durante toda la vida del mamífero (Cohen-Freue *et al.*, 2007). Cuando otra mosca pica a una persona infectada puede tomar los amastigotes presentes en la sangre y piel. Los amastigotes no se encuentran usualmente en la circulación periférica, sino que se encuentran en la piel (Schlein *et al.*, 1992). Es en el tejido dañado, asociado con la creación de la herida, donde los macrófagos de la piel infectados con amastigotes son tomados por el insecto al alimentarse de la sangre del vertebrado (Bates & Rogers, 2004). El cambio de condiciones al moverse del hospedero mamífero a la probóscide del insecto (decremento de la temperatura, incremento de pH) dispara el desarrollo del parásito en el vector hacia la forma de promastigote procíclico, la cual es la forma replicativa en el insecto. El parásito no sólo debe evadir los mecanismos de defensa del vector, sino también soportar los cambios hostiles del intestino, el embate de las enzimas digestivas, así como escapar de la matriz peritrófica, la cual constituye uno de los grandes obstáculos y consiste en una envoltura que cubre al bolo sanguíneo que se forma en el intestino medio abdominal en las primeras 4 h post ingesta (Pimenta *et al.*, 1997).

Otro cambio importante en el parásito es la expresión de proteínas de adhesión al epitelio que impiden su eliminación durante el proceso de digestión por acción de las enzimas hidrolíticas (Nieves & Rondon, 2007). Los promastigotes procíclicos se unen a la pared del intestino medio iniciando su ciclo de división celular y posteriormente migran al

aparato bucal de la mosca, donde se diferencian en promastigotes metacíclicos, estadio infectivo del hospedero vertebrado (Figura 7) (Handman, 1999).

Además de su importancia médica, los parásitos del género *Leishmania* son también relevantes por presentar mecanismos de expresión genética atípicos, diferentes a los presentes en otros organismos eucariontes. En nuestro laboratorio estamos interesados en estudiar los mecanismos transcripcionales en este parásito. En particular, nuestro interés está enfocado en el análisis de la transcripción de la RNA Pol III, la cual sintetiza moléculas de RNA pequeñas que son esenciales para el crecimiento celular.

3.4 Transcripción en eucariontes

La transcripción es el proceso por el cual se genera una molécula de RNA a partir una secuencia de DNA. En el caso de los genes codificantes de proteínas, la molécula de RNA resultante contiene la información necesaria para generar un polipéptido. Los transcritos eucariontes necesitan someterse a algunos pasos de procesamiento para madurar y poder realizar sus funciones.

La transcripción se basa en el emparejamiento complementario de las bases. Las dos hebras de la doble hélice se separan y una de ellas actúa como una plantilla. A continuación, los nucleótidos libres se alinean en la plantilla de DNA mediante sus bases complementarias. El ribonucleótido Adenina libre se alinea con Timina en el DNA, Guanina con Citosina, Citosina con Guanina y Uracilo con Adenosina. El proceso es catalizado por la enzima RNA polimerasa que se une y se mueve a lo largo del DNA añadiendo ribonucleótidos en el RNA en crecimiento (Figura 8) (Griffiths *et al.*, 2000).

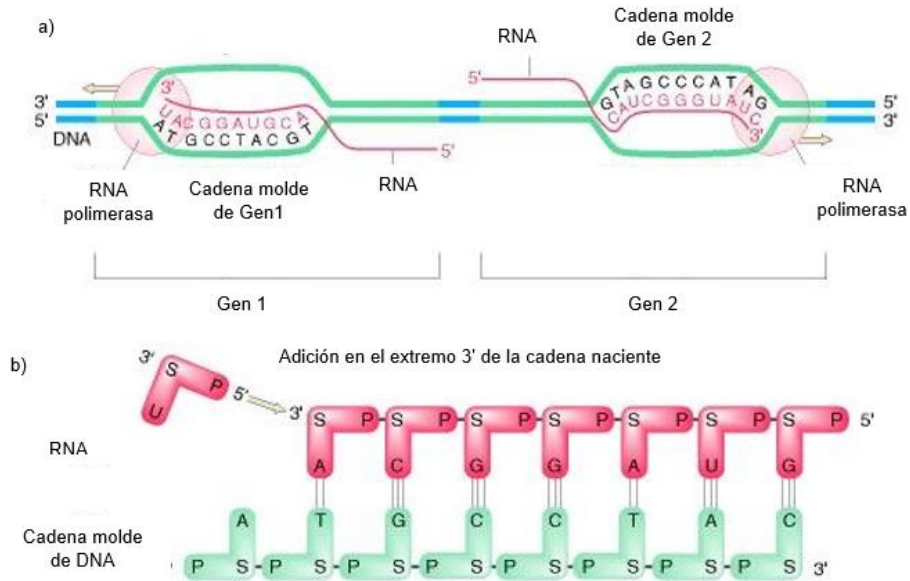


Fig. 8 Transcripción de dos genes. (a) La RNA polimerasa se mueve desde el extremo 3' de la hebra molde, creando una cadena de RNA que crece en una dirección 5' → 3' (porque debe ser antiparalela a la cadena molde). (b) Adición de un uracilo al extremo 3' de la molécula de RNA en crecimiento (5' → 3'). Tomado de Griffiths *et al.*, 2000.

Hay tres RNA polimerasas nucleares principales en eucariontes: RNA polimerasa I (RNA Pol I), RNA polimerasa II (RNA Pol II) y RNA polimerasa III (RNA Pol III). Cada una de ellas se encarga de transcribir distintos genes. Si bien la función de cada enzima RNA Pol difiere, sus estructuras están parcialmente conservadas (Figura 9). La RNA Pol I, que se encuentra en el nucléolo, se encarga de la síntesis de los RNAs ribosomales (rRNA) 18S, 28S y 5.8S. La RNA Pol II, localizada en el nucleoplasma, transcribe todos los RNAs mensajeros (mRNAs), los RNAs pequeños nucleolares (snoRNAs), algunos RNAs pequeños nucleares (snRNAs), los microRNAs (miRNAs), entre otras moléculas de RNA.

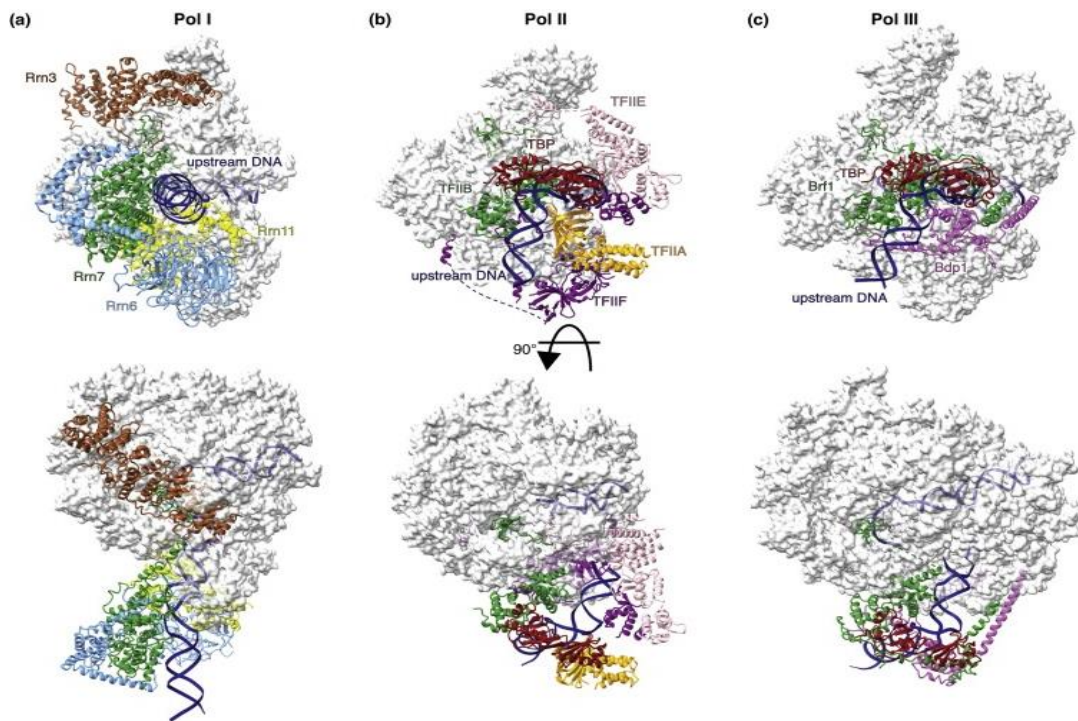


Fig. 9 Estructuras de alta resolución de los complejos de preinicio (PIC) de las RNA polimerasas I, II y III. Tomado de Hanske *et al.*, 2018.

La RNA Pol III, también encontrada en el nucleoplasma, es responsable de la síntesis de moléculas importantes como los RNAs de transferencia (tRNAs), el rRNA 5S, el snRNA U6 y otras moléculas de RNA que llevan a cabo funciones esenciales para la célula. Los tRNAs sirven como adaptadores entre los mRNAs y los aminoácidos durante la síntesis de proteínas, mientras que el rRNA 5S es un componente de la subunidad mayor de los ribosomas. El snRNA U6 participa en el proceso de *splicing* (Martin, 2001).

Además de la RNA Pol, se necesitan factores de transcripción para la síntesis del RNA. Se conoce como factor de transcripción a cualquier proteína necesaria para el inicio de la transcripción que no forma parte de la RNA Pol. Muchos factores de transcripción actúan reconociendo sitios específicos en el DNA, aunque también pueden reconocer otros factores o a la RNA Pol misma (Lewin, 2004).

En levadura, se considera que el rRNA constituye más del 80% del RNA total en la célula (Kuhn *et al.*, 2007). La RNA Pol I (Figura 10) está compuesta de 14 subunidades, 5 de ellas compartidas entre las tres RNA polimerasas (ABC27, ABC23, ABC14.5, ABC10 α y ABC10 β), dos subunidades mayores (A190 y A135) y dos subunidades compartidas con la RNA Pol III (AC40 y AC19). Dos subunidades forman un heterodímero (A14/A43), el cual tiene relación funcional con heterodímeros formados en la RNA Pol II y la RNA Pol III (B32/B16 y C17/C25, respectivamente). De las tres restantes, una subunidad (A12.2) es homóloga de la subunidad B12.6 de la RNA Pol II y de C11 de la RNA Pol III, y dos subunidades no tienen contrapartes en otras RNA polimerasas (A49 y A34.5) (Geiduschek & Kassavetis, 2001).

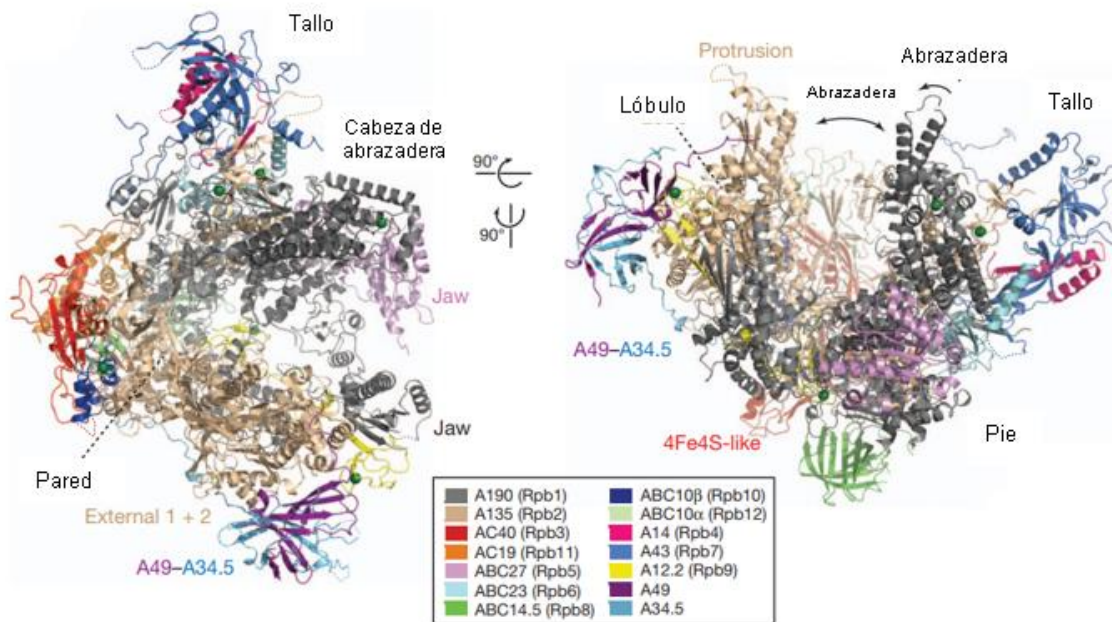


Fig. 10 Estructura cristalina de la RNA polimerasa I de levadura. Dos vistas ortogonales del modelo con diferentes dominios y elementos. El código de color para las 14 subunidades se indica en la caja con las correspondientes subunidades de la RNA Pol II entre paréntesis. Modificada de Fernández-Tornero *et al.*, 2013.

La mayoría de los eucariontes tiene una RNA Pol II con 12 subunidades (Figura 11), con una masa de aproximadamente 550 kDa (Bushnell & Kornberg, 2003).

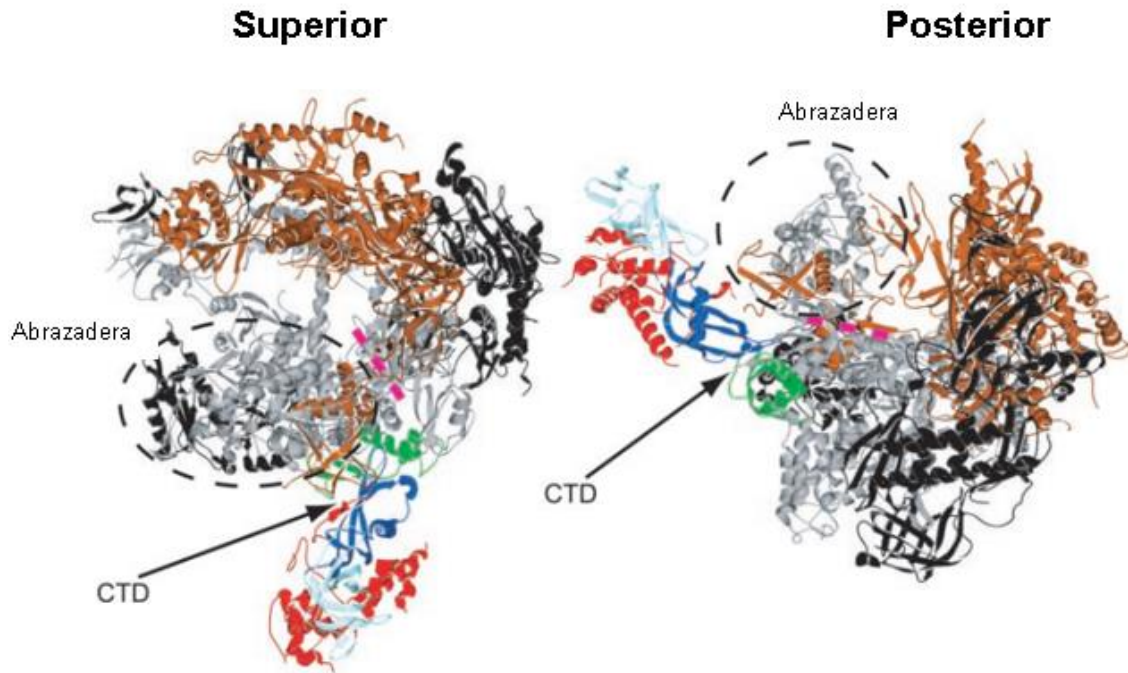


Fig. 11 Modelo tridimensional de la RNA Pol II. Se muestra una representación de la estructura completa con las 12 subunidades, vistas superior y posterior (Cramer *et al.*, 2000 y Cramer *et al.*, 2001). B220 se muestra en gris, B150 en bronce, B32 en rojo, ABC23 en verde, la mitad N-terminal de B7 que contiene el dominio RNP en azul oscuro, la mitad C-terminal de B16, que contiene el pliegue OB, en azul claro, y las subunidades restantes son negras. Se señalan las ubicaciones del *clamp* (abrazadera), el dominio de repetición carboxilo-terminal (CTD, por sus siglas en inglés) y la ranura de salida de RNA propuesta (línea de puntos rosa). Modificada de Bushnell & Kornberg, 2003.

3.4.1 RNA polimerasa III

La RNA Pol III (Figura 12) está altamente conservada en todos los organismos eucariontes en comparación con las RNA Pol I y II (Vannini & Cramer, 2012). Es la más grande de las RNA polimerasas, pues comprende 17 subunidades con un peso molecular combinado de 0.7 MDa. Además, posee subcomplejos y dominios de proteínas adicionales que tienen funciones estructurales y funcionales que muestran homología con factores de transcripción generales para la RNA Pol II (Khatter *et al.*, 2017).

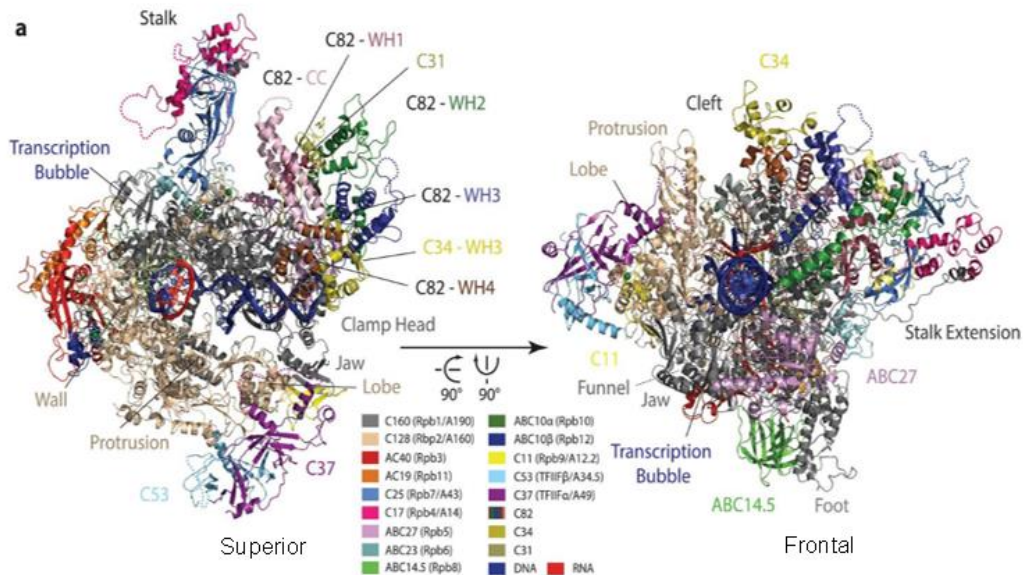


Fig. 12 Vista superior y frontal de la RNA Pol III, los elementos individuales y los dominios están etiquetados. Las líneas de puntos indican regiones que no están incluidas en el modelo. El código de color se presenta en los cuadros correspondientes. Modificada de Hoffman *et al.*, 2015.

La subunidad *core* C11, similar a TFIIS, tiene intrínseca la actividad de escisión del RNA para la corrección de errores y se requiere para la reiniciación facilitada (Landrieux *et al.*, 2006). Las subunidades C53-C37 están relacionados con TFIIF y contribuyen a la apertura del promotor, la terminación de la RNA Pol III y la reiniciación a través de interacciones con C11 (Hoffmann *et al.*, 2015; Kassavetis *et al.*, 2006). El subcomplejo C82-C34-C31, relacionado con el factor de iniciación TFIIE de la RNA Pol II, se posiciona sobre el dominio de fijación de la subunidad principal más grande, C160, y participa en el reclutamiento de la RNA Pol II a través de interacciones entre Brf1 y C34 (Hoffmann *et al.*, 2015; Khoo *et al.*, 2014).

El subcomplejo C53-C37 promueve la terminación de la transcripción al disminuir la velocidad de elongación de la RNA Pol III en la parte proximal de la señal de término (un tracto de T's localizado justo después del gen). Mientras que los dominios de dimerización

de C53-C37 interactúan con un lóbulo periférico de la RNA Pol III, algunas partes de esta interacción con el centro catalítico sugieren que pueden interactuar con la señal de terminación. Sin embargo, se desconocen los mecanismos por los cuales estas tres subunidades dirigen el núcleo de la RNA Pol III para unirse a la señal del oligo (dT) y su función en la terminación (Arimbasseri & Maraia, 2015; Arimbasseri & Maraia, 2013; Iben *et al.*, 2011; Landrieux *et al.*, 2006; Rijal & Maraia, 2013).

3.4.2 Promotores y factores de transcripción de la RNA Pol III

Los promotores de la RNA Pol III se clasifican en tres clases: el tipo I está presente en los genes 5S rRNA, que contiene una región de control (ICR) integrada por las cajas A y C y el elemento intermedio; el tipo II, presente en los genes de tRNA, está formado por las cajas A y B altamente conservadas y el tipo III, presente en una pequeña colección de genes con diversas funciones como el U6 snRNA, está formado por secuencias cortas localizadas río arriba del sitio de inicio de la transcripción (Arimbasseri & Maraia, 2016) (Figura 13).

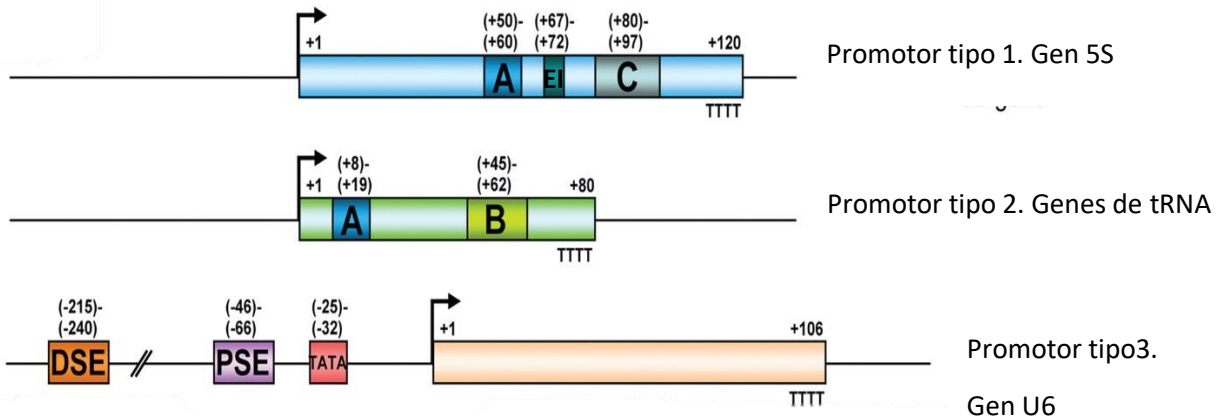


Fig. 13 Tipos de promotores de RNA polimerasa III en humanos. La flecha indica el sitio de inicio de la transcripción, y la región de T's representa la región de término de la transcripción. Modificado de Teichmann *et al.*, 2010.

Para que se pueda llevar a cabo la transcripción de moléculas de RNA de manera específica y correcta debe darse un arreglo y colaboración precisa de proteínas que comprenden a las RNA Polimerasas y a otras denominadas factores de transcripción (Huang *et al.*, 2005). Al igual que el resto de las RNA polimerasas, la RNA Pol III requiere de factores de transcripción para unirse a sus promotores, conocidos en este caso como TFIIIA, TFIIIB y TFIIIC. Cada tipo de promotor tiene requerimientos diferentes de factores de transcripción (Figura 13) (Geiduschek & Kassavetis, 2001).

TFIIIA fue el primer factor de transcripción identificado en eucariontes (Engelke *et al.*, 1980). Se une al ICR dentro del gen 5S rRNA, que se considera el primer paso en la transcripción de este gen por la RNA Pol III. TFIIIA está compuesto por nueve motivos de dedos de zinc tipo Cys2His2 (Figura 14), de los cuales los primeros tres son suficientes para la interacción de alta afinidad con el gen 5S rRNA (Clemens *et al.*, 1992). Tanto la resonancia magnética nuclear (RMN) como las estructuras cristalinas mostraron cómo TFIIIA reconoce el promotor, pero también el propio producto de rRNA 5S transcrito (Foster *et al.*, 1997, Lu *et al.*, 2003, Lu & Klug, 2007). Esta capacidad de unirse tanto al DNA molde

como al RNA producto refleja las múltiples funciones de TFIIA en la expresión del gen 5S rRNA, incluida su exportación citoplasmática (Vannini & Cramer, 2012).

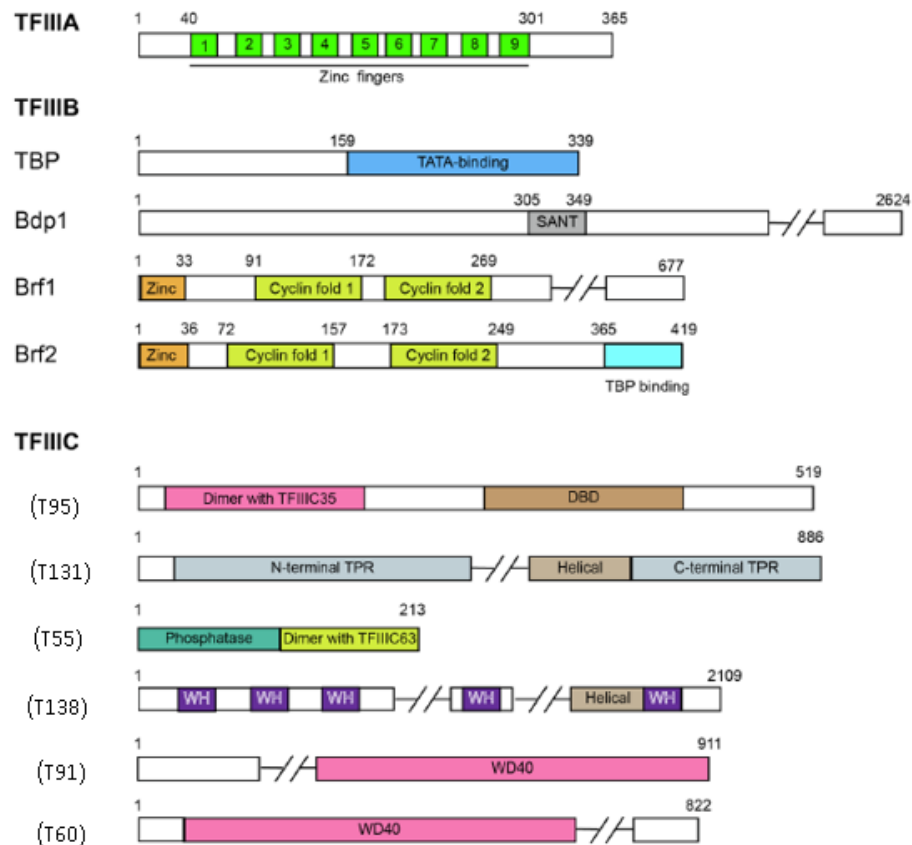


Fig. 14 Resumen esquemático de la organización de dominios de factores transcripcionales generales de la RNA Pol III de *H. sapiens*. Abreviaturas: TPR, repeticiones tetratricopeptídicas; DBD, dominio de unión a DNA; WH, hélice alada. Tomado de Wang *et al.*, 2022.

TFIIB es un complejo heterotrimérico que consta de la proteína de unión a la caja TATA (TBP), el factor 1 relacionado con TFIIB (Brf1) y la subunidad B doble prima (Bdp1). TBP se comparte entre los sistemas de transcripción Pol I, II y III (Kramm *et al.*, 2019). Brf1 contiene un dominio de cinta de Zn N-terminal y dos motivos de ciclina consecutivos que se asemejan al factor de iniciación de la transcripción TFIIB y a la subunidad del factor central Rrn7, involucrados en la transcripción de RNA Pol II y I, respectivamente (Knutson y Hahn, 2011; Naidu *et al.*, 2011). En los vertebrados, Brf2 puede ensamblar una versión de TFIIB

junto con Bdp1 y TBP, en lugar de Brf1, para regular la transcripción de los promotores de Tipo III. Bdp1 contiene un dominio SANT conservado, que se une al surco principal del DNA de doble cadena (dsDNA) e interactúa con el complejo TBP-Brf2. Además, un conector N-terminal del dominio SANT interactúa con el surco menor del DNA, lo que contribuye aún más a la estabilidad del complejo TFIIB-DNA (Gouge *et al.*, 2017).

De forma particular, TFIIB se considera como el factor central de la transcripción de la RNA Pol III al requerirse para la expresión de todos sus genes. Además, la presencia de este factor es suficiente para que ocurran múltiples rondas de transcripción de genes como los de tRNAs y el rRNA 5S *in vitro*. Se sabe que las subunidades Brf1 y Bdp1 interactúan con la RNA Pol III y que participan en la apertura del promotor.

TFIIIC comprende seis subunidades en levaduras y humanos. El subcomplejo τ A está formado por las subunidades τ 95, τ 131 y τ 55, y se une a la caja A de los promotores de RNA Pol III tipo II (Marzouki *et al.*, 1986, Schramm & Hernández, 2002). El subcomplejo τ B está formado por τ 138, τ 91 y τ 60 e interactúa fuertemente con las cajas B de los promotores de RNA Pol III (Marzouki *et al.*, 1986, Schramm & Hernández, 2002). Para hacer frente a las diversas distancias entre las cajas A y B, los subcomplejos τ A y τ B están separados por una región conectora flexible (Schramm & Hernández, 2002).

En el caso de los genes Tipo 3, que tienen elementos de control externos, el complejo proteínico activador de snRNA (SNAPc) se coloca en el PSE y al DSE se unen los activadores transcripcionales Oct1 y STAF. SNAPc participa en la transcripción mediada tanto por RNA Pol II como por RNA Pol III y está compuesto por cinco subunidades: SNAP43, SNAP45, SNAP50, SNAP190 y SNAP19 (Schramm & Hernández, 2002).

3.4.3 Reguladores de la transcripción de la RNA Pol III

En contraste con la población altamente diversa de mRNAs, los niveles de transcritos de Pol I y Pol III se controlan predominantemente de manera global. Estas dos polimerasas, a veces denominadas colectivamente "*Odd Pols*", se especializan en la síntesis de alto nivel de RNA no codificantes fundamentales y en conjunto representan más del 90% de todo el RNA celular en masa (Boguta, 2013).

Debido a que la transcripción por la RNA Pol III es un proceso que demanda energía, su actividad está estrechamente vinculada a los niveles de estrés y el estado de nutrientes de la célula. Múltiples vías de señalización controlan la actividad de la RNA Pol III en respuesta a diversas señales, aunque no se conoce todavía cómo ocurre exactamente esta regulación (Chymkowitch y Enserink, 2018). En mamíferos, la RNA Pol III está sujeta a influencias regulatorias más amplias que en la levadura. Su actividad disminuye en respuesta a la diferenciación y señales de estrés, como inanición, daño en el DNA e hipoxia (Crighton *et al.*, 2003) y aumenta en respuesta a factores de crecimiento, hormonas, nutrientes y señales inflamatorias (Graczyk *et al.*, 2015; Zhong *et al.*, 2004). Como hay un espectro de factores que modulan la actividad de la RNA Pol III tanto en levaduras como en células de mamíferos, se deben emplear los mecanismos apropiados para controlar esta enzima crucial (Graczyk *et al.*, 2015).

La transcripción de la RNA Pol III también está sujeta a una regulación global negativa. Las células de mamífero contienen un repertorio ampliado de elementos reguladores que modulan la actividad de esta RNA polimerasa, incluidos p53, Myc y Rb. En las células de levadura, las señales que reprimen la RNA Pol III convergen en un regulador negativo central, la proteína Maf1 (Upadhyya *et al.*, 2002). La función de Maf1 como represor de Pol III se conserva a lo largo de la línea evolutiva de los eucariontes.

3.4.4 Maf1 es un regulador negativo de la transcripción de la RNA Pol III

Maf1 es un represor global transcripcional de RNA Pol III que fue descubierto originalmente en *Saccharomyces cerevisiae* (Pluta *et al.*, 2001). La secuencia de la proteína Maf1 está conservada entre los eucariontes y contiene tres secuencias conservadas: los dominios A, B y C, que no se encuentran en ningún otro polipéptido (Figura 15). De acuerdo con estudios moleculares, las regiones A y B de la proteína Maf1 de humano forman un complejo con las subunidades grandes de RNA Pol III y con Brf1, respectivamente, mientras que la región C regula la estabilidad de Maf1 (Pradhan *et al.*, 2017). Hay ortólogos de Maf1 que funcionan como represores Pol III en hongos, moscas, gusanos, mamíferos, plantas y parásitos (Johnson *et al.*, 2007; Cai & Wei, 2016; McLean & Jacobs-Lorena, 2017; Rideout *et al.*, 2012; Romero-Meza *et al.*, 2017; Soprano *et al.*, 2013).

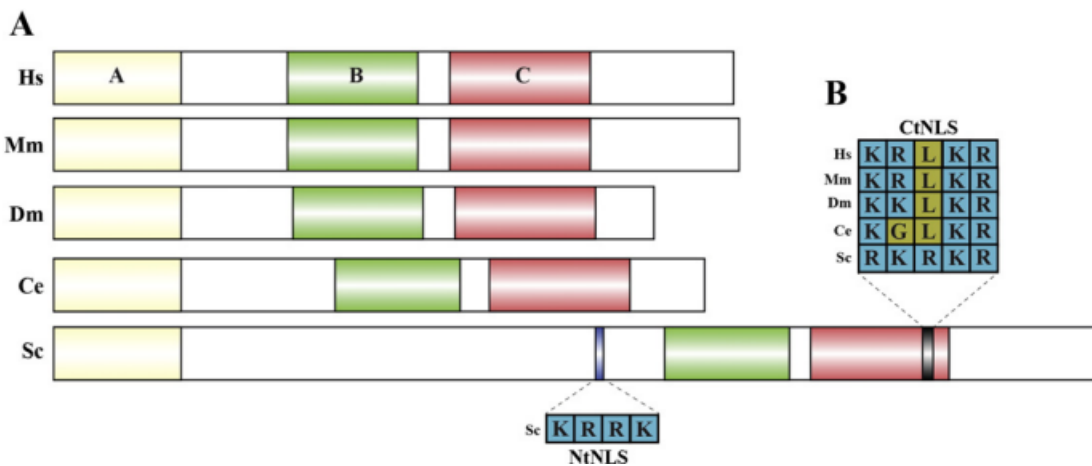


Fig. 15 Estructura de la proteína Maf1. (A) La proteína Maf1 de diferentes especies posee tres regiones conservadas: los dominios A, B y C. Pueden contener señales de localización nuclear (NLS). (B) Alineación de CtNLS. Hs, *Homo sapiens*; Mm, *Mus musculus*; Dm, *D. melanogaster*; Ce, *C. elegans*; Sc, *S. cerevisiae*. Extraído de Khanna, *et al.*, 2015.

Generalmente, Maf1 está codificado por un gen de una sola copia. La única excepción es *T. brucei*, que posee dos genes de Maf1 casi idénticos (Romero-Meza *et al.*, 2017; Reina *et al.*, 2006). Mientras que Maf1 nuclear funciona como un represor de RNA

Pol III, el papel de Maf1 en el citoplasma no ha sido explorado. Además de los parásitos, mamíferos y plantas, Maf1 es predominantemente nuclear también en varias cepas de levadura (Romero-Meza *et al.*, 2017; Soprano *et al.*, 2017; Wei *et al.*, 2009). En este organismo Maf1 contiene dos secuencias de localización nuclear (NLS): una cerca del extremo N-terminal (NtNLS) y otra cerca del extremo C-terminal (CtNLS) de la proteína (Figura 15). Aunque no se predice la presencia de NLS en Maf1 de eucariontes superiores, la secuencia de CtNLS muestra alta conservación entre diferentes especies (Figura 15) (Khanna *et al.*, 2015).

Varios estudios han indicado que la represión de la transcripción mediada por Maf1 no se limita a la RNA Pol III. De hecho, en humanos, Maf1 se ha propuesto como represor de las tres RNA polimerasas al inhibir la expresión de TBP (Johnson *et al.*, 2007). Fue demostrado que Maf1 y el factor de transcripción Elk-1 se unen recíprocamente al promotor del gen de TBP y que la unión de Maf1 se correlaciona con la disminución de la expresión de TBP. Asimismo, la represión dirigida por Maf1 de genes blanco de RNA Pol II de humano (PTEN y FASN) afecta procesos fisiológicos, como la reproducción y la homeostasis de lípidos, además de ser clave en procesos de carcinogénesis (Khanna *et al.*, 2015).

Otros genes humanos de RNA Pol II, como CDKN1A y GDF15, también están reprimidos por Maf1 de manera dependiente de la RNA Pol III, y se ha sugerido que Maf1 es una proteína de unión directa al DNA en secuencias específicas (Lee *et al.*, 2015). En *T. brucei*, Maf1 también está asociado con la región promotora del gen de la prociclina, transcrito por RNA Pol I, y con el gen del RNA SL, transcrito por RNA Pol II, por lo que quizá juegue un papel en su regulación (Romero-Meza *et al.*, 2017). No está claro, sin embargo, cómo una proteína ácida como Maf1 puede unirse al DNA. Un reciente estudio de todo el genoma (Orioli *et al.*, 2016) usando el método *DamIP-seq* mostró que es poco probable que Maf1 de humano se una a los genes transcritos por RNA Pol II. A la luz de lo anterior, y teniendo en cuenta los resultados mostrando que Maf1 de levadura no tiene actividad

intrínseca de unión al DNA (Desai *et al.*, 2005), el mecanismo subyacente a la regulación dependiente de Maf1 de los genes transcritos por RNA Pol II requiere más investigación.

3.4.5 Modificaciones post-traduccionales de Maf1

Varios estudios revelaron que la actividad de Maf1 en mamíferos está regulada a través de modificaciones postraduccionales, como fosforilación y ubiquitinación, en respuesta a estrés y disponibilidad de nutrientes (Moir & Willis, 2013; Willis & Moir, 2017). Los residuos fosforilados se encuentran en una región interna, poco conservada. Maf1 desfosforilado se acumula en el núcleo y se une a RNA Pol III (Moir & Willis, 2013).

En levadura, Maf1 es el único regulador negativo de RNA Pol III que actúa como efector de varias vías de señalización (Roberts *et al.*, 2003). Además de la regulación a la baja que normalmente se produce en la fase estacionaria, se requiere a Maf1 para la represión de RNA Pol III después de tratamiento con rapamicina, inanición, defectos en la secreción celular, estrés por oxidación y replicación (Oficjalska-Pham *et al.*, 2006; Roberts *et al.*, 2006; Boissard *et al.*, 2009; Upadhyay *et al.*, 2002; Nguyen *et al.*, 2010; Huber *et al.*, 2009).

La principal proteína que desfosforila a Maf1 es la fosfatasa 4 (PP4), que interactúa directamente con Maf1 mediante su subunidad catalítica llamada pph3 (Oler & Cairns, 2012). Sin embargo, la fosfatasa PP2A también está involucrada (Oficjalska-Pham *et al.*, 2006). Los mecanismos moleculares que desencadenan la actividad de Maf1 en respuesta a las diferentes vías de señalización sólo se entienden parcialmente hasta ahora. En condiciones favorables de crecimiento, Maf1 se fosforila y no puede interactuar con RNA Pol III. Esta fosforilación de Maf1 de levadura está mediada por Sch9 (Huber *et al.*, 2009), proteína cinasa A dependiente de AMP (PKA), TORC1 y la cinasa de caseína II (CK2) (Wei *et al.*, 2009; Moir *et al.*, 2006; Graczyk *et al.*, 2011). Sch9 y PKA parecen ser las principales

cinastas para Maf1 de levadura, pues la inactivación de todos los sitios potenciales de fosforilación de Sch9 (que son al mismo tiempo los sitios de reconocimiento de PKA), promueve la localización nuclear de Maf1 y aumenta la asociación con la RNA Pol III (Huber *et al.*, 2009; Graczyk *et al.*, 2011). Notablemente, Sch9 es fosforilada y activada por TORC1; de este modo, TORC1 podría potencialmente controlar a Maf1 de manera indirecta (Figura 16).

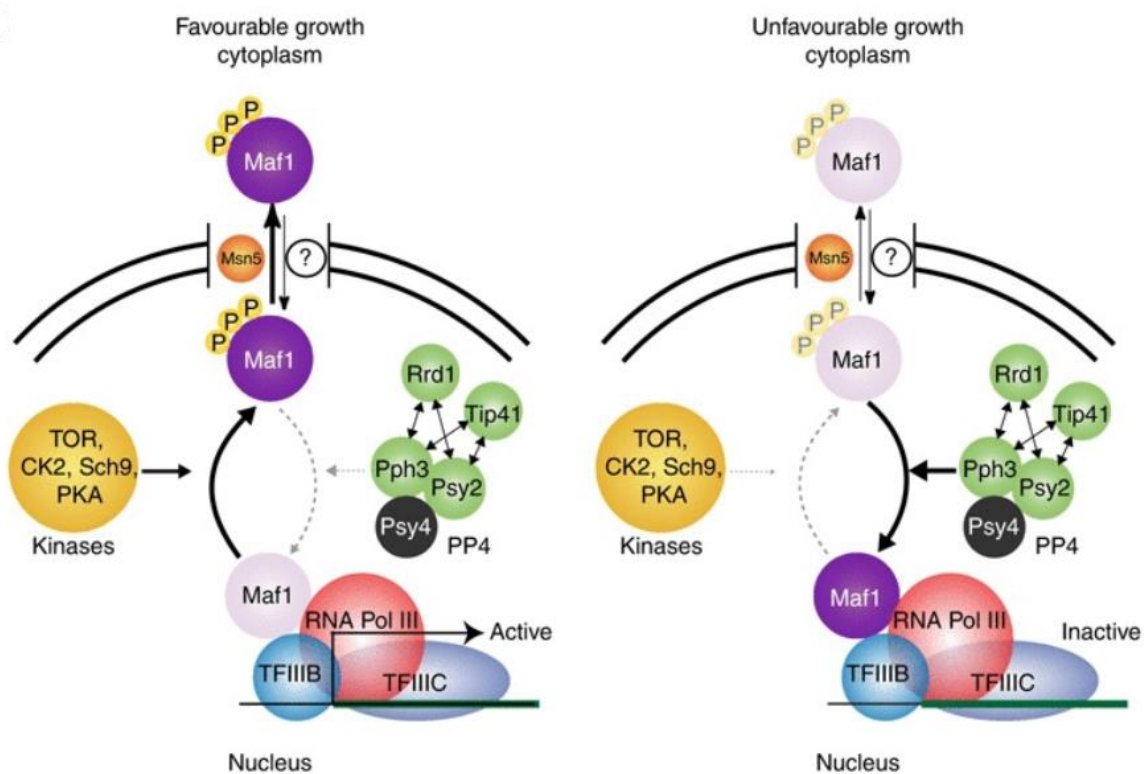


Fig. 16 Mecanismo de acción de Maf1. En condiciones favorables de crecimiento (panel izquierdo), la actividad de las cinasas que interactúan con Maf1 predomina sobre la actividad de PP4 y otras fosfatasa, lo que inhibe la interacción Maf1-Pol III y permite que RNA Pol III permanezca activa. Maf1 fosforilado se exporta al citoplasma desde el núcleo de manera dependiente de Msn5. Maf1 hiperfosforilado se representa con varias P, mientras que Maf1 hipofosforilado se representa sin P. En condiciones donde Maf1 está predominantemente fosforilado (panel izquierdo), la tasa de exportación de Msn5 es alta, lo que lleva a una localización principalmente citoplasmática. Maf1 de color claro representa un grupo pequeño o decreciente de Maf1, debido a la acción de las cinasas en condiciones favorables (panel izquierdo) o de la fosfatasa PP4 en crecimiento desfavorable (panel derecho). En cuanto a PP4, se requieren las subunidades de color verde, mientras que la subunidad de color negro no se requiere. En el diagrama, las diversas cinasas se representan en el núcleo, aunque no se ha determinado su lugar de acción. Tomado de Oler & Cairns, 2012.

La cinasa TOR de mamíferos (mTOR) se asocia con genes de tRNA a través de su interacción con TFIIC (Kantidakis *et al.*, 2010). La fosforilación de Maf1 mediada por mTOR contribuye funcionalmente a la regulación de la actividad de represión de Maf1 en la cromatina (Michels *et al.*, 2010; Shor *et al.*, 2010).

En levadura, Maf1 también es blanco de la cinasa CK2, que está enriquecida mayormente en genes de tRNA en comparación con otros genes de RNA Pol III (Graczyk *et al.*, 2011; Moir *et al.*, 2012). En otro estudio se demostró que la fosforilación de Maf1 por CK2 no es necesaria para la recuperación de la actividad de la RNA Pol III posteriormente a las condiciones de represión (Moir *et al.*, 2012). CK2 es una cinasa con actividad constitutiva y, además de Maf1, fosforila a otros componentes de la maquinaria de RNA Pol III en levaduras y humanos, como las subunidades de TFIIIB y el factor SNAP190 (Ghavidel & Schultz, 2001; Gu *et al.*, 2007).

Otra modificación postraduccional que es de gran importancia en la regulación de Maf1 es la sumoilación, que consiste en la adición de una pequeña proteína (de un peso molecular de 11 kDa) llamada SUMO (*small ubiquitin-related modifier*) que puede afectar la función de los factores de transcripción tanto positiva como negativamente por múltiples mecanismos (Rosonina *et al.*, 2017). Varios sitios de sumoilación han sido mapeados en TFIIC, SNAPc, TFIIIB y la RNA Pol III. La gran cantidad de sitios de modificación (157 sitios mapeados en 23 proteínas) plantea desafíos significativos para futuros estudios funcionales (Chymkowitch *et al.*, 2015). Maf1 de humano está sumoilado en la lisina 35 y en experimentos en los que se generó una mutante de esta lisina se vio disminuida la interacción de Maf1 con la RNA Pol III, lo que se tradujo en una reducción en su función represiva (Rohira *et al.*, 2013). Sin embargo, mientras que la función de Maf1 parece verse afectada por sumoilación, no hay evidencia que indique un papel regulador directo. No obstante, recientemente se observó que la ubiquitina ligasa E3 de cullina 2 (CUL2) regula críticamente la ubiquitinación de Maf1 y controla su estabilidad y la posterior transcripción

dependiente de RNA Pol III. El análisis de los cambios fenotípicos como consecuencia de la modulación de la expresión de las proteínas CUL2 o Maf1 reveló cambios en la reorganización del citoesqueleto de actina y sensibilidad alterada a la apoptosis inducida por doxorrubicina (Wang, *et al.*, 2019).

3.4.6 Localización celular de Maf1

Maf1 se transloca entre el núcleo y el citoplasma como muchos activadores transcripcionales y represores que regulan las respuestas de nutrientes y estrés en levadura (Chong *et al.*, 2015). La distribución de Maf1 entre estos compartimentos está determinada por varios factores que incluyen: (a) una fuerte NLS que se inhibe por la fosforilación de la región reguladora, atribuida a isoformas de PKA y Sch9 localizadas en el citoplasma; (b) la exportina Msn5, que devuelve a Maf1 al citoplasma después de su fosforilación en el núcleo. La actividad de Maf1 en la levadura está regulada a través de su distribución dependiente del estado de fosforilación entre el núcleo y el citoplasma (Boguta & Graczyk, 2011). Mientras que Maf1 nuclear funciona como un represor de la RNA Pol III, su papel en el citoplasma no ha sido explorado hasta ahora. En otros organismos, como mamíferos y plantas, Maf1 es predominantemente nuclear (Romero-Meza *et al.*, 2017; Soprano *et al.*, 2017; Wei *et al.*, 2009; Kantidakis *et al.*, 2010).

A pesar de que en un inicio se pensó que al mutar a Msn5, Maf1 ya no podría volver al citoplasma y estaría reprimiendo constitutivamente a la RNA Pol III, los experimentos mostraron que Maf1 en efecto se mantenía en el núcleo, pero no ejercía su acción represora. Por ello, se concluyó que Maf1 comienza a fosforilarse en el núcleo, lo cual la inactiva y facilita su interacción con Msn5, para poder viajar nuevamente hacia el citoplasma (Wei, *et al.*, 2009).

3.5 Expresión y control génico en *Leishmania*

Además de su relevancia médica, *Leishmania* y otros tripanosomas son biológica y molecularmente importantes debido a los mecanismos de expresión génica inusuales que exhiben, incluida la transcripción policistrónica y el procesamiento de mRNAs por *trans-splicing* (Martínez-Calvillo *et al.*, 2018). En *Leishmania*, como en otras especies de la familia *Trypanosomatidae*, los genes se organizan en grandes grupos dentro de una misma cadena de DNA denominados unidades policistrónicas (Figura 17) (Martínez-Calvillo *et al.*, 2010). Esta organización se observó por primera vez en el cromosoma 1 de *L. major*, que contiene 85 genes organizados en dos unidades policistrónicas distintas (Myler *et al.*, 1999). Este tipo de disposición de genes resulta en una modalidad transcripcional exclusiva de los tripanosomátidos: la transcripción a partir de promotores policistrónicos que son muy escasos en el genoma. La RNA Pol II inicia la transcripción en las regiones de cambio de la hebra (SSR), río arriba del primer gen de un *cluster* génico, generando transcritos policistrónicos (El-Sayed *et al.*, 2005; Bhattacharya *et al.*, 2002). La mayoría de los cromosomas tiene al menos dos unidades policistrónicas que pueden converger (confluir en un punto común) o divergir (ir en direcciones opuestas) transcripcionalmente.

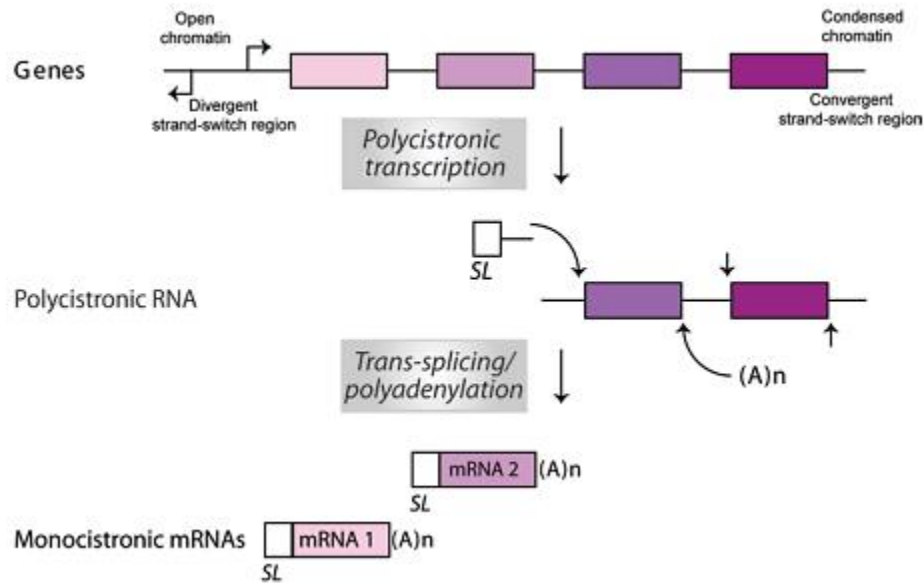


Fig. 17 Representación esquemática de la maduración del mRNA mediante *trans-splicing* y poliadenilación. La transcripción se inicia en las regiones de cambio de cadena divergentes (cromatina abierta) y termina en regiones de cambio de cadena convergentes (cromatina condensada). La composición de las variantes de histonas en ambas regiones es diferente. Los grupos de genes, que codifican proteínas de funciones no relacionadas, primero se transcriben de manera policistrónica y luego se procesa mediante *trans-splicing* acoplado a mecanismos de poliadenilación, dando lugar a mRNAs monocistrónicos maduros. Las cajas representan cuatro diferentes secuencias de codificación. (A)_n representa la cola poli(A). Tomado de Docampo, *et al.*, 2011.

A diferencia de la mayoría de los organismos, *Leishmania* (y otras especies de tripanosomátidos) perdieron o no adquirieron la capacidad de regular el inicio de la transcripción de genes individuales (Bringaud *et al.*, 2007). Además, en estos organismos la regulación postranscripcional parece ser más importante que el control transcripcional (Ullu *et al.*, 2004). Los genes en las unidades policistrónicas no codifican proteínas con funciones relacionadas y todos se transcriben en el mismo nivel. Sin embargo, los genes que se encuentran en la misma unidad pueden expresar diferentes concentraciones de mRNA maduro o pueden expresarse sólo en una etapa de desarrollo, lo que evidencia la importancia de la regulación génica a nivel postranscripcional (Martínez-Calvillo *et al.*, 2010).

El *trans-splicing* se observó por primera vez en los tripanosomátidos, donde todos los mRNA para glicoproteínas variables de superficie que se aislaron de *T. brucei* tenían una secuencia consenso de 39 bases en el extremo 5', conocida como RNA *spliced leader* (SL) o mini-exón. Posteriormente, se descubrió que todos los mRNAs de tripanosomátidos maduran a través del *trans-splicing* (Liang *et al.*, 2003; Boothroyd & Cross, 1982). El dinucleótido AG (sitio aceptor del miniexón) y un tracto de polipirimidinas (en el sitio de corte y empalme 3') son las secuencias más importantes y conservadas involucradas en el *trans-splicing*. Esta reacción se puede dividir en dos pasos, similares a las dos reacciones de transesterificación del *cis-splicing* (Figura 18), y la lleva a cabo un complejo de ribonucleoproteínas (RNP) denominado empalmosoma. Estos RNP están formados por los snRNA U1, U2, U4, U5 y U6, cada uno asociado con proteínas Sm, lo que permite transportar los snRNA al núcleo y aumentar su eficiencia en el reconocimiento del pre-mRNA.

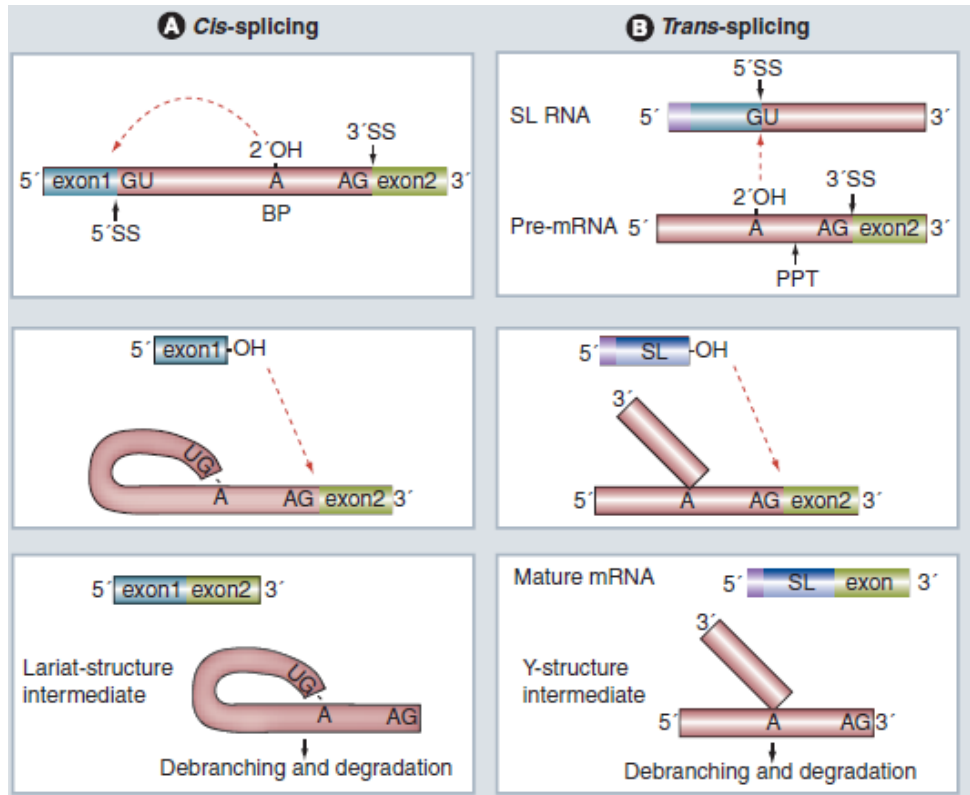


Fig. 18 Mecanismo de *cis-splicing* (A) y *trans-splicing* (B). Se presentan los dos pasos de transesterificación. Se indican los sitios de *splicing* (SS) 5' (GU) y 3' (AG), así como el punto de ramificación (A) y el tracto de polipirimidinas (PPT). SL: *Spliced-leader*. Tomado de Michaeli, 2011.

3.5.1 Promotores en tripanosomátidos

La transcripción en los tripanosomátidos muestra una variación significativa en comparación con la expresión de otros genes eucarióticos. Algunos ejemplos de esto son la escasez de promotores de RNA Pol II y la transcripción de genes codificadores de proteínas por parte de RNA Pol I en *T. brucei*; este es el caso de dos proteínas, la glicoproteína variable de superficie (VSG) y la prociclina, que recubren la superficie del parásito en dos etapas diferentes (Martínez-Calvillo *et al.*, 2010). Por otro lado, la transcripción de los snRNAs depende de las cajas A y B contenidas en tRNAs o genes tRNA-like (secuencias estructuralmente relacionadas con tRNAs) (Rojas-Sánchez *et al.*, 2016). Los promotores que se han caracterizados ampliamente son los de las unidades de

rRNA (transcritos por RNA Pol I) y los genes de RNA SL (transcritos por RNA Pol II) (Campbell *et al.*, 2003; Martínez-Calvillo *et al.* 2010). Aunque el rRNA más grande (28S) se fragmenta para generar seis moléculas de rRNA independientes (24 α , 24S β , S1, S2, S4 y S6), la transcripción de las unidades de rRNA en los tripanosomátidos es similar a la de otros eucariontes. (Martínez-Calvillo *et al.*, 2001). Al igual que en otros organismos, el promotor del rRNA de *T. brucei* está formado de cuatro dominios. Sin embargo, en algunas especies de *Leishmania* el promotor de rRNA es mucho más pequeño. Por ejemplo, se han observado tres regiones funcionalmente importantes en *L. donovani*: -69 a -57, -46 a -27 y -6 a +4 (Zomerdijk *et al.*, 1991; Yan *et al.*, 1999). Las regiones promotoras de la prociclina se han caracterizado ampliamente, incluidas cuatro regiones, y se ha encontrado que son muy similares a las de los genes de rRNA (Martínez-Calvillo *et al.*, 2010). Además, sus elementos promotores son intercambiables con los del promotor del rRNA. En contraste, los promotores de las VSG constan de sólo dos elementos que se extienden hasta la posición -67 (Landeira & Navarro, 2007). Cada una de las aproximadamente 200 copias del gen del SL RNA contiene su propia región promotora, la cual se encuentra río arriba del gen. Éstas consisten en un elemento bipartito (un dominio alrededor de la base -60 y otro cerca de la base -30) y un elemento localizado cerca de la región de inicio de la transcripción. Todos los genes del SL RNA poseen un tracto variable de timinas como señal de término de la transcripción (Gilinger & Bellofatto, 2001).

En lo que respecta a la transcripción de genes que codifican para proteínas se sabe muy poco. Como se ha mencionado, los mRNAs son transcritos juntos en un RNA policistrónico largo, lo cual ha dificultado el estudio de sus promotores, puesto que el inicio de la transcripción puede estar a miles de bases río arriba del inicio del gen. No se ha resuelto cómo la RNA Pol II inicia la transcripción de las unidades en tándem; el modelo actual favorece las modificaciones de la cromatina que inducen la transcripción en lugar de los promotores específicos de secuencia. En *L. major* se observó que la transcripción de

todo el cromosoma 1 inicia de manera bidireccional únicamente en la región intergénica que separa las dos unidades policistrónicas presentes en el cromosoma (entre los genes 29 y 30) (Martínez-Calvillo *et al.*, 2003). En una región de 100 pb fueron identificados varios sitios de inicio de la transcripción para ambas unidades policistrónicas. Estudios similares llevados a cabo en el cromosoma 3 de *L. major* confirmaron que la transcripción inicia únicamente río arriba del primer gen de una unidad policistrónica (Martínez-Calvillo *et al.*, 2004). En estos análisis no se encontraron dominios típicos de la RNA Pol II para el inicio de la transcripción u otras secuencias conservadas que pudieran fungir como promotores. Sin embargo, en estudios realizados recientemente con *T. brucei* se han propuesto promotores centrales mediante la caracterización funcional de los picos identificados de RNA Pol II por secuenciación de inmunoprecipitación de cromatina (ChIP-seq) (Cordon-Obras *et al.*, 2022). Dos promotores distintos fueron ubicados entre unidades policistrónicas divergentes, cada uno de los cuales impulsa la transcripción unidireccional. El análisis de otros promotores sugiere que el inicio de la transcripción está regulado y que los promotores están concentrados o dispersos. Estos hallazgos en *T. brucei* sugieren que, además de las modificaciones de la cromatina, la regulación de la expresión génica basada en motivos promotores está profundamente conservada entre los eucariontes (Cordon-Obras *et al.*, 2022).

En lo referente a los promotores de la RNA Pol III, se han identificado los elementos del promotor tipo I (Cajas A y C) del rRNA 5S, pero éstos no han sido analizados funcionalmente (Moreno-Campos *et al.*, 2016). Por otro lado, también se observó que la secuencia de las cajas A y B del promotor tipo 2 de los tRNA se encuentra muy conservada en *L. major*, *T. brucei* y *T. cruzi* (Padilla-Mejía *et al.*, 2009). Asimismo, en *T. brucei* han sido caracterizados los promotores de algunos snRNA. Estos genes tienen un gen de tRNA contiguo, hacia el extremo 5' y localizado en la cadena opuesta de DNA. Sorprendentemente, las cajas A y B del tRNA vecino son esenciales para la transcripción

del snRNA. En la mayoría de los casos, se requieren también elementos regulatorios intragénicos del snRNA para lograr un nivel de expresión óptimo (Nakaar *et al.*, 1997; Das *et al.*, 1988). Aunque no es muy claro cómo las cajas A y B del tRNA promueven la expresión del snRNA, se ha propuesto un modelo de “loop de DNA” en el que los sitios de inicio de la transcripción de los genes de snRNA y del tRNA son aproximados de manera tal que el factor TFIIB facilita la llegada de la RNA Pol III en ambos sitios (Nakaar *et al.*, 1994 & 1995; Ben-Shlomo *et al.*, 1997). Recientemente se reportó que la transcripción del snRNA U2 de *L. major* también depende de cajas A y B localizadas en un tRNA-like y un tRNA asociados a éste (Rojas-Sánchez *et al.*, 2016).

El estudio de la transcripción y particularmente de complejos proteínicos como factores implicados en este proceso en tripanosomátidos se ha favorecido con el desarrollo de técnicas moleculares, como la purificación por afinidad en tándem (Schimanski *et al.*, 2005), la cual se describe a continuación.

3.6 Purificación de complejos proteínicos en tripanosomátidos

La técnica molecular de purificación por afinidad en tándem (TAP) es un método ampliamente utilizado para la purificación de complejos proteínicos específicos, incluidos factores de transcripción y RNA Pols (Brown *et al.*, 2006; Collins & Choudhary, 2008; Takebe *et al.*, 2007). Consiste en la fusión de un péptido de extracción, llamado TAP-tag, con una secuencia de proteína diana. La etiqueta TAP consta de dos dominios de unión a proteína A de *S. aureus* y un péptido de unión a calmodulina (CBP) separados por una secuencia sensible a la proteasa TEV. Una vez que se obtiene el plásmido con la fusión, se introduce en las células del organismo en estudio, efectuando así la expresión de la proteína recombinante. Una vez dentro de la célula, la proteína marcada es libre de interactuar con las proteínas de su complejo. A continuación, se obtienen extractos celulares a partir de los

cuales la proteína diana y sus proteínas interactuantes se separan mediante cromatografías de afinidad utilizando matrices con IgG y calmodulina (Puig *et al.*, 2001). A continuación, las proteínas purificadas se analizan mediante SDS-PAGE seguido de su identificación por espectrometría de masas.

Recientemente se modificó la bandera TAP, reemplazando el dominio de CBP con una región de proteína C de hígado humano (Prot C). Esta nueva combinación de epítosos purificados se denominó etiqueta PTP (Figura 19).

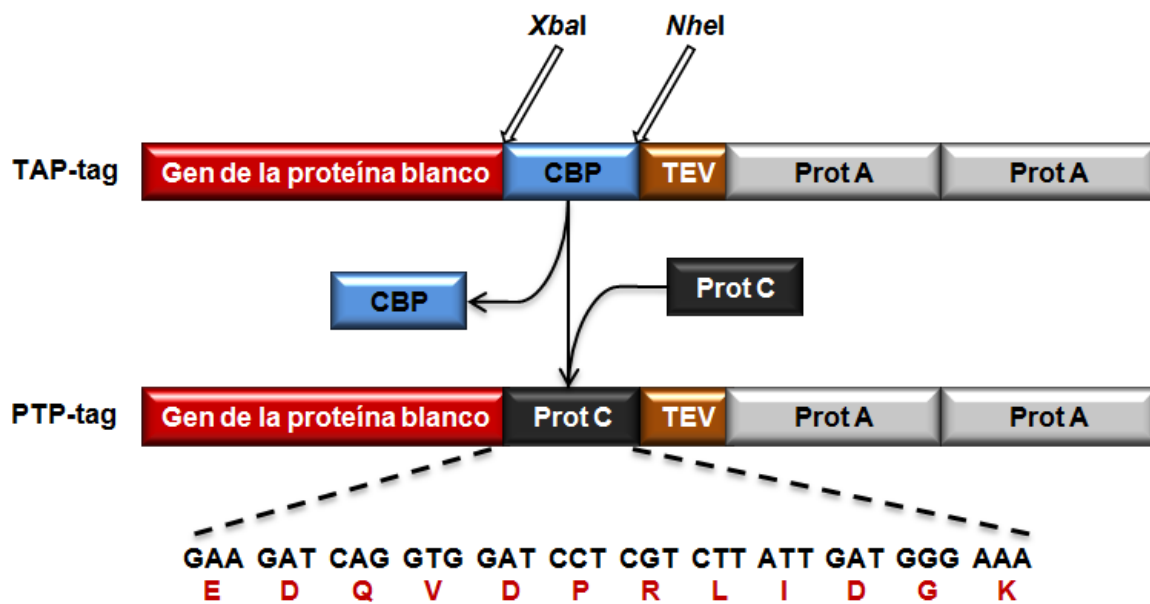


Fig. 19 Bandera de extracción PTP. El esquema muestra la diferencia estructural entre los péptidos de extracción TAP y PTP, la cual consiste en el cambio de la secuencia de unión a calmodulina (CBP) por un dominio de la proteína C humana (Prot C). Tomada de Flores, 2011.

Se ha observado que la etiqueta PTP tiene ventajas sobre la etiqueta TAP para la purificación de complejos proteínicos al eliminar la ineficiencia de la cromatografía de afinidad con calmodulina y al proporcionar una forma alternativa de elución usando el péptido ProtC, en los casos en los que EGTA inactive la función de la proteína (Schimanski *et al.*, 2005). Esta técnica de purificación por afinidad en tándem, usando la bandera PTP,

ha sido ampliamente utilizada en *T. brucei* para aislar complejos transcripcionales (Denningerm & Rudenko, 2014; Koch, 2016 y Schimanski *et al.*, 2005).

3.7 Antecedentes directos

En *Leishmania* y otros tripanosomátidos se sabe muy poco sobre la transcripción de la RNA Pol III, ya que a la fecha han sido caracterizados pocos promotores y factores de transcripción. Los promotores de los genes de rRNA 5S y tRNAs no han sido caracterizados, pero mediante análisis de secuencias se demostró que tienen las regiones de control interno típicas de otros eucariontes. De los tres factores de transcripción esenciales en eucariontes, se ha identificado TFIIIB en tripanosomátidos con los homólogos de sus subunidades TBP, BRF1 y BDP1. Además, se caracterizó BRF1 de *L. major*, donde la subunidad Tau131 de TFIIIC se identificó como uno de sus socios interactuantes (Florencio- Martínez, *et al.*, 2021).

Anteriormente, en nuestro laboratorio se generaron líneas celulares de *T. brucei* en las que es posible inducir la degradación del mRNA de Maf1 mediante RNA de interferencia. Se encontró que además de influir en el crecimiento celular, Maf1 de *T. brucei* reprime la actividad transcripcional de la RNA Pol III de los genes de tRNA y U2 snRNA por asociación con sus promotores (Romero-Meza *et al.*, 2017). En nuestro laboratorio también hemos iniciado el estudio de Maf1 en *L. major* (LmMaf1) generando la línea celular LmMaf1-PTP, la cual expresa la proteína recombinante Maf1 fusionada al péptido de extracción PTP (Hernández, 2019). Ensayos preliminares de purificación por afinidad en tándem con dicha línea celular en condiciones óptimas de crecimiento revelaron la posible interacción de LmMaf1 con proteínas ligadas al proteosoma, la biogénesis ribosomal y la traducción, así como la vía de MAPK (Hernández, 2019). En este trabajo se continuó con el análisis de las

interacciones proteicas de LmMaf1 en células creciendo activamente. Además, se llevaron a cabo ensayos con células sometidas a choque térmico, considerando que en otros organismos se ha reportado que Maf1 tiene mayor asociación con la maquinaria transcripcional en condiciones desfavorables de crecimiento (Moir & Willis, 2013; Boguta, 2013).

4 Objetivos

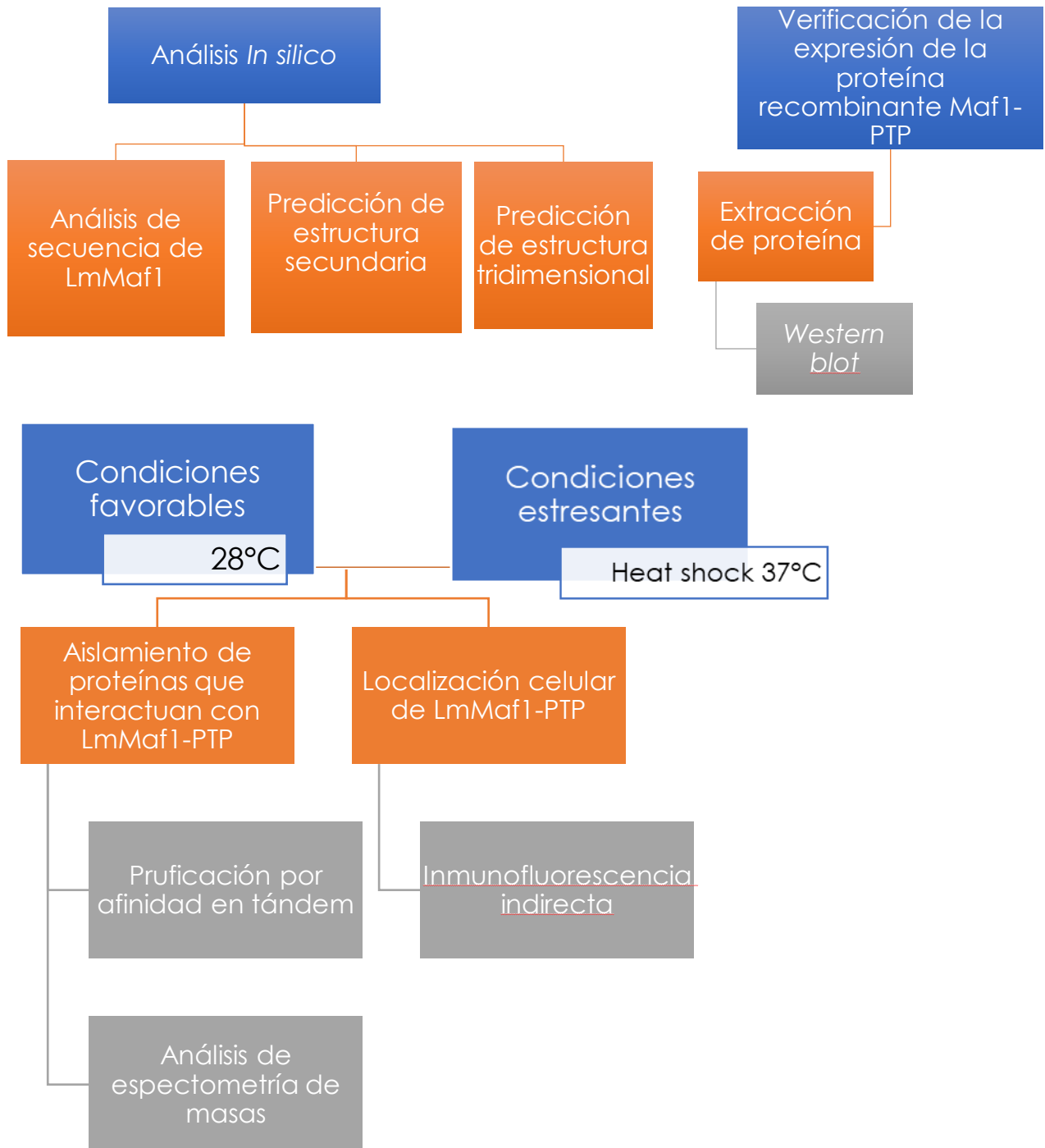
4.1 Objetivo general

Estudiar a Maf1 en promastigotes de *L. major* creciendo activamente y en condiciones de estrés.

4.2 Objetivos particulares

- Comparar la secuencia y estructura de Maf1 de *L. major* con la proteína ortóloga de *H. sapiens*.
- Determinar las interacciones proteínicas de Maf1 en células bajo condiciones favorables y desfavorables de crecimiento celular.
- Analizar la localización celular de Maf1 en condiciones favorables (28°C) y condiciones de estrés por calor (37°C) en promastigotes transgénicos.

5 Estrategia experimental



6 Materiales y Métodos

6.1 Análisis *in silico*

La secuencia del genoma de *L. major* se encuentra disponible en TriTrypDB versión 27 (<http://tritrypdb.org/tritrypdb/>). Se hizo el análisis de Maf1 comparando los ortólogos de *L. major* y humano (PDB: 3nr5) usando el programa Clustal Ω (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>). Las secuencias de nucleótidos y aminoácidos obtenidas se analizaron con las herramientas bioinformáticas disponibles en Phyre2 (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/html/page.cgi?id=index>). Para la predicción de la estructura secundaria y el modelado tridimensional por homología se utilizó el programa PyMOL 2.2. La predicción de sitios de fosforilación se hizo con el servidor PhosTryp (<http://phostryp.bio.uniroma2.it>). Se utilizó el programa GPS-SUMO (<http://sumosp.biocuckoo.org/citation.php>) para la predicción de los probables sitios de sumoilación. La información sobre las interacciones de proteínas con Maf1, con evidencia física y genética, se obtuvo en el servidor de The Biogrid (<https://thebiogrid.org/>).

6.2 Cultivo de promastigotes

Se crecieron cultivos de promastigotes de *L. major* a una densidad inicial de 5×10^6 células/ml a 28°C en medio líquido BM (medio M199 GIBCO® 0.5x, bicarbonato de sodio 1.1 $\mu\text{g/ml}$, infusión de cerebro corazón 0.25x, suero fetal bovino inactivado (SFB) 10%, HEPES 40 mM, hemina 0.01 mg/ml, biotina 2 mg/l y penicilina (100 U/ml)-estreptomicina 0.1 mg/ml). Los cultivos fueron resembrados dos veces, una vez que alcanzaban una densidad entre 25 y 30×10^6 células/ml (fase media logarítmica).

El conteo de los organismos se realizó cada 24 h mediante una dilución 1:10 (50 µl del cultivo en 450 µl de PBS-formaldehído al 2%). Se colocaron 10 µl de dicha dilución en una cámara de Neubauer y se contó el número de células dentro de los cuadros en diagonal de cada cuadrante de la esquina. La suma total de células se dividió entre cuatro y posteriormente se multiplicó por 10^5 para obtener el número de parásitos por ml de cultivo.

Posteriormente, las células se sembraron utilizando distintos tiempos de estrés por calor, subiendo la temperatura de distintos cultivos, dando un choque térmico de 28°C directamente a 37°C por 2, 4, 6 y 24 h. Se monitoreó por triplicado el crecimiento de la línea celular LmMaf1-PTP sometida a estrés por calor a la par de un control de esta línea recombinante sin condiciones de estrés y un control de células *Wild Type (wt)* de *L. major* strain *Friedlin*, igualmente crecido en condiciones óptimas y en condiciones de estrés por calor a distintos tiempos.

6.3 Viabilidad celular de promastigotes de *L. major*

Para calcular la viabilidad celular se agregaron 100 µl de una solución de azul de tripano al 0.4% suspendido en PBS a una alícuota de promastigotes de la línea celular preparada y contada como se explica anteriormente para determinar la densidad celular. Si las células absorbieron el azul de tripano, se las consideró inviables. Posteriormente se calculó el porcentaje de células viables usando la siguiente fórmula: % de células viables = $1.00 - (\text{número de células azules} \div \text{número de células totales}) \times 100$.

6.4 Verificación de la expresión de la proteína recombinante LmMaf1-PTP

El análisis de la expresión de la proteína recombinante LmMaf1-PTP se confirmó mediante análisis tipo *Western blot*. Se realizó la extracción de proteínas empleando el *buffer* RIPA. Inicialmente se partió de una muestra de 5×10^8 células de las líneas celulares LmMaf1-PTP y *L. major wt*, las cuales fueron centrifugadas a 4,000 rpm por 10 min y lavadas con 500 μ l de PBS frío dos veces. Se resuspendieron en 500 μ l de *buffer* RIPA (Tris 50 mM, EDTA 5 mM, NaCl 150 mM, NP40 1%, deoxicolato de sodio 0.5%, SDS 0.1% e inhibidores de proteasas 1 \times); para que la concentración final fuera de 10^6 células por μ l. Las muestras se incubaron en hielo durante 30 min agitando con vórtex cada 5 min, y se centrifugaron 14,000 rpm durante 20 min a 4°C.

Las proteínas extraídas se desnaturalizaron adicionándoles 25 μ l de *buffer* Laemmli (Tris-HCl 22 mM pH 6.8, SDS 2%, azul de bromofenol 0.02%, glicerol 10% y β -Mercapto etanol 5%), se colocaron en tubos de 1.5 ml y se mantuvieron durante 10 min en agua en ebullición, posteriormente se transfirieron a hielo durante 5 min. Las muestras se fraccionaron en un gel de poliacrilamida con dodecil sulfato sódico (SDS-PAGE, por sus siglas en inglés) donde se involucra un sistema discontinuo con dos geles: uno concentrador de poliacrilamida al 4% (Tris-HCl 133 mM pH 6.8, SDS 0.1%, persulfato de sodio 0.1% y TEMED 0.2%), y un gel separador de poliacrilamida al 10% (Tris-HCl 375 mM, SDS 0.1%, persulfato de sodio 0.1% y TEMED 0.2%). De esta forma, las proteínas migrarán de acuerdo únicamente a su masa molecular. La electroforesis se realizó con *buffer* de corrida (Tris 24.76 mM, glicina 191.82 mM, SDS 0.1%) a 80 voltios hasta que el frente de corrida entró al gel separador (~30 min) y posteriormente a 100 voltios por ~1.5 h.

Transcurrida la electroforesis en gel, las proteínas fraccionadas se transfirieron a membranas de PVDF (Immun-Blot™ PVDF, BIO-RAD) con *buffer* de transferencia (Tris

24.76 mM, glicina 191.82 mM, metanol 20%). La transferencia se llevó a cabo a 100 voltios durante 2 h a 4°C.

La membrana fue bloqueada con una solución de leche descremada al 5% en PBS Tween-20 0.05% toda la noche a 4°C. Posteriormente, se adicionó el anticuerpo primario Anti-Proteína C (Delta biolabs®, organismo de procedencia: conejo), que reconoce al epítopo de Proteína C de la bandera PTP, a una dilución 1:3000, incubando durante 1 h a temperatura ambiente. Después se realizaron 3 lavados de 10 min con PBS Tween-20 0.05% y se incubó con el anticuerpo secundario HRP anti-conejo (Biolegend®, organismo de procedencia: burro) (dilución 1:3000) durante 1 h. Finalmente, se repitieron los lavados de la misma forma y para el revelado, se utilizó el kit de detección *Immobilon™ Western* (Millipore).

6.5 Purificaciones por afinidad en tándem con condiciones óptimas de crecimiento y condiciones estresantes

Se realizaron experimentos de purificación por afinidad en tándem por duplicado bajo condiciones de estrés de calor y en condiciones normales de crecimiento. Para cada repetición, se usaron cultivos en fase media logarítmica ($20\text{-}25 \times 10^6$ células/ml) de 3 litros. En el caso del duplicado en condiciones estresantes, el cultivo se incubó a 37°C.

Como paso inicial, los cultivos fueron centrifugados a 6000 rpm durante 10 min a 4°C. En condiciones estresantes, el cultivo se centrifugó a temperatura ambiente. Después de este punto, todos los ensayos siguieron el mismo protocolo. Se lavó la pastilla con 200 ml de PBS-Glicina (Glicina 10%) y se resuspendió en 18 ml de *buffer* IPP-150 (Tris-HCl 10 mM pH 8.0, NaCl 150 mM, NP-40 al 0.1%) frío complementado con inhibidores de proteasas 2x, concentración final (*Protease Inhibitor Cocktail for Plants and Tissue Extract*, Sigma).

Se homogeneizó por inversión y se adicionaron 3.5 ml de Tritón X-100 al 10% y se homogeneizó nuevamente por inversión. Se incubó en hielo hasta que las células estuvieran completamente lisadas (~20 min). Posteriormente, se dieron 50 golpes manualmente en un homogenizador de 30 ml (marca Wheaton®) hasta observar la completa lisis celular. Para aclarar el lisado celular se centrifugó a 10,000 rpm, durante 15 min a 4°C.

El sobrenadante se colocó en una columna de cromatografía desechable Econo-Pac® (BIO-RAD) de 20 ml conteniendo 350 µl de perlas de Sefarosa-IgG (*IgG Sepharose™ 6 Fast Flow*, Amersham®) previamente equilibradas, y se incubó por 3 h a 4°C en rotación suave. La columna fue drenada por flujo de gravedad y lavada tres veces con 20 ml de solución IPP-150 fría. El complejo proteínico fue digerido con 100 unidades de la proteasa TEV (Sigma) en 1 ml de amortiguador de proteasa AcTEV (KCl 150 mM, Tris-HCl 20 mM pH 7.7, MgCl₂ 3 mM, DTT 0.5 mM, Tween 20 al 0.1%, EDTA 0.5 mM) durante toda la noche a 4°C, agitando la columna de manera circular. La columna se drenó por flujo de gravedad, se realizó un lavado con 350 µl de solución PC-150 (KCl 150 mM, Tris-HCl 20 mM pH 7.7, MgCl₂ 3 mM, DTT 0.5 mM, Tween 20 al 0.1 %; CaCl₂ 1 mM), equivalente al volumen muerto de las perlas de Sefarosa-IgG. Posteriormente, el eluido conteniendo los complejos proteínicos se llevó a un volumen final de 6 ml con *buffer* PC-150 más CaCl₂ a una concentración final de 3 mM e inhibidores de proteasas a una concentración final de 2x, antes de adicionarlo a una columna de cromatografía Econo-Pac® (BIO-RAD®) de 5 ml conteniendo 250 µl de matriz de afinidad α-Prot C (HPC4, Roche®) previamente equilibrada.

La columna se incubó 4 h a 4°C en rotación suave y se drenó por flujo de gravedad, lavando 6 veces con 5 ml de PC-150. Finalmente, se realizaron ocho eluciones, cada una con 250 µl de *buffer* de elución (Tris-HCl pH 7.75 mM, EGTA 10 mM, EDTA 5 mM e

inhibidores de proteasas 2x). Todos los reactivos utilizados durante este estudio cumplían con grado biología molecular.

6.6 Preparación de las muestras proteicas para su análisis por espectrometría de masas

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

El gel se analizó en un fotodocumentador (BioSens SC 645). Finalmente, el resto de la proteína se corrió en un gel de poliacrilamida al 10% preparado con soluciones filtradas y se dejó ingresar la muestra aproximadamente 1 cm al gel separador. Posteriormente, se tiñó con GelCode Blue Stain Reagent (Pierce) durante 2 h a temperatura ambiente y se lavó con agua destilada durante 2 h. Las bandas del gel que correspondían a las proteínas

purificadas se cortaron en dos fragmentos que contenían las proteínas de bajo y alto peso molecular. Las bandas fueron analizadas por espectrometría de masas en la Instalación Central para Proteómica y Espectrometría de masas de la Upstate Medical University, de Nueva York, USA.

Con respecto a las condiciones de estrés, se midió el cambio en los niveles de interacción de cada proteína con relación al target (LmMaf1-PTP). Para ello, se obtuvo el promedio del número de péptidos de cada proteína obtenida de los resultados de condiciones favorables y desfavorables y, al promedio del target LmMaf1, se le designó el valor de 100%. Posteriormente, se realizó una regla de tres directa con los promedios de péptidos de cada proteína y se procedió a restar el valor de la proteína en condición de estrés al valor de la misma proteína en condiciones favorables. Podría obtenerse entonces un cambio positivo o negativo.

6.7 Inmunofluorescencia indirecta

Los parásitos en fase media logarítmica se centrifugaron a 5,000 g durante 10 min y se resuspendieron en PBS a una densidad de 300,000 células/ μ l. Aproximadamente 1.5×10^6 células se expandieron sobre un portaobjetos previamente tratado con Poli-L-lisina y después de permitir que sedimentaran por 15 min a temperatura ambiente, se fijaron con paraformaldehído al 6% durante 30 min a 4°C. Las células se permeabilizaron con Tritón X-100 al 0.05% durante 2 min a temperatura ambiente y se bloquearon con solución de bloqueo (BSA 2%, incubando 1 h a temperatura ambiente en cámara húmeda). El anticuerpo primario (α -ProtC conejo, Delta Biolabs) se incubó a una dilución de 1:25 en solución de bloqueo, incubando 1 h a temperatura ambiente. Posteriormente, se realizaron

3 lavados con PBS y 2 lavados con PBS-T durante 5 min cada uno. El anticuerpo secundario (Alexa488 cabra anti-conejo, Life technologies) se incubó a una dilución 1:300 en solución de bloqueo durante 1 h a temperatura ambiente en cámara húmeda en oscuridad. Se repitió la serie de lavados antes descritos en oscuridad y se cubrió con Vectashield con DAPI (Vector Laboratories INC). Las imágenes se obtuvieron con un equipo Axio Vert.A1, cámara AxioCam MRc (Zeiss) y fueron procesadas con los programas ZEN 2 e Image J64 (versión 2.1.4.6, NIH).

7 Resultados

7.1 Maf1 se conserva entre eucariontes

Maf1 es un regulador negativo de la transcripción que está conservado en la línea evolutiva eucariontes. Anteriormente, se ha descrito la secuencia, estructura y aminoácidos conservados de esta proteína en distintas especies (Reina *et al.*, 2006; Pradhan *et al.*, 2017; Romero-Meza *et al.*, 2017). Para determinar la presencia de secuencias conservadas en LmMaf1, se comparó su secuencia predicha de aminoácidos con la de Maf1 de humano (HsMaf1) y se generaron predicciones de estructura secundaria y terciaria. Además, se identificaron probables modificaciones post traduccionales y otras secuencias importantes en la regulación y acción represora de Maf1.

La comparación entre LmMaf1 y HsMaf1 mostró un porcentaje de identidad del 32%. Como se anticipaba, se reveló la presencia en LmMaf1 de las tres regiones conservadas en los ortólogos de Maf1, que corresponden a los dominios A, B y C (Figura 20).

Por otra parte, la comparación de las secuencias indicó que algunos de los aminoácidos que son importantes en la actividad represora de Maf1 están conservados en *L. major*. Por ejemplo, dentro del dominio B se localiza la secuencia consenso PGYDFS, la cual está conservada en LmMaf1, que es importante para la interacción de Maf1 con la subunidad C34 de la RNA pol III en distintos organismos (Vorländer, *et al.*, 2020; Romero-Meza, *et al.*, 2017). Asimismo, en el dominio C de LmMaf1 se identificó parcialmente la secuencia consenso WSxxYFxYNKRxK (Figura 20) la cual es una probable señal de localización nuclear (NLS, por sus siglas en inglés) ya identificada en levadura y humano.

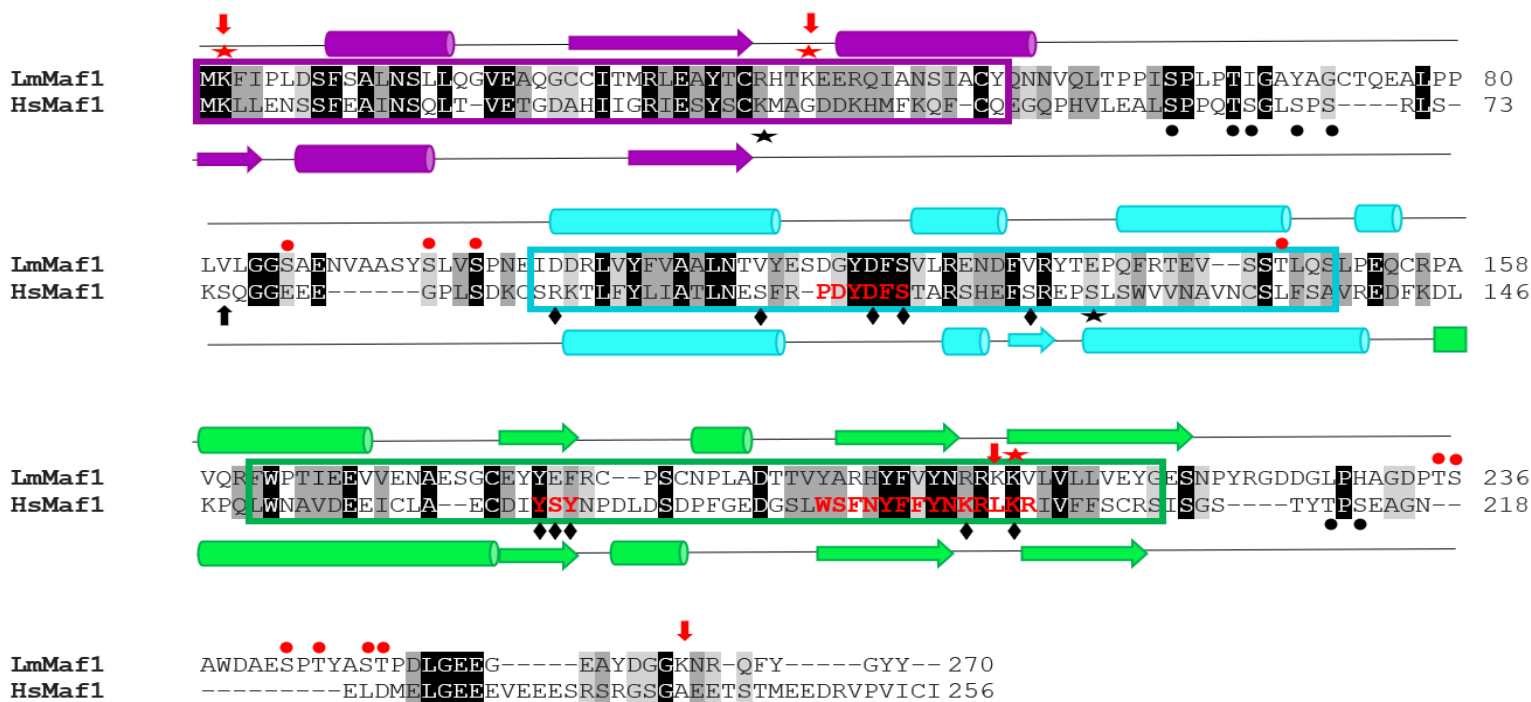


Fig. 20 Análisis de secuencia y estructura secundaria de LmMaf1 y HsMaf1. Alineamiento de la secuencia de aminoácidos de Maf1 de *L. major* (LmMaf1) y de *H. sapiens* (HsMaf1). Los residuos conservados y semiconservados están sombreados en negro y gris, respectivamente. Los dominios conservados de Maf1 están señalados en morado (dominio A), azul (dominio B) y verde (dominio C). Los elementos predichos de la estructura secundaria de LmMaf1 se muestran arriba del alineamiento; abajo se muestra la estructura secundaria ya reportada de HsMaf1 (Vannini *et al.*, 2010). Las cadenas β se representan con flechas y las α -hélices con cilindros y están coloreados de acuerdo con el dominio conservado donde se encuentran. Las secuencias para la localización y función de Maf1 (Romero-Meza *et al.*, 2017) se muestra resaltadas en color rojo en el dominio C. Los rombos muestran los aminoácidos que se requieren para la función de Maf1 en levaduras o mamíferos (Reina, *et al.*, 2006, Pradhan, *et al.*, 2017). Los círculos negros muestran aminoácidos que están fosforilados en humanos (no se conservan en *L. major*) (Michels, 2011) y los círculos rojos muestran los probables sitios de fosforilación de *L. major* con un score mayor a 0.5. La estrella en color negro muestra un sitio de sumoilación y con una flecha negra un sitio de ubiquitinación para HsMaf1 (Rohira *et al.*, 2013 y Akimov *et al.*, 2018) y con una estrella roja, se señalan sitios predichos de sumoilación de LmMaf1 y con una flecha roja, los probables sitios de ubiquitinación.

Considerando que la función de Maf1 se regula por fosforilación (Moir & Willis, 2013), se procedió a buscar probables aminoácidos fosforilados en LmMaf1. El análisis con el programa PhosTryp (<http://phostryp.bio.uniroma2.it>) mostró que hay 10 sitios probables, con un puntaje mayor a 0.5, que pueden ser fosforilados en LmMaf1: S-86, S-95, S-98, T-147, T-235, S-236, S-242, T-244, S-247 y T-248 (marcados con círculos rojos en la Figura 20). Aunque la mayoría de estos residuos se encuentra en el extremo C-terminal de la

proteína, tres de ellos se localizan en la región *linker* de la proteína (entre los dominios A y B), donde se han reportado aminoácidos fosforilados en HsMaf1 (Figura 20).

Asimismo, se ha reportado que Maf1 es ubiquitinada y sumoilada en humano (Rohira *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2019). Estas modificaciones post traduccionales son de gran importancia en el marcaje, procesamiento y regulación de las proteínas; y se relacionan al estrés celular (Zhou, *et. al.*, 2004). Se procedió a buscar posibles residuos ubiquitinados y sumoilados en LmMaf1 con el programa GPS-SUMO. El análisis mostró que algunos residuos son igualmente susceptibles tanto a ubiquitinarse como sumoilarse, debido a la similitud entre ambas PTM. Estos aminoácidos que se comparten son K-2 y K-39, el cual está en una posición cercana a la K-35 que es ubiquitinada en Maf1 de humano (Rohira *et al.*, 2013). Además, otro residuo que se predijo con posibilidad de ubiquitinación es K-208 y otros como posibles sumoilados son K-207 y K-262.

La predicción de la probable estructura secundaria de LmMaf1 reveló que el dominio A está conformado por una α -hélice inicial, seguida de una hoja β -plegada y otra α -hélice. En humano, el dominio A inicia con una hoja β -plegada, seguida de una α -hélice y finaliza con otra hoja β -plegada (Figura 20). En la región *linker* no se predice alguna estructura secundaria. El dominio B está conformado por cuatro α -hélices predichas en *L. major*, mientras que en *H. sapiens* se conforma por dos α -hélices seguidas de una pequeña hoja β -plegada y finalmente termina con una α -hélice. Por último, se predice que en *L. major* el dominio C se pliega en una α -hélice, seguida de una β -plegada pequeña, otra α -hélice y dos hojas β -plegadas. Este dominio es bastante parecido al de humano, que cuenta con el mismo número de α -hélices y hojas β -plegadas (Figura 20).

Posteriormente se procedió a determinar la probable estructura tridimensional de LmMaf1, comparando con el cristal de HsMaf1 (PDB id: 3nr5). Considerando que la cristalografía de HsMaf1 fue hecha con una fracción de la proteína que carecía de la región

linker y del extremo carboxilo-terminal, estas regiones de LmMaf1 fueron descartadas para el modelaje. Los resultados indicaron que la estructura de LmMaf1 es globular, presentando cinco hojas β -plegadas en el centro, las cuales están rodeadas por cinco α -hélices (Figura 21). Esta estructura es muy parecida a la reportada para Maf1 de humano (Figura 21) con un puntaje de sobrelape en Modbase de 0.779, en una escala de 0 a 1, considerando desde el valor de 0.6 como un buen puntaje.

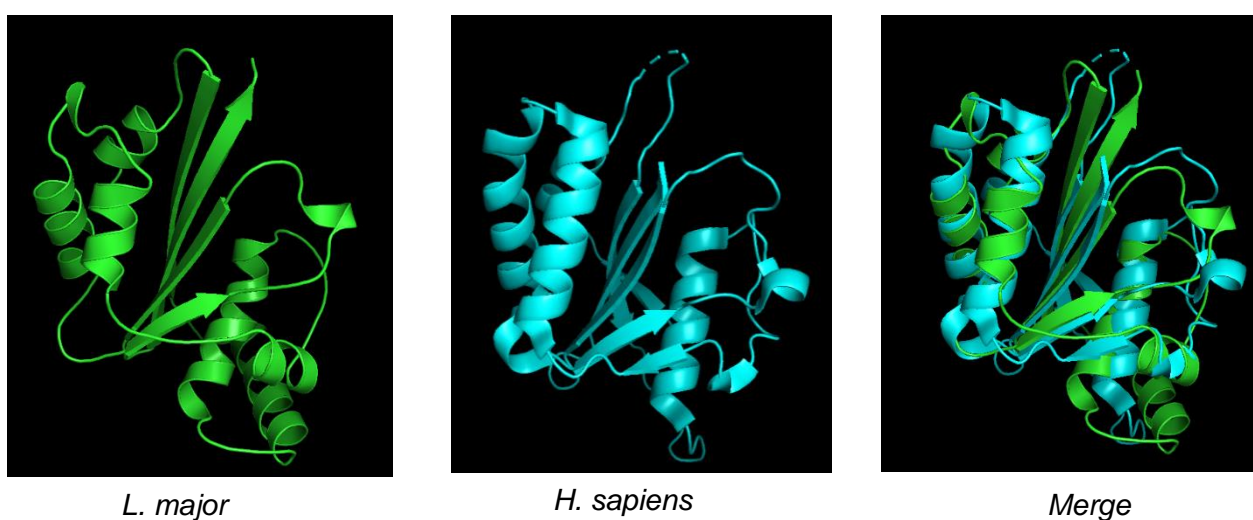


Fig. 21 Predicción de estructura terciaria de LmMaf1. Se muestra en el panel izquierdo la predicción de Maf1 de *L. major* basada en el cristal (PDB: 3nr5) reportado de *H. sapiens* (panel central) modelada en PyMol. En el panel de la derecha se muestra el *merge* de ambas estructuras, que muestra una gran similitud entre las Maf1 de ambas especies. Las flechas representan estructuras β -plegada y los espirales corresponden a estructuras α -hélice. Score de *merge* de 0.779.

7.2 Análisis de la línea celular que expresa la proteína LmMaf1-PTP

Para verificar la expresión de la proteína Maf1 recombinante fusionada con la bandera PTP de la línea celular que previamente se generó en el laboratorio (Hernández, 2019) se realizó un análisis tipo *Western blot*. Para ello, se utilizó el anticuerpo anti Prot C, el cual reconoce el dominio de Proteína C presente en el péptido de extracción. De esta manera, la señal que se obtiene es únicamente de la proteína exógena.

La proteína quimérica LmMaf1-PTP tiene un peso esperado de 48 kDa. Una banda de este tamaño se observó, indicando que la línea celular expresa correctamente la proteína recombinante LmMaf1-PTP (Figura 22). Se apreció también una banda de menor tamaño, la cual podría corresponder a un producto de degradación de LmMaf1-PTP. Alternativamente, esta banda podría corresponder a la forma desfosforilada de Maf1, con un tamaño menor a la forma fosforilada (48 KDa). Como se anticipaba, no se obtuvo ninguna señal con las células *wt* (Figura 22).

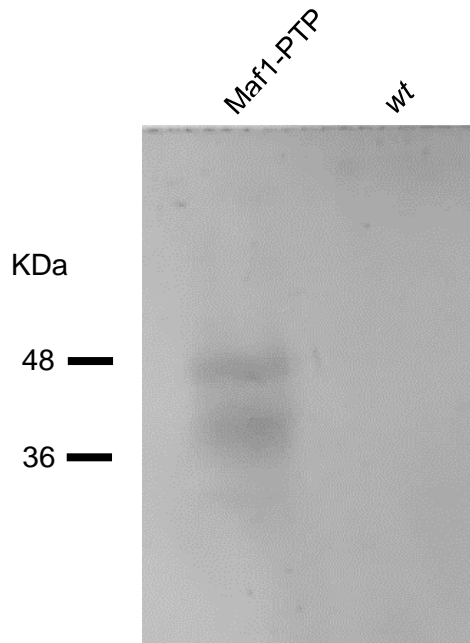


Fig. 22 Análisis de *Western blot* de la línea celular recombinante LmMaf1-PTP. Se señala el carril de LmMaf1-PTP y el *wt*. Se utilizó el anticuerpo anti Prot C a una dilución 1:3000.

Una vez verificada la correcta expresión de la proteína recombinante LmMaf1-PTP, se procedió a determinar si la expresión de esta proteína afecta el crecimiento de la línea celular, en relación con células *wt*. Para ello se llevaron a cabo curvas de crecimiento, resemebrando y contando los cultivos cada 24 h en condiciones favorables de crecimiento (Figura 23).

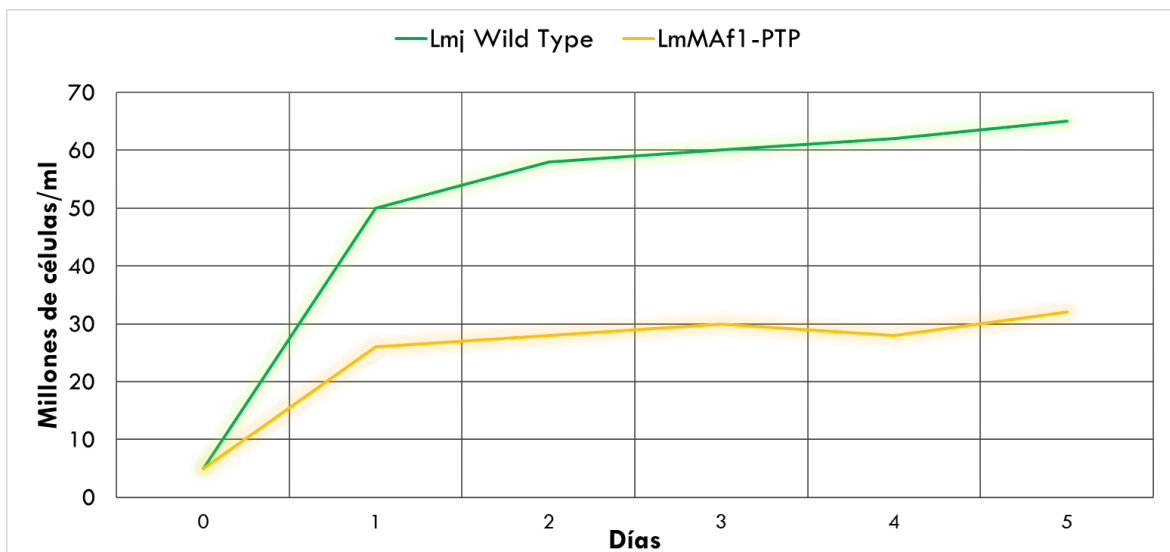


Fig. 23 Curvas de crecimiento de la línea celular recombinante (naranja) y *wt* (verde) en condiciones favorables de crecimiento, resemebrándose cada 24 h. Se denota un crecimiento menor en las células recombinantes.

Se observó un menor crecimiento en la línea celular recombinante comparada con la línea *wt*. Esto podría deberse a que al expresarse una mayor cantidad de Maf1 se presente una mayor represión de la transcripción de genes dependientes de Pol III, lo que a su vez reduciría el crecimiento celular.

7.3 Maf1 interactúa con una gran diversidad de proteínas con distintas funciones biológicas en condiciones favorables de crecimiento

Para aislar complejos proteínicos de LmMaf1, se llevaron a cabo experimentos de purificación por afinidad en tándem con células de *L. major* que expresan la proteína LmMaf1-PTP bajo condiciones favorables de crecimiento. Como control, se trabajó también con el cultivo *wt*. Para ello, se crecieron 3 litros de cada cultivo en fase media logarítmica ($20\text{-}25 \times 10^6$ células/ml). A continuación, el extracto proteínico 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 un periodo de 3 h 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 proteínicos se liberaron de las columnas mediante el uso de agentes quelantes (EDTA y CaCl₂). Los eluidos finales de la purificación fueron concentrados y una fracción (~1/4 parte del total) fue analizada en un gel de poliacrilamida. Se obtuvieron varias bandas con pesos moleculares que varían de ~15 a 150 kDa (Figura 24). Se observó una banda que parece corresponder a LmMaf1-PTP, considerando que LmMaf1 tiene un tamaño predicho de 30 kDa, más 3.56 kDa adicionales otorgados por el dominio de la proteína C del epítipo de extracción. En el experimento control con células *wt* también se detectaron algunas bandas, que fueron identificadas por espectrometría de masas como queratinas humanas, albúmina de suero bovino y múltiples proteínas de *L. major*, incluyendo proteínas ribosomales, proteínas de choque térmico, factores de elongación de la traducción, actina y tubulinas. Estas proteínas son contaminantes comunes en ensayos de purificación por afinidad en tándem (Mellacheruvu, *et al.*, 2013).

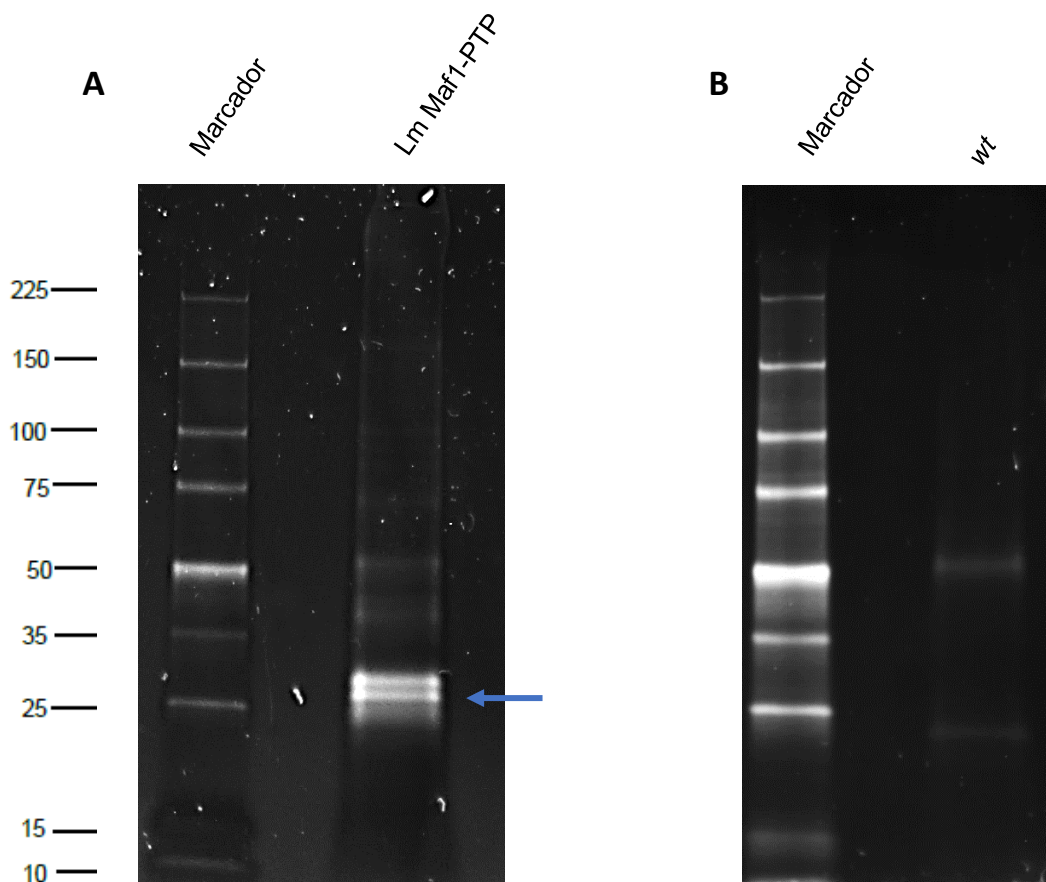


Fig. 24 Eluido final de la purificación por afinidad en tándem en condiciones favorables de LmMaf1-PTP (Panel A) y la línea *wt* (panel B). Las muestras corresponden a una alícuota del material final concentrado. Geles de gradiente (4-15%) de poliacrilamida (Mini-PROTEAN® TGX™ Precast Gel) teñidos con SYPRO Ruby. La flecha indica a la proteína blanco probable, LmMaf1-PTP. Marcador Broad Range Protein Molecular Weight Markers PROMEGA.

Con el objetivo de identificar las proteínas que copurificaron con LmMaf1-PTP, se analizaron por espectrometría de masas los eluidos concentrados de las purificaciones por afinidad en tándem, realizadas por duplicado. Para ello, se realizó por separado la introducción de 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 cortaron dos fragmentos de poliacrilamida que contenían todas las proteínas de la muestra, los cuales se mandaron a analizar por espectrometría de masas. Los péptidos obtenidos se identificaron comparando su secuencia con la base de datos del genoma de *L. major*.

Los análisis de las muestras confirmaron la presencia de la proteína blanco LmMaf1, además de otras proteínas que pudieran tener interacción directa o indirecta con LmMaf1 (Tabla 1). Se excluyeron aquellas proteínas que fueron purificadas en el experimento control con células silvestres.

Las proteínas obtenidas de este estudio se dividieron por su función biológica en las siguientes categorías: subunidades de RNA polimerasas, reguladores de transcripción y/o remodeladores de cromatina, proteínas de unión a RNA, replicación o reparación de DNA, fosforegulación, proteínas nucleolares, procesamiento de tRNA, transporte nuclear, ubiquitinación e interacción con proteosoma, metabolismo de lípidos, proteínas Heat Shock, y otras funciones biológicas.

Como se anticipaba, se encontraron varias subunidades de la RNA Pol III, entre ellas varias que se ha demostrado que interactúan directamente con Maf1 en otros organismos, tales como C160, C128 y C82; además de AC40, que también se comparte con la RNA Pol I.

Tabla 1 Proteínas que copurificaron con LmMaf1 en condiciones favorables de crecimiento.

TriTrypDB ID	Nombre de la proteína (Conocido o putativo)	Tamaño predicho (kDa)	Peptidos ¹
Proteína blanco	Maf1 regulator	30.2	114, 66
Subunidades de RNA polimerasas			
LmjF.34.0360 *+	C160, RPC1 (Pol III)	173.6	70, 47
LmjF.20.0010 *+	C128, RPC2 (Pol III)	126.8	27, 5
LmjF.19.0660 *+	AC40, RPAC1 (Pol I and Pol III)	47.4	27, 16
LmjF.13.1370*+	C37, RPC5 (Pol III)	76.5	24, 16
LmjF.31.0160	RPB2 (Pol II)	133.8	19, 9
LmjF.27.2600+	C82, RPC3 (Pol III)	65.4	15, 5
LmjF.18.0780	RPB5 (Pol II and Pol III)	27.2	11, 5
LmjF.35.4170+	C53, RPC4 (Pol III)	37.9	11
LmjF.03.0790	C17, RPC17 (Pol III)	45.4	10, 7
LmjF.31.2610	RPB1 (Pol II)	184.6	8, 2
Reguladores de la transcripción y/o remodeladores de la cromatina			
LmjF.21.0800*	CCR4-NOT transcription complex subunit Not1	248.7	22, 3
LmjF.34.2610	Ruvb-like DNA helicase, putative	53.6	19, 8
LmjF.05.0400	Structural maintenance of chromosome (SMC), putative	136.2	13, 2
LmjF.27.0310	TATA-binding protein interacting (TIP120), putative	133.9	7, 1
LmjF.29.2550	PAF1 complex subunit CTR9	96.6	7, 1
LmjF.23.1350	Elp3B	79.4	7, 1
LmjF.29.2550	RNA polymerase-associated protein CTR9, putative	96.6	7, 1
LmjF.10.0050	Dos2-interacting transcription regulator of RNA-Pol II, putative	103.7	5, 3
Proteínas de unión a RNA			
LmjF.29.2090	AAA domain containing protein, putative	175.9	69, 31
LmjF.36.5100	Hypothetical protein, conserved (Probable pumilio/PUF RNA binding protein 7, putative)	105.2	49, 20
LmjF.26.1790	HEAT repeat-containing protein 1	296.1	38, 17
LmjF.35.3100	ATP-dependent RNA helicase, putative	100.2	27, 8
LmjF.35.0370	ATP-dependent DEAD-box RNA helicase, putative	46.4	24, 17
LmjF.17.1250	RNA cytidine acetyltransferase, NAT10	118	24, 12
LmjF.32.2650	Spou rRNA Methylase family, putative	221.9	23, 6
LmjF.30.3430	Protein Mkt1, putative	90.2	18, 13
LmjF.32.1750	Pumilio/PUF RNA binding protein 7, putative	85.2	17, 9

LmjF.36.0050	PUF1, putative	61.2	15, 14
LmjF.32.0750	Nuclear RNA binding domain	25.2	15, 4
LmjF.19.1410	Cid1 family poly A polymerase, putative	104.1	15, 3
LmjF.25.0080	Polyadenylate-binding protein 3	60.9	13, 2
LmjF.24.0130	WD40/YVTN repeat-like-containing protein	60.7	12, 4
LmjF.13.1360	Hypothetical protein, conserved (probable enhancer of mRNA-decapping protein 4)	90.9	11, 9
LmjF.32.1150	Hypothetical protein, conserved (Probable RNA-binding protein EWS isoform X21)	33.5	11, 5
LmjF.34.2580	ALBA-domain protein 3	22.6	10, 1
LmjF.36.5190	SWI/SNF-related helicase, putative	144.1	9
LmjF.28.0450	DIS3-like exonuclease, putative	107.3	7, 1
LmjF.31.2370	Hypothetical protein, conserved (Probable Pre-mRNA-splicing factor prp5)	49.7	6, 3
Procesamiento de tRNA			
LmjF.35.1410	Threonyl-tRNA synthetase, putative	89.4	42, 21
LmjF.18.1220	Bifunctional aminoacyl-tRNA synthetase, putative	81.5	41
LmjF.36.5620	Isoleucyl-tRNA synthetase, putative	138.8	36
LmjF.18.1210	Prolyl-tRNA synthetase, putative	90.6	35, 22
LmjF.22.1540	Alanyl-tRNA synthetase, putative	106.3	27, 11
LmjF.20.1710	tRNA (Uracil-5-)-methyltransferase, putative	65	8, 3
LmjF.30.0460	Aspartyl-tRNA synthetase, putative	62.3	8, 2
Replicación y reparación del DNA			
LmjF.33.0410	DNA mismatch repair protein MSH2, putative	103.7	19, 12
LmjF.21.0820	Temperature dependent protein affecting M2 dsRNA replication, putative	149.6	18, 4
LmjF.36.1880	CBF/Mak21 family, putative	70.2	17, 5
LmjF.34.3500	Ruvb-like 1 DNA helicase, putative	50.3	16, 6
LmjF.29.0020	Spt16 (fact 140)	114.7	15, 5
LmjF.24.0990	Replication factor C, subunit 1, putative	71.7	14, 8
LmjF.33.1690	DNA polymerase delta catalytic subunit, putative	116.5	13, 2
LmjF.28.0530	RAD50 DNA repair-like protein	253.8	12, 2
LmjF.32.2960	DNA replication licensing factor MCM7, putative	80.3	7, 3
Fosforegulación			
LmjF.28.0140	Pantothenate kinase subunit, putative	161.5	39, 14
LmjF.27.1250	Serine-threonine kinase receptor-associated protein, putative	35.3	16, 6
LmjF.31.2980*	Hypothetical protein, conserved (Probable PP4)	105.8	16, 3
LmjF.36.1520	Serine/threonine-protein kinase NEK17, putative	56.3	15, 6
LmjF.32.3050	Ras family, putative	113.7	13, 5
LmjF.34.2180	Hypothetical protein, conserved (probable PP2A)	166.3	12, 3

LmjF.34.3940+	Target of rapamycin kinase 3TOR3	295.3	12, 3
LmjF.30.0800 *	Rac serine-threonine kinase, RAC putative (Possible Sch9 or AKT)	57.7	11, 4
LmjF.23.1260+	AVO3, Rapamycin-insensitive companion of TOR2	166.2	10, 6
LmjF.31.2960	Repressor of differentiation kinase 2, putative	49.8	10, 5
LmjF.19.0150	Mitogen-activated protein kinase kinase kinase, putative	30.9	7, 2
LmjF.29.0240	Serine/threonine protein kinase RIO1, putative	59.5	9, 6
LmjF.07.0900	CAMK/CAMKL family protein kinase, putative (Possible TPK2)	33.6	9, 3
LmjF.18.1130	Ras-related protein Rab5A, putative	25.1	8, 4
Proteínas nucleolares			
LmjF.05.0140	Nucleolar RNA helicase II, putative	73.3	22, 20
LmjF.10.0210	Nucleolar protein 56, putative	52.7	20, 11
LmjF.19.0100	Fibrillarin	31	19, 15
LmjF.22.0210	Nucleolar protein 168, putative	170.6	10
LmjF.35.1990	U3 small nucleolar RNA-associated protein 6, putative	115.8	8, 5
LmjF.36.2170	NOL1/NOP2/sun family, putative	84.2	6, 2
Transporte nuclear			
LmjF.32.2150	Hypothetical protein, conserved (Probable importin 5)	117.6	28, 13
LmjF.30.3390	CAS/CSE/importin domain protein, putative	107.8	23, 9
LmjF.35.2330	Importin 1	99.4	18, 8
LmjF.36.2510	Nucleoporin NUP96	96.9	14, 9
LmjF.36.2680*	Hypothetical protein, conserved (Probable MSN5)	112.2	13, 4
LmjF.36.2720	Transportin2-like protein	102.2	9, 4
LmjF.32.1100	Exportin 1, putative (probable Los1)	118.1	6, 2
Ubiquitinación e interacción con el proteosoma			
LmjF.35.5390	HECT-domain (ubiquitin-transferase), putative	723.3	84, 22
LmjF.35.3060	Ubiquitin-activating enzyme E1, putative	126.4	31, 4
LmjF.07.0280	Ubiquitin-protein ligase-like, putative	669.1	30, 11
LmjF.30.0760	Hypothetical protein, conserved (Probable cullin protein)	125.3	29, 10
LmjF.22.0620	Proteasome regulatory ATPase subunit 5, putative	49.5	27, 21
LmjF.32.0390	19S proteasome non-ATPase subunit 8	40.1	14, 7
LmjF.24.0420	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase, putative	34.4	13, 5
LmjF.30.1010	Ubiquitin conjugation factor E4 B, putative	114.6	9, 3
LmjF.35.0670	Hypothetical protein, conserved (Probable Small subunit processome component 20 homolog)	455.8	8, 6
LmjF.35.1760	Proteasome complex subunit Rpn13 ubiquitin receptor, putative	27.3	7, 5
Metabolismo de lípidos			

LmjF.31.2970	Acetyl-coa carboxylase (posible ACC1)	241	44, 13
LmjF.03.0230	Long chain fatty Acyl CoA synthetase, putative	78.9	21, 13
3LmjF.20.1120	Phosphatidylinositol 3-kinase TOR4, putative (possible PI3K)	359.3	11, 3
LmjF.36.4960	Hypothetical protein, conserved (Probable star-related lipid transfer protein 5)	105.2	6, 3
LmjF.36.5230	Hypothetical protein, conserved (Probable Membrane protein, lipid metabolism, lipid transport)	49.2	6, 3
Proteínas Heat Shock			
LmjF.28.2780 *	Heat shock protein 78 (HSP70), putative	71.6	57, 47
LmjF.27.2400	Heat shock protein DNAJ, putative	43.6	57, 45
LmjF.27.2630	Heat shock protein 78 (HSP78), putative	90.8	57, 25
LmjF.33.0316	Heat shock protein 83 (HSP83-3)	80.5	36, 16
LmjF.18.1370	Heat shock protein 110, putative	91.7	34, 20
LmjF.26.1240	Heat shock protein 70-related protein (HSP70.4)	70.5	26, 11
Otras funciones			
LmjF.28.1200	Luminal binding protein 1 (BIP), putative	71.9	41, 27
LmjF.31.2790	ADP-ribosylation factor, putative	20.2	15, 4
LmjF.31.2170+	ARM-like helical domain-containing protein. (Possible ARM CX3)	139.6	13, 2
LmjF.05.0030	Ras-like small GTPases, putative	21.7	8, 1
LmjF.26.2030	Hypothetical protein, conserved (Probable ARO (armadillo repeats only protein))	83.4	7, 3
LmjF.26.0250	Hypothetical protein, conserved (Probable GCN1)	121.8	6, 2
LmjF.19.0240	Hypothetical protein, conserved (Probable Nuclear GTP-binding protein NUG1)	72.7	6, 2

¹Se indica el número de péptidos diferentes detectados en dos experimentos de purificación por afinidad en tándem; una sola cifra indica que sólo se identificaron péptidos en una repetición. Se resaltan en verde las proteínas que copurificaron exclusivamente en las condiciones óptimas de crecimiento. Se señala con * las proteínas que se tiene registrado en la base de datos de BioGrid 4.4 como interactores físicos en *S. cerevisiae* y con + se señalan las proteínas que interactúan con Maf1 en *H. sapiens*. No se incluyeron las proteínas que probablemente sean contaminantes (incluidas múltiples proteínas ribosomales, factores de traducción, tubulinas, y algunas proteínas mitocondriales), que se purificaron en los ensayos con células silvestres. Se muestran sólo las proteínas en las que se identificaron al menos 8 péptidos.

De manera interesante, también se reconocieron subunidades específicas de la RNA Pol II, como RPB1 y RPB2. De igual manera, se identificaron varios reguladores de la transcripción, como la subunidad Not1 del complejo CCR4-NOT y la subunidad CTR9 del complejo PAF1.

Proteínas que se asocian con LmMaf1-PTP bajo condiciones de estrés de temperatura

Como primer paso para la identificación de las proteínas que se asocian con Maf1 en condiciones de estrés, se procedió a realizar curvas de crecimiento de la línea celular LmMaf1-PTP y la línea *wt* en condiciones de estrés por calor a 37°C (Figura 25). Para ello, el esquema metodológico consistió en iniciar el crecimiento de cultivos en condiciones favorables de crecimiento. Un día después, una vez que los cultivos alcanzaron densidades de alrededor de 28×10^6 células/ml (*wt*) y 20×10^6 (LmMaf1-PTP), los cultivos se transfirieron a 37°C y se checó el crecimiento celular por triplicado a las 2, 4, 6, 24, 48 y 72 h (Figura 25). Además, en cada tiempo se verificó la morfología y movimiento celular.

En ambas líneas celulares, el crecimiento fue continuo hasta las 24 h de choque térmico, tiempo en el que se empezaron a observar afectaciones en la morfología y en la movilidad celular (datos no mostrados). Pasadas las 24 h de estrés con calor, se notó un decaimiento en el conteo celular de ambas líneas, con una disminución más notable en el cultivo silvestre (Figura 25).

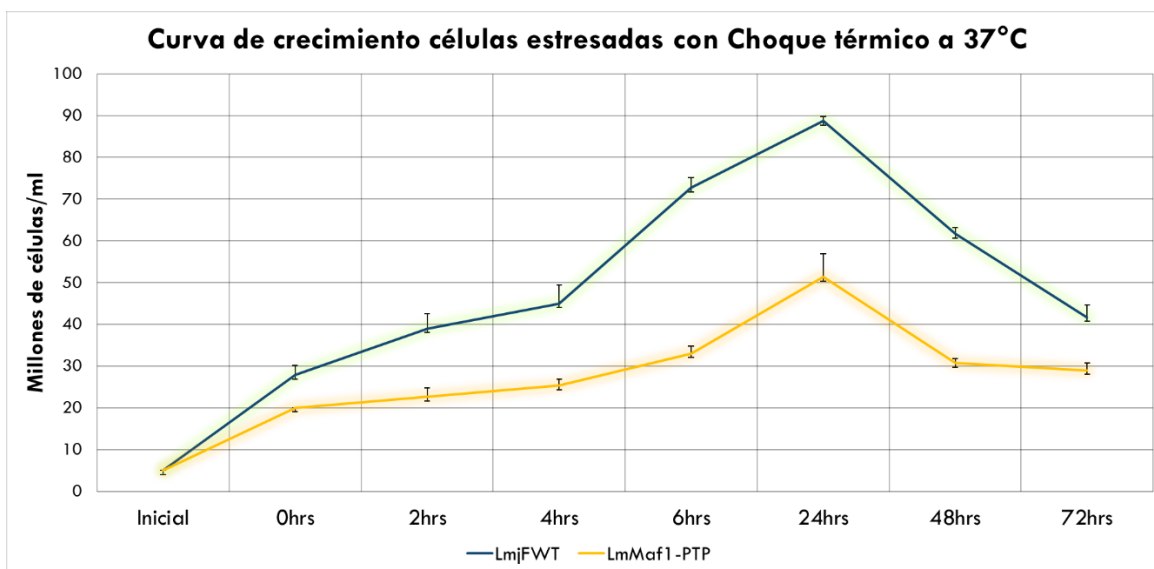


Fig. 25 Curvas de crecimiento de la línea celular recombinante (LmMaf1-PTP) y la línea *wt* (LmjFWT) en condiciones de estrés por choque térmico a 37°C.

Se decidió entonces emplear un tiempo de 4 h de calor para los ensayos de purificación por afinidad en tándem, ya que en este tiempo las células no mostraron cambios en su morfología ni en su viabilidad celular. Además, existe un reporte en el que crecieron cultivos de *L. major* por 2 h a 37°C para analizar los cambios en el transcriptoma del parásito bajo estrés por calor (Rastrojo, *et al.*, 2019); basándonos en esta publicación, y para asegurar que los parásitos estuvieran bajo estrés un tiempo suficiente, seleccionamos 4 h.

Se realizaron entonces los ensayos de purificación por afinidad en tándem con el cultivo LmMaf1-PTP y la línea celular *wt*. Estos cultivos fueron crecidos a 28°C hasta que alcanzaron la fase media de crecimiento y posteriormente se colocaron a 37°C durante 4 h, antes de cosechar las células. Al analizar el eluido final por electroforesis se observó un patrón proteínico diferente al observado con los cultivos creciendo favorablemente, pues se apreció un barrido del que sobresalen algunas cuantas bandas (Figura 26). Entre éstas hay una banda del tamaño esperado de la proteína recombinante LmMaf1PTP, de ~34 kDa. En el control con células *wt* no se observó alguna banda que indicara presencia de contaminantes (Figura 26); de cualquier forma, esta muestra fue enviada a analizar por espectrometría de masas, y no se identificó ninguna proteína.

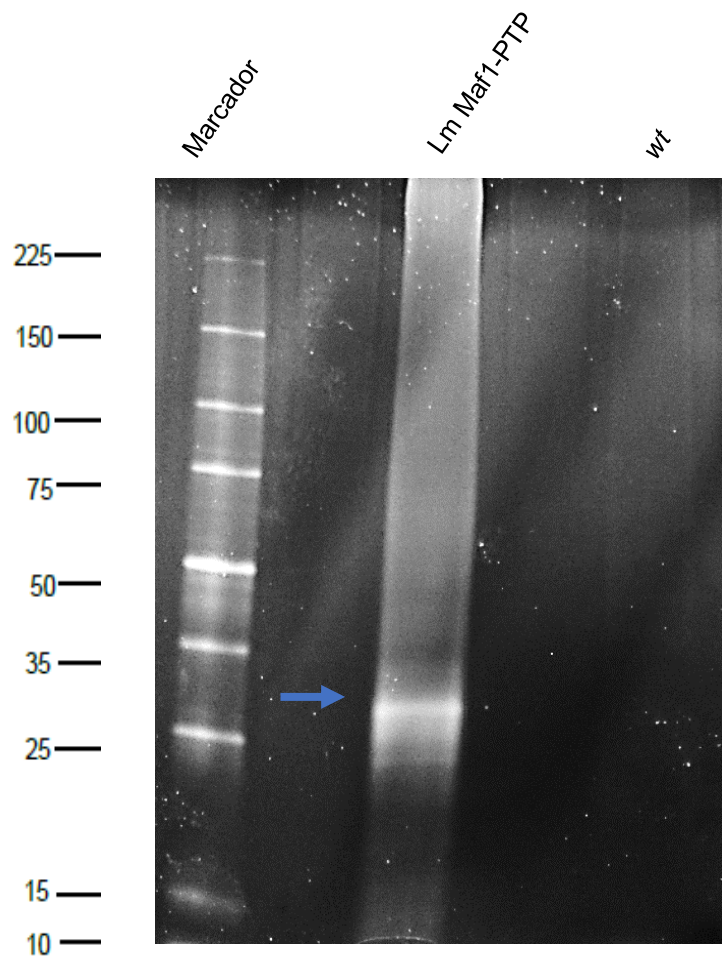


Fig. 26 Purificación por afinidad en tándem con células *L. major* en condiciones de choque térmico, que expresan LmMaf1-PTP y de la línea celular *wt*. SDS-PAGE de proteínas copurificadas con LmMaf1-PTP. La flecha indica la proteína recombinante. También se muestra un experimento de control con células *wt*. Las muestras se analizaron en geles de proteína prefabricados Mini-PROTEAN al 4–15 % teñidos con SYPRO Ruby. Marcador Broad Range Protein Molecular Weight Markers PROMEGA.

El análisis de espectrometría de masas de las proteínas eluidas de la línea recombinante LmMaf1-PTP en condiciones de estrés térmico permitió la identificación de múltiples proteínas (Tabla 2), las cuales se dividieron en las mismas categorías que en los experimentos realizados en condiciones favorables. Para aquellas proteínas que copurificaron con LmMaf1-PTP en ambas condiciones de crecimiento, se analizaron los porcentajes de cambio (Tabla 2). Además, se identificaron las proteínas que sólo fueron purificadas en una de las dos condiciones.

Tabla 2. Proteínas que copurificaron con LmMaf1 en condiciones de estrés térmico.

TriTrypDB ID	Nombre de la proteína (Conocido o putativo)	Tamaño predicho (kDa)	¹ Peptidos	² Cambio con relación al crecimiento en condiciones normales de crecimiento (%)
Target protein LmjF.31.2820	Maf1	30.2	44,40	-
Subunidades de RNA polimerasas				
LmjF.27.2600+	C82, RPC3 (Pol III)	65.4	20, 6	+19.84
LmjF.19.0660 *+	AC40, RPAC1 (Pol I and Pol III)	47.4	22,15	+20.16
LmjF.20.0010	C128, RP2 (Pol III)	126.8	14	+15.56
LmjF.13.1370*+	C37, RPC5 (Pol III)	76.5	15, 13	+11.11
LmjF.18.0780	RPB5 (Pol II and Pol III)	27.2	9, 9	+12.62
Reguladores de transcripción y/o remodeladores de la cromatina				
LmjF.34.2610	RuvB-like DNA helicase, putative	53.6	10, 5	+7.72
LmjF.21.0800*	CCR4-NOT transcription complex subunit Not1	248.7	3, 2	-7.07
Proteínas de unión a RNA				
LmjF.36.5100	Hypothetical protein, conserved (Probable pumilio/PUF RNA binding protein 7, putative)	105.2	34, 16	+21.19
LmjF.21.1552	ATP-dependent RNA helicase SUB2, putative	49.5	13, 8	+15.1
LmjF.13.1360	Hypothetical protein, conserved (probable enhancer of mRNA-decapping protein 4)	90.9	9, 4	+9.34
LmjF.25.0080	Poly(A)-binding protein 3	60.9	9, 5	+8.33
LmjF.11.0470	Pumillio protein 10, putative	81.8	8, 1	+5.96
LmjF.26.1790	HEAT repeat-containing protein 1	296.1	7, 7	-13.89
LmjF.32.2650	Spou RNA Methylase family, putative	221.9	1, 4	-16.11
LmjF.29.2090	AAA domain containing protein, putative	175.9	16, 37	-19.19
Replicación y reparación del DNA				
LmjF.36.6710	Replication factor C subunit 3, putative	39.3	8, 1	+7.07
LmjF.36.1880	CBF/Mak21 family, putative	70.2	7, 2	+3.68
LmjF.27.0550	Replication factor C, subunit 4, putative	39.5	4	+3.54
LmjF.21.0820	Temperature dependent protein affecting M2 dsRNA replication, putative	149.6	4, 2	+3.13
LmjF.35.3250	Replication factor C, subunit 3, putative	39.8	4, 3	+2.98
Fosforegulación				
LmjF.07.0900	CAMK/CAMKL family protein kinase, putative (Probable TPK2)	33.6	8	+11.52
LmjF.36.1520	Serine/threonine-protein kinase NEK17, putative	56.3	9, 4	+8.79
LmjF.19.0150	Mitogen-activated protein kinase kinase kinase, putative	30.9	5, 3	+6.36

LmjF.20.0660*	Serine/threonine protein phosphatase 2A regulatory subunit, putative	63.9	4, 1	+5.76
LmjF.35.5190	NIMA-related kinase, putative	54.4	7, 1	New
Proteínas nucleolares				
LmjF.19.0100	Fibrillarin	31	14, 9	+12.93
Procesamiento de tRNAs				
LmjF.18.1210	Prolyl-tRNA synthetase, putative	90.6	19	+13.79
LmjF.22.1540	Alanyl-tRNA synthetase, putative	106.3	13, 4	+8.43
LmjF.35.1410	Threonyl-tRNA synthetase, putative	89.4	18, 7	+5.90
Transporte nuclear				
LmjF.32.2150	Hypothetical protein, conserved (Probable importin 5)	117.6	14, 8	+9.04
LmjF.34.0490	Importin beta-1 subunit, putative	95.6	6, 6	+5.93
LmjF.30.1120	Importin alpha, putative	58.1	3, 1	+5.15
LmjF.36.2510	Nucleoporin NUP96	96.9	2, 2	-8.23
Ubiquitinación e interacción con el proteosoma				
LmjF.02.0370	Proteasome regulatory non-ATPase subunit 6, putative	58.8	19, 14	+19.3
LmjF.22.0620	Proteasome regulatory ATPase subunit 5, putative	49.5	18, 5	+14.24
LmjF.19.1120	Proteasome regulatory non-ATPase subunit 9	46.5	14, 8	+14.04
LmjF.35.3060	Ubiquitin-activating enzyme E1, putative	126.4	12, 6	+7.83
LmjF.30.0760	Hypothetical protein, conserved (Probable cullin protein)	125.3	10, 4	+1.06
LmjF.32.2820	Proteasome regulatory non-ATPase subunit, putative	46.3	5, 13	-6.97
LmjF.29.0120	Proteasome regulatory non-ATPase subunit, putative	99.3	6, 18	-20.81
LmjF.28.1730	Proteasome regulatory non-ATPase subunit 2, putative	106	2, 12	-24.9
LmjF.35.5390	HECT-domain (ubiquitin-transferase), putative	723.3	3, 3	-52.07
Metabolismo de lípidos				
LmjF.03.0230	Long chain fatty Acyl CoA synthetase, putative	78.9	4, 1	-12.89
LmjF.31.2970	Acetyl-CoA carboxylase (posible ACC1)	241	16, 11	+0.50
Proteínas Heat Shock				
LmjF.28.2780 *	Heat shock protein 78 (HSP70), putative	71.6	51, 17	+58.13
LmjF.27.2630	Heat shock protein 78 (HSP78), putative	90.8	44, 21	+54.45
LmjF.27.2400	Heat shock protein DNAJ, putative	43.6	40, 18	+34.24
LmjF.18.1370	Heat shock protein 110, putative	91.7	23, 19	+70
LmjF.33.0316	Heat shock protein 83 (HSP83-3)	80.5	22, 14	+14
Otras funciones				
LmjF.28.1200	Luminal binding protein 1 (BIP), putative	71.9	33, 13	+16.99
LmjF.25.1420	GTP-binding protein, putative	24.2	12, 9	+10.61
LmjF.05.0030	Ras-like small GTPase, putative	21.7	8, 4	+13.18

LmjF.16.1610	Prohibitin	78.3	5	+8.59
--------------	------------	------	---	-------

¹Se indica el número de péptidos detectados en dos experimentos de purificación por afinidad en tándem; una sola cifra indica que sólo se identificaron péptidos en una repetición.²Se señala el cambio positivo (verde) o negativo (rojo) que hay en aquellas proteínas en las que varió la interacción con el target LmMaf1, comparando con las condiciones óptimas de crecimiento. Para determinar la concentración relativa, se consideró como 100% el número promedio de péptidos de ambas repeticiones obtenidos con Maf1. Después se determinó la abundancia de cada proteína y se comparó dicha concentración entre las condiciones favorables y de estrés. Las proteínas se ordenaron de mayor a menor cambio. Se resalta con verde la proteína que copurificó exclusivamente en las condiciones estresantes de crecimiento. Se señala con * las proteínas que se tiene registrado en la base de datos de BioGrid 4.4 como interactores físicos en *S. cerevisiae* y con + se señalan las proteínas que interactúan con Maf1 en *H. sapiens*. No se incluyeron las proteínas que probablemente sean contaminantes (incluidas múltiples proteínas ribosomales, factores de traducción, tubulinas, y algunas proteínas mitocondriales). Se presentan sólo las proteínas para las que se identificaron al menos cuatro péptidos.

La mayoría de las proteínas observadas con condiciones favorables (Tabla 1) se presentaron en el experimento en condiciones de estrés, aunque algunas de estas proteínas tuvieron cambios notables, a la alza o a la baja, en su interacción con LmMaf1 al ser sometidas a estrés por calor (Figura 27). De manera interesante, la mayoría de las subunidades de las tres RNA polimerasas subieron sus niveles de interacción con LmMaf1 en condiciones de estrés. Por ejemplo, C82 aumentó alrededor de un 34% (Tabla 2).

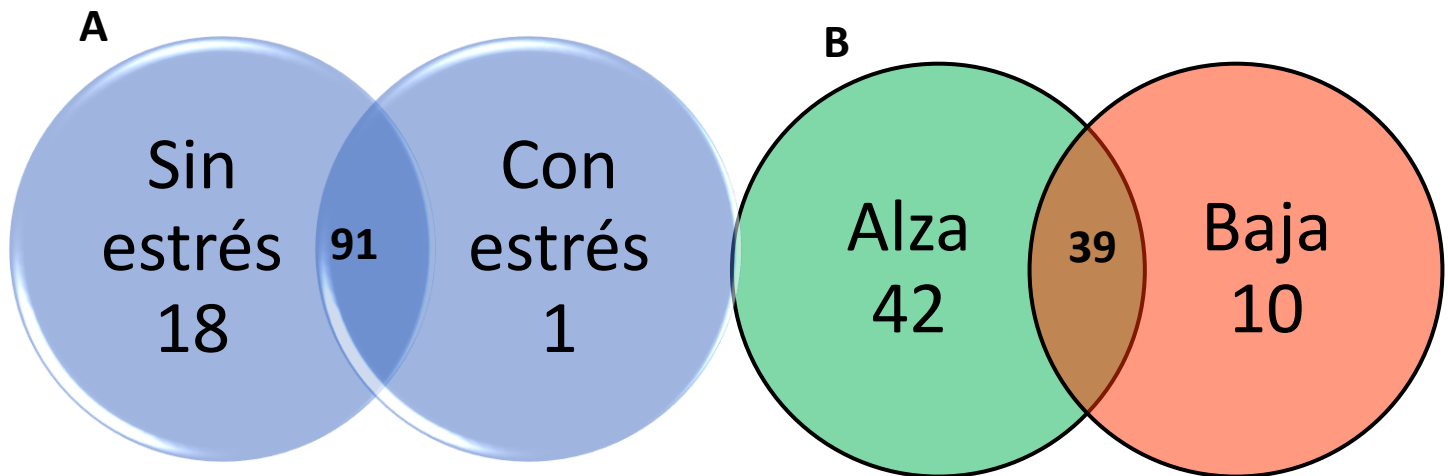
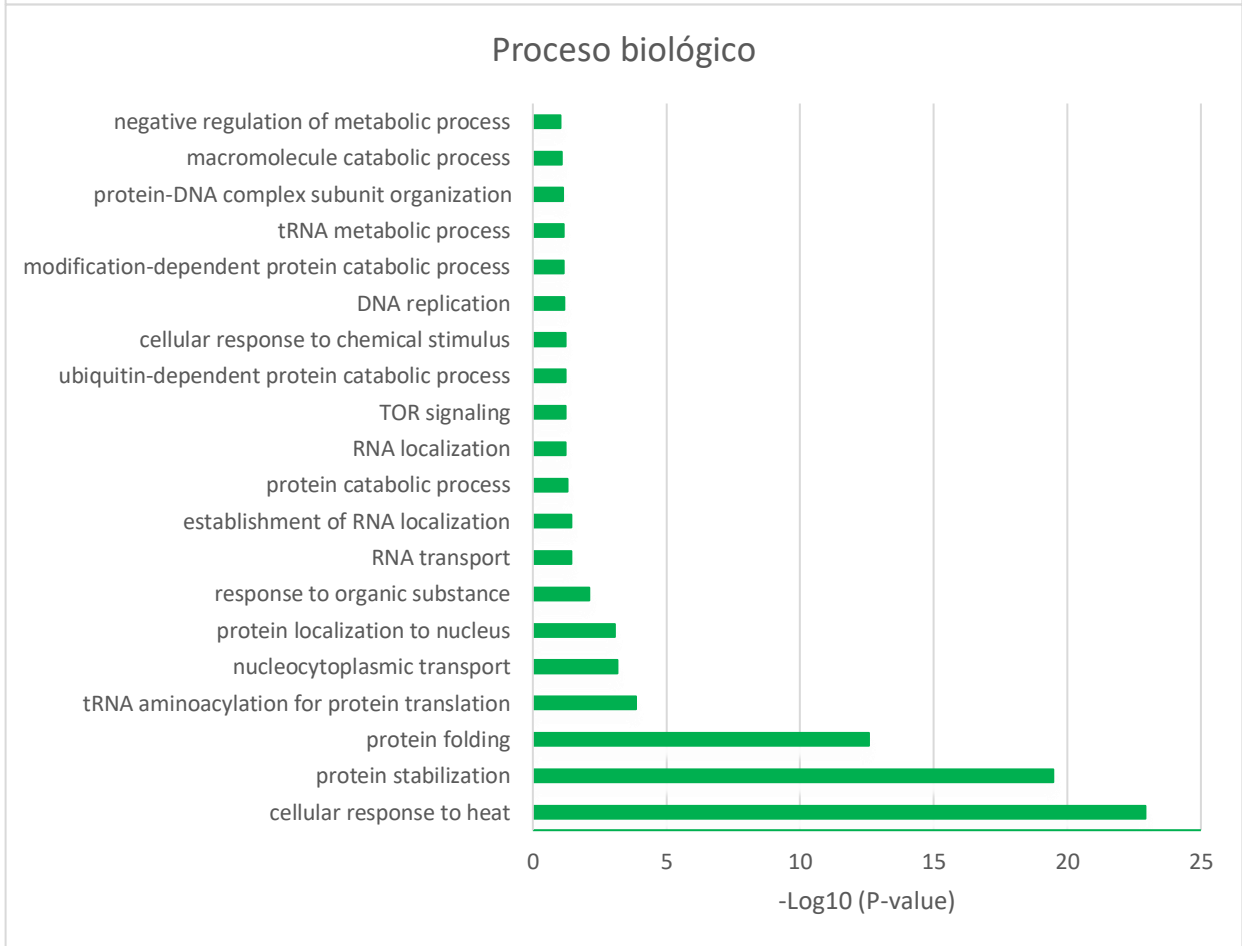
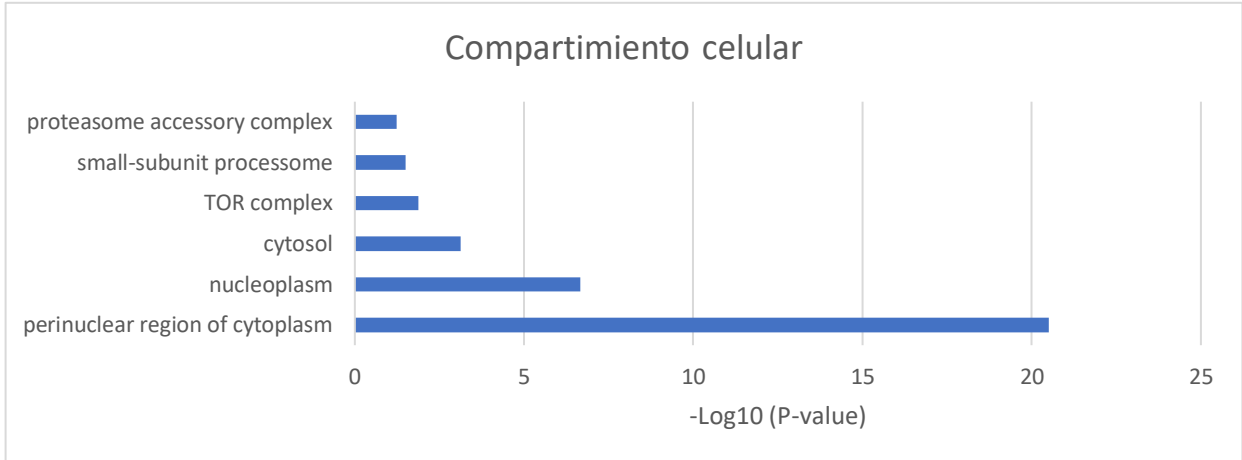


Fig. 27 Diagramas de proteínas purificadas. A) Número de proteínas exclusivas de ambas condiciones de crecimiento. Se comparten 91 proteínas entre ambas condiciones, las cuales se analizan en el panel B. B) Número de proteínas que subieron (alza) o bajaron (baja) sus niveles, después del choque térmico. 39 proteínas no tuvieron cambios.

7.4 Análisis de enriquecimiento funcional

Se realizó un análisis de enriquecimiento funcional para estudiar más a fondo la expresión e interacción de las proteínas asociadas a Maf1 en ambas condiciones de crecimiento evaluadas. Tras el análisis de enriquecimiento de *Gene Ontology* (GO), se detectaron tres categorías (proceso biológico, componente celular y función molecular) utilizando la base de datos DAVID. Los términos más significativamente enriquecidos ($P < 0.05$) en cada categoría se presentan en la Fig. 28.



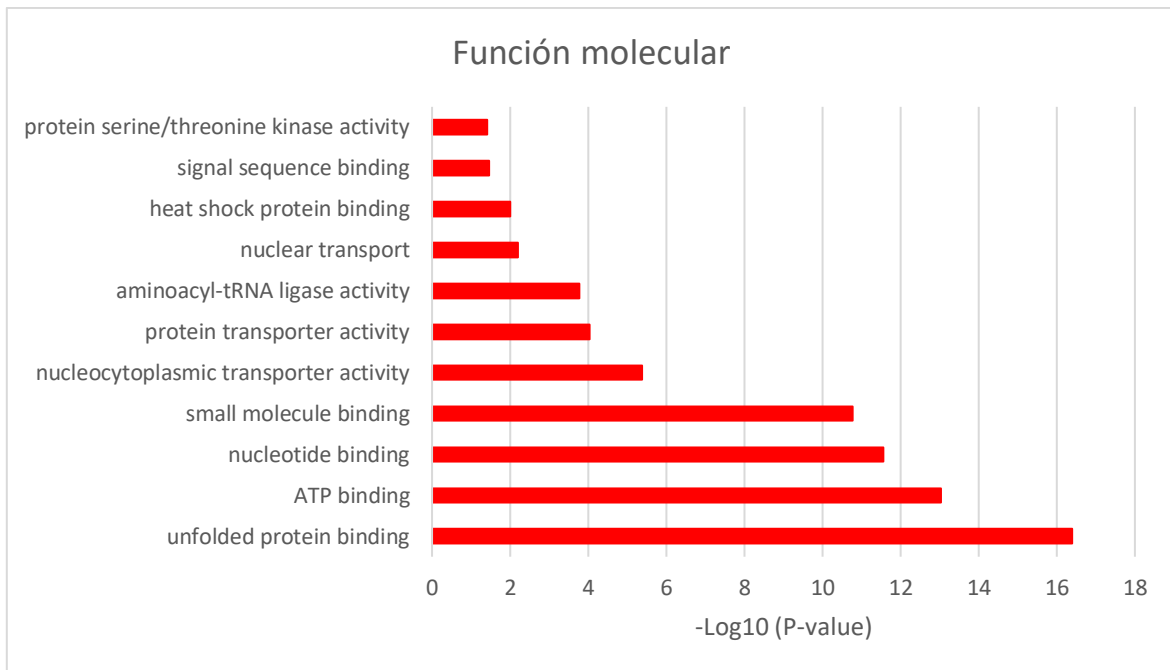


Fig. 28 GO funcional de las proteínas que interaccionan con Maf1 en condiciones favorables y de estrés. Se identificaron procesos biológicos (verde), compartimiento celular (azul) y función molecular de vías biológicas enriquecidas utilizando la base de datos del software de DAVID. Categorías estadísticamente significativas ($P < 0.05$). Los valores estadísticamente significativos ajustados se transformaron logarítmicamente en base 10 negativo.

Con respecto al proceso biológico, la mayoría de las proteínas interactuantes pertenecen a la categoría de respuesta celular al calor, estabilización de proteínas y aminoacilación de tRNAs; además en menor medida se encuentran representadas proteínas con destino en el núcleo, transporte de RNA, entre otras.

Con respecto a la compartimentación de las proteínas interactuantes con Maf1, se observó que la mayoría recae de manera muy notable en la periferia nuclear citoplásmica, y con un número menor en el nucleoplasma y el citosol. Finalmente las funciones moleculares mayormente representadas fueron las de unión a proteínas desplegadas, unión a nucleótidos y proteínas con actividad de transportador núcleo-citoplasma.

7.5 Localización subcelular de LmMaf1

Con la finalidad de determinar el patrón de localización subcelular de Maf1 en condiciones favorables y estresantes de crecimiento, se realizaron experimentos de inmunofluorescencia indirecta. Se utilizó un anticuerpo que reconoce al epítipo de ProtC de la etiqueta PTP de la proteína recombinante LmMaf1-PTP. Para visualizar el nucleolo, se utilizó un anticuerpo que reconoce a la proteína nucleolar Nop56 (Figura 27).

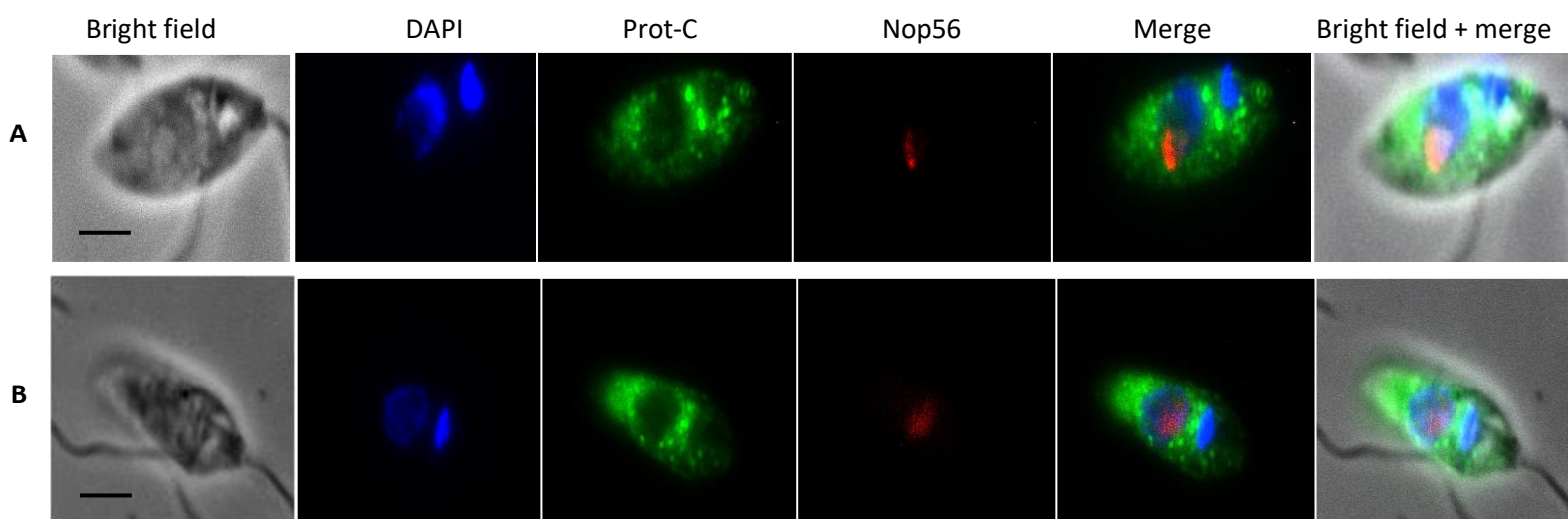


Fig. 29 Localización celular de LmMaf1-PTP. El experimento se realizó tres veces, por duplicado. Se muestran imágenes representativas. **A:** Condiciones favorables de crecimiento. **B:** Condiciones de estrés de calor. Se denota un patrón parecido entre ambas condiciones. LmMaf1 marcado con PTP, se detectó mediante inmunofluorescencia con un anticuerpo policlonal anti-Prot C de conejo y una inmunoglobulina G (IgG) anti-conejo junto con Alexa Fluor 568 (rojo). Nop56 se detectó con un anticuerpo anti-Nop56 de ratón y un anticuerpo secundario IgG anti-ratón conjugado con Alexa Fluor 488 (verde). Los núcleos (N) y el DNA del cinetoplasto (K) se tiñeron con 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI; azul). La barra de escala corresponde a 2 micras.

El patrón observado entre ambas condiciones fue muy similar, apreciándose una señal punteada e intensa en el citoplasma, sobre todo alrededor del núcleo (Figura 29). Dentro del núcleo, la señal detectada de LmMaf1 fue débil. Este resultado difiere del reportado en otros organismos, donde Maf1 se localiza tanto en citoplasma como en núcleo en condiciones favorables de crecimiento, pero tiene una localización nuclear bajo

condiciones de estrés (Chong *et al.*, 2015; Romero-Meza *et al.*, 2017; Soprano *et al.*, 2017; Wei *et al.*, 2009; Kantidakis *et al.*, 2010).

8 Discusión

Los protozoos tripanosomátidos causan enfermedades mortales como la leishmaniasis y la tripanosomiasis, las cuales tienen un gran impacto sanitario y económico en las regiones tropicales y subtropicales del mundo. Sin embargo, pocas son las iniciativas farmacéuticas que están interesadas en desarrollar tratamientos efectivos para ellas. Se espera que, en el mediano plazo investigaciones enfocadas en el conocimiento de aspectos fundamentales de la biología molecular de este grupo de organismos brinden información importante para ayudar a controlar estas enfermedades parasitarias. Por otra parte, el estudio molecular de estos organismos puede arrojar luz sobre la conservación a lo largo de la evolución de las proteínas y los distintos complejos proteínicos que participan en procesos fundamentales como la transcripción. Así, uno de los complejos importantes de estudiar son las RNA polimerasas, así como otras proteínas que se asocian al proceso de transcripción y regulación de la expresión genética.

La RNA Pol III tiene un papel fundamental en la transcripción de los RNAs más abundantes de los organismos eucariontes, los tRNAs; así como de otros RNAs esenciales para distintos procesos biológicos, como el rRNA 5S, constituyente estructural y funcional de la subunidad mayor de los ribosomas; además de sintetizar el snRNA U6 que es parte esencial en el proceso de splicing, y el RNA 7SK que participa en la regulación de la transcripción. El gran costo de energía que conlleva la síntesis de estos RNAs hace que la regulación de la RNA Pol III esté estrechamente relacionada con el crecimiento celular, regulado por la disponibilidad de nutrientes y las condiciones de diversos tipos de estrés (Willis & Moir, 2018).

Maf1 es un regulador global de la transcripción (Romero-Meza *et al.*, 2017; Orioli *et al.*, 2016; Willis & Moir, 2018), el cual actúa en el control de este proceso cuando hay condiciones de estrés, como la falta de nutrientes. Los análisis bioinformáticos realizados

en este trabajo arrojan que la secuencia de LmMaf1 se parece poco a la de su ortólogo en humano, ya que únicamente presenta una identidad del 32% (Figura 20). No obstante, este porcentaje de identidad es muy parecido al reportado para ortólogos de Maf1 en otras especies, el cual ronda entre 26-35% (Johnson *et al.*, 2007; Vannini *et al.*, 2010; Cai & Wei, 2016; McLean & Jacobs-Lorena, 2017; Rideout *et al.*, 2012; Romero-Meza *et al.*, 2017; Soprano *et al.*, 2013). A pesar de la relativamente baja homología, LmMaf1 sí posee las tres secuencias características de Maf1: los dominios A, B y C. Asimismo, mediante modelado por homología encontramos que la estructura tridimensional predicha de LmMaf1 es muy parecida a la de Maf1 de humano (Figura 21).

Los experimentos de purificación por afinidad en tándem y espectrometría de masas permitieron la identificación de numerosas proteínas que podrían interactuar con LmMaf1, de manera directa o indirecta, en condiciones favorables de crecimiento (Tabla 1). Como se anticipaba, entre las proteínas identificadas se encontraron distintas subunidades de las tres RNAs polimerasas, lo cual concuerda con lo reportado en otros eucariontes (Johnson *et al.*, 2007). Entre éstas, se hallaron subunidades que han sido reportadas como esenciales para el control de la transcripción y que son blanco de unión directa con Maf1, como C160, C128, AC40, C37 y C82, que son importantes para que se lleve a cabo la formación del complejo de pre-inicio (PIC) y el proceso de elongación de la transcripción de RNA Pol III (Willis & Moir, 2018). También se identificaron RPB1 y RPB2, las dos subunidades mayores de la RNA Pol II. Estos resultados sugieren que Maf1 regula la transcripción global nuclear en *L. major*, como se ha reportado en células humanas.

También se encontraron factores de transcripción, como subunidades de TFIIC, que son importantes en el ensamblaje de los PIC y BRF1, que se ha reportado que se une directamente a este represor de transcripción en otras especies (Rollins *et al.*, 2007); estas proteínas no se presentan en la Tabla 1 debido a que se identificó un número de péptidos

reducido (menor a 8). En relación con el control de transcripción, se encontró la subunidad Not1 del complejo CCR4-NOT, el cual regula la expresión génica en todos los pasos, desde la transcripción del mRNA en el núcleo hasta su degradación en el citoplasma (Collart, 2016; Miller *et al.*, 2018). También se identificó CTR9, subunidad del complejo PAF, que interactúa con la RNA polimerasa II y coordina la configuración de las marcas de histonas asociadas con la transcripción activa (Zhu *et al.*, 2005). Curiosamente, hallazgos recientes indican que PAF1 también participa en la transcripción de RNA Pol I y RNA Pol III (Bhalla *et al.*, 2019).

Maf1 se ve regulada por cambios post traduccionales de fosforilación por acción de cinasas y de desfosforilación por medio de distintas fosfatasas. Algunas de estas proteínas han sido ampliamente estudiadas, pues tienen un papel importante en el control de la función y la localización celular de Maf1 en respuesta a distintos tipos de estrés y condiciones celulares (Willis & Moir, 2018). De manera interesante, varias de estas proteínas fueron copurificadas con LmMaf1-PTP, como subunidades del complejo TOR, cinasa importante para la función de Maf1. También se identificaron otras cinasas, como AKT y MAP cinasa, lo que sugeriría que Maf1 pudiera tener un papel en el desarrollo y proliferación celular en *Leishmania*. Las fosfatasas PP2 y PP4, importantes para el control de la localización de Maf1 en levadura (Oler & Cairns, 2012), también se encontraron en este estudio.

Siguiendo la línea de la localización celular de Maf1, se encontraron varias proteínas del complejo del poro nuclear (NPC), incluyendo a Nup 96. Hay estudios que sugieren que los tDNA se asocian con proteínas del NPC para coordinar la transcripción de RNA Pol III con la exportación nuclear de pre-tRNA (Chen, M., & Gartenberg, M. R., 2014). Así, es probable que, además de regular la transcripción de los tRNA, Maf1 también participe en su exportación en *L. major*. De igual manera, se copurificó un posible ortólogo

(LmjF.36.2680) de un transportador llamado MSN5, el cual interactúa directamente con Maf1 en levadura para regular su localización subcelular (Towpik *et al.*, 2008).

Anteriormente, en estudios realizados por Willis *et al.*, 2008, donde se empleó la técnica de análisis de arreglo genético sintético (SGA, por sus siglas en inglés) para identificar las interacciones genéticas de Maf1 en levadura, se hallaron algunas proteínas que participan en la biogénesis del ribosoma o en la traducción. De manera interesante, entre las proteínas que identificamos en nuestros experimentos se encontraron varias que participan en estos procesos, como NOP56, fibrilarina, aminoacil-tRNA sintetasas y proteínas de la familia PUF que pueden involucrarse en distintas funciones biológicas, incluyendo el procesamiento del rRNA.

Se ha reportado en humano y en *C. elegans* que los niveles de Maf1 en el núcleo son regulados por el sistema ubiquitina proteosoma (UPS, por sus siglas en inglés), quien realiza la mayor parte de la degradación regulada de proteínas en eucariontes (Pradhan *et al.*, 2017). Nuestros resultados indican la posible interacción de LmMaf1 con proteínas relacionadas a vías de ubiquitanción y proteólisis mediadas por el proteosoma. Algunas ubiquitin ligasas, proteínas con dominio de anillo y poliubiquitinación, así como diversas subunidades del proteosoma se encontraron en los análisis de espectrometría, sugiriendo que el UPS también regula la cantidad de Maf1 en *L. major*. Por otro lado, también se encontraron algunas proteínas de la familia de las cullinas, proteínas de andamiaje hidrofóbicas que brindan apoyo a las ubiquitinas ligasas (E3). Las cullinas se combinan con proteínas RING para formar ligasas de ubiquitina Cullin-RING (CRL) que son muy diversas y desempeñan un papel en innumerables procesos celulares, sobre todo en la degradación de proteínas por ubiquitinación (Sarikas *et al.*, 2011).

Maf1 cumple una función importante en el control de la transcripción de genes de tRNA y rRNA 5S, quienes a su vez participan en la regulación del crecimiento celular. Así,

Maf1 y la RNA Pol III se ven implicados con la síntesis de lípidos, pues una mayor proliferación celular requiere de una tasa alta de producción de lípidos para generar nuevas membranas (Willis & Moir, 2018). De manera interesante, en este estudio se encontraron algunas proteínas importantes en la síntesis/metabolismo de lípidos, tales como la Acetil-CoA carboxilasa, que participa en la síntesis de ácidos grasos. Además, aunque con un número bajo de péptidos, también se identificó la sintasa de ácidos grasos FASN y la fosfatasa de lípidos PTEN. Esta última también regula directamente la transcripción de la RNA Pol III, al fosforilar a TFIIIB y al inhibir a TORC1. Además, se ha observado que la expresión de PTEN es inducida por Maf1 (Johnson & Stiles, 2016).

Las chaperonas moleculares son una familia diversa de proteínas que funcionan para proteger las proteínas de la agregación irreversible durante la síntesis y en tiempos de estrés celular. Entre las proteínas que posiblemente interactúan con Maf1 y tienen implicaciones de reparación y respuesta al daño a DNA están diversas proteínas Heat shock, una proteína chaperona DNAJ, así como factores tumorales como ARMCX3, que tiene injerencia en el ciclo celular, proceso que es dependiente de la integridad del DNA.

De manera notable, entre las proteínas que copurificaron con LmMaf1-PTP encontramos un elevado número de proteínas de unión a RNA. Entre éstas podemos mencionar proteínas de la familia PUF/pumilio, RNA helicasa HEL67, proteínas de poliadenilación, y la proteína de metilación de RNA SpoU. Este hecho sugiere que LmMaf1 también podría regular la expresión genética a nivel post-transcripcional, uniéndose a regiones 5' y/o 3'-UTR de mRNAs para controlar su abundancia. Trabajos futuros permitirán probar esta hipótesis.

Entre las proteínas que copurificaron con LmMaf1, y cuya asociación con Maf1 no había sido reportada en otras especies, tenemos a la subunidad Elp3B del complejo elongador, TIP120 que se une a la proteína TBP para regular la expresión de genes

transcritos por la RNA Pol II, y a Los1. En *T. brucei*, Elp3B es nucleolar y regula negativamente la transcripción del rRNA (Alsford & Horn, 2011). En *L. major*, Elp3B también se localiza en el nucleolo (Moreno-Campos *et al.*, 2016), lo que sugiere que su papel en el control de la transcripción del rRNA se conserva en los tripanosomátidos (Martínez-Calvillo *et al.*, 2019). Por otra parte, TIP120 es una proteína relativamente poco estudiada que estimula el nivel basal de transcripción a través de un mayor reclutamiento de las proteínas formadoras del PIC que interactúan con las tres RNA polimerasas (Makino *et al.*, 1999). Por su parte, Los1 es un exportador de tRNAs, y su interacción con Maf1 podría darse mientras ésta regula la síntesis de los tRNAs (Boguta, 2013).

Ahora bien, tomando en cuenta los resultados obtenidos con parásitos en condiciones de estrés (Tabla 2), en general se copurificaron las mismas proteínas que en condiciones óptimas de crecimiento, aunque algunas cambiaron su interacción con Maf1 al alza o a la baja. El cambio más notable, y como era de esperarse, fue un alza en los niveles de las proteínas *heat shock*, ya que se sabe que son un conjunto de proteínas que producen las células cuando son sometidas a cualquier tipo de estrés (Li & Srivastava, 2003).

Además de su participación en la regulación de la transcripción de la RNA Pol III, se ha reportado que Maf1 regula la expresión de algunos genes transcritos por Pol II y por Pol I (Romero-Meza *et al.*, 2017). Algo interesante es que las subunidades que se ha demostrado que interactúan con Maf1 (Johnson *et al.*, 2007) aumentaron sus niveles de interacción con ésta en las condiciones de estrés. Esto sugiere que la actividad represora de Maf1 se incrementa en condiciones desfavorables de crecimiento en *L. major*, como se ha observado en levadura. Varios de los reguladores de transcripción mostraron cambios al alza, como la RuvB-like DNA helicasa, aunque la subunidad Not1 del complejo CCR4-NOT disminuyó.

En relación con las proteínas de unión a RNA, hubo cambios tanto al alza como a la baja. Entre las que aumentaron están algunas proteínas de la familia Pumilio/PUF, involucradas en procesos postranscripcionales como la degradación y transporte de RNA, el procesamiento de rRNA y la represión de la traducción (Wang *et al.*, 2018). Una de las que cambió a la baja es la proteína que contiene el dominio AAA, la cual participa en diversas funciones celulares, como la replicación del DNA, la degradación de proteínas, la fusión de membranas, la transducción de señales y la regulación de la expresión génica (Erzberger & Berger, 2006).

Por otra parte, aumentaron los niveles de la luminal binding protein 1 (BiP), chaperona del retículo endoplásmico que juega un papel clave en el plegamiento de proteínas y el control de calidad en el retículo endoplásmico. También puede desempeñar un papel en la apoptosis y la proliferación celular (Macer & Koch, 1988). También se ha descrito que Maf1 tiene presencia en el nucleolo (Wei & Zheng, 2010) y que podría repercutir en la viabilidad celular. En condiciones de estrés hubo un cambio al alza en la fibrilarina, metiltransferasa localizada principalmente en el nucléolo y cuerpos de Cajal. Sin embargo, su papel en el núcleo va más allá de la metilación de RNA e histona H2A, pues los datos sugieren que está involucrada directamente en el procesamiento tanto del rRNA como de algunos mRNA (Rodríguez-Corona *et al.*, 2015).

Maf1 regula su localización y por lo tanto su función represora en el núcleo por medio de fosforilación de sus aminoácidos. De manera interesante, varias cinasas aumentaron su presencia en la condición de estrés, como una proteína predicha por HHpred como TPK2, la cual promueve el crecimiento celular de la levadura a través de la vía de señalización Ras-cAMP (Conlan & Tzamarias, 2001). Además, la proteína NEK17 también aumentó sus niveles. En humanos, ésta es un miembro de la familia de proteínas codificadas por el gen llamado *Never in Mitosis Gene A* (NIMA) y realiza funciones esenciales como regulador de

los telómeros y participa en los cambios estructurales que se llevan a cabo desde la interfase hasta la división mitótica (Fry *et al.*, 2012).

Maf1 se transloca hacia el núcleo en varios organismos en condiciones de estrés (Chong *et al.*, 2015). En la categoría de transporte nuclear se dio al alza la proteína importina 5 y a la baja Nup96. En condiciones de estrés cambió al alza una GTPasa similar a Ras, las cuales realizan funciones reguladoras centrales en una miríada de procesos celulares, como la división celular, la diferenciación, la adhesión célula-célula, el crecimiento y la apoptosis (Maertens & Cichowski, 2014).

Maf1 realiza otras funciones celulares, incluyendo su participación en vías de señalización que regulan el ciclo circadiano, la regulación de cáncer y proliferación celular y participación secundaria en vías que alteran el ciclo celular, como la vía de TORC, además de tener implicaciones en el metabolismo de ácidos grasos (Willis & Moir, 2018). Algunas proteínas relacionadas a estos procesos, y que sufrieron cambios a la baja en la condición de estrés, son: HEAT repeat-containing protein 1, requerida para la transcripción óptima del pre-rRNA por la RNA Pol I (Prieto & McStay, 2007); y la proteína MSH2, actor principal en MMR (Mismatch repair) y que se ha implicado en una variedad de procesos que sirven para proteger la integridad genómica (Tronov *et al.*, 2007). En metabolismo de lípidos se dio a la baja una *long chain fatty Acyl CoA sintasa*, la cual se ha reportado que juega un papel en la regulación fisiológica, afectando el transporte de proteínas, la activación de enzimas, la acilación de proteínas, la señalización celular y la regulación transcripcional (Hisanaga *et al.*, 2004).

Aunque no hay evidencia que indique un papel regulador directo, recientemente se observó que la ubiquitinación de Maf1 es necesaria para controlar su estabilidad y la posterior transcripción dependiente de RNA Pol III (Wang, *et al.*, 2019). Dentro de la categoría de ubiquitinación, fue notable el cambio a la baja de las subunidades regulatorias

no ATP-asa 1 y 2 del proteosoma y una ubiquitina transferasa (dominio HECT). Llama la atención que otras subunidades del proteosoma cambiaron al alza, como las regulatorias no ATP-asa 5, 6 y 9 (Tabla 2).

Es importante resaltar la aparición de la proteína *NIMA-related Kinase*, exclusiva de la condición de estrés, que como se mencionó anteriormente, está directamente relacionada al ciclo celular, al contribuir significativamente a la orquestación de la progresión mitótica y, por lo tanto, proteger a las células de la inestabilidad cromosómica. Esto podría indicar el papel regulatorio indirecto que tiene Maf1 en vías de crecimiento celular y diferenciación, ya que esta familia de proteínas tiene un impacto directo en la motilidad, la morfología, la polaridad, la división celular y la expresión génica (Amin *et al.*, 2013).

Relacionado con los resultados anteriores, en el análisis de *Gene Ontology* realizado se encontró de manera interesante que las categorías de función molecular y proceso biológico mayormente representadas tienen una correlación al tratarse de categorías relacionadas a la estabilidad de proteínas desplegadas y de transportación entre núcleo y citoplasma, lo cual se relacionaría con el hecho ya bien caracterizado de que Maf1 está en constante translocación de citoplasma hacia al núcleo y viceversa al darse situaciones de estrés celular que obligan a la célula a activar mecanismos de estabilización de proteínas y de otras vías celulares que resulten en la estabilización de la célula.

En menor medida se ven categorías que tienen que ver con el complejo del proteosoma y ubiquitinación que, como ya se ha reportado en otros organismos, tienen implicación en la estabilidad y función de Maf1 (Rohira, *et al.*, 2013) Un detalle interesante es además que los análisis arrojan que también se vieron representados procesos de aminoacilación de tRNAs y de transporte de RNA, lo cual refuerza la idea de que Maf1 tiene implicaciones más allá del silenciamiento de genes transcritos por las RNA pols, sino que

además, como se ha visto en algunos estudios, puede tener injerencia en acumulación de tRNAs o interacción directa o indirecta con alguna especie de RNA.

Finalmente, los ensayos de inmunofluorescencia realizados para este trabajo revelaron que la señal de la proteína recombinante LmMaf1-PTP es principalmente citoplásmica tanto en condiciones favorables como bajo estrés (Figura 29), concentrándose principalmente alrededor del núcleo. Esto concuerda con los análisis de *Gene Ontology*, los cuales revelaron que la mayoría de las proteínas interactuantes tienen una localización muy marcada en la región perinuclear, seguida de una localización en nucleoplasma y posteriormente, citoplásmica (Figura 28). Los compartimentos celulares donde principalmente interaccionan las proteínas con Maf1 son en complejos de interacción DNA-RNA Pol III, en el proteosoma (el cual se localiza tanto en núcleo como citoplasma) (Guo, 2002) y en menores niveles en el nucleoplasma, lo cual concuerda con lo observado en las imágenes de inmunofluorescencia (Figura 29).

Estos resultados difieren de lo reportado en levadura, donde Maf1 se localiza predominantemente en el citoplasma en condiciones normales de crecimiento, y se reposiciona en el núcleo en condiciones de estrés (Towpik, 2008; Chong *et al.*, 2015). Cabe mencionar que entre las proteínas que copurificaron con LmMaf1-PTP en ambas condiciones hay tanto proteínas citoplásmicas como nucleares, lo que indica la presencia de Maf1 en el citoplasma y el núcleo. No podemos descartar la posibilidad de que la localización celular de Maf1 presente un patrón distinto en la línea celular recombinante debido a la posible sobreexpresión de la proteína.

9 Conclusiones

- Aunque la secuencia de aminoácidos de LmMaf1 no es muy parecida a la de su ortólogo en humano, las estructuras secundaria y tridimensional predichas sí están conservadas.
- Se predijeron algunos aminoácidos susceptibles a modificaciones post traduccionales como fosforilación, ubiquitinación y sumoilación, importantes para la función y regulación de Maf1.
- Numerosas proteínas, involucradas en diversas funciones, copurificaron con LmMaf1-PTP. Esto sugiere que Maf1 lleva a cabo múltiples roles en *Leishmania*.
- Entre las proteínas copurificadas se encontraron diversas subunidades de las tres RNA polimerasas, así como reguladores globales de la transcripción, lo que indica que Maf1 participa en el control transcripcional de las tres RNA polimerasas nucleares en *L. major*.
- Se identificaron también varias proteínas cuya asociación con Maf1 no había sido reportada en otros organismos, como TIP120, Elp3B y Los1.
- En general, bajo condiciones de estrés de calor se copurificaron las mismas proteínas que en condiciones óptimas de crecimiento, aunque muchas de ellas cambiaron su concentración relativa, al alza o a la baja.
- La proteína cinasa NIMA copurificó con LmMaf1 sólo en condiciones de estrés, lo que sugiere su participación en la modulación de la función de LmMaf1 en condiciones adversas de crecimiento.
- LmMaf1 tiene una localización principalmente citoplásmica tanto en promastigotes creciendo activamente como en células sometidas a estrés térmico.

10 Perspectivas

- Confirmar la interacción de Maf1 con otras proteínas con distintas técnicas moleculares como coimmunoprecipitación o inmunoprecipitación cuantitativa combinada con *knock-out*.
- Verificar la localización subcelular de Maf1 en *Leishmania* bajo otras condiciones de estrés celular como senescencia y estrés nutricional.
- Realizar mutaciones en los distintos dominios de Maf1 con el fin de evaluar la importancia de éstos en su actividad represora.
- Evaluar las fosforilaciones u otras modificaciones post traduccionales de la proteína en condiciones favorables de crecimiento y con distintos tipos de estrés celular.

11 Referencias bibliográficas

- Abadías-Granado, I., Diago, A., Cerro, P. A., Palma-Ruiz, A. M., & Gilaberte, Y. (2021). *Leishmaniasis cutánea y mucocutánea. Actas Dermo-Sifiliográficas*, 112(7), 601-618.
- Akimov, V., Barrio-Hernandez, I., Hansen, S. V., Hallenborg, P., Pedersen, A. K., Bekker-Jensen, D. B., ... & Blagoev, B. (2018). *UbiSite approach for comprehensive mapping of lysine and N-terminal ubiquitination sites. Nature structural & molecular biology*, 25(7), 631-640.
- Alexander, J., Satoskar, A. R., & Russell, D. G. (1999). *Leishmania species: models of intracellular parasitism. Journal of cell science*, 112(18), 2993-3002.
- Alsford, S., & Horn, D. (2011). *Elongator protein 3b negatively regulates ribosomal DNA transcription in African trypanosomes. Molecular and Cellular Biology*, 31(9), 1822-1832.
- Alvar, J., Velez, I. D., Bern, C., Herrero, M., Desjeux, P., Cano, J., Jannin, J., den Boer, M., y WHO Leishmaniasis Control Team. (2012). *Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. PLOS ONE*, 7(5), e35671.
- Amin, E., Dubey, B. N., Zhang, S. C., Gremer, L., Dvorsky, R., Moll, J. M., ... & Ahmadian, M. R. (2013). *Rho-kinase: regulation,(dys) function, and inhibition. Biological chemistry*, 394(11), 1399-1410.
- Arimbasseri, A. G., & Maraia, R. J. (2013). *Distinguishing core and holoenzyme mechanisms of transcription termination by RNA polymerase III. Molecular and Cellular Biology*, 33 (8) 1571-1581.
- Arimbasseri, A. G., & Maraia, R. J. (2015). *Mechanism of transcription termination by RNA polymerase III utilizes a non-template strand sequence-specific signal element. Molecular Cell*, 58(6), 1124-1132.

- Bates, P. A. (2007). *Transmission of Leishmania metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies. International Journal for Parasitology*, 37(10), 1097-1106.
- Bates, P. A., & Rogers, M. E. (2004). *New insights into the developmental biology and transmission mechanisms of Leishmania. Current Molecular Medicine*, 4(6), 601-609.
- Ben-Shlomo, H., Levitan, A., Bèjà, O., & Michaeli, S. (1997). *The trypanosomatid Leptomonas collosoma 7SL RNA gene. Analysis of elements controlling its expression. Nucleic Acids Research*, 25(24), 4977-4984.
- Benne, R., Van Den Burg, J., Brakenhoff, J. P., Sloof, P., Van Boom, J. H., & Tromp, M. C. (1986). *Major transcript of the frameshifted coxII gene from trypanosome mitochondria contains four nucleotides that are not encoded in the DNA. Cell*, 46(6), 819-826.
- Besteiro S, Williams RA, Coombs GH & Mottram JC. (2007) *Protein turnover and differentiation in Leishmania. Int J Parasitol.* Aug;37(10),1063-75.
- Bhalla, P., Shukla, A., Vernekar, D. V., Arimbasseri, A. G., Sandhu, K. S., & Bhargava, P. (2019) *Yeast PAF1 complex counters the pol III accumulation and replication stress on the tRNA genes. Scientific reports*, 9(1), 1-13.
- Bhattacharya, S., Bakre, A., & Bhattacharya, A. (2002) *Mobile genetic elements in protozoan parasites. Journal of genetics*, 81(2), 73-86.
- Boguta, M. (2013). *Maf1, a general negative regulator of RNA polymerase III in yeast. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Regulatory Mechanisms*, 1829(3-4), 376-384.
- Boguta, M. & Graczyck, D. (2011). "RNA polymerase III under control: repression and de-repression." *Trends in biochemical sciences* 36.9 (2011): 451-456.

- Boissard, S., Lagniel, G., Garmendia-Torres, C., Molin, M., Boy-Marcotte, E., Jacquet, M., ... & Chédin, S. (2009). *H₂O₂ activates the nuclear localization of Msn2 and Maf1 through thioredoxins in Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryotic Cell*, 8(9), 1429-1438.
- Boothroyd, J. C., & Cross, G. A. M. (1982). *Transcripts coding for variant surface glycoproteins of Trypanosoma brucei have a short, identical exon at their 5' end*. *Gene*, 20(2), 281-289.
- Bringaud, F., Müller, M., Cerqueira, G. C., Smith, M., Rochette, A., El-Sayed, N. M. A., ... & Ghedin, E. (2007). *Members of a large retroposon family are determinants of post-transcriptional gene expression in Leishmania*. *PLoS pathogens*, 3(9), e136.
- Brown, A. P., Affleck, V., Fawcett, T., & Slabas, A. R. (2006). *Tandem affinity purification tagging of fatty acid biosynthetic enzymes in Synechocystis sp. PCC6803 and Arabidopsis thaliana*. *Journal of Experimental Botany*, 57(7), 1563-1571.
- Bushnell, D. A., & Kornberg, R. D. (2003). *Complete, 12-subunit RNA polymerase II at 4.1-Å resolution: implications for the initiation of transcription*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(12), 6969-6973.
- Cai, Y., & Wei, Y. H. (2016). *Stress resistance and lifespan are increased in C. elegans but decreased in S. cerevisiae by maf1-1/Maf1 deletion*. *Oncotarget*, 7(10), 10812.
- Campbell, D. A., Thomas, S., & Sturm, N. R. (2003). *Transcription in kinetoplastid protozoa: why be normal?* *Microbes and Infection*, 5(13), 1231-1240.
- Chen, M., & Gartenberg, M. R. (2014). *Coordination of tRNA transcription with export at nuclear pore complexes in budding yeast*. *Genes & development*, 28(9), 959-970.

- Chong, Y. T., Koh, J. L., Friesen, H., Duffy, S. K., Cox, M. J., Moses, A., Moffat, J., Boone, C., & Andrews, B. J. (2015). *Yeast proteome dynamics from single cell imaging and automated analysis*. *Cell*, 161(6), 1413-1424.
- Chymkowitch, P., Aanes, H., Koehler, C., Thiede, B., Lorenz, S., Meza-Zepeda, L., Klungland, A., & Enserink, J. M. (2015). *Sumoylation of Rap1 mediates the recruitment of TFIID to promote transcription of ribosomal protein genes*. *Genome Research*, 25(6), 897-906.
- Chymkowitch, P., & Enserink, J. M. (2018). *Regulation of tRNA synthesis by posttranslational modifications of RNA polymerase III subunits*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Regulatory Mechanisms*, 1861(4), 310-319.
- Clemens, K. R., Liao, X., Wolf, V., Wright, P. E., & Gottesfeld, J. M. (1992). *Definition of the binding sites of individual zinc fingers in the transcription factor IIIA-5S RNA gene complex*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 89(22), 10822-10826.
- Cohen-Freue, G., Holzer, T. R., Forney, J. D., & McMaster, W. R. (2007). *Global gene expression in Leishmania*. *International Journal for Parasitology*, 37(10), 1077-1086.
- Collart, M. A. (2016). *The Ccr4-Not complex is a key regulator of eukaryotic gene expression*. *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA*, 7(4), 438-454.
- Collins, M. O., & Choudhary, J. S. (2008). *Mapping multiprotein complexes by affinity purification and mass spectrometry*. *Current Opinion in Biotechnology*, 19(4), 324-330.
- Conlan, R. S., & Tzamarias, D. (2001). *Sfl1 functions via the co-repressor Ssn6-Tup1 and the cAMP-dependent protein kinase Tpk2*. *Journal of molecular biology*, 309(5), 1007-1015.

- Cordon-Obras, C., Gomez-Liñan, C., Torres-Rusillo, S., Vidal-Cobo, I., Lopez-Farfan, D., Barroso-del Jesus, A., ... & Navarro, M. (2022). *Identification of sequence-specific promoters driving polycistronic transcription initiation by RNA polymerase II in trypanosomes. Cell Reports*, 38(2), 110221.
- Correa, F. & Romero R. (2022) Guía para la atención médica de la leishmaniasis en México. CENAPRECE. www.gob.mx/salud/cenaprece.
- Crighton, D., Woiwode, A., Zhang, C., Mandavia, N., Morton, J. P., Warnock, L. J., Milner, J., White, J. R., & Johnson, D. L. (2003). *p53 represses RNA polymerase III transcription by targeting TBP and inhibiting promoter occupancy by TFIIIB. The EMBO Journal*, 22(11), 2810-2820.
- Das, G., Henning, D., Wright, D., & Reddy, R. (1988). *Upstream regulatory elements are necessary and sufficient for transcription of a U6 RNA gene by RNA polymerase III. The EMBO Journal*, 7(2), 503-512.
- Denninger, V., & Rudenko, G. (2014). *FACT plays a major role in histone dynamics affecting VSG expression site control in Trypanosoma brucei. Molecular microbiology*, 94(4), 945-962.
- Desai, N., Lee, J., Upadhyay, R., Chu, Y., Moir, R. D., & Willis, I. M. (2005). *Two steps in Maf1-dependent repression of transcription by RNA polymerase III. Journal of Biological Chemistry*, 280(8), 6455-6462.
- Docampo, R., de Souza, W., Miranda, K., Rohloff, P., & Moreno, S. N. (2005). *Acidocalcisomes? Conserved from bacteria to man. Nature Reviews Microbiology*, 3(3), 251-261.
- Docampo, R., De Gaudenzi, J. G., Noé, G., Campo, V. A., Frasch, A. C., & Cassola, A. (2011). *Gene expression regulation in trypanosomatids. Essays in biochemistry*, 51, 31-46.

- El-Sayed, N. M., Myler, P. J., Blandin, G., Berriman, M., Crabtree, J., Aggarwal, G., ... & Hall, N. (2005). *Comparative genomics of trypanosomatid parasitic protozoa*. *Science*, 309(5733), 404-409.
- Engelke, D. R., Ng, S. Y., Shastry, B. S., & Roeder, R. G. (1980). *Specific interaction of a purified transcription factor with an internal control region of 5S RNA genes*. *Cell*, 19(3), 717-728.
- Erzberger, J. P., & Berger, J. M. (2006). *Evolutionary relationships and structural mechanisms of AAA+ proteins*. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, 35, 93-114.
- Geiduschek, E. P., & Kassavetis, G. A. (2001). *The RNA polymerase III transcription apparatus*. *Journal of Molecular Biology*, 310(1), 1-26.
- Ghavidel, A., & Schultz, M. C. (2001). *TATA binding protein-associated CK2 transduces DNA damage signals to the RNA polymerase III transcriptional machinery*. *Cell*, 106(5), 575-584.
- Florencio-Martínez, L. E., Cano-Santiago, A., Mondragón-Rosas, F., Gómez-García, M., Flores-Pérez, C., Román-Carraro, F. C., ... & Martínez-Calvillo, S. (2021). *Participation of TFIIIB Subunit Brf1 in Transcription Regulation in the Human Pathogen Leishmania major*. *Genes*, 12(2), 280.
- Flores, P. C. (2011). *Identificación de los componentes proteicos del complejo transcripcional de la RNA polimerasa III en Leishmania major*. Tesis de licenciatura. Director: Dr. Santiago Martínez Calvillo. Facultad de Estudios Superiores Iztacala, UNAM, México DF. Universidad Nacional Autónoma de México, México.
- Foster, M. P., Wuttke, D. S., Radhakrishnan, I., Case, D. A., Gottesfeld, J. M., & Wright, P. E. (1997). *Domain packing and dynamics in the DNA complex of the N-terminal zinc fingers of TFIIIA*. *Nature structural biology*, 4(8), 605-608.

- Fry, A. M., O'Regan, L., Sabir, S. R., & Bayliss, R. (2012). *Cell cycle regulation by the NEK family of protein kinases. Journal of cell science*, 125(19), 4423-4433.
- Gilinger, G., & Bellofatto, V. (2001). *Trypanosome spliced leader RNA genes contain the first identified RNA polymerase II gene promoter in these organisms. Nucleic acids research*, 29(7), 1556-1564.
- Gitari, J. W., Nzou, S. M., Wamunyokoli, F., Kinyeru, E., Fujii, Y., Kaneko, S., & Mwau, M. (2018). *Leishmaniasis recidivans by Leishmania tropica in central rift valley region in Kenya. International Journal of Infectious Diseases*, 74, 109-116.
- Gouge, J., Guthertz, N., Kramm, K., Dergai, O., Abascal-Palacios, G., Satia, K., ... & Vannini, A. (2017). *Molecular mechanisms of Bdp1 in TFIIIB assembly and RNA polymerase III transcription initiation. Nature communications*, 8(1), 130.
- Graczyk, D., Dębski, J., Muszyńska, G., Bretner, M., Lefebvre, O., & Boguta, M. (2011). *Casein kinase II-mediated phosphorylation of general repressor Maf1 triggers RNA polymerase III activation. Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(12), 4926-4931.
- Graczyk, D., White, R. J., & Ryan, K. M. (2015). *Involvement of RNA polymerase III in immune responses. Molecular and cellular biology*, 35(10), 1848-1859.
- Griffiths, A. J. F., Miller, J. H., Suzuki, D. T., Lewontin, R. C., & Gelbart, W. M. (2000). *Transcription: an overview of gene regulation in eukaryotes. An Introduction to Genetic Analysis, WH Freeman and Company, New York*, 7th edition.
- Gu, L., Husain-Ponnampalam, R., Hoffmann-Benning, S., & Henry, R. W. (2007). *The protein kinase CK2 phosphorylates SNAP190 to negatively regulate SNAPC DNA binding and human U6 transcription by RNA polymerase III. Journal of Biological Chemistry*, 282(38), 27887-27896.

- Guerin P. J., Olliaro P., Sundar S., Boelaert M., Croft S. L., Desjeux P., Wasunna M. K. y Bryceson A. D. (2002). *Visceral leishmaniasis: current status of control, diagnosis, and treatment, and a proposed research and development agenda. The Lancet Infectious Diseases*, 2 (8), 494-501.
- Guo, X. (2022). *Localized proteasomal degradation: from the nucleus to cell periphery. Biomolecules*, 12(2), 229.
- Handler M., Patel P., Kapila R., Al-Qubati Y & Schwartz RA. (2015). *Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis: Clinical perspectives. J Am Acad Dermatol.* 2015;73:897-908.
- Handman, E. (1999). *Cell biology of Leishmania. In Advances in parasitology, Academic Press.* 44, 1-39.
- Hanske, J., Sadian, Y., & Müller, C. W. (2018). *The cryo-EM resolution revolution and transcription complexes. Current Opinion in Structural Biology*, 52, 8-15.
- Hailu, A., Dagne, D. A., & Boelaert, M. (2016). *Leishmaniasis. In Neglected Tropical Diseases-Sub-Saharan Africa. Springer, Cham.* 87-112.
- Hernández, A. (2019). *Obtención y caracterización de clonas celulares de Leishmania major que expresen al represor de la transcripción Maf1 fusionado a la etiqueta PTP. Tesis de licenciatura. Director: Dr. Santiago Martínez Calvillo. Facultad de Estudios Superiores Iztacala, UNAM, México DF. Universidad Nacional Autónoma de México, México.*
- Hisanaga, Y., Ago, H., Nakagawa, N., Hamada, K., Ida, K., Yamamoto, M., ... & Miyano, M. (2004). *Structural basis of the substrate-specific two-step catalysis of long chain fatty acyl-CoA synthetase dimer. Journal of Biological Chemistry*, 279(30), 31717-31726.

- Hoffmann, N. A., Jakobi, A. J., Moreno-Morcillo, M., Glatt, S., Kosinski, J., Hagen, W. J., Sachse, C., & Müller, C. W. (2015). *Molecular structures of unbound and transcribing RNA polymerase III*. *Nature*, 528(7581), 231-236.
- Huang, Y., Intine, R. V., Mozlin, A., Hasson, S. & Maraia, R. J. (2005). *Mutations in the RNA polymerase III subunit Rpc11p that decrease RNA 3' cleavage activity increase 3'-terminal oligo (U) length and La-dependent tRNA processing*. *Molecular and Cellular Biology*, 25(2), 621-636.
- Huber, A., Bodenmiller, B., Uotila, A., Stahl, M., Wanka, S., Gerrits, B., ... & Loewith, R. (2009). *Characterization of the rapamycin-sensitive phosphoproteome reveals that Sch9 is a central coordinator of protein synthesis*. *Genes & development*, 23(16), 1929-1943.
- Iben, J. R., Mazeika, J. K., Hasson, S., Rijal, K., Arimbasseri, A. G., Russo, A. N., & Maraia, R. J. (2011). *Point mutations in the Rpb9-homologous domain of Rpc11 that impair transcription termination by RNA polymerase III*. *Nucleic Acids Research*, 39(14), 6100-6113.
- Johnson, D. L., & Stiles, B. L. (2016). *Maf1, a new PTEN target linking RNA and lipid metabolism*. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 27(10), 742-750.
- Johnson, S. S., Zhang, C., Fromm, J., Willis, I. M., & Johnson, D. L. (2007). *Mammalian Maf1 is a negative regulator of transcription by all three nuclear RNA polymerases*. *Molecular cell*, 26(3), 367-379.
- Kantidakis, T., Ramsbottom, B. A., Birch, J. L., Dowding, S. N., & White, R. J. (2010). *mTOR associates with TFIIC, is found at tRNA and 5S rRNA genes, and targets their repressor Maf1*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(26), 11823-11828.

- Kassavetis, G. A. & Geiduschek, E. P. (2006). *Transcription factor TFIIIB and transcription by RNA polymerase III. Biochemical Society Transactions*, 34 (6): 1082-1087.
- Khanna, A., Pradhan, A., & Curran, S. P. (2015). *Emerging roles for Maf1 beyond the regulation of RNA polymerase III activity. Journal of molecular biology*, 427(16), 2577-2585.
- Khatter, H., Vorlaender, M. K., & Mueller, C. W. (2017). *RNA polymerase I and III: similar yet unique. Current opinion in Structural Biology*, 47, 88-94.
- Khoo, S. K., Wu, C. C., Lin, Y. C., Lee, J. C., & Chen, H. T. (2014). *Mapping the protein interaction network for TFIIIB-related factor Brf1 in the RNA polymerase III preinitiation complex. Molecular and Cellular Biology*, 34(3), 551-559.
- Klingbeil, M. M., & Englund, P. T. (2004). *Closing the gaps in kinetoplast DNA network replication. Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(13), 4333-4334.
- Knutson, B. A., & Hahn, S. (2011). *Yeast Rrn7 and human TAF1B are TFIIIB-related RNA polymerase I general transcription factors. Science*, 333(6049), 1637-1640.
- Koch, H., Raabe, M., Urlaub, H., Bindereif, A., & Preußner, C. (2016). *The polyadenylation complex of Trypanosoma brucei: characterization of the functional poly (A) polymerase. RNA Biology*, 13(2), 221-231.
- Kramm, K., Engel, C., & Grohmann, D. (2019). *Transcription initiation factor TBP: old friend new questions. Biochemical Society Transactions*, 47(1), 411-423.
- Kuhn C. D., Geiger S. R., Baumli S., Gartmann M., Gerber J., Jennebach S., Mielke T., Tschochner H., Beckmann R. & Cramer P. (2007). *Functional architecture of RNA polymerase I. Cell*, 131(7), 1260-1272.

- Landeira, D., & Navarro, M. (2007). *Nuclear repositioning of the VSG promoter during developmental silencing in Trypanosoma brucei*. *The Journal of Cell Biology*, 176(2), 133-139.
- Landrieux, E., Alic, N., Ducrot, C., Acker, J., Riva, M., & Carles, C. (2006). *A subcomplex of RNA polymerase III subunits involved in transcription termination and reinitiation*. *The EMBO Journal*, 25(1), 118-128.
- Laskay, T., Van Zandbergen, G., & Solbach, W. (2003). *Neutrophil granulocytes—Trojan horses for Leishmania major and other intracellular microbes?* *Trends in Microbiology*, 11(5), 210-214.
- Lee, Y. L., Li, Y. C., Su, C. H., Chiao, C. H., Lin, I. H., & Hsu, M. T. (2015). *MAF1 represses CDKN1A through a Pol III-dependent mechanism*. *Elife*, 4, e06283.
- Lewin, B. (2004). *Genes IX*. Upper Saddle River, New Jersey. Pearson Prentice Hall.
- Li, Z., & Srivastava, P. (2003). *Heat-shock proteins*. *Current protocols in immunology*, 58(1), A-1T.
- Liang, X. H., Haritan, A., Uliel, S., & Michaeli, S. (2003). *trans and cis splicing in trypanosomatids: Mechanism, factors, and regulation*. *Eukaryotic Cell*, 2(5), 830-840.
- Liu, B., Liu, Y., Motyka, S. A., Agbo, E. E., & Englund, P. T. (2005). *Fellowship of the rings: the replication of kinetoplast DNA*. *Trends in Parasitology*, 21(8), 363-369.
- Lu, D., Alexandra Searles, M., & Klug, A. (2003). *Crystal structure of a zinc-finger–RNA complex reveals two modes of molecular recognition*. *Nature*, 426(6962), 96-100.
- Lu, D., & Klug, A. (2007). *Invariance of the zinc finger module: A comparison of the free structure with those in nucleic-acid complexes*. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 67(2), 508-512.

- Macer, D. R., & Koch, G. L. (1988). *Identification of a set of calcium-binding proteins in reticuloplasm, the luminal content of the endoplasmic reticulum. Journal of Cell Science*, 91(1), 61-70.
- Maertens, O., & Cichowski, K. (2014). *An expanding role for RAS GTPase activating proteins (RAS GAPs) in cancer. Advances in biological regulation*, 55, 1-14.
- Martin, M. P., Gerlach, V. L., & Brow, D. A. (2001). *A novel upstream RNA polymerase III promoter element becomes essential when the chromatin structure of the yeast U6 RNA gene is altered. Molecular and Cellular Biology*, 21(19), 6429-6439.
- Martínez-Calvillo S., Vizuet-de-Rueda J. C., Florencio-Martínez L. E., Manning-Cela R. G. y Figueroa-Angulo E. E. (2010). *Gene expression in trypanosomatid parasites. Journal of Medicine & Biotechnology*, Vol 2010, Num 525241, pp: 15
- Martínez-Calvillo, S., Sunkin, S. M., Yan, S. F., Fox, M., Stuart, K., & Myler, P. J. (2001). *Genomic organization and functional characterization of the Leishmania major Friedlin ribosomal RNA gene locus. Molecular and biochemical parasitology*, 116(2), 147-157.
- 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.
- Martínez-Calvillo, S., Nguyen, D., Stuart, K., & Myler, P. J. (2004). *Transcription initiation and termination on Leishmania major chromosome 3. Eukaryotic cell*, 3(2), 506-517.
- Martínez-Calvillo, S., Romero-Meza, G., Vizuet-de-Rueda, J. C., Florencio-Martínez, L. E., Manning-Cela, R., y Nepomuceno-Mejia, T. (2018). *Epigenetic Regulation of Transcription in Trypanosomatid Protozoa. Current genomics*, 19(2), 140-149.

- Martínez-Calvillo, S., Florencio-Martínez, L. E., & Nepomuceno-Mejía, T. (2019). *Nucleolar structure and function in trypanosomatid protozoa. Cells*, 8(5), 421.
- Marra, F., Chiappetta, M. C., & Vincenti, V. (2014). *Ear, nose and throat manifestations of mucocutaneous Leishmaniasis: a literature review. Acta Biomed*, 85(1), 3-7.
- Marzouki, N., Camier, S., Ruet, A., Moenne, A., & Sentenac, A. (1986). Selective proteolysis defines two DNA binding domains in yeast transcription factor τ . *Nature*, 323(6084), 176-178.
- Makino, Y., Yogosawa, S., Kayukawa, K., Coin, F., Egly, J. M., Wang, Z. X., ... & Tamura, T. A. (1999). *TATA-binding protein-interacting protein 120, TIP120, stimulates three classes of eukaryotic transcription via a unique mechanism. Molecular and cellular biology*, 19(12), 7951-7960.
- Maslov, D. A., Podlipaev, S. A., & Lukes, J. (2001). *Phylogeny of the kinetoplastidae: taxonomic problems and insights into the evolution of parasitism. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 96 (3), 397-402.
- McLean, K. J., & Jacobs-Lorena, M. (2017). *Plasmodium falciparum Maf1 confers survival upon amino acid starvation. MBio*, 8(2), e02317-16.
- Mellacheruvu, D., Wright, Z., Couzens, A. L., Lambert, J. P., St-Denis, N. A., Li, T., ... & Nesvizhskii, A. I. (2013). *The CRAPome: a contaminant repository for affinity purification–mass spectrometry data. Nature methods*, 10(8), 730-736.
- Michaeli, S. (2011). *Trans-splicing in trypanosomes: machinery and its impact on the parasite transcriptome. Future Microbiology*, 6(4), 459-474.
- Michels, A. A., Robitaille, A. M., Buczynski-Ruchonnet, D., Hodroj, W., Reina, J. H., Hall, M. N., & Hernandez, N. (2010). *mTORC1 directly phosphorylates and regulates human MAF1. Molecular and cellular biology*, 30(15), 3749-3757.

- Michels, A.A. (2011) *MAF1: a new target of mTORC1. Biochemical Society Transactions*, 39: 487–491.
- Miller, J. E., Zhang, L., Jiang, H., Li, Y., Pugh, B. F., & Reese, J. C. (2018). *Genome-wide mapping of decay factor–mRNA interactions in yeast identifies nutrient-responsive transcripts as targets of the deadenylase ccr4. G3: Genes, Genomes, Genetics*, 8(1), 315-330.
- Monroy-Ostria, A., & Sanchez-Tejeda, G. (2002). *Molecular probes and the polymerase chain reaction for detection and typing of Leishmania species in Mexico. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 96(Supplement 1), 101-104.
- Moir, R. D., Lee, J., & Willis, I. M. (2012). *Recovery of RNA polymerase III transcription from the glycerol-repressed state: revisiting the role of protein kinase CK2 in Maf1 phosphoregulation. Journal of Biological Chemistry*, 287(36), 30833-30841.
- Moir, R. D., Lee, J., Haeusler, R. A., Desai, N., Engelke, D. R., & Willis, I. M. (2006). *Protein kinase A regulates RNA polymerase III transcription through the nuclear localization of Maf1. Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(41), 15044-15049.
- Moir, R. D., & Willis, I. M. (2013). *Regulation of pol III transcription by nutrient and stress signaling pathways. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Regulatory Mechanisms*, 1829(3-4), 361-375.
- Momen, H. (2003). *Concepts of species in trypanosomatids. Kinetoplastid. Biol. Dis.*, Vol 2, Num 1, pp: 1-13.
- Moreno-Campos, R., Florencio-Martinez, L. E., Nepomuceno-Mejia, T., Rojas-Sanchez, S., Velez-Ramirez, D. E., Padilla-Mejia, N. E., ... & Martinez-Calvillo, S.

- (2016). *Molecular characterization of 5S ribosomal RNA genes and transcripts in the protozoan parasite Leishmania major*. *Parasitology*, 143(14), 1917-1929.
- Myler, P. J., Audleman, L., Hixson, G., Kiser, P., Lemley, C., Magness, C., Rickel, E., Sisk, E., Sunkin, S., Swartzell, S., Westlake, T., Bastien, P., Fu, G., Ivens, A., & Stuart K. (1999). *Leishmania major Friedlin chromosome 1 has an unusual distribution of protein-coding genes*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(6), 2902-2906.
 - Naidu, S., Friedrich, J. K., Russell, J., & Zomerdijk, J. C. (2011). *TAF1B is a TFIIB-like component of the basal transcription machinery for RNA polymerase I*. *Science*, 333(6049), 1640-1642.
 - Nakaar, V., Dare, A. O., Hong, D., Ullu, E., & Tschudi, C. (1994). *Upstream tRNA genes are essential for expression of small nuclear and cytoplasmic RNA genes in trypanosomes*. *Molecular and Cellular Biology*, 14(10), 6736-6742.
 - Nakaar, V., Günzl, A., Ullu, E., & Tschudi, C. (1997). *Structure of the Trypanosoma brucei U6 snRNA gene promoter*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 88(1-2), 13-23.
 - Nakaar, V., Tschudi, C., & Ullu, E. (1995). *An unusual liaison: Small nuclear and cytoplasmic RNA genes team up with tRNA genes in trypanosomatid protozoa*. *Parasitology Today*, 11(6), 225-228.
 - Nguyen, V. C., Clelland, B. W., Hockman, D. J., Kujat-Choy, S. L., Mewhort, H. E., & Schultz, M. C. (2010). *Replication stress checkpoint signaling controls tRNA gene transcription*. *Nature structural & molecular biology*, 17(8), 976-981.
 - Nieves, E., & Rondon, M. (2007). *Sobrevivencia del parásito Leishmania en el insecto vector: interacciones moleculares*. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*, 27(2), 66-72.

- Oficjalska-Pham, D., Harismendy, O., Smagowicz, W. J., de Peredo, A. G., Boguta, M., Sentenac, A., & Lefebvre, O. (2006). *General repression of RNA polymerase III transcription is triggered by protein phosphatase type 2A-mediated dephosphorylation of Maf1. Molecular cell, 22(5), 623-632.*
- Oler, A. J., & Cairns, B. R. (2012). *PP4 dephosphorylates Maf1 to couple multiple stress conditions to RNA polymerase III repression. The EMBO journal, 31(6), 1440-1452.*
- Orioli, A., Praz, V., Lhôte, P., & Hernandez, N. (2016). *Human MAF1 targets and represses active RNA polymerase III genes by preventing recruitment rather than inducing long-term transcriptional arrest. Genome research, 26(5), 624-635.*
- Padilla-Mejía, N. E., Florencio-Martínez, L. E., Figueroa-Angulo, E. E., Manning-Cela, R. G., Hernández-Rivas, R., Myler, P. J., & Martínez-Calvillo, S. (2009). *Gene organization and sequence analyses of transfer RNA genes in Trypanosomatid parasites. BMC Genomics, 10(1), 232-250.*
- Pimenta, P. F. P., Modi, G. B., Pereira, S. T., Shahabuddin, M., & Sacks, D. L. (1997). *A novel role for the peritrophic matrix in protecting Leishmania from the hydrolytic activities of the sand fly midgut. Parasitology, 115(4), 359-369.*
- Pluta, K., Lefebvre, O., Martin, N. C., Smagowicz, W. J., Stanford, D. R., Ellis, S. R., Hooper A. K., Sentenac, A., & Boguta, M. (2001). *Maf1p, a Negative Effector of RNA Polymerase III in Saccharomyces cerevisiae. Molecular and Cellular Biology, 21(15), 5031-5040.*
- Pradhan, A., Hammerquist, A. M., Khanna, A., & Curran, S. P. (2017). *The C-box region of MAF1 regulates transcriptional activity and protein stability. Journal of molecular biology, 429(2), 192-207.*

- Prieto, J. L., & McStay, B. (2007). *Recruitment of factors linking transcription and processing of pre-rRNA to NOR chromatin is UBF-dependent and occurs independent of transcription in human cells. Genes & development, 21(16), 2041–2054.*
- Puig, O., Caspary, F., Rigaut, G., Rutz, B., Bouveret, E., Bragado-Nilsson, E., Wilm, M., & Séraphin, B. (2001). *The tandem affinity purification (TAP) method: a general procedure of protein complex purification. Methods, 24(3), 218-229.*
- Rastrojo, A., Corvo, L., Lombraña, R., Solana, J. C., Aguado, B., & Requena, J. M. (2019). *Analysis by RNA-seq of transcriptomic changes elicited by heat shock in Leishmania major. Scientific reports, 9(1), 1-18.*
- Reina, J. H., Azzouz, T. N., & Hernandez, N. (2006). *Maf1, a new player in the regulation of human RNA polymerase III transcription. PloS one, 1(1), e134.*
- Rideout, E. J., Marshall, L., & Grewal, S. S. (2012). *Drosophila RNA polymerase III repressor Maf1 controls body size and developmental timing by modulating tRNA^{iMet} synthesis and systemic insulin signaling. Proceedings of the National Academy of Sciences, 109(4), 1139-1144.*
- Rijal, K., & Maraia, R. J. (2013). *RNA polymerase III mutants in TFIIIF α -like C37 that cause terminator readthrough with no decrease in transcription output. Nucleic Acids Research, 41(1), 139-155.*
- Rodriguez-Corona, U., Sobol, M., Rodriguez-Zapata, L. C., Hozak, P., & Castano, E. (2015). *Fibrillarin from Archaea to human. Biology of the Cell, 107(6), 159-174.*
- Roberts, D. N., Stewart, A. J., Huff, J. T., & Cairns, B. R. (2003). *The RNA polymerase III transcriptome revealed by genome-wide localization and activity–occupancy relationships. Proceedings of the National Academy of Sciences, 100(25), 14695-14700.*

- Roberts, D. N., Wilson, B., Huff, J. T., Stewart, A. J., & Cairns, B. R. (2006). *Dephosphorylation and genome-wide association of Maf1 with Pol III-transcribed genes during repression. Molecular cell, 22(5), 633-644.*
- Rohira, A. D., Chen, C. Y., Allen, J. R., & Johnson, D. L. (2013). *Covalent small ubiquitin-like modifier (SUMO) modification of Maf1 protein controls RNA polymerase III-dependent transcription repression. Journal of Biological Chemistry, 288(26), 19288-19295.*
- 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.*
- Rollins, J., Veras, I., Cabarcas, S., Willis, I., & Schramm, L. (2007). *Human Maf1 negatively regulates RNA polymerase III transcription via the TFIIIB family members Brf1 and Brf2. International journal of biological sciences, 3(5), 292.*
- 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.*
- Rosonina, E., Akhter, A., Dou, Y., Babu, J., & Sri Theivakadadcham, V. S. (2017). *Regulation of transcription factors by sumoylation. Transcription, 8(4), 220-231.*
- Ruíz, M. (2011). *Leishmaniasis. Wikimedia.com*
- Sarikas, A., Hartmann, T., & Pan, Z. Q. (2011). *The cullin protein family. Genome biology, 12, 1-12.*

- Schimanski, B., Nguyen, T. N., & Günzl, A. (2005). *Highly efficient tandem affinity purification of trypanosome protein complexes based on a novel epitope combination. Eukaryotic Cell*, 4(11), 1942-1950.
- Schlein, Y., Jacobson, R. L., & Messer, G. (1992). *Leishmania infections damage the feeding mechanism of the sandfly vector and impede parasite transmission by bite. Proceedings of the National Academy of Sciences*, 89(20), 9944-9948.
- Schramm, L., & Hernandez, N. "Recruitment of RNA polymerase III to its target promoters." *Genes & development* 16.20 (2002): 2593-2620.
- Shor, B., Wu, J., Shakey, Q., Toral-Barza, L., Shi, C., Follettie, M., & Yu, K. (2010). *Requirement of the mTOR kinase for the regulation of Maf1 phosphorylation and control of RNA polymerase III-dependent transcription in cancer cells. Journal of Biological Chemistry*, 285(20), 15380-15392.
- Soprano, A. S., Abe, V. Y., Smetana, J. H. C., & Benedetti, C. E. (2013). *Citrus MAF1, a repressor of RNA polymerase III, binds the Xanthomonas citri canker elicitor PthA4 and suppresses citrus canker development. Plant physiology*, 163(1), 232-242.
- Soprano, A. S., de Giuseppe, P. O., Shimo, H. M., Lima, T. B., Batista, F. A. H., Righetto, G. L., ... & Benedetti, C. E. (2017). *Crystal structure and regulation of the citrus Pol III repressor MAF1 by auxin and phosphorylation. Structure*, 25(9), 1360-1370.
- Stevens, J. R., Noyes, H. A., Schofield, C. J., & Gibson, W. (2001). *The molecular evolution of Trypanosomatidae. Advances in Parasitology*, 48, 1-56
- Takebe, S., Witola, W. H., Schimanski, B., Günzl, A., & Mamoun, C. B. (2007). *Purification of components of the translation elongation factor complex of*

Plasmodium falciparum by tandem affinity purification. *Eukaryotic Cell*, 6(4), 584-591.

- Fernández-Tornero, C., Moreno-Morcillo, M., Rashid, U. J., Taylor, N. M., Ruiz, F. M., Gruene, T., Legrand, P., Steuerwald, U., & Müller, C. W. (2013). *Crystal structure of the 14-subunit RNA polymerase I. Nature*, 502(7473), 644-649.
- Teichmann, M., Dieci, G., Pascali, C., & Boldina, G. (2010). *General transcription factors and subunits of RNA polymerase III: Paralogs for promoter-and cell type-specific transcription in multicellular eukaryotes. Transcription*, 1(3), 130-135.
- Tovar, A., & Yasnot, A. (2017). *Visceral Leishmaniasis in Latin America and therapy perspectives. Revista MVZ Córdoba*, 22, 6075-6088.
- Towpik, J., Graczyk, D., Gajda, A., Lefebvre, O., & Boguta, M. (2008). *Derepression of RNA polymerase III transcription by phosphorylation and nuclear export of its negative regulator, Maf1. Journal of Biological Chemistry*, 283(25), 17168-17174.
- Tronov, V. A., Kramarenko, I. I., & Zakharov, S. F. (2007). *Mismatch repair (MMR) efficiency and MSH2 gene mutation in human colorectal carcinoma cell line COLO320HSR. Russian Journal of Genetics*, 43, 430-436.
- Upadhy, R., Lee, J., & Willis, I. M. (2002). *Maf1 is an essential mediator of diverse signals that repress RNA polymerase III transcription. Molecular cell*, 10(6), 1489-1494.
- Ullu, E., Tschudi, C., & Chakraborty, T. (2004). *RNA interference in protozoan parasites. Cellular microbiology*, 6(6), 509-519.
- 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.

- Vannini, A., & Cramer, P. (2012). *Conservation between the RNA polymerase I, II, and III transcription initiation machineries*. *Molecular cell*, 45(4), 439-446.
- Vorländer, M. K., Baudin, F., Moir, R. D., Wetzels, R., Hagen, W. J., Willis, I. M., & Müller, C. W. (2020). *Structural basis for RNA polymerase III transcription repression by Maf1*. *Nature structural & molecular biology*, 27(3), 229-232.
- Wang, M., Ogé, L., Perez-Garcia, M. D., Hamama, L., & Sakr, S. (2018). *The PUF Protein Family: Overview on PUF RNA Targets, Biological Functions, and Post Transcriptional Regulation*. *International journal of molecular sciences*, 19(2), 410.
- Wang, X., Rusin, A., Walkey, C. J., Lin, J. J., & Johnson, D. L. (2019). *The RNA polymerase III repressor MAF1 is regulated by ubiquitin-dependent proteasome degradation and modulates cancer drug resistance and apoptosis*. *Journal of Biological Chemistry*, 294(50), 19255-19268.
- Wang, Q., Daiß, J. L., Xu, Y., & Engel, C. (2022). *Snapshots of RNA polymerase III in action—A mini review*. *Gene*, 821, 146282.
- Wei, Y., Tsang, C. K., & Zheng, X. S. (2009). *Mechanisms of regulation of RNA polymerase III-dependent transcription by TORC1*. *The EMBO journal*, 28(15), 2220-2230.
- Wei, Y., & Zheng, X. S. (2010). *Maf1 regulation: a model of signal transduction inside the nucleus*. *Nucleus*, 1(2), 162-165.
- WHO. 2021. *Control of Leishmaniases, Technical Report Series 949*. Geneva: World Health Organization.
- Willis, I. M., Chua, G., Tong, A. H., Brost, R. L., Hughes, T. R., Boone, C., & Moir, R. D. (2008). *Genetic interactions of MAF1 identify a role for Med20 in transcriptional repression of ribosomal protein genes*. *PLoS genetics*, 4(7), e1000112.

- Willis, I. M., & Moir, R. D. (2018). *Signaling to and from the RNA polymerase III transcription and processing machinery. Annual Review of Biochemistry, 87*, 75-100.
- Yan, S., Lodes, M. J., Fox, M., Myler, P. J., & Stuart, K. (1999). *Characterization of the Leishmania donovani ribosomal RNA promoter. Molecular and Biochemical Parasitology, 103*(2), 197-210.
- Zhong, S., Zhang, C., & Johnson, D. L. (2004). *Epidermal growth factor enhances cellular TATA binding protein levels and induces RNA polymerase I-and III-dependent gene activity. Molecular and cellular biology, 24*(12), 5119-5129.
- Zhou, W., Ryan, J. J., & Zhou, H. (2004). *Global analyses of sumoylated proteins in Saccharomyces cerevisiae: induction of protein sumoylation by cellular stresses. Journal of Biological Chemistry, 279*(31), 32262-32268.
- Zhu, B., Mandal, S. S., Pham, A. D., Zheng, Y., Erdjument-Bromage, H., Batra, S. K., ... & Reinberg, D. (2005). *The human PAF complex coordinates transcription with events downstream of RNA synthesis. Genes & development, 19*(14), 1668-1673.
- Zijlstra, E. E., & El-Hassan, A. M. (2001). *Visceral leishmaniasis. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, 95*(Supplement 1), 27-58.
- Zomerdijk, J. C., Kieft, R., Shiels, P. G., y Borst, P. (1991). *Alpha-amanitin-resistant transcription units in trypanosomes: a comparison of promoter sequences for a VSG gene expression site and for the ribosomal RNA genes. Nucleic Acids Research, 19*(19), 5153-5158.