



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**  
**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA**

---

Caracterización molecular de TbZ5, una proteína con múltiples de dedos de zinc, en *Trypanosoma brucei*.

**TESIS**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

**BIÓLOGO**

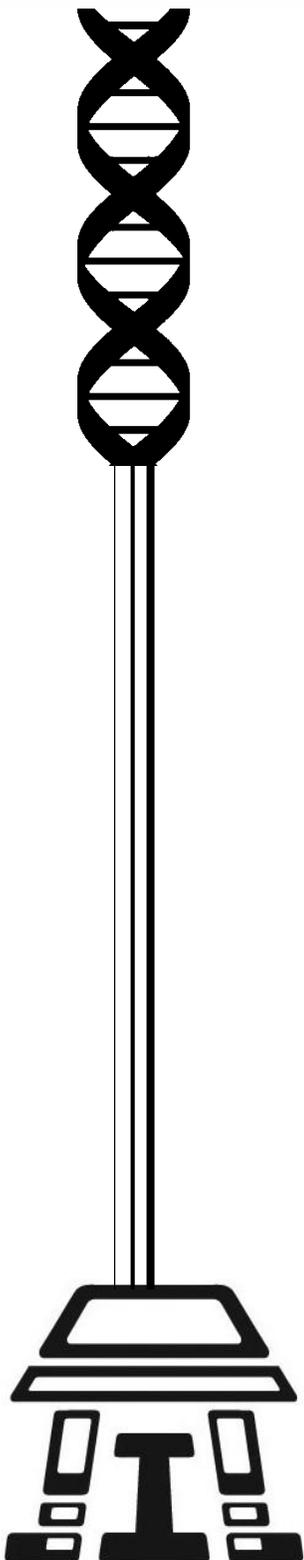
Presenta:

**MARÍA DE LOURDES MEJÍA HERNÁNDEZ**

**Director de Tesis:** Dr. Santiago Martínez Calvillo

LOS REYES IZTACALA, EDO. DE MÉXICO

SEPTIEMBRE, 2015





Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

## AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México ya que he tenido la gran fortuna de crecer dentro de sus puertas.

A la Facultad de Estudios Superiores Iztacala mi *alma mater*, por brindarme la oportunidad de desarrollarme académicamente y de recorrer el camino más importante de mi vida como bióloga.

Al Dr. Santiago Martínez Calvillo por su asesoría a lo largo de este proyecto de tesis de licenciatura; además por su confianza al permitirme formar parte de su laboratorio, su paciencia y su apoyo incondicional durante la dirección de este trabajo. Infinitas gracias.

Al Biol. Luis Enrique Florencio por el gran apoyo técnico. Además por su invaluable ayuda y por todos los conocimientos que me brindó dentro de la realización de este proyecto.

De manera relevante quiero agradecer a la M.C Gabriela Romero y al Biol. Daniel Vélez por ser mis mentores en todo momento. Su excelente guía a lo largo de este proceso fue vital para la conclusión del mismo, no tengo palabras para agradecerles todo lo que me han enseñado, por su paciencia y sobre todo por brindarme parte de su tiempo. Los quiero mucho, son los mejores.

A mis compañeros del Laboratorio 1 de la Unidad de Biomedicina especialmente a Norma, Fio, Maricarmen y Juan Carlos por su amistad, compañía, consejos y aventuras; me llevo lo mejor gracias a ustedes, los aprecio mucho.

Así mismo se agradece la ayuda de todos los miembros del comité tutorial: Dr. Sergio Vaca; Dr. Federico Ávila; Dr. Roberto Velasco y al Dr. Manuel Arias por su colaboración en este proceso.

Este proyecto de tesis de investigación fue financiado por el donativo 128461 de CONACyT, y por los donativos IN210712 e IN214715 de PAPIIT (DGAPA, UNAM).

## DEDICATORIA

En primera instancia quiero dedicar este trabajo a mi padre Juan Sebastián Mejía; ya que todo lo que soy es gracias a ti. Te agradezco por enseñarme a luchar por mis sueños y a ser siempre fuerte; es un orgullo para mí ser tu línea directa. Fuiste la estrella fugaz más hermosa de mi vida y tu brillo (inextinguible) estará conmigo siempre.

A mi madre Lourdes Hernández que indudablemente me apoya incondicionalmente. Soy muy afortunada de tenerte a mi lado, eres parte de mi motor de vida, mi sostén más grande. Agradezco que me hayas enseñado a jamás darme por vencida y a valorar todo lo que tengo. Sin ti todos estos logros jamás hubieran sido posibles, mi amor y admiración por ti son infinitos.

A mis hermanos Carlos y Omar por ser una guía para mí en este camino, por cuidarme y apoyarme en todo momento. Una parte invaluable de mi ser la conforman ustedes, gracias por ser mis compañeros de vida y por todo lo que hacen por mí, los quiero hoy y siempre.

A esa familia que nació en las aulas: Dalila, María Elena, Tayde, Chalé, Gio, Nancy que son como mis hermanos, todos estos años de amistad lo avalan. Con ustedes he pasado los mejores y peores momentos de la vida, el aprendizaje y las aventuras jamás terminan junto a ustedes. Agradezco que formen parte de mi vida, los aprecio y quiero con toda mi alma.

A mis queridas amigas Rebe, Yael y Keyla que compartieron conmigo este tiempo de desarrollo. Nos conocimos entre risas, nos vimos en nuestros peores momentos, hubieron días difíciles pero lo más bello de todo es que permanecemos juntas y eso es lo que más valoro de ustedes; lo importante para mí no fue el inicio sino más bien quién permaneció hasta el final, las adoro.

A las personas importantes que fueron apareciendo a lo largo de este trayecto Alam, Beto, Aldo, Fanny, Chava, Gabriel, Fer, Iván la convivencia con ustedes ha hecho de esta etapa una de las mejores de mi vida. Gracias totales, los quiero y aprecio mucho.

## ÍNDICE DE CONTENIDOS

Índice de figuras y tablas.....	5
Abreviaturas.....	6
Resumen.....	8
1.Introducción .....	9
1.1 Aspectos generales de <i>Trypanosoma brucei</i> .....	9
1.1.1 Epidemiología .....	9
1.1.2 Morfología celular .....	11
1.1.3 Ciclo de vida de <i>T. brucei</i> .....	13
1.1.4 Manifestaciones clínicas de la tripanosomiasis humana africana.....	13
1.1.5 Diagnóstico y tratamiento .....	15
1.2 Transcripción en Eucariontes.....	17
1.2.1 RNA Polimerasa I (Pol I) .....	19
1.2.2 RNA Polimerasa II (Pol II) .....	20
1.2.3 RNA Polimerasa III (Pol III) .....	21
1.2.3.1 Factor de Transcripción TFIIIA .....	24
1.2.3.2 Dedos de Zinc .....	24
1.3 Transcripción en tripanosomátidos .....	26
1.3.1 Organización genómica de <i>T. brucei</i> . .....	26
1.3.2 Transcripción de la RNA Polimerasa II en <i>T. brucei</i> : <i>trans-splicing</i> y poliadenilación .....	27
1.4 Transcripción de la RNA Polimerasa I en <i>T. brucei</i> .....	31
1.5 Transcripción de la RNA Polimerasa III en <i>T. brucei</i> .....	32
2.Antecedentes .....	33
3.Objetivos .....	34
4.Materiales y Métodos .....	35
4.1. Análisis <i>in silico</i> de TbZ5 .....	35
4.2. Generación de vectores .....	35
4.2.1 Amplificación y clonación de la región 3'-terminal del gen TbZ5 en pGEM-T .....	35
4.2.2 Generación del vector pTbZ5-PTP .....	36
4.3 Extracción de DNA genómico.....	36
4.4 Amplificación de DNA por medio de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) .....	37
4.5 Electroforesis en geles de agarosa.....	38
4.6 Digestiones con enzimas de restricción .....	38
4.7 Purificación de DNA a partir de geles de agarosa .....	38
4.8 Ligaciones de DNA.....	39
4.9 Transformaciones de células competentes .....	39
4.10 Minipreparación de plásmidos.....	40
4.11 Midipreparaciones de plásmidos .....	41

4.12 Cultivo y transfección de <i>T. brucei</i> .....	41
4.13 Análisis de la población transfectada con pTbZ5-PTP.....	41
4.14 Clonación por dilución limitante .....	42
4.15 Ensayo tipo Western blot.....	43
4.16 Ensayos de inmunofluorescencia indirecta.....	44
5.Resultados.....	45
5.1 Análisis <i>in silico</i> de la secuencia de aminoácidos de TbZ5 en <i>T. brucei</i> .....	45
5.2 Generación de construcción pTbZ5-PTP.....	54
5.3 Transfección y análisis de clonas celulares pTbZ5-PTP .....	57
5.4 Localización celular de pTbZ5-PTP.....	62
6.Discusión .....	67
7.Conclusiones y Logros .....	71
8.Perspectivas.....	72
9.Referencias.....	73

## ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Distribución geográfica de la tripanosomiasis africana .....	10
<b>Figura 2.</b> Representación de la arquitectura celular de formas sanguíneas de <i>T. brucei</i> .....	11
<b>Figura 3.</b> El cinetoplasto cambia de posición durante el ciclo de vida de <i>T. brucei</i> .....	12
<b>Figura 4.</b> Ciclo de vida de <i>T. brucei</i> .....	14
<b>Figura 5.</b> Representación esquemática del complejo de inicio de la transcripción de Pol II.....	18
<b>Figura 6.</b> Regiones promotoras y factores de inicio de la transcripción de genes transcritos por Pol III .....	22
<b>Figura 7.</b> Dominios de dedo de zinc C <sub>2</sub> H <sub>2</sub> .....	25
<b>Figura 8.</b> Procesamiento de los mRNAs y transcripción policistrónica en <i>T. brucei</i> .....	28
<b>Figura 9.</b> Diagrama representativo de los promotores caracterizados en tripanosomátidos.....	30
<b>Figura 10.</b> Diagrama de una placa de 96 pozos .....	42
<b>Figura 11.</b> Esquema de los dominios de dedos de zinc C <sub>2</sub> H <sub>2</sub> encontrados en TbZ5.....	46
<b>Figura 12.</b> Comparación de los dedos de zinc C <sub>2</sub> H <sub>2</sub> encontrados en TbZ5 y en TFIIIA .....	48
<b>Figura 13.</b> Esquema de la estructura secundaria predicha para la secuencia de TbZ5 .....	50
<b>Figura 14.</b> Modelos de las estructuras tridimensionales para cada dedo de zinc de TbZ5. ....	51
<b>Figura 15.</b> Motivos conservados en la secuencia de TbZ5 .....	52
<b>Figura 16.</b> Sitios de fosforilación predichos en la secuencia de TbZ5.....	53
<b>Figura 17.</b> Secuencia del gen TbZ5 de <i>T. brucei</i> .....	54
<b>Figura 18.</b> Amplificación por PCR de C-terminal de TbZ5 y análisis de restricción de clonas.....	55
<b>Figura 19.</b> Purificación del inserto TbZ5 C-terminal y del vector pC-PTP-BLA. Análisis de restricción del vector pTbZ5-PTP. ....	56
<b>Figura 20.</b> Mapa de los vectores pGEM-TbZ5 y pTbZ5-PTP .....	57
<b>Figura 21.</b> Linearización del vector pTbZ5-PTP. ....	58
<b>Figura 22.</b> Esquema del locus recombinante TbZ5-PTP y oligonucleótidos empleados en PCRs. ....	59
<b>Figura 23.</b> Análisis por PCR de la población y clonas celulares pTbZ5-PTP.....	60
<b>Figura 24.</b> Ensayo Western blot de la población y clonas celulares pTbZ5-PTP con anticuerpo anti-protA. ....	61
<b>Figura 25.</b> Localización celular de TbZ5-PTP mediante microscopía de fluorescencia (campo general celular).. ....	63
<b>Figura 26.</b> Localización celular de TbZ5-PTP mediante microscopía de fluorescencia (acercamiento celular).....	64
<b>Figura 27.</b> Localización celular de TbZ5-PTP por medio de microscopía confocal. ....	65
<b>Tabla I</b> Resumen de las características principales del genoma nuclear de <i>T. brucei</i> considerando únicamente los megacromosoma .....	26
<b>Tabla II</b> Oligonucleótidos usados para amplificar y caracterizar el gen de TbZ5.....	37
<b>Tabla III</b> Proteínas con un mayor número de motivos de zinc C <sub>2</sub> H <sub>2</sub> en <i>T. brucei</i> .....	45

## ABREVIATURAS

<b>BDP1</b>	Homólogo del componente B del factor de transcripción TFIIIB
<b>BES</b>	Sitio de expresión de la forma sanguínea
<b>BRF1</b>	Factor asociado a TFIIIB 1
<b>CK2</b>	Proteín cinasa 2
<b>DNA</b>	Ácido desoxiribonucleico
<b>DSE</b>	Elemento distal
<b>ESAG</b>	Genes de expresión sitio-asociados
<b>h</b>	Horas
<b>Kb</b>	Kilobases
<b>M</b>	Molar
<b>Maf1</b>	Proteína Maf1
<b>Mb</b>	Megabases
<b>min</b>	Minutos
<b>ml</b>	Mililitros
<b>mM</b>	Milimolar
<b>mRNA</b>	Ácido ribonucleico mensajero
<b>PAGs</b>	Genes asociados a prociclina
<b>PARP</b>	Promotor para la proteína procíclica de repetidos acídicos
<b>pb</b>	Pares de bases
<b>PCR</b>	Reacción en cadena de la polimerasa
<b>Pol I</b>	RNA polimerasa I
<b>Pol II</b>	RNA polimerasa II
<b>Pol III</b>	RNA polimerasa III
<b>PSE</b>	Elemento proximal
<b>RNA</b>	Ácido ribonucleico
<b>RNAi</b>	Ácido ribonucleico de interferencia
<b>rpm</b>	Revoluciones por minuto

<b>rRNA</b>	Ácido ribonucleico ribosomal
<b>SE</b>	Sitio de expresión
<b>seg</b>	Segundos
<b>SIT</b>	Sitio de inicio de la transcripción
<b>SL</b>	Splice leader
<b>SLN</b>	Señal de localización nuclear
<b>snoRNA</b>	Ácido ribonucleico pequeño nucleolar
<b>snRNA</b>	Ácido ribonucleico pequeño nuclear
<b>SSR</b>	Sitio de cambio de hebra
<b>TAP</b>	Purificación por afinidad en tándem
<b>TBP</b>	Proteína de unión a cajas TATA
<b>TFIIIA</b>	Factor de transcripción de la RNA polimerasa III A
<b>TFIIIB</b>	Factor de transcripción de la RNA polimerasa III B
<b>TFIIIC</b>	Factor de transcripción de la RNA polimerasa III C
<b>tRNA</b>	Ácido ribonucleico de transferencia
<b>UCR</b>	Región de control río arriba
<b>UTR</b>	Región no traducida
<b>vol</b>	Volúmenes
<b>VSG</b>	Glicoproteínas variables de superficie
<b>ZnF</b>	Dedo de zinc
<b>μl</b>	Microlitros
<b>μm</b>	Micrometros
<b>°C</b>	Grados Celsius

## RESUMEN

*Trypanosoma brucei*, agente causal de la enfermedad del sueño, es un protozoo parásito que presenta mecanismos atípicos de expresión genética. El interés por estudiar estos mecanismos nos llevó al análisis de la transcripción de la RNA Polimerasa III, enzima encargada de la transcripción de moléculas pequeñas de RNA que son esenciales para la viabilidad celular, como el rRNA 5S y los tRNAs. El factor de transcripción TFIIIA, necesario para la síntesis del rRNA 5S, se caracteriza por presentar nueve dedos de zinc del tipo  $C_2H_2$ . En *T. brucei* no ha sido detectada esta proteína; sin embargo, analizando su genoma se identificó el gen de una proteína que posee cinco dedos de zinc  $C_2H_2$ , a la que denominamos TbZ5, la cual podría ser el ortólogo de TFIIIA en *T. brucei*. Alternativamente, existen indicios que sugieren que TbZ5 podría participar en la transcripción de alguna de las RNA Polimerasas I y/o II, o estar involucrada en la regulación post-transcripcional, uniéndose a mRNAs. Así, el objetivo del presente trabajo fue iniciar la caracterización molecular de TbZ5. Para ello se realizaron diversos análisis *in silico*, los cuales mostraron que la secuencia de los dedos de zinc de TbZ5 está muy conservada en relación a la secuencia consenso de dedos de zinc de TFIIIA en otros organismos. Además, predicciones de estructuras secundaria y terciaria indicaron que cada dedo de zinc de TbZ5 forma dos estructuras  $\beta$  plegadas y una  $\alpha$  hélice, tal como está reportado para otros dedos de zinc. Nuestro análisis indicó también que TbZ5 posee 20 aminoácidos que potencialmente podrían ser fosforilados, así como otras dos secuencias conservadas en TFIIIA: una posible secuencia de unión a DNA, y una probable señal de localización nuclear. Con el objeto de determinar si efectivamente TbZ5 es una proteína nuclear se llevaron a cabo experimentos de inmunofluorescencia indirecta. Para ello fue generado el vector pTbZ5-PTP, en el cual el gen de TbZ5 fue fusionado a una bandera PTP. La construcción fue transfectada en formas procíclicas de *T. brucei* y se obtuvieron clonas celulares estables. Mediante WB, usando un anticuerpo que reconoce la bandera PTP, se demostró que las clonas expresan la proteína recombinante TbZ5-PTP. El análisis de microscopía de fluorescencia y confocal demostró que TbZ5-PTP presenta una señal punteada en varias partes del núcleo, principalmente en las inmediaciones del nucléolo.

## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1 Aspectos generales de *Trypanosoma brucei*

Los miembros de la Familia Trypanosomatidae, comúnmente conocidos como tripanosomátidos, son protozoarios flagelados que infectan a diversos animales y plantas. Entre ellos se incluyen organismos de los géneros *Leishmania* y *Trypanosoma*, que causan enfermedades transmitidas por vectores en los seres humanos, el ganado y la fauna silvestre. Estos parásitos unicelulares son responsables de mortalidad y morbilidad sustancial en todo el mundo (Jackson, 2014). Los organismos pertenecientes al género *Leishmania* provocan las diversas manifestaciones clínicas de la leishmaniasis, mientras que *Trypanosoma cruzi* es responsable de la enfermedad de Chagas. *Trypanosoma brucei* es el agente causal de la tripanosomiasis africana o enfermedad del sueño (Gomez, 2010). Como una de las enfermedades tropicales más desatendidas, la tripanosomiasis africana ha llamado la atención de diversos sectores y asociaciones para tratar de controlar su transmisión y, de ser posible, lograr su eliminación. El diagnóstico y el tratamiento de esta enfermedad son poco exitosos, por lo que es necesario aumentar el estudio del parásito para conocer a fondo sus mecanismos biológicos y su correlación con el vector y el hospedero (Brun *et al.*, 2010).

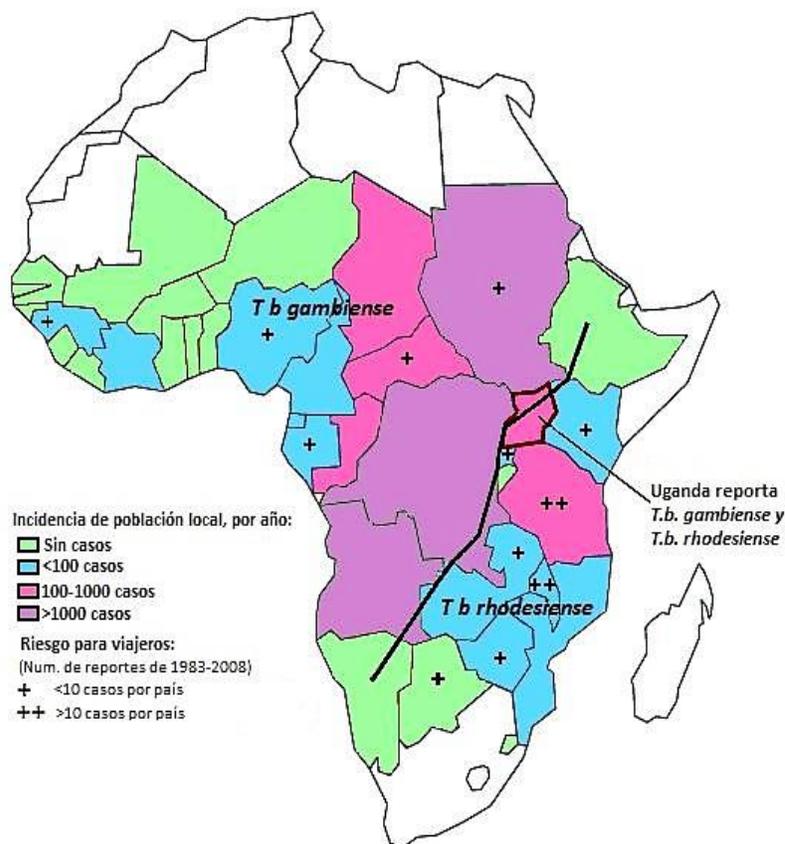
#### 1.1.2 Epidemiología

*T. brucei* se transmite por insectos hematófagos del género *Glossina* spp., comúnmente conocidos como mosca tse-tse. Dos subespecies de *T. brucei* son patógenas para los humanos (*T. brucei gambiense* y *T. brucei rhodesiense*), mientras que la subespecie *T. brucei brucei* es causante de la enfermedad de Nagana en el ganado (Franco *et al.*, 2014). La tripanosomiasis humana africana causa la muerte de miles de personas afectadas en las regiones donde se concentran las epidemias (Kennedy, 2013). Históricamente, la enfermedad del sueño se ha producido en las zonas rurales más pobres de África sub-Sahariana, donde los sistemas de salud ineficientes hacen que el manejo de la enfermedad sea difícil (Figura 1). La mayoría de los casos (>90%) son causados por *T. brucei gambiense*, que es endémica en 24 países de África occidental y central (como Angola, Congo, Guinea, Sudán y Uganda), mientras que *T. brucei rhodesiense* se encuentra en 13 países de África oriental y meridional (incluyendo Malawi, Tanzania y parte de Uganda) y causa aproximadamente el 10% de los casos reportados (Rodrigues *et al.*, 2014).

Se estima que hay 300,000 personas en vigilancia médica por haber presentado la enfermedad en algún momento de su vida.

Anualmente se reportan más de 10,000 casos nuevos, sin embargo se estima que aproximadamente 60 millones de personas en África viven en zonas de riesgo de contraer tripanosomiasis (Geiger *et al.*, 2011), aunque se puede considerar que el número de casos podría ser subestimado debido a que la mayor parte de los infectados se presenta en comunidades lejanas a una infraestructura médica, por lo que podría haber datos que no se estén tomando en cuenta en dichas encuestas (Romero, 2012).

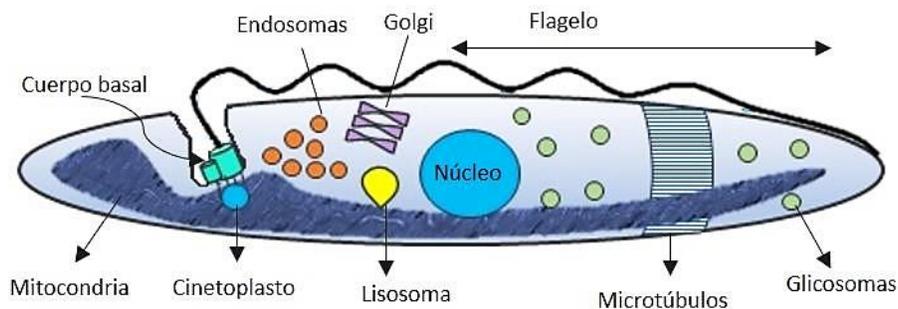
En un futuro cercano, los factores ambientales y sociales podrían desencadenar cambios en la intensidad de la transmisión y, por lo tanto, dar lugar a brotes o epidemias, e incluso a la propagación de la enfermedad a nuevas áreas (Franco *et al.*, 2014).



**Figura 1. Distribución geográfica de la tripanosomiasis africana** (modificado de Brun *et al.*, 2010).

### 1.1.2 Morfología celular

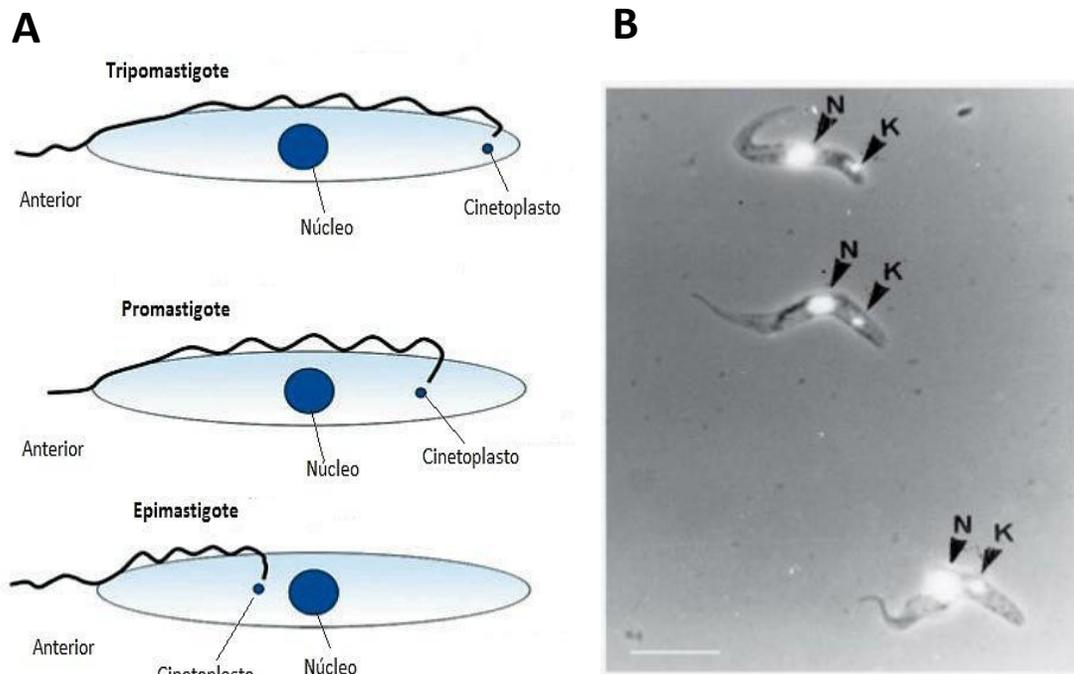
Los tripanosomátidos son organismos eucariontes que tienen una organización celular clásica. Sin embargo, algunos de sus organelos son especiales, ya que están ausentes en otros eucariontes o tienen características que se encuentran exclusivamente en tripanosomátidos (Figura 2). Estas diferencias además de ser de gran interés biológico, también poseen un valor médico significativo, ya que su estudio podría brindar nuevas estrategias terapéuticas para los pacientes infectados (Rodrigues *et al.*, 2014). El agente causal de la tripanosomiasis humana africana, *T. brucei*, es un organismo unicelular polimórfico de 15 a 30  $\mu\text{m}$  de longitud; el parásito tiene una forma alargada y un citoesqueleto compuesto principalmente de microtúbulos localizados debajo de la membrana celular (microtúbulos subpeliculares) (Romero, 2012). La bolsa flagelar es el punto de salida para el flagelo y es el único sitio donde se realiza la endo- y exo-citosis. El flagelo posee una estructura axonémica convencional y una membrana ondulante que se origina en un cuerpo basal y continúa a lo largo de toda la membrana celular. El cuerpo basal está, a su vez, unido a través de la membrana mitocondrial al genoma mitocondrial, que comprende una estructura de DNA organizada en una red compleja de moléculas circulares concatenadas de dos tamaños diferentes, llamadas minicírculos y maxicírculos, denominado cinetoplasto (Matthews, 2005). La mitocondria es una estructura particular que se encuentra extendida a todo lo largo de la célula. En las formas sanguíneas de *T. brucei*, la mitocondria es una estructura tubular que no posee crestas, lo cual refleja la ausencia de respiración mitocondrial, por lo que la mayor fuente de producción de energía es obtenida en organelos especializados llamados glicosomas. Por otro lado, las formas procíclicas poseen una mitocondria activa (Rodrigues *et al.*, 2014).



**Figura 2. Representación de la arquitectura celular de formas sanguíneas de *T. brucei* (modificado de Matthews, 2005).**

Al poseer un ciclo de vida complejo entre un hospedero mamífero y uno invertebrado, *T. brucei* debe someterse a múltiples cambios morfológicos y fisiológicos con el fin de adaptarse al ambiente donde se encuentra (Fenn y Mathews, 2007). Por ejemplo, en el estadio sanguíneo del parásito la membrana celular se recubre de una densa capa superficial homogénea, compuesta de aproximadamente  $10^7$  copias de una glucoproteína variable de superficie o VSG (*Variable Surface Glycoprotein*) de aproximadamente 400 aminoácidos que le permite evadir su destrucción por la respuesta inmune del hospedero (Rodrigues *et al.*, 2014; Romero, 2012).

Otra diferencia morfológica destacable entre los estadios parasitarios de *T. brucei* es la posición del cinetoplasto con respecto al núcleo de la célula (Figura 3). En los tripomastigotes el cinetoplasto se encuentra cerca del extremo posterior de la célula. Por el contrario, en epimastigotes el cinetoplasto se encuentra cercano a la parte anterior de la célula. Los promastigotes tienen el cinetoplasto localizado entre el núcleo y el extremo posterior de la célula. Las razones de estos cambios en la posición del cinetoplasto en los diferentes estadios son por el momento desconocidas, sin embargo, se cree que son requeridos para la división celular en cada etapa del ciclo de vida (Mathews, 2005).



**Figura 3. El cinetoplasto cambia de posición durante el ciclo de vida de *T. brucei*.** (A) Posición relativa del cinetoplasto en los diferentes estadios de vida. (B) Imagen de contraste de fases de tripomastigotes en proceso de diferenciación a promastigotes, donde se revela la posición del núcleo (N) y del cinetoplasto (K) (tomado de Mathews, 2005).

### **1.1.3 Ciclo de vida de *T. brucei***

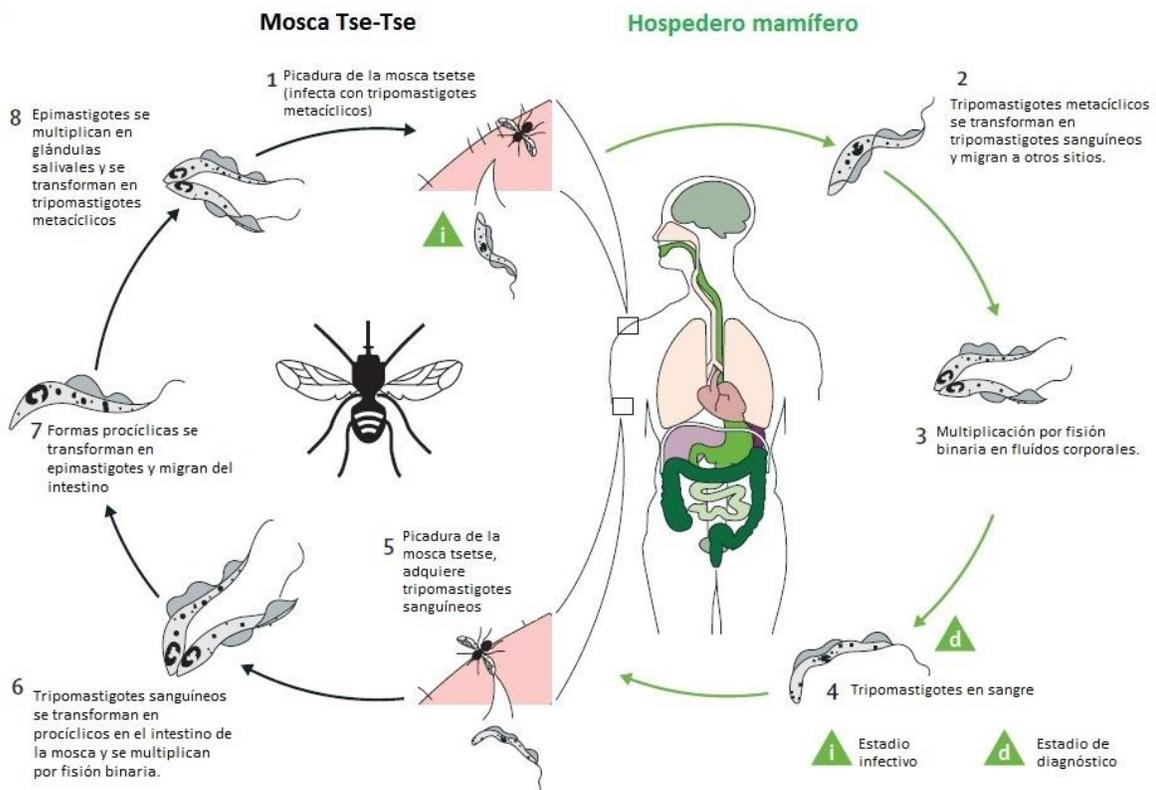
*T. brucei* es transmitido a humanos y otros mamíferos por insectos hematófagos llamados comúnmente moscas tse-tse (*Glossina* spp.). Su ciclo de vida, al igual que el de otros tripanosomátidos, se caracteriza por una alternancia de estadios replicativos que no son infectivos, y estadios no replicativos que sí lo son (Figura 4). A diferencia de otros organismos pertenecientes a la familia Trypanosomatidae, *T. brucei* no presenta estadios intracelulares durante su vida en el hospedero mamífero (Figuroa-Angulo *et al.*, 2010).

El ciclo de vida del parásito inicia cuando el insecto inyecta por vía subcutánea tripomastigotes metacíclicos, la forma infectiva del parásito. Los parásitos proliferan en el sitio de la inoculación y después se transforman en tripomastigotes sanguíneos, los cuales se multiplican por fisión binaria y se transportan a otros fluidos corporales como sangre, linfa, líquido cefalorraquídeo e incluso pueden atravesar la placenta. Este estadio se caracteriza por la presencia de una capa de glucoproteínas variables de superficie (VSG) que le permiten sobrevivir en el hospedero.

El ciclo prosigue cuando una mosca tse-tse ingiere sangre infectada con tripomastigotes del torrente sanguíneo, los cuales migran hacia el intestino medio del insecto donde se diferencian en formas procíclicas (promastigotes) y se replican. Estas formas dejan el intestino y se transforman en epimastigotes, luego emigran a través del esófago y la probóscide para llegar a las glándulas salivales donde son capaces de multiplicarse y finalmente transformarse en formas infecciosas (tripomastigotes metacíclicos) (Kennedy, 2013; Franco *et al.*, 2014).

### **1.1.4 Manifestaciones clínicas de la tripanosomiasis humana africana**

La tripanosomiasis humana africana evoluciona clínicamente en dos etapas. Inicialmente, hay una etapa temprana o estadio hemolinfático, en el que los parásitos habitan en el sistema linfático y el torrente sanguíneo (Franco *et al.*, 2014). Los tripanosomas se difunden por todo el organismo provocando en el hospedero una fuerte respuesta inflamatoria en el sitio de la picadura de la mosca tse-tse, formándose un nódulo doloroso denominado chancro, que se cura en 2-3 semanas, dejando una cicatriz descolorida (Lejon *et al.*, 2013).



**Figura 4. Ciclo de vida de *T. brucei* (modificado de Kennedy, 2013).**

Los síntomas en la etapa temprana inician en un intervalo de 1-3 semanas después de la picadura, y tienden a ser inespecíficos, pues incluyen dolor de cabeza, fiebre intermitente, pérdida de peso, prurito, adenopatías y hepatoesplenomegalia. Piel, corazón, ojos y otros órganos también pueden verse afectados (Kennedy, 2013). Después de un periodo variable, que es mucho más corto en la infección causada por *T. brucei rhodesiense*, ocurre la etapa avanzada o estadio meningoencefálico en la que los tripanosomas atraviesan la barrera hematoencefálica e invaden el sistema nervioso central provocando un daño progresivo (Franco *et al.*, 2014). Pueden suceder síntomas y signos en casi todas las regiones del sistema nervioso, incluyendo trastornos mentales y del sistema motor, pero los más característicos son los desórdenes del sueño, los cuales le dan nombre a la enfermedad. En estadios avanzados los pacientes presentan otras características como problemas visuales, convulsiones, cambios en la personalidad, ansiedad, delirio, alucinaciones, una severa desnutrición, deterioro mental e irreversible, culminando con un coma o insuficiencia cardíaca que los lleva a la muerte (Kennedy, 2013).

### 1.1.5. Diagnóstico y tratamiento

El diagnóstico de la enfermedad puede ser difícil como consecuencia de los signos clínicos inespecíficos que presenta. Generalmente se puede realizar un diagnóstico certero en un estadio avanzado de la infección. La detección de los parásitos normalmente es posible mediante el análisis de fluidos corporales del paciente a través de técnicas de microscopía, ya sea provenientes de una muestra sanguínea, aspirado de ganglio linfático, líquido cefalorraquídeo o médula ósea (Lejon *et al.*, 2013). Para aumentar el nivel de detección es necesario realizar un método de concentración de parásitos en la muestra de fluidos para ello es posible realizar una centrifugación sencilla o doble para asegurar la presencia de los tripanosomas previo a su observación al microscopio.

Existen otras opciones más sofisticadas para identificar a los parásitos, una de ellas es mediante el uso de pruebas con Tarjetas de Aglutinación para Tripanosomiasis o CATT (*Card Agglutination Test for Trypanosomiasis*) que se basa en la variante del antígeno LiTat 1.3 que poseen los pacientes con la enfermedad del sueño. Otras técnicas utilizadas son: mini intercambio-anión/centrifugación, cuantificación de glóbulos blancos, resonancia magnética y cuantificación proteica (Geiger *et al.*, 2011). Métodos alternativos de diagnóstico de la enfermedad se han desarrollado para incrementar la exactitud, tal es el caso del uso de técnicas moleculares para la amplificación de fragmentos específicos del genoma de *T. brucei*. Sin embargo, el uso de estos métodos es variable en las zonas geográficas donde se presentan los casos, ya que no en todas las regiones se encuentran disponibles; además de que cada una de las técnicas tiene cierto rango de error en la detección (Kennedy, 2013).

A pesar de su diagnóstico relativamente rápido, la tripanosomiasis humana se considera una enfermedad letal cuando no es tratada a tiempo. Actualmente se dispone de algunos medicamentos para su tratamiento, sin embargo tienen un elevado grado de toxicidad, son difíciles de usar y requieren de una estricta vigilancia (Brun *et al.*, 2010). Por lo tanto, el tratamiento se convierte una tarea difícil y aún más por los recursos limitados de los centros de salud donde los pacientes son atendidos. Los fármacos usados para contrarrestar la infección en pacientes son elegidos dependiendo de la fase en la que se encuentra la enfermedad y de la sub-especie del parásito. La pentamidina es una diamidina que es tolerada por el organismo, pero no logra penetrar la barrera hematoencefálica, por lo que se recomienda utilizar sólo en etapas tempranas de la enfermedad por *T. brucei gambiense*. Por otro lado, para el tratamiento de la fase inicial de la enfermedad causada por *T. brucei rhodesiense* se utiliza suramina intravenosa, la cual

tiene una mayor eficacia, aunque produce un gran número de efectos secundarios. La eflornitina, desarrollada inicialmente como un fármaco anti-tumoral, se utiliza en la fase avanzada de la enfermedad provocada por *T. brucei gambiense*. Este medicamento es costoso, de efecto lento y con menor disponibilidad, que debe administrarse por vía intravenosa varios días, requiriendo algunas veces de transfusiones sanguíneas o interrupción de la terapia. Para los casos desarrollados por *T. brucei rhodesiense* el único fármaco disponible para etapas finales de tripanosomiasis es melarsoprol, el cual es una droga altamente tóxica, con un elevado porcentaje de letalidad y con grandes tasas de fracaso en su uso. Se administra vía intravenosa y debe de ser utilizado bajo una estrecha vigilancia clínica, ya que como los otros compuestos tiene una serie de efectos secundarios graves (Lejon *et al.*, 2013). La eficacia de los diversos fármacos es muy variable y dependiente del área de aplicación, además se consideran altamente riesgosos para su uso constante debido a su alta toxicidad. Hasta la fecha no existe una vacuna eficaz contra la tripanosomiasis (Robays *et al.*, 2008). Varios programas de investigación están encaminados a explorar vías bioquímicas del parásito para identificar nuevos blancos terapéuticos menos agresivos (Romero, 2012).

Además del interés médico que generan, los tripanosomátidos son importantes por presentar mecanismos atípicos de expresión genética, diferentes a los presentes en otros eucariontes. Estas diferencias, que serán detalladas más adelante, hacen muy relevantes los estudios de los aspectos moleculares en *T. brucei*.

Nuestro grupo de trabajo está interesado en el estudio de los mecanismos de expresión genética en *T. brucei*. En particular, estamos interesados en el análisis de la transcripción de la RNA Polimerasa III (Pol III) que se encarga de la transcripción de moléculas de RNA que son esenciales para la viabilidad celular.

En las siguientes secciones se presenta un panorama completo sobre transcripción, promotores y factores de transcripción en eucariontes en general, considerando desde la levadura hasta las células de mamífero. Un punto importante en este sentido es que hay una considerable, pero no completa, conservación evolutiva de la maquinaria transcripcional entre estos organismos. Posteriormente se mencionarán las particularidades que presenta *T. brucei* y otros tripanosomátidos en relación a los mecanismos de expresión genética.

## 1.2. Transcripción en Eucariontes.

Los genomas de los organismos eucariontes son complejos y se encuentran organizados en una estructura compacta denominada cromatina. Los mecanismos por los que los genes de forma individual se activan son de gran relevancia, que implican fenómenos complejos de regulación biológica y expresión genética (Roeder, 2005). El proceso de transcripción es el primer paso en la expresión génica, el cual se lleva a cabo por una enzima denominada RNA polimerasa. Dicha enzima sintetiza una molécula de RNA usando como molde una cadena de DNA (Lewin, 2011). En eucariontes existen tres RNA Polimerasas diferentes y cada una de ella se encarga de transcribir un grupo particular de genes. La RNA Polimerasa I (Pol I) está localizada en el nucléolo y se encarga de transcribir precursores de RNA ribosomales (rRNA) 18S, 28S y 5.8S. La RNA polimerasa II (Pol II), localizada en el nucleoplasma, sintetiza todos los RNA mensajeros (mRNA), los RNA pequeños nucleolares (snoRNA), algunos RNA pequeños nucleares (snRNA) y los microRNAs. Por último, la RNA polimerasa III (Pol III) lleva a cabo a síntesis de los RNA de transferencia (tRNA), que participan en el proceso de síntesis de proteínas, el rRNA 5S, que es un componente de la subunidad mayor de los ribosomas, y el snRNA U6, involucrado en el proceso de *splicing* (Lodish *et al.*, 2008).

Cada una de las RNA polimerasas posee una complejidad estructural necesaria para el inicio de la transcripción mediante el reconocimiento específico de los elementos básicos de los promotores génicos. Existen diversas subunidades que conforman a las RNA polimerasas, siendo Pol II la menos compleja de las tres enzimas, ya que sólo posee 12 subunidades, en comparación con las 14 que tiene Pol I y las 17 que conforman a Pol III (Roeder, 2005). Cinco subunidades son comunes en las tres polimerasas (ABC27, 23, 14.5, 10 $\alpha$  y 10 $\beta$ ); AC40 y AC19 son compartidas entre Pol I y Pol III, pero con homólogos en Pol II (B44 y B12.5). Otras cinco subunidades son homólogas entre las tres polimerasas (A190/B220/C160, A135/B150/C128, A43/B16/C25, A14/B32/C17 y A12/B12.6/C11). A49 y A34.5 son específicas de Pol I, mientras que C82, C53, C37, C34 y C31 son subunidades propias de Pol III (Geiduscheck y Kassavetis, 2001).

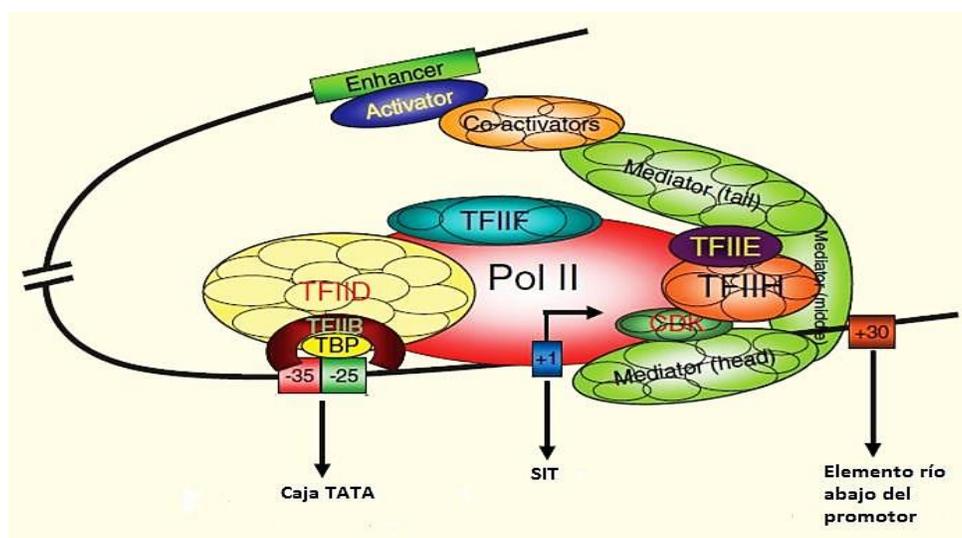
El proceso de regulación de la transcripción está conformado de tres fases principales: La iniciación, elongación y terminación. La fase de iniciación es considerada como la etapa más compleja en la regulación transcripcional. Para que inicie la transcripción es necesario que se presente previamente una remodelación de la cromatina, originada por enzimas que permiten que su estructura sea más accesible para la intervención de la maquinaria transcripcional.

Posteriormente se requiere la separación de las hebras (cadenas) del DNA en un pequeño sector cercano al promotor para permitir que la RNA polimerasa sintetice el fragmento de RNA complementario a la cadena molde, generando una “burbuja de transcripción” que se irá desplazando a lo largo del gen conforme la RNA polimerasa sintetiza la cadena. Esta fase requiere de la unión de proteínas al DNA, las cuales son llamadas factores de transcripción, que en su conjunto permiten el reconocimiento de la RNA polimerasa al gen particular a transcribir.

Durante la fase de elongación, la RNA Pol genera la síntesis de la cadena de RNA naciente mientras recorre el DNA a través de la burbuja de la transcripción. Existen proteínas que regulan la etapa de elongación, las cuales evitan que se termine prematuramente la transcripción o intervienen en la maduración de los RNAs transcritos.

En la última fase, de terminación, la RNA polimerasa detiene la síntesis de la cadena molde de DNA por el reconocimiento de una secuencia de término y, consecuentemente, se desestabiliza el complejo RNA-DNA de transcripción (Nelson y Cox, 2008).

La transcripción es un importante proceso dentro de las células eucariontes, permitiéndole adquirir elementos indispensables para su supervivencia. Dada la gran precisión con la que trabajan los complejos transcripcionales, la regulación de su funcionamiento requiere de la participación de diversas proteínas que interactúan específicamente para intervenir ya sea positivamente o negativamente dentro de su desarrollo (Roeder, 2005).



**Figura 5. Representación esquemática del complejo de inicio de la transcripción de Pol II** (tomado de Krishnamurthy y Hamsey, 2009).

Además de los factores de transcripción, entre las proteínas que regulan la transcripción se encuentran los represores, que pueden localizarse a cierta distancia del promotor inhibiendo la unión de la RNA polimerasa al DNA; y los activadores, que a diferencia de los anteriores, se unen al DNA y promueven la actividad de la RNA polimerasa. Algunos activadores se unen a sitios de DNA llamados potenciadores (*enhancers*), que se encuentran distantes del promotor (incluso encontrándose en cromosomas diferentes) que afectan positivamente la tasa de transcripción (Figura 5). Se han identificado elementos que bloquean señales del exterior conocidos como aislantes o barreras (*insulators*), los cuales tienen la capacidad de proteger a un promotor de la acción de un potenciador (*enhancer*) distal, adicionalmente impidiendo el avance de la cromatina condensada adyacente (Nelson y Cox, 2008; Burgess-Beusse *et al.*, 2002).

Además de la intervención de proteínas reguladoras, existen mecanismos epigenéticos que también afectan el control de la expresión génica. La cromatina está sujeta a cambios conformacionales para regular su función dentro del complejo transcripcional, los cuales consisten en la metilación, acetilación, fosforilación o ubiquitinación de histonas por diversas enzimas, permitiéndole modificar la arquitectura de la cromatina (Kornberg, 1999).

### **1.2.1 RNA Polimerasa I (Pol I)**

Como se había mencionado anteriormente, Pol I es la enzima encargada de la transcripción de rRNA 18S, 5.8S y 28S, los cuales son sintetizados en el nucléolo. Los rRNA forman parte de las subunidades que conforman los ribosomas (Roeder, 2005), por lo que podría decirse que el papel de Pol I se centra en la biogénesis de los ribosomas. La inversión energética que hacen las células para la formación de ribosomas es mayor que la empleada en cualquier otro proceso celular. La tasa de transcripción ribosomal es proporcional a tasas de crecimiento y proliferación celular (Viktorovskaya *et al.*, 2014). Pol I genera un transcrito policistrónico largo el cual es procesado posteriormente para dar origen a las tres moléculas de rRNA independientes; el proceso de montaje del complejo ribosomal es altamente organizado y controlado (Fatica y Tollervey, 2002).

Los promotores de los genes del rRNA están generalmente formados por dos regiones: un dominio central y un dominio “río arriba”. En células humanas el dominio central se extiende del nucleótido +20 al -45, en relación al sitio de inicio de la transcripción (SIT, +1), mientras que el dominio “río arriba” se localiza de la base -107 a -186 (Reeder, 1984). Los factores implicados en la transcripción de los genes del rRNA son pocos en comparación de los requeridos por la Pol II para iniciar dicho proceso. Estos factores específicos de unión al DNA incluyen a SL1, formado por TBP (*TATA-binding protein*), además de varios factores asociados a TBP o por sus siglas en inglés TAFs (*TBP-Associated Factors*). Otro factor de transcripción necesario por Pol I es UBF (Goodfellow y Zomerdijk, 2012).

### **1.2.2 RNA Polimerasa II (Pol II)**

La transcripción de Pol II se lleva a cabo en el nucleoplasma utilizando una maquinaria proteica comprendida por aproximadamente 60 polipéptidos y la combinación de una compleja organización de cofactores asociados (Figura 5) (Krishnamurthy y Hampsey, 2009).

Pol II, al igual que las otras RNA Polimerasas, es incapaz de reconocer la región promotora por sí misma, pues requiere de complejos proteicos que le facilitan la detección de la secuencia de DNA (Roeder, 2005). Para la formación del complejo de preiniciación de la transcripción se requiere la participación de seis factores de transcripción: TFIIA, TFIIB, TFIID, TFIIE, TFIIF y TFIIH (Schumacher *et al.*, 2013). El inicio de la transcripción involucra el reconocimiento de la caja TATA del promotor por TFIID, el cual está formado por TBP y 14 elementos TAF (Krishnamurthy y Hampsey, 2009). Después del primer contacto por TFIID se une al promotor TFIIA, seguido de TFIIB y TFIIF. Sólo entonces es reclutada Pol II al complejo de pre-inicio de la transcripción (Grünberg y Hahn, 2013). Finalmente, TFIIE y TFIIH se unen al complejo. Se ha visto que TFIIE tiene como función unirse y estabilizar la hebra de DNA, además de que interactúa directamente con TFIIH, el cual sólo puede reclutarse hasta que TFIIE previamente se une al complejo. Por otro lado, TFIIH es un factor que posee actividades enzimáticas adicionales que incluyen actividad de helicasa y cinasa (Krishnamurthy y Hampsey, 2009; Grünberg y Hahn, 2013; Guo y Price, 2013).

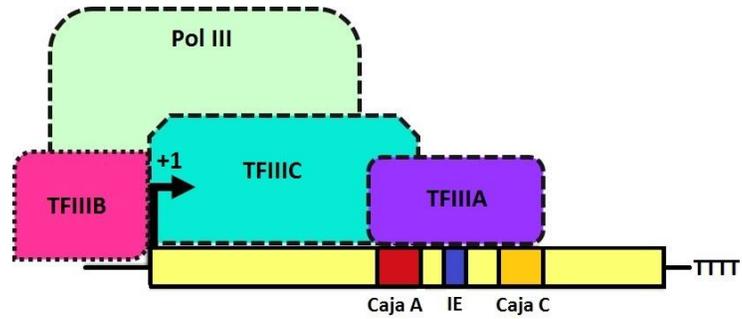
Posteriormente al inicio de la transcripción, proteínas reguladoras adicionales interactúan con Pol II durante el proceso de elongación del transcrito. Por otro lado, muchas enzimas afectan el procesamiento del mRNA, ya sea en la adición del Cap 5', eliminación de intrones y empalme de exones (*splicing*), así como la poliadenilación en el extremo 3' (Proudfoot, 2000).

### **1.2.3 RNA Polimerasa III (Pol III)**

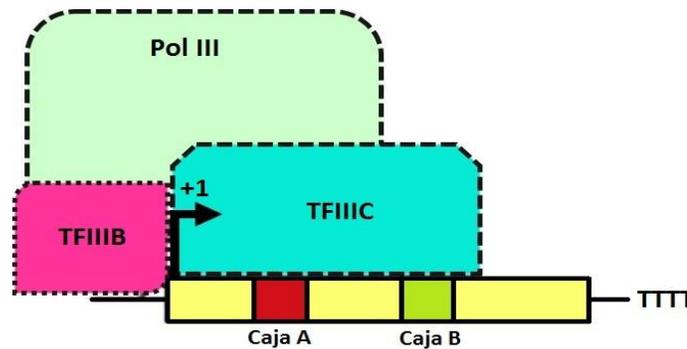
La maquinaria transcripcional de la RNA Polimerasa III en organismos eucariontes se encarga de sintetizar los tRNA, el rRNA 5S y el snRNA U6, entre otras moléculas de RNA. Muchas de ellas son componentes esenciales para el proceso de traducción o la maduración de los mRNAs. Por esta razón, los genes transcritos por Pol III deben ser producidos en grandes cantidades para mantener la eficiencia celular bajo condiciones favorables. Asimismo, Pol III debe ser funcionalmente susceptible a los cambios del microambiente celular generados bajo condiciones adversas (Dieci *et al.*, 2012).

Anteriormente se mencionó que Pol III está conformada por 17 subunidades, de las cuales cinco están relacionadas evolutivamente con otras subunidades de las RNA polimerasas, dos son compartidas con Pol I y Pol II; y otras cinco son compartidas entre las tres polimerasas. El resto de las subunidades forman dos subcomplejos diferentes: C82/C34/C31 y C53/C37, los cuales tienen funciones destacadas dentro de la transcripción conducidas por Pol III (Geiduschek y Kassavetis, 2001).

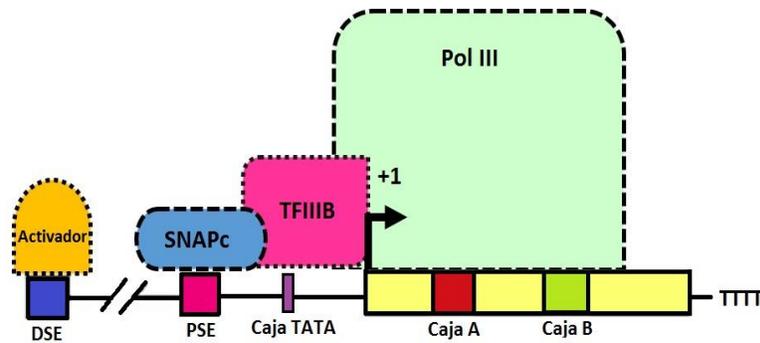
**Tipo 1  
(rRNA 5S)**



**Tipo 2  
(tRNA)**



**Tipo 3  
(snRNA U6)**



**Figura 6. Regiones promotoras y factores de inicio de la transcripción de genes transcritos por Pol III.** Se muestran los tres tipos de promotores y la presencia de los factores de transcripción para cada caso. TFIIB es indispensable para la transcripción de todos los genes por la RNA Pol III. TFIIA es requerido únicamente para los genes rRNA 5S, y TFIIC para los genes tRNA y rRNA 5S. El promotor para snRNA U6 presenta secuencias río arriba del gen a las cuales se asocian proteínas activadoras y la proteína específica SNAPc; donde DSE simboliza el elemento distal y PSE elemento proximal (modificado de Dieci *et al*, 2013).

Los genes de Pol III se clasifican según la estructura que posee su promotor, dependiendo del tipo y localización de sus elementos en cis (Figura 6). Los promotores del Tipo 1, presentes en los genes del rRNA 5S, poseen tres regiones intergénicas: una caja A, un elemento intermedio (EI) y una caja C. Los genes Tipo 2, incluidos los tRNA, cuentan con una caja A que se encuentra de 12 a 20 pares de bases (pb) río abajo del SIT y una caja B localizada aproximadamente de 30 a 60 pb río abajo de la caja A. Estos elementos situados dentro de la región transcrita son altamente conservados y dirigen el posicionamiento orientado de los factores de transcripción. Por último, los promotores del Tipo 3 se identifican por tener secuencias río arriba de la secuencia codificante. El gen snRNA U6 posee un promotor Tipo 3, el cual está conformado por una caja TATA que está posicionada aproximadamente 30 pb río arriba del gen, un elemento proximal (PSE) cerca de la posición -60; y un elemento distal (DSE) ubicado a mayor distancia del gen (Huang y Marai, 2001). La transcripción de Pol III requiere de la participación de 3 factores de transcripción: TFIIIA, TFIIIB y TFIIIC. El factor TFIIIC está compuesto por seis subunidades organizados en dos subdominios (Geiduschek y Kassavetis, 2001); además es considerado un complejo flexible ya que es capaz de unirse a la caja A y B en genes codificadores de tRNA a pesar de que éstas se encuentran separadas por una distancia variable. Tiene como papel participar en el proceso de ensamblaje de la maquinaria de transcripción ya que, una vez incorporado, promueve la unión del factor TFIIIB río arriba del SIT, del mismo modo estabiliza complejos preformados antes de reclutar a TFIIIB (Acker *et al.*, 2013).

El factor de transcripción TFIIIB comprende tres subunidades (TBP, BRF1 y BDP1) y es considerado el elemento clave para la unión de la Pol III. Es el único factor que participa en los tres tipos de promotores, ya que puede unirse directamente a la caja TATA en genes tipo 3 o puede participar en el reclutamiento de Pol III dependiente de TFIIIC. Además de su capacidad para reclutar a la Pol III y de su participación dentro del proceso de iniciación para la apertura de la doble hebra de DNA, TFIIIB es un factor que permite el proceso de reinicio de la transcripción para alcanzar una eficiencia mayor tras el primer ciclo de síntesis (Dieci *et al.*, 2013). Por último, el factor de transcripción TFIIIA es un polipéptido que se requiere únicamente para la transcripción del gen rRNA 5S. Es el primer factor de ensamble que reconoce los elementos del promotor tipo 1, por lo cual presenta una complejidad muy particular.

### 1.2.3.1 Factor de Transcripción TFIIIA

TFIIIA es una proteína de aproximadamente 40 kDa que se requiere para la generación de transcritos del gen del rRNA 5S. Fue el primer factor específico de genes eucariontes en ser aislado del organismo *Xenopus laevis*, ya que es una proteína extremadamente abundante en los ovocitos de anfibios (Acker *et al.*, 2013). Como factor de transcripción se demostró que tiene la capacidad de interactuar con las regiones promotoras del gen, debido a que posee motivos de dedos de zinc; en la mayoría de los organismos eucariontes presenta nueve dedos de zinc consecutivos del tipo  $C_2H_2$ , aunque existen algunas excepciones. La unión de TFIIIA a los tres elementos intragénicos requiere una alta afinidad, abarcando aproximadamente 120 pb de largo. La caja A se extiende desde la posición 50 a 64, mientras que el E1 se localiza entre los nucleótidos 67 a 72, y la caja C se encuentra entre las bases 80 y 97. Cada uno de estos elementos promotores interactúa con tres dedos de zinc de TFIIIA por separado (Layat *et al.*, 2013). Los tres primeros y los tres últimos dedos de zinc hacen contacto con las bases del surco mayor de la caja C y A respectivamente, mientras que los dedos cuatro y seis conectan los dos segmentos de DNA cruzando el surco menor (Shastry, 1991).

#### 1.2.3.1.1 Dedos de Zinc

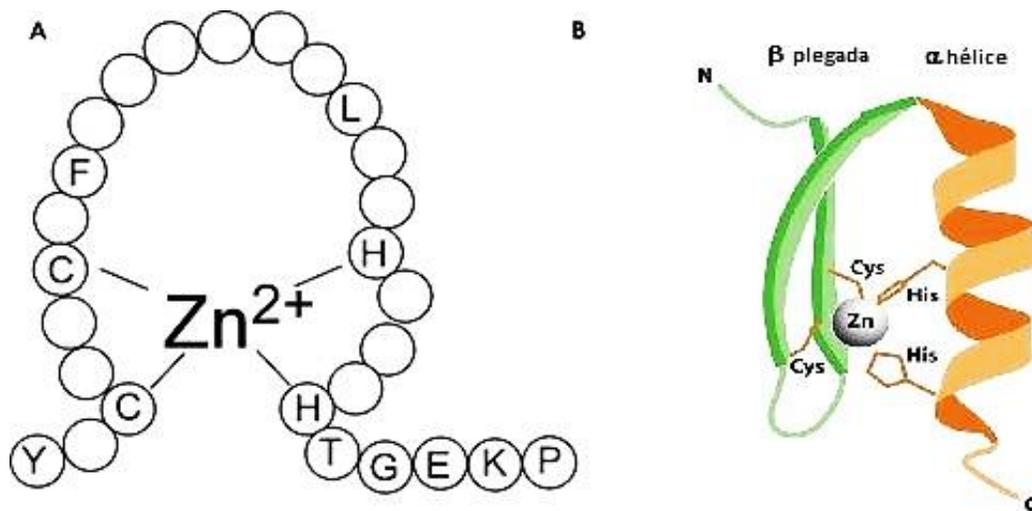
La capacidad de las proteínas para reconocer y unirse a secuencias específicas del DNA es crítica en una variedad de procesos biológicos, incluyendo la transcripción (Persikov y Singh, 2014). La clasificación de las proteínas que se unen al DNA puede llevarse a cabo en términos de clases estructurales en grandes familias, siendo una de ellas la de las proteínas con dedos de zinc. Un dedo de zinc individual contiene aproximadamente 30 aminoácidos organizados en una unidad estructural simple alrededor de un átomo de zinc (Acosta-Viana y Zavala-Castro, 1996) (Figura 7). Estas unidades se presentan típicamente como repeticiones en tándem.

Los motivos de dedos de zinc tienen múltiples copias de pequeños dominios plegados de forma independiente, que conservan cisteínas e histidinas en un número variable, y dan lugar a familias descritas como: CCCC ( $C_4$ ), CCCH ( $C_3H_1$ ) y CCHH ( $C_2H_2$ ) (Brown, 2005). La familia de dedos de zinc con una configuración  $C_2H_2$ , descubierta en el factor de transcripción TFIIIA, constituye uno de los motivos estructurales más comunes en eucariontes (Pabo *et al.*, 2001).

Hay evidencia de que algunos de los dedos de zinc de este tipo pueden unirse al RNA e incluso participar en interacciones proteína-proteína, pero parece que su papel predominante es la interacción de proteína-DNA (Wolfe *et al.*, 2000).

El sello distintivo del dedo de zinc es la presencia de los residuos de cisteína e histidina que sirven como ligandos del zinc, pero además hay otros aminoácidos conservados. Así, la secuencia consenso de los dedos de zinc  $C_2H_2$  es  $F/I/Y-X-C-X_{2,4}-C-X_3-F-X-K-X_{2,3}-L-X_2-H-X_{3,5}-H$ , donde X representa un aminoácido cualquiera (Layat *et al.*, 2013), y donde la separación entre las cisteínas e histidinas es variable. En algunos casos existe una secuencia común para las regiones enlazadoras cortas que conectan dedos adyacentes, que es TGEKP o variantes estrechamente relacionadas (Figura 7, panel A). Esta secuencia no sólo funciona como un conector entre motivos de zinc sino que sirve también para estabilizar el complejo y ayudar a mantener la relación proteína-DNA (Pabo *et al.*, 2001).

Se ha reportado que la estructura clásica de un dedo de zinc del tipo  $C_2H_2$  es una simple y compacta unidad formada por dos láminas  $\beta$  plegadas y una  $\alpha$  hélice, con la forma  $\beta\beta\alpha$  como se muestra en el panel B de la figura 7 (Isalan, 2013).



**Figura 7. Dominios de dedo de zinc  $C_2H_2$ .** Esquema lineal (A) y representación de la estructura secundaria (B) de un motivo de dedo de zinc (modificado de Hatayama *et al.*, 2008).

### 1.3 Transcripción en tripanosomátidos

#### 1.3.1 Organización genómica de *T. brucei*.

El genoma de *T. brucei* tiene un tamaño aproximado de 26 Megabases (Mb), y se compone de varios tipos de cromosomas: minicromosomas, cromosomas intermedios y megacromosomas. El parásito posee 11 megacromosomas (cuyo tamaño varía de 1 a 6 Mb), en los cuales se encuentran diversos tipos de genes como los denominados “*housekeeping*” o constitutivos, organizados en unidades policistrónicas largas, esto es, grupos de decenas a cientos de genes localizados en la misma cadena de DNA. Los megacromosomas contienen casi 8,800 genes codificadores de proteínas, incluyendo aproximadamente 500 pseudogenes. *T. brucei* posee de 1 a 5 cromosomas intermedios, que tienen un tamaño de entre 300 y 900 kilobases (kb), y contienen reservorios de VSGs. Los cromosomas más pequeños, los minicromosomas, tienen una longitud de entre 50 y 150 Kb. En el genoma del parásito se cuentan aproximadamente 100 minicromosomas, lo cual representa el 10% del genoma nuclear; se sabe que cerca de la mitad de cada uno de esos elementos se compone de secuencias repetidas de 177 pb, además contienen copias silenciosas de las VSG y pseudogenes (Maree y Patterton, 2014).

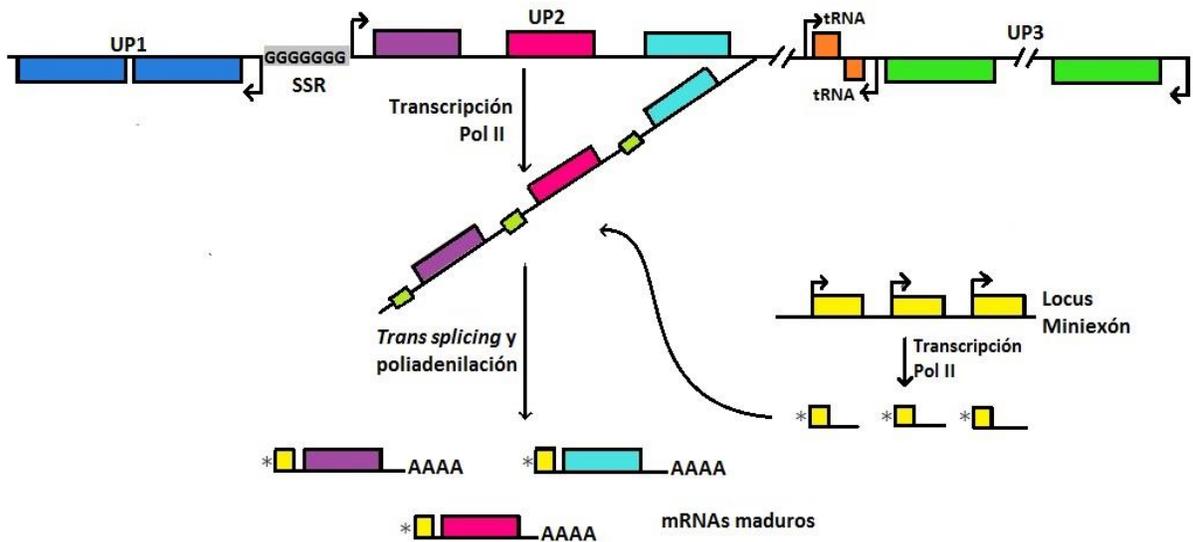
**Tabla I.** Resumen de las características principales del genoma nuclear de *T. brucei* considerando únicamente los megacromosomas (tomado de Padilla-Mejía *et al.*, 2009).

<b>Características</b>	
<b>Tamaño del genoma (Mb)</b>	26
<b>Número de megacromosomas</b>	11
<b>Genes de proteínas</b>	8,000
<b>Genes de rRNA</b>	56
<b>Genes de tRNA</b>	66
<b>Genes de snRNA</b>	5
<b>Genes de snoRNA</b>	353
<b>Genes de Splice leader o miniexón</b>	>28
<b>Densidad génica por Mb</b>	317
<b>Contenido de G+C (%)</b>	46.6

El estudio de la secuencia genómica de *T. brucei* permitió determinar algunas características importantes (Tabla I). *T. brucei* requiere de un programa de diferenciación preciso, el cual es altamente regulado por la expresión de un perfil genético que le permiten adaptarse y sobrevivir en entornos biológicos diferentes (Clayton y Shapira, 2007; Haile y Papadopoulou, 2007).

### **1.3.2 Transcripción de la RNA Polimerasa II en *T. brucei*: *trans-splicing* y poliadenilación.**

Anteriormente se mencionó que en los cromosomas de *T. brucei* existen largas unidades de genes que codifican para proteínas, las unidades policistrónicas, las cuales tienen la particularidad de localizarse en la misma cadena de DNA (Figura 8). A diferencia de los operones bacterianos, los genes presentes en las unidades policistrónicas no se encuentran relacionados funcionalmente entre sí (Martínez-Calvillo *et al.*, 2001). Cada cromosoma contiene dos o más unidades policistrónicas, las cuales pueden transcribirse de forma divergente (hacia los telómeros) o convergente (alejándose de los telómeros) (Martínez-Calvillo *et al.*, 2001). Las regiones que separan dos unidades policistrónicas se llaman regiones de cambio de hebra (SSR, por las siglas en inglés de *Strand Switch Region*) (Daniels *et al.*, 2010).



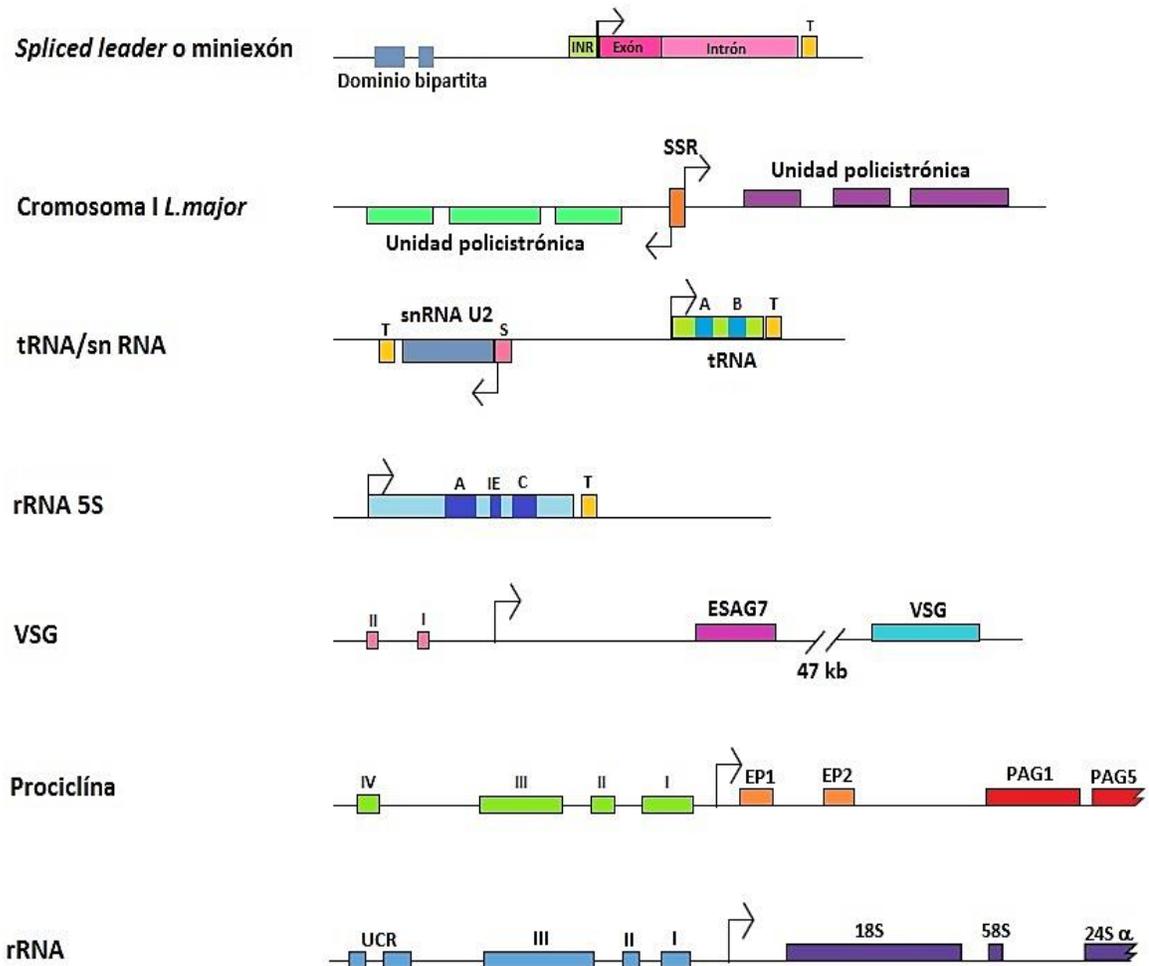
**Figura 8. Procesamiento de los mRNAs y transcripción policistrónica en *T. brucei*.** Se representa en la parte superior un cromosoma con tres unidades policistrónicas (UP1-3). La transcripción de una unidad policistrónica, que inicia en la región SSR, produce un transcrito primario que es procesado mediante *trans-splicing* y poliadenilación para su maduración. El asterisco en el miniexón representa el cap (modificado de Martínez-Calvillo et al, 2010).

Los transcritos policistrónicos se procesan en mRNA individuales mediante *trans-splicing* y poliadenilación. El *trans-splicing* es un proceso por el cual se adiciona una secuencia de 39 nucleótidos, llamada miniexón o *spliced-leader*, al extremo 5' de todos los mRNA. El miniexón porta un CAP prefabricado y altamente modificado, que le confiere estabilidad al mRNA maduro (Figura 8) (Palenchar y Bellofatto, 2006). Al igual que el *cis-splicing*, el *trans-splicing* se realiza a través de dos reacciones de *trans-esterificación* y también participan en él diversos complejos que contienen a los snRNA, por ejemplo U1, U2, U4, U5 y U6 (Romero, 2012). El sitio aceptor del empalme es un dinucleótido AG inmediatamente río abajo de un tracto de pirimidinas. Esta región rica en pirimidinas es también necesaria para la poliadenilación del transcrito del gen localizado río arriba. Los sitios de poliadenilación se encuentran entre 100 y 300 nucleótidos río arriba de la señal de *trans-splicing* (Cayton y Shapira, 2009).

El *trans-splicing* y la poliadenilación son procesos altamente acoplados, requeridos para la regulación de la expresión génica asociada a la diferenciación del parásito bajo condiciones específicas. Recientemente se ha demostrado que existen métodos de regulación transcripcional, incluyendo el silenciamiento de genes y cambios estructurales de la cromatina (Haile y Papadopoulou, 2007).

A diferencia de otros eucariontes, las regiones promotoras de Pol II en *T. brucei* están débilmente definidas. El único promotor descrito hasta el momento es el del gen que codifica para el miniexón, el cual está formado por tres dominios: un elemento -60, localizado entre las posiciones -67 y -58 relativo al SIT; el elemento -30, que se localiza entre la región -41 y -58; y por último un dominio denominado INR en la región de inicio de la transcripción (Figura 9) (Martínez-Calvillo *et al.*, 2010). Como se puede apreciar, el promotor carece de una caja TATA y una secuencia canónica de inicio, a pesar de lo cual se han encontrado algunas proteínas ortólogas necesarias para la transcripción realizada de Pol II en eucariontes superiores (Palenchar y Bellofatto, 2006).

En tripanosomátidos se tiene poco conocimiento acerca de los promotores de los genes que codifican para proteínas. Lo único que se conoce hasta ahora deriva del estudio del cromosoma 1 de *Leishmania major*, en donde la transcripción de dos unidades policistrónicas inicia de manera bidireccional en una región de alrededor de 100 pb rica en G+C dentro de la región SSR (Figura 9) (Martínez-Calvillo *et al.*, 2004).



**Figura 9. Diagrama representativo de los promotores caracterizados en *T. brucei* y otros tripanosomátidos.** Se esquematizan las regiones codificantes y elementos de DNA requeridos para iniciar la transcripción. En el gen de miniexón de *L. tarentolae* se muestran dos dominios a -60 y -30. En el Cromosoma 1 de *L. major* se señala la región de inicio de la transcripción bidireccional (SSR). Se esquematiza también el locus de un snRNA y un tRNA de *T. brucei* con sus regiones particulares de transcripción; así como el gen rRNA 5S. Además se muestran los promotores de dos de los genes relacionados con la diferenciación celular de *T. brucei* (VSG y prociclina), así como el promotor de la unidad de rRNA (modificado de Martínez-Calvillo *et al.*, 2010).

#### 1.4 Transcripción de la RNA Polimerasa I en *T. brucei*

En *T. brucei*, la RNA Pol I no sólo sintetiza los rRNA, sino también se encarga de la transcripción de algunos genes codificadores de proteínas. Este tipo de habilidad sólo es conocida en los tripanosomas africanos, y las proteínas que sintetiza incluyen las glucoproteínas variables de superficie (VSG) y proteínas de la superficie de membrana en formas procíclicas, llamadas PARP. De esta manera, la transcripción por la Pol I está íntimamente ligada a la diferenciación entre los estadios del ciclo de vida en los hospederos (Daniels *et al.*, 2010).

El promotor de los rRNA en *T. brucei* posee dos dominios centrales esenciales (I y II) y un dominio distal (III), además de que contiene una región de control río arriba (UCR) que se localiza hasta la posición -250, pero que tiene una menor influencia en la eficiencia de la transcripción. Las regiones promotoras de los genes que codifican prociclinas guardan alta homología de aquellas para los rRNA. Los genes de prociclinas están organizados en unidades policistrónicas de entre 5 a 10 kb, en los cromosomas VI y X, con diferentes genes asociados o PAGs (*Procyclin Associated Genes*) (Figura 9) (Martínez-Calvillo *et al.*, 2010).

El gen que codifica para VSG se localiza al final de una unidad policistrónica de 50 kb conocida como sitio de expresión de la forma sanguínea, o BES por sus siglas en inglés (*Blodstream-form Expression Site*) el cual contiene de 8 a 12 genes adicionales asociados (ESAGs, por sus siglas en inglés *Expression Site-Associated Genes*), los cuales son co-transcritos con el gen VSG y son parte de receptores membranales (Campbell *et al.*, 2003). El promotor del gen posee un dominio central bipartito en las regiones -60 y -36 (Figura 9). La limitada conservación de las secuencias entre los tres tipos de promotores para la RNA Pol I en *T. brucei* hace pensar que no reclutan a Pol I utilizando el mismo conjunto de factores de transcripción. Se desconoce la razón por la que Pol I transcribe los genes de VSGs y prociclinas. Claramente la mayor expresión de proteínas VSG añadiría una complejidad antigénica, protegiendo eficazmente al parásito de los efectos letales del sistema inmune del hospedero (Palenchar y Bellofatto, 2006).

Se han aislado 10 subunidades de Pol I mediante la técnica de purificación por afinidad en tándem en *T. brucei* (Walgraffe *et al.*, 2005), además se han identificado una subunidad exclusiva de los tripanosomátidos llamada p31 (Nguyen *et al.*, 2007) y una proteína que tiene la función de un factor de transcripción denominado CITFA (por sus siglas en inglés *Class I Transcription Factor A*) (Romero, 2012).

### 1.5 Transcripción de la RNA Polimerasa III en *T. brucei*

Al igual que en otros organismos eucariontes, Pol III se encarga de la síntesis de una serie de RNAs pequeños no codificantes que tienen un papel en la traducción (tRNA y rRNA 5S) y en otros procesos celulares (como el RNA 7SL). Particularmente, en *T. brucei* Pol III transcribe todos los snRNA, pero sólo se han caracterizado los promotores de algunos de ellos. Curiosamente estos genes dependen de elementos reguladores (cajas A y B) que se encuentran en un gen de tRNA adyacente hacia su extremo 5' y localizado en la cadena opuesta del DNA (Figura 9) (Daniels *et al.*, 2010). Aunque no es muy claro cómo es que las cajas A y B del tRNA vecino son esenciales para la expresión del snRNA, se ha propuesto un modelo de “asa de DNA” en el que los sitios de inicio de transcripción de los genes del snRNA y del tRNA son aproximados de tal manera que el factor TFIIB permite el reclutamiento de Pol III en ambos sitios. Aunque no se ha llevado a cabo el análisis funcional de los promotores de los genes del tRNA y del rRNA 5S en tripanosomátidos, el análisis de las secuencias mostró que se poseen las regiones de control interno típicas de otros eucariontes (Figura 9) (Padilla-Mejía *et al.*, 2009).

Se han identificado hasta el momento 12 subunidades de Pol III por medio de la técnica de purificaciones por afinidad en tándem: C160, C128, C82, C53, C37, C34, C17, AC40, AC19, ABC27, ABC23 Y ABC14.5 (Martínez-Calvillo *et al.*, 2007). También se han identificado tres subunidades que forman parte del complejo TFIIB (TBP, BRF1 y BDP1). Sin embargo, resulta interesante que no se han encontrado ortólogos de los factores de transcripción TFIIIA y TFIIIC en tripanosomátidos (Martínez-Calvillo *et al.*, 2010).

## 2. ANTECEDENTES

Varios estudios han revelado diversas proteínas de unión a DNA y RNA en tripanosomátidos, las cuales realizan funciones particulares dentro de algunos procesos celulares. Se conocen algunas proteínas con dominios de dedos de zinc de *T. brucei* con una configuración CCCH. En 2001, Hendriks *et al.* encontraron dos proteínas con esa configuración, a las que llamaron TbZFP1 y TbZFP2. Ambas proteínas con dedos de zinc participan en la modulación de la diferenciación de formas procíclicas de *T. brucei*. Otras proteínas de una configuración similar poseen diferentes roles: TbZC3H20 es requerida para el crecimiento de formas procíclicas y regulación de algunos mRNAs (Ling *et al.*, 2011); TbZC3H18 ha sido implicada en el control de la diferenciación celular pero se desconoce su mecanismo de acción (Benz *et al.*, 2011); TbZC3H12 y TbZC3H13 son probablemente requeridas para el crecimiento óptimo de algunos estadios del ciclo de vida del parásito (Ouna *et al.*, 2012). Sin embargo, ninguna de las proteínas descritas posee los dominios característicos que conforman a TFIIIA (D'Orso *et al.*, 2003).

Al analizar el genoma de *T. brucei* encontramos el gen de una proteína que contiene cinco dedos de zinc del tipo C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>, a la que denominamos TbZ5, y que es un firme candidato a ser el ortólogo de TFIIIA. Alternativamente, TbZ5 podría ser algún otro factor de transcripción o participar en la regulación genética post-transcripcional uniéndose a mRNA, por lo que estamos interesados en su estudio. Así, en el presente trabajo se generó una línea celular de *T. brucei* que expresa a TbZ5 fusionada a una bandera PTP-tag. Esta bandera consta de dos dominios de unión a la proteína A de *Staphylococcus aureus* (Prot A) y un epítipo de la proteína C (Prot C) separados por un sitio de corte de la proteasa TEV (Puig *et al.*, 2001; Schimanski *et al.*, 2005). La proteína TbZ5 fusionada a la bandera PTP permitirá conocer la localización celular y, en estudios posteriores, servirá para identificar a las proteínas con las que interactúa TbZ5, mediante cromatografías de afinidad en tándem. Así, los resultados que se obtengan en el presente proyecto sentarán las bases para futuros estudios que determinarán la función que cumple TbZ5 en el parásito *T. brucei*.

### 3. OBJETIVOS

#### **Objetivo general**

Analizar molecularmente a TbZ5 en el protozoo parásito *T. brucei*.

#### **Objetivos particulares**

1. Realizar un análisis *in silico* de la secuencia de aminoácidos de TbZ5.
2. Obtener y caracterizar una línea celular que exprese a la proteína recombinante TbZ5-PTP.
3. Determinar la localización celular de la proteína recombinante TbZ5-PTP.

## 4. MATERIALES Y MÉTODOS

### 4.1. Análisis *in silico* de TbZ5

La secuencia del genoma de *T. brucei* y de TbZ5 se encuentra disponible en las bases de datos de NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) y tritrypDB (<http://tritrypdb.org/tritrypdb/>) (version 8.1). Los alineamientos de secuencias se generaron usando la herramienta bioinformática Clustal W 1.82 (<http://ebi.ac.uk/clustalw>). Para la detección y el análisis de dedos de zinc se utilizaron los programas bioinformáticos SMART 7 (<http://smart.embl-heidelberg.de/>), Pfam (<http://pfam.sanger.ac.uk/>) y Superfamily 1.75 (<http://supfam.org/SUPERFAMILY/hmm.html>). La búsqueda de posibles dominios conservados se llevó a cabo con la herramienta Blast 2.0 disponible en la página de NCBI, y la búsqueda de señal de localización nuclear se realizó mediante el uso del programa PSORTII (<http://psort.hgc.jp/form2.html/>). El análisis de posibles aminoácidos fosforilados se efectuó con las páginas disponibles en la red PhosTryp (<http://phostryp.bio.uniroma2.it/>) y NetPhos 2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/>). Por último, para la predicción de estructura secundaria y terciaria de la proteína se utilizaron las herramientas bioinformáticas disponibles en los sitios PSIPRED (Protein Sequence Analysis Workbench) (<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/>), NetSurfP 1.1 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetSurfP/>), Jpred 3 (<http://www.compbio.dundee.ac.uk/www-jpred/>), CFSSP (<http://www.biogem.org/tool/chou-fasman/>), Phyre 2 (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/>) y SWISS-model (<http://swissmodel.expasy.org/>).

### 4.2. Generación de vectores

#### 4.2.1 Amplificación y clonación de la región 3'-terminal del gen TbZ5 en pGEM-T

La región 3'-terminal del gen TbZ5 se amplificó por medio de la PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) empleando DNA genómico de *T. brucei* como molde, con los oligonucleótidos TbZ5-C-PTP-ApaI-5' y TbZ5-CPTP-NotI-3'-GC los cuales contienen los sitios de restricción para las enzimas ApaI y NotI. El producto de esta amplificación se desaló utilizando el kit NucleoSpin Extract II (Macherey Nagel). Posteriormente para la formación del vector pGEM-TbZ5, se procedió a realizar la reacción de adición de adeninas en el extremo carboxilo terminal del fragmento amplificado de

TbZ5 usando 1U de DNA Taq polimerasa (KAPA), dATP 25  $\mu$ M y MgCl<sub>2</sub> 25 mM en un volumen final de 10  $\mu$ l durante 30 min a una temperatura de 72°C. Después el producto se ligó al vector pGEM-T Easy (ver sección 3.8) de acuerdo con lo establecido por PROMEGA. Se transformaron células competentes de *Escherichia coli* cepa JM109 con la reacción de la ligación y se sembraron en placas de agar con X-gal (ver sección 3.9). Se seleccionaron colonias blancas, las cuales contienen el inserto para su posterior análisis (Vieira & Messing, 1982). Éstas se resembraron en 5 ml de medio líquido LB (Luria-Bertani) con ampicilina (0.01 mg/ml) y se incubaron a 37°C de 12 a 16 h para hacer una minipreparación de plásmido por lisis alcalina con SDS (ver sección 3.10). Luego se efectuó un análisis de restricción con la enzima EcoRI (a 37°C por 4 h) para confirmar la presencia del inserto. Después de corroborar esto se secuenció el DNA plasmídico de la construcción pGEM-TbZ5; dicha determinación se llevó a cabo en el servicio de laboratorio de Bioquímica Molecular de la Unidad de Biotecnología y Prototipos de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala, UNAM.

#### **4.2.2 Generación del vector pTbZ5-PTP**

Se eligió una de las clonas del vector pGEM-TbZ5 para subclonar el fragmento de TbZ5 en un vector con la bandera PTP. Para ello, pGEM-TbZ5 se digirió con las enzimas Apal y NotI para liberar el inserto de aproximadamente 513 pb. Se hizo una electroforesis con un gel de agarosa al 0.8%, purificándose la banda deseada (ver sección 3.7). El DNA obtenido de la purificación se ligó al vector pC-PTP-BLA (Nguyen *et al.*, 2007) previamente digerido con Apal y NotI. Se transformaron células electrocompetentes, siguiendo las indicaciones del fabricante (Invitrogen). Las colonias obtenidas se resembraron en medio líquido LB con ampicilina para extraer DNA plasmídico por lisis alcalina. El DNA obtenido se analizó mediante restricción con la enzima ClaI (37°C por 4 h) para corroborar que el fragmento se integró correctamente. Un segundo análisis se realizó con Apal y NotI para liberar el inserto clonado. Confirmada la clonación correcta del inserto, se solicitó su secuenciación.

#### **4.3 Extracción de DNA genómico**

Un total de  $3 \times 10^8$  células de *T. brucei* en fase logarítmica se centrifugaron a 4,500 rpm por 10 min a 4°C. Las células se resuspendieron en 5 ml de buffer de lisis, el cual contiene SSC 0.5X (NaCl 3 M, acetato de sodio 0.3 M), TNE 1X pH 8 (Tris 40 mM, EDTA 1 mM, NaCl 15 mM), Sarcosyl 1% y 100  $\mu$ g

de proteinasa K. Después de una incubación de 2 h a 55°C se realizó una extracción con fenol-cloroformo y la pastilla se resuspendió en 300 µl de buffer TE pH 8 (Tris 10 mM, EDTA 0.2 mM).

#### 4.4 Amplificación de DNA por medio de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).

Para amplificar las regiones específicas de DNA, ya sea para su análisis o para su ligación en un vector, se llevaron a cabo reacciones de amplificación por PCR utilizando la enzima DNA polimerasa RED *Taq* (1U). En tubos para PCR se agregaron 5 µl de Buffer regulador RED *Taq* PCR 10X (100 mM Tris-HCl pH 8.3, 500 mM KCl y 0.1% gelatin), mezcla de dNTPs 0.2 mM, oligonucleótidos sentido y antisentido (0.2mM), el DNA templado (100 ng) y MgCl<sub>2</sub> 2mM en un volumen final de 50 µl. El termociclador Corbet Research se programó con las siguientes condiciones de amplificación: un ciclo a 94°C por 2 min; 30 ciclos de desnaturalización (94° por 1 min), hibridación (50° C por 2.5 min) y extensión (72°C por 2.5 min); y un ciclo a 72°C por 7 min.

**Tabla II.** Oligonucleótidos usados para amplificar y caracterizar el gen de TbZ5

Oligonucleótidos	Secuencia
<b>TbZ5-C-PTP-ApaI-5'</b>	GGG CCC CTC CTC CCA CTG AGT TTG TC
<b>TbZ5-C-PTP-NotI-3'-GC</b>	GCG GCC GCG CGC AGG GTG CCA ATA TA
<b>TbZ5-RNAi-5'</b>	AGG ATC CAA GCT TCG CTG TCC GTA CTG CTG TTA
<b>TbZ5-RNAI-3'</b>	ACT CGA GTA GCA CCT TAG ATG CCG CTT
<b>Maf1BamHi-5'</b>	AGG TCC AGC TTG GAG GCT TTC CAT GTC GTT
<b>TEV 3'</b>	GCT CAC CCT GAA AAT ACA AAT TCT C

#### **4.5 Electroforesis en geles de agarosa**

El DNA de los diversos experimentos fue analizado en geles de agarosa (Agarose D-1 low EEO PRONADISA) preparados en su mayoría a una concentración de 0.8% con buffer TBE 1X pH 8.3 (Tris base 89 mM; ácido bórico 89 mM; EDTA 2mM) y además con 0.1 µg/ml de bromuro de etidio, el cual es un agente intercalante que emite una intensa fluorescencia bajo luz ultravioleta, lo cual permite visualizar el DNA. Los geles de agarosa se dejaron polimerizar entre 20-30 min y se corrieron dentro de una cámara de electroforesis, inmersos en buffer TBE 1X. El voltaje empleado generalmente fue de 100 volts, sin embargo, en algunas muestras se empleó uno menor, durante un tiempo variable. Las muestras de DNA fueron previamente resuspendidas en buffer de carga 1X (azul de bromofenol 0.25%; xilen-cianol 0.25%; glicerol 30%) y corridas a la par con un marcador de peso molecular (Invitrogen 1 Kb DNA ladder). Las imágenes se tomaron con el dispositivo FUJI FILM FLA-500.

#### **4.6 Digestiones con enzimas de restricción**

Las diferentes reacciones con enzimas de restricción se llevaron a cabo con el buffer de reacción especificado por el fabricante (New England BioLabs) a una concentración final de 1X. Algunas enzimas utilizadas requerían BSA a una concentración final de 1X. Los diversos análisis de restricción para caracterizar la identidad de alguna clona obtenida o para la obtención de fragmentos específicos se realizaron en un volumen 40 µl digiriendo aproximadamente 1 µg de DNA. La cantidad de enzima empleada en cada caso variaba y la temperatura de acción de la mayoría de ellas era de 37°C, en algunos casos se utilizaron enzimas que requerían de una mayor temperatura.

#### **4.7 Purificación de DNA a partir de geles de agarosa.**

Se utilizó el kit NucleoSpin Gel and PCR Clean-up (Macherey Nagel). Para purificar insertos o vectores se corrió la totalidad de la muestra de DNA en un gel de agarosa, posteriormente se visualizó la banda de interés en el transiluminador y se cortó cuidadosamente tomando la mínima cantidad de gel posible. El fragmento obtenido se colocó en tubos Eppendorf de 1.5 ml, y se pesaron para adicionarle 200 µl de buffer NT por cada 100 mg de agarosa; se incubó a 50°C

durante 10 min invirtiendo el tubo para disolver y homogeneizar la muestra durante el tiempo de incubación. Una vez que la agarosa se disolvió totalmente las muestras se colocaron en una columna incluida en el kit que tiene una membrana que permite la retención de moléculas de DNA, ésta se colocó dentro del tubo colector y se centrifugó a  $1,000 \times g$  durante 30 seg eliminando el excedente encontrado en el tubo. Después se adicionaron 700  $\mu\text{l}$  del buffer NT3 para lavar la membrana de silica, se centrifugó a  $11,000 \times g$  durante 30 seg y se eliminó el exceso de sustancia del tubo colector. Para secar la membrana se volvió a centrifugar a  $11,000 \times g$  durante 1 min, después se obtuvo el DNA de las columnas agregando 30  $\mu\text{l}$  de buffer NE incubando 1 min a temperatura ambiente y posteriormente se centrifugó a  $11,000 \times g$  durante 1 min.

#### **4.8 Ligaciones de DNA**

Las secuencias de DNA se unen covalentemente mediante el uso de la enzima DNA Ligasa del fago T4 (Promega). Para la mezcla de reacción se agregó 1 unidad de la enzima T4 DNA ligasa, la secuencia blanco, el vector al que se requiere ligar, y regulador de reacción 2x, el cual fue proporcionado por el fabricante. Para que la reacción tuviera una eficiencia adecuada, se dejó incubando 12 h a  $4^\circ\text{C}$ .

#### **4.9 Transformaciones de células competentes**

Se transformaron células competentes de *Escherichia coli* cepa JM109 de alta eficiencia con la reacción de ligación. Las bacterias se incubaron a  $4^\circ\text{C}$  por 20 min con 5  $\mu\text{l}$  de la ligación generada y posteriormente se les dio un choque térmico de  $42^\circ\text{C}$  por 45 seg, y se añadió medio SOC (triptona 2%, extracto de levadura 0.5%, NaCl 1 mM,  $\text{MgCl}_2$  1 mM y glucosa 2 mM) a un volumen final de 1 ml. Las células se incubaron por 1 h a  $37^\circ\text{C}$  a 200rpm. Transcurrido ese tiempo, se sembraron en placas de medio LB agar con ampicilina (triptona 1%, extracto de levadura 0.5%, NaCl 0.5 mM, agar 1.5%, ampicilina 0.1 mg/ml, X-Gal 50 mg/ml, IPTG 100 mM) y se incubaron a  $37^\circ\text{C}$  por 18 h.

Para el caso de la transformación usando células electrocompetentes DH5 $\alpha$  (Invitrogen) se realizó una electroporación, es decir, provocar un aumento en la conductividad eléctrica para cambiar la permeabilidad de la membrana e introducir el plásmido. El proceso consiste en colocar las células electrocompetentes en contacto con la ligación que se desea integrar en una cubeta especial para electroporación (de plástico y con electrodos), la cual previamente se enfrió en hielo. Se colocó la cubeta en el electroporador marca BTX Electro Square Porator ECM 830 y se seleccionó el voltaje

2,000 V, 200  $\Omega$  y 25  $\mu$ F para el pulso eléctrico. Después la mezcla obtenida de la electroporación se plaqueó en cajas con medio LB agar/ampicilina (0.1 mg/ml).

#### **4.10 Minipreparación de plásmidos**

Para las minipreparaciones de plásmidos mediante lisis alcalina se usaron cultivos de *E. coli* en 5 ml de LB transformados con el plásmido de interés que fueron incubados por 12 h a 37°C. Cada cultivo se centrifugó a velocidad máxima, durante 60 seg a 4°C y posteriormente se retiró el sobrenadante. La pastilla bacteriana se resuspendió en 100  $\mu$ l de Solución I (glucosa 50 mM; Tris-Cl 25 mM pH 8.0; EDTA 10 mM pH 8.0). Se adicionaron 200  $\mu$ l de Solución II preparada al momento (NaOH 0.2N; SDS 1%), se mezcló rápidamente invirtiendo 5 veces y se mantuvo en hielo. Se adicionaron 150  $\mu$ l de Solución III fría (60 ml de acetato de sodio 3M pH 4.8; 11.5 ml de ácido acético glacial; 28.5 ml de H<sub>2</sub>O) se mezcló invirtiendo varias veces, y se mantuvo en hielo 3-5 min. Se centrifugó a velocidad máxima por 5 min a 4°C y se pasó el sobrenadante a un tubo para microcentrífuga de 1.5 ml. Se agregó un volumen de fenol: cloroformo (1:1), se mezcló mediante vórtex y se centrifugó a velocidad máxima 5 min a 4°C; posteriormente se pasó la fase líquida en un tubo nuevo. Se precipitó el DNA con dos volúmenes de etanol absoluto, se mezcló por vortex y se incubó en hielo por 2 min. Se centrifugó a velocidad máxima 5 min a 4°C y se retiró el sobrenadante. Se realizó un lavado con 1 ml de etanol al 70%, se dejó secar la pastilla, se resuspendió en 50  $\mu$ l de amortiguador TE con RNAsa A (20  $\mu$ g/  $\mu$ l) y se incubó a 37°C por una hr. Cuando fue necesario enviar a secuenciar un plásmido, éste fue preparado mediante el uso de un kit comercial de purificación NucleoSpin Plasmid (Macherey Nagel), siguiendo las instrucciones y recomendaciones especificadas por el fabricante.

#### **4.11 Midipreparaciones de plásmidos**

Los plásmidos que se emplearon para realizar la transfección de los parásitos de *T. brucei* fueron preparados con el kit comercial QIAfilter Plasmid Midi Kit (QIAGEN), siguiéndose las instrucciones y recomendaciones señaladas por el fabricante.

#### **4.12 Cultivo y transfección de *T. brucei***

Para la realización de este trabajo se utilizaron parásitos procíclicos de *T. brucei* cepa 29-13 (Wirtz *et al.*, 1997). El parásito se creció en medio SDM-79 (Carruthers *et al.*, 1992) suplementado con suero fetal bovino al 10% con higromicina (50 µg/ml) y neomicina (15 µg/ml) a una temperatura de 27°C. Se realizó una midipreparación de pTbZ5-PTP para obtener una cantidad suficiente para transfectar dicha construcción en los parásitos. Para la transfección con pTbZ5-PTP, el DNA plasmídico obtenido se linearizó mediante digestión con la enzima HpaI, se corrió un gel de agarosa al 0.8% y se purificó para obtener el fragmento.  $1 \times 10^8$  células en fase media logarítmica fueron centrifugadas a 4,500 rpm por 5 min a 4°C y resuspendidas en 500 µl de buffer Cytomix (HEPES 25 mM pH 7.6, KCl 120 mM, 15 CaCl<sub>2</sub>, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 10 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 10 mM pH 7.6, EDTA 2 mM, MgCl<sub>2</sub> 5 mM). Después se incubaron a 4°C por 10 min con 10 µg de DNA plasmídico linearizado y posteriormente fueron electroporadas con un pulso de 1500 V, 500 Ω y 50 µF por 100 µs en un electroporador marca BTX Electro Square Porator ECM 830. 24 h después de la electroporación los parásitos transfectados fueron seleccionados con el antibiótico blastidina a una concentración final de 10 µg/ml (Nguyen *et al.*, 2007). Se transfirieron a cajas de cultivo de 25 cm<sup>3</sup> con 5 ml de medio SDM-79 suplementado con suero fetal bovino al 10%, las cuales estuvieron en constante monitoreo esperando que la población celular se recupera.

#### **4.13 Análisis de la población transfectada con pTbZ5-PTP**

La población celular estable obtenida se analizó mediante PCR empleando DNA genómico extraído de la misma, usando los oligonucleótidos TbZ5-RNAi-5' el cual se une a una región intragénica en el gen de TbZ5 y TEV 3' que se une a la región de corte de la proteasa TEV que forma parte del PTP. Una vez obtenido el amplificado del tamaño esperado, se realizó un ensayo de western blot de la población celular para confirmar la expresión de la proteína recombinante, utilizando el anticuerpo anti-prot A.

#### 4.14 Clonación por dilución limitante

La clonación celular de los cultivos transfectados se realizó haciendo diluciones seriadas de un inóculo inicial extraído de la población celular con una densidad de aproximadamente  $2.3 \times 10^7$  células/ml. Se colocaron 10 ml de medio SDM-79 con blasticidina ( $10 \mu\text{g/ml}$ ) en una caja Petri para poder tomar más fácilmente el medio con la micropipeta multicanal. En una placa de 96 pozos, la cual está organizada mediante coordenadas de letras y números (Figura 10) se colocaron  $100 \mu\text{l}$  de medio en todos los pozos de la caja excepto el pozo inicial (A1) con ayuda de una micropipeta multicanal. En el pozo vacío (A1) se agregaron  $200 \mu\text{l}$  de la dilución final obtenida del inóculo inicial (aproximadamente 1,000 células), luego con una micropipeta se transfirieron  $100 \mu\text{l}$  del primer pozo al segundo pozo de la misma columna (B1), mezclando ligeramente evitando las burbujas, hasta llegar al pozo H1 que finalmente queda con un volumen de  $200 \mu\text{l}$ . Posteriormente se agregaron  $100 \mu\text{l}$  de medio en cada pozo de la columna 1, excepto al último. Utilizando la micropipeta multicanal, se transfirió rápidamente  $100 \mu\text{l}$  de los pozos de la primera columna a la segunda columna y así a través de las 12 columnas. Al final, los pozos de la última columna tienen un volumen de  $200 \mu\text{l}$ , por lo que a todos los pozos restantes se les añadieron  $100 \mu\text{l}$  de medio. Se incubó la placa a  $27^\circ\text{C}$  en una incubadora con  $\text{CO}_2$  al 5%. Las células que se recuperaron en los pozos que contenían los cultivos más diluidos fueron seleccionadas. Dichas clonas se transfirieron a cajas de 24 pozos para monitorear su crecimiento.

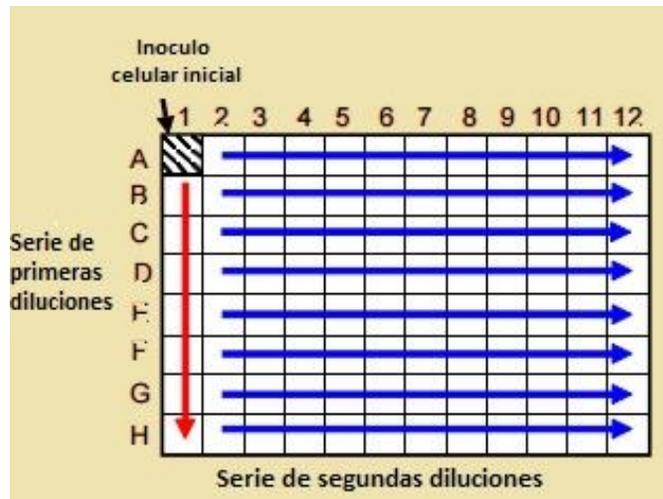


Figura 10. Diagrama de una placa de 96 pozos, indicando la dirección de las diluciones celulares (modificado de Corning, 2008).

#### 4.15 Ensayo tipo western blot

La expresión de la proteína recombinante TbZ5-PTP se confirmó mediante un análisis por medio de western blot; para esto, se extrajeron muestras proteicas de la población y de las clonas celulares. Dichas proteínas fueron fraccionadas por electroforesis en gel de poliacrilamida con duodecil sulfato sódico (SDS-PAGE); después las proteínas fueron transferidas a una membrana de PVDF de 0.2  $\mu\text{m}$  (BIO-RAD). Los anticuerpos utilizados fueron el anti-rabbit ProtA (Sigma), el cual reconoce el epítotope de ProtA del PTP-tag y el anti-rabbit Protein C-tag (Delta biolabs) que reconoce el epítotope de protC del PTP-tag. Se empleó un gel separador de poliacrilamida al 10% y un gel concentrador al 4%. Las muestras de proteína se obtuvieron por la lisis de parásitos en fase logarítmica ( $10 \times 10^6$ ) y se resuspendieron en buffer Laemmli 2.5X (Tris-HCl 83 mM pH 6.8; SDS 118 mM; azul de bromofenol 99.5  $\mu\text{M}$ ; glicerol 33.3%); paralelamente se cargó marcador de peso molecular (BlueStar PLUS Prestained Protein ladder). Para realizar el fraccionamiento de la muestra se empleó buffer de corrida 1 $\times$  (Tris base 24.76 mM; Glicina 191.82 mM; SDS 3.54 mM), el voltaje empleado fue de 80 V con 15 mA constantes por aproximadamente 120-150 m. La transferencia de las proteínas a la membrana de PVDF se realizó empleando buffer de transferencia 5 $\times$  (Tris base 25mM; glicina 191.82 mM; metanol 20%) con pH 8.3. Las condiciones de la transferencia fueron: 90 V, 500 mA, durante 2 h. Después de la transferencia las membranas se dejaron bloqueando con una solución de PBS 1 $\times$  (NaCl 137 mM; KCl 2.7 mM;  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  10 mM;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1.8 mM) y leche descremada al 5% por una hr. Inmediatamente después se efectuaron lavados con PBS 1 $\times$  y Tween 20 al 0.05%, terminando dichos lavados se colocó el anticuerpo primario anti-rabbit ProtA en una dilución 1:3,000 en una solución de PBS 1 $\times$  y leche al 2% toda la noche y en agitación constante. Realizado esto, se hicieron lavados como se describió anteriormente y se añadió el anticuerpo secundario acoplado a HRP (Sigma) en una dilución 1:7,500 en una solución de PBS 1 $\times$  y leche al 2% por 1 h. Se empleó el sistema ECL *Western Blotting Detection Reagents* (GE Healthcare) para el revelado.

#### **4.16 Ensayos de inmunofluorescencia indirecta**

La ubicación intracelular de TbZ5 se realizó utilizando clonas celulares que expresan de manera estable la proteína recombinante pTbZ5-PTP. Se utilizaron  $1.5 \times 10^6$  parásitos en cada muestra para analizar. Dichas células se fijaron en portaobjetos previamente tratados con Poly-L-lisina con PBS-Paraformaldehído 4%, por 30 min. Después las células se permeabilizaron con Tritón X-100 al 0.05% por 2 min y se bloquearon con PBS-BSA 2%-*Cold Water Fish Skin Gelatin* (Sigma) 1% por 1 h, después se incubó por 1 h con el anticuerpo anti-rabbit Protein C-tag (Delta biolabs) a una dilución 1:20. Posteriormente se lavaron las laminillas seis veces por 5 min con PBS-Tween 20 al 0.05% y se incubaron con el anticuerpo anti-rabbit Alexa Fluor 488 (Life Technologies) diluido 1:400 por una hr en oscuridad. En seguida se realizaron seis lavados con las condiciones anteriormente mencionadas. Las laminillas se montaron con Vectashield +DAPI y se observaron en microscopio de fluorescencia Axio Vert.A1 (Zeiss) en la Unidad de Biomedicina de la FES Iztacala, UNAM. Algunas de las laminillas se analizaron además por medio de microscopía confocal en el dispositivo Leica TCS, el cual se encuentra en el Laboratorio Central de Servicios Experimentales en CINVESTAV, Unidad Zacatenco.

## 5. RESULTADOS

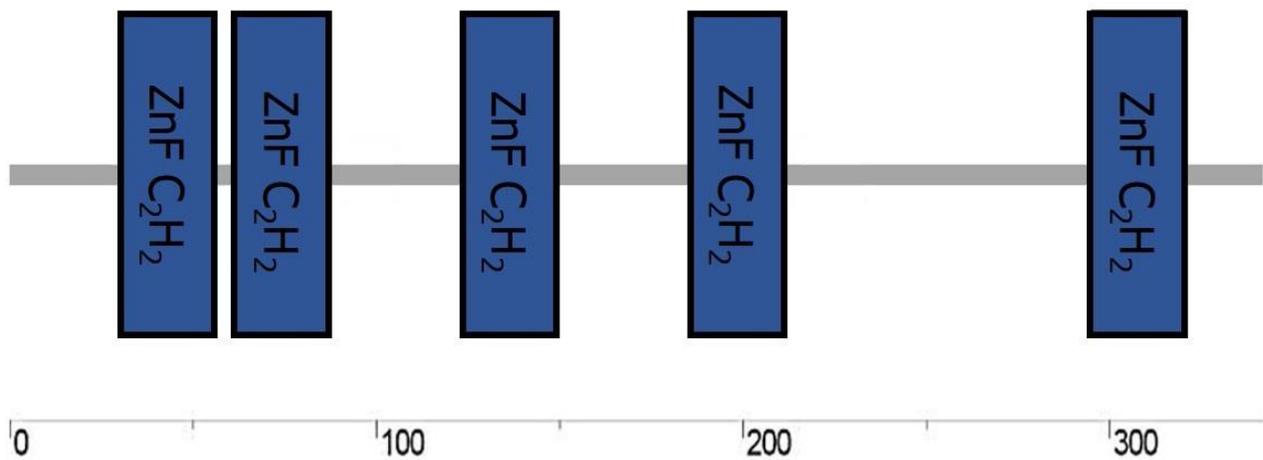
### 5.1 Análisis *in silico* de la secuencia de aminoácidos de TbZ5 en *T. brucei*

El factor de transcripción TFIIIA, caracterizado por la presencia de múltiples dedos de zinc del tipo C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>, no ha sido identificado en tripanosomátidos. Así, con la finalidad de detectar al probable ortólogo de TFIIIA en *T. brucei*, se llevó a cabo una búsqueda en la base de datos del genoma del parásito (tritrypDB) de las proteínas que presentaran el mayor número de dedos de zinc. La proteína Tb927.6.1680 fue la que presentó el número más alto de dedos de zinc, con un total de ocho (ver tabla III). Sin embargo, dicha proteína fue descartada por el hecho de que se reportó que se localiza en la mitocondria (Acestor *et al.*, 2009). La siguiente proteína con el número más elevado de dedos de zinc, con un total de cinco, fue Tb927.9.2780, a la cual denominamos TbZ5. El gen de TbZ5 tiene un tamaño de 1,029 pb y codifica para una proteína predicha de 38 KDa. Se decidió continuar con la caracterización de TbZ5.

**Tabla III.** Proteínas con un mayor número de motivos de zinc C<sub>2</sub>H<sub>2</sub> en *T. brucei*

Proteína	Número de dedos de zinc C <sub>2</sub> H <sub>2</sub>
Tb927.6.1680	8
<b>Tb927.9.2780 (TbZ5)</b>	<b>5</b>
Tb927.11.8330	4
Tb927.6.3540	4

Para confirmar la presencia y posición de los 5 dedos de zinc, se analizó la secuencia de aminoácidos de TbZ5 con los programas Pfam, Superfamily y SMART 7 (Laity *et al.*, 2001). Como se observa en la Figura 11, los programas confirmaron la presencia de cinco dedos de zinc en TbZ5, los cuales se encuentran distribuidos a todo lo largo de la proteína. Cabe señalar que mientras los dos primeros dedos de zinc se encuentran muy cercanos entre sí (separados por sólo 28 aa), los dos últimos están separados por una distancia relativamente grande (86 aa).



**Figura 11. Esquema de los dominios de dedos de zinc C<sub>2</sub>H<sub>2</sub> encontrados en TbZ5.** De color azul se indican los cinco motivos de zinc detectados; la barra inferior señala el tamaño de la proteína en aminoácidos.

La estructura que poseen los dedos de zinc de TFIIIA tiene una conformación muy particular. En *X. laevis*, el primer organismo donde se caracterizó la proteína TFIIIA, se encontró un patrón conservado en cada uno de los nueve motivos de zinc. La secuencia consenso tiene la forma F/I/Y-X-C-X<sub>2,4</sub>-C-X<sub>3</sub>-F-X-K-X<sub>2,3</sub>-L-X<sub>2</sub>-H-X<sub>3,5</sub>-H, donde X representa un aminoácido cualquiera (Layat *et al.*, 2013).

Para determinar si los dedos de zinc de TbZ5 están conservados en relación a los de *X. laevis* y otros organismos (*Schizosaccharomyces pombe*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Arabidopsis thaliana*, *Homo sapiens*) se realizó un alineamiento de cada uno de los dedos de zinc identificados en TbZ5. Analizando con detenimiento los diversos dedos de zinc de TbZ5 se pudo observar que, aunque la secuencia es altamente conservada, no se cumple rigurosamente la secuencia consenso en todos los casos (Figura 12).

De manera interesante, el mismo resultado se obtuvo al analizar la secuencia de los dedos de zinc de TFIIIA de todas las especies analizadas, incluida *X. laevis* (Figura 12). Individualmente los dedos de zinc contienen aproximadamente de 20 a 30 aminoácidos (Pabo *et al.*, 2001). Examinando cada dominio en todos los organismos analizados se puede ver que la mayoría oscila en un rango entre 20-29 aminoácidos, lo cual concuerda con lo especificado. Cabe mencionar que en la mayoría de las especies TFIIIA contiene nueve dedos de zinc, siendo el ortólogo de *S. pombe* la única excepción hasta ahora conocida, pues posee diez dedos de zinc. Aunque la secuencia de los dedos de zinc individuales pueda presentar variaciones, se ha reportado que su estructura secundaria es muy conservada.

*Trypanosoma brucei* TbZ5

ZnF1 MRCPYC--CYTTRRSPDSSGGT<sup>H</sup>FRRHLLT<sup>H</sup><sub>29</sub>  
 ZnF2 YKCYV--CLVGF<sup>H</sup>TNTNMRH<sup>H</sup>IRTL<sup>H</sup>----<sub>H24</sub>  
 ZnF3 INCRF--CNVGF<sup>H</sup>SCKGKR<sup>H</sup>TRHER<sup>H</sup>----<sub>H22</sub>  
 ZnF4 FVCPN--CEQELADRRQ<sup>L</sup>LKRHLR<sup>H</sup>----<sub>C22</sub>  
 ZnF5 FTCPYDDCMAT<sup>F</sup>ELSRQRW<sup>L</sup>LKHVARR<sup>H</sup>----<sub>H26</sub>  
 Consenso F I Y X C X X X X C X X X F X X X X L X X H X X X X X H

*Xenopus laevis* TFIIIA

ZnF1 Y I C S F A D C G A A Y N K N W K L Q A H L C K --<sub>H25</sub>  
 ZnF2 F P C K E E G C E K G F T S L H H L T R H S L T --<sub>H25</sub>  
 ZnF3 F T C D S D G C D L R F T K A N M K K H F N R F --<sub>H26</sub>  
 ZnF4 Y V C H F E N G C K A F K K H N Q L K V H Q F S --<sub>H25</sub>  
 ZnF5 Y E C P H E G C D K R F S L P S R L K R H E K V --<sub>H25</sub>  
 ZnF6 Y P C K K D D S C S F V G K T W T L Y L K H V A E C H --<sub>H27</sub>  
 ZnF7 A V C D V -- C N R K F R H K D Y L R D H Q K T --<sub>H29</sub>  
 ZnF8 Y L C P R D G C D R S Y T T A F N L R S H I Q S F --<sub>H29</sub>  
 ZnF9 F V C E H A G C G K C F A M K K S L E R H S V V --<sub>H25</sub>  
 Consenso F I Y X C X X X X C X X X F X X X X L X X H X X X X X H

*Saccharomyces cerevisiae* TFIIIA

ZnF1 Y F C D Y D G C D K A F T R P S I L T E H Q L S V --<sub>H26</sub>  
 ZnF2 F Q C D K -- C A K S F V K K S H L E R H L Y T --<sub>H23</sub>  
 ZnF3 F Q C S Y -- C G K V T T R Q Q L K R H E V T --<sub>H23</sub>  
 ZnF4 F I C P E E G C N L R F Y K H P Q L R A H I L S V --<sub>H26</sub>  
 ZnF5 L T C P H -- C N K S F Q R P Y R L R N H I S K --<sub>H23</sub>  
 ZnF6 Y Q C T F A G C C K E F R I W S Q L Q S H I K N D --<sub>H26</sub>  
 ZnF7 L K C P I -- C S K P C V G E N G L Q M H M I I --<sub>H23</sub>  
 ZnF8 W K C H I -- C P D M S F S R K H D L L T H Y G S I H --<sub>H25</sub>  
 ZnF9 Y R C F Y N N C S R T E K T K E Y E K H I D K --<sub>H25</sub>  
 Consenso F I Y X C X X X X C X X X F X X X X L X X H X X X X X H

*Homo sapiens* TFIIIA

ZnF1 F I C S F P D C S A N Y S K A W K L D A H L C K --<sub>H25</sub>  
 ZnF2 F V C D Y E G C G K A F I R D Y H L S R H I L T --<sub>H25</sub>  
 ZnF3 F V C A A N G C D Q K E N T K S N L K K H F E R K --<sub>H26</sub>  
 ZnF4 Y I C S F E D C K K T F K K H Q Q L K I H Q C Q --<sub>H25</sub>  
 ZnF5 F K C T Q E G C G K H E A S P S K L K R H A K A --<sub>H25</sub>  
 ZnF6 Y V C Q K G -- C S F V A K T W T E L L K H V R E T --<sub>H25</sub>  
 ZnF7 I L C E V -- C R K T F K R K D Y L Q H M K T --<sub>H23</sub>  
 ZnF8 C R C P R E G C G R T Y T V F N L Q S H I L S F --<sub>H26</sub>  
 ZnF9 F V C E H A G C G K T F A M K Q S L T R H A V V --<sub>H25</sub>  
 Consenso F I Y X C X X X X C X X X F X X X X L X X H X X X X X H

*Schizosaccharomyces pombe* TFIIIA

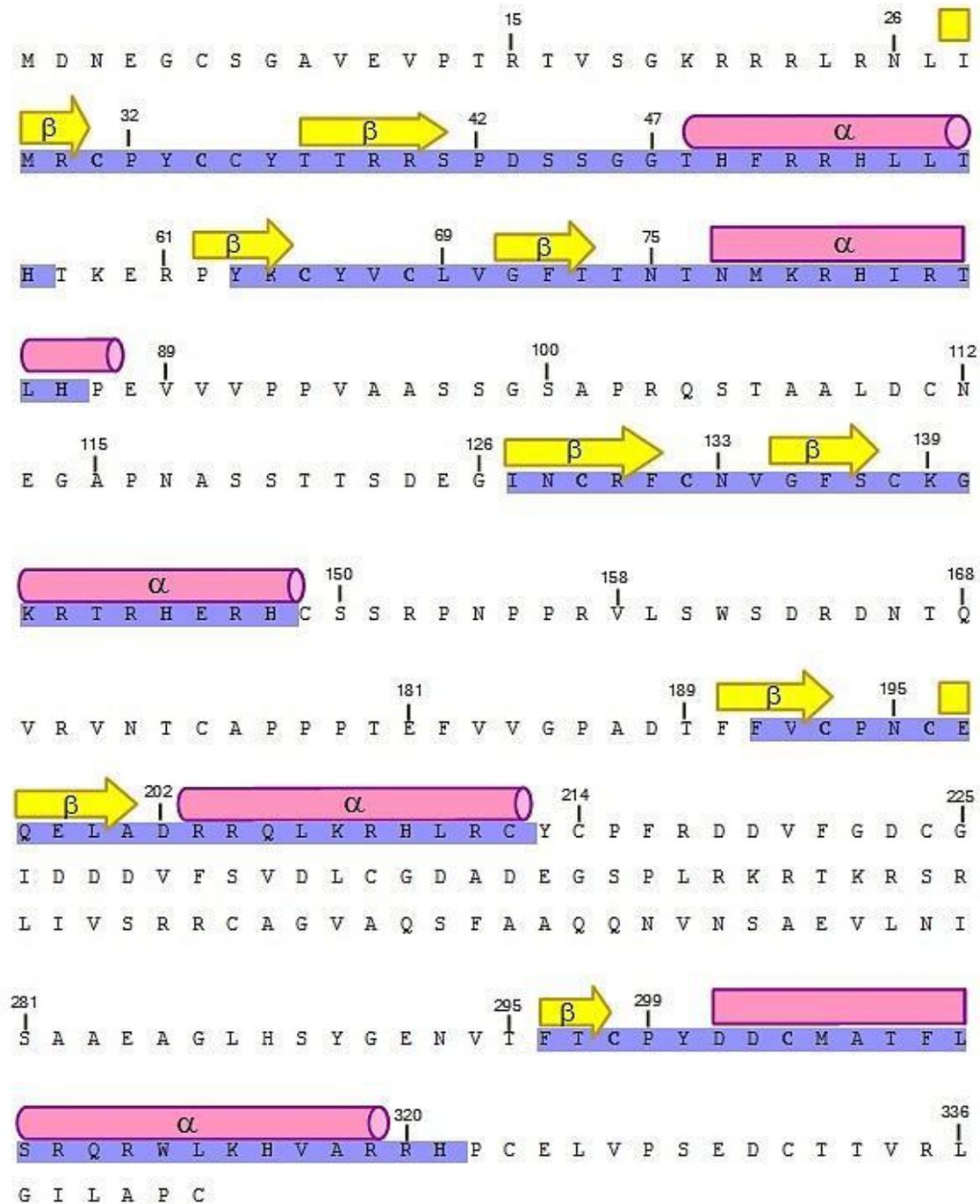
ZnF1 F H C P Y E E C G K K Y S R P S L E Q H L R T --<sub>H25</sub>  
 ZnF2 F V C D Y T G C S K A F Y R K S H L K I H K R C --<sub>H25</sub>  
 ZnF3 F S C H Y D G C D A Q Y F Y T Q Q H L E R H I E V --<sub>H25</sub>  
 ZnF4 Y A C T W E G C D E C F S K H Q Q L R S H I S A C --<sub>H26</sub>  
 ZnF5 Y P C T Y Q D C E L R F A T K Q K L Q N H V N R A --<sub>H26</sub>  
 ZnF6 Y S C P H E S C V G H E G F E K W S Q L Q N H I R E A H --<sub>H28</sub>  
 ZnF7 P S C S I -- C G R Q F K T A A H L R H H V V L --<sub>H23</sub>  
 ZnF8 Y H C P M E G C K K S F T R S S A L K K H I S V I --<sub>H26</sub>  
 ZnF9 F H C D S -- C G T K F G Y K H M L Q R H L E R G T C K K A H --<sub>H29</sub>  
 ZnF10 Y S C S F P E C N Y R F K R L Y D M H R H L N S H --<sub>H26</sub>  
 Consenso F I Y X C X X X X C X X X F X X X X L X X H X X X X X H

*Arabidopsis thaliana* TFIIIA

ZnF1 F T C Y V D D C A A S -- Y R R K D H L N R H L L T --<sub>H25</sub>  
 ZnF2 F K C P K E N C K S E -- F S V Q G N V G R H V K K Y --<sub>H26</sub>  
 ZnF3 V V C K E I G C G K A -- F K Y P S Q L Q K H Q D S --<sub>H25</sub>  
 ZnF4 A F C S E P G C M K Y -- F T N E E C L K S H --<sub>H21</sub>  
 ZnF5 R S C H Q H I N C E I C G S K H L K K N I K R H L R T H --<sub>H28</sub>  
 ZnF6 I K C E V E G C S S T -- F S K A S N L Q K H M K A V --<sub>H26</sub>  
 ZnF7 F V C G F P G C G M R -- F A Y K H V R N K H E N S G Y H --<sub>H27</sub>  
 ZnF8 W K C H I -- C P D M -- S F S R K H D L L T H Y G S I H --<sub>H25</sub>  
 ZnF9 F K C P K E N C K S E -- F S V Q G N V G R H V K K Y --<sub>H26</sub>  
 Consenso F I Y X C X X X X C X X X F X X X X L X X H X X X X X H

Figura 12. Comparación de los dominios de dedos de zinc C2H2 encontrados en TbZ5 y en TFIIIA de diferentes organismos (*X. laevis*, *S. pombe*, *S. cerevisiae*, *A. thaliana*, *H. sapiens*) con la secuencia conservada reportada. De color negro se muestran los aminoácidos específicos altamente conservados. De color gris se muestran los aminoácidos no conservados. Las cisteínas se señalan de color amarillo, mientras que las histidinas se muestran de color azul. Al final de la secuencia se indica el tamaño de cada dedo de zinc.

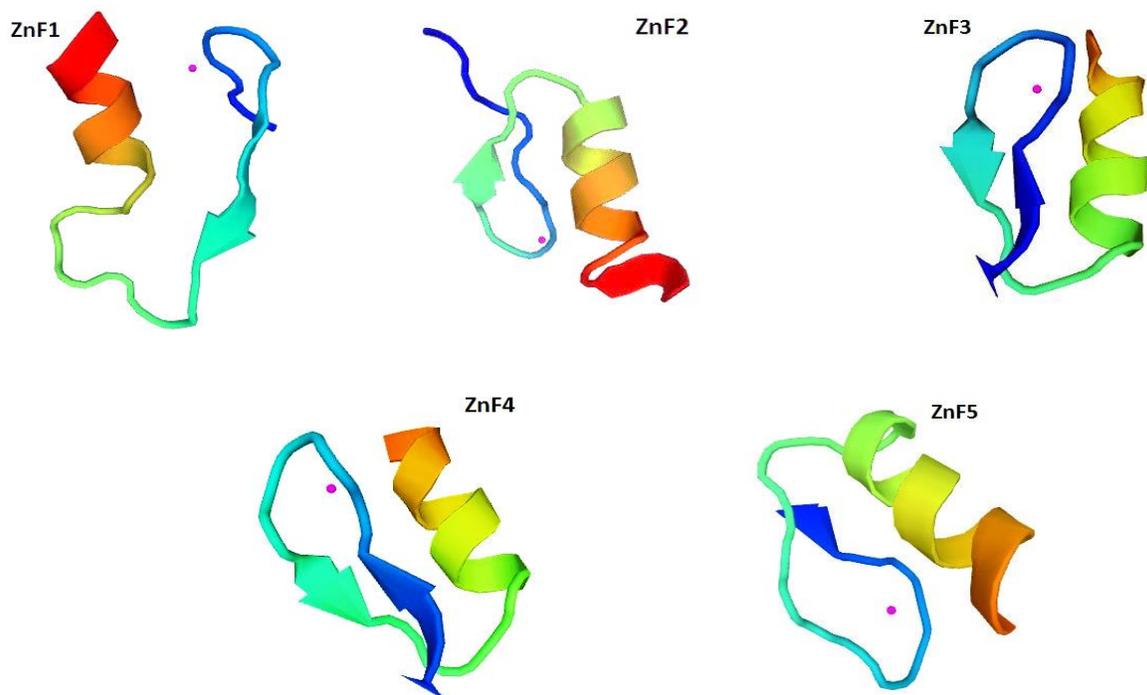
Para determinar si las características estructurales de los dedos de TbZ5 están conservadas se obtuvieron sus probables estructuras secundaria y terciaria con los programas SWISS-MODEL (Biasini *et al.*, 2014), Phyre2 (Kelley *et al.*, 2015) y Psipred (Kosciolek & Jones, 2014). La estructura clásica de una proteína de dedo de zinc  $C_2H_2$  conserva la forma de dos láminas  $\beta$  plegadas antiparalelas seguidas de una  $\alpha$  hélice, elementos que se encuentran coordinados por la acción de un ion de zinc (Lee *et al.*, 2006). TFIIIA de *X. laevis* conserva dichos dominios en cada uno de sus nueve dedos de zinc. Para conocer si TbZ5 posee la estructura tradicional se determinó primeramente la estructura secundaria. La conformación que tiene la secuencia de TbZ5 en general concuerda con la forma  $\beta\beta\alpha$ , pues como se muestra en la figura 13, cada uno de los dedos de zinc cuenta con dos estructuras  $\beta$  plegadas y una  $\alpha$  hélice predichas. La única excepción fue el último dedo de zinc, el cual sólo cuenta con una de las dos estructuras  $\beta$  plegada.



**Figura 13. Esquema de la estructura secundaria predicha para la secuencia de TbZ5.** Los dedos de zinc encontrados se muestran de color azul. Las flechas de color amarillo representan las láminas  $\beta$  plegadas, mientras que las estructuras en forma de barril de color rosa representan las  $\alpha$  hélices.

A continuación se procedió a la predicción de la estructura terciaria de TbZ5. Para ello se usó un programa de modelado en línea que utiliza una base de datos de proteínas tridimensionales reportadas para realizar un análisis por similitud y con esto diseñar un modelo semejante (Biasini *et al.*, 2014). Al ingresar la secuencia completa de TbZ5 en el programa, no se encontró una proteína que fuera un candidato óptimo para realizar la construcción del modelo, por lo que se decidió analizar cada uno de los dedos de zinc por separado.

Se obtuvieron entonces cinco modelos de los motivos de zinc de TbZ5, observando que la mayoría de ellos se ajusta con la estructura general antes descrita (Figura 14). Sin embargo, con este programa, sólo se detectó una de las dos estructuras  $\beta$  plegadas en los dedos de zinc 1, 2 y 5.



**Figura 14. Modelos de las estructuras tridimensionales predichas para cada dedo de zinc de TbZ5.** Se muestran las láminas  $\beta$  plegadas como flechas coloreadas de azul y verde, mientras que las  $\alpha$  hélices se indican con estructuras tipo resorte de tonalidad que va del rojo al verde claro. El punto color rosa representa el ion de zinc coordinado en cada estructura.

Además de los dedos de zinc, algunas otras secuencias pueden estar conservadas en los ortólogos de TFIIIA. Entre éstas se encuentra el péptido TGEKP, el cual es primordial para el reconocimiento y unión de TFIIIA al promotor del gen del rRNA 5S (Brayer y Segal, 2008; Laity *et al.*, 2000). Se realizó una búsqueda de una secuencia probable dentro de TbZ5, encontrándose una muy parecida entre el primer y el segundo dedo de zinc: TKERP (Figura 15). Dicha secuencia conserva tres de los aminoácidos conocidos y uno de los dos restantes (R/K) posee características bioquímicas similares.

Al ser TFIIIA un factor de transcripción, desarrolla sus funciones primordialmente en el núcleo, por lo que cuenta con una señal de localización nuclear (NLS por sus siglas en inglés) (Rudt y Pieler, 1996). Así, se procedió a analizar la secuencia de TbZ5 en busca de una posible NLS utilizando el programa PSORT II. Dicho programa encontró una probable señal, compuesta por ocho aminoácidos (RKRTKRSR), hacia la región carboxilo de la proteína (Figura 15). El porcentaje de predicción de localización nuclear es de 91.3%, indicando que es factible que la proteína realice alguna función celular en ese organelo.

Aunado a esto, en anfibios y mamíferos se sabe que la proteína contiene una señal de activación de la transcripción (TAS por sus siglas en inglés) en una región libre de dominios de zinc, hacia la región carboxilo terminal. Dicha secuencia conservada tiene un tamaño de 25 residuos, 10 de los cuales pueden sobrelaparse con la NLS, y los otros 15 que contienen un péptido altamente conservado: KRSLASRLS (Ogilvie & Hanas, 1997).

```

MDNEGCSGAVEVPTRTRTVSGKRRRLRNLI MRCPYCCYTTRRSPDSSGGTHFRRHLLTH 57
TKERPYKCYVCLVGF TTNTNMKRHIRTLHPEVVVPPVAASSGSAPRQSTAALDCNEG 114
APNASSTTSDEG INCRFCNVGFSCGKRTRHERH CSSRPNP PRVLSWSDRDNTQVRV 171
NTCAPPTEFVVG PADTF FVCPNCEQELADRRQLKRHLRCYCPFRDDVFGDCGIDDD 228
VFSVDLCGDADEGSPL RKRTKRSRLIVSRRCAGVAQSF AAQQNVNSAEVLNISAAEA 285
GLHSYGENVT FTCPYDDCMATFLSRQRWLKHVARRH PCELVPS EDCTTVRLGILAPC 342

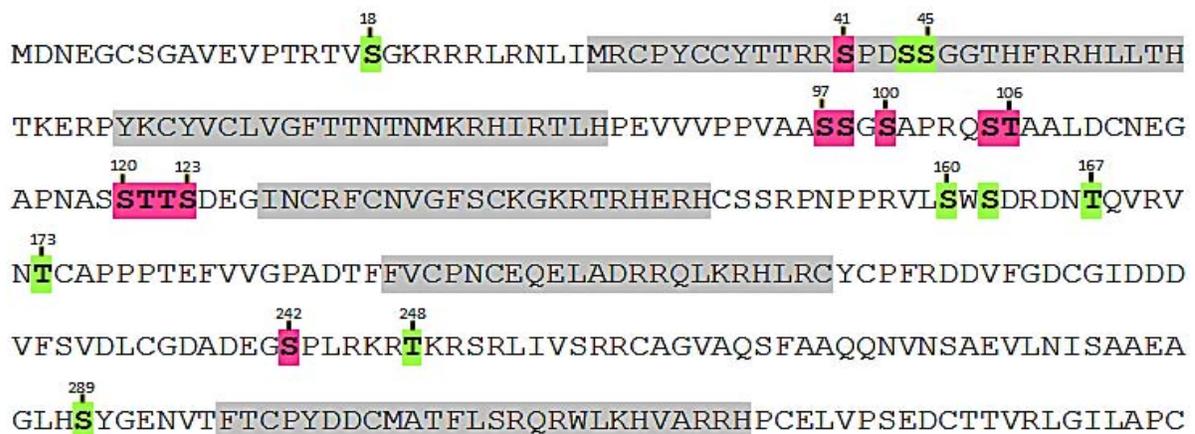
```

**Figura 15. Motivos conservados en la secuencia de TbZ5.** Los dedos de zinc se muestran de color azul. El péptido de unión conservado se observa de color rosa; de verde se indica la señal de localización nuclear predicha. Se subraya la probable secuencia conservada de la señal de activación de la transcripción, que incluye la posible señal de localización nuclear.

En TbZ5 se encontró una posible TAS (KRSRLIVSR) (Figura 15), cuyos tres primeros aminoácidos son iguales al péptido consenso; los siguientes tres aminoácidos son semiconservados (debido a que los aminoácidos que lo conforman poseen características bioquímicas similares) y los últimos tres difieren totalmente. De esta manera, sería arriesgado decir que la secuencia TAS está presente en TbZ5. Trabajo futuro permitirá determinar si esta secuencia es importante para la función de TbZ5.

Un aspecto importante en la regulación génica de los factores de transcripción es la fosforilación (Withmarsh & Davis, 2000). Dicho proceso lo llevan a cabo proteínas cinasas en los residuos de serina, treonina y tirosina (Ghose *et al.*, 2004). Para identificar potenciales aminoácidos fosforilados en TbZ5 se usaron los programas NetPhos y PhosTryp. El primero predice los sitios de fosforilación en proteínas de eucariontes en general (Bloom *et al.*, 2004), mientras que el segundo busca residuos fosforilables en proteínas de forma específica para tripanosomátidos (Palmeri *et al.*, 2011).

En total fueron predichos 20 residuos fosforilables en TbZ5 con una posibilidad mayor al 85% de que ocurran *in vivo* (Figura 14). De éstos, 11 fueron identificados por ambos programas y los nueve restantes sólo los identificó el programa NetPhos. De los 11 residuos encontrados con los dos programas, ocho corresponden a serinas y tres a treoninas. Por otro lado, de los nueve aminoácidos detectados sólo con NetPhos, seis corresponden a serinas (con un porcentaje arriba del 97%) y tres a treoninas (con un valor arriba del 85%).



**Figura 16. Sitios de fosforilación predichos en la secuencia de TbZ5.** Los aminoácidos obtenidos en ambos programas se encuentran marcados de color rosa. Los residuos encontrados sólo por NetPhos se indican de color verde. El número sobre los aminoácidos identificados indica su posición. Los dedos de zinc se muestran de color gris.

## 5.2 Generación de construcción pTbZ5-PTP

Después de realizar el análisis *in silico* de la secuencia de aminoácidos de TbZ5, se procedió a obtener la construcción pTbZ5-PTP, la cual como su nombre lo indica posee una bandera o dominio PTP. Esta bandera se ha utilizado para la técnica de purificación por afinidad en tándem, y consta de dos dominios de unión a la proteína A de *S. aureus* (Prot A) y un epítotope de la proteína C (Prot C) separados por un sitio de corte para TEV proteasa (Puig *et al.*, 2001; Schimanski *et al.* 2005). Para realizar la construcción PTP, una parte del gen de TbZ5 fue inicialmente clonada en el vector pGEMT-Easy. Para ello se amplificó por medio de PCR la región C-terminal del gen usando DNA genómico de *T. brucei* con los oligonucleótidos TbZ5-C-PTP-ApaI-5' y TbZ5-C-PTP-NotI-3'-GC (Figura 17), obteniéndose un fragmento con el tamaño esperado de aproximadamente 516 pb (Figura 18, panel A).

**Tb927.9.2780 (TbZ5) 1,029pb**

5'

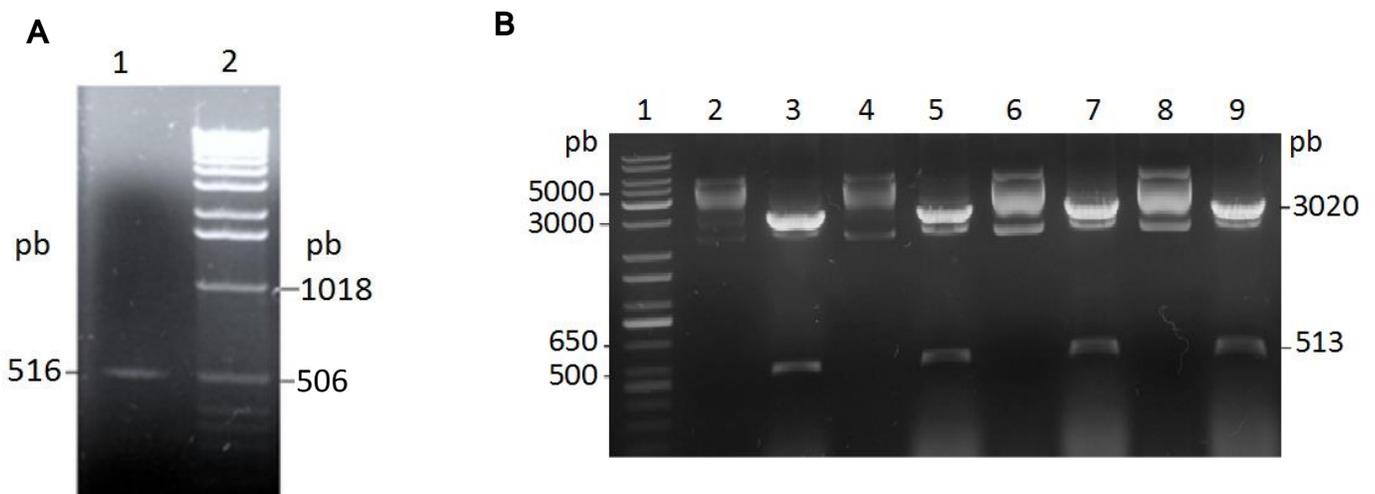
```
ATGGATAACGAAGGCTGCAGCGGTGCAGTGGAGGTTCCCACTCGGACGGTTTTCTGGGAAG60
CGGCGGCGCCTCAGGAACCTTGATTATGCGCTGTCCGTA CTGCTGTACACCACGAGGCGC120
AGCCCGGACAGCAGCGGTGGGACGCATTTCCGCCGACATCTCCTCACTCATAACGAAGGAG180
AGGCCGTACAAGTGCTATGTGTGCTTAGTTGGCTTCACAACCAACACAAACATGAAGAGA240
CATATTCGGACCCTCCATCCTGAGGTAGTAGTGCCACCGGTGGCTGCATCTTCCGGTAGC300
GCTCCTCGGCAGTCAACTGCAGCTTTAGATTGCAATGAAGGGGCACCGAATGCTTCATCC360
ACCACTTCTGATGAGGGAATAAACTGTCGTTTTTTGCAACGTTGGATTTTCTGTAAGGGG420
AAGCGGACCAGGCATGAGCGTCACTGCTCTTCCAGGCCTAACCCACCTCGTGTACTTAGT480
TGGTCCGACCGAGACAACACACAAGTTAGGGTTAACACGTGTGCT CCTCCTCCCACTGAG540
TTTGTCGTTGGTCCCGCTGATACATTTTTTCGTTTGCCTAACTGTGAACAGGAACTTGCC600
GACCGTCTGTCAGTTGAAGCGGCATCTAAGGTGCTATTGTCCATTCGCGGATGATGTTTTT660
GGCGACTGTGGTATCGATGACGATGTATTCTCTGTTGACCTTTGTGGCGACGCTGACGAG720
GGTCCCGGTTGCGCAAGAGAACTAAGCGCAGTCGCTTGATAGTTTCAAGGCGCTGTGCA780
GGTGTGGCTCAGAGTTTTGCTGCCAGCAGAATGTTAACTCGGCTGAAGTGCTAAATATT840
TCGGCAGCGGAGGCTGGTCTGCACCTCGTATGGAGAGAACGTTACGTTTACATGTCCGTAT900
GATGATTGCATGGCGACCTTCTCTCTCGGCAGCGTTGGCTAAAACACGTAGCCCGGCGT960
CATCCCTGTGAGCTTGTTCCTCCGAGGATTGTACCA CTGTGCGCCTCGGTATATTGGCA1020
CCCTGCTAG
```

3'

**Figura 17. Secuencia del gen TbZ5 de *T. brucei*.** Se indica la posición de los oligonucleótidos utilizados para la amplificación de la región carboxilo terminal. El oligonucleótido TbZ5-C-PTP-ApaI-5' se muestra de color rosa y el oligonucleótido TbZ5-C-PTP-NotI-3'-GC se observa de color turquesa.

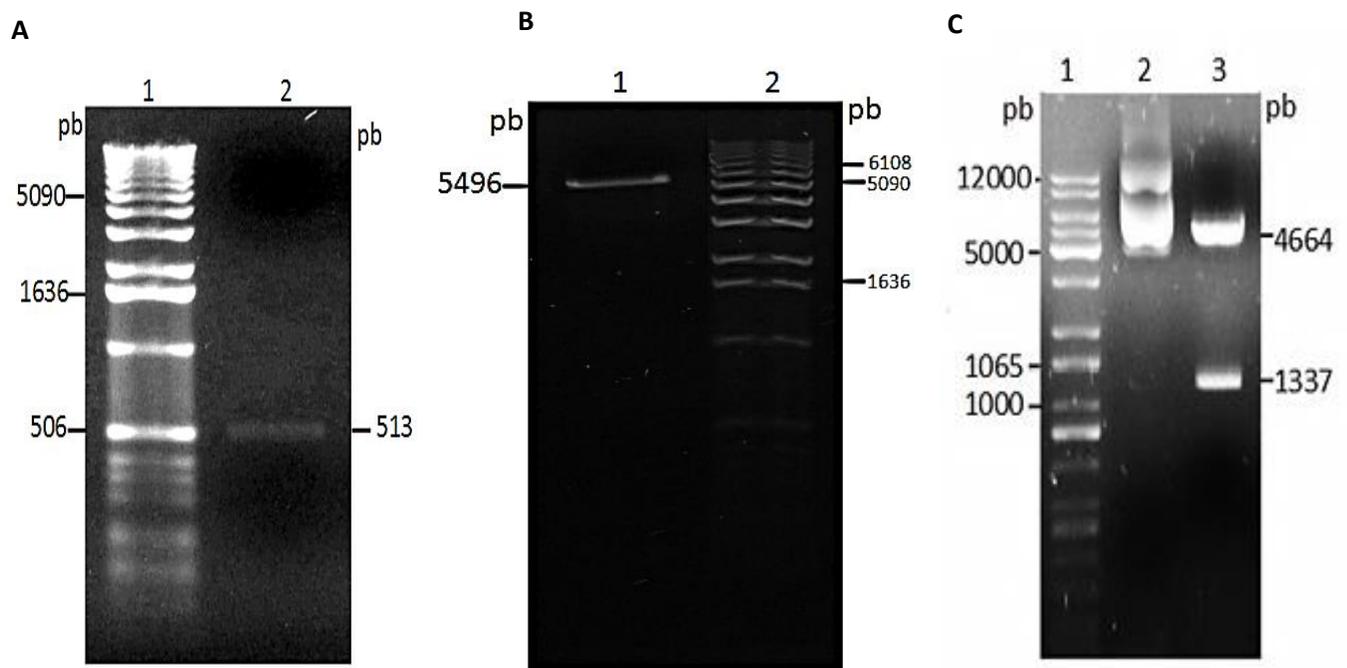
Esta región se ligó al vector pGEMT-Easy, el producto de dicha ligación se utilizó para la transformación de células competentes de *E. coli*.

Se obtuvieron cuatro colonias positivas, de las cuales se realizó una extracción de DNA plasmídico para efectuar un análisis de restricción con la enzima EcoRI. Dicho análisis nos indicó la presencia del fragmento del tamaño esperado de 516 pb en cada una de las clonas (Figura 18, panel B). Se seleccionó una de las clonas para secuenciar y con esto confirmar la identidad del fragmento, obteniéndose así el plásmido pGEM-TbZ5 (Figura 20, panel A).



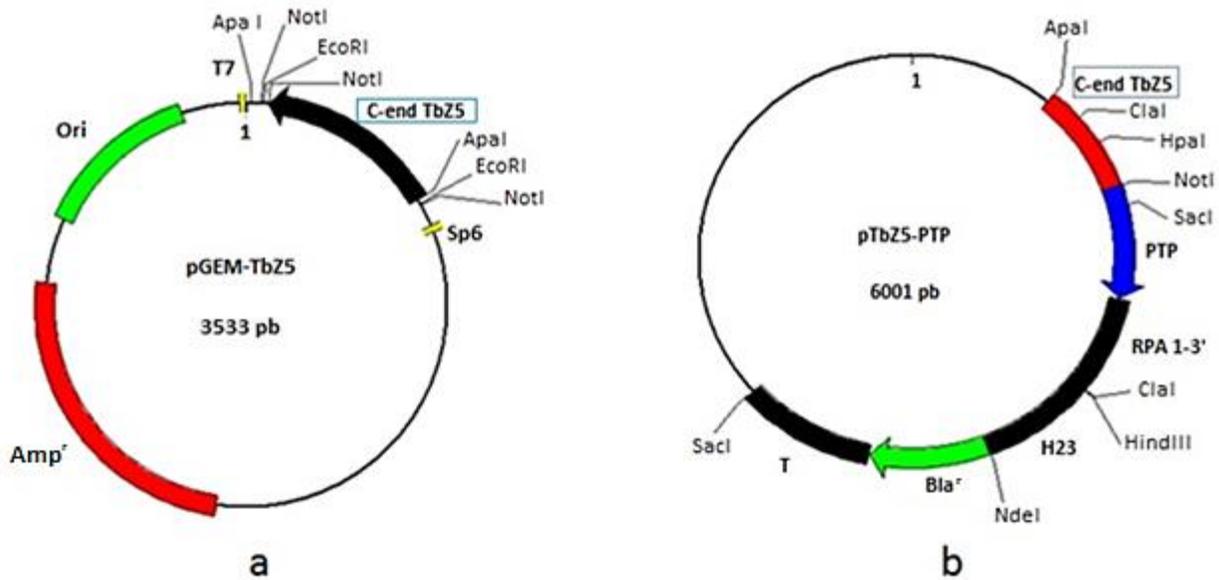
**Figura 18. Amplificación por PCR de la región carboxilo terminal de TbZ5 (A) y Análisis de restricción de las clonas de TbZ5 en pGEMT-Easy (B).** A) El carril 1 muestra la amplificación de la región C-terminal del gen, de aproximadamente 516 pb. En el carril 2 se observa el marcador de peso molecular (Invitrogen 1 kb DNA Ladder). B) En el carril 1 se visualiza el marcador de peso molecular (Invitrogen 1 kb Plus DNA Ladder). En los carriles 2, 4, 6 y 8 se observa el DNA plasmídico de las clonas sin digerir. En los carriles 3, 5, 7 y 9 se encuentran las muestras digeridas con EcoRI. El inserto clonado tiene un tamaño aproximado de 513 pb. Geles de agarosa al 0.8%.

El vector pGEM-TbZ5 fue después digerido con las endonucleasas *Apal* y *NotI* para liberar y purificar el inserto de TbZ5 (Figura 19, panel A). Asimismo, el vector pC-PTP-BLA fue digerido con *Apal* y *NotI* y purificado (Figura 19 panel B). Inserto y vector se ligaron, y con la mezcla de ligación se transformaron células electrocompetentes, obteniéndose una colonia que se resembró en medio líquido para la extracción de DNA plasmídico. Se realizó una digestión con la enzima *Clal* para corroborar que el inserto se hubiera clonado correctamente. Se observaron las dos bandas esperadas de 1337 y 4664 pb (Figura 19, panel C), considerando que hay un sitio de corte de *Clal* en el inserto de TbZ5 y otro en el vector (Figura 20 B). Para corroborar la correcta incorporación del inserto en el vector fue enviado a secuenciar el plásmido. Con esto se confirmó la generación del plásmido pTbZ5-PTP (Figura 20B), el cual fue preparado a gran escala.



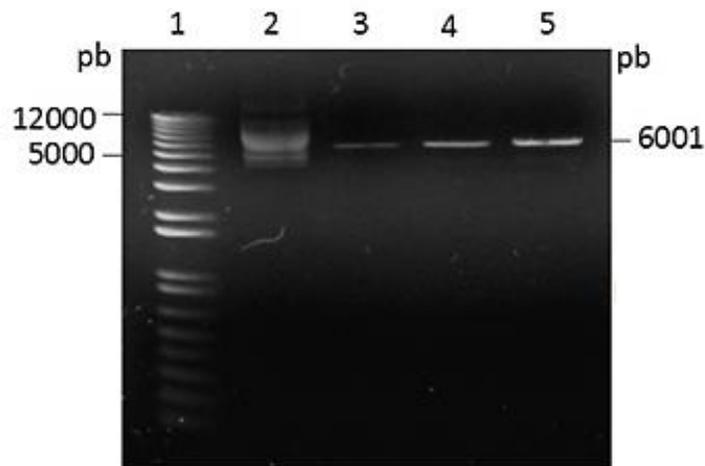
**Figura 19. Purificación del inserto TbZ5 C-terminal (A) y del vector pC-PTP-BLA (B). Análisis de restricción del vector pTbZ5-PTP (C).** A) Purificación del fragmento de TbZ5 C-terminal obtenido con las enzimas *Apal* y *NotI* del vector pGEM-TbZ5. El carril 2 muestra el inserto de 513 pb. B) Purificación del vector pC-PTP-BLA. En el carril 1 se visualiza el vector pC-PTP-BLA purificado obtenido de la previa digestión con enzimas *Apal* y *NotI*. C) Digestión del vector pTbZ5-PTP con enzima *Clal*. En el carril 2 se muestra el DNA sin digerir. En el carril 3 se muestran los fragmentos obtenidos de 4664 pb y 1337 pb. En los tres paneles se visualiza el marcador de peso molecular (Invitrogen 1 kb Plus DNA Ladder). Geles de agarosa al 0.8%.

### 5.3 Transfección y análisis de clones celulares pTbZ5-PTP



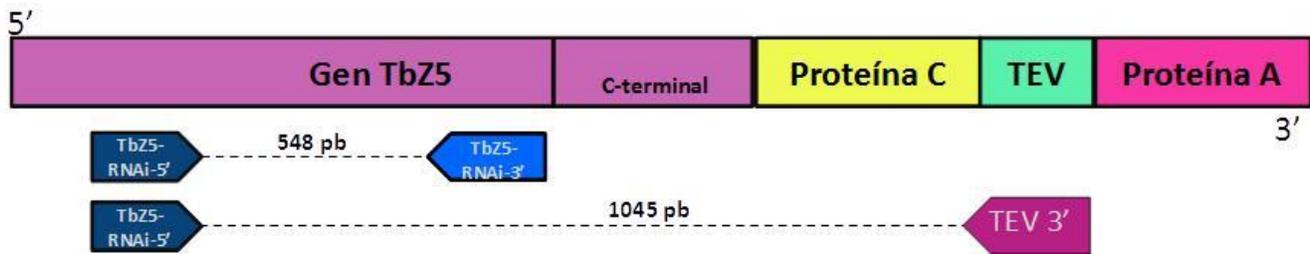
**Figura 20. Mapa de los vectores pGEM-TbZ5 y pTbZ5-PTP.** a) pGEM-TbZ5: de color negro se encuentra la región amplificada del extremo C-terminal de TbZ5. Los fragmentos de color amarillo son los promotores de la RNA polimerasa T7 y Sp6, de rojo la secuencia de resistencia a ampicilina. b) pTbZ5-PTP: de color rojo se encuentra el inserto C-terminal de TbZ5, de color azul se muestra la bandera PTP y de color verde la secuencia de resistencia a blastomicina. De color negro se observan las secuencias de procesamiento. RPA 1-3' contiene las secuencias necesarias para la poliadenilación. Las secuencias necesarias para el procesamiento del mRNA del gen de blastomicina se localizan en la región H23 (sitio aceptor del miniexón) y la región T (sitio de poliadenilación).

El plásmido pTbZ5-PTP linearizado se usó para transfectar formas procíclicas de la cepa 29-13 de *T. brucei*, en fase media de crecimiento logarítmico, mediante electroporación. Para ello, el plásmido se digirió con la enzima HpaI y se purificó a partir de un gel de agarosa (Figura 21). Se seleccionó esta enzima debido a que corta justamente en la región C-terminal de TbZ5, lo cual es necesario para integrar la construcción en el locus de TbZ5 en el genoma de *T. brucei* por recombinación homóloga. Al integrar la construcción en un alelo endógeno se logra que la proteína TbZ5 fusionada a la bandera PTP se exprese en niveles normales (Schimanski *et al.*, 2005). Los cultivos transfectados fueron seleccionados con blastomicina, obteniéndose una población estable después de aproximadamente 4 semanas.



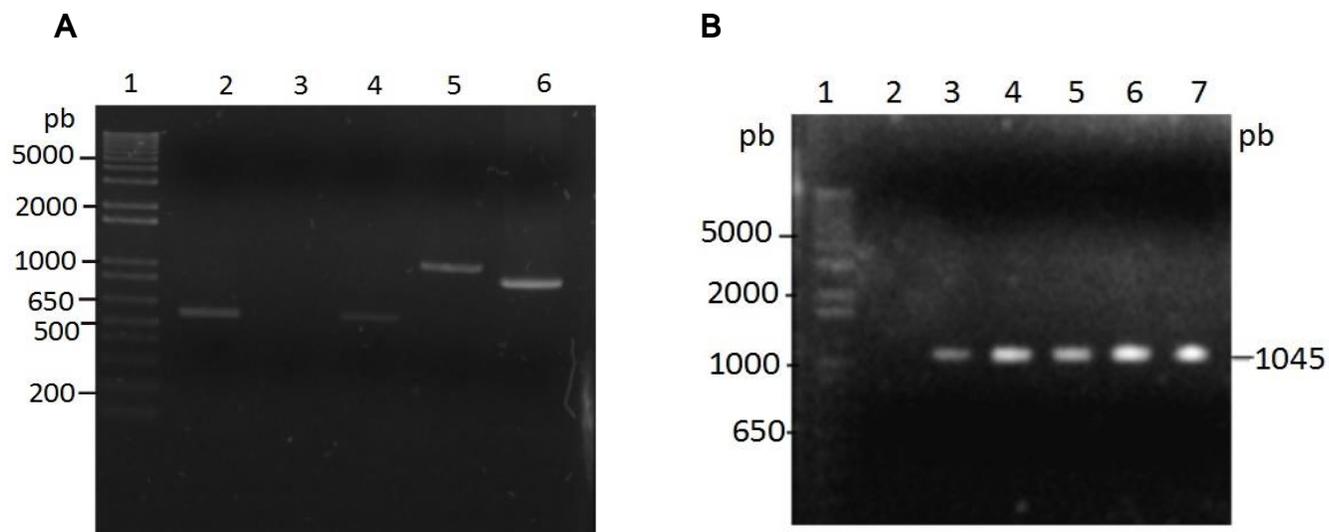
**Figura 21. Linearización del vector pTbZ5-PTP.** El carril 2 muestra el DNA del vector pTbZ5-PTP sin digerir. En los carriles 3, 4 y 5 el vector linearizado con la enzima HpaI, obteniendo en todos los casos una banda de 6001 pb. En el carril 1 se encuentra el marcador de peso molecular (Invitrogen 1kb Plus DNA Ladder). Gel de agarosa al 0.8%.

Para corroborar que la población celular pTbZ5-PTP obtenida después de la transfección tuviera la construcción en el *locus* del gen de TbZ5, se realizó un análisis de PCR con los oligonucleótidos TbZ5-RNAi-5 y TEV 3'. El primero reconoce una región intragénica de TbZ5, diferente a la usada en la amplificación de la región carboxilo terminal del gen, mientras que el oligonucleótido TEV 3' se une a la región de corte de la proteasa TEV que forma parte del PTP (Figura 22).



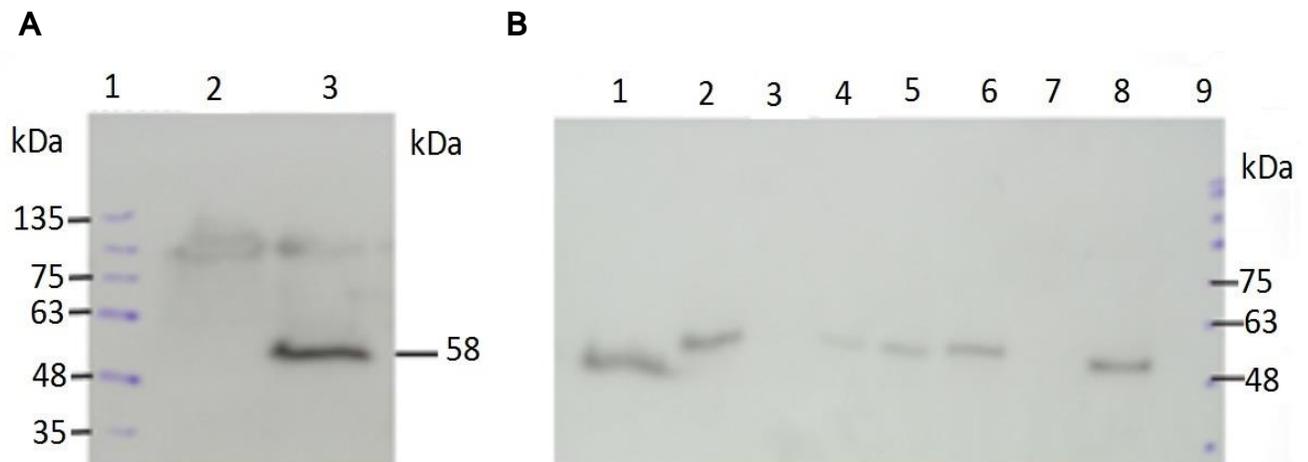
**Figura 22. Esquema del locus recombinante TbZ5-PTP y oligonucleótidos empleados en los PCRs.** Se muestra el gen TbZ5 (color lila) con los dominios que conforman la bandera PTP; de amarillo se indica la región de la proteína C, de rosa se muestra la proteína A y en medio de ellos la región de corte de la proteasa TEV (verde). Debajo del esquema se muestran los oligonucleótidos usados en los PCRs y el tamaño del producto esperado.

Se observó el producto de PCR esperado, de 1,045 pb (Figura 23, carril 5), lo cual indicó que el vector PTP se integró de manera correcta. Como se esperaba, no se observó amplificación alguna cuando se usó como templado DNA de células silvestres (Figura 23, carril 3). Para confirmar la buena calidad del DNA de las células silvestres, se amplificó con él una región de 548 pb del gen de TbZ5, empleando los oligonucleótidos TbZ5-RNAi-5' y TbZ5-RNAi-3' (Figura 22), observándose el producto del tamaño esperado (Figura 23, carril 2); el mismo producto se obtuvo con DNA de la población TbZ5-PTP, como era de esperarse (Figura 23, carril 4). Como control, también se usó DNA de una clona de *T. brucei* que expresa una proteína recombinante Maf1-PTP, con los oligonucleótidos Maf1BamHI 5' y TEV 3', obteniéndose el producto esperado de 800 pb (Figura 23, carril 6). En conclusión, con estos experimentos se demostró que la construcción pTbZ5-PTP se integró en el locus de TbZ5.



**Figura 23. Análisis por PCR de la población y clones celulares pTbZ5-PTP.** A) Población celular pTbZ5-PTP. Los carriles 2 y 4 muestran DNA de células silvestres (WT) y pTbZ5-PTP, respectivamente, con oligonucleótidos TbZ5-RNAi-5' y TbZ5-RNAi-3' (548 pb). El carril 3 muestra DNA WT con oligonucleótidos TbZ5-RNAi-5 y TEV 3', y el carril 5 muestra DNA pTbZ5-PTP con oligonucleótidos TbZ5-RNAi-5' y TEV 3' (1,045 pb). En el carril 6 se muestra el control positivo, que corresponde a Maf1-PTP con oligonucleótidos Maf1BamHI 5' y TEV 3' (800 pb). B) Clonas celulares pTbZ5-PTP. El carril 2 muestra el DNA de WT. Los carriles 3-6 las clonas celulares obtenidas por medio de clonación por dilución limitante; el carril 7 muestra el amplificado obtenido de la población celular. Se observa el fragmento esperado de 1,045 pb. Los carriles número 1 corresponden al marcador de peso molecular (Invitrogen 1 kb Plus DNA Ladder). Geles de agarosa al 0.8%.

Posteriormente se realizó un ensayo tipo western blot utilizando el anticuerpo anti-protA, el cual reconoce la región correspondiente al dominio de proteína A que forma parte de la bandera PTP. La inmunodetección del epítipo de proteína A reveló que la población celular expresa una proteína recombinante de aproximadamente 58 kDa, la cual es acorde con lo esperado, considerando que el tamaño predicho de TbZ5 es de 38 kDa y que la bandera PTP tiene un tamaño de 20 kDa (Figura 24, panel A).



**Figura 24. Ensayo western blot de la población y clones celulares pTbZ5-PTP utilizando anticuerpo anti-protA.** (A) El carril 2 muestra el lisado de células silvestres (WT). En el carril 3 la proteína recombinante expresada por la población celular pTbZ5-PTP de 58 kDa. (B) En el carril 1 se observa la señal de la proteína recombinante Maf1-PTP de 50 kDa (control positivo). En los carriles 2-8 se muestra la expresión de la proteína recombinante en las clones celulares pTbZ5-PTP, correspondiente a 58 kDa. En los carriles 1 (panel A) y 9 (panel B) se localiza el marcador de peso molecular (BlueStar PLUS Prestained Protein ladder). Las fracciones de proteína fueron separadas en un gel SDS-PAGE al 10% de poliacrilamida transferido a membranas PVDF.

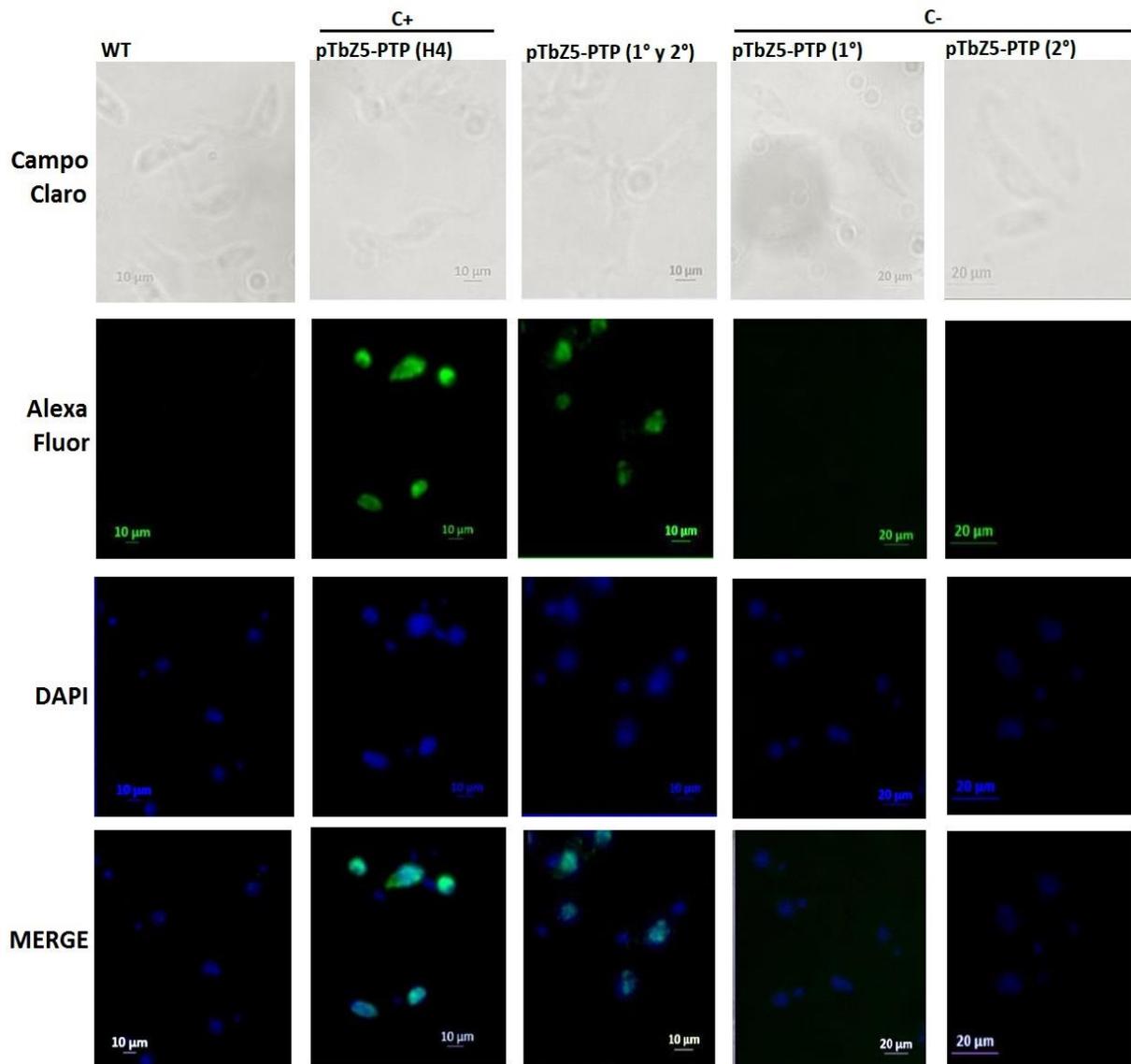
Después de corroborar que la población expresaba la proteína recombinante pTbZ5-PTP y confirmar que la construcción se encontraba en el sitio correcto, se procedió a realizar la clonación celular por dilución limitante. Se seleccionaron siete clones celulares estables para analizarlas por western blot, bajo las mismas condiciones usadas para analizar la población. Se observó que cinco de las clones expresaban la proteína recombinante correspondiente a pTbZ5-PTP (Figura 24, panel B). De las clones celulares positivas obtenidas, se eligieron cuatro para efectuar otro PCR y confirmar la integración de la construcción en el *locus* del gen TbZ5, como se realizó anteriormente con la población pTbZ5-PTP. Como se observa en los carriles 2-5 de la figura 22 (panel B) se visualizó la banda del tamaño esperado en todas las clones. Confirmado lo anterior, se seleccionó una clona celular con crecimiento estable para escalar el cultivo recombinante y con ella realizar los experimentos de inmunofluorescencia indirecta.

#### 5.4 Localización celular de pTbZ5-PTP

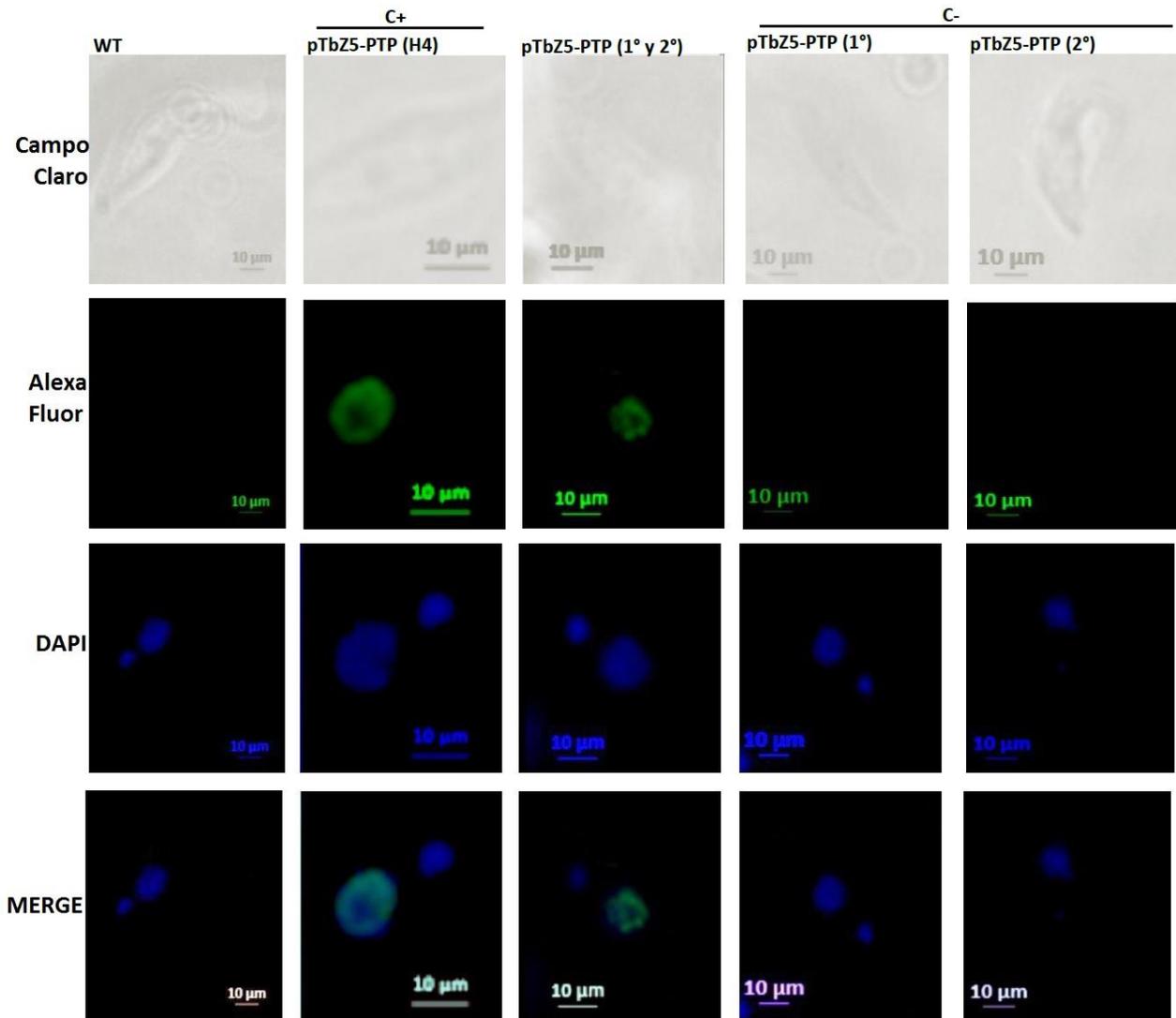
Para determinar la localización celular de la proteína recombinante pTbZ5-PTP, se decidió realizar ensayos de inmunofluorescencia indirecta, en los cuales se requiere el uso de un anticuerpo primario que reconozca a la proteína blanco y un anticuerpo secundario con un fluoróforo acoplado que a su vez detecte al primer anticuerpo. La estrategia que se diseñó para llevar a cabo estos experimentos fue utilizar un anticuerpo primario anti-ProtC, el cual es un epítipo que forma parte de la bandera PTP a la que se encuentra fusionado TbZ5, y un anticuerpo secundario acoplado a un fluoróforo que emite luz de color verde (Alexa Fluor 488).

Se obtuvieron diferentes capturas de varias laminillas con ayuda del microscopio de fluorescencia con la finalidad de analizar la reproducibilidad de los resultados. Para tener una visión más general de las células analizadas, se hizo una captura de varias células encontradas en el mismo campo de visión. En la figura 25 se pueden observar los diferentes campos que se tomaron en cuenta: el campo claro permite visualizar la integridad celular sin fluorescencia, Alexa Fluor indica la localización celular de la proteína de interés emitiendo luz de color verde, DAPI es un marcador fluorescente de color azul que se une al DNA, lo cual permite detectar al núcleo y cinetoplasto. Las capturas tomadas con Alexa Fluor y DAPI a su vez se utilizaron para realizar una sobreposición de las imágenes con el programa ZEN (Zeiss) para determinar la colocalización (MERGE, color turquesa). Además del campo general, se hicieron capturas con acercamiento celular con la finalidad de distinguir con mayor detenimiento la señal emitida (Figura 26).

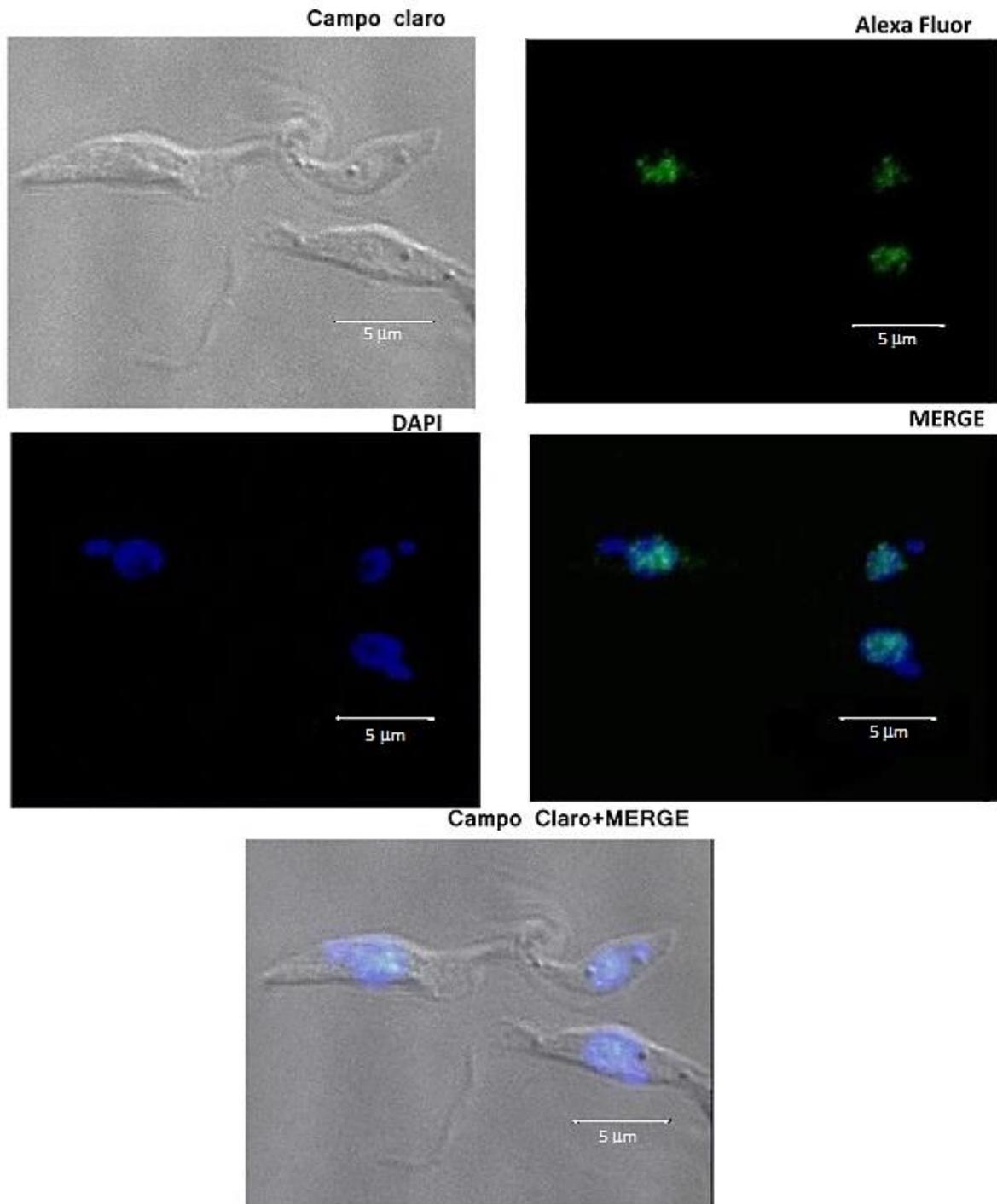
Inicialmente se realizaron varias pruebas de la técnica en células pTbZ5-PTP con un anticuerpo primario contra histona H4 (anti H4), la cual tiene una localización nuclear. Como se observa en la figura 26, en todas las células analizadas se observó la señal de la histona H4 en el núcleo. Al analizar una célula con mayor resolución se apreció que la señal de H4 se presenta en prácticamente todo el núcleo, siendo menos abundante en el nucléolo (Figura 26).



**Figura 25. Localización celular de TbZ5-PTP mediante microscopía de fluorescencia (campo general celular).** En la primera fila se encuentran las imágenes de campo claro, en la segunda fila se muestra la señal obtenida con el anticuerpo secundario acoplado a alexa fluor, en la tercera fila se muestra la tinción con DAPI, y en la cuarta fila se muestra el MERGE. En la primera columna se analizaron células WT, mientras que en el resto de las columnas fue analizada la clona celular que expresa a la proteína recombinante pTbZ5-PTP. La segunda columna corresponde al control positivo, en donde se empleó el anticuerpo anti-Histona H4; en la tercera columna se usó el anticuerpo anti-ProtC. En las dos últimas columnas se empleó sólo el anticuerpo primario o sólo el anticuerpo secundario. La escala se muestra en micrómetros ( $\mu\text{m}$ ).



**Figura 26. Localización celular de TbZ5-PTP mediante microscopía de fluorescencia (acercamiento celular).** En la primera fila se encuentran las imágenes de campo claro, en la segunda fila se muestra la señal obtenida con el anticuerpo secundario acoplado a alexa fluor, en la tercera fila se muestra la tinción con DAPI, y en la cuarta fila se muestra el MERGE. En la primera columna se analizaron células WT, mientras que en el resto de las columnas fue analizada la clona celular que expresa a la proteína recombinante pTbZ5-PTP. La segunda columna corresponde al control positivo, en donde se empleó el anticuerpo anti-Histona H4; en la tercera columna se usó en anticuerpo anti-ProtC. En las dos últimas columnas se empleó sólo el anticuerpo primario o sólo el anticuerpo secundario. La escala se muestra en micrómetros ( $\mu\text{m}$ ).



**Figura 27. Localización celular de TbZ5-PTP por medio de microscopía confocal.** Las células analizadas expresan la proteína recombinante TbZ5-PTP. La primera imagen corresponde al campo claro, mientras que en la segunda imagen se muestra la señal obtenida con el anticuerpo secundario acoplado a alexa fluor. En la tercera fila se muestra la tinción con DAPI, y en la cuarta imagen se muestra el MERGE de DAPI con Alexa fluor. La imagen inferior muestra la colocalización del MERGE con el campo claro. La escala se muestra en micrómetros ( $\mu\text{m}$ ), la cual corresponde al tamaño del núcleo.

Obtenida la señal esperada con anti H4, se procedió a utilizar el mismo método con el anticuerpo anti-ProtC. Después de diversos ensayos se logró encontrar la emisión de señal de la proteína recombinante pTbZ5-PTP en el núcleo en todas las células analizadas (Figura 25), lo cual concuerda con lo esperado. La figura 26 muestra que, a diferencia de la histona H4, la señal de TbZ5-PTP está localizada a manera de puntos en varias regiones del núcleo.

Adicionalmente se realizaron diversos controles negativos: 1) células silvestres, utilizando ambos anticuerpos (anti-ProtC y secundario acoplado a Alexa-Fluor); 2) células transfectadas, pero usando sólo el anticuerpo primario; 3) células transfectadas, pero usando sólo el anticuerpo secundario. Esto para descartar que alguno de los anticuerpos detectara proteínas de forma inespecífica o emitiera fluorescencia por cuenta propia. Como se esperaba, no se observó señal alguna en los controles negativos (Figuras 25 y 26).

Para determinar con mayor detalle y resolución la señal de TbZ5-PTP en el núcleo se procedió a analizar las laminillas mediante microscopía confocal. El análisis reveló que efectivamente TbZ5 no emite señal en todo el núcleo, sino que su señal es punteada y parece ser más intensa en la periferia del nucléolo y en algunas regiones de la membrana nuclear (Figura 27).

## 6. DISCUSIÓN

En el presente trabajo se inició la caracterización molecular de TbZ5, una proteína de *T. brucei* que presenta 5 dedos de zinc del tipo C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>. TbZ5 es un firme candidato a ser el ortólogo de TFIIIA en *T. brucei*, pues es la proteína nuclear que presenta el mayor número de dedos de zinc en este parásito. TbZ5 comparte con TFIIIA las siguientes características: 1) contiene múltiples estructuras del tipo dedos de zinc C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>; 2) los residuos que conforman los motivos de zinc son de naturaleza similar; 3) la estructura secundaria y terciaria de cada uno de los dedos de zinc está conservada; 4) la presencia de un péptido conservado de unión (TGKEP); 5) la presencia de una posible señal de TAS; 6) sitios fosforilables en la secuencia proteica; y 7) localización nuclear.

La proteína TFIIIA posee residuos altamente conservados que, como se mencionó anteriormente, comparte con TbZ5. Uno de ellos lo constituye la secuencia TGEKP, la cual conecta motivos de zinc vecinos y es un importante elemento estructural que ayuda a estabilizar la unión de la proteína con el DNA (Wolfe *et al.*, 1999; Brayer y Segal, 2008). También está conservada la señal de localización nuclear en la región C-terminal, ya que TFIIIA al ser un factor de transcripción reconoce la región promotora del gen RNAr 5S dentro del núcleo (Latchman, 1990; Lindell *et al.*, 1970). Así, en TbZ5 se localizó la probable NLS en la región C-terminal y, de manera importante, nuestros resultados de microscopía de inmunofluorescencia indirecta demostraron que TbZ5 es en efecto una proteína de localización nuclear, aunque faltaría demostrar que dicha localización es exclusiva de formas procíclicas de *T. brucei*, como nuestros datos indican.

En anfibios y mamíferos TFIIIA cuenta con una secuencia TAS en una región en donde no hay un motivo de zinc, hacia el extremo carboxilo terminal (Gaskins *et al.*, 1992) (Hanas *et al.*, 2002). En *S. cerevisiae* la señal se localiza en el espaciador entre los dedos ocho y nueve (Archambault *et al.*, 1992). En TbZ5 se identificó una posible señal de activación que está ligada a la NLS: KRSRLIVSR. La secuencia como tal es semiconservada, ya que sólo tres de los nueve residuos son iguales, mientras que los siguientes residuos son similares bioquímicamente y los últimos difieren totalmente. Por último, una función esencial de TFIIIA como factor de transcripción es su activación en respuesta a estímulos extracelulares que generalmente se encuentra mediada a través de la fosforilación por proteínas cinasas, que pueden modular la estabilidad de la proteína y la unión al DNA de los complejos de iniciación de Pol III (Karin, 1994; Whitmarsh & Davis, 2000).

En levadura, la fosforilación de la subunidad de la proteína de unión a la caja TATA (TBP) de TFIIIB se lleva a cabo por la proteína cinasa CK2, la cual es requerida para la eficiente transcripción de los genes de Pol III (Ghavidel & Schultz, 1997). En TFIIIA, se ha identificado en oocitos de *X. laevis* la actividad de la proteína cinasa CK2, como elemento de fosforilación (Westmark *et al.*, 2002), la cual lleva a cabo su actividad como cinasa preferentemente fosforilando la serina 16 en TFIIIA aislada de *X. laevis* (Ghose *et al.*, 2004). De acuerdo con los resultados del análisis realizado, TbZ5 cuenta con varios residuos potencialmente fosforilados, entre los cuales se encuentra la serina 18, que podría ser equivalente a la serina 16 de *X. laevis*. Dicho residuo tiene un porcentaje aproximadamente del 97%, lo cual aumenta las probabilidades de que en realidad ocurra *in vivo*.

Aunque hay similitudes, también hay diferencias entre TbZ5 y TFIIIA. Todas las proteínas TFIIIA descritas hasta ahora tienen nueve dedos de zinc consecutivos del tipo C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>, a excepción de *S. pombe* que posee diez dedos de zinc (Shulma & Setzer, 2002). En el caso de *T. brucei* la proteína TbZ5 cuenta con cinco dedos de zinc con la conformación de los encontrados en TFIIIA. Aunque el número de dedos de zinc de TbZ5 es evidentemente menor al descrito en general para eucariontes superiores, no se descarta la posibilidad de que sea el ortólogo de TFIIIA, ya que se sabe que estas proteínas están poco conservadas en diferentes organismos. Así, es probable que los ortólogos de TFIIIA en protozoos tengan un número menor de dedos de zinc. Por otro lado, en *X. laevis* y *H. sapiens* la separación entre cada dedo de zinc es de sólo 6 aminoácidos. Comparativamente, la separación entre los dominios de zinc de TbZ5 es relativamente grande, siendo en promedio de 40 aminoácidos, aunque la distancia entre los dos últimos dominios es de 86 aminoácidos (Figura 11). No obstante, hay ejemplos de dedos de zinc separados por distancias grandes en ortólogos de TFIIIA en otras especies. Por ejemplo, en *A. thaliana* existe una separación de 66 aminoácidos entre los dedos cuatro y cinco, mientras que en *S. cerevisiae* existe un espacio de 81 residuos entre los dos últimos dedos de zinc. Aunque esto no descarta que TbZ5 sea el ortólogo de TFIIIA en *T. brucei*, estas diferencias abren la posibilidad de que la proteína realice otras funciones dentro del núcleo.

Los dedos de zinc han sido asociados con la unión a ácidos nucleicos, es decir, DNA y RNA; la proteína arquetipo de dedo de zinc TFIIIA es bifuncional, ya que tiene maneras distintas de unión que le permiten unirse tanto a la región de control interno de DNA de los genes del RNAr 5S y al producto transcrito del RNA.

En ese sentido, las proteínas con dedos de zinc son importantes en la regulación, con el potencial para influir tanto en la transcripción como en la traducción (Islan, 2013).

En tripanosomatidos la transcripción está regulada globalmente en las diferentes formas de vida de los parásitos. Correspondientemente, el genoma de estos parásitos codifica para pocas proteínas con potencial de ser factores de transcripción, por lo que se cree que la regulación de la expresión génica se da principalmente a nivel post-transcripcional en los tripanosomátidos (Clayton, 2002). Las únicas excepciones a esto son los genes que corresponden a las proteínas de recubrimiento de superficie como VSG's, las cuales están moduladas por regulación del ambiente y mayormente por silenciamiento de la cromatina (Glover y Horn, 2006). En mamíferos la degradación rápida de mRNAs que codifican citocinas y reguladores del ciclo celular es crítica para el control de la respuesta inmune y crecimiento celular. Los mRNAs contienen elementos ricos en -AU (AREs) en sus regiones no transcritas 3' (3'-UTR). Estas regiones son reconocidas y reguladas por proteínas que estabilizan y desestabilizan el mRNA por inhibición o promoviendo la adenilación. Estas proteínas que se une a las regiones de AREs y tienen influencia en la degradación del mensajero, tienen motivos de reconocimiento y unión como los dedos de zinc del tipo CCCH. Las funciones de algunas de estas proteínas de unión a RNA son reprimidas por fosforilación (Barreau *et al.*, 2006). En tripanosomatidos se han observado procesos similares de regulación que involucran proteínas de unión al RNA. La inhibición de estas proteínas se ha observado en mRNAs que codifican para ciertas proteínas en algunos estadios celulares, como en formas sanguíneas, así como también para la histona H4 y actina; lo cual indica que la estabilidad de estos mRNA es vital para las funciones del parásito. Al igual que en eucariontes superiores, en tripanosomátidos se ha visto que existen secuencias que determinan el desarrollo de esta regulación en las regiones 3'-UTR. Por ejemplo, para una región rica en uridinas fue claramente demostrado que es necesaria para la inestabilidad del mRNA de prociclina en formas sanguíneas de *T. brucei*. Los genes de prociclina son pobremente transcritos en un crecimiento exponencial de formas sanguíneas, y los mRNAs son muy inestables, lo cual da una inferencia de la relación con la inhibición por complejos proteicos (Clayton & Shapira, 2007).

Las proteínas con dominios de unión a RNA también pueden participar en la regulación de la traducción, por múltiples mecanismos.

Tradicionalmente el complejo de inicio de la traducción escanea una región no traducida 5' (5'-UTR), hasta que encuentra el codón AUG, donde se inicia el proceso. Regiones 3'-UTR pueden contener elementos que interactúan con proteínas represoras y prevenir la circulación del mRNA durante el proceso de inicio de la traducción (Ritcher *et al.*, 2005). La formación de complejos de proteína con el RNA puede ser mediante la unión con el cap o con otros sitios de unión; de esta manera el RNA puede ser estabilizado para aumentar la tasa de traducción. Es importante considerar que esta regulación coordinada en tripanosomátidos por proteínas y RNAs a nivel post-transcripcional se basa en diversos motivos de unión, cada uno para un proceso específico y para un particular modelo de expresión dentro del ciclo de vida del parásito.

La idea de que las proteínas de unión a RNA pueden participar de manera activa en ciertos estadios celulares del parásito abre la posibilidad de que TbZ5 esté involucrada en procesos de regulación post-transcripcionales, como la degradación o estabilidad de los mRNAs. Alternativamente, TbZ5 podría interactuar con factores de transcripción de Pol I o de Pol II. Incluso podría desempeñar algún papel en la regulación del inicio de la transcripción, influyendo en cambios dinámicos en la metilación y acetilación del DNA (Filion *et al.*, 2006).

En otras especies del género *Trypanosoma*, los ortólogos de TbZ5 cuentan con los cinco dedos de zinc, excepto por *T. vivax*, en el cual la proteína cuenta únicamente con cuatro dedos de zinc. Las características de los dedos de zinc que poseen los ortólogos de TbZ5 son similares dentro de los tripanosomátidos. En organismos del género *Leishmania* no se encontró como tal un ortólogo de TbZ5, lo cual hace pensar que esta proteína tenga que ver con regulación específica de estadios celulares característicos de organismos del género *Trypanosoma*.

## 7. CONCLUSIONES Y LOGROS

- La proteína TbZ5 en *T. brucei* contiene cinco dedos de zinc del tipo C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>.
- Análisis *in silico* permitió la identificación de algunos residuos conservados en TbZ5 presentes en proteínas TFIIIA de diferentes organismos, como *X.laevis*, *H. sapiens*, *S. cerevisiae*, *S.pombe* y *A. Thaliana*.
- La proteína TbZ5 posee un probable péptido de unión al DNA y una secuencia de localización nuclear
- Se identificaron 20 sitios predictivos de fosforilación en las secuencias de aminoácidos de TbZ5 en *T. brucei*.
- Las estructuras secundaria y terciaria predichas de los dedos de zinc de TbZ5 están conservadas en relación a otros dedos de zinc del tipo C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>.
- Se generó el vector recombinante pTbZ5-PTP.
- Se obtuvo y se caracterizó una línea celular que expresa la proteína recombinante pTbZ5-PTP.
- La proteína recombinante pTbZ5-PTP tiene una localización nuclear en formas procíclicas de *T. brucei*.

## 8. PERSPECTIVAS

En este trabajo se inició la caracterización molecular de la proteína TbZ5 y se generaron herramientas moleculares que permitirán continuar con su caracterización funcional. La obtención de la línea celular que expresa la proteína recombinante TbZ5-PTP permitió determinar que TbZ5 es una proteína nuclear. A continuación se realizarán experimentos de purificación por afinidad en tándem para conocer las proteínas asociadas de TbZ5 (como factores de transcripción de alguna de las tres RNA polimerasas o alternativamente otras proteínas de unión a RNA). Asimismo, la línea celular TbZ5-PTP será usada para realizar ensayos de inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP) para determinar su posible unión al promotor del gen rRNA 5S u otros promotores. La función de TbZ5 también será investigada realizando knock-downs de la proteína mediante RNA de interferencia. Todos estos experimentos nos permitirán determinar si TbZ5 es el ortólogo de TFIIIA en *T. brucei* o desempeña otra función relacionada a la transcripción o la la regulación post-transcripcional.

## 9. REFERENCIAS

- Acker J., Conesa C. y Lefebvre O. 2013. Yeast RNA polymerase III transcription factors and effectors. *Biochim Biophys Acta*.1824(3-4):283-295.
- Acosta-Viana. K.Y. y Zavala-Castro. J. E. 1996. Proteínas de unión a DNA. *Biomédica*. 7:163-172.
- Archambault J., Milne C.A., Schappert K.T., Baum B., Friesen J.D. y Segall J.1992. The deduced sequence of the transcription factor TFIIIA from *Saccharomyces cerevisiae* reveals extensive divergence from *Xenopus* TFIIIA. *J Biol Chem*.267(5):3282-3288.
- Barreau C., Paillard L. y Osborne H. 2006. AU-rich elements and associated factors: are there unifying principles? *Nucl Acids Res*.33:7138–50.
- Benz C., Mulindwa J., Ouna B. y Clayton C. 2011. The *Trypanosoma brucei* zinc finger protein ZC3H18 is involved in differentiation. *Mol Biochem Parasitol*. 177(2):148-151.
- Biasini M., Bienert S., Waterhouse A., Arnold K., Studer G., Schmidt T., Kiefer F., Cassarino T.G., Bertoni M., Bordoli L. y Schwede T. SWISS-MODEL: modelling protein tertiary and quaternary structure using evolutionary information. *Nucleic Acids Res*.42:1-5.
- Bloom N., Sicheritz-Pontén T., Gupta R., Gammeltoft S. y Brunak, S. 2004. Prediction of post-translational glycosylation and phosphorylation of proteins from the amino acid sequence. *Proteomics*, 4(6), 1633–1649.
- Brayer K.J. y Segal D.J. 2008. Keep your fingers off my DNA: protein-protein interactions mediated by C2H2 zinc finger domains. *Cell Biochem Biophys*.50(3):111-131.
- Brown R.S., Sander C. y Argos P. 1985. The primary structure of transcription factor TFIIIA has 12 consecutive repeats. *FEBS Lett*. 186:271–274
- Brown R.S. 2005. Zinc finger proteins: getting a grip on RNA. *Curr Opin Struct Biol*. 15(1):94-98.
- Brun, R., Blum, J., Chappuis, F., & Burri, C. 2010. Human African trypanosomiasis. *Lancet*. 375(9709):148–159.
- Burgess-Beusse B., Farrell C., Gaszner M., Litt M., Mutskov V., Recillas-targa F., Simpson M., West A. y Felsenfeld G. 2002. The insulation of genes from external enhancers and silencing chromatin. *Proc Natl Acad Sci USA*. 99(10)6883-6888.

- Campbell D. A., Thomas S. y Sturm N. R. 2003. Transcription in kinetoplastid protozoa: why be normal? *Microbes Infect.* 5(13):231–1240.
- Clayton C.E. 2002. Developmental regulation without transcriptional control? From fly to man and back again. *EMBO J.*21:1881–8.
- Clayton C. y Shapira M. 2007. Post-transcriptional regulation of gene expression in trypanosomes and leishmanias. *Mol Biochem Parasit.*156(2):93-101.
- Corning Life Sciences [en línea].New York: 2008. Disponible en: [http://csmedia2.corning.com/LifeSciences//media/pdf/Single\\_cell\\_cloning\\_protocol.pdf](http://csmedia2.corning.com/LifeSciences//media/pdf/Single_cell_cloning_protocol.pdf). [Consultado: 16 Mayo 2014]
- D'Orso I.,De Gaudenzi J.G. y Frasch A.C. 2003.RNA-binding proteins and mRNA turnover in trypanosomes. *Trends Parasitol.*19(4):151-155.
- Daniels J.P., Gull K. y Wickstead B. 2010. Cell biology of the trypanosome genome. *Microbiol Mol Rev.*74(4):552.569.
- Dieci et al., 2012 Dieci G., Conti A., Pagano A. y Carnevali D. 2012. Identification of RNA polymerase III-transcribed genes in eukaryotic genomes. *Biochim Biophys Acta.*1829(3-4):296-305.
- Dieci G.,Bosio M.C., Fermi B. y Ferrari R. 2013. Transcription reinitiation by RNA polymerase III. *Biochim Biophys Acta.*1828(3-4):331.341.
- Estevez A.M., T. Kempf., C. Clayton.2001. The exosome of Trypanosomabrucei. *EMBO J.* 20:3831-3839
- Fatica A. y Tollervey D. 2002. Making ribosomes. *Curr Opin Cell Biol.* 14(3):313-318.
- Fenn K. y Matthews K.R. 2007. The cell biology of *Trypanosoma brucei* differentiation. *Curr Opin Microbiol.* 10(6):539-546.
- Figueroa- Angulo E.E., Vélez-Ramírez D.E., Romero-Meza G., Martínez-Calvillo S.2012. *Trypanosoma brucei*: Mecanismos atípicos de expresión génica y variación antigénica. En Alvarez S.M.E. & Azuara E. Genómica de Parásitos: Aspectos moleculares, genómicos, proteómicos y de virulencia. (80-112pp) Académica Española. 493pp.
- Filion G.J., Zhenilo S., Salozhin S., Yamada D., Prokhortchouk E. y Defossez P.A. 2006. A family of human zinc finger proteins that bind methylated DNA and repress transcription. *Mol Cell Biol.*26(1):169-81.
- Franco J.R., Simarro P.P., Diarra A. y Jannin J.G. 2014. Epidemiology of human African trypanosomiasis. *Clin Epidemiol.*6:257-275.

- Gaskins C.J., Smith J.F., Ogilvie M.K. y Hanas J.S. 1992. Comparison of the sequence and structure of transcription factor IIIA from *Bufo americanus* and *Rana pipiens*. *Gene*.120(2):197-206.
- Geiduschek E.P. y Kassavetis G.A. 2001. The RNA polymerase III transcription apparatus. *J Mol Biol*. 310(1):1-26.
- Geiger A., Simo G., Grébaut P., Peltier J.B., Cuny G. y Holzmüller P. 2011. Transcriptomics and proteomics in human African trypanosomiasis: current status and perspectives. *J Proteomics*.74(9):1625-1643.
- Ghavidel A. y Schultz M.C.1997. Casein kinase II regulation of yeast TFIIB is mediated by the TATA-binding protein. *Genes*.11(21):2780-9.
- Ghose R., Malik M. y Huber P.W. 2004. Restricted specificity of *Xenopus* TFIIIA for transcription of somatic 5S rRNA genes. *Mol Cell Biol*.24(6):2467-2477.
- Glover L. y Horn D.2006. Repression of polymerase I-mediated gene expression at *Trypanosoma brucei* telomeres. *EMBO*. 7:93–9.
- Goodfellow S.J. y Zomerdijk J.C.2012. Basic mechanisms in RNA polymerase I transcription of the ribosomal RNA genes. *Subcell Biochem*. 61:211-236.
- Gomez C., Ramirez M.E., Calixto-Galvez M., Medel O. y Rodriguez M.A.2010. Regulation of gene expression in protozoa parasites. *J Biomed Biotechnol*. 1:1-24.
- Grünberg S. y Hahn S. 2013. Structural insights into transcription initiation by RNA polymerase II. *Trends Biochem Sci*.38(12):603-611.
- Guo J. y Price D.H. 2013. RNA polymerase II transcription elongation control. *Chem Rev*. 113(13):8583-8603.
- Haile S. y Papadopoulou B. 2007. Developmental regulation of gene expression in trypanosomatid parasitic protozoa. *Curr Opin Microbiol*.10(6):569-577.
- Hanas J.S., Hocker J.R., Cheng Y.G., Lerner M.R., Brackett D.J., Lightfoot S.A., Hanas R.J., Madhusudhan K.T. y Moreland R.J. 2002. cDNA cloning, DNA binding, and evolution of mammalian transcription factor IIIA. *Gene*.282(1-2):43-52
- Hendriks E.F., Robinson D.R., Hinkins M. y Matthews K.R. 2001. A novel CCCH protein which modulates differentiation of *Trypanosoma brucei* to its procyclic form. *EMBO J*.20(23):6700-6711.
- Isalan M. 2013. *Zinc Fingers*. Elsevier. 575-579.
- Jackson A.P. 2014. Genome evolution in trypanosomatid parasites. *Parasitology*. 1:1-17.

- Karin M. 1994. Signal transduction from the cell surface to the nucleus through the phosphorylation of transcription factors. *Curr Opin Cell Biol.* 6(3):415-424.
- Kelley L.A., Mezulis S., Yates C.M., Wass M.N. y Sternberg M.J..2015.The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis. *Nat Protoc.*10(6):845-858
- Kennedy P.G. 2013. Clinical features, diagnosis, and treatment of human African trypanosomiasis (sleeping sickness). *Lancet Neurol.* 12:186-194.
- Kornberg R.D.1999. Eukaryotic transcriptional control. *Trends Cell Biol.* 9(12):M46-M49.
- Kosciolk T. y Jones D.T. 2014 De Novo Structure Prediction of Globular Proteins Aided by Sequence Variation-Derived Contacts. *PLoS one.* 9 (3).
- Krishnamurthy S. y Hamsey M. 2009. Eukaryotic transcription initiation. *Curr Biol.* 19(4):153-156
- Laity J.H., Dyson H.J. y Wright P.E. 2000. DNA-induced alpha-helix capping in conserved linker sequences is a determinant of binding affinity in Cys(2)-His(2) zinc fingers. *J Mol Biol.*295(4):719-27.
- Latchman D.S. 1990.Eukaryotic transcription factors. *Biochem J.* 270(2):281-289.
- Layat E., Probst A.V. y Tourmente S. 2013.Structure, function and regulation of Transcription Factor IIIA: From *Xenopus* to *Arabidopsis*. *Biochim Biophys Acta.*1829(3-4):274-282
- Lecordier L., Devaux S., Uzureau P., Dierick J.F., Walgraffe D., Poelvoorde P., Pays E. y Vanhamme L. 2007.Characterization of a TFIIH homologue from *Trypanosoma brucei*. *Mol Microbiol.* 64(5):1164-1181.
- Lee B.M., Xu J., Clarkson B.K., Martinez-Yamout M.A., Dyson H.J., Case D.A., Gottesfeld J.M. y Wright P.E.2006.Induced fit and "lock and key" recognition of 5S RNA by zinc fingers of transcription factor IIIA. *J Mol Biol.*357(1):275-291.
- Lejon V. Bentivoglio M. y Franco J.R. 2013. Huma African trypanosomiasis. *Handb Clin Neurol.* 114:169-181.
- Lewin B., Krebs J.E., Goldstein E.S. y Kilpatrick S.T. 2011. Genes X. Jones & Bartlett Learning. 930pp.
- Lindell T.J, Weinberg F., Morris P.W., Roeder R.G. y Rutter W.J. 1970.Specific inhibition of nuclear RNA polymerase II by alpha-amanitin. *Science.*170(3956):447-9.
- Ling A.S., Trotter J.R. y Hendriks E.F. 2011. A zinc finger protein, TbZC3H20, stabilizes two developmentally regulated mRNAs in trypanosomes. *J Biol Chem.*286(23):20152-20162.

- Liu H., Luo M. y Wen J.K.2014. mRNA stability in the nucleus.*J Zhejiang Univ Sci B*.15(5):444-454.
- Lodish H. Berk A., Kaiser C.A.,Krieger M., Bretscher A., Ploegh H., Amon A. y Scott M.P. 2008. Molecular Cell Biology. W.H. Freeman. 6th Edition.973pp.
- Luz Ambrósio D.,Lee J.H.,Panigrahi A.K.,Nguyen T.N.,Cicarelli R.M. y Günzl A. 2009.Spliceosomal proteomics in *Trypanosoma brucei* reveal new RNA splicing factors. *Eukaryot Cell*. 8(7):990-1000
- Maree J.P. y Patterton H.G. 2014.The epigenome of *Trypanosoma brucei*: a regulatory interface to an unconventional transcriptional machine. *Biochim Biophys Acta*.1839(9):743-750.
- Martínez-Calvillo S., Sunkin S. M., Yan S. F., Fox M., Stuart K. y Myler P. J. 2001. Genomic organization and functional characterization of the *Leishmania major* Friedlin ribosomal RNA gene locus. *Mol Biochem Parasit*. 116:147–157.
- Martínez-Calvillo S., Nguyen D., Stuart K. y Myler P. J. 2004. Transcription Initiation and Termination on *Leishmania major* Chromosome 3. *Eukaryot Cell*.3(2):1–12.
- Martínez-Calvillo S., Saxena A., Green A., Leland A., Myler P.J.2007. Characterization of the RNA polymerase II and III complexes in *Leishmania major*. *Int J Parasitol*. 37(5):491-502.
- Martínez-Calvillo, S., Vizuet-de-Rueda, J. C., Florencio-Martínez, L. E., Manning-Cela, R. G., Figueroa-Angulo, E. E. 2010. Gene Expression in Trypanosomatid Parasites. *J Biomed Biotechnol*. 1–16.
- Matthews, K. R. 2005. The developmental cell biology of *Trypanosoma brucei*. *J. Cell Sci*. 118:283-290.
- Nelson L.D. y Cox M.M. Principios de Bioquímica. Omega. 5Th Edition. 1296pp.
- Nguyen T.N., Shimanski B. y Günzl A. 2007. Active RNA polymerase I of *Trypanosoma brucei* harbors a novel subunit essential for transcription. *Mol Cell Biol*. 27(17):6254-6263.
- Nguyen T.N, Nguyen B.N., Lee J.H., Panigrahi A.K. y Günzl A. 2012.Characterization of a novel class I transcription factor A (CITFA) subunit that is indispensable for transcription by the multifunctional RNA polymerase I of *Trypanosoma brucei*.*Eukaryot Cell*.11(12):1573-1581.
- Nolte R.T., Conlin R.M., Harrison S.C. y Brown R.S.1998.Differing roles for zinc fingers in DNA recognition: structure of a six-finger transcription factor IIIA complex.*Proc Natl Acad Sci U S A*.95(6):2938-2943.

- Ogilvie M.K. y Hanas J.S. 1997. Molecular biology of vertebrate transcription factor IIIA: cloning and characterization of TFIIIA from channel catfish oocytes. *Gene*.203(2):103-12.
- Orioli A., Pascali C., Pagano A., Teichmann N y Dieci G. 2012. RNA polymerase III transcription control elements: themes and variations. *Gene*. 493(2):185-194.
- Ouna B.A., Stewart M., Helbig C. y Clayton C. 2012. The *Trypanosoma brucei* CCCH zinc finger proteins ZC3H12 and ZC3H13. *Mol Biochem Parasitol*. 183(2):184-188.
- Palenchar J.B. y Bellofatto V. 2006. Gene Transcription in trypanosomes. *Mol Biochem Parasitol*.146(2):135-141.
- Palmeri A., Gherardini P. F., Tsigankov P., Ausiello G., Späth G. F., Zilberstein D. y Helmer-Citterich M. 2011. PhosTryp: a phosphorylation site predictor specific for parasitic protozoa of the family trypanosomatidae. *BMC Genomics*.12(1):614.
- Pabo C.O., Peisach E. y Grant R.A. 2001. Design and selection of novel Cys2His2 zinc finger proteins. *Annu Rev Biochem*. 70:313-340.
- Padilla-Mejia N., Florencio-Martinez L., Figueroa-Angulo E., Manning-Cela R., Hernandez-Rivas R., Myler P. y Martínez-Calvillo S. 2009. Gene organization and sequence analyses of transfer RNA genes in Trypanosomatid parasites. *BMC Genomics*.10(1):232.
- Persikov A.V. y Singh M. 2014. De novo prediction of DNA-binding specificities for Cys2His2 zinc finger proteins. *Nucleic Acids Res*.42(1):97-108
- Proudfoot N. 2000. Connecting transcription to Messenger RNA processing. *Trends Biochem Sci*.25(6):290-293.
- Puig O., Caspary F., Rigaut G., Rutz B., Bouveret E., Bragado N. E., Wilm M., Séraphin B. 2001. The tandem affinity purification (TAP) method: A general procedure of protein complex purification. *Methods*.24:218-229.
- Reeder R.H. 1984. Enhancers and ribosomal gene spacers. *Cell*.12(15):6043-6052.
- Richter J.D. y Sonenberg N. 2005. Regulation of cap-dependent translation by eIF4E inhibitory proteins. *Nature*.433:477–80.
- Robays J., Nyamowala G., Sese C. Betu Ku Mesu Kande V., Lutumba P., Van der Veken W. y Boelaert M. 2008. High failure rates of melarsoprol for sleeping sickness, Democratic Republic of Congo. *Emerg Inf Dis*.14: 966–967.
- Roeder R.G. 1996. Nuclear RNA polymerases: role of general initiation factors and cofactors in eukaryotic transcription. *Methods Ezymol*. 273:165-171.

- Roeder R.G. 2005. Transcriptional regulation and the role of diverse coactivators in animal cells. *Febs Lett.* 579(4):909-915.
- Rodrigues J.C, Godinho. J.L. y De Souza W.2014. Biology of Human Pathogenic Trypanosomatids: Epidemiology, Lifecycle and Ultrastructure. En Santos A. Branquinha M., D'Avila-Levy C., Kneipp L. y Sodr  C. *Proteins and Proteomics of Leishmania and Trypanosoma.* (1-42pp) Subcellular Biochemistry. 378pp.
- Romero M. G. 2012. *Caracterización molecular de Maf1, probable regulador negativo de la transcripción de la RNA Polimerasa III, en Trypanosoma brucei.* Tesis de Maestr a. CINVESTAV. IPN. México D.F. 103pp.
- Rudt F. y Pieler T. 1996. Cytoplasmic retention and nuclear import of 5S ribosomal RNA containing RNPs. *EMBO J.*5(6):1383-91.
- Schimanski B., Nguyen T.N. y G nzl A. 2005. Highly efficient tandem affinity purification of Trypanosome protein complexes based on a novel epitope combination. *Eukaryot Cell.* 4(11):1942-1950.
- Schneider, D.A., Michel, A., Sikes, M.L., Vu, L., Dodd, J.A., Salgia, S., Osheim, Y.N., Beyer, A.L. y Nomura M. 2007. Transcription elongation by RNA polymerase I is linked to efficient rRNA processing and ribosome assembly. *Mol. Cell.* 26:217–229.
- Schumacher M.A., Lau A.O. y Johnson P.J. 2003. Structural basis of core promoter recognition in a primitive eukaryote. *Cell.*115(4):413-424.
- Segall J.,1896. Assembly of a yeast 5 S RNA gene transcription complex. *J Biol Chem.* 261:11578–11584.
- Shastry B.S. 1991. Xenopus transcription factor IIIA (XTFIIIA): after a decade of research. *Prog Biophys Mol Biol.* 56(2):136-144.
- Schulman D.B. y Setzer D.R. 2002. Identification and characterization of transcription factor IIIA from *Schizosaccharomyces pombe*. *Nucleic Acids Res.*30(13):2772-2781.
- Vieira, J. y Messing, J.1982. The pUC plasmids, an M13mp7-derived system for insertion mutagenesis and sequencing with synthetic universal primers. *Gene.* 19(3):259–268.
- Viktorovskaya O.V. y Schneider D.A.2014. Functional divergence of eukaryotic RNA polymerases: unique properties of RNA polymerase I suit its cellular role. *Gene.* 556(1):19-26.
- Vrana K.E., Churchill M.E., Tullius T.D. y Brown D.D.1988. Mapping functional regions of transcription factor TFIIIA. *Mol Cell Biol.*8(4):1684-1696.

- Walgraffe D., Devaux S., Lecordier L., Dierick J.F., Dieu M., Van den Abbeele J., Pays E. y Vanhamme L. 2005. Characterization of subunits of the RNA polymerase I complex in *Trypanosoma brucei*. *Mol Biochem Parasitol.*139(2):249-260.
- Westmark C.J., Ghose R. y Huber P.W. 2002. Phosphorylation of *Xenopus* transcription factor IIIA by an oocyte protein kinase CK2. *Biochem J.* 362(Pt 2):375-382
- Wirtz L. E., Lorenz P. y Clayton C. 1997. Vectors for inducible expression of toxic gene products in bloodstream and procyclic *Trypanosoma brucei*. *Molecular & Biochemical Parasitology.*1-14.
- Whitmarsh A.J. y Davis R.J. 2000. Regulation of transcription factor function by phosphorylation. *Cell Mol Life Sci.* 57(8-9):1172-1183.
- Wolfe S.A., Nekludova L. y Pabo C.O. 2000. DNA recognition by Cys2His2 zinc finger proteins. *Annu Rev Biophys Biomol Struct.* 29:183-212.
- Wuttke D.S., Foster M.P., Case D.A., Gottesfeld J.M. y Wright P.E. 1997. Solution structure of the first three zinc fingers of TFIIIA bound to the cognate DNA sequence: determinants of affinity and sequence specificity. *J Mol Biol.*273(1):183-206.