



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA**

**BIOLOGÍA EXPERIMENTAL Y BIOMEDICINA**

**CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE UN PROBABLE FACTOR DE  
TRANSCRIPCIÓN DE *Trypanosoma brucei***

**TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

**DOCTOR EN CIENCIAS**

PRESENTA:

**DANIEL EDUARDO VÉLEZ RAMÍREZ**

**TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. SANTIAGO MARTÍNEZ CALVILLO, FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA, UNAM**

**COMITÉ TUTOR: DRA. ANA MARÍA CEVALLOS GAOS, INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNAM**

**COMITÉ TUTOR: DRA. MARÍA IMELDA LÓPEZ VILLASEÑOR, INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNAM**

**MÉXICO, D.F. NOVIEMBRE, 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.

Dr. Isidro Ávila Martínez  
Director General de Administración Escolar, UNAM  
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Subcomité de Biología Experimental y Biomedicina del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 31 de agosto de 2015, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **DOCTOR EN CIENCIAS** del alumno **VÉLEZ RAMÍREZ DANIEL EDUARDO**, con número de cuenta **405032392**, con la tesis titulada **"CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE UN PROBABLE FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN DE *Trypanosoma brucei*"**, realizada bajo la dirección del **DR. SANTIAGO MARTÍNEZ CALVILLO**:

Presidente: DRA. ROSA LAURA CAMARENA MEJÍA  
Vocal: DRA. MARÍA MAGDALENA AGUIRRE GARCÍA  
Secretario: DRA. ANA MARÍA CEVALLOS GAOS  
Suplente: DR. JULIO CÉSAR CARRERO SÁNCHEZ  
Suplente: DRA. MARÍA IMELDA LÓPEZ VILLASEÑOR

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

ATENTAMENTE  
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"  
Cd. Universitaria, D.F., a 20 de octubre de 2015.

*M. del Coro Arizendi*  
DRA. MARÍA DEL CORO ARIZENDI ARRIAGA  
COORDINADORA DEL PROGRAMA



c.c.p. Expediente del (la) interesado (a)

## **Agradecimientos**

Al Posgrado en Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, por la beca para cursar estudios de doctorado durante el periodo comprendido de Agosto de 2009 a Julio de 2014. Correspondiente a la Convocatoria de Becas Nacionales, Agosto – Octubre 2009; CVU/Becario: 325790/229359.

Este proyecto fue financiado por los donativos 128461 del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología y los proyectos IN210712 e IN214715 del PAPIIT de la UNAM, todos otorgados al Dr. Santiago Martínez Calvillo.

Al Consejo Mexiquense de Ciencia y Tecnología, por el apoyo recibido en el marco de la convocatoria de Beca de Tesis de Posgrado, periodo 2014; folio 14BTD0005.

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

A la Dra. Ana María Cevallos Gaos y a la Dra. María Imelda López Villaseñor, por la asesoría brindada para la realización del presente trabajo.

## **Agradecimientos a título personal**

Al Biólogo Luis Enrique Florencio Martínez, por el apoyo técnico recibido a todo lo largo del trabajo experimental.

A Leticia Ávila-González y Claudia I. Flores Pucheta, por la asistencia técnica en la obtención del anticuerpo  $\alpha$ -TbBRF1r.

A la Dra. María Magdalena Aguirre García por la donación del anticuerpo  $\alpha$ - $\beta$ -tubulina.

A la Maestra en Ciencias Gabriela Romero Meza, por el apoyo técnico recibido y las enriquecedoras discusiones de los resultados generados en todos y cada uno de los experimentos a lo largo del proyecto.

A la Bióloga María de Lourdes Mejía Hernández por la ayuda brindada para estandarizar la técnica de inmunofluorescencia indirecta.

Al Biólogo Saúl Rojas Sánchez por la ayuda brindada para la realización de los experimentos de RT-PCR.

A la Dra. Norma Edith Padilla Mejía por la estandarización de la técnica de *run-on* nuclear.

A la Bióloga Fiordaliso Carolina Román Carrero por las discusiones en torno al complejo proteico TFIIIB.

Al Biólogo Juan Carlos Vizuet de Rueda como miembro del laboratorio.

Al Dr. Elías Piedra Ibarra, por la ayuda recibida para realizar los análisis filogenéticos.

A la Dra. Josefina Vázquez Medrano, por la orientación recibida en el Curso-Taller “Herramientas Bioinformáticas Aplicadas al Estudio de las Biomoléculas”, en la Facultad de Estudios Superiores Iztacala, UNAM.

## **Dedicatoria**

A Anahí, el amor de mi vida. Gracias por tu paciencia, comprensión, apoyo y cariño.

A mi hermana Sarai, mi cómplice y confidente de toda la vida. Gracias por estar siempre conmigo y de mi lado.

A mi hermano Aarón, mi inspiración y mi ejemplo a seguir. Gracias por mostrarme otra forma de vivir, estudiar e investigar.

A mi mamá, mi faro en el horizonte. Gracias por guiarme y seguir enseñándome a vivir.

A mi papá, mi héroe y mi ideal de vida. Gracias por estar siempre para mí; sin importar qué, cómo, cuándo ni dónde.

A la vida, por darme la oportunidad de cumplir este proyecto y por todas las enseñanzas académicas, profesionales, científicas y personales.

## Índice general

Lista de Figuras	X
Lista de Tablas	XIII
Resumen	1
Abstract	2
1. Introducción	3
1.1. Biología de <i>Trypanosoma brucei</i>	3
1.1.1. Ciclo de vida	3
1.1.2. Tripanosomiasis Humana Africana	4
1.2. RNAP-III eucarionte	7
1.2.1. Composición y estructura	7
1.2.2. Transcritos	9
1.2.3. Promotores	10
1.2.4. Factores de transcripción	11
1.2.4.1. TFIIB	13
1.2.4.1.1. BRF1	13
1.3. Características atípicas de expresión genética en <i>T. brucei</i>	15
1.3.1. Organización genómica	15
1.3.2. Transcripción policistrónica	15
1.3.3. <i>Trans-splicing</i>	16
1.3.4. Transcripción de genes codificadores por la RNAP-I	17
2. Antecedentes	18

2.1.	Regulación de la transcripción de la RNAP-III	18
2.2.	rRNA 5S	18
2.3.	tRNA	19
2.4.	Otros transcritos	20
2.5.	Factores de transcripción y otras proteínas involucradas en la función de la RNAP-III	20
2.5.1.	Identificación de TbBRF1	21
3.	Objetivos	22
3.1.	Objetivo general	22
3.2.	Objetivos particulares	22
4.	Metodología	23
4.1.	Análisis bioinformáticos	24
4.2.	Cultivo de <i>T. brucei</i>	25
4.3.	Generación de construcciones	26
4.3.1.	Clonación molecular	26
4.3.1.1.	Amplificación por PCR	26
4.3.1.2.	Digestiones con enzimas de restricción	26
4.3.1.3.	Desalado de productos de PCR y purificación de fragmentos a partir de gel de agarosa	26
4.3.1.4.	Ligaciones	28
4.3.1.5.	Transformación de células competentes	28
4.3.1.6.	Preparaciones de DNA de plásmido	28



4.3.2.	Construcciones para obtener la línea celular <i>knock-down</i> por RNAi	28
4.3.3.	Obtención y clonación de los fragmentos analizados en los ensayos de <i>run-on</i>	28
4.3.4.	Construcciones para generar la proteína recombinante TbBRF1r	29
4.3.5.	Construcciones para generar la línea celular TbBRF1-PTP	29
4.4.	Transfección	30
4.5.	Obtención de clones celulares 2T7-TbBRF1 y TbBRF1-PTP	30
4.6.	Ensayos de RNAi	31
4.6.1.	Northern blot	31
4.6.1.1.	Marcaje radioactivo	32
4.6.2.	Western blot	32
4.7.	Obtención del anticuerpo $\alpha$ -TbBRF1r	33
4.7.1.	Expresión y purificación de la proteína recombinante	33
4.7.2.	Inoculación y obtención del anticuerpo	34
4.8.	Ensayos de <i>run-on</i> nuclear	34
4.8.1.	Preparación de los filtros	34
4.8.2.	Obtención de núcleos y el marcaje	35
4.8.3.	Hibridación	36
4.9.	RT-PCR	36
4.9.1.	Extracción de RNA total y tratamiento con DNAsa	36
4.9.2.	Síntesis de cDNA	37
4.9.3.	PCR en tiempo real cuantitativo	36

4.10.	Inmunofluorescencia Indirecta	37
5.	Resultados	39
5.1.	Análisis bioinformáticos	39
5.1.1.	Alineamiento multiespecie y análisis filogenético	39
5.1.2.	Identificación de posibles sitios de interacción proteína-proteína y fosforilables	43
5.1.3.	Identificación de posible Señal de Localización Nuclear	46
5.1.4.	Determinación de estructura secundaria	47
5.1.5.	Predicción de estructura de los repetidos de ciclina	47
5.2.	Análisis experimentales	49
5.2.1.	Localización celular	50
5.2.2.	Análisis del <i>knock-down</i>	57
5.2.2.1.	Curvas de crecimiento de cultivo <i>knock-down</i> de TbBRF1	61
5.2.2.2.	Efecto del <i>knock-down</i> de TbBRF1 en transcripción	70
6.	Discusión	76
6.1.	TbBRF1 es un ortólogo típico de BRF1	76
6.2.	TbBRF1 es necesario para la transcripción mediada por la RNAP-III	78
7.	Logros y conclusiones	82
8.	Referencias bibliográficas	83
9.	Apéndice	95

## Lista de Figuras

<b>Figura 1.</b> Morfología celular de <i>T. brucei</i> .	4
<b>Figura 2.</b> Ciclo de vida de <i>T. brucei</i> .	5
<b>Figura 3.</b> Distribución de la Tripanosomiasis Humana Africana.	6
<b>Figura 4.</b> Subunidades de RNAP-III eucarionte.	8
<b>Figura 5.</b> Topología de RNAP-III.	8
<b>Figura 6.</b> Principales promotores para RNAP-III eucarionte.	11
<b>Figura 7.</b> Unión de los factores de transcripción a los diferentes promotores para RNAP-III.	12
<b>Figura 8.</b> Dominios de BRF1.	14
<b>Figura 9.</b> Transcripción policistrónica y <i>trans-splicing</i> .	16
<b>Figura 10.</b> Arreglo de un <i>cluster</i> tRNA/snRNA.	18
<b>Figura 11.</b> Esquema general del proyecto.	23
<b>Figura 12.</b> Alineamiento multiespecie de ortólogos de BRF1.	40
<b>Figura 13.</b> Árbol filogenético de ortólogos de BRF1 (vecino más cercano, JTT).	43
<b>Figura 14.</b> Residuos de interacción proteína-proteína, fosforilables y NLS de TbBRF1.	44
<b>Figura 15.</b> Predicción de la estructura secundaria de TbBRF1.	48
<b>Figura 16.</b> Modelado por homología de los repetidos de ciclina de TbBRF1.	49
<b>Figura 17.</b> Amplificación de 500 pb del extremo C-terminal del gen de TbBRF1 y desalado del producto de PCR.	50
<b>Figura 18.</b> Análisis de restricción de clona pGEM-TbBRF1/C-terminal.	51
<b>Figura 19.</b> Obtención del inserto TbBRF1/C-terminal.	52

<b>Figura 20.</b> Obtención del cuerpo del vector pC-PTP-BLA.	52
<b>Figura 21.</b> Análisis de restricción de clona pTbBRF1-PTP.	53
<b>Figura 22.</b> Mapa de la construcción pTbBRF1-PTP.	53
<b>Figura 23.</b> Construcción pTbBRF1-PTP linearizada con la enzima <i>BsmI</i> .	54
<b>Figura 24.</b> Análisis por PCR de la población TbBRF1-PTP.	54
<b>Figura 25.</b> Análisis de clonas celulares TbBRF1-PTP.	55
<b>Figura 26.</b> Microfotografías de la Inmunofluorescencia Indirecta hacia TbBRF1.	56
<b>Figura 27.</b> Amplificación de la secuencia blanco de TbBRF1 y desalado del producto de PCR.	57
<b>Figura 28.</b> Análisis de restricción de pGEM-TbBRF1/RNAi.	58
<b>Figura 29.</b> Obtención del inserto TbBRF1/RNAi y del cuerpo del vector p2T7-177.	59
<b>Figura 30.</b> Análisis de restricción de clona p2T7-TbBRF1.	59
<b>Figura 31.</b> Mapa de la construcción p2T7-TbBRF1.	60
<b>Figura 32.</b> Construcción p2T7-TbBRF1 linearizada con la enzima <i>NotI</i> .	60
<b>Figura 33.</b> Curvas de crecimiento del <i>knock-down</i> hacia TbBRF1.	62
<b>Figura 34.</b> Análisis tipo Northern blot del cultivo <i>knock-down</i> de TbBRF1.	63
<b>Figura 35.</b> Amplificación de todo el gen de TbBRF1 y desalado del producto de PCR.	64
<b>Figura 36.</b> PCR de colonia de pGEM-TbBRF1.	64
<b>Figura 37.</b> Obtención del inserto y del cuerpo del vector pCold™ I DNA.	65
<b>Figura 38.</b> Análisis de restricción de clona pCold-TbBRF1.	66
<b>Figura 39.</b> PCR de colonia de pCold-TbBRF1 (clonado en las células de expresión).	66
<b>Figura 40.</b> Inducción y purificación de TbBRF1r.	67

<b>Figura 41.</b> Obtención del anticuerpo $\alpha$ -TbBRF1r.	68
<b>Figura 42.</b> Análisis tipo Western blot del cultivo <i>knock-down</i> de TbBRF1.	69
<b>Figura 43.</b> Amplificación de algunos de los fragmentos para el ensayo de <i>run-on</i> .	70
<b>Figura 44.</b> Análisis de restricción de las clonas pGEM-TbncRNA SL (A) y pGEM-TbtRNA-Phe (B) de los fragmentos para el ensayo de <i>run-on</i> .	71
<b>Figura 45.</b> <i>Dot</i> -blot del <i>run-on</i> nuclear del <i>knock-down</i> de TbBRF1.	72
<b>Figura 46.</b> Análisis densitométrico del <i>run-on</i> nuclear del <i>knock-down</i> de TbBRF1.	73
<b>Figura 47.</b> Amplificación de fragmentos seleccionados para el RT-PCR utilizando cDNA.	73
<b>Figura 48.</b> Curva estándar del rRNA 18S y el tRNA-Arg.	74
<b>Figura 49.</b> Análisis de PCR en tiempo real cuantitativo.	75

## Lista de Tablas

<b>Tabla 1.</b> Subunidades de las tres RNA Polimerasas nucleares eucariontes, tomando como modelo a <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .	9
<b>Tabla 2.</b> Oligonucleótidos utilizados en el proyecto.	27
<b>Tabla 3.</b> Resumen de los fragmentos usados en el análisis de <i>run-on</i> .	29
<b>Tabla 4.</b> Matriz de porcentajes de identidad entre ortólogos de BRF1.	41
<b>Tabla 5.</b> Porcentaje de identidad entre los repetidos de ciclina de ortólogos de BRF1 y TFIIB.	42
<b>Tabla 6.</b> Residuos conservados en TbBRF1 que podrían participar en las interacciones con subunidades de TFIIB o con subunidades de la RNAP-III.	45
<b>Tabla 7.</b> Puntuación de los sitios de fosforilación identificados.	46

## Resumen

*Trypanosoma brucei* es un protozooario hemoflagelado, causante de la Tripanosomiasis Humana Africana, enfermedad transmitida por un insecto vector que se encuentra diseminada en el África subsahariana. Además de su importancia médica, *T. brucei* es un organismo de estudio interesante ya que posee mecanismos de expresión genética atípicos. En nuestro laboratorio estamos interesados en el estudio de la transcripción mediada por la RNA Polimerasa III, enzima responsable de la transcripción del rRNA 5S, el snRNA U6 y los tRNAs. La RNA Polimerasa III requiere al factor de transcripción TFIIIB para posicionarse en el sitio correcto de inicio de la transcripción. TFIIIB es un heterotrímero compuesto por las subunidades TBP, BDP1 y BRF1. En el presente trabajo se llevó a cabo la caracterización molecular del ortólogo de BRF1 en *T. brucei* (TbBRF1). Mediante análisis *in silico* se encontró que TbBRF1 contiene los tres dominios conservados en otros ortólogos de BRF1 en la mitad N-terminal: un dominio de unión a zinc (*Zn-ribbon*) y dos repetidos de ciclina. Contiene además varios residuos que pueden ser fosforilados y otros residuos conservados que podrían interactuar con las otras subunidades de TFIIIB y algunas subunidades de la RNA Polimerasa III. Estructuralmente, TbBRF1 es una proteína constituida casi exclusivamente de hélices  $\alpha$ . Específicamente cada uno de los repetidos de ciclina está conformado por cinco hélices  $\alpha$  que adoptan una estructura globular. Haciendo uso de una línea celular que expresa una proteína recombinante TbBRF1 fusionada al epítotope PTP, se localizó a la proteína TbBRF1-PTP en el núcleo celular. Para estudiar la función de TbBRF1 se generó una línea celular en la que es posible inducir con doxiciclina el *knock-down* de TbBRF1 por RNAi. Encontramos que la ablación de TbBRF1 produce la muerte celular. Además se demostró que TbBRF1 participa en la transcripción de genes transcritos por la RNA Polimerasa III (rRNA 5S, snRNA U2 y diferentes genes de tRNA). La evidencia presentada nos llevó a la conclusión de que TbBRF1 es efectivamente el ortólogo del factor de transcripción BRF1 en el protozooario parásito *T. brucei*.

## Abstract

*Trypanosoma brucei* is the hemoflagellate protozoan that produces Human African Trypanosomiasis, a disease transmitted by a vector insect that is disseminated in the subsaharan Africa. *T. brucei* is also important for presenting atypical genetic expression mechanisms. In our laboratory we are interested in the study of the RNA Polymerase III transcription, the enzyme responsible for the transcription of the 5S rRNA, U6 snRNA and the tRNA. RNA Polymerase III is recruited to the transcription initiation site by transcription factor TFIIB, which is a heterotrimeric factor composed by the subunits TBP, BDP1 and BRF1. In the present work we performed the molecular characterization of the BRF1 orthologue in *T. brucei* (TbBRF1). It was found by *in silico* analysis that TbBRF1 contains the three conserved domains of other BRF1 orthologues in the N-terminal half: a zinc binding domain (*Zn-ribbon*) and two cyclin repeats. It also contains several conserved residues that could be phosphorylated and that might interact with the other TFIIB subunits and with some subunits of the RNA Polymerase III. We also found that each cyclin repeat is composed by five  $\alpha$  helices that form a globular structure. By analyzing a cell line that expresses TbBRF1 tagged to the PTP epitope, TbBRF1 was localized in the nucleus, as expected for a transcription factor. To study the function of TbBRF1, we generated a TbBRF1 conditional knock-down cell line in which the ablation of TbBRF1 was induced with doxycycline. Our results showed that TbBRF1 is needed for cell viability in *T. brucei* procyclic forms, and that it participates in RNA Polymerase III transcription of 5S rRNA, U2 snRNA and different tRNA genes. Thus, our results show that TbBRF1 is indeed the orthologue of the BRF1 transcription factor in the protozoan parasite *T. brucei*.



## 1. Introducción

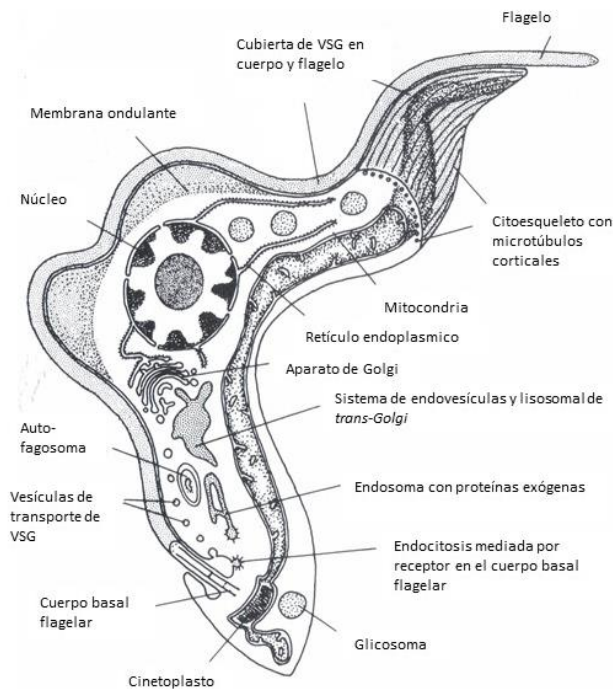
### 1.1. Biología de *Trypanosoma brucei*

*Trypanosoma brucei* es un protozoo flagelado, miembro de la familia *Trypanosomatidae*, clase *Kinetoplastea*, filo *Euglenozoa*. Es el agente causal de la Tripanosomiasis Humana Africana, también conocida como Enfermedad del Sueño. Tiene forma de hoja alargada, con dimensiones aproximadas de 5 x 12  $\mu\text{m}$  (Figura 1). Presenta una mitocondria única que se extiende a lo largo de toda la célula. El DNA mitocondrial está conformado por moléculas de DNA circulares de dos diferentes tamaños (maxicírculos y minicírculos), que se concatenan y empaquetan formando una estructura característica de la clase, denominada cinetoplasto. El parásito realiza la glucólisis de manera exclusiva en organelos especializados denominados glicosomas. El único sitio de membrana celular donde se realiza la endocitosis y la exocitosis se localiza en la base del flagelo, en una estructura denominada bolsa basal flagelar. El axonema del flagelo tiene una configuración típica 9 + 2 y protruye hacia el extremo anterior de la célula, jalando a la célula y dirigiendo su desplazamiento. El flagelo se repliega a lo largo del cuerpo celular formando una extensión de la membrana celular, denominada membrana ondulante, que también sirve para el movimiento. Por debajo de la membrana plasmática se extiende un citoesqueleto estable de microtúbulos subpeliculares altamente entrelazados (Vaughan & Gull, 2008). Su alimentación es saprozoica, y su reproducción es asexual por fisión binaria longitudinal, aunque se ha reportado que hay intercambio de material genético dentro del vector.

#### 1.1.1. Ciclo de vida

El ciclo de vida de *T. brucei* alterna entre el humano y un díptero hematófago del género *Glossina*, conocido como mosca *tse-tse*, que sirve como vector de la enfermedad (Figura 2). El ciclo comienza cuando una mosca infectada se alimenta e inocular tripomastigotes metacíclicos dentro de la herida en la piel por medio de su probóscide. Estos tripomastigotes metacíclicos establecen la infección, en primer lugar en el sistema sanguíneo y linfático, donde se transforman a tripomastigotes sanguíneos y se reproducen. Algunos de estos parásitos invaden el sistema nervioso central y otros permanecen en

circulación. Cuando una mosca se alimenta de un humano infectado, ingiere tripomastigotes sanguíneos que se transforman a tripomastigotes procíclicos en el intestino de la mosca. En este órgano se multiplican, algunos se transforman a epimastigotes y migran hacia las glándulas salivares donde continúan su multiplicación. En estas glándulas se transforman a tripomastigotes metacíclicos y permanecen ahí hasta la siguiente alimentación, cerrando de esta manera el ciclo de vida (Stuart *et al.*, 2008).

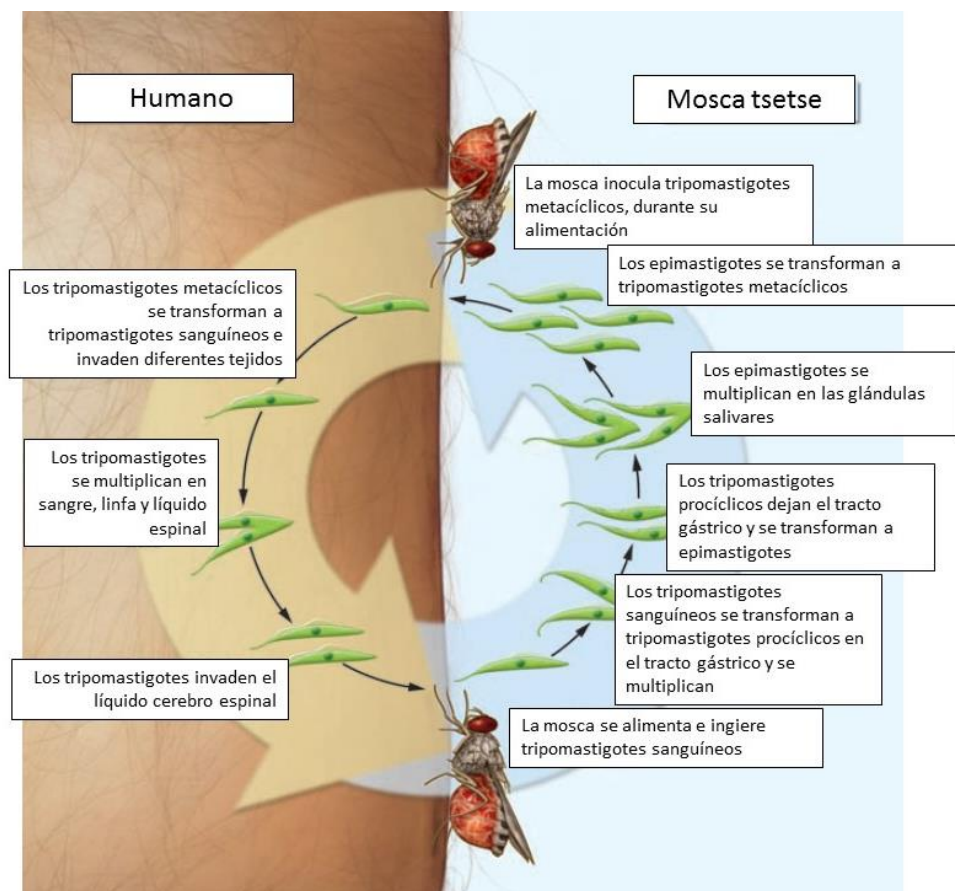


**Figura 1.** Morfología celular de *T. brucei*. El estadio representado es de tripomastigote sanguíneo.

### 1.1.2. Tripanosomiasis Humana Africana

Es una enfermedad tropical transmitida por vector y está catalogada por la Organización Mundial de la Salud (OMS) como una “enfermedad olvidada”. El cuadro clínico de la Tripanosomiasis Humana Africana puede dividirse en tres etapas que están estrechamente relacionadas con el ciclo de vida de *T. brucei*. La primera etapa comienza con la picadura de la mosca. En el sitio de la herida se produce inflamación, a lo que le sigue una enfermedad

febril sin una sintomatología característica que incluye debilidad y pérdida de peso. La segunda etapa inicia cuando los parásitos invaden el sistema nervioso central, atravesando la barrera hematoencefálica. Los parásitos permanecen en el líquido céfalo raquídeo, donde generan síntomas como desórdenes motores, sensoriales e incluso psicológicos. Hacia el final de esta etapa se comienzan a dar alteraciones en los ciclos de sueño-vigilia, de lo que deriva el nombre de la enfermedad. En la etapa tres, el paciente cae en coma y muere (Kennedy, 2013).



**Figura 2.** Ciclo de vida de *T. brucei*. El lado derecho muestra la parte del ciclo de vida que se lleva a cabo en el insecto vector, mientras que el lado izquierdo muestra la parte que acontece en el humano. Modificado de Stuart *et al.*, 2008.

Existen dos subespecies de *T. brucei* que son capaces de infectar al hombre: *T. brucei gambiense* y *T. brucei rhodesiense*. La primera se distribuye en la región centro occidental de África y causa una enfermedad crónica que puede conducir a la muerte en un lapso de



Debido a lo anterior, la investigación debe de recaer en las universidades con proyectos de ciencia básica y aplicada (WHO, 2010).

En nuestro laboratorio estamos interesados en estudiar los mecanismos de expresión genética en *T. brucei*. En particular, nuestro interés está enfocado en el análisis de la transcripción de la RNA Polimerasa III (RNAP-III), la cual sintetiza moléculas de RNA pequeñas que son esenciales para el crecimiento celular.

## **1.2. RNAP-III eucarionte**

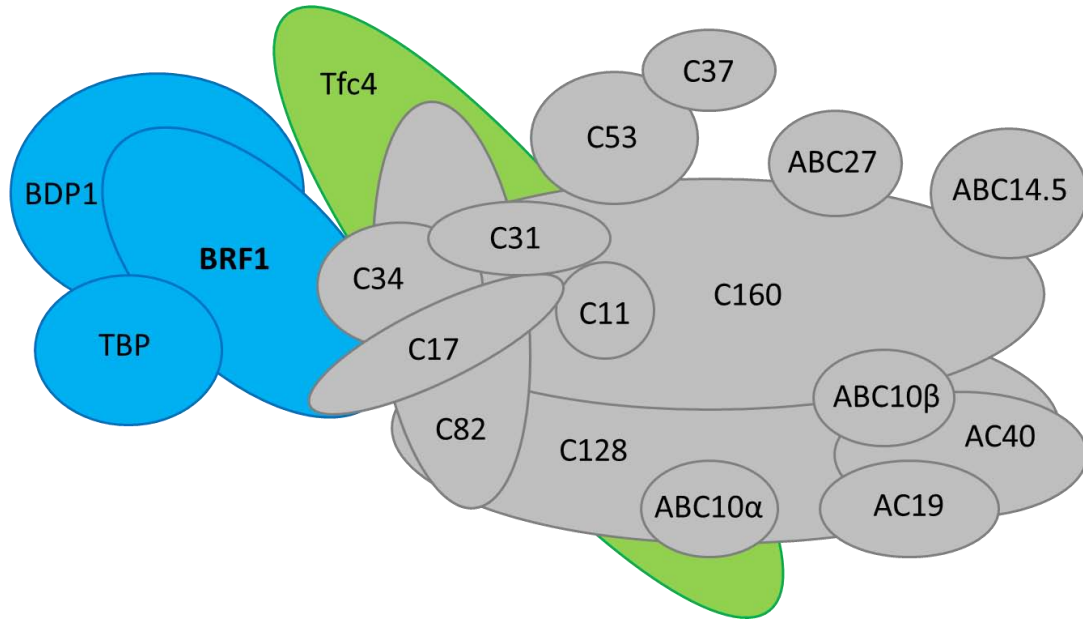
En eucariontes superiores y levadura, la RNAP-III está formada por 17 subunidades (Figura 4), lo que la hace la más grande de las tres RNA Polimerasas nucleares, con dimensiones de 170 x 150 x 130 Å (Fernández-Tornero *et al.*, 2007) y un peso de 7.0 MDa (Cramer, 2006) (Tabla 1). RNAP-III se encarga de la transcripción del rRNA 5S, los tRNA, el snRNA U6, además de una variedad de otros transcritos no codificantes que llevan a cabo diferentes funciones en la célula. Se podría decir que la RNAP-III está especializada en la transcripción a gran escala de transcritos cortos, ya que la mayoría de los genes que transcribe no tienen una longitud mayor a 150 pb.

La diversidad de transcritos que genera se podría posicionar entre la RNA Polimerasa I (RNAP-I), que primordialmente transcribe a los genes del rRNA, y la RNA Polimerasa II (RNAP-II), que transcribe todos los genes codificadores de proteínas. Se ha observado que es medianamente sensible a la  $\alpha$ -amanitina (Willis, 1993). En células HeLa, RNAP-III se distribuye en aproximadamente 2,000 sitios focalizados en el nucleoplasma, cada uno de aproximadamente 40 nm de diámetro, conteniendo en promedio 5 moléculas activas de RNAP-III.

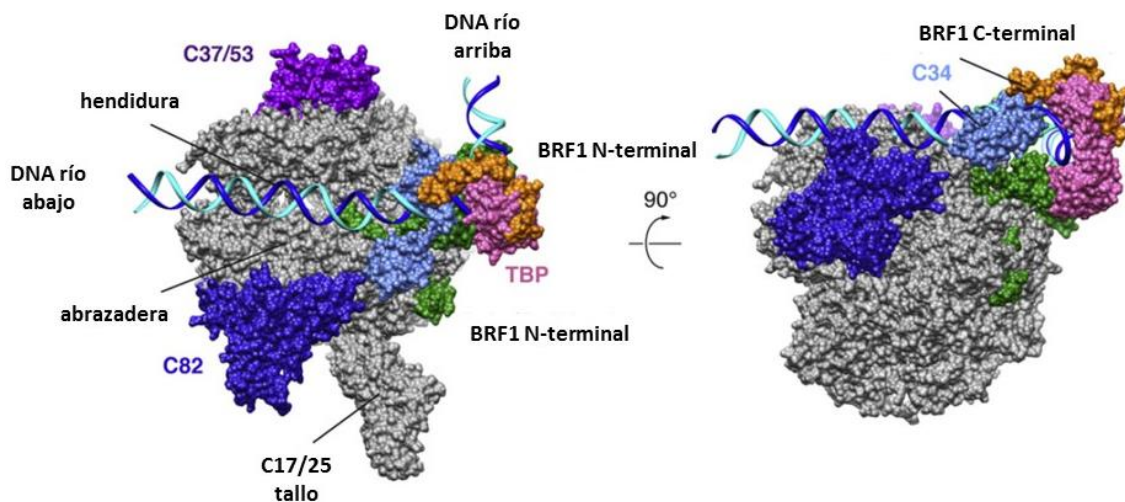
### **1.2.1. Composición y estructura**

Algunas de las subunidades de la RNAP-III son homólogas a las de la RNAP-I y la RNAP-II (Tabla 1). Las dos subunidades mayores, C160 y C128, contienen el centro activo de la RNAP-III. Existe un heterotrímero (C82/C34/C31) exclusivo de la RNAP-III que, debido a su participación en el inicio de la transcripción, se le ha catalogado como un subcomplejo de

inicio de la transcripción (Dieci *et al.*, 2013). Este interactúa de manera estrecha con el factor de transcripción TFIIB para posicionar a la RNAP-III en el sitio de inicio de la transcripción (SIT) (Figura 5) (Geiduscheck & Kassavetis, 2001).



**Figura 4.** Subunidades de RNAP-III eucariote. Las subunidades de la RNAP-III se muestran en gris, por simplicidad se omiten las subunidades C25 y ABC23. TFIIB se muestra en azul y la subunidad Tfc4 de TFIIC en verde. Los colores coinciden con los de la Figura 7 pero la orientación es diferente. Modificado de Geiduscheck & Kassavetis, 2001.



**Figura 5.** Topología de RNAP-III. Se puede apreciar la cercana interacción de TFIIB, particularmente TBP, con el DNA. El color de las diferentes subunidades, no corresponde con el color de las Figuras 4 y 7. Modificado de Vannini & Cramer, 2012.

RNA Polimerasa	RNAP-I	RNAP-II	RNAP-III
Núcleo del complejo	A190	B220	C160
	A135	B450	C128
	AC40	B44	AC40
	AC19	B12.5	AC19
	ABC23	ABC23	ABC23
Subunidades compartidas	ABC27	ABC27	ABC27
	ABC14.5	ABC14.5	ABC14.5
	ABC10 $\alpha$	ABC10 $\alpha$	ABC10 $\alpha$
	ABC10 $\beta$	ABC10 $\beta$	ABC10 $\beta$
Subunidades homólogas	A12.2	B12.6	C11
	A14	B32	C17
	A43	B16	C25
Subunidades específicas	A49	--	--
	A34.5	--	--
	--	--	C82
	--	--	C53
	--	--	C37
	--	--	C34
	--	--	C31
Número total de subunidades	14	12	17

**Tabla 1.** Subunidades de las tres RNA Polimerasas nucleares eucariontes, tomando como modelo a *Saccharomyces cerevisiae*. Modificado de Cramer *et al.*, 2008.

### 1.2.2. Transcritos

RNAP-III transcribe al rRNA 5S y al snRNA U6, componentes estructurales y catalíticos de los ribosomas y la maquinaria de *splicing*, respectivamente. También transcribe a todos los tRNA, moléculas acarreadoras de los aminoácidos durante la síntesis de proteínas. Además

de estos transcritos clásicos, existen numerosos transcritos no codificantes que son generados por esta RNA Polimerasa, entre éstos se incluye (Dieci *et al.*, 2007):

1. RNA de la RNasa P, una endoribonucleasa que procesa el extremo 5' de los pre-tRNA;
2. RNA de la RNasa mitocondrial MRP, involucrada en el procesamiento de RNA;
3. ncRNA 7SL, molécula que forma el andamio de la partícula de reconocimiento del péptido señal;
4. sRNA crípticos, componentes ribonucleicos de ribonucleoproteínas (RNP, por sus siglas en inglés) involucradas en ensamblaje macromolecular y/o transporte;
5. RNA Y, componente de la RNP Ro;
6. RNA 7SK, identificado únicamente en vertebrados, el cual reprime la transcripción de la RNAP-II impidiendo la elongación;
7. sRNA BC1 y BC200, sRNA específicos de roedor y humano, respectivamente, expresados en células nerviosas, presentes como RNP y probablemente involucrados en traducción;
8. RNAs virales con promotores para RNAP-III;
9. sRNA SINE, retrotransposones no autónomos originarios de genes transcritos por RNAP-III.

### **1.2.3. Promotores**

Existen tres tipos principales de promotores para la RNAP-III, con la notoriedad que dos de ellos presentan elementos intragénicos, es decir, río abajo del SIT (considerado como la posición +1) (Figura 6) (White, 2011).

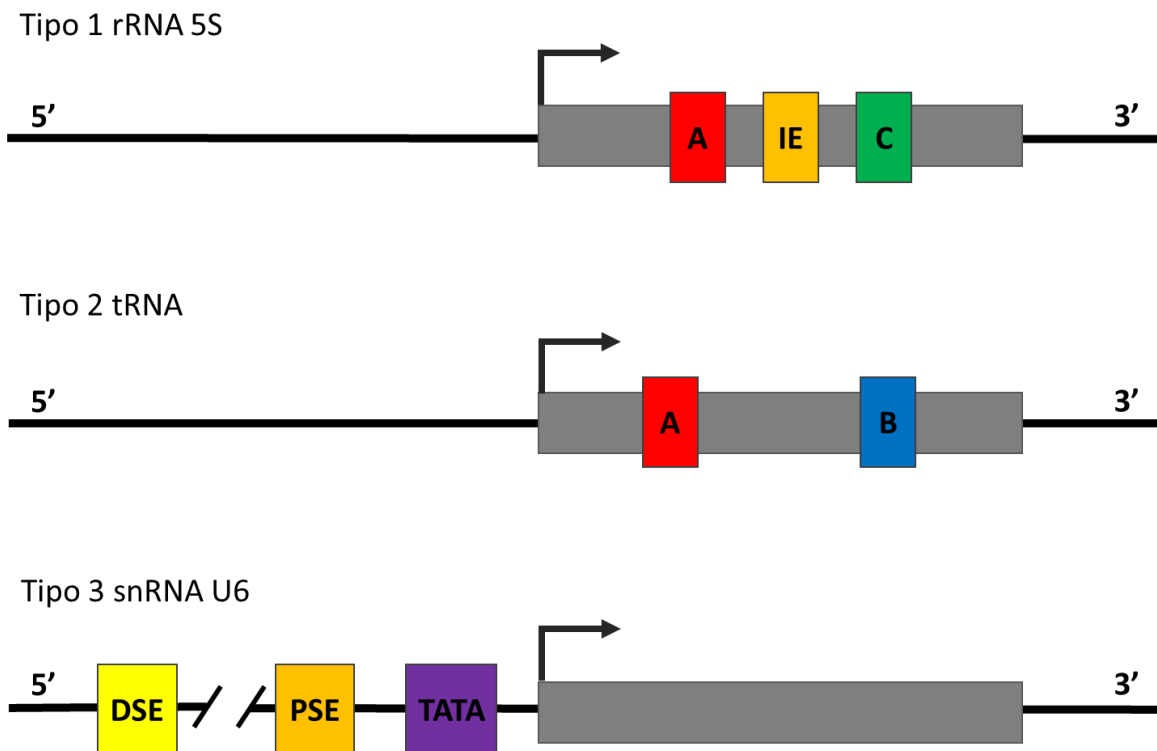
El promotor tipo I es característico del rRNA 5S, y está constituido por dos cajas (A y C) ubicadas dentro del gen. La caja A se posiciona entre +50 y +64, y la caja C se posiciona entre +80 y +97, siendo importante la distancia entre ellas. Entre ambas cajas existe una secuencia llamada Elemento Intermedio (EI).

El promotor tipo II es característico de genes de tRNA. Está constituido por dos cajas (A y B) altamente conservadas y ubicadas dentro del gen. Las cajas A de los promotores tipo I y II son homólogas y en algunas ocasiones son funcionalmente intercambiables; pero en el tipo



II se encuentran más cerca del SIT. La distancia de la caja B respecto a la caja A es altamente variable, siendo generalmente de 30 a 60 pb.

El promotor tipo III es característico del gen del snRNA U6. A diferencia de los otros dos tipos, este promotor no tiene elementos intragénicos, pues está constituido por una caja TATA entre -30 y -25, un Elemento de Secuencia Proximal (PSE, por sus siglas en inglés) entre -66 y -46, y en Elemento de Secuencia Distal (DSE, por sus siglas en inglés) entre -244 y -214.



**Figura 6.** Principales promotores para RNAP-III eucariote. Las flechas indican el sitio de inicio de la transcripción. A, B, C y TATA corresponden a las cajas A, B, C y TATA, respectivamente. IE, Elemento Intermedio. DSE, Elemento de Secuencia Distal. PSE, Elemento de Secuencia Proximal. Los recuadros grises son los genes. La figura no está a escala.

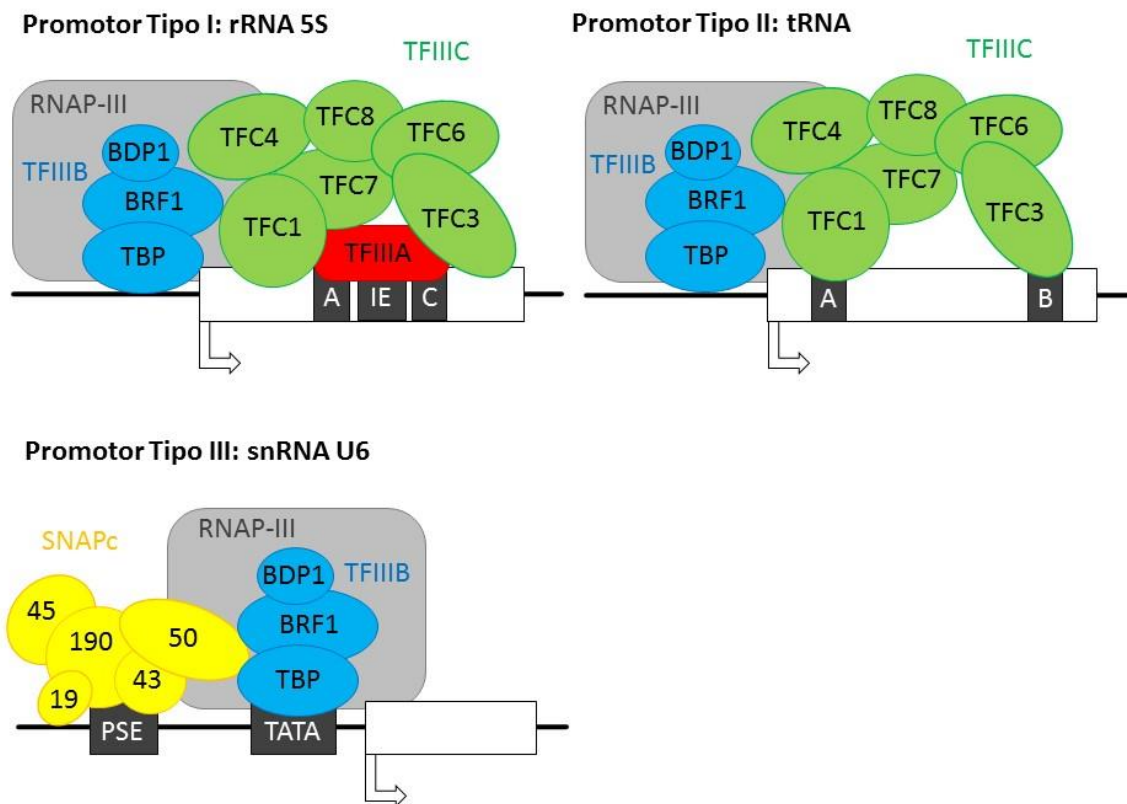
#### 1.2.4. Factores de transcripción

RNAP-III utiliza cuatro factores de transcripción principales: TFIIIA, TFIIC, SNAPc y TFIIB (Figura 7) (Schramm & Hernandez, 2002; Acker *et al.*, 2013).

TFIIIA es la proteína arquetipo de dedos de zinc del tipo Cys2-His2. Este factor de transcripción funciona exclusivamente para la transcripción del rRNA 5S (promotor tipo I), reconociendo y uniéndose a las cajas A y C y al Elemento Intermedio, proporcionando de esta manera una plataforma sobre la cual se puede unir TFIIIC y posteriormente TFIIIB.

TFIIIC es un factor de transcripción compuesto por seis subunidades (Tfc1, Tfc3, Tfc4, Tfc6, Tfc7 y Tfc8). En los promotores tipo I se une después de que TFIIIA se ha unido a las cajas A y C. En los promotores tipo II (tRNA), TFIIIC reconoce y se une a las cajas A y B. En ambos casos la función de TFIIIC es la de proporcionar un punto de anclaje para TFIIIB.

SNAPc es un factor de transcripción formado por 5 subunidades (SNAP19, SNAP43, SNAP45, SNAP50 y SNAP190). Participa en la transcripción del snRNA U6 (promotor tipo III), reconociendo y uniéndose a los PSE y DSE del promotor, permitiendo la unión de TFIIIB.



**Figura 7.** Unión de los factores de transcripción a los diferentes promotores para RNAP-III. Los puntos de interacción son aproximados. La figura no está a escala. Modificado de Vannini, 2012.

#### **1.2.4.1. TFIIB**

TFIIB participa en la transcripción de todos los tipos de promotores que transcribe la RNAP-III, y su función es la de anclar a la RNAP-III en el sitio correcto para iniciar la transcripción en el SIT y también participa en la apertura de la cadena de DNA (Figura 7). Está conformado por tres subunidades: la proteína de unión a la caja TATA (TBP, por sus siglas en inglés), la proteína BDP1 y el factor 1 relacionado a TFIIB (BRF1, por sus siglas en inglés); todas necesarias para la función de TFIIB y la transcripción de la RNAP-III. Como habría de esperarse, la subunidad TBP reconoce y se une a la caja TATA de los promotores tipo III de snRNA U6. En los promotores que no tienen caja TATA, TFIIB no puede unirse al DNA sin la ayuda de otros factores de transcripción (Juo *et al.*, 2003; Kassavetis & Geiduscheck, 2006).

Al participar en la transcripción de todos los genes transcritos por la RNAP-III, existen diferentes mecanismos de regulación de la transcripción de la RNAP-III. Por ejemplo, la proteína Maf1 es un regulador negativo de la transcripción de la RNAP-III, el cual se activa en respuesta a diversas señales de estrés como estivación, tratamiento con rapamicina, defectos secretores o daño al DNA. Maf1 ejerce su función a través de dos mecanismos: el ensamblaje del complejo TFIIB-DNA y el reclutamiento de RNAP-III a los complejos TFIIB-DNA preexistentes. La transcripción de RNAP-III y la regulación negativa de Maf1 están ligadas a diversas vías de transducción de señales (Boguta, 2013).

##### **1.2.4.1.1. BRF1**

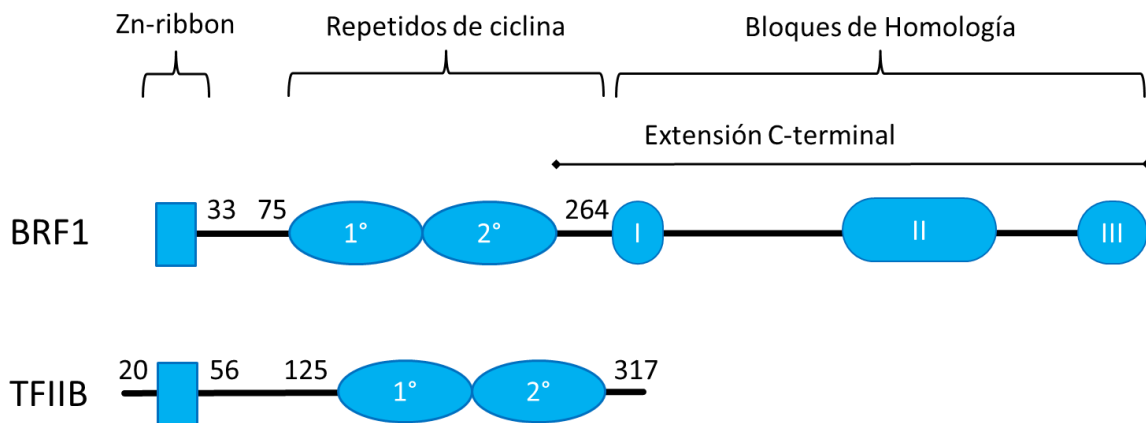
BRF1 es miembro de la familia de factores de transcripción TFIIB-like, junto con TFIIB (RNAP-II), Rrn7 o TAF1B (RNAP-I) y ATFB o TFB (un factor de transcripción de *Archaea*). Todas estas proteínas comparten tres dominios característicos bien definidos: un *Zn-ribbon* y dos repetidos de ciclina (Figura 8). En el caso particular de BRF1, estos tres dominios representan lo que se conoce como la mitad N-terminal, ya que BRF1 presenta una extensión hacia el extremo C-terminal (Lopez-de-Leon *et al.*, 1992; Kassavetis *et al.*, 1997). Esta mitad C-terminal no está conservada entre ortólogos de BRF1. Sin embargo, en levaduras y humanos se han delimitado en esta mitad tres regiones semiconservadas denominadas bloques de homología I a III (Figura 8) (Saxena *et al.*, 2005).

El *Zn-ribbon* es un pequeño motivo, dentro de cuya secuencia hay cuatro residuos básicos que sirven para coordinar a un catión de zinc, de ahí deriva el nombre que recibe este dominio. La función de este dominio es estabilizar el complejo DNA-proteína (Chen *et al.*, 2000; Gibson *et al.*, 1994; Hahn & Roberts, 2000).

Los repetidos de ciclina están arreglados en tándem uno detrás del otro. Se denominan de esta forma debido a que presentan la misma estructura de cinco hélices  $\alpha$ , en un arreglo globular, presente en las ciclinas y en la proteína retinoblastoma. La función de este dominio es establecer interacciones proteína-proteína con subunidades de la RNAP-III y TFIIC (Noble *et al.*, 1997).

Mientras que en la mayoría de los eucariontes BRF1 participa en la transcripción de todos los genes transcritos por la RNAP-III, en humano existe una variable llamada BRF2 que participa en la transcripción de genes con promotores tipo III (Schramm *et al.*, 2000).

BRF1 interactúa directamente con las subunidades de RNAP-III: C160, C128, C34 y C17, y con las subunidades de TFIIC: Tfc1, Tfc4 y Tfc8. BRF1 es esencial para la función de TFIIB y por ende de la RNAP-III (Kassavetis *et al.*, 1997; Moir *et al.*, 2002; Khoo *et al.*, 2014).



**Figura 8.** Dominios de BRF1. Se señala cual es la región equivalente con TFIIB y las posiciones aproximadas del inicio y término de cada dominio.

### **1.3. Características atípicas de expresión genética en *T. brucei***

Además de la importancia en el área de salud pública, inherente a *T. brucei*, este parásito es interesante por poseer mecanismos atípicos de expresión genética. Muchos de éstos rompen paradigmas que se tiene bien establecidos para eucariontes y por ende representan una interesante fuente de información respecto a la evolución temprana del dominio *Eukarya* (Campbell *et al.*, 2003; Martínez-Calvillo *et al.*, 2010).

#### **1.3.1. Organización genómica**

El genoma nuclear de *T. brucei* tiene un tamaño de 26 - 35 megabases, y está constituido por tres tipos diferentes de cromosomas: los megacromosomas, los cromosomas intermedios y los minicromosomas. El parásito presenta 11 megacromosomas diploides que tienen un tamaño de 0.9 a 6 Mb, y que representan el ~60% del genoma. Éstos contienen todos los genes de mantenimiento y están relativamente bien conservados entre diferentes subespecies y cepas. Los cromosomas intermedios constituyen el ~30% del genoma, son poliploides, pues su número varía entre 1 y 7, y su tamaño está en el rango de 200 a 700 kb. Los minicromosomas constituyen el ~10% del genoma, son poliploides (aproximadamente 100 copias), y su tamaño está en el rango de 30 a 150 kb. La estructura de los cromosomas intermedios y los minicromosomas es similar, pues en ambos existe una secuencia repetida de 177 pb cerca del centrómero (Berriman *et al.*, 2005; Gunzl *et al.* 2007; Maree & Patterton, 2014).

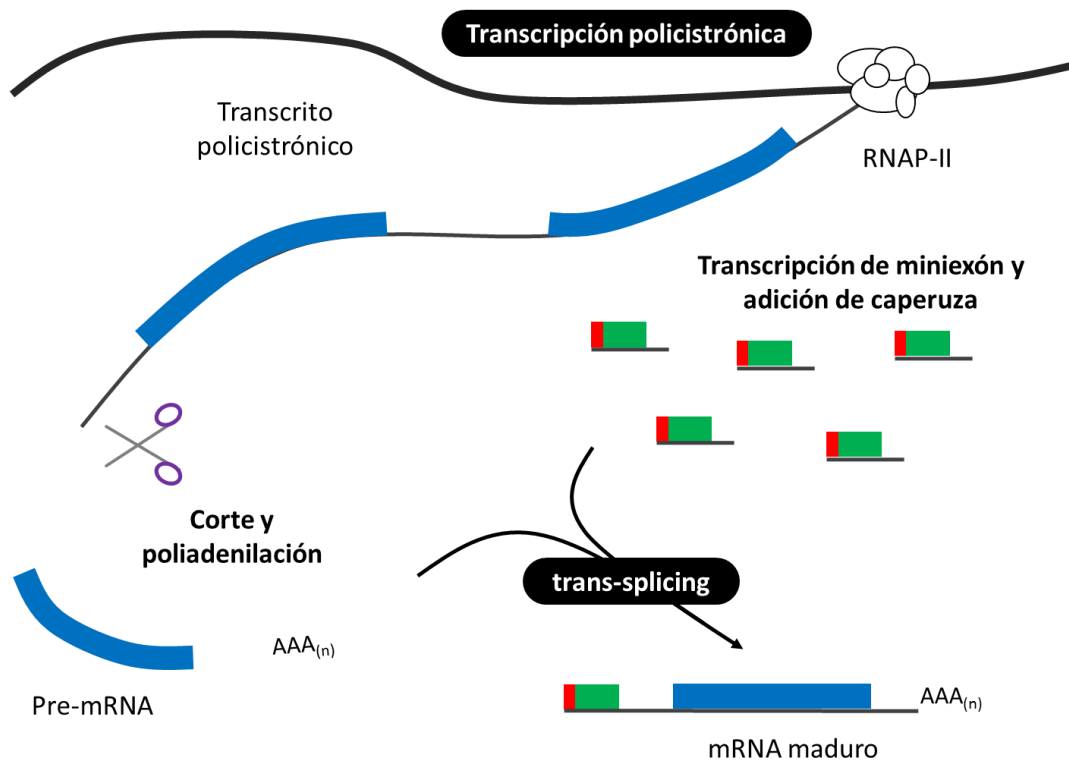
#### **1.3.2. Transcripción policistrónica**

El genoma de *T. brucei* está organizado en unidades policistrónicas. Éstas son arreglos de decenas a cientos de genes codificadores de proteínas, no relacionados funcionalmente entre sí, que se localizan en la misma cadena de DNA y que son transcritos conjuntamente como una sola unidad transcripcional (Figura 9). Como en el resto de los eucariontes, la RNAP-II es la encargada de la transcripción de estos grupos de genes. Una característica notable de la RNAP-II de *T. brucei* es su mayor procesividad para poder permanecer unida a la hebra de DNA templado y transcribir por varias kilobases. El inicio de la transcripción se da principalmente en los sitios donde divergen dos unidades policistrónicas y el término de

la transcripción se da donde convergen dos unidades policistrónicas (Martínez-Calvillo *et al.*, 2003).

### 1.3.3. *Trans-splicing*

Los transcritos policistrónicos, que contienen los precursores de los mRNAs, son procesados mediante *trans-splicing* y poliadenilación para generar los mRNA maduros que luego serán traducidos para generar las proteínas codificadas. El *trans-splicing* consiste en la adición de un oligonucleótido de RNA de 39 bases, el miniexón o *spliced-leader* (SL), al extremo 5' de todos los Pre-mRNAs. El miniexón presenta en su extremo 5' una caperuza modificada tipo cap 4 ( $m^7Gpppm^{6,2}AmpAmpCmpm^3Um$ ), que confiere estabilidad al mRNA. La maduración de los Pre-mRNAs termina cuando se agrega la cola de poli adeninas en su extremo 3' (Figura 9).



**Figura 9.** Transcripción policistrónica y *trans-splicing*. Cada cistrón (gen) es escindido, se le agrega la cola de poliadeninas en el extremo 3' y el miniexón (ncRNA SL) con la caperuza en el extremo 5', para generar los mRNA maduros.

En el genoma de *T. brucei* hay de 100 a 200 copias del gen del miniexón agrupadas en tándem, cuya transcripción representa el 6% de los transcritos totales producidos dentro de la célula. Los genes del miniexón son transcritos por la RNAP-II, y poseen el único promotor de esta RNA Polimerasa caracterizado a la fecha en los tripanosomátidos (Gilinger & Bellofatto, 2001; Michaeli, 2011).

#### **1.3.4. Transcripción de genes codificadores por la RNAP-I**

Una característica notable de *T. brucei* es la capacidad de la RNAP-I de transcribir genes codificadores de proteínas, además de transcribir los genes del rRNA como en el resto de los organismos eucariontes. Los genes en cuestión codifican para proteínas de superficie específicas para los dos estadios principales de *T. brucei*: las Glicoproteínas Variables de Superficie (VSG, por sus siglas en inglés) y las prociclinas. En las formas sanguíneas del humano, las VSG son la principal proteína antigénica de *T. brucei* y son responsables de los picos de parasitemia. En un momento determinado se expresa sólo una VSG, cada vez que el sistema inmunitario monta una respuesta inmune humoral hacia esta VSG, la población de parásitos desciende al mínimo. Entonces se cambia el tipo de VSG que se expresa, lo que da origen a un rápido incremento en el número de parásitos, al no haber anticuerpos que reconozcan este nuevo tipo de VSG. Las prociclinas realizan una función análoga en las formas procíclicas, dentro del insecto vector. Se sugiere que la RNAP-I es la responsable de la transcripción de estos genes codificadores de proteínas, porque presenta la mayor tasa transcripcional de las tres RNA Polimerasas nucleares (Zomerdiik *et al.*, 1991).

## 2. Antecedentes

### 2.1. Regulación de la transcripción de la RNAP-III

Entre las unidades policistrónicas del genoma de *T. brucei* se encuentran diversos genes de tRNA, rRNA 5S y snRNA. Es importante destacar que en *T. brucei* todos los genes de snRNA (U1 a U6) son transcritos por la RNAP-III, mientras que en el resto de los eucariontes únicamente el snRNA U6 es transcrito por esta RNA Polimerasa.

En *T. brucei* la transcripción de los genes snRNA y ncRNA 7SL requiere de cajas A y B de genes de tRNA que son transcritos de manera divergente o genes similares a tRNA (*tRNA-like*) localizados aproximadamente 100 nucleótidos río arriba (Figura 10). En algunos casos se requieren secuencias internas cerca del SIT, lo que sigue una estructura de promotor distinta a la de snRNAs en eucariontes superiores (Fantoni *et al.*, 1994).

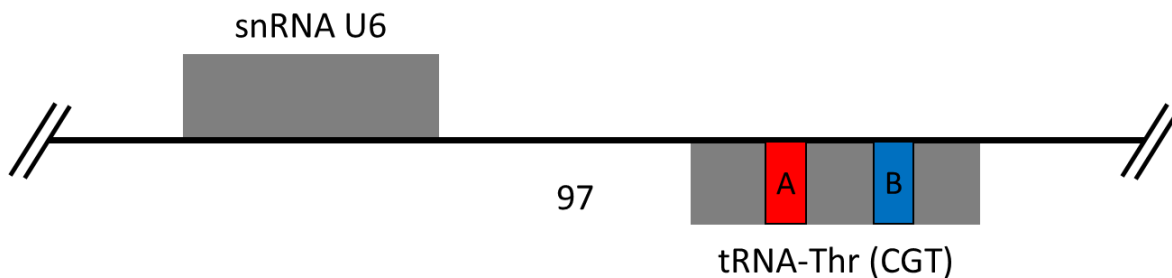


Figura 10. Arreglo de un *cluster* tRNA/snRNA. Nakaar *et al.*, 1997.

### 2.2. rRNA 5S

En *T. brucei* los genes del rRNA 5S están arreglados en repetidos en tándem (Lenardo *et al.*, 1985). Estos repetidos de 750 pb, los cuales son inusualmente largos comparados con otros eucariontes, contienen únicamente un gen. Los polimorfismos encontrados son similares a otros organismos y las secuencias de control internas detectadas están localizadas en los sitios esperados (Cordingley, 1985). No obstante de estas similitudes, en estos repetidos existe una base nitrogenada modificada denominada base J; misma que probablemente



está involucrada en represión génica (van Leeuwen *et al.*, 2000). En *Trypanosoma cruzi* se ha calculado que existen 1,600 copias del rRNA 5S organizadas también en repetidos en tándem de 481 pb. La región que codifica para el rRNA 5S es de 120 pb y contiene las regiones de control internas convencionales. En algunas de las regiones espaciadoras hay señales putativas de término de la transcripción y sitios homólogos a la secuencia consenso de unión al factor de transcripción Sp1 (Hernández-Rivas *et al.*, 1992). A diferencia de *T. brucei* y *T. cruzi*, *Leishmania major* (quien también pertenece a la familia *Trypanosomatidae*) presenta sólo 11 genes del rRNA 5S, y éstos no se encuentran organizados en tándem, sino distribuidos al azar en el genoma del parásito (Ivens *et al.*, 2005).

El rRNA 5S de *T. brucei* se asocia con la proteína L5, formando un complejo análogo al 7S RNP de células de mamífero (Michael & Agabian, 1990). Además, otras dos proteínas, denominadas p34 y p37, se asocian con el rRNA 5S de manera específica (Pitula *et al.*, 2002a; Pitula *et al.*, 2002b); dichas proteínas estabilizan al rRNA 5S (Hellman *et al.*, 2007) y participan en el transporte del rRNA 5S y biogénesis ribosomal (Prohaska & Williams, 2009).

### **2.3. tRNA**

*T. brucei* tiene 66 genes de tRNA distribuidos en 26 *loci* de 8 diferentes cromosomas; 40 (61.5%) están en 3 cromosomas (4, 7 y 8). El número de genes de tRNA por grupo es de 2 a 10. Once de los 66 genes son genes sencillos, no asociados a otros genes de la RNAP-III.

*T. brucei*, *T. cruzi* y *L. major* poseen varios genes isodecodificadores de tRNA (presentan el mismo anticodón pero diferentes secuencias en el resto de la estructura). Algunas de las diferencias se encuentran en los elementos promotores internos, lo que sugiere un control diferencial en la expresión de tRNA isodecodificadores. La distribución genómica de los genes de tRNA en *L. major* parece ser no totalmente aleatoria, como en la mayoría de los organismos (Padilla-Mejia *et al.*, 2009). Lo anterior podría tener un papel importante en la organización genómica dentro del núcleo.

El gen de tRNA-Tyr de *T. brucei* contiene un intrón de 11 nucleótidos de largo, que es removido en su proceso de maduración (Schneider *et al.*, 1993). En *T. cruzi*, oligonucleótidos

derivados de la mitad 5' de tRNA maduros se generan y acumulan en gránulos citoplasmáticos. Este fenómeno al parecer no es consecuencia de la degradación inespecífica, sino un proceso controlado. Los oligonucleótidos generados podrían estar alimentando una maquinaria alternativa de interferencia de RNA (Garcia-Silva *et al.*, 2010). Por otro lado, un gen de tRNA separa las dos unidades policistrónicas convergentes del cromosoma 3 de *L. major* (Worthey *et al.*, 2003). Este gen está involucrado en el término de la transcripción de las unidades policistrónicas. Además, diferentes evidencias indican que los genes de tRNA participan no solamente en el término de la transcripción de RNAP-II, sino también de RNAP-I (Martínez-Calvillo *et al.*, 2004).

Una característica atípica de los tRNA en tripanosomátidos es que en el genoma mitocondrial no hay genes para estas moléculas de RNA. Por tal motivo todos los tRNA que se requieren para la síntesis de proteínas en la mitocondria tienen que ser importados desde el núcleo celular.

#### **2.4. Otros transcritos**

En algunos protistas los genes de los RNA P y MRP están en tándem, evidenciando la relación evolutiva que existe entre ellos. El componente ribonucleico de la RNasa P de *T. brucei* es indispensable para la función de la enzima en cuestión. El ncRNA 7SL de *T. brucei* es similar en secuencia y estructura secundaria al ortólogo de humano.

#### **2.5. Factores de transcripción y otras proteínas involucradas en la función de la RNAP-III**

De los factores de transcripción generales de la RNAP-III (TFIIIA, TFIIB, TFIIC y SNAPc), en *T. brucei* no han sido identificados ni TFIIIA ni TFIIC. Por su parte, SNAPc está conformado por 3 subunidades en este parásito, las cuales ya han sido estudiadas. De manera similar, el ortólogo de TBP (conocido como TRF4, por Factor 4 Relacionado a la proteína de unión a la caja TATA), ya ha sido caracterizado (Ruan *et al.*, 2004; Das *et al.*, 2005).

Además, en *T. brucei* se ha identificado y caracterizado parcialmente a la proteína "La" (Dong *et al.*, 2004). Ésta se une al extremo 3' de los transcritos recién sintetizados de la

RNAP-III y participa en el procesamiento (remoción de intrón) del tRNA-Tyr (Foldynová-Tratírková *et al.*, 2005). “La” se une al tRNA-Met de elongación, permitiendo que este tRNA se pueda acumular en la célula; lo que tiene consecuencias importantes en la traducción y en la proliferación celular. Aparte de esta proteína, también se ha identificado y caracterizado a una exonucleasa que participa en el procesamiento del extremo 3’ del rRNA 5S, snRNA U2 y U4 y en la estabilización del snRNA U3 y U2.

### **2.5.1. Identificación de TbBRF1**

En 2006, Palenchar *et al.* y Schimanski *et al.* identificaron y caracterizaron al ortólogo de TFIIB en *T. brucei* (TbTFIIB). Concluyeron que se trataba de un TFIIB atípico por la ausencia del segundo repetido de ciclina y confirmaron que este factor de transcripción era necesario e indispensable para la transcripción de los genes del ncRNA SL. Consecuentemente, también concluyeron que se trata de una proteína esencial para la supervivencia de *T. brucei*.

En 2009, Ibrahim *et al.*, concluyeron que la región equivalente al segundo repetido de ciclina en el ortólogo de TFIIB en *T. brucei* era atípica en secuencia y estructura, respecto a otros ortólogos de TFIIB. La región en cuestión adopta una estructura de hélices  $\alpha$ , pero sin tener la conformación típica de cinco hélices  $\alpha$  por motivo de ciclina. Además se reportó que el *linker* que une al primer repetido con el segundo, es también una hélice  $\alpha$  y no una secuencia sin estructura definida.

En 2005, Schimanski *et al.*, utilizaron la técnica de purificación por afinidad en tándem, usando como anzuelo a TBP (TRF4), para purificar y estudiar a la RNAP-II. Sin embargo, como TBP también es un componente de TFIIB, purificaron e identificaron al ortólogo de BRF1 en *T. brucei*. No obstante, no se continuó con su estudio, hasta el presente trabajo. A la proteína en cuestión se le ha denominado TbBRF1 y el presente trabajo versa en su análisis bioinformático y funcional.

### **3. Objetivos**

#### **3.1. Objetivo general**

Caracterizar molecularmente al factor de transcripción TbBRF1 en el protozoario parásito *T. brucei*.

#### **3.2. Objetivos particulares**

- Analizar la secuencia y la estructura de TbBRF1 mediante programas bioinformáticos.
- Generar líneas celulares en las que se induzca el *knock-down* de TbBRF1 por medio de RNA de interferencia.
- Analizar los efectos de los *knock-down* de TbBRF1 en el crecimiento celular y en la transcripción.
- Determinar la localización celular de TbBRF1.

#### 4. Metodología

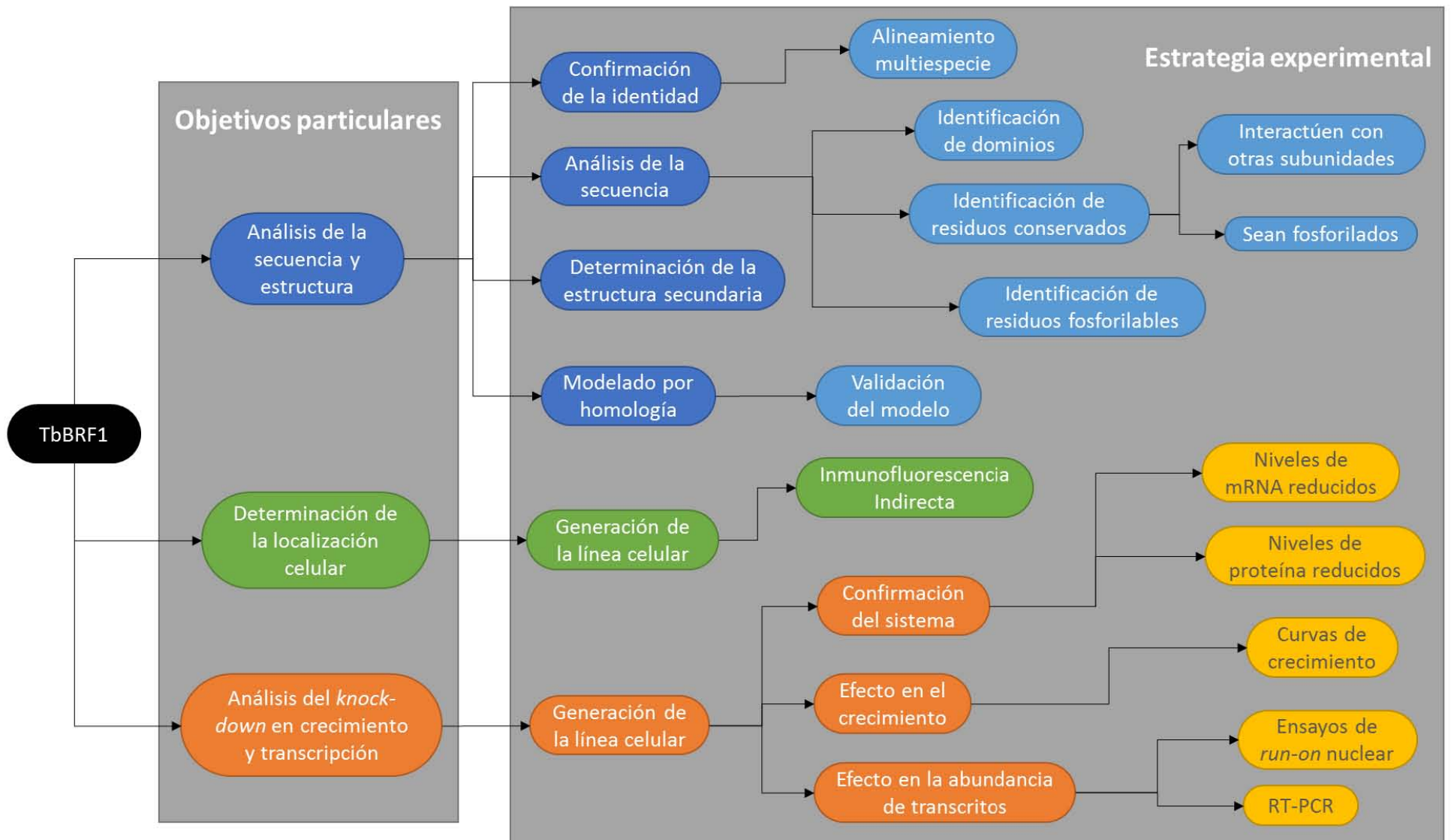


Figura 11. Esquema general del proyecto.

#### 4.1. Análisis bioinformáticos

Estos análisis se dividieron en (Figura 11):

- a) Alineamiento de ortólogos
- b) Identificación de dominios conservados
- c) Análisis filogenético
- d) Identificación de residuos conservados
- e) Predicción de la estructura secundaria
- f) Análisis de sitios putativos de fosforilación
- g) Identificación de señal de localización nuclear
- h) Modelado por homología

Para el alineamiento se identificaron y obtuvieron los ortólogos de TbBRF1 en la base de datos del NCBI y la base de datos de TrityDB (<http://tritypdb.org/tritypdb/>). Las secuencias se alinearon usando el programa Clustal  $\Omega$  (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>).

La identificación de los dominios conservados se realizó con SMART 7 (<http://smart.embl-heidelberg.de/>), InterPro Scan 5 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/pfa/iprscan/>), Pfam (<http://pfam.sanger.ac.uk/>) y Superfamily 1.75 (<http://supfam.org/SUPERFAMILY/hmm.html>).

El análisis filogenético consistió en la construcción de un árbol filogenético, se realizó siguiendo un protocolo similar al de Knutson, 2013 para estudiar proteínas TFIIIB-*like* en plantas. Las secuencias incluidas en el árbol fueron alineadas con ClustalX 2.1, los alineamientos fueron editados manualmente con el programa Seaview 4, y el programa MEGA 6 fue utilizado para elaborar los árboles filogenéticos mediante modelos de máxima probabilidad, distancia y evolución mínima, usando 500 *bootstraps*.

La identificación de residuos conservados se realizó mediante una búsqueda bibliográfica de trabajos donde se hubieran realizado mutaciones puntuales para caracterizar la

interacción con las otras subunidades de TFIIB (TBP y BDP1) y subunidades de la RNAP-III o su estado de fosforilación.

Para la predicción de estructura secundaria, la secuencia de TbBRF1 se analizó con los programas 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/) y CFSSP (http://www.biogem.org/tool/chou-fasman/). El análisis de fosforilación se realizó utilizando el programa específico para tripanosomátidos PhosTryp (http://phostryp.bio.uniroma2.it/) (Palmeri *et al.*, 2011).

El modelado por homología se realizó utilizando SWISS-MODEL (http://swissmodel.expasy.org/interactive) y Phyre 2 (http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/html/page.cgi?id=index) y la estructura obtenida se editó utilizando el Swiss-PDBViewer (http://www.expasy.org/spdbv/); para validar la estructura generada se usó el programa Mod Eval (http://modbase.compbio.ucsf.edu/evaluation/).

La identificación de la señal de localización nuclear se realizó en dos pasos: 1) inicialmente se hizo una revisión bibliográfica de trabajos donde se hubieran identificado señales de localización nuclear en otros tripanosomátidos y 2) posteriormente se alinearon dichas secuencias con la secuencia de TbBRF1.

#### **4.2. Cultivo de *T. brucei***

Se utilizaron tripomastigotes procíclicos de la cepa de *Trypanosoma brucei* 427 / 29-13 (Wirtz *et al.*, 1999). Se cultivaron en medio SDM-79 complementado con 10% de suero fetal bovino. Se incubaron a 28°C y en las clonaciones por dilución en serie se incubaron con 5% de CO<sub>2</sub>.

### **4.3. Generación de construcciones**

#### **4.3.1. Clonación molecular**

Todos los insertos o fragmentos de interés se clonaron en primer lugar en el vector comercial pGEM®-T Easy de Promega. Posteriormente se secuenciaron en una o ambas direcciones y se subclonaron en los distintos vectores donde serían ulteriormente utilizados.

##### **4.3.1.1. Amplificación por PCR**

La amplificación del fragmento para RNA de interferencia (RNAi) y de los diversos fragmentos que se utilizaron en los ensayos de *run-on*, se realizó con una DNA polimerasa convencional (KAPA Taq de Kapa Biosystems). La amplificación del marco de lectura de TbBRF1 para expresar una proteína recombinante fusionada a una cola de poli histidinas, utilizó una DNA polimerasa de alta fidelidad (KAPA HiFi HS DNA Polymerase de Kapa Biosystems). En ambos casos se siguieron las indicaciones y recomendaciones marcadas por el fabricante. En la Tabla 2 se enlistan todos los oligonucleótidos que fueron utilizados como cebadores o iniciadores para amplificar por PCR los diferentes fragmentos que fueron utilizados en el proyecto.

##### **4.3.1.2. Digestiones con enzimas de restricción**

En todas las digestiones se utilizaron enzimas de New England Biolabs, siguiendo las instrucciones y recomendaciones marcadas por el fabricante.

##### **4.3.1.3. Desalado de productos de PCR y purificación de fragmentos a partir de gel de agarosa**

Para el desalado de los productos de PCR y la purificación de DNA de gel de agarosa, se utilizó el kit NucleoSpin® Plasmid de Macherey-Nagel, siguiendo las instrucciones y recomendaciones marcadas por el fabricante.



Oligonucleótido sentido		Oligonucleótido antisentido		Gen	Fragmento amplificado
Nombre	Secuencia	Nombre	Secuencia		
BRF1-RNAi-5'	AGGATCCAAGCTTGGATAGTATTGATAAG	BRF1-RNAi-3'	ACTCGAGATTAGGTACAGGTGGTGCT	<b>TbBRF1</b>	Secuencia blanco para RNAi
BRF1-PTP-5'	GGGCCCTCAACCCTGATGATGTGGTGCC	BRF1-PTP-3'	GCGGCCGCGCAGCGACCCATTCATC		Secuencia codificante de la región C-terminal
TbBRF1-SacI -F	GAGTCATGTCTAGTTGTTCCGCATC	TbBRF1-XbaI -R	TCTAGAAGCGACCCATTCATCCTC		Secuencia codificante completa
18S rRNA-5'	CGGCTTCCAGGAATGAAGG	18S rRNA-3'	CCCCTGAGACTGTAACCTC	<b>rRNA 18S</b>	Fragmento del gen
procyclin-5'	ATGGCACCTCGTCCCTTTA	procyclin-3'	TTAGAATGCGGCAACGAGAG	<b>Prociclina</b>	Fragmento del gen
SL-5'	TGTTTCCATAAGTCTACCG	SL-3'	TATATATGAGTGAGTGAGTGTG	<b>ncRNA SL</b>	Gen más regiones intergénicas
$\alpha$ -tubulin-5'	AGAAGTCCAAGCTCGGCTACAC	$\alpha$ -tubulin-3'	GTAGTTGATGCCGCACTTGAAG	<b><math>\alpha</math>-tubulina</b>	Fragmento del gen
Elp3-5'	GGATCCAAGCTTTATTGAGGCGGAAATGAAGG	Elp3-3'	CTCGAGATTTTCATGAACCCACGCTC	<b>Elp3</b>	Fragmento del gen
5S rRNA-5'	AAAGGTGCTTTTCTTCTTTTCT	3S rRNA-3'	GGAGAGAAGGGGAACCTT	<b>rRNA 5S</b>	Gen más regiones intergénicas
7SL ncRNA-5'	GAATATCACTTGGCTTTGTCAAA	7SL ncRNA-3'	TCGGCAAAGAAACCCACTT	<b>ncRNA 7SL</b>	Gen más regiones intergénicas
U2 snRNA-5'	ACTTTTGGATAAGGCGCTGCAT	U2 snRNA-3'	GAGTGAACCTGAAGGACCAAAC	<b>snRNA U2</b>	Gen más regiones intergénicas
tRNA-Arg-5'	AAAAGGTTATTTATATACGTTGGC	tRNA-Arg-3'	TGCAAGAAGCGGTTCTTCCA	<b>tRNA-Arg</b>	Gen más regiones intergénicas
tRNA-Phe-5'	GAGTCACTTTCTGTTACGATAATAAAAA	tRNA-Phe-3'	AGAGGAGCCGACCTTCAC	<b>tRNA-Phe</b>	Gen más regiones intergénicas
Elp3qFw	GGGATACTCAAACCCATCCA	Elp3qRv	CCCTTTAACAGCAACAGCATTAA	<b>Elp3</b>	Fragmento del gen
TubqFw	GGGCTTCTCGTGTATCA	TubqRv	GCTTGGACTTCTTGCCATAG	<b><math>\alpha</math>-tubulina</b>	Fragmento del gen
TbZ5qFw	GCTGGGAGTCTACATGGATAAC	TbZ5qRv	AGTACGGACAGCGCATAATC	<b>TbZ5</b>	Fragmento del gen
Tf2bqFw	GAACAGGGAACGCACATTAG	Tf2bqRv	TTGTTGACTTTGGTCACTTCC	<b>TbTFIIB</b>	Fragmento del gen
ARGqFw	GGTCTCGTGGCGCAATG	ARGqRv	CGATCCCGGCAGGACTC	<b>tRNA-Arg</b>	Fragmento del gen
ALAqFw	GGGGATGTAGCTCAGATGG	ALAqRv	TGGAGAAGTTGGGTATCGATC	<b>tRNA-Ala</b>	Fragmento del gen
		ProcqRv	CTTTGCCTCCCTTCACGATAAC	<b>Prociclina</b>	Fragmento del gen
18sqFw	GGGATACTCAAACCCATCCA	18sqRv	CCCTTTAACAGCAACAGCATTAA	<b>rRNA 18S</b>	Fragmento del gen

**Tabla 2.** Oligonucleótidos utilizados en el proyecto.

### **3.1.1.1. Ligaciones**

Las ligaciones vector-inserto se realizaron utilizando la DNA ligasa T4 de Promega, siguiendo las instrucciones y recomendaciones marcadas por el fabricante.

### **3.1.1.2. Transformación de células competentes**

Se utilizaron células competentes de *E. coli* JM109 de Promega, se siguieron las instrucciones y recomendaciones marcadas por el fabricante.

### **3.1.1.3. Preparaciones de DNA de plásmido**

Las minipreparaciones y maxipreparaciones de DNA de plásmido se obtuvieron utilizando el kit de Macherey-Nagel, NucleoBond® Xtra Maxi Plus EF. Se siguieron las instrucciones y recomendaciones marcadas por el fabricante.

## **3.1.2. Construcciones para obtener la línea celular *knock-down* por RNAi**

Para obtener la secuencia más propicia para inducir una respuesta de RNAi específica hacia el mRNA de TbBRF1, la secuencia de dicho gen se analizó en el programa TrypanoFAN: RNAi target selection script software (<http://trypanofan.path.cam.ac.uk/trypanofan/main/>). El programa estableció que la secuencia comprendida entre 780 y 1224 pb, como la más adecuada para tal fin. La secuencia se amplificó por PCR con los oligonucleótidos BRF1-RNAi-5' y BRF1-RNAi-3' (Tabla 2); se clonó en el vector pGEM®-T Easy; se secuenció y se subclonó (usando los sitios de restricción *Bam*HI y *Xho*I) en el vector p2T7-177, obteniendo de esta manera la construcción p2T7-TbBRF1 (Figura 11) (Wickstead *et al.*, 2002).

## **3.1.3. Obtención y clonación de los fragmentos analizados en los ensayos de *run-on***

Se escogió un grupo de genes que fueran transcritos por cada una de las tres RNA Polimerasas nucleares, como una muestra representativa de la actividad transcripcional nuclear. La Tabla 3 enlista los genes que fueron seleccionados, indica cual RNA Polimerasa lo transcribe, la longitud del fragmento y el contenido de CG. Estos fragmentos se amplificaron por PCR; en la Tabla 2 se detalla que pares de oligonucleótidos fueron usados

para cada fragmento. Posteriormente estos fragmentos se clonaron en el vector comercial pGEM®-T Easy y se secuenciaron.

Gen	RNA Polimerasa que lo transcribe	Longitud (pb)	% GC
rRNA 18S	RNAP-I	393	50
Prociclina		345	58
Elp3	RNAP-II	393	51
$\alpha$ -tubulina		584	56
ncRNA SL		350	40
rRNA 5S		351	47
snRNA U2	RNAP-III	351	52
ncRNA 7SL		351	57
tRNA-Arg		350	54
tRNA-Phe		350	54
tRNA-Tyr		316	64

**Tabla 3.** Resumen de los fragmentos usados en el análisis de *run-on*.

#### 3.1.4. Construcciones para generar la proteína recombinante TbBRF1r

El marco de lectura de TbBRF1 se amplificó por PCR utilizando los oligonucleótidos TbBRF1-SacI-F y TbBRF1-XbaI-R; el fragmento se clonó en pGEM®-T Easy; se secuenció y se subclonó (usando los sitios de restricción *SacI* y *XbaI*) en el vector pCold™ I DNA generado de esta manera la construcción pCold-TbBRF1, para expresión en bacterias.

#### 3.1.5. Construcciones para generar la línea celular TbBRF1-PTP

Se amplificaron las últimas 500 pb de la región C-terminal del gen de TbBRF1 sin el codón de paro, con los oligonucleótidos BRF1-PTP-5' y BRF1-PTP-3'. La secuencia se clonó en el vector pGEM®-T Easy; se secuenció y subclonó (usando los sitios de restricción *ApaI* y *NotI*) en el vector pC-PTP-BLA (diseñado para integrarse en una de las copias endógenas del gen blanco), obteniendo de esta manera la construcción pTbBRF1-PTP (Figura 11) (Nguyen *et*

*al.*, 2007). El epítoto PTP (típicamente usado para purificación por afinidad en tándem) está formado por la Proteína C, un sitio de corte para la proteasa TEV y la Proteína A de *Staphylococcus aureus*.

### **3.2. Transfección**

Las transfecciones de células de *T. brucei* con los vectores p2T7-TbBRF1 y pTbBRF1-PTP, se realizaron mediante electroporación. Brevemente  $1 \times 10^8$  células en fase media logarítmica se centrifugaron a 2,000 rfc, 5 minutos a 4°C; se lavaron con 5 ml de PBS-G (PBS, glucosa 2%); se lavaron con 5 ml de amortiguador Cytomix (Hepes 25 mM pH 7.6, KCl 120 mM, CaCl<sub>2</sub> 0.15 mM, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> / KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 10 mM pH 7.6, EDTA 2 mM y MgCl<sub>2</sub> 5 mM); se resuspendieron en 0.5 ml; se transfirieron a una cubeta de electroporación de 4 mm (Electroporation Cuvettes Plus™, de BTX®) previamente enfriada en hielo; se agregaron 10 µg de DNA (construcciones linearizadas); se incubó 10 minutos en hielo; se dio un choque eléctrico de 1,500 V, 500 Ω y 50 µF con un equipo ECM Electro Cell Manipulator de BTX®; se incubó en hielo 10 minutos; se transfirió a 5 ml de medio SDM-79; 24 horas post-transfección se adicionó el antibiótico de selección a la mitad de la concentración final y 48 horas post-transfección se adicionó el resto del antibiótico de selección (fleomicina a 2.5 µg/ml en el caso de la línea celular para RNAi y blasticidina a 10 µg/ml para el caso de la línea celular TbBRF1-PTP) (Foldynova-Trantirkova *et al.*, 2005).

### **3.3. Obtención de clones celulares 2T7-TbBRF1 y TbBRF1-PTP**

Una vez seleccionada y recuperada la población transfectada, la clonación celular se realizó mediante la técnica de dilución en serie o dilución limitante. En una placa multipozo de 96 pozos con 100 µl de medio SDM-79 en cada pozo, se inocularon 3,000 células en fase media logarítmica en el pozo A1, se tomaron 100 µl del pozo A1 y se inocularon en el pozo B1 y así sucesivamente hasta llegar a H1. Utilizando una multipipeta de 8 canales se tomaron 100 µl de la columna 1 y se inocularon en la columna 2 y así sucesivamente hasta llegar a la columna 12, descartando los 100 µl excedentes de cada fila al final. La placa se incubó a 28°C en una atmósfera con 5% de CO<sub>2</sub>. Es importante señalar que se trabajó con medio SDM-79 enriquecido con un 5% adicional de suero fetal bovino.

### **3.4. Ensayos de RNAi**

La interferencia de RNA hacia el mRNA de TbBRF1 en las clonas 2T7-TbBRF1 se indujo con doxiciclina (un fármaco análogo a la tetraciclina) a una concentración de 2 µg/ml. Partiendo de un mismo cultivo se iniciaron dos cultivos independientes, un cultivo control (Dox-, no inducido) y otro interferido (Dox+, inducido) a una densidad celular de  $2 \times 10^6$  células/ml; ambos cultivos se contaron diario y se sembraron a una densidad celular de  $2 \times 10^6$  células/ml durante una semana. Los datos se graficaban multiplicando la densidad celular acumulativa por el factor de dilución (Figura 11).

#### **3.4.1. Northern blot**

La reducción del mRNA de TbBRF1 se comprobó mediante un ensayo Northern blot con RNA total del cultivo Dox+, utilizando como sonda la secuencia que se usó para el RNAi de TbBRF1. Esto con el fin de detectar al mRNA de TbBR1 y también el RNA de doble cadena (Figura 11). Las muestras de RNA total se resuspendieron en formaldehído/formamida y se corrieron en un gel desnaturizante de agarosa al 1.2% a 80 V con MOPS/EDTA 1× como amortiguador de corrida, durante aproximadamente 5 horas, agitando el amortiguador cada hora. Terminada la corrida, el gel se montó en un dispositivo de transferencia, el amortiguador de transferencia fue SSC 10× y la membrana utilizada fue Amersham Hybond™-N<sup>+</sup> de GE Healthcare. El tiempo de transferencia fue de aproximadamente 20 horas. Al final de la transferencia la membrana se lavó una vez con SSC 2× y se dejó secar aproximadamente 40 minutos antes de hacer el entrecruzamiento en un equipo UV Stratalinker® 1800 de Stratagene®.

Las membranas se prehibridaron con solución de hibridación (formamida 50%, SSC 5×, SDS 0.2%, solución Denhardtts 4× y DNA de esperma de salmón [100 µg/ml]) durante 2 horas a 42°C. Se hibridó con  $5 \times 10^6$  cpm de la sonda, en la misma solución utilizada en la prehibridación, a 42°C por 12 a 16 horas. Los lavados que se realizaron de la siguiente manera:

No. de lavado	1°	2°	3°	4°	5°
Temperatura	TA	55°C	55°C	65°C	65°C
SSC	2×	1×	0.5×	0.25×	0.1×
SDS	0.1%	0.1%	0.1%	0.1%	0.1%

El lavado con SSC al 0.1× sólo se realizó con el control de carga de  $\alpha$ -tubulina.

Después de dejar secar las membranas por 20 minutos, se dejaron exponiendo en una placa IP (Imaging Plate BAS-IP MS 3543 de Fujifilm) por 48 horas. La placa IP se escaneo con un equipo Fuji FLA 5000 y el análisis densitométrico se realizó con el programa MultiGauge.

#### **3.4.1.1. Marcaje radioactivo**

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

#### **3.4.2. Western blot**

La reducción TbBRF1 se comprobó mediante un ensayo Western blot con proteínas totales del cultivo Dox+, utilizando un anticuerpo específico hacia TbBRF1 generado en conejo (Figura 11).

Para este ensayo y otros del mismo tipo realizados en el proyecto, las muestras de proteínas se resuspendieron en amortiguador Laemmli; se corrieron en un gel discontinuo a 80 V durante un tiempo variable de 2 a 3 horas. Los geles discontinuos consistieron en un gel separador de poliacrilamida al 10% y el gel concentrador de poliacrilamida al 3.9%. Al término de la corrida las muestras de proteínas se transfirieron a una membrana de PVDF (Immun-Blot® PVDF Membrane For Protein Blotting de Bio-Rad) a 90 V, durante 2 horas; el amortiguador de transferencia consistía en Tris base 25 mM, glicina 192 mM, SDS 3.5 mM y metanol 20%. Al término de la transferencia para confirmar la transferencia, la membrana

de PVDF se sumergió en una solución de Rojo Ponceau al 0.1% (en ácido acético al 5%) durante 5 minutos a temperatura ambiente en agitación suave y el exceso de colorante se retiró rociando chorros de agua bidestilada con una pisseta.

La membrana se bloqueó con leche en polvo libre de grasa al 5% en PBS + Tween 20 al 0.05%. Las condiciones de bloqueo fueron 2 horas a temperatura ambiente o toda la noche a 4°C, con agitación suave en ambos casos. El anticuerpo primario se incubó con PBS + Tween 20 al 0.05% y leche al 1%, una hora a temperatura ambiente o toda la noche a 4°C, en agitación suave; las diluciones utilizadas variaban dependiendo del anticuerpo utilizado. Después de esta incubación, se realizaron tres lavados de 10 minutos cada uno con PBS + Tween 20 al 0.05%. Posteriormente se realizó la incubación con el anticuerpo secundario, que en todos los casos consistió en un anticuerpo anti-conejo, producido en burro que tenía acoplada una peroxidasa de rábano (HRP Donkey anti-rabbit IgG, de BioLegend); la incubación era de 2 horas a temperatura ambiente. Finalmente, se realizaban tres lavados de 15 minutos cada uno con PBS + Tween 20 al 0.05%. Para desarrollar la señal se utilizó el kit ECL (Amersham™ ECL™ Western Blotting Detection Reagents de GE Healthcare), siguiéndose las instrucciones marcadas por el fabricante. Las películas utilizadas fueron Amersham Hyperfilm™ MP de GE Healthcare y se utilizaron soluciones de revelado de Kodak.

### **3.5. Obtención del anticuerpo $\alpha$ -TbBRF1r**

La obtención del anticuerpo se dividió en diferentes etapas:

- a) Clonación del gen de TbBRF1 en un vector de expresión.
- b) Expresión de la proteína en células de *E. coli*.
- c) Purificación de la proteína.
- d) Inoculación de la proteína purificada.
- e) Obtención del anticuerpo.

#### **3.5.1. Expresión y purificación de la proteína recombinante**

El vector de expresión pCold-TbBRF1, el cual contiene el marco de lectura de TbBRF1 fusionado a una cola de poli histidinas en su extremo C-terminal, se introdujo en células de

*E. coli* de la cepa BL21 (DE3). Las células de *E. coli* se crecieron en medio Terrific Broth (TB) modificado a 37°C con agitación. La expresión de la proteína se indujo mediante IPTG a una concentración de 1 mM. Después de 16 horas de incubación (a 37°C) el cultivo se procesó para purificar la proteína en cuestión.

La proteína TbBRF1r fue purificada a partir de un extracto total del cultivo inducido, empleando una columna cromatográfica de níquel Ni-Sepharose 6 Fast Flow (GE Healthcare) siguiendo las instrucciones marcadas por el fabricante. La pureza de la proteína recuperada se analizó mediante geles de poliacrilamida al 15% en SDS-PAGE.

### **3.5.2. Inoculación y obtención del anticuerpo**

El anticuerpo policlonal anti-TbBRF1r se obtuvo inoculando conejos New Zealand machos de cuatro semanas de edad con 100 µg de la proteína TbBRF1r junto con el adyuvante TiterMax Gold adjuvant (Sigma) en la proporción de 1:1, dos veces en intervalos de tres semanas. Los conejos se sangraron semanalmente para monitorear el título del anticuerpo mediante Western blot. El suero se colectó 15 días después de la última inoculación y el suero preinmune se colectó antes y fue usado como control negativo. La especificidad del anticuerpo obtenido se confirmó mediante Western blot contra cultivos bacterianos inducidos, la proteína TbBRF1r purificada y extractos totales de *T. brucei*.

El manejo de los conejos contó con la aprobación de la Comisión Institucional para Cuidado Animal (CICUAL) del Centro de Investigación y Estudios Avanzados (CINVESTAV) del Instituto Politécnico Nacional.

El suero obtenido se tituló con extractos totales de *T. brucei* silvestres, para su posterior empleo.

## **3.6. Ensayos de *run-on* nuclear**

### **3.6.1. Preparación de los filtros**

Se utilizaron membranas Amersham Hybond™-N<sup>+</sup> de GE Healthcare y un equipo de microfiltración Bio-Dot® Microfiltration Apparatus de BioRad, el cual funciona por medio de vacío. Brevemente, 2 µg de cada una de las construcciones se desnaturalizaron con NaOH



0.4 M, las muestras se incubaron a 100°C en baño de agua por 10 minutos y posteriormente se pasaron a hielo por 5 minutos. La membrana se montó en el dispositivo de BioRad, se hidrató con agua bidestilada desionizada y estéril. Las muestras de DNA desnaturalizado se pasaron por la membrana; posteriormente se pasaron 500 µl de NaOH 0.4 M; el dispositivo se desmontó; se secó la membrana y se realizó el entrecruzamiento (Padilla-Mejia *et al.*, 2015).

### 3.6.2. Obtención de núcleos y el marcaje

Partiendo del mismo cultivo se iniciaron dos cultivos, uno donde se indujo RNAi hacia el mRNA de TbBRF1 (Dox+) y otro donde no se indujo (Dox-), ambos fueron resemebrados a las 24 horas (Figura 11). Para obtener los núcleos de ambos cultivos, las células se empastillaron a 4,000 rfc por 10 minutos a 4°C; se realizaron 2 lavados con PBS-G y la pastilla celular se resuspendió en 10 ml del amortiguador de lisis (Tris-HCL 10 mM pH 7.5, CaCl<sub>2</sub> 3 mM, MgCl<sub>2</sub> 2 mM). Se adicionó NP-40 a una concentración de 0.5%; las células se transfirieron a un homogenizador con mazo de teflón; para lisarlas se dieron entre 15 a 30 golpes; se confirmó la lisis celular. Los núcleos se recuperaron mediante centrifugación a 4,000 rfc por 10 minutos a 4°C; se lavaron una vez con 1 ml del amortiguador de lisis (Padilla-Mejia *et al.*, 2015).

Los núcleos se resuspendieron en 100 µl del amortiguador para *run-on* nuclear (Tris-HCl 100 mM pH 7.5, glicerol 25%, espermina 0.15 mM, espermidina 0.15 mM, DTT 2 mM, 40 u RNAsin [Promega], MgCl<sub>2</sub> 2 mM, MnCl<sub>2</sub> 4 mM, NaCl 50 mM, KCl 50 mM, ATP 2 mM, GTP 2 mM, UTP 2 mM, CTP 10 µM y 300 µCi de [α-<sup>32</sup>P]CTP {3000 Ci/mmol, Amersham}). El marcaje se realizó incubando los núcleos 8 minutos a 25°C; se adicionaron 10 u de DNAsa I (Applied Biosystems) y se incubó 5 minutos a 37°C; la reacción se paró agregando 100 µl de solución de paro (Tris-HCl 10 mM pH 7.5, EDTA 10 mM, SDS al 1% y proteinasa K a una concentración de 100 µg/ml) y se incubó 5 minutos a 37°C. Para extraer el RNA se adicionó un volumen de fenol: cloroformo: alcohol isoamílico (25:24:1); se centrifugó a 12,000 rfc por 5 minutos a 4°C; la fase acuosa se transfirió a un tubo nuevo; se agregaron otros 100 µl de fenol: cloroformo: alcohol isoamílico (25:24:1), se repitió la centrifugación y se volvió a recuperar

la fase acuosa. Se removieron los nucleótidos no incorporados y se cuantificó la sonda (Padilla-Mejia *et al.*, 2015).

### 3.6.3. Hibridación

La prehibridación y la hibridación se realizaron a 50°C; en ambos casos la solución fue la utilizada para el Northern blot. Para la hibridación se utilizó toda la sonda, tanto del cultivo inducido (Dox+) como del no inducido (Dox-). Los lavados de las membranas fueron los siguientes:

No. de lavado	1°	2°	3°	4°	5°	6°	7°
Temperatura	TA	55°C	55°C	60°C	60°C	65°C	65°C
SSC	2×	1×	0.5×	0.25×	0.1×	0.05×	0.01×
SDS	0.1%	0.1%	0.1%	0.1%	0.1%	0.1%	0.1%

Las placas IP con las membranas se dejaron exponiendo por un lapso de 48 horas, el escaneo y el análisis densitométrico se realizaron de la misma manera que el Northern blot.

## 3.7. RT-PCR

### 3.7.1. Extracción de RNA total y tratamiento con DNasa

Se extrajo RNA total de células de *T. brucei* 2T7-TbBRF1 no inducidas e inducidas por 24 y 48 horas usando trizol (TRI Reagent® Sigma T9424), siguiendo las instrucciones marcadas por el fabricante (Figura 11). La extracción se trató con DNasa I de Thermo Scientific para remover cualquier traza de DNA que se hubiera coextraído.

### 3.7.2. Síntesis de cDNA

El RNA total tratado con DNasa se utilizó para sintetizar cDNA usando la reverso transcriptasa SuperScript III Reverse Transcriptase de Invitrogen usando oligonucleótidos (hexámeros) al azar (Invitrogen, N8080127).

### **3.7.3. PCR en tiempo real cuantitativo**

El cDNA fue analizado por PCR en tiempo real cuantitativo usando la DNA Polimerasa Platinum SYBR Green qPCR SuperMix-UDG kit (Invitrogen) en un equipo Rotor-Gene 3000 de Corbett Research, de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Todas las reacciones se llevaron a cabo por triplicado, usando oligonucleótidos y condiciones que previamente habían sido optimizadas para obtener un producto único y del tamaño correcto. Cada producto fue analizado por medio de electroforesis en gel de agarosa y curva de desnaturalización. Se realizaron curvas estándar para los pares de oligonucleótidos de DNA genómico y diluciones en serie de cDNA, obteniendo rangos de  $r^2$  de 0.98 a 1.0. La eficiencia del PCR fue del 100% para todos los genes y el método de análisis fue por  $2^{-\Delta\Delta Cq}$ . Los datos se normalizaron con el rRNA 18S, como gen de referencia y se graficó en relación a las células no inducidas.

El rRNA 18S se amplificó con los oligonucleótidos 18sqFw y 18sqRv. El tRNA-Arg se amplificó con los oligonucleótidos ARGqFw y ARGqRv. El tRNA-Ala se amplificó con los oligonucleótidos ALAqFw y ALAqRv. Prociclina se amplificó con los oligonucleótidos procyclin-5' y ProcqRv. TbTFIIB se amplificó con los oligonucleótidos Tf2bqFw y Tf2bqRv. Tubulina se amplificó con los oligonucleótidos TubqFw y TubqRv. Elp3 se amplificó con los oligonucleótidos Elp3qFw y Elp3qRv. TbZ5 (Tb927.9.2780) se amplificó con los oligonucleótidos TbZ5qFw y TbZ5qRv.

### **3.8. Inmunofluorescencia Indirecta**

Células TbBRF1-PTP en fase media logarítmica se empastillaron a 6,000 rfc por 10 minutos a 4°C y se lavaron dos veces con PBS previamente enfriado; se resuspendieron para que quedaran a una densidad de 300,000 células/ $\mu$ l; 5  $\mu$ l se expandieron en un área de 0.5 cm<sup>2</sup> sobre un portaobjetos previamente tratado con Poli-L-lisina; se dejaron 15 minutos a temperatura ambiente procurando que no se secase la muestra; las células se fijaron con una solución de paraformaldehído al 4% por 30 minutos a 4°C; se realizaron 2 lavados de 5 min a temperatura ambiente con PBS en agitación suave; las células se permeabilizaron con 50  $\mu$ l de Tritón X-100 al 0.05% por exactamente 2 min a temperatura ambiente;

inmediatamente después se realizaron 4 lavados adicionales; las células se bloquearon con 50  $\mu$ l de BSA al 2% y gelatina de peces de agua fría (G7765-250ML de Sigma) al 1%, incubando 1 hora a temperatura ambiente en cámara húmeda; se incubó el anticuerpo primario ( $\alpha$ -ProtC) a una dilución de 1:25 usando la solución de bloqueo, incubando 1 hora a temperatura ambiente en cámara húmeda; se realizaron 3 lavados con PBS frío y otros 2 lavados con PBS adicionado con Tween 20 al 0.05%; se incubó el anticuerpo secundario (Alexa 488) a una dilución de 1:300 usando la solución de bloqueo, incubando 1 hora a temperatura ambiente en cámara húmeda en oscuridad; se realizaron 3 lavados con PBS frío y otros 2 lavados con PBS adicionado con Tween 20 al 0.05% en oscuridad; la muestra se dejó secar en oscuridad; se cubrió con Vectashield con DAPI (Vector Laboratories INC.); la laminilla se tapó con un cubreobjetos y el borde se selló con barniz de uñas. Las imágenes se obtuvieron con equipo Leica SP5, DM 16000, Mo y se utilizó el programa LAS AF software para hacer el procesamiento de las microfotografías (Figura 11).

## 5. Resultados

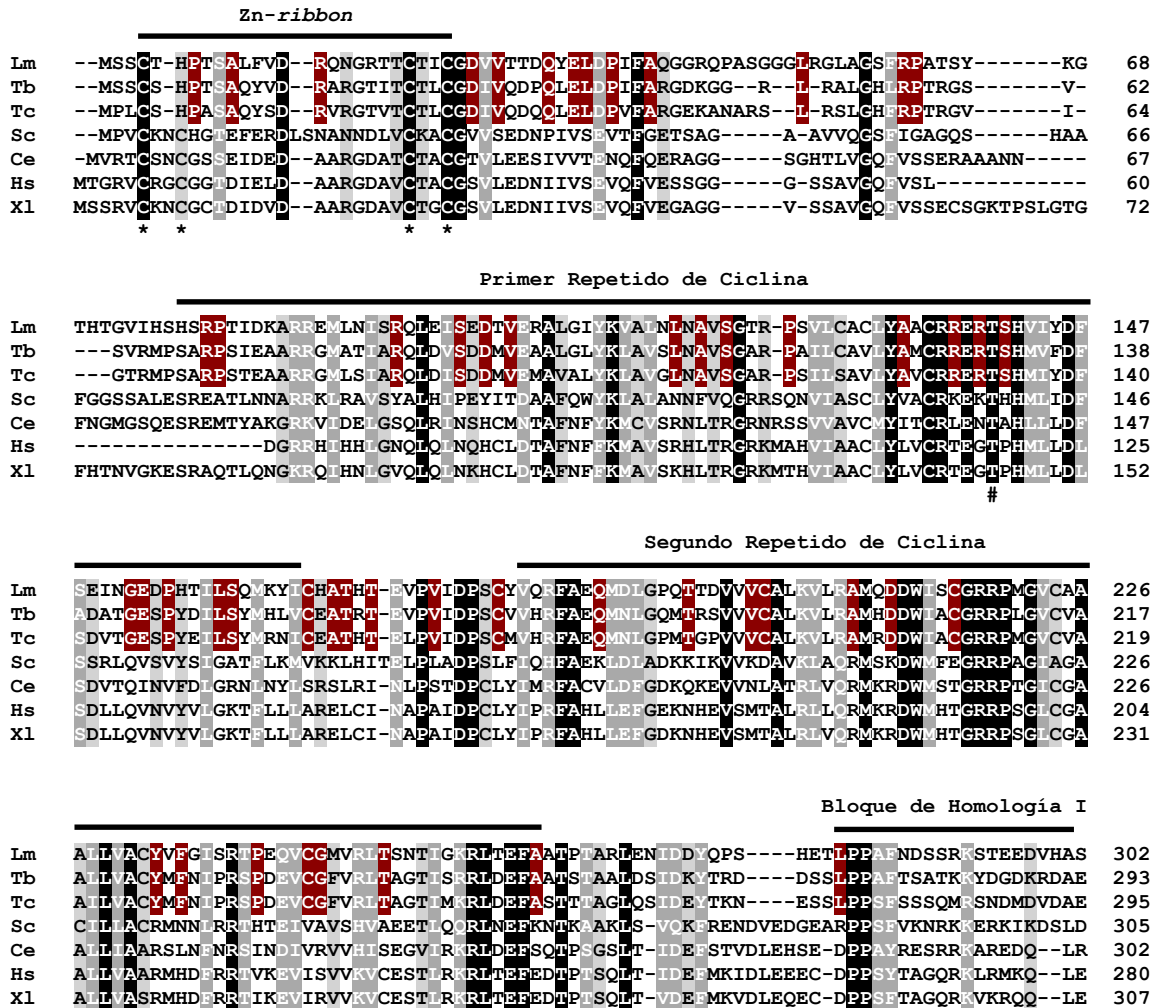
El estudio de TbBRF1 fue dividido en dos partes: el análisis bioinformático y el análisis experimental. El primero consistió en: 1) los alineamientos multiespecie entre ortólogos de BRF1; 2) el análisis filogenético; 3) la búsqueda bibliográfica de residuos y secuencias conservadas; 4) el análisis de posibles amino ácidos fosforilados; 5) la predicción de estructura secundaria; y 6) el modelado por homología y su validación. El análisis experimental por otra parte consistió en: 1) confirmar la localización nuclear por inmunofluorescencia indirecta usando una línea celular de *T. brucei* que expresa una proteína recombinante de TbBRF1 fusionada al epítipo PTP; 2) generar una línea celular en la que por medio de RNAi, se induzca el *knock-down* de TbBRF1 con doxiciclina; 3) determinar los efectos del *knock-down* en la supervivencia celular mediante curvas de crecimiento; y 4) analizar la abundancia de transcritos generados por las tres RNA Polimerasas nucleares, por medio de *run-on* nuclear y RT-PCR.

### 5.1. Análisis bioinformáticos

Los análisis bioinformáticos siguieron la lógica de la estructura de las proteínas. Es decir, primero se estudió la estructura primaria con el alineamiento de la secuencia de aminoácidos, confirmando su validez mediante un análisis filogenético; también se llevó a cabo la identificación de residuos y secuencias conservadas, ya sea por sitios de interacción proteína-proteína o por ser sitios probables de fosforilación. Posteriormente se predijo la estructura secundaria y finalmente se modeló por homología la estructura terciaria o tridimensional.

#### 5.1.1. Alineamiento multiespecie y análisis filogenético

Para confirmar la identificación de Tb927.11.470 como el ortólogo de BRF1 en *T. brucei*, se realizó un alineamiento multiespecie entre diferentes ortólogos de BRF1, incluyendo otros parásitos y metazoarios, con el fin de tener un grupo heterogéneo de especies y secuencias. Las secuencias se obtuvieron de la base de datos del NCBI y la base de datos de tripanosomátidos TriTrypDB y se alinearon con ClustalΩ. El alineamiento se muestra en la Figura 12 y la matriz de porcentajes de identidad se presenta en la Tabla 4.



**Figura 12.** Alineamiento multiespecie de ortólogos de BRF1. Secuencia de amino ácidos de la mitad N-terminal de *Leishmania major* (Lm, LmjF.25.0440), *Trypanosoma brucei* (Tb, Tb927.11.470), *Trypanosoma cruzi* (Tc, TcCLB.507093.180), *Saccharomyces cerevisiae* (Sc, CAA68968.1), *Caenorhabditis elegans* (Ce, NP\_495526.1), *Homo sapiens* (Hs, AAH86856.1) y *Xenopus laevis* (Xl, NP\_001088063.1). La conservación completa se indica con sombreado negro; sustituciones conservadas se indican con sombreado gris oscuro y fuente blanca; sustituciones semiconservadas se indican con sombreado gris claro y fuente negra. Los residuos conservados específicos de tripanosomas se marcan con sombreado rojo y fuente blanca. Se indican los dominios de Zn-ribbon, los dos repetidos de ciclina y el bloque de homología I. Los asteriscos indican los 4 residuos del Zn-ribbon que coordinan al catión de zinc. El signo de gato indica un residuo de treonina que es fosforilado en *S. cerevisiae* y esta conservado en todas las especies.

El alineamiento de los diferentes ortólogos de BRF1 reveló que TbBRF1 presenta los dominios típicos de este factor de transcripción. El primer dominio identificado es un motivo Zn-ribbon, después están dos repetidos de ciclina y el Bloque de Homología I. Dentro del motivo Zn-ribbon se pudieron identificar cuatro residuos para la coordinación de un ion

zinc, estos son: Cys-4, His-6, Cis-22 y Cis-25. Estos tres dominios también se detectaron en los ortólogos de *L. major* (LmjF.25.0440) y *T. cruzi* (TcCLB.507093.180).

	Lm	Tb	Tc	Sc	Ce	Hs	Xl
Lm		52.06	54.67	22.61	23.45	25.00	24.02
Tb	52.06		<b>66.89</b>	23.32	22.15	25.00	24.85
Tc	<b>54.67</b>	<b>66.89</b>		23.91	22.73	26.29	24.19
Sc	22.61	22.32	23.91		32.09	24.79	34.30
Ce	23.45	22.15	22.73	32.09		33.20	39.12
Hs	25.00	26.29	24.79	33.20	37.78		<b>72.99</b>
Xl	24.02	24.85	24.19	<b>34.30</b>	<b>39.12</b>	<b>72.99</b>	

**Tabla 4.** Matriz de porcentajes de identidad entre ortólogos de BRF1. Las iniciales son las mismas que en la Figura 12.

Como era de esperarse, TbBRF1 mostró una elevada identidad con los ortólogos de *T. cruzi* (66.89%) y de *L. major* (54.67%). En contraste, la identidad de TbBRF1 con los ortólogos de *S. cerevisiae*, *C. elegans*, *H. sapiens* y *X. laevis* fue baja, pues está en un rango de 22 a 25%. *X. laevis* mostró alta identidad con *S. cerevisiae*, *C. elegans* y *H. sapiens*.

Para evaluar el porcentaje de identidad entre los dos repetidos de ciclina se realizó un alineamiento únicamente de estas secuencias en los ortólogos de BRF1 y TFIIB de *T. brucei*, *S. cerevisiae* y *H. sapiens* (Tabla 5). La primera columna muestra la especie, la segunda columna el porcentaje de identidad entre el 1° y 2° repetido de ciclina en los ortólogos de BRF1 y la tercera columna el porcentaje de identidad entre el 1° y 2° repetido de ciclina en los ortólogos de TFIIB.

Tanto en TbBRF1 como en TbTFIIB el porcentaje de identidad entre el primer y segundo repetido de ciclina fue mayor que el determinado para los respectivos ortólogos de *S. cerevisiae* y *H. sapiens*. Esto resulta interesante si consideramos que *T. brucei* es más primitivo que *S. cerevisiae* y *H. sapiens* y que divergió de manera temprana del dominio

*Eukarya*. Si se compara el porcentaje de identidad entre TbBRF1 y TbTFIIB, el porcentaje de identidad del primero es menor.

Espece	Identidad entre el 1° y 2° repetido de ciclina en BRF1 (%)	Identidad entre el 1° y 2° repetido de ciclina en TFIIB (%)
<i>T. brucei</i>	22.03	29.73
<i>S. cerevisiae</i>	14.08	27.42
<i>H. sapiens</i>	15.49	23.94

**Tabla 5.** Porcentaje de identidad entre los repetidos de ciclina de ortólogos de BRF1 y TFIIB.

La masa predicha de TbBRF1 (67.6 kDa) es similar a la masa predicha para los ortólogos de *S. cerevisiae* (66.9 kDa), *T. cruzi* (67.7 kDa), *H. sapiens* (71.1 kDa) y *X. laevis* (73.7 kDa). No obstante, la masa predicha para el ortólogo de *L. major* (77.2 kDa) es casi 10 kDa mayor que TbBRF1, debido a una inserción en la mitad C-terminal de *L. major* (datos no mostrados).

Para confirmar la validez del alineamiento obtenido, se realizaron diferentes análisis filogenéticos por los métodos de probabilidad máxima, vecino más cercano y evolución mínima; usando un *bootstrap* de 500 en todos los casos y empleando tres diferentes modelos estadísticos: JTT, Dayhoff y Poisson. Los árboles filogenéticos se construyeron utilizando los programas SeaView y Mega 6 con las especies incluidas en el alineamiento, más las secuencias de *Mus musculus*, *Entamoeba histolytica*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Candida albicans*, *Trypanosoma vivax* y *Trypanosoma congolense* IL; esto con el fin de ampliar el espectro de ortólogos. También se incluyó la secuencia del factor de transcripción TFB (ATFB) de la *Archaea Pyrococcus woesei* para enraizar el árbol.

Los diferentes árboles mostraron un arreglo similar; en la Figura 13 se muestra un árbol representativo, en el cuál se observa que los ortólogos de BRF1 se agrupan como cabría esperar en base a las relaciones evolutivas existentes entre las diferentes especies analizadas, con lo que se valida el alineamiento y se confirma que TbBRF1 es el ortólogo de BRF1 en el parásito *T. brucei*. El árbol también sugiere que los ortólogos de BRF1 son





sitios de interacción identificados se dividieron en dos: 1) aquellos que interactúan con las otras subunidades de TFIIB (BDP1 y TBP) y 2) los que interactúan con subunidades de la RNAP-III. Los residuos identificados se señalan en la Figura 14 y las proteínas con las que interaccionan en otros sistemas se detallan en la Tabla 6. La primer columna muestra el residuo, la segunda columna su posición en la secuencia, la tercera columna la subunidad de TFIIB o RNAP-III con la que interactúa y la cuarta columna el complejo proteico del que forma parte la subunidad en cuestión.

```

1  MSSCSHPTSA QYVDRARGTI TCTLCGDIVQ DPQLELDPIF ARGDKGGRLR ALGHLRPTRG
      Zn-ribbon
61  SVSVRMPSAR PSIEAARGM ATIARQLDVS DDMVEAALGL YKLAVSLNAV SGARPAILCA
      Primer Repetido de Ciclina
121 VLAMCRER TSHMVDFAD ATGESPYDIL SYMHLVCEAT RTEVPVIDPS CVVHRFAEQM
181 NLGQMTRSVV VCALKVLRAM HDDWIACGR PLGVCVAALL VACYMFNIPR SPDEVCGFVR
      Segundo Repetido de Ciclina
241 LTAGTISRRL DEFAATSTAA LDSIDKYTRD DSSLPPAFTS ATKKYDGDKR DAELRQLSAM
      Bloque de Homología I
301 YYELVAEAKV STPSTPDRCE KWRHFLLCHC ALEGKTPSDA SLDLTTLTPQ QQLQILGLPN
361 TKPIDSSKAR ASVKEEEDKI MVKLERVKQE PVRQEPSTPE KGAPPVPNAG MSLSEMTDYY
421 RMLMTRDPNV LDIRRDFDME AVNPDDVVPA PQLPEEEAVV KTEGAAEAKF KIDPCLAEVL
481 YDNERTLALP WEFIVLQDPE LDDMTDLEPY LVLNNEERLR RQKVGEALYG ESWNLGAART
541 KEEIERLEES HSTRKRREP IREHLTVQDA VSQALRRRGA STINVSQIDE LIPGLAGLEN
601 SAEDEWVA

```

**Figura 14.** Residuos de interacción proteína-proteína, fosforilables y NLS de TbBRF1. Los residuos conservados que interactúan con subunidades de la RNAP-III, BDP1 y TBP, se muestran en verde, azul oscuro y azul claro, respectivamente. El residuo Ala-450 que interactúa tanto con BDP1 como con TBP, se muestra en azul y subrayado. El residuo conservado Thr-131, fosforilado por ERK en *S. cerevisiae*, se muestra en rojo. Otros posibles residuos fosforilables, identificados por PhosTryp, se muestran en naranja. La NLS putativa (554-RKRRR-558) se muestra en morado.

Así, los residuos de TbBRF1 que podrían estar involucrados en la unión con las subunidades de la RNAP-III C128 y C160 son Gly-60 y Arg-78, respectivamente. Los residuos que podrían interactuar con TBP (subunidad de TFIIB) son Arg-127, Thr-162, Arg-210, Leu-413, Thr-417, Asp-427, Pro-428, Asp-436, Leu-453, Leu-476, Glu-478 y Leu-489. Los residuos que podrían interactuar BDP1 (subunidad de TFIIB) son Lys-321 y Phe-325. Un residuo de alanina en la posición 450, que se ha reportado que interactúa tanto con TBP como BDP1, también fue

detectado. La presencia de todos estos residuos sugiere que los puntos de interacción entre TbBRF1 y el ortólogo de *S. cerevisiae* son similares (Chaussivert *et al.*, 1995; Ferri *et al.*, 2000; Kassavetis *et al.*, 2006; Khoo *et al.*, 1994; Khoo *et al.*, 2014; Liao *et al.*, 2006; Moir *et al.*, 2002; Saxena *et al.*, 2005; Schroder *et al.*, 2003).

Residuo	Posición	Proteína de interacción	
		Subunidad	Complejo
<b>Gly</b>	60	C160	RNAP-III
<b>Arg</b>	78	C128	
<b>Arg</b>	127	TBP	TFIIIB
<b>Thr</b>	162	TBP	
<b>Arg</b>	210	TBP	
<b>Lys</b>	321	BDP1	
<b>Phe</b>	325	BDP1	
<b>Leu</b>	413	TBP	
<b>Thr</b>	417	TBP	
<b>Asp</b>	427	TBP	
<b>Pro</b>	428	TBP	
<b>Asp</b>	436	TBP	
<b>Ala</b>	450	BRF1 / TBP	
<b>Leu</b>	453	TBP	
<b>Leu</b>	476	TBP	
<b>Glu</b>	478	TBP	
<b>Leu</b>	479	TBP	

**Tabla 6.** Residuos conservados en TbBRF1 que podrían participar en las interacciones con subunidades de TFIIIB o con subunidades de la RNAP-III.

También se identificó que el residuo Thr-131 en la mitad N-terminal dentro del primer repetido de ciclina, además de que está conservado en todos los ortólogos analizados (Figura 14), es fosforilado por la MAP cinasa ERK en *S. cerevisiae* (Felton-Edkins *et al.*, 2003). Otros residuos que probablemente son fosforilados se identificaron mediante el programa PhosTryp y se detallan en la Tabla 7. La presencia de estos sitios de fosforilación sugiere que la función de TFIIIB, como otros ortólogos de BRF1, podría ser regulada por fosforilación (Fairley *et al.*, 2003).

### 5.1.3. Identificación de posible Señal de Localización Nuclear

Para determinar si TbBRF1 podría localizarse en el núcleo se hizo una búsqueda bibliográfica de trabajos donde se hubiera identificado una Señal de Localización Nuclear (NLS, por sus siglas en inglés) y se hubiera confirmado experimentalmente. La revisión bibliográfica arrojó que las NLS de la proteína “La” (RGHKRSRE) y de p14 (RRKRRR) de *T. brucei* (Marchetti *et al.*, 2000; Westergaard *et al.*, 2010), tienen similitud con la secuencia 554-RKRRR-558 de TbBRF1 (Figura 14). Esto concuerda con la localización esperada para un factor de transcripción de una RNA Polimerasa nuclear, aunque debe confirmarse experimentalmente.

Posición	Residuo	Puntuación
131	Thr	1.14
311	Ser	0.84
312	Thr	1.02
336	Thr	1.12
338	Ser	0.99
412	Ser	0.86

**Tabla 7.** Puntuación de los sitios de fosforilación identificados. Puntuaciones iguales o mayores a 0.8 se consideran altamente probables de ser fosforilados. La primera columna muestra la posición del residuo, la segunda columna si dicho residuo es de treonina o serina y la tercera columna la puntuación que asignó el programa.

#### 5.1.4. Determinación de estructura secundaria

Los dominios de *Zn-ribbon* usualmente se pliegan en hebras  $\beta$ , mientras que el resto de BRF1 se pliega en hélices  $\alpha$ . Para comenzar a indagar en torno a la estructura secundaria de TbBRF1, específicamente en la mitad N-terminal, se analizó la secuencia de aminoácidos de TbBRF1 con los programas PSIPRED, NetSurfP 1.1, Jpred 3 y CFSSP. La predicción de estructura secundaria reveló que TbBRF1 está formado casi exclusivamente de hélices  $\alpha$ , a excepción del *Zn-ribbon*, el cual está conformado por 3 hebras  $\beta$  antiparalelas (Figura 15). Cabe destacar que en la región correspondiente a cada uno de los repetidos de ciclina se identificaron 5 hélices  $\alpha$ , lo cual concuerda con el número de hélices presentes en este tipo de motivos.

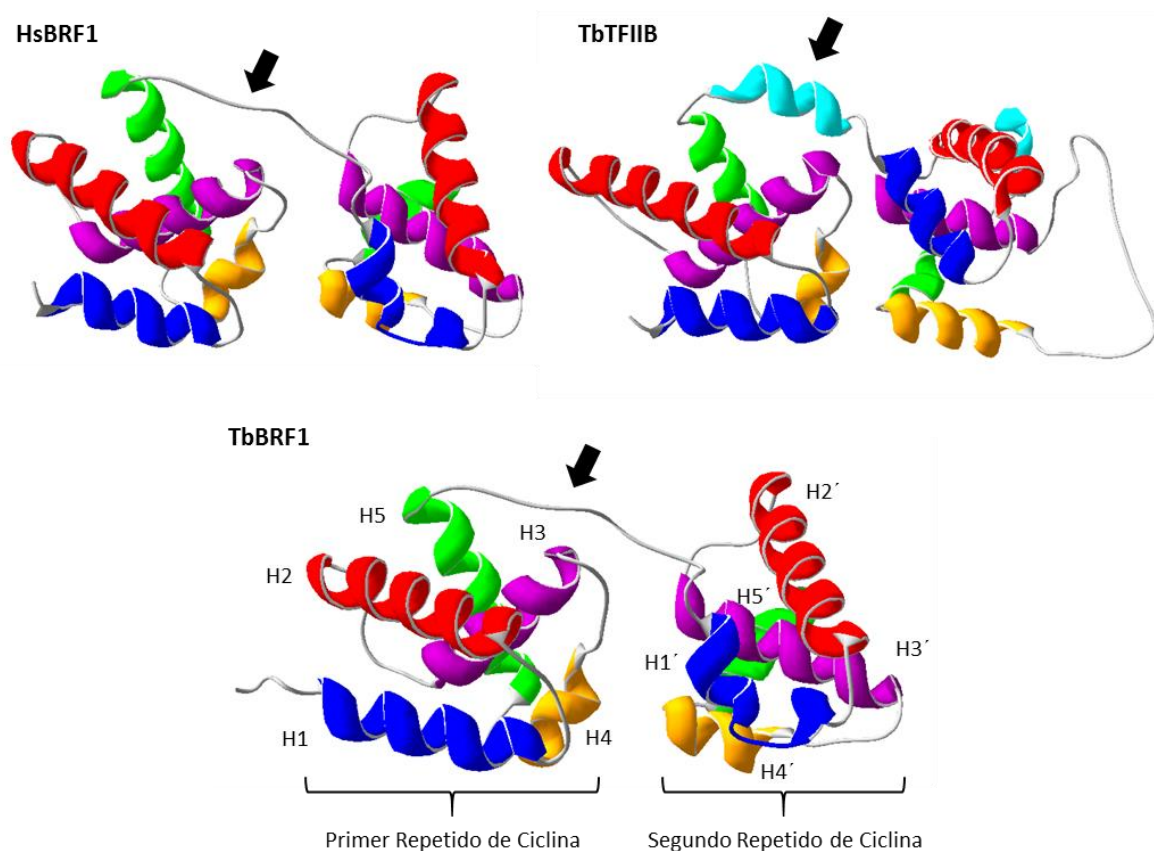
#### 5.1.5. Predicción de estructura de los repetidos de ciclina

La estructura del ortólogo de TFIB de *T. brucei* es atípica con respecto a la reportada para otros ortólogos de TFIB. En ese sentido, para indagar la estructura que los repetidos de ciclina de TbBRF1 potencialmente podrían adoptar, se realizó modelado por homología de TbBRF1 con los programas SWISS-MODEL y Phyre 2. El modelado por homología de los repetidos de ciclina de TbBRF1 reveló que cada uno está conformado por dos dominios globulares formados por 5 hélices  $\alpha$ ; dichos dominios están unidos por un *linker* sin una estructura definida (Figura 16). La validación del modelo se realizó utilizando el programa Mod Eval, donde se obtuvo un score de 1, lo que significa que hay una probabilidad mayor al 95% de que el plegamiento del modelo sea correcto.



**Figura 15.** Predicción de la estructura secundaria de TbBRF1. Se muestra la estructura secundaria arriba de la secuencia de aminoácidos. Las hebras  $\beta$  se muestran como flechas y las hélices  $\alpha$  como rectángulos redondeados. Los colores de las hélices  $\alpha$  de los repetidos de ciclina, coinciden con la Figura 16.

A manera de control se generaron los modelos de los ortólogos de BRF1 de *H. sapiens* (HsBRF1) y de *T. brucei* (TbTFIIB), obteniendo estructuras prácticamente idénticas a las reportadas previamente. Cuando se comparó la estructura de TbBRF1 con el ortólogo de BRF1 en humano, se encontró una arquitectura muy similar, que consiste en los dos característicos motivos de ciclina bien definidos, cada uno plegado en 5 hélices  $\alpha$ . Por otra parte, mientras que la estructura del primer repetido de ciclina de TbBRF1 y el primer módulo de TbTFIIB están conservados, la estructura del segundo repetido de ciclina de TbBRF1 y el segundo módulo de TbTFIIB es bastante diferente (Figura 16). Por otra parte, el *linker* de estructura al azar que conecta a ambos residuos en TbBRF1 (como ocurre con otros ortólogos de BRF1), es reemplazado por una estructura de hélice  $\alpha$  en TbTFIIB (Figura 16).



**Figura 16.** Modelado por homología de los repetidos de ciclina de TbBRF1. En la parte superior izquierda se muestra el modelo del ortólogo de BRF1 de *H. sapiens* y en la parte superior derecha el modelo del ortólogo de TFIIB de *T. brucei*. Los colores de las hélices  $\alpha$  del primer (H1 a H5) y segundo (H1' a H5') repetido de ciclina, son los mismos para todos los modelos. Las flechas indican el *linker* entre el primer y segundo repetido de ciclina, que es una hélice  $\alpha$  en TbTFIIB. Los colores coinciden con la Figura 15.

En su conjunto, los datos de los diversos análisis bioinformáticos sugieren que TbBRF1 posee todos los atributos estructurales que están presentes en otros ortólogos de BRF1.

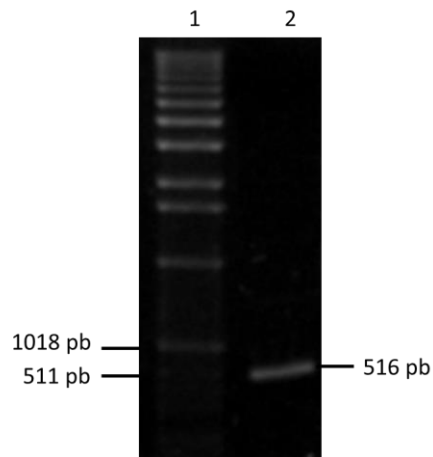
## 5.2. Análisis experimentales

Los análisis experimentales consistieron en confirmar la localización celular de TbBRF1 en el núcleo celular y analizar los efectos del *knock-down* de TbBRF1 en la supervivencia celular y en la abundancia de transcritos generados por las tres RNA Polimeras nucleares.

### 5.2.1. Localización celular

Para confirmar que TbBRF1 es una proteína nuclear, como cabría de esperarse de un factor de transcripción, se analizó la localización celular de la proteína de fusión TbBRF1-PTP, expresada en una línea celular recombinante, mediante inmunofluorescencia indirecta. Cabe recordar que el péptido de extracción PTP está conformado por un epítipo de Proteína C, un sitio de corte de la proteasa TEV y un epítipo de la Proteína A. Para tal fin se debió de obtener la construcción que permitiera la expresión de la proteína TbBRF1-PTP, transfectarla en células de *T. brucei* y obtener líneas celulares que expresaran de forma estable la proteína de fusión.

El primer paso fue amplificar 500 pb del extremo C-terminal del gen TbBRF1, sin el codón de paro, con los oligonucleótidos BRF1-PTP-5' y BRF1-PTP-3'. Se obtuvo una única banda del tamaño esperado; posteriormente este producto de PCR fue desalado y se confirmó su concentración y pureza (Figura 17).

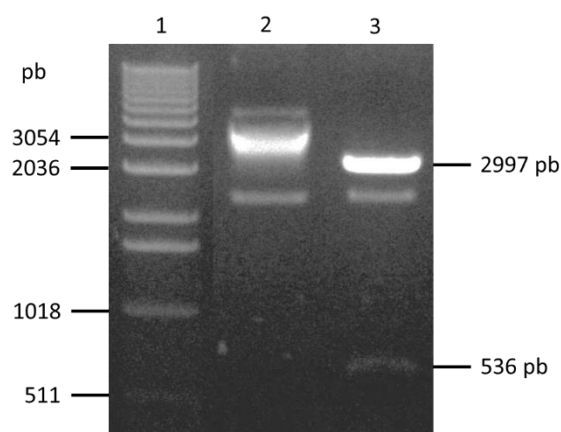


**Figura 17.** Amplificación de 500 pb del extremo C-terminal del gen de TbBRF1 y desalado del producto de PCR. Carril 1: marcador de peso molecular de 1 kb; carril 2: producto de PCR del fragmento C-terminal de TbBRF1. Gel de agarosa al 0.8%.

Este fragmento del extremo C-terminal del gen de TbBRF1 se clonó en el vector pGEM<sup>®</sup>-T Easy y posteriormente algunas de las clonas obtenidas se analizaron mediante restricción



con la enzima *EcoRI*, esperando un patrón de 2997 y 536 pb. El análisis de algunas de las clonas, arrojó el resultado esperado (Figura 18).



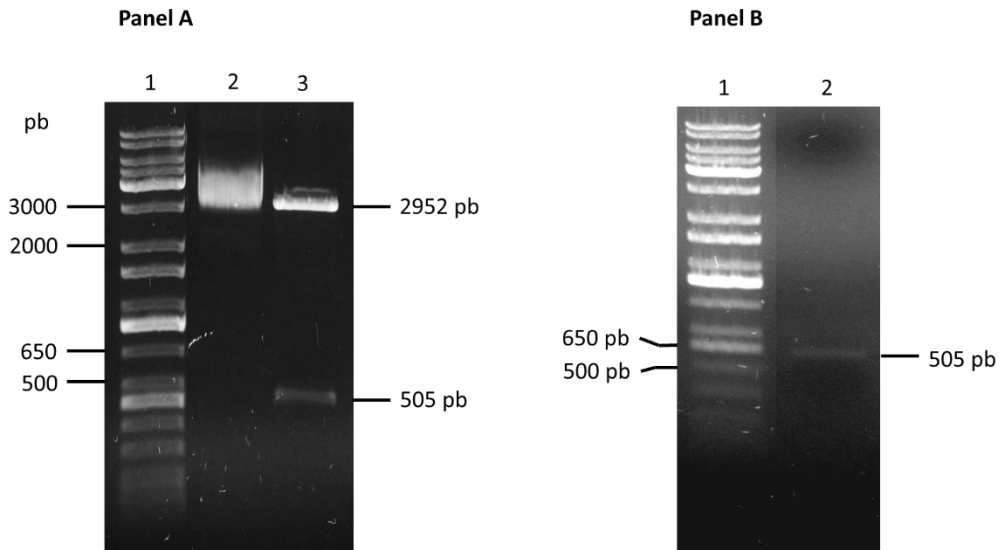
**Figura 18.** Análisis de restricción de clona pGEM-TbBRF1/C-terminal. Carril 1: marcador de peso molecular de 1 kb; carril 2: pGEM-TbBRF1/C-terminal sin digerir; carril 3: pGEM-TbBRF1/C-terminal digerido con *EcoRI*. Gel de agarosa al 0.8%.

La secuencia del inserto TbBRF1/C-terminal se confirmó mediante secuenciación, obteniendo de esta manera a la construcción pGEM-TbBRF1/C-terminal y se prosiguió con la subclonación en el vector pC-PTP-BLA.

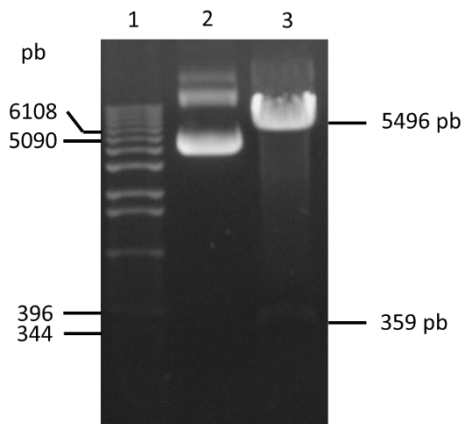
Para obtener al inserto TbBRF1/C-terminal, la construcción pGEM-TbBRF1/C-terminal se digirió con *Apal* y *NotI*. La digestión se corrió en un gel de agarosa y la banda correspondiente al inserto se escindió del gel y se purificó (Figura 19, Panel A). Se confirmó la concentración y pureza del inserto (Figura 19, Panel B) y se prosiguió a subclonarlo en el cuerpo del vector pC-PTP-BLA. Éste se obtuvo digiriendo a pC-PTP-BLA con las enzimas de restricción *Apal* y *NotI* (Figura 20), la digestión se corrió en un gel de agarosa y la banda correspondiente al cuerpo del vector (5496 pb) se escindió del gel de agarosa, se purificó y se confirmó la concentración y pureza del vector.

Se clonó el inserto de TbBRF1 en el vector pC-PTP-BLA. Algunas de las clonas obtenidas se analizaron mediante restricción con la enzima *BamHI*, esperando un patrón de restricción de 5644 y 357 pb. El análisis de algunas clonas, arrojó el resultado esperado (Figura 21).

Para determinar que el inserto de TbBRF1 estuviera en marco de lectura con el péptido de extracción PTP, se secuenció la unión entre ambos y se confirmó que no había ningún corrimiento en el marco de lectura (Figura 25, Panel A); de esta manera se obtuvo la construcción pTbBRF1-PTP (Figura 22).



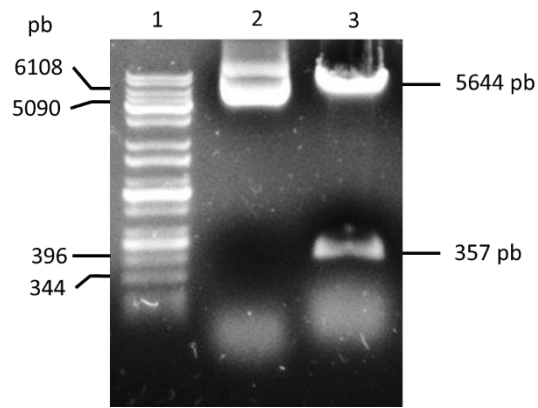
**Figura 19.** Obtención del inserto TbBRF1/C-terminal. A) Carril 1: marcador de peso molecular de 1 kb; carril 2: pGEM-TbBRF1/C-terminal sin digerir; carril 3: pGEM-TbBRF1/C-terminal digerido con *Apal* y *NotI*. B) Carril 1: marcador de peso molecular de 1 kb; carril 2: inserto TbBRF1/C-terminal purificado. Geles de agarosa al 0.8%.



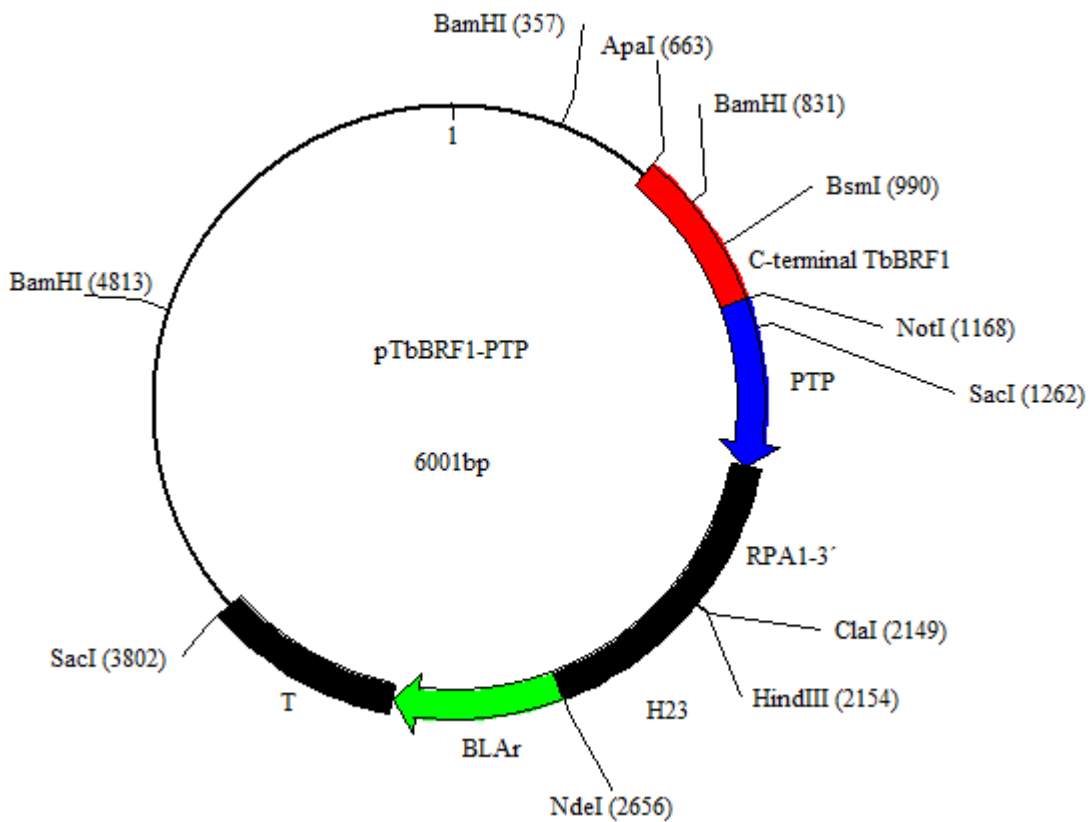
**Figura 20.** Obtención del cuerpo del vector pC-PTP-BLA. Carril 1: marcador de peso molecular de 1 kb; carril 2: pC-PTP-BLA sin digerir; carril 3: pC-PTP-BLA digerido con *Apal* y *NotI*. Gel de agarosa al 0.8%.

La construcción pTbBRF1-PTP se linearizó con la enzima *BsmI* (Figura 23) y se usó para transfectar células de *T. brucei*. La transfección se realizó por electroporación y las células

se seleccionaron con blasticidina. Una vez recuperada la población se analizó por medio de PCR para determinar si la construcción pTbBRF1-PTP se había integrado en el sitio correcto.

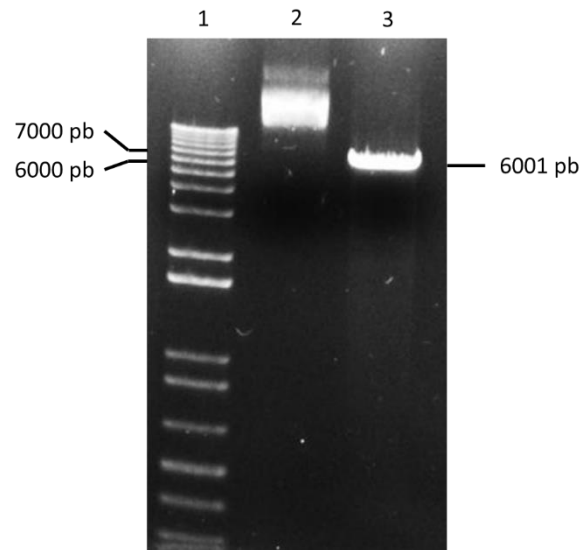


**Figura 21.** Análisis de restricción de clona pTbBRF1-PTP. Carril 1: marcador de peso molecular de 1 kb; carril 2: pTbBRF1-PTP sin digerir; carril 3: pTbBRF1-PTP digerido con *Bam*HI. Gel de agarosa al 0.8%.

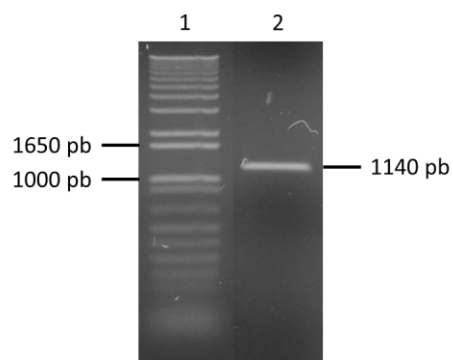


**Figura 22.** Mapa de la construcción pTbBRF1-PTP. RPA1-3', H23 y T son secuencias de procesamiento para la adición del minixón y la cola de poliadeninas; BLAr es el marcador de resistencia a blasticidina.

El principio del análisis consistía en usar un oligonucleótido que hibridara dentro de la construcción y otro que hibridara fuera de la construcción, en el sitio de integración. Se obtuvo un fragmento del tamaño esperado de 1140 pb (Figura 24), lo que indicó que la construcción se integró en el sitio correcto.



**Figura 23.** Construcción pTbBRF1-PTP linearizada con la enzima *BsmI*. Carril 1: marcador de peso molecular de 1 kb; carril 2: pTbBRF1-PTP sin digerir; carril 3: pTbBRF1-PTP digerido con *BsmI*. Gel de agarosa al 0.8%.



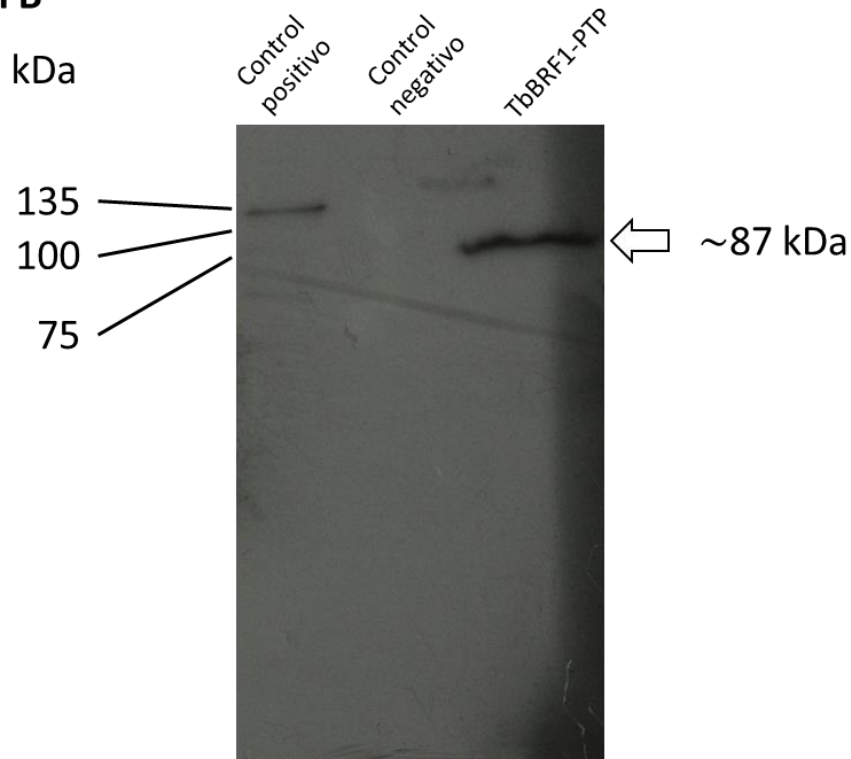
**Figura 24.** Análisis por PCR de la población TbBRF1-PTP. Carril 1: marcador de peso molecular de 1 kb; carril 2: producto de PCR del análisis de una clona TbBRF1-PTP. Gel de agarosa al 0.8%.

## Panel A

```
      250      260      270      280      290      300
TGATGAACTGATTCCAGGTCTTGC GGGTTTAGAAAAC TCAGCGGAGGATGAATGGGTCGC
* * T D S R S C G F R K L S G G * M G R
  D E L I P G L A G L E N S A E D E W V A
L M N * F Q V L R V * K T Q R R M N G S

      310      320      330      340      350      360
TGCGCGGCCGCTGGAAGATCAGGTGGATCCTCGTCTTATTGATGGGAAATATGATATTCC
C A A A G R S G G S S S Y * W E I * Y S
  A R P L E D Q V D P R L I D G K Y D I P
L R G R W K I R W I L V L L M G N M I F
```

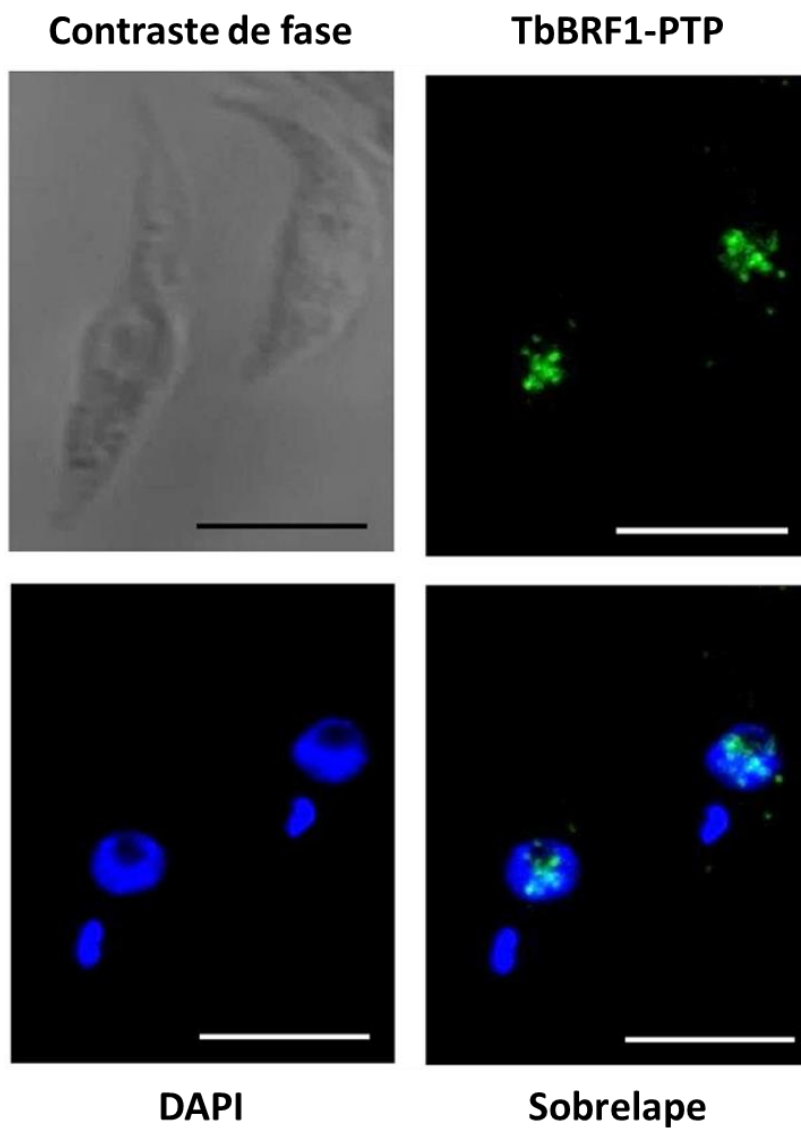
## Panel B



**Figura 25.** Análisis de clonas celulares TbBRF1-PTP. A) Traducción *in silico* de la secuencia del marco abierto de lectura entre el final de TbBRF1 y el comienzo del epítipo PTP (sólo se muestra la secuencia de Proteína C). Los colores coinciden con el mapa de la Figura 22. B) Análisis tipo Western blot de una clona celular TbBRF1-PTP. Como control positivo se usó un extracto total de una línea celular de *L. major* que expresa la proteína recombinante C128-PTP. Como control negativo se usó un extracto total de células silvestres de *T. brucei*. El anticuerpo usado fue un  $\alpha$ -ProtC, que reconoce al epítipo de Proteína C.

Una vez confirmada la integración de la construcción pTbBRF1-PTP, se prosiguió a obtener clonas celulares por el método de dilución en serie. Algunas de las clonas celulares se

analizaron para determinar si se expresaba la proteína recombinante TbBRF1-PTP. Para tal fin se realizó un ensayo Western blot con extractos totales de las clonas celulares y utilizando un anticuerpo  $\alpha$ -ProtC (Proteína C) para detectar a la proteína TbBRF1-PTP (Figura 25); únicamente se detectó una banda de aproximadamente 87 kDa, que corresponde con la proteína recombinante TbBRF1-PTP.



**Figura 26.** Microfotografías de la Inmunofluorescencia Indirecta hacia TbBRF1. TbBRF1-PTP se detectó con Alexa-488 (verde) conjugado con  $\alpha$ -ProtC. El núcleo y el cinetoplasto se tiñeron con DAPI (azul). La barra de escala corresponde a 5  $\mu$ m.

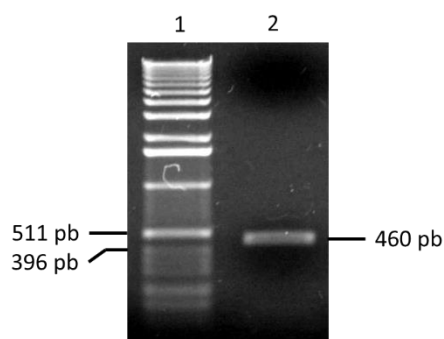
Se seleccionó una clona para realizar la localización celular mediante inmunofluorescencia indirecta, utilizando como anticuerpo primario un anticuerpo  $\alpha$ -ProtC y un anticuerpo secundario acoplado a Alexa 488. Se utilizó un microscopio Leica (SP5, DM 16000, Mo), con un objetivo 100 $\times$  y las imágenes se analizaron con el programa LAS AF software. En las microfotografías de la Figura 26, se puede apreciar que TbBRF1-PTP se localiza en el núcleo, como es de esperarse de un factor de transcripción de una RNA Polimerasa nuclear.

La correlación de Pearson para la colocalización nuclear TbBRF1-PTP / DAPI (DNA) fue de 0.76. La señal de TbBRF1 es punteada, misma que se ha reportado para TFIIB y TFIIC en humano y *S. pombe* (Haeusler & Engelke, 2006).

### 5.2.2. Análisis del *knock-down*

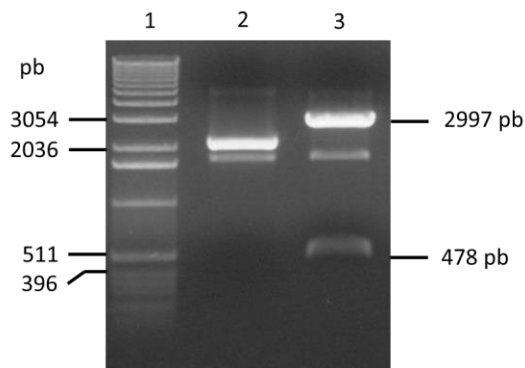
Para analizar el papel de TbBRF1 en *T. brucei* se obtuvo una línea celular de RNAi regulable mediante un sistema de inducción con doxiciclina. Para tal fin se debió de obtener la construcción que permitiera la inducción de RNAi hacia el mRNA de TbBRF1, transfectarla en células de *T. brucei* y obtener líneas celulares.

El primer paso fue analizar la secuencia de nucleótidos de TbBRF1 con el servidor TrypanoFAN para identificar la mejor secuencia blanco para dirigir una respuesta específica. Dicha secuencia comprende entre los nucleótidos 780 a 1224 y fue amplificada con los oligonucleótidos BRF1-RNAi-5' y BRF1-RNAi-3'. Se obtuvo una única banda del tamaño esperado; este producto de PCR fue desalado y se confirmó su concentración y pureza (Figura 27).



**Figura 27.** Amplificación de la secuencia blanco de TbBRF1 y desalado del producto de PCR. Carril 1: marcador de peso molecular de 1 kb; carril 2: producto de PCR del fragmento TbBRF1/RNAi. Gel de agarosa al 0.8%.

Este fragmento (TbBRF1/RNAi) se clonó en el vector pGEM®-T Easy y posteriormente algunas de las clonas obtenidas se analizaron mediante restricción con la enzima *EcoRI*, esperando un patrón de 2997 y 478 pb. El análisis de algunas clonas, arrojó el resultado esperado (Figura 28).



**Figura 28.** Análisis de restricción de pGEM-TbBRF1/RNAi. Carril 1: marcador de peso molecular de 1 kb; carril 2: pGEM-TbBRF1/RNAi; carril 3: pGEM-TbBRF1/RNAi digerido con *EcoRI*. Gel de agarosa al 0.8%.

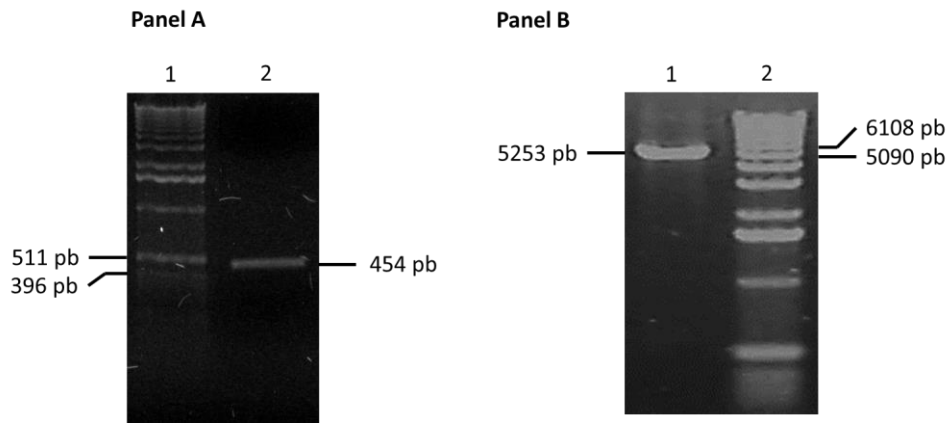
La identidad del inserto TbBRF1/RNAi se confirmó mediante secuenciación, obteniendo de esta manera a la construcción pGEM-TbBRF1/RNAi, y se prosiguió con la subclonación en el vector p2T7-177.

Para obtener al inserto TbBRF1/RNAi, la construcción pGEM-TbBRF1/RNAi se digirió con *Bam*HI y *Xho*I, la digestión se corrió en un gel de agarosa y la banda correspondiente al inserto se escindió del gel y se purificó. Se confirmó la concentración y pureza del inserto (Figura 29, Panel A) y se prosiguió a subclonarlo en el cuerpo del vector p2T7-177. Éste se obtuvo digiriendo a p2T7-177 con las enzimas de restricción *Bam*HI y *Xho*I, la digestión se corrió en un gel de agarosa y la banda correspondiente al cuerpo del vector se escindió del gel, se purificó y se confirmó la concentración y pureza del vector (Figura 29, Panel B).

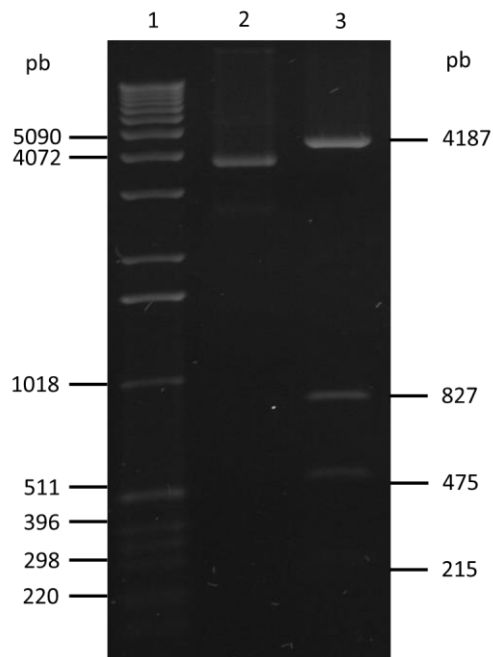
Se procedió entonces a clonar el inserto de TbBRF1 en el vector p2T7-177. Algunas de las clonas obtenidas se analizaron mediante restricción con la enzimas *Xba*I y *Xma*I, esperando un patrón de restricción de 215, 475, 827 y 4187 pb (Figura 30). El análisis de algunas clonas,



arrojó el resultado esperado (Figura 31), obteniéndose la construcción p2T7-TbBRF1 (Figura 31).

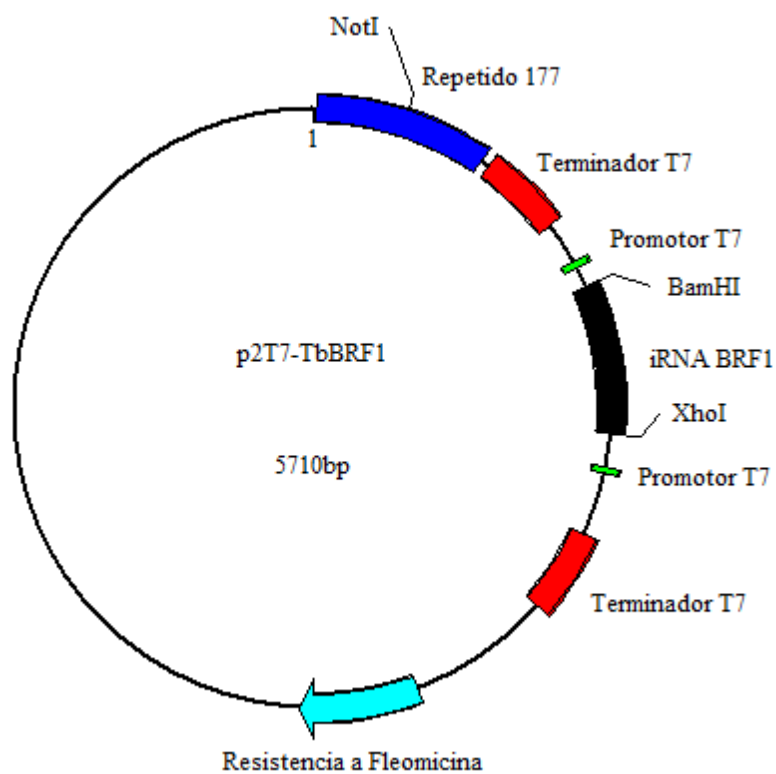


**Figura 29.** Obtención del inserto TbBRF1/RNAi y del cuerpo del vector p2T7-177. A) Carril 1: marcador de peso molecular de 1 kb; carril 2: inserto TbBRF1/RNAi purificado. B) Carril 1: cuerpo del vector p2T7-177 con sitios de clonación *Bam*HI y *Xho*I; carril 2: marcador de peso molecular de 1 kb. Geles de agarosa al 0.8%.

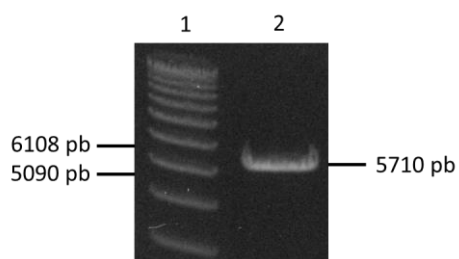


**Figura 30.** Análisis de restricción de clona p2T7-TbBRF1. Carril 1: marcador de peso molecular de 1 kb; carril 2: p2T7-TbBRF1; carril 3: p2T7-TbBRF1 digerido con *Xba*I y *Xma*I. Gel de agarosa al 0.8%.

La construcción p2T7-TbBRF1 se linearizó con la enzima *NotI* (Figura 32) y se usó para transfectar células de *T. brucei*. La transfección se realizó por electroporación y las células se seleccionaron con fleomicina. Una vez recuperada la población se obtuvieron clones celulares por el método de dilución en serie. Se seleccionó una para los análisis del *knock-down* de TbBRF1 en el crecimiento celular y la transcripción, por medio de la inducción de RNAi hacia el mRNA de TbBRF1.



**Figura 31.** Mapa de la construcción p2T7-TbBRF1.



**Figura 32.** Construcción p2T7-TbBRF1 linearizada con la enzima *NotI*. Carril 1: marcador de peso molecular de 1 kb; carril 2: p2T7-TbBRF1 digerido con *NotI*. Gel de agarosa al 0.8%.

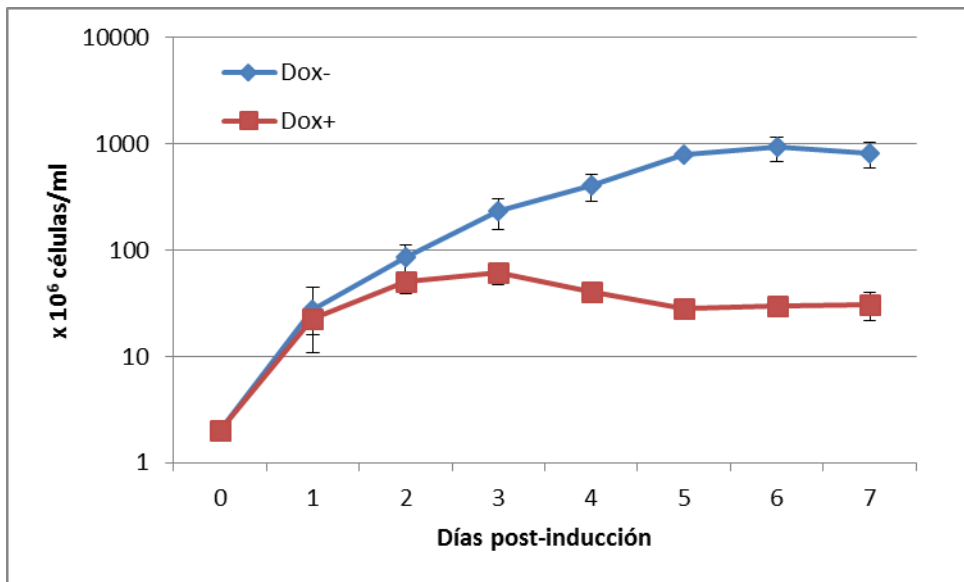
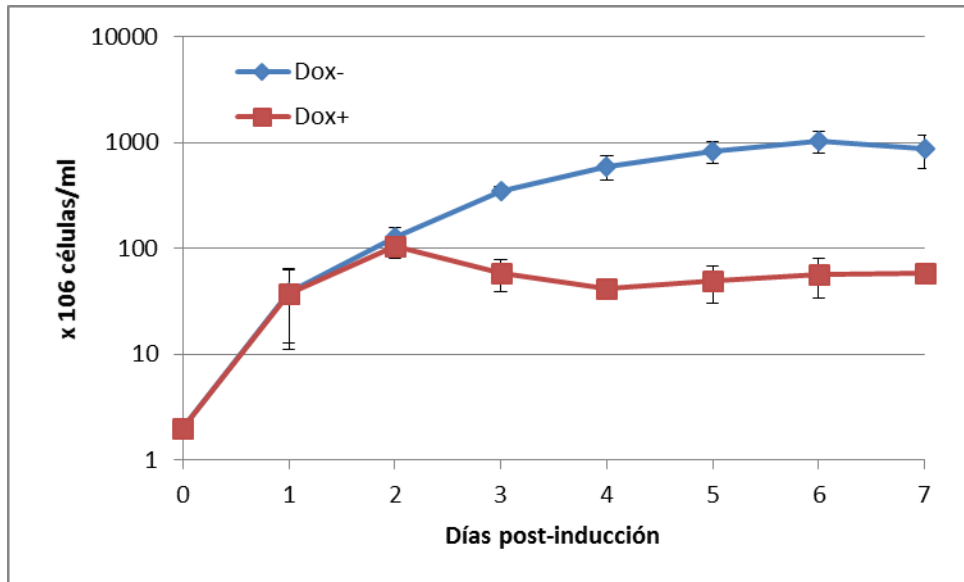
### 5.2.2.1. Curvas de crecimiento del cultivo *knock-down* de TbBRF1

Para determinar si TbBRF1 es necesario para la supervivencia de *T. brucei*, se indujo la RNAi hacia el mRNA de TbBRF1 por medio de doxiciclina. Para tal fin, partiendo de un cultivo se iniciaron dos cultivos independientes, en uno se indujo la RNAi (Dox+), mientras que el otro se usó como control (Dox-) y se monitoreo el crecimiento de ambos cultivos mediante curvas de crecimiento. El cultivo Dox- creció normalmente, pero el cultivo Dox+ dejó de dividirse 48 horas después de la inducción de la RNAi hacia TbBRF1 y murió a las 96 horas post-inducción. Resultados similares se obtuvieron al analizar el crecimiento de una segunda clona (Figura 33). No se detectaron anomalías en la morfología celular, ni en el movimiento celular de los cultivos *knock-down*.

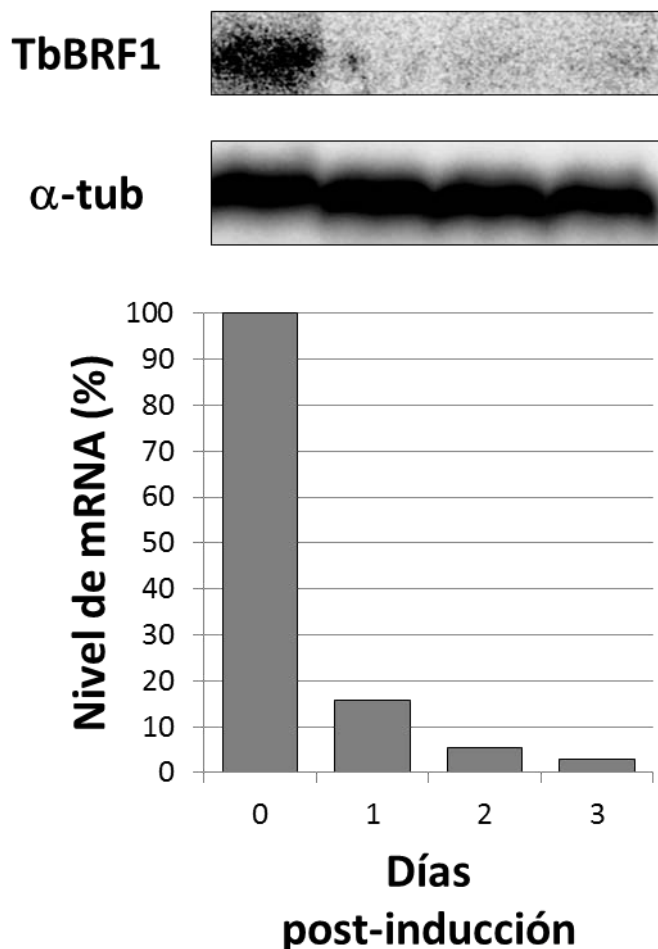
Para comprobar que el efecto observado en las curvas de crecimiento se debió a la respuesta de RNAi hacia el mRNA de TbBRF1, fue necesario comprobar que el mencionado mRNA disminuyera. Para tal fin se obtuvieron extractos totales de RNA del cultivo Dox+ a diferentes tiempos y se analizaron mediante Northern blot, usando como sonda un fragmento de la región 3' no traducida (Figura 34). Se calculó que el mRNA de TbBRF1 disminuyó en un 95% a las 72 horas post-inducción, tomando como referencia el tiempo 0 y un control de carga de  $\alpha$ -tubulina.

Para comprobar que el efecto observado en las curvas de crecimiento se debiera a una disminución en la cantidad de la proteína TbBRF1, se midieron los niveles de la proteína mediante Western blot. Para tal fin, primero se debió de generar un anticuerpo policlonal que reconociera de manera específica a TbBRF1, inmunizando conejos con una proteína recombinante TbBRF1r fusionada a un epítoto de poli-histidinas.

El primer paso fue amplificar todo el gen de TbBRF1, sin el codón de paro, con los oligonucleótidos TbBRF1-SacI-F y TbBRF1-XbaI-R. Se obtuvo una única banda del tamaño esperado de 1836 pb. Este producto de PCR fue desalado, se confirmó su concentración y pureza (Figura 35) y se clonó el vector pGEM<sup>®</sup>-T Easy.



**Figura 33.** Curvas de crecimiento del *knock-down* hacia TbBRF1. Curvas de crecimiento de dos clones 2T7-TbBRF1 no inducidas / Dox- (●) e inducidas / Dox+ (■). Ambos cultivos se contaron diario y se resebraron a una densidad de  $2 \times 10^6$  células/ml. Los valores representan la densidad celular acumulativa por el factor de dilución.

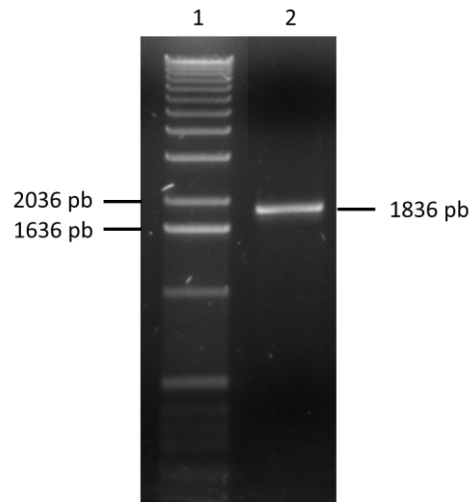


**Figura 34.** Análisis tipo Northern blot del cultivo *knock-down* de TbBRF1. Se consideró como 100% la señal del cultivo no inducido (Dox-); los valores representan el promedio de dos experimentos independientes; los valores se normalizaron con un control de carga de  $\alpha$ -tubulina.

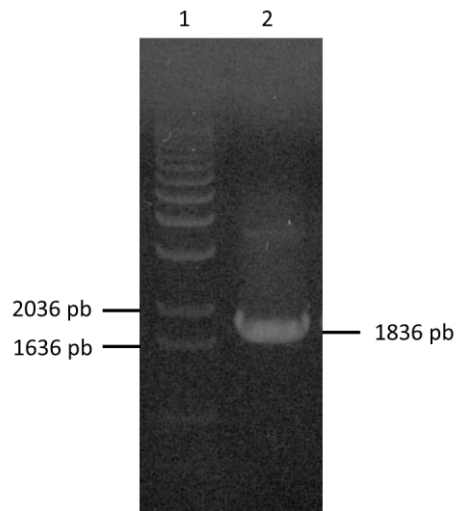
Algunas de las clonas obtenidas se analizaron por PCR de colonia, usando los mismos oligonucleótidos que se utilizaron para la amplificación a partir de DNAg. Con algunas de las clonas analizadas, se obtuvo una única banda del tamaño esperado (Figura 36).

La identidad del inserto se confirmó mediante secuenciación, obteniendo de esta manera a la construcción pGEM-TbBRF1. Para liberar el inserto del gen TbBRF1, la construcción pGEM-TbBRF1 se digirió con *SacI* y *XbaI* (Figura 37, Panel A). La digestión se corrió en un gel de agarosa, la banda correspondiente al inserto (1826 pb) se escindió, se purificó, se confirmó su concentración y pureza (Figura 37, Panel B) y se subclonó en el cuerpo del

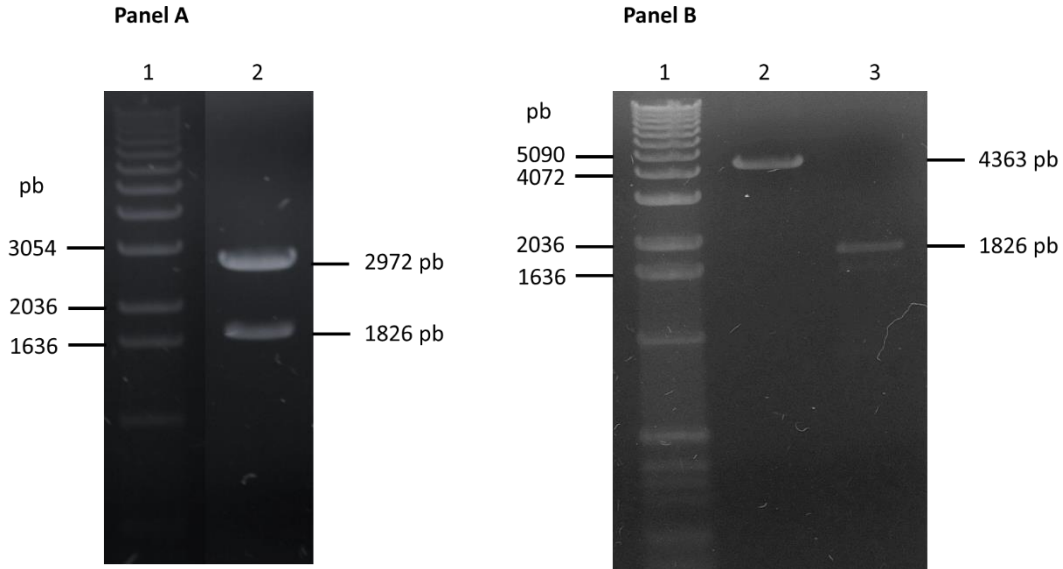
vector pCold™ I DNA previamente digerido con las mismas enzimas de restricción (*SacI* y *XbaI*). De manera similar, la digestión del vector se corrió en un gel de agarosa, la banda correspondiente al cuerpo del vector se escindió, se purificó, se confirmó su concentración y pureza (Figura 37, Panel B).



**Figura 35.** Amplificación de todo el gen de TbBRF1 y desalado del producto de PCR. Carril 1: marcador de peso molecular de 1 kb; carril 2: producto de PCR de todo el gen de TbBRF1. Gel de agarosa al 0.8%.



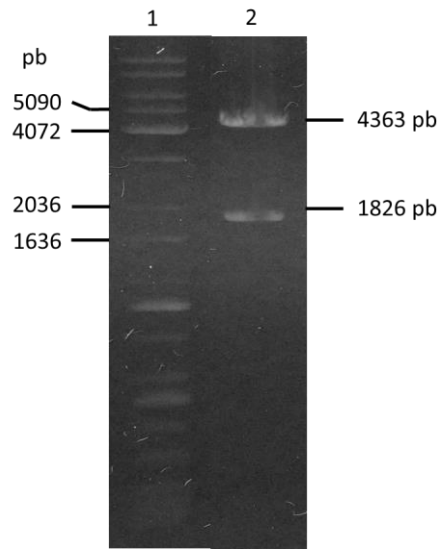
**Figura 36.** PCR de colonia de pGEM-TbBRF1. Carril 1: marcador de peso molecular de 1 kb; carril 2: producto de PCR del análisis de una clona. Gel de agarosa al 0.8%.



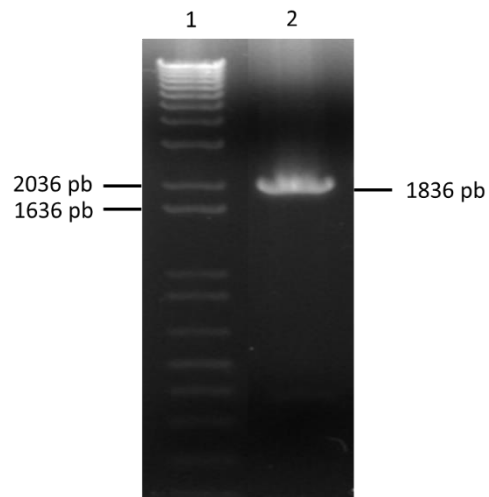
**Figura 37.** Obtención del inserto y del cuerpo del vector pCold™ I DNA. A) Carril 1: marcador de peso molecular de 1 kb; pGEM-TbBRF1 digerido con *SacI* y *XbaI*. B) Carril 1: marcador de peso molecular de 1 kb; pCold™ I DNA con los sitios de clonación *SacI* y *XbaI*; carril 3: inserto TbBRF1 purificado. Geles de agarosa al 0.8%.

Algunas de las clonas obtenidas se analizaron mediante restricción usando las enzimas utilizadas para la clonación (*XbaI* y *SacI*), esperando un patrón de restricción de 4363 y 1826 pb. Algunas de las clonas mostraron el patrón esperado (Figura 38); se secuenció la región donde se une el marco de lectura del gen de TbBRF1 con el marco de la cola de poli histidinas que sirven para la purificación de la proteína. Se observó que no hubo corrimientos en el marco de lectura y de esta manera se obtuvo la construcción pCold-TbBRF1.

pCold-TbBRF1 se utilizó para transformar células competentes de *E. coli* de la cepa BL21 (DE3); la transformación se confirmó mediante PCR de colonia (Figura 39). La expresión de la proteína recombinante TbBRF1r se indujo con IPTG y se purificó por medio de una columna de níquel (Figura 40).

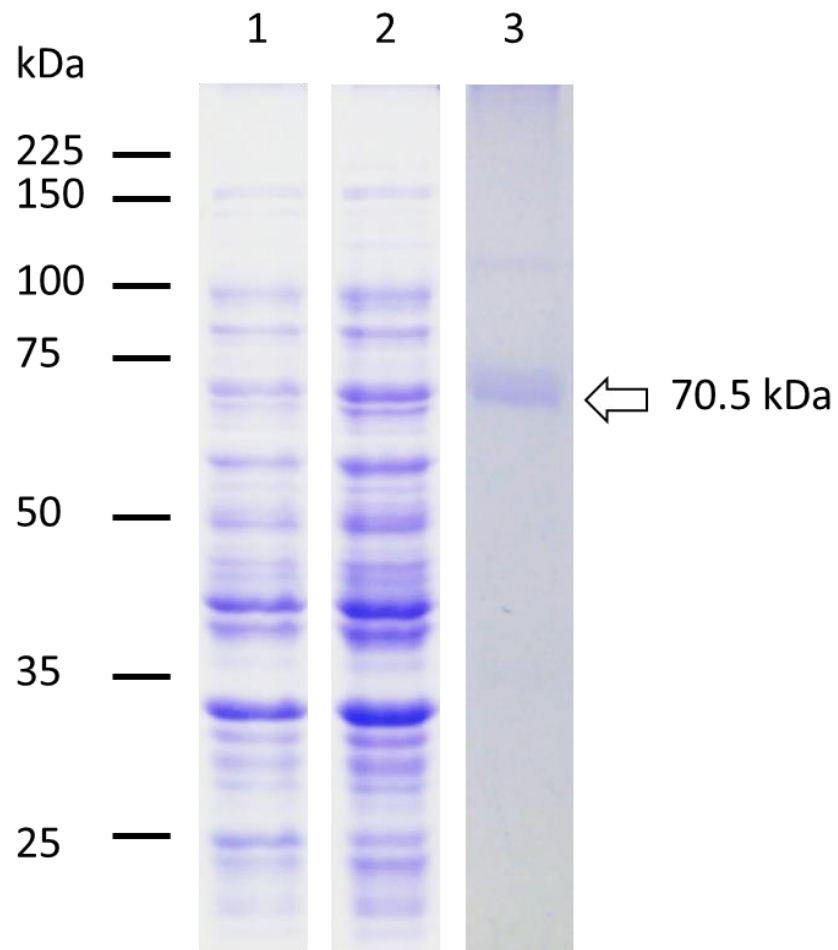


**Figura 38.** Análisis de restricción de clona pCold-TbBRF1. Carril 1: marcador de peso molecular de 1 kb; carril 2: pCold-TbBRF1 digerido con *Xba*I y *Sac*I. Gel de agarosa al 0.8%.



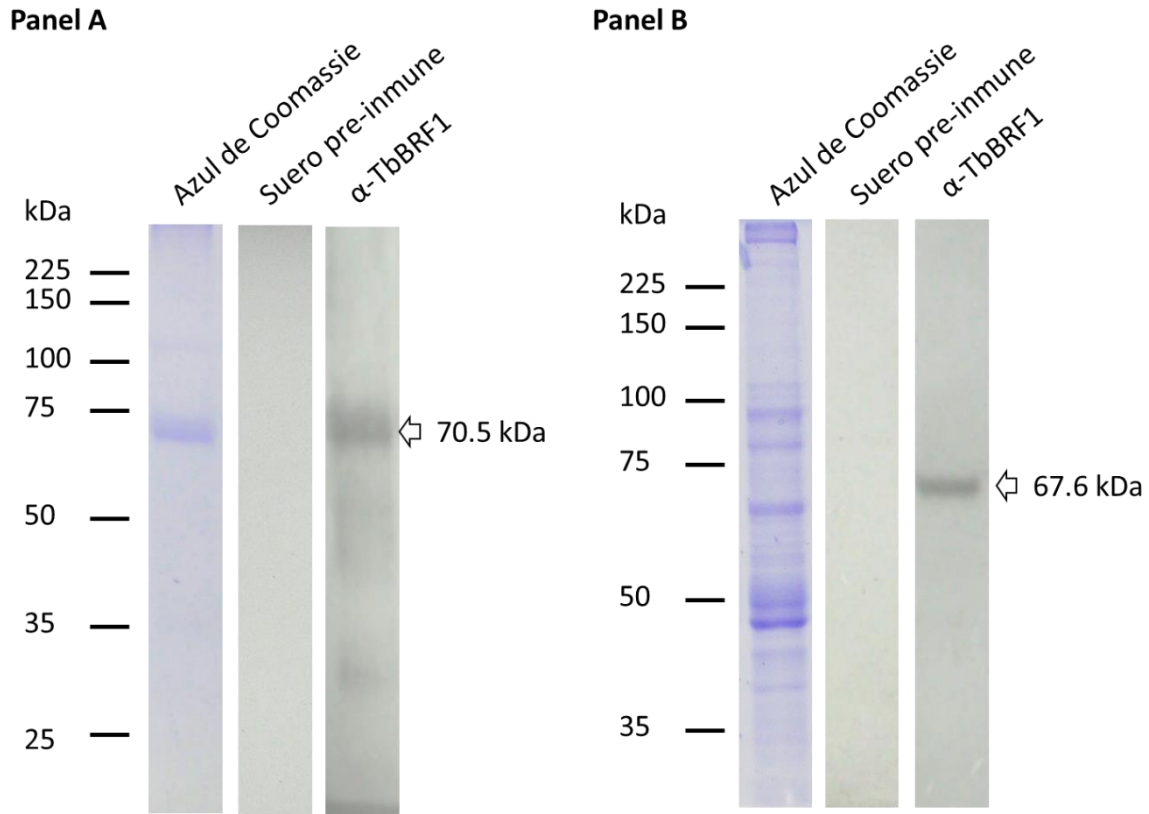
**Figura 39.** PCR de colonia de pCold-TbBRF1 (clonado en las células de expresión). Carril 1: marcador de peso molecular de 1 kb; carril 2: producto de PCR del análisis de una clona. Gel de agarosa al 0.8%.





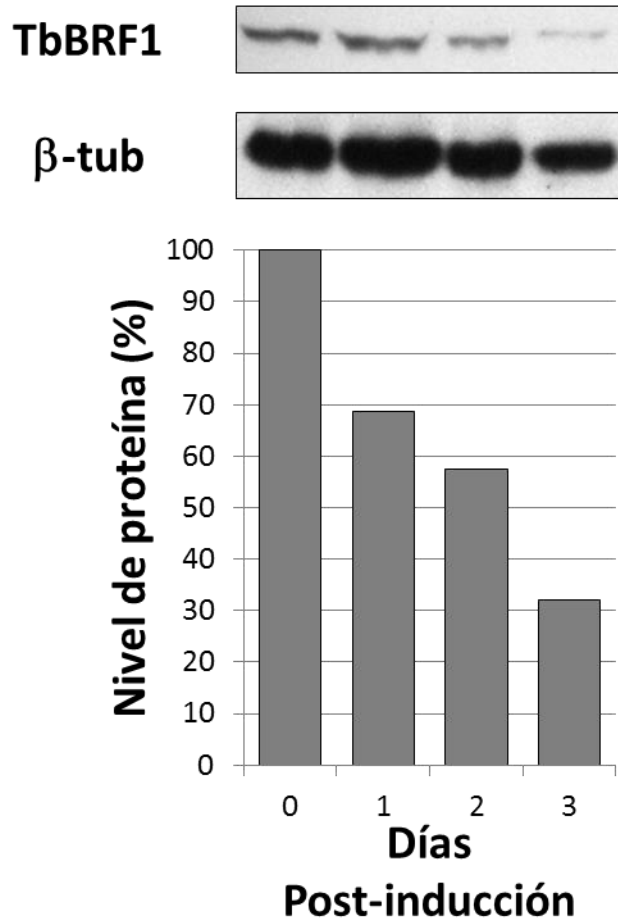
**Figura 40.** Inducción y purificación de TbBRF1r. SDS-PAGE al 12%. Carril 1: células no inducidas; carril 2: células inducidas con IPTG; carril 3: TbBRF1r purificado. Se indica el tamaño esperado para TbBRF1r (70.5 kDa).

La proteína recombinante TbBRF1r se utilizó para inmunizar conejos. El suero preinmune y el anticuerpo obtenido ( $\alpha$ -TbBRF1r) se probó contra la proteína TbBRF1r purificada y extractos totales de *T. brucei* (Figura 41). Demostrándose que se detectaba una única banda del tamaño esperado para la TbBRF1 endógena.



**Figura 41.** Obtención del anticuerpo  $\alpha$ -TbBRF1r. A) Células BL21 (DE3). B) Extractos totales de *T. brucei*. SDS-PAGE al 12%. Se usó suero pre-inmune como control y el anticuerpo  $\alpha$ -TbBRF1r se usó a una dilución de 1:1,000.

El anticuerpo  $\alpha$ -TbBRF1r se utilizó para analizar extractos totales, obtenidos a diferentes tiempos, de un cultivo donde se había inducido la RNAi hacia el mRNA de TbBRF1. Se usó como referencia el tiempo 0 y un control de carga de  $\beta$ -tubulina, se calculó que la proteína TbBRF1 disminuyó en un 75% a las 72 horas post-inducción (Figura 42).



**Figura 42.** Análisis tipo Western blot del cultivo *knock-down* de TbBRF1. Se consideró como 100% la señal del cultivo no inducido (Dox-); los valores representan el promedio de dos experimentos independientes; los valores se normalizaron con un control de carga de β-tubulina. Se utilizó el α-TbBRF1r a una dilución 1:1,000.

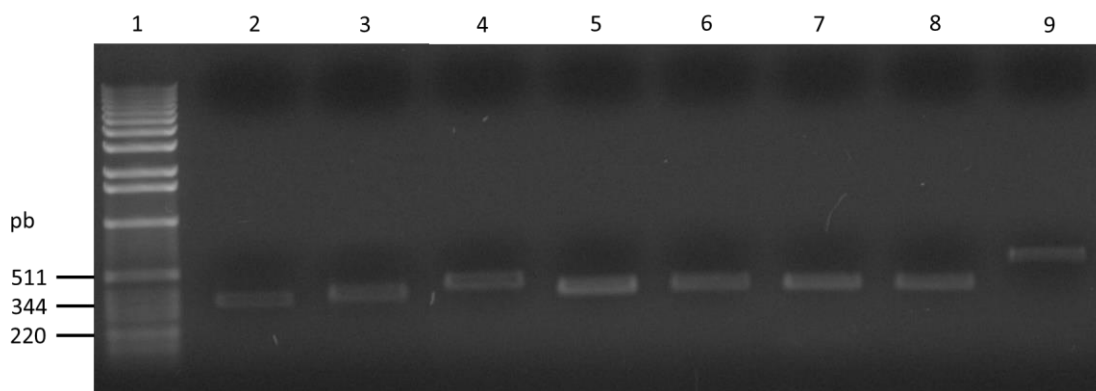
Estos resultados muestran en conjunto que el sistema de RNAi hacia TbBRF1 se activa de manera específica mediante la inducción con doxiciclina, produciendo la degradación específica del mRNA correspondiente y la concomitante disminución de la proteína, generando así un *knock-down* de TbBRF1.

Todos estos resultados demuestran que TbBRF1 es esencial para la supervivencia de *T. brucei*, como ha sido reportado en *S. cerevisiae* (Buratowski & Zhou, 1992; Colbert & Hahn 1992; Kassavetis *et al.*, 1991).

### 5.2.2.2. Efecto del *knock-down* de TbBRF1 en transcripción

Para analizar la función de TbBRF1 como factor de transcripción, se analizó el efecto del *knock-down* de dicha proteína en la abundancia de diferentes transcritos generados por las tres RNA Polimerasas nucleares, mediante marcaje radioactivo de transcritos nacientes o *run-on* nuclear y PCR cuantitativo en tiempo real. Los genes analizados fueron el rRNA 18S y prociclina transcritos por la RNAP-I;  $\alpha$ -tubulina, Elp3b, ncRNA SL transcritos por la RNAP-II; y rRNA 5S, snRNA U2, ncRNA 7SL, tRNA-Arg, tRNA-Phe y tRNA-Tyr transcritos por la RNAP-III.

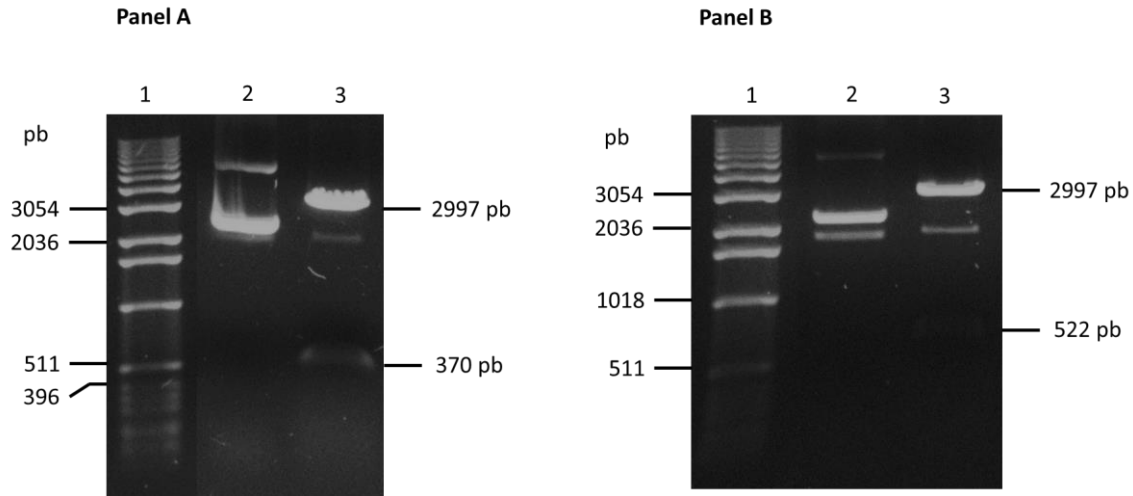
En el caso de los ensayos de *run-on* nuclear, el primer paso consistió en la amplificación de fragmentos que contuvieran parte o la totalidad de los genes seleccionados. Los oligonucleótidos empleados se enlistan en la Tabla 2, y en todos los casos se obtuvo una única banda del tamaño esperado para todos los fragmentos (Figura 43).



**Figura 43.** Amplificación de algunos de los fragmentos para el ensayo de *run-on*. Carril 1: marcador de peso molecular de 1 kb; carriles 2 a 9: productos de PCR de la amplificación de Prociclina, ncRNA SL, rRNA 18S, rRNA 5S, snRNA U2, tRNA-Arg, ncRNA 7SL y tRNA-Phe, respectivamente. Gel de agarosa al 0.8%.

Todos estos productos de PCR se desalaron y se clonaron en el vector pGEM<sup>®</sup>-T Easy. Algunas de las clonas obtenidas se analizaron mediante restricción con la enzima *EcoRI* esperando diferentes patrones de restricción. En la Figura 44 se muestra un resultado representativo de las clonas pGEM-TbncRNA SL y pGEM-TbtRNA-Phe. La identidad de los insertos se confirmó mediante secuenciación.

Las construcciones se utilizaron para preparar filtros para *dot*-blot que contenían todos los genes clonados, además de un control negativo que consistió en el vector de clonación pGEM®-T Easy vacío y circularizado.



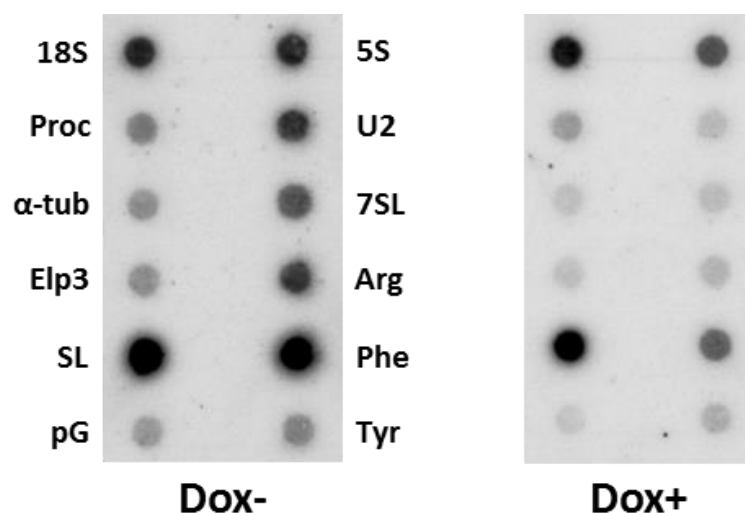
**Figura 44.** Análisis de restricción de las clonas pGEM-TbncRNA SL (A) y pGEM-TbtRNA-Phe (B) de los fragmentos para el ensayo de *run-on*. A) Carril 1: marcador de peso molecular de 1 kb; carril 2: pGEM-TbncRNA SL sin digerir; carril 3: pGEM-TbncRNA SL digerido con *EcoRI*. B) Carril 1: marcador de peso molecular de 1 kb; carril 2: pGEM-TbtRNA-Phe sin digerir; carril 3: pGEM-TbtRNA-Phe digerido con *EcoRI*. Geles de agarosa al 0.8%.

Partiendo del mismo cultivo se dividió a la mitad y se indujo la RNAi hacia el mRNA de TbBRF1 con doxiciclina. El cultivo se resembró a las 24 horas, se extrajeron los núcleos a las 48 horas y se realizó el marcaje radioactivo de los transcritos nacientes mediante *run-on* nuclear. El producto de este *run-on* se utilizó como sonda para hibridar los filtros que contenían todos los fragmentos a probar (*dot*-blots). En la Figura 45 se presentan los autoradiogramas representativos de un experimento.

La Figura 46 muestra la cuantificación de los *dot*-blots de tres experimentos independientes, donde la señal de transcripción obtenida con las células no inducidas se tomó como el 100%. Como se esperaba, la transcripción de los genes transcritos por la RNAP-III (snRNA U2, ncRNA 7SL, tRNA-Arg, tRNA-Phe y tRNA-Tyr) se redujo en un rango de ~24 a 36% respecto al control. EL rRNA 5S también se redujo, pero en menor magnitud (~65%). Estos resultados confirman la participación de TbBRF1 en la transcripción de todos

los genes transcritos por la RNAP-III. En relación a los genes transcritos por la RNAP-I, la señal del rRNA 18S no se vio afectada, mientras que la señal del gen de prociclina se redujo ligeramente (~87%).

Curiosamente, la transcripción de los genes transcritos por la RNAP-II se redujo a ~29% para  $\alpha$ -tubulina y ~55% para Elp3b. En contraste, la transcripción del ncRNA SL, que también es transcrito por la RNAP-II, se redujo ligeramente a ~78% respecto al control.

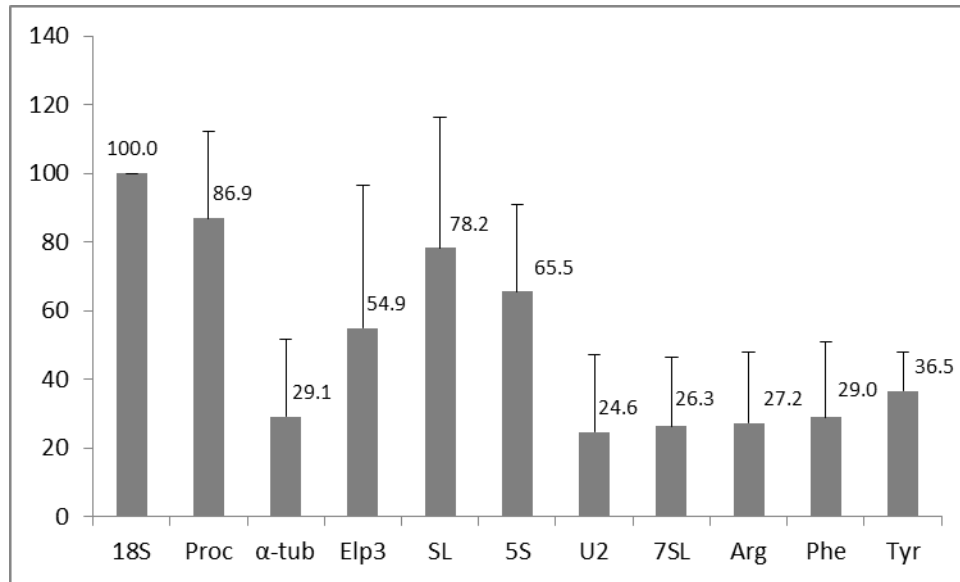


**Figura 45.** Dot-blot del *run-on* nuclear del *knock-down* de TbBRF1. El ensayo de *run-on* nuclear se realizó con células no inducidas e inducidas por 48 horas. El RNA nascente marcado se usó para hibridar filtros *dot-blot* con 2  $\mu$ g de los genes que se analizaron: rRNA 18S (18S), prociclina (Proc),  $\alpha$ -tubulina ( $\alpha$ -tub), Elp3b (Elp3), ncRNA SL (SL), rRNA 5S (5S), snRNA U2 (U2), ncRNA 7SL (7SL), tRNA-Arg (Arg), tRNA-Phe (Phe) y tRNA-Tyr (Tyr); también se incluyó el cuerpo del vector pGEM<sup>®</sup>-T Easy vacío (pG).

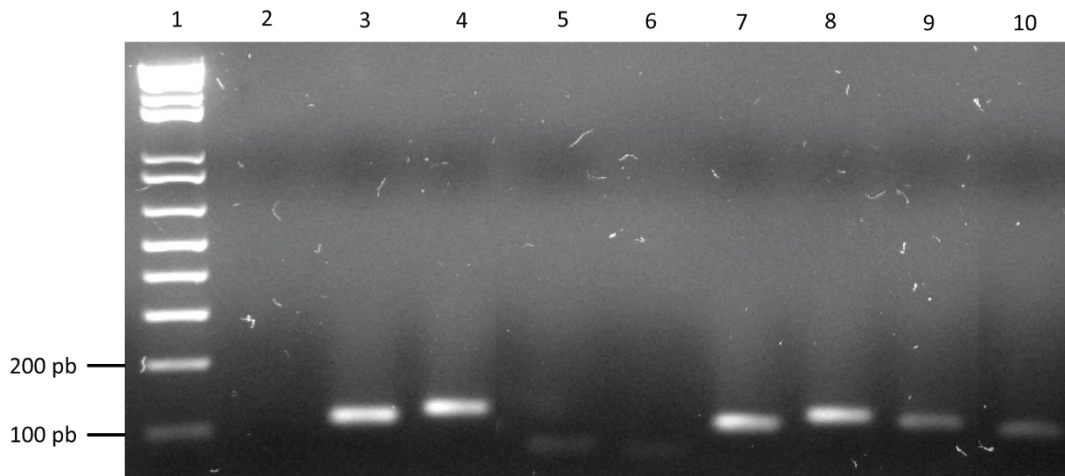
De manera complementaria al análisis de transcripción nascente, se analizó el nivel basal de algunos transcritos mediante PCR en tiempo real cuantitativo, utilizando muestras de RNA total.

El primer paso fue determinar si se producía un producto único del tamaño esperado con los oligonucleótidos que se diseñaron para este ensayo. El resultado se muestra en la Figura 47 donde se observa que se obtiene un producto único y del tamaño esperado. Cabe señalar

que el templado en estos PCR fue cDNA de células silvestres, con los oligonucleótidos detallados en la Tabla 2.



**Figura 46.** Análisis densitométrico del *run-on* nuclear del *knock-down* de TbBRF1. Se muestra el promedio de 3 experimentos independientes, se incluyen las barras de desviación estándar. Se usó como 100% la señal de los cultivos no inducidos (Dox-) y la señal del rRNA 18S se usó para normalizar los datos. Las abreviaturas son las mismas que en la Figura 45.



**Figura 47.** Amplificación de fragmentos seleccionados para el RT-PCR utilizando cDNA. Carril 1: marcador de peso molecular de 1 kb; carriles 2 a 10: productos de PCR de los genes rRNA 18S, Prociclina, tRNA-Ala, tRNA-Arg, α-tubulina, TbZ5, TbTFIIB y Elp3, respectivamente. Gel de agarosa al 0.8%.

Una vez confirmado que se amplificó un fragmento único y del tamaño esperado, se obtuvo la eficiencia de amplificación para cada uno de los pares de oligonucleótidos. A manera de ejemplo se muestra la curva estándar para el rRNA 18S y el tRNA-Arg, cuyas eficiencias de reacción fueron 84 y 99%, respectivamente. Posteriormente se prosiguió a hacer el ensayo propiamente.

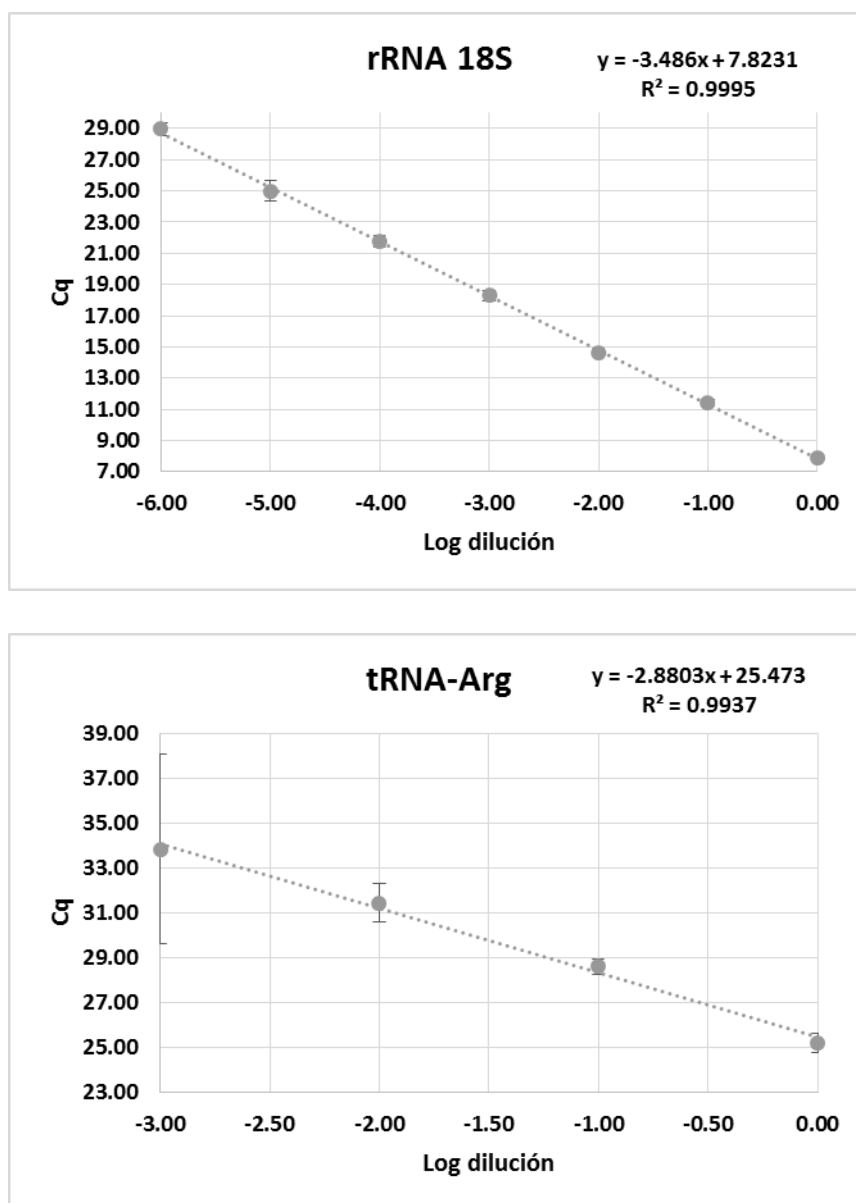
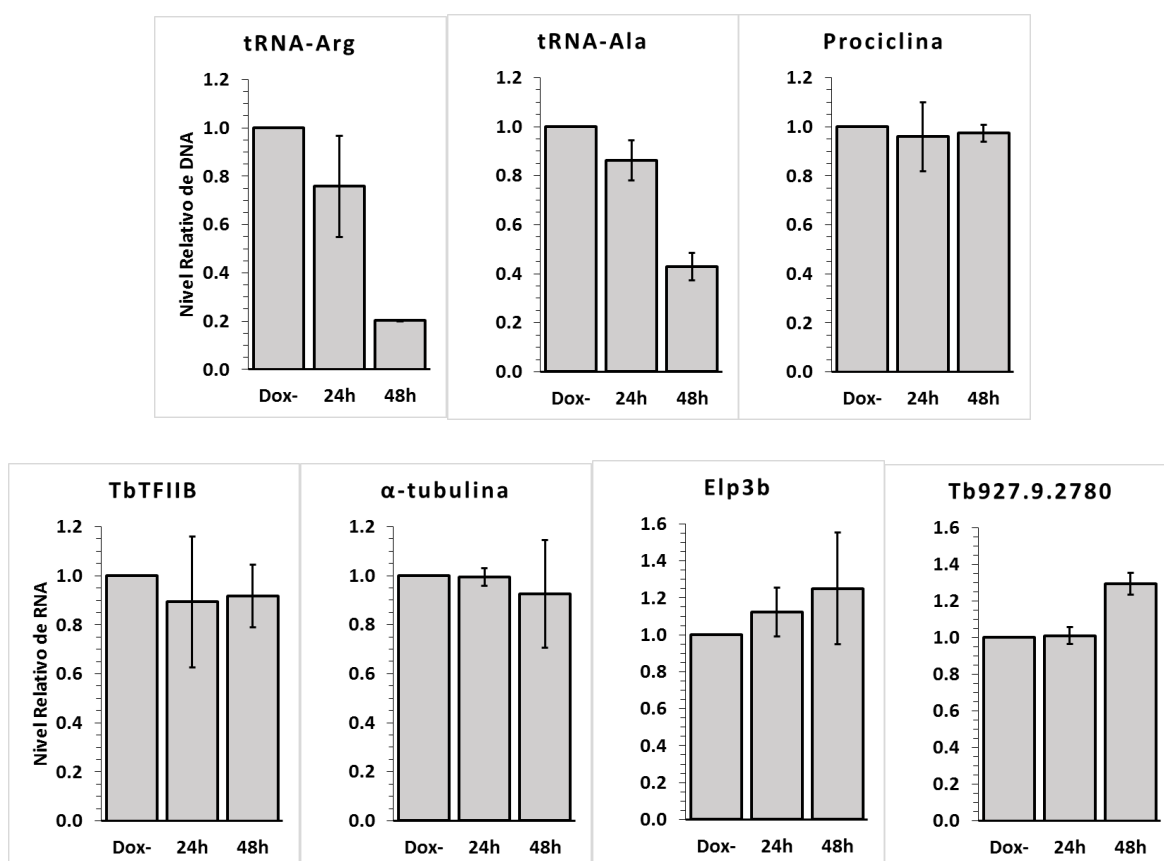


Figura 48. Curva estándar del rRNA 18S y el tRNA-Arg.



De manera similar al *run-on*, se partió del mismo cultivo, el cual se dividió en dos partes y en una parte se indujo la RNAi hacia el mRNA de TbBRF1, mientras que la otra parte se utilizó como control. Se extrajo el RNA total a las 24 y 48 horas post-inducción, se obtuvo el cDNA y se realizó el PCR cuantitativo en tiempo real. Hubo una fuerte reducción en la abundancia del tRNA-Arg y tRNA-Ala a las 48 h. En contraste, la abundancia de los mRNA de TbTFIIB,  $\alpha$ -tubulina, Tb927.9.2780 y prociclina no se vio afectada (Figura 49). Estos resultados sugieren que la reducción observada en la transcripción nascente de los genes de  $\alpha$ -tubulina y Elp3b en los ensayos de *run-on*, se debe a un efecto indirecto del *knock-down* hacia TbBRF1, resultado de la disminución de transcritos generados por la RNAP-III necesarios para el *trans-splicing* y la traducción.



**Figura 49.** Análisis de PCR en tiempo real cuantitativo. Todas las reacciones de PCR se realizaron al menos por triplicado, usando los oligonucleótidos y las condiciones que fueron optimizadas para producir un amplificado único y del tamaño correcto. Las barras indican la desviación estándar.

## 6. Discusión

En su conjunto, los resultados obtenidos en el presente trabajo demuestran que Tb927.10.7840 posee las características en su secuencia, estructura, localización y función para ser considerado como el ortólogo de BRF1 en *T. brucei*.

### 6.1. TbBRF1 es un ortólogo típico de BRF1

La mitad N-terminal de TbBRF1 posee los tres dominios esperados para un ortólogo de BRF1: un *Zn-ribbon* y dos repetidos de ciclina.

El motivo de *Zn-ribbon* de la familia BRF1 / TFIIB posee una secuencia C-X<sub>2</sub>-C/H-X<sub>15-17</sub>-C-X<sub>2</sub>-C (Hahn & Roberts, 2000). En tripanosomátidos los ortólogos de BRF1 poseen la secuencia C-X-H-X<sub>15</sub>-C-X<sub>2</sub>-C, que es un dominio bien conservado excepto por el hecho de que los residuos de cisteína e histidina, están separados sólo por un único residuo en la primera parte del motivo. En contraste, la secuencia del motivo *Zn-ribbon* en el TFIIB de *T. brucei* es idéntica al consenso eucarionte: C-X<sub>2</sub>-C-X<sub>16</sub>-C-X<sub>2</sub>-C (Palenchar *et al.*, 2006; Schimanski *et al.*, 2006).

El *Zn-ribbon* en TFIIB es necesario para el reclutamiento de la RNAP-II (Buratowski & Zhou, 1993). Sin embargo, dicho dominio en BRF1 no es requerido para el reclutamiento de la RNAP-III al promotor, pero sí para la apertura de la cadena de DNA (Hahn & Roberts, 2000; Kassavetis *et al.*, 1997). Por lo tanto, aunque los *Zn-ribbons* de TFIIB y BRF1 tengan secuencia y estructura similares, tienen funciones diferentes.

La presencia del segundo repetido de ciclina en TbBRF1 es interesante debido a que dicho repetido en el ortólogo de TFIIB de *T. brucei* es atípico (Ibrahim *et al.*, 2009; Palenchar *et al.*, 2006; Schimanski *et al.*, 2006). Probablemente en el caso de TbTFIIB, el segundo módulo y la región *linker*, evolucionaron para adaptarse a la maquinaria transcripcional de la RNAP-II en tripanosomátidos, la cual parece ser diferente en muchos aspectos (Das *et al.*, 2008; Gunzl *et al.*, 2007).

El hecho de que el porcentaje de homología entre el primer y segundo repetido de ciclina en TbBRF1 (21.5%) sea mayor que el de humano (15%) y *S. cerevisiae* (14%), sugiere que debe de existir una fuerza evolutiva que limita su divergencia.

Otra observación que hay destacar es la identificación del Bloque de Homología I en TbBRF1, ya que anteriormente sólo se había reportado conservado en levaduras y posteriormente en humano (Khoo *et al.*, 2014). Esto debería replantear si dicho dominio se restringe a algunos eucariontes o si es una secuencia que está más difundida en el dominio *Eukarya*.

El árbol filogenético mostró que las similitudes encontradas en el alineamiento reflejan las relaciones evolutivas esperadas; lo que valida el alineamiento y confirma que TbBRF1 es el ortólogo de BRF1 en *T. brucei*.

Como en el caso de los residuos del *Zn-ribbon* que coordinan al ion zinc, la conservación del residuo Thr-131 en todas las especies sugiere una función conservada en el dominio *Eukarya*. Se sabe que en *S. cerevisiae* este aminoácido es fosforilado por la cinasa ERK, lo que estimula el ensamblaje del complejo de inicio de la RNAP-III, que a su vez causa un aumento en la transcripción (Felton-Edkins *et al.*, 2003). Es probable que exista una cinasa análoga en *T. brucei* que realice la misma función. La identificación de dicha cinasa y el análisis de los efectos que esto tendría en la transcripción mediada por la RNAP-III en *T. brucei* es motivo de más investigación.

Los residuos susceptibles a fosforilación identificados mediante análisis *in silico*, al igual que los probables sitios de interacción con las otras subunidades de TFIIB y RNAP-III, deben de estudiarse mediante mutaciones puntuales; para analizar el efecto en la función, regulación y estructura de TbBRF1.

Las NLS se caracterizan por la presencia de residuos de arginina y lisina (Ding *et al.*, 2010), la secuencia RKRRR de TbBRF1 cumple con esa característica. El hecho de que se localice en la mitad C-terminal, fuera de estructuras determinadas, sugiere que es accesible a la maquinaria de importación nuclear. Al tratarse de un factor de transcripción, es de esperarse que TbBRF1 se haya localizado en el núcleo celular. Como en el caso de los

residuos fosforilables y los de interacción proteína-proteína, sería interesante mutar esta NLS para analizar su función.

La estructura secundaria de TbBRF1 en la mitad N-terminal es la típica para los ortólogos de BRF1, tanto en el dominio del Zn-*ribbon* como en los repetidos de ciclina. En este último caso, la estructura secundaria sugiere que en realidad el primer y segundo repetido de ciclina adoptarían una estructura terciaria globular, conformada exclusivamente por hélices  $\alpha$ .

El modelado por homología de TbBRF1 mostró que los repetidos de ciclina adoptan la estructura esperada. Esto contrasta con lo que observaron en el ortólogo de TFIIB de *T. brucei*, donde concluyen que la estructura terciaria del motivo de ciclina es diferente a los otros ortólogos de TFIIB, pues mientras el primer repetido está formado por 5 hélices  $\alpha$ , el *linker* es también una hélice  $\alpha$ , en lugar de una región con estructura al azar. La región equivalente al segundo repetido, aunque compuesta de hélices  $\alpha$ , su número, longitud y acomodo tridimensional es completamente diferente a un motivo de ciclina típico. Esta discrepancia sugiere que BRF1 y TFIIB en *T. brucei* evolucionaron de manera independiente para adaptarse a dos maquinarias transcripcionales distintas: RNAP-III y RNAP-II, respectivamente.

## **6.2. TbBRF1 es necesario para la transcripción mediada por la RNAP-III**

La muerte celular en los cultivos *knock-down* donde se indujo la interferencia de TbBRF1 fue el resultado esperado, considerando que en otros sistemas BRF1 es un factor de transcripción indispensable para la transcripción mediada por la RNAP-III y por ende necesario para la viabilidad celular. El tiempo en que las células dejan de dividirse y comienzan a morir, es similar a lo observado con otros factores de transcripción (como TFIIB y TFIIH) de *T. brucei* (Palenchar *et al.*, 2006; Schimanski *et al.*, 2006; Lecordier *et al.*, 2007; Lee *et al.*, 2007).

La disminución observada del mRNA y la proteína de TbBRF1 comprueban dos cosas: 1) que la interferencia de RNA hacia el mRNA de TbBRF1, funcionó eficientemente en este sistema

de inducción y 2) TbBRF1 es esencial para la viabilidad celular y para la transcripción de la RNAP-III.

La disminución en la transcripción naciente de algunos de los genes transcritos por la RNAP-III (tRNA, snRNA U2 y ncRNA 7SL) del 24 al 36% y la reducción en el nivel basal de los tRNA, comprueba fehacientemente que TbBRF1 es necesario e indispensable para la transcripción mediada por la RNAP-III. Es interesante destacar que la transcripción naciente del rRNA 5S no se vio afectada en la misma medida (65%). No obstante, se debe de considerar que recientemente se demostró que la transcripción del tRNA-Sec no es exclusiva de la RNAP-III en *L. major*, ya que la RNAP-II también puede transcribir dicho gen (Padilla-Mejia *et al.*, 2015). Lo que podría sugerir que el rRNA 5S sea transcrito tanto por la RNAP-II, como por la RNAP-III. Además, el hecho de que no se haya identificado a la fecha un ortólogo para TFIIIA en tripanosomátidos podría sugerir que la transcripción del rRNA 5S es independiente de RNAP-III, como ha sido propuesto para *Yarrowia lipolytica*, donde el rRNA 5S se transcribe como parte de una unidad transcripcional dicistrónica tRNA-rRNA 5S (Acker *et al.*, 2008).

La reducción en la abundancia de tRNAs en los cultivos *knock-down* también se observó en los ensayos de PCR cuantitativo en tiempo real. Estos ensayos también demostraron que el mRNA de TbTFIIB permanece sin cambio en el *knock-down* de TbBRF1, a pesar de la similitud de secuencia entre TbBRF1 y TbTFIIB. Por lo tanto, los efectos observados en la viabilidad celular y en la transcripción mediada por la RNAP-III se deben a la ablación de TbBRF1.

El agotamiento de TbBRF1 parece reducir la transcripción de  $\alpha$ -tubulina y Elp3b, ambos transcritos por la RNAP-II, a pesar de que el nivel basal de estos y otros mRNA no se vio afectado tras la inducción de la RNAi. De esta manera, es posible que la reducción en la síntesis de transcritos generados por la RNAP-III necesarios para la traducción (rRNA 5S y tRNAs) y el *trans-splicing* (snRNAs), resulte en una disminución general de la transcripción mediada por la RNAP-II; considerando que cambios en la transcripción mediada por la RNAP-III lleva a alteraciones en la traducción de mRNAs y el crecimiento celular (Goodfellow & White, 2007; Moir & Willis, 2013; White, 2011). Lo que apoya la hipótesis de que existe

una relación fuerte entre las RNA Polimerasas nucleares, e inclusive se sugiere existe una co-regulación.

De hecho, en un estudio *genome-wide* en *S. cerevisiae* se observó que más del 4% de los genes transcritos por la RNAP-II mostraron cambios significativos en los niveles de expresión en una cepa termosensible de crecimiento lento, deficiente en la transcripción mediada por la RNAP-III, debido a la presencia de mutaciones en la subunidad BRF1 (Conesa *et al.*, 2005). Resultados similares fueron obtenidos con cepas que tenían mutaciones en la subunidad C160 de la RNAP-III y en dos diferentes subunidades de TFIIC, mostrando que un remodelamiento mayor del perfil de transcripción global es producido para permitir a las células de levadura adaptarse a los defectos en la transcripción mediada por la RNAP-III (Conesa *et al.*, 2005).

En células humanas se ha encontrado que la RNAP-II se une río arriba del gen del snRNA U6 (que es transcrito por la RNAP-III), y que esa inhibición de la actividad de la RNAP-II con  $\alpha$ -amanitina reduce los niveles del snRNA U6 (Listerman *et al.*, 2007); tanto la acetilación de la RNAP-II y de histonas se perdieron del promotor del gen del snRNA U6 después del tratamiento con  $\alpha$ -amanitina. En consecuencia, es posible que la RNAP-II promueva la transcripción del snRNA U6 permitiendo la formación de cromatina abierta (Listerman *et al.*, 2007). También, un análisis *genome-wide* mostró que la RNAP-II y algunos factores de transcripción asociados a la RNAP-II, se unen cerca de genes transcritos por la RNAP-III, y que la transcripción de la RNAP-II es necesaria para la expresión óptima de varios genes transcritos por la RNAP-III, lo que demuestra que la transcripción mediada por la RNAP-II afecta la transcripción de la RNAP-III (Raha *et al.*, 2010). Por otra parte, se ha reportado que en células HeLa una gran porción de los genes de tRNA que están ocupados por la RNAP-III están justo arriba de genes anotados transcritos por la RNAP-II; y que un gen activo de tRNA se correlaciona con modificaciones de cromatina que son típicas de promotores para la RNAP-II y amplificadores, sugiriendo que la accesibilidad al promotor es un regulador mayor de la transcripción mediada por la RNAP-III (Oler *et al.*, 2010). También, fue demostrado recientemente que el gen de tRNA-Sec en el parásito *L. major* es transcrito tanto por la RNAP-II como por la RNAP-III (Padilla-Mejia *et al.*, 2015).

Para coordinar los niveles totales de transcripción en las células, algunos factores de transcripción son capaces de unirse a más de una RNA Polimerasa. Por ejemplo, el represor de tumores p53 se encontró que reprime la transcripción mediada por la RNAP-II y la RNAP-III, en adición de su papel en regular la transcripción de la RNAP-II (Crighton *et al.*, 2003). La proteína Maf1, originalmente descrita como un represor negativo de la transcripción de la RNAP-III, se reportó recientemente que regula la transcripción de todas las RNA Polimerasas (Johnson *et al.*, 2007). Finalmente TLS, una proteína involucrada en la transcripción mediada por la RNAP-II, fue recientemente implicada en la transcripción de la RNAP-III (Tan & Manley, 2010). Así, a pesar de que no se ha reportado que BRF1 participa directamente en la transcripción mediada por la RNAP-II, no se puede descartar la posibilidad que en *T. brucei* esta proteína esté involucrada en la transcripción de la RNAP-II de genes codificadores de proteínas.

De manera interesante, varios transcritos generados por la RNAP-III han sido implicados en la regulación de la transcripción de la RNAP-II. Por ejemplo, el RNA B2 de ratón y el RNA Alu de humano, transcritos por la RNAP-III, reprimen la transcripción mediada por RNAP-II en choque térmico (Allen *et al.*, 2005; Mariner *et al.*, 2008). También, el RNA 7SK transcrito por la RNAP-III de mamífero regula la elongación de la transcripción de la RNAP-II vía la inhibición de factor de elongación P-TEFb (Egloff *et al.*, 2006). Así, también sería posible que uno o varios transcritos generados por la RNAP-III, todavía no identificados, puedan participar en la transcripción mediada por la RNAP-II en *T. brucei*. Análisis futuros permitirán establecer si la reducción observada en la transcripción de algunos genes codificadores de proteínas es un efecto directo o indirecto de la ablación de TbBRF1.

## 7. Logros y conclusiones

- El gen Tb927.11.470 es el ortólogo de BRF1 en *T. brucei*.
- TbBRF1 posee los tres dominios típicos de la mitad N-terminal presentes en otros ortólogos de BRF1: un *Zn-ribbon*, y dos repetidos de ciclina; además del Bloque de Homología I en la mitad C-terminal, únicamente identificado en levaduras y humano.
- La estructura secundaria de hebras  $\beta$  en el *Zn-ribbon* y hélices  $\alpha$  en los repetidos de ciclina es la esperada; además de que los repetidos de ciclina de TbBRF1 adoptan la estructura terciaria típica de motivos globulares de ciclina.
- TbBRF1 presenta varios residuos conservados que podrían ser sitios de interacción con subunidades de la RNAP-III y de las otras subunidades que forman a TFIIB, además de numerosos sitios que podrían fosforilarse.
- Se generó una línea celular que expresa a la proteína recombinante TbBRF1-PTP.
- TbBRF1-PTP tiene una localización nuclear.
- Se obtuvo una línea celular en la que se puede inducir el *knock-down* de TbBRF1 con doxiciclina.
- TbBRF1 es necesario para la viabilidad celular.
- TbBRF1 participa en la transcripción de los genes transcritos por la RNAP-III: tRNAs, rRNA 5S, snRNAs y ncRNA 7SL.



## 8. Referencias bibliográficas

- Acker J, Conesa C, Lefebvre O. 2013. Yeast RNA polymerase III transcription factors and effectors. *Biochim. Biophys. Acta* 1829:283-295.
- Acker J, Ozanne C, Kachouri-Lafond R, Gaillardin C, Neuvéglise C, Marck C. 2008. Dicistronic tRNA-5S rRNA genes in *Yarrowia lipolytica*: an alternative TFIIIA-independent way for expression of 5S rRNA genes. *Nucleic Acids Res.* 36(18):5832-5844.
- Allen TA, Von KS, Goodrich JA, Kugel JF. 2004. The SINE-encoded mouse B2 RNA represses mRNA transcription in response to heat shock. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 11:816-821.
- Berriman M, Ghedin E, Hertz-Fowler C, Blandin G, Renauld H, Bartholomeu DC, Lennard NJ, Caler E, Hamlin NE, Haas B, Bohme U, Hannick L, Aslett MA, Shallom J, Marcello L, Hou L, Wickstead B, Alsmark UC, Arrowsmith C, Atkin RJ, Barron AJ, Bringaud F, Brooks K, Carrington M, Cherevach I, Chillingworth TJ, Churcher C, Clark LN, Corton CH, Cronin A, Davies RM, Doggett J, Djikeng A, Feldblyum T, Field MC, Fraser A, Goodhead I, Hance Z, Harper D, Harris BR, Hauser H, Hostetler J, Ivens A, Jagels K, Johnson D, Johnson J, Jones K, Kerhornou AX, Koo H, Larke N, Landfear S, Larkin C, Leech V, Line A, Lord A, Macleod A, Mooney PJ, Moule S, Martin DM, Morgan GW, Mungall K, Norbertczak H, Ormond D, Pai G, Peacock CS, Peterson J, Quail MA, Rabbinowitsch E, Rajandream MA, Reitter C, Salzberg SL, Sanders M, Schobel S, Sharp S, Simmonds M, Simpson AJ, Tallon L, Turner CM, Tait A, Tivey AR, Van AS, Walker D, Wanless D, Wang S, White B, White O, Whitehead S, Woodward J, Wortman J, Adams MD, Embley TM, Gull K, Ullu E, Barry JD, Fairlamb AH, Opperdoes F, Barrell BG, Donelson JE, Hall N, Fraser CM, Melville SE, El-Sayed NM. 2005. The genome of the African trypanosome *Trypanosoma brucei*. *Science* 309:416-422.
- Boguta M. 2013. Maf1, a general negative regulator of RNA polymerase III in yeast. *Biochim. Biophys. Acta.* 1829(3-4):376-384.

- Buratowski S, Zhou H. 1992. A suppressor of TBP mutations encodes an RNA polymerase III transcription factor with homology to TFIIB. *Cell* 71:221-230.
- Buratowski S, Zhou H. 1993. Functional domains of transcription factor TFIIB. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 90:5633-5637.
- Campbell DA, Thomas S, Sturm NR. 2003. Transcription in kinetoplastid protozoa: why be normal? *Microbes. Infect.* 5:1231-1240.
- Chaussivert N, Conesa C, Shaaban S, Sentenac A. 1995. Complex interactions between yeast TFIIB and TFIIC. *J. Biol. Chem.* 270:15353-15358.
- Chen HT, Legault P, Glushka J, Omichinski JG, Scott RA. 2000. Structure of a (Cys3His) zinc ribbon, a ubiquitous motif in archaeal and eucaryal transcription. *Protein Sci.* 9:1743-1752.
- Colbert T, Hahn S. 1992. A yeast TFIIB-related factor involved in RNA polymerase III transcription. *Genes Dev.* 6:1940-1949.
- Conesa C, Ruotolo R, Soularue P, Simms TA, Donze D, Sentenac A, Dieci G. 2005. Modulation of yeast genome expression in response to defective RNA polymerase III-dependent transcription. *Mol. Cell Biol.* 25:8631-8642.
- Cordingley JS. 1985. Nucleotide sequence of the 5S ribosomal RNA gene repeat of *Trypanosoma brucei*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 17(3):321-330.
- Cramer P, Armache KJ, Baumli S, Benkert S, Brueckner F, Buchen C, Damsma GE, Dengl S, Geiger SR, Jasiak AJ, Jawhari A, Jennebach S, Kamenski T, Kettenberger H, Kuhn CD, Lehmann E, Leike K, Sydow JF, Vannini A. 2008. Structure of eukaryotic RNA polymerases. *Annu Rev Biophys.* 37:337-352.
- Cramer P. 2006. Recent structural studies of RNA polymerases II and III. *Biochem. Soc. Trans.* 34(Pt 6):1058-1061.

- Crichton D, Woiwode A, Zhang C, Mandavia N, Morton JP, Warnock LJ, Milner J, White RJ, Johnson DL. 2003. p53 represses RNA polymerase III transcription by targeting TBP and inhibiting promoter occupancy by TFIIIB. *EMBO J.* 22:2810-2820.
- Das A, Banday M, Bellofatto V. 2008. RNA polymerase transcription machinery in trypanosomes. *Eukaryot. Cell* 7:429-434.
- Das A, Zhang Q, Palenchar JB, Chatterjee B, Cross GA, Bellofatto V. 2005. Trypanosomal TBP functions with the multisubunit transcription factor tSNAP to direct spliced-leader RNA gene expression. *Mol. Cell Biol.* 25:7314-7322.
- Dieci G, Bosio MC, Fermi B, Ferrari R. 2013. Transcription reinitiation by RNA polymerase III. *Biochim. Biophys. Acta* 1829:331-341.
- Dieci G, Fiorino G, Castelnuovo M, Teichmann M, Pagano A. 2007. The expanding RNA polymerase III transcriptome. *Trends Genet.* 23:614-622.
- Ding Q, Zhao L, Guo H, Zheng AC. 2010. The nucleocytoplasmic transport of viral proteins. *Viol. Sin.* 25(2):79-85.
- Dong G, Chakshusmathi G, Wolin SL, Reinisch KM. 2004. Structure of the La motif: a winged helix domain mediates RNA binding via a conserved aromatic patch. *EMBO J.* 23(5):1000-1007.
- Egloff S, Van HE, Kiss T. 2006. Regulation of polymerase II transcription by 7SK snRNA: two distinct RNA elements direct P-TEFb and HEXIM1 binding. *Mol. Cell Biol.* 26:630-642.
- Fairley JA, Scott PH, White RJ. 2003. TFIIIB is phosphorylated, disrupted and selectively released from tRNA promoters during mitosis in vivo. *EMBO J.* 22:5841-5850.
- Fantoni A, Dare AO, Tschudi C. 1994. RNA polymerase III-mediated transcription of the trypanosome U2 small nuclear RNA gene is controlled by both intragenic and extragenic regulatory elements. *Mol. Cell Biol.* 14:2021-2028.

- Felton-Edkins ZA, Fairley JA, Graham EL, Johnston IM, White RJ, Scott PH. 2003. The mitogen-activated protein (MAP) kinase ERK induces tRNA synthesis by phosphorylating TFIIB. *EMBO J.* 22:2422-2432.
- Fernández-Tornero C, Böttcher B, Riva M, Carles C, Steuerwald U, Ruigrok RW, Sentenac A, Müller CW, Schoehn G. 2007. Insights into transcription initiation and termination from the electron microscopy structure of yeast RNA polymerase III. *Mol. Cell.* 25(6):813-823.
- Ferri ML, Peyroche G, Siaux M, Lefebvre O, Carles C, Conesa C, Sentenac A. 2000. A novel subunit of yeast RNA polymerase III interacts with the TFIIB-related domain of TFIIB70. *Mol. Cell Biol.* 20:488-495.
- Foldynová-Trantírková S, Paris Z, Sturm NR, Campbell DA, Lukes J. 2005. The *Trypanosoma brucei* La protein is a candidate poly(U) shield that impacts spliced leader RNA maturation and tRNA intron removal. *Int. J. Parasitol.* 35(4):359-366.
- Garcia-Silva MR, Frugier M, Tosar JP, Correa-Dominguez A, Ronalte-Alves L, Parodi-Talice A, Rovira C, Robello C, Goldenberg S, Cayota A. 2010. A population of tRNA-derived small RNAs is actively produced in *Trypanosoma cruzi* and recruited to specific cytoplasmic granules. *Mol. Biochem. Parasitol.* 171(2):64-73.
- Geiduschek EP, Kassavetis GA. 2001. The RNA polymerase III transcription apparatus. *J. Mol. Biol.* 310:1-26.
- Gibson TJ, Thompson JD, Blocker A, Kouzarides T. 1994. Evidence for a protein domain superfamily shared by the cyclins, TFIIB and RB/p107. *Nucleic Acids Res.* 22:946-952.
- Gilinger G, Bellofatto V. 2001. Trypanosome spliced leader RNA genes contain the first identified RNA polymerase II gene promoter in these organisms. *Nucleic Acids Res.* 29:1556-1564.
- Goodfellow SJ, White RJ. 2007. Regulation of RNA polymerase III transcription during mammalian cell growth. *Cell Cycle* 6:2323-2326.

- Gunzl A, Vanhamme L, Myler PJ. 2007. Transcription in trypanosomes: a different means to the end, p 177-208. In Barry JD, McCulloch R, Mottram JC, Acosta-Serrano A (ed), *Trypanosomes: after the genome*, 1st ed, Horizon Bioscience Press, Wymonham, UK.
- Haeusler RA, Engelke DR. 2006. Spatial organization of transcription by RNA polymerase III. *Nucleic Acids Res.* 34:4826-4836.
- Hahn S, Roberts S. 2000. The zinc ribbon domains of the general transcription factors TFIIIB and Brf: conserved functional surfaces but different roles in transcription initiation. *Genes Dev.* 14:719-730.
- Hellman KM, Ciganda M, Brown SV, Li J, Ruyechan W, Williams N. 2007. Two trypanosome-specific proteins are essential factors for 5S rRNA abundance and ribosomal assembly in *Trypanosoma brucei*. *Eukaryot. Cell.* 6(10):1766-1772.
- Hernández-Rivas R, Martínez-Calvillo S, Romero M, Hernández R. 1992. *Trypanosoma cruzi* 5S rRNA genes: molecular cloning, structure and chromosomal organization. *FEMS Microbiol. Lett.* 71(1):63-67.
- Ibrahim BS, Kanneganti N, Rieckhof GE, Das A, Laurents DV, Palenchar JB, Bellofatto V, Wah DA. 2009. Structure of the C-terminal domain of transcription factor IIB from *Trypanosoma brucei*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 106:13242-13247.
- Ivens AC, Peacock CS, Worthey EA, Murphy L, Aggarwal G, Berriman M, Sisk E, Rajandream MA, Adlem E, Aert R, Anupama A, Apostolou Z, Attipoe P, Bason N, Bauser C, Beck A, Beverley SM, Bianchetti G, Borzym K, Bothe G, Bruschi CV, Collins M, Cadag E, Ciarloni L, Clayton C, Coulson RM, Cronin A, Cruz AK, Davies RM, De Gaudenzi J, Dobson DE, Duesterhoeft A, Fazelina G, Fosker N, Frasch AC, Fraser A, Fuchs M, Gabel C, Goble A, Goffeau A, Harris D, Hertz-Fowler C, Hilbert H, Horn D, Huang Y, Klages S, Knights A, Kube M, Larke N, Litvin L, Lord A, Louie T, Marra M, Masuy D, Matthews K, Michaeli S, Mottram JC, Müller-Auer S, Munden H, Nelson S, Norbertczak H, Oliver K, O'neil S, Pentony M, Pohl TM, Price C, Purnelle B, Quail

- MA, Rabbinowitsch E, Reinhardt R, Rieger M, Rinta J, Robben J, Robertson L, Ruiz JC, Rutter S, Saunders D, Schäfer M, Schein J, Schwartz DC, Seeger K, Seyler A, Sharp S, Shin H, Sivam D, Squares R, Squares S, Tosato V, Vogt C, Volckaert G, Wambutt R, Warren T, Wedler H, Woodward J, Zhou S, Zimmemann W, Smith DF, Blackwell JM, Stuart KD, Barrell B, Myler PJ. 2005. The genome of the kinetoplastid parasite, *Leishmania major*. *Science*. 309(5733):436-442.
- Johnson SS, Zhang C, Fromm J, Willis IM, Johnson DL. 2007. Mammalian Maf1 is a negative regulator of transcription by all three nuclear RNA polymerases. *Mol. Cell* 26:367-379.
- Juo ZS, Kassavetis GA, Wang J, Geiduschek EP, Sigler PB. 2003. Crystal structure of a transcription factor IIIB core interface ternary complex. *Nature* 422:534-539.
- Kassavetis GA, Bardeleben C, Kumar A, Ramirez E, Geiduschek EP. 1997. Domains of the Brf component of RNA polymerase III transcription factor IIIB (TFIIIB): functions in assembly of TFIIIB-DNA complexes and recruitment of RNA polymerase to the promoter. *Mol. Cell Biol.* 17:5299-5306.
- Kassavetis GA, Bartholomew B, Blanco JA, Johnson TE, Geiduschek EP. 1991. Two essential components of the *Saccharomyces cerevisiae* transcription factor TFIIIB: transcription and DNA-binding properties. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 88:7308-7312.
- Kassavetis GA, Driscoll R, Geiduschek EP. 2006. Mapping the principal interaction site of the Brf1 and Bdp1 subunits of *Saccharomyces cerevisiae* TFIIIB. *J. Biol. Chem.* 281:14321-14329.
- Kassavetis GA, Geiduschek EP. 2006. Transcription factor TFIIIB and transcription by RNA polymerase III. *Biochem. Soc. Trans.* 34:1082-1087.
- Kennedy PG. 2013. Clinical features, diagnosis, and treatment of human African trypanosomiasis (sleeping sickness). *Lancet Neurol.* 12:186-194.

- Khoo B, Brophy B, Jackson SP. 1994. Conserved functional domains of the RNA polymerase III general transcription factor BRF. *Genes Dev.* 8:2879-2890.
- Khoo SK, Wu CC, Lin YC, Lee JC, Chen HT. 2014. Mapping the protein interaction network for TFIIB-related factor Brf1 in the RNA polymerase III preinitiation complex. *Mol. Cell Biol.* 34:551-559.
- Knutson BA. 2013. Emergence and expansion of TFIIB-like factors in the plant kingdom. *Gene* 526:30-38.
- Lecordier L, Devaux S, Uzureau P, Dierick JF, Walgraffe D, Poelvoorde P, Pays E, Vanhamme L. 2007. Characterization of a TFIH homologue from *Trypanosoma brucei*. *Mol. Microbiol.* 64:1164-1181.
- Lee JH, Nguyen TN, Schimanski B, Gunzl A. 2007. Spliced leader RNA gene transcription in *Trypanosoma brucei* requires transcription factor TFIH. *Eukaryot. Cell* 6:641-649.
- Lenardo MJ, Dorfman DM, Reddy LV, Donelson JE. 1985. Characterization of the *Trypanosoma brucei* 5S ribosomal RNA gene and transcript: the 5S rRNA is a spliced-leader-independent species. *Gene.* 35(1-2):131-141.
- Liao Y, Moir RD, Willis IM. 2006. Interactions of Brf1 peptides with the tetratricopeptide repeat-containing subunit of TFIIC inhibit and promote preinitiation complex assembly. *Mol. Cell Biol.* 26:5946-5956.
- Listerman I, Bledau AS, Grishina I, Neugebauer KM. 2007. Extragenic accumulation of RNA polymerase II enhances transcription by RNA polymerase III. *PLoS. Genet.* 3:e212.
- Lopez-de-Leon A, Librizzi M, Puglia K, Willis IM. 1992. PCF4 encodes an RNA polymerase III transcription factor with homology to TFIIB. *Cell* 71:211-220.
- Lundkvist GB, Kristensson K, Bentivoglio M. 2004. Why trypanosomes cause sleeping sickness. *Physiology (Bethesda).* 19:198-206.
- Marchetti MA, Tschudi C, Kwon H, Wolin SL, Ullu E. 2000. Import of proteins into the trypanosome nucleus and their distribution at karyokinesis. *J. Cell Sci.* 113:899-906.

- Maree JP, Patterson HG. 2014. The epigenome of *Trypanosoma brucei*: a regulatory interface to an unconventional transcriptional machine. *Biochim Biophys Acta*. 1839(9):743-750.
- Mariner PD, Walters RD, Espinoza CA, Drullinger LF, Wagner SD, Kugel JF, Goodrich JA. 2008. Human Alu RNA is a modular transacting repressor of mRNA transcription during heat shock. *Mol. Cell* 29:499-509.
- Martínez-Calvillo S, Nguyen D, Stuart K, Myler PJ. 2004. Transcription initiation and termination on *Leishmania major* chromosome 3. *Eukaryot. Cell*. 3(2):506-517.
- Martinez-Calvillo S, Vizuet-de-Rueda JC, Florencio-Martinez LE, Manning-Cela RG, Figueroa-Angulo EE. 2010. Gene expression in trypanosomatid parasites. *J. Biomed. Biotechnol.* 2010:525241.
- Martinez-Calvillo S, Yan S, Nguyen D, Fox M, Stuart K, Myler PJ. 2003. Transcription of *Leishmania major* Friedlin chromosome 1 initiates in both directions within a single region. *Mol. Cell*. 11:1291-1299.
- Michaeli S, Agabian N. 1990. A *Trypanosoma brucei* small RNP particle containing the 5S rRNA. *Mol Biochem Parasitol*. 41(1):7-15.
- Michaeli S. 2011. Trans-splicing in trypanosomes: machinery and its impact on the parasite transcriptome. *Future. Microbiol.* 6:459-474.
- Moir RD, Puglia KV, Willis IM. 2002. A gain-of-function mutation in the second tetratricopeptide repeat of TFIIIC131 relieves autoinhibition of Brf1 binding. *Mol. Cell Biol*. 22:6131-6141.
- Moir RD, Willis IM. 2013. Regulation of pol III transcription by nutrient and stress signaling pathways. *Biochim. Biophys. Acta* 1829:361-375.
- Nakaar V, Gunzl A, Ullu E, Tschudi C. 1997. Structure of the *Trypanosoma brucei* U6 snRNA gene promoter. *Mol. Biochem. Parasitol*. 88:13-23.



- Nguyen TN, Schimanski B, Gunzl A. 2007. Active RNA polymerase I of *Trypanosoma brucei* harbors a novel subunit essential for transcription. *Mol. Cell Biol.* 27:6254-6263.
- Noble ME, Endicott JA, Brown NR, Johnson LN. 1997. The cyclin box fold: protein recognition in cell-cycle and transcription control. *Trends Biochem. Sci.* 22:482-487.
- Oler AJ, Alla RK, Roberts DN, Wong A, Hollenhorst PC, Chandler KJ, Cassiday PA, Nelson CA, Hagedorn CH, Graves BJ, Cairns BR. 2010. Human RNA polymerase III transcriptomes and relationships to Pol II promoter chromatin and enhancer-binding factors. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 17:620-628.
- Padilla-Mejía NE, Florencio-Martínez LE, Figueroa-Angulo EE, Manning-Cela RG, Hernández-Rivas R, Myler PJ, Martínez-Calvillo S. 2009. Gene organization and sequence analyses of transfer RNA genes in Trypanosomatid parasites. *BMC Genomics.* 10:232.
- Padilla-Mejia NE, Florencio-Martinez LE, Moreno-Campos R, Vizuet-de-Rueda JC, Cevallos AM, Hernandez-Rivas R, Manning-Cela R, Martinez-Calvillo S. 2015. The Selenocysteine tRNA Gene in *Leishmania major* Is Transcribed by both RNA Polymerase II and RNA Polymerase III. *Eukaryot. Cell* 14:216-227.
- Palenchar JB, Liu W, Palenchar PM, Bellofatto V. 2006. A divergent transcription factor TFIIB in trypanosomes is required for RNA polymerase II-dependent spliced leader RNA transcription and cell viability. *Eukaryot. Cell* 5:293-300.
- Palmeri A, Gherardini PF, Tsigankov P, Ausiello G, Spath GF, Zilberstein D, Helmer-Citterich M. 2011. PhosTryp: a phosphorylation site predictor specific for parasitic protozoa of the family trypanosomatidae. *BMC. Genomics* 12:614.
- Pitula J, Ruyechan WT, Williams N. 2002a. Two novel RNA binding proteins from *Trypanosoma brucei* are associated with 5S rRNA. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 290(1):569-576.

- Pitula JS, Park J, Parsons M, Ruyechan WT, Williams N. 2002b. Two families of RNA binding proteins from *Trypanosoma brucei* associate in a direct protein-protein interaction. *Mol. Biochem. Parasitol.* 122(1):81-89.
- Prohaska K, Williams N. 2009. Assembly of the *Trypanosoma brucei* 60S ribosomal subunit nuclear export complex requires trypanosome-specific proteins P34 and P37. *Eukaryot. Cell.* 8(1):77-87.
- Raha D, Wang Z, Moqtaderi Z, Wu L, Zhong G, Gerstein M, Struhl K, Snyder M. 2010. Close association of RNA polymerase II and many transcription factors with Pol III genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 107:3639-3644.
- Ruan JP, Arhin GK, Ullu E, Tschudi C. 2004. Functional characterization of a *Trypanosoma brucei* TATA-binding protein-related factor points to a universal regulator of transcription in trypanosomes. *Mol. Cell Biol.* 24:9610-9618.
- Saxena A, Ma B, Schramm L, Hernandez N. 2005. Structure-function analysis of the human TFIIB-related factor II protein reveals an essential role for the C-terminal domain in RNA polymerase III transcription. *Mol. Cell Biol.* 25:9406-9418.
- Schimanski B, Brandenburg J, Nguyen TN, Caimano MJ, Gunzl A. 2006. A TFIIB-like protein is indispensable for spliced leader RNA gene transcription in *Trypanosoma brucei*. *Nucleic Acids Res.* 34:1676-1684.
- Schimanski B, Nguyen TN, Gunzl A. 2005. Highly efficient tandem affinity purification of trypanosome protein complexes based on a novel epitope combination. *Eukaryot. Cell* 4:1942-1950.
- Schneider A, McNally KP, Agabian N. 1993. Splicing and 3'-processing of the tyrosine tRNA of *Trypanosoma brucei*. *J. Biol. Chem.* 268(29):21868-21874.
- Schramm L, Hernandez N. 2002. Recruitment of RNA polymerase III to its target promoters. *Genes Dev.* 16:2593-2620.

- Schramm L, Pendergrast PS, Sun Y, Hernandez N. 2000. Different human TFIIIB activities direct RNA polymerase III transcription from TATA-containing and TATA-less promoters. *Genes Dev.* 14:2650-2663.
- Schroder O, Bryant GO, Geiduschek EP, Berk AJ, Kassavetis GA. 2003. A common site on TBP for transcription by RNA polymerases II and III. *EMBO J.* 22:5115-5124.
- Stuart K, Brun R, Croft S, Fairlamb A, Gurtler RE, McKerrow J, Reed S, Tarleton R. 2008. Kinetoplastids: related protozoan pathogens, different diseases. *J. Clin. Invest* 118:1301-1310.
- Tan AY, Manley JL. 2010. TLS inhibits RNA polymerase III transcription. *Mol. Cell Biol.* 30:186-196.
- van Leeuwen F, Kieft R, Cross M, Borst P. 2000. Tandemly repeated DNA is a target for the partial replacement of thymine by beta-D-glucosyl-hydroxymethyluracil in *Trypanosoma brucei*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 109(2):133-145.
- Vaughan S, Gull K. 2008. The structural mechanics of cell division in *Trypanosoma brucei*. *Biochem Soc Trans.* 36(Pt 3):421-424.
- Westergaard GG, Bercovich N, Reinert MD, Vazquez MP. 2010. Analysis of a nuclear localization signal in the p14 splicing factor in *Trypanosoma cruzi*. *Int. J. Parasitol.* 40:1029-1035.
- White RJ. 2011. Transcription by RNA polymerase III: more complex than we thought. *Nat. Rev. Genet.* 12:459-463.
- WHO. 2010. Working to overcome the global impact of neglected tropical diseases. First WHO report on neglected tropical diseases. 1-172.
- Wickstead B, Ersfeld K, Gull K. 2002. Targeting of a tetracycline-inducible expression system to the transcriptionally silent minichromosomes of *Trypanosoma brucei*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 125:211-216.

- Willis IM. 1993. RNA polymerase III. Genes, factors and transcriptional specificity. *Eur. J. Biochem.* 212:1-11.
- Wirtz E, Leal S, Ochatt C, Cross GA. 1999. A tightly regulated inducible expression system for conditional gene knock-outs and dominant-negative genetics in *Trypanosoma brucei*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 99:89-101.
- Worthey EA, Martinez-Calvillo S, Schnauffer A, Aggarwal G, Cawthra J, Fazelinia G, Fong C, Fu G, Hassebrock M, Hixson G, Ivens AC, Kiser P, Marsolini F, Rickel E, Salavati R, Sisk E, Sunkin SM, Stuart KD, Myler PJ. 2003. *Leishmania major* chromosome 3 contains two long convergent polycistronic gene clusters separated by a tRNA gene. *Nucleic Acids Res.* 31(14):4201-4210.
- Zomerdijk JC, Kieft R, Borst P. 1991. Efficient production of functional mRNA mediated by RNA polymerase I in *Trypanosoma brucei*. *Nature.* 353:772-775.

## 9. Apéndice

Sobretiro del artículo de investigación derivado del proyecto.

Referencia completa:

Vélez-Ramírez DE, Florencio-Martínez LE, Romero-Meza G, Rojas-Sánchez S, Moreno-Campos R, Arroyo R, Ortega-López J, Manning-Cela R, Martínez-Calvillo S. 2015. BRF1, a subunit of RNA polymerase III transcription factor TFIIIB, is essential for cell growth of *Trypanosoma brucei*. *Parasitology*. Sep 4:1-11.

# BRF1, a subunit of RNA polymerase III transcription factor TFIIIB, is essential for cell growth of *Trypanosoma brucei*

D. E. VÉLEZ-RAMÍREZ<sup>1</sup>, L. E. FLORENCIO-MARTÍNEZ<sup>1</sup>, G. ROMERO-MEZA<sup>1,2</sup>, S. ROJAS-SÁNCHEZ<sup>1</sup>, R. MORENO-CAMPOS<sup>1</sup>, R. ARROYO<sup>3</sup>, J. ORTEGA-LÓPEZ<sup>4</sup>, R. MANNING-CELA<sup>2</sup> and S. MARTÍNEZ-CALVILLO<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Unidad de Biomedicina, Facultad de Estudios Superiores Iztacala, Universidad Nacional Autónoma de México, Av. De los Barrios 1, Col. Los Reyes Iztacala, Tlalnepantla, Edo. de México, CP 54090, México

<sup>2</sup> Departamento de Biomedicina Molecular, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN, Av. IPN 2508, México, D.F., CP 07360, México

<sup>3</sup> Departamento de Infectómica y Patogénesis Molecular, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN, Av. IPN 2508, México, D.F., CP 07360, México

<sup>4</sup> Departamento de Biotecnología y Bioingeniería, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN, Av. IPN 2508, México, D.F., CP 07360, México

(Received 3 July 2015; revised 28 July 2015; accepted 3 August 2015)

## SUMMARY

RNA polymerase III (Pol III) synthesizes small RNA molecules that are essential for cell viability. Accurate initiation of transcription by Pol III requires general transcription factor TFIIIB, which is composed of three subunits: TFIIIB-related factor BRF1, TATA-binding protein and BDP1. Here we report the molecular characterization of BRF1 in *Trypanosoma brucei* (TbBRF1), a parasitic protozoa that shows distinctive transcription characteristics. *In silico* analysis allowed the detection in TbBRF1 of the three conserved domains located in the N-terminal region of all BRF1 orthologues, namely a zinc ribbon motif and two cyclin repeats. Homology modelling suggested that, similarly to other BRF1 and TFIIIB proteins, the TbBRF1 cyclin repeats show the characteristic structure of five  $\alpha$ -helices per repeat, connected by a short random-coiled linker. As expected for a transcription factor, TbBRF1 was localized in the nucleus. Knock-down of TbBRF1 by RNA interference (RNAi) showed that this protein is essential for the viability of procyclic forms of *T. brucei*, since ablation of TbBRF1 led to growth arrest of the parasites. Nuclear run-on and quantitative real-time PCR analyses demonstrated that transcription of all the Pol III-dependent genes analysed was reduced, at different levels, after RNAi induction.

Key words: BRF1, Pol III transcription, *Trypanosoma brucei*, gene expression.

## INTRODUCTION

*Trypanosoma brucei*, a parasitic protozoa of the Trypanosomatidae family, is the etiologic agent of Human African Trypanosomiasis, also known as sleeping sickness. The parasite is transmitted through the bite of the tsetse fly (*Glossina* spp.) in the Sub-Saharan Africa, and without appropriate treatment it produces neurological disorders, including changes in the sleep–wake cycle, which may lead to a state of coma and death (Kennedy, 2013). *Trypanosoma brucei* is also important for presenting atypical characteristics of gene expression, such as RNA polymerase II (Pol II) polycistronic transcription, coupled with *trans*-splicing and polyadenylation to generate mature mRNAs (Martinez-Calvillo *et al.* 2010; Michaeli, 2011); and transcription of some protein-coding genes by the RNA polymerase

I (Pol I) (Gunzl *et al.* 2003). Little is known in this parasite about RNA polymerase III (Pol III) transcription, despite its role in the synthesis of small essential RNA molecules, such as tRNAs, 5S rRNA, snRNAs and 7SL RNA (Willis, 1993; Dieci *et al.* 2007).

In higher eukaryotes and yeast, Pol III recognizes three main types of promoters that in most cases are located downstream of the transcription start site, within the gene itself. Type I promoters are present in 5S rRNA genes, and consist of three internal domains: box A, an intermediate element and box C. Type II promoters, characteristic of tRNA genes, consist of two conserved internal elements: boxes A and B. Type III promoters, found in U6 snRNA genes, contain elements that reside exclusively upstream of the coding sequence: a TATA box, a proximal sequence element and a distal sequence element (Schramm and Hernandez, 2002; White, 2011). Several transcription factors participate in Pol III transcription, including TFIIIA, TFIIIB, TFIIIC and SNAPc (Acker *et al.* 2013; Dieci *et al.* 2013). TFIIIB is a heterotrimeric factor composed of the TFIIIB-related factor 1

\* Corresponding author. Unidad de Biomedicina, Facultad de Estudios Superiores Iztacala, Universidad Nacional Autónoma de México. Av. De los Barrios 1, Col. Los Reyes Iztacala, Tlalnepantla, Edo. de México, CP 54090, México. E-mail: [scalv@campus.iztacala.unam.mx](mailto:scalv@campus.iztacala.unam.mx)

(BRF1), the TATA-binding protein (TBP) and BDP1. TFIIIB is involved in transcription of all the different types of Pol III genes, and it recruits and positions Pol III to the transcription start site and participates in promoter opening (Kassavetis and Geiduschek, 2006). Whereas in most organisms BRF1 participates in transcription of all Pol III genes, a human variant called BRF2 is responsible for transcription of genes with a type III promoter (Schramm *et al.* 2000). The BRF1 subunit of TFIIIB interacts directly with the Pol III subunits C160, C128, C34 and C17, as well as with the TFIIIC subunits Tfc1, Tfc4 and Tfc8 (Moir *et al.* 2002; Khoo *et al.* 2014). BRF1 is essential for the function of TFIIIB and consequently for the function of Pol III itself. The N-terminal half of BRF1 contains three domains with homology to the Pol II transcription factor TFIIB: a zinc ribbon motif and two cyclin or TFIIB-related repeats (Lopez-de-Leon *et al.* 1992). The C-terminal half of BRF1 does not show homology to TFIIB, and in several different yeast species it contains three conserved sequence domains, named BRF1 homology blocks I–III (Khoo *et al.* 2014).

In contrast to other eukaryotes, *T. brucei* Pol III not only transcribes the U6 snRNA gene, but also transcribes all the snRNA genes (Fantoni *et al.* 1994). Interestingly, snRNA genes in this parasite have a divergently oriented tRNA gene (or a tRNA-like) in their 5'-flanking region, and internal sequences from the neighbouring tRNA genes are required for the expression of the snRNAs (Nakaar *et al.* 1997). The only Pol III-related transcription factors identified and characterized in *T. brucei* are TBP (also known as TRF4, for TBP-related factor 4) and SNAPc (composed of three subunits in *T. brucei*) (Ruan *et al.* 2004; Das *et al.* 2005). These two transcription factors have been mainly studied in the context of transcription of the spliced-leader (SL) RNA genes, which are transcribed by Pol II (Gilinger and Bellofatto, 2001). Other Pol II transcription factors that are required for the expression of the SL RNA in *T. brucei* are TFIIA (Schimanski *et al.* 2005a), TFIIB (Palenchar *et al.* 2006; Schimanski *et al.* 2006), TFIIH (Lecordier *et al.* 2007; Lee *et al.* 2007) and the mediator complex (Lee *et al.* 2010).

Notably, neither TFIIA nor TFIIC has been identified in trypanosomatids. However, putative orthologues of BDP1 (Tb927.10.7840) and BRF1 (Tb927.11.470) have been identified in the *T. brucei* databases (Berriman *et al.* 2005; Gunzl *et al.* 2007). Tandem affinity purification experiments with a PTP-tagged version of TBP demonstrated that Tb927.11.470 co-purified with TBP; this confirmed the identity of Tb927.11.470 as the BRF1 orthologue in *T. brucei* (TbBRF1) (Schimanski *et al.* 2005a). Here we report that TbBRF1 contains the typical domains that are present in all the BRF1 orthologues:

a zinc ribbon motif and two cyclin repeats. Additionally, TbBRF1 possesses a homology block I, conserved among yeast species and human. By generating TbBRF1 conditional knock-down cell lines, we show that TbBRF1 is needed for cell viability and that participates in Pol III transcription in *T. brucei* procyclic forms. Corresponding to its function, TbBRF1 was localized in the parasite nucleus.

## MATERIALS AND METHODS

### Bioinformatic analysis

Sequences were obtained from the NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) and tritrypDB (<http://tritrypdb.org/tritrypdb/>) (version 8.1) databases. Sequence alignments were generated using the ClustalΩ program (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) and shaded manually. Domain identification was performed using SMART 7 (<http://smart.embl-heidelberg.de/>), InterPro Scan 5 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/pfa/ipscan/>), Pfam (<http://pfam.sanger.ac.uk/>) and Superfamily 1.75 (<http://supfam.org/SUPERFAMILY/hmm.html>) pages. Secondary structure analysis was performed using 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/>) and CFSSP (<http://www.biogem.org/tool/choufasman/>). Homology modelling was carried out using SWISS-MODEL (<http://swissmodel.expasy.org/interactive>) and Phyre 2 (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/html/page.cgi?id=index>). The structure obtained was edited with the Swiss-PDBViewer program (<http://www.expasy.org/spdbv/>). The most suitable sequence of BRF1 for RNA interference (RNAi) experiments was selected using the trypanoFAN page (<http://trypanofan.path.cam.ac.uk/trypanofan/main/>).

### Plasmid constructs

To generate plasmid p2T7-TbBRF1, a 445-bp fragment from TbBRF1-coding sequence was amplified with primers BRF1-RNAi-5' (5'-AGGATCCAA GCTTGGATAGTATTGATAAG) and BRF1-RNAi-3' (5'-ACTCGAGATTAGGTACAGGTGG TGCT) and inserted between the *Xho*I and *Bam*HI restriction sites of the RNAi vector p2T7-177 (Wickstead *et al.* 2002). For PTP-tagging, a 500-bp fragment from the C-terminal BRF1-coding sequence was amplified by PCR with primers BRF1-PTP-5' (5'-GGGCCCTCAACCCTGATG ATGTGGTGCC) and BRF1-PTP-3' (5'-GCCG CCGCGCAGCGACCCATTCATC) and cloned into the *Apa*I and *Not*I restriction sites of the pC-PTP-BLA vector (Nguyen *et al.* 2007). To obtain plasmid pCold-TbBRF1, the entire

TbBRF1 gene was amplified with primers TbBRF1-SacI-F (5'-GAGCTCATGTCTAGTTGTTTCGCATC) and TbBRF1-XbaI-R (5'-TCTAG AAGCGACCCATTCATCCTC) and cloned into the *SacI* and *XbaI* restriction sites of the pCold1 expression vector (Takara Bio Inc.). For run-on analysis several DNA fragments from *T. brucei* were amplified by PCR and cloned into the pGEM-T Easy vector (Promega). The 18S rRNA fragment was amplified with primers 18S rRNA-5' (5'-CGGCTTCCAGG AATGAAGG) and 18S rRNA-3' (5'-CCCCTGAG ACTGTAACCTC); and procyclin with oligonucleotides procyclin-5' (5'-ATGGCACCTCGTTCCCTTTA) and procyclin-3' (5'-TTAGAATGCGGC AACGAGAG). The SL gene was amplified with primers SL-5' (5'-TGTTTTCCATAAGTCT ACCG) and SL-3' (5'-TATATATGAGTGAGT GAGTGTG); and  $\alpha$ -tubulin with oligonucleotides  $\alpha$ -tubulin-5' (5'-AGAAGTCCAAGCTCGGCTAC AC) and  $\alpha$ -tubulin-3' (5'-GTAGTTGATGCCGC ACTTGAAG). Elp3b was amplified with oligonucleotides ELP3-5' (5'-GGATCCAAGCTTTTATT GAGGCGGAAATGAAGG) and ELP3-3' (5'-CT CGAGATTTTCATGAACCCACGCTC); and 5S rRNA with primers 5S rRNA-5' (5'-AAAGGT GCTTTTCTTCTTTTCT) and 5S rRNA-3' (5'-GGAGAGAAGGGGAAGTT). 7SL ncRNA was amplified with primers 7SL ncRNA-5' (5'-GAATATCACTTGGCTTTGTCAA) and 7SL ncRNA-3' (5'-TCGGCAAAGAAACCCA CTT); and U2 snRNA with oligonucleotides U2 snRNA-5' (5'-ACTTTTGGATAAAGGCGCTGC AT) and U2 snRNA-3' (5'-GAGTGAAGTTG AAGGACCAAAC). The tRNA-Arg fragment was amplified with oligonucleotides tRNA-Arg-5' (5'-AAAAGGTTATTTTCATATACGTTGGC) and tRNA-Arg-3' (5'-TGCAAGAAGCGGTTCTT CCA); and tRNA-Phe with primers tRNA-Phe-5' (5'-GAGTCACTTTCTGTTACGATAATAAAAA) and tRNA-Phe-3' (5'-AGAGGAGCCGACCTTCA C). The *Leishmania major* tRNA-Tyr gene was amplified with oligonucleotides Lm36-TRNAT YR-5' (5'-AGTGCCGAGAAGTTCGACG) and Lm36-TRNATYR-3' (5'-TCGTCTCCGTTCCCT GTTGC). All constructs were verified by sequencing.

#### *Trypanosoma cell culture and transfection*

Procyclic (tsetse midgut form) parasites of the *T. brucei* strain 29-13 (Wirtz *et al.* 1999) were cultured at 28 °C in SDM-79 medium supplemented with 10% fetal bovine serum, G418 (15  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) and hygromycin (50  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ). Transfection by electroporation was performed as previously described (Foldynova-Trantirkova *et al.* 2005). Briefly,  $1 \times 10^8$  cells in 0.5 mL electroporation buffer (25 mM HEPES, 120 mM KCl, 0.15 mM CaCl<sub>2</sub>, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2 mM EDTA, pH 7.6)

were transfected with 10  $\mu\text{g}$  of linearized vector by electroporation at 1500 V, 50  $\mu\text{F}$  and 500  $\Omega$  (BTX Electro Square Porator ECM 830). Transfectants containing an RNAi construct were selected with phleomycin (2.5  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ), whereas transfectants containing a PTP-tagging construct were selected with blasticidin (10  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ). For transfection, p2T7-TbBRF1 was linearized with *NotI* and pTbBRF1-PTP with *BsmI*. Clonal cell lines were obtained by serial dilution in 96-well plates.

#### *Indirect immunofluorescence*

Mid-log cells were harvested, washed twice with  $1 \times$  PBS and resuspended to obtain a 300 000 cells  $\mu\text{L}$  cell density. From this cell suspension 5  $\mu\text{L}$  were spread onto a poly-L-lysine-coated glass slide. Cells were fixed with 4% paraformaldehyde for 30 min at 4 °C and permeabilized with 0.05% Triton X-100, for 2 min at room temperature. Then, cells were blocked with 1% cold fish skin gelatin and 2% BSA for 1 h at room temperature. After that, cells were incubated with rabbit anti-protein C polyclonal antibody (Delta Biolabs) diluted at 1:25 with blocking solution for 1 h at room temperature, and washed with  $1 \times$  PBS and 0.05% Tween 20. Next, cells were incubated with a secondary goat anti-rabbit antibody conjugated with Alexa 488 diluted at 1:400 with blocking solution at room temperature, and washed with  $1 \times$  PBS and 0.05% Tween. Finally, cells were mounted with Vectashield – DAPI solution (Vector Laboratories Inc.). Images were obtained using a Leica microscope (SP5, DM 16000, Mo) and analysed with the LAS AF software.

#### *Analysis of RNAi knock-down cell line*

In the knock-down cell line, silencing of BRF1 was induced by adding doxycycline (2  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) to the medium (Dox+ or induced culture). As a control, the same cell line was grown without doxycycline (Dox– or non-induced culture) in parallel with the induced culture. Both cultures were counted daily and diluted to  $2 \times 10^6$  cells  $\text{mL}^{-1}$ . For growth curves, cell number was calculated as the product of the cumulative cell density and the dilution factor. Total RNA was extracted with TRI reagent (Sigma) at different time points and fractionated by formaldehyde-MOPS agarose gels. After electrophoresis, RNA was transferred to Hybond N+ membranes (Amersham) by capillary action. TbBRF1 mRNA was detected with a 300-bp probe that corresponds to the 3'-UTR, which was labelled with [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]dCTP using the High Prime labelling system (Amersham). Whole-cell protein was extracted at different time points, fractionated by SDS-PAGE and transferred to PVDF membranes. TbBRF1 protein was detected with a



specific polyclonal antibody (see below) and a horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody, and developed using an ECL kit (GE Healthcare).

#### *Production of TbBRF1 polyclonal antibody*

*Escherichia coli* BL21 (DE3) competent cells were transformed with the pCold-TbBRF1 construct. Expression of TbBRF1 recombinant protein (TbBRF1r) was induced with 1 mM IPTG at 37 °C for 16 h. The TbBRF1r protein was purified by Ni-Sepharose 6 Fast Flow chromatography (GE Healthcare) following the manufacturer's instructions. The purity of the recombinant protein was examined by SDS-PAGE using 15% polyacrylamide gels. The anti-TbBRF1r polyclonal antibody was produced by inoculating a 4-week-old male New Zealand rabbit intramuscularly two times at 3-week intervals with purified TbBRF1r protein (100 µg) plus TiterMax Gold adjuvant (Sigma) at a 1:1 ratio. The rabbit was bled weekly to check for antibody production by Western blot analysis. Serum was collected 15 days after the last immunization. Preimmune normal rabbit serum was collected before immunization and used as a negative control in all experiments with rabbit antibodies. The specificity of the anti-TbBRF1 polyclonal antibody was confirmed by Western blot analysis against TbBRF1r and parasite extracts.

#### *Nuclear run-on experiments*

These experiments were performed as described elsewhere (Martinez-Calvillo *et al.* 2003; Padilla-Mejia *et al.* 2015), with nuclei isolated from  $2 \times 10^8$  mid-log cells incubated for 48 h in the presence of doxycycline. Labelled nascent RNA was hybridized to Hybond filters (Amersham) containing dots of 2 µg of plasmid DNA. Hybridization was performed for 48 h at 50 °C in a solution containing 50% formamide, 5× SSC (1× SSC is 0.15 M NaCl and 0.015 M sodium citrate), 0.2% SDS, 4× Denhardt's reagent and 100 µg mL<sup>-1</sup> salmon sperm DNA. Post-hybridization washes were carried out in 0.1× SSC and 0.1% SDS at 65 °C. RNA signals were quantified by densitometry using the MultiGauge software.

#### *Quantitative real-time PCR*

Briefly, 1 µg of total RNA from the induced (for 24 and 48 h) and non-induced TbBRF1 RNAi cultures was used as template for the first strand cDNA synthesis using SuperScript<sup>TM</sup> III Reverse Transcriptase (Invitrogen) and 50 ng of random hexamers (Invitrogen). The cDNA was analysed by quantitative real-time PCR (qPCR) assays using the Platinum SYBR Green qPCR SuperMix-UDG kit

(Invitrogen) in a Rotor-Gene 3000 cycler (Corbett Research) according to the manufacturer's recommendations. All qPCR reactions were performed at least in triplicate, using primers and conditions that were optimized to produce a single amplicon of the correct size. Each amplification product was analysed for specificity by both agarose gel electrophoresis and melt curve analysis. Standard curves for primer pairs were derived from genomic DNA and cDNA dilution series and ranged in their  $r^2$  value from 0.98 to 1.0. PCR efficiencies were near to 100% for all the genes, so the data were analysed by the  $2^{-\Delta\Delta C_q}$  method. For normalization of the data we used 18S rRNA as a reference gene, and all values were represented relative to non-induced treatments. The 18S rRNA (*Tb927.2.1452*) was amplified with primers 18sqFw (5'-GGGATACTCAAACCCATCCA) and 18sqRv (5'-CCCTTTAACAGCAACAGCATTA); and the tRNA<sup>ARG</sup> (*Tb927.8.2859*) with ArgqFw (5'-GGTCTCGTGGCGCAATG) and ArgqRv (5'-CGATCCCGGCAGGACTC). The tRNA<sup>ALA</sup> (*Tb927.7.6821*) was amplified with oligonucleotides AlaqFw (5'-GGGGATGTAGCTCAGATGG) and AlaqRv (5'-TGGAGAAGTTGGGTATCGATC); and procyclin (*Tb927.6.510*) with Procyclin-5 (5'-ATGGCACCTCGTTCCCTTTA) and ProcqRv (5'-CTTTGCCTCCCTTCACGATAAC). TFIIB (*Tb927.9.5710*) was amplified with primers Tf2bqFw (5'-GAACAGGGAACGCACATTAG) and Tf2bqRv (5'-TTGTTGACTTTGGTCACTTCC); and  $\alpha$ -tubulin (*Tb927.1.2340*) with TubqFw (5'-GGGCTTCCTCGTGTATCA) and TubqRv (5'-GCTTGGACTTCTTGCCATAG). Elp3b (*Tb927.8.3310*) was amplified with oligonucleotides Elp3qFw (5'-TAA GGGTATCCGGTGCAAAG) and Elp3qRv (5'-CTGGCGCGAAACTCATTAAC); and *Tb927.9.2780* (a hypothetical protein) with primers TbZ5qFw (5'-GCTGGGAGTCTACATGGATAAC) and TbZ5qRv (5'-AGTACGGACAGCGCATAATC).

## RESULTS

### *TbBRF1 possesses the three conserved domains*

Tb927.11.470 was previously identified as the BRF1 orthologue in *T. brucei* (TbBRF1) (Schimanski *et al.* 2005a, 2006). A multiple sequence alignment of TbBRF1 and homologues in other eukaryotes showed that TbBRF1 contains the three conserved domains located in the N-terminal half of the protein: a zinc ribbon motif and two imperfect cyclin repeats (also known as TFIIB-related repeats) (Fig. 1A). The presence of these domains was confirmed using the SMART, InterPro Scan, Pfam and Superfamily servers. The three domains are also present in the BRF1 orthologues of the related trypanosomatids *L. major* (LmjF.25.0440) and *Trypanosoma cruzi* (TcCLB.507093.180)

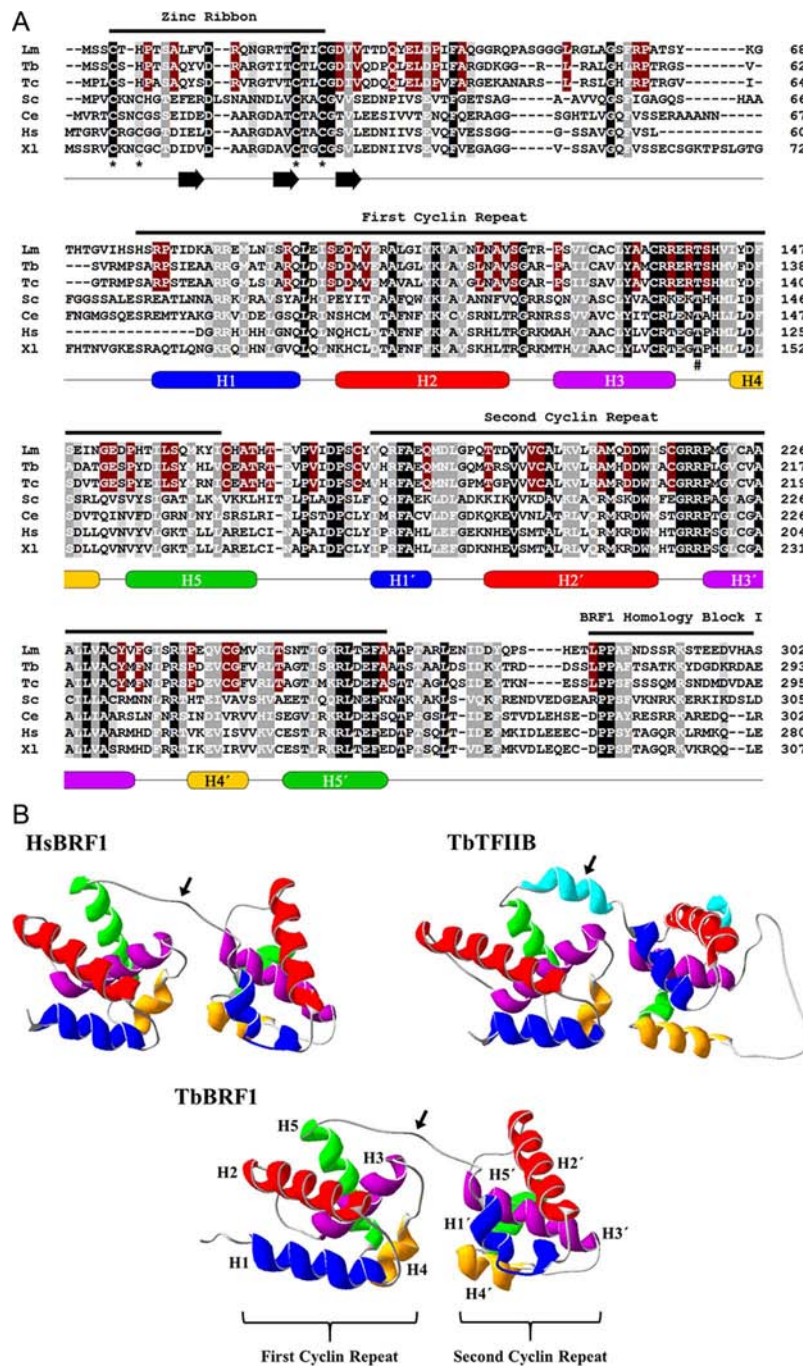


Fig. 1. Sequence and predicted structure analyses of TbBRF1. (A) Multiple sequence alignment of the N-terminal region of BRF1 from *Leishmania major* (Lm, LmjF.25.0440), *Trypanosoma brucei* (Tb, Tb927.11.470), *Trypanosoma cruzi* (Tc, TcCLB.507093.180), *Saccharomyces cerevisiae* (Sc, CAA68968.1), *Caenorhabditis elegans* (Ce, NP\_495526.1), *Homo sapiens* (Hs, AAH86856.1) and *Xenopus laevis* (Xl, NP\_001088063.1). Complete conservation is denoted by black shading, conserved substitutions are indicated by dark-grey shading with white lettering and semi-conserved substitutions are denoted by light-grey shading with black lettering, according to the ClustalΩ program. Trypanosomatid-specific conserved residues are shaded in red with white letters. The zinc ribbon domain, both cyclin or TFIIB-related repeats and the BRF1 homology block I, are indicated. Asterisks (\*) indicate the four zinc-binding residues in the zinc ribbon. The hash character (#) indicates a Thr residue that is phosphorylated in *S. cerevisiae* and that is conserved in all the species analysed. Predicted secondary structure elements are shown below the TbBRF1 sequence. The  $\beta$ -strands are denoted by black arrows, whereas  $\alpha$ -helices by rounded rectangles. The five  $\alpha$ -helices of the first cyclin repeat (H1–H5) and the second cyclin repeat (H1'–H5') are shown in colour. (B) Predicted three-dimensional structure of the N-terminal region of TbBRF1. Homology-modelling was performed for TbBRF1 (bottom image), BRF1 from *H. sapiens* (HsBRF1) and TFIIB from *T. brucei* (TbTFIIB), using the crystal structure of human TFIIB as a template. The five  $\alpha$ -helices of the first cyclin repeats (H1–H5) and the second cyclin repeats (H1'–H5') are shown in the same colours, which correspond to the colours shown in panel (A). For simplicity, cyclin repeats and  $\alpha$ -helices are only labelled in the TbBRF1 model. The arrows indicate the random-coiled region that separates the first and second cyclin repeats in TbBRF1 and HsBRF1, which is substituted by an  $\alpha$ -helix in TbTFIIB. The quality of the homology models was evaluated with the Mod Eval program, showing a score of 0.95.

(Fig. 1A). Sequence identity of TbBRF1 ranges from 52 to 67% for the *L. major* and *T. cruzi* orthologues, respectively; and 22–26% for other eukaryotes. Sequence conservation is higher in the N-terminal half of BRF1 than in the C-terminal half (Fig. 1A and data not shown). The predicted mass of TbBRF1 (67.6 kDa) is similar to the predicted masses for the orthologues in *Saccharomyces cerevisiae* (66.9 kDa), *T. cruzi* (67.7 kDa), *Homo sapiens* (71.1 kDa) and *Xenopus laevis* (73.7 kDa). Interestingly, the predicted size of the BRF1 orthologue in *L. major* (77.2 kDa) is almost 10 kDa larger than TbBRF1, due to insertions in the C-terminal region of the former (data not shown).

In contrast to the N-terminal half, the C-terminal half of BRF1 shows a low degree of sequence conservation. However, in *S. cerevisiae* this region contains three domains (homology blocks I–III) that are conserved in yeast species and human (Khoo *et al.* 2014). TbBRF1 contains a relatively conserved homology block I, but lacks the other two conserved domains (Fig. 1A and data not shown).

#### *TbBRF1 predicted structure*

Zinc ribbon domains usually fold into  $\beta$ -sheet structures (Chen *et al.* 2000). Accordingly, the zinc-binding motif in TbBRF1 is predicted to form a  $\beta$ -sheet, while the rest of the protein is composed of  $\alpha$ -helices (Fig. 1A). The TbBRF1 cyclin repeats show the characteristic structure of five  $\alpha$ -helices per repeat, connected by a short random-coiled linker (Fig. 1A) (Noble *et al.* 1997). Thus, TbBRF1 presents the typical BRF1 secondary structure. To further examine the structure of TbBRF1, the hypothetical three-dimensional structure of the cyclin repeats was obtained by homology modelling, using the crystal structure of human TFIIB as a template. As controls, we generated the structures of human BRF1 and TbTFIIB (Fig. 1B), obtaining models that were practically identical to those previously reported (Ibrahim *et al.* 2009; Khoo *et al.* 2014). When comparing the predicted structures for TbBRF1 and *H. sapiens* BRF1 we found a very similar architecture, which consists of the two defined and characteristic cyclin motifs, each of them folded into five  $\alpha$ -helices (Fig. 1B). On the other hand, while the structure of the first cyclin repeat of TbBRF1 and first module of TbTFIIB is conserved, the structure of the second cyclin repeat of TbBRF1 and the second module of TbTFIIB is very different; moreover, the random-coil linker that connects both cyclin repeats in TbBRF1 is replaced by an  $\alpha$ -helix structure in TbTFIIB (Fig. 1B) (Ibrahim *et al.* 2009). Altogether, the data presented suggest that TbBRF1 possesses all the attributes that are present in the BRF1 orthologues from other species.

#### *TbBRF1 localizes to the nucleus*

The TbBRF1 sequence was compared to nuclear localization signals (NLS) previously identified in trypanosomatids (Marchetti *et al.* 2000), and a putative NLS was identified (554-RKRRR-558) in the C-terminal half of the protein, in accordance with the expected nuclear localization of TbBRF1. To determine whether TbBRF1 is actually a nuclear protein, we produced a cell line where TbBRF1 was labelled with a C-terminal PTP tag to perform indirect immunofluorescence experiments. The PTP tag consists of protein A and protein C epitopes separated by a tobacco etch virus protease cleavage site (Schimanski *et al.* 2005b). For these experiments, a specific polyclonal antibody recognizing the protein C epitope was used on fixed and permeabilized parasites. As expected for a transcription factor, TbBRF1 was localized in the nucleus of transfected parasites (Fig. 2). The observed TbBRF1 punctate signal resembles the nuclear distribution reported for TFIIB and TFIIC in human and fission yeast (Haeusler and Engelke, 2006).

#### *TbBRF1 is indispensable for cell survival*

To evaluate whether TbBRF1 is essential for cell growth, we knock-down TbBRF1 *in vivo* by RNAi. Thus, a 445-bp fragment from the TbBRF1-coding sequence, encompassing nucleotides 780–1224, was amplified and cloned into the p2T7-177 vector, which contains two opposite tetracycline-inducible T7 RNA polymerase promoters to generate double-stranded RNA (Wickstead *et al.* 2002). The resultant vector was transfected into procyclic *T. brucei* cell line 29–13 that constitutively expresses the tetracycline repressor and T7 RNA polymerase (Wirtz *et al.* 1999). The transfected population was cloned by limiting dilution, and a clonal cell line was selected for further analysis. Synthesis of TbBRF1 double-stranded RNA was induced by the addition of the tetracycline analogue doxycycline. In the absence of doxycycline, cells grew normally; in contrast, cells stop growing 2 days after RNAi induction, leading to cell death 2 or 3 days later (Fig. 3A). A Northern blot analysis was performed to confirm the TbBRF1 mRNA depletion after induction of RNAi, observing that the TbBRF1 mRNA level was decreased by around 95% on day 3 post-induction (Fig. 3B).

In order to analyse the levels of the TbBRF1 protein in the knock-down culture, we obtained TbBRF1r and produced antibodies against it (anti-TbBRF1r) (data not shown). When analysing the TbBRF1 protein in the knock-down culture, we observed that its levels were reduced by around 70% on day 3 post-induction, as verified by Western blot analysis using the specific anti-TbBRF1r antibody (Fig. 3C). Altogether, these results demonstrate that TbBRF1 is essential for

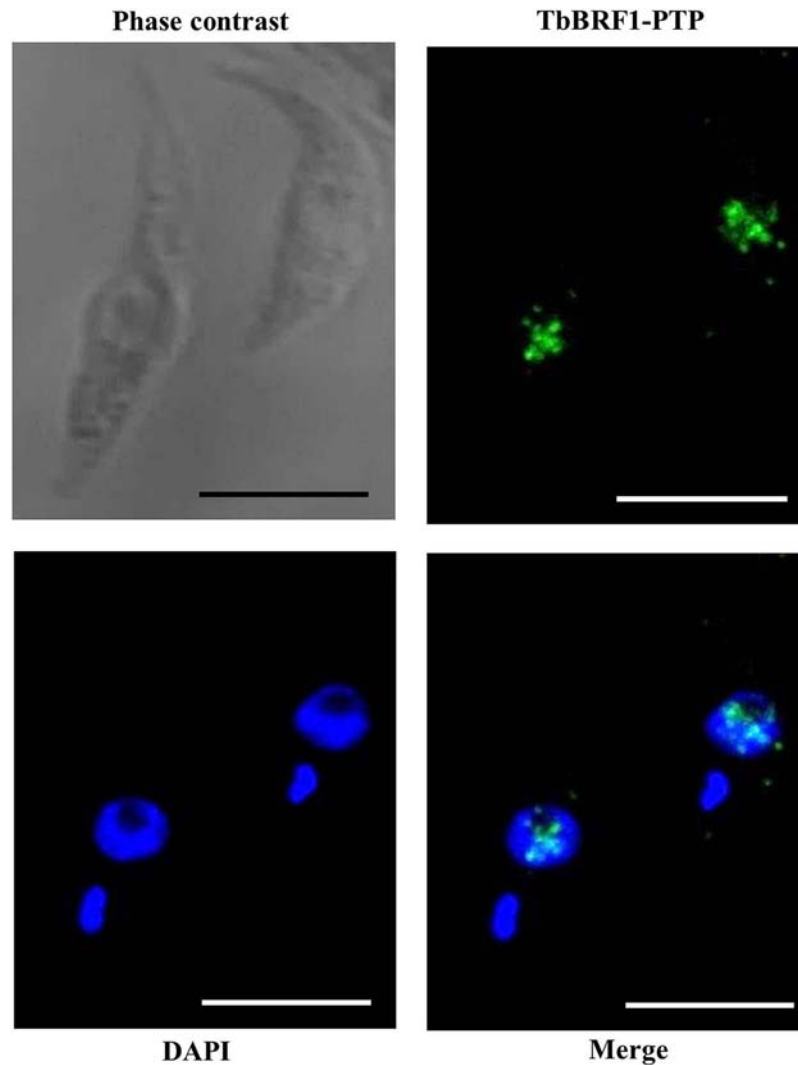


Fig. 2. TbBRF1 is localized in the nucleus. PTP-tagged TbBRF1 was detected by immunofluorescence with a rabbit anti-protein C polyclonal antibody and an Alexa 488-conjugated anti-rabbit secondary antibody. Nuclei and kinetoplast were stained with DAPI. Scale bar indicates 10  $\mu\text{m}$ .

cell survival in procyclic forms of *T. brucei*, as has been reported in *S. cerevisiae* (Kassavetis *et al.* 1991; Colbert and Hahn, 1992).

#### *Ablation of TbBRF1 affects Pol III transcription*

To confirm the participation of TbBRF1 in Pol III-mediated transcription, radiolabelled nascent transcripts were obtained by run-on assays with isolated nuclei from TbBRF1 RNAi cultures that were induced for 48 h (Dox+) or non-induced (Dox-) (Fig. 4). The Pol III genes analysed were: 5S rRNA, U2 snRNA, 7SL RNA, tRNA-Arg, tRNA-Phe and tRNA-Tyr. As controls, three Pol II-transcribed genes were included ( $\alpha$ -tubulin, Elp3b and SL RNA), as well as 18S rRNA and procyclin, which are transcribed by Pol I. The autoradiograph presented in Fig. 4A is a representative result of three independent experiments obtained 2 days after Dox induction. Figure 4B shows the quantification of the dot blot signal intensities from

the three independent experiments, where transcription signal obtained with the non-induced cells was set to 100%. As expected, transcription signal of tRNA-Arg, tRNA-Phe, tRNA-Tyr, U2 snRNA and 7SL RNA was clearly reduced to ~24–36% of the control value. The 5S rRNA was also reduced, but to a lesser extent (~65%). Thus, these results confirm the participation of TbBRF1 in transcription of all types of Pol III genes. This is the expected result, taking into consideration that a BRF2 orthologue has not been found in *T. brucei* (Berriman *et al.* 2005). Regarding Pol I transcription, signal of the 18S rRNA was not affected, while transcription signal of the protein-coding gene procyclin was slightly reduced to ~87%. Intriguingly, Pol II transcription of  $\alpha$ -tubulin was reduced to ~29% after RNAi induction with doxycycline, while signal of Elp3b was also reduced to ~55%. By contrast, transcription signal for SL RNA, which is also transcribed by Pol II, was slightly reduced to 78% of the control value.

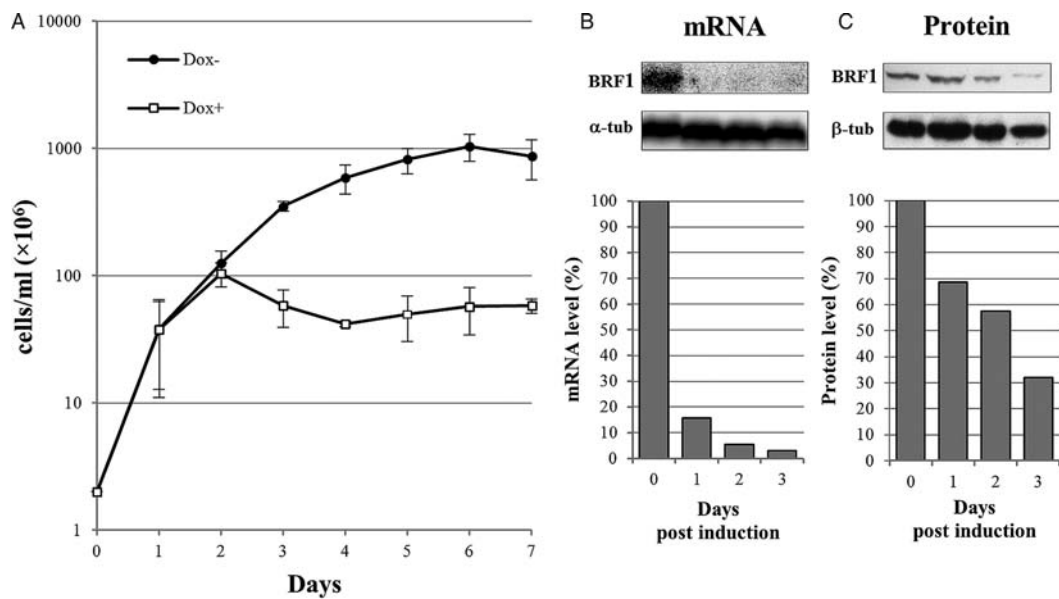


Fig. 3. TbBRF1 is essential for cell growth of procyclic forms of *Trypanosoma brucei*. (A) Growth curve of a clonal cell line under non-induced (Dox-) and doxycycline-induced (Dox+) conditions. Cells were counted and diluted daily to a density of  $2 \times 10^6$  cells mL<sup>-1</sup>. The values represent the cumulative cell density multiplied by the dilution factor. Data points reflect the means of triplicate experiments. Standard deviation bars are shown. (B) Northern blot analysis of TbBRF1 mRNA in non-induced cells (0 days), and cells induced for 1, 2 or 3 days. The bands shown here and from an independent experiment were quantified and plotted, considering as 100% the RNA level obtained in the non-induced culture. Values represent means of the two experiments. TbBRF1 mRNA levels were normalized to the level of the  $\alpha$ -tubulin mRNA (loading control). (C) Western blot analysis of TbBRF1 protein in non-induced cells (0 days), and cells induced for 1, 2 or 3 days using the specific anti-TbBRF1r polyclonal antibody at 1:1000 dilution. The bands shown here and from an independent experiment were quantified and plotted, considering as 100% the protein level obtained in the non-induced culture. Values represent means of the two experiments. TbBRF1 protein levels were normalized to the level of the  $\beta$ -tubulin protein (loading control).

To further analyse the abundance of different transcripts in TbBRF1 RNAi cultures, qPCR experiments were performed with total RNA from cultures induced for 24 and 48 h (Fig. 5). As expected, a strong reduction in the abundance of tRNA-Arg and tRNA-Ala was observed 48 h post-induction. By contrast, the abundance of the mRNAs from TFIIB,  $\alpha$ -tubulin, Elp3b and Tb927.9.2780 was not affected in the knock-down cultures. Procyclin's mRNA abundance was not affected either. Thus, it is likely that the observed signal reduction for  $\alpha$ -tubulin and Elp3b in the nuclear run-on assay represents an indirect effect of the ablation of TbBRF1, resulting from the reduced synthesis of Pol III transcripts needed for translation and trans-splicing.

#### DISCUSSION

The results presented here indicate that TbBRF1 possesses all the sequence and structural attributes that are present in the BRF1 orthologues from other organisms. For instance, the N-terminal region of TbBRF1 contains a zinc ribbon domain and two cyclin repeats, as reported for other BRF1 orthologues and for TFIIB. Zinc ribbon motifs in the BRF1-TFIIB family contain the sequence

C-X<sub>2</sub>-C/H-X<sub>15-17</sub>-C-X<sub>2</sub>-C (Hahn and Roberts, 2000). In trypanosomatids, the BRF1 orthologues possess the sequence C-X-H-X<sub>15</sub>-C-X<sub>2</sub>-C, which is a well-conserved domain, except for the fact that C and H are separated by only one amino acid in the first part of the motif (Fig. 1A). In contrast, the sequence of the zinc-binding region in TFIIB from *T. brucei* (TbTFIIB) is identical to the consensus (C-X<sub>2</sub>-C-X<sub>16</sub>-C-X<sub>2</sub>-C) (Palenchar *et al.* 2006; Schimanski *et al.* 2006). It has been shown that the TFIIB zinc ribbon is necessary for Pol II recruitment into the preinitiation complex (Buratowski and Zhou, 1993). Nevertheless, the BRF1 zinc-binding domain is not needed for Pol III recruitment, but instead is required for promoter opening (Hahn and Roberts, 2000). Thus, although zinc ribbons in TFIIB and BRF1 have similar sequence and structure, they are involved in different functions.

It is noteworthy that TbBRF1 possesses two canonical copies of the cyclin repeat, considering that in TbTFIIB the second repeat is atypical (Palenchar *et al.* 2006; Schimanski *et al.* 2006; Ibrahim *et al.* 2009). It is plausible that TbTFIIB second module and linker region, which folds into an  $\alpha$ -helix structure instead of a random-coil structure, have evolved to set specific characteristics

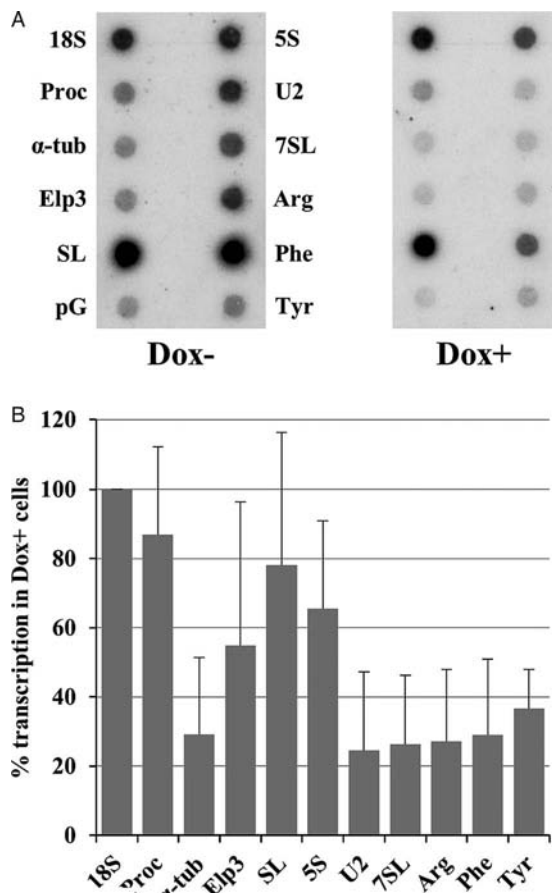


Fig. 4. Effect of TbBRF1 depletion on Pol III transcription. (A) Nuclear run-on assays carried out with nuclei isolated from *Trypanosoma brucei* cultures that were either induced with doxycycline for 2 days (Dox+) or non-induced (Dox-). Labelled nascent RNA was hybridized to dot blots of double-stranded DNAs (2  $\mu$ g) cloned into pGEM-T Easy. The Pol III genes analysed were: 5S rRNA (5S), U2 snRNA (U2), 7SL RNA (7SL), tRNA-Arg (Arg), tRNA-Phe (Phe) and tRNA-Tyr (Tyr). 18S rRNA (18S) and procyclin (Proc), transcribed by Pol I, were also analysed. Also, three genes transcribed by Pol II were included:  $\alpha$ -tubulin ( $\alpha$ -tub), Elp3b (Elp3) and spliced-leader RNA gene (SL). As control, an empty vector was also analysed (pG). (B) Signals obtained for each gene in panel (A), and from two more independent experiments, were quantified and plotted, considering as 100% the signal obtained in the Dox- experiment. Values represent means of the three experiments. Standard deviation bars are shown. All RNA levels were normalized to the level of the 18S rRNA.

required to participate in Pol II transcription in trypanosomatids, which is unusual in different aspects (Gunzl *et al.* 2007; Das *et al.* 2008). The two cyclin repeats present in TbBRF1 are 21.5% identical (Fig. 1A). This identity is higher than the one observed between both BRF1 repeats from *H. sapiens* (15%) and *S. cerevisiae* (14%). Homology modelling suggested that the TbBRF1 cyclin repeats show the characteristic structure of five  $\alpha$ -helices per repeat, connected by a short random-coiled linker. Interestingly, TbBRF1 also contains a BRF1

homology block I, which is conserved among yeast species and human (Fig. 1A).

Since the function of BRF1 is regulated by phosphorylation of specific amino acids (Felton-Edkins *et al.* 2003), we performed an *in silico* search for potential phosphorylation sites in TbBRF1. We found several potential amino acids, including a threonine located in the first cyclin repeat (T-131) that is conserved in all the species analysed (Fig. 1A, and data not shown), and that in *S. cerevisiae* is phosphorylated by the mitogen-activated protein kinase ERK (Felton-Edkins *et al.* 2003). The presence of this putative phosphorylation site in TbBRF1 suggests that, similarly to other organisms, in *T. brucei* the function of TFIIB is regulated by phosphorylation.

Ablation of TbBRF1 by RNAi showed that this protein is essential for the viability of procyclic forms of *T. brucei* (Fig. 3). And nuclear run-on analysis demonstrated that transcription of tRNAs, U2 snRNA and 7SL RNA was strongly reduced (to ~24–36% of the control value) after RNAi induction. Intriguingly, 5S rRNA transcription was reduced to a lesser extent (to ~65% of the control value) (Fig. 4). The reduction in the abundance of tRNAs in the knock-down cultures was also shown by qPCR assays (Fig. 5). These experiments also demonstrated that the TFIIB mRNA remains unaffected in the BRF1 knockdown, in spite of the sequence similarity between BRF1 and TFIIB. Therefore, the observed effects on cell viability and Pol III transcription are due to TbBRF1 ablation.

Depletion of TbBRF1 seemed to reduce Pol II transcription of  $\alpha$ -tubulin and Elp3b (Fig. 4), although the steady-state abundance of these and other mRNAs was not affected after RNAi induction (Fig. 5). Thus, it is possible that a reduced synthesis of Pol III transcripts needed for translation (rRNA 5S and tRNAs) and trans-splicing (snRNAs), resulted in an overall decrease in Pol II transcription, considering that changes in Pol III transcription drive alterations in mRNA translation and cell growth (Goodfellow and White, 2007; White, 2011; Moir and Willis, 2013). Indeed, a genome-wide study in *S. cerevisiae* showed that more than 4% of the Pol II-transcribed genes exhibited significant changes in expression levels in a slow-growing thermosensitive strain defective in Pol III transcription due to the presence of mutations in the BRF1 subunit (Conesa *et al.* 2005). Similar results were obtained with strains bearing mutations in the C160 subunit of Pol III and in two different subunits of TFIIC, showing that a major remodelling of genome expression is evoked to allow yeast cells to adapt to defects in Pol III transcription (Conesa *et al.* 2005). Therefore, the observed reduction in transcription of  $\alpha$ -tubulin and Elp3b is most likely a secondary effect caused by ablation of Pol III products.

In conclusion, our results show that Tb927.11.470 is indeed the BRF1 orthologue in *T. brucei*, since: (1)

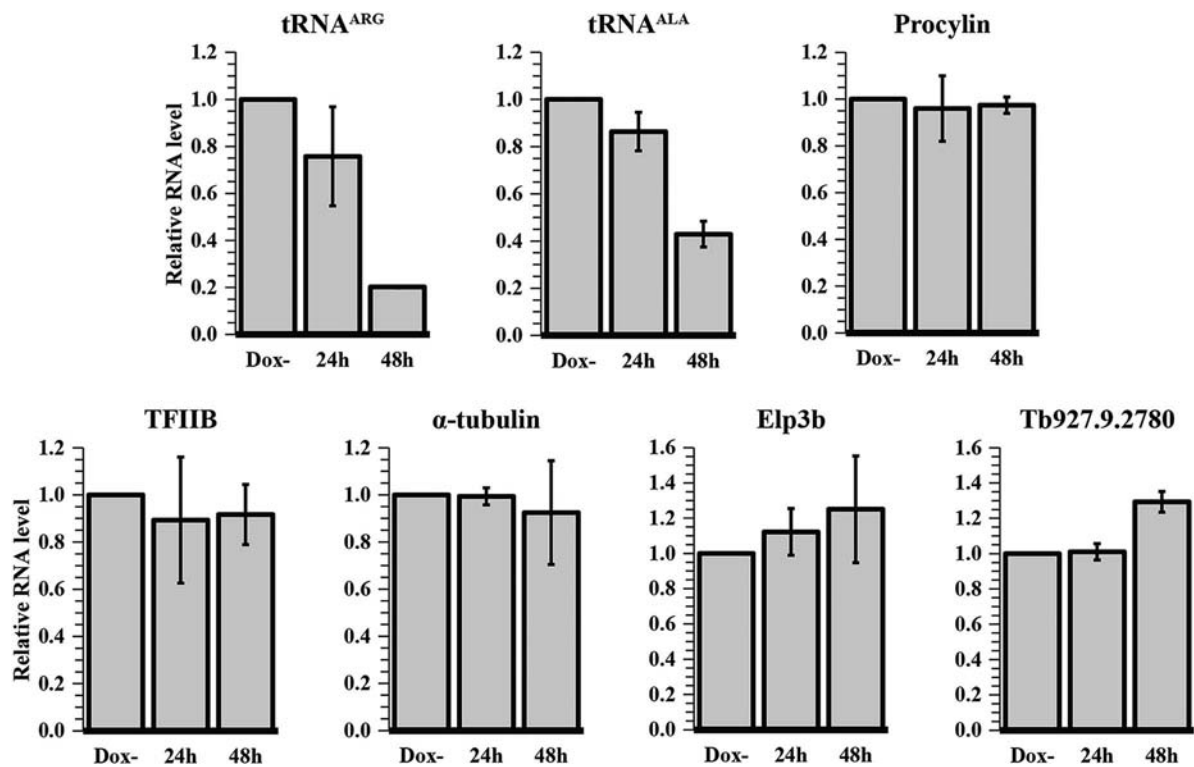


Fig. 5. Silencing of TbBRF1 affects abundance of Pol III transcripts. Quantitative real-time PCR analysis of total RNA from the induced (for 24 and 48 h) and non-induced (Dox-) TbBRF1 RNAi cultures. The analysis included cDNAs derived from two Pol III transcripts (tRNA-Arg and tRNA-Ala), one Pol I transcript (procylin) and four Pol II transcripts (TFIIB,  $\alpha$ -tubulin, Elp3b and Tb927.9.2780). All qPCR reactions were performed at least in triplicate, using primers and conditions that were optimized to produce a single amplicon of the correct size. Error bars indicate standard deviations.

it possesses the three typical BRF1 conserved sequences in the N-terminal half (a zinc ribbon motif and two imperfect cyclin repeats); (2) homology modelling indicates that the predicted structures of the N-terminal region for TbBRF1 and *H. sapiens* BRF1 show very similar architectures, with each cyclin repeat folded into five  $\alpha$ -helices; (3) the C-terminal region of TbBRF1 contains the BRF1 homology block I, conserved in yeast species and human; (4) TbBRF1 localizes to the nucleus, as expected for a transcription factor; (5) similarly to BRF1 in yeast, TbBRF1 is essential for cell survival; (6) reduced transcriptional signals were observed for all Pol III-transcribed genes in the TbBRF1 knock-down cell line. Thus, the results presented here substantially increase our understanding of Pol III transcription in *T. brucei*. Future studies will help determine whether highly divergent orthologues for transcription factors TFIIB and TFIIC, which have not been identified in trypanosomatids, are present in this group of early branched eukaryotes.

#### ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Imelda López-Villaseñor and Ana M. Cevallos for fruitful discussions, and Leticia Ávila-González and Claudia I. Flores-Pucheta for technical assistance. We

also thank David A. Campbell for the *T. brucei* 29-13 strain. This work is one of the requirements to obtain the PhD degree in Posgrado en Ciencias Biológicas (UNAM) for Daniel E. Vélez-Ramírez, who was the recipient of a doctoral fellowship from CONACyT (Fellowship 229359, CVU 325790).

#### FINANCIAL SUPPORT

This work was supported by grants 128461 from CONACyT, IN210712 and IN214715 from PAPIIT (UNAM) to S. Martínez-Calvillo.

#### REFERENCES

- Acker, J., Conesa, C. and Lefebvre, O. (2013). Yeast RNA polymerase III transcription factors and effectors. *Biochimica et Biophysica Acta* **1829**, 283–295.
- Berriman, M., Ghedin, E., Hertz-Fowler, C., Blandin, G., Renauld, H., Bartholomeu, D. C., Lennard, N. J., Caler, E., Hamlin, N. E., Haas, B., Bohme, U., Hannick, L., Aslett, M. A., Shallom, J., Marcello, L., Hou, L., Wickstead, B., Alsmark, U. C., Arrowsmith, C., Atkin, R. J., Barron, A. J., Bringaud, F., Brooks, K., Carrington, M., Cherevach, I., Chillingworth, T. J., Churcher, C., Clark, L. N., Corton, C. H., Cronin, A. *et al.* (2005). The genome of the African trypanosome *Trypanosoma brucei*. *Science* **309**, 416–422.
- Buratowski, S. and Zhou, H. (1993). Functional domains of transcription factor TFIIB. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **90**, 5633–5637.
- Chen, H. T., Legault, P., Glushka, J., Omichinski, J. G. and Scott, R. A. (2000). Structure of a (Cys3His) zinc ribbon, a ubiquitous motif in archaeal and eucaryal transcription. *Protein Science* **9**, 1743–1752.
- Colbert, T. and Hahn, S. (1992). A yeast TFIIB-related factor involved in RNA polymerase III transcription. *Genes & Development* **6**, 1940–1949.

- Conesa, C., Ruotolo, R., Soularue, P., Simms, T. A., Donze, D., Sentenac, A. and Dieci, G.** (2005). Modulation of yeast genome expression in response to defective RNA polymerase III-dependent transcription. *Molecular and Cellular Biology* **25**, 8631–8642.
- Das, A., Zhang, Q., Palenchar, J. B., Chatterjee, B., Cross, G. A. and Bellofatto, V.** (2005). Trypanosomal TBP functions with the multisubunit transcription factor tSNAP to direct spliced-leader RNA gene expression. *Molecular and Cellular Biology* **25**, 7314–7322.
- Das, A., Banday, M. and Bellofatto, V.** (2008). RNA polymerase transcription machinery in trypanosomes. *Eukaryotic Cell* **7**, 429–434.
- Dieci, G., Fiorino, G., Castelnovo, M., Teichmann, M. and Pagano, A.** (2007). The expanding RNA polymerase III transcriptome. *Trends in Genetics* **23**, 614–622.
- Dieci, G., Bosio, M. C., Fermi, B. and Ferrari, R.** (2013). Transcription reinitiation by RNA polymerase III. *Biochimica et Biophysica Acta* **1829**, 331–341.
- Fantoni, A., Dare, A. O. and Tschudi, C.** (1994). RNA polymerase III-mediated transcription of the trypanosome U2 small nuclear RNA gene is controlled by both intragenic and extragenic regulatory elements. *Molecular and Cellular Biology* **14**, 2021–2028.
- Felton-Edkins, Z. A., Fairley, J. A., Graham, E. L., Johnston, I. M., White, R. J. and Scott, P. H.** (2003). The mitogen-activated protein (MAP) kinase ERK induces tRNA synthesis by phosphorylating TFIIIB. *EMBO Journal* **22**, 2422–2432.
- Foldynova-Trantirkova, S., Paris, Z., Sturm, N. R., Campbell, D. A. and Lukes, J.** (2005). The *Trypanosoma brucei* La protein is a candidate poly(U) shield that impacts spliced leader RNA maturation and tRNA intron removal. *International Journal for Parasitology* **35**, 359–366.
- Gilinger, G. and Bellofatto, V.** (2001). Trypanosome spliced leader RNA genes contain the first identified RNA polymerase II gene promoter in these organisms. *Nucleic Acids Research* **29**, 1556–1564.
- Goodfellow, S. J. and White, R. J.** (2007). Regulation of RNA polymerase III transcription during mammalian cell growth. *Cell Cycle* **6**, 2323–2326.
- Gunzl, A., Bruderer, T., Laufer, G., Schimanski, B., Tu, L. C., Chung, H. M., Lee, P. T. and Lee, M. G.** (2003). RNA polymerase I transcribes procyclin genes and variant surface glycoprotein gene expression sites in *Trypanosoma brucei*. *Eukaryotic Cell* **2**, 542–551.
- Gunzl, A., Vanhamme, L. and Myler, P. J.** (2007). Transcription in trypanosomes: a different means to the end. In *Trypanosomes: After the Genome* (ed. Barry, J. D., McCulloch, R., Mottram, J. C. and Acosta-Serrano, A.), pp. 177–208. Horizon Bioscience, Wymonham, UK.
- Haeusler, R. A. and Engelke, D. R.** (2006). Spatial organization of transcription by RNA polymerase III. *Nucleic Acids Research* **34**, 4826–4836.
- Hahn, S. and Roberts, S.** (2000). The zinc ribbon domains of the general transcription factors TFIIIB and Brf: conserved functional surfaces but different roles in transcription initiation. *Genes & Development* **14**, 719–730.
- Ibrahim, B. S., Kanneganti, N., Rieckhof, G. E., Das, A., Laurents, D. V., Palenchar, J. B., Bellofatto, V. and Wah, D. A.** (2009). Structure of the C-terminal domain of transcription factor IIB from *Trypanosoma brucei*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106**, 13242–13247.
- Kassavetis, G. A. and Geiduschek, E. P.** (2006). Transcription factor TFIIIB and transcription by RNA polymerase III. *Biochemical Society Transactions* **34**, 1082–1087.
- Kassavetis, G. A., Bartholomew, B., Blanco, J. A., Johnson, T. E. and Geiduschek, E. P.** (1991). Two essential components of the *Saccharomyces cerevisiae* transcription factor TFIIIB: transcription and DNA-binding properties. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **88**, 7308–7312.
- Kennedy, P. G.** (2013). Clinical features, diagnosis, and treatment of human African trypanosomiasis (sleeping sickness). *Lancet Neurology* **12**, 186–194.
- Kho, S. K., Wu, C. C., Lin, Y. C., Lee, J. C. and Chen, H. T.** (2014). Mapping the protein interaction network for TFIIIB-related factor Brf1 in the RNA polymerase III preinitiation complex. *Molecular and Cellular Biology* **34**, 551–559.
- Lecordier, L., Devaux, S., Uzureau, P., Dierick, J. F., Walgraffe, D., Poelvoorde, P., Pays, E. and Vanhamme, L.** (2007). Characterization of a TFIIH homologue from *Trypanosoma brucei*. *Molecular Microbiology* **64**, 1164–1181.
- Lee, J. H., Nguyen, T. N., Schimanski, B. and Gunzl, A.** (2007). Spliced leader RNA gene transcription in *Trypanosoma brucei* requires transcription factor TFIIH. *Eukaryotic Cell* **6**, 641–649.
- Lee, J. H., Cai, G., Panigrahi, A. K., Dunham-Ems, S., Nguyen, T. N., Radolf, J. D., Asturias, F. J. and Gunzl, A.** (2010). A TFIIH-associated mediator head is a basal factor of small nuclear spliced leader RNA gene transcription in early-diverged trypanosomes. *Molecular and Cellular Biology* **30**, 5502–5513.
- Lopez-de-Leon, A., Librizzi, M., Puglia, K. and Willis, I. M.** (1992). PCF4 encodes an RNA polymerase III transcription factor with homology to TFIIIB. *Cell* **71**, 211–220.
- Marchetti, M. A., Tschudi, C., Kwon, H., Wolin, S. L. and Ullu, E.** (2000). Import of proteins into the trypanosome nucleus and their distribution at karyokinesis. *Journal of Cell Science* **113** (Pt 5), 899–906.
- Martinez-Calvillo, S., Yan, S., Nguyen, D., Fox, M., Stuart, K. and Myler, P. J.** (2003). Transcription of *Leishmania major* Friedlin chromosome 1 initiates in both directions within a single region. *Molecular Cell* **11**, 1291–1299.
- Martinez-Calvillo, S., Vizuet-de-Rueda, J. C., Florencio-Martinez, L. E., Manning-Cela, R. G. and Figueroa-Angulo, E. E.** (2010). Gene expression in trypanosomatid parasites. *Journal of Biomedicine and Biotechnology* **2010**, 525241.
- Michaeli, S.** (2011). Trans-splicing in trypanosomes: machinery and its impact on the parasite transcriptome. *Future Microbiology* **6**, 459–474.
- Moir, R. D. and Willis, I. M.** (2013). Regulation of pol III transcription by nutrient and stress signaling pathways. *Biochimica et Biophysica Acta* **1829**, 361–375.
- Moir, R. D., Puglia, K. V. and Willis, I. M.** (2002). A gain-of-function mutation in the second tetratricopeptide repeat of TFIIIC131 relieves autoinhibition of Brf1 binding. *Molecular and Cellular Biology* **22**, 6131–6141.
- Nakaar, V., Gunzl, A., Ullu, E. and Tschudi, C.** (1997). Structure of the *Trypanosoma brucei* U6 snRNA gene promoter. *Molecular and Biochemical Parasitology* **88**, 13–23.
- Nguyen, T. N., Schimanski, B. and Gunzl, A.** (2007). Active RNA polymerase I of *Trypanosoma brucei* harbors a novel subunit essential for transcription. *Molecular and Cellular Biology* **27**, 6254–6263.
- Noble, M. E., Endicott, J. A., Brown, N. R. and Johnson, L. N.** (1997). The cyclin box fold: protein recognition in cell-cycle and transcription control. *Trends in Biochemical Sciences* **22**, 482–487.
- Padilla-Mejia, N. E., Florencio-Martinez, L. E., Moreno-Campos, R., Vizuet-de-Rueda, J. C., Cevallos, A. M., Hernandez-Rivas, R., Manning-Cela, R. and Martinez-Calvillo, S.** (2015). The Selenocysteine tRNA gene in *Leishmania major* is transcribed by both RNA Polymerase II and RNA polymerase III. *Eukaryotic Cell* **14**, 216–227.
- Palenchar, J. B., Liu, W., Palenchar, P. M. and Bellofatto, V.** (2006). A divergent transcription factor TFIIIB in trypanosomes is required for RNA polymerase II-dependent spliced leader RNA transcription and cell viability. *Eukaryotic Cell* **5**, 293–300.
- Ruan, J. P., Arhin, G. K., Ullu, E. and Tschudi, C.** (2004). Functional characterization of a *Trypanosoma brucei* TATA-binding protein-related factor points to a universal regulator of transcription in trypanosomes. *Molecular and Cellular Biology* **24**, 9610–9618.
- Schimanski, B., Nguyen, T. N. and Gunzl, A.** (2005a). Characterization of a multisubunit transcription factor complex essential for spliced-leader RNA gene transcription in *Trypanosoma brucei*. *Molecular and Cellular Biology* **25**, 7303–7313.
- Schimanski, B., Nguyen, T. N. and Gunzl, A.** (2005b). Highly efficient tandem affinity purification of trypanosome protein complexes based on a novel epitope combination. *Eukaryotic Cell* **4**, 1942–1950.
- Schimanski, B., Brandenburg, J., Nguyen, T. N., Caimano, M. J. and Gunzl, A.** (2006). A TFIIIB-like protein is indispensable for spliced leader RNA gene transcription in *Trypanosoma brucei*. *Nucleic Acids Research* **34**, 1676–1684.
- Schramm, L. and Hernandez, N.** (2002). Recruitment of RNA polymerase III to its target promoters. *Genes & Development* **16**, 2593–2620.
- Schramm, L., Pendergrast, P. S., Sun, Y. and Hernandez, N.** (2000). Different human TFIIIB activities direct RNA polymerase III transcription from TATA-containing and TATA-less promoters. *Genes & Development* **14**, 2650–2663.
- White, R. J.** (2011). Transcription by RNA polymerase III: more complex than we thought. *Nature Reviews Genetics* **12**, 459–463.
- Wickstead, B., Ersfeld, K. and Gull, K.** (2002). Targeting of a tetracycline-inducible expression system to the transcriptionally silent minichromosomes of *Trypanosoma brucei*. *Molecular and Biochemical Parasitology* **125**, 211–216.
- Willis, I. M.** (1993). RNA polymerase III. Genes, factors and transcriptional specificity. *European Journal of Biochemistry* **212**, 1–11.
- Wirtz, E., Leal, S., Ochatt, C. and Cross, G. A.** (1999). A tightly regulated inducible expression system for conditional gene knock-outs and dominant-negative genetics in *Trypanosoma brucei*. *Molecular & Biochemical Parasitology* **99**, 89–101.



