



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---

---

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

**Generación de clonas celulares *knock-out* de  
Elp3b, un probable factor de elongación de la  
transcripción, en *Leishmania major*.**

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:  
B I O L Ó G O

PRESENTA

**LUIS ALBERTO BAROCIO RODRÍGUEZ**

**Asesor: Dr. Santiago Martínez Calvillo**



Los Reyes Iztacala, Tlalnepantla, Estado de México



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



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

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

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

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

## Agradecimientos

---

A la Universidad Nacional Autónoma de México, a través de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala, por creer en mí y permitirme formarme en el campo de la ciencia.

Al Dr. Santiago Martínez Calvillo por permitirme formar parte de su grupo de trabajo para la realización del presente proyecto, por su apoyo y paciencia, y por ser un modelo en mi formación académica y personal. Estoy muy agradecido con usted.

A todos los que conforman el laboratorio de Biología Molecular de la Unidad de Biomedicina por sus valiosas aportaciones académicas y personales, en especial al técnico académico el Biol. Luis Enrique Florencio por su ayuda y asesoría durante la realización experimental de este trabajo.

A mi grupo de revisores: el Dr. Sergio Vaca Pacheco, la Dra. Miriam Rodríguez Sosa, el Dr. Tomas Nepomuceno Mejía y el Dr. Luis Enrique Arias Romero; por la paciencia y atenta revisión de este trabajo.

Este proyecto de investigación fue financiado por el donativo 251831 de CONACyT y por los donativos IN214715 e IN207118 de PAPIIT (DGAPA, UNAM), otorgados al Dr. Santiago Martínez Calvillo.

## Agradecimientos

---

A mi mamá, Paula Rodríguez Reyes. Gracias por la oportunidad de existir, por tu sacrificio en algún tiempo incomprendido, por tu ejemplo de superación incasable, por tu comprensión y confianza, por tu amor y amistad incondicional, porque sin tu apoyo no hubiera sido posible la culminación de mi carrera profesional. Por lo que ha sido y será... Gracias.

A mi papá, Alberto Barocio Guadarrama. Porque sin escatimar esfuerzo alguno, has sacrificado gran parte de tu vida para formarme y educarme. A quien la ilusión de su vida ha sido convertirme en persona de provecho. A quien nunca podré pagar todos sus desvelos. Por esto y más... Gracias.

A mis abuelos Pedro Rodríguez López y Petra Reyes Martínez. Gracias por la herencia más valiosa que pudiera recibir, fruto del inmenso apoyo y confianza que en mi se depositó para que los esfuerzos y sacrificios hechos por mi no fueran en vano. Con admiración y respeto.

A Daniel Paredes Nuñez. A quien nunca podré pagar todo lo que ha hecho por mi. Porque eres de esa clase de personas que todo lo comprenden y dan lo mejor de si mismos sin esperar nada a cambio... porque sabes escuchar y brindar ayuda cuando es necesario... porque te has ganado todo el amor, admiración y respeto de mi parte. Sinceramente gracias.

A mi familia. Grisela Rodríguez Reyez, Guadalupe Rodríguez Reyes, Emma Rodríguez Reyes, Angela Rodríguez Reyes, Miguel Rodríguez Reyes, Esteban Casio Sánchez, Gerardo Martín Vera y Juan Islas Cruz. Como no sentirme afortunado, si tengo una familia llena de amor. Al igual que todos, tenemos altibajos, pero siempre los hemos superado, unidos. Los adoro, y sé que no sería nadie, sin su constante apoyo.

A mis amigos, por hacerme superar el estrés y sobrellevar con risas y buenos momentos todos los problemas académicos y personales. Me siento agradecido con cada uno. Tenerlos como amigos es para mí un privilegio. Los quiero mucho.

## Dedicatoria

---

**A mi hermana, Vianey Barocio Rodríguez**

Porque tú representas todo lo bueno que tengo, y sin tu apoyo esto no sería posible. Solo tú sabes lo que hemos tenido que pasar para llegar hasta este punto. Te quiero

Ya no vuela la mariposa, ya no volará jamás,  
Pero en el aire una rosa, siempre la recordará.

**Butterfly**  
**(Oralia Meléndez Rodríguez)**

# Índice

---

• <b>Lista de tablas y figuras</b> .....	IV
• <b>Lista de abreviaturas</b> .....	VI
• <b>Resumen</b> .....	IX
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	1
<b>1.1. Tripanosomátidos</b> .....	1
<b>1.1.1. Generalidades</b> .....	1
<b>1.1.2. Agentes patógenos y enfermedades</b> .....	1
<b>1.1.3. Biología Celular</b> .....	3
<b>1.1.4. Clasificación Taxonómica</b> .....	4
<b>1.2. <i>Leishmania</i></b> .....	6
<b>1.2.1. Ciclo de vida</b> .....	6
<b>1.2.2. Distribución</b> .....	8
<b>1.2.3. Sistemática</b> .....	9
<b>1.2.4. Manifestaciones clínicas</b> .....	10
<b>1.2.4.1. Leishmaniasis Cutánea (LC)</b> .....	10
<b>1.2.4.2. Leishmaniasis Mucocutánea (LMC)</b> .....	11
<b>1.2.4.3. Leishmaniasis Visceral (LV)</b> .....	12
<b>1.3. Transcripción</b> .....	13
<b>1.3.1. Mecanismos de regulación de la transcripción</b> .....	15
<b>1.3.2. Promotores y factores de transcripción de Pol II en eucariontes</b> .....	16
<b>1.3.3. Elongación de la transcripción de Pol II</b> .....	16
<b>1.3.4. Elp3 y el complejo Elongador</b> .....	17
<b>1.3.5. Transcripción de Pol I</b> .....	19
<b>1.4. Genómica de tripanosomátidos</b> .....	20
<b>1.4.1. <i>Trans-splicing</i> y poliadenilación</b> .....	22
<b>1.4.2. Transcripción en tripanosomátidos</b> .....	23
<b>1.4.3. Isoformas de Elp3 en tripanosomátidos:</b> Elp3a y Elp3b.....	24
<b>1.4.4. Eliminación de genes en <i>L. major</i></b> .....	25

<b>2. Objetivos</b> .....	27
2.1. Objetivo general .....	27
2.2. Objetivos particulares.....	27
<b>3. Materiales y Métodos</b> .....	28
3.1. Análisis <i>in silico</i> .....	28
3.2. Cultivo y conteo de parásitos .....	28
3.3. Extracción de DNA genómico .....	29
3.4. Eliminación de sales de muestras de DNA.....	30
3.5. Amplificación de DNA por medio de reacción en cadena de polimerasa (PCR) .....	31
3.6. Ligación .....	31
3.7. Transformación de células competentes de <i>E. coli</i> .....	32
3.8. Purificación de plásmidos por minipreps.....	33
3.9. Purificación de plásmidos a gran escala .....	34
3.10. Construcción de vectores.....	34
3.11. Ensayos de restricción .....	35
3.12. Purificación de los <i>cassettes</i> de <i>hyg</i> y <i>pac</i> .....	36
3.13. Electroporación de promastigotes de <i>L. major</i> .....	37
3.14. Ensayo tipo <i>Western-blot</i> .....	37
<b>4. Resultados</b> .....	40
4.1. Análisis bioinformáticos.....	40
4.2. Análisis de la secuencia de Elp3b de <i>L. major</i> .....	40
4.3. Predicción de la estructura secundaria y tridimensional de Elp3b.....	45
4.4. Análisis de los vectores <i>knock-out</i> .....	46
4.5. Obtencion y caracterización de cultivos <i>knock-out</i> sencillo de Elp3b con el gen de resistencia a higromicina .....	48
4.5.1. Intentos de obtención de cultivos <i>knock-out</i> doble de Elp3b con el gen de resistencia a puromicina. ....	51
4.6. Obtencion y caracterización de cultivos <i>knock-out</i> sencillo de Elp3b con el gen de resistencia a puromicina.....	52
4.6.1. Intentos de obtención de cultivos <i>knock-out</i> doble de Elp3b con el gen de resistencia a higromicina. ....	54

4.7. Adición de una copia episomal de Elp3b con una bandera PTP.....	55
4.8. Eliminación de la segunda copia alélica de Elp3b.....	56
<b>5. Discusión .....</b>	<b>59</b>
5.1. Obtención de cultivos <i>knock-out</i> de Elp3b .....	60
5.2. Obtención de cultivos <i>knock-out</i> de Elp3b en células con una copia episomal unida a una bandera PTP .....	62
<b>6. Conclusiones y Logros.....</b>	<b>65</b>
<b>7. Literatura citada .....</b>	<b>66</b>



## Lista de tablas y figuras

---

<b>Fig. 1.</b> Enfermedad del sueño o tripanosomiasis africana .....	2
<b>Fig. 2.</b> Enfermedad de Chagas o tripanosomiasis americana.....	2
<b>Fig. 3.</b> Leishmaniasis. ....	3
<b>Fig. 4.</b> Representación esquemática de un tripanosomátido .....	4
<b>Fig. 5.</b> Clasificación taxonómica clásica de tripanosomátidos.....	5
<b>Fig. 6.</b> Clasificación taxonómica de kinetoplastidios .....	5
<b>Fig. 7.</b> Las seis clases principales de morfotipos de los tripanosomátidos .....	6
<b>Fig. 8.</b> Ciclo de vida de <i>Leishmania</i> . ....	7
<b>Fig. 9.</b> Distribución global de la leishmaniasis.....	8
<b>Fig. 10.</b> Clasificación simplificada del genero <i>Leishmania</i> derivado de análisis filogenético .....	10
<b>Fig. 11.</b> Leishmaniasis cutánea (LC), Afganistan.....	11
<b>Fig. 12.</b> Leishmaniasis mucocutánea (LMC).....	12
<b>Fig. 13.</b> Paciente con leishmaniasis visceral (LV) .....	13
<b>Fig. 14.</b> Características de las RNA polimerasas eucariotas. ....	14
<b>Fig. 15.</b> Complejo de iniciación de la transcripción en eucariotes.....	15
<b>Fig. 16.</b> Complejo de inicio de la elongación.....	17
<b>Fig. 17.</b> Funciones del complejo Elongador. ....	18
<b>Fig. 18.</b> Factores de inicio de la transcripción de Pol I.....	20
<b>Fig. 19.</b> Organización del genoma de <i>Leishmania</i> en unidades de transcripción policistrónica. ....	21
<b>Fig. 20.</b> Transcripción y procesamiento de mRNAs en tripanosomatidos.....	22
<b>Fig. 21.</b> Esquema de la cámara de Neubauer.....	29
<b>Fig. 22.</b> Mapa del vector pGEM-T Easy y sus puntos de referencia. ....	32
<b>Fig. 23.</b> Mapa de los vectores pΔElp3b-Hyg y pΔElp3b-Pac .....	35
<b>Fig. 24.</b> Mapa del vector pElp3-PTP .....	38
<b>Fig. 25.</b> Alineamiento multiespecie de Elp3b y sus ortólogos. ....	41
<b>Fig. 26.</b> Alineamiento de la secuencia de aminoácidos de Elp3b en tripanosomátidos. ....	43
<b>Fig. 27.</b> Esquemmatización de los dominios conservados en Elp3.....	44
<b>Fig. 28.</b> Modelado tridimensional de Elp3b de <i>L. major</i> por homología con <i>D. mccartyi</i> .....	45
<b>Fig. 29.</b> Ensayos de restricción de los vectores pΔElp3b-Pac y pΔElp3b-Hyg .....	47
<b>Fig. 30.</b> Digestión del vector pΔElp3b-Hyg y Purificación del cassette de higromicina.....	48
<b>Fig. 31.</b> Representación esquemática de la sustitución de Elp3b por el gen de <i>hyg</i> .....	49

<b>Fig. 32.</b> Extracción de DNA genómico de los cultivos <i>knock-out</i> sencillo de Elp3b .....	49
<b>Fig. 33.</b> Amplificación por PCR del gen de <i>hyg</i> .....	50
<b>Fig. 34.</b> Amplificación por PCR de la región UTR-5' de Elp3b a partir de DNA genómico de la población y las cinco clonas de <i>knock-out</i> sencillo Elp3b.....	51
<b>Fig. 35.</b> Digestión del vector pΔElp3b-Pac y Purificación del <i>cassette</i> de puromicina .....	52
<b>Fig. 36.</b> Representación esquemática de la sustitución del gen endógeno Elp3b por el gen de puromicina y las regiones a amplificar.....	53
<b>Fig. 37.</b> Análisis por PCR del <i>knock-out</i> sencillo de Elp3.....	54
<b>Fig. 38.</b> Análisis tipo <i>Western-blot</i> de la población y la clona 5 de <i>L. major</i> con el <i>knock-out</i> sencillo de Elp3b transfectadas con el vector pElp3-PTP.....	56
<b>Fig. 39.</b> Amplificación por PCR del gen de <i>pac</i> con los oligonucleótidos Pac-3' y Pac-5' .....	58
<b>Fig. 40.</b> Amplificación por PCR del gen de <i>pac</i> con los oligonucleótidos Pac-Loc-3'-Rev y Elp3b-5'-UTR-2F .....	58
<b>Tabla 1.</b> Oligonucleótidos empleados para la amplificación de las regiones intergenicas 3' y 5' de Elp3b en <i>L. major</i> .....	31
<b>Tabla 2.</b> Porcentajes de identidad entre ortólogos de Elp3b.....	42
<b>Tabla 3.</b> Porcentajes de identidad entre ortólogos de Elp3b en tripanosomatidos.....	44

## Abreviaturas

---

<b><i>Amp</i></b>	Gen de resistencia a ampicilina
<b>CDC</b>	Centro de control de enfermedades
<b>CITFA</b>	Factor de transcripción clase A
<b>CPSF</b>	Factor específico de corte y poliadenilación
<b>CTD</b>	Extremo carboxilo terminal
<b>Da</b>	Dalton
<b>dNTPs</b>	Desoxinucleótidos trifosfato
<b>EDTA</b>	Ácido etilendiaminotetracético
<b>DPE</b>	Elemento promotor río abajo
<b>ELL</b>	Factor elongador de polimerasa II
<b>EIp3</b>	Proteína elongadora 3
<b>HAT</b>	Histona acetiltransferasa
<b>hnRNA</b>	RNA heteronuclear
<b><i>hyg</i></b>	Gen de resistencia a higromicina
<b>Inr</b>	Elemento iniciador
<b>kb</b>	Kilobases
<b>LC</b>	Leishmaniasis cutánea
<b>LMC</b>	Leishmaniasis mucocutánea
<b>LV</b>	Leishmaniasis visceral
<b>mcm5</b>	5-metoxycarbonometil
<b>mRNA</b>	RNA mensajero

<b>ncm5</b>	5-carbonometil
<b>NORs</b>	Regiones organizadoras nucleolares
<b>N-TEF</b>	Factores de elongación negativos de la transcripción
<b><i>pac</i></b>	Gen de resistencia a puromicina
<b><i>pb</i></b>	Pares de bases
<b>PCR</b>	Reacción en cadena de la polimerasa
<b>PGC</b>	<i>clusters</i> de genes policistrónicos
<b>Pol I</b>	RNA Polimerasa I
<b>Pol II</b>	RNA Polimerasa II
<b>Pol III</b>	RNA Polimerasa III
<b>P-TEP</b>	Factores de elongación positivos de la transcripción
<b>PTP</b>	ProtC-TEV-ProtA
<b>RNA</b>	Ácido ribonucleico
<b>rRNA</b>	RNA ribosomal
<b>SAM</b>	S-adenosilmetionina
<b>SDS-PAGE</b>	Electroforesis en gel de poliacrilamida con duodecil sulfato sódico
<b>SL</b>	<i>Spliced-leader</i>
<b>SNAPc</b>	Complejo proteico activador de snRNA
<b>snRNA</b>	RNA pequeño nuclear
<b>SSR</b>	Región de cambio de banda
<b>TAF</b>	Factor asociado a proteína de unión a caja TATA
<b>TBP</b>	Proteína de unión a caja TATA

<b>TF</b>	Factor de transcripción
<b>tRNA</b>	RNA de transferencia
<b>UBF</b>	Factor de unión río arriba
<b>Ufc</b>	Unidad formadora de colonia
<b>UTR</b>	Región no traducida
<b>VSG</b>	Glucoproteína variante de superficie
<b>WHO</b>	Orgnización Mundial de la Salud

## Resumen

---

*Leishmania major* es un tripanosomátido flagelado que produce leishmaniasis en el humano. Además de su importancia médica, este parásito es de suma importancia por presentar características genéticas atípicas. Nuestro grupo de trabajo está interesado en el estudio de la transcripción en *L. major*. Recientemente identificamos en el parásito un ortólogo de Elp3b, proteína que participa en la elongación de la transcripción en eucariontes superiores. Así, el objetivo del presente trabajo fue generar y caracterizar parásitos *knock-out* de Elp3b para estudiar su participación en la transcripción. Inicialmente se llevó a cabo la caracterización molecular de la proteína Elp3b mediante análisis *in silico* y se encontró que posee dos dominios importantes: dominio radical SAM y dominio HAT, los cuales están conservados en diversos ortólogos desde procariontes hasta humano. En el dominio radical SAM se identificaron diversos residuos conservados que corresponden a posibles sitios de unión a un *cluster* de Fe<sub>4</sub>S<sub>4</sub> y a S-adenosilmetionina. Estructuralmente Elp3b está constituida por una serie de β plegadas y α-hélices alternadas, guardando alta similitud estructural con Elp3 de *D. mccartyi*. Para estudiar la función de Elp3b en *L. major*, se intentó la eliminación de las dos copias alélicas de este gen a través de recombinación homóloga. Con este fin, los vectores pΔElp3b-Pac y pΔElp3b-Hyg se analizaron mediante ensayos de restricción y se obtuvieron los *cassettes* para la electroporación, los cuales contenían los genes de resistencia a higromicina (*hyg*) y puromicina (*pac*) flanqueados por las secuencias 5' y 3'-UTR de Elp3b. Se pudieron generar líneas celulares *knock-out* sencillo en las que se substituyó una copia de Elp3b por los genes de *hyg* o *pac* (LmΔElp3b/Hyg y LmΔElp3b/Pac), pero no fue posible obtener el remplazo de ambas copias alélicas. Considerando la posibilidad de que Elp3b sea una proteína esencial para la viabilidad de *L. major*, se procedió a trabajar con una línea celular *knock-out* sencillo que expresa la proteína recombinante Elp3b-PTP a partir de episomas (LmΔElp3/Hyg+Elp3b-PTP). Se procedió entonces a transfectar el cultivo *knock-out* sencillo LmΔElp3b/Hyg+Elp3b-PTP con el *cassette* de *pac*, obteniéndose una línea celular resistente a ambos fármacos (LmΔElp3/Hyg+Elp3b-PTP+rPac). La caracterización mediante ensayos de PCR de dicha línea celular reveló que el gen de *pac* no substituyó una copia de Elp3b, sino que se integró en otra región del genoma del parásito. Entonces, la imposibilidad de deletar ambas copias alélicas de Elp3b indica que este gen es esencial para la viabilidad de promastigotes de *L. major*.

# 1. INTRODUCCIÓN

---

## 1.1 Tripanosomátidos

### 1.1.1 Generalidades

Dentro del reino protista los tripanosomátidos son un grupo monofilético de protozoos parásitos, unicelulares y flagelados, que pertenecen a la familia Trypanosomatidae, del orden Kinetoplastida (Hamilton *et al.*, 2004). Los miembros de este orden se caracterizan por la presencia de un cinetoplasto, o DNA mitocondrial, el cual se encuentra formado por una red compleja de dos tipos de moléculas de DNA concatenadas: los minicírculos y los maxicírculos (Maslov *et al.*, 2001; Liu *et al.*, 2005). Dentro de la familia Trypanosomatidae se incluye a *Trypanosoma cruzi*, *Trypanosoma brucei* y diversas especies del género *Leishmania*, todos ellos causantes de graves enfermedades de gran importancia a nivel mundial. Estos parásitos poseen una organización genómica y estructuras celulares muy similares; además todos ellos sufren cambios morfológicos importantes a lo largo de su ciclo de vida y son transmitidos a sus diferentes hospederos por insectos vectores. *T. brucei* es el causante de la enfermedad del sueño en África, mientras que *T. cruzi* produce el mal de Chagas en América y *Leishmania* causa diversas variantes de leishmaniasis alrededor del mundo. Además de su importancia médica estos organismos muestran numerosas particularidades metabólicas y funcionales que resultan de gran importancia científica (Stuart *et al.*, 2008).

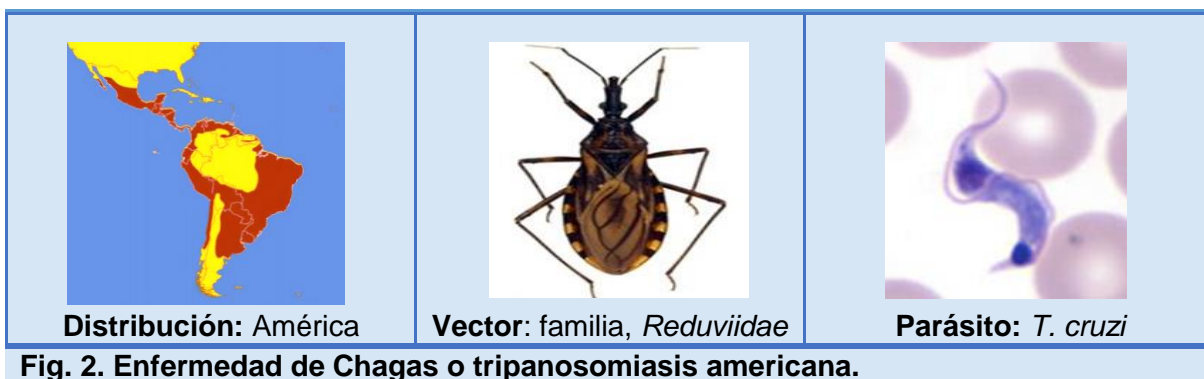
### 1.1.2 Agentes patógenos y enfermedades

Los tripanosomátidos se encuentran distribuidos a lo largo del mundo y su éxito evolutivo se debe en parte a su capacidad de parasitar invertebrados y vertebrados. La **enfermedad del sueño** o tripanosomiasis africana es transmitida por las subespecies *T. brucei gambiense* y *T. brucei rhodesiense* en el oeste y este de África, respectivamente (Figura 1). Se transmite al ser humano por la picadura de la mosca tse-tsé, del género *Glossina*, infectada por otras personas o

animales que albergan al parásito. Cuando los tripanosomas se introducen en el torrente sanguíneo, proliferan hasta invadir el sistema nervioso central (Verlinde, 2001).



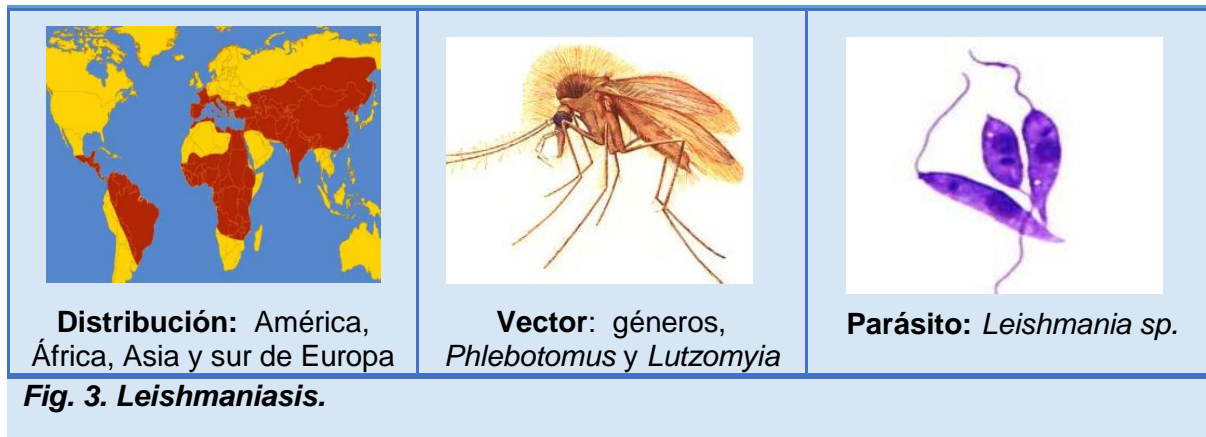
**La enfermedad de Chagas** o tripanosomiasis Americana, se extiende desde el sur de los Estados Unidos hasta el sur de Argentina y Chile, y está altamente asociada a condiciones sanitarias desfavorables, donde proliferan dípteros hematófagos de la familia *Reduviidae*, que actúan como vector del agente etiológico, *T. cruzi*, provocando deficiencias cardiacas y del sistema digestivo en humanos; aunque en algunos casos una persona infectada puede no presentar síntomas (Figura 2) (WHO, 2010).



La infección causada por *Leishmania* es conocida como **Leishmaniasis**. Ésta constituye un problema de gran importancia a nivel mundial desde el punto de vista de salud pública, pues su prevalencia está en torno a los 12 millones de



enfermos y los casos han ido en aumento debido a los cambios climáticos. *Leishmania* se encuentra distribuido en diversas partes del mundo (Figura 3), y es transmitido al hombre por insectos dípteros conocidos como mosca de la arena, provocando tres tipos principales de leishmaniasis: visceral, cutánea y mucocutánea (WHO, 2010)

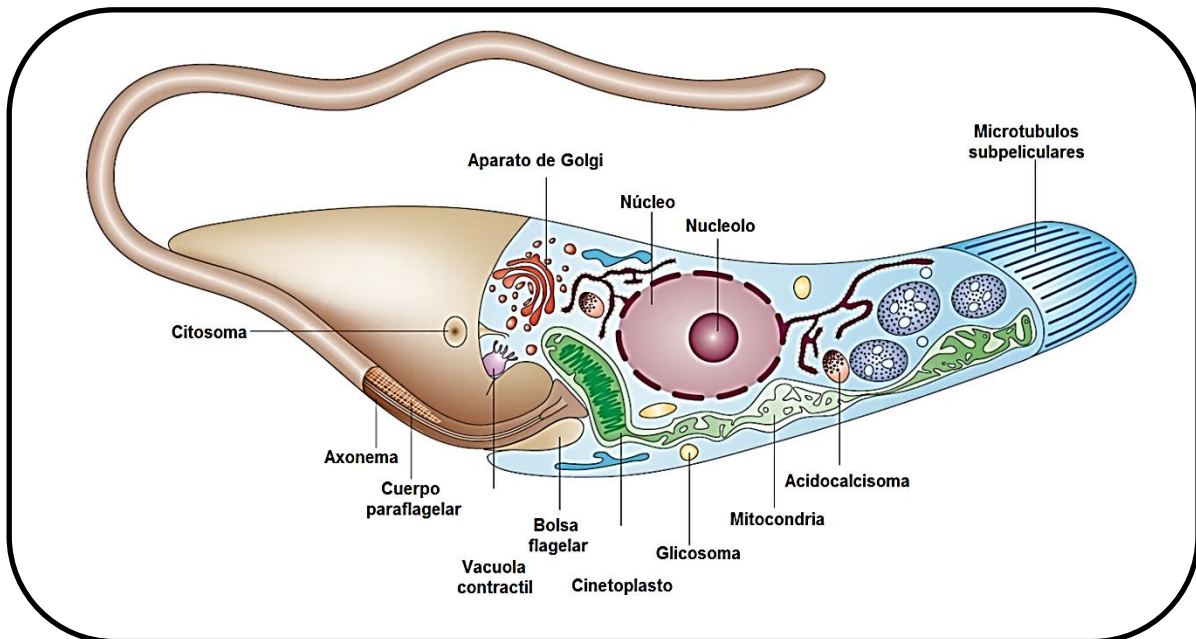


### 1.1.3 Biología Celular

La biología celular de los tripanosomátidos es muy similar. Por ejemplo, todos son protozoos móviles con un flagelo que se origina cerca de la mitocondria, la cual es única y alargada, y además emana de una bolsa de la membrana celular (Figura 4). Los tripanosomátidos poseen organelos únicos que los diferencian de otros eucariotas. Por ejemplo, los peroxisomas están modificados para realizar la glucólisis, por lo que son conocidos como "glicosomas". Típicamente se reproducen asexualmente por fisión binaria; y durante la división celular su membrana nuclear no se disuelve ni sus cromosomas se condensan. Por otro lado, su citoesqueleto está constituido por una capa de microtúbulos que se localizan bajo la membrana celular, y su superficie celular se encuentra cubierta por proteínas específicas que son críticas para su supervivencia (Stuart *et al.*, 2008).

Como se mencionó, la presencia de una masa de DNA mitocondrial llamada cinetoplasto es una característica única del orden Kinetoplastida. El cinetoplasto

se sitúa en el área basal del flagelo y consiste en decenas de copias de minicírculos y maxicírculos que se encuentran unidos formando una red; dentro del cinetoplasto se lleva a cabo la edición de mRNA mediante la inserción y delección de residuos de uridinas en sitios específicos del RNA naciente, lo cual conduce a la creación de marcos de lectura correctos (Simpson *et al.*, 1987).



**Fig. 4. Representación esquemática de un tripanosomátido.** Se señalan todos sus componentes celulares. (Obtenido de: Lopes, *et. al.* 2010).

#### 1.1.4 Clasificación Taxonómica

Los tripanosomátidos son evolutivamente exitosos, no sólo porque se encuentran en casi todo el planeta y parasitan a todos los grupos de vertebrados, varias especies de invertebrados (incluyendo muchos insectos) e incluso plantas, sino también porque hay pruebas sólidas de que sus antepasados datan de hace unos 100 millones de años (Lopes *et. al.*, 2010).

En el esquema clásico, los tripanosomátidos se sitúan en el filo Sarcomastigophora, clase Zoomastigophora y orden Kinetoplastida (Figura 5) (Simpson *et al.* 1987).

Reino	Protista
Subreino	Protozoa
<i>Phylum</i>	<i>Sarcomastigophora</i>
<i>Subphylum</i>	<i>Mastigophora</i>
Clase	<i>Zoomastigophora</i>
Orden	<i>Kinetoplastida</i>
Suborden	<i>Trypanosomatina</i>
Familia	<i>Trypanosomatidae</i>

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

En los últimos 25 años las nuevas técnicas moleculares han forjado modificaciones extremas en el esquema de la clasificación taxonómica clásica de los tripanosomátidos. Fue en el 2005 cuando Adl y colaboradores propusieron una nueva clasificación donde se incluyeron organismos considerados por Cavalier-Smith en 1998, además de estar basada en evidencias moleculares que colocan a seis nuevos súper grupos: Amebozoa, Chromalveolata, Archaeplastida, Excavata, Opisthokonta y Rhizaria (Adl *et al.* 2007).

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

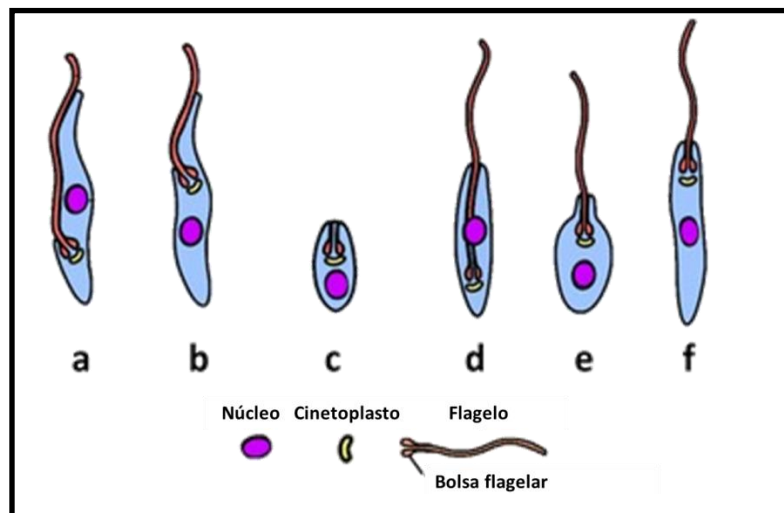
Súper Grupo	Primer Clado	Segundo Clado
<b>Excavata</b>	Fornicata, Malawimonas Parabasalia Preaxostyla Jakobida Heterolobosea Euglenozoa	Carpediemonas, Eopharyngia Cristamonadida, Spirotrichonymphida, Trichomonadida Trichonymphida Oxymonadida, Trimastix Histionidae, Jakobacrasidae, Gruberellidae, Vahlkampfiidae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

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

## 1.2 *Leishmania*

### 1.2.1 Ciclo de vida

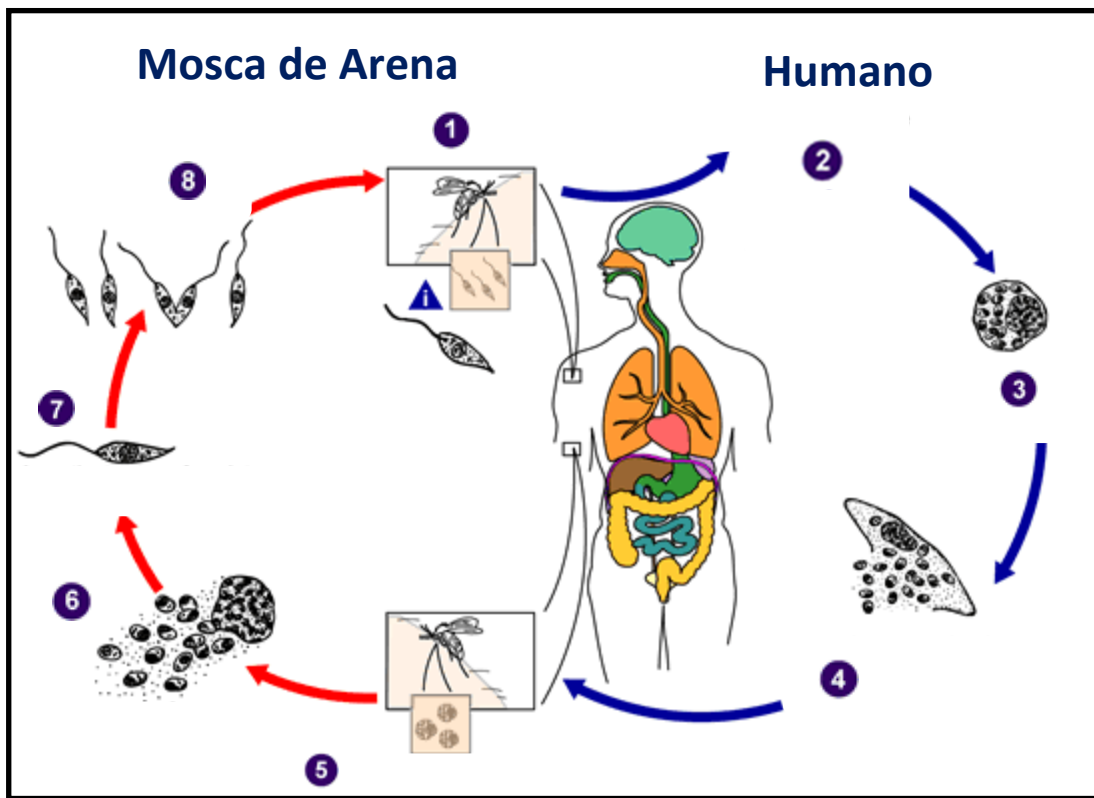
Los ciclos de vida que presentan los tripanosomátidos son bastante complejos, pues involucran varios estadios de desarrollo ya sea en el insecto vector o en el hospedero vertebrado. Las morfologías más comunes son: promastigote, amastigote, epimastigote y tripomastigote, que se distinguen por su morfología y dimensión, así como por la forma y el sitio donde emerge el flagelo (Figura 7) (Lopes, *et. al.* 2010).



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

El ciclo de vida de *Leishmania* implica la alternancia entre un hospedero mamífero y un hospedero artrópodo conocido comúnmente como mosca de la arena de los géneros *Phlebotomus* y *Lutzomyia* (Figura 8). En el hospedero mamífero los promastigotes metacíclicos (formas infecciosas) son introducidos en la piel por la picadura de la mosca de la arena. Estas formas son fagocitadas por los macrófagos y dentro de los fagolisosomas se diferencian en amastigotes intracelulares, permaneciendo en esta forma, en la cual se multiplican por división simple. Posteriormente los amastigotes que salen al torrente sanguíneo pueden

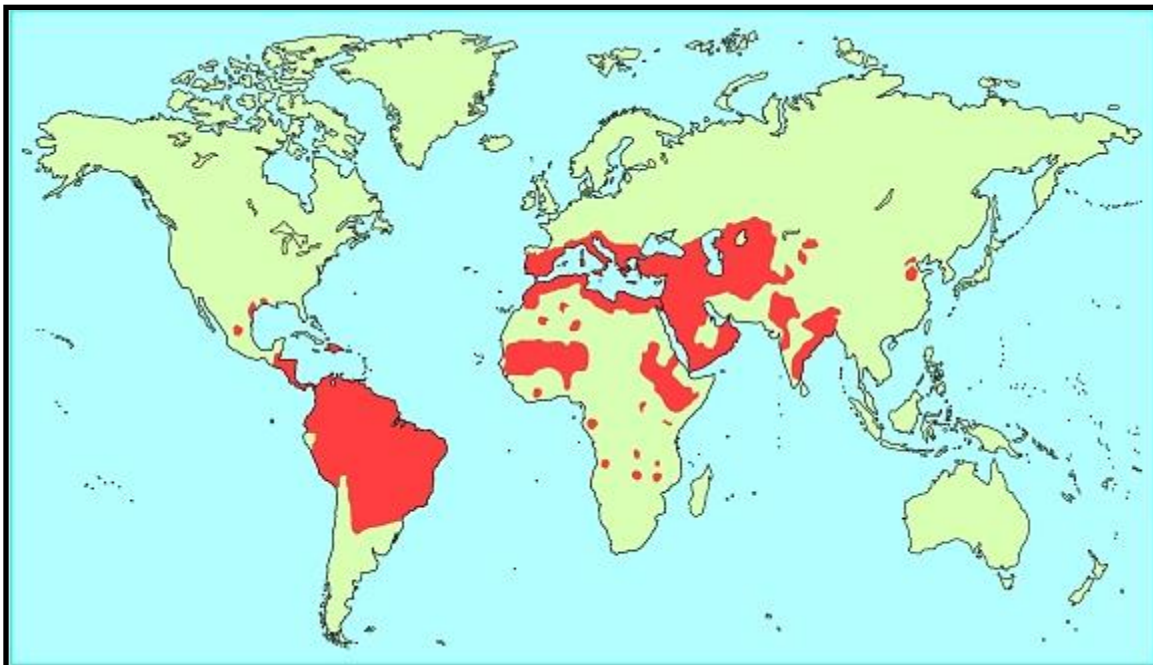
ser tomados por la mosca de arena a través de una picadura, donde se diferencian en promastigotes procíclicos, siendo ésta una forma replicativa (Gossage, *et al.* 2003). Estas se unen a la pared del intestino medio y migran al aparato bucal de la mosca, diferenciándose en promastigotes metacíclicos infectivos (Figura 8) (Handman, 1999).



**Fig. 8. Ciclo de vida de *Leishmania*.** 1) Los promastigotes metacíclicos son transmitidos al hospedero mamífero a través de la picadura de la mosca de arena. 2) Los promastigotes que alcanzan la herida de punción y son fagocitados por macrófagos. 3) Dentro de los fagolisosomas los promastigotes se diferencian en amastigotes. 4) Los amastigotes se multiplican por simple división y proceden a infectar otras células fagocíticas mononucleares. 5) Una mosca puede ingerir los amastigotes al alimentarse de la sangre del mamífero infectado. 6) Dentro de la mosca de arena los amastigotes viajan de la probóscide al estómago. 7) En el intestino de la mosca los amastigotes se transforman en promastigotes procíclicos, forma replicativa. 8) Los promastigotes procíclicos migran a la probóscide del mosquito diferenciándose en promastigotes metacíclicos. Tomado de <https://www.cdc.gov/parasites/leishmaniasis/index.html> "CDC" (Center of Disease Control).

### 1.2.2 Distribución

La leishmaniasis es una enfermedad con alta prevalencia en zonas tropicales y subtropicales de casi todo el mundo, con una incidencia de 2 millones de casos nuevos anualmente y amenazando a aproximadamente 350 millones de personas en áreas endémicas (Figura 9) (Zetina, 2008). La epidemiología es extremadamente diversa, con 20 especies de parásitos protozoarios del género *Leishmania* que se sabe que son patógenas para los seres humanos. La distribución geográfica de cada especie de *Leishmania* determina el tipo de enfermedad que ocurre en cada región, así como su gravedad. La leishmaniasis visceral (LV; también conocida como Kala-azar) es causada por *L. donovani* en el sur de Asia y África, mientras que *L. infantum* causa LV en el Mediterráneo, Oriente Medio, América Latina y partes de Asia. Por otro lado la leishmaniasis cutánea (LC) es causada por *L. major* en África, Medio Oriente y partes de Asia, y por *L. tropica* en el Medio Oriente, el Mediterráneo y partes de Asia (Duthie *et al.*, 2012).



**Fig. 9. Distribución global de la leishmaniasis.** La enfermedad se presenta en zonas tropicales y subtropicales de casi todo el mundo. Las áreas resaltadas en color rojo representan zonas de casos reportados de personas infectadas con este parásito (Davies, *et al.* 2003).

En México se han reportado tres especies: *L. mexicana*, *L. infantum* y *L. braziliensis*. La leishmaniasis cutánea, producida por *L. mexicana*, se presenta principalmente en la región del sureste (Campeche, Yucatán, Quintana Roo, Tabasco y Chiapas), donde es conocida comúnmente como “úlceras de los chicleros”. Por otro lado los estados donde se han registrado casos de leishmaniasis visceral son: Puebla, Guerrero, Chiapas, Oaxaca y Morelos (Trejo *et al.*, 1993). Este tipo de leishmaniasis es causado por *L. infantum*. Por otro lado los casos de leishmaniasis mucocutánea se concentran en un 90% en Bolivia, Brasil y Perú, y son producidos por *L. braziliensis*

La infección por *Leishmania* constituye un problema de gran importancia a nivel mundial desde el punto de vista de salud pública. La prevalencia de la leishmaniasis está en torno a los 12 millones de enfermos y los casos han ido en aumento debido a los cambios climáticos (WHO, 2006). De todos los casos la cuarta parte corresponde a la forma visceral presente principalmente en: India, Bangladesh, Sudan y Brasil. De las formas cutáneas el 90% ocurre en Afganistán, Arabia Saudita, Irán, Siria, Brasil, Perú y México (WHO, 2010).

### **1.2.3 Sistemática**

Se han registrado más de 20 especies de *Leishmania* capaces de infectar al humano produciendo las diferentes manifestaciones de la leishmaniasis. De esta manera el género *Leishmania* se divide en tres subgéneros (Figura 10), dependiendo de las partes del intestino del vector (mosca de arena) que son colonizadas por el parásito: *Leishmania*, *Viannia* y *Sauroleishmania*. Las especies pertenecientes al subgénero *Leishmania* producen leishmaniasis cutánea y visceral y se encuentran presentes en el Viejo y Nuevo Mundo, mientras que las especies del subgénero *Viannia* son causantes de leishmaniasis cutánea y/o mucocutánea sólo en el Nuevo Mundo. Por otro lado, las especies que pertenecen al subgénero *Sauroleishmania* no son patógenas para el humano, ya que sólo infectan reptiles (Bates, 2007).

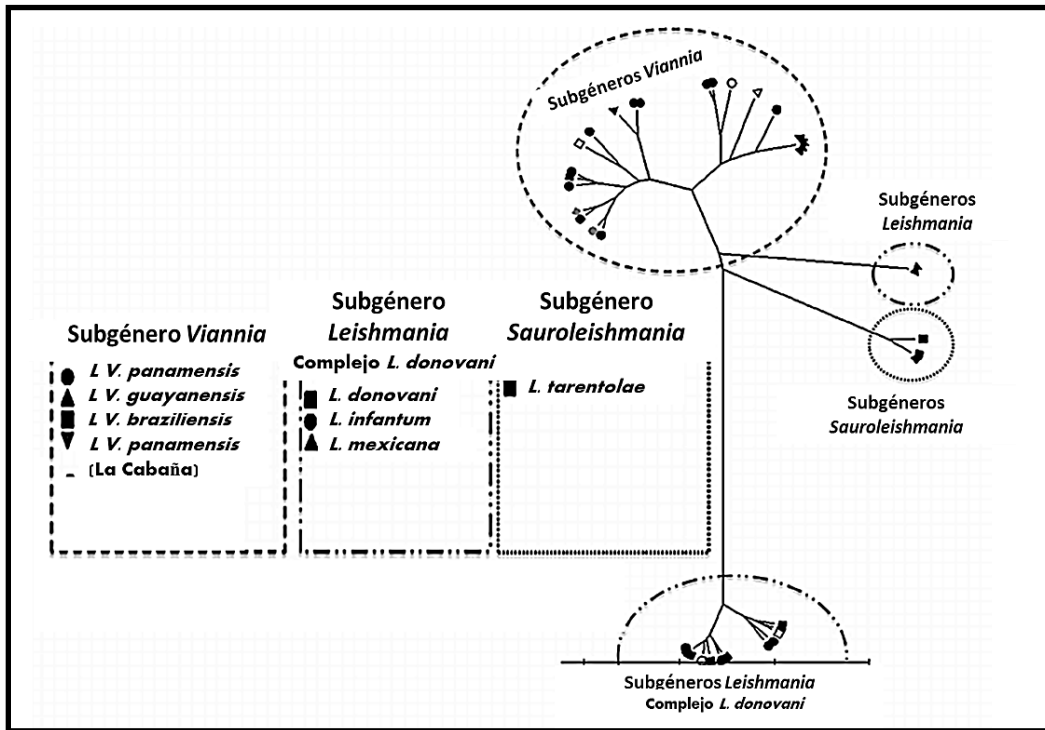


Fig. 10. Clasificación simplificada del genero *Leishmania* derivado de análisis filogenético (Moreno *et al*, 2015).

#### 1.2.4 Manifestaciones clínicas

En general, se ha observado que la especie de *Leishmania* que causa la infección determina el tipo de leishmaniasis que desarrolla el hospedero. Sin embargo esto depende de diversos factores que incluyen: la saliva del mosquito, la genética del hospedero y la inmunosupresión (Fantoni *et al.*, 1994). A continuación se describen las manifestaciones clínicas de los diferentes tipos de leishmaniasis:

##### 1.2.4.1 Leishmaniasis Cutánea (LC)

Los primeros síntomas de la LC ocurren de uno a seis meses después de la picadura infecciosa de la mosca de la arena. Los daños de LC suelen presentarse como lesiones múltiples ulceradas en la epidermis y se caracterizan por ser nodulares diseminadas o localizadas (Figura 11). El diagnóstico presuntivo de LC se basa en estos síntomas clínicos, mientras que el diagnóstico parasitológico sigue siendo el estándar de referencia que incluye el examen microscópico de



frotis obtenidos directamente de las úlceras, basado en la identificación directa de formas amastigotes por microscopía. Puede haber auto-curación por parte del hospedero (ocurre de 6 a 15 meses) pero esto depende de la especie del parásito, de la respuesta inmune del hospedero, así como de la carga parasitaria (Bennis *et al.*, 2015).



**Fig. 11. Leishmaniasis cutánea (LC), Afganistan.** Tomada de WHO 2014.

#### **1.2.4.2 Leishmaniasis Mucocútanea (LMC)**

La LMC es producida comúnmente por *L. braziliensis* y con menor frecuencia por *L. panamensis*. Está presente en Latinoamérica, registrando la mayoría de casos en Bolivia, Perú y Brasil. La característica de las especies causantes de esta enfermedad es que producen metástasis en la mucosa y las vías respiratorias por diseminación linfática o hematológica (Figura 12). Los síntomas de dicha enfermedad pueden presentarse hasta después de 20 años de haber adquirido el parásito a través de la picadura del vector (WHO, 2010).

Como signos iniciales pueden presentarse ulceraciones en los orificios nasales, seguidos por inflamación destructiva que puede extenderse hasta afectar el septo nasal y en ocasiones la faringe o la laringe. En casos más severos se han visto involucrados lo genitales y, a diferencia de la LC, no presenta auto-curación (Bailey y Lockwood, 2007).



**Fig. 12. Leishmaniasis mucocutánea (LMC).** Lesión destructiva del labio superior y parpado del ojo derecho (Zea et al., 2008).

#### 1.2.4.3 Leishmaniasis Visceral (LV)

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

Las manifestaciones clínicas de la enfermedad pueden variar de una infección asintomática a una enfermedad visceral progresiva que, si no es tratada, puede conducir a la muerte y se caracteriza por fiebre, pérdida de peso, hipergammaglobulinemia, hepatoesplenomegalia, anemia, trombocitopenia, leucopenia e inmunosupresión (Piscopo y Mallia, 2006).



**Fig. 13. Paciente con leishmaniasis visceral (LV).** Su vientre se encuentra distendido a causa del agrandamiento del bazo y el hígado (Silversides, 2009).

Debido a su importancia médica, los parásitos del género *Leishmania* han sido ampliamente estudiados en todo el mundo. Sin embargo, *Leishmania* y otros tripanosomátidos son también importantes desde el punto de vista de la biología molecular debido a que se caracterizan por presentar mecanismos de expresión genética muy diferentes a los de otros organismos eucariontes. En nuestro laboratorio estamos interesados en el estudio de la transcripción en *Leishmania*, proceso fundamental que muestra características únicas en este grupo de organismos de divergencia temprana.

### 1.3 Transcripción

La transcripción es el proceso mediante el cual una secuencia de nucleótidos de DNA es utilizada como molde para la síntesis de una molécula de RNA por mediación de la enzima RNA polimerasa dependiente de DNA. La transcripción en procariontes y eucariontes difiere en varios aspectos, por lo que se estudian por

separado. En eucariontes se han identificado tres RNA polimerasas denominadas Pol I, Pol II y Pol III. Éstas difieren en su localización nuclear, composición de subunidades y en el tipo de RNAs que sintetizan (Figura 14). Pol I sintetiza los precursores de RNA ribosomales (rRNA), mientras que Pol II produce los RNA mensajeros (mRNAs) y la mayoría de los RNA pequeños nucleares (snRNA). Por otro lado Pol III es responsable de la síntesis del rRNA 5S, los RNAs de transferencia (tRNA) y de U6 snRNA, entre otros (Conaway *et al.*, 1994).

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

**Fig. 14. Características de las RNA polimerasas eucariotas (Conaway *et al.*, 1994).**

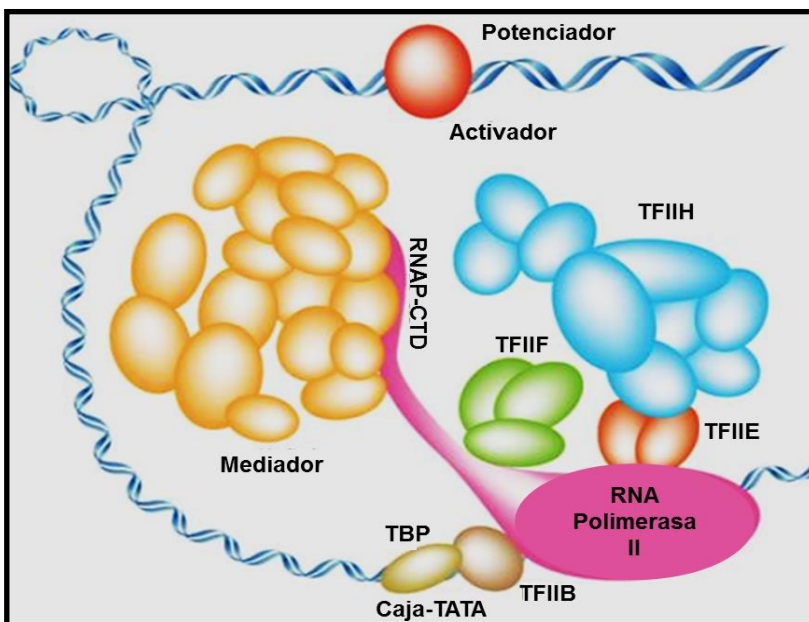
Una característica diferencial de las polimerasas eucariotas es que no se fijan directamente al DNA para transcribirlo, sino que lo hacen mediante factores proteicos adicionales. Las proteínas necesarias para la iniciación de la transcripción, pero que no forman parte como tal de la RNA polimerasa, se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

### 1.3.1 Mecanismos de regulación de la transcripción

La transmisión de la información genética desde el DNA hasta la proteína tiene lugar a través de un proceso complejo y sometido a múltiples formas de regulación: existencia de genes repetidos o metilación del DNA; iniciación, elongación y terminación de la transcripción; procesamiento diferencial (*splicing*), transporte y estabilidad de los mRNA.

Los factores de transcripción son por excelencia los reguladores de la expresión génica, pues estimulan o reprimen la tasa transcripcional de sus genes blanco al unirse a regiones promotoras específicas o a otros factores (Figura 15). Esto activa o desactiva cascadas de señalización intracelular (Chuck, 2008).

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



**Fig. 15. Complejo de iniciación de la transcripción en eucariotes.** Se incluye una secuencia de DNA y factores generales de transcripción (TBP, TFIIB, E, F Y H).

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

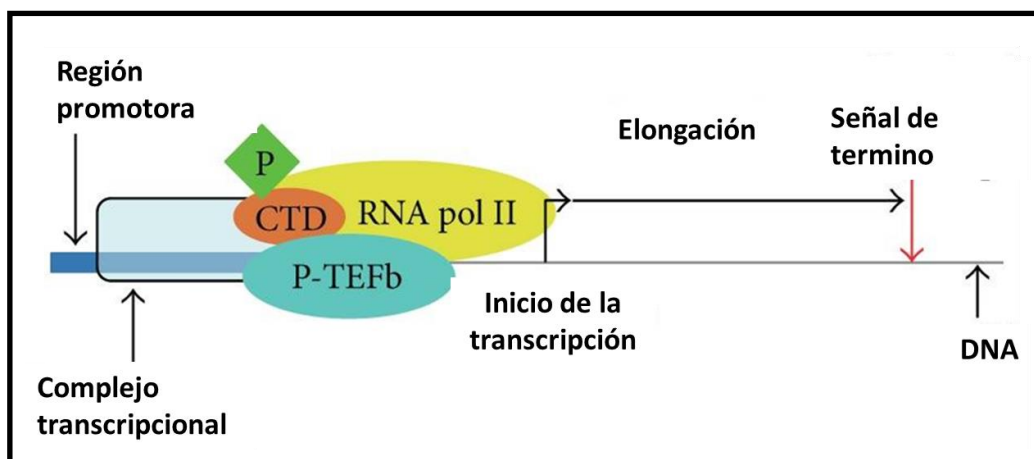
Las regiones promotoras para Pol II comprenden típicamente aproximadamente 40 bases y contienen subregiones funcionales llamadas elementos promotores básicos. Estos elementos incluyen la caja TATA, el iniciador (Inr) y el elemento promotor río abajo (DPE). La transcripción génica por Pol II comienza con el montaje de un complejo de preiniciación que comprende los factores de transcripción basales TFIIA, -B, -D, -E, -F y -H y el complejo coactivador mediador (Figura 15). El complejo de iniciación completo comprende aproximadamente 70 polipéptidos y tiene un peso molecular de alrededor de 4 MDa. La iniciación de la transcripción implica tres etapas principales: 1) la formación de un complejo promotor cerrado, 2) la apertura del DNA y la formación de un complejo promotor abierto, y 3) el inicio de la síntesis de RNA, dando lugar a un complejo de inicio de la transcripción. Durante la formación del complejo cerrado, se reconoce primero el promotor, y esto se consigue mediante TFIIA, -B y -D, que forman un conjunto río arriba. El conjunto río arriba entonces recluta el complejo Pol II-TFIIF. La unión de TFII E y TFII H facilita la apertura del promotor y la formación del complejo abierto. Cuando el RNA crece más allá de una longitud crítica, el complejo de iniciación se desmonta y se forma un complejo de elongación, que es responsable de la síntesis del mRNA (Hantsche y Cramer, 2017).

### 1.3.3 Elongación de la transcripción de Pol II

La fase de elongación de la transcripción por Pol II es una de las muchas etapas que está sujeta a regulación durante la generación de mRNAs maduros. Poco después de la iniciación, Pol II se encuentra bajo el control de factores negativos de elongación de la transcripción, generalmente denominados N-TEF (*negative transcription elongation factors*), que intervienen en la formación de transcritos abortivos. Durante la fase de post-iniciación de la elongación sólo se generan transcritos cortos y prematuros, y es hasta la salida de los factores N-TEF y la unión de al menos uno de los factores de regulación positivos llamados P-TEFb (*positive transcription elongation factors*) que se permite la transición hacia la

elongación productiva, generando transcripciones largas de las que se derivan los mRNAs (Figura 16). La eficiencia de la elongación puede estar influenciada por factores adicionales, incluyendo S-II, TFIIIF y ELL (Price, 2000).

Por otra parte, también se ha relacionado la fosforilación del dominio C-terminal (CTD) de Pol II con la regulación de la elongación, ya que el CTD se fosforila durante el ciclo de transcripción en un momento coincidente con el inicio de la elongación. De igual manera se demostró el papel de TFEb como un agente promotor de la elongación al fosforilar el CTD (Marshall *et al.*, 1996). Otro factor importante para la elongación de Pol II es el complejo Elongador (Karlsborn *et al.*, 2014).



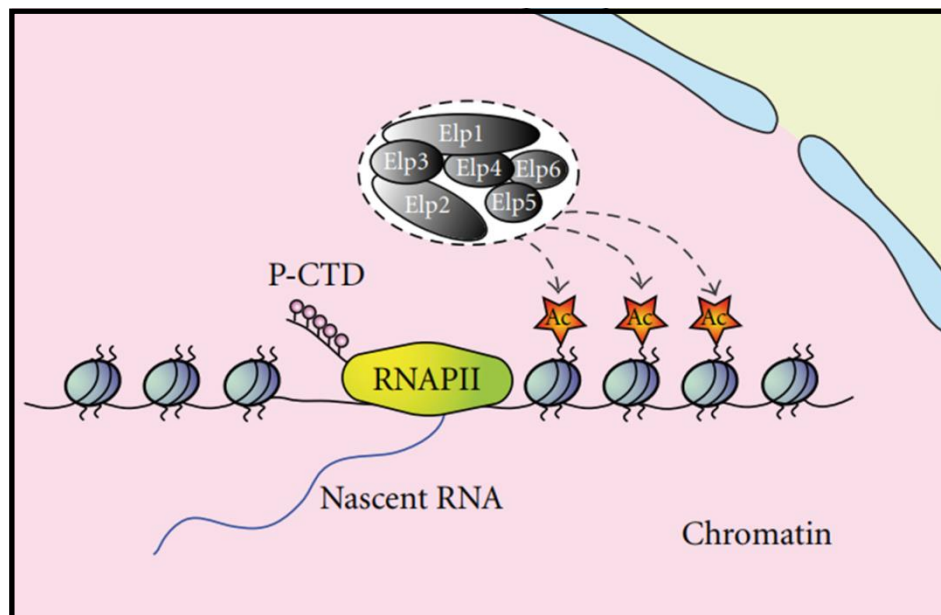
**Fig. 16. Complejo de inicio de la elongación.** Se muestra P-TEFb unido a Pol II como un complejo potenciador de la elongación, así como el CTD fosforilado permitiendo la formación de transcritos largos (pre-mRNA) no abortivos (Romano, 2013).

### 1.3.4 Elp3 y el complejo Elongador

El complejo Elongador, identificado por primera vez en *Saccharomyces cerevisiae*, está formado por seis subunidades diferentes (Figura 17). Éste consiste en un núcleo complejo, formado por las subunidades Elp1-Elp3, y un sub-complejo integrado por Elp4-Elp6. Ortólogos de las seis subunidades del complejo han sido

purificados en humano. En levadura, mutantes del complejo Elongador han mostrado fenótipos pleiotrópicos en múltiples procesos celulares, incluyendo la transcripción de Pol II y exocitosis.

En eucariotas, todo el genoma se empaqueta en un complejo de nucleoproteínas conocido como cromatina, a través del cual se regulan varios procesos celulares, incluyendo la transcripción, la división celular, la replicación y reparación del DNA. Las propiedades de la cromatina pueden ser alteradas por modificaciones postranscripcionales de histonas, incluyendo acetilación, metilación, fosforilación y ubiquitinación. La proteína Elp3 del complejo Elongador contiene un dominio de histona acetiltransferasa (HAT) en la región C-terminal y los niveles de acetilación de histonas están disminuidos en mutantes de Elp3, lo cual enfatiza la acción de Elp3 como remodelador de la cromatina, papel que es importante en el proceso de elongación de la transcripción (Figura 17) (Chinenov, 2002).



**Fig. 17. Funciones del complejo Elongador.** El complejo Elongador media la acetilación de las histonas contribuyendo a la elongación de la transcripción, además interactúa con el CTD de la RNA Pol II fosforilándolo (Creppe y Buschbeck, 2011).



La subunidad Eip3 se conserva altamente desde arqueas hasta eucariotas superiores, con más del 40% de identidad entre las secuencias proteicas. Los análisis de secuencias adicionales han revelado la presencia de un segundo dominio putativo, conocido como radical S-adenosilmetionina (SAM). Este dominio divergente se encuentra presente en un gran número de secuencias bacterianas y se caracteriza por la presencia de un *cluster* de hierro-azufre ( $Fe_4S_4$ ) (Paraskevopoulou *et al.*, 2006), además de la presencia de un posible sitio de unión a S-adenosilmetionina, el cual se caracteriza por ser una región rica en glicinas (Wang y Frey, 2007).

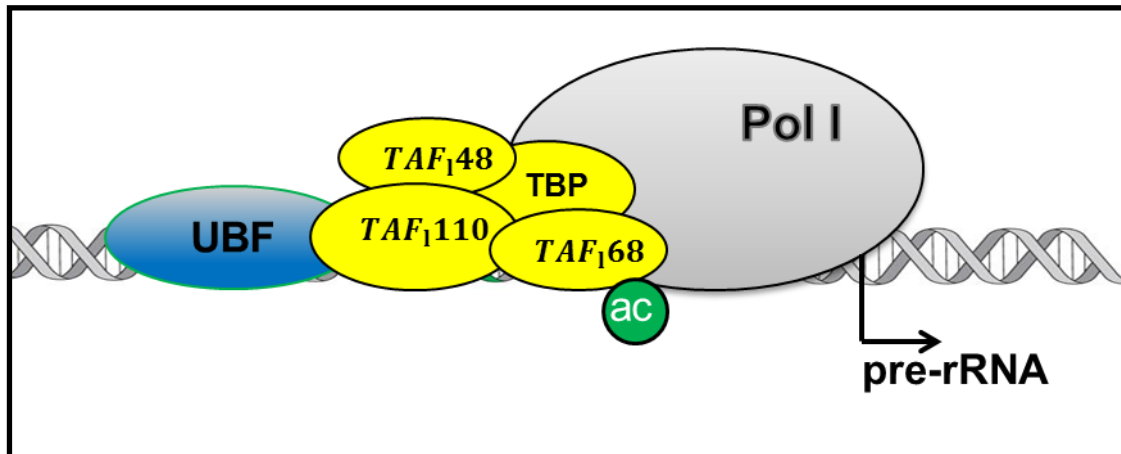
Una observación crucial en la comprensión del papel del complejo Elongador fue el descubrimiento del papel de este complejo en la formación de 5-carbonometil (ncm5) y 5-metoxicarbonometil (mcm5) en sitios ricos en uridinas de tRNAs. Cuando se eliminaron las cadenas laterales de ncm5 y mcm5, las especies de tRNA correspondientes actuaron de manera menos eficiente en la traducción (Chen *et al.*, 2011). Esto indica que el complejo Elongador, además de participar en la elongación de la transcripción de Pol II, lleva a cabo otras funciones celulares relacionadas con la traducción.

### 1.3.5 Transcripción de Pol I

Los eucariontes tienen gran cantidad de copias casi idénticas de genes de rRNA, que son transcritos en el nucléolo por Pol I. Estos genes de rRNA se agrupan en arreglos largos en tándem en sitios conocidos como regiones organizadoras nucleolares (NORs). Los transcritos primarios de genes de rRNA varían en tamaño desde 35S a 48S dependiendo de la especie, y se procesan en rRNAs 18S, 5.8S y 28S maduros, los cuales forman los núcleos catalíticos de los ribosomas, las máquinas de síntesis de proteínas de la célula (Chandrasekhara *et al.*, 2016).

El sistema de iniciación de Pol I difiere substancialmente del de Pol II. En general se ha observado que Pol I requiere solamente de dos factores de transcripción para iniciar la síntesis del pre-rRNA: UBF y SL1 (Figura 18) (Engel *et al.*, 2017).

De manera interesante, una de las subunidades que conforman a SL1 es la proteína de unión a la caja TATA (TBP), que participa también en la transcripción de las otras dos RNA polimerasas.



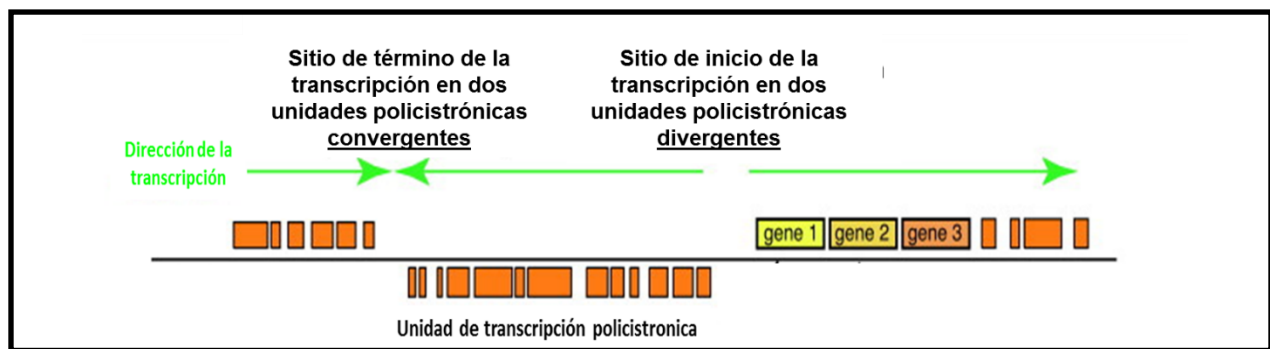
**Fig. 18. Factores de inicio de la transcripción de Pol I.** Se muestran los dos principales factores de Pol I: UBF y el complejo SL1 (formado por las subunidades TAF<sub>168</sub>, TAF<sub>148</sub>, TAF<sub>110</sub> y TBP) (Voit *et al.*, 2015).

#### 1.4 Genómica de tripanosomátidos

Actualmente se han completado los proyectos de secuenciación de los genomas de los tres tripanosomátidos más estudiados: *L. major*, *T. brucei* y *T. cruzi* (El-Sayed *et al.*, 2005). Este importante avance ha otorgado una herramienta poderosa para el estudio de la biología de estos organismos. A través de estudios de comparación entre estos organismos se ha observado que los tres genomas comparten 6158 genes que codifican proteínas. Además, se encontró que los genomas de las tres especies son altamente sintéticos, esto es, que el orden de los genes es altamente conservado (Kissinger, 2005). Los genomas de los tripanosomátidos y sus modos de expresión génica difieren en varios aspectos importantes de los de otros organismos eucariotas. Los genes codificadores de proteínas se organizan en grandes grupos de genes direccionales a escala genómica, y su transcripción policistrónica no se regula generalmente en la iniciación (Daniels *et al.*, 2010).

El genoma nuclear de *L. major* (32.8 Mb) se encuentra distribuido en 36 cromosomas diploides de tamaño relativamente pequeño (de 0.28 a 2.8 Mb). Se han predicho 8272 genes codificadores de proteína (de los cuales sólo al 36% se le ha descrito una función putativa), 911 genes de RNA y 39 pseudogenes. Aunque los tres genomas codifican un repertorio muy similar de genes de RNA, su organización difiere entre *L. major* y las dos especies de tripanosomas. Por ejemplo, los genes de los rRNA 28S, 18S y 5.8S se encuentran en un arreglo sencillo en tándem en *L. major*, pero en distintos loci en varios cromosomas en *T. brucei* y *T. cruzi*. Por otro lado, los genes del rRNA 5S se encuentran en 11 diferentes loci en *L. major*, pero en un arreglo sencillo en tándem en *T. brucei* y *T. cruzi* (Berriman *et al.*, 2005).

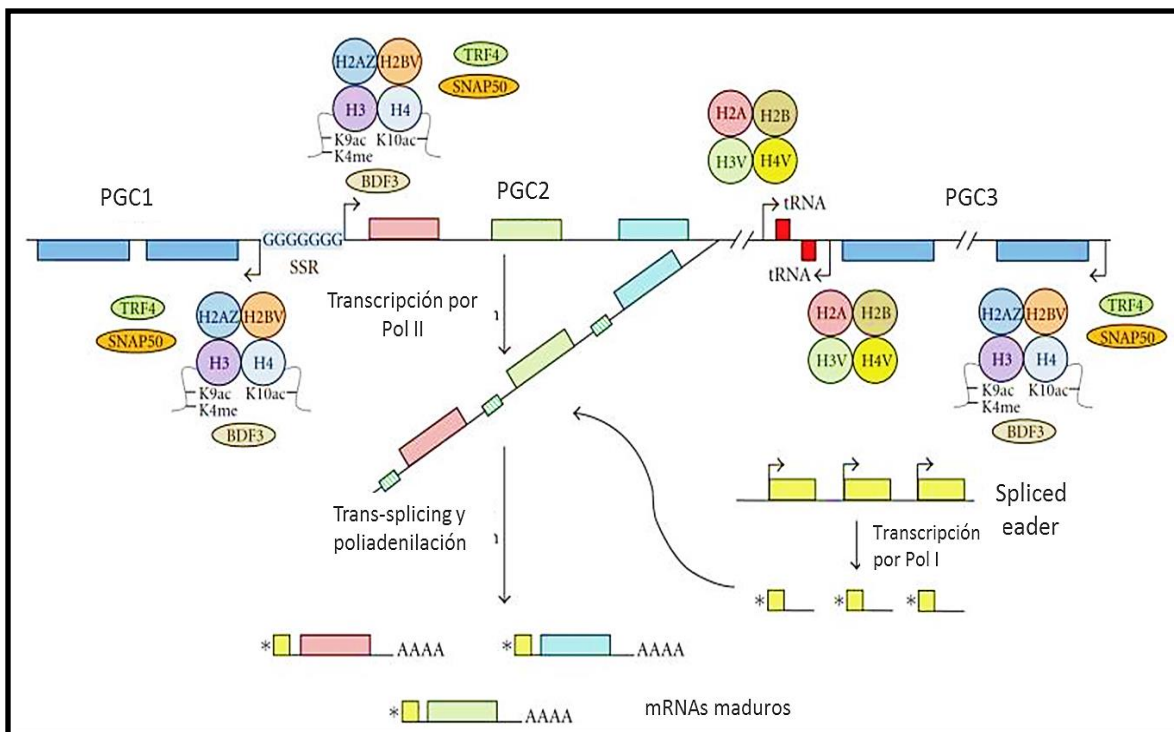
Cada cromosoma contiene al menos dos unidades de transcripción, las cuales pueden ser divergentes o convergentes (Figura 19). La transcripción policistrónica de cada unidad genera transcritos primarios largos que se procesan rápidamente en unidades monocistrónicas de mRNAs por *trans-splicing* y poliadenilación.



**Fig. 19. Organización del genoma de *Leishmania* en unidades de transcripción policistrónica.** Se observan los sitios donde convergen y divergen las unidades policistrónicas (Siegel *et al.*, 2011).

### 1.4.1 *Trans-splicing* y poliadenilación

En el *trans-splicing*, un mini exón o RNA *spliced-leader* (SL), que es una secuencia de 39 nt de longitud, es agregada al extremo 5' de todos los mRNA (Daniels *et al.*, 2010). El precursor del RNA SL contiene una estructura *cap* en su extremo 5' y está formado por el mini exón y por un intrón de aproximadamente 100 bases. A diferencia del *splicing* convencional o *cis-splicing*, en el *trans-splicing* se libera una estructura en forma de "Y", en lugar de la estructura en forma de lazo (*ariat*) del *cis-splicing*. En ambos casos el proceso se lleva a cabo de manera coordinada por varios factores proteicos y los snRNA U1, U2, U4, U5 y U6 (Michaeli, 2011).



**Fig. 20. Transcripción y procesamiento de mRNAs en tripanosomátidos.** La transcripción de los PGCs (*clusters* de genes policistrónicos) inicia en las regiones SSR y termina en regiones que contienen genes tRNA. La transcripción de una PGC produce un transcrito primario que se procesa mediante *trans-splicing* y poliadenilación para generar los mRNA maduros. Mediante *trans-splicing*, se agrega una secuencia de RNA denominada *spliced leader* (SL) al extremo 5' de cada mRNA. También se muestran algunos factores de transcripción como TRF4 y SNAP50 que se unen a los sitios de inicio (Martínez-Calvillo *et al.*, 2010).

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

#### 1.4.2 Transcripción en tripanosomátidos

En este grupo de organismos se sabe poco sobre transcripción. A diferencia de la mayoría de los organismos eucariotas, la transcripción en tripanosomátidos es policistronica. La mayoría de los cromosomas contienen al menos dos PGCs (*clusters* de genes policistrónicos) también llamadas unidades policistrónicas o unidades de transcripción, que pueden transcribirse divergentemente (hacia los telómeros) o transcribirse convergentemente (desde los telómeros) (Martínez-Calvillo *et al.*, 2003 y 2004). La transcripción de Pol II inicia río arriba del primer gen de una unidad policistrónica, en regiones llamadas SSR (Figura 20). Estas regiones no contienen cajas TATA ni ningún otro elemento promotor típico de Pol II. Varios factores generales de transcripción de Pol II han sido identificados en tripanosomátidos, incluyendo TFIIA, TFIIB y TFIIF (Martínez-Calvillo *et al.*, 2010).

Otra característica distintiva de *Leishmania* y otros tripanosomátidos es que el rRNA 28S se encuentra fragmentado en 6 moléculas de rRNA independientes: 28S $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$  y  $\zeta$  (White *et al.*, 1986). *L. major* contiene alrededor de 12 copias de la unidad del rRNA, localizadas en tándem en el cromosoma 27. El sitio de inicio de la transcripción de Pol I en la unidad del rRNA de *L. major* fue localizado a 1043 pb río arriba del gen del rRNA 18S. Una región promotora pequeña que abarca hasta la base -183 (en relación al sitio de inicio de la transcripción) fue

identificada (Martínez-Calvillo *et al.*, 2001). Además, se observó que varias marcas epigenéticas relacionadas con activación de la transcripción están enriquecidas en dicha región promotora (Vizuet-de-Rueda *et al.*, 2016). En tripanosomátidos no han sido identificados los factores de transcripción UBF y SL1, esenciales para el reclutamiento de Pol I. Sin embargo, en *T. brucei* se identificó y caracterizó un factor de transcripción de Pol I, llamado CITFA, que parece ser exclusivo de los tripanosomátidos (Nguyen *et al.*, 2014). Por otro lado se han identificado las 12 subunidades que componen a Pol I en *T. brucei* y se ha determinado la existencia de una subunidad específica de tripanosomátidos, llamada RPA31, la cual es esencial para la transcripción *in vitro* de Pol I y la viabilidad celular (Das *et al.*, 2008).

Las especies de tripanosomátidos africanos albergan la única Pol I conocida que transcribe no sólo genes de rRNA sino también genes codificantes de proteínas. Es importante destacar que estos genes codificadores de proteínas incluyen los que codifican las glicoproteínas variables de superficie (VSG), que cubren la superficie de la célula de las formas sanguíneas, y también la prociclina, la principal proteína de superficie del estadio de la mosca tsetse. De esta manera, la transcripción de Pol I en tripanosomas africanos está íntimamente ligada a la diferenciación entre las etapas del ciclo de vida y también a la supervivencia en el hospedero mamífero (Daniels *et al.*, 2010).

### **1.4.3 Isoformas de Elp3 en tripanosomátidos: Elp3a y Elp3b**

Se sabe muy poco del proceso de elongación de la transcripción en *Leishmania* y otros tripanosomátidos. En relación al complejo Elongador, en tripanosomátidos sólo ha sido identificada la subunidad Elp3 (Alonso y Serra, 2012). De hecho, existen dos isoformas relacionadas con Elp3 en este grupo de organismos: Elp3a y Elp3b (Alsford y Horn, 2011). De manera interesante, se ha demostrado que en *T. brucei* Elp3b juega un papel muy importante en la regulación de la elongación de Pol I. Esta conclusión es apoyada por el aumento de la transcripción de los

genes de rRNA en líneas celulares donde se redujo la expresión de Elp3b. De igual manera se comprobó que Elp3b controla selectivamente la transcripción de rRNA, y no la de las VSG y las prociclinas, lo que indica una capacidad para distinguir entre diferentes unidades de transcripción de Pol I. Además, se definió a Elp3b como una proteína nucleolar. Por otro lado, la función de Elp3a no ha sido analizada, aunque se ha determinado que se localiza en la periferia nuclear en *T. brucei* (Alsford y Horn, 2011).

#### **1.4.4. Eliminación de genes en *L. major***

Al proceso de introducción de fragmentos de DNA en células eucariontes que inducen un cambio en la expresión génica se le denomina transfección. De esta manera existen dos tipos de transfección: 1) los métodos químicos que consisten en la formación de complejos de DNA que son introducidos a la célula a través de diversas rutas metabólicas (endocitosis e incorporación por afinidad a la membrana celular); y 2) los métodos físicos, por medio de los cuales se introduce mecánicamente alguna molécula o fragmento de DNA (microinyección y electroporación) (Laban *et al.*, 1990).

Desde diversos enfoques se ha demostrado desafiante el estudio de *Leishmania* debido a los cromosomas supernumerarios y las complejidades que presenta en su expresión genética a lo largo de su ciclo de vida (Beverley, 2003). En contraste, la disponibilidad de secuencias del genoma de *Leishmania*, de fácil búsqueda con el recurso en línea, ha permitido el estudio de genes esenciales que regulan procesos celulares fundamentales. En su mayor parte, estos estudios se han centrado en el análisis de la función mediante la manipulación genética de ciertos genes utilizando la recombinación homóloga para insertar transgenes en el genoma. La sustitución génica se realiza por transfección de promastigotes procíclicos con un vector lineal que contiene un gen de resistencia a un fármaco flanqueado por brazos de homología para el locus del gen blanco. Dado que

*Leishmania* es un organismo diploide se requieren de dos marcadores para la eliminación de ambos alelos (Duncan *et al.*, 2017).

Entre los factores variables para la transfección en *Leishmania* por electroporación se encuentran: la densidad celular, la concentración y pureza del DNA, las condiciones de selección de las células transfectadas y la duración del pulso eléctrico. Además se ha reportado que para una recombinación homóloga eficiente en *Leishmania* se requieren entre 150 y 200 pb (Alsford y Horn, 2011; Kapler *et al.*, 1990).

A pesar de la eficacia de la sustitución de genes de *Leishmania* por genes de resistencia que contienen flancos homólogos al locus del gen endógeno, al reemplazar genes que son esenciales para la viabilidad del promastigote la plasticidad genómica de *Leishmania* puede dar lugar a la selección de la aneuploidía, o células con elementos extracromosómicos que conservan una copia del gen blanco a pesar de su sustitución. La selección de tales células proporciona pruebas de la importancia del gen, pero no es suficiente para demostrar la esencialidad o para estudiar la función de los genes esenciales. La expresión de una copia exogénica del gen blanco en un episoma, permite la sustitución de copias de genes endógenos sin la selección de clones con aneuploidía, la retención de este episoma en ausencia de selección puede proporcionar evidencia de que es un gen esencial (Duncan *et al.*, 2017).

Resulta necesario estudiar la función de Elp3b en otros tipanosomátidos, para así determinar si la participación de Elp3b en la síntesis de rRNA es una característica distintiva de todos los miembros de esta familia de parásitos. En el presente trabajo se inició el estudio de Elp3b en *L. major*, intentando obtener cultivos *knock-out*, por medio de recombinación homóloga, en los que se haya eliminado una o las dos copias alélicas del gen de Elp3b en cultivos de promastigotes.



## 2. Objetivos

---

### 2.1. Objetivo general

- Generar clonas celulares *knock-out* de Elp3b en *L. major*, partiendo de un cultivo que exprese la proteína recombinante Elp3b-PTP.

### 2.2. Objetivos particulares

- Determinar la presencia de secuencias conservadas en Elp3b, mediante análisis *in silico*.
- Predecir las estructuras secundaria y tridimensional de Elp3b con programas bioinformáticos.
- Generar y caracterizar clonas celulares en las que una copia del gen de Elp3b haya sido eliminada por recombinación homóloga (*knock-out* sencillo).
- Producir y analizar clonas celulares en las que las dos copias del gen de Elp3b hayan sido eliminadas por recombinación homóloga (*knock-out* doble).

## 3. Materiales y Métodos

---

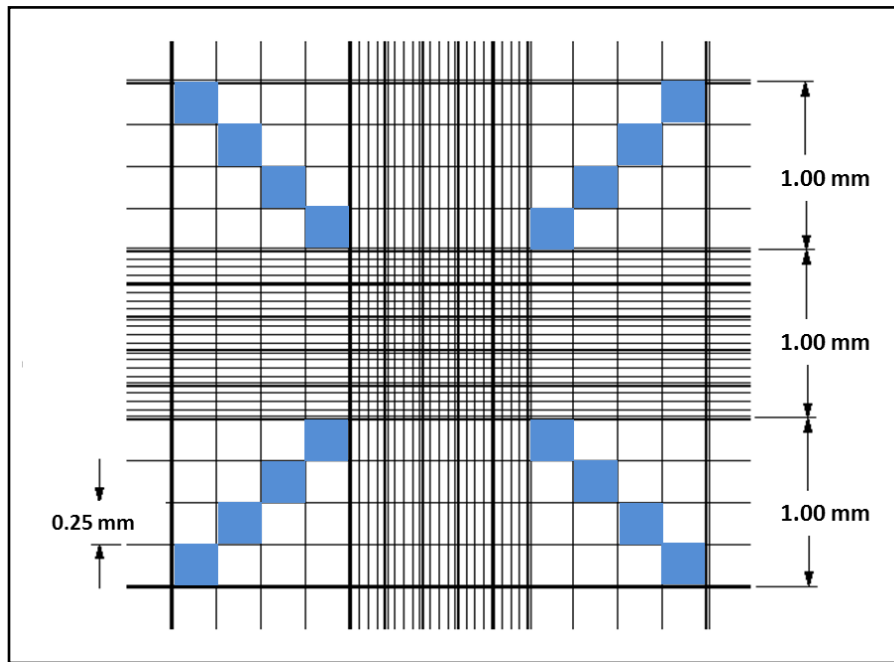
### 3.1. Análisis *in silico*

La secuencia de Elp3b de *L. major* y sus ortólogos en otras especies se obtuvieron de las bases de datos de NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), TriTrypDB (<http://tritrypdb.org/tritrypdb>) y GeneDB (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Éstas fueron analizadas mediante los programas bioinformáticos: Blast 2.0 (Basic Alignment Search Tool), Clustal  $\omega$  1.82 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2>), Swiss-PDBViewer 4.1 y DNAMAN 3.0.

### 3.2. Cultivo y conteo de parásitos

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

Para el conteo se tomaron 50  $\mu$ L de cultivo, diluyéndolos en 450  $\mu$ L de PBS-Formaldehído al 2%. De la dilución se tomaron 10  $\mu$ L y se colocaron en una cámara de Neubauer, contando los parásitos ubicados en los cuadros en diagonal de cada uno de los cuadrantes de la esquina (Figura 21). Posteriormente, el resultado se multiplicó por  $10^6$  para así obtener el número total de parásitos por mililitro.



**Fig. 21. Esquema de la cámara de Neubauer.** Se señalan en azul las áreas que se tomaron en cuenta para realizar el conteo de parásitos.

Para su mantenimiento a largo plazo, los cultivos fueron congelados en nitrógeno líquido. Para ello,  $8 \times 10^7$  células en fase media logarítmica se centrifugaron a 4,000 rpm durante 12 min a  $4^\circ\text{C}$ ; la pastilla fue resuspendida en 2 mL de suero fetal bovino con 10% de dimetilsulfoxido. Las células fueron transferidas a un criovial y se mantuvieron a  $-70^\circ\text{C}$  durante toda la noche. Finalmente, los crioviales fueron etiquetados y almacenados en nitrógeno líquido.

### 3.3. Extracción de DNA genómico

La extracción de DNA se realizó a partir de un total de  $3 \times 10^8$  promastigotes en fase media logarítmica empleando el método convencional de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico, para el cual los parásitos se centrifugaron a 5,000 rpm durante 10 min. Posteriormente se resuspendió la pastilla en 5 ml de una solución de lisis que contiene 5  $\mu\text{L}$  de SSC 1 $\times$  (NaCl 3 M y citrato de sodio 0.6 M), 5 mL de TNE pH 8.0 (Tris 40 mM, EDTA 1 mM y NaCl 15 mM), sarcosyl 0.5% y 100  $\mu\text{g}$  de proteinasa K. Las muestras se agitaron en vortex (Daigger Genie 2) y se

mantuvieron a 55°C durante 2 h. Posteriormente se adicionaron 0.5 volúmenes de fenol y 0.5 volúmenes de cloroformo y se centrifugó a 4,000 rpm durante 10 min a 4°C, se transfirió la fase superior acuosa a un tubo nuevo y se precipitó con 0.1 volúmenes de acetato de sodio 3 M y 2.5 volúmenes de etanol absoluto a -20°C toda la noche. Al siguiente día se centrifugó a 9,000 rpm durante 15 min a 4°C y se lavó la pastilla dos veces, la primera con etanol al 70% y la segunda con etanol absoluto. Finalmente el DNA se resuspendió en 300 µL de Tris-EDTA pH 7.8 (Tris-HCl 10 mM y EDTA 0.2 mM). La calidad y concentración del DNA se evaluó por espectrofotometría a 260 nm (1 D. O. a 260 nm= 50 µg/mL) y por electroforesis en geles de agarosa al 0.8% con amortiguador TBE 1x y Midori Green Advance como agente intercalante para visualizar los ácidos nucleicos con luz UV; dichos geles fueron observados y fotografiados en un sistema de documentación de geles Bio Sens SC645 con el software PSRemote V 1.6.3.

### **3.4 Eliminación de sales de muestras de DNA**

La desalación de las muestras se realizó con el kit NucleoSpin Extract II (Macherey Nagel). Este método es utilizado para remover sales, enzimas y dNTPs de muestras de DNA. Se usaron 2 volúmenes de buffer NT por cada volumen de muestra. Ésta se colocó en una columna con membrana de sílica incluida en el kit, que a su vez se posicionó dentro del tubo colector y se centrifugó a 11,000 × g durante 1 min. Luego se agregó 600 µL de buffer NT3 y se volvió a centrifugar a 11,000 × g durante 1 min y de igual manera se eliminó el excedente. Finalmente, para eliminar el excedente de líquido en la membrana, se centrifugó a 11,000 × g durante 2 min colocando posteriormente la columna en un tubo eppendorf nuevo para resuspender el DNA en 30 µL de buffer de elución.

### 3.5. Amplificación de DNA por medio de reacción en cadena de polimerasa (PCR)

Para la amplificación de las secuencias específicas de DNA, se efectuaron múltiples reacciones de PCR. Las reacciones se llevaron a cabo en tubos de PCR, donde se adicionó buffer KAPA Taq PCR con MgCl<sub>2</sub> 2 mM (1x), mezcla de dNTPS 200 µM, oligonucleótidos sentido y antisentido (200 µM), el DNA molde (100 ng) y de 1 a 3 U de DNA polimerasa KAPA Taq (Promega), dependiendo del fragmento a amplificar, llevando a un volumen final de 50 µL con agua destilada. El perfil térmico empleado consistió en 30 ciclos, incluyendo desnaturalización a 95°C durante un min, la hibridación entre 50-60°C durante un min, la extensión a 72°C durante 1-3 min y un ciclo de extensión final a 72°C durante 7 min. Dichas reacciones se realizaron en el termociclador Corbett Research. En la **Tabla 1** se muestran los oligonucleótidos empleados en las amplificaciones.

Oligonucleótido	Secuencia	Tamaño del amplificado	Región amplificada
Elp3b-5'-for-Xbal	ATCTAGACACAAGCACACACTGTGCACG	566 pb	UTR-5' para ligar a <i>pac</i>
Elp3b-5'-rev-EcoRI	AGAATTCCCGAGATGCGAGATGCGAGAT		
Elp3b-5'-for-Xbal	ATCTAGACACAAGCACACACTGTGCACG	566 pb	UTR-5' para ligar a <i>hyg</i>
Elp3b-5'-rev-SpeI	AACTAGTCCGAGATGCGAGATGCGAGAT		
Elp3b-3'-for-SacI	AGAGCTCAGAGACGAATCCGCGTAAGC	536 pb	UTR-3' para ligar a <i>pac</i> o <i>hyg</i>
Elp3b-3'-rev-XhoI	ACTCGAGAAGCAACACGGTCACGAGGC		

**Tabla 1. Oligonucleótidos empleados para la amplificación de las regiones intergenicas 3' y 5' de Elp3b en *L. major*.**

### 3.6. Ligación

Las secuencias amplificadas por PCR y purificadas fueron ligadas en el plásmido pGEM-T Easy (Promega) (Figura 22), un vector utilizado para la clonación directa de productos de PCR que posee dos genes de selección para bacterias

transformadas (resistencia a ampicilina y el gen LacZ, que codifica para la enzima  $\beta$ -galactosidasa). Este plásmido se usó para la ligación de las secuencias 5'-UTR y 3'-UTR de Elp3b. Las reacciones para la ligación se realizaron con 100-200 ng de inserto, 37.5 ng del vector pGEM-T Easy, 1  $\mu$ L de ligasa T4 DNA (3U/ $\mu$ L) y 5  $\mu$ L de buffer Rapid Ligation 2x, llevándolo a un volumen final de 10  $\mu$ L con agua desionizada e incubando a 4°C toda la noche.

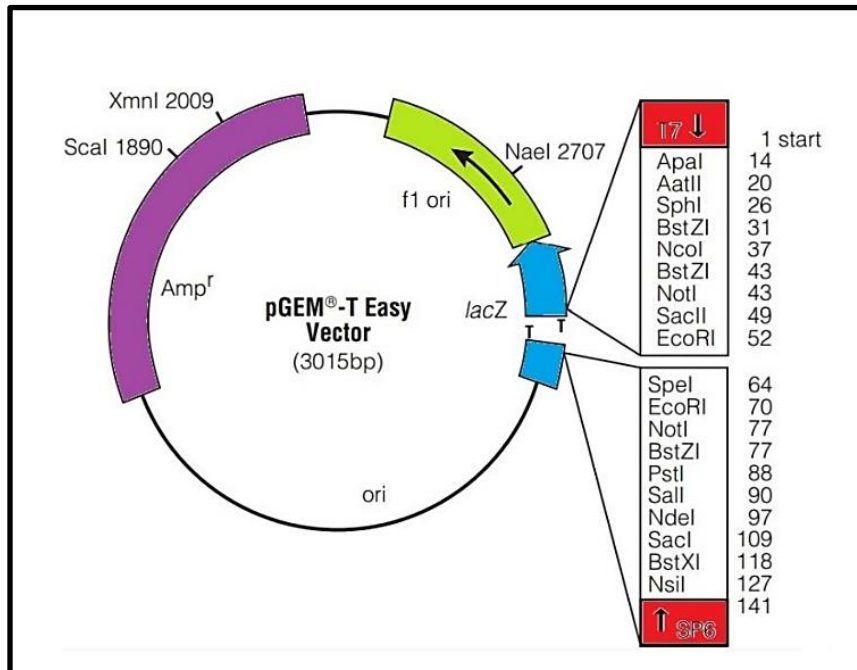


Fig. 22. Mapa del vector pGEM-T Easy y sus puntos de referencia.

### 3.7. Transformación de células competentes de *E. coli*

Para la transformación se utilizaron 200  $\mu$ L de células competentes de *E. coli* JM109 ( $1 > 10^7$  ufc/ $\mu$ g de DNA, Promega), las cuales fueron transferidas al fondo de un tubo cónico de 15 mL y se mezclaron con los productos de ligación, incubando en hielo por 20 min. Posteriormente se efectuó un choque térmico durante 45 s en un baño de agua a 42°C, para colocar en hielo nuevamente por 2 min. Enseguida se adicionaron 800  $\mu$ L de medio SOC (triptona 2%, extracto de levadura 0.5%, NaCl 1%, KCl 2.4 mM, MgCl<sub>2</sub> 1% y glucosa 2%) y se incubó a 37°C con una agitación constante de 200 rpm durante 1.5 h. Finalmente las

células fueron centrifugadas durante 2 min a 7000 rpm, la pastilla resuspendida en 100  $\mu$ L de medio SOC, para posteriormente ser esparcidas en cajas Petri con medio LB agar (peptona de caseína 1%, extracto de levadura 0.5% y NaCl 0.5%) suplementado con ampicilina 0.01%, IPTG (50 mg/mL). Finalmente las células se dejaron crecer toda la noche a 37°C.

### **3.8. Purificación de plásmidos por minipreps**

Para la purificación de los plásmidos a pequeña escala, fue necesaria la selección de colonias de *E. coli* blancas, es decir, resistentes a ampicilina y sin la capacidad de degradar X-Gal. Dichas colonias fueron empleadas para inocular 5 mL de medio LB con ampicilina (100  $\mu$ g/mL) en tubos de ensayo, los cuales se incubaron a 37°C con agitación suave de 220 rpm toda la noche. Para la purificación fue empleado el kit NucleoSpin Plasmid (Macherey Nagel), siguiendo las indicaciones del fabricante. Para ello se centrifugaron las células 11,000  $\times$  g durante 30 segundos para eliminar el medio LB, después se añadieron 250  $\mu$ L del buffer de resuspensión A1 y se agitó en vortex; luego se agregaron 250  $\mu$ L del buffer de lisis A2 y se mezcló, posteriormente se incubó a temperatura ambiente por 5 min y se adicionó el buffer neutralizador A3 para después centrifugar a 11,000  $\times$  g durante 10 min a temperatura ambiente. Por otro lado se colocó una columna con la membrana de sílica en un tubo colector y se le agregó la mezcla anterior, se centrifugó a 11,000  $\times$  g por 1 min y se eliminó la descarga que quedó en el tubo colector. Se volvió a colocar en el tubo colector y se adicionó Buffer de lavado A4 para centrifugar a 11,000  $\times$  g durante 1 min. Finalmente la columna se colocó en un tubo eppendorf estéril de 1.5 mL y se adicionaron 50  $\mu$ L de buffer de elución AE y se centrifugó a 11,000  $\times$  g por 1 min obteniendo así el plásmido purificado.

### 3.9. Purificación de plásmidos a gran escala

Los plásmidos a gran escala (maxipreps) fueron preparados con el kit QIAfilter™ Plasmid Maxi Kit de QIAGEN®, siguiendo las indicaciones del fabricante. Para ello se centrifugaron las células provenientes de cultivos de 500 mL a 11,000 × g durante 30 segundos para eliminar el medio LB y se resuspendió la pastilla en 250 µL de buffer P1, se agitó en vortex y se agregaron 250 µL de buffer P2 mezclando por 5 min a temperatura ambiente para después agregar el buffer P3 y colocar en una columna con un tubo colector. Posteriormente se centrifugó a 11,000 × g por 1 min y se eliminó la descarga del tubo colector, luego se realizó un lavado con buffer QC a 11,000 × g por 1 min y finalmente la columna se colocó en un tubo eppendorf estéril y se agregó buffer QF para la elución y se centrifugó a 11,000 × g por 1 min para dar termino a la purificación del plásmido.

### 3.10. Construcción de vectores

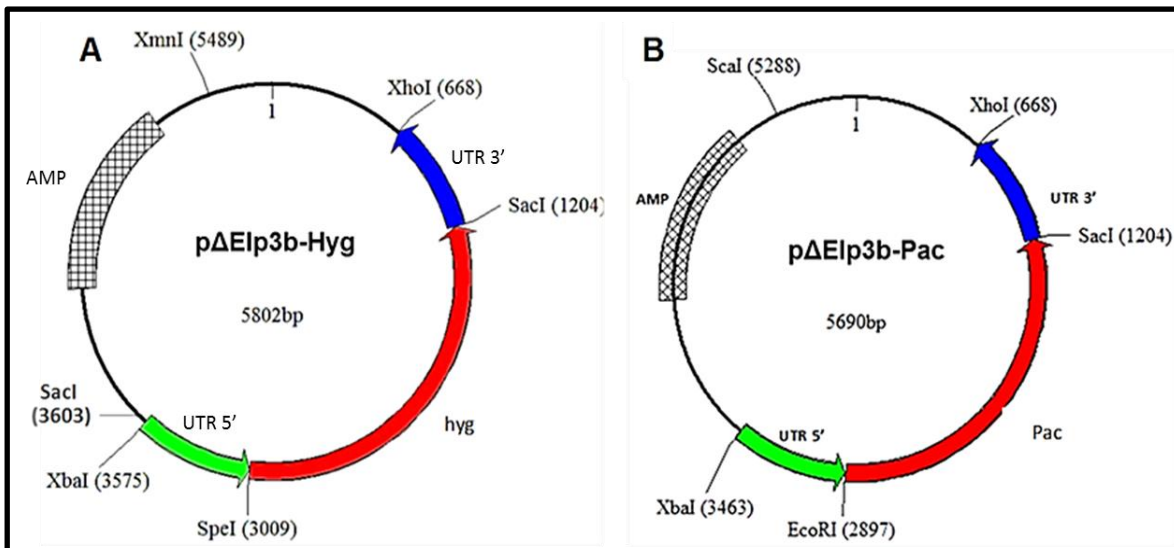
Con la finalidad de reemplazar las dos copias de Elp3b en *L. major* se utilizaron genes de resistencia a higromicina (*hyg*) y puromicina (*pac*) que se integrarían por recombinación homóloga, siguiendo una estrategia descrita previamente (Martínez-Calvillo *et al.*, 2005). Para ello se generaron vectores en los cuales los genes de resistencia a fármacos quedarían flanqueados por las regiones intergénicas 5' y 3' de Elp3b. Dichas regiones intergénicas se generaron mediante la amplificación por PCR de los fragmentos 5'-UTR y 3'-UTR de Elp3b y su clonación en el vector pGEM-T Easy. Por otro lado los genes de resistencia a higromicina y puromicina se obtuvieron de los vectores pX63PAC y pX63HYG digiriendo con las enzimas EcoRI-SacI y Spel-SacI respectivamente. Además el vector pBluescript II SK fue digerido con las enzimas XbaI y XhoI. Una vez que se contó con todos los fragmentos requeridos para la construcción de los plásmidos pΔElp3bHyg y pΔElp3bPac, se procedió a realizar la ligación de los tres fragmentos con el vector en un solo paso. Para el vector pΔElp3bPac, fueron ligadas al vector pBluescript II SK las regiones 5'-UTR/XbaI-EcoRI, 3'-UTR/SacI-



XhoI y el gen de resistencia a puromicina. Para el vector pΔElp3bHyg se ligaron en el vector pBluescript II SK las regiones 5'-UTR/XbaI-SpeI, 3'-UTR/SacI-XhoI y el gen de resistencia a higromicina. La secuenciación de los diferentes vectores se llevó a cabo en la Unidad de Biotecnología y Prototipos (UBIPRO) de la FES Iztacala. Las muestras se procesaron en el Secuenciador Automático 3100, Genetic Analyser of Applied Biosystems.

### 3.11. Ensayos de restricción

Con la finalidad de realizar la transfección de los promastigotes de *L. major* con los genes de resistencia y las regiones flanqueantes 5' y 3' de Elp3b se procedió a liberar dichos *cassettes* mediante digestiones con enzimas de restricción. Usualmente se realizaron 8 digestiones con 10 µg de cada plásmido (pΔElp3bHyg y pΔElp3bPac) (Figura 23) con XbaI, XhoI, XmnI y SacI (BioLabs®Inc.), con 5 µL de buffer Cutsmart (BioLabs®Inc.) en un volumen final de 50 µL, por 6 horas a 37°C.



**Fig. 23.** Mapa de los vectores pΔElp3b-Hyg (A) y pΔElp3b-Pac (B). Se muestran los vectores que contienen los genes de resistencia, así como sus respectivos sitios de restricción.

### 3.12. Purificación de los *cassettes* de *hyg* y *pac*

El DNA plasmídico digerido fue analizado en geles de agarosa (Agarose D-1 low EEO PRONADISA) preparado a una concentración de 0.8% con amortiguador TBE 1× (Tris Base-HCl 5.4%, ácido bórico 2.74% y EDTA 0.46%) y teñido con Midori Green Advance. Los geles se dejaron polimerizar durante 30 min y se corrieron inmersos en TBE 0.5× en una cámara de electroforesis (Gel XL Ultra V-2 Labnet), durante 30 min A 100 v. Las muestras fueron resuspendidas en buffer de carga 6×, además se emplearon marcadores de peso molecular (1 kb ladder, Invitrogen); la visualización de las muestras en gel para su extracción se llevó a cabo mediante un transiluminador de luz UV (M-26 UVP), esto para identificar las bandas a purificar y éstas fueran cortadas inmersas en la agarosa. La purificación de las muestras de DNA se realizó con ayuda del Kit Nucleospin Extract II (Machereil Nagel), siguiendo las indicaciones del fabricante. Brevemente, el fragmento de agarosa se colocó en un tubo eppendorf de 1.5 mL y se pesó para adicionarle 200 µL de buffer NT por cada 100 mg de agarosa; se incubó a 50°C durante 10 min vortexeando para la muestra durante la incubación. Cuando la agarosa se disolvió completamente las muestras se colocaron en una columna incluida en el kit, la cual tiene una membrana de sílica que retiene el DNA. La columna se colocó en un tubo colector y se centrifugó a 1,000 × g durante 1 min eliminando el excedente retenido en el tubo. Después se adicionaron 600 µL de buffer NT3, se centrifugó a 11,000 × g durante 1 min y se volvió a eliminar el excedente del tubo colector. Para secar la membrana se volvió a centrifugar a 11,000 × g durante 2 min y finalmente el DNA en las columnas se resuspendió en un volumen de 30 µL en un tubo eppendorf nuevo y estéril. Este método remueve la agarosa, además de enzimas y dNTPs, de las muestras de DNA a purificar.

### **3.13. Electroporación de promastigotes de *L. major***

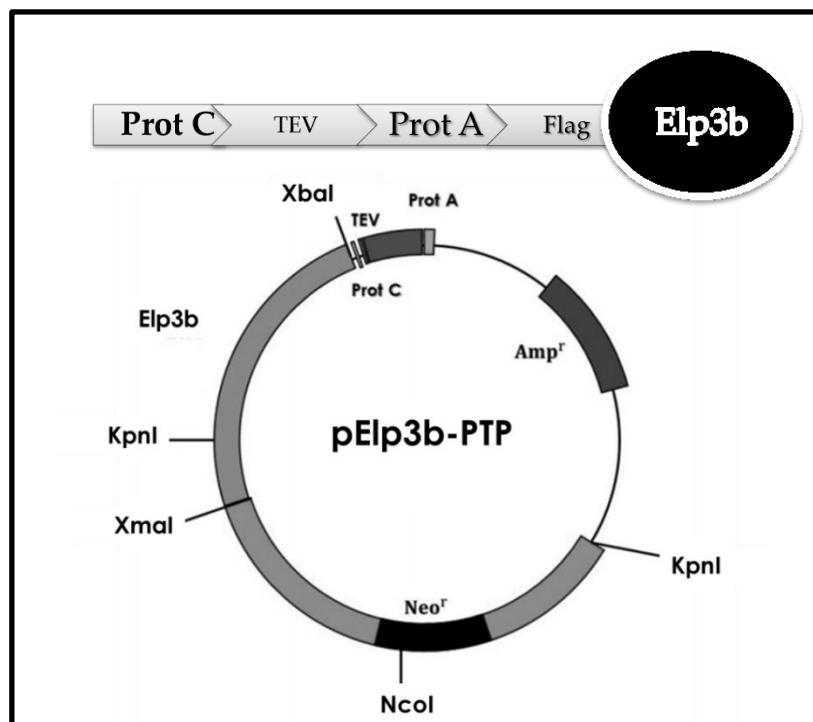
Fueron transfectados  $1 \times 10^8$  promastigotes de *L. major* por electroporación. Los parásitos fueron centrifugados por 12 min a 4,000 rpm a 4°C. La pastilla fue resuspendida en 10 mL de PBS-G (PBS con glucosa al 2 %). Posteriormente se centrifugó nuevamente y la pastilla fue resuspendida en 10 mL de buffer Cytomix (Hepes 25 mM, KCl 120 mM, CaCl<sub>2</sub> 0.15 mM, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 10 mM, EDTA 2 mM y NaCl<sub>2</sub> 5 mM); las células fueron centrifugadas y resuspendidas en 400 µL del mismo buffer. Las células se transfirieron a una celdilla de electroporación con *gap* de 4 mm (BTX) previamente enfriada con hielo. Posteriormente se agregaron de 5 a 10 µg de DNA a transfectar y se mezcló, manteniendo en hielo 10 min. Con ayuda del electroporador BTX, se dio un pulso eléctrico de 1600 V, 25 Ohms y 5 µF, y las celdillas fueron colocadas inmediatamente en hielo por 10 min. Los parásitos electroporados fueron transferidos a tubos cónicos de 50 mL con 10 mL de medio BM sin fármaco, dejándolas crecer a 27°C en agitación suave. Durante los dos días posteriores se adicionaron los fármacos correspondientes; el primer día se adicionó la mitad de concentración de los fármacos y para el segundo día se agregó el resto de los mismos, quedando a una concentración final de: 16 µg/mL de higromicina y/o 12.5 µM de puromicina. Cuando se trabajó con los cultivos que expresan la proteína recombinante Elp3-PTP, se agregó además 25 µg/mL de G418.

Los cultivos transfectados se mantuvieron bajo vigilancia en agitación suave en los tubos cónicos hasta observar crecimiento celular, para posteriormente transferirlos a cajas de cultivo. Se realizaron resiembras con medio con fármaco cada que fue necesario.

### **3.14. Ensayo tipo *Western-blot***

Con la finalidad de confirmar que la línea celular *L. major*/Elp3b-PTP expresa la proteína recombinante pElp3b-PTP (Figura 24), se llevó a cabo un ensayo de

*Western-blot.* Para ello, inicialmente se realizó una electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato sódico (SDS-PAGE); usando un sistema discontinuo, en el que se empleó un gel concentrador de poliacrilamida (BioRad) al 10% con Tris-HCl 1.9 M, SDS 0.5%, TEMED 0.25% y glicerol; y un gel separador de poliacrilamida al 3.9% con Tris-HCl 160.6 mM pH 6.8, SDS 0.12%, azul de bromofenol 0.55% y TEMED 0.06%. Se prepararon las muestras correspondientes a  $20 \times 10^6$  células, las cuales se centrifugaron a 5,000 rpm a 4°C, las pastillas fueron lavadas con PBS y finalmente resuspendidas en 20  $\mu$ L de PBS+buffer Laemmli 1x (Tris-HCl 83 mM pH 6.8; SDS 118 mM; azul de bromofenol 99.5  $\mu$ M; glicerol 33.3%). Además de las muestras, se cargó marcador de peso molecular (Broad Range Protein Molecular Weight Markers Promega). Para realizar el fraccionamiento de la muestra se utilizó buffer de corrida 1x (Tris base 24.76 mM; glicina 191.82 mM; SDS 3.54 mM); se empleó un voltaje de 80 V con 15 mA constantes durante 2 h.



**Fig. 24. Mapa del vector pElp3-PTP.** El gen Elp3b se encuentra fusionado a la bandera PTP (~95 kDa) formada por dos dominios de unicon IgG de la proteína A (Prot A) y un dominio de la proteína C (Prot C), separados por un sitio de corte de la proteasa TEV.

La transferencia de las proteínas fraccionadas mediante SDS-PAGE a la membrana de PVDF se realizó empleando buffer de transferencia 1× (Tris base 25 mM; glicina 191.8 mM; metanol 20%) con pH 8.3. Las condiciones para la transferencia fueron: 90 V y 500 mA, durante 2 h. La membrana fue previamente bloqueada con una solución de leche al 5% y PBS Tween 0.1%, durante toda la noche a 4°C. Posteriormente se realizó una dilución del anticuerpo 1:300 en una solución de leche al 0.1% y PBS-Tween 0.1% con el cual se incubó la membrana. Los anticuerpos usados fueron: Anti-Prot A, Anti-Prot C, PAP y FLAG (Sigma-Aldrich) que reconocen a la bandera PTP. Finalmente se empleó el sistema ECL™ Western Blotting Detection Reagents (GE Healthcare, Amersham) para el revelado.

## 4. Resultados

---

### 4.1. Análisis bioinformáticos

Los análisis bioinformáticos siguieron la lógica de la estructura de las proteínas. Primero se estudió la estructura primaria de Elp3b con el alineamiento de la secuencia de aminoácidos. Después se llevó a cabo la identificación de residuos y secuencias conservadas así como los residuos potencialmente fosforilables. Posteriormente se predijo la estructura secundaria y finalmente se modeló, por homología, la estructura terciaria o tridimensional de Elp3b.

### 4.2. Análisis de la secuencia de Elp3b de *L. major*

Con el fin de determinar si Elp3b de *L. major* posee los dominios característicos de Elp3 en otros organismos, se realizó un alineamiento multiespecie con las secuencias de aminoácidos de algunos ortólogos de organismos eucariontes (*H. sapiens*, *S. cerevisiae* y *Arabidopsis thaliana*) y un organismo procarionte (*Dehalococcoides mccartyi*) (Figura 25).

Las secuencias se obtuvieron de la base de datos NCBI y de TriTrypDB para ser alineadas con Clustal  $\Omega$ . En primera instancia observamos que el tamaño de Elp3 varía considerablemente entre las diferentes especies, presentándose en un rango de 459 aminoácidos (en *D. mccartyi*) a 704 residuos (en *L. major*) (Figura 25). Al obtenerse los porcentajes de identidad, se encontró que en general la secuencia de todos los ortólogos está medianamente conservada (Tabla 2). La secuencia más parecida a Elp3 de *L. major* resultó ser el ortólogo de *D. mccartyi* (38.1% de identidad). Resalta la alta conservación entre los ortólogos de *H. sapiens* y *S. cerevisiae* (73.9% de identidad).



**Fig. 25. Alineamiento multiespecie de Elp3b y sus ortólogos.** Comparación de la secuencia de Elp3b de *L. major* (LmElp3b) (LmjF.23.1350) con Elp3 de *H. sapiens* (HsElp3) (BAB14138), *S. cerevisiae* (ScElp3) (NP\_015239), *A. thaliana* (AtElp3) (CAI79647) y *D. mccartyi* (DmcElp3) (CAI82774). Se observan residuos altamente conservados sombreados de negro así como residuos semiconservados sombreados de gris. Se señaló el radical SAM (caja azul) y el dominio HAT acetiltransferasa (caja rosa).

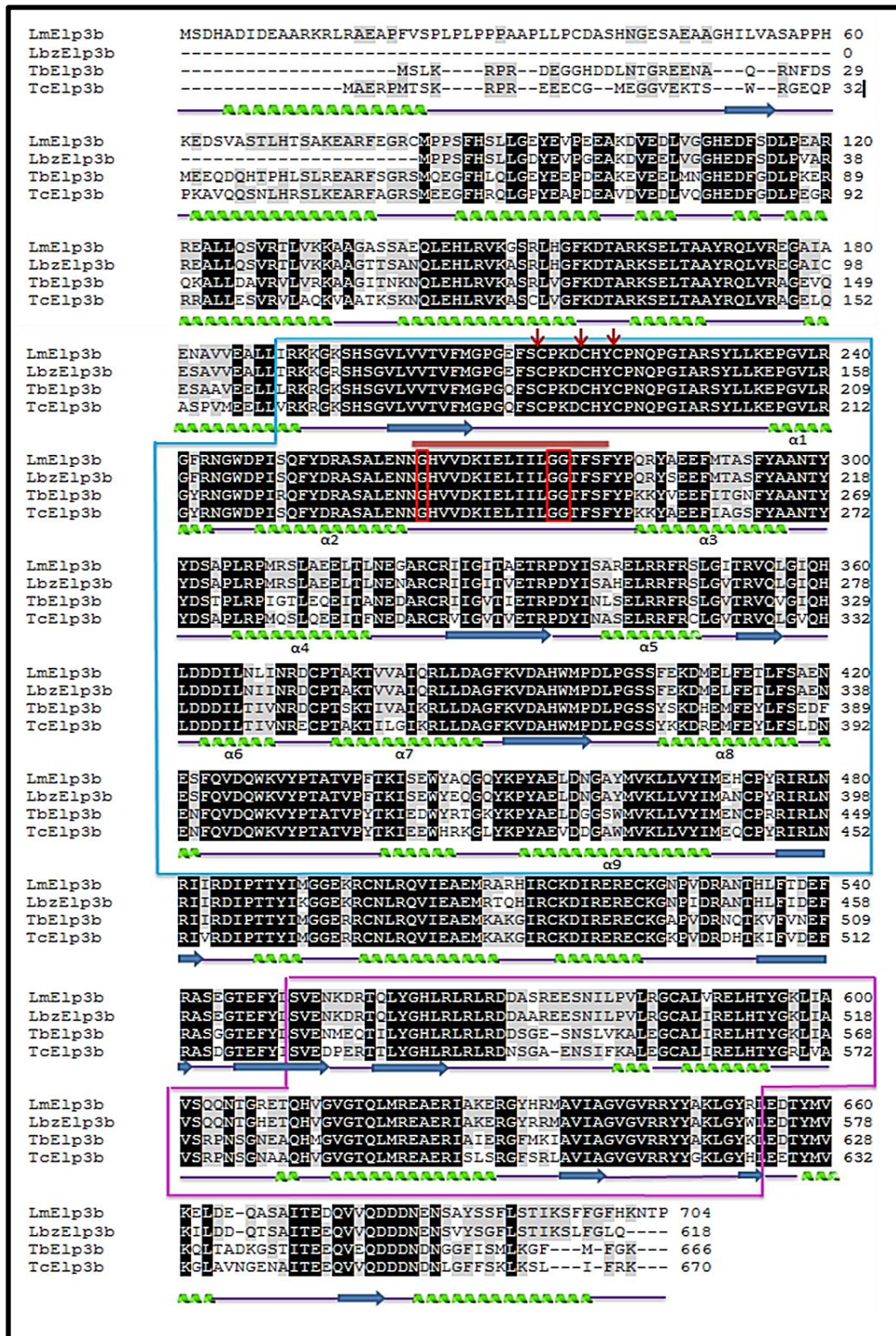
A pesar de que la secuencia de Elp3b de *L. major* no está altamente conservada, sí presenta los dos dominios característicos de todos los ortólogos de Elp3: el radical SAM (con su típico *cluster* de hierro-azufre, Fe-S) y el dominio de acetiltransferasa (HAT) (Figura 25). Estos dos dominios justamente corresponden a las dos regiones más conservadas de la proteína (Figura 25).

	<i>L. major</i> Elp3b	<i>D. mccartyi</i> Elp3	<i>S. cerevisiae</i> Elp3	<i>H. sapiens</i> Elp3	<i>A. Thaliana</i> Elp3
<i>L. major</i> Elp3b	100%	38.14%	33.02%	35.04%	33.52%
<i>D. mccartyi</i> Elp3	-	100%	41.05%	42.01%	42.01%
<i>S. cerevisiae</i> Elp3	-	-	100%	73.90%	68.60%
<i>H. sapiens</i> Elp3	-	-	-	100%	72.94%
<i>A. Thaliana</i> Elp3	-	-	-	-	100%

**Tabla 2. Porcentajes de identidad entre ortólogos de Elp3b.** Se resalta el porcentaje de identidad entre *L. major* y *D. mccartyi*.

Con el fin de determinar la presencia del gen Elp3b en otros tripanosomátidos, se llevaron a cabo búsquedas de tipo BLAST en las bases de datos de *L. braziliensis* y *T. cruzi*. Además, se analizó la secuencia de *T. brucei* (trytrip). Así se encontró que el gen de Elp3b se localiza en el cromosoma 23 en *L. braziliensis*, al igual que en *L. major*. La comparación de las secuencias reveló una muy alta conservación de Elp3b en tripanosomátidos (Figura 26 y Tabla 3). Como se esperaba, Elp3b de *L. major* es más parecido al ortólogo de *L. braziliensis* (93.5% de identidad) que a los ortólogos de *T. cruzi* y *T. brucei* (72.7 y 72.6%, respectivamente) (Tabla 3). Los dominios SAM y HAT son particularmente conservados entre Elp3b de los tripanosomátidos (Figura 26).





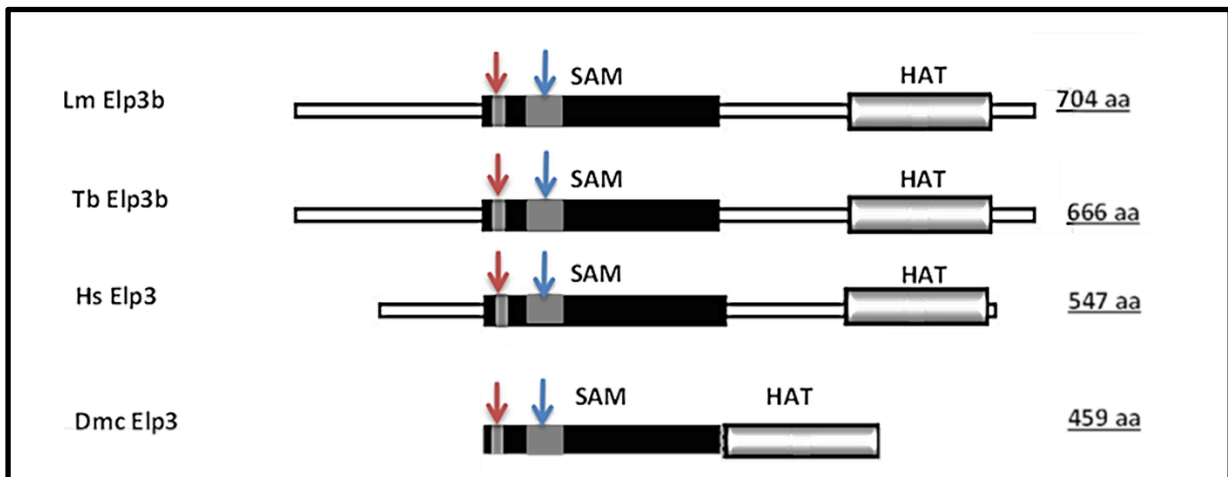
**Fig. 26. Alineamiento de la secuencia de aminoácidos de Elp3b en tripanosomátidos.** Se comparan las secuencias de *L. major* (Lm) (LmjF.23.1350), *L. braziliensis* (Lb) (LbrM.23.1470), *T. brucei* (Tb) (Tb927.8.3310) y *T. cruzi* (Tc) (Tc00.1047053509769.110). Se observan residuos altamente conservados sombreados de negro, así como residuos semiconservados sombreados de gris. Se señala el radical SAM (caja azul) y el dominio HAT (caja rosa): También se indica la estructura secundaria predicha para Elp3b de *L. major*. Las espirales indican  $\alpha$ -hélices (se marcan las 9  $\alpha$ -

hélices que son más evidentes en la estructura terciaria de Elp3b) y las flechas denotan  $\beta$ -plegadas. Las flechas rojas verticales señalan las cisteínas conservadas que conforman el cluster  $Fe_4S_4$  mientras que la barra roja horizontal señala el posible sitio de unión de S-adenosilmetionina, el cual se caracteriza por poseer regiones conservadas de glicinas.

	<i>L. major</i> Elp3b	<i>L. braziliensis</i> Elp3b	<i>T. brucei</i> Elp3b	<i>T. cruzi</i> Elp3b
<i>L. major</i> Elp3b	100%	93.53%	72.63%	72.75%
<i>L. braziliensis</i> Elp3b	-	100%	76.67%	76.02%
<i>T. brucei</i> Elp3b	-	-	100%	79.37
<i>T. cruzi</i> Elp3b	-	-	-	100%

**Tabla 3. Porcentajes de identidad entre ortólogos de Elp3b en tripanosomátidos.**

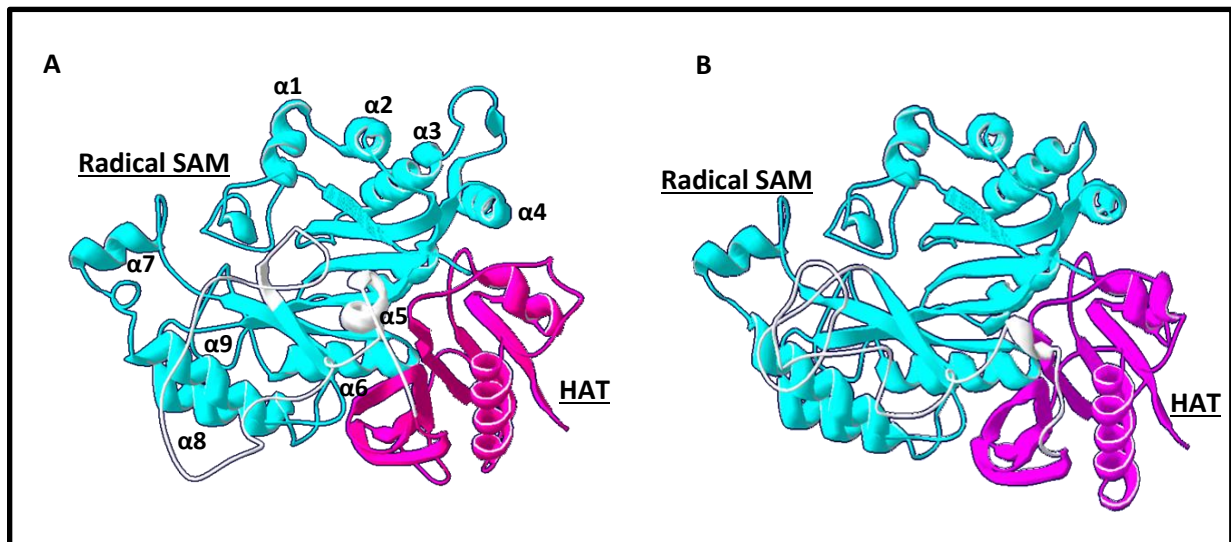
En resumen, Elp3b de *L. major* presenta las características distintivas de los ortólogos de Elp3: el dominio radical SAM en el extremo amino, y el dominio HAT en el extremo carboxilo (Figura 27).



**Fig. 27. Esquemización de los dominios conservados en Elp3.** Se muestra al radical SAM con su característico cluster de  $Fe_4S_4$  (flecha roja) y el posible sitio de unión a S-adenosilmetionina (flecha azul), así como el dominio HAT en *L. major* (Lm), *T. brucei* (Tb), *H. sapiens* (Hs) y *D. mccartyi* (Dmc). Se indica el respectivo tamaño de cada proteína.

### 4.3. Predicción de la estructura secundaria y tridimensional de Elp3b

La estructura secundaria predicha de Elp3b de *L. major* fue generada con el programa bioinformático Phyre<sup>2</sup> (Figura 25). En el dominio radical SAM se presentaron 9  $\alpha$ -hélices y 4  $\beta$ -plegadas, lo cual concide con reportes que indican que este dominio se caracteriza por la presencia de múltiples  $\alpha$ -hélices y  $\beta$ -plegadas (Frey *et al.*, 2008). Por otro lado el dominio HAT presentó 2  $\alpha$ -hélices, lo cual coincide con lo reportado para otros dominios HAT (Clements *et al.*, 1999). Asimismo, para obtener la probable estructura tridimensional de los dominios SAM y HAT de Elp3b de *L. major* se usó el programa Swiss-model, empleando como templado el cristal de Elp3 de *D. maccartyi* (Glatt *et al.*, 2016).



**Fig. 28. Modelado tridimensional de Elp3b de *L. major* por homología con *D. maccartyi*.** (A) Se muestra el modelo generado de Elp3b de *L. major* y se enumeran las  $\alpha$ -hélices más evidentes que constituyen al radical SAM (B) se muestra el modelo de Elp3 de *D. maccartyi*. En ambos modelos se reconoce al radical SAM (azul) y al dominio HAT (rosa).

El modelo obtenido muestra una estructura globular formada por dos regiones que justamente corresponden a los dominios SAM y HAT (Figura 29). En el dominio SAM se aprecia que las 9  $\alpha$ -hélices se distribuyen principalmente hacia la parte externa de la estructura globular, mientras que las hojas  $\beta$  se localizan hacia el centro de la estructura (Figura 28A). A manera de control se generó el modelo de

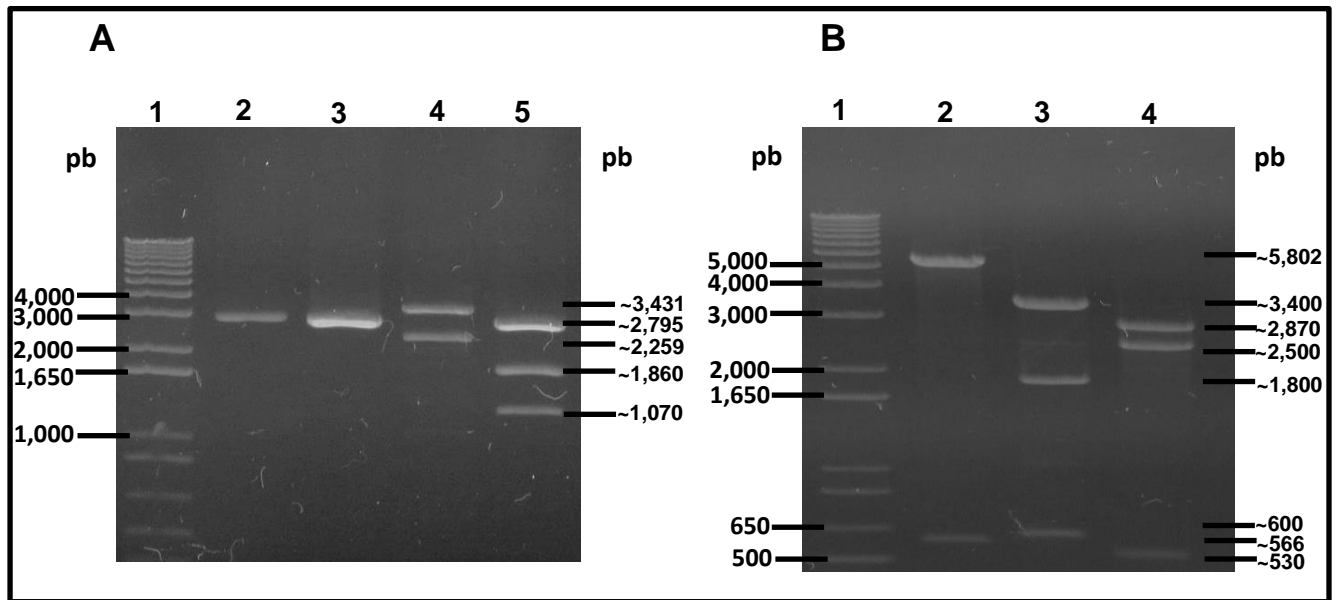
Elp3 de *D. mccartyi* (Figura 28B). Cuando se comparó la estructura de ambos modelos se encontró una arquitectura y disposición muy similar.

#### 4.4. Análisis de los vectores *knock-out*

En nuestro laboratorio, intentos previos de obtener líneas celulares de *L. major* en las que se eliminaran ambas copias alélicas del gen Elp3b resultaron fallidos (datos no publicados). En el presente trabajo se continuó con el estudio de Elp3b en *L. major*, intentando nuevamente eliminar las dos copias alélicas de Elp3b para estudiar la función que realiza esta proteína en el parásito. Para ello, como primer paso se procedió a verificar la integridad de los vectores pΔElp3b-Hyg y pΔElp3b-Pac (Figura 23), previamente generados en el laboratorio, mediante el análisis con enzimas de restricción. El vector pΔElp3b-Hyg contiene el *cassette* de *hyg* (gen de resistencia a higromicina flanqueado por las regiones 5' y 3'-UTR de Elp3b) y fue diseñado para reemplazar una copia de Elp3b por el gen de resistencia a higromicina. Por su parte, el vector pΔElp3b-Pac contiene el *cassette* de Pac (gen de resistencia a puromicina flanqueado por las regiones 5' y 3'-UTR de Elp3b) y fue construido para reemplazar una copia de Elp3b por el gen de resistencia a puromicina.

Al digerir pΔElp3b-Pac con las enzimas *Xba*I y *Xho*I se esperaban dos bandas de ~2.79 y ~2.89 kb. En el gel se observó sólo una banda debido a que el tamaño de ambos fragmentos generados es muy similar (Figura 29A, carriles 2 y 3). La digestión de este vector con *Xba*I y *Sac*I produjo las dos bandas esperadas de ~2.25 y ~3.43 kb (carril 4), mientras que al digerir con *Xba*I, *Xho*I y *Sca*I se obtuvieron los fragmentos esperados de ~2.79, ~1.86 y ~1.07 Kb (carril 5). Al digerir el vector pΔElp3b-Hyg (Figura 29B) con las enzimas *Xba*I y *Spe*I se observaron las dos bandas esperadas de ~0.56 y ~5.28 kb (carril 2). Por otro lado al digerir con las enzimas *Spe*I y *Sac*I se observaron las 3 bandas esperadas de ~3.4, ~1.80 y ~0.6 kb (carril 3), mientras que al digerir con *Sac*I y *Xho*I se confirmaron las bandas esperadas de ~2.8, ~2.5 y ~0.53 kb (carril 4).

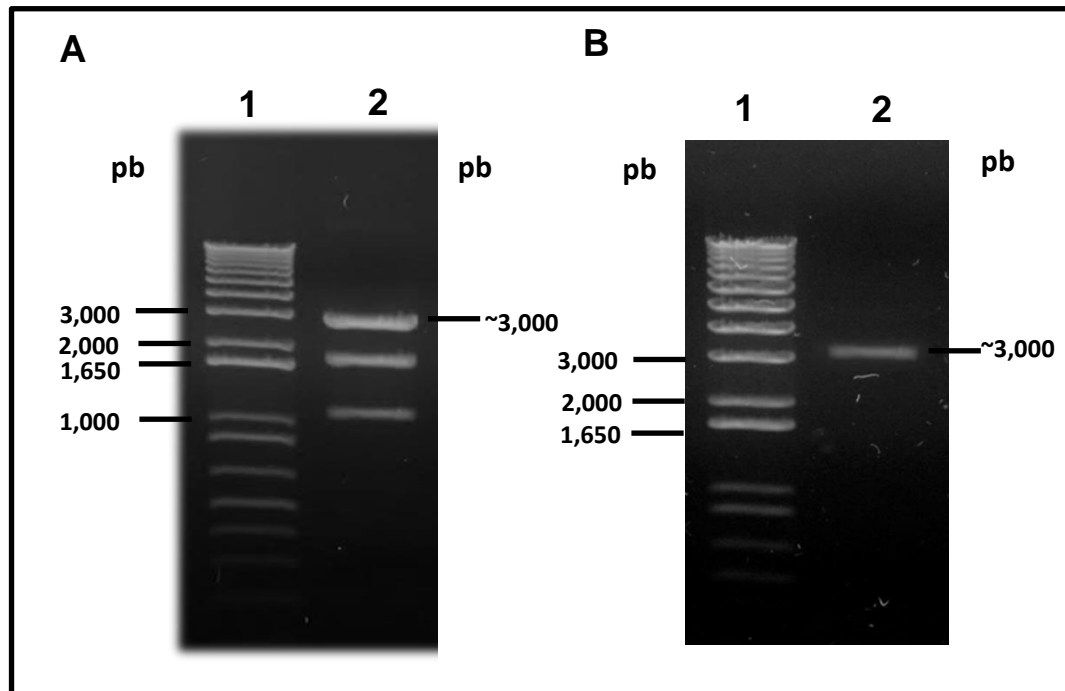
En resumen, el análisis de restricción de los dos vectores mostró los fragmentos esperados. De manera adicional, los dos vectores fueron enviados a secuenciar. El análisis de la secuencia obtenida confirmó la integridad de los dos plásmidos. De esta manera, una vez verificado el buen estado de pΔEIp3b-Hyg y pΔEIp3b-Pac se continuó con la generación de los cultivos *knock-out*.



**Fig. 29. Ensayos de restricción de los vectores y pΔEIp3b-Pac (A) y pΔEIp3b-Hyg (B).** (A) en los carriles 2 y 3 se digirieron 100 y 200 ng de vector, respectivamente, con las enzimas *XbaI* y *XhoI*. Se observó sólo una banda debido a que el tamaño de ambos fragmentos generados es muy similar. En el carril 4 se digirió con *XbaI* y *ScaI* y en el carril 5 con *XbaI*, *XhoI* y *ScaI*. (B) en el carril 2 se digirió con *XbaI* y *SpeI*, en el carril 3 con *SpeI* y *SacI*, y en el carril 4 con *SacI* y *XhoI*. En ambos paneles se muestran las bandas correspondientes a los tamaños esperados. El marcador de peso molecular (escalera de 1kb plus de Invitrogen™) se muestra en los carriles 1 de los dos paneles. Geles de agarosa 0.8%. Pb: pares de bases.

#### 4.5. Obtención y caracterización de cultivos *knock-out* sencillo de Elp3b con el gen de resistencia a higromicina

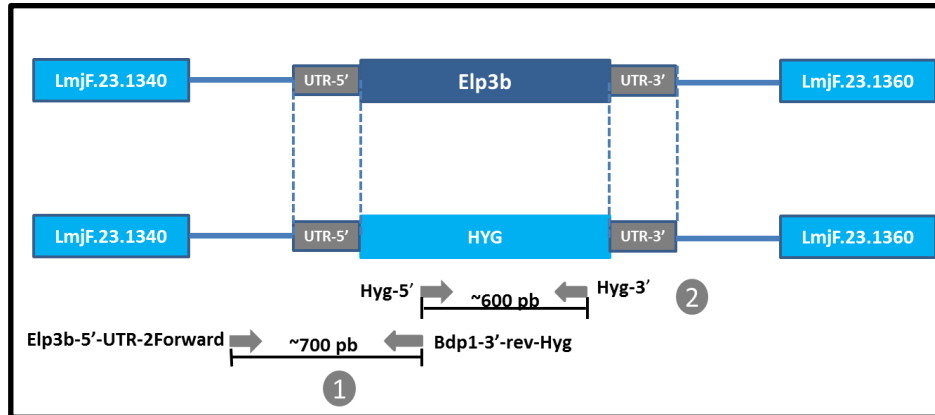
En primera instancia, se procedió a la obtención del *knock-out* sencillo de Elp3b con el vector pΔElp3b-Hyg. Para ello, el vector fue digerido con *Xba*I, *Xho*I y *Xmn*I (Figura 30A), y el *cassette* de *hyg* (fragmento de ~3 kb) fue purificado (Figura 30B). Aproximadamente 10 µg de dicho *cassette* fueron empleados para transfectar promastigotes de *L. major*, los cuales fueron seleccionados en presencia de higromicina.



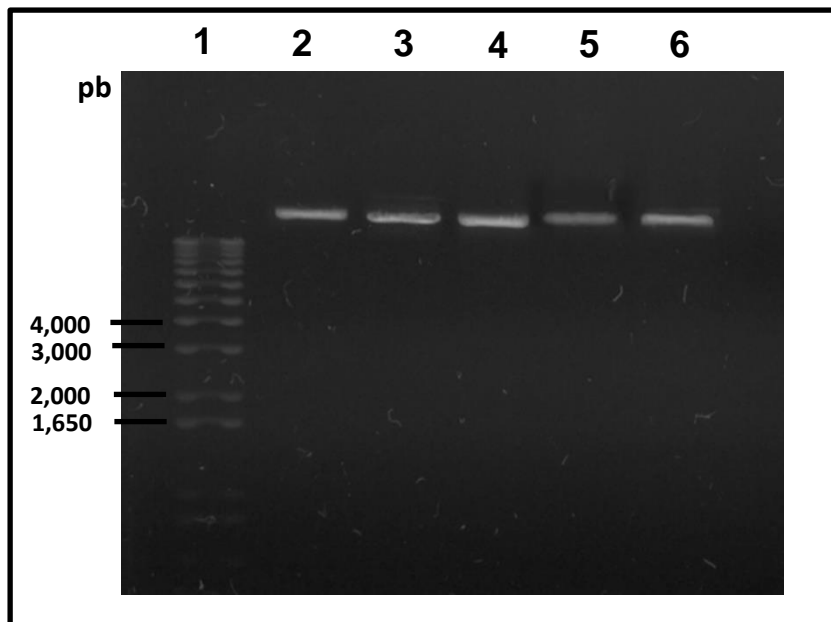
**Fig. 30. A) Digestión del vector pΔElp3b-Hyg** con las enzimas *Xba*I, *Xho*I y *Xmn*I para liberar el inserto del vector de clonación (carril 2). Se señala el *cassette* con el peso esperado de ~3,000 pb. **B) Purificación del *cassette* de higromicina.** El inserto de 3 kb fue purificado (carril 2). El Marcador de peso molecular (escalera de 1kb plus de Invitrogen™) se muestra en los carriles 1 de los dos páneces. Geles de agarosa 0.8%. Pb: pares de bases

Alrededor de dos semanas después de la electroporación se obtuvo una población transfectada estable, la cual se mantuvo con una concentración de 32 µg/mL de

higromicina. A partir de dicha población se obtuvieron cinco clones celulares mediante plaqueo en cajas de medio de cultivo. Tanto la población como las clones fueron analizadas por medio de PCR con el fin de corroborar que una de las copias de Elp3b hubiese sido substituida por el gen *hyg* en el locus de Elp3b (Figura 31). Para ello fue necesario primero purificar DNA genómico de los cultivos (Figura 32).

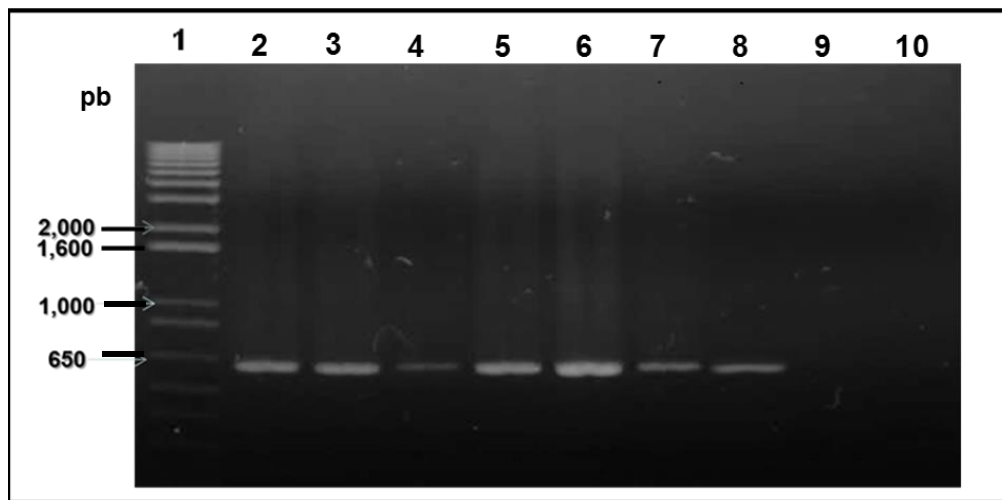


**Fig. 31. Representación esquemática de la substitución de Elp3b por el gen de *hyg*.** Se indica la posición de los oligonucleótidos empleados para amplificar parte del gen de *hyg* (2) y un fragmento que incluye la región 3'-UTR y parte del gen *hyg* (1). Se indica el tamaño esperado.



**Fig. 32. Extracción de DNA genómico de los cultivos *knock-out* sencillo de Elp3b.** Se muestra el marcador en el carril 1 (escala 1 Kb plus de Invitrogen™) y el DNA genómico de las cinco clones (carriles 2-6) en un gel de agarosa al 1%.

Las reacciones de PCR se llevaron a cabo con los oligonucleótidos Hyg-5' y Hyg-3', que amplificarían un fragmento de ~600 pb que corresponde a una parte del gen de higromicina (Figura 31). El análisis en gel de agarosa de los productos de PCR de las 5 clonas *knock-out*, así como el de la población y el plásmido pΔElp3-Hyg que fueron utilizados como controles positivos, mostró la banda esperada de ~600 pb (Figura 33, carriles 2-8).

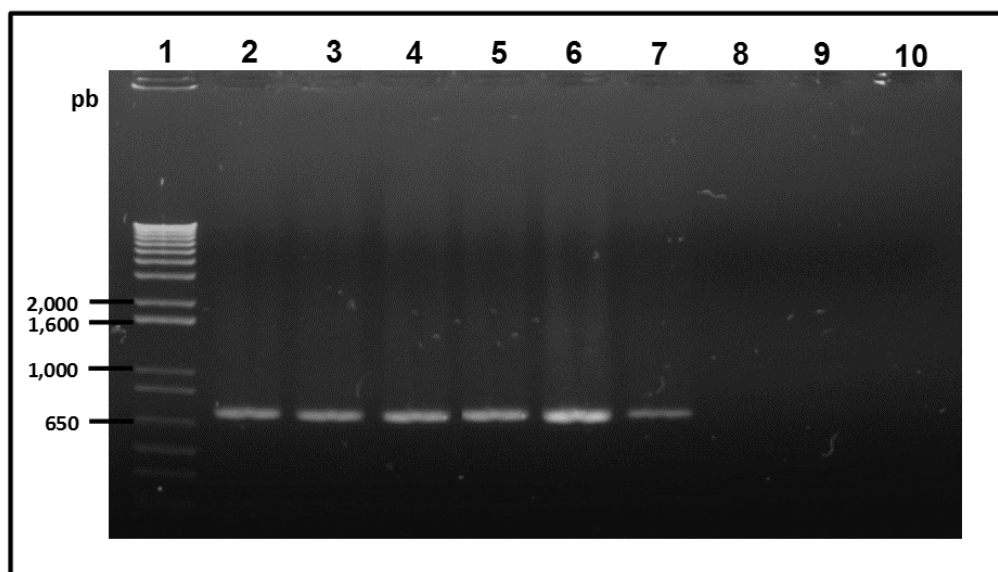


**Fig. 33. Amplificación por PCR del gen de *hyg* a partir de DNA genómico de la población (carril 7) y las cinco clonas de *knock-out* sencillo Elp3b (carriles 2-6).** Como controles se usó el plásmido pΔElp3-Hyg (carril 8), DNA de células silvestres de *L. major* (carril 9) y agua (carril 10). Los oligonucleótidos empleados son Hyg-5' y Hyg-3'. El marcador corresponde a la escalera 1 kb plus Invitrogen™. Gel de agarosa al 0.8%.

Como se esperaba, no se observó producto al analizar células de *L. major* silvestres (carril 9) y en ausencia de DNA molde (carril 10). Para confirmar que el gen de *hyg* estuviera integrado en el locus de Elp3b, se realizó un análisis por PCR con los oligonucleótidos Bdp1-3'-rev-Hyg y Elp3b-5'-UTR-2F, que amplificarían un producto de ~700 pb. En este caso el oligonucleótido sentido se une a una región localizada río arriba de la región 5'-UTR presente en el *cassette* de *Hyg* (Figura 31). El análisis de los productos de PCR reveló la presencia de la banda esperada de ~700 pb en la población y las cinco clonas *knock-out* (Figura 34, carriles 1-7). Como se esperaba, no se observó producto con el vector pΔElp3-



Hyg (carril 8), al analizar células de *L. major* silvestres (carril 9) y en ausencia de DNA molde (carril 10). Así, estos resultados indicaron que en los cultivos *knock-out* una copia alélica de Elp3b fue substituida por el gen de resistencia a higromicina de manera exitosa. A este cultivo *knock-out* se le denominó Lm $\Delta$ Elp3b/Hyg.



**Fig. 34.** Amplificación por PCR de la región UTR-5' de Elp3b a partir de DNA genómico de la población (carril 6) y las cinco clonas de *knock-out* sencillo Elp3b (carriles 2-6). Como controles se usó el plásmido p $\Delta$ Elp3-Hyg (carril 8), DNA de células silvestres de *L. major* (carril 9) y agua (carril 10). El marcador corresponde a la escalera 1 kb plus de Invitrogen™. Gel de agarosa al 0.8%.

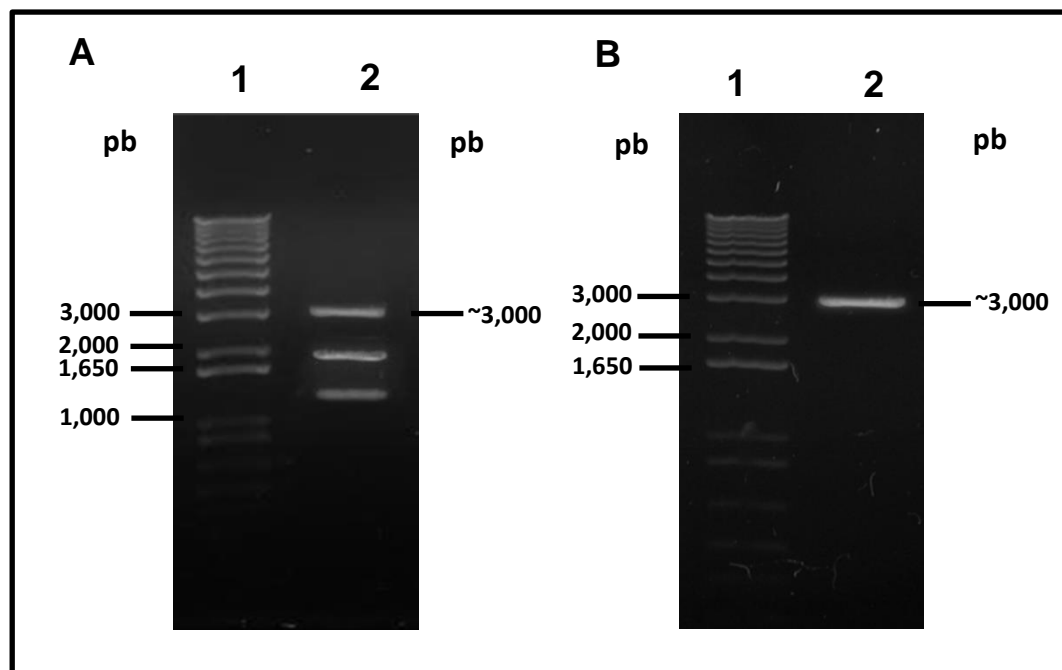
#### 4.5.1. Intentos de obtención de cultivos *knock-out* doble de Elp3b con el gen de resistencia a puromicina.

Una vez comprobada la substitución de una copia de Elp3b por el gen de higromicina, la clona 5 del cultivo Lm $\Delta$ Elp3b/Hyg fue seleccionada para intentar el reemplazo de la segunda copia alélica de Elp3b por el gen de resistencia a puromicina. Para ello, el plásmido p $\Delta$ Elp3b-Pac fue digerido con *Xba*I, *Xho*I y *Sca*I (Figura 35A), y el *cassette* de *pac* fue purificado (Figura 35B). La transfección de la clona *knock-out* sencillo con 5  $\mu$ g del *cassette* de puromicina generó células no viables, las cuales murieron al poco tiempo de adicionar la puromicina a la concentración final (45  $\mu$ M).

Se repitió la transfección, pero esta vez empleando 10 µg del *cassette pac*. Sin embargo, como en el caso anterior, no fue posible seleccionar células en presencia de la droga. Por esta razón se decidió comenzar nuevamente haciendo un *knock-out* sencillo de *Elp3b*, pero en esta ocasión transfectando primero con el *cassette pac*.

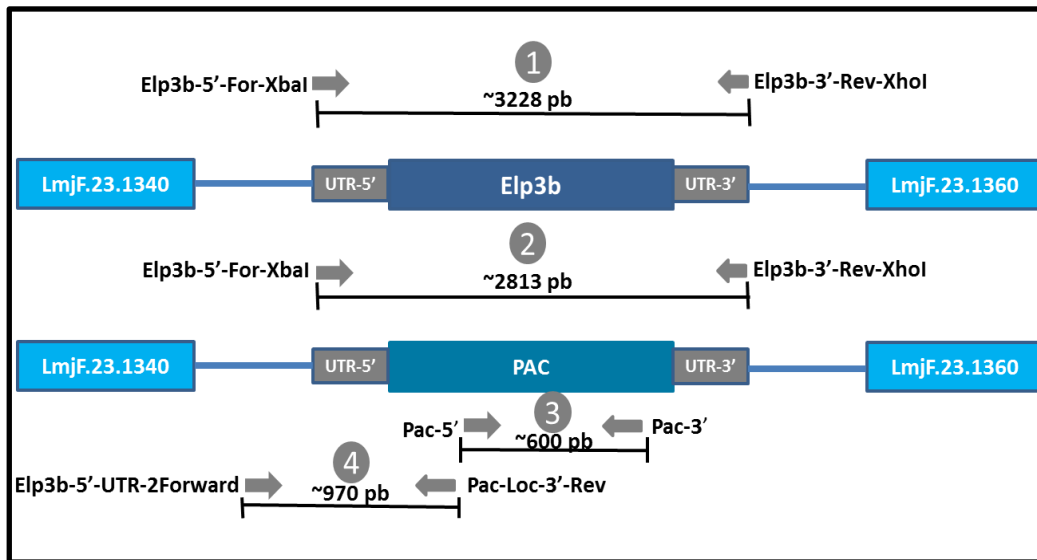
#### 4.6. Obtención y caracterización de cultivos *knock-out* sencillo de *Elp3b* con el gen de resistencia a puromicina

Para obtener el *knock-out* sencillo de *Elp3b*, pΔ*Elp3b*-Pac fue digerido con *Xba*I, *Xho*I y *Sca*I, y el *cassette* de *pac* fue purificado (Figura 35). Aproximadamente 10 µg de dicho *cassette* fueron empleados para transfectar promastigotes de *L. major*, los cuales fueron seleccionados en presencia de puromicina.



**Fig. 35. A) Digestión del vector pΔ*Elp3b*-Pac** con las enzimas *Xba*I, *Xho*I y *Sca*I para liberar el inserto del vector de clonación (carril 2). Se señala el *cassette* con el peso esperado de ~3,000 pb. **B) Purificación del *cassette* de puromicina.** El inserto de 3 kb fue purificado (carril 2). El marcador de peso molecular (escala de 1 kb plus de Invitrogen™) se muestra en los carriles 1 de los dos paneles. Geles de agarosa 0.8%. Pb: pares de bases.

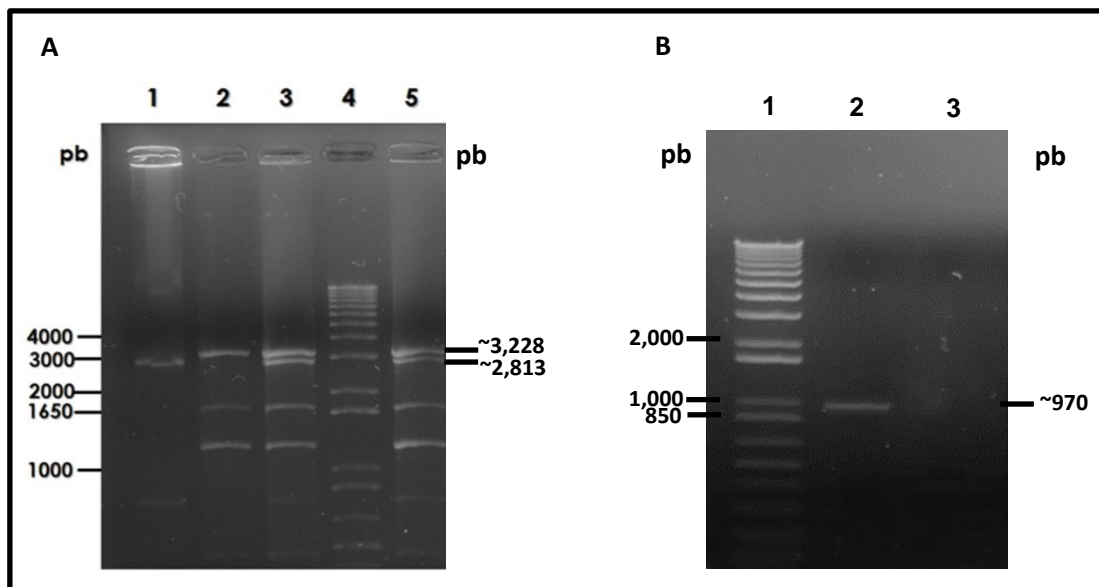
Alrededor de dos semanas después de la electroporación se obtuvo una población transfectada establemente, la cual se mantuvo con una concentración de 45  $\mu$ M de puromicina. A partir de dicha población se obtuvieron seis clonas celulares mediante plaqueo en cajas de medio de cultivo. La población y las clonas fueron analizadas por medio de PCR con el fin de corroborar que una de las copias de Elp3b hubiese sido substituida por el gen *pac* en el locus de Elp3b.



**Fig. 36. Representación esquemática de la sustitución del gen endógeno Elp3b por el gen de puromicina y las regiones a amplificar.** 1) Representa la región a amplificar que corresponde al gen Elp3b y las regiones UTR-3' y UTR-5'. 2) Corresponde al amplificado del gen de puromicina y las regiones UTR. 3) Corresponde a parte del gen de puromicina. 4) Se muestra el amplificado que incluye la región 3'-UTR y parte del gen *pac* (1). Se indican los tamaños esperados.

El DNA genómico fue aislado de la población y de las clonas con el fin de analizar la presencia del gen de resistencia a puromicina (Figura 36). El análisis en gel de agarosa de los productos de PCR con los oligonucleótidos Elp3-5'-For-XbaI y Elp3-3'-Rev-XhoI (Figura 37A), mostró las bandas esperadas de ~2.8 kb y ~3.2 kb con el DNA genómico de los cultivos *knock-out* (carriles 3 y 5). Con los controles también se obtuvieron los resultados esperados: Con el DNA de plásmido se observó la banda de ~2.8 kb (carril 1), y con el DNA genómico de células silvestres se obtuvo la banda de ~3.2 kb (carril 2). Por otro lado se verificó la presencia del

gen de puromicina en el locus de Elp3b utilizando los oligonucleótidos Pac-Loc-3'-Rev y Elp3b-5'-UTR-2F (Figura 36), obteniendo la banda esperada de ~970 pb con la clona del knock-out sencillo (Figura 37B, carril 2). Así, estos resultados indicaron que en los cultivos *knock-out* una copia alélica de Elp3b fue substituida por el gen de resistencia a puromicina de manera exitosa en el locus de Elp3b.



**Fig. 37. Análisis por PCR del *knock-out* sencillo de Elp3.** (A) Se usaron los oligonucleótidos Elp3-5'-For-*Xba*I y Elp3-3'-Rev-*Xho*I. Como templado se usó: DNA del plásmido pΔElp3-Pac (1), DNA genómico de células silvestres (2), DNA genómico de la población del *knock-out* sencillo (3), y DNA genómico de la clona del *knock-out* sencillo de Elp3 (4-9). (B) Se usaron los oligonucleótidos Pac-Loc-3'-Rev y Elp3b-5'-UTR-2F. Se muestra un amplificado que corresponde a parte del gen de puromicina y una región río abajo de la región UTR-5' de la clona (carril 2) y como control negativo el plásmido pΔElp3-Pac (carril 3). Los carriles 4(A) y 1(B) muestran el marcador de peso molecular (escalera de 1kb de Invitrogen™). Geles de agarosa al 1%.

#### 4.6.1. Intentos de obtención de cultivos *knock-out* doble de Elp3b con el gen de resistencia a higromicina.

Una vez comprobada la substitución de una copia de Elp3b por el gen de puromicina, la clona 1 del *knock-out* sencillo fue seleccionada para intentar obtener el reemplazo de la otra copia de Elp3b por el gen de higromicina. Entonces se realizó por duplicado la transfección con 5 µg del *cassette* de hyg. Sin

embargo, los cultivos electroporados murieron al poco tiempo de adicionar la concentración final de higromicina (32 µg/mL).

#### **4.7. Adición de una copia episomal de Elp3b con una bandera PTP**

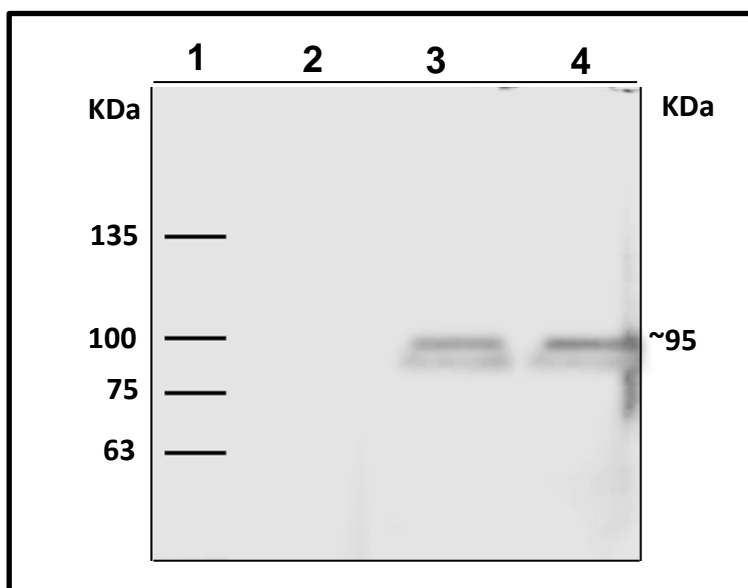
Los resultados mostrados anteriormente sugirieron que Elp3b es un gen esencial para el crecimiento de *L. major*. Con la finalidad de continuar estudiando la importancia de Elp3b en la viabilidad celular, se decidió que la clona 5 del cultivo *knock-out* sencillo obtenido con el *cassette* de *hyg* sería transfectada con el vector pElp3b-PTP, para generar una línea celular que expresara la proteína recombinante Elp3b-PTP a partir de episomas. Posterior a esto se realizaría el segundo *knock-out*, esperando que al haber copias episomales de Elp3b, esta vez sí fuera posible eliminar la segunda copia alélica de Elp3b.

Para esto, promastigotes de la cepa LmjFΔElp3-Hyg (*knock-out* sencillo en el que una copia de Elp3b fue reemplazada por el gen de Hyg) fueron transfectados con 25 µg del vector pElp3b-PTP (Figura 24), generado previamente en el laboratorio. Este vector contiene el gen Elp3b fusionado a una bandera PTP, y secuencias UTR-5' y -3' diferente a las del gen endógeno de Elp3b. Así, ninguno de los *cassettes* de las drogas de resistencia sería capaz de recombinar con estas copias episomales de Elp3b.

Alrededor de dos semanas después de la electroporación se obtuvo una población estable, la cual se mantuvo a una concentración de 32 µg/mL de higromicina y 50 µg/mL de G418.

Posteriormente se seleccionó una clona, la cual junto con la población fueron analizadas por medio de ensayos de *Western-blot* con el fin de corroborar la presencia de la proteína recombinante Elp3b-PTP, usando un anticuerpo que reconoce la bandera PTP (Anti-FLAG). Tanto la población como la clona #5 mostraron la banda esperada de ~95 kDa que corresponde a la proteína Elp3b

fusionada a la bandera PTP (Figura 38, carriles 3 y 4). Como se anticipaba, con las células de *L. major* silvestres no se observó ninguna banda (carril 2).



**Fig. 38. Análisis tipo *Western-blot* de la población y la clona 5 de *L. major* con el *knock-out* sencillo de Elp3b transfectadas con el vector pElp3-PTP.** Se analizaron  $30 \times 10^6$  células de la población (carril 3), y de la clona #5 (carril 4), donde se observa una banda de ~95 kDa que corresponde a Elp3b-PTP. También se analizaron células silvestres (carril 2) como control negativo. Las muestras se fraccionaron en un gel de poliacrilamida al 10%, se transfirieron a una membrana de PVDF y se trataron con el anticuerpo Anti-FLAG. kDa: Kilo Daltones

Una vez corroborada la correcta expresión de la proteína recombinante Elp3b-PTP en las células *knock-out* sencillo de Elp3b se prosiguió a trabajar con la clona #5 para eliminar la segunda copia alélica de Elp3b.

#### 4.8. Eliminación de la segunda copia alélica de Elp3b

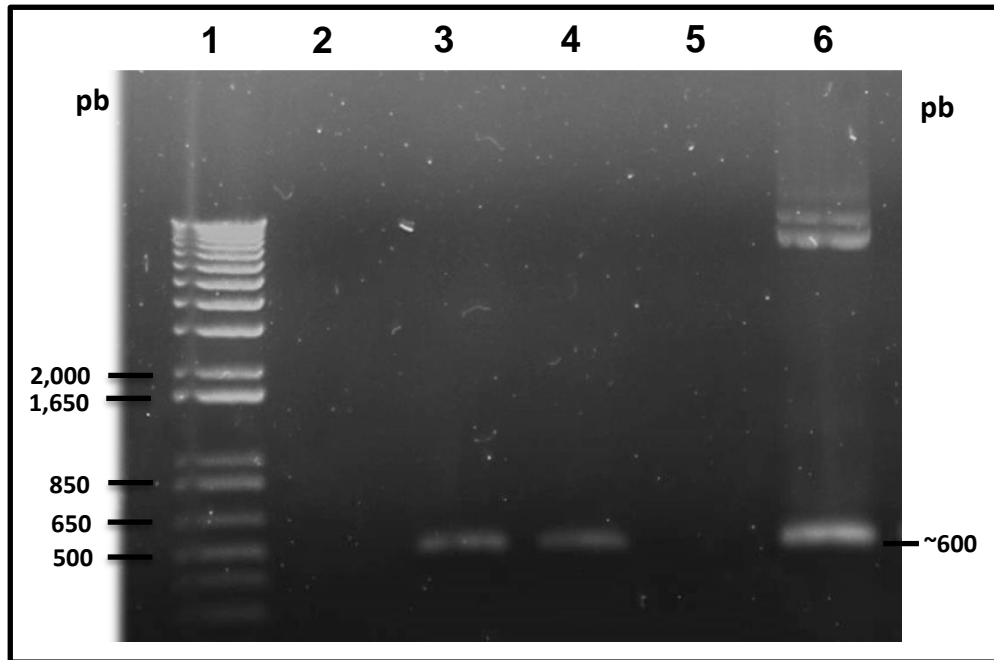
Para deletar la segunda copia alélica de Elp3b, pΔElp3b-Pac fue digerido con *Xba*I, *Xho*I y *Scal*I, y el *cassette* de *pac* fue purificado, de manera similar a lo mostrado en la Figura 31. Se hicieron tres repeticiones con diferentes

concentraciones de *cassette* (2.5, 5 y 10 µg) para transfectar promastigotes de *L. major*, los cuales fueron seleccionados en presencia de puromicina.

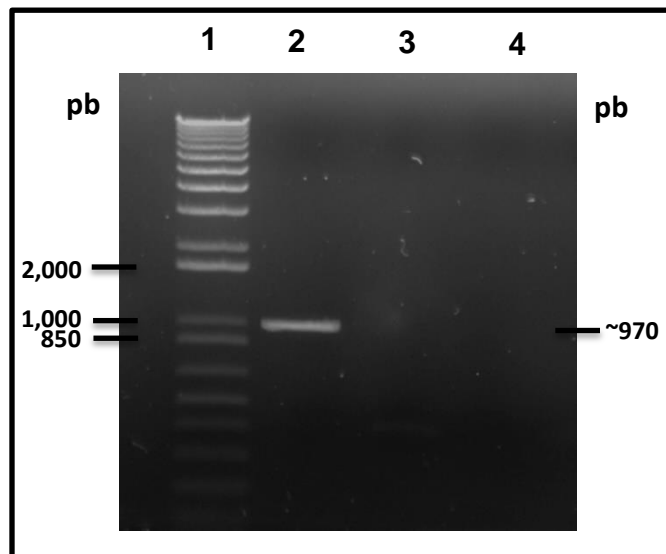
Alrededor de 13 días después de la transfección se obtuvo una población estable la cual correspondía al cultivo que se transfectó con 10 µg de *cassette* de puromicina. A este cultivo se le llamó Lm/ΔHyg+Elp3b/PTP+rPac, y se mantuvo con una concentración de 32 µg/mL de higromicina, y 50 µg/mL de G418 y 45 µM de puromicina.

Se procedió entonces a analizar el cultivo Lm/ΔHyg+Elp3b/PTP+rPac por ensayos de PCR, para verificar la presencia del *pac* y su correcta inserción en el locus de Elp3b (Figura 36).

Utilizando los oligonucleótidos Pac-3'- y Pac- 5' (Figura 36), que amplifican una parte del gen de resistencia a puromicina, se obtuvo la banda esperada de ~600 pb en la población Lm/ΔHyg+Elp3b/PTP+rPac (Figura 39, carril 4), en el plásmido pΔElp3b-Pac (que se utilizó como control positivo) (carril 6), así como en el DNA genómico de la línea celular *knock-out* sencillo (carril 3). Por otro lado, no se observó producto en los controles negativos, que fueron agua (carril 5) y células silvestres (carril 2). Con esto se confirmó la presencia del gen de Pac en el cultivo Lm/ΔHyg+Elp3b/PTP+rPac. Para el segundo análisis de PCR se intentó amplificar la región río arriba del *cassette pac* y parte del gen *pac* con los oligonucleótidos Pac-Loc-3'-Rev y Elp3b-5'-UTR-2F (Figura 36) para verificar el correcto posicionamiento del gen *pac* en el locus de Elp3b. Los resultados revelaron que el gen de *pac* en la población Lm/ΔHyg+Elp3b/PTP+rPac no se integró en el locus de Elp3b, pues no se observó el producto esperado (Figura 40, carril 3). Dicho producto de ~970 pb sí se observó en el control positivo, que correspondió a DNA proveniente del cultivo LmΔElp3b/Pac *knock-out* sencillo previamente obtenido, en el que una copia endógena de Elp3b fue substituida por el gen de *pac* (Figura 40, carril 2).



**Fig. 39. Amplificación por PCR del gen de *pac* con los oligonucleótidos Pac-3' y Pac-5'.** Como molde se usó DNA genómico de la población LmΔElp3/Hyg+Elp3b-PTP+rPac (carril 4). Como controles positivos se usaron el plásmido pΔElp3-Pac (carril 6), DNA de la línea LmΔElp3b/-Pac (carril 3). Los controles negativos fueron DNA de células silvestres de *L. major* (carril 2) y agua (carril 5). El marcador corresponde a la escalera 1kb plus de Invitrogen™ (carril 1). Gel de agarosa al 0.8%.



**Fig. 40. Amplificación por PCR del gen de *pac* con los oligonucleótidos Pac-Loc-3'-Rev y Elp3b-5'-UTR-2F.** Se utilizó DNA genómico de la línea celular LmΔElp3/Hyg+Elp3b-PTP+rPac (carril 2), como control positivo se utilizó DNA genómico de la línea celular LmΔElp3b/Pac generada anteriormente (carril 1) y como controles negativos el plásmido pΔElp3b-Pac (carril 3) y agua (carril 4). El marcador corresponde a la escalera 1kb plus de Invitrogen™ (carril 1). Gel de agarosa al 0.8%.



## 5. Discusión

---

Los ortólogos de Elp3b están ampliamente distribuidos en procariontes, arqueas, levaduras, y mamíferos. Dichos ortólogos se encuentran como una subunidad del complejo Elongador (Nevan *et al.*, 2001). Esta subunidad es el núcleo catalítico del complejo Elongador y tiene la principal función de regular el proceso de elongación de la transcripción. Todos los ortólogos presentan dominios bien conservados que están altamente relacionados con su función, así como con la interacción con otras proteínas. Estos dominios corresponden a la secuencia HAT que pertenece a la familia de las GNAT acetiltransferasas, y al radical SAM, el cual presenta un *cluster* de Fe<sub>4</sub>S<sub>4</sub> que se une a una secuencia CXXXCXXC bien definida, y un sitio de unión a S-adenosilmetionina (Paraskevopoulou *et al.*, 2006). La primera observación obtenida al realizar los alineamientos es que existe una considerable divergencia asociada con el número de residuos de Elp3, siendo Elp3b de *L. major* considerablemente más grande que los otros ortólogos, ya sea de bacterias, protozoos o vertebrados (Figuras 25 y 26). Al comparar la secuencia de aminoácidos entre Elp3b de *L. major* y sus ortólogos, se encontró que el mayor porcentaje de identidad corresponde a *L. braziliensis* (93.5%), como era de esperarse. Otras especies no tan cercanas filogenéticamente, como *A. thaliana* y *S. cerevisiae*, exhibieron el porcentaje de identidad más bajo (33%). Cabe resaltar que hay más residuos conservados en las regiones que corresponden a los dominios SAM y HAT que en el resto de la secuencia, lo que indica que estos dominios son esenciales para la función de esta proteína. En particular para el radical SAM se identificó la secuencia que coordina el *cluster* de Fe<sub>4</sub>S<sub>4</sub>, que consiste en tres residuos de cisteína (CXXXCXXC) altamente conservados en todas las especies analizadas. Además se identificó una probable secuencia de unión a S-adenosilmetionina, que consiste en una región rica en glicinas. En su estado reducido, el *cluster* de Fe<sub>4</sub>S<sub>4</sub> transfiere un electrón a S-adenosilmetionina, induciendo el corte de ésta en metionina y radical 5'-desoxiadenosilo. Este radical

es un agente fuertemente oxidante que actúa en diversas reacciones implicadas en múltiples funciones, como la transcripción y la traducción (Layer *et al.*, 2003).

Por otro lado, la estructura secundaria compuesta por una serie de  $\alpha$ -hélices y  $\beta$ -plegadas regularmente alternadas (Figura 26) coincidieron con el modelaje de la estructura terciaria de Elp3b resaltando la presencia de 9  $\alpha$ -hélices las cuales fueron las más evidentes en la estructura terciaria y que corresponden al radical SAM, así como las 2  $\alpha$ -hélices del dominio HAT (Frey *et al.*, 2008). En el modelaje tridimensional de Elp3b de *L. major* se usó como templado la estructura cristalina de *D. mccartney* (Glatt *et al.*, 2016). Como se observa en la Figura 28, los dos modelos son muy parecidos, lo que sugiere una alta conservación en cuanto a estructura terciaria entre ortólogos de Elp3.

### **5.1. Obtención de cultivos *knock-out* de Elp3b**

Estudios de genómica funcional en tripanosomátidos se han realizado usando diversas técnicas con el fin de generar líneas celulares *knock-out*. En dichos estudios se han utilizado varias herramientas metodológicas, como la transfección de pequeños fragmentos de DNA en dichos parásitos, permitiendo así la eliminación y complementación de genes por recombinación homóloga; así como la posterior selección de líneas celulares *knock-out* con diferentes fármacos (Stoecklin *et al.*, 2002).

Para el caso particular de *Leishmania* es posible generar *knock-outs* génicos mediante recombinación homóloga con la finalidad de obtener información sobre la expresión génica y función de dichos genes. Para esto es necesario conocer el número de copias del gen a deletar, ya que es necesario eliminar todas las copias presentes de dicho gen para poder observar su efecto en la célula y de esa manera inferir su función. Los genomas de los tripanosomátidos pueden contener múltiples copias endógenas de un gen en tándem, así como genes relacionados entre sí (Graham, 1995). Mientras mayor sea el número de genes, mayor será el

número de construcciones con distintos marcadores de selección necesarios para eliminarlos. Gracias a la secuenciación completa del genoma de *L. major* se sabe que existen dos variantes de Elp3 para este parásito: Elp3a y Elp3b. Ambas variantes son codificadas por un gen único, con dos copias alélicas (Ivens *et al.*, 2005).

Actualmente se sabe que para efectuar la exitosa eliminación de un gen completo, las regiones UTR-5' y UTR-3' de dicho gen blanco deben utilizarse como regiones flanqueantes al gen de resistencia, y en particular para *Leishmania* el tamaño mínimo para obtener una recombinación homóloga eficiente es de 150 a 200 pb (Papadopoulou *et al.*, 1997).

Considerando todo lo anterior los *cassettes* se generaron con las regiones UTR-5' y UTR3' del gen endógeno Elp3b de *L. major* ligadas a los genes de resistencia seleccionados (puromicina e higromicina) generando los vectores pΔElp3b-Pac y pΔElp3b-Hyg (Figura 23), los cuales fueron digeridos con las enzimas correspondientes para purificar los *cassettes* de *hyg* y *pac*. El *cassette hyg* fue utilizado en la primera transfección en promastigotes de *L. major* para posteriormente realizar la selección con higromicina, así como los ensayos de PCR correspondientes para verificar que una de las copias alélicas de Elp3b fuera substituida por el gen de resistencia a higromicina. Cabe mencionar que se realizaron tres repeticiones con diferentes concentraciones de *cassette hyg* (2.5, 5 y 10 µg), obteniendo resultados positivos con 10 µg, lo que indicó que una mayor cantidad de *cassette* en el proceso de electroporación favorece la eliminación del gen blanco por recombinación homóloga. Los ensayos de PCR indicaron que una de las copias alélicas de Elp3b fue substituida por el gen de resistencia a higromicina en el locus endógeno de Elp3b (Figuras 33 y 34). Por lo que se procedió a la segunda transfección, ahora utilizando el gen de resistencia a puromicina. Sin embargo, esta vez no hubo resultados positivos, ya que ninguna electroporación mostró células vivas después de exponerlas a la droga de selección.

Con la finalidad de eliminar cualquier variable o error en el primer intento de un doble *knock-out*, se procedió a intentar nuevamente la delección de ambas copias alélicas de Elp3b, comenzando esta vez con el *cassette* de *pac*. De igual manera se manejaron tres grupos control con diferentes concentraciones de *cassette pac* (2.5, 5 y 10 µg), obteniendo resultados positivos para la repetición de 10 µg. Esta línea celular fue sometida a ensayos de PCR con la finalidad de confirmar el reemplazo de una copia endógena de Elp3b por el gen de *pac* (Figura 35). Después se procedió a intentar eliminar la segunda copia alélica de Elp3b con el *cassette* de *hyg*, utilizando nuevamente tres grupos control con diferentes concentraciones de *cassette hyg* (2.5, 5 y 10 µg). Como en el intento previo, no se obtuvieron resultados positivos al no obtener células vivas después de exponerlas a higromicina.

## **5.2. Obtención de cultivos *knock-out* de Elp3b en células con una copia episomal unida a una bandera PTP**

Diversos estudios han llevado a la identificación de una gran variedad de genes esenciales cuya pérdida no puede ser tolerada por el organismo, sobre todo aquellos genes que se expresan constitutivamente en todos los estadios de dicho organismo. La eliminación de dichos genes produce organismos no viables, tal es el caso de N-miristoiltransferasa, proteína que realiza procesos importantes para la regulación de la señalización celular y regula las interacciones proteína-proteína en *L. major* (Vasudevan *et al.*, 1998). En otros casos, se ha observado la generación de copias adicionales del gen en estudio al deletar las copias endógenas de un gen esencial (Martínez-Calvillo *et al.*, 2005). Tomando en cuenta lo anterior y después de diversos intentos para deletar ambas copias alélicas de Elp3b en *L. major* se llegó a la conclusión de que Elp3b es un gen esencial, por lo que se cree que no es posible eliminar las dos copias alélicas de Elp3b sin afectar la viabilidad del parásito.

Elp3b en *T. brucei* regula el proceso de transcripción de Pol I en la fase de elongación de manera negativa. Se ha llegado a esta conclusión por diversos experimentos donde se observó un aumento en la transcripción del rRNA al disminuir la expresión de Elp3b, aumentando incluso el crecimiento celular. También se observó que dicha actividad puede ser reconstituida mediante la adición de Elp3b recombinante unida a una bandera (Alsford *et al.*, 2011). Es posible que Elp3b en *L. major* pueda participar en la regulación de la transcripción de los genes del rRNA, así como realizar otras funciones esenciales para la supervivencia del parásito.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos, se concluyó que para obtener la línea celular con ambas copias alélicas de Elp3b substituidas por genes de resistencia es necesaria la adición de una copia episomal unida a una bandera. De esta forma se mantendría la expresión de la proteína. Con este fin, clonas celulares de la línea *knock-out* sencillo Lm $\Delta$ Elp3b/Hyg fueron transfectadas con el vector pElp3-PTP (Figura 24), en el que el gen Elp3b fue fusionado a la bandera PTP (formada por dos dominios de unión a IgG de la proteína A y un dominio de la proteína C, separados por un sitio de corte de la proteasa TEV). Se obtuvo entonces una población transfectada exitosamente y se clonó por medio de plaqueo, obteniendo 6 clonas celulares. Una de éstas se seleccionó para analizarse por *Western-blot* para confirmar la presencia de la proteína recombinante Elp3b-PTP, usando un anticuerpo contra la bandera. Tanto la clona como la población mostraron la señal de la bandera PTP unida a la proteína recombinante Elp3b, la cual presentaba una masa molecular esperada de ~95 kDa (Figura 38).

Una vez comprobada la presencia de la proteína recombinante Elp3b-PTP en línea celular Lm $\Delta$ Elp3/Hyg+Elp3b-PTP, se procedió a la segunda transfección con el *cassette* de *pac*, esperando que ahora con la expresión de la proteína recombinante se lograra deletar ambas copias endógenas de Elp3b. En esta ocasión, después de 2 semanas se obtuvo una línea celular que poseía resistencia a *hyg* y *pac*. La línea celular obtenida (Lm $\Delta$ Elp3/Hyg+Elp3b-PTP+rPac)

se sometió a los respectivos ensayos de PCR para confirmar la presencia del gen de puromicina en el locus de Elp3b. Los ensayos de PCR arrojaron resultados interesantes, ya que dicha línea celular poseía ambos genes de resistencia así como la copia episomal unida a la bandera. Sin embargo, el gen de resistencia a puromicina no se encontró localizado en el locus de Elp3b, por lo que dicha línea celular todavía poseía una copia alélica de Elp3b (Figuras 39 y 40). Esto ya se había reportado para el caso de genes esenciales en *L. major* como el gen de la topoisomerasa, donde en el proceso de delección de ambas copias alélicas de dicho gen la segunda droga de resistencia no recombinó en el locus del gen blanco, sino que se encontró presente en otra región del genoma del parásito. Y por otro lado, al eliminar ambas copias alélicas del gen de topoisomerasa el parásito desarrolló trisomía de dicho gen (Baldaña-Fouce *et al.*, 2008).

Si bien la eliminación de una copia alélica de Elp3b no afectó la morfología, ni el crecimiento celular y movilidad del parásito, se esperaría que con el doble *knock-out* se presenten posibles alteraciones en el crecimiento del parásito. Aunque por el momento no tenemos evidencias que sugieran la función de Elp3b en *L. major*, es muy probable que, como se observó en *T. brucei* (Alsford *et al.*, 2011), esté involucrada en la regulación negativa de la elongación de la transcripción de Pol I. Alternativamente, podría participar en la elongación de la transcripción de Pol II, como ocurre en la mayoría de los organismos.

De esta manera se pretende seguir con el estudio de Elp3b generando líneas celulares *knock-out* para *L. major* utilizando el mismo proceso de recombinación homóloga de genes de resistencia a fármacos, ya que este procedimiento ha sido exitoso en el caso de genes esenciales para este parásito (Baldaña-Fouce *et al.*, 2008). Por otro lado también existen otras técnicas como CRISPR-Cas9 para la generación de líneas *knock-out* la cual ya ha permitido la edición del genoma en *Leishmania* a través de la formulación de RNAs guía, permitiendo la generación de líneas celulares *knock-out* sin el uso de drogas de selección (Zhang y Matlashewski, 2015).

## 6. Conclusiones y Logros

---

- La proteína Elp3b de *L. major* posee los dos dominios típicos, presentes en otros ortólogos de Elp3: el dominio radical SAM y el dominio HAT. El dominio radical SAM presenta un probable sitio de unión a S-adenosilmetionina, así como una región con tres cisteínas que coordina el *cluster* Fe<sub>4</sub>S<sub>4</sub>.
- La estructura secundaria predicha de Elp3b reveló que el dominio SAM se compone de una serie de β plegadas y α-hélices, mientras que el dominio HAT está conformado por las dos α-hélices típicas.
- El modelo tridimensional de Elp3b reveló una estructura globular muy parecida a la estructura reportada para Elp3 de *D. mccartyi*.
- Se generaron clonas celulares de *L. major* en donde una de las copias del gen de Elp3b fue substituida por el gen de resistencia a higromicina por medio de recombinación homóloga (*knock-out* sencillo).
- Se generaron clonas celulares de *L. major* con el *knock-out* sencillo y una copia episomal del gen Elp3b (LmΔElp3/Hyg+Elp3b-PTP) y se confirmó la señal correspondiente a la proteína recombinante Elp3b-PTP
- No se logró la obtención de células con el *knock-out* doble de Elp3b, sugiriendo así que dicho gen es esencial para la supervivencia celular en promastigotes de *L. major*.

## 7. Literatura citada

---

- Adl, S.M., Leander, B.S., Simpson, A.G., Archibald, J.M., Anderson, O.R., Bass, D., Bowser, S.S., Brugerolle, G., Farmer, M.A. y Karpov, S. (2007). Diversity nomenclature and taxonomy of protists. *Systematic Biology* 56, 684-689.
- Alexander, J., Satoscar, A. R. y Rusell, D., G. (1999). *Leishmania* species: models of intracelular Parasitism. *Journal of Cell Science*. 112, 2993-3002.
- Alsford, S. y Horn, D. (2011). Elongator Protein 3b Negatively Regulates Ribosomal DNA Transcription in African Trypanosomes. *Molecular and Cellular Biology* 31, 1822-1832.
- Alonso, V. L. y Serra, E. C. (2012). Lysine Acetylation: Elucidating the Components of an Emerging Global Signaling Pathway in Trypanosomes. *Journal of Biomedicine and Biotechnology* 2012, 822–831.
- Bailey, M. S. y Lockwood, D. N. (2007) Cutaneous leishmaniasis. *Journal of Clinical Dermatology* 25, 203-211.
- Bates, P.A. (2007).Transmission of *Leishmania* metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies. *International Journal for Parasitology* 37, 1097-1106.
- Bennis, I., De Brouwere, V., Ameer, B., Laamrani, A., Chichaoui, S., Hamid, S. y Boelaert, A. (2015). Control of cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania major* in south-eastern Morocco. *Tropical Medicine and International Health* 20, 1297–1305.
- Berriman, M., Ghedin, E., Hertz-Fowle, C., Blandin, G., Renauld, H., Bartholomeu, D.C., Lennard, N.J., Caler, E., Hamlin, N.E., Haas, B., Böhme, U., Hannick ,L., Aslett, M.A., Shallom J., Marcello L., Hou L., Wickstead, B., Alsmark, U.C., Arrowsmith, C., Atkin, R.J., Barron, A.J., Bringaud, F., Brooks, K., Carrington, M., Cherevach, I., Chillingworth, T.J., Churcher, C., Clark, L.N., Corton, C.H., Cronin, A., Davies, R.M., Doggett, J., Djikeng, A., Feldblyum, T., Field, MC., Fraser, A., Goodhead, I., Hance, Z., Harper, D., Harris, B.R., Hauser, H., Hostetler, J., Ivens, A., Jagels, K., Johnson, D.,



Johnson, J., Jones, K., Kerhornou, A.X., Koo, H., Larke, N., Landfear, S., Larkin, C., Leech, V., Line, A., Lord, A., Macleod, A., Mooney, P.J., Moule, S., Martin, D.M., Morgan, G.W., Mungall, K., Norbertczak, H., Ormond, D., Pai, G., Peacock, C.S., Peterson, J., Quail, M.A., Rabbinowitsch, E., Rajandream, M.A., Reitter, C., Salzberg, S.L., Sanders, M., Schobel, S., Sharp, S., Simmonds, M., Simpson, A.J., Tallon, L., Turner, C.M., Tait, A., Tivey, A.R., Van Aken, S., Walker, D., Wanless, D., Wang, S., White, B., White, O., Whitehead, S., Woodward, J., Wortman, J., Adams, M.D., Embley, T.M., Gull, K., Ullu, E., Barry, J.D., Fairlamb, A.H., Opperdoes, F., Barrell, B.G., Donelson, J.E., Hall, N., Fraser, C.M., Melville, S.E. y El-Sayed, N.M. (2005). The genome of the African trypanosome *Trypanosoma brucei*. *Science* 15, 416-22.

- Beverley, S. M. (2003). Protozomics: trypanosomatid parasite genetics comes of age. *Nature Reviews Genetics* 4, 11-19.
- Castrillo, J. L. (1992). Factores de Transcripción tejido específicos. *Investigación y ciencia* 26, 64-72.
- Chandrasekhara, C., Mohannath, G., Blevins, T., Pontvianne, F. y Pikaard, C. S. (2016). Chromosome-specific NOR inactivation explains selective rRNA gene silencing and dosage control in *Arabidopsis*. *Genes and Development* 30, 177-190.
- Chen, C., Huang, B., Eliasson, M., Rydén, P. y Byström, A. (2011). Elongator Complex Influences Telomeric Gene Silencing and DNA Damage Response by Its Role in Wobble Uridine tRNA Modification. *PLOS Genetics* 7, e1002258.
- Chinenov, Y. (2002) A second catalytic domain in the Elp3 histone acetyltransferases: a candidate for histone demethylase activity? *Trends in Biochemical Sciences* 27, 115–117.
- Clements, A., Rojas, J.R., Trievel, R.C., Wang, L., Berger, S.L. y Marmorstein, R. (1999). Crystal structure of the histone acetyltransferase domain of the human PCAF transcriptional regulator bound to coenzyme A. *EMBO Journal* 18, 3521-3532.

- Conaway, R.C. y Conaway, J. W. (1994). Transcription: Mechanisms and Regulation. Raven Press Series on Molecular and Cellular Biology 3, 123-134.
- Creppe, C. y Buschbeck, M. (2011). Elongator: An Ancestral Complex Driving Transcription and Migration through Protein Acetylation. Journal of Biomedicine and Biotechnology 2011, 924898.
- Daniels, J., P., Keith, G. y Wickstead, B. (2010). Cell Biology of the Trypanosome Genome. Microbiology and Molecular Biology Reviews 74, 552-569.
- Das, A., Banday, M. y Bellofatto, V. (2008). RNA Polymerase Transcription Machinery in Trypanosomes. Eukariotic Cell 7, 429-434.
- Davies, C. R., Kaye, P., Croft, S. L. y Sundar, S. (2003). Leishmaniasis: new approaches to disease control. The British Medical Journal 15, 377–382.
- De Gaudenzi, J. G., Noé, G., Campo, V. A., Frasch, A. C. y Cassola, A. (2011). Gene expression regulation in trypanosomatids. Essays Biochemistry 51, 31-46.
- Dieci, G., Fiorino, G., Castelnuovo, M., Teichmann, M. y Pagano, A. (2007). The expanding RNA polymerase III transcriptome. Trends Genetics 23, 614-622.
- Duncan, S. M., Jones, N. G. y Mottram, J. C. (2017). Recent advances in Leishmania reverse genetics: Manipulating a manipulative parasite. Molecular and Biochemical Parasitology 216, 30-38.
- Duthie, M. S., Raman, V. S., Piazza, F. M. y Reed, S. G. (2012). The Development and Clinical Evaluation of Second-Generation Leishmaniasis Vaccines. National Institutes of Health 5, 134–141.
- El-Sayed, N. M., Myler, P. J., Blandin, G., Berriman, M., Crabtree, J. y Aggarwal, G., (2005). Comparative Genomics of Trypanosomatid Parasitic Protozoa. Science 309, 404-409.
- Engel, C., Gubbey, T., Neyer, S., Sainsbury, S., Oberthuer, C., Baeje, C., Bernecky, C. y Cramer, P. (2017). Structural Basis of RNA Polymerase I Transcription Initiation. Cell 1469, 120-131.

- Fantoni, D., Dari, O. y 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, 2021-8.
- Frey, P. Hegeman, D. y Ruzicka, F. (2008). The Radical SAM Superfamily. *Biochemistry and Molecular Biology* 43, 63-88.
- Glatt, S., Zabel, R., Kolaj-Robin, O., Onuma, O., Baudin, F., Graziadei, A., Taverniti, V., Lin, T., Baymann, B., Breuning, K. y Müller, C. (2016). Structural basis for tRNA modification by Elp3 from *Dehalococcoides mccartyi*. *Nature Structural and Molecular Biology* 23, 794-802.
- Gossage, S. M., Rogers, M. E. y Bates, P. A., (2003). Two separate growth phases during the development of *Leishmania* in sand flies: implications for understanding the life cycle. *International Journal for Parasitology* 15, 1027–1034.
- Graham, S. (1995). Mechanisms of stage-regulated gene expression in Kinetoplastidia. *Parasitology Today* 11, 217-230.
- Hamilton, P. B., Stevens, J. R., Gaunt, M. V., Gidley, J., Y. y Gibson, W. C. (2004). Trypanosomes are monophyletic evidence from genes for glyceraldehyde phosphate dehydrogenase and small subunit ribosomal RNA. *International Journal for Parasitology* 34, 1394-1404.
- Handman, E. (1999). Cell Biology of *Leishmania*. *Advances in Parasitology* 44, 1-32.
- Hantsche, M. y Cramer, P. (2017). Conserved RNA polymerase II initiation complex structure. *Current Opinion in Structural Biology* 47, 17-22.
- Ivens, A. V., Peacock, C. S., Worthey, E. A., Murphy, L., Aggarwal, G., Berriman, M., Sisk, E., Rajandream, M. A., Adlem, E. y Aert, R. (2005). The genome of the kinetoplastid parasite, *Leishmania major*. *Science* 309, 436-442.
- Kaufer, A., Ellis, J., Stark, D. y Barratt, J. (2017). The evolution of trypanosomatid taxonomy. *Parasites and Vectors* 10, 287-298.

- Kapler, G., Coburn, C. y Beverley, S. (1990). Stable transfection of the human parasite *Leishmania major* delineates a 30-kilobase region sufficient for extrachromosomal replication and expression. *Molecular and cellular Biology* 10, 1084-1094.
- Karlsborn, T., Tükenmez, H., Mahmud, A. K. M. F., Xu, F., Xu, H. y Byström, A. S. (2014). Elongator, a conserved complex required for wobble uridine modifications in Eukaryotes. *RNA Biology Journal* 11, 1519-1528.
- Keeling, P.J., Burger, G., Durnford, D.G. Lang, B.F., Lee, R.W. Pearlman, R.E., Roger, A.J. y Gray, M.W. (2005). The tree of Eucaryotes. *Trends in Ecology and Evolution* 20, 670-676.
- Kissinger, J. C. (2005). A tale of three genomes: the kinetoplastids have arrived. *Trends in Parasitology* 22, 240-243.
- Klerk, E., Vanema, A., Anvar, S. Y., Goeman, J. J., Hu, O., Trollet, C., Dickson, G., Dunnen, J. T., Van der Maarel, S. M., Raz, V. y 'tHoen, P. A. C. (2012). Poly(A) binding protein nuclear 1 levels affect alternative polyadenylation. *Nucleid Acids Research* 40, 9089-9101.
- Koch, H., Raabe, M., Urlaub, H., Bindereif, A. y Preußner, C. (2016). The polyadenylation complex of *Trypanosoma brucei*: Characterization of the functional poly(A) polymerase. *RNA Biology* 13, 221-231.
- Laban, A., Tobin, M., Curotto y Wirth, D. (1990). Stable expression of the bacterial neogene in *Leishmania enrietti*. *Nature* 343, 572-574.
- Lopes, H. A., Souto-Padróni, T., Diaz, A. F., Gomez, T. M. Rodriguez, C. G. Zimmermann, T. L., Alves, L.T. Y. y Vermelho, B.A. (2010). Tripanosomatids: Odd organisms, devastating diseases. *The Open Parasitology Journal* 4, 30-59.
- Marshall, N. F., Peng, J., Xie, Z. y Price, D. H. (1996). Control of RNA Polymerase II Elongation Potential by a Novel Carboxyl-terminal Domain Kinase. *Journal of Biological Chemistry* 271, 27176-27186.
- Martínez-Calvillo, S., Sunkin, S. M., Yan, S.-F., Fox, M., Stuart, K. y Myler, P. J. (2001). Genomic organization and functional characterization of the

*Leishmania major* Friedlin ribosomal RNA gene locus. *Molecular and Biochemical Parasitology* 116, 147-157.

- Martínez-Calvillo, S., Yan, S., Nguyen, D., Fox, M., Stuart, K. y Myler, P. J., (2003). Transcription of *Leishmania major* Friedlin chromosome 1 initiates in both directions within a single region. *Molecular Cell* 11, 1291-1299.
- Martínez-Calvillo, S., Nguyen, D., Stuart, K. y Myler, P. J. (2004). Transcription Initiation and Termination on *Leishmania major* Chromosome 3. *Eukaryotic Cell* 3, 506-517.
- Martínez-Calvillo, S., Stuart, K. y Myler, P. J. (2005). Ploidy changes associated with disruption of two adjacent genes on *Leishmania major* chromosome 1. *International Journal for Parasitology* 35, 419-429.
- Martínez-Calvillo, S., Vizuet-de-Rueda, J. C., Florencio-Martínez, L. E., Manning-Cela, R. G. y Figueroa-Angulo, E. E. (2010). Gene Expression in Trypanosomatid Parasites. *Journal of Biomedicine and Biotechnology* 2010, 525241.
- Maslov, D. A., Podlipaev, S. A. y Lukes, J. (2001). Phylogeny of the Kinetoplastida: Taxonomic problems and insights into the evolution of parasitism. *Memorias del Instituto Oswaldo Cruz*. 96, 397-402.
- Maurício, I. L., Stothard, J. R. y Miles, M. A. (2000). The strange case of *Leishmania chagasi*. *Parasitology Today* 16, 188–189.
- Michaeli, S. (2011). Trans-splicing in trypanosomes: machinery and its impact on the parasite transcriptome. *Future Microbiology* 6, 455-461.
- Moreno, M., Ferro, C., Rosales-Chilama, M., Rubiano, L., Cossio, E., Gomez, M., Ocampo, C. y Saravia, N. (2015). First report of *Warileya rotundipennis* (Psychodidae: Phlebotominae) naturally infected with *Leishmania* (Viannia) in a focus of cutaneous leishmaniasis in Colombia. *Centro Internacional de Entrenamiento e Investigaciones Médicas* 148, 395-412.
- Nevan, J. Krogan y Jack, F. (2001). Characterization of a Six-Subunit Holo-Elongator Complex Required for the Regulated Expression of a Group of

Genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Cellular Biology* 21, 8203-8212.

- Nguyen, T. N., Müller, L. S. M., Park, S. H., Siegel, T. N. y Güzl, A. (2014). Promoter occupancy of the basal class I transcription factor A differs strongly between active and silent VSG expression sites in *Trypanosoma brucei*. *Nucleic Acids Research* 42, 3164-3176.
- Papasaikas, P. y Valcarcel, J. (2015). The Spliceosome: The Ultimate RNA Chaperone and Sculptor. *Trends in Biochemical* 41, 33-45.
- Paraskevopoulou, C., Fairhurst, S. A., Lowe, D. J., Brick, P. y Onesti, S. (2006). The Elongator subunit Elp3 contains a FeS cluster and binds S-adenosylmethionine. *Molecular Biology* 59, 795-806.
- Piscopo, T.V. y Mallia, A.C. (2006). Leishmaniasis. *Postgraduate Medical Journal* 82, 649–657.
- Price, D. H. (2000). P-TEFb, a Cyclin-Dependent Kinase Controlling Elongation by RNA Polymerase II. *Molecular and Cellular Biology* 20, 2629-2634.
- Ramírez, L., Iborra, S., Oliveira, C., Weber, M., Abánades, D., Gonzáles, V. M., Corvo, L., Nieto, C. G., Alonso, C., Bonay, P., Barral, A. M. P., Barral, M. y Soto, M. (2009). Las histonas de *Leishmania*. *Gazeta Médica da Bahia* 3, 129-133.
- Romano, G. (2013). Deregulations in the Cyclin-Dependent Kinase-9-Related Pathway in Cancer: Implications for Drug Discovery and Development. *International Scholarly Research Notices of Oncology* 2013, 305371.
- Russell, J. y Zomerdijk, J. C. M. (2006). The RNA polymerase I transcription machinery. *Biochemical Society Symposium Journal* 73, 203-216.
- Siegel, T. N., Gunasekera, K., Cross, G. A. y Ochsenreiter, T. (2011). Gene expression in *Trypanosoma brucei*: lessons from high-throughput RNA sequencing. *Trends in Parasitology* 27, 434-441.
- Silversides, A. (2009). Push to link medical research innovations to public good. *Canadian Medical Association Journal* 180, 1097–1098.

- Smid, A., Riva, M., Bouet, F., Sentenac, A. y Carles, C. (1995). The association of three subunits with yeast RNA polymerase is stabilized by A14. *Journal of Biological Chemistry* 270, 13534-13540.
- Stoecklin, G., Colombi, M., Raineri, I., Leuenberger, S., Mallaun, M., Schmidlin, M., Gross, B., Kitamura, T. y Monroni, C. (2002). Functional cloning of BRF1, a regulator of ARE-dependent mRNA turnover. *The European Molecular Biology Organization Journal* 21, 4709-4718.
- Trejo, P. J., Miranda, N. M., Solorzano, S. F., Cabrera, M. L., y Díaz, P. H. (1993). Kal-azar in Mexico: report of 2 cases. *Boletín médico del hospital infantil de México* 50, 662-665.
- Vizuet-de-Rueda, J. C., Florencio-Martínez, L. E., Padilla-Mejía, N. E., Manning-Cela, R., Hernández-Rivas, R. y Martínez-Calvillo, S. (2016). Ribosomal RNA Genes in the Protozoan Parasite *Leishmania* major Possess a Nucleosomal Structure. *Protist* 167, 121-135.
- Voit, R., Seiler, J. y Grummt I. (2015). Cooperative Action of Cdk1/cyclin B and SIRT1 Is Required for Mitotic Repression of rRNA Synthesis. *PLOS Genetics* 11, e1005246.
- Wang, S. C. y Frey, P. A. (2007). S-adenosylmethionine as an oxidant: the radical SAM superfamily. *TRENDS in Biochemical Sciences* 32, 101-110.
- WHO. 2010. Control of Leishmaniases, Technical Report Series 949. (Geneva: World Health Organization).
- Wilson, M. E., Jerônimo, S.M. y Pearson, R.D. (2005). Immunopathogenesis of infection with the visceralizing *Leishmania* species. *Microbial Pathogenesis* 38, 147–160.
- Zea, D. F., Prager, M., Figueroa, R. A. y Miranda, M. A. (2008). Mucosal complication of cutaneous leishmaniasis. *Biomedical Journal* 29, 9-11.
- Zetina, J. J. (2008). Leishmaniasis cutánea en el estado de Quintana Roo. *Dermatología Revista Mexicana* 52, 114-126.