



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

**Estudio molecular de Brf1, subunidad del
factor de transcripción TFIIIB, en
*Leishmania major***

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

B I Ó L O G O

Presenta:

JOSÉ ANDRÉS CANO SANTIAGO

Director de tesis: Dr. Santiago Martínez Calvillo



Los Reyes Iztacala, Tlalnepantla, Estado de México, 2018



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, por todos estos años de educación y experiencias de excelencia, que me han permitido enriquecer mi conocimiento y, sobre todo, mi calidad humana.

Al Doctor Santiago Martínez Calvillo, mi director de tesis, por haberme aceptado en su laboratorio e integrarme a su equipo de trabajo y guiarme en la realización de este proyecto.

A mis compañeros del laboratorio 1 de la UBIMED por su cercanía e interés en el desarrollo de este trabajo, especialmente a Gabi y Fio por sus recomendaciones en el desarrollo metodológico y por su apoyo en momentos de flaqueza; así como al Técnico Académico, Biol. Luis Enrique Florencio Martínez, por todas sus enseñanzas y tiempo dedicado a resolver dudas durante la realización de este trabajo.

A mi Comité de Asesores: el Dr. Federico Ávila Moreno, la Dra. Martha Ofelia Salcedo Álvarez, la Mtra. María Eugenia Isabel Heres y Pulido y al Dr. Tomás Nepomuceno Mejía; por sus valiosas contribuciones a 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 PERSONALES

A mi mamá, por haber sido siempre mi pilar y acompañarme en cada momento de mi vida. Sabes que he llegado a este punto gracias a ti y no me cansaré de verte como ¡la mejor *má* del mundo! El camino no ha sido fácil, hemos tenido que superar grandes retos, pero siempre juntos y este ha sido sin duda uno de los más difíciles, pero sé que no has dejado de creer en mí. Gracias por estar siempre.

A mi papá, gran parte de mi motivación has sido tú. Tu apoyo e interés me han hecho seguir adelante para superar todas las expectativas.

A mi familia entera, pues de manera muy particular me han impulsado y se han preocupado por mi carrera. Esto es una muestra de que con la intención, cualquier cosa es posible.

A mis amigos:

Uriel. Por seguir siendo mi amigo después de estos años, por acompañarme y pasar momentos divertidos que me han ayudado anímicamente.

Ofelia. Por ser mi mejor amiga, por darme grandes momentos de alegría y diversión, aunque también por haberme hecho enfadar en algunas ocasiones. Sin duda esa ha sido la clave de nuestra amistad, no tomarnos nada tan literal.

Viridiana. Por las risas, las experiencias chuscas en la preparatoria y por mantener aún ese sello de amistad incluso después de varios años.

Fabiola, Cristófer y Alexia. Por estar en todos los momentos de la licenciatura, por sus risas, por sus bromas, pero sobre todo por escucharme cuando lo requerí. Sin ustedes, este paso por la FES-I hubiera sido muy diferente.

Daniel, Norma y Joselo. Gracias por ser mis amigos, por cada momento en nuestras diferentes reuniones y por aceptarme tal como soy, siempre fue un placer

encontrarlos por la escuela y platicar, aunque sea unos minutos, sé que la vida les depara algo muy importante a cada uno de ustedes.

Fio, Luis Alberto, Adrián y Fabiola. Realmente su compañía ha convertido el laboratorio en un lugar muy agradable. Han sido muy buenas conversaciones, momentos de reflexión, momentos de crítica y sobre todo momentos de calidad. Inolvidables las comidas llenas de risas.

A cada persona que ha cruzado su camino con el mío y que tal vez nos hemos alejado, gracias por lo bueno que me han aportado, espero haber sido recíproco con ustedes.

DEDICATORIA

A la mujer que me dio la vida, Julia

A mi padre, por el apoyo incondicional

A mi familia

A la vida, por darme las herramientas necesarias siempre

CONTENIDO

Lista de figuras.....	IV
Lista de tablas.....	VI
Abreviaturas.....	VII
Resumen.....	VIII
1. Introducción.....	1
1.1 Características principales de la familia Trypanosomatidae.....	1
1.2 Género <i>Leishmania</i>	5
1.2.1 Sistemática.....	5
1.2.2 Ciclo biológico.....	6
1.2.3 Leishmaniasis.....	8
1.2.3.1 Leishmaniasis cutánea.....	8
1.2.3.2 Leishmaniasis mucocutánea.....	8
1.2.3.3 Leishmaniasis visceral.....	9
1.2.4 Distribución y prevalencia en México.....	9
1.3 Transcripción en eucariontes.....	11
1.3.1 RNA polimerasa I.....	12
1.3.1.1 Promotores y factores de transcripción de Pol I... 13	13
1.3.2 RNA polimerasa II.....	13
1.3.2.1 Promotores y factores de transcripción de Pol II... 13	13
1.3.3 Transcripción mediada por la RNA polimerasa III.....	14
1.3.3.1 Promotores de Pol III.....	16
1.3.3.2 Factores de transcripción de Pol III.....	17
1.3.3.3 Factor de transcripción TFIIIB.....	18
1.3.3.4 Subunidad Brf1.....	19
1.4 Expresión genética en <i>Leishmania</i>	20
1.4.1 Organización genómica.....	20
1.4.2 Transcripción en tripanosomátidos.....	21

1.5 Purificación de complejos proteicos.....	23
1.6 Antecedentes.....	24
2. Hipótesis.....	26
3. Objetivos.....	27
4. Materiales y métodos.....	28
4.1 Estrategia experimental.....	28
4.2 Análisis bioinformáticos.....	29
4.3 Cultivo y conteo celular.....	29
4.4 Purificación de plásmidos.....	30
4.5 Obtención de los <i>cassettes</i> de resistencia a antibióticos.....	31
4.6 Purificación de fragmentos de DNA de geles de agarosa.....	32
4.7 Electroporación de <i>L. major</i>	32
4.8 Extracción de DNA genómico.....	33
4.9 Electroforesis de DNA en gel de agarosa.....	34
4.10 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	34
4.11 Experimentos tipo Western blot.....	35
4.12 Purificación por afinidad en tándem.....	36
5. Resultados.....	38
5.1 Análisis bioinformáticos.....	38
5.1.1 Ortólogo de Brf1 en <i>L. major</i>	38
5.1.2 Análisis de ortólogos de Brf1 en tripanosomátidos.....	41
5.2 Verificación de la expresión de Brf1-PTP.....	43
5.3 Purificación por afinidad en tándem.....	44

5.4 Obtención de cultivos <i>knock-out</i> sencillo de Brf1.....	47
5.5 Intentos de obtención de cultivos <i>knock-out</i> doble de Brf1.....	51
6. Discusión	54
6.1 Análisis bioinformáticos de la secuencia de Brf1 en <i>L. major</i>	54
6.2 Brf1 interactúa con TBP en <i>L. major</i>	56
6.3 Brf1 podría ser un gen esencial también en <i>L. major</i>	57
7. Conclusiones y logros.....	60
8. Literatura citada.....	61

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Microscopía electrónica de kDNA del tripanosomátido <i>Crithidia fasciculata</i>	1
Figura 2. Esquema general de un tripanosomátido	3
Figura 3. Esquematzación de las reacciones metabólicas en los glicosomas de los tripanosomátidos	4
Figura 4. Estadios morfológicos principales de los tripanosomátidos.....	5
Figura 5. Clasificación propuesta por Moreira <i>et al.</i> (2004)	6
Figura 6. Esquema del ciclo de vida de <i>Leishmania</i> spp.....	7
Figura 7. Manifestaciones clínicas de la leishmaniasis	9
Figura 8. Mapa de prevalencia de casos de leishmaniasis cutánea y mucocutánea en México	10
Figura 9. Transcripción de Pol I y procesamiento de rRNAs	12
Figura 10. Esquematzación de los elementos que conforman un promotor típico de Pol II	14
Figura 11. Tres tipos de regiones promotoras en Pol III.....	16
Figura 12. Representación esquemática del complejo de pre-inicio de un promotor tipo 1	18
Figura 13. Formación de los complejos τ A y τ B de TFIIC en promotores tipo 2.....	18
Figura 14. Factor de transcripción TFIIB, formado por las subunidades - Bdp1, Brf1 y TBP.....	19
Figura 15. Representación esquemática de la transcripción policistrónica y <i>trans-splicing</i> en tripanosomátidos	22
Figura 16. Elementos del promotor del RNA <i>spliced-leader</i> transcrito por Pol II en algunos tripanosomátidos.....	23
Figura 17. Péptidos de extracción usados durante purificaciones por afinidad en tándem.....	24
Figura 18. Mapas de los vectores p Δ Brf1-Hyg y p Δ Brf1-Pac	31

Figura 19. Análisis estructural de Brf1 en <i>L. major</i>	39
Figura 20. Ortólogos de Brf1 en algunas especies de tripanosomátidos.....	42
Figura 21. Experimentos tipo Western blot para verificar la expresión de Brf1- PTP.....	44
Figura 22. Eluídos finales de la purificación por afinidad en tándem.....	45
Figura 23. Péptidos de Brf1 identificados por espectrometría de masas.....	47
Figura 24. Péptidos de TBP identificados por espectrometría de masas	47
Figura 25. Obtención del <i>cassette</i> Hyg.....	48
Figura 26. Extracción de DNA genómico.....	49
Figura 27. Representación esquemática del <i>cassette</i> de Hyg integrado en el locus de Brf1	50
Figura 28. Productos de PCR.....	51
Figura 29. Obtención del <i>cassette</i> Pac.....	52

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Subunidades de las RNA polimerasas en eucariontes	15
Tabla 2. Oligonucleótidos empleados para la verificación del <i>knock-out</i> sencillo.	34
Tabla 3. Identificación de probables sitios de fosforilación en Brf1 de <i>L. major</i>	41
Tabla 4. Matriz de porcentajes de identidad de la secuencia de aminoácidos de diferentes ortólogos de Brf1 en tripanosomátidos	43
Tabla 5. Proteínas co-purificadas con Brf1-PTP, identificadas por espectrometría de masas.	46

ABREVIATURAS

BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
DNA	Ácido desoxirribonucleico
RNA	Ácido ribonucleico
IE	Elemento intermedio
TSS	Sitio de inicio de la transcripción
PIC	Complejo de pre-inicio
Hyg	Gen de resistencia a higromicina
Kb	Kilobases
kDa	Kilodaltones
mRNA	RNA mensajero
Pac	Gen de resistencia a puromicina
Pol	RNA polimerasa
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
Prot A	Proteína A
Prot C	Proteína C
PTP	Prot A-TEV-Prot C
rRNA	RNA ribosomal
snRNA	RNA pequeño nuclear
tRNA	RNA de transferencia
SL	<i>Spliced-leader</i>
TBP	Proteína de unión a TATA
VSG	Glicoproteína variable de superficie
WHO	Organización Mundial de la Salud

RESUMEN

Los parásitos del género *Leishmania* son agentes etiológicos de la leishmaniasis, considerada como problema de salud pública en regiones tropicales y subtropicales del mundo. Además de su importancia médica, estos organismos presentan mecanismos de expresión génica muy particulares. En nuestro laboratorio estamos interesados en el análisis de la transcripción mediada por la RNA polimerasa III (Pol III), encargada de la síntesis de RNAs pequeños como los tRNAs, el rRNA 5S y el snRNA U6. En el presente trabajo se analizó a Brf1, subunidad del factor de transcripción TFIIIB necesaria para el inicio de la transcripción de Pol III, en *L. major*. Mediante análisis bioinformáticos se determinó la presencia de Brf1 en *L. major* y otros tripanosomátidos, así como las secuencias características de ortólogos de esta proteína: el dominio zinc-ribbon, dos repetidos de ciclina y el bloque de homología I. Asimismo, se generó la estructura tridimensional, mediante modelado por homología de los repetidos de ciclina de Brf1 en *L. major*, observándose que éstos se pliegan formando regiones globulares integradas por 5 α -hélices. Para identificar las proteínas con las que interactúa Brf1, se realizó un experimento de purificación por afinidad en tándem empleando una línea celular que expresa la proteína Brf1 fusionada a la bandera PTP (LmjF + Brf1-PTP). En dicho experimento se identificó por espectrometría de masas a TBP, que es también una subunidad de TFIIIB en otros organismos. Para analizar la función de Brf1 se intentó obtener cultivos *knock-out* en los que se reemplazaran, por recombinación homóloga, las dos copias alélicas de Brf1 por genes de resistencia a fármacos. Se trabajó con la línea celular LmjF + Brf1-PTP para generar el cultivo *knock-out* sencillo sustituyendo una copia alélica de Brf1 con el gen de resistencia a higromicina. Este cultivo *knock-out* sencillo se verificó mediante PCR. Múltiples intentos por obtener cultivos *knock-out* doble fueron infructíferos, lo que indica que Brf1 es un gen esencial en promastigotes de *L. major*, y que la expresión de la proteína Brf1-PTP no fue lo suficientemente alta como para permitir la eliminación de las dos copias endógenas de Brf1.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Características principales de la familia Trypanosomatidae

En la familia Trypanosomatidae se incluyen protozoos flagelados de especies parásitas como *Leishmania* spp., *Trypanosoma cruzi* y *Trypanosoma brucei*; agentes causales de la leishmaniasis, la enfermedad de Chagas y la enfermedad del sueño, respectivamente. Los miembros de este grupo se caracterizan por presentar un DNA mitocondrial conocido como cinetoplasto (kDNA) ubicado en la base del flagelo, que está formado por una red compleja de moléculas circulares concatenadas denominadas maxicírculos y minicírculos (Figura 1). Este DNA mitocondrial es capaz de replicarse de manera independiente del DNA nuclear (Maslov *et al.*, 2001; Shlomai, 2004; Kaufer *et al.*, 2017).

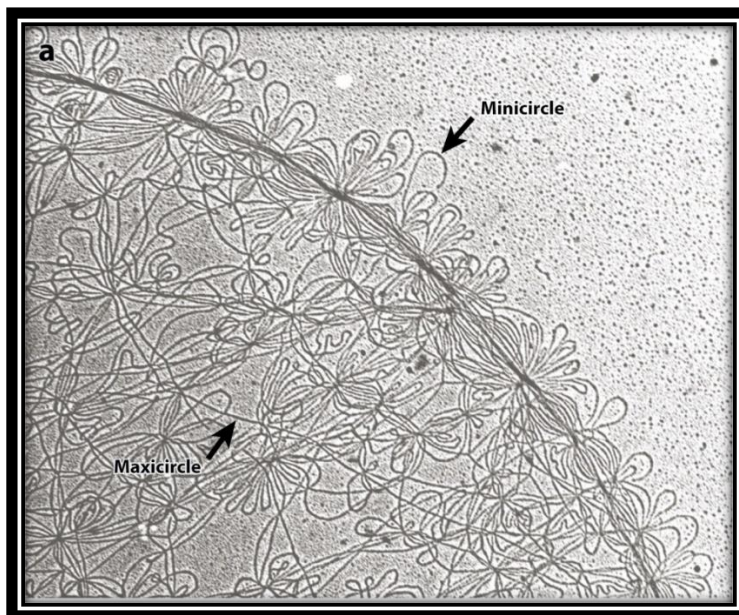


Figura 1. Microscopía electrónica de kDNA del tripanosomátido *Crithidia fasciculata*, donde se observan minicírculos y maxicírculos. Imagen tomada de Jensen y Englund (2012).

De manera interesante, los transcritos mitocondriales en los tripanosomátidos son procesados extensivamente mediante la adición y delección de uridinas para formar

las moléculas de RNA mensajero (mRNA) maduras. Este proceso, conocido como edición del mRNA, es llevado a cabo por un complejo multiproteico (el editosoma) y por los llamados RNAs guía, que son pequeños RNAs codificados en los minicírculos y que están uridilados en su extremo 3' (Sturm y Simpson, 1991; Wong *et al.*, 2015).

Los miembros de la familia Trypanosomatidae (tripanosomátidos) poseen un único flagelo que emerge de una invaginación de la membrana plasmática, denominada saco flagelar (Figura 2). En *Trypanosoma*, el flagelo se encuentra adherido a la superficie celular, formando una membrana ondulante, mientras que en *Leishmania* surge del saco flagelar y continúa libre. También, como parte de su ultraestructura, los tripanosomátidos presentan una red de microtúbulos subpeliculares, adosados a la membrana plasmática, que forman parte del citoesqueleto y les permite conservar la forma alargada (Figura 2) (Hammarton *et al.*, 2007).

Además de esto, los tripanosomátidos se caracterizan por presentar glicosomas, los cuales son organelos que se identificaron como un tipo particular de microcuerpos, primeramente estudiados en *T. brucei*, donde Opperdoes y Borst (1977) localizaron las enzimas de la vía de la glucólisis. Estos organelos (tipo peroxisomas) están envueltos por una membrana simple y se encuentran en todos los estadios de los tripanosomátidos, oscilando entre 10-100 organelos por célula (Figura 2). Es importante señalar que dentro de los glicosomas se llevan a cabo las reacciones que transforman la glucosa a 3-fosfoglicerato, mientras que la transformación a piruvato continúa en el citoplasma (Figura 3) (Szöör *et al.*, 2014).

Al momento de su descubrimiento, los glicosomas no fueron definidos como peroxisomas, debido a que albergan a la mayoría de las enzimas requeridas para las vías glucolíticas y gluconeogénicas y carecen de catalasas (Haanstra *et al.*, 2016). Dentro de los glicosomas también se ha reportado la presencia de otras enzimas requeridas para diferentes ramas de vías metabólicas que convergen con la glucólisis; tales como: la formación de succinato, la vía de las pentosas-fosfato, la biosíntesis de pirimidinas y las de protección ante estrés oxidativo (Szöör *et al.*, 2014; Haanstra *et al.*, 2016).

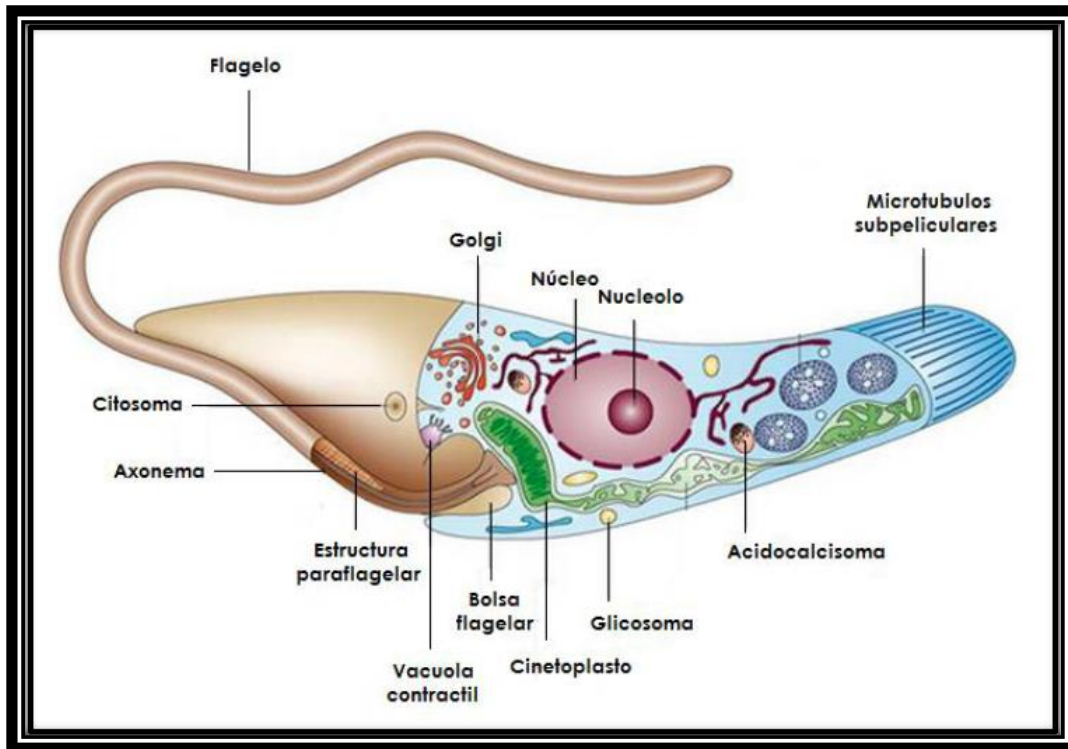


Figura 2. Esquema general de un tripanosomátido. Se señalan los organelos principales. Tomado de Docampo *et al.* (2005).

Otra característica importante de los miembros de la clase Kinetoplastida es la presencia de una base nitrogenada modificada en su genoma: la β -D-glucosil-hidroximetiluracil (base J). Esta base J fue identificada en *T. brucei* a partir del estudio de los genes de las glicoproteínas variantes de superficie (VSGs por sus siglas en inglés) de este parásito, cuando algunas endonucleasas de restricción (tales como *Pst*I, *Pvu*II, *Sph*I y *Hind*III) digerían parcialmente las regiones teloméricas, que es donde se localiza principalmente la base J (Borst y van Leeuwen, 1997; Borst y Sabatini, 2008).

La base J fue la primer hiper-modificación de este tipo en eucariontes, e incluso se ha determinado que *Leishmania* también la contiene en los repetidos teloméricos. Por su parte, *T. brucei* y *T. cruzi* poseen otros repetidos genómicos con base J (Borst y Sabatini, 2008).

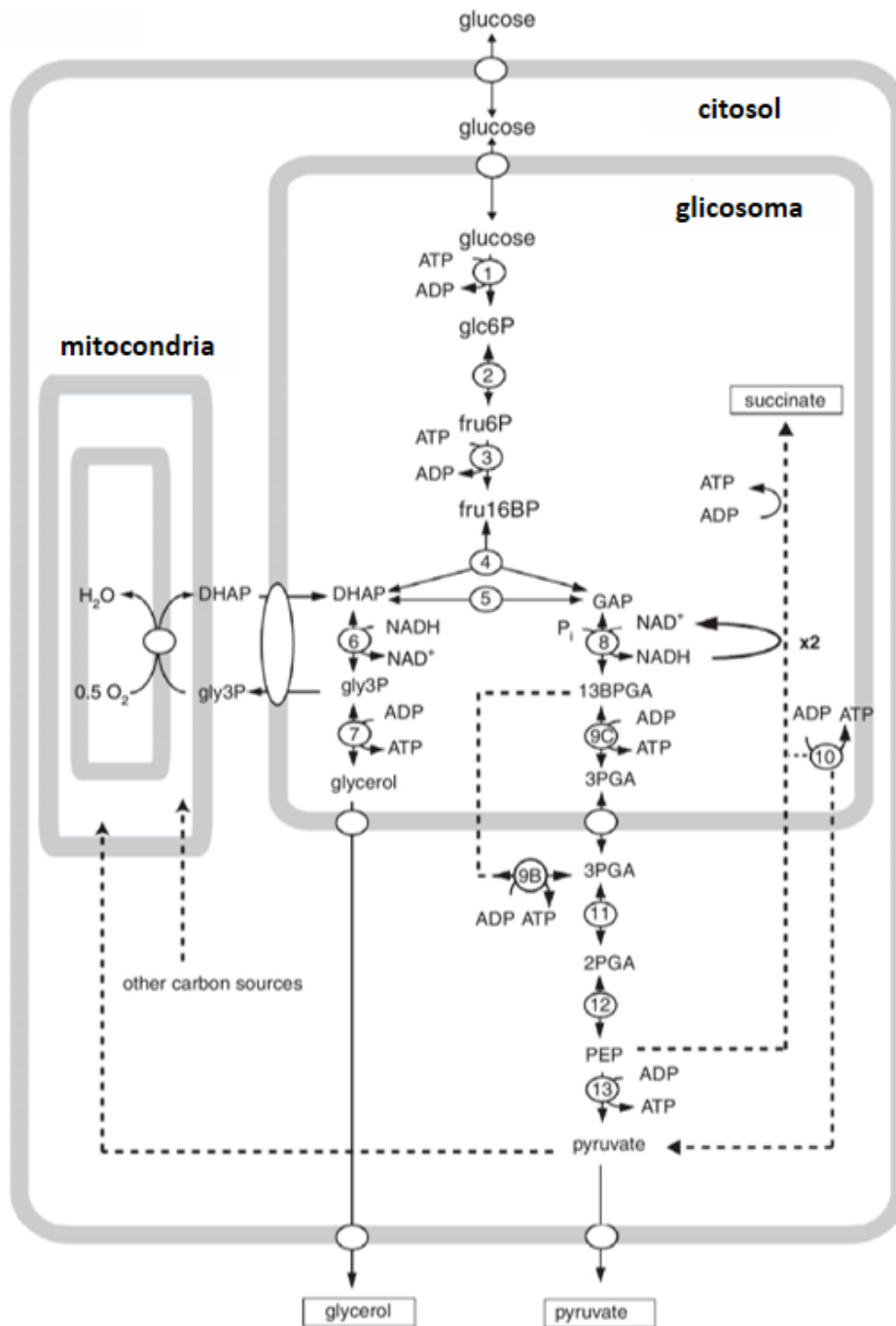


Figura 3. Esquemización de las reacciones metabólicas en los glicosomas de los tripanosomátidos. Modificado de Haanstra *et al.* (2016).

Los tripanosomátidos son organismos que generalmente infectan un hospedero invertebrado (ciclo de vida monogénico). Sin embargo, géneros como *Phytomonas*,

Trypanosoma y *Leishmania* poseen un ciclo de vida digénico, en el que están involucrados dos hospederos, un invertebrado y un vertebrado (Kaufer *et al.*, 2017). Estos organismos presentan varios estadios o formas de desarrollo a lo largo de sus ciclos de vida, siendo los principales el tripomastigote, el amastigote, el promastigote y el epimastigote (Figura 4).

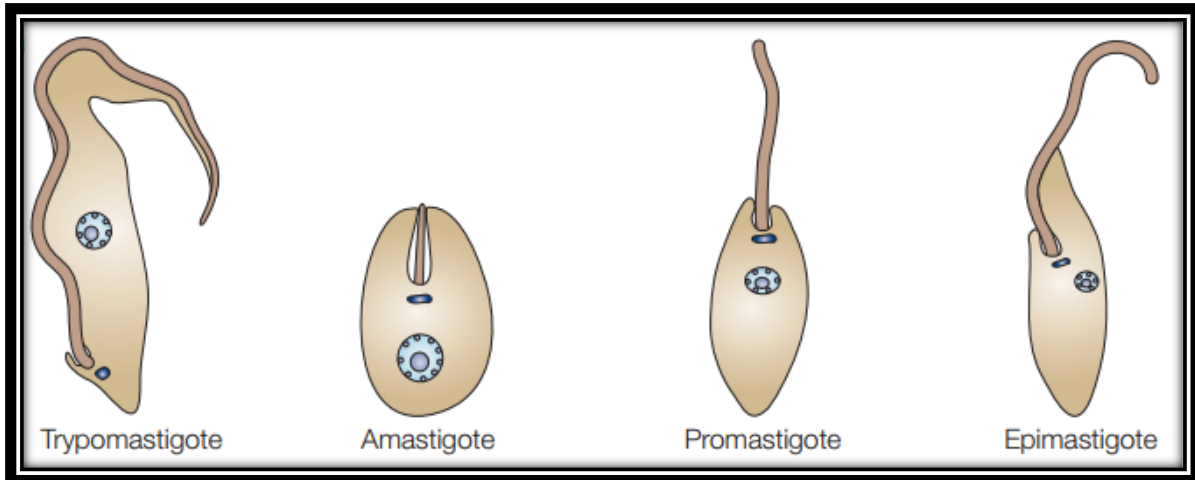


Figura 4. Estadios morfológicos principales de los tripanosomátidos. Tomado de Docampo *et al.* (2005).

1.2 Género *Leishmania*

1.2.1 Sistemática

El género *Leishmania* fue descrito por Leishman, Donovan y Wrighty en 1903 y a la fecha han sido identificadas más de 30 especies diferentes. Estas especies se han dividido en tres subgéneros, dependiendo de su región de desarrollo dentro del intestino del vector. El subgénero *Leishmania* se desarrolla en el intestino medio, *Viannia* se desarrolla en el triángulo pilórico en la región posterior del intestino, y en el subgénero *Sauroleishmania* se agrupa a las especies que parasitan a reptiles (Akhoundi *et al.*, 2016). La clasificación propuesta por Moreira *et al.* (2004) se esquematiza en la Figura 5.

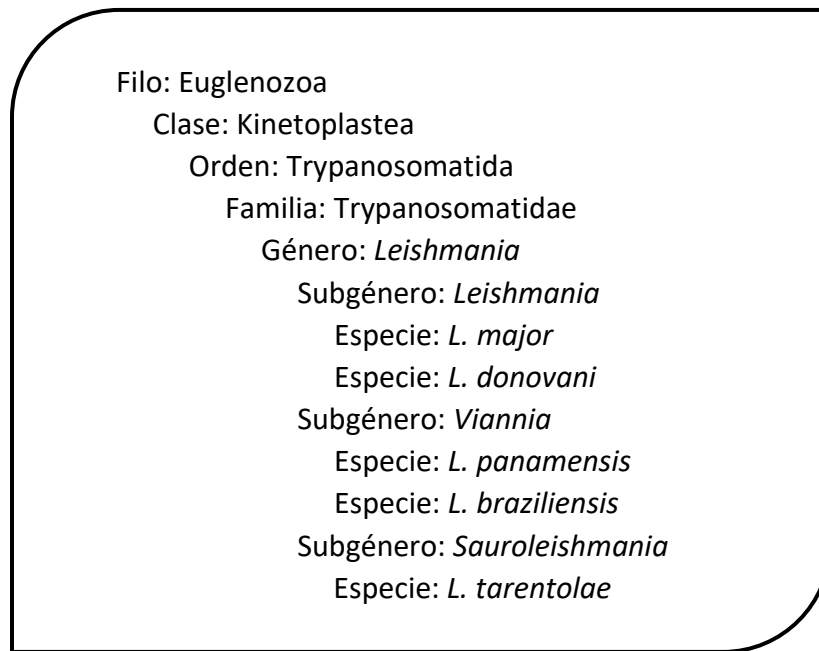


Figura 5. Clasificación propuesta por Moreira et al. (2004). Para cada subgénero se señalan sólo algunos ejemplos de especies de *Leishmania*.

1.2.2 Ciclo biológico

El ciclo de vida de *Leishmania* involucra la participación de un vector invertebrado y un hospedero vertebrado (Figura 6) (Borghini et al., 2017; Akhoundi et al., 2016). El parásito infecta al hospedero vertebrado a través de la picadura de un díptero hembra de los géneros *Phlebotomus*, en el Viejo Mundo, o *Lutzomyia* en el Nuevo Mundo. En el vector, el estadio extracelular de promastigote procíclico se encuentra en el intestino y se multiplica por fisión binaria. Después, mediante el proceso de metaciclogénesis se transforma en promastigote metacíclico y migra a las glándulas salivales del vector para ser inyectado al hospedero mamífero a través de la picadura. Dentro del cuerpo del hospedero, los parásitos son fagocitados por neutrófilos, células dendríticas y especialmente por macrófagos de la piel. Dentro de los macrófagos se forma una vacuola denominada fagolisosoma y se lleva a cabo el cambio al estadio de amastigote (forma ovoide con un flagelo corto), el cual se divide por fisión binaria hasta lisis la célula hospedera. El ciclo puede comenzar

de nuevo si un díptero vuelve a picar y toma amastigotes en la sangre, los cuales se transforman en promastigotes procíclicos en el intestino del vector (Figura 6).

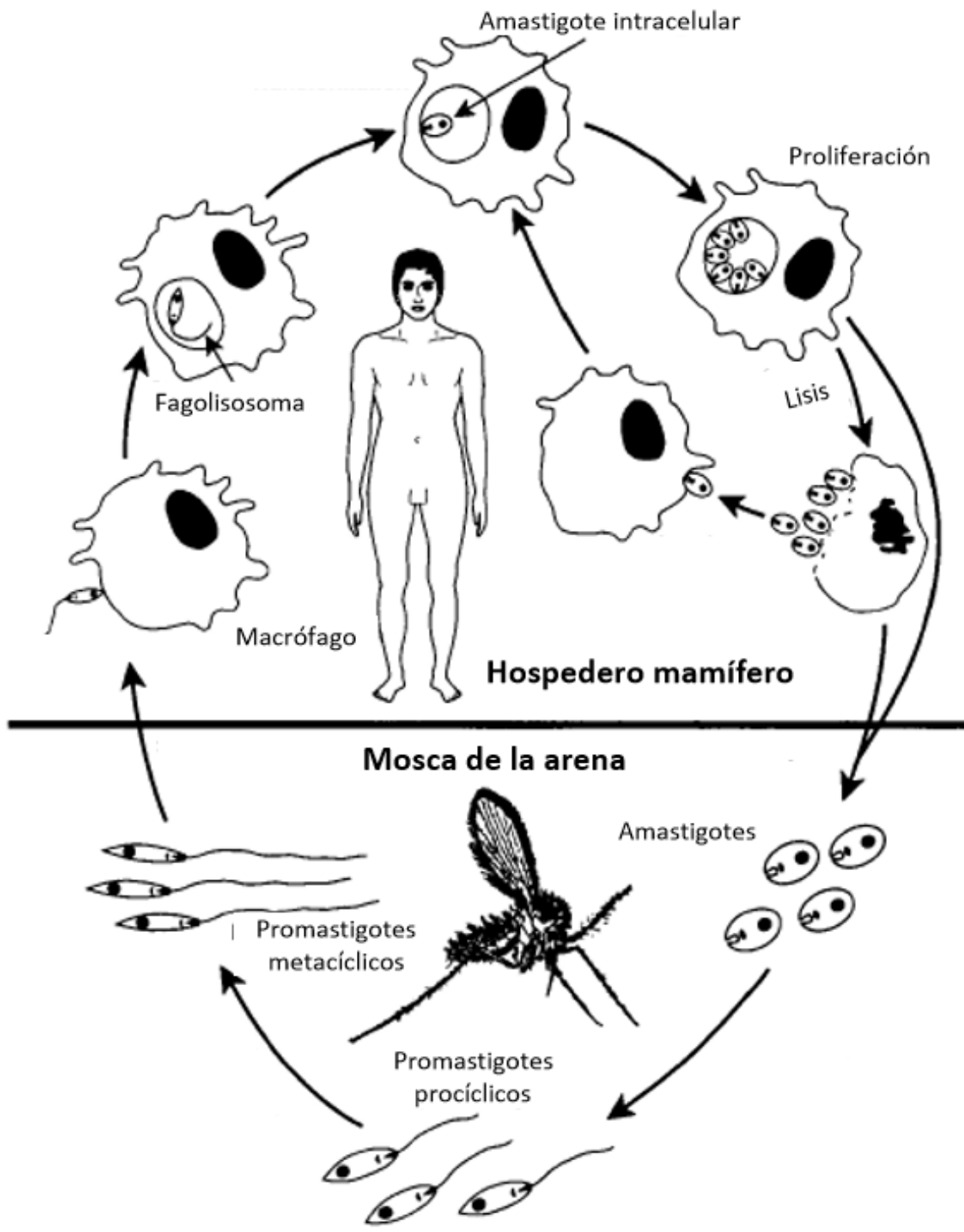


Figura 6. Esquema del ciclo de vida de *Leishmania* spp. Modificado de Handman (2000).

1.2.3 Leishmaniasis

Se considera que hay al menos 20 especies diferentes de *Leishmania* que producen leishmaniasis en el ser humano (Borghetti *et al.*, 2017). La leishmaniasis puede ser de tres tipos principales: cutánea, mucocutánea y visceral (Hernández-Rivas *et al.*, 2007; WHO, 2016). La Organización Mundial de la Salud estima que cada año ocurren de 0.2 a 0.4 millones de casos de leishmaniasis visceral y de 0.7 a 1.3 millones de casos de leishmaniasis cutánea alrededor del mundo (WHO, 2016).

1.2.3.1 Leishmaniasis cutánea

Está considerada como un problema de salud pública, pues es la manifestación clínica más frecuente. Las especies que la transmiten son: *L. mexicana* y *L. braziliensis* en el Nuevo Mundo; *L. major* y *L. tropica* en Asia; *L. infantum* en la cuenca del Mediterráneo Occidental y *L. aethiopica* y *L. major* en África (Sánchez-García, 2010). Se caracteriza por la presencia de lesiones y úlceras en la piel cercanas a la zona de la picadura del insecto vector, las cuales pueden ser supurativas y tornarse en tonalidades rojizas-marrones, manteniendo bordes lisos y bien definidos (Figura 7A) (Kaufert *et al.*, 2017).

1.2.3.2 Leishmaniasis mucocutánea

Es causada principalmente por las especies *L. panamensis*, *L. guyanensis* y *L. braziliensis*. En este padecimiento se presenta inicialmente inflamación de la mucosa nasal, la cual es altamente desfigurativa y los pacientes presentan problemas respiratorios. Las manifestaciones pueden aparecer varios meses después de haber sido diagnosticada la leishmaniasis cutánea y puede ser progresiva, comprometiendo el labio superior, paladar, úvula, epiglotis, hipofaringe, laringe y tráquea; imponiendo dificultades para deglutir, vocalizar y respirar (Ampuero, 2000) (Figura 7B).

1.2.3.3 Leishmaniasis visceral

La forma más agresiva y grave es la leishmaniasis visceral, conocida también como *Kala-Azar*. Es causada por *L. infantum* en el Nuevo Mundo y por *L. donovani* y *L. infantum* en el Viejo Mundo. Es una enfermedad sistémica donde los pacientes pierden peso y presentan inflamación de órganos, tales como bazo e hígado. Si no es tratada eficazmente, pueden ocurrir hemorragias internas e infecciones asociadas que ponen en riesgo la vida (Figura 7C) (Kaufer *et al.*, 2017), causando una mortalidad anual estimada de 59,000 personas (den Boer *et al.*, 2011).



Figura 7. Manifestaciones clínicas de la leishmaniasis. A: Úlcera característica de leishmaniasis cutánea, B: Deformaciones por leishmaniasis mucocutánea y C: Agrandamiento de órganos internos por leishmaniasis visceral. Imágenes tomadas de WHO (2016).

1.2.4 Distribución y prevalencia en México

De acuerdo con datos presentados por la Secretaría de Salud (2016), la presencia de este parásito en nuestro país está relacionada a regiones rurales con actividades agrícolas, tales como la siembra de cacao, café o árboles chicleros; donde más de nueve millones de personas se encuentran en riesgo en diversos estados de la República. La leishmaniasis cutánea (también conocida como leishmaniasis

tegumentaria) tiene mayor incidencia en la Península de Yucatán y fue la variante con la mayor prevalencia en nuestro país durante el año 2013, donde Tabasco presentó 448 casos y Quintana Roo 308 (WHO, 2016). La enfermedad está presente también en Veracruz, Chiapas, Oaxaca, Nayarit y Sinaloa, principalmente (Figura 8A). Estos casos han sido provocados por *L. mexicana* y *L. braziliensis* (Alvar *et al.*, 2012).

Otras manifestaciones, como la leishmaniasis mucocutánea son raras en México, aunque se han reportado casos principalmente en comunidades de Oaxaca, Veracruz, Tabasco y Campeche, provocados por *L. braziliensis* (Figura 8B), mientras que *L. infantum* ha provocado casos de leishmaniasis visceral en poblaciones de Guerrero y Chiapas (Alvar *et al.*, 2012).

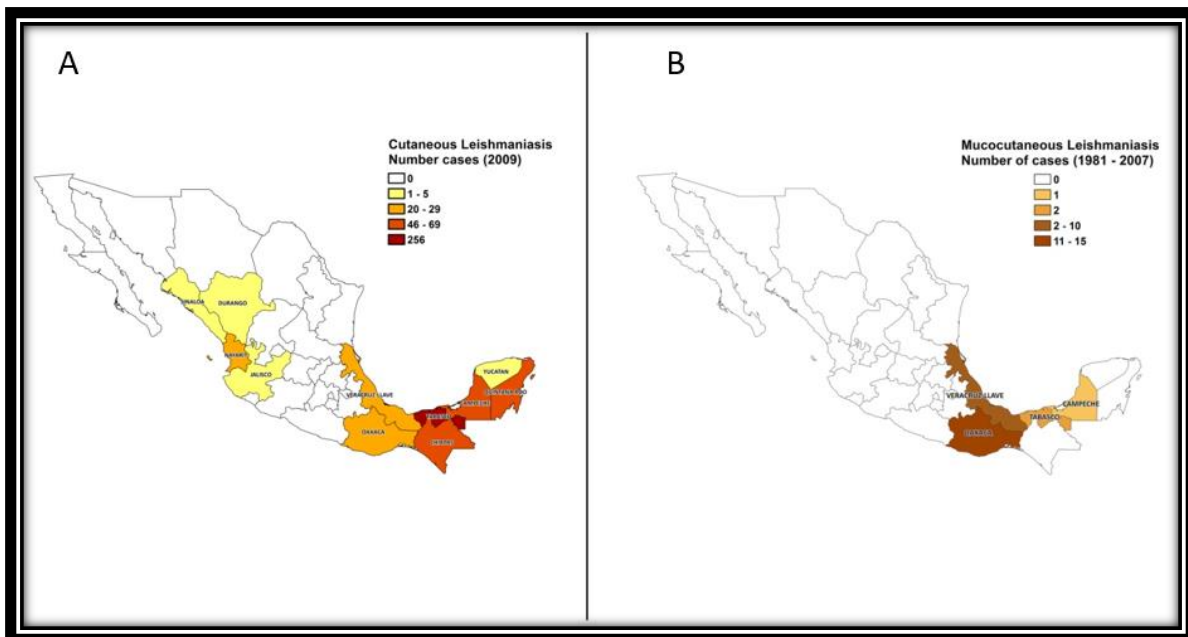


Figura 8. Mapa de prevalencia de casos de leishmaniasis cutánea (A) y mucocutánea (B) en México en 2009. Tomado de Alvar *et al.*, 2012.

Muchos laboratorios en el mundo han estudiado a *Leishmania* debido a su evidente importancia médica. Sin embargo, *Leishmania* y otros tripanosomátidos son también importantes en los campos de la genética y la biología molecular debido a que poseen mecanismos de expresión genética muy particulares, diferentes a los

que se presentan en otros organismos eucariontes. Nuestro laboratorio está interesado en el estudio de la transcripción en *Leishmania*, proceso que, como se discutirá más adelante, rompe con los paradigmas de la expresión génica en eucariontes.

1.3 Transcripción en eucariontes

La transcripción es un proceso permanente durante la vida celular y se puede entender como el proceso bioquímico y molecular en el cual se sintetizan moléculas de RNA a partir de una secuencia molde de DNA, a través de enzimas especializadas denominadas RNA polimerasas. Las RNA polimerasas son complejos proteicos que están presentes en todos los organismos vivos. En bacterias y archaeas únicamente se encuentra una RNA polimerasa, encargada de sintetizar todas las especies necesarias de RNAs. Por el contrario, los organismos eucariontes dividen el trabajo de la transcripción de RNA en al menos tres RNA polimerasas (Pol I, II y III).

Pol II sintetiza una gran variedad de RNAs, tales como los mRNAs de los genes codificantes de proteínas, RNAs pequeños nucleares (snRNA) y microRNAs. Los niveles de transcripción de esta polimerasa en levadura se estiman en alrededor de 60,000 moléculas de RNA por cada generación (Lesniewska y Boguta, 2017). Por otro lado, Pol I se encarga de la síntesis de los RNA ribosomales (rRNAs) 18S, 5.8S y 28S, que son componentes estructurales y funcionales de los ribosomas. Pol III transcribe RNAs pequeños, requeridos para la traducción de proteínas y el procesamiento de mRNAs, como el rRNA 5S, los RNAs de transferencia (tRNAs) y el snRNA U6 (Orioli *et al.*, 2012 y Khatter *et al.*, 2017). Los niveles de transcripción de estas dos últimas enzimas alcanzan 300,000 rRNAs y hasta 3 millones de tRNAs por cada generación en levaduras (Lesniewska y Boguta, 2017).

El inicio de la transcripción requiere la formación de complejos de inicio, los cuales se ensamblan en las regiones promotoras. Los factores generales de transcripción reconocen elementos específicos en los promotores, reclutan la RNA polimerasa

correspondiente y permiten la apertura del DNA para la síntesis transcripcional (Vannini y Cramer, 2012).

1.3.1 RNA polimerasa I

Pol I de levadura ha sido ampliamente caracterizada y está constituida por 14 subunidades y posee una masa molecular de 590 kDa (Tabla 1). De forma característica, los genes de los rRNA 18S, 5.8S y 28S están organizados juntos, formando la unidad del rRNA. Un organismo puede contener cientos de copias de la unidad del rRNA, arregladas en tándem en uno o varios cromosomas (Figura 9). Los tres genes de la unidad del rRNA se transcriben juntos generando un rRNA precursor que contiene espaciadores internos y externos (Figura 9). Dicho precursor debe ser procesado para dar lugar a las moléculas de rRNA maduras (Tsekrekou *et al.*, 2017).

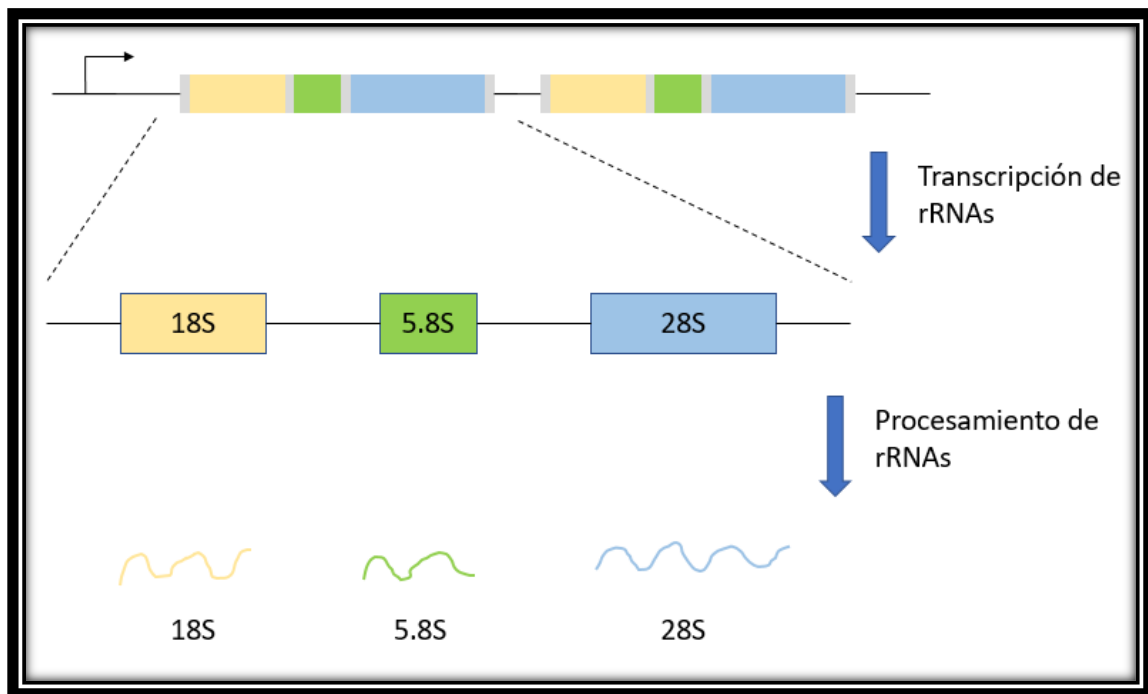


Figura 9. Transcripción de Pol I y procesamiento de rRNAs. Se muestran dos unidades del rRNA, cada una con los genes de los rRNA 18S, 5.8S y 28S. La flecha indica el sitio de inicio de la transcripción. Se produce un transcrito primario que incluye espaciadores internos y externos, que se representan con líneas horizontales.

1.3.1.1 Promotores y factores de transcripción de Pol I

Los promotores se han definido como la secuencia mínima requerida de DNA para el inicio directo y preciso de la transcripción. Generalmente, el *core* del promotor incluye el sitio de inicio de la transcripción (TSS por sus siglas en inglés) y se extiende ~35 pb río arriba y/o río debajo del TSS (Butler y Kadonaga, 2002). Los promotores de Pol I están generalmente formados por dos regiones: un dominio central (que abarca de la posición +20 a la -40, en relación al TSS) y un dominio río arriba (que se extiende aproximadamente de -80 a -150). Para que Pol I pueda iniciar la transcripción requiere de dos factores de transcripción generales, UBF y SL1. De manera interesante, SL1 está formado por varias subunidades, una de las cuales corresponde a la proteína de unión a la caja TATA (TBP), necesaria también para la transcripción de Pol II y Pol III (Kwon y Green, 1994; Panov *et al.*, 2006).

1.3.2 RNA Polimerasa II

Pol II está formada por 12 subunidades y tiene una masa de ~550 kDa. La transcripción de Pol II ha sido ampliamente estudiada, debido a que transcribe los genes codificadores de proteínas. El reclutamiento de Pol II se lleva a cabo por regiones promotoras y una serie de factores generales de transcripción altamente especializados.

1.3.2.1 Promotores y factores de transcripción de Pol II

La región promotora basal de Pol II está compuesta de varios elementos *core*, incluidos la caja TATA, un iniciador (Inr), el elemento de reconocimiento de TFIIB (BRE) y elemento promotor río abajo (DPE) (Butler y Kadonaga, 2002; Hahn, 2004). Cada promotor contiene diferentes combinaciones de éstos y otros elementos *core*, los cuales son reconocidos por los factores de transcripción generales (Figura 10).

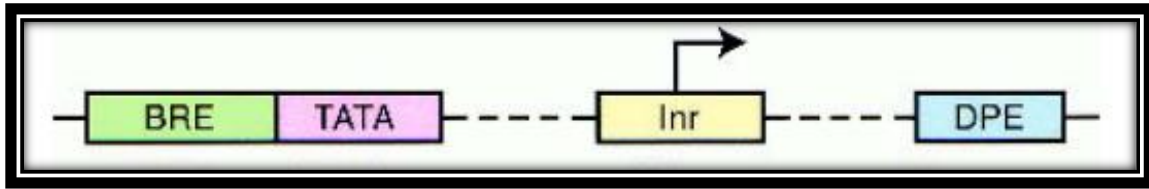


Figura 10. Esquematación de los elementos que conforman un promotor típico de Pol II. Con cajas se representan los elementos del promotor: elemento de reconocimiento de TFIIB (BRE), caja TATA, iniciador (Inr) y elemento promotor río abajo (DPE).

El complejo multi-proteico requerido para el inicio de la transcripción de los genes codificantes de proteínas involucra la unión específica de varios factores generales de transcripción al promotor (Hahn, 2004). Se ha establecido que TFIID está conformada por TBP y al menos 10 polipéptidos más, denominados factores asociados a TBP (TAFs). La unión de TFIID al promotor, a través de la subunidad TBP, representa el primer paso en la transcripción mediada por Pol II. Posteriormente, TFIIA y TFIIB pueden estabilizar esta interacción y además TFIIB puede establecer uniones específicas con el DNA, necesarias para el reclutamiento de Pol II previamente unida a TFIIF, que termina por formar el complejo de pre-inicio (PIC por sus siglas en inglés) junto con TFIIE y TFIIH (Elsby y Roberts, 2008; Deng y Roberts, 2007).

Todos estos factores de transcripción permiten la formación del PIC en eucariontes, mientras que en procariontes se requiere únicamente del factor sigma (σ) y en archaeas se emplean homólogos reducidos de TBP, TFIIB y TFIIE (Deng y Roberts, 2007).

1.3.3 Transcripción mediada por la RNA polimerasa III

Pol III está constituida por 17 subunidades y 700 kDa de masa aproximadamente, lo que la convierte en la RNA polimerasa más grande y compleja (Tabla 1). El core se compone de 10 subunidades: C128 y C160 (que forman la hendidura del sitio activo), AC40 y AC19 (compartidas con Pol I), C11 (involucrada en la terminación

de la transcripción), y ABC27, ABC23, ABC14.5, ABC10 α y ABC10 β (cinco subunidades pequeñas, compartidas por las tres RNA polimerasas). En la periferia del *core* se encuentran dos sub-complejos más: C82-C34-C31 y C53-C37. Finalmente, C17 y C25 forman una estructura en forma de tallo necesaria para el inicio de la transcripción (Tabla 1) (Vannini y Cramer, 2012; Lesniewska y Boguta, 2017).

Tabla 1. Subunidades de las diferentes RNA polimerasas en eucariontes

Pol I	Pol II	Pol III
A190	Rpb1	C160
A135	Rpb2	C128
AC40	Rpb3	AC40
AC19	Rpb11	AC19
ABC23	ABC23	ABC23
ABC27	ABC27	ABC27
ABC14.5	ABC14.5	ABC14.5
ABC10 β	ABC10 β	ABC10 β
ABC10 α	ABC10 α	ABC10 α
A12.2	Rpb9	C11
A43	Rpb7	C25
A14	Rpb4	C17
A49		C53
A34.5		C37
		C82
		C34
		C31

1.3.3.1 Promotores de Pol III

Las regiones promotoras del Pol III son altamente conservadas y específicas, y se pueden clasificar en tres tipos principales. Los promotores tipo 1 son característicos de genes de rRNA 5S y constan de una región de control interno (ICR) río abajo del sitio de inicio de la transcripción, la cual está formada por la caja A, la caja C y un elemento intermedio (IE) (Figura 11). Los promotores tipo 2 están presentes en genes de tRNAs y constan de una caja A y una caja B dentro de la región a transcribir; y, por último, los promotores tipo 3, presentes en los genes de snRNA U6, constan de elementos río arriba del sitio de inicio de la transcripción: caja TATA, elemento de secuencia proximal (PSE) y elemento de secuencia distal (DSE) que potencializa la transcripción (Figura 11) (Schramm y Hernández, 2002).

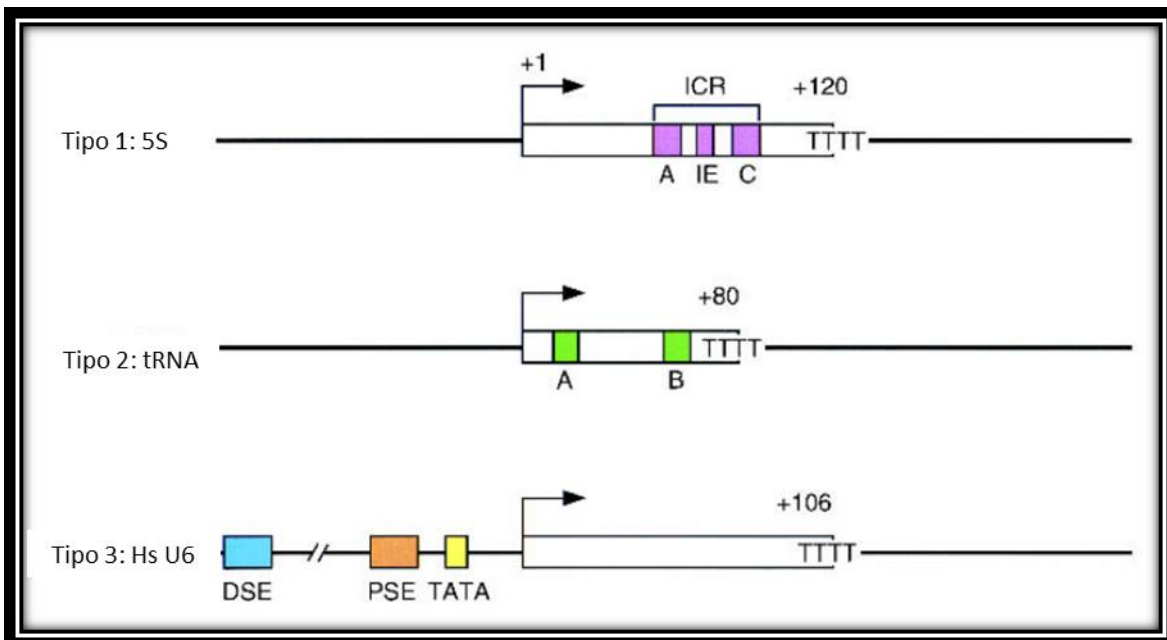


Figura 11. Tres tipos de regiones promotoras en Pol III. El tipo 1 corresponde al gen del rRNA 5S y el tipo 2 está presente en los tRNA. Los genes del snRNA U6 contienen un promotor tipo 3. Tomado de Schramm y Hernández (2002).

1.3.3.2 Factores de transcripción de Pol III

Pol III presenta cinco subunidades más que Pol II, que forman dos sub-complejos independientes: C53/C37 y C82/C34/C31. Estos subcomplejos son homólogos a los factores de transcripción TFIIF y TFIIE de Pol II, respectivamente. Para la formación del complejo de preinicio, Pol III requiere la participación de tres factores de transcripción generales: TFIIIA, TFIIB y TFIIC (Hu *et al.*, 2015). TFIIIA fue uno de los primeros factores de transcripción caracterizados. Está formado por un solo polipéptido, el cual contiene 9 dedos de zinc. Por otra parte, TFIIC está formado por 6 subunidades, las cuales forman dos subcomplejos, denominados τ A y τ B, unidos por un *linker* estrecho (Acker *et al.*, 2013; Lesniewska y Boguta, 2017) (Figura 12).

En los promotores del tipo 1, TFIIIA reconoce la caja A y posteriormente TFIIC se une a la caja C. Después se une TFIIB, quien recluta a Pol III para que se inicie la transcripción (Canella *et al.*, 2010) (Figura 12). Durante la transcripción de los genes con promotor tipo 2 (tRNAs), la caja A es reconocida por el subcomplejo τ A de TFIIC, mientras τ B se une a la caja B (Figura 13). La unión de τ B a la caja B es fuerte, mientras que τ A se une a la caja A débilmente (Schramm y Hernández, 2002). Esto genera una interacción DNA-proteína, permitiendo el posicionamiento del factor TFIIB, encargado de reclutar a Pol III.

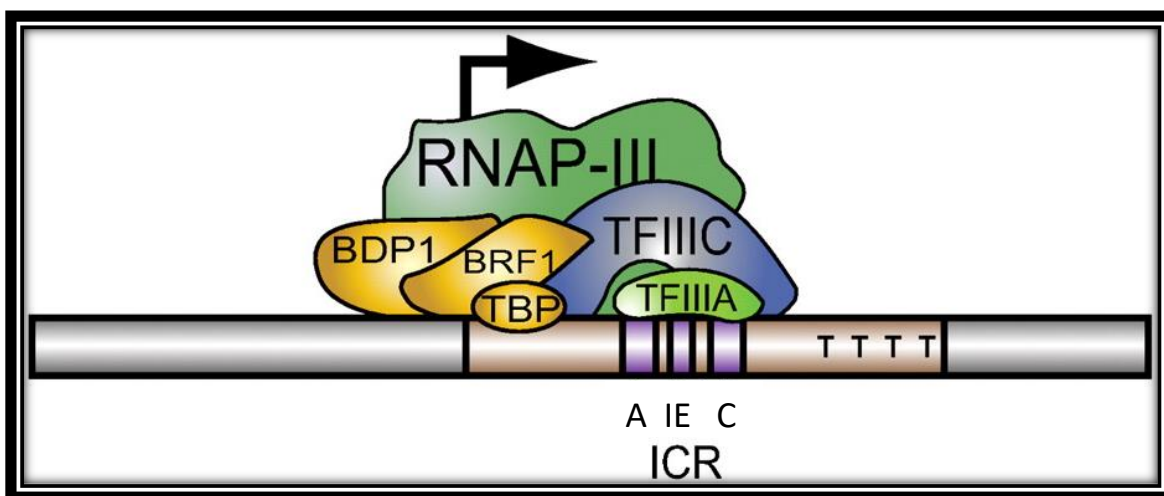


Figura 12. Representación esquemática del complejo de pre-inicio de un promotor tipo 1. Con color amarillo se presentan las 3 subunidades de TFIIIB (Bdp1, Brf1 y TBP). También se muestran TFIIIA y TFIIIC. Tomado de Canella *et al.* (2010).

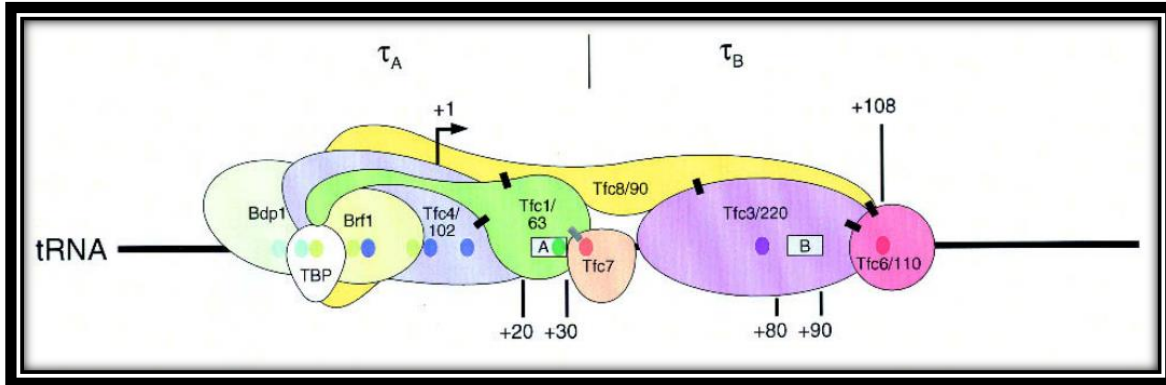


Figura 13. Formación de los complejos τ_A y τ_B de TFIIIC en promotores tipo 2. Se muestran las 6 subunidades de TFIIIC y las 3 subunidades de TFIIIB (Bdp1, Brf1 y TBP). Tomado de Schramm y Hernández (2002).

Los promotores tipo 3, cuyos elementos se encuentran río arriba de la región a transcribir, no contienen sitios de unión a TFIIIA ni TFIIIC, por lo que no se han observado efectos en la síntesis del snRNA U6 después de eliminar alguno de estos dos factores de transcripción (Lagna *et al.*, 1994). El PSE de estos promotores recluta al factor SNAP_c, el cual está conformado por 5 subunidades (SNAP190, SNAP50, SNAP45, SNAP43 y SNAP19). Además, TBP de TFIIIB reconoce y se une a la caja TATA (Schramm y Hernández, 2002).

1.3.3.3 Factor de transcripción TFIIIB

El factor general de transcripción TFIIIB está constituido por 3 subunidades proteicas: la proteína de unión a la caja TATA (TBP), Bdp1 y Brf1 (Figura 14). Este factor hace posible el reclutamiento y posicionamiento de Pol III al sitio de inicio de la transcripción en todos los genes transcritos por esta RNA polimerasa (Schramm y Hernández, 2002; Kassavetis *et al.*, 2006). En ensayos de co-purificación, se ha

determinado que TBP y Brf1 se unen fuertemente, mientras que Bdp1 se disocia con facilidad durante el proceso de purificación (Hu *et al.*, 2015).

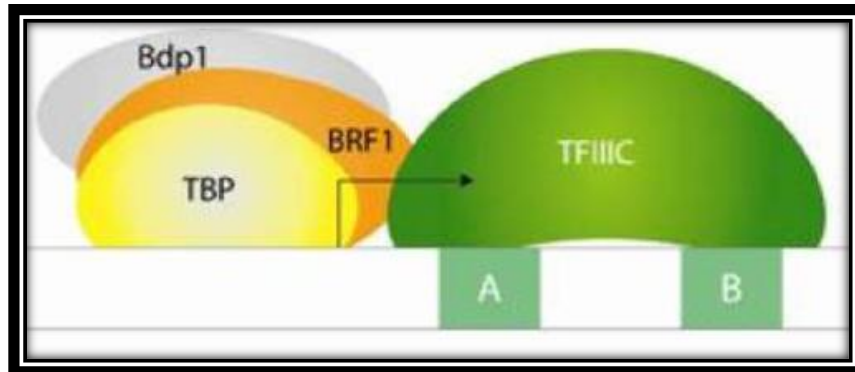


Figura 14. Factor de transcripción TFIIB, formado por las subunidades Bdp1, Brf1 y TBP. También se muestra el factor TFIIC unido a las cajas A y B de un gen de tRNA.

Los vertebrados poseen una versión alternativa de TFIIB que contiene Brf2 (en lugar de Brf1), y está involucrado exclusivamente en la transcripción de genes con promotor tipo 3 (White, 2011; Gouge *et al.*, 2017).

1.3.3.4 Subunidad Brf1

Brf1 forma parte de la familia de los factores de transcripción TFIIB-*like*, al igual que TFIIB (en Pol II), Rrn7 y TAF1B (en Pol I). La subunidad Brf1 es la más grande del factor TFIIB y en levadura tiene una masa molecular de ~70 kDa. Presenta dos grandes dominios identificados como N-terminal (altamente relacionado con TFIIB) y C-terminal, que resulta ser específico para Pol III. El dominio N-terminal, compartido entre las proteínas de la familia TFIIB-*like*, incluye motivos conservados entre los diferentes ortólogos: un zinc-*ribbon* y dos repetidos imperfectos de ciclina que presentan estructuras secundarias determinadas (Kassavetis *et al.*, 2006).

El motivo zinc-*ribbon* forma una lámina β y en TFIIB de levadura se han identificado 4 residuos de cisteína o histidina coordinadores de un ion zinc (Cys-X₂-His/Cys-X₁₅₋₁₇-Cys-X₂-Cys) que son los responsables de la formación del denominado dedo de

zinc (Chen *et al.*, 2000). La función principal de este motivo es establecer uniones DNA-proteína y participa en la apertura del promotor (Hahn y Roberts, 2000; Chen *et al.*, 2000). Por otro lado, cada repetido de ciclina está constituido por 5 α -hélices que establecen interacciones con TFIIIC y con las subunidades C17 y C34 de Pol III (Noble *et al.*, 1997).

El dominio C-terminal de Brf1 no está conservado, aunque entre diferentes especies de levaduras e incluso en humano se han identificado tres regiones medianamente conservadas, llamadas bloques de homología I-III (Khoo *et al.*, 2014).

1.4 Expresión genética en *Leishmania*

1.4.1 Organización genómica

El total del genoma de *L. major* representa alrededor de 32.8 megabases (Mb) y está organizado en 36 cromosomas de un tamaño relativamente pequeño, de 0.28 a 2.8 Mb. Resulta importante el estudio de la cepa Friedlin de *L. major*, pues su cromosoma 1 fue el primero en ser secuenciado completamente (Myler *et al.*, 1999) y también fue la primera cepa de *Leishmania* en ser sometida a secuenciación genómica completa (Ivens *et al.*, 2005). Al igual que en otras células eucariontes, los cromosomas de *Leishmania* contienen repeticiones teloméricas GGGTTA. Además, presentan regiones sub-teloméricas con elementos repetidos variables que están involucrados en la mayoría de los polimorfismos observados entre cromosomas homólogos (Padilla-Mejía *et al.*, 2013).

Leishmania y otros tripanosomátidos presentan una organización y expresión génica particulares. A diferencia de otros eucariontes, el genoma de los tripanosomátidos está organizado en *clusters* policistrónicos largos, que generalmente contienen de decenas a cientos de genes codificantes de proteínas en la misma hebra de DNA (Martínez-Calvillo *et al.*, 2010). Por ejemplo, el cromosoma 1 de *L. major* está compuesto por 85 genes organizados en dos *clusters* policistrónicos divergentes, de forma que hay 32 genes agrupados en la hebra inferior y 53 en la hebra superior (Myler *et al.*, 1999; Martínez-Calvillo *et al.*, 2010).

La secuenciación del genoma completo de *L. major* reveló que los genes de todos los cromosomas están organizados en *clusters* policistrónicos (Ivens *et al.*, 2005).

Los tripanosomátidos contienen un número reducido de genes del rRNA. Por ejemplo, *L. major* presenta alrededor de 12 copias de la unidad del rRNA, las cuales están arregladas en tándem, en el cromosoma 27, entre *clusters* policistrónicos de Pol II (Martínez-Calvillo *et al.*, 2001). Asimismo, *L. major* posee 83 genes de tRNA, un número bajo considerando que otros organismos pueden contener varios cientos de genes de tRNAs. Los 83 genes están distribuidos en 19 cromosomas, en grupos de 2 a 10 genes tanto en la hebra superior como en la hebra inferior, asociados a otros genes transcritos por Pol III, como 5S rRNAs o snRNAs (Martínez-Calvillo *et al.*, 2010). Se ha propuesto que estas particularidades están relacionadas con la divergencia temprana de estos organismos.

1.4.2 Transcripción en tripanosomátidos

Como se ha expuesto, la transcripción de Pol II en tripanosomátidos es policistrónica. Cada cromosoma cuenta con al menos dos unidades policistrónicas, cuya transcripción puede ser divergente (con dirección a los telómeros) o convergente (alejándose de los telómeros) (Martínez-Calvillo *et al.*, 2003; 2004). El grado de conservación en el orden de estos genes (sintenia) es un carácter sobresaliente en estos organismos (El-Sayed *et al.*, 2005).

En la Figura 15 se esquematiza el proceso de transcripción policistrónica, donde a partir de un *cluster* direccional se sintetiza un transcrito primario largo que contiene una serie de genes codificantes que generalmente no están relacionados funcionalmente unos con otros. Posteriormente se realiza el *trans-splicing*, donde al extremo 5' de cada pre-mRNA se le adiciona un elemento de 39 nucleótidos denominado RNA *spliced-leader* (SL) o mini-exón, que aporta el cap, por lo que protege a los mRNAs maduros de la degradación.

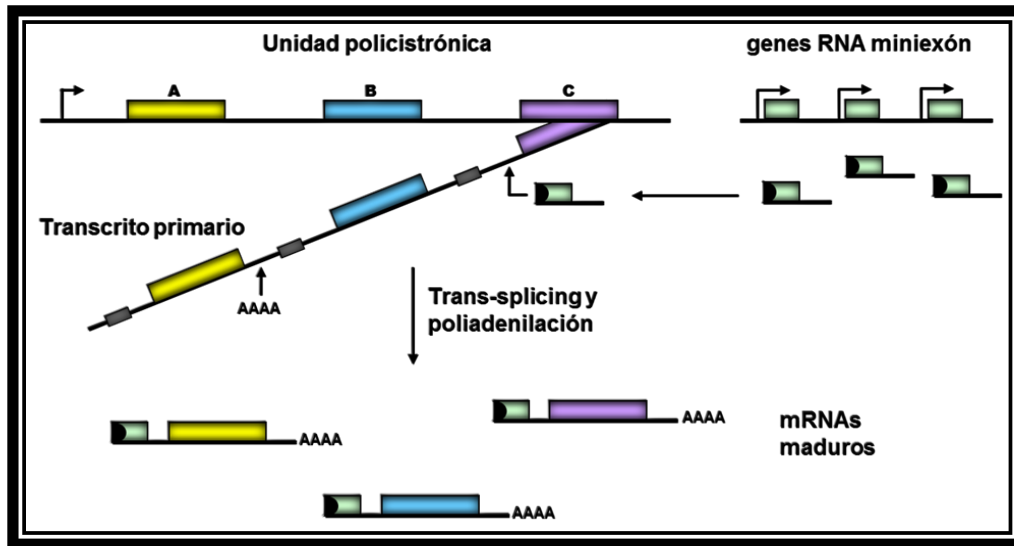


Figura 15. Representación esquemática de la transcripción policistrónica y *trans-splicing* en tripanosomátidos. Se presenta un *cluster* policistrónico hipotético y los genes de RNA SL, ambos transcritos por Pol II. Se forma un transcrito primario largo mediante transcripción policistrónica a partir del sitio de inicio representado con una flecha y el posterior procesamiento mediante *trans-splicing*, en el que se agrega el SL al extremo 5' de cada pre-mRNA y una cola de poli-A al extremo 3', formando entonces los mRNAs maduros. Tomado de Martínez-Calvillo *et al.* (2012).

Los genes del RNA SL contienen el único promotor de Pol II que se ha caracterizado en tripanosomátidos. Dicha región promotora en *L. tarentolae* consta de dos elementos río arriba del SIT, el elemento -60 (de -67 a -58) y el elemento -30 (de -40 a -31) (Figura 17) (Campbell *et al.*, 2000; Martínez-Calvillo *et al.*, 2010). El promotor del RNA SL de otros tripanosomátidos también es relativamente corto, pudiendo estar conformado por 1 a 3 elementos (Figura 16) (Campbell *et al.*, 2000). Varios factores generales de transcripción de Pol II participan en la síntesis del RNA SL de *T. brucei*. Entre éstos se encuentra TBP, TFIIA, TFIIB y TFIIH (Lee *et al.*, 2009).

De forma interesante, la síntesis de los mRNAs que codifican para las glicoproteínas variantes de superficie (VSGs por sus siglas en inglés) es llevada a cabo por Pol I en *T. brucei*, y no por la Pol II. Así, la Pol I de *T. brucei* es la única enzima que, además de sintetizar rRNA, es capaz de producir mRNAs (Günzl *et al.*, 2003).

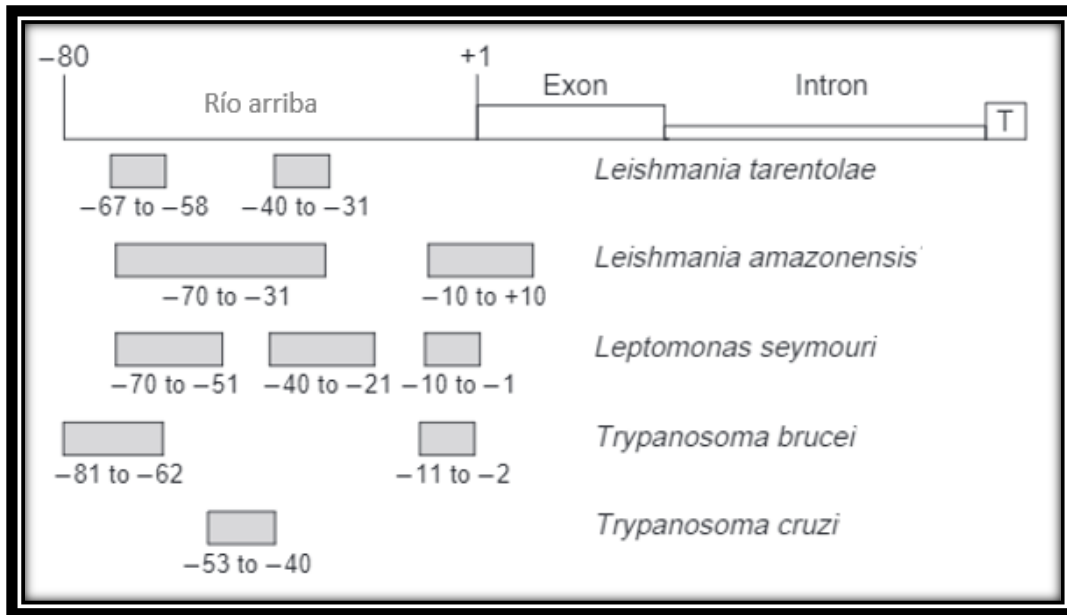


Figura 16. Elementos del promotor del RNA *spliced-leader* transcrita por Pol II en algunos tripanosomátidos. Modificado de Campbell *et al.* (2000).

Asimismo, se ha reportado que la transcripción de Pol III en tripanosomátidos es también atípica en relación a otros eucariontes. Esto debido a que en estos parásitos Pol III transcribe todos los snRNAs, y no sólo el U6, como ocurre en otros eucariontes (Rojas-Sanchez *et al.*, 2016). Por otro lado, de los factores generales de Pol III, sólo ha sido identificado TFIIB en los tripanosomátidos (Campbell *et al.*, 2000).

1.5 Purificación de complejos proteicos

Gran cantidad de procesos biológicos celulares se llevan a cabo principalmente por complejos proteicos. La secuenciación de genomas completos nos provee de una gran oportunidad para analizar las diferentes funciones realizadas por los genes, por lo que resulta imprescindible identificar los componentes de grandes complejos para entender los mecanismos de acción dentro de la célula. Precisamente, se han desarrollado metodologías experimentales para dicho objetivo, como la purificación por afinidad en tándem (TAP por sus siglas en inglés), que en conjunto con análisis

por espectrometría de masas ha permitido identificar complejos proteicos en levadura y otros eucariontes (Forler *et al.*, 2003; Xiaoli *et al.*, 2010).

El experimento TAP-tag consiste en la generación de un vector en el que la bandera TAP sea fusionada al gen de nuestra proteína blanco. El tag está conformado por dos dominios de unión de IgG a proteína A (Prot A) de *Staphylococcus aureus* y un péptido de unión a IgG a calmodulina (CBP), los cuales están separados por un sitio de corte de la proteasa TEV (Figura 17). El vector resultante es transfectado en las células, para que se exprese la proteína recombinante e interaccione normalmente con las demás proteínas del complejo del que forma parte. La proteína marcada es purificada mediante cromatografías de afinidad a los diferentes epítopes de la bandera TAP bajo condiciones no desnaturalizantes.

Una modificación a esta técnica recibe el nombre de PTP-tag y consiste en la sustitución del dominio de unión CBP por un epítipo de la proteína C hepática (Prot C) para contrarrestar la ineficiencia del dominio de unión de IgG a CBP durante la purificación (Figura 17) (Schimanski *et al.*, 2005).

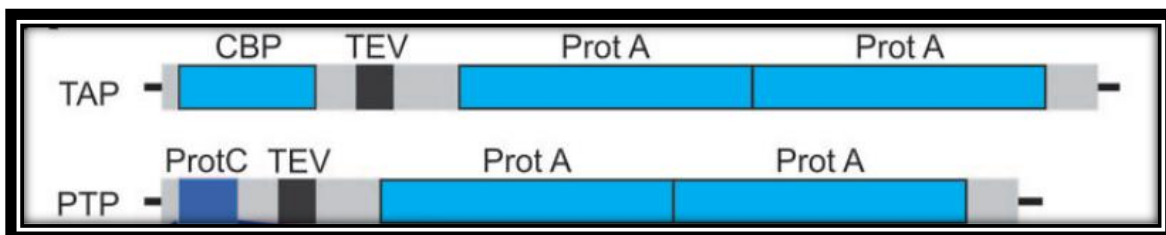


Figura 17. Péptidos de extracción usados durante purificaciones por afinidad en tándem. En la parte superior se esquematiza el péptido TAP-tag constituido por dos dominios de unión de IgG a Prot A, sitio de corte de la proteasa TEV y un epítipo de unión a calmodulina (CBP); mientras que en la parte inferior se presenta la sustitución del dominio CBP por un dominio de Prot C, conformando el péptido PTP-tag. Tomado de Schimanski *et al.* (2005).

1.6 Antecedentes

El conocimiento sobre transcripción en *Leishmania* y otros tripanosomátidos es escaso. Purificaciones por afinidad en tándem y análisis *in silico* han permitido la

identificación de la mayoría de las subunidades de las tres RNA polimerasas (Martínez-Calvillo *et al.*, 2010). Sin embargo, se ha reportado que en *L. major* se presentan dos isoformas de la subunidad ABC23 (llamadas ABC23 y ABC23z), donde ABC23z pareciera estar restringida únicamente a Pol I, mientras que ABC23 está presente en los complejos de Pol II y Pol III (Martínez-Calvillo *et al.*, 2007).

De manera interesante, en tripanosomátidos no se han encontrado los factores de transcripción TFIIIA ni TFIIIC, a pesar de que en otros eucariontes son indispensables para sostener la viabilidad celular. Únicamente se han encontrado los genes que codifican para las tres subunidades de TFIIIB: TBP, Bdp1 y Brf1. La subunidad TBP fue caracterizada en *T. brucei* por Ruan y colaboradores (2004), mientras que Bdp1 ha sido estudiada en *L. major* por Roman-Carraro (2012).

Por otra parte, un estudio en *T. brucei* reveló que el *knock-down* de Brf1 mediante RNA de interferencia conduce a la muerte de formas procíclicas (Vélez-Ramírez *et al.*, 2015). Intentos por deletar ambas copias alélicas del gen de Brf1 en *L. major* no fueron exitosos, lo que sugiere que Brf1 es también un gen esencial en este parásito (Gómez-García, 2015). En el presente trabajo se continuará con el estudio de Brf1 en *L. major*, intentando ahora eliminar las dos copias alélicas de Brf1 en un cultivo que expresa, a partir de episomas, a Brf1 fusionado a la bandera PTP (Flores-Pérez, 2011). Esta bandera consiste de dos epítopes de proteína A, uno de proteína C y un sitio de corte de la proteínasa TEV. Se esperaría que la presencia de la proteína recombinante Brf1-PTP permita la eliminación de las dos copias endógenas del gen de Brf1. De esta manera, el objetivo de este trabajo es eliminar, mediante recombinación homóloga, las dos copias endógenas del gen Brf1 en un cultivo de promastigotes de *L. major* que exprese la proteína recombinante Brf1-PTP. Este constituirá un primer paso para el esclarecimiento del papel que juega Brf1 en la transcripción de Pol III en *Leishmania*.

2. HIPÓTESIS

En diversos organismos, la subunidad Brf1 del factor de transcripción TFIIIB cumple funciones esenciales para la viabilidad celular. La eliminación de las dos copias alélicas del gen no se ha logrado en *L. major*, lo que sugiere fuertemente que Brf1 es también esencial para el crecimiento de este parásito. No obstante, al trabajar con una línea celular de promastigotes de *L. major* que exprese la proteína recombinante Brf1-PTP se esperaría que fuese posible la eliminación de las dos copias alélicas de Brf1.

Las interacciones proteína-proteína que establece Brf1 podrían ser determinadas mediante ensayos de purificación por afinidad en tándem y espectrometría de masas. Se esperaría identificar otras proteínas participantes del proceso de transcripción de Pol III en este parásito de divergencia temprana, como otras subunidades de TFIIIB o subunidades de Pol III.

3. OBJETIVOS

Objetivo general

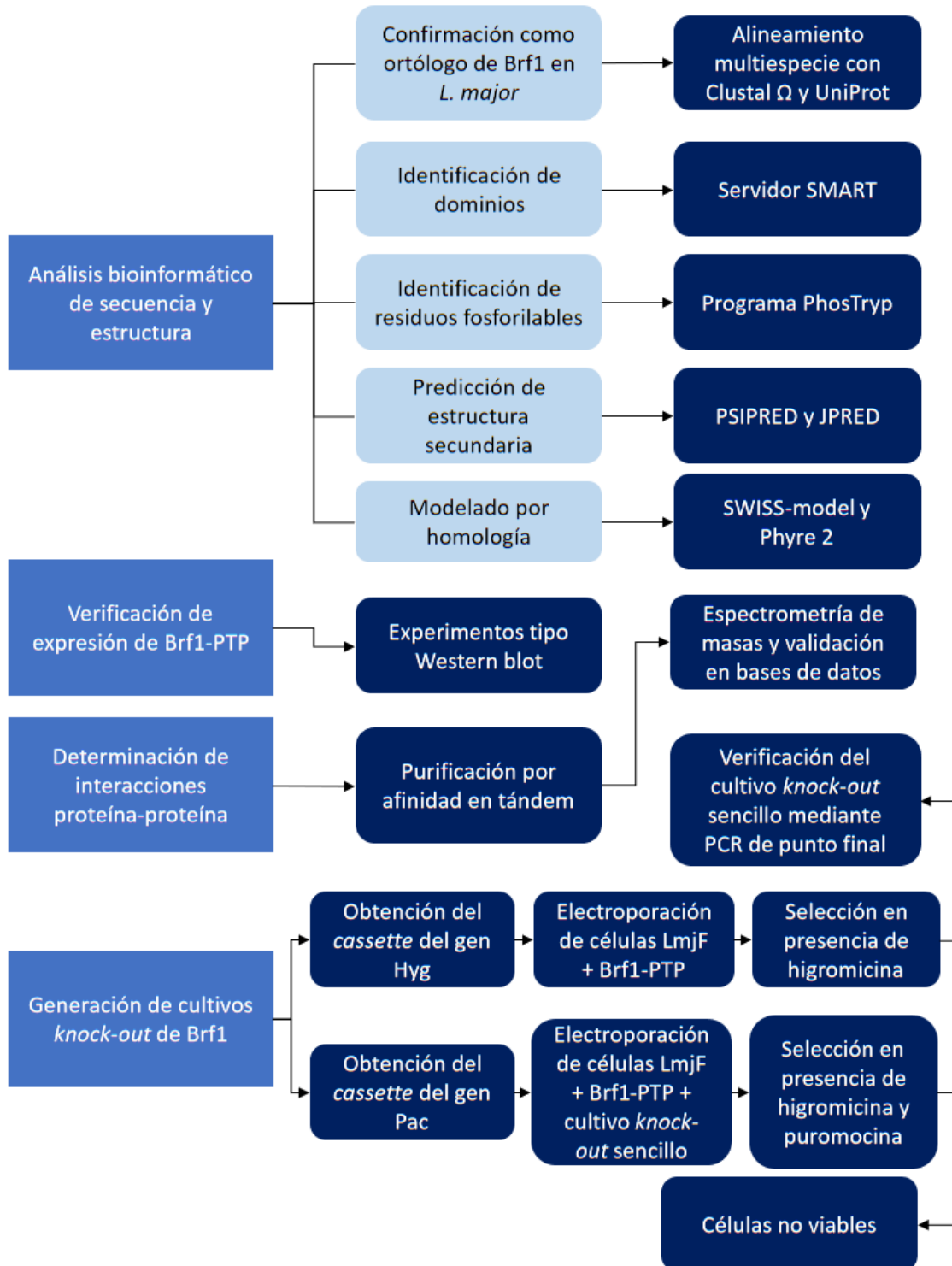
Identificar las proteínas con las que interactúa Brf1 en *L. major*. Asimismo, intentar la obtención de mutantes nulas de Brf1 en un cultivo que exprese la proteína recombinante Brf1-PTP.

Objetivos particulares

- Analizar la secuencia y estructura de Brf1 mediante herramientas de bioinformática.
- Verificar la correcta expresión de la proteína recombinante Brf1-PTP en el cultivo *L. major* + Brf1-PTP.
- Determinar las interacciones proteína-proteína que establece Brf1 mediante experimentos de purificación por afinidad en tándem y espectrometría de masas.
- Obtener y caracterizar clonas celulares en las que se haya eliminado una copia endógena del gen de Brf1 (*knock-out* sencillo), a partir del cultivo *L. major* + Brf1-PTP.
- Intentar generar clonas celulares en las que las dos copias endógenas de Brf1 hayan sido eliminadas (*knock-out* doble).

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Estrategia experimental



4.2 Análisis bioinformáticos

Las secuencias de los ortólogos de Brf1 entre las diferentes especies se obtuvieron de la base de datos de NCBI y de TriTrypDB (<http://tritrypdb.org/tritrypdb/>). Para el alineamiento multiespecie se utilizó el servidor Clustal Omega (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) y UniProt (<http://www.uniprot.org/align/>). La identificación de dominios se realizó con SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de/>). La predicción de la estructura secundaria se obtuvo mediante los programas PSIPRED (<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/>) y JPRED (<http://www.compbio.dundee.ac.uk/jpred/>). La identificación de residuos fosforilables putativos se realizó con el programa PhosTryp, específico para tripanosomátidos (<http://phostryp.bio.uniroma2.it/>).

El modelado por homología se realizó utilizando los servidores SWISS-MODEL (<https://swissmodel.expasy.org/>) y Phyre 2 (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/~phyre2/html/page.cgi?id=index>). El modelo obtenido se editó utilizando el software Swiss-PDB Viewer (<https://spdbv.vital-it.ch/>).

4.3 Cultivo y conteo celular

Promastigotes procíclicos de *L. major* cepa Friedlin fueron crecidos y mantenidos a 27°C en medio BM (suero fetal bovino descomplementado al 10%, infusión 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 7.4), hasta alcanzar fase media de crecimiento logarítmico en 5 mL totales de medio.

El conteo de parásitos se realizó mediante dilución 1:10 (50 µL de cultivo diluidos con 450 µL de PBS-formaldehído al 2%). Se colocaron 10 µL de dicha dilución en una cámara de Neubauer y se contó el número de células dentro de los cuadros en diagonal de cada cuadrante de la esquina. La suma total de células se multiplicó por 10⁴ para obtener el número de parásitos por mililitro de cultivo.

Para la crio-preservación de las líneas celulares, se tomaron 1×10⁸ células, se centrifugaron a 4000 rpm durante 10 minutos a 4°C. Las células se resuspendieron

en 1 mL de suero fetal bovino descomplementado con 10% de glicerol y se transfirieron a un criovial que fue almacenado a -70°C por 24 horas, para después colocarlo en un tanque con nitrógeno líquido. Cuando fue necesario, los crioviales se descongelaron y se diluyeron en 4 mL de medio BM sin drogas de selección. 24 horas después se les agregó la mitad de la concentración de drogas y 48 horas después el resto para completar la concentración final de cada antibiótico.

4.4 Purificación de plásmidos

Las construcciones con los genes de resistencia a antibióticos se obtuvieron a partir de la purificación de plásmidos a gran escala (Maxiprep), que se realizó a partir de colonias bacterianas blancas (resistentes a ampicilina e incapaces de digerir X-Gal) almacenadas a -70°C en glicerol. Las bacterias se crecieron en placas de agar LB con ampicilina (0.01%) a 37°C durante 24 horas para activarlas. Posteriormente, las colonias se inocularon en 1 L de medio LB líquido con ampicilina ($100\ \mu\text{g}/\text{mL}$) y se incubaron en agitación a 200 rpm durante toda la noche. Para la purificación se empleó el kit NucleoBond^R Xtra Maxi EF (Macherey-Nagel) siguiendo las indicaciones del fabricante. A partir del cultivo crecido *over-night* se determinó la densidad óptica mediante espectrofotometría ($>2\ \text{OD}$; $\lambda = 600\ \text{nm}$), sin embargo, no se alcanzó la densidad óptica requerida, por lo que se centrifugó a $4500 \times g$ durante 10 minutos a 4°C en tubos cónicos de 50 mL, se descartó el sobrenadante y se determinó la masa de la pastilla ($\sim 3\ \text{g}$). Las pastillas se resuspendieron en 12 mL del *buffer* RES-EF. Posteriormente, se agregaron 12 mL de *buffer* LYS-EF y se homogeneizó por inversión (4-6 veces) y se incubó a temperatura ambiente por 5 minutos. Durante este tiempo, se equilibró una columna NucleoBond^R Xtra con 35 mL de *buffer* EQU-EF, teniendo especial cuidado en únicamente humedecer los bordes de la columna. A continuación, se neutralizó la lisis con 12 mL de *buffer* NEU-EF homogeneizando 10-15 veces por inversión. Para el paso de clarificación se centrifugó la muestra a $6000 \times g$ durante 5 minutos, con el fin de llevar los restos celulares a la pared del tubo. Después se cargó la fracción líquida a la columna y se permitió que se desplazara por gravedad. Posteriormente, se agregaron 10 mL

de *buffer* FIL-EF y luego 90 mL de *buffer* ENDO-EF. Se hizo un lavado más con 45 mL de *buffer* WASH-EF y después se eluyó el DNA con 15 mL de *buffer* ELU-EF. Aunado a lo anterior, el material se concentró con 200 μ L de *buffer* TE-EF mediante NucleoBond[®] Finalizers. El DNA se cuantificó y analizó en geles de agarosa al 0.8%.

4.5 Obtención de los cassettes de resistencia a antibióticos

Las copias endógenas del gen de Brf1 serían reemplazadas por los genes de resistencia a higromicina (Hyg) y a puromicina (Pac) que se encontraban en los plásmidos p Δ Brf1-Pac y p Δ Brf1-Hyg (Figura 18), previamente generados (Gómez-García, 2015). Se realizaron digestiones con enzimas de restricción específicas para liberar los *cassettes* de interés, usando *Xho*I y *Xba*I para liberarlos de sus respectivos vectores. Debido a que los tamaños de los fragmentos resultantes (*cassette* y cuerpo del vector) eran muy similares (cerca de los 3000 pb), también se digirieron con *Sca*I (para Pac) y con *Xmn*I (para Hyg) para cortar el cuerpo del vector en dos fragmentos y así poder diferenciarlos en geles de agarosa.

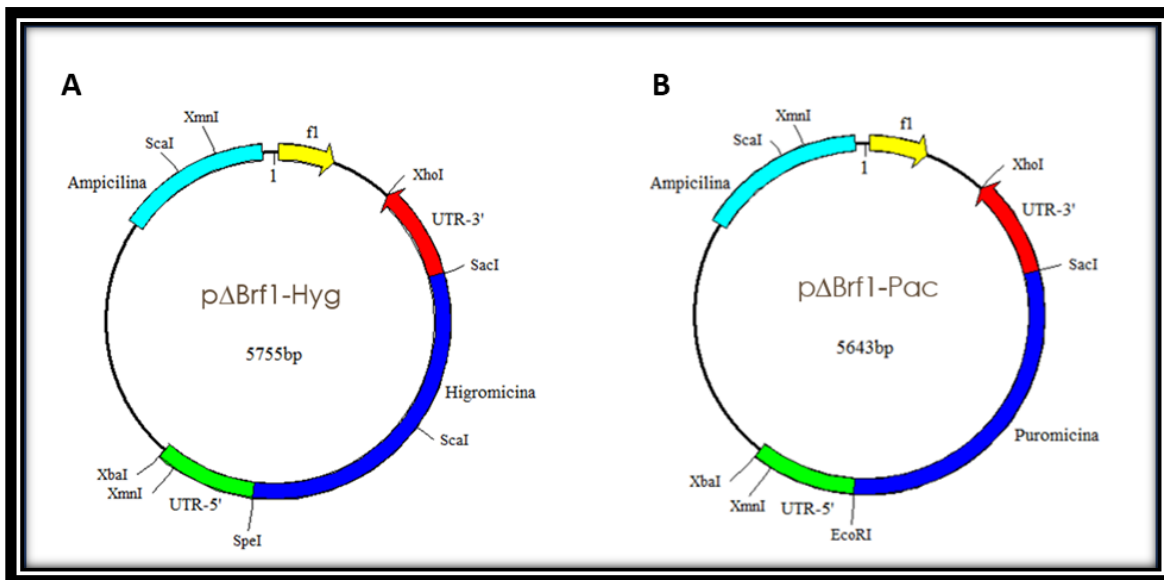


Figura 18. Mapas de los vectores p Δ Brf1-Hyg (A) y p Δ Brf1-Pac (B).

4.6 Purificación de fragmentos de DNA de geles de agarosa

Los vectores digeridos se corrieron en un gel de agarosa largo al 0.8% con pozos amplios, con el fin de desplazar lo más posible cada una de las bandas. La purificación se realizó cortando la fracción del gel que contuviera el fragmento de DNA deseado y con ayuda del kit NucleoSpin^R Gel and PCR Clean-up de acuerdo con las indicaciones del fabricante. Primeramente, el DNA digerido se precipitó con acetato de sodio (C₂H₃NaO₂) 3 M y etanol, se resuspendió en un volumen final de 30 µL de agua destilada y se separó en un gel de agarosa por ~2 horas a 100 voltios. Con ayuda de un transiluminador UVP (M-26), se identificó la banda de interés y con un escalpelo se cortó el fragmento de gel que la contenía. Se determinó la masa del fragmento, se colocó en tubos Eppendorf de 1.5 mL y se agregaron 200 µL de *buffer* NT1 por cada 100 mg de gel de agarosa. Se incubó la muestra a 50°C hasta que se disolviera por completo el gel (aproximadamente 10 minutos). Posteriormente, se colocó una columna NucleoSpin^R Gel and PCR Clean-up dentro de un tubo colector y se cargaron 700 µL de la muestra, donde se uniría el DNA, se centrifugó a velocidad máxima 30 segundos y se descartó el volumen que fluyó al tubo colector. Cuando fue necesario, se cargó el resto de la muestra y se repitieron los pasos descritos. Posteriormente, se lavó la columna con 700 µL de *buffer* NT3 y se centrifugó de la misma forma. Para eliminar restos de humedad en la columna, se centrifugó a velocidad máxima durante 1 minuto y después se colocaron 30 µL de *buffer* de elución NE, sustituyendo el tubo colector por un tubo Eppendorf de 1.5 mL. Para este caso, se realizaron 2 eluciones con el mismo volumen en cada una, recuperando finalmente 60 µL de DNA eluído en cada tubo.

4.7 Electroporación de *L. major*

Para cada electroporación se emplearon 1×10⁸ células de un cultivo que expresaba mediante episomas la proteína Brf1 unida a una bandera PTP. Los parásitos se centrifugaron a 4000 rpm durante 12 minutos a 4°C. La pastilla se resuspendió en 10 mL de PBS-G y se centrifugó de la misma forma. La pastilla se resuspendió en

10 mL de *buffer* Cytomix (HEPES 25 mM, KCl 120 mM, CaCl₂ 0.15 mM, K₂HPO₄ 10 mM, EDTA 2 mM y NaCl 5 mM), se centrifugaron nuevamente y se resuspendieron en 400 µL del mismo *buffer*. Las células se transfirieron a una celda de electroporación con *gap* de 4 mm (BTX) enfriada en hielo previamente, posteriormente se agregaron 5 – 10 µg de DNA lineal y se homogeneizó, incubando en hielo durante 10 minutos. Se dio un pulso de 1600 V, 25 Ohms y 50 µF con el electroporador BTX. Después del pulso, las celdas se colocaron en hielo inmediatamente durante 10 minutos y posteriormente las células se transfirieron a tubos cónicos de 50 mL con 10 mL de medio BM sin drogas y se dejaron crecer a 27°C. Las drogas de selección se agregaron en las 48 horas posteriores a la transfección, por lo que los cultivos quedaron complementados con G418 (25 µg/ml), higromicina (16 µg/mL) y/o puromicina (12.5 µM).

4.8 Extracción de DNA genómico

La extracción de DNA genómico (DNAg) se realizó siguiendo las instrucciones del fabricante del mini kit PureLink Genomic DNA (Invitrogen). 3×10^8 células fueron centrifugadas a 5000 rpm durante 10 minutos a 4°C, lavadas y resuspendidas en 200 µL de PBS. Posteriormente fueron tratadas con proteinasa K y RNasa A a temperatura ambiente por 2 minutos. Después se realizó la lisis con 200 µL de *buffer* Lysis/Binding, homogeneizando con vórtex, posteriormente se incubó a 55°C por 10 minutos y se añadieron 200 µL de etanol absoluto. La muestra se cargó a una columna PureLink^R Spin y se centrifugó a 10,000 × g por 1 minuto y se descartó el sobrenadante. Se hicieron lavados con 500 µL de *buffer* 1 y después con *buffer* 2 y finalmente se secó la columna centrifugando a velocidad máxima por 3 minutos. El DNA se eluyó con 200 µL con *buffer* de elución. La concentración del DNAg extraído se cuantificó por espectrofotometría a 260 nm y se verificó mediante electroforesis en gel de agarosa.

4.9 Electroforesis de DNA en gel de agarosa

Los geles requeridos se prepararon a una concentración de 0.8 – 1% con *buffer* TBE 0.5x (Tris base-HCl 5.4%, ácido bórico 2.74% y EDTA 0.46%) usando Midori Green Advance 0.1 µg/mL o bromuro de etidio 0.1 µg/mL como agentes intercalantes para observar los ácidos nucleicos bajo luz UV. La polimerización de los geles fue de 15 – 20 minutos y se corrieron inmersos en *buffer* TBE 0.5x en cámara de electroforesis a 100 voltios durante el tiempo necesario. Cada muestra de DNA fue resuspendida en *buffer* de carga GLB 1x (azul de bromofenol 0.25%, xilen-cianol 0.25%, glicerol 30%). Como marcador de peso molecular se cargaron 500 ng de la escalera de 1 kb DNA de Invitrogen. Los geles se visualizaron y fotografiaron en un sistema de documentación de geles Gel Doc™ EZ System (Bio-Rad).

4.10 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Para verificar la presencia de los genes de resistencia a antibióticos, se realizaron reacciones de PCR de punto final con los oligonucleótidos necesarios (Tabla 2). Estas reacciones se llevaron a cabo en tubos de PCR, adicionando *buffer* KAPA Taq PCR, mezcla de dNTPs (200 µM), DNA templado (100 ng) y 1 – 3 unidades de DNA polimerasa KAPA Taq (Promega) en un volumen final de 50 µL con agua destilada.

Tabla 2. Oligonucleótidos empleados para la verificación del *knock-out* sencillo.

OLIGONUCLEÓTIDO	SECUENCIA
Hyg 5'	AGTTCGACAGCGTCTCCGAC
Hyg 3'	AAGTAGCGCGTCTGCTGCTC
Bdp1-3-rev-hyg	GTCGGAGACGCTGTGCGAACT
Brf1-5'UTR-2-forward	ACATGGTAGCACATGCACCAC

Se realizaron en 30 ciclos, incluyendo la desnaturalización a 95°C durante 1 minuto, el alineamiento a 55°C durante un minuto, la extensión a 72°C durante 1 minuto y

un ciclo de extensión final a 72°C durante 7 minutos. Se empleó un termociclador T100™ Thermal Cycler (Bio-Rad).

4.11 Experimentos tipo Western blot

Un total de 25×10^6 células se centrifugaron a 4000 rpm durante 10 minutos a 4°C, se lavaron en dos ocasiones con 500 μ L de PBS 1x centrifugando de la misma forma y descartando el sobrenadante. Se resuspendieron en 20 μ L de PBS-*buffer* Laemli 2x (Tris-HCl 83 mM pH 6.8, SDS 118 mM, azul de bromofenol 99.5 μ M, glicerol 33.3%), se colocaron en tubos de 1.5 mL en agua en ebullición durante 10 minutos y se transfirieron posteriormente a hielo durante 5 minutos. Las muestras se fraccionaron en un gel de poliacrilamida con dodecil sulfato sódico (SDS-PAGE) donde se involucra un sistema discontinuo con dos geles: uno concentrador de poliacrilamida al 3.9% (Tris-HCl 160.6 mM pH 6.8, SDS 0.12%, azul de bromofenol 0.55% y TEMED 0.06%), y un gel separador de poliacrilamida al 10% (Tris-HCl 1.9 M, SDS 0.5%, TEMED 0.25% y glicerol 25%). De esta forma, las proteínas migrarían de acuerdo únicamente a su masa molecular. La electroforesis se realizó con *buffer* de corrida 1x (Tris 24.76 mM, glicina 191.82 mM, SDS 3.54 mM) a 70 voltios hasta que el frente de corrida entrara al gel separador (~30 minutos) y posteriormente a 100 voltios por ~1.5 horas.

Transcurrida la electroforesis en gel, las proteínas fraccionadas se transfirieron a membranas de PVDF con *buffer* de transferencia 1x (Tris 25 mM, glicina 191.82 mM, metanol 20%). La transferencia se llevó a cabo a 100 voltios durante 2 horas a 4°C.

Posteriormente, las membranas fueron bloqueadas con PBS – Tween-20 0.05% y leche descremada al 5% durante toda la noche a 4°C en agitación constante. Al día siguiente, se incubaron con el anticuerpo primario anti-FLAG (dilución 1:500) o anti-proteína C (dilución 1:500), que reconocen epítopes dentro de la bandera PTP, durante dos horas. Posteriormente, se hicieron 3 lavados de 10 minutos con PBS – Tween-20 0.05% y se incubó con el anticuerpo secundario HRP anti-conejo (dilución

1:3000) durante una hora. Finalmente, se repitieron los lavados de la misma forma. Para el revelado se utilizó el sistema Immobilon™ Western (Millipore).

4.12 Purificación por afinidad en tándem

Se trabajó con una línea celular de *L. major* que expresa la proteína recombinante Brf1-PTP. Se creció un cultivo de 3 L de medio BM con 50 µg/mL de G418 hasta que alcanzó la fase media de crecimiento logarítmico (30×10^6 células/mL). Después se centrifugó a 6000 rpm durante 10 minutos a 4°C en una centrífuga Avanti J-25 I (Beckman) y se descartó el sobrenadante. Se lavó la pastilla con PBS-G y posteriormente se resuspendió en 40 mL de *buffer* PBS-G en un tubo cónico de 50 mL.

Se adicionó *buffer* IPP-150 (Tris-HCl 10 mM pH 8.1, NaCl 150 mM, NP-40 0.1%) frío con inhibidores de proteasas 2.5x. Se homogeneizó por inversión y se adicionó 3.5 mL de Triton X-100 al 10% y se homogeneizó nuevamente por inversión. Se incubó en hielo durante 30 minutos esperando que la lisis celular fuera completa. Sin embargo, al hacer una observación al microscopio aún no se observaron las células completamente lisadas, por lo que fue necesario dar 50 golpes con un homogenizador previamente enfriado. El lisado se centrifugó a 10,000 rpm por 15 minutos a 4°C.

Se montó una columna Econo-Pac (Bio-Rad) de 20 mL y se adicionaron 10 mL de IPP-150 y 350 µL de perlas de sefarosa IgG (Amersham). Se incubó durante 5 minutos y posteriormente se permitió que el líquido drenara por gravedad. Posteriormente se adicionó el lisado celular (~20 mL) y se rotó la columna durante 3 horas a 4°C. Después de ese tiempo, se volvió a drenar la columna para liberar las fracciones no unidas a IgG.

Posteriormente se equilibró la columna con 15 mL de *buffer* de proteasa AcTEV (KCl 150 mM, Tris-HCl 20 mM pH 7.7, MgCl₂ 3 mM, DTT 0.5 mM, Tween-20 0.1%, EDTA 0.5 mM) incubando a 4°C durante 10 minutos en rotación. Se resuspendieron las perlas en 2 mL de *buffer* de proteasa AcTEV más 20 µL de proteasa AcTEV

(Invitrogen) (a 10 U/ μ L) para que el complejo proteico fuera digerido durante 3 horas a 4°C en rotación constante. La columna se drenó por gravedad, se lavó con 350 μ L de amortiguador PC-150 (Tris-HCl 20 mM pH 7.7, KCl 150 mM, MgCl₂ 3 mM, DTT 0.5 mM, Tween 20 0.1%, CaCl₂ 0.5 mM), equivalente al volumen muerto de las perlas de sefarosa IgG. Posteriormente se elevó a un volumen de 6 mL con *buffer* PC-150 con CaCl₂ a una concentración final de 3 mM e inhibidores de proteasas 2x, antes de adicionarlo a una columna de cromatografía desechable Econo-Pac (Bio-Rad) de 5 mL conteniendo 250 μ L de matriz de afinidad α -Prot C (“HPC4”, Roche). La columna se incubó 3 horas a 4°C en rotación suave, y posteriormente se drenó por flujo de gravedad y se lavó 8 veces con 5 mL de PC-150. Finalmente, se realizaron seis eluciones, cada una con 300 μ L de *buffer* de elución (Tris-HCl 5 mM pH 7.7, EGTA 10 mM, EDTA 5 mM, inhibidores de proteasas 1x). Una fracción de las muestras se analizaron por SDS-PAGE y se tiñeron con plata usando el kit PlusOne Silver Staining (GE). Para identificar las proteínas co-purificadas con Brf1-PTP, las muestras fueron concentradas en columnas Amicon^R Ultra (Millipore) de 0.5 mL, siguiendo las instrucciones del fabricante y posteriormente fueron enviadas a analizar mediante espectrometría de masas a la Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigación y a la Industria (USAII) de la Facultad de Química, UNAM.

Todos los reactivos utilizados durante este estudio cumplían con grado biología molecular.

5. RESULTADOS

5.1 Análisis bioinformáticos

5.1.1 Ortólogo de Brf1 en *L. major*

El gen de Brf1 en *L. major* (LmjF.25.0440) se localiza en el cromosoma 25 y codifica para una proteína predicha de 703 aminoácidos. Con el fin de determinar si la secuencia proteica de Brf1 en este parásito posee las características distintivas de ortólogos de Brf1 de otras especies, se llevó a cabo un análisis bioinformático. La comparación entre las secuencias de aminoácidos de Brf1 de humano (AAH86856.1) y *L. major* mostró un porcentaje de identidad relativamente bajo (del 19.6%). Sin embargo, encontramos que la secuencia de *L. major* presenta los tres dominios característicos del extremo amino terminal de los ortólogos de Brf1: el motivo zinc-*ribbon* y dos secuencias repetidas de ciclina (Figura 19A).

Cabe destacar la presencia en el dominio zinc-*ribbon* de los cuatro residuos de histidina o cisteína coordinadores del ion zinc: Cys-4, His-6, Cys-22 y Cys-25 (marcados con una cuña en la Figura 19A). Como ocurre en otras especies, los repetidos de ciclina de Brf1 en *L. major* no son idénticos entre sí, sino que mostraron una identidad del 17%. Brf1 de *L. major* presenta también el llamado bloque de homología I, localizado después del segundo repetido de ciclina (Figura 19A). Esta secuencia está presente en los ortólogos de Brf1 de levaduras y en humano.

La predicción de la estructura secundaria de Brf1 de *L. major* con el programa SWISS model mostró que esta proteína está formada casi exclusivamente por α -hélices. La excepción la constituye el zinc-*ribbon*, el cual está formado por láminas β (Figura 19A). Cada repetido de ciclina está formado por cinco α -hélices (Figura 19A), como se ha reportado en otros ortólogos de Brf1.

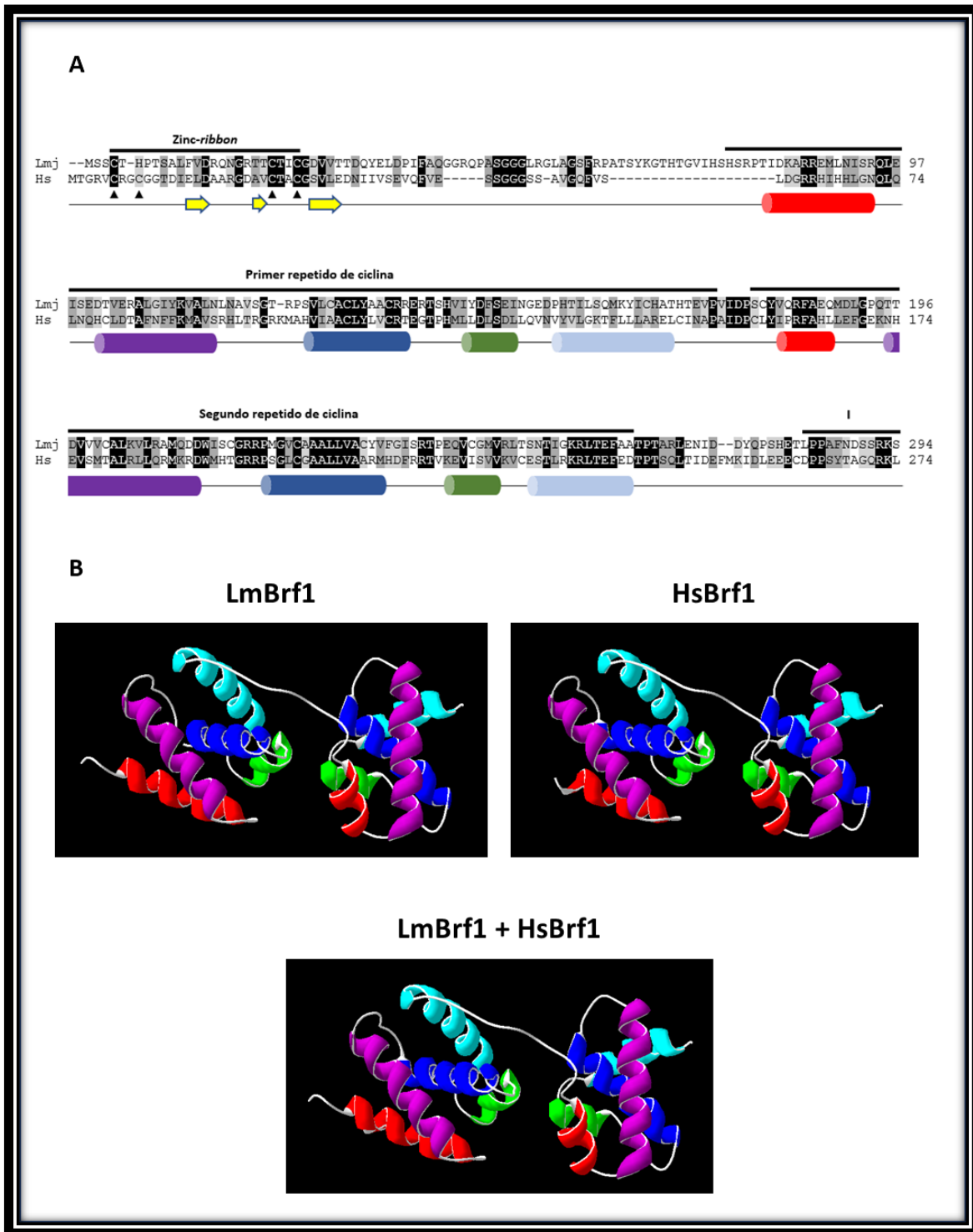


Figura 19. Análisis estructural de Brf1 en *L. major*. A) Alineamiento del extremo N-terminal de los ortólogos de Brf1 en *L. major* (Lm, LmjF.25.0440) y humano (Hs, AAH86856.1), donde se muestran los dominios zinc-*ribbon*, repetidos de ciclina y el bloque de homología I. Los residuos conservados se marcan con sombreado negro y fuente blanca, las substituciones conservadas presentan

sombreado gris oscuro y las sustituciones semiconservadas se presentan con sombreado gris claro. Dentro del motivo zinc-*ribbon* se señalan con una cuña los residuos reguladores del ion zinc. Se indica la estructura secundaria predicha con flechas (láminas β) y barriles (hélices α). **B)** Modelado por homología de los repetidos de ciclina de Brf1 en *L. major* (LmBrf1). Como control se obtuvo el modelo de Brf1 en humano (HsBrf1). La similitud en las estructuras es alta, por lo que en el sobrelape (LmBrf1 + HsBrf1) no se observan diferencias significativas. Estos dos modelos se obtuvieron usando como templatado a TFIIB de humano (5IY9). Los colores de las hélices α corresponden a los presentados en el alineamiento (panel A).

Posteriormente se obtuvo la estructura tridimensional de los dos repetidos de ciclina mediante modelado por homología (Figura 19B, panel superior izquierdo), tomando como templatado a TFIIB de humano (5IY9). El modelo indicó que esta porción de la proteína está formada por dos regiones globulares que justamente corresponden a los dos repetidos de ciclina. Las regiones globulares, formadas por 5 α -hélices, están enlazadas a través de un *linker* sencillo. Como control, se generó el modelo de Brf1 de humano (Figura 19B, panel superior derecho), el cual mostró una estructura casi idéntica a la de *L. major*, como puede apreciarse en el sobrelape de ambas estructuras (Figura 19B, panel inferior).

Tomando en consideración que la función de Brf1 se regula mediante la fosforilación de algunos de sus aminoácidos (Felton-Edkins *et al.*, 2003; Woiwode *et al.*, 2008; Lee *et al.*, 2015), se realizó una búsqueda de probables sitios de fosforilación en Brf1 de *L. major*, usando el programa PhosTryp. Se encontraron ocho residuos que potencialmente podrían ser fosforilados con un alto nivel de probabilidad (>0.8) (Tabla 3). Estos residuos corresponden a serinas y treoninas localizadas en la región C-terminal de la proteína (Figura 20).

Tabla 3. Identificación de probables sitios de fosforilación en Brf1 de *L. major* mediante PhosTryp.

Residuo	Posición	Probabilidad
Treonina	549	0.991
Serina	544	0.966
Serina	515	0.936
Serina	320	0.895
Serina	442	0.870
Treonina	345	0.850
Serina	401	0.829
Serina	425	0.809

5.1.2 Análisis de ortólogos de Brf1 en tripanosomátidos

Mediante análisis tipo BLAST se identificaron las secuencias de los ortólogos de Brf1 en *L. mexicana* (LmxM.25.0440), *L. braziliensis* (LbrM.25.0390), *L. tropica* (LTRL590_250010300), *T. brucei* (Tb927.11.470), *T. cruzi* (TcCLB.507093.180) y *T. vivax* (TvY486_1100330). Se realizó un alineamiento multiespecie (Figura 20) donde se representan los residuos totalmente conservados (fondo negro y fuente blanca), sustituciones conservadas (fondo gris oscuro) y sustituciones semiconservadas (fondo gris claro). Además, las secuencias se compararon en una matriz de identidad (Tabla 4). Entre las diferentes especies de *Leishmania* se observó conservación en el tamaño (696-703 aminoácidos) y un alto índice de identidad de aminoácidos que varía entre 86 y 96%. La conservación entre las diferentes especies de *Trypanosoma* fue menor, pues se observaron porcentajes de identidad entre 63.8 y 67.7%. Asimismo, entre *L. major* y los tripanosomas la identidad de Brf1 varía entre 52 y 55%.

En resumen, el análisis *in silico* realizado demostró que Brf1 de *L. major* posee las características típicas de secuencia y estructura presentes en otros ortólogos de Brf1. Asimismo, encontramos que entre las diferentes especies de *Leishmania* existe una elevada conservación en la secuencia de Brf1, mientras que entre especies de *Trypanosoma* la conservación es moderada.

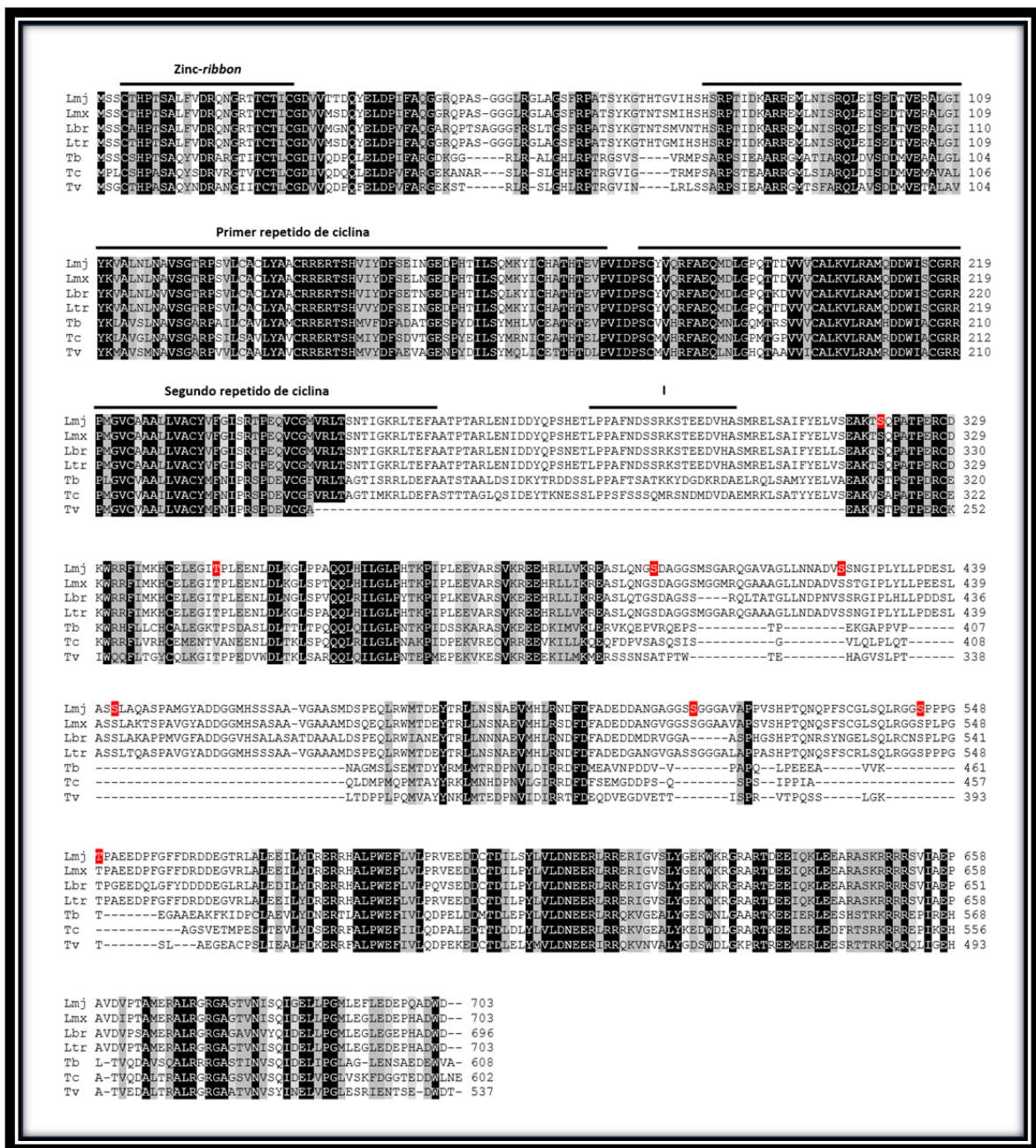


Figura 20. Ortólogos de Brf1 en algunas especies de tripanosomátidos. Alineamiento multiespecie de los ortólogos de Brf1 en *L. major* (Lmj), *L. mexicana* (Lmx), *L. braziliensis* (Lbr), *L. tropica* (Ltr), *T. brucei* (Tb), *T. cruzi* (Tc) y *T. vivax* (Tv); donde se puede apreciar la alta conservación entre especies de *Leishmania*. Se señalan los dominios zinc-ribbon, los repetidos de ciclina y el bloque de homología I (I); así como la posición de los residuos potencialmente fosforilables en *L. major* con rojo. La conservación de aminoácidos y las substituciones de residuos se señalan de la misma forma que en la figura 19A.

Tabla 4. Matriz de porcentajes de identidad de la secuencia de aminoácidos de diferentes ortólogos de Brf1 en tripanosomátidos. Las abreviaturas corresponden a las de la Figura 20.

	Lbr	Lmx	Lmj	Ltr	Tv	Tb	Tc
Lbr	100	88.18	86.17	87.46	50.56	51.40	54.29
Lmx	88.18	100	95.31	96.59	52.05	52.72	55.54
Lmj	86.17	95.31	100	96.73	52.05	52.72	55.36
Ltr	87.46	96.59	96.73	100	52.61	53.21	55.18
Tv	50.56	52.05	52.05	52.61	100	63.81	66.12
Tb	51.40	52.72	52.72	53.21	63.81	100	67.74
Tc	54.29	55.54	55.36	55.18	66.12	67.74	100

5.2 Verificación de la expresión de Brf1-PTP

En el laboratorio se contaba ya con un cultivo de promastigotes de *L. major* que expresa la proteína recombinante Brf1-PTP (LmjF + Brf1-PTP), generado hace varios años (Flores-Pérez, 2011). Se procedió entonces a confirmar que dicho cultivo continuara expresando correctamente la proteína Brf1 fusionada a la bandera PTP, para lo cual se realizaron experimentos tipo Western blot (Figura 21). Se utilizaron dos anticuerpos que reconocen epitopes de la construcción PTP: anti-FLAG (Figura 21A) y peroxidasa anti-peroxidasa (PAP) que reconoce el dominio Prot A (Figura 21B). Considerando que el tamaño predicho de Brf1 es de 77 kDa y que la bandera PTP tiene un tamaño de 20 kDa, se esperaba observar una banda de 97 kDa. Se comprobó que la línea celular sí expresaba correctamente la proteína Brf1-PTP, al observarse la banda esperada de ~100 kDa en la línea celular, y no así en células silvestres (Figura 21). Una vez verificada la expresión de la proteína recombinante Brf1-PTP, se procedió a la realización de los ensayos de purificación por afinidad en tándem para identificar las proteínas con las que interactúa Brf1.

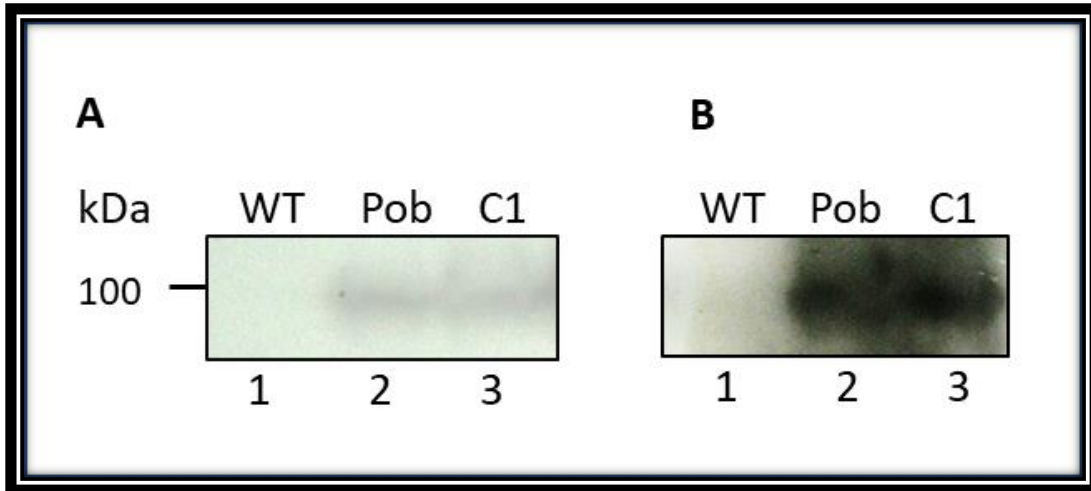


Figura 21. Experimentos tipo Western blot para verificar la expresión de Brf1-PTP. Se analizaron una población (carriles 2) y la clona 1 (carriles 3) del cultivo LmjF + Brf1-PTP utilizando anticuerpos anti-FLAG (**panel A**) y anti-Prot A (PAP) (**panel B**). En ambos casos se observa señal ligeramente por debajo de la marca de 100 kDa, por lo que se concluye que corresponde a la proteína recombinante cuya masa molecular predicha es de ~97 kDa. En los carriles 1 de ambos paneles se analizaron células *wild-type* como control.

5.3 Purificación por afinidad en tándem

Para identificar las proteínas a las que se une Brf1 para llevar a cabo su función, se realizaron experimentos de purificación por afinidad en tándem, utilizando la línea celular LmjF + Brf1-PTP. En la primera cromatografía se emplearon perlas acopladas a IgG, las cuales reconocen el dominio Prot A de la bandera PTP. En la segunda cromatografía se usan perlas con anti-proteína C, las cuales se unen al dominio Prot C de la bandera. Los eluidos finales fueron analizados mediante electroforesis en un gel de poliacrilamida teñido con plata usando el kit PlusOne Silver (GE) (Figura 22).

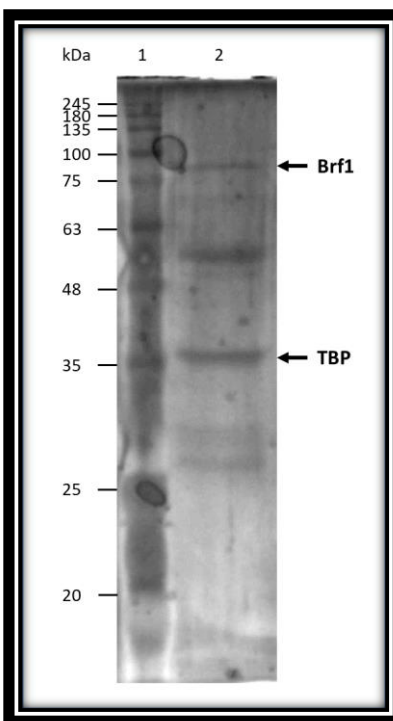


Figura 22. Eluídos finales de la purificación por afinidad en tándem. Se analizó una fracción de los eluídos finales por SDS-PAGE y el gel se tiñó con plata. De acuerdo a los resultados de espectrometría de masas, con flechas se señalan las bandas correspondientes a la proteína blanco Brf1 y a la proteína de unión a caja TATA (TBP) (carril 2), ambas caracterizadas como subunidades de TFIIB en eucariontes. En el carril 1 se colocó el marcador *BLUE Wide Range Prestained Protein Ladder* (CS Cleaver Scientific Ltd).

En el gel se observaron aproximadamente 10 bandas, con un tamaño de entre ~25 y >100 kDa (Figura 22). Los eluídos finales fueron concentrados mediante columnas Amicon^R Ultra (Millipore) de 0.5 mL con membrana de corte de 3 kDa. Posteriormente fueron enviados a analizar por espectrometría de masas a la Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigación y a la Industria (USAI) de la Facultad de Química, UNAM. En la Tabla 5 se muestran las proteínas identificadas. Como era de esperarse, fue identificada nuestra proteína blanco, Brf1. Del resto de las proteínas destaca TBP (proteína de unión a la caja TATA), la cual forma parte del factor de transcripción TFIIB en otros organismos.

Tabla 5. Proteínas co-purificadas con Brf1-PTP, identificadas por espectrometría de masas.

Nombre	Descripción	Masa molecular (kDa)	Péptidos	Cobertura (%)
LmjF.25.0440	Brf1	77.2	13	41.39
LmjF.19.1390	TBP	31.1	10	42.32
LmjF.28.2780	HSP70	71.6	14	23.25
LmjF.13.0350	α tubulina	49.7	6	17.74
LmjF.01.0420	Proteína ribosomal S7	23.7	1	5
LmjF.33.0318	HSP83	80.3	15	24
LmjF.33.0804	β tubulina	49.7	6	17.61
LmjF.35.0400	Proteína ribosomal S3A	30	8	34.85
LmjF.17.0085	Factor de elongación 1 α	49.1	3	6.9
LmjF.04.0750	Proteína ribosomal L10	24.5	2	12.21
LmjF.13.1220	Proteína ribosomal S4	30.7	3	11

En las Figuras 23 y 24 se presentan los péptidos de Brf1 y TBP identificados por espectrometría de masas. De esta manera, nuestros resultados demuestran que Brf1 interactúa con TBP en *L. major*. El resto de las proteínas no parecen estar involucradas en transcripción, por lo que probablemente sean contaminantes con algún grado de afinidad a la matriz de la cromatografía. Será necesario repetir este experimento para confirmar nuestros resultados y para identificar otras proteínas que se unan a Brf1 en *L. major*.



Figura 23. Péptidos de Brf1 identificados por espectrometría de masas. Se marcan con diferentes colores las diferentes secuencias de los 13 péptidos identificados de la proteína blanco Brf1.

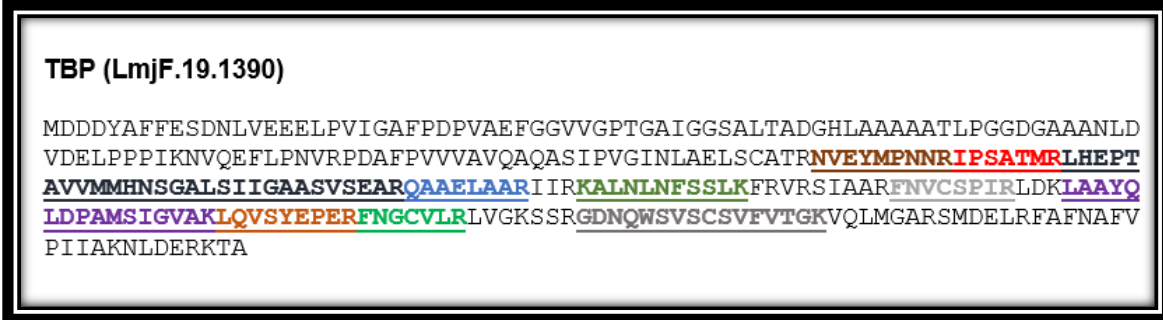


Figura 24. Péptidos de TBP identificados por espectrometría de masas. Se marcan con diferentes colores las diferentes secuencias de los 10 péptidos identificados de la proteína de unión a TATA (TBP).

5.4 Obtención de cultivos *knock-out* sencillo de Brf1

En nuestro laboratorio se trató previamente de obtener mutantes nulas de Brf1 en *L. major* (Gómez-García, 2015). La imposibilidad de eliminar ambas copias de Brf1 sugirió fuertemente que Brf1 es esencial para el crecimiento de *L. major*. Con objeto de continuar con el estudio de la importancia de Brf1 para la viabilidad celular, se decidió intentar la eliminación de las dos copias alélicas de Brf1 en el cultivo LmjF + Brf1-PTP, el cual expresa la proteína recombinante Brf1-PTP a partir de episomas.

Se esperaría que ahora sí fuera posible eliminar las dos copias alélicas del gen de Brf1. Para esto se trabajó con los vectores p Δ Brf1-Hyg y p Δ Brf1-Pac, previamente generados en el laboratorio (Figura 18) (Gómez-García, 2015). Para confirmar el buen estado de dichos vectores, éstos se enviaron a secuenciar. El análisis de la secuencia reveló que los dos vectores estaban íntegros, con el orden correcto de los insertos y sin mutaciones. Entonces, los plásmidos fueron preparados a gran escala y digeridos para purificar los *cassettes* de Hyg y Pac.

Primeramente, el vector p Δ Brf1-Hyg (Figura 18A) se digirió con las enzimas de restricción *Xho*I y *Xba*I para obtener el *cassette* de Hyg, así como con *Xmn*I para fragmentar el cuerpo del vector. De esta digestión se obtuvieron tres bandas (Figura 25A), incluida la que corresponde al *cassette* de Hyg, conteniendo el gen de resistencia flanqueado por las regiones UTR-5' y 3' de Brf1 (2867 pb). Posteriormente, este fragmento se purificó y se concentró (Figura 25B).

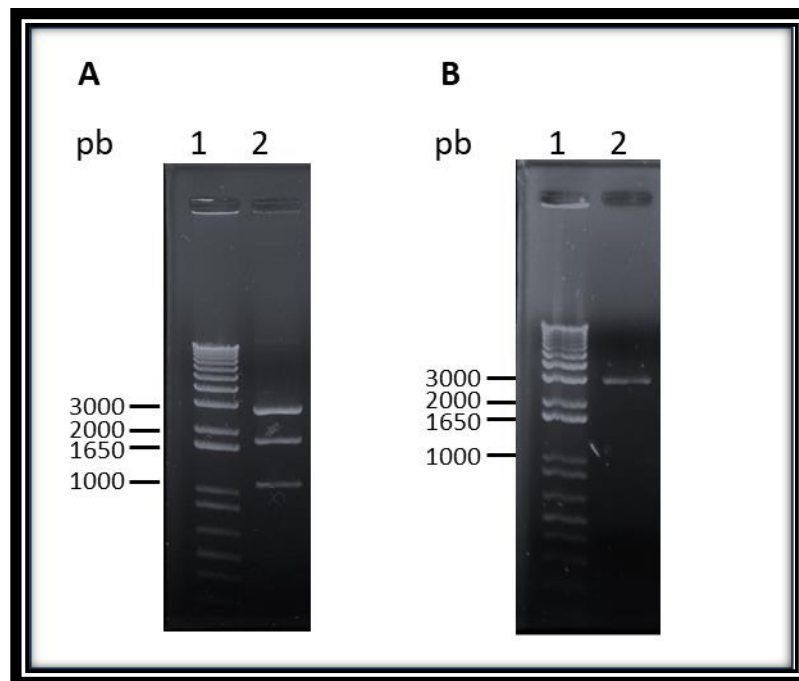


Figura 25. Obtención del *cassette* Hyg. A) Digestión del plásmido p Δ Brf1-Hyg con las enzimas de restricción *Xho*I, *Xba*I y *Xmn*I. Se observan tres bandas derivadas de la digestión (carril 2), donde la banda de mayor tamaño corresponde al *cassette* de Hyg (2859 pb). **B)** Purificación del *cassette* de

Hyg (carril 2). En los carriles 1 de ambos páneles se cargaron 500 ng de marcador de masa molecular 1 Kb plus (Invitrogen).

Se utilizaron 10 μg del *cassette* de Hyg para electroporar promástigotes de *L. major* y después de aproximadamente tres semanas se obtuvo una población estable, con crecimiento en presencia de higromicina como droga de selección.

Con el fin de caracterizar la línea celular, se obtuvieron tres clonas mediante plaqueo en cajas Petri. Dichas clonas se analizaron a través de PCR de punto final para verificar la presencia del gen de Hyg en los cultivos transfectados. En la Figura 26 se presenta un gel de agarosa con el DNA genómico aislado de las tres clonas celulares, el cual se observó íntegro.

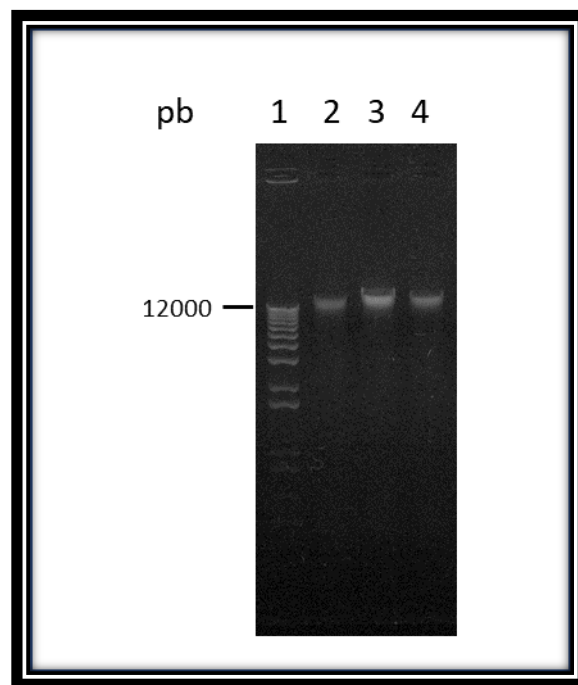


Figura 26. Extracción de DNA genómico. Se aisló DNA genómico de las 3 clonas obtenidas de un cultivo transfectado con el *cassette* de Hyg (carriles 2-4). En el carril 1 se muestra la escalera de 1Kb plus de Invitrogen, donde la banda de mayor tamaño es de 12 Kb.

Posteriormente se analizaron por PCR las tres clonas celulares con dos pares de oligonucleótidos, de acuerdo con el esquema presentado en la Figura 27. Como molde se utilizó el DNA genómico aislado (Figura 26) y como controles se realizaron reacciones con DNA genómico de células silvestres, DNA del plásmido p Δ Brf1-Hyg y una reacción sin DNA molde.

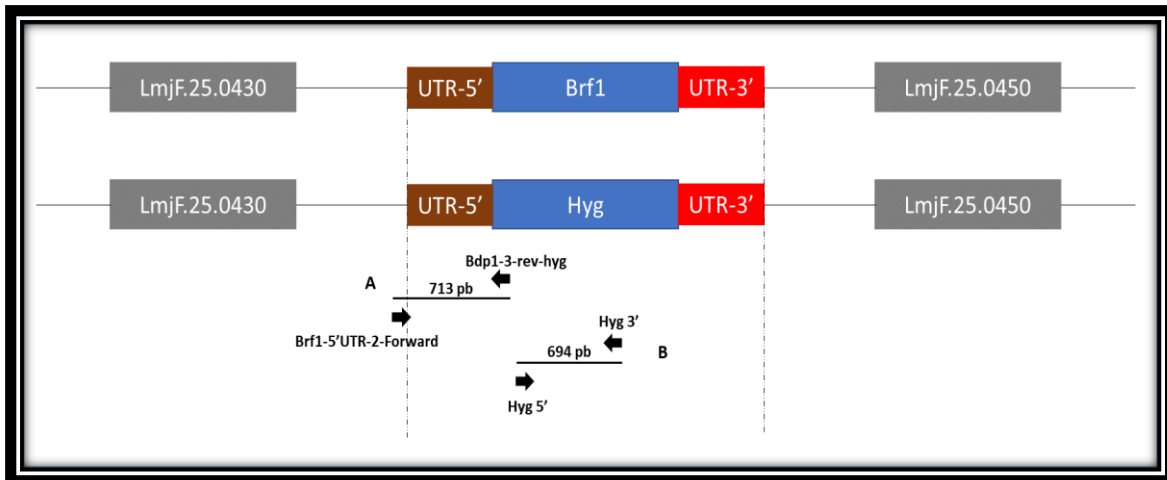


Figura 27. Representación esquemática del *cassette* de Hyg integrado en el locus de Brf1. El mapa superior representa una copia endógena del gen de Brf1, mientras que el mapa inferior representa el reemplazo de una copia de Brf1 por el gen de resistencia a higromicina. Se señalan los oligonucleótidos empleados para el análisis por PCR. La presencia del gen de Hyg se verificó con los oligonucleótidos Hyg 5' e Hyg 3', que generan un producto de 694 pb (B). La correcta integración del *cassette* en el locus de Brf1 se confirmó con los *primers* Brf1-5'UTR-2-Forward y Bdp1-3-rev-hyg (producto de 713 pb), pues el oligonucleótido sentido reconoce una región del locus de Brf1 localizada río arriba de la región 5'-UTR, que no está presente en el *cassette* Hyg (A).

Los productos de PCR fueron analizados en geles de agarosa al 1% (Figura 28). Con los oligonucleótidos Hyg 5' e Hyg 3' (panel B) se observó una banda única por encima de los 650 pb en los carriles 2-5, correspondientes a las reacciones preparadas con DNA genómico de las tres clonas obtenidas y el plásmido p Δ Brf1-Hyg respectivamente, indicando la presencia del gen de resistencia a Hyg. Como se esperaba, no se obtuvo ningún amplificado en los controles negativos con DNA genómico de células silvestres (carril 6) y sin DNA molde (carril 7). En las reacciones

con los oligonucleótidos Brf1-5'UTR-2-Forward y Bdp1-3-rev-hyg (panel A) se observó la banda esperada de 713 pb en las reacciones con DNA genómico de las tres clonas (carriles 2-4). Como se esperaba, no se observó amplificado en la reacción preparada con DNA del plásmido p Δ Brf1-Hyg (carril 5), ni con DNA genómico de células silvestres (carril 6) ni en la reacción sin DNA molde (carril 7); estos resultados indican entonces que el gen de resistencia a Hyg se recombinó correctamente en el locus de Brf1.

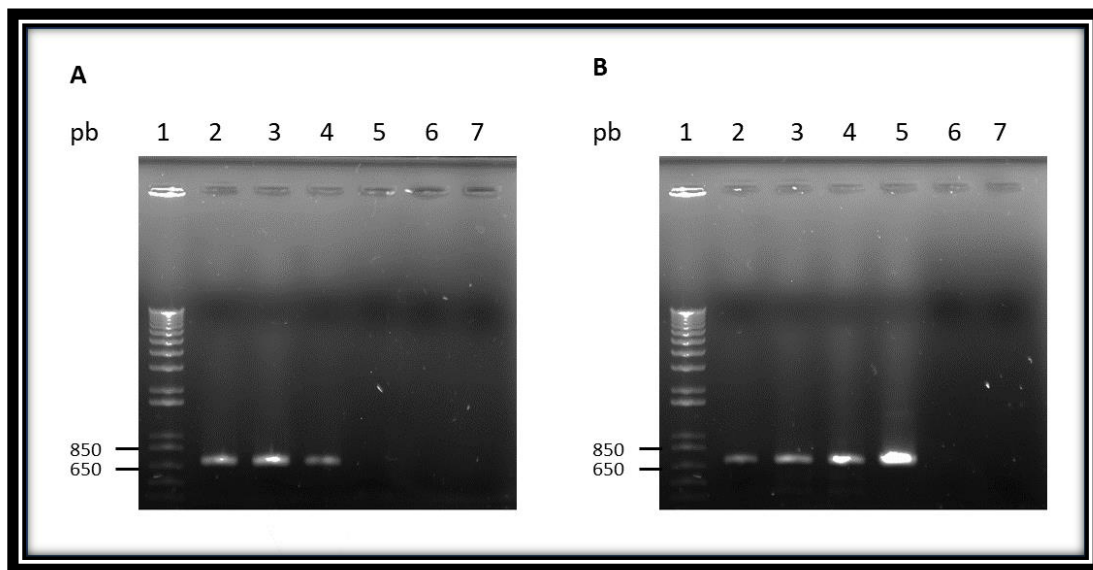


Figura 28. Productos de PCR. A) Reacciones con oligonucleótidos Brf1-5'UTR-2-Forward y Bdp1-3-rev-hyg con DNA genómico de las tres clonas celulares como templado (carriles 2-4), DNA del plásmido p Δ Brf1-Hyg (donde no se esperaba amplicón) (carril 5), DNA genómico de células silvestres (carril 6) y una reacción sin DNA molde (carril 7). Las bandas corresponden al tamaño esperado. **B)** Reacciones con oligonucleótidos Hyg 5' e Hyg 3'. Las muestras se cargaron en el mismo orden que el panel A. En este caso, sí se esperaba que en el carril 5 hubiera amplificación. Se observan bandas únicas del tamaño esperado. En ambos paneles se usó escalera de 1 Kb plus (Invitrogen) como marcador de masa molecular en los carriles 1.

5.5 Intentos de obtención de cultivos *knock-out* doble de Brf1

Después de verificar que una copia alélica de Brf1 había sido reemplazada por Hyg (*knock-out* sencillo), se seleccionó la clona 3 para realizar el *knock-out* doble con

Pac. Para este caso, el plásmido p Δ Brf1-Pac (Figura 18B) se digirió con las enzimas de restricción *Xba*I y *Xho*I para liberar el *cassette* de Pac y con *Sca*I para fragmentar el cuerpo del vector. En el panel A de la Figura 29 se presenta la digestión del vector, donde la banda de mayor tamaño corresponde al *cassette* Pac, el cual se purificó y concentró (Figura 29B).

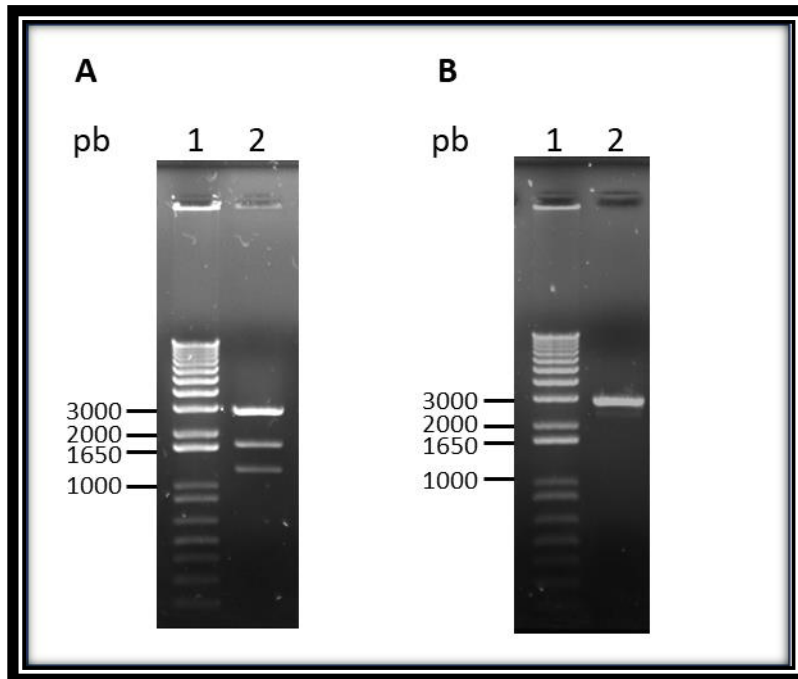


Figura 29. Obtención del *cassette* Pac. **A)** Digestión del plásmido p Δ Brf1-Pac con las enzimas de restricción *Xho*I, *Xba*I y *Sca*I. Se observan tres bandas derivadas de la digestión (carril 2), donde la banda de mayor tamaño corresponde al *cassette* de Pac (2773 pb). **B)** Purificación del *cassette* de Hyg (carril 2). En los carriles 1 de ambos paneles se cargaron 500 ng de marcador de masa molecular 1 Kb plus (Invitrogen).

En un primer intento se utilizaron 5 μ g de *cassette* Pac en una transfección por duplicado. Sin embargo, no se obtuvieron células viables después de algunos días de completar la concentración final de drogas de selección.

Se realizaron posteriormente múltiples intentos para obtener el *knock-out* doble de Brf1, utilizando concentraciones de *cassette* de Pac de 2.5, 5 y 10 μ g, obteniendo

los mismos resultados negativos, pues no se recuperaron cultivos viables después de la transfección. Estos resultados sugieren fuertemente que Brf1 es un gen esencial para el crecimiento de promastigotes del *L. major*. Quizá la expresión de la proteína recombinante Brf1-PTP en nuestra línea celular no fue lo suficientemente elevada como para permitir la delección de la segunda copia endógena de Brf1.

6. DISCUSIÓN

La transcripción mediada por Pol III es fundamental para la síntesis de RNAs esenciales para la viabilidad celular. Este proceso de transcripción requiere la participación de factores de transcripción como TFIIIA, TFIIIB y TFIIIC. Sin embargo, en tripanosomátidos exclusivamente se han identificado las tres subunidades componentes de TFIIIB: TBP, Bdp1 y Brf1. La aparente ausencia de TFIIIA y TFIIIC en tripanosomátidos es notoria, considerando que en otros organismos estos dos factores de transcripción son esenciales para el crecimiento celular. Por otro lado, la falta de TFIIIA y TFIIIC en los tripanosomátidos hace de TFIIIB el principal regulador de la transcripción de Pol III en este grupo de organismos de divergencia temprana, lo que hace aún más relevante su estudio y caracterización.

6.1 Análisis bioinformático de la secuencia de Brf1 en *L. major*

El gen de Brf1 en *L. major* se localiza en el cromosoma 25, y codifica para una proteína predicha de 703 aminoácidos. Mediante análisis *in silico* se determinó que efectivamente correspondía a un ortólogo de Brf1, pues posee los dominios característicos de esta familia de proteínas: el motivo zinc-*ribbon* y dos repetidos de ciclina (Figuras 19 y 20).

Para el caso del dominio zinc-*ribbon* se identificaron los residuos Cys-4, His-6, Cys-22 y Cys-25, los cuales corresponden a los residuos moduladores del ión zinc y que están altamente conservados a lo largo de la escala evolutiva. Los miembros de la familia de proteínas TFIIIB (TFIIIB, TFB y Brf1) contienen la secuencia consenso C-X₂-C(H)-X_{15/17}-C-X₂-C y la formación de tres láminas β antiparalelas en el extremo N-terminal. En *L. major* se presenta la secuencia C-X-H-X₁₅-X₂-C la cual es una secuencia muy conservada, excepto por presentar sólo un aminoácido (Thr-5) entre los residuos Cys-4 e His-6. Asimismo, la estructura secundaria predicha también está conservada en *L. major*, pues se observan las características láminas β (Figura 19).

La función del motivo zinc-*ribbon* ha sido caracterizada en diferentes modelos biológicos. En el caso de TFIIIB, este dominio es fundamental para el reclutamiento de Pol II al TSS y mutaciones puntuales o deleciones dentro de esta región impiden la formación del complejo de pre-inicio de Pol II (Buratowski y Zhou, 1993; Hawkes y Roberts, 2000). Por el contrario, en el sistema de transcripción de Pol III, el dominio zinc-*ribbon* de Brf1 pareciera no ser fundamental para el reclutamiento de Pol III, pero sí lo es para la apertura del promotor (Kassavetis *et al.*, 1997; Hahn y Roberts, 2000).

En cuanto a los repetidos de ciclina de Brf1 en *L. major* (Figura 19B), el porcentaje de similitud entre ambos repetidos fue del 17%, lo cual no resulta diferente a lo reportado para otros organismos como levadura y humano, cuyos porcentajes de similitud son del 14 y 15% respectivamente. Se ha reportado que es a través de este dominio que se lleva a cabo la interacción de Brf1 con la subunidad C34 de Pol III (Khoo *et al.*, 2014). Al analizar la secuencia de Brf1 en otros tripanosomátidos, se observó en todos los casos la presencia de los dos repetidos de ciclina (Figura 20). Sin embargo, resulta interesante el hecho de que el segundo repetido de ciclina en *T. vivax* esté “recortado” en su extremo C-terminal (Figura 20). Esto sugiere que, en dicho organismo, TFIIIB podría establecer interacciones con la maquinaria transcripcional de Pol III diferentes a lo reportado en levadura y vertebrados.

En las levaduras *S cerevisiae*, *Candida albicans* y *Kluyveromyces lactis* (Khoo *et al.*, 1994), así como en humano se han identificado tres secciones conservadas en la mitad carboxilo terminal de Brf1, denominados bloques de homología I-III, los cuales son regiones de unión específicas de Pol III. Diversos autores han referido que los bloques de homología II y III establecen uniones con la subunidad TBP (Khoo *et al.*, 1994; Larminie y White, 1998; Khoo *et al.*, 2014). En este estudio, se observó la presencia del bloque de homología I en *L. major* (Figuras 19A y 20); sin embargo, en este parásito no se localizó ninguna región correspondiente a los bloques de homología II y III. La excepción la constituye *T. vivax*, el cual no presenta ninguna secuencia correspondiente a este dominio (Figura 19). Si en *L. major* solamente está presente el bloque de homología I, sería necesario reconsiderar que

la unión a TBP se realice mediante regiones no conservadas en Brf1 de estos organismos (Figuras 19A y 20). Esto refuerza la idea de que en tripanosomátidos las interacciones de Brf1 con el resto de la maquinaria transcripcional son diferentes a las observadas en otros organismos.

La regulación derivada de la fosforilación en Brf1 ha sido estudiada en otros eucariontes, pues una disminución en los niveles de fosforilación de serinas en Brf1 interrumpe la unión con TBP (Woiwode *et al.*, 2008). Aunado a esto, se ha reportado que la hiper-fosforilación de Brf1 durante la mitosis (especialmente en metafase) impide la expresión genética a través de un sistema en el que Brf1-TBP permanece unido a las regiones promotoras de los tRNAs, pero no se establece unión con Bdp1 (Fairley *et al.*, 2003).

Se han reportado hasta el momento 3 residuos sujetos a fosforilación en Brf1 de levadura (residuos 375, 381 y 384) (Lee *et al.*, 2015) por las cinasas ERK y Plk1. Resulta interesante el hecho de que estos sitios no corresponden a ninguno de los sitios probables de fosforilación identificados en *L. major* (Tabla 3), aunque en las bases de datos se encuentran registradas algunas proteínas putativas que corresponderían a los ortólogos de las cinasas ERK y Plk1 en este parásito. Para profundizar en este campo del conocimiento, se requiere realizar estudios puntuales para determinar los blancos de estas enzimas y la función de cada residuo mencionado en la Tabla 3.

6.2 Brf1 interactúa con TBP en *L. major*

Como se sabe, el factor de transcripción TFIIB está compuesto por tres subunidades proteicas (TBP, Bdp1 y Brf1). En este trabajo, utilizando como proteína blanco a Brf1 haciendo ensayos de purificación por afinidad en tándem, se logró determinar por primera vez que Brf1 de *L. major* tiene interacción con TBP (Figura 22). Sin embargo, en nuestro experimento no se encontró la subunidad Bdp1 (Tabla 5). Esto es en cierta medida un resultado esperado, pues se ha reportado que las subunidades TBP y Brf1 tienen uniones más fuertes entre sí, por lo que pueden co-

purificar juntas con mayor facilidad. La subunidad Bdp1, por su parte, se une débilmente al complejo TBP-Brf1, por lo que se separa fácilmente de éste durante el proceso de purificación. Por otra parte, se ha observado que Bdp1 se une al complejo TBP-Brf1 cuando éste se encuentra unido al promotor (Kassavetis y Geiduschek, 2006; Hu *et al.*, 2015). Se tiene planeado hacer nuevos ensayos de purificación, pero con células tratadas con formaldehído (2 al 5%) para fijar por *cross-linking* las uniones proteína-proteína. De esta manera esperamos co-purificar a Bdp1 como parte del complejo TFIIIB de *L. major*. Asimismo, esperaríamos identificar otros componentes del complejo transcripcional de Pol III en *L. major*.

Con respecto a las otras proteínas purificadas en el ensayo (Tabla 5), creemos que pueden constituir proteínas contaminantes que tienen afinidad por las perlas empleadas en las purificaciones. Para verificar esto, será necesario realizar ensayos con células silvestres, además de con las células que expresan la proteína recombinante Brf1-PTP, para identificar a aquellas proteínas contaminantes que tengan tendencia a unirse inespecíficamente a las matrices que se usan para las dos columnas de afinidad. No obstante, no podemos descartar que algunas de las proteínas co-purificadas participen en la transcripción de Pol III en *L. major*. A este respecto se ha reportado en *S. cerevisiae* que una proteína homóloga a Hsp70 (Ssb) en conjunto con la proteína Bmh1 regula la transcripción de genes reprimidos por glucosa bajo algunas condiciones de estrés (Hübscher *et al.*, 2016).

6.3 Brf1 podría ser un gen esencial también en *L. major*

Desde la década de 1990, se han realizado estudios para la comprensión de la función de determinadas proteínas debido a su ausencia en especies de *Leishmania* (Roberts, 2011). Anteriormente, en nuestro laboratorio se había intentado eliminar por completo las dos copias endógenas de Brf1 en *L. major* (Gómez-García, 2015) pero no se había conseguido, lo que sugería la idea de que se trataba de un gen esencial. En este trabajo se intentó la eliminación de las dos copias endógenas del gen de Brf1 de *L. major* a partir de la línea celular LmjF + Brf1-PTP, la cual expresa mediante episomas a la proteína Brf1-PTP recombinante. Se esperaba que la

expresión de dicha proteína recombinante permitiera la eliminación de las dos copias endógenas de Brf1. Se trabajó con las construcciones previamente generadas en el laboratorio (Figura 18) y mediante recombinación homóloga se obtuvo una población y tres clonas celulares *knock-out* sencillo de Brf1 en *L. major* con relativa facilidad. La presencia del gen de resistencia a higromicina se comprobó mediante PCR de punto final (Figura 28).

Posteriormente, se realizaron cinco intentos para obtener cultivos *knock-out* doble de Brf1, tratando de reemplazar la segunda copia de Brf1 por el gen de resistencia a puomicina. Sin embargo, no fue posible la obtención de células viables resistentes a higromicina y puomicina. Esto incluso con la expresión de la proteína recombinante Brf1-PTP (Figura 21).

Estos resultados indican que Brf1 es un gen esencial para la viabilidad celular en promastigotes de *L. major*. Es muy probable que la expresión de la proteína recombinante Brf1-PTP sea relativamente baja en nuestra línea celular, por lo que la delección de la segunda copia endógena de Brf1 no fue posible. A este respecto, ya ha sido reportado que Brf1 es un gen esencial en levadura (Colbert y Hahn, 1992). Asimismo, Vélez-Ramírez *et al.* (2015) determinó que el *knock-down* de Brf1 en *T. brucei* conlleva a muerte celular, siendo evidente la esencialidad de esta subunidad de TFIIB en la supervivencia de ese parásito. Un resultado similar podría estar ocurriendo en *L. major*, pues parece evidente que los parásitos no sobreviven a la eliminación total de este gen. Desafortunadamente, en *L. major* no es posible realizar *knock-downs* génicos, como en *T. brucei*, debido a que este organismo carece de la vía de interferencia de RNA. Una alternativa para el estudio de la función de genes en *L. major* es el sistema CRISPR/Cas, que es un mecanismo descubierto en bacterias como respuesta a virus o plásmidos invasores y que es descrito como un sistema basado en RNAs pequeños de detección de secuencias específicas y silenciamiento de ácidos nucleicos foráneos (Jinek *et al.*, 2012).

Inicialmente, para la edición y estudio genómico en tripanosomátidos se emplearon métodos clásicos de biología molecular, tales como eventos de entrecruzamiento en regiones de homología iniciados por una rotura en la doble cadena de DNA y

posteriormente el uso de DNAs lineales que contenían regiones de homología en los extremos para aumentar la eficiencia de reconocimiento durante la recombinación en el locus de algún gen de interés (Sollelis *et al.*, 2015). Sin embargo, fue en 2015 cuando dos grupos de investigadores (Sollelis *et al.*, 2015; Zhang y Matlashewski, 2015) emplearon por primera vez la técnica de edición CRISPR/Cas9 en *L. donovani* como una alternativa más efectiva e innovadora, la cual podría ser utilizada para la continuación de este trabajo.

7. CONCLUSIONES Y LOGROS

- El ortólogo de Brf1 en *L. major* presenta los dominios típicos de esta subunidad del factor de transcripción TFIIIB: el dominio zinc-*ribbon* y los dos repetidos de ciclina, así como el bloque de homología I.
- El modelado por homología reveló una gran similitud en las estructuras tridimensionales de los repetidos de ciclina entre Brf1 de *L. major* y Brf1 y TFIIIB de humano.
- El cultivo LmjF + Brf1-PTP, generado previamente en el laboratorio, expresa correctamente la proteína fusionada a la bandera PTP.
- La proteína Brf1 interactúa con TBP, otra subunidad de TFIIIB en *L. major*.
- Se generó una línea celular donde una copia alélica del gen de Brf1 fue sustituida por el gen de resistencia a higromicina (*knock-out* sencillo) a partir del cultivo LmjF + Brf1-PTP.
- No se obtuvieron líneas celulares *knock-out* doble de Brf1 viables. Esto sugiere que se trata de un gen esencial en promastigotes de *L. major*, y que la expresión de la proteína Brf1-PTP probablemente no sea lo suficientemente alta como para permitir la substitución de la segunda copia alélica del gen.

8. LITERATURA CITADA

- Acker, J., Conesa, C. y Lefebvre, O. 2013. Yeast RNA polymerase III transcription factors and effectors. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1829 (3-4): 283-295.
- Akhoundi, M., Kuhls, K., Cannet, A., Votýpka, J., Marty, P., Delaunay, P. y Sereno, D. 2016. A historical overview of the classification, evolution, and dispersión of *Leishmania* parasites and sandflies. *PLoS*. 10 (3): 4349.
- Alvar, J., Vélez, I. D., Bern, C., Herrero, M., Desjeux, P., Cano, J., Jannin, J., den Boer, M. y The WHO Leishmaniasis control team. 2012. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. *PLoS One*. 7 (5): e35671.
- Ampuero, V. J. 2000. Leishmaniasis. En *Medica*, Magíster en enfermedades infecciosas y parasitarias. Universidad de Brasilia. Brasil.
- Borghi, S. M., Fattori, V., Conchon-Costa, I., Pinge-Filho, P., Pavanelli, W. R. y Verri W. A. 2017. *Leishmania* infection: painful or painless? *Parasitology Research*. 116 (2): 465-475.
- Borst, P. y van Leeuwen. 1997. β -D-glucosyl-hydroxymethyluracil, a novel base in african trypanosomes and other Kinetoplastida. *Molecular and Biochemical Parasitology*. 90: 1-8.
- Borst, P. y Sabatini, R. 2008. Base J: discovery, biosynthesis, and possible functions. *Annual Review of Microbiology*. 62: 235-251.
- Butler, J. E. y Kadonaga, J. T. 2002. The RNA polymerase II core promoter: a key component in the regulation of gene expression. *Genes & Development*. 16 (20): 2583-2592.
- Buratowski, S. y Zhou, H. 1993. Functional domains of transcription factor TFIIB. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 90 (12): 5633-5637.
- Canella, D., Praz, V., Reina, J. H., Cousin, P. y Hernández, N. 2010. Defining the RNA polymerase III transcriptome: Genome-wide localization of the RNA polymerase III transcription machinery in human cells. *Genome Research*. 20 (6): 710-721.

- Campbell, D. A., Sturm, N. R. y Yu, M. C. 2000. Transcription of the kinetoplastid spliced leader RNA gene. *Parasitology Today*. 16 (2): 78-82.
- Chen, H., Legault, P., Glushka, J., Omichinski, J. G. y Scott, R. A. 2000. Structure of a (Cys₃His) zinc ribbon, a ubiquitous motif in archaeal and eucaryal transcription. *Protein Science*. 9:1743-1752.
- Colbert, T. y Hahn, S. 1992. A yeast TFIIB-related factor involved in RNA polymerase III transcription. *Genes & Development*. 6: 1940-1949.
- den Boer, M., Argaw, D., Jannin, J. y Alvar, J. 2011. Leishmaniasis impact and treatment access. *Clinical Microbiology and Infection*. 17 (10): 1471-1477.
- Deng, W. y Roberts, S. G. E. 2007. TFIIB and the regulation of transcription by RNA polymerase II. *Chromosoma*. 116: 417-429.
- Docampo, R., de Souza, W., Miranda, K., Rohloff, P. y Moreno, S. N. J. 2005. Acidocalcisomes-conserved from bacteria to man. *Nature*. 3: 251-261.
- El-Sayed, N. M., Myler, P. J., Blandin, G., Barriman, M., Crabtree, J., Aggarwai, G., Caler, E., Renauld, H., Worthey, E. A., Hertz-Fowler, C., Ghedin, E., Peacock, C., Bartholomeu, D. C., Haas, B. J., Tran, A., Wortman, J. R., Alsmark, U. C. M., Angiuoli, S., Anupama, A., Badger, J., Bringaud, F., Cadag, E., Carlton, J. M., Cerqueria, G. C., Creasy, T., Delcher, A. L., Djikeng, A., Embley, T. M., Hauser, C., Ivens, A. C., Kummerfeld, S. K., Pereira-Leal, J. B., Nilsson, D., Peterson, J., Salzberg, S. L., Shallom, J., Silva, J. C., Sundaram, J., Westenberger, S., White, O., Melville, S. E., Donelson, J. E., Andersson, B., Stuart, K. D. y Hall, N. 2005. Comparative genomics of trypanosomatid parasitic protozoa. *Science*. 309: 404-409.
- Elsby, L. M. y Roberts, S. G. E. 2008. Interaction of the TFIIB zinc ribbon with RNA polymerase II. *Biochemical Society Transactions*. 36: 595-598.
- Fairley, J. A., Scott, P. H. y White, R. J. 2003. TFIIB is phosphorylated, disrupted and selectively released from tRNA promoters during mitosis *in vivo*. *The EMBO Journal*. 22 (21): 5841-5850.
- Felton-Edkins, Z. A., Farley, J. A., Graham, E. L., Johnson, I. M., White, R. J. y Scott, P. H. 2003. The mitogen-activated protein (MAP) kinase ERK induces

tRNA synthesis by phosphorylating TFIIIB. *The EMBO Journal*. 22 (10): 2422-2432.

- Forler, D., Köcher, T., Rode, M., Gentzel, M., Izaurralde, E. y Wilm, M. 2003. An efficient protein complex purification method for functional proteomics in higher eukaryotes. *Nature*. 21: 89-92.
- Flores-Pérez, C. 2011. Identificación de componentes proteicos del complejo transcripcional de la RNA polimerasa III en *Leishmania major*. Tesis de Maestría. UNAM. México.
- Gouge, J., Guthertz, N., Kramm, K., Dergai, O., Abascal-Palacios, G., Satia, K., Cousin, P., Hernandez, N., Grohmann, D. y Vannini, A. 2017. Molecular mechanisms of Bdp1 in TFIIIB assembly and RNA polymerase III transcription initiation. *Nature Communicatios*. 8 (1): 130.
- Gómez-García, M. 2015. Obtención de líneas celulares *knock-out* de Brf1, subunidad del factor de transcripción TFIIIB, en el parásito *Leishmania major*. Tesis de licenciatura. UNAM. México.
- Günzl, A., Bruderer, T., Laufer, G., Schimanski, B., Tu, L., Chung, H., Lee, P. y L, M. G. 2003. RNA polymerase I transcribes procyclin genes and variant surface glycoprotein gene expression sites in *Trypanosoma brucei*. *Eukaryotic Cell*. 2 (3): 542-551.
- Hahn, S. y Roberts, S. 2000. The zinc ribbon domains of the general transcription factors TFIIIB and Brf: conserved functional surfaces but different roles in transcription initiation. *Genes & Development*. 14: 719-730.
- Haanstra, J. R., González-Marcano, E. B., Gualdrón-López, M. y Michels, P. A. M. 2016. Biogenesis, maintenance and dynamics of glycosomes in trypanosomatid parasites. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1863: 1038-1048.
- Hahn, S. 2004. Structure and mechanism of the RNA polymerase II transcription machinery. *Nature*. 11 (5): 394-403.
- Handman, E. 2000. Cell biology of *Leishmania*. *Advances in Parasitology*. Australia. 39 pp.
- Hammarton, T. C., Monnerat, S. y Mottram, J. C. 2007. Cytokinesis in trypanosomatids. *Current Opinion in Microbiology*. 10: 520-527.

- Hawkes, N. A., Roberts, S. G. y Evans, R. 2000. The conformation of the transcription factor TFIIIB modulates the response to transcriptional activators in vivo. *Current Biology*. 10 (5): 273-276.
- Hernández-Rivas, R., Florencio-Martínez, L. E., Martínez-Salazar, M. y Martínez-Calvillo, S. 2007. Gene expression and transcriptional machinery in trypanosomatid and apicomplexa parasites. 313-337. En *Advances in the immunobiology of parasitic diseases*. Terrazas, L. I. Research Signpost.
- Hu, H., Wu, C., Lee, J. y Chen, H. A. 2015. Region of Bdp1 necessary for transcription initiation that is located within the RNA polymerase III active site cleft. *Molecular and Cell Biology*. 35 (16): 2831-2840.
- Hübscher, V., Mudholkar, K., Chiabudini, M., Fitzke, E., Wölfle, T., Pfeifer, D., Drepper, F., Warscheid, B. y Rospert, S. 2016. The Hsp70 homolog Ssb and the 14-3-3 protein Bmh1 jointly regulate transcription of glucose repressed genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Research*. 44 (12): 5629-5645.
- Ivens A. C., Peacock C. S., Worthey E. A., Murphy L., Aggarwal G., Berriman M., Sisk E., Rajandream M. A., Adlem E., Aert R., Anupama A., Apostolou Z., Attipoe P., Bason N., Bauser C., Beck A., Beverley S. M., Bianchettin G., Borzym K., Bothe G., Bruschi C. V., Collins M., Cadag E., Ciarloni L., Clayton C., Coulson R. M., Cronin A., Cruz A. K., Davies R. M., De Gaudenzi J., Dobson D. E., Duesterhoeft A., Fazelina G., Fosker N., Frasch A. C., Fraser A., Fuchs M., Gabel C., Goble A., Goffeau A., Harris D., Hertz-Fowler C., Hilbert H., Horn D., Huang Y., Klages S., Knights A., Kube M., Larke N., Litvin L., Lord A., Louie T., Marra M., Masuy D., Matthews K., Michaeli S., Mottram J. C., Müller-Auer S., Munden H., Nelson S., Norbertczak H., Oliver K., O'Neil S., Pentony M., Pohl T. M., Price C., Purnelle B., Quail M. A., Rabbinowitsch E., Reinhardt R., Rieger M., Rinta J., Robben J., Robertson L., Ruiz J. C., Rutter S., Saunders D., Schäfer M., Schein J., Schwartz D. C., Seeger K., Seyler A., Sharp S., Shin H., Sivam D., Squares R., Squares S., Tosato V., Vogt C., Volckaert G., Wambutt R., Warren T., Wedler H., Woodward J., Zhou S., Zimmermann W., Smith D. F., Blackwell J. M., Stuart K. D., Barrell B. y

Myler P. J. 2005. The genome of the kinetoplastid parasite, *Leishmania major*. *Science*. 309: 436-442.

- Jensen, R. E. y Englund, P. T. 2012. Network news: the replication of kinetoplast DNA. *Annual Review of Microbiology*. 66: 473-491.
- Jinek, M., Chylinski, K., Fonfara, I., Hauer, M., Doudna, J. A. y Charpentier, E. 2012. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science*. 337 (6096): 816-821.
- Kaufer, A., Ellis, J., Stark, D. y Barrat J. 2017. The evolution of trypanosomatid taxonomy. *Parasites & Vectors*. 10: 287.
- Kassavetis, G. A., Bardeleben, C., Kumar, A., Ramirez, E., Geiduschek, P. 1997. Domains of the Brf component of RNA polymerase III transcription factor IIIB (TFIIIB): Functions in assembly of TFIIIB-DNA complexes and recruitment of RNA polymerase to the promoter. *Molecular and Cell Biology*. 17 (9): 5299-5306.
- Kassavetis, G. A., Driscoll, R. y Gelduschek, E. P. 2006. Mapping the principal interaction site of the Brf1 and Bdp1 subunits of *Saccharomyces cerevisiae* TFIIIB. *Journal of Biological Chemistry*. 281 (20): 14321-14329.
- Kassavetis, G. A. y Geiduschek, E. P. 2006. Transcription factor TFIIIB and transcription by RNA polymerase III. *Biochemical Society Transactions*. 34: 1082-1087.
- Khatter, H., Vorländer, M. K. y Müller, C. W. 2017. RNA polymerase I and III: similar yet unique. *Current Opinion in Structural Biology*. 47: 88-94.
- Khoo, B. Brophy, B. y Jackson, S. P. 1994. Conserved functional domains of the RNA polymerase III general transcription factor BRF. *Genes & Development*. 8: 2679-2890.
- Khoo, S. K., Wu, C. C., Lin, Y. C., Lee, J. C. y Chen, H. T. 2014. Mapping the protein interaction network for TFIIIB-related factor Brf1 in the RNA polymerase III preinitiation complex. *Molecular and Cellular Biology*. 34 (3): 551-559.

- Kwon, H., Imbalzano, A. N., Khavari, P. A., Kingston, R. E. y Green M. R. 1994. Nucleosome disruption and enhancement of activator binding by a human SW1/SNF complex. *Nature*. 11 (370): 477-481.
- Lagna, G., Kovelman, R., Sukegawa, J. y Roeder, R. G. 1994. Cloning and characterization of an evolutionarily divergent DNA-binding subunit of mammalian TFIIIC. *Molecular and Cell Biology*. 14 (5): 3053-3064.
- Larminie, C. G. C. y White, R. J. 1998. Identification of a putative BRF homologue in the genome of *Caenorhabditis elegans*. *DNA Sequence*. 9 (1): 49-58.
- Lee, J. H., Jung, H. S. y Günzl, A. 2009. Transcriptionally active TFIIH of the early-diverged eukaryote *Trypanosoma brucei* harbors two novel core subunits but not a cyclin-activating kinase complex. *Nucleic Acids Research*. 37 (11): 3811-3820.
- Lee, J., Moir, R. D. y Willis, I. M. 2015. Differential phosphorylation of RNA polymerase III and the initiation factor TFIIIB in *Saccharomyces cerevisiae*. *PLoS One*. 10 (5): e0127225.
- Lesniewska, E. y Boguta, M. 2017. Novel layers of RNA polymerase III control affecting tRNA gene transcription in eukaryotes. *Open Biology*. 7: 170001.
- Martínez-Calvillo, S., Sunkin, S. M., Yan, S., 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 (2): 506-517.
- Martínez-Calvillo, S., Saxena, A., Green, A., Leland, A. y Myler, P. J. 2007. Characterization of the RNA polymerase II and III complexes in *Leishmania major*. *International Journal of Parasitology*. 37: 491-502.

- 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: 1-15.
- Martínez-Calvillo, S., Florencio-Martínez, L. E., Rojas-Sánchez, S., Moreno-Campos, R., Vizuet-de-Rueda, J. C., Román-Carraro, F. C., Flores-Pérez, C., Manning-Cela, R. G. y Figueroa-Angulo, E. E. 2012. Estructura genómica y regulación de la expresión genética en *Leishmania major* y *Trypanosoma cruzi*. 47-79. En *Genómica de parásitos. Aspectos moleculares, genómicos, proteómicos y de virulencia*. Editorial Académica Española.
- Maslov, D. A., Podlipaev, S. A., Lukes, J. 2001. Phylogeny of the Kinetoplastida: taxonomic problems and insights into the evolution of parasitism. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 96 (3): 397-402.
- Moreira, D., López-García, P. y Vickerman, K. 2004. An updated view of kinetoplastid phylogeny using environmental sequences and a closer outgroup: proposal for a new classification of the class Kinetoplastea. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 54 (5): 1861-1875.
- Myler, P. J., Audleman, L., de Vos, T., Hixson, G., Kiser, P., Lemley, C., Magness, C., Rickel, E., Sisk, E., Sunkin, S., Swartzell, S., Westlake, T., Bastien, P., Fu, G., Ivence, A. y Stuart, K. 1999. *Leishmania major* Friedlin chromosome 1 has an unusual distribution of protein-coding genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 96: 2902-2906.
- Noble, M. E. M., Endicott, J. A., Brown, N. R. y Johnson, L. N. 1997. The cyclin box fold: protein recognition in cell-cycle and transcription control. *Trends in Biochemistry Science*. 22 (12):482-487.
- Opperdoes, F. R. y Borst, P. 1977. Localization of nine glycolytic enzymes in a microbody-like organelle in *Trypanosoma brucei*: the glycosome. *FEBS Letters*. 80 (2): 360-364.

- Orioli, A., Pascali, C., Pagano, A., Teichmann, M. y Dieci, G. 2012. RNA polymerase III transcription control elements: themes and variations. *Gene*. 493 (2): 185-194.
- Padilla-Mejía, N. E., Gómez-Hurtado, C. M., Sánchez-Santamaria, I. I., Florencio-Martínez. L. E., Manning-Cela, R. G. y Martínez-Calvillo, S. 2013. Comparative genomics of *Leishmania* parasites. En *Comparative genomics in neglected human parasites*. Nova Biomedical.
- Panov, K. I., Friedrich, K., Russell, J. y Zomerdijk, J. C. B. M. 2006. UBF activates RNA polymerase I transcription by stimulating promotor escape. *The EMBO journal*. 25 (14): 3310-3322.
- Roberts, S. C. 2011. The genetic toolbox for *Leishmania* parasites. *Bioengineered Bugs*. 2 (6): 320-326.
- Rojas-Sánchez, S., Figueroa-Angulo, E., Moreno-Campos, R., Florencio-Martínez, L. E., Manning-Cela, R. G., Martínez-Calvillo, S. 2016. Transcription of *Leishmania major* U2 small nuclear RNA gene is directed by extragenic sequences located within a tRNA-like and a tRNA-Ala gene. *Parasites & Vectors*. 9: 401.
- Román-Carraro, F. C. 2012. Caracterización molecular de Bdp1, subunidad del factor de transcripción TFIIIB, en *Leishmania major*. Tesis de licenciatura. UNAM. México.
- Ruan, J., Arhin, G. K., Ullu, E. y Tschuni, C. 2004. Functional characterization of a *Trypanosoma brucei* TATA-binding protein-related factor points to a universal regulator of transcription in trypanosomes. *Molecular and Cell Biology*. 24 (21): 9610-9618.
- Sánchez-García, L., Berzunza-Cruz, M., Becker-Fauser, I. y Rebollar-Téllez, E. A. 2010. Sand flies naturally infected by *Leishmania* (L.) *mexicana* in the peri-urban area of Chetumal city, Quintana Roo, México. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 104: 406-411.
- Schimanski, B., Nguyen, T. N. y Günzl, A. 2005. Highly efficient tandem affinity purification of trypanosome protein complexes based on a novel epitope combination. *Eukaryotic Cell*. 4 (11): 1942-1950.

- Schramm, L. y Hernández, N. 2002. Recruitment of RNA polymerase III to its target promoters. *Genes & Development*. 16: 2593-2620.
- Secretaría de Salud. 2016. Leishmaniasis. Acciones y programas. <https://www.gob.mx/salud/acciones-y-programas/leishmaniasis> (URL).
- Shlomai, J. 2004. The structure and replication of kinetoplast DNA. *Current Molecular Medicine*. 4: 623-647.
- Sollelis, L., Ghorbal, M., MacPerson, C. R., Miyazawa, M. R., Kuk, N., Crobu, L., Bastien, P., Scherf, A., López-Rubio, J.J. y Sterkers, Y. 2015. First efficient CRISPR-Cas9-mediated genome editing in *Leishmania* parasites. *Cellular Microbiology*. 17 (10): 1405-1412.
- Sturm, N. R y Simpson, L. 1991. *Leishmania tarentolae* minicircles of different sequence classes encode single guide RNAs located in the variable region approximately 150 bp from the conserved región. *Nucleic Acids Research*. 19 (22): 6277-6281.
- Szöör, B., Haanstra, J. R., Gualdrón-López, M. y Michels, P. A. M. 2014. Evolution, dynamics and specialized functions of glycosomes in metabolism and development of trypanosomatids. *Current Opinion in Microbiology*. 22: 79-87.
- Tsekrekou, M., Kalliopi, S. y Chatzinikolaou, G. 2017. The nucleolus: in genome maintenance and repair. *International Journal of Molecular Sciences*. 18 (7): 1411.
- Vannini, A. y Cramer, P. 2012. Conservation between the RNA polymerase I, II and III transcription initiation machineries. *Molecular Cell*. 45: 439-446.
- Vélez-Ramírez, D. E., Florencio-Martínez, L. E., Romero-Meza, G., Rojas-Sánchez, S., Moreno-Campos, R., Arrollo, R., Manning-Cela, R. y Martínez-Calvillo, S. 2015. BRF1, a subunit of RNA polymerase III transcription factor TFIIIB, is essential for cell growth of *Trypanosoma brucei*. *Parasitology*. 142: 1563-1573.
- White, R. J. 2011. Transcription by RNA polymerase III: more complex than we thought. *Nature Reviews Genetics*. 12: 459-460.

- World Health Organization (WHO). 2016. Leishmaniasis. Revisado en <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs375/es/> (URL).
- Woiwode, A., Johnson, S. A. S., Zhong, S., Zhang, C., Roeder, R. G., Teichmann, M. y Johnson, D. L. 2008. PTEN represses RNA polymerase III-dependent transcription by targeting the TFIIIB complex. *Molecular and Cell Biology*. 28 (12): 4204-4214.
- Wong, R. G., Kazane, K., Maslov, D. A., Rogers, K, Aphasizhev, R. y Simpson, L. 2015. U-insertion/deletion RNA editing multiprotein complexes and mitochondrial ribosomes in *Leishmania tarentolae* are located in antipodal nodes adjacent to the kinetoplast DNA. *Mitochondrion*. 25: 76-86.
- Xiaoli, X., Song, Y., Li. Y., Chang, J., Zhang, H. y An, L. 2010. The tandem affinity purification method: An efficient system for protein complex purification and protein interaction identification. *Protein Expression and Purifications*. 72: 149-156.
- Zhang, W. W. y Matlashewski, G. 2015. CRISPR-Cas9-mediated genome editing in *Leishmania donovani*. *mBio*. 6 (4): e00861.