



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA  
DE MÉXICO



---

---

Facultad de Estudios Superiores Iztacala

Obtención y caracterización de clonas celulares de  
*Leishmania major* que expresen al represor de la  
transcripción Maf1 fusionado a la etiqueta PTP

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I Ó L O G O

Presenta:

Hernández Zamarripa Aldo Rodrigo



Asesor: Dr. Santiago Martínez Calvillo

Los Reyes, Iztacala, Estado de México

2019



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**

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.

A la Universidad Nacional Autónoma de México, por darme el honor de pertenecer a tan enorme institución académica y por las innumerables horas llenas de aprendizaje y crecimiento académico y personal.

Al Dr. Santiago Martínez Calvillo, por darme la oportunidad de ser parte de su grupo de trabajo, por su paciencia, su apoyo y por guiarme durante la realización de este proyecto.

A mis compañeros del Laboratorio 1 de la UBIMED, en especial al Biólogo Luis Enrique Florencio Martínez, por enseñarme a trabajar en un laboratorio, por su apoyo técnico, su paciencia al enseñar, por los regaños y la disciplina; de igual manera al Dr. Tomás Nepomuceno Mejía por su apoyo en la realización de este trabajo.

A mis revisores: la Dra. Martha Ofelia Salcedo Álvarez, el Dr. Tomás Nepomuceno Mejía, el Dr. Ismael Herminio Pérez Hernández y el Biol. Luis Enrique Florencio Martínez por sus valiosas aportaciones a este proyecto.

## AGRADECIMIENTOS PERSONALES

A mis padres, por su infinito amor y paciencia; por nunca dejar de intentar darme un hogar amoroso, así como los valores y enseñanzas que me permitan ser un hombre de bien. Por quitar de sus manos la más mínima posesión para darnos a mi hermano y a mí lo que incluso a veces, no merecemos. Por ser guías y enseñarme con el ejemplo siempre y porque aún en las situaciones adversas, cuando la derrota parecía inminente, nos han sacado adelante.

A mi hermano, por los buenos momentos y risas, y por esas muestras de afecto y de amor que por siempre en mi mente y corazón estarán guardados.

A toda aquellos primos, tíos, padrinos y demás familia que me han tenido en sus pensamientos, oraciones y se han interesado por mi bienestar.

A Abril, por estar a mí lado gran parte de la carrera y vivir conmigo experiencias que nos han hecho crecer como profesionistas y pareja bajo uno de los más bonitos y complejos pilares, el amor.

A Enrique, Edson, Dianita y demás amigos que hicieron del CCH algo memorable y entrañable. De igual manera a Martín, por ser un gran amigo y tenerme siempre contemplado en su vida a pesar de la distancia física y de las fallas.

A esos amigos con los que viví experiencias maravillosas durante la carrera, llenas de compañerismo, aprendizaje y sobre todo risas. A Fercho, Jorge, Brito, Brenda (Montaño), Marianita, entre muchas otras personas que cruzaron su camino académico con el mío. Sobre todo a Gino, del cual no me pude librar desde el principio pero a cambio me ha brindado años de amistad y confidencialidad.

A los chicos del laboratorio, por sus útiles y bien recibidas observaciones y consejos, así como sus palabras de aliento y pláticas personales que me permitieron conocer un poco de su vida. Gracias personalmente al Doctor Santiago por esas clases tan buenas de genética y por brindarme su apoyo y confianza durante la estadía en su laboratorio.

A todas esas personas que no son mencionadas pero que me impulsaron a llegar hasta estas instancias. A esos profes buenos y malos porque todos me enseñaron algo, cómo se debe y no se debe ser en la docencia.

A los que no creyeron en mí (que espero hayan sido pocos) porque también me impulsaron a demostrar que se equivocan.

# Índice

<b>Agradecimientos</b> .....	II
<b>Lista de figuras y tablas</b> .....	III
<b>Abreviaturas</b> .....	V
<b>Resumen</b> .....	VII
<b>1. Introducción</b> .....	1
1.1 Características generales del género <i>Leishmania</i> .....	1
1.2 Leishmaniasis .....	3
1.2.1 Formas clínicas.....	4
1.3 Ciclo de vida de <i>Leishmania</i> .....	7
1.4 Transcripción en eucariontes .....	9
1.4.1 RNA Polimerasa I .....	11
1.4.2 RNA Polimerasa II .....	12
1.4.3 RNA Polimerasa III .....	13
1.4.3.1 Promotores de la RNA Pol III .....	15
1.4.3.2 Factores de transcripción generales de la RNA Pol III .....	16
1.4.4 Reguladores de la transcripción de la RNA Pol III .....	18
1.4.5 Maf1, regulador negativo de la transcripción de la RNA Pol III .....	20
1.4.6 Modificaciones post-traduccionales de Maf1 .....	22
1.4.7 Localización celular de Maf1 .....	26
1.5 Biología molecular de <i>Leishmania</i> .....	27
1.5.1 Transcripción policistrónica.....	27
1.5.2 <i>Trans-splicing</i> .....	28
1.5.3 Promotores en Tripanosomátidos.....	29
1.6. Purificación de complejos proteicos.....	32
1.7 Antecedentes directos.....	34
<b>2. Objetivos</b> .....	35
2.1 Objetivo general .....	35
2.2 Objetivos particulares.....	35
<b>3. Estrategia Experimental</b> .....	36

<b>4. Materiales y métodos</b> .....	37
4.1 Análisis <i>in silico</i> .....	37
4.2 Cultivo y conteo de promastigotes .....	37
4.3 Amplificación por PCR .....	38
4.4 Clonación en el vector pGEM-T-EASY .....	38
4.5 Subclonación en vector de expresión PTP .....	40
4.6 Preparaciones plasmídicas .....	40
4.7 Transfección de <i>Leishmania</i> por electroporación.....	41
4.8 Obtención de clonas celulares de <i>Leishmania</i> por cultivo en placa .....	42
4.9 Análisis de la expresión de proteínas recombinantes .....	43
4.10 Purificación por Afinidad en Tándem .....	44
4.11 Preparación de las muestras proteicas para su análisis por espectrometría de masas.....	45
<b>5. Resultados</b> .....	47
5.1 Análisis de la secuencia de LmMaf1 .....	47
5.1.2 Determinación <i>in silico</i> de las estructuras secundaria y terciaria de LmMaf1 .....	49
5.1.3 Maf1 está conservada entre tripanosomátidos .....	50
5.2 Clonación de LmMaf1 en el vector pGEM-T-EASY.....	52
5.3 Construcción del vector PTP .....	56
5.4 Análisis de la expresión de proteínas recombinantes .....	61
5.5 Purificaciones por afinidad en tándem .....	62
5.6 Análisis por espectrometría de masas .....	63
<b>6. Discusión</b> .....	66
<b>7. Principales logros y conclusiones</b> .....	71
<b>8. Literatura citada</b> .....	72

## LISTA DE FIGURAS Y TABLAS

Fig. 1. Esquema de la morfología de los tripanosomátidos.....	1
Fig. 2. DNA mitocondrial. ....	2
Fig. 3. Promastigotes y Amastigotes de <i>Leishmania</i> sp.....	3
Fig. 4. Manifestaciones clínicas de leishmaniasis.. ....	4
Fig. 5. Distribución de leishmaniasis en México. ....	6
Fig. 6. Ciclo de vida de <i>Leishmania</i> .....	7
Fig. 7. Proceso de transcripción .....	9
Fig. 8. RNA polimerasas I, II y III.....	10
Fig. 9. Estructura cristalina de la RNA polimerasa I de levadura.....	12
Fig. 10. Modelo tridimensional completo de 12 subunidades la RNA Pol II ....	13
Fig. 11. Vista superior y frontal de la RNA Pol III .....	14
Fig. 12. Tipos de promotores de RNA polimerasa III en humanos .....	16
Fig. 13. Promotores y factores de transcripción de la maquinaria de transcripción de la RNA Pol III humana.....	18
Fig. 14. Modelo de acción de Maf1 .....	21
Fig. 15. Señalización al sistema de la RNA Pol III en levadura.....	23
Fig. 16. Transcripción policistrónica, <i>trans-splicing</i> y poliadenilación en los tripanosomátidos .....	28
Fig. 17. Mecanismo de <i>cis-splicing</i> y <i>trans-splicing</i> .....	29
Fig. 18. Purificación por afinidad en tándem. ....	33
Fig. 19. Cassette de extracción PTP .....	33
Fig. 20. Análisis de secuencia y estructura de LmMaf1. ....	48
Fig. 21. Predicción de la estructura tridimensional de Lmmaf1 y Hsmaf1. ....	49
Fig. 22. Alineamiento de secuencia de aminoácidos de Maf1 de tripanosomátidos .....	51
Fig. 23. Amplificación por PCR del gen Maf1 de <i>L. major</i> .....	53
Fig. 24. Digestión de plásmido .....	54
Fig. 25. Alineamiento de la secuencia del gen de Maf1 de <i>L. major</i> .....	55
Fig. 26. Mapa del vector pGE-LmMaf1.....	56
Fig. 27. Electroforesis de DNA de plásmido pb6-PTP.....	57
Fig. 28. Análisis de restricción de clonas obtenidas de la ligación de LmMaf1 al vector PTP. ....	58
Fig. 29. Secuencia génica y de aminoácidos del gen LmMaf1 unido a la bandera PTP.....	59
Fig. 30. Mapa del vector pLmMaf1-PTP.....	60
Fig. 31. Digestión de DNA de plásmido pLmMaf1-PTP.....	60
Fig. 32. Análisis de <i>Western blot</i> de las clonas celulares transfectantes de <i>L.</i> <i>major</i> con LmMaf1-PTP .....	61
Fig. 33. Purificación por afinidad en tándem de LmMaf1-PTP. ....	63



Tabla 1. Oligonucleótidos utilizados para amplificar el gen de Maf1 de <i>L.major</i> . .....	38
Tabla 2. Porcentajes de identidad entre Maf1 de distintas especies de tripanosomátidos y Maf1 de humano. ....	52
Tabla 3. Proteínas identificadas en la espectrometría de masas. ....	65

## ABREVIATURAS

Amp <sup>r</sup>	Gen de resistencia a ampicilina
CBP	Péptido de Unión a Calmodulina ( <i>Calmodulin Binding Peptide</i> )
CK2	Caseína Cinasa 2
DNA	Ácido desoxirribonucleico
G418	Neomicina
Kb	Kilobases
KDa	Kilodaltones
MAPK	Proteína Cinasa Activada por Mitógeno ( <i>Mitogen-Activated Protein</i> )
Neo <sup>r</sup>	Gen de resistencia a Neomicina
NLS	Secuencia de Localización Nuclear ( <i>Nuclear Localization Sequence</i> )
pb	Pares de bases
PBS	Amortiguador de Fosfatos ( <i>Phosphate Buffered Saline</i> )
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa ( <i>Polymerase Chain Reaction</i> )
PKA	Proteína Cinasa A
PTP	Péptido de extracción con dominios Prot A-TEV-Prot C
Prot A	Dominio de Proteína A
Prot C	Dominio de Proteína C
RNA Pol I	RNA Polimerasa I
RNA Pol II	RNA Polimerasa II
RNA Pol III	RNA Polimerasa III

RNA	Ácido ribonucleico
mRNA	RNA mensajero
rRNA	RNA ribosomal
snRNA	RNA pequeño nuclear
RNP	Ribonucleoproteína
SL RNA	RNA <i>Spliced Leader</i>
SNAPc	Complejo Proteico Activador de snRNA ( <i>Small Nuclear RNA Activating Complex Polypeptide</i> )
snoRNA	RNA pequeño nucleolar
SUMO	<i>Small Ubiquitin-related Modifier</i>
TAP	Purificación por Afinidad en Tándem ( <i>Tandem Affinity Purification</i> )
TBP	Proteína de Unión a Baja TATA ( <i>TATA Binding Protein</i> )
TOR	Diana de Rapamicina ( <i>Target of Rapamicin</i> )
TORC	Diana del Complejo de Rapamicina ( <i>Target of Rapamicin Complex</i> )
tRNA	RNA de transferencia
UFC	Unidad(es) Formadora(s) de Colonia
UPS	Sistema de proteosoma de ubiquitina ( <i>Ubiquitin-Proteasome System</i> )

## RESUMEN

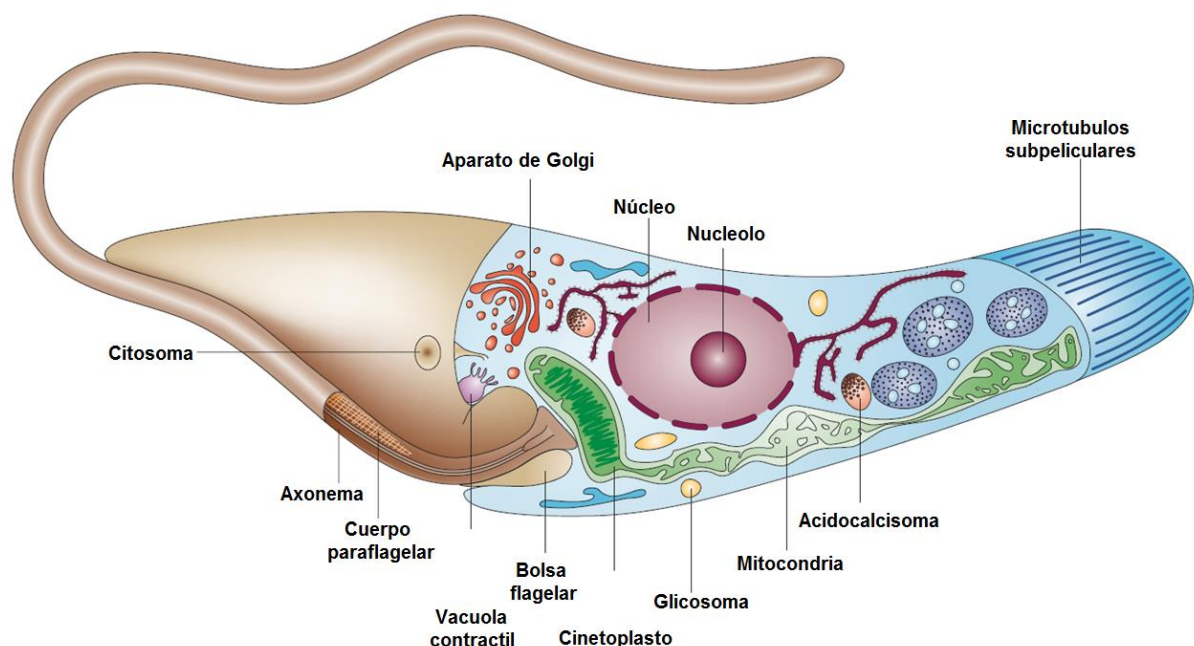
*Leishmania* es un protozoo flagelado que pertenece a la familia de los tripanosomátidos, los cuales se caracterizan por presentar mecanismos de expresión genética diferentes a los de otros eucariontes. Nuestro grupo de trabajo está interesado en el estudio de la transcripción de la RNA polimerasa III (RNA Pol III), encargada de transcribir tRNAs, rRNA 5S y snRNAs, moléculas esenciales para la viabilidad celular. Maf1 es un regulador negativo de la transcripción de la RNA Pol III. En este trabajo se inició la caracterización molecular de Maf1 en *L. major* (LmMaf1). Mediante análisis *in silico* se determinó que LmMaf1 posee las tres secuencias típicas de ortólogos de Maf1 (los dominios A, B y C). También se observó que LmMaf1 presenta una probable estructura globular muy parecida a la de Maf1 de humano. Asimismo, se generaron y analizaron clonas celulares de *L. major* que expresan la proteína recombinante LmMaf1 fusionada a la bandera PTP. Con ellas se hicieron experimentos de purificación por afinidad en tándem para identificar las proteínas con las que interactúa LmMaf1 para reprimir la transcripción. Para ello, el gen de LmMaf1 fue amplificado por Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés) y clonado en el vector pGEMT-Easy. Posteriormente, el gen de LmMaf1 fue subclonado en el vector PTP. El plásmido resultante fue transfectado por electroporación en promastigotes de *L. major*. Se obtuvieron clonas celulares transfectadas establemente, las cuales se caracterizaron por *Western blot*. Con una de las clonas se realizaron los experimentos de Purificación por Afinidad en Tándem (TAP, por sus siglas en inglés). Las proteínas purificadas se identificaron mediante espectrometría de masas y análisis en las bases de datos del genoma de *L. major*. Nuestros resultados indican que en promastigotes de *L. major*, LmMaf1 interacciona con proteínas ligadas al proteosoma, la biogénesis ribosomal y la traducción. Los datos también sugieren la interacción de Maf1 con una MAP triple cinasa (MAPKKK).

# 1. Introducción

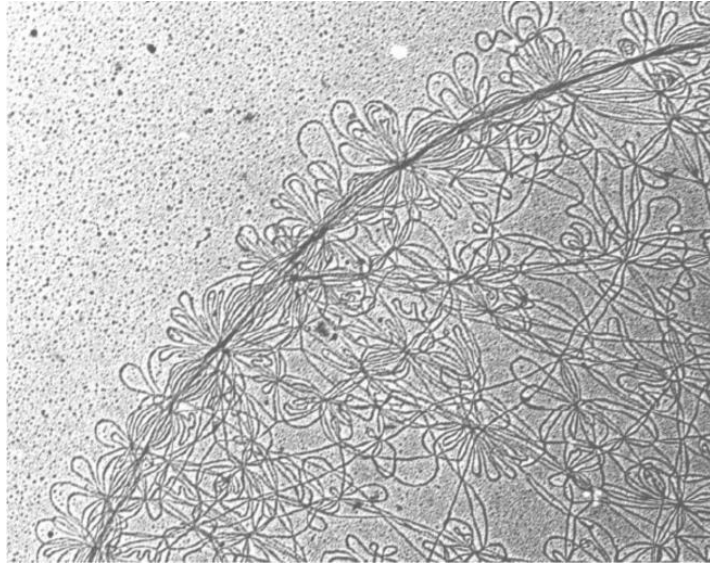
## 1.1 Características generales del género *Leishmania*

Los organismos del género *Leishmania* son protozoos parásitos unicelulares que pertenecen a la familia *Trypanosomatidae*, del orden *Kinetoplastida* (Momen, 2003). Los miembros de este orden se caracterizan por la presencia de un DNA mitocondrial muy particular, llamado cinetoplasto (Figura 1), el cual se encuentra formado por una red compleja de moléculas circulares (Figura 2) (Maslov *et al.*, 2001; Liu *et al.*, 2005). En este organelo se lleva a cabo la edición del RNA, un proceso que involucra la adición o deleción de residuos de uridina que pueden duplicar el tamaño del transcrito y son esenciales para generar marcos de lectura abiertos, proceso descrito por primera vez en un estudio realizado en *T. brucei* (Benne *et al.*, 1986).

Otra característica importante de los tripanosomátidos son los microtúbulos subpelliculares, una capa de microtúbulos que corre longitudinalmente por debajo de la membrana plasmática (Figura 1). La remodelación de este citoesqueleto facilita los cambios morfológicos de los diferentes estadios de desarrollo de *Leishmania* (Padilla-Mejía *et al.*, 2013).



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

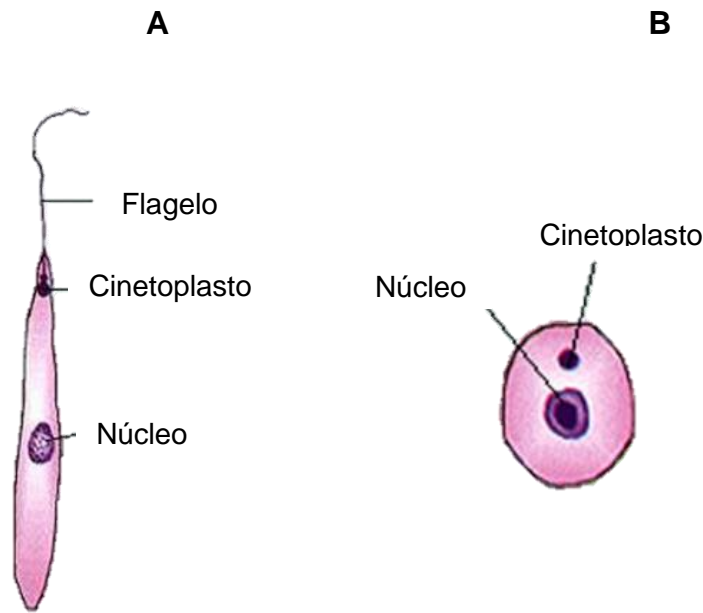


**Fig. 2.** DNA mitocondrial. Fotografía tomada con microscopio electrónico de un segmento del DNA de cinetoplasto del tripanosomátido *Crithidia fasciculata*, donde se observa el arreglo de los minicírculos. Tomado de Klingbeil y Englund, 2004.

Muchos de los tripanosomátidos provocan graves enfermedades de importancia médica y veterinaria que se encuentran dentro del grupo de enfermedades tropicales desatendidas señaladas por la Organización Mundial de la Salud (OMS). Entre éstas se encuentra la tripanosomiasis africana y la enfermedad de Chagas, causadas por *Trypanosoma brucei* y por *Trypanosoma cruzi*, respectivamente. La leishmaniasis en sus variantes visceral, cutánea y mucocutánea, es causada por parásitos del género *Leishmania*. Los organismos pertenecientes a esta familia pueden tener ciclos de vida mono o digenéticos, que se caracterizan por una sucesión de diferentes formas adaptadas a medios ambientes diversos, alternando estadios replicativos y no replicativos, infectivos y no infectivos (Stevens *et al.*, 2001). En particular, *Leishmania* presenta tres estadios de desarrollo principales: el promastigote procíclico, el promastigote metacíclico y el amastigote.

Los promastigotes (tanto procíclicos como metacíclicos) tienen forma lanceolada (de ~15 a 30  $\mu\text{m}$  de largo), con un núcleo central y un flagelo largo que emerge de la parte anterior de la célula (Figura 3 A); el cinetoplasto aparece como una banda granular electrodensa dentro de la extensión de la mitocondria, localizada a 1-2  $\mu\text{m}$  del extremo anterior del parásito, de donde emerge el flagelo.

El amastigote es la forma replicativa en el hospedero vertebrado (Figura 3 B). Es redondo, mide de 2-4  $\mu\text{m}$  y presenta un flagelo muy reducido, que apenas sobresale del cuerpo del parásito. Este estadio intracelular se multiplica en fagolisosomas dentro de fagocitos mononucleares de los hospederos, aunque también se ha reportado que puede infectar neutrófilos y fibroblastos en lesiones de piel (Laskay, *et al.* 2003).



**Fig. 3.** Estadios de promastigote **(A)** y amastigote **(B)** de *Leishmania* sp.

## 1.2 Leishmaniasis

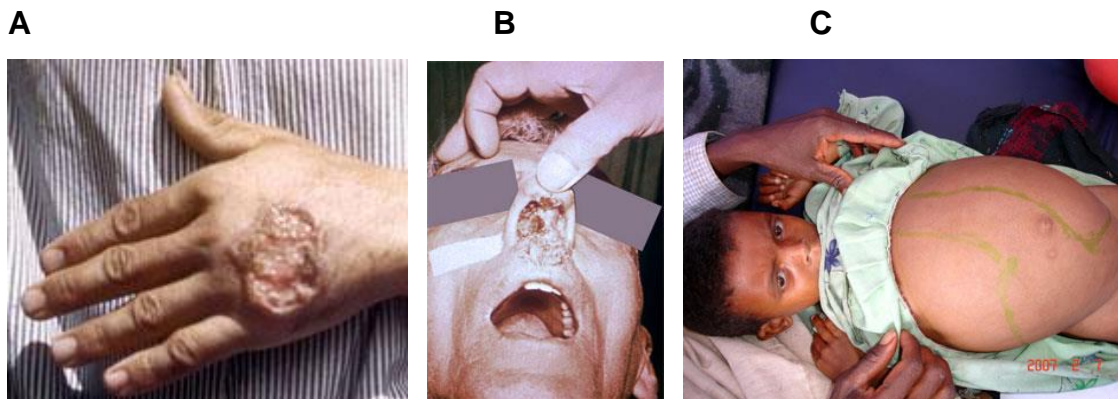
*Leishmania* es el agente causal de la leishmaniasis, la cual comprende un grupo amplio de enfermedades que exponen diferentes manifestaciones clínicas en humanos. Las variedades de la enfermedad dependen no sólo de la especie que infecta, sino también de la salud general y la estructura genética del hospedero (Alexander *et al.*, 1999). Se estima que cada año se producen entre 700 000 y 1 millón de nuevos casos y entre 20 000 y 30 000 defunciones (WHO, 2017).

La leishmaniasis es causada por alrededor de 20 especies de *Leishmania* (incluida *L. major*) y es transmitida a humanos por la picadura de la hembra de un díptero conocido como flebotómo o mosca de la arena. Se

conocen más de 90 especies de flebotominos transmisores de *Leishmania* (WHO, 2017).

### 1.2.1 Formas clínicas

La leishmaniasis presenta manifestaciones clínicas muy diversas, y se divide en tres tipos principales: cutánea, mucocutánea y visceral (Figura 4).



**Fig. 4.** Manifestaciones clínicas de leishmaniasis. **A)** Ulceración en la mano por leishmaniasis cutánea. **B)** Leishmaniasis mucocutánea. Lesión conocida como "nariz de tapir". **C)** Leishmaniasis visceral en niña. Tomado de WHO, 2017.

La leishmaniasis cutánea es la más común de las tres variedades y se caracteriza por la presencia de úlceras en el sitio de la picadura del insecto transmisor. Es causada por *L. major* y *L. mexicana*, entre otras especies. Más del 50% de los casos sanan sin tratamiento a los 6 meses de la infección (Martínez-Calvillo et al., 2012; Hailu et al., 2016). Un tercio de los casos ocurre en cada una de las siguientes regiones epidemiológicas: América Latina, los países alrededor del Mar Mediterráneo y en Asia, desde Medio Oriente hasta Asia Central. Los diez países que reportan la mayor cantidad de casos, con un estimado del 70-75% global, son: Afganistán, Argelia, Colombia, Brasil, Irán, Siria, Etiopía, Sudán del norte, Costa Rica y Perú (Alvar et al., 2012).

Se consideran dos cuadros clínicos cutáneos: leishmaniasis cutánea localizada (LCL), generalmente circunscrita al sitio de inoculación gracias a una respuesta inmune celular protectora, y leishmaniasis cutánea diseminada



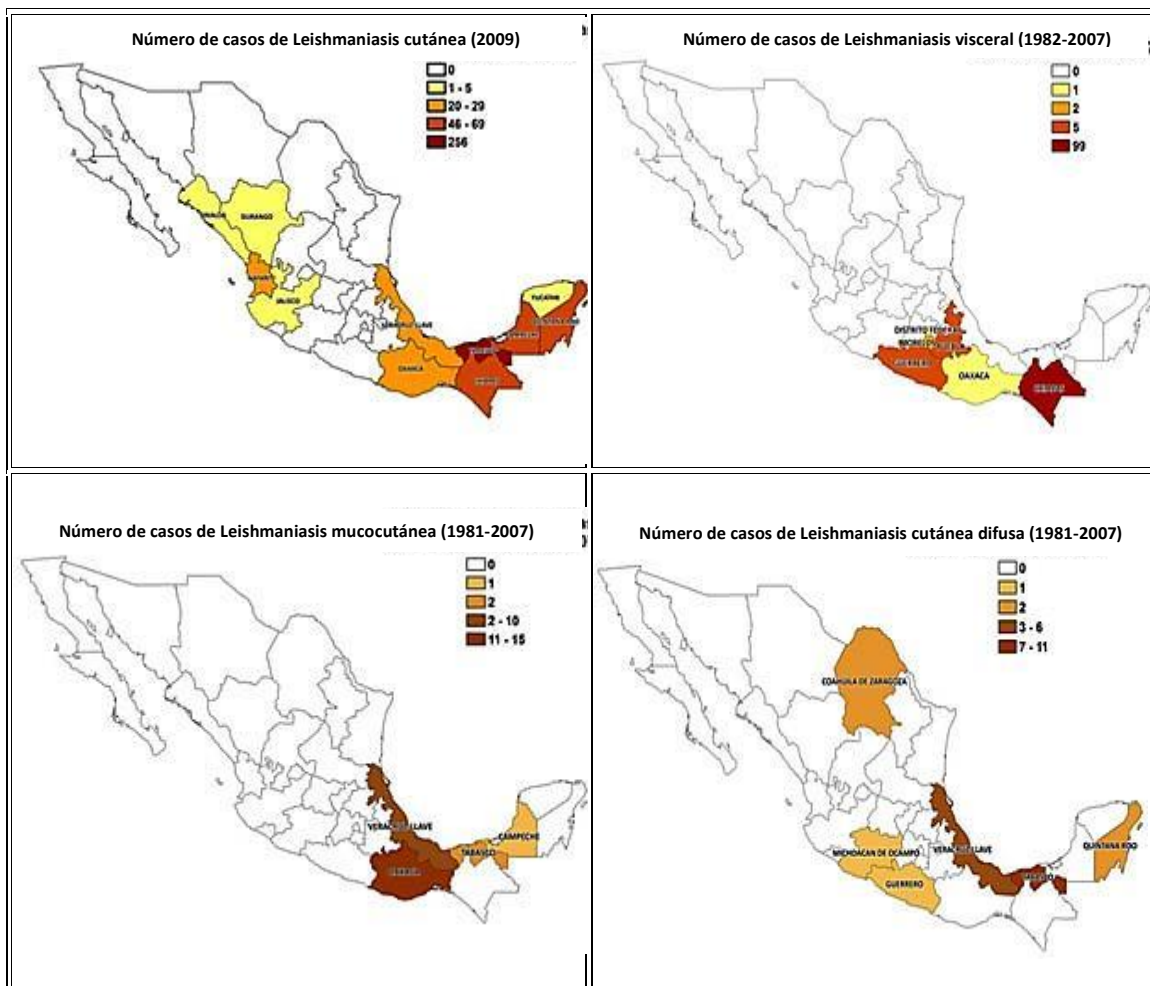
(LCD) caracterizada por una pobre respuesta inmune celular, que permite la diseminación no controlada en piel (Alvar *et al.*, 2012).

Las lesiones causadas por la leishmaniasis mucocutánea son las más desfigurantes, ya que son producto de la destrucción de las membranas mucosas de la nariz y boca, así como de tejidos periféricos. Después de la lesión inicial, ésta se cura lenta y espontáneamente, aunque después regresa de manera crónica (en pocos meses o años) a manera de úlceras en la piel, boca y nariz, con la destrucción del tejido subyacente (cartílago nasal, por ejemplo). La destrucción del tejido en este caso puede ser muy severa (Bates, 2007). Ésta es causada principalmente por *L. braziliensis*.

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

En México se han reportado casos de los tres tipos de leishmaniasis (Figura 5). La leishmaniasis cutánea, producida por *L. mexicana*, se distribuye principalmente en las regiones del sur del país, como la península de Yucatán, Veracruz y Oaxaca, aunque también hay reportes en estados del centro y norte del país. La leishmaniasis mucocutánea es muy escasa y se ha reportado en los estados de Oaxaca, Veracruz, Tabasco y Campeche, donde es generada por *L. braziliensis*. La leishmaniasis visceral ha sido reportada en el estado de Guerrero desde 1952, pero actualmente es más abundante en Chiapas, con

141 casos entre 1981 y 2010 y un promedio de 8 a 15 casos al año, resultando en un 90% del total de los casos de leishmaniasis visceral en México (Alvar *et al.*, 2012). Esta variedad es producida por *L. infantum*, anteriormente conocida como *L. chagasi* en México (Alvar *et al.*, 2012; Monroy-Ostria y Sanchez-Tejada, 2002).



**Fig. 5.** Distribución de leishmaniasis en México. Tomado de Alvar *et al.*, 2012

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

### 1.3 Ciclo de vida de *Leishmania*

Todas las especies de *Leishmania* son transmitidas por la mosca de arena, perteneciente a los géneros *Phlebotomus* o *Lutzomyia*. El ciclo de vida comienza con la picadura de una mosca infectada, con la que se transmiten al hospedero mamífero los promastigotes metacíclicos, que son las formas infectivas del parásito (Figura 6).

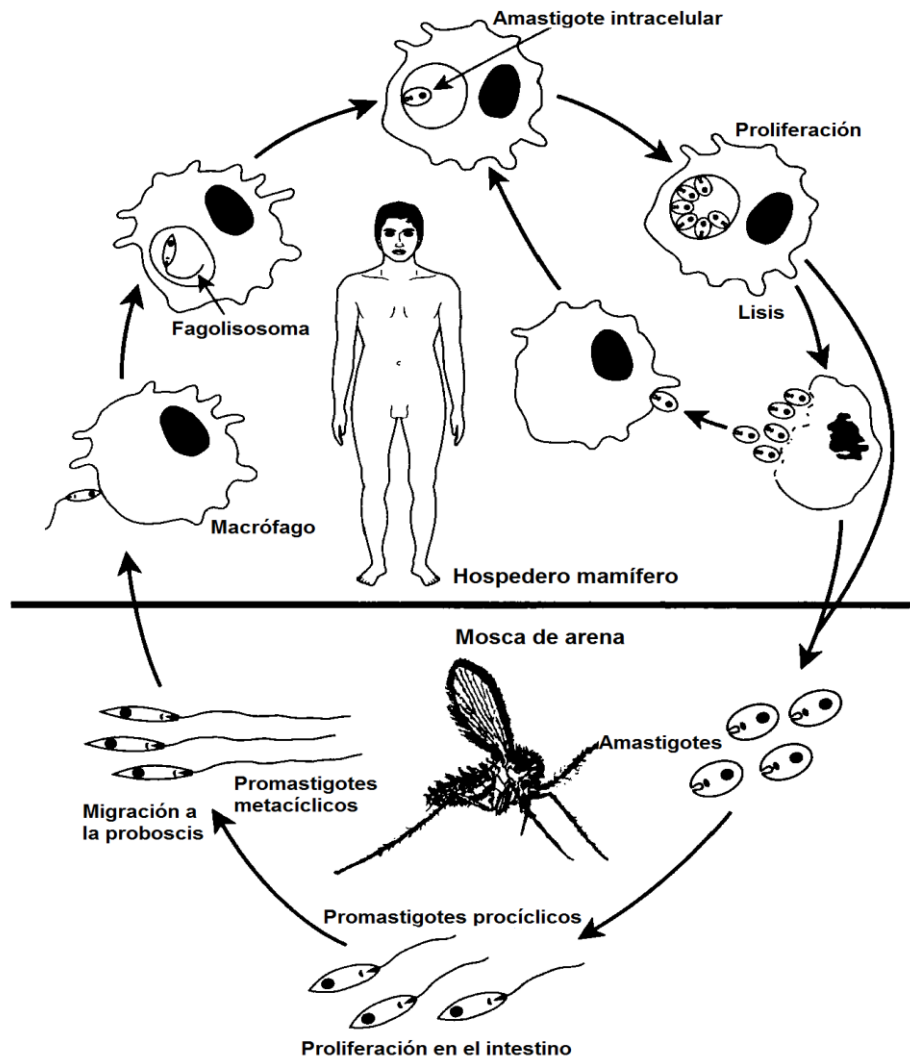


Fig. 6. Ciclo de vida de *Leishmania*. Tomado de Handman, 1999.

Éstas son fagocitadas por los macrófagos, residiendo inicialmente en fagosomas, los que son después modificados mediante la fusión con los lisosomas, resultando en la formación del fagolisosoma o vacuola parasitófora, que contiene enzimas hidrolíticas en un ambiente ácido favorable a la cinética digestiva de dichas enzimas. Es este cambio en las condiciones el que

desencadena la diferenciación a amastigotes, con la pérdida del flagelo, el cierre de la bolsa flagelar y una disminución en el tamaño (Figura 6) (Martínez-Calvillo *et al.*, 2012; Handman, 1999).

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

Otro cambio importante en el parásito es la expresión de proteínas de adhesión al epitelio que impiden su eliminación durante el proceso de digestión por acción de las enzimas hidrolíticas (Nieves y Rondon, 2007). Los promastigotes procíclicos se unen a la pared del intestino medio iniciando su ciclo de división celular y posteriormente después migran al aparato bucal de la mosca, donde se diferencian en promastigotes metacíclicos, estadio infectivo del hospedero vertebrado (Figura 6) (Martínez-Calvillo *et al.*, 2012).

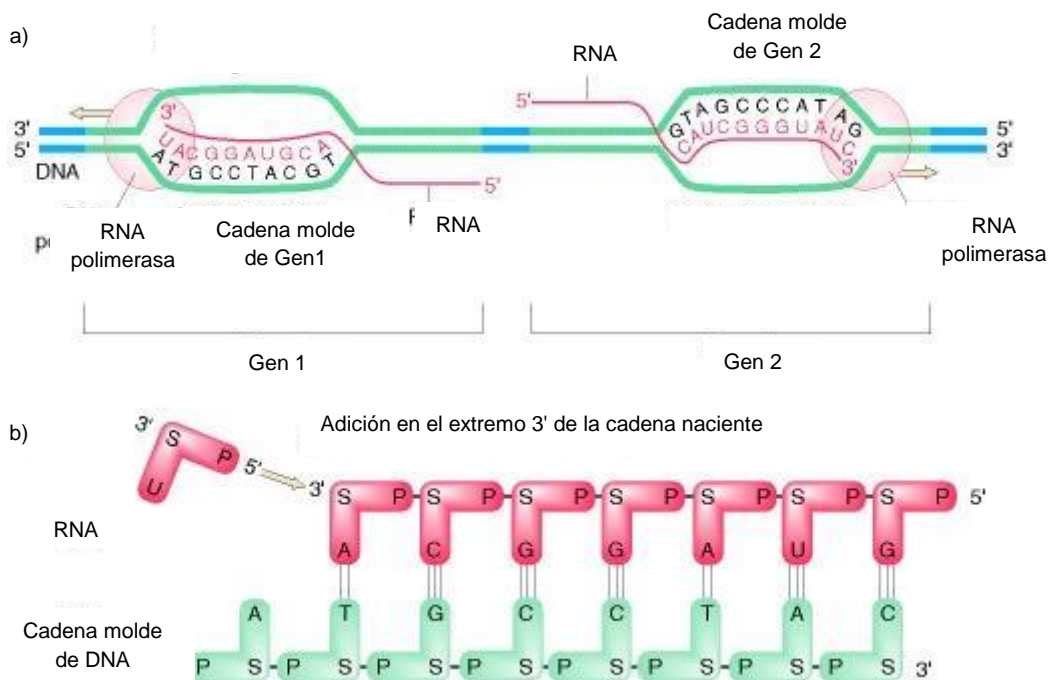
Además de su importancia médica, los parásitos del género *Leishmania* son también importantes por presentar mecanismos de expresión genética atípicos, diferentes a los presentes en otros organismos eucariontes. En nuestro laboratorio estamos interesados en estudiar los mecanismos

transcripcionales en este parásito. En particular, nuestro interés está enfocado en el análisis de la transcripción de la RNA Pol III, la cual sintetiza moléculas de RNA pequeñas que son esenciales para el crecimiento celular.

## 1.4 Transcripción en eucariontes

La transcripción es el proceso mediante el cual las moléculas de RNA son sintetizadas a partir de una secuencia de DNA (Das *et al.*, 2008). En el caso de los genes codificantes de proteínas, la molécula de RNA, o transcrito, contiene la información necesaria para generar un polipéptido (una proteína o la subunidad de un complejo proteico). Los transcritos eucariontes necesitan someterse a algunos pasos de procesamiento antes de traducirse en proteínas.

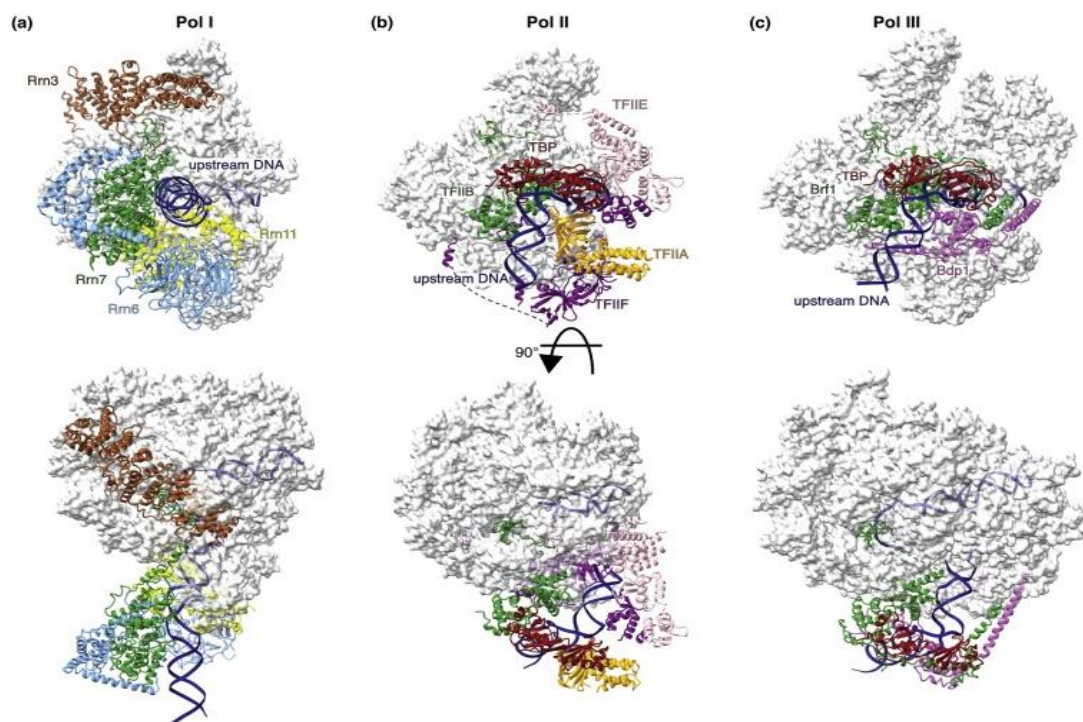
La transcripción se basa en el emparejamiento complementario de las bases. Las dos hebras de la doble hélice se separan y una de ellas actúa como una plantilla.



**Fig. 7.** Transcripción de dos genes (a) La RNA polimerasa se mueve desde el extremo 3' de la cadena molde, creando una cadena de RNA que crece en una dirección 5' → 3' (porque debe ser antiparalela a la cadena molde). (b) Adición de un uracilo al extremo 3' de la molécula de RNA en crecimiento (5' → 3'). Tomado de Griffiths *et al.*, 2000.

A continuación, los nucleótidos libres se alinean en la plantilla de DNA mediante sus bases complementarias. El ribonucleótido A libre se alinea con T en el DNA, G con C, C con G y U con A. El proceso es catalizado por la enzima RNA polimerasa, que se une y se mueve a lo largo del DNA añadiendo ribonucleótidos en el RNA en crecimiento (Figura 7) (Griffiths *et al.*, 2000).

Hay tres RNA polimerasas nucleares principales en eucariontes: RNA polimerasa I (RNA Pol I), RNA polimerasa II (RNA Pol II) y RNA polimerasa III (RNA Pol III) (Figura 8). Cada una de ellas se encarga de transcribir distintos genes. La RNA Pol I, que se encuentra en el nucléolo, se encarga de la síntesis de los RNAs ribosomales (rRNA) 18S, 28S y 5.8S. La RNA Pol II, localizada en el nucleoplasma, transcribe todos los RNAs mensajeros (mRNAs), los RNAs pequeños nucleolares (snoRNAs), algunos RNAs pequeños nucleares (snRNAs) y los microRNAs (miRNAs).



**Fig. 8.** Estructuras de alta resolución de los complejos de preiniciación (PIC) de las RNA polimerasas I, II y III. Tomado de Hanske *et al.*, 2018.

La RNA Pol III, también encontrada en el nucleoplasma, es responsable de la síntesis de moléculas importantes como los RNAs de transferencia (tRNAs) que sirven como adaptadores entre los mRNAs y los aminoácidos durante la síntesis de proteínas; el rRNA 5S, un componente de la subunidad mayor de los ribosomas, y algunos snRNAs, involucrados en el proceso de

*splicing* (Martin, 2001). Si bien la función de cada enzima RNA Pol difiere, sus estructuras están parcialmente conservadas (Figura 8).

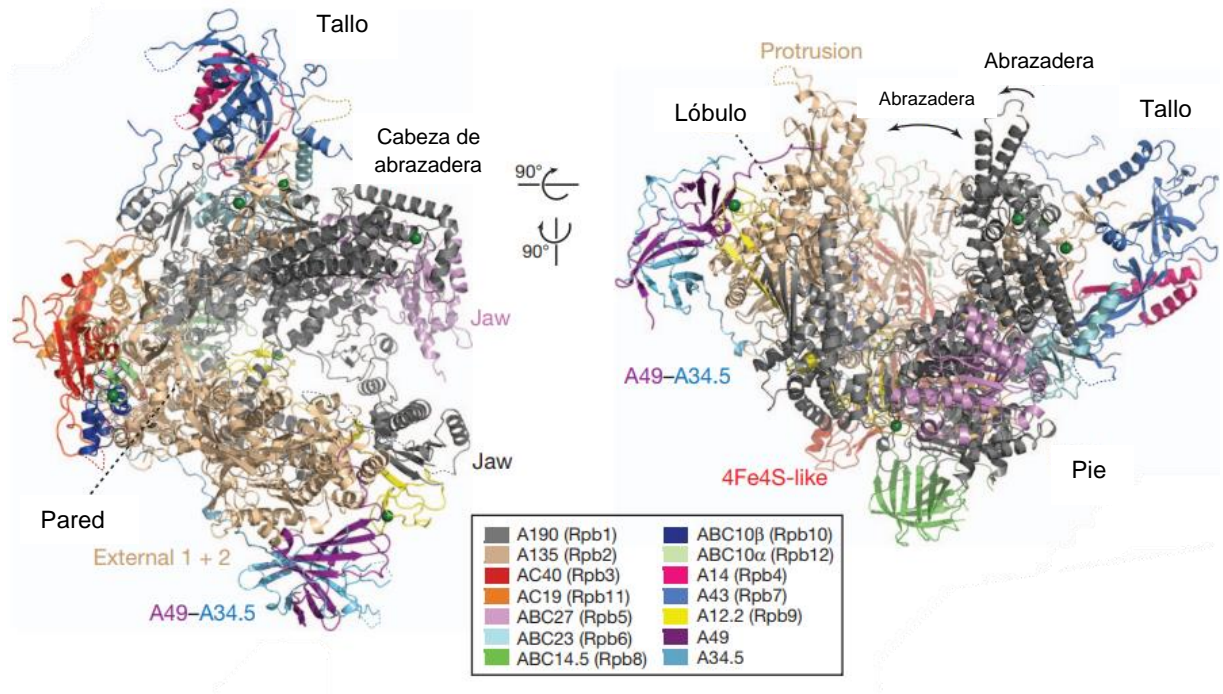
Además de la RNA Pol, se necesitan factores de transcripción para la síntesis del RNA. Se conoce como factor de transcripción a cualquier proteína necesaria para el inicio de la transcripción que no forma parte de la RNA Pol. Muchos factores de transcripción actúan reconociendo sitios específicos en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

### **1.4.1 RNA Polimerasa I**

En levadura, se considera que el rRNA constituye arriba del 80% del RNA total en la célula (Kuhn *et al.*, 2007). La RNA Pol I (Figura 9) está compuesta de 14 subunidades, 5 de ellas compartidas entre las tres RNA Polimerasas (ABC27, ABC23, ABC14.5, ABC10 $\alpha$  y ABC10 $\beta$ ), dos subunidades mayores (A190, A135) y dos subunidades compartidas con la RNA Pol III, AC40 y AC19.

Dos subunidades forman un heterodímero (A14/A43) el cual tiene relación funcional con heterodímeros formados en la RNA Pol II y la RNA Pol III (B32/B16 y C17/C25, respectivamente).

De las tres restantes, una subunidad (A12.2) es homóloga de la subunidad B12.6 de la RNA Pol II y de C11 de la RNA Pol III, y dos subunidades no tienen contrapartes en otras Polimerasas (A49 y A34.5) (Geiduschek y Kassavetis, 2001).

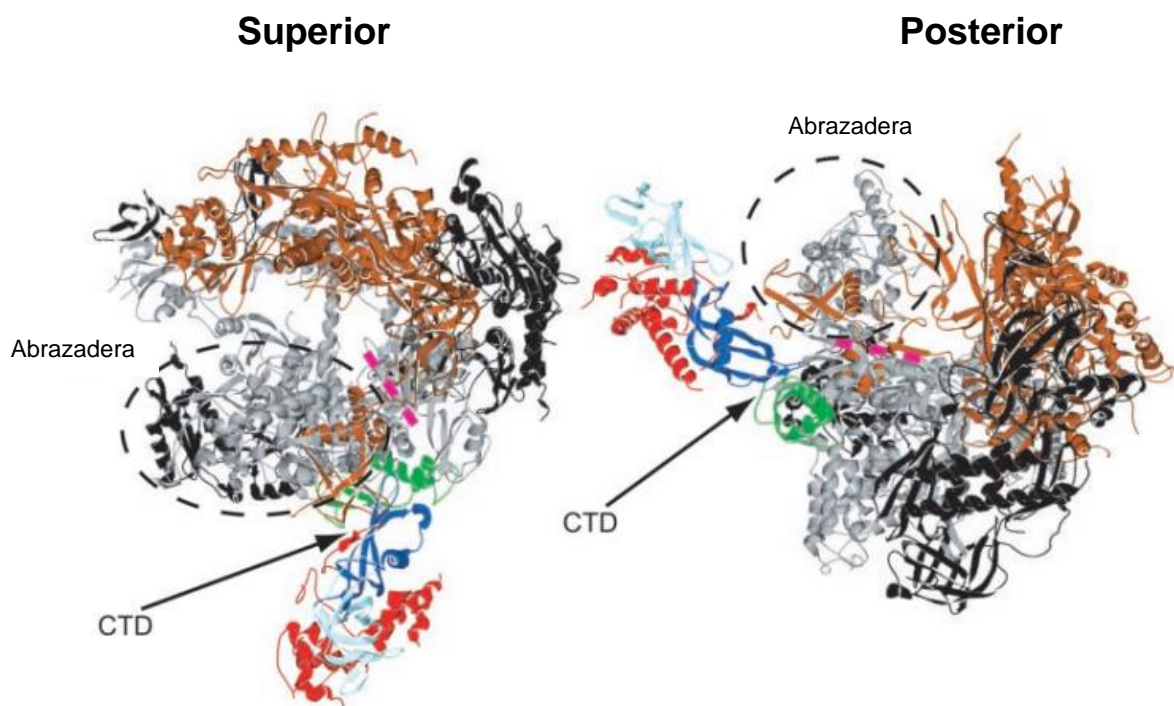


**Fig. 9.** Estructura cristalina de la RNA polimerasa I de levadura. Dos vistas ortogonales del modelo con diferentes dominios y elementos. El código de color para las 14 subunidades se indica en la caja con las correspondientes subunidades de la RNA Pol II entre paréntesis. Modificada de Fernández-Tornero *et al.*, 2013.

## 1.4.2 RNA Polimerasa II

La RNA Pol II se localiza en el nucleoplasma, y transcribe todos los mRNAs, los snoRNAs, algunos snRNAs y los microRNAs. La mayoría de eucariontes tienen una RNA Pol II con 12 subunidades (Figura 10) (con una masa de aproximadamente 550 kDa). Además otras proteínas son requeridas para la actividad completa de la enzima, y la holoenzima puede tener una masa de 4000 kDa (Bushnell y Kornberg, 2003).

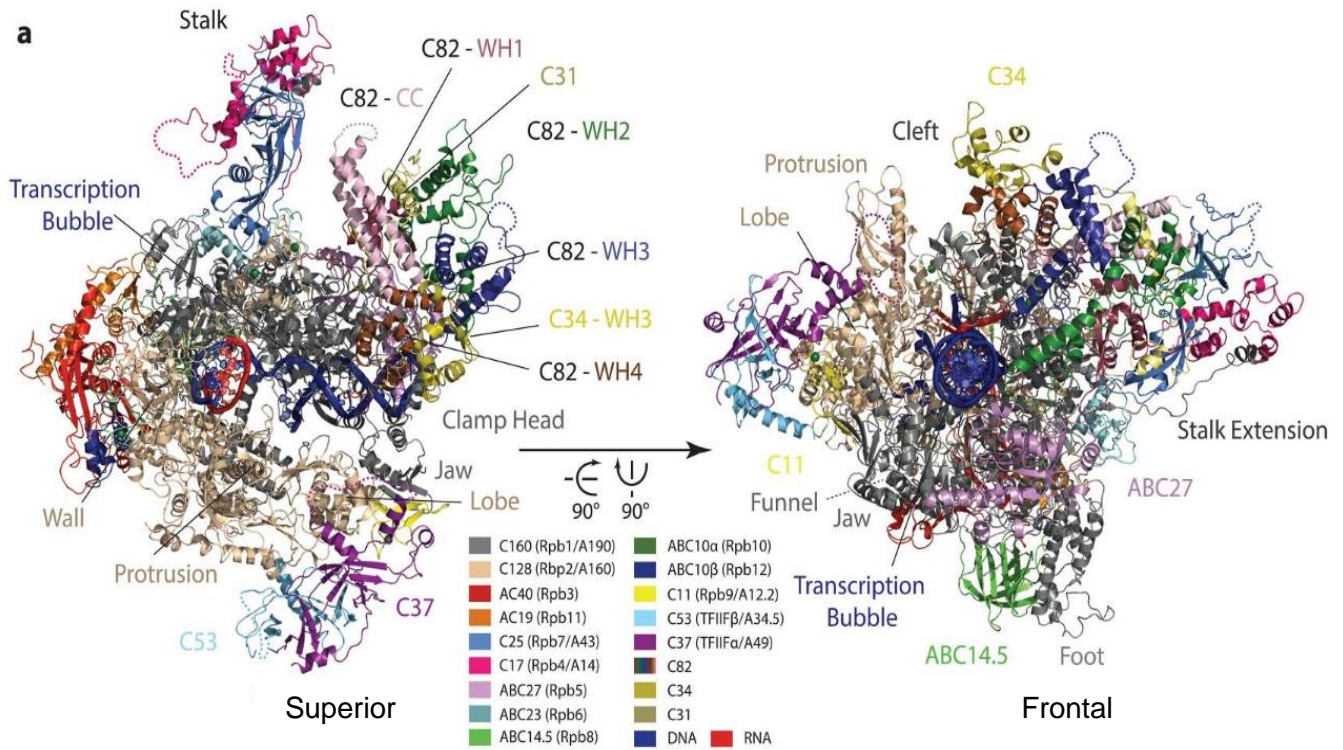




**Fig. 10.** Modelo tridimensional de la RNA Pol II. Se muestra una representación de la estructura completa con las 12 subunidades, vistas superior y posterior. (Cramer *et al.*, 2000 y Cramer *et al.*, 2001). B220 se muestra en gris, B150 en bronce, B32 en rojo, ABC23 en verde, la mitad N-terminal de B7 que contiene el dominio RNP es azul oscuro, la mitad C-terminal de B16, que contiene el pliegue OB, en azul claro, y las subunidades restantes son negras. Se señalan las ubicaciones del *clamp* (abrazadera), el dominio de repetición carboxilo-terminal (CTD, por sus siglas en inglés) y la ranura de salida de RNA propuesta (línea de puntos rosa). Modificada de Bushnell y Kornberg, 2003.

### 1.4.3 RNA Polimerasa III

La RNA Pol III (Figura 11) contiene el núcleo catalítico de 10 subunidades encontrado en todas las RNA polimerasas nucleares, además de subcomplejos y dominios de proteínas adicionales que tienen funciones estructurales y funcionales que muestran homología con factores de transcripción generales para la RNA Pol II (Khatter *et al.*, 2017).



**Fig. 11.** Vista superior y frontal de la RNA Pol III, los elementos individuales y los dominios están etiquetados. Las líneas de puntos indican regiones que no están incluidas en el modelo. El código de color se presenta en los cuadros correspondientes. Modificada de Hoffman *et al.*, 2015.

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

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

partes de esta interacción con el centro catalítico sugieren que pueden interactuar con la señal de terminación. Sin embargo, se desconocen los mecanismos por los cuales estas tres subunidades dirigen el núcleo de la RNA Pol III para unirse a la señal del oligo (dT) y su función en la terminación (Arimbasseri y Maraia, 2015). Además de su participación en el término de la transcripción, se ha reportado que C11 es importante en el proceso de reciclaje facilitado de la transcripción de la RNA Pol III (Arimbasseri y Maraia, 2013; Iben *et al.*, 2011; Landrieux *et al.*, 2006; Rijal y Maraia, 2013).

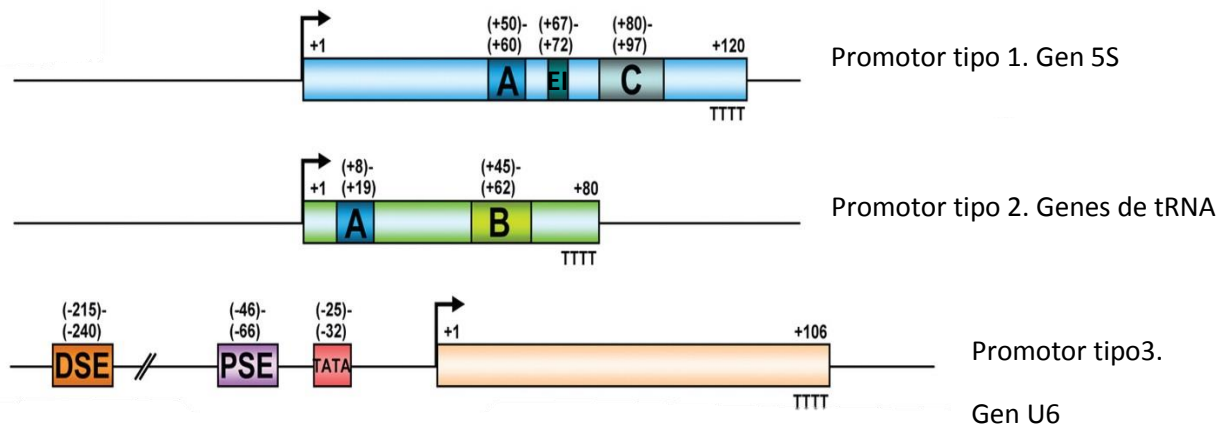
### **1.4.3.1 Promotores de la RNA Pol III**

La RNA Pol III transcribe moléculas de RNA pequeñas no codificantes que se requieren para procesos celulares esenciales que incluyen la regulación de transcripción (RNA 7SK, RNA Alu), procesamiento de RNA (U6 snRNA, RNA de la RNasa P, RNA de la RNasa MRP) y traducción (rRNA 5S, tRNAs) (Teichmann *et al.*, 2010).

Existen distintos tipos de promotores (Figura 12) que son reconocidos por conjuntos de factores de transcripción promotor-específicos (Figura 13). Los elementos del promotor tipo 1, presentes en el gen del rRNA 5S, son intragénicos y consisten en una caja A, un elemento intermedio (EI) y una caja C. Dichos elementos se encuentran conservados en la mayoría de las especies y juntos constituyen la región de control interna.

Los promotores tipo 2, representados por los genes de tRNAs, contienen una caja A intragénica muy cercana al sitio de inicio de la transcripción (10 a 20 pb) y una caja B con localización variable río abajo de la caja A (Figura 12).

Los genes con promotores tipo 3 se caracterizan por tener secuencias ubicadas solamente río arriba de la región codificante. El gen representativo es el snRNA U6 de humano, que contiene una caja TATA cerca de la posición -30, un elemento de secuencia proximal (PSE, por sus siglas en inglés) cerca de la posición -60, y un elemento de secuencia distal (DSE, por sus siglas en inglés) ubicado a varias pares de bases de distancia (-200 a -1 pb) (Figura 12).



**Fig. 12.** Tipos de promotores de RNA polimerasa III en humanos. La flecha indica el sitio de inicio de la transcripción, y la región de T's representa la región de término de la transcripción. Modificado de Teichmann *et al.*, 2010.

### 1.4.3.2 Factores de transcripción generales de la RNA Pol III

Para que se pueda llevar a cabo la transcripción de moléculas de RNA de manera específica y correcta debe darse un arreglo y colaboración precisa de proteínas que comprenden a las RNA Polimerasas y a otras denominadas factores de transcripción (Huang *et al.*, 2005).

Al igual que el resto de las RNA polimerasas, la RNA Pol III requiere de factores de transcripción para unirse a sus promotores, conocidos en este caso como TFIIIA, TFIIIB y TFIIIC. Cada tipo de promotor tiene requerimientos diferentes de factores de transcripción (Figura 13) (Geiduschek y Kassavetis, 2001). TFIIIA es específico de los genes del rRNA 5S, se une directamente a la región de control interno por medio de sus nueve dedos de zinc y es necesario para el reclutamiento de TFIIIC en este tipo de promotor. TFIIIC es capaz de reconocer el complejo TFIIIA-ICR (*Internal Control Region*, por sus siglas en inglés) en los promotores de tipo 1 y a las cajas A y B en los promotores de tipo 2, mientras que TFIIIB es indispensable para la transcripción de los tres tipos de promotores (Geiduschek y Kassavetis, 2001).

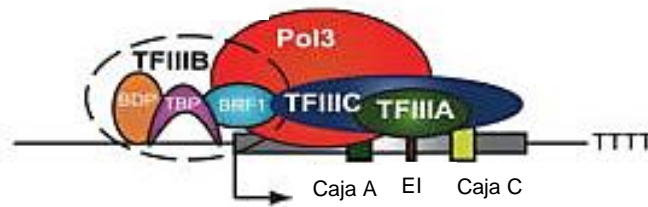
Más de veinte proteínas están involucradas en la formación del complejo de inicio de la transcripción en genes transcritos por la RNA Pol III (Figura 13). Para la mayoría de estos genes, TFIIIB recluta a la RNA Pol III y dirige el inicio de la transcripción. Este factor está compuesto por 3 subunidades esenciales para la transcripción: la proteína de unión a la caja TATA (TBP, por sus siglas

en inglés), Bdp1 (la cual contiene un dominio SANT) y una subunidad relacionada a TFIIB, que puede ser Brf1 (*TFIIB related factor 1*) o Brf2.

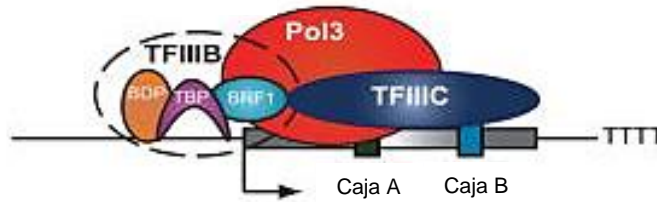
De forma particular, TFIIB se considera como el factor central de la transcripción de la RNA Pol III al requerirse para la expresión de todos sus genes. Además, la presencia de este factor es suficiente para que ocurran múltiples rondas de transcripción de genes como el de tRNAs y rRNA 5S. Se sabe que las subunidades Brf1 y Bdp1 interactúan con la RNA Pol III y que participan en la apertura del promotor. El dominio amino-terminal de Brf1 en levadura contiene un dominio de plegamiento de unión a zinc (*Zinc ribbon*) y un dominio de repetidos de ciclina, los cuales son homólogos a los encontrados en el factor de transcripción TFIIB. Estructuralmente, estos dominios se posicionan en el sitio de salida del RNA naciente. El extremo carboxilo-terminal de Brf1 es específico de la RNA Pol III y no se comparte entre otros miembros de la familia de TFIIB (la cual también incluye a Rrn7 o Taf1b en el sistema de RNA Pol I). Este extremo carboxilo-terminal tiene tres bloques homólogos de secuencia (I, II y III) y proporciona un andamiaje para mantener juntas a las tres subunidades de TFIIB (Khoo *et al.*, 2014).

TFIIIC es un complejo de seis proteínas que reconoce elementos de control internos (las cajas A y B) en los genes de tRNAs. En la cromatina, TFIIIC muestra plasticidad, ya que se acomoda en un rango de distancia amplia abarcando la caja A, la caja B y la señal de término. Las seis subunidades de TFIIIC están organizadas en dos dominios globulares:  $\tau$ A (Tfc1p, Tfc4p y Tfc7p) y  $\tau$ B (Tfc3p, Tfc6p y Tfc8p).  $\tau$ B se une específicamente a la caja B con alta afinidad y favorece la unión de  $\tau$ A a la caja A. Estudios estructurales de alta resolución han mostrado que la subunidad Tfc4p de TFIIIC interactúa con Brf1 y Bdp1 para reclutar a TFIIB (Male, 2015).

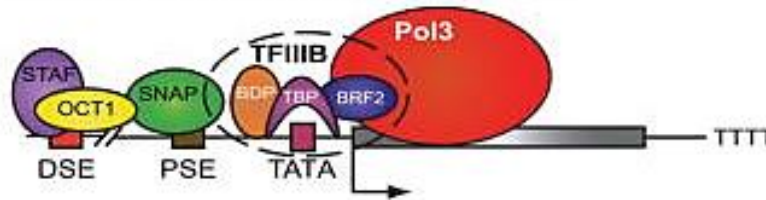
Promotor tipo 1. rRNA 5S



Promotor tipo 2. tRNAs



Promotor tipo 3. U6, RNasa P, 7SK y otros



**Fig. 13.** Promotores y factores de transcripción de la maquinaria transcripcional de la RNA Pol III humana. Tomado de Oler *et al.*, 2010.

En el caso de los genes Tipo 3, que tienen elementos de control externos, el complejo proteico activador de snRNA (SNAPc) se coloca en el PSE, y al DSE se unen activadores transcripcionales como ZNF143 y POU2F1 (también conocido como Oct1 y SBF). Además, la subunidad Brf2 reemplaza a Brf1 en TFIIB en estos genes (Figura 13) (Arimbasseri y Maraia, 2015).

#### 1.4.4 Reguladores de la transcripción de la RNA Pol III

Las células eucariotas regulan coordinadamente la transcripción de las tres RNA polimerasas nucleares para mantener los niveles óptimos de las diferentes moléculas de RNA, en respuesta a las condiciones de crecimiento y proliferación celular (Čabart *et al.*, 2008).

Debido a que la transcripción por la RNA Pol III es un proceso que demanda energía, su actividad está estrechamente vinculada a los niveles de

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

Entre los diferentes mecanismos utilizados para lograr coordinar la transcripción en eucariotas superiores, la oncoproteína Myc activa directamente la transcripción de la RNA Pol II de genes de proteínas ribosomales y una gran variedad de reguladores del crecimiento y del ciclo celular, junto con la transcripción de los genes de rRNA y tRNAs por las RNA Pols I y III.

En las células que no se están dividiendo, las señales positivas para el crecimiento y proliferación celular se oponen por la acción de numerosas proteínas supresoras tumorales que reprimen la transcripción por RNA Pol I y III (por ejemplo Rb, p53, ARF, PTEN) y regulan diferentes subconjuntos de genes codificadores de proteínas. Notablemente, la inactivación de estos supresores tumorales en diferentes tipos de cáncer dirige a una sobre regulación de la transcripción de las RNA Pol I y III. En lugar de ser una simple consecuencia de la transformación celular, un número creciente de estudios indica que la desregulación de la transcripción de las RNA Pol I y III desempeña un papel importante en el desarrollo de cáncer y en el crecimiento de tumores.

En eucariotas, el reclutamiento de la RNA Pol III a genes de tRNA está mediado por dos factores generales de transcripción, TFIIIB y TFIIIC, y la contribución de proteínas reguladoras específicas de un gen desconocido (Graczyk *et al.*, 2015).

La transcripción de la RNA Pol III también está sujeta a una regulación negativa global. En células de levadura, las señales que reprimen a la RNA Pol III convergen en un regulador negativo central, la proteína Maf1 (Upadhy *et al.*, 2002).

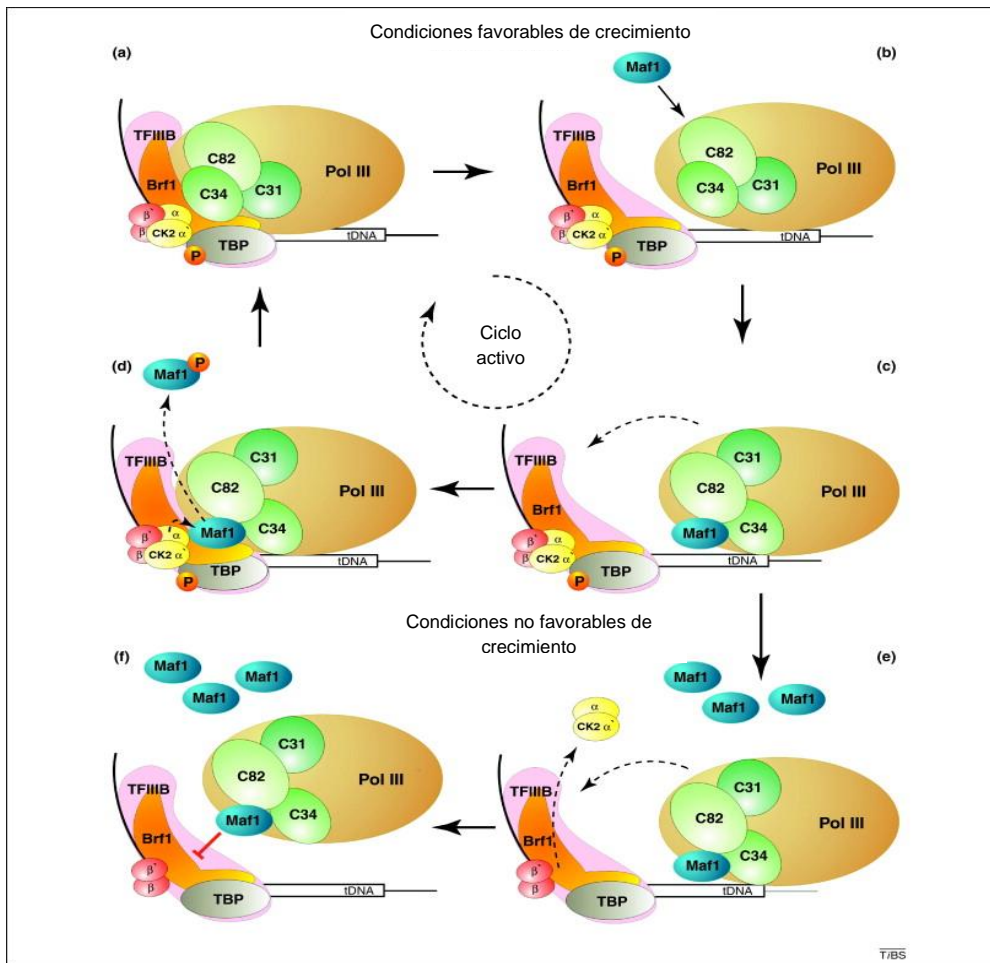
### **1.4.5 Maf1, regulador negativo de la transcripción de la RNA Pol III**

Maf1 es un represor transcripcional global de la RNA Pol III que fue originalmente descubierto en *S. cerevisiae* (Pluta *et al.*, 2001; Čabart *et al.*, 2008; Graczyk *et al.*, 2015). Trabajos recientes han demostrado que varias propiedades de los supresores tumorales son compartidos por la proteína Maf1, además de impactar en algunas vías metabólicas (Willis y Moir, 2018). En células de mamífero, la función de Maf1 es reprimir directamente la transcripción por la RNA Pol III y un subconjunto de genes transcritos de RNA Pol II que incluyen la proteína TBP (Boguta *et al.*, 1997). A través de su efecto en niveles de TBP, Maf1 regula indirectamente la transcripción por RNA Pol I.

A pesar de que la proteína Maf1 está conservada desde levaduras hasta humanos, así como su función de represión de la acción de la RNA Pol III, la habilidad para reprimir la transcripción de genes de TBP, y por lo tanto influir en la síntesis de rRNA, no se ha observado en levadura. Esta función parece haber evolucionado en eucariotas superiores. Mucho de lo que sabemos actualmente sobre el mecanismo de represión por Maf1 se deriva de los estudios en el sistema de la RNA Pol III (Boguta, 2013).

Los estudios genéticos y bioquímicos iniciales en levadura identificaron a la subunidad C160 de la RNA Pol III y a Brf1, una subunidad del factor de inicio TFIIB, como los objetivos directos de Maf1, demostrando que la unión de Maf1 a estas moléculas inhibe dos pasos discretos en la transcripción: la unión de Brf1 al complejo de preinicio de la transcripción, y el reclutamiento de la RNA Pol III al complejo TFIIB-TFIIC-DNA (Figura 14) (Čabart *et al.*, 2008) (Moir y Willis, 2013; Boguta, 2013). Ambas interacciones inhibitorias se conservan en mamíferos. Además, cuando Maf1 se une al complejo de preinicio, reorganiza el complejo de subunidades C82/34/31 dentro de la RNA Pol III que es requerido para el inicio de la transcripción (Vannini *et al.*, 2010).





**Fig. 14.** Modelo de acción de Maf1. En condiciones favorables de crecimiento, la eficiencia de la transcripción de la RNA Pol III aumenta con el reciclaje activo. Las flechas indican la secuencia de acción por parte de Maf1 en condiciones favorables y desfavorables de crecimiento. Tomado de Boguta y Graczik, 2011.

Estudios bioquímicos adicionales en levadura y humano establecieron que los complejos de preiniciación que contienen a la RNA Pol III y complejos de elongación estancados o detenidos están protegidos contra la inhibición por Maf1 (Čabart y Willis, 2008). Estos complejos pueden iniciar o reanudar la transcripción, respectivamente, para generar productos completos a pesar de la presencia de exceso de Maf1.

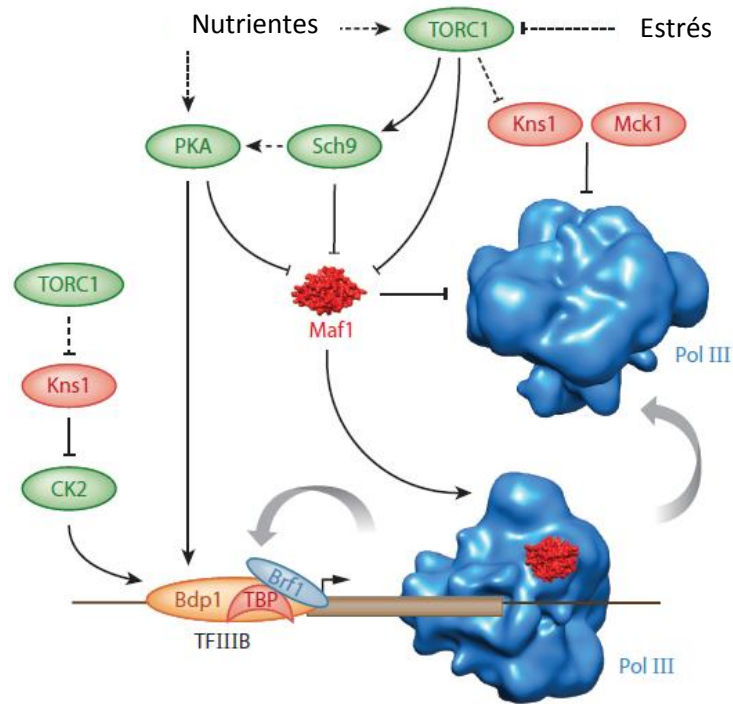
Una nueva visión mecanicista surgió con el hallazgo de que moléculas de la RNA Pol III sometidas a reciclaje facilitado (un proceso en el cual la polimerasa termina la transcripción y reinicia sin dissociarse del templado) son resistentes a la represión por Maf1 (Figura 14) (Desai *et al.*, 2005). Caseína cinasa 2 (CK2) fosforila a Maf1, lo libera del complejo de la RNA Pol III y

permite el reinicio en cada ciclo de transcripción después de la iniciación. Durante la elongación o la terminación, Maf1 se recluta en el complejo de la RNA Pol III. Antes de la reiniciación, Maf1 interactúa con CK2, que la fosforila y se une a la subunidad TBP del factor de iniciación TFIIIB en la región promotora. Cuando se encuentran condiciones desfavorables, las subunidades catalíticas de CK2 se disocian de TBP y CK2 se vuelve inactiva. Maf1 asociado con la RNA Pol III no puede ser fosforilado y permanece unido a la subunidad C160 de la RNA Pol III y al sub-complejo C82/34/31. Maf1 evita la interacción de la subunidad C34 con la subunidad Brf1 de TFIIIB, por lo que el reinicio no es posible y la acción de la RNA Pol III se inhibe (Boguta y Graczik, 2011).

En conjunto, las observaciones anteriores respaldan la idea de que Maf1 se une a la RNA Pol III después de que se disocia del DNA e inhibe su posterior unión al promotor. Sin embargo, un tipo diferente de interacción de Maf1 es aparentemente posible durante el proceso de elongación y el reciclaje facilitado: la función de complejos RNA Pol III-Maf1 transcripcionalmente activos aparentemente no se ve afectada en estas condiciones, pero el represor está preparado para inhibir la transcripción en el momento en que la polimerasa se disocia del DNA (Figura 14). De esto se puede inferir que los eventos que dirigen la disociación de la RNA Pol III del DNA, el reciclaje facilitado y las funciones de los factores de iniciación son importantes en el control de la transcripción dependiente de Maf1.

#### **1.4.6 Modificaciones post-traduccionales de Maf1**

El estado de fosforilación de Maf1 regula su interacción con la RNA Pol III en diferentes especies. Todos los sitios de fosforilación mapeados, que se sabe que son biológicamente importantes, están ubicados en una región de secuencia variable entre dos segmentos filogenéticamente conservados (denominados A y B). Maf1 de levadura contiene siete sitios fosforilables en esta región. En condiciones óptimas de crecimiento en las que Maf1 está inactivo, seis de estos sitios son fosforilados de manera redundante por CK2, la proteína cinasa A (PKA) y la cinasa Sch9, el ortólogo de la S6 cinasa de mamíferos regulado por TOR, mientras que el séptimo aminoácido es fosforilado selectivamente por Sch9.



**Fig. 15.** Señalización al sistema de la RNA Pol III en levadura. El esquema muestra las cinasas de señalización conocidas que median la respuesta a los nutrientes y el estrés y sus objetivos. Cinasas que funcionan para promover o reprimir la transcripción se muestran en óvalos verdes y rojos, respectivamente. Las interacciones / efectos directos e indirectos están representados por líneas continuas y discontinuas, respectivamente. Modelos de superficie del complejo humano Maf1 (rojo) e interacción RNA Pol III-Maf1. La RNA Pol III se representa en un gen de tRNA con Maf1. Las flechas grandes indican destinos alternativos de la RNA Pol III en el terminador; en otras palabras, el reciclaje resistente a Maf1 o disociación del DNA.

Los resultados obtenidos por múltiples grupos de trabajo han establecido que la fosforilación de Maf1 y la transcripción de la RNA Pol III en levaduras están moduladas por la vía Ras/PKA y por la sensibilidad a rapamicina del Complejo TORC1 (Moir y Willis, 2013; Boguta, 2013). Además, la relación entre estas vías permite a TORC1 controlar la interacción de PKA hacia algunos de sus sustratos, entre ellos Maf1 (Figura 15).

La caseína cinasa 2 (CK2) y la vía de integridad celular (conocida también como vía de MAPs cinasas) actúan también como reguladores de la función de Maf1. Sin embargo, la conectividad en esta red de señalización no está completamente definida y de hecho, para muchos tipos de estrés (por ejemplo, daño en el DNA, estrés oxidativo, estrés en el retículo endoplásmico, etc.) no se sabe cómo se transducen las señales a Maf1 (Willis y Moir, 2018).

Entre las cinasas que fosforilan a Maf1 en el núcleo probablemente se incluya la isoforma Tpk2 de PKA, que se encuentra predominantemente en este compartimento en células no estresadas (Tudisca *et al.*, 2010). Se sabe que la desfosforilación de Maf1 implica fosfatasas PP4 y PP2A (Willis y Moir, 2018).

Por otra parte, experimentos realizados en *Saccharomyces cerevisiae*, demostraron que el blanco de la rapamicina (TOR, por sus siglas en inglés) es una cinasa de serina/treonina que pertenece a la superfamilia de las fosfatidilinositol 3-cinasas (PI3K). Posteriormente se encontró que TOR está muy conservada en los eucariontes (Betz y Hall, 2013; Weisman *et al.*, 2014) y que además impacta en la acción que tiene Maf1 (Cornu *et al.*, 2013).

Las proteínas cinasas TOR1 actúan a través de dos complejos multiproteicos llamados TORC1 y TORC2, los cuales detectan y responden a señales desencadenadas por fuentes de nitrógeno, glucosa, oxígeno, diversos mitógenos y factores de crecimiento en levaduras y en mamíferos (Cornu *et al.*, 2013). TORC1 participa en la regulación del crecimiento y de varios procesos del metabolismo celular tales como la síntesis de fosfolípidos, la biogénesis de los ribosomas, el incremento de la síntesis del mRNA y de proteínas y la inhibición de la autofagia, entre otras, mientras que TORC2 está relacionado con la regulación de la polarización de la actina, los procesos de endocitosis, la actividad de la calcineurina, la síntesis de esfingolípidos y la organización del citoesqueleto (Cornu *et al.*, 2013).

La localización de TORC1 es dependiente de un NLS y un motivo de unión al DNA putativo (HLH). Curiosamente, mientras TOR1 no se detecta en genes de tRNA en levadura, un alelo TOR1 resistente a la rapamicina que porta mutaciones en el NLS o en el HLH mostró una disminución de la fosforilación de Maf1 y una transcripción reducida de rRNA 5S y genes tRNA. Después de realizar estudios de inmunofluorescencia, los autores propusieron que TORC1 nucleolar regula el transporte de Maf1 del nucleoplasma al nucléolo y ayuda a mantener altos niveles de la transcripción de la RNA Pol III, dirigiendo a la proteína Maf1 fosforilada inactiva al nucleoplasma (Willis y Moir, 2018). En el mismo estudio, TORC1 inmunopurificado demostró fosforilar a Maf1 *in vitro*. Sin embargo, los sitios de fosforilación no han sido mapeados y

las contribuciones relativas de TORC1 y Tpk2 en la fosforilación nuclear de Maf1 son desconocidas.

Al igual que Maf1, mTOR se asocia con todos los tipos de genes transcritos por la RNA Pol III en mamíferos (Shor *et al.*, 2010; Kantidakis *et al.*, 2010), y su interacción con TFIIC, demostrada por inmunoprecipitación y datos de *Proximity ligation assay* (PLA, por sus siglas en inglés) proporciona un mecanismo para el reclutamiento de mTORC1, al menos para los genes 5S y tRNA.

Por otra parte, otro proceso bioquímico que es de gran importancia en la regulación de Maf1 y de otras proteínas y elementos asociados a transcripción es el de la sumoilación, mediante la cual algunas de las proteínas celulares son covalentemente modificadas mediante la adición de otra pequeña proteína (de un peso molecular de 11 kDa) llamada SUMO (*small ubiquitin-related modifier*) la cual puede afectar la función de los factores de transcripción tanto positiva como negativamente por múltiples mecanismos (Rosonina *et al.*, 2017).

Múltiples sitios de sumoilación han sido mapeados en TFIIC, SNAPc, TFIIB y la RNA Pol III. La gran cantidad de sitios de modificación (157 sitios mapeados en 23 proteínas) plantea desafíos significativos para futuros estudios funcionales (Chymkowitch *et al.*, 2015).

Estudios en levadura revelaron que SUMO regula positivamente la transcripción de los genes de tRNA y de snoRNA en condiciones de crecimiento normal (Chymkowitch *et al.*, 2015; Chymkowitch y Enserink, 2018). Asimismo experimentos en los que se analizó la sumoilación en condiciones ricas en nitrógeno y nitrógeno limitante revelaron sumoilación diferencial de las subunidades C128, C82 y C53 de la RNA Pol III (Chymkowitch *et al.*, 2015) mientras que para Brf1 y varias subunidades TFIIC fue observada una respuesta de hiper sumoilación. Se puede concluir que las acciones más notables que conlleva la sumoilación en levadura son la disociación de la polimerasa, retención de Brf1 y aumento de la ocupación de TFIIC (Roberts *et al.*, 2003).

Maf1 de humano está sumoilado en la lisina 35, y en experimentos en los que se generó una mutante de esta lisina se vio disminuida la interacción de

Maf1 con la RNA Pol III y esto se traduce en una reducción en su función regulatoria de la represión (Rohira *et al.*, 2013). Sin embargo, mientras que la función de Maf1 parece verse afectada por su sumoilación, no hay evidencia que indique un papel regulador directo.

#### **1.4.7 Localización celular de Maf1**

Maf1 se transloca entre el núcleo y el citoplasma, como muchos activadores transcripcionales y represores que regulan las respuestas de nutrientes y estrés en la levadura (Chong *et al.*, 2015). Su distribución entre estos compartimentos está determinada por varios factores, que incluyen:

- (a) una fuerte secuencia de localización nuclear (NLS, por sus siglas en inglés) que se inhibe por la fosforilación de la región reguladora, atribuida a isoformas PKA y Sch9 localizadas en el citoplasma;
- (b) la exportina Msn5, que devuelve a Maf1 al citoplasma después de su fosforilación en el núcleo.

Maf1 de levadura, a diferencia de la Maf1 humana, contiene dos NLS (Pluta *et al.*, 2001). La actividad de Maf1 en la levadura es regulada a través de su distribución dependiente del estado de fosforilación entre el núcleo y el citoplasma (Boguta y Graczyk, 2011).

Mientras que Maf1 nuclear funciona como un represor de la RNA Pol III, su papel en el citoplasma no ha sido explorado hasta ahora. En otros organismos, como mamíferos y plantas, Maf1 es predominantemente nuclear (Romero-Meza *et al.*, 2017; Soprano *et al.*, 2017; Wei *et al.*, 2009; Kantidakis *et al.*, 2010).

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

## 1.5 Biología molecular de *Leishmania*

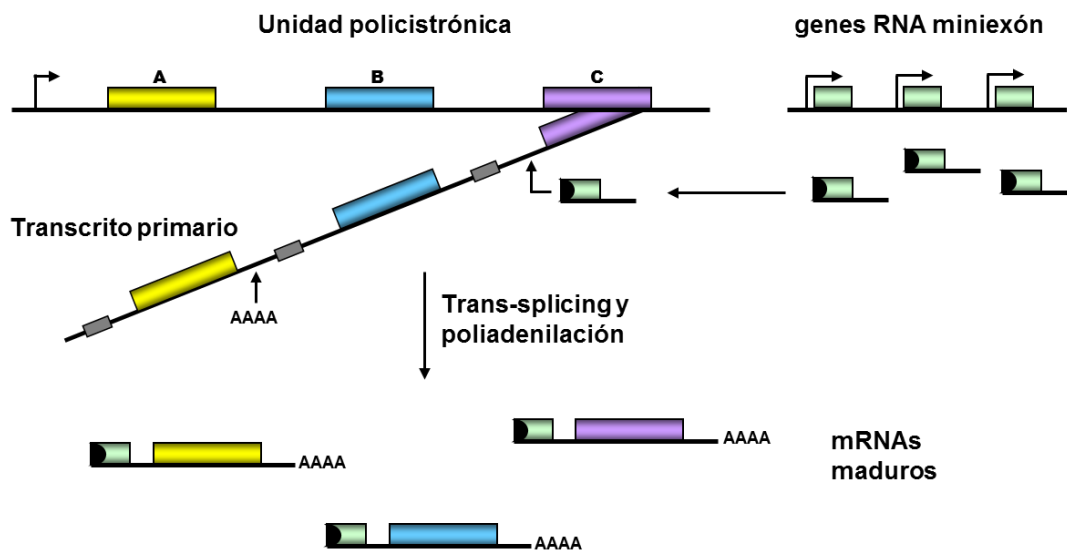
Además de ser organismos de interés médico, *Leishmania* y otros tripanosomátidos son de interés biológico-molecular debido a los mecanismos atípicos de expresión genética que presentan, incluyendo la transcripción policistrónica y el procesamiento de sus mRNAs mediante *trans-splicing* (Martínez-Calvillo *et al.*, 2018).

El genoma de las diferentes especies de *Leishmania* muestra una conservación notable en el orden de sus genes (sintenia), con hasta un 99% de similitud entre *L. major*, *L. infantum* y *L. braziliensis*. El tamaño de los genomas de las especies de este género va de 31.9 a 32.8 Mb, mostrando además similitud en el número de genes codificadores de proteínas, que es de aproximadamente 8 mil (Padilla-Mejía *et al.*, 2013).

### 1.5.1 Transcripción policistrónica

En *Leishmania*, al igual que en el resto de los tripanosomátidos, los genes se encuentran organizados en grupos grandes en una misma cadena de DNA, llamados unidades policistrónicas (Figura 18) (Martínez-Calvillo *et al.*, 2012). Esta organización fue observada por primera vez en el cromosoma 1 de *L. major*, que contiene 85 genes organizados en dos unidades policistrónicas divergentes (Myler *et al.*, 1999). La publicación del genoma completo de *L. major* reveló que la gran mayoría de los genes están organizados de esta manera (Ivens *et al.*, 2005).

La mayoría de los cromosomas tienen al menos dos unidades policistrónicas, que pueden tener una transcripción convergente (que confluye en un punto común) o divergente (en dirección opuesta). Los genes en una unidad policistrónica no codifican proteínas con funciones relacionadas y todos son transcritos al mismo nivel. Sin embargo, genes que se encuentran en una misma unidad pueden mostrar concentraciones diferentes de mRNAs maduros o pueden sólo expresarse en un estadio de desarrollo; esto se debe a que la expresión genética en tripanosomátidos es regulada principalmente a nivel post-transcripcional (Martínez-Calvillo *et al.*, 2010).



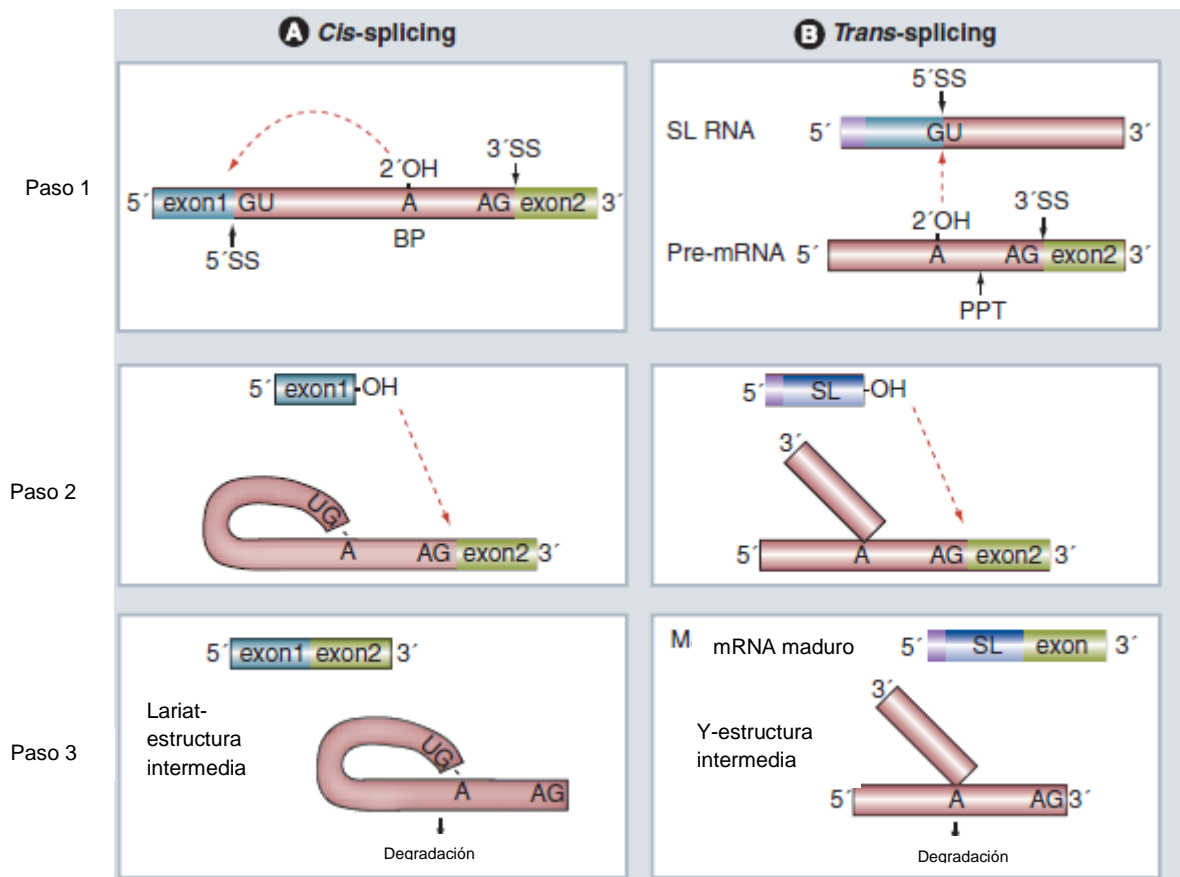
**Fig. 16.** Transcripción policistrónica, *trans-splicing* y poliadenilación en los tripanosomátidos. Tomada de Martínez-Calvillo *et al.*, 2012.

### 1.5.2 *Trans-splicing*

En los tripanosomas, todos los mRNA se procesan mediante la acción concertada del *trans-splicing* y la poliadenilación (Michaeli, 2011). El *trans-splicing* fue observado por primera vez en tripanosomátidos, al descubrir que todos los mRNAs de las diferentes glicoproteínas variables de superficie en *T. brucei* tenían en su extremo 5' una secuencia común de 39 bases, nombrada *spliced leader* o miniexón. Después fue descubierto que todos los mRNAs de todos los tripanosomátidos maduran por *trans-splicing* (Liang *et al.*, 2003; Boothroyd y Cross, 1982).

El dinucleótido AG en el sitio de empalme 3' y un tracto de poli-pirimidinas, son las secuencias más prominentes y altamente conservadas que actúan en el *trans-splicing* del pre-mRNA. La reacción se puede dividir en dos pasos, análogos a las dos reacciones de transesterificación del *cis-splicing* (Figura 19), y son llevados a cabo por un complejo multiproteico de ribonucleoproteínas (RNP) denominado empalmosoma. Estas RNP están formadas por los snRNA U1, U2, U4, U5 y U6, cada uno asociado a proteínas Sm, las cuales entre otras funciones tienen permitir a los snRNA su transporte de vuelta al núcleo y aumentar la eficiencia con la reconocen a los pre-mRNA.





**Fig. 17.** Mecanismo de *cis-splicing* y *trans-splicing*. (A) Representa el *cis-splicing* y (B) Los mecanismos de *trans-splicing*. Se presentan los dos pasos de transesterificación. Se indican los 5' (GU) y 3' y los sitios de empalme (AG) y las secuencias de BP. BP: punto de ramificación; PPT: tracto de polipirimidina; SL: líder empalmado; SS: sitio de empalme. Tomado de Michaeli, 2011.

A diferencia del *cis-splicing*, en el que se forma una estructura intermediaria conocida como lazo, en el *trans-splicing* se forma una estructura con forma de “Y” (Figura 19) (Martínez-Calvillo *et al.*, 2012). La mayoría de los genes de los tripanosomátidos no tienen intrones. De hecho, sólo se ha encontrado un gen con un intrón en el que se lleva a cabo *splicing*, lo que indica que el *trans-splicing* y el *splicing* coexisten en estos organismos (Liang *et al.*, 2003).

### 1.5.3 Promotores en Tripanosomátidos

La transcripción en protozoos tripanosomátidos muestra una importante variación de los paradigmas de la expresión génica en otros eucariontes. Algunos ejemplos de esto son la escasez de promotores de la RNA Pol II y la transcripción de genes codificadores de proteínas por la RNA Pol I en *T. brucei*; este es el caso de dos proteínas que recubren la superficie del parásito en sus dos diferentes estadios, las glicoproteínas variantes de superficie (VSG, por sus siglas en inglés) y las prociclinas (Martínez-Calvillo *et al.*, 2010). Por otro lado, la transcripción de snRNAs depende de cajas A y B contenidas en genes de tRNA o tRNA-like (secuencias que guardan relación estructural pero no funcional con los tRNA) (Rojas-Sánchez *et al.*, 2016). Los promotores que han sido ampliamente caracterizados son los de la unidad del rRNA (transcrita por la RNA Pol I) y el de los genes del SL RNA (transcritos por la RNA Pol II) (Campbell *et al.*, 2003; Martínez-Calvillo *et al.*, 2010).

La transcripción de la unidad del rRNA mantiene una cinética de transcripción similar a la de otros eucariontes, aunque la subunidad mayor (rRNA 28S) se encuentra fragmentada, generando seis moléculas de rRNA independientes: 24 $\alpha$ , 24S $\beta$ , S1, S2, S4 y S6 (Hernández *et al.*, 1993; Martínez-Calvillo *et al.*, 2001). Como en otros eucariontes, el promotor de la unidad del rRNA de *T. brucei* está formado por cuatro dominios. Sin embargo, en varias especies de *Leishmania* que han sido analizadas, el promotor del rRNA es mucho más pequeño; por ejemplo, en *L. donovani* se observan tres regiones con importancia funcional: de -69 a -57, -46 a -27 y de -6 a +4 (Zomerdijk *et al.*, 1991; Rudenko *et al.*, 1995; Yan *et al.*, 1999). Las regiones promotoras de las prociclinas han sido extensivamente caracterizadas, y se ha encontrado que son muy parecidas a las de los genes del rRNA, pues también están formadas por cuatro dominios (Martínez-Calvillo *et al.*, 2010); además sus elementos promotores son intercambiables con los del promotor del rRNA. En contraste, los promotores de las VSG consisten de dos elementos que se extienden hasta la posición -67 (Landeira y Navarro, 2007). Cada una de las aproximadamente 200 copias del gen del SL RNA, contiene su propia región promotora, la cual se encuentra río arriba del gen. Éstas consisten de un elemento bipartito (un dominio alrededor de la base -60 y otro cerca de la base -30) y un elemento localizado cerca de la región de inicio de la transcripción. Todos los genes del

SL RNA poseen un tracto variable de timinas como señal de término de la transcripción (Gilinger y Bellofatto, 2001).

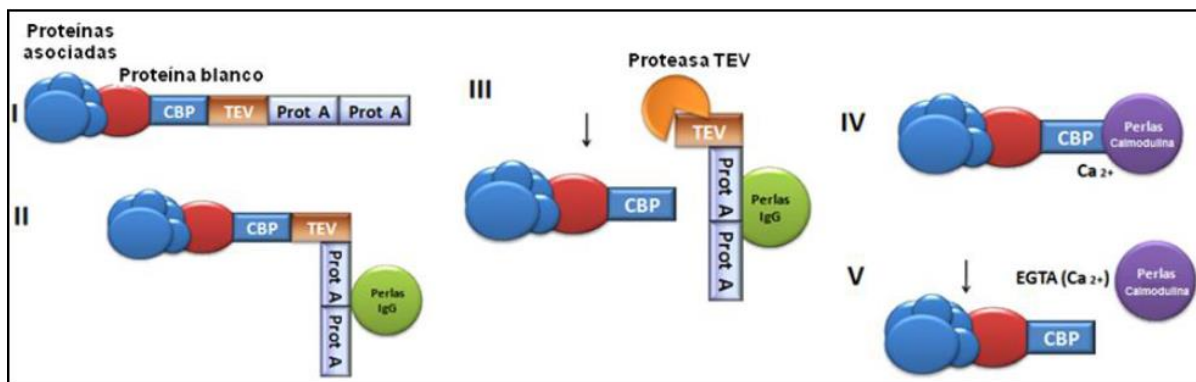
En lo que respecta a la transcripción de genes que codifican para proteínas se sabe muy poco. Como se ha mencionado, los mRNA son transcritos juntos en un RNA policistrónico largo, lo cual ha dificultado el estudio de sus promotores, puesto que el inicio de la transcripción puede estar a miles de bases río arriba del inicio del gen. En *L. major* se pudo observar que la transcripción de todo el cromosoma 1 inicia de manera bidireccional únicamente en la región intergénica que separa las dos unidades policistrónicas presentes en el cromosoma (entre los genes 29 y 30) (Martínez-Calvillo *et al.*, 2003). En una región de 100 pb fueron identificados varios sitios de inicio de la transcripción para ambas unidades policistrónicas. Estudios similares llevados a cabo en el cromosoma 3 de *L. major* confirmaron que la transcripción inicia únicamente río arriba del primer gen de una unidad policistrónica (Martínez-Calvillo *et al.*, 2004). En estos análisis no se encontraron dominios típicos de la RNA Pol II para el inicio de la transcripción u otras secuencias conservadas que pudieran fungir como promotores.

En lo referente a promotores de la RNA Pol III, se han identificado los elementos del promotor tipo I (Cajas A y C) del rRNA 5S, pero éstos no ha sido analizados funcionalmente (Moreno-Campos *et al.*, 2016). Por otro lado, también se ha observado que la secuencia de las cajas A y B del promotor tipo 2 de los tRNA se encuentra muy conservada en *L. major*, *T. brucei* y *T. cruzi* (Padilla-Mejía *et al.*, 2009). Asimismo, en *T. brucei* han sido caracterizados los promotores de algunos snRNA. Estos genes tienen un gen de tRNA contiguo, hacia su extremo 5' y localizado en la cadena opuesta de DNA. Sorprendentemente, las cajas A y B del tRNA vecino son esenciales para la transcripción del snRNA. En la mayoría de los casos, se requieren también elementos regulatorios intragénicos del snRNA para lograr un nivel de expresión óptimo (Nakaar *et al.*, 1997; Das *et al.*, 1988). Aunque no es muy claro cómo las cajas A y B del tRNA promueven la expresión del snRNA, se ha propuesto un modelo de "loop de DNA" en el que los sitios de inicio de la transcripción de los genes de snRNA y del tRNA son aproximados de manera tal que el factor TFIIIB facilita la llegada de la RNA Pol III en ambos sitios (Nakaar *et al.*, 1994 y 1995; Ben-Shlomo *et al.*, 1997). Recientemente se

reportó que la transcripción del snRNA U2 de *L. major* depende de cajas A y B localizadas en un tRNA-*like* y un tRNA asociados a éste. Aunque se desconoce cómo actúan estas secuencias, se ha propuesto que las cajas A y B de estos tRNAs pueden regular la expresión de los snRNAs mediante un mecanismo indirecto que involucra la unión de factores de transcripción al gen de tRNA, resultando en cambios en la estructura de la cromatina que permiten la transcripción del snRNA (Rojas-Sánchez *et al.*, 2016).

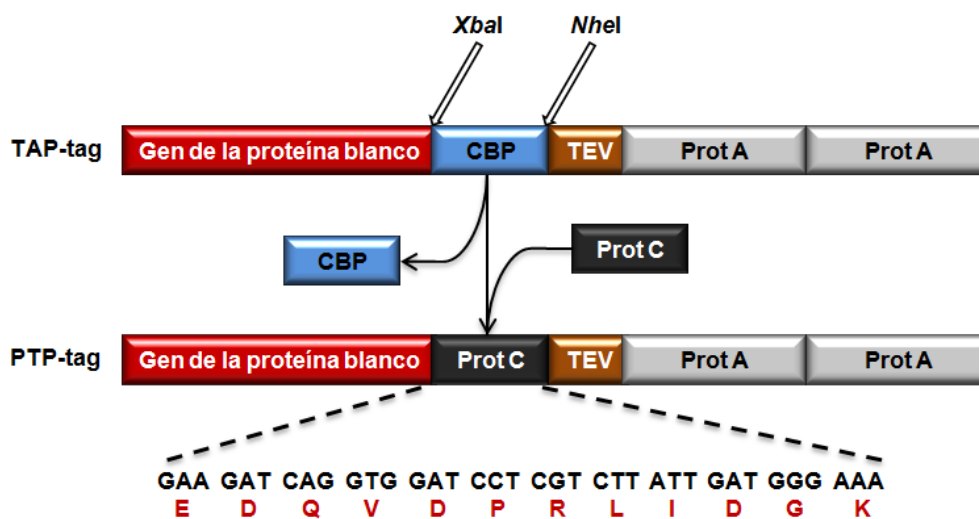
## 1.6. Purificación de complejos proteicos

La técnica de purificación por afinidad en tándem (TAP, por sus siglas en inglés), es un método ampliamente usado en la purificación de complejos proteicos específicos, incluyendo factores de transcripción y RNA Pol (Brown, 2006; Collins y Choudhary, 2008, Takebe *et al.*, 2007). Consiste en la fusión de un péptido de extracción, denominado TAP-*tag*, a la secuencia de la proteína blanco de la cual se quiere conocer sus interacciones. El TAP-*tag* está formado por dos dominios de unión a IgG de la proteína A de *Staphylococcus aureus* y por un péptido de unión a calmodulina (CBP, por sus siglas en inglés), separados por una secuencia susceptible a la proteasa TEV. Una vez que se obtiene la construcción plasmídica, se introduce en células del organismo en estudio, logrando con esto la expresión de esta construcción. Ya dentro de la célula, la proteína marcada interacciona libremente con las proteínas de su complejo. Después se obtiene un extracto celular, del cual se separan la proteína blanco y las proteínas que interactúan con ella mediante cromatografías de afinidad en matrices con IgG y calmodulina (Puig *et al.*, 2001) (Figura 16). Las proteínas purificadas son después analizadas por SDS-PAGE, seguido de un análisis por espectrometría de masas.



**Fig. 18.** Purificación por afinidad en tándem. I) Esquema de la proteína recombinante con el péptido de extracción TAP-tag. II) Unión del complejo proteico a perlas de IgG (verde) mediante los dominios de la proteína A. III) Liberación del complejo por la digestión con proteasa TEV. IV) Unión calcio-dependiente a perlas de calmodulina (morado). V) Liberación del complejo mediante la quelación del  $Ca_{2+}$ .

Recientemente se ha diseñado una modificación a la técnica, en la cual se sustituyó el CBP por un dominio de la proteína C (Prot C) hepática de humano. Esta nueva combinación de epítopes de purificación fue denominada PTP-tag (Figura 17).



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

Se ha reportado que el PTP-tag presenta, en algunos casos, ventajas en la purificación de complejos con respecto al TAP-tag (Schimanski *et al.*, 2005). La técnica de purificación por afinidad en tándem con una bandera PTP ha sido ampliamente usada en *T. brucei* para aislar complejos transcripcionales (Denninger, 2014; Koch, 2016 y Schimanski *et al.*, 2005).

## 1.7 Antecedentes directos

En nuestro laboratorio hemos iniciado el estudio de Maf1 en *T. brucei*, generando líneas celulares *knock-down* en las que es posible inducir con tetraciclina la degradación del mRNA de Maf1 mediante RNA de interferencia. Los resultados mostraron que, además de influir en el crecimiento celular, Maf1 de *T. brucei* reprime la actividad transcripcional de la RNA Pol III de los genes de tRNA y U2 snRNA por asociación con sus promotores (Romero-Meza *et al.*, 2017).

De manera igualmente interesante, se encontró que los niveles del rRNA 5S no cambian después de la disminución o la sobre expresión de Maf1. Notablemente, también se reportó que Maf1 regula la expresión de algunos genes transcritos por las RNA Pol I y II en *T. brucei* (Romero-Meza *et al.*, 2017).

Por otra parte, TbMaf1 posee una señal de localización nuclear probable (NKRA / TR), que se superpone con la parte de la secuencia conservada ubicada en el dominio C de TbMaf1. Modelos de homología indican que esta señal es accesible a la superficie, lo que en principio sugirió que TbMaf1 es una proteína nuclear. La localización nuclear de Maf1 en *T. brucei* fue demostrada con ensayos de inmunolocalización y *Western blot* (Romero-Meza *et al.*, 2017).

Resulta ahora necesario extender nuestro estudio a *Leishmania*, para determinar los alcances de la regulación génica de Maf1 en los tripanosomátidos. Así, en este trabajo se inició la caracterización molecular de Maf1 en *L. major* (LmMaf1). Con ese objetivo, se generaron y analizaron clones celulares de *L. major* que expresan la proteína recombinante LmMaf1-PTP. Con ellas se realizaron experimentos de purificación por afinidad en tándem para identificar las proteínas con las que interactúa Maf1 para reprimir la transcripción. La identificación de dichas proteínas ayudará a revelar los mecanismos empleados por Maf1 para regular la transcripción en *L. major* y otros tripanosomátidos.

## 2. Objetivos

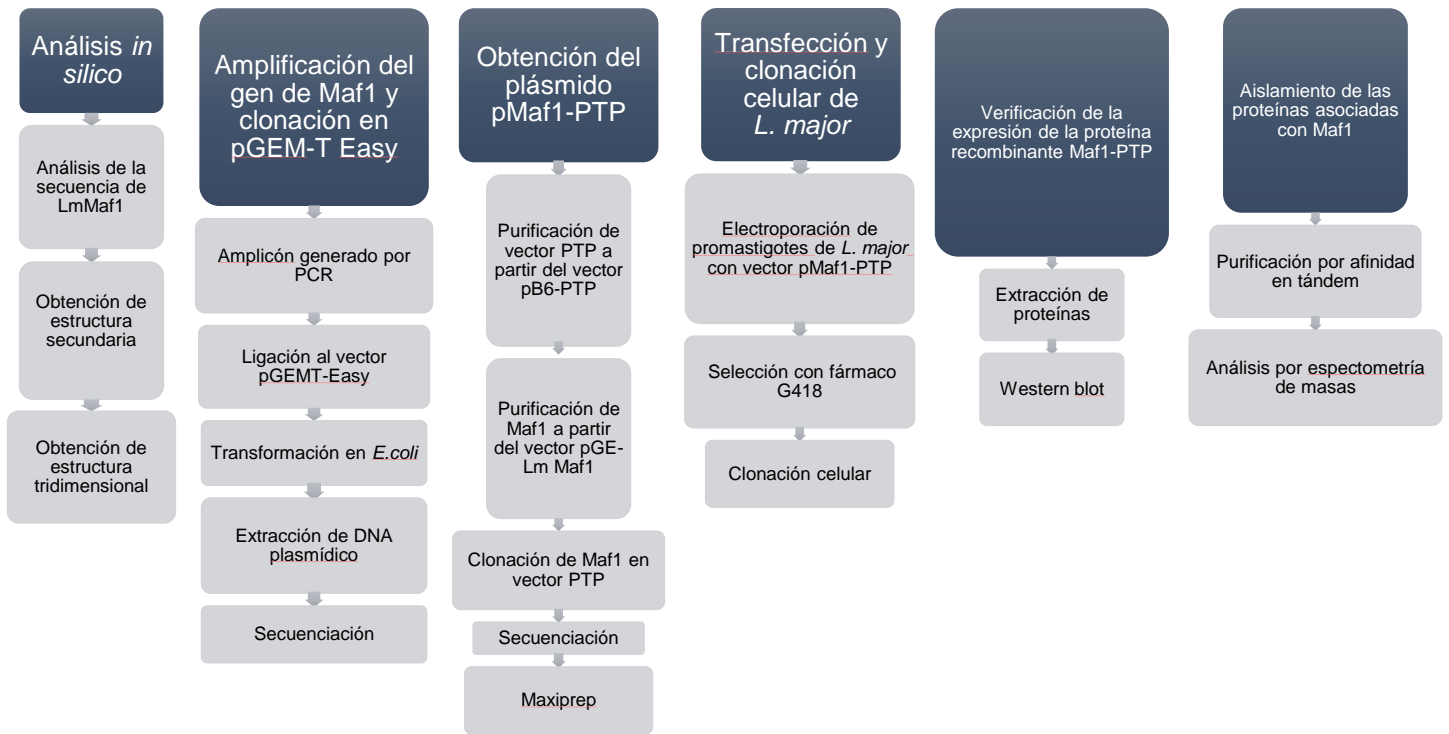
### 2.1 Objetivo general

- Generar y analizar clonas celulares de *Leishmania major* que expresen la proteína recombinante LmMaf1-PTP.

### 2.2 Objetivos particulares

- Clonar el gen de LmMaf1 en un vector que contenga la bandera PTP.
- Transfectar promastigotes de *L. major* con el vector PTP generado y seleccionar clonas celulares.
- Determinar la expresión de LmMaf1-PTP en las clonas transgénicas.
- Identificar las proteínas con las que se asocia LmMaf1-PTP mediante ensayos de purificación por afinidad en tándem.

### 3. Estrategia Experimental





## 4. Materiales y métodos

### 4.1 Análisis *in silico*

Las secuencias de los genomas de *L. major* y de otros tripanosomátidos se encuentran disponibles en TriTrypDB versión 27 (<http://tritrypdb.org/tritrypdb/>). Se hizo el análisis de Maf1 comparando *L. major* con distintas especies de tripanosomátidos (*L. braziliensis*, *L. guyanensis*, *L. panamensis*, *L. mexicana*, *L. infantum*, *L. donovani*, *T. cruzi* y *T. brucei*) y con Maf1 de humano (PDB: 3nr5) usando el programa Clustal  $\Omega$  (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>). Las secuencias de nucleótidos y aminoácidos obtenidas se analizaron con las herramientas bioinformáticas disponibles en los sitios SwissProt (<http://expasy.org/sprot/>). Para la predicción de estructura secundaria y modelado tridimensional por homología se utilizó el programa PyMOL 2.2. La predicción de sitios de fosforilación se hizo con el servidor PhosTryp (<http://phostryp.bio.uniroma2.it>). Se utilizó el programa GPS-SUMO (<http://sumosp.biocuckoo.org/citation.php>) para la predicción de los probables sitios de sumoilación.

### 4.2 Cultivo y conteo de promastigotes

Promastigotes de la cepa *L. major* Friedlin fueron crecidos a 27°C en medio líquido B/M (medio M199 0.5x, bicarbonato de sodio 1.1  $\mu\text{g/ml}$ , infusión de cerebro corazón 0.25x, suero fetal bovino inactivado 10%, HEPES 40 mM, hemina 0.01 mg/ml, biotina 2 mg/l y penicilina (100 U/ml)-estreptomicina (0.1 mg/ml). Los cultivos fueron resemebrados una vez que alcanzaron la fase estacionaria.

El conteo de los organismos se realizó cada 24 hrs mediante dilución 1:10 (50  $\mu\text{l}$  de cultivo en 450  $\mu\text{l}$  de PBS-formaldehído al 2%). Se colocaron 10  $\mu\text{l}$  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  $10^5$  para obtener el número de parásitos por ml de cultivo.

### 4.3 Amplificación por PCR

El gen codificante de LmMaf1 (LmjF.31.2820) de 810 pb (sin codón de paro), se amplificó mediante reacciones de PCR. Se utilizaron los siguientes oligonucleótidos (Tabla1) que contenían sitios de corte para enzimas de restricción para su posterior subclonación: LmMaf1-*Xma*I-For (que contiene un sitio de restricción de *Xma*I en el extremo 5´) y LmMaf1-*Xba*I-Rev (con un sitio de restricción de *Xba*I en el extremo 3´). El diseño de estos oligonucleótidos se realizó con base a la secuencia de Maf1 obtenida de las bases de datos del genoma de *L. major* (TriTrypDB). Las reacciones se llevaron a cabo en tubos de PCR empleando 100 ng de DNA genómico de la línea celular *L. major wild type* como molde, 1U de Herculase II Fusion DNA Polymerase (Stratagene) la cual es de alta fidelidad, buffer de reacción 1x, 1 µl de mezcla de dNTPs (10 mM) y 1 µl de oligonucleótidos sentido y antisentido (10 µM) en un volumen final de 50 µl. Se ajustaron las siguientes condiciones de amplificación en un termociclador Bio-Rad T100: se requirió de un ciclo a 95°C por 3 min; 30 ciclos de: desnaturalización (95°C por 30 seg.), alineamiento (56°C por 30 seg.) y extensión (68°C por 30 seg.); y un ciclo a 68°C por 7 min.

Oligonucleótido	Secuencia 5'-3'
LmMaf1- <i>Xma</i> I-For	CCCGGGACGAACAATGAAGTTCATCCCGC
LmMaf1- <i>Xba</i> I-Rev	GACAGTTCTACGGATACTACGTCTAG

**Tabla 1.** Oligonucleótidos utilizados para amplificar el gen de Maf1 de *L.major*.

### 4.4 Clonación en el vector pGEM-T-EASY

El DNA obtenido de la amplificación fue precipitado con 0.1 volúmenes de acetato de sodio ( $C_2H_3NaO_2$ ) 3 M y 2.5 volúmenes de etanol absoluto, la pastilla se resuspendió en un volumen final de 30 µl de agua destilada y se separó en un gel de agarosa al 0.8% por ~2 hrs 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 purificó con el kit NucleoSpin Gel and PCR clean-up extract II (Macherey-Nagel) siguiendo las instrucciones del fabricante. Con el DNA purificado, se realizaron reacciones de adición de A-terminal usando 210 ng de DNA adicionando 1  $\mu$ l (1 U) de DNA Taq Pol (Kapa Biosystems), Buffer Kapa Taq 1 X, y 1  $\mu$ l de dATP 2 mM en un volumen final de 10  $\mu$ l, durante 30 minutos, a una temperatura de 70°C. El DNA fue adenilado con el fin de permitir la posterior ligación del amplicón al vector pGEM-T-Easy (Promega).

Se realizaron dos ligaciones con distinta cantidad de DNA adenilado (60 ng y 100 ng de DNA. Con una proporción inserto: vector 6:1 y 10:1 respectivamente) usando para cada reacción 1U de enzima T4 DNA ligasa (Promega), buffer de ligación 1x y 37.5 ng de vector, volumen final 10  $\mu$ l y se incubaron toda la noche a 4°C. Las reacciones de ligación se usaron para transformar células competentes de *Escherichia coli* cepa JM109 de alta eficiencia  $1 \times 10^8$  (Promega), siguiendo las recomendaciones del fabricante, finalmente, las células transformadas se plaquearon en LB agar más ampicilina 100  $\mu$ g/ml, a las que previamente se les adiciono 100  $\mu$ l de IPTG (100mM) y 20  $\mu$ l de Xgal (50 mg/ml), incubando toda la noche a 37°C. De las Unidades Formadoras de Colonia obtenidas (UFC), se seleccionaron 2 colonias blancas y se inocularon en 5 ml de medio LB con ampicilina 100  $\mu$ g/ml incubando a 37°C con agitación de 250 rpm. De los cultivos obtenidos, se purificó DNA de plásmido empleando el Kit NucleoSpin Plasmid (Macherey-Nagel). El DNA de plásmido se sometió a digestiones enzimáticas dobles con las enzimas *Xba*I y *Xma*I y digestiones sencillas con la enzima *Eco*RI para liberar el inserto de LmMaf1 del vector. Las digestiones fueron analizadas por electroforesis.

La secuenciación de las construcciones obtenidas se realizó en la unidad de secuenciación de DNA del Laboratorio de Bioquímica Molecular de la Unidad de Biotecnología y Prototipos de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala, UNAM. El método empleado fue "BIG DYE Terminator Fluorescent Based Sequencing", con un equipo ABI 3100. De esta manera se generó y caracterizó el vector pGE-LmMaf1.

## 4.5 Subclonación en vector de expresión PTP

Se procedió a subclonar el inserto de LmMaf1 en el vector PTP. Para ello, el vector pB6-PTP (Moreno-Campos *et al.*, 2016) fue digerido con las enzimas *Xba*I y *Xma*I para liberar dos fragmentos: El gen RPB6 (507 pb) y el vector PTP de 6.7 kb. El inserto de LmMaf1 se obtuvo mediante digestiones del vector pGE-LmMaf1 con las enzimas *Xba*I y *Xma*I. El inserto y el vector, se purificaron a partir de gel de agarosa al 0.8% haciendo uso del kit NucleoSpin Gel and PCR clean-up Extract II.

Las ligaciones del vector PTP con el inserto LmMaf1 se realizaron en proporción 7:1 empleando 100 y 200 ng del vector con 84 y 170 ng de inserto (respectivamente), para cada reacción se adiciono 1U de enzima T4 DNA ligasa (Promega) y buffer de ligación 1x en un volumen final 10 µl, las reacciones se incubaron toda la noche a 4°C. El producto de ligación se empleó para electroporar células de *E. coli* electrocompetentes ElectroMax DH5αE (Invitrogene®). Las células transformadas se plaquearon en LB agar con ampicilina 100 µg/ml. Posteriormente, se seleccionaron 2 UFC y se hizo el análisis mediante la extracción de su DNA plasmídico (miniprep), realizando digestiones con enzimas de restricción y secuenciación.

## 4.6 Preparaciones plasmídicas

La extracción de DNA de plásmido para secuenciación se realizó mediante el uso del kit comercial NucleoSpin Plasmid (Macherey-Nagel) siguiendo las instrucciones y recomendaciones del fabricante. Para otros procedimientos se realizaron minipreparaciones a pequeña escala (miniprep) mediante la técnica de lisis alcalina. Para ello, las colonias bacterianas obtenidas, fueron inoculadas en 5 ml de medio LB más ampicilina 100 µg/ml y se dejaron crecer toda la noche a 37°C en agitación a 250 rpm

Los cultivos obtenidos se centrifugaron a 8,000 rpm durante 1 min a 4°C la pastilla se resuspendió en 100 µl de buffer de resuspención (glucosa 50 mM, Tris-HCl 25 mM pH 8.0, EDTA 10 mM pH 8.0) con un vortex y se adicionaron 200 µl de solución de lisis fresca (NaOH 0.2 N, SDS 1%).

Una vez lisadas las células, se agregaron 150 µl de solución de neutralización (sodio 3 M, acetato 5M), se mezcló invirtiendo varias veces y se mantuvo en hielo 4 min; a continuación se centrifugó a 13,000 rpm 5 min a 4°C y se pasó el sobrenadante a un tubo de 1.5 ml. Posteriormente, se adicionó un volumen de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (25:24:1), se agitó y centrifugó a 13,000 rpm 5 min a 4°C; la fase acuosa se transfirió a un tubo nuevo y se precipitó el DNA con dos volúmenes de etanol absoluto por 2 minutos a temperatura ambiente.

Después se centrifugó a velocidad máxima por 5 min a 4°C y se retiró el sobrenadante. Finalmente, se realizó un lavado con 1 ml de etanol al 70% y se dejó secar el DNA, la pastilla se resuspendió en 50 µl de TE suplementado con RNAsa A (20 µg/ml), incubando a 37°C por 1 hr.

Para la obtención de DNA de plásmido a mediana escala (Midiprep), se inocularon 500 ml de medio LB más ampicilina 100 µg/ml, con las células transformadas de LmMaf1-PTP y se crecieron a 250 rpm a 37°C. La extracción se realizó empleando el kit Nucleo Bond Xtra Midi plus (Macherey-Nagel), siguiendo las recomendaciones del fabricante. Se hicieron pruebas de restricción con las enzimas *Xba*I y *Xma*I para verificar el tamaño correcto de vector e inserto, este DNA se empleó para electroporar células de *L. major*.

#### **4.7 Transfección de *Leishmania* por electroporación**

Promastigotes de *L. major* en fase media logarítmica ( $20\text{-}25 \times 10^6$  células/ml) fueron crecidos en medio B/M. Para la transfección por medio de la electroporación,  $1 \times 10^8$  células fueron centrifugadas a 4,000 rpm durante 10 minutos a 4°C. Posteriormente, se realizó un lavado con 10 ml de PBS-G (NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  10 mM,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  2 mM, complementado con 6 mM de glucosa, pH 7.4) y se centrifugo nuevamente, la pastilla se resuspendió en 10 ml de amortiguador cytomix (HEPES 25 mM pH 7.6, KCl 120 mM,  $\text{CaCl}_2$  0.15 mM,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ /  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  10 mM pH 7.6, EDTA 2 mM,  $\text{MgCl}_2$  5 mM). Las células fueron centrifugadas y resuspendidas en 400 µl de amortiguador cytomix y se transfirió a una cubeta de electroporación de 4 mm (Electroporation Cuvettes Plus™, BTX®) previamente enfriada. Dentro de la misma cubeta se adicionaron 25 µg de DNA de plásmido LmMaf1-PTP. Se

mezcló suavemente y se incubó en hielo por 10 min. Se aplicó un pulso de 1600 volts, 25 ohms y 50  $\mu$ F en un equipo ECM Electro Cell Manipulator (BTX®) inmediatamente después se colocaron en hielo por 10 minutos.

Una vez electroporados los cultivos se transfirieron a tubos cónicos de 50 ml conteniendo 10 ml de medio B/M y se incubaron a 40 rpm y 27°C. A las 24 hrs se agregó la droga G418 a una concentración de 25  $\mu$ g/ml. 24 hrs después se agregó más G418, a una concentración final de 50  $\mu$ g/ml. Los cultivos se monitorearon hasta su recuperación y se pasaron a cajas de cultivo de 25 cm<sup>2</sup>, para obtener así las poblaciones transfectantes estables.

#### **4.8 Obtención de clonas celulares de *Leishmania* por cultivo en placa**

Después de dos resiembras de los cultivos transfectados se prosiguió a la obtención de clonas celulares en medio B/M con agarosa al 0.8% (SeaPlaque GTG, Cambrex®). Brevemente, después de llevar a cabo el conteo celular se prepararon diluciones de 2000, 1000, 500, 250 y 100 células de las poblaciones transfectantes en 0.5 ml de medio. Las células diluidas se sembraron en cajas Petri que contenían el medio de cultivo semisólido (medio B/M, SFB 20%, agarosa SeaPlaque GTG al 0.8% y G418 50  $\mu$ g/ml) y se expandieron de manera homogénea sobre la superficie de éstas. La temperatura de incubación fue de 27°C con 5% de CO<sub>2</sub>. Los cultivos se monitorearon hasta la aparición de las primeras colonias (aprox. 11 días), las cuales se transfirieron a cajas multipozo con medio B/M más G418. Una vez que alcanzaron una densidad celular óptima ( $4-5 \times 10^7$  células/ml) se transfirieron a cajas de cultivo de 25 cm<sup>2</sup> y se crecieron a 27°C.

Para la crio-preservación de las líneas celulares, se tomaron  $1 \times 10^8$  células, se centrifugaron a 4,000 rpm durante 10 minutos a 4°C. Las células se resuspendieron en 1 ml de suero fetal bovino con 10% de glicerol y se transfirieron a un criovial que fue almacenado a -70°C por 24 hrs, para después colocarlo en un tanque con nitrógeno líquido. Cuando fue necesario, los crioviales se descongelaron y se diluyeron con 4 ml de medio B/M sin drogas de selección. 24 hrs después se les agregó la mitad de la concentración de

drogas y 48 hrs después el resto para completar la concentración final de cada droga.

#### **4.9 Análisis de la expresión de proteínas recombinantes**

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

Se desnaturalizaron las proteínas extraídas adicionándoles 25  $\mu$ l de muestra con buffer Laemmli 1x (Tris-HCl 22 mM pH 6.8, SDS 2%, azul de bromofenol 0.02%, glicerol 10% y  $\beta$ -Mercapto etanol 5%), se colocaron en tubos de 1.5 ml y se mantuvieron durante 10 minutos en agua en ebullición, posteriormente se transfirieron a hielo durante 5 minutos. Las muestras se fraccionaron en un gel de poliacrilamida con dodecil sulfato sódico (SDS-PAGE, por sus siglas en inglés) donde se involucra un sistema discontinuo con dos geles: uno concentrador de poliacrilamida al 4 % (Tris-HCl 133 mM pH 6.8, SDS 0.1%, Persulfato de sodio 0.1% y TEMED 0.2%), y un gel separador de poliacrilamida al 10% (Tris-HCl 375 mM, SDS 0.1%, persulfato de sodio 0.1% y TEMED 0.2%). De esta forma, las proteínas 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 0.1%) a 80 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 (Immun-Blot™ PVDF, BIO-RAD) con

*buffer* de transferencia 1× (Tris 24.76 mM, glicina 191.82 mM, metanol 20%). La transferencia se llevó a cabo a 100 voltios durante 2 horas a 4°C.

La membrana fue bloqueada con una solución de leche descremada al 5% en PBS Tween-20 0.05% toda la noche a 4°C. Posteriormente se adiciono el anticuerpo primario Anti-Proteína C (Delta biolabs), que reconoce al epítoto de Proteína C de la bandera PTP, con una dilución 1:3000. Incubando durante una hora a temperatura ambiente, después se realizaron 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 kit de detección Immobilon™ Western (Millipore).

#### **4.10 Purificación por Afinidad en Tándem**

Para los experimentos de purificación por afinidad en tándem se usaron cultivos en fase media logarítmica ( $20\text{-}25 \times 10^6$  células/ml) de 3 litros. Como paso inicial, los cultivos fueron centrifugados a 6000 rpm por 10 min a 4°C. Se lavó la pastilla con 200 ml de PBS-G y se resuspendió 18 ml de *buffer* IPP-150 (Tris-HCl 10 mM pH 8.0, NaCl 150 mM, NP-40 al 0.1%) frío complementado con inhibidores de proteasas 2× (“Protease Inhibitor Cocktail for Plants and Tissue Extract”, Sigma). 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 hasta que las células estuvieran completamente lisadas (~20 min). Posteriormente se dieron 50 golpes manualmente en un homogenizador de 30 ml (marca Wheaton) hasta observar la completa lisis celular. Para aclarar el lisado celular se centrifugó a 10,000 rpm, durante 15 min a 4°C.

El sobrenadante se colocó en una columna de cromatografía desechable Econo-Pac® (BIO-RAD) de 20 ml conteniendo 350 µl de perlas de Sefarosa-IgG (“IgG Sepharose™ 6 Fast Flow”, Amersham) previamente equilibradas, y se incubó por 3 hrs a 4°C en rotación suave. La columna fue drenada por flujo de gravedad y lavada tres veces con 20 ml de solución IPP-150 fría. El complejo proteico fue digerido con 100 unidades de la proteasa TEV (SIGMA ALDRICH) en 1 ml de amortiguador de proteasa AcTEV (KCl 150 mM, Tris-HCl



20 mM pH 7.7, MgCl<sub>2</sub> 3 mM, DTT 0.5 mM, Tween 20 al 0.1%, EDTA 0.5 mM) durante toda la noche a 4°C, agitando la columna de manera circular. La columna se drenó por flujo de gravedad, se realizó un lavado con 350 µl de solución PC-150 (KCl 150 mM, Tris-HCl 20 mM pH 7.7, MgCl<sub>2</sub> 3 mM, DTT 0.5 mM, Tween 20 al 0.1 %; CaCl<sub>2</sub> 1 mM), equivalente al volumen muerto de las perlas de Sefarosa-IgG. Posteriormente, el eluido conteniendo los complejos proteicos se llevó a un volumen final de 6 ml con buffer PC-150 más CaCl<sub>2</sub> a una concentración final de 3 mM, e inhibidores de proteasas a una concentración final de 2x, antes de adicionarlo a una columna de cromatografía Econo-Pac® (BIO-RAD®) de 5 ml conteniendo 250 µl de matriz de afinidad α-Prot C (“HPC4”, Roche®) previamente equilibrada.

La columna se incubó 4 hrs a 4°C en rotación suave, y se drenó por flujo de gravedad, lavando 6 veces con 5 ml de PC-150. Finalmente, se realizaron ocho eluciones, cada una con 250 µl de buffer de elución (Tris-HCl pH 7.75 mM, EGTA 10 mM, EDTA 5 mM e inhibidores de proteasas 2x).

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

#### **4.11 Preparación de las muestras proteicas para su análisis por espectrometría de masas**

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

agitación suave con solución de lavado (metanol 10%, ácido acético 7%). Finalmente, se lavó por 5 min en agua bidestilada.

El gel se analizó en un fotodocumentador (BioSens SC 645). Finalmente, el resto de la proteína se corrió en un gel de poliacrilamida al 10 % preparado con soluciones filtradas y se dejó ingresar la muestra aproximadamente 1 cm al gel. Posteriormente se tiñó con GelCode Blue Stain Reagent (Pierce) durante 2 hrs a temperatura ambiente y se lavo con agua destilada durante 2 hrs. Las bandas del gel que correspondían a las proteínas purificadas se cortaron en dos fragmentos que contenían las proteínas de bajo y alto peso molecular. Las bandas fueron analizadas por espectrometría de masas en la Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigación y a la Industria (USAI), UNAM.

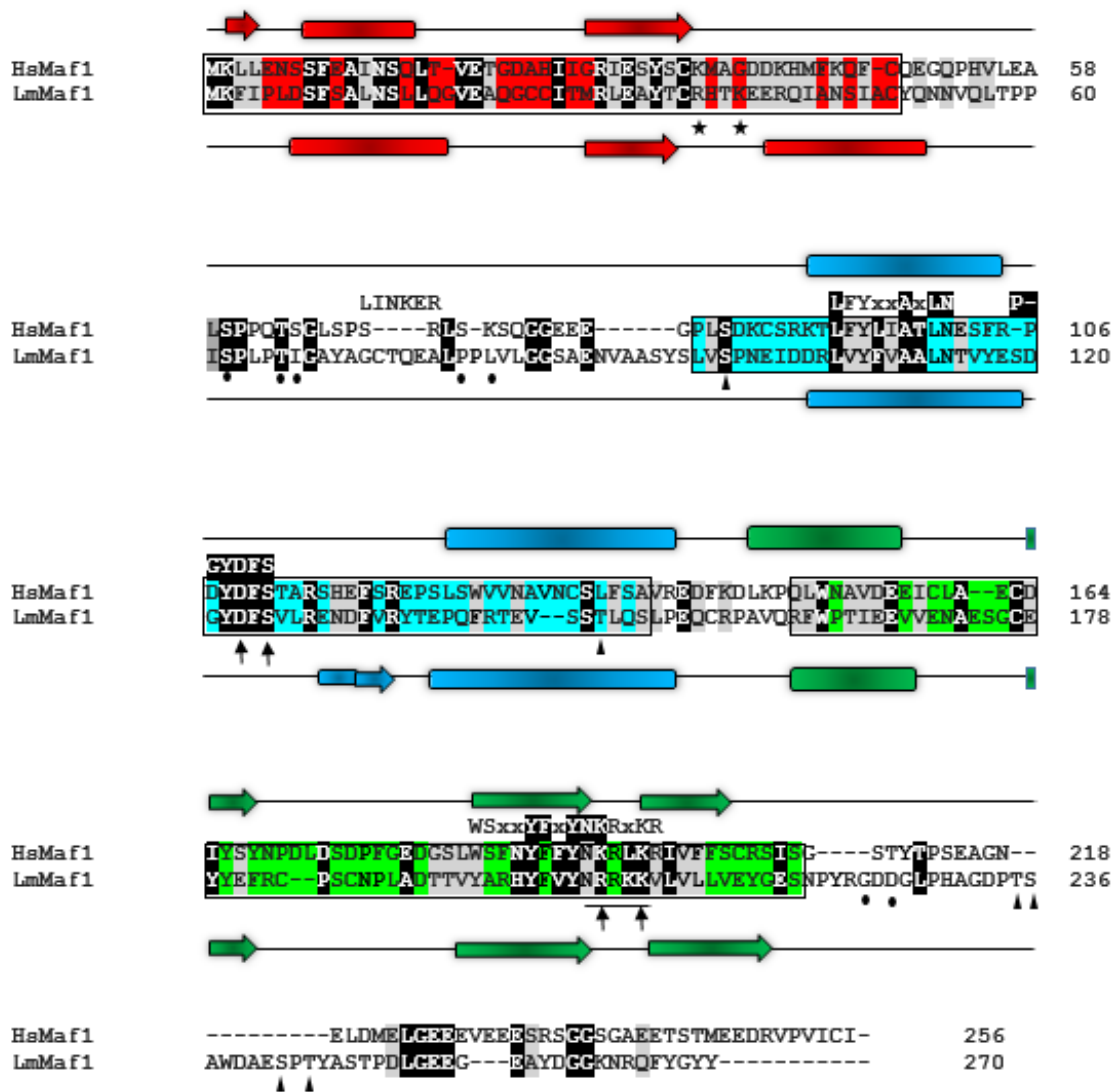
## 5. Resultados

### 5.1 Análisis de la secuencia de LmMaf1

Para determinar la presencia de secuencias conservadas en LmMaf1, se comparó su secuencia predicha de aminoácidos con la de Maf1 de humano. Como se observa en la Figura 20, aunque las secuencias no son muy parecidas, puesto que muestran un porcentaje de identidad de 25.94%, LmMaf1 posee las tres regiones conservadas en los ortólogos de Maf1: los dominios A, B y C. Dentro del dominio B se localizan dos secuencias consenso (LFYxxAxLN y PGYDFS), las cuales están conservadas en LmMaf1. Asimismo, en el dominio C de LmMaf1 se localiza parcialmente conservada la secuencia consenso WSxxYFxFYNKRxK (Figura 20).

Estudios funcionales han permitido la identificación de residuos importantes para la función de Maf1 en humano y levadura (Moir *et al.*, 2006; Roberts *et al.*, 2006; Gajda *et al.*, 2010; Michels, 2011). La comparación de las secuencias indicó que algunos de estos aminoácidos están conservados en LmMaf1. Por ejemplo, D-123, S-125 y K-298 en LmMaf1 (señalados con una flecha en la Figura 20).

Considerando que la función de Maf1 se regula por fosforilación (Moir y Willis, 2013), se procedió a buscar probables aminoácidos fosforilados en LmMaf1. El análisis con el programa PhosTryp (<http://phostryp.bio.uniroma2.it>) mostró que hay 6 sitios probables que pueden ser fosforilados en LmMaf: S-38, T-147, T-235, S-236, S-242 y T-244 (marcados con triángulos en la Figura 20). Asimismo, también se ha reportado que Maf1 es sumoilada en humano (Rohira *et al.*, 2013), por lo que se procedió a buscar posibles residuos sumoilados en LmMaf1 con el programa GPS-SUMO. El análisis mostró que un sitio probable de sumoilación en LmMaf1 es la K-39 (señalada con un asterisco en la Figura 20), la cual está en una posición cercana a la K-35 que es sumoilada en Maf1 de humano (Rohira *et al.*, 2013).

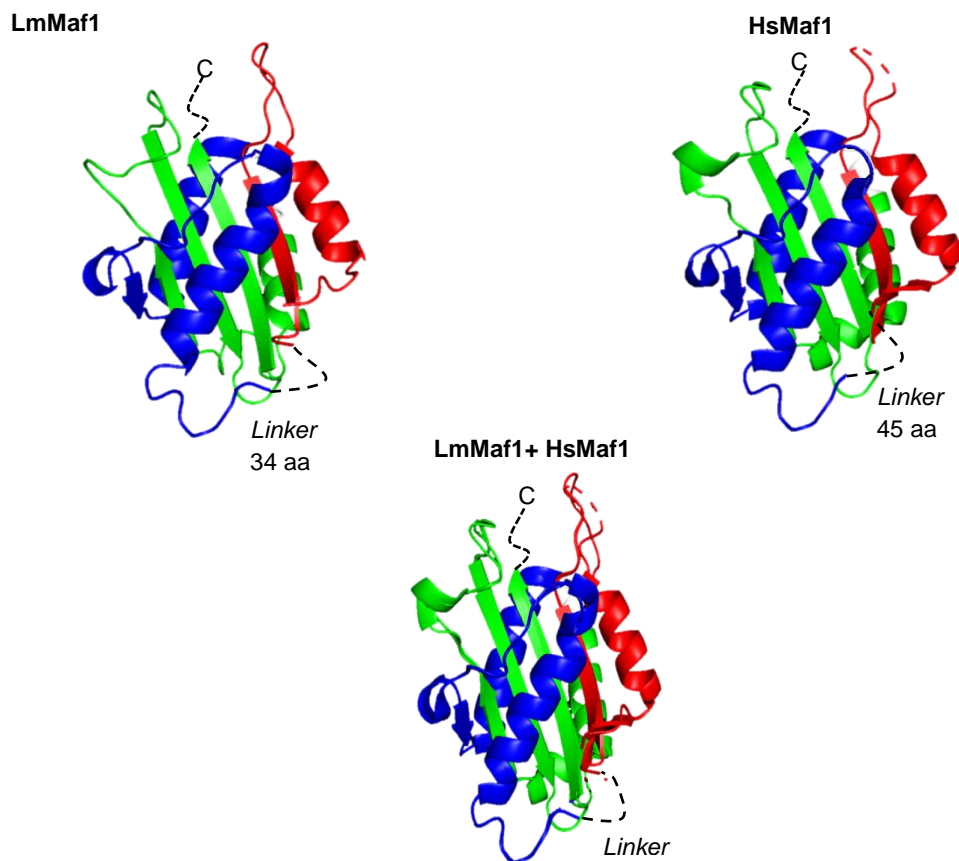


**Fig. 20. Análisis de secuencia y estructura de LmMaf1.** Alineamiento de secuencia de aminoácidos de Maf1 de *H. sapiens* (HsMaf1) y *L. major* (LmMaf1). Los residuos conservados y semiconservados están sombreados en negro y gris respectivamente. Los dominios conservados de Maf1 están señalados en rojo (dominio A), azul (dominio B) y verde (dominio C). Las secuencias consenso de Maf1 (Romero-Meza *et al.*, 2017) se muestran arriba de los dominios B y C, con residuos conservados sombreados en negro. La probable señal de localización nuclear está subrayada (Romero-Meza *et al.*, 2017). Las flechas muestran los aminoácidos que se requieren para la función de Maf1 en levaduras o mamíferos que se conservan en *L. major*. Los círculos muestran aminoácidos que están fosforilados en humanos (Michels, 2011) (no se conservan en *L. major*). Los triángulos muestran los probables sitios de fosforilación de *L. major* con un score mayor a 0.6. Las estrellas muestran el sitio de sumoilación para HsMaf1 en K-35 (Rohira *et al.*, 2013) y un probable sitio de sumoilación de LmMaf1 en K-39. Los elementos predichos de la estructura secundaria de LmMaf1 se muestran abajo del alineamiento; arriba se muestra la estructura secundaria ya reportada de HsMaf1 (Vannini *et al.*, 2010). Las cadenas  $\beta$  se representan con flechas y las  $\alpha$ -hélices con rectángulos redondeados, y están coloreados de acuerdo con el dominio conservado donde se encuentran.

### 5.1.2 Determinación *in silico* de las estructuras secundaria y terciaria de LmMaf1

La predicción de la estructura secundaria probable de LmMaf1 reveló que el dominio A está conformado por una  $\alpha$ -hélice inicial, seguida de una hoja  $\beta$ -plegada y otra  $\alpha$ -hélice (Figura 20). En la región *linker*, que corresponde a la región entre los dominios A y B, no se predice alguna estructura secundaria. El dominio B está conformado por una  $\alpha$ -hélice seguida de otra  $\alpha$ -hélice pequeña ligada a una hoja  $\beta$ -plegada; y el dominio termina con una  $\alpha$ -hélice.

Finalmente, se predice que el dominio C se pliega en una  $\alpha$ -hélice y tres hojas  $\beta$ -plegadas. Esta estructura secundaria es muy similar a la reportada para Maf1 en humano (Figura 20).



**Fig. 21. Predicción de la estructura tridimensional de LmMaf1 y HsMaf1.** La región correspondiente a la caja A se encuentra coloreada en rojo, la caja B en azul y la C en verde. Las regiones correspondientes al *linker* y al extremo carboxilo-terminal se indican con líneas negras punteadas. Las flechas representan estructuras  $\beta$ -plegadas y los espirales corresponden a estructuras  $\alpha$ -hélice. Se indica la posición y el tamaño del *linker* en las dos especies.

Posteriormente se procedió a determinar la probable estructura tridimensional de LmMaf1, comparando con el cristal de Maf1 de humano (PDB id: 3nr5). Considerando que la cristalografía de Maf1 de humano fue hecha con una fracción de la proteína que carecía de la región *linker* y del extremo carboxilo-terminal, fueron descartadas estas regiones de LmMaf1 para el modelaje.

Los resultados indicaron que la estructura de LmMaf1 es globular, presentando cinco hojas  $\beta$ -plegadas en el centro, las cuales están rodeadas por cinco  $\alpha$ -hélices (Figura 21). Esta estructura es muy parecida a la reportada para Maf1 de humano (Figura 21).

### 5.1.3 Maf1 está conservada entre tripanosomátidos

Con el objeto de determinar el grado de conservación de la secuencia de Maf1 entre los parásitos tripanosomátidos, se llevó a cabo un alineamiento de las secuencias de varias especies de *Leishmania*, *T. cruzi* y *T. brucei* (Figura 22). La comparación de las secuencias de aminoácidos predichas reveló que Maf1 está muy conservada entre los tripanosomátidos (Figura 22). Entre *L. major* y otras especies de *Leishmania* se encontraron porcentajes de identidad que van desde 89.96% (con *L. braziliensis* y *L. panamensis*) hasta 98.51% (con *L. infantum*) (Tabla 2). Entre Maf1 de *L. infantum* y *L. donovani* se presenta una identidad del 99.63%. Por otro lado, entre *L. major* y *T. cruzi* y *T. brucei* se presentan porcentajes de identidad menores, de 47.86 y 46.12%, respectivamente.

Como se anticipaba, las regiones más conservadas corresponden a los dominios A, B y C, mientras que las regiones menos conservadas son *el linker* y el extremo carboxilo terminal (Figura 22).

LbMaf1	MKIIPLSFSALNSLLQGVQAQCCITRLEAYTCRRTKEERCIAANNIASYONNVQLTPP	60
LgMaf1	MKIIPLSFSALNSLLQGVQAQCCITRLEAYTCRRTKEERCIAANNIASYONNVQLTPP	60
LpMaf1	MKIIPLSFSALNSLLQGVQAQCCITRLEAYTCRRTKEERCIAANNIASYONNVQLTPP	60
LmxMaf1	MKIIPLSFSALNSLLQGVQAQCCITRLEAYTCRRTKEERCIAANNIASYONNVQLTPP	60
LmMaf1	MKIIPLSFSALNSLLQGVQAQCCITRLEAYTCRRTKEERCIAANSIASYONNVQLTPP	60
LiMaf1	MKIIPLSFSALNSLLQGVQAQCCITRLEAYTCRRTKEERCIAANSIASYONNVQLTPP	60
LdMaf1	MKIIPLSFSALNSLLQGVQAQCCITRLEAYTCRRTKEERCIAANSIASYONNVQLTPP	60
TcMaf1	MDIVPLSSEFLNSLLQGVQAQCCIMTRLEAFTCRSTRKKKQLAASMAFYANA--NTPP	58
TbMaf1-4	MEIVPLSSEFLNSLLQGVQAQCCIMTRLEAFTCRSTRKKKLLAASIAFYANK--TTPP	58
TbMaf1-8	MEIVPLSSEFLNSLLQGVQAQCCIMTRLEAFTCRSTRKKKLLAASIAFYANK--TTPP	58

LINKER

LbMaf1	ISPSPAIGAYADFPQEAIPPLVLGGSA-DLAANYSL/NPDEIDDRLVYFVAALNTVYES	119
LgMaf1	ISPSPAIGAYADFPQEAIPPLVLGGSA-DLAANYSL/NPDEIDDRLVYFVAALNTVYES	119
LpMaf1	ISPSPAIGAYADFPQEAIPPLVLGGSA-DLAANYSL/NPDEIDDRLVYFVAALNTVYES	119
LmxMaf1	ISPLPTIGAYAGFTS-EALPPLVLGGSAENLTASYSL/SPNEIDDRLVYFVAALNTVYES	119
LmMaf1	ISPLPTIGAYAGCTQ-EALPPLVLGGSAENVAASYSL/SPNEIDDRLVYFVAALNTVYES	119
LiMaf1	ISPLPTIGAYAGFTQ-EALPPLVLGGSAENVTASYSL/SPNEIDDRLVYFVAALNTVYES	119
LdMaf1	ISPLPTIGAYAGFTQ-EALPPLVLGGSAENVTASYSL/SPNEIDDRLVYFVAALNTVYES	119
TcMaf1	LAPASHAG-----LSPPLQL---DGRLPVVFAP/DPDEIDDRLVYFVAALNSIYGE	107
TbMaf1-4	LRPLCSAN-----APVPLLNLSDDSAHVVPTEP/EPSEIDDRLVYFVAALNSIYGE	110
TbMaf1-8	LRPLCSAN-----APVPLLNLSDDSVHVVPTEP/EPSEIDDRLVYFVAALNSIYGE	110

LbMaf1	DGYDFSVLREDFVRYTEPQRTEVSNSTLQSLHEQCQCPAVQRFWPTMBEVVENAEGGCEY	179
LgMaf1	DGYDFSVLREDFVRYTEPQRTEVSNSTLQSLHEQCQCPAVQRFWPTMBEVVENAEGGCEY	179
LpMaf1	DGYDFSVLREDFVRYTEPQRTEVSNSTLQSLHEQCQCPAVQRFWPTMBEVVENAEGGCEY	179
LmxMaf1	DGYDFSVLREDFVRYTEPQRTEVSNSTLQSLHEQCQCPAVQRFWPTMBEVVENAEGGCEY	179
LmMaf1	DGYDFSVLREDFVRYTEPQRTEVSNSTLQSLHEQCQCPAVQRFWPTMBEVVENAEGGCEY	179
LiMaf1	DGYDFSVLREDFVRYTEPQRTEVSNSTLQSLHEQCQCPAVQRFWPTMBEVVENAEGGCEY	179
LdMaf1	DGYDFSVLREDFVRYTEPQRTEVSNSTLQSLHEQCQCPAVQRFWPTMBEVVENAEGGCEY	179
TcMaf1	DGYDFSVLTEEDFVVCNEAQRVAEVDVTLHSMSDSCRPAVEQFWILVSEQVMDASQGCEY	167
TbMaf1-4	DGYDFSVLTEEDFVPCDEAHVRAEVNNTLRSFSSCGPAVQCFWVRVTEHSDASQGCEY	170
TbMaf1-8	DGYDFSVLTEEDFVPCDEAHVRAEVNNTLRSFSSCGPAVQCFWVRVTEHSDASQGCEY	170

LbMaf1	YEFCCPSCDPLADTAVYARHYFVYNRRKVLVLLVEYGESNPYRGDDGLPHAGGPTSA--	237
LgMaf1	YEFCCPSCDPLADTAVYARHYFVYNRRKVLVLLVEYGESNPYRGDDGLPHAGGPTSA--	237
LpMaf1	YEFCCPSCDPLADTAVYARHYFVYNRRKVLVLLVEYGESNPYRGDDGLPHAGGPTSA--	237
LmxMaf1	YEFRCPSCDPLADTTVYARHYFVYNRRKVLVLLVEYGESNPYRGDDGLPHAGDPTSG--	237
LmMaf1	YEFRCPSCDPLADTTVYARHYFVYNRRKVLVLLVEYGESNPYRGDDGLPHAGDPTSA--	237
LiMaf1	YEFRCPSCDPLADTTVYARHYFVYNRRKVLVLLVEYGESNPYRGDDGLPHAGDPTSA--	237
LdMaf1	YEFRCPSCDPLADTTVYARHYFVYNRRKVLVLLVEYGESNPYRGDDGLPHAGDPTSA--	237
TcMaf1	YFRMCPICDPMVSRSLFSOHYFLYNRRSRLVLSLLIFAEGNAYRGDDGVIIVNGFYVERD	227
TbMaf1-4	YRFASPCDPMASRALFSOHYFLYNKRRLVLSLLIFAEGNLYRGDDGAMVENSFLYETD	230
TbMaf1-8	YRFASPCDPMASRALFSOHYFLYNKRRLVLSLLIFAEGNLYRGDDGMIENSFLYETD	230

LbMaf1	-----WDGESSTYASTPEAGEEGE-VYGGGKNRQFYGY	270
LgMaf1	-----WDGESSTYASTPEAGEEGE-VYGGGKNRQFYGY	270
LpMaf1	-----WDGESSTYASTPEAGEEGE-VYGGGKNRQFYGY	270
LmxMaf1	-----WDAESPTYASTEDPGDEGE-AYDGGKNRQFYGY	270
LmMaf1	-----WDAESPTYASTPDLGEEGE-AYDGGKNRQFYGY	270
LiMaf1	-----WDAESPTYASTPDPGEEGE-AYDGGKNRQFYGY-	269
LdMaf1	-----WDAESPTYASTPDPGEEGE-AYDGGKNRQFYGY	270
TcMaf1	DADTDEGNSSRGAWQSSPEPLSSDD--GVGGKNLHYVYGH	266
TbMaf1-4	DNST-----HSRLWFSPPDGASEDDEHVLVGGKNVHYVCRA	265
TbMaf1-8	DNSN-----HQRPWLSPPDGASEDDEQVLVGGKNVHYVYRP	265

**Fig. 22.** Alineamiento de secuencia de aminoácidos de Maf1 de *L. braziliensis* (LbMaf1), *L. guyanensis* (LgMaf1), *L. panamensis* (LpMaf1), *L. mexicana* (LmxMaf1), *L. major* (LmMaf1), *L. infantum* (LiMaf1), *L. donovani* (LdMaf1), *T. cruzi* (TcMaf1) y *T. brucei* (TbMaf1-4 y TbMaf1-8). Los residuos conservados y semiconservados están sombreados en negro y gris respectivamente. Los dominios conservados de Maf1 están remarcados en rojo (dominio A), azul (dominio B) y verde (dominio C).

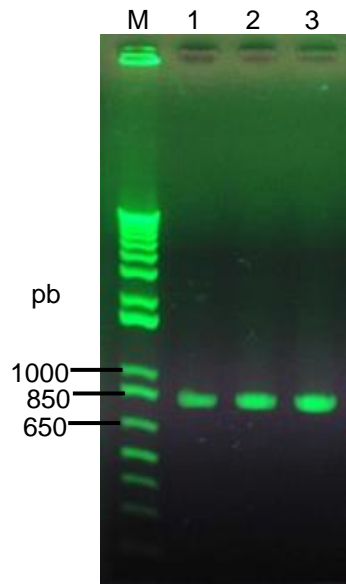
	LmMaf1	LbMaf1	LgMaf1	LpMaf1	LmxMaf 1	LiMaf1	LdMaf1	TcMaf1	TbMaf1-4	TbMaf1-8	HsMaf1
LmMaf1	100	89.96	90.33	89.96	95.93	98.51	98.15	47.86	46.51	46.12	25.94
LbMaf1		100	98.9	99.26	90.71	90.30	89.96	48.83	46.69	46.30	23.24
LgMaf1			100	99.63	90.71	90.67	90.33	49.22	47.08	46.69	23.24
LpMaf1				100	90.33	90.30	89.96	49.22	47.08	46.69	23.24
LmxMaf1					100	97.40	97.04	48.25	46.51	46.12	24.98
LiMaf1						100	99.63	48.83	47.08	46.69	24.38
LdMaf1							100	48.25	46.51	46.12	23.97
TcMaf1								100	69.62	69.23	22.54
TbMaf1-4									100	95.85	23.48
TbMaf1-8										100	22.67
HsMaf1											100

**Tabla 2.** Porcentajes de identidad entre Maf1 de distintas especies de tripanosomátidos y Maf1 de humano.

## 5.2 Clonación de LmMaf1 en el vector pGEM-T-EASY

Se procedió después a la amplificación por PCR del gen de LmMaf1 para su clonación inicial en el vector pGEM-T-Easy. Para ello se diseñaron oligonucleótidos que permitieran la amplificación del gen completo, sin el codón de término. Se usó DNA genómico para la amplificación de la secuencias de interés empleando la DNA polimerasa Herculasa HIFI, que es de alta fidelidad. Se empleó un rango de temperatura de 52°C-56°C para los ciclos de PCR. En todas las condiciones analizadas se observó el producto esperado de 831 pb (Figura 23).

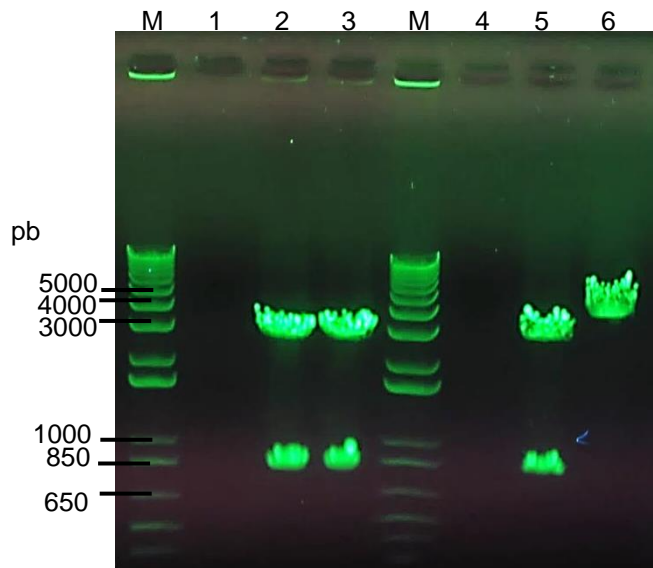




**Fig. 23.** Amplificación por PCR del gen Maf1 de *L. major* con DNA polimerasa Herculasa HIFI. M: Marcador 1 Kb Plus (Invitrogen). 1: 52°C; 2: 54°C; 3: 56°C. Gel de agarosa al 1% teñido con midory green.

El DNA obtenido fue precipitado, purificado y adenilado, para ser ligado al vector pGEM-T-Easy. Posteriormente se realizaron transformaciones de células competentes de *E. coli* con los productos de ligación.

Se obtuvieron tres colonias positivas, y se purificó el DNA plasmídico de éstas por medio de la técnica de extracción de DNA por lisis alcalina (miniprep). El DNA de plásmido obtenido se sometió a digestiones enzimáticas dobles con las enzimas *Xba*I y *Xma*I y digestiones sencillas con la enzima *Eco*RI para liberar el inserto de Maf1 del vector. Las digestiones fueron analizadas por electroforesis (Figura 24). Se observó la banda esperada de 0.8 kb, además del vector de 3 kb, en las colonias 2 y 3 (carriles 2, 3 y 5). La colonia 1 (carriles 1 y 4) no dio señal alguna.



**Fig. 24.** Electroforesis de DNA de plásmido digerido con *EcoRI* (carriles 1-3) y con *XbaI* y *XmaI* (carriles 4-6). Se analizó DNA de la colonia 1 (carriles 1 y 4), de la colonia 2 (carriles 2 y 5) y de la colonia 3 (carriles 3 y 6). M: Marcador 1Kb Plus (Invitrogen). Gel de agarosa al 1% teñido con midory green.

Para verificar la integridad del gen, se obtuvo DNA de plásmido de la colonia 2 y se mandó a secuenciar. El análisis de los resultados obtenidos (Figura 25) reveló que no se presentaron cambios en la secuencia del gen. De esta forma se obtuvo el vector pGE-LmMaf1 (Figura 26).

```

LmMaf1      -----ATGAAGTTCATCCCCTGGACAGCTTCAG
c2LmMaf1    -----ATGAAGTTCATCCCCTGGACAGCTTCAG
                *****

LmMaf1      CGCGCTAAACTCCCTCTTGCAAGGGGTGGAGGCGCAGGGGTGCTGCATCACCATGCGCCT
c2LmMaf1    CGCGCTAAACTCCCTCTTGCAAGGGGTGGAGGCGCAGGGGTGCTGCATCACCATGCGCCT
                *****

LmMaf1      AGAGGCCTACACGTGTCGGCACACAAAAGAGGAGCGGCAGATAGCGAACAGCATAGCTTG
c2LmMaf1    AGAGGCCTACACGTGTCGGCACACAAAAGAGGAGCGGCAGATAGCGAACAGCATAGCTTG
                *****

LmMaf1      CTATCAAACAACGTGCAACTCACGCCACCTATTAGTCCCTTGCCCACTATTGGCGCGTA
c2LmMaf1    CTATCAAACAACGTGCAACTCACGCCACCTATTAGTCCCTTGCCCACTATTGGCGCGTA
                *****

LmMaf1      CGCCGGCTGTACTCAGGAGGCGCTGCCACCGCTTGTGCTGGGCGGAAGCGCCGAGAACGT
c2LmMaf1    CGCCGGCTGTACTCAGGAGGCGCTGCCACCGCTTGTGCTGGGCGGAAGCGCCGAGAACGT
                *****

```

```

LmMaf1      GGCCGCGAGTTACAGCCTCGTGAGCCCCAACGAGATTGATGACCGACTAGTGTACTTTGT
c2LmMaf1    GGCCGCGAGTTACAGCCTCGTGAGCCCCAACGAGATTGATGACCGACTAGTGTACTTTGT
*****

LmMaf1      GGCAGCTCTCAACACGGTATATGAGAGCGACGGTTACGACTTTTCGGTTCTGCGGGAGAA
c2LmMaf1    GGCAGCTCTCAACACGGTATATGAGAGCGACGGTTACGACTTTTCGGTTCTGCGGGAGAA
*****

LmMaf1      CGACTTTGTGCGTTACACAGAGCCGAGTTCGCACAGAGGTGTCGAGCACGCTGCAGTC
c2LmMaf1    CGACTTTGTGCGTTACACAGAGCCGAGTTCGCACAGAGGTGTCGAGCACGCTGCAGTC
*****

LmMaf1      ATTGCCGAGCAGTGCCGCCCGCAGTGCAGCGCTTCTGGCCCACGATCGAGGAGGTAGT
c2LmMaf1    ATTGCCGAGCAGTGCCGCCCGCAGTGCAGCGCTTCTGGCCCACGATCGAGGAGGTAGT
*****

LmMaf1      CGAGAACGCGGAGAGTGGCTGCGAGTACTACGAGTTTCGATGTCCCTCCTGCAACCCGCT
c2LmMaf1    CGAGAACGCGGAGAGTGGCTGCGAGTACTACGAGTTTCGATGTCCCTCCTGCAACCCGCT
*****

LmMaf1      CGCCGACACCACCGTGTACGCCGCCACTATTTTGTGTATAACCGTAGAAAAAAGGTGCT
c2LmMaf1    CGCCGACACCACCGTGTACGCCGCCACTATTTTGTGTATAACCGTAGAAAAAAGGTGCT
*****

LmMaf1      TGTGCTGCTTGTGGAGTACGGCGAGAGCAACCCTTACCGTGGGGACGACGGACTGCCACA
c2LmMaf1    TGTGCTGCTTGTGGAGTACGGCGAGAGCAACCCTTACCGTGGGGACGACGGACTGCCACA
*****

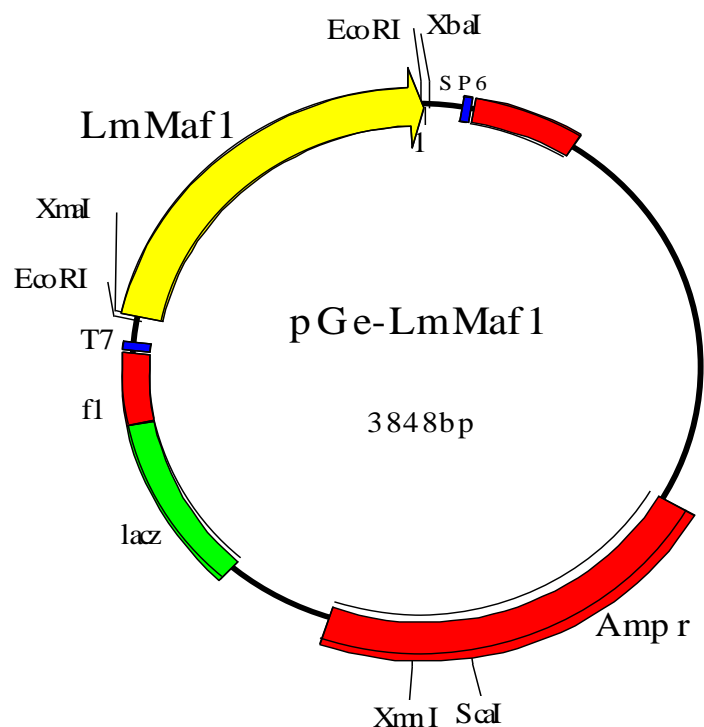
LmMaf1      CGCTGGCGACCCGACGTCAGCGTGGGACGCTGAGAGTCCCACGTATGCCAGCACCCCGA
c2LmMaf1    CGCTGGCGACCCGACGTCAGCGTGGGACGCTGAGAGTCCCACGTATGCCAGCACCCCGA
*****

LmMaf1      CCTAGGCGAGGAAGGTGAGGCATACGATGGTGGCAAGAACAGACAGTTCTACGGATACTA
c2LmMaf1    CCTAGGCGAGGAAGGTGAGGCATACGATGGTGGCAAGAACAGACAGTTCTACGGATACTA
*****

LmMaf1      CGTCTAGA
c2LmMaf1    CGTCTAGA
*****

```

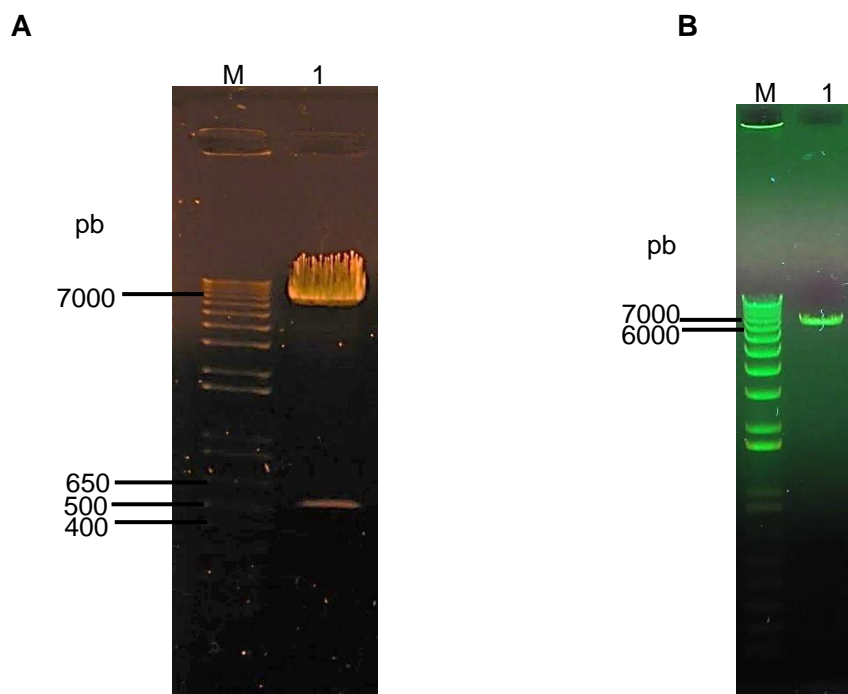
**Fig. 25.** Alineamiento de la secuencia del gen de Maf1 de *L. major* (LmMaf1) con la secuencia de la clona 2 obtenida (c2LmMaf1). Se observa que hay una identidad del 100% entre las dos secuencias.



**Fig. 26.** Mapa del vector pGE-LmMaf1. Se indica la posición del gen de Maf1 de *L. major*, así como la secuencia de resistencia a ampicilina y los sitios de corte de enzimas de restricción.

### 5.3 Construcción del vector PTP

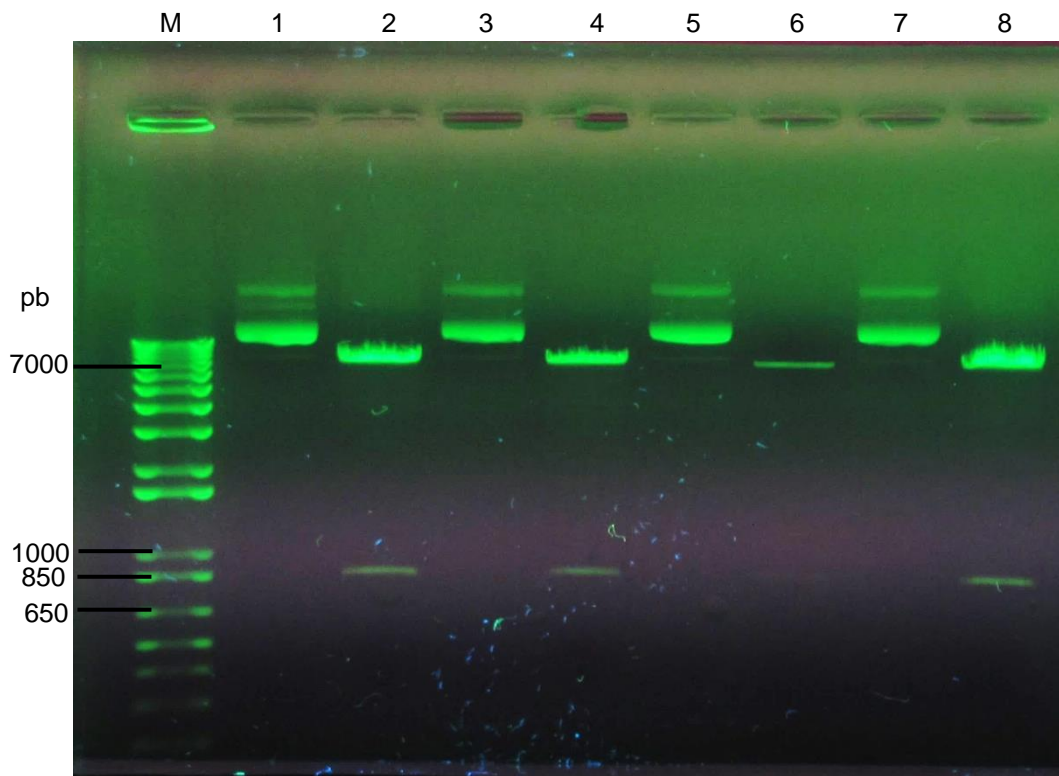
Se procedió a subclonar el inserto de Maf1 en el vector PTP. Para ello, el vector pGE-LmMaf1 fue digerido con las enzimas *XbaI* y *XmaI* y el inserto fue purificado a partir de un gel de agarosa. Por otro lado, el vector pB6-PTP (Moreno-Campos *et al.*, 2016) fue digerido con las enzimas *XbaI* y *XmaI* (Figura 27A) y el fragmento de 6.7 kb fue purificado a partir de un gel de agarosa (Figura 27B).



**Fig. 27. A** Electroforesis de DNA de plásmido pB6-PTP digerido con enzimas *Xba*I y *Xma*I. M: Marcador 1Kb Plus (Invitrogen); 1: DNA digerido. Se observa el vector PTP de un tamaño de 6.7 Kb. Gel de agarosa al 0.8% teñido con bromuro de etidio. **B** Electroforesis de vector PTP purificado. M: Marcador 1Kb Plus (Invitrogen). 1: Vector PTP. Gel de agarosa al 1% teñido con midory green.

Se realizaron dos ligaciones con distinta cantidad de DNA purificado del gen de Maf1 (84 y 170 ng) y de vector (100 y 200 ng, respectivamente). Posteriormente, se realizaron transformaciones de células electrocompetentes ElectroMax DH5 $\alpha$ E de *E. coli*. Se obtuvieron 3 colonias con la ligación de 100 ng de vector y 20 colonias de la ligación con 200 ng.

Se hicieron minipreps de las colonias 1, 2, 4 y 5 y se realizaron digestiones con las enzimas de restricción *Xba*I y *Xma*I, obteniendo fragmentos de los tamaños esperados de 6.7 Kb (vector PTP) y 831 pb (LmMaf1) (Figura 28).



**Fig. 28.** Análisis de restricción con *Xba*I y *Xma*I de cuatro clonas obtenidas de la ligación de Maf1 al vector PTP. Se analizó la colonia 1 (carriles 1 y 2), la colonia 2 (carriles 3 y 4), la colonia 4 (carriles 5 y 6), y colonia 5 (carriles 7 y 8). Plásmido sin digerir se muestra en los carriles 1, 3, 5 y 7. M: Marcador 1 Kb Plus (Invitrogen). Gel de agarosa al 0.8%.

Se seleccionaron las colonas 1 y 2 para enviar a secuenciar. El análisis de las secuencias mostró que no hubo ningún cambio o mutación, y que el gen de LmMaf1 está en marco con la bandera PTP (Figura 29). De esta forma se obtuvo el vector pLmMaf1-PTP (Figura 30)

```

1      GAGAGTCCCACGTATGCCAGCACCCCGACCTAGGCGAGGAAGGTGAGGCATACGATGGT
1      E S P T Y A S T P D L G E E G E A Y D G

61     GGCAAGAACAGACAGTTCTACGGATACTACTCTAGAGGTCCGACGGCGAAGATCAGGTG
21     G K N R Q F Y G Y Y S R G S D G E D Q V

121    GATCCTCGTCTTATTGATGGGAAATATGATATTCCAACACTGCTAGCGAGAATTGTAT
41     D P R L I D G K Y D I P T T A S E N L Y

181    TTTCAGGGTGAGCTCAAACCGGGCTCTTGCGCAACACGATGAAGCCGTGGACAACAAA
61     F Q G E L K T A A L A Q H D E A V D N K

241    TTCAACAAAGAACAACAAAACGCGTTCTATGAGATCTTACATTTACCTAACTTAAACGAA
81     F N K E Q Q N A F Y E I L H L P N L N E

301    GAACAACGAAACGCCTTCATCCAAAGTTTAAAAGATGACCCAAGCCAAAGCGCTAACCTT
101    E Q R N A F I Q S L K D D P S Q S A N L

361    TTAGCAGAAGCTAAAAAGCTAAATGATGCTCAGGCGCCGAAAGTAGACAACAAATTCAAC
121    L A E A K K L N D A Q A P K V D N K F N

421    AAAGAACAACAAAACGCGTTCTATGAGATCTTACATTTACCTAACTTAAACGAAGAACAA
141    K E Q Q N A F Y E I L H L P N L N E E Q

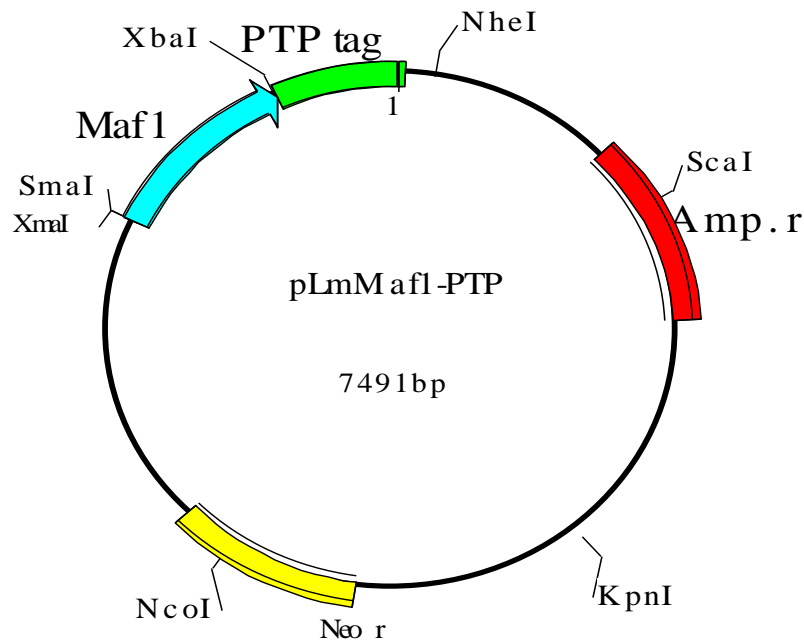
481    CGAAACGCCTTCATCCAAAGTTTAAAAGATGACCCAAGCCAAAGCGCTAACCTTTTAGCA
161    R N A F I Q S L K D D P S Q S A N L L A

541    GAAGCTAAAAAGCTAAATGGTGCTCAGGCGCCGAAAGTAGACGGAATCCGCGGGGAAG
181    E A K K L N G A Q A P K V D A N S A G K

601    TCAACCAATTGGATTATAAAGATGATGATGATAAATAA
201    S T Q L D Y K D D D D K *

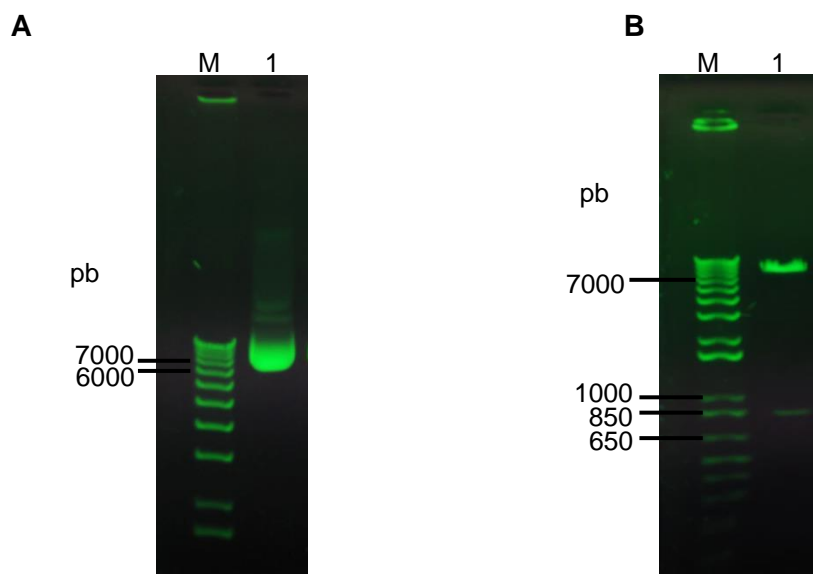
```

**Fig. 29.** Secuencia génica y de aminoácidos del gen LmMaf1 unido a la bandera PTP. En color verde se representa el extremo C-terminal de LmMaf1, en amarillo el epítipo de Prot C, en morado el sitio de corte de la proteasa TEV y en azul los dos epítipes de Prot A. Se observa que la secuencia está en marco.



**Fig. 30.** Mapa del vector pLmMaf1-PTP. Se indica la posición del gen de Maf1 de *L. major* fusionado a la bandera PTP, así como la secuencia de resistencia a G418 (*Neor*) y los sitios de corte de enzimas de restricción.

El vector pLmMaf1-PTP se preparó a gran escala por maxiprep (Figura 31A). Se hicieron pruebas de restricción con las enzimas *XbaI* y *XmaI* para verificar el correcto tamaño de vector e inserto, obteniéndose los fragmentos esperados de 6.7 Kb y 831 pb respectivamente (Figura 31B).



**Fig. 31.** **A** DNA de plásmido pLmMaf1-PTP sin digerir. **B** Digestión con *XbaI*-*XmaI* del plásmido pLmMaf1-PTP. M: Marcador 1 Kb Plus (Invitrogen). Gel de agarosa al 1% teñido con midory green

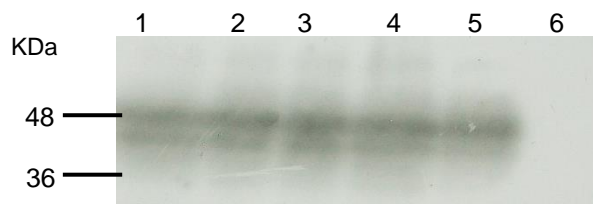


Posteriormente se realizaron las transfecciones de promastigotes de *L. major*, usando 25 µg del plásmido pLmMaf1PTP. Las células fueron seleccionadas con el fármaco G418, monitoreándolas hasta la aparición de células en división, aproximadamente una semana posterior a la electroporación. Las poblaciones se resembraron una vez que alcanzaron la fase media de crecimiento logarítmico. Después de la tercera resiembra se prosiguió a la obtención de clonas celulares mediante la técnica de plaqueo en caja petri. Las cajas se mantuvieron en un ambiente de CO<sub>2</sub> durante un periodo aproximado de 12 días. Una vez que aparecieron las primeras colonias (clonas), se llevó a cabo la selección aleatoria de 4 de ellas. Las clonas se resembraron en medio B/M líquido con G418 hasta alcanzar un crecimiento constante, posteriormente se pasaron a cajas de 25 cm<sup>2</sup> donde se mantuvieron como *stock*.

#### 5.4 Análisis de la expresión de proteínas recombinantes

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

El análisis se efectuó con la población y las 4 clonas celulares. La proteína quimérica LmMaf1-PTP tiene un peso esperado de 48 kDa. Una banda del tamaño esperado se observó en la población y las 4 clonas, indicando que éstas expresan de forma correcta la proteína recombinante LmMaf1-PTP (carriles 1-5, Figura 32). Como se anticipaba, no se observó ninguna señal con células silvestres (carril 6, Figura 32)

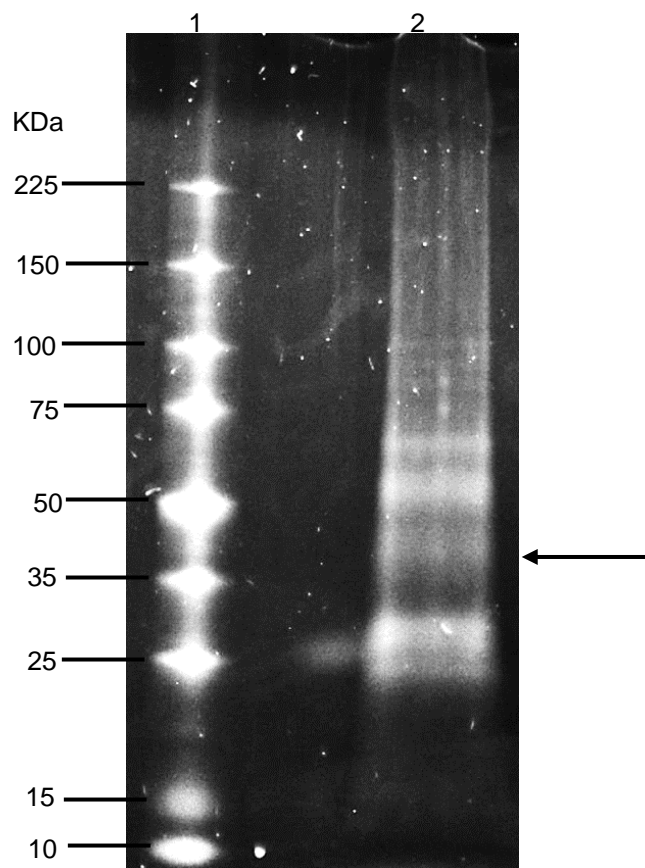


**Fig. 32.** Análisis de *Western blot* de las clonas celulares transfectantes de *L. major* con Maf1-PTP. 1) Población; 2-5) Clonas celulares; 6) Control de células silvestres. Se utilizó el anticuerpo anti Prot C a una dilución 1:3000.

## 5.5 Purificaciones por afinidad en tándem

Para aislar complejos proteicos de LmMaf1, se llevaron a cabo experimentos de purificación por afinidad en tándem con células de *L. major* transfectadas con el vector LmMaf1-PTP. Para ello se crecieron 3 litros de cultivo de células transfectantes en fase media logarítmica ( $20\text{-}25 \times 10^6$  células/ml). A continuación el extracto proteico crudo obtenido de los cultivos lisados con Tritón X-100 se transfirió a una columna cromatográfica que contenía una matriz de Sefarosa-IgG y se incubaron por un periodo de 3 hrs a 4°C. Posteriormente, se liberaron de la matriz mediante la incubación con la proteasa TEV durante toda la noche a 4°C. El eluido obtenido se transfirió a una nueva columna cromatográfica con una matriz de afinidad de Prot C. Finalmente, los complejos proteicos se liberaron de las columnas mediante el uso de agentes quelantes. Los eluidos finales de la purificación fueron concentrados, y una fracción (~1/4 parte del total) fue analizada en un gel de poliacrilamida (Figura 33).

Se obtuvieron ~13 bandas con pesos moleculares que varían de ~15 a 150 kDa (Figura 33). Se puede observar una banda de ~34 kDa que parece corresponder a LmMaf1-PTP, considerando que LmMaf1 tiene un tamaño predicho de 30 kDa, más 3.56 kDa adicionales otorgados por el dominio de la proteína C del epítipo de extracción.



**Fig. 33.** Eluido final de la purificación por afinidad en tándem de LmMaf1-PTP (carril 2). La muestra corresponde a una alícuota del material final concentrado. Gel de gradiente (4-15%) de poliacrilamida (Mini-PROTEAN® TGX™ Precast Gel) teñido con SYPRO Ruby. La flecha indica a la proteína blanco probable, Maf1-PTP. Marcador Broad Range Protein Molecular Weight Markers PROMEGA.

## 5.6 Análisis por espectrometría de masas

Con el objeto de identificar las proteínas purificadas en los experimentos de afinidad en tándem, el eluido final concentrado fue analizado por espectrometría de masas. Para ello, se procedió a introducir la muestra en un gel de poliacrilamida de manera que sólo entraran las proteínas en el gel aproximadamente 1 cm, y se tiñó con GelCode Blue Stain Reagent. De la banda observada se cortaron dos fragmentos de poliacrilamida que contenían todas las proteínas de la muestra, la cual fue enviada a analizar a la Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigación y a la Industria (USAII), de la UNAM. Los péptidos obtenidos se identificaron comparando su secuencia con la base de datos del genoma de *L. major*.

El análisis de la muestra confirmó la presencia de la proteína blanco LmMaf1 además de otras 17 proteínas que pudieran tener interacción con LmMaf1 (Tabla 3). Algunas de ellas, no obstante, podrían corresponder a proteínas contaminantes. Será necesario repetir este experimento para confirmar los resultados.

Las proteínas obtenidas de este estudio se pueden dividir por su función biológica en las siguientes categorías:

- Relacionadas al proteosoma: Subunidad reguladora RPT5 (ATPasa) del proteosoma, subunidad reguladora RPN8 (no ATPasa) del proteosoma, subunidad reguladora RPN12 (no ATPasa) del proteosoma, ubiquitina hidrolasa carboxylo-terminal y proteína de fusión ubiquitina/proteína ribosomal L40.
- Biogénesis ribosomal y traducción: Proteína de fusión ubiquitina/proteína ribosomal L40, proteína 40S ribosomal S2, proteína 40S ribosomal S14, proteína 60S ribosomal L9, proteína 60S ribosomal L23 y factor de elongación 1- $\alpha$ .
- Plegamiento de proteínas: Proteína heat shock DNAJ.
- Vía de MAPK, regulación de genes: Proteína triple cínasa activada por mitógeno (MAPKKK).
- Proteínas flagelares: Proteína 16 del axonema flagelar, cadena ligera de dineína axonémica,  $\alpha$ -tubulina y  $\beta$ -tubulina.

ID	Proteína	mW (KDa)	Péptidos	% Cobertura
LmjF.31.2820	Maf1	30.196	28	55.1852
LmjF.22.0620	Subunidad reguladora RPT5 (ATPasa) del proteosoma	49.502	6	16.4414
LmjF.32.0390	Subunidad reguladora RPN8 (no ATPasa) del proteosoma	40.071	5	20.0557
LmjF.32.1200	Subunidad reguladora RPN12 (no ATPasa) del proteosoma	31.138	5	21.5328
LmjF.31.0140	Ubiquitina hidrolasa carboxylo-terminal	50.626	4	16.4114
LmjF.31.1900	Proteína de fusión ubiquitina/proteína ribosomal L40	14.672	1	12.5
LmjF.19.0060	Proteína 40S ribosomal S2	28.728	7	21.8868
LmjF.28.0960	Proteína 40S ribosomal S14	15.583	3	29.1667
LmjF.30.3340	Proteína 60S ribosomal L9	21.512	4	28.9474
LmjF.35.3790	Proteína 60S ribosomal L23	14.947	4	25.8993
LmjF.17.0080	Factor de elongación 1- $\alpha$	49.085	18	51.6704
LmjF.27.2400	Proteína heat shock DNAJ	43.573	12	38.1313
LmjF.19.0150	Proteína triple cínasa activada por mitógeno (MAPKKK)	30.864	9	52.1429
LmjF.20.1400	Proteína 16 del axonema flagelar	55.154	5	28.8235
LmjF.26.1120	Cadena ligera de dineína axonémica, putativa	49.991	7	26.824
LmjF.33.0819	$\beta$ -tubulin	49.707	9	25.0564
LmjF.13.0280	$\alpha$ -tubulina	49.727	12	33.2594
LmjF.31.2790	Factor de ribosilación de ADP, putativo	20.176	4	32.0225

**Tabla 3.** Proteínas identificadas en la espectrometría de masas.

## 6. Discusión

Los parásitos tripanosomátidos generan enfermedades mortales como leishmaniasis y tripanosomiasis que tienen un gran impacto en la salud y economía en zonas tropicales y subtropicales de todo el mundo. A pesar de eso, hay pocas iniciativas farmacéuticas interesadas en desarrollar un tratamiento efectivo contra ellas. Se espera que los estudios enfocados a conocer aspectos básicos de la biología molecular de este grupo de organismos aporten información importante que a mediano plazo ayude al control de las enfermedades que producen.

Por otra parte, el estudio molecular de estos organismos puede darnos una idea de la conservación evolutiva que ha habido en las proteínas y en los distintos complejos proteicos que podrían formar. Uno de los complejos importantes de estudiar son las RNA Polimerasas, así como otras proteínas que se asocian al proceso de transcripción y regulación de la expresión genética.

La RNA Polimerasa III tiene un papel fundamental en la transcripción de los RNAs más abundantes de los organismos eucariotas, los tRNAs. Éstos son esenciales para la síntesis de proteínas, al acarrear a los aminoácidos al ribosoma durante la traducción. Otra molécula que sintetiza la RNA Pol III que es necesaria para la traducción es el rRNA 5S, constituyente estructural y funcional de la subunidad mayor de los ribosomas. Además, sintetiza el snRNA U6 que es parte esencial en el proceso de *splicing* y el RNA 7SK que participa en la regulación de la transcripción.

El gran costo de energía que conlleva la síntesis de estos RNAs genera que la regulación de la acción de la RNA Polimerasa III esté estrechamente relacionada con el crecimiento celular, regulado por la disponibilidad de nutrientes y las condiciones de diversos tipos de estrés (Willis y Moir, 2018).

Una molécula recientemente identificada es Maf1, la cual actúa en la regulación de la transcripción bajo condiciones desfavorables de nutrimentos, crecimiento celular y condiciones de estrés. Si bien no es esencial para la viabilidad, las células de levadura que carecen de Maf1 están impedidas en gran medida en su capacidad de reprimir la transcripción de la RNA Pol III, lo

cual conduce a serios desequilibrios en el crecimiento celular (Willis y Moir, 2018). Esta propiedad parece estar conservada en células de eucariotas más evolucionados.

En este trabajo se inició la caracterización del ortólogo de Maf1 en *L. major*, un eucariote que divergió tempranamente del linaje principal de los eucariotes. La presencia de Maf1 en este organismo ancestral sugiere que esta proteína estuvo presente en el antecesor común de todos los organismos eucariotes, lo que sugeriría que los mecanismos de represión de la transcripción en los que participa son evolutivamente muy antiguos.

En las células que no se están dividiendo, las señales positivas para el crecimiento y proliferación celular se oponen por la acción de numerosas proteínas supresoras tumorales que reprimen la transcripción por RNA Pol I y III (por ejemplo Rb, p53, ARF, PTEN) y regulan diferentes subconjuntos de genes codificadores de proteínas. Estos reguladores negativos de la RNA Pol III han sido ampliamente estudiados en eucariotes superiores. Resulta interesante el hecho de que ninguno de estos reguladores parece estar presente en los tripanosomátidos o en algún otro grupo de parásitos (Fernandes, 2008). Esto sugiere que Maf1 es el único regulador negativo de la transcripción en parásitos. De aquí la importancia de su estudio en *L. major* y otros organismos tempranamente divergentes.

Como ocurre en la mayoría de los organismos, *L. major* posee un gen único de Maf1. Nuestros datos demuestran que si bien la secuencia de LmMaf1 se parece poco a la de sus ortólogos en levaduras y vertebrados, sí posee las tres secuencias características de Maf1: los dominios A, B y C (Figura 20). La función de estos dominios no ha sido totalmente establecida, pero se sabe que el dominio A participa en las interacciones con la subunidad mayor de la RNA Pol III, mientras que el dominio B interactúa con la subunidad Brf1 de TFIIIB (Reina *et al.*, 2006). Por otro lado, el dominio C lleva a cabo un papel crítico en la regulación de la actividad y la estabilidad de Maf1 (Pradhan *et al.*, 2017). Además, dentro de los dominios B y C se presentan tres secuencias consenso que están parcialmente conservadas en LmMaf1 (Figura 20). No se sabe la función de las secuencias consenso del dominio B, pero en la secuencia WSxxYFxxYNKRxxK que se encuentra en el dominio C está la probable señal de localización nuclear (Romero-Meza *et al.*, 2017).

La estructura secundaria de los dominios A, B y C de LmMaf1 resultó muy similar a la reportada para Maf1 de humano (HsMaf1) (Vannini, 2010) (Figura 20). Asimismo, la estructura terciaria predicha también es muy parecida a la reportada para HsMaf1, presentando una estructura globular en la que las hojas beta centrales están rodeadas por las  $\alpha$ -hélices (Figura 21). Al haberse realizado la cristalografía de HsMaf1 sin las regiones *linker* y carboxilo-terminal, no fue posible determinar qué estructura podrían tener estas regiones en *L. major*. A la fecha no hay evidencia experimental de si estas regiones son relevantes para la función de Maf1, aunque su baja homología entre especies sugiere que no son importantes (Pluta, 2001).

El análisis tipo BLAST en los genomas de otros tripanosomátidos con la secuencia de LmMaf1 reveló la presencia de ortólogos putativos en *L. braziliensis*, *L. guyanensis*, *L. panamensis*, *L. mexicana*, *L. infantum*, *L. donovani*. La comparación de estas secuencias, junto con Maf1 de *T. cruzi* y los dos genes ya caracterizados de Maf1 en *T. brucei*, indicó que hay un alto grado de conservación de los dominios de Maf1 así como una variación en la secuencia de aminoácidos de la región *linker* y C-terminal entre estas especies de tripanosomátidos (Figura 22). Por otra parte, como se anticipaba, LmMaf1 presentó una mayor homología con sus ortólogos de especies del género *Leishmania* que con los del género *Trypanosoma*.

Además de su participación en la regulación de la transcripción de la RNA Pol III, se ha reportado que Maf1 regula la expresión de algunos genes transcritos por Pol II y por Pol I (Romero-Meza *et al.*, 2017). Asimismo, Maf1 realiza otras funciones celulares, incluyendo su participación en vías de señalización que regulan el ciclo circadiano, la regulación de cáncer y proliferación celular y participación secundaria en vías que alteran el ciclo celular como la vía de TORC, además de tener implicaciones en el metabolismo de ácidos grasos (Willis y Moir, 2018). La participación de Maf1 en diversas funciones celulares sugiere que tiene interacciones directas o indirectas con muy diversas proteínas. Las proteínas reportadas en este estudio que pudieran tener una posible interacción con LmMaf1 son en su mayoría proteínas asociadas a la proteólisis dependiente de ubiquitina y a la función del ribosoma (Tabla 3) las cuales pueden repercutir directa o



indirectamente en la señalización de los procesos celulares antes mencionados.

Los blancos principales de Maf1 para la represión de la transcripción de la RNA Pol III son la subunidad Brf1 de TFIIIB y la propia RNA Polimerasa II. Sin embargo, diversas fuentes sugieren que la mayor parte de la proteína Maf1 en levadura no está asociada de manera estable con otras proteínas en condiciones normales o de represión. Experimentos de co-inmunoprecipitación demostraron que sólo el 10-20% de Maf1 se asocia con la RNA Pol III, y que sólo >1% se une a Brf1 (Desai *et al.*, 2005; Oficjalska-Pham *et al.*, 2006). Por lo tanto, no es sorprendente que en el experimento de purificación por afinidad en tándem no hayamos identificado ninguna subunidad de la RNA Pol III ni a Brf1 (Tabla 3). Futuros experimentos con células creciendo en condiciones de estrés quizás nos permitan determinar la unión de Maf1 con la RNA Pol III y Brf1, pues es en dichas condiciones que se favorece la asociación de Maf1 a estas proteínas para inhibir la transcripción.

Se ha reportado en humano y en *C. elegans* que los niveles de Maf1 en el núcleo son regulados por el sistema ubiquitina proteosoma (UPS, por sus siglas en inglés), quien realiza la mayor parte de la degradación regulada de proteínas en eucariontes (Pradhan *et al.*, 2017). En el UPS, la unión de ubiquitina a una proteína la marca como sustrato del proteosoma, complejo multimérico de proteasas que se une, desubiquitina y desdobla sus sustratos antes de completar su degradación (Wang y Maldonado, 2006). Nuestros resultados indican la posible interacción de LmMaf1 con 5 proteínas del UPS, las cuales son: Subunidad reguladora RPT5 (ATPasa) del proteosoma, subunidad reguladora RPN8 (no ATPasa) del proteosoma, subunidad reguladora RPN12 (no ATPasa) del proteosoma, ubiquitina hidrolasa carboxilo-terminal y proteína de fusión ubiquitina/proteína ribosomal L40.

La relación entre Maf1 y el UPS también se hizo evidente en un trabajo publicado por Willis *et al.*, 2008, donde se empleó la técnica de análisis de “arreglo genético sintético” (SGA, por sus siglas en inglés) para identificar las interacciones genéticas de Maf1 en levadura. Esta técnica permite identificar genes cuyos productos están relacionados funcionalmente y que podrían participar en un mismo proceso celular esencial. Los 64 genes que exhibieron interacciones genéticas con Maf1 están involucrados en unas cuantas

funciones biológicas, entre las que se encontró la proteólisis mediada por ubiquitina. Esto sugiere fuertemente la participación de Maf1 en la regulación de la degradación de proteínas.

Notablemente, el 40% de los genes reportados por Willis *et al.* en el 2008) participa en biogénesis del ribosoma o en la traducción. De manera interesante, nosotros identificamos 5 proteínas ribosomales y un factor de elongación de la traducción como candidatos a interactuar con LmMaf1. Considerando que se ha reportado que Maf1 regula la transcripción global y la proliferación celular, es de esperarse la participación, directa o indirecta, de Maf1 en la regulación de la síntesis de ribosomas y en la traducción.

El ensayo de purificación por afinidad en tándem también reveló la posible interacción entre LmMaf1 y una proteína MAP triple cinasa (MAPKKK). Dicha interacción es plausible tomando en cuenta que las proteínas MAP cinasas son componentes claves en vías de transducción de señales que regulan procesos como proliferación celular, diferenciación y muerte celular (Seger y Krebs, 1995). Algunas MAP cinasas regulan la actividad de factores de transcripción para modular la expresión de ciertos genes (Robinson y Cobb, 1997). Así, la función de LmMaf1 podría ser controlada por MAP cinasas.

Trabajos futuros con células creciendo en condiciones normales y bajo diferentes tipos de estrés permitirán determinar las funciones que realiza Maf1 en *L. major* y otros tripanosomátidos. Se espera que la línea celular de LmMaf1-PTP obtenida en este trabajo contribuya a entender los mecanismos por los que LmMaf1 regula la transcripción y otros procesos biológicos en *L. major*.

## 7. Principales logros y conclusiones

- LmMaf1 posee las tres secuencias características de ortólogos de Maf1: los dominios A, B y C.
- LmMaf1 tiene una estructura globular conservada en eucariontes.
- Hay un alto grado de conservación de Maf1 entre tripanosomátidos.
- Se obtuvieron clonas celulares de *L. major* que expresan la proteína recombinante LmMaf1 ligada a la etiqueta PTP.
- LmMaf1 podría interactuar con proteínas del sistema ubiquitina proteosoma y con proteínas que participan en la biogénesis del ribosoma o en la traducción.
- LmMaf1 podría asociarse con una proteína MAP triple cinasa.

## 8. Literatura citada

- Alexander, J., Satoskar, A. R., y Russell, D. G. (1999). *Leishmania* species: models of intracellular parasitism. *Journal of Cell Science*, 112(18), 2993-3002.
- Alvar, J., Velez, I. D., Bern, C., Herrero, M., Desjeux, P., Cano, J., Jannin, J., den Boer, M., y WHO Leishmaniasis Control Team. (2012). Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. *PLOS ONE*, 7(5), e35671.
- Arimbasseri, A. G., y Maraia, R. J. (2013). Distinguishing core and holoenzyme mechanisms of transcription termination by RNA polymerase III. *Molecular and Cellular Biology*, 33 (8) 1571-1581.
- Arimbasseri, A. G., y Maraia, R. J. (2015). Mechanism of transcription termination by RNA polymerase III utilizes a non-template strand sequence-specific signal element. *Molecular Cell*, 58(6), 1124-1132.
- Bates, P. A. (2007). Transmission of *Leishmania* metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies. *International Journal for Parasitology*, 37(10), 1097-1106.
- Bates, P. A., y Rogers, M. E. (2004). New insights into the developmental biology and transmission mechanisms of *Leishmania*. *Current Molecular Medicine*, 4(6), 601-609.
- Ben-Shlomo, H., Levitan, A., Bèjà, O., y Michaeli, S. (1997). The trypanosomatid *Leptomonas collosoma* 7SL RNA gene. Analysis of elements controlling its expression. *Nucleic Acids Research*, 25(24), 4977-4984.
- Benne, R., Van Den Burg, J., Brakenhoff, J. P., Sloof, P., Van Boom, J. H., y Tromp, M. C. (1986). Major transcript of the frameshifted coxII gene from trypanosome mitochondria contains four nucleotides that are not encoded in the DNA. *Cell*, 46(6), 819-826.
- Betz, C., y Hall, M. N. (2013). Where is mTOR and what is it doing there? *Journal of Cell Biology*, 203(4), 563-574.
- Boguta, M. (2013). Maf1, a general negative regulator of RNA polymerase III in yeast. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Regulatory Mechanisms*, 1829(3), 376-384.

- Boguta, M., Czerska, K., y Żołądek, T. (1997). Mutation in a new gene MAF1 affects tRNA suppressor efficiency in *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene*, 185(2), 291-296.
- Boguta, M., y Graczyk, D. (2011). RNA polymerase III under control: repression and de-repression. *Trends in Biochemical Sciences*, 36(9), 451-456.
- Boothroyd, J. C., y Cross, G. A. M. (1982). Transcripts coding for variant surface glycoproteins of *Trypanosoma brucei* have a short, identical exon at their 5' end. *Gene*, 20(2), 281-289.
- Brown, A. P., Affleck, V., Fawcett, T., y Slabas, A. R. (2006). Tandem affinity purification tagging of fatty acid biosynthetic enzymes in *Synechocystis* sp. PCC6803 and *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Experimental Botany*, 57(7), 1563-1571.
- Bushnell, D. A., y Kornberg, R. D. (2003). Complete, 12-subunit RNA polymerase II at 4.1-Å resolution: implications for the initiation of transcription. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(12), 6969-6973.
- Čabart, P., Lee, J., y Willis, I. M. (2008). Facilitated recycling protects human RNA polymerase III from repression by Maf1 in vitro. *Journal of Biological Chemistry*, 283(52), 36108-36117.
- Campbell, D. A., Thomas, S., y Sturm, N. R. (2003). Transcription in kinetoplastid protozoa: why be normal? *Microbes and Infection*, 5(13), 1231-1240.
- Chaveroux, C., Eichner, L. J., Dufour, C. R., Shatnawi, A., Khoutorsky, A., Bourque, G., Sonenberg, N., y Giguère, V. (2013). Molecular and genetic crosstalks between mTOR and ERR $\alpha$  are key determinants of rapamycin-induced nonalcoholic fatty liver. *Cell Metabolism*, 17(4), 586-598.
- Chong, Y. T., Koh, J. L., Friesen, H., Duffy, S. K., Cox, M. J., Moses, A., Moffat, J., Boone, C., y Andrews, B. J. (2015). Yeast proteome dynamics from single cell imaging and automated analysis. *Cell*, 161(6), 1413-1424.
- Chymkowitch, P., Aanes, H., Koehler, C., Thiede, B., Lorenz, S., Meza-Zepeda, L., Klungland, A., y Enserink, J. M. (2015). Sumoylation of Rap1

- mediates the recruitment of TFIID to promote transcription of ribosomal protein genes. *Genome Research*, gr-185793.
- Chymkowitch, P., Aanes, H., Robertson, J., Klungland, A., y Enserink, J. M. (2017). TORC1-dependent sumoylation of Rpc82 promotes RNA polymerase III assembly and activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 114(5), 1039-1044.
  - Chymkowitch, P., y Enserink, J. M. (2018). Regulation of tRNA synthesis by posttranslational modifications of RNA polymerase III subunits. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Regulatory Mechanisms*, 1861(4), 310-319.
  - Cohen-Freue, G., Holzer, T. R., Forney, J. D., y McMaster, W. R. (2007). Global gene expression in *Leishmania*. *International Journal for Parasitology*, 37(10), 1077-1086.
  - Collins, M. O., y Choudhary, J. S. (2008). Mapping multiprotein complexes by affinity purification and mass spectrometry. *Current Opinion in Biotechnology*, 19(4), 324-330.
  - Cornu, M., Albert, V., y Hall, M. N. (2013). mTOR in aging, metabolism, and cancer. *Current Opinion in Genetics & Development*, 23(1), 53-62.
  - Cramer, P., Bushnell, D. A., Fu, J., Gnatt, A. L., Maier-Davis, B., Thompson, N. E., Richard R. B., Aled M. E., Peter R. D., y Kornberg, R. D. (2000). Architecture of RNA polymerase II and implications for the transcription mechanism. *Science*, 288(5466), 640-649.
  - Cramer, P., Bushnell, D. A., y Kornberg, R. D. (2001). Structural basis of transcription: RNA polymerase II at 2.8 Ångstrom resolution. *Science*, 292(5523), 1863-1876.
  - Crighton, D., Woiwode, A., Zhang, C., Mandavia, N., Morton, J. P., Warnock, L. J., Milner, J., White, J. R., y Johnson, D. L. (2003). p53 represses RNA polymerase III transcription by targeting TBP and inhibiting promoter occupancy by TFIIIB. *The EMBO Journal*, 22(11), 2810-2820.
  - Das, A., Banday, M. y Bellofatto, V. (2008). RNA polymerase transcription in Trypanosomes. *Eukaryotic Cell*. 7 (3): 429-434.

- Das, G., Henning, D., Wright, D., y Reddy, R. (1988). Upstream regulatory elements are necessary and sufficient for transcription of a U6 RNA gene by RNA polymerase III. *The EMBO Journal*, 7(2), 503-512.
- Denninger, V., y Rudenko, G. (2014). FACT plays a major role in histone dynamics affecting VSG expression site control in *Trypanosoma brucei*. *Molecular microbiology*, 94(4), 945-962.
- Desai, N., Lee, J., Upadhyaya, R., Chu, Y., Moir, R. D., y Willis, I. M. (2005). Two steps in Maf1-dependent repression of transcription by RNA polymerase III. *Journal of Biological Chemistry*, 280(8), 6455-6462.
- Docampo, R., de Souza, W., Miranda, K., Rohloff, P., y Moreno, S. N. (2005). Acidocalcisomes? Conserved from bacteria to man. *Nature Reviews Microbiology*, 3(3), 251-261.
- Dragon, F., Gallagher, J. E., Compagnone-Post, P. A., Mitchell, B. M., Porwancher, K. A., Wehner, K. A., Wormsley, S., Settlege, R. E., Shabanowitz, J., Osheim, Y., Beyer, A. L., Hunt, D. F., y Baserga, S. J. (2002). A large nucleolar U3 ribonucleoprotein required for 18S ribosomal RNA biogenesis. *Nature*, 417(6892), 967-970.
- Fernandes, A. D., y Atchley, W. R. (2008). Biochemical and functional evidence of p53 homology is inconsistent with molecular phylogenetics for distant sequences. *Journal of Molecular Evolution*, 67(1), 51-67.
- Fernández-Tornero, C., Moreno-Morcillo, M., Rashid, U. J., Taylor, N. M., Ruiz, F. M., Gruene, T., Legrand, P., Steuerwald, U., y Müller, C. W. (2013). Crystal structure of the 14-subunit RNA polymerase I. *Nature*, 502(7473), 644-649.
- Flores, P. C. 2011. Identificación de los componentes proteicos del complejo transcripcional de la RNA polimerasa III en *Leishmania major*. Tesis de licenciatura. Director: Dr. Santiago Martínez Calvillo. Facultad de Estudios Superiores Iztacala, UNAM, México DF. Universidad Nacional Autónoma de México, México.
- Geiduschek, E. P., y Kassavetis, G. A. (2001). The RNA polymerase III transcription apparatus. *Journal of Molecular Biology*, 310(1), 1-26.
- Gilinger, G., y Bellofatto, V. (2001). *Trypanosome* spliced leader RNA genes contain the first identified RNA polymerase II gene promoter in these organisms. *Nucleic acids research*, 29(7), 1556-1564.

- Günzl, A., y Schimanski, B. (2009). Tandem affinity purification of proteins. *Current Protocols in Protein Science*, 55(1), 19-35.
- Guerin P. J., Olliaro P., Sundar S., Boelaert M., Croft S. L., Desjeux P., Wasunna M. K. y Bryceson A. D. (2002). Visceral leishmaniasis: current status of control, diagnosis, and treatment, and a proposed research and development agenda. *The Lancet Infectious Diseases*, 2 (8), 494-501.
- Guex, N., y Peitsch, M. C. (1997). SWISS-MODEL and the Swiss-Pdb Viewer: an environment for comparative protein modeling. *Electrophoresis*, 18(15), 2714-2723.
- Graczyk, D., White, R. J., y Ryan, K. M. (2015). Involvement of RNA polymerase III in immune responses. *Molecular and Cellular Biology*, 35(10), 1848-1859.
- Griffiths, A. J. F., Miller, J. H., Suzuki, D. T., Lewontin, R. C., y Gelbart, W. M. (2000). Transcription: an overview of gene regulation in eukaryotes. *An Introduction to Genetic Analysis*, WH Freeman and Company, New York, 7th edition.
- Hailu, A., Dagne, D. A., y Boelaert, M. (2016). Leishmaniasis. In *Neglected Tropical Diseases-Sub-Saharan Africa*. Springer, Cham. 87-112
- Handman, E. (1999). Cell biology of *Leishmania*. In *Advances in parasitology*, Academic Press. 44, 1-39.
- Hanske, J., Sadian, Y., y Müller, C. W. (2018). The cryo-EM resolution revolution and transcription complexes. *Current Opinion in Structural Biology*, 52, 8-15.
- Hernandez, R., Martínez-Calvillo, S., Hernandez-Rivas, R., y Gomez, E. (1993). *Trypanosoma cruzi* ribosomal RNA genes: a review. *Biological Research*, 26(1-2), 109-114.
- Hietakangas, V., Anckar, J., Blomster, H. A., Fujimoto, M., Palvimo, J. J., Nakai, A., y Sistonen, L. (2006). PDSM, a motif for phosphorylation-dependent SUMO modification. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(1), 45-50.
- Hoffmann, N. A., Jakobi, A. J., Moreno-Morcillo, M., Glatt, S., Kosinski, J., Hagen, W. J., Sachse, C., y Müller, C. W. (2015). Molecular structures



- of unbound and transcribing RNA polymerase III. *Nature*, 528(7581), 231-236.
- Huang, Y., Intine, R. V., Mozlin, A., Hasson, S., y Maraia, R. J. (2005). Mutations in the RNA polymerase III subunit Rpc11p that decrease RNA 3' cleavage activity increase 3'-terminal oligo (U) length and La-dependent tRNA processing. *Molecular and Cellular Biology*, 25(2), 621-636.
  - 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., Bianchetti 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 (5733): 436-442.
  - Kantidakis, T., Ramsbottom, B. A., Birch, J. L., Dowding, S. N., y White, R. J. (2010). mTOR associates with TFIIC, is found at tRNA and 5S rRNA genes, and targets their repressor Maf1. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(26), 11823-11828.
  - Kassavetis, G. A. y Geiduschek, E. P. (2006). Transcription factor TFIIB and transcription by RNA polymerase III. *Biochemical Society Transactions*. 34 (6): 1082-1087.

- Khatter, H., Vorlaender, M. K., y Mueller, C. W. (2017). RNA polymerase I and III: similar yet unique. *Current opinion in Structural Biology*, 47, 88-94.
- Khoo, S. K., Wu, C. C., Lin, Y. C., Lee, J. C., y Chen, H. T. (2014). Mapping the protein interaction network for TFIIB-related factor Brf1 in the RNA polymerase III preinitiation complex. *Molecular and Cellular Biology*, 34(3), 551-559.
- Iben, J. R., Mazeika, J. K., Hasson, S., Rijal, K., Arimbasseri, A. G., Russo, A. N., y Maraia, R. J. (2011). Point mutations in the Rpb9-homologous domain of Rpc11 that impair transcription termination by RNA polymerase III. *Nucleic Acids Research*, 39(14), 6100-6113.
- Klingbeil, M. M., y Englund, P. T. (2004). Closing the gaps in kinetoplast DNA network replication. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(13), 4333-4334.
- Koch, H., Raabe, M., Urlaub, H., Bindereif, A., y Preußner, C. (2016). The polyadenylation complex of *Trypanosoma brucei*: characterization of the functional poly (A) polymerase. *RNA Biology*, 13(2), 221-231.
- Kuhn C. D., Geiger S. R., Baumli S., Gartmann M., Gerber J., Jennebach S., Mielke T., Tschochner H., Beckmann R. y Cramer P. (2007). Functional architecture of RNA polymerase I. *Cell*, 131(7), 1260-1272.
- Landeira, D., y Navarro, M. (2007). Nuclear repositioning of the VSG promoter during developmental silencing in *Trypanosoma brucei*. *The Journal of Cell Biology*, 176(2), 133-139.
- Landrieux, E., Alic, N., Ducrot, C., Acker, J., Riva, M., y Carles, C. (2006). A subcomplex of RNA polymerase III subunits involved in transcription termination and reinitiation. *The EMBO Journal*, 25(1), 118-128.
- Laskay, T., Van Zandbergen, G., y Solbach, W. (2003). Neutrophil granulocytes—Trojan horses for *Leishmania major* and other intracellular microbes? *Trends in Microbiology*, 11(5), 210-214.

- 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.
- Lewin, B. (2004). Genes IX. Upper Saddle River, New Jersey. Pearson Prentice Hall.
- Liang, X. H., Haritan, A., Uliel, S., y Michaeli, S. (2003). *trans* and *cis* splicing in trypanosomatids: Mechanism, factors, and regulation. *Eukaryotic Cell*, 2(5), 830-840.
- Liu, B., Liu, Y., Motyka, S. A., Agbo, E. E., y Englund, P. T. (2005). Fellowship of the rings: the replication of kinetoplast DNA. *Trends in Parasitology*, 21(8), 363-369.
- Male, G., Appen, von, A., Glatt, S., Taylor, N. M. I., Cristovao, M., Groetsch, H., *et al.* (2015). Architecture of TFIIIC and its role in RNA polymerase III pre-initiation complex assembly. *Nature Communications*, 6, 1–11.
- Martin, M. P., Gerlach, V. L., y Brow, D. A. (2001). A novel upstream RNA polymerase III promoter element becomes essential when the chromatin structure of the yeast U6 RNA gene is altered. *Molecular and Cellular Biology*, 21(19), 6429-6439.
- Martínez-Calvillo, S., Sunkin, S. M., Yan, S. F., Fox, M., Stuart, K., y Myler, P. J. (2001). Genomic organization and functional characterization of the *Leishmania major* Friedlin ribosomal RNA gene locus. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 116(2), 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(5), 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., 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., Florencio-Martínez, L. E., Rojas-Sánchez, S., Moreno-Campos, R., Vizuet-de-Rueda, J., Padilla-Mejía, N. E., 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*. En M. E. Alvarez-Sánchez, y E. Azuara, Genómica de parásitos, aspectos moleculares, genómicos, proteómicos y de virulencia (pp. 47 – 79). Editorial Académica Española
- Martínez-Calvillo, S., Romero-Meza, G., Vizuet-de-Rueda, J. C., Florencio-Martínez, L. E., Manning-Cela, R., y Nepomuceno-Mejía, T. (2018). Epigenetic Regulation of Transcription in Trypanosomatid Protozoa. *Current genomics*, 19(2), 140-149.
- Maslov, D. A., Podlipaev, S. A., y Lukes, J. (2001). Phylogeny of the *kinetoplastidae*: taxonomic problems and insights into the evolution of parasitism. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 96(3), 397-402.
- Michaeli, S. (2011). *Trans-splicing* in trypanosomes: machinery and its impact on the parasite transcriptome. *Future Microbiology*, 6(4), 459-474.
- Michels, A.A. (2011) MAF1: a new target of mTORC1. *Biochemical Society Transactions*, 39: 487–491.
- Moir, R. D., y Willis, I. M. (2013). Regulation of pol III transcription by nutrient and stress signaling pathways. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Regulatory Mechanisms*, 1829(3-4), 361-375.
- Monroy-Ostria, A., y Sanchez-Tejeda, G. (2002). Molecular probes and the polymerase chain reaction for detection and typing of *Leishmania* species in Mexico. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 96(Supplement 1), 101-104.
- Momen, H. (2003). Concepts of species in trypanosomatids. *Kinetoplastid Biology and Disease*, 2(1), 13.
- Moreno-Campos, R., Florencio-Martínez, L. E., Nepomuceno-Mejía, T., Rojas-Sánchez, S., Velez-Ramirez, D. E., Padilla-Mejía, N. E., Figueroa, A. E., Manning-Cela, R., y Martínez-Calvillo, S. (2016). Molecular characterization of 5S ribosomal RNA genes and transcripts in the protozoan parasite *Leishmania major*. *Parasitology*, 143(14), 1917-1929.
- Myler, P. J., Audleman, L., Hixson, G., Kiser, P., Lemley, C., Magness, C., Rickel, E., Sisk, E., Sunkin, S., Swartzell, S., Westlake, T., Bastien,

- P., Fu, G., Ivens, A., 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(6), 2902-2906.
- Nakaar, V., Dare, A. O., Hong, D., Ullu, E., y Tschudi, C. (1994). Upstream tRNA genes are essential for expression of small nuclear and cytoplasmic RNA genes in trypanosomes. *Molecular and Cellular Biology*, 14(10), 6736-6742.
  - Nakaar, V., Günzl, A., Ullu, E., y Tschudi, C. (1997). Structure of the *Trypanosoma brucei* U6 snRNA gene promoter. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 88(1-2), 13-23.
  - Nakaar, V., Tschudi, C., y Ullu, E. (1995). An unusual liaison: Small nuclear and cytoplasmic RNA genes team up with tRNA genes in trypanosomatid protozoa. *Parasitology Today*, 11(6), 225-228.
  - Nieves, E., y Rondon, M. (2007). Sobrevivencia del parásito *Leishmania* en el insecto vector: interacciones moleculares. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*, 27(2), 66-72.
  - Oficjalska-Pham, D., Harismendy, O., Smagowicz, W. J., de Peredo, A. G., Boguta, M., Sentenac, A., y Lefebvre, O. (2006). General repression of RNA polymerase III transcription is triggered by protein phosphatase type 2A-mediated dephosphorylation of Maf1. *Molecular Cell*, 22(5), 623-632.
  - Oler, A. J., Alla, R. K., Roberts, D. N., Wong, A., Hollenhorst, P. C., Chandler, K. J., P.A., Hagedorn, C. A., C. H. y Cairns, B. R. (2010). Human RNA polymerase III transcriptomes and relationships to Pol II promoter chromatin and enhancer-binding factors. *Nature Structural and Molecular Biology*, 17(5), 620-68.
  - Padilla-Mejía, N. E., Florencio-Martínez, L. E., Figueroa-Angulo, E. E., Manning-Cela, R. G., Hernández-Rivas, R., Myler, P. J., y Martínez-Calvillo, S. (2009). Gene organization and sequence analyses of transfer RNA genes in Trypanosomatid parasites. *BMC Genomics*, 10(1), 232-250.
  - Padilla-Mejía, N. E., Gómez-Hurtado, C. M., Sánchez-Santamaría, I. I., Florencio-Martínez, L. E., Manning-Cela, R. G. y Martínez-Calvillo, S. 2013. Comparative genomics of *Leishmania* parasites. En C. López-

- Camarillo y L. A. Marchat, Comparative genomics in neglected human parasites (pp. 59-80). *Nova Biomedical*.
- Pimenta, P. F. P., Modi, G. B., Pereira, S. T., Shahabuddin, M., y Sacks, D. L. (1997). A novel role for the peritrophic matrix in protecting *Leishmania* from the hydrolytic activities of the sand fly midgut. *Parasitology*, 115(4), 359-369.
  - Pluta, K., Lefebvre, O., Martin, N. C., Smagowicz, W. J., Stanford, D. R., Ellis, S. R., Hooper A. K., Sentenac, A., y Boguta, M. (2001). Maf1p, a Negative Effector of RNA Polymerase III in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Cellular Biology*, 21(15), 5031-5040.
  - Pradhan, A., Hammerquist, A. M., Khanna, A., y Curran, S. P. (2017). The C-Box region of MAF1 regulates transcriptional activity and protein stability. *Journal of Molecular Biology*, 429(2), 192-207.
  - Puig, O., Caspary, F., Rigaut, G., Rutz, B., Bouveret, E., Bragado-Nilsson, E., Wilm, M., y Séraphin, B. (2001). The tandem affinity purification (TAP) method: a general procedure of protein complex purification. *Methods*, 24(3), 218-229.
  - Reina, J. H., Azzouz, T. N., y Hernandez, N. (2006). Maf1, a new player in the regulation of human RNA polymerase III transcription. *PLOS ONE*, 1(1), e134.
  - Rijal, K., y Maraia, R. J. (2012). RNA polymerase III mutants in TFIIIF $\alpha$ -like C37 that cause terminator readthrough with no decrease in transcription output. *Nucleic Acids Research*, 41(1), 139-155.
  - Roberts, D. N., Stewart, A. J., Huff, J. T., y Cairns, B. R. (2003). The RNA polymerase III transcriptome revealed by genome-wide localization and activity–occupancy relationships. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(25), 14695-14700.
  - Robinson, M. J., y Cobb, M. H. (1997). Mitogen-activated protein kinase pathways. *Current Opinion in Cell Biology*, 9(2), 180-186.
  - Rohira, A. D., Chen, C. Y., Allen, J. R., y Johnson, D. L. (2013). Covalent small ubiquitin-like modifier (SUMO) modification of Maf1 protein controls RNA polymerase III-dependent transcription repression. *Journal of Biological Chemistry*, 288(26), 19288-19295.

- Rojas-Sánchez, S., Figueroa-Angulo, E., Moreno-Campos, R., Florencio-Martínez, L. E., Manning-Cela, R. G., y Martínez-Calvillo, S. (2016). Transcription of *Leishmania major* U2 small nuclear RNA gene is directed by extragenic sequences located within a tRNA-like and a tRNA-Ala gene. *Parasites & Vectors*, 9(1), 401.
- Romero-Meza, G., Vélez-Ramírez, D. E., Florencio-Martínez, L. E., Román-Carraro, F. C., Manning-Cela, R., Hernández-Rivas, R., y Martínez-Calvillo, S. (2017). Maf1 is a negative regulator of transcription in *Trypanosoma brucei*. *Molecular Microbiology*, 103(3), 452-468.
- Rosonina, E., Akhter, A., Dou, Y., Babu, J., y Sri Theivakadadcham, V. S. (2017). Regulation of transcription factors by sumoylation. *Transcription*, 8(4), 220-231.
- Rudenko, G., Blundell, P. A., Dirks-Mulder, A., Kieft, R., y Borst, P. (1995). A ribosomal DNA promoter replacing the promoter of a telomeric VSG gene expression site can be efficiently switched on and off in *T. brucei*. *Cell*, 83(4), 547-553.
- Rudra, D., Mallick, J., Zhao, Y., y Warner, J. R. (2007). Potential interface between ribosomal protein production and pre-rRNA processing. *Molecular and Cellular Biology*, 27(13), 4815-4824.
- 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.
- Schlein, Y., Jacobson, R. L., y Messer, G. (1992). *Leishmania* infections damage the feeding mechanism of the sandfly vector and implement parasite transmission by bite. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 89(20), 9944-9948.
- Seger, R., y Krebs, E. G. (1995). The MAPK signaling cascade. *The FASEB Journal*, 9(9), 726-735.
- Shor, B., Wu, J., Shakey, Q., Toral-Barza, L., Shi, C., Follettie, M., y Yu, K. (2010). Requirement of the mTOR kinase for the regulation of Maf1 phosphorylation and control of RNA polymerase III-dependent transcription in cancer cells. *Journal of Biological Chemistry*, jbc-M109.

- Stark, C., Breitkreutz, B. J., Reguly, T., Boucher, L., Breitkreutz, A., y Tyers, M. (2006). BioGRID: a general repository for interaction datasets. *Nucleic Acids Research*, 34(suppl\_1), 35-39.
- Stevens, J. R., Noyes, H. A., Schofield, C. J., y Gibson, W. (2001). The molecular evolution of *Trypanosomatidae*. *Advances in Parasitology*, 48, 1-56
- Soprano, A. S., de Giuseppe, P. O., Shimo, H. M., Lima, T. B., Batista, F. A. H., Righetto, G. L., Pereira, J. G. C., Granato, D. C., Nascimento, A. F. Z., Gozzo, F. C., de Oliveira, P. S. L., Figueira, A. C. M., Smetana, J. H. C., Leme, P. A. F., Murakami, M. T., y Benedetti, C. E. (2017). Crystal Structure and Regulation of the *Citrus* Pol III Repressor MAF1 by Auxin and Phosphorylation. *Structure*, 25(9), 1360-1370.
- Takebe, S., Witola, W. H., Schimanski, B., Günzl, A., y Mamoun, C. B. (2007). Purification of components of the translation elongation factor complex of *Plasmodium falciparum* by tandem affinity purification. *Eukaryotic Cell*, 6(4), 584-591.
- Teichmann, M., Dieci, G., Pascali, C., y Boldina, G. (2010). General transcription factors and subunits of RNA polymerase III: Paralogs for promoter-and cell type-specific transcription in multicellular eukaryotes. *Transcription*, 1(3), 130-135.
- Tovar, A., y Yasnot, A. (2017). Visceral Leishmaniasis in Latin America and therapy perspectives. *Revista MVZ Córdoba*, 22, 6075-6088.
- Tudisca, V., Recouvreux, V., Moreno, S., Boy-Marcotte, E., Jacquet, M., y Portela, P. (2010). Differential localization to cytoplasm, nucleus or P-bodies of yeast PKA subunits under different growth conditions. *European Journal of Cell Biology*, 89(4), 339-348.
- Upadhyya, R., Lee, J., y Willis, I. M. (2002). Maf1 is an essential mediator of diverse signals that repress RNA polymerase III transcription. *Molecular Cell*, 10(6), 1489-1494.
- Vannini, A., Ringel, R., Kusser, A. G., Berninghausen, O., Kassavetis, G. A., y Cramer, P. (2010). Molecular basis of RNA polymerase III transcription repression by Maf1. *Cell*, 143(1), 59-70.



- Wang, J., y Maldonado, M. A. (2006). The ubiquitin-proteasome system and its role in inflammatory and autoimmune diseases. *Inmunología Celular y Molecular*, 3(4), 255-261.
- Wei, Y., Tsang, C. K. y Zheng, X. F. S. (2009). Mechanisms of regulation of RNA polymerase III-dependent transcription by TORC1. *EMBO Journal*, 28(15), 2220–2230.
- Weisman, R., Cohen, A., y Gasser, S. M. (2014). TORC2—a new player in genome stability. *EMBO molecular medicine*, 6(8), 995-1002.
- WHO. 2017. Control of Leishmaniases, Technical Report Series 949. Geneva: *World Health Organization*. <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis>
- Willis, I. M., Chua, G., Tong, A. H., Brost, R. L., Hughes, T. R., Boone, C., y Moir, R. D. (2008). Genetic interactions of MAF1 identify a role for Med20 in transcriptional repression of ribosomal protein genes. *PLoS Genetics*, 4(7), e1000112.
- Willis, I. M., y Moir, R. D. (2018). Signaling to and from the RNA polymerase III transcription and processing machinery. *Annual Review of Biochemistry*, 87, 75-100.
- Yan, S., Lodes, M. J., Fox, M., Myler, P. J., y Stuart, K. (1999). Characterization of the *Leishmania donovani* ribosomal RNA promoter. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 103(2), 197-210.
- Zhong, S., Zhang, C., y Johnson, D. L. (2004). Epidermal growth factor enhances cellular TATA binding protein levels and induces RNA polymerase I-and III-dependent gene activity. *Molecular and Cellular Biology*, 24(12), 5119-5129.
- Zijlstra, E. E., y El-Hassan, A. M. (2001). Visceral leishmaniasis. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 95(Supplement 1), 27-58.
- Zomerdijk, J. C., Kieft, R., Shiels, P. G., y Borst, P. (1991). Alpha-amanitin-resistant transcription units in trypanosomes: a comparison of promoter sequences for a VSG gene expression site and for the ribosomal RNA genes. *Nucleic Acids Research*, 19(19), 5153-5158.