



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO



Facultad de Estudios Superiores Iztacala

Análisis molecular de la subunidad Tau95 del factor de
transcripción TFIIC en *Leishmania major*

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I Ó L O G O

Presenta:

Villa Delavequia Gino Stefano

Director de Tesis:

Dr. Santiago Martínez Calvillo



Los Reyes Iztacala, Tlalnepantla, 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 IN207118 de PAPIIT (DGAPA, UNAM) y por el donativo 251831 de CONACyT, otorgados al Dr. Santiago Martínez Calvillo.

Al Dr. Santiago Martínez Calvillo, por brindarme la oportunidad de pertenecer a su grupo de investigación y su inagotable paciencia y apoyo en la realización de este proyecto.

Al Biol. Luis Enrique Florencio, por su gran apoyo, paciencia, guía y todo el tiempo de enseñanza y disciplina necesaria para la parte experimental de este proyecto.

A los revisores de este trabajo: la Mtra. Irma Elena Dueñas García, el Dr. Luis Enrique Arias Romero, el Dr. Tomás Nepomuceno Mejía, y el Biol. Luis Enrique Florencio Martínez, por las valiosas aportaciones a este proyecto.

A la Universidad Nacional Autónoma de México, por darme el honor de ser parte de esta gran institución, que ha sido parte esencial en mi vida para mi desarrollo y crecimiento académico y personal, gracias a todas las valiosas horas de enseñanza.

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

A Claudia, por ser guía en mi camino, por todo el enorme apoyo, paciencia, comprensión y sobre todo amor, que me ha impulsado siempre hacia adelante, y que a pesar de los obstáculos, siempre has permanecido a mi lado.

A mi mamá, que siempre has sido uno de los pilares más fuertes en mi vida. Gracias por enseñarme a ser lo que soy, te debo mucho y te seguiré debiendo todo el esfuerzo que has puesto en nosotros, para que saliéramos adelante.

A mi hermana Michelle, que siempre has creído en mí y me has apoyado incondicionalmente, además de demostrarme que siempre puedo confiar en ti.

A Tulio mi hermano, mi inspiración y héroe por siempre preocuparte por la familia y demostrarme tu apoyo y amor, muchas de las cosas que soy y busco ser, se deben a tu ejemplo, gracias por confiar en mí.

A mi papá, por tu apoyo e inspiración para seguir adelante, sin dejar que me rinda y por todo el amor que siempre has demostrado.

A todos mis amigos que me acompañaron en este proceso de formación. Aldo, pasamos muchos momentos y todo tipo de emociones durante la carrera, que sin duda, no habrían hecho de este proceso tan fascinante y gratificante como lo fue. Brito, que compartimos mucho en común y que has demostrado que tengo en quien confiar y con quién compartir ideas, opiniones, gustos. Fer Tapia, que has sido tan alegre que se contagia, además que he aprendido muchas cosas de ti y hemos podido compartir muchos gustos y momentos. A todos mis compañeros de la carrera, ustedes hicieron de la carrera algo inolvidable y me quedo con muchos recuerdos que me llenan de alegría. Ale Serna, Fer Alvarado, Jorge, Alan, Dana, me llevo cosas, recuerdos e ideas, que muchas veces me hicieron plantearme nuevas perspectivas.

Índice

Lista de Figuras y Tablas	VII
Resumen	IX
1. Introducción	1
1.1 Características generales de tripanosomátidos.....	1
1.2 Biología del género <i>Leishmania</i>	4
1.2.1 Ciclo de vida.....	5
1.2.2 Leishmaniasis.....	7
1.3 Transcripción en eucariontes.....	10
1.3.1 RNA Polimerasa I	11
1.3.2 RNA Polimerasa II	13
1.3.3 RNA Polimerasa III	15
1.3.3.1 Estructura y función.....	15
1.3.3.2 Promotores	16
1.3.3.3 Factores de transcripción	17
1.3.3.4 TFIIC.....	19
1.3.3.4.1 Tau95.....	20
1.3.4 Expresión genética en tripanosomátidos.....	21
1.3.4.1 Organización de los genes	22
1.3.4.2 Transcripción policistrónica de la RNA Pol II	23
1.3.4.3 RNA Pol I.....	24
1.3.4.4 RNA Pol III	25
1.4 Antecedentes	27
2. Objetivos	29
2.1 Objetivo General.....	29
2.2 Objetivos particulares.....	29

3.	Estrategia experimental	3-30
4.	Metodología	31
4.1	Análisis <i>in silico</i>	31
4.2	Cultivo de <i>L. major</i>	31
4.3	Amplificación por PCR.....	32
4.4	Clonación en el vector pGEM-T-Easy.....	33
4.5	Transformación de células competentes.....	33
4.6	Generación del vector PTP.....	34
4.7	Transfección de <i>Leishmania</i> por electroporación	35
4.8	Obtención de clonas celulares.....	36
4.9	Análisis de la expresión de proteínas recombinantes	37
4.10	Purificación por afinidad en tándem	38
4.11	Preparación de las muestras para el análisis de espectrometría de masas	39
5.	Resultados.....	41
5.1	Análisis de la secuencia de LmTau95.....	41
5.1.1	Dominios conservados y estructura secundaria predicha de LmTau95.....	43
5.1.2	Determinación <i>in silico</i> de la estructura terciaria de LmTau95.....	46
5.1.3	Tau95 en <i>Leishmania</i> spp.	48
5.2	Clonación en el vector pGEM-T Easy	51
5.3	Subclonación de LmTau95 en el vector PTP	53
5.4	Generación de la línea celular LmjF-Tau95-PTP	58
5.5	Análisis de la expresión de las proteínas recombinantes.....	59
5.6	Purificación por afinidad en tándem	60
5.7	Identificación de las proteínas que se asocian con LmTau95.....	62
6.	Discusión	64
7.	Logros y conclusiones.....	72
8.	Bibliografía	73

Lista de Figuras y tablas

- Fig. 1. Esquema de la morfología de los tripanosomátidos.
- Fig. 2. DNA mitocondrial.
- Fig. 3. Estadios de *Leishmania*.
- Fig. 4. Ciclo de vida digenético de *Leishmania*.
- Fig. 5. Distribución de las diferentes especies responsables por leishmaniasis cutánea en América.
- Fig. 6. Distribución de las diferentes especies responsables de leishmaniasis cutánea en el Viejo Mundo.
- Fig. 7. Repetidos y promotor de rDNA de mamíferos.
- Fig. 8 Vista superior y frontal de la estructura cristalina de RNA Pol I.
- Fig. 9. Modelo canónico para el ensamblaje del PIC.
- Fig. 10. Vista superior y frontal de la RNA Pol III.
- Fig. 11. Promotores de la RNA Pol III.
- Fig. 12. Complejo de preiniciación de la transcripción de la RNA Pol III.
- Fig. 13. Subunidades de TFIIC y su unión al DNA.
- Fig. 14. Transcripción policistrónica, trans-splicing y poliadenilación en tripanosomátidos
- Fig. 15. Mecanismo de trans-splicing.
- Fig. 16. Comparación de secuencia de aminoácidos de Tau95 en diferentes especies.
- Fig. 17. Comparación de secuencia y estructura secundaria de Tau95 entre *L. major* (Lm) y *S. pombe* (Sp).
- Fig. 18. Estructura secundaria del dominio de dimerización LmTau95 y SpTau95.
- Fig. 19. Estructura tridimensional del dominio de unión a DNA de SpTau95 y LmTau95.
- Fig. 20. Estructura globular de SpTau95 y LmTau95.
- Fig. 21. Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de Tau95 en diferentes especies de *Leishmania*.
- Fig. 22. Amplificación y purificación del gen LmTau95.
- Fig. 23. DNA de plásmidos aislados de las colonias positivas.

Fig. 24. Clonación de LmTau95 en pGEM-T Easy.

Fig. 25. Electroforesis de DNA de plásmido digerido con enzimas *XbaI* y *XmaI* e inserto LmTau95 purificado.

Fig. 26. Electroforesis del plásmido pB6-PTP.

Fig. 27. Análisis de restricción de las colonias obtenidas para LmTau95-PTP.

Fig. 28. Secuencia de LmTau95 unido a la bandera PTP.

Fig. 29. Mapa del vector pLmTau95-PTP.

Fig. 30. Obtención de DNA por midiprep.

Fig. 31. Ensayo Western blot.

Fig. 32. Proteínas obtenidas mediante purificación por afinidad en tándem de LmTau95-PTP.

Fig. 33. Comparación de secuencias de aminoácidos entre Tau55 de *L. major* (LmTau55) y *S. pombe* (SpTau55).

Fig. 34. Análisis de secuencia de aminoácidos de Tau131 entre *L. major* (Lm) y *S. cerevisiae* (Sc).

Tabla 1. Condiciones para la amplificación del gen LmTau95 por PCR.

Tabla 2. Porcentajes de identidad de ortólogos de Tau95.

Tabla 3. Porcentaje de identidad de la secuencia de Tau95 entre distintas especies del género *Leishmania*.

Tabla 4. Proteínas identificadas en la espectrometría de masas.

Resumen

Leishmania es un género de protozoos flagelados pertenecientes a la familia Trypanosomatidae, grupo de organismos caracterizados por una expresión genética peculiar, distinta de otros eucariontes. Desde que se reveló la secuencia genómica de *L. major* en 2005, se ha avanzado en el estudio de los procesos moleculares y expresión de genes. En nuestro laboratorio, estamos interesados en el estudio de la transcripción de la RNA Pol III, que se encarga de transcribir genes de tRNA, 5S rRNA y snRNAs, entre otras moléculas esenciales para la viabilidad celular. En este estudio se caracterizó la subunidad Tau95 del factor de transcripción TFIIC de *L. major* (LmTau95), que forma parte importante del complejo de transcripción de RNA Pol III. Mediante análisis *in silico* se encontró que LmTau95 presenta similitudes con su ortólogo en *S. pombe*, ya que comparten dominios conservados y su estructura tridimensional predicha es muy similar. También se generaron líneas celulares que expresan la proteína recombinante LmTau95-PTP, para identificar las proteínas que se asocian con LmTau95 mediante ensayos de purificación por afinidad en tándem. Para ello, se amplificó el gen LmTau95 por PCR y se clonó en el vector de expresión PTP. El plásmido obtenido fue electroporado en células de *L. major*. Una vez obtenida una población transfectada establemente, se obtuvieron clonas celulares, las cuales se analizaron y caracterizaron mediante Western blot para corroborar la expresión de la proteína recombinante LmTau95-PTP. Con una clona seleccionada se realizó la purificación por afinidad en tándem. Los complejos moleculares obtenidos fueron analizados mediante espectrometría de masas. Entre las proteínas purificadas, identificamos los probables ortólogos de las dos subunidades de TFIIC que junto con Tau95 forman el subdominio TauA: Tau55 y Tau131. Así, nuestros datos sugieren que el factor TFIIC se conforma de al menos tres subunidades (el subcomplejo TauA) en *L. major*. Además, se identificaron algunas otras proteínas que podrían regular la transcripción de Pol III en este eucarionte de divergencia temprana.

1. Introducción

1.1 Características generales de tripanosomátidos

La familia Trypanosomatidae incluye una serie de parásitos protozoos infecciosos para los humanos, que en conjunto representan grandes problemas de salud pública en regiones tropicales y subtropicales de casi todo el mundo. Esta familia incluye organismos flagelados como *Leishmania* spp., *Trypanosoma cruzi* y *Trypanosoma brucei*, agentes causales de la leishmaniasis, la enfermedad de Chagas y la enfermedad del sueño, respectivamente (Bernardes *et al.*, 2013).

La posesión de un solo flagelo es común en todos los tripanosomátidos (Figura 1). Éste, junto con el resto de los orgánulos celulares, debe replicarse una vez durante cada ciclo celular. A diferencia de la situación de los cilios en las células de mamíferos, el flagelo de tripanosomátidos no se desensambla antes de la división celular, sino que permanece intacto y se construye un nuevo flagelo junto al antiguo (Gluezn *et al.*, 2015).

Esta familia se caracteriza también por la presencia de sólo una mitocondria, la cual es alargada y abarca casi toda la célula (Figura 1). El DNA mitocondrial, conocido como cinetoplasto (kDNA), se localiza en la base del flagelo (Figura 1), y se encuentra conformado por una compleja red de moléculas circulares denominadas maxicírculos y minicírculos (Figura 2). Este DNA tiene una capacidad de replicación independiente del DNA nuclear y codifica para los RNA guía pequeños (gRNA) que controlan la especificidad del proceso de edición del mRNA mitocondrial (Maslov *et al.*, 2001; De Souza, 2002a; De Souza 2002b).

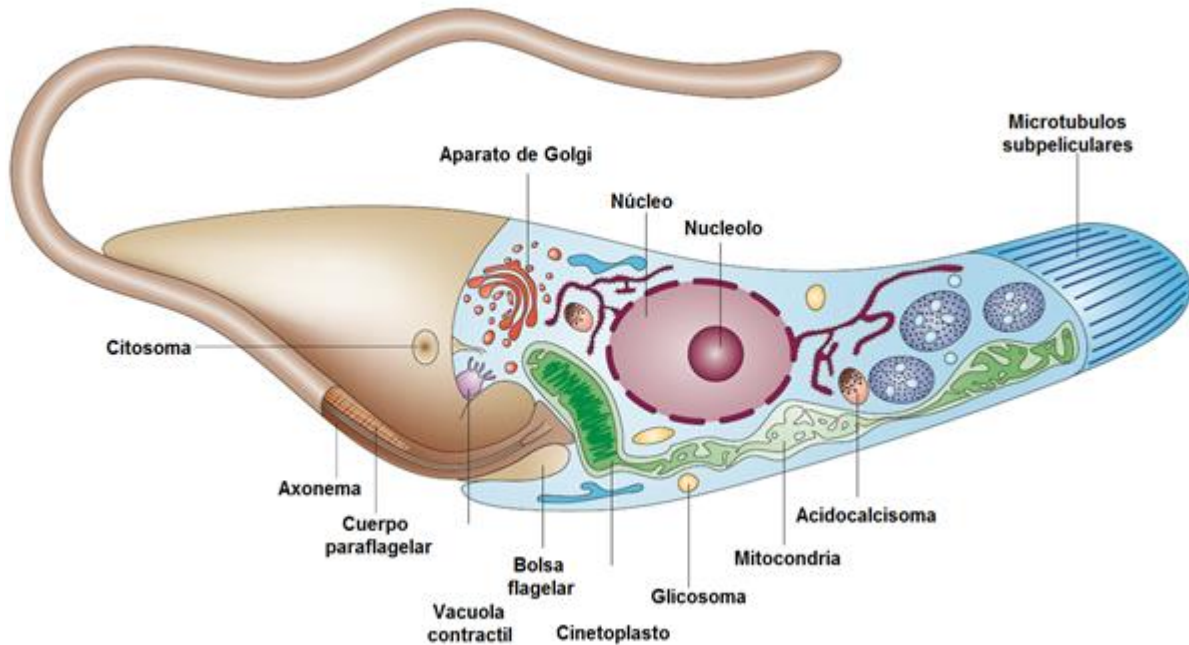


Fig. 1. Esquema de la morfología de los tripanosomátidos. Modificado de Docampo *et al.*, 2005.

Otra característica distintiva es la presencia de microtúbulos subpeliculares, localizados debajo de la membrana plasmática (Figura 1). Éstos constituyen el citoesqueleto en los tripanosomátidos, y su reorganización ayuda a los cambios morfológicos que presentan estos parásitos a lo largo de sus ciclos de vida (De Souza, 2002a).

Los tripanosomátidos fueron las primeras células en las que se identificaron los acidocalcisomas, orgánulos ácidos densos con una alta concentración de cationes como fósforo (presente como pirofosfato y polifosfato) y calcio que en otros organismos participan en varias funciones como la regulación osmótica y el mantenimiento del pH intracelular. El descubrimiento de que las membranas de los acidocalcisomas de tripanosomátidos contienen varias bombas e intercambiadores sugirió una función metabólica parecida a la de otros organismos (Docampo *et al.*, 2005).

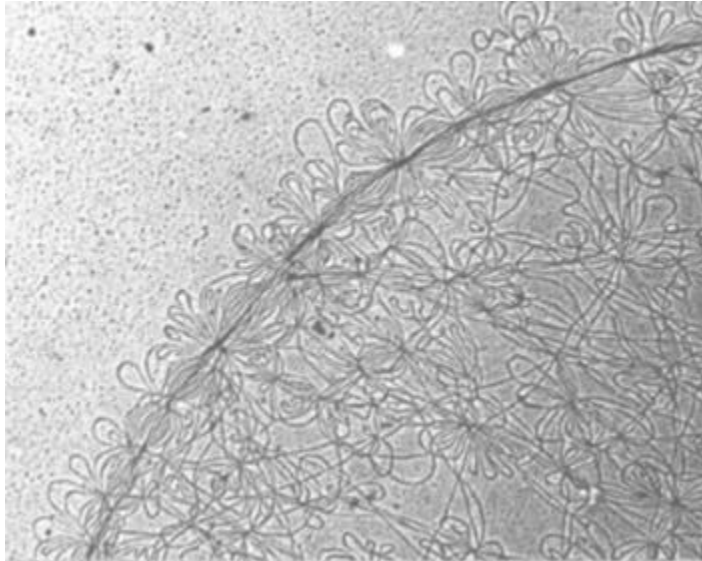


Fig. 2. DNA mitocondrial. Micrografía electrónica de un segmento del DNA de cinetoplasto del tripanosomátido *Crithidia fasciculata*, donde se observa el arreglo de los minicírculos. Tomado de Klingbeil y Englund, 2004.

Un organelo exclusivo de los tripanosomátidos es el glicosoma. A diferencia de otros eucariontes, en donde la glicólisis es un proceso citosólico, los tripanosomátidos contienen enzimas necesarias para la glicólisis en organelos llamados glicosomas, los cuales poseen una maquinaria de proteínas similar a la de los peroxisomas y contienen vías de generación de energía clave, como la glucólisis y la β -oxidación de ácidos grasos. De hecho, la compartimentalización de estas vías en glicosomas ayuda a los parásitos a sobrevivir breves períodos de condiciones anaeróbicas durante las etapas intracelulares. Los glicosomas de los tripanosomátidos pertenecen a la familia de microcuerpos, donde también se engloban los glioxisomas de las plantas y los cuerpos de Woronin en hongos. Específicamente, los glicosomas de tripanosomátidos participan en el metabolismo de carbohidratos. En *T. brucei*, han sido identificadas en glicosomas siete enzimas de la ruta glicolítica, dos del metabolismo del glicerol y varias del metabolismo de pirimidinas (Oppendoes y Szikora, 2006; Jamdhade *et al.*, 2015; Bauer y Morris, 2017).

1.2 Biología del género *Leishmania*

Los parásitos del género *Leishmania* llevan el nombre de W.B. Leishman, quien identificó y aisló una de las primeras cepas del parásito en 1901. Hasta 2017, alrededor de 53 especies del parásito han sido descritas en diferentes regiones del mundo. De éstas, se sabe que 31 especies son parásitas de los mamíferos y 20 son patógenas para los seres humanos (Alemayehu y Alemayehu, 2017).

Leishmania es un tipo de parásito intracelular obligado que presenta un ciclo de vida que involucra un hospedero vertebrado (que puede ser el humano) y uno invertebrado (la mosca de la arena). El parásito presenta estadios replicativos no infectivos y estadios no replicativos infectivos, que invaden células de la línea fagocítica mononuclear de sus hospederos vertebrados (Figura 3) (Vaidyanathan, 2005).

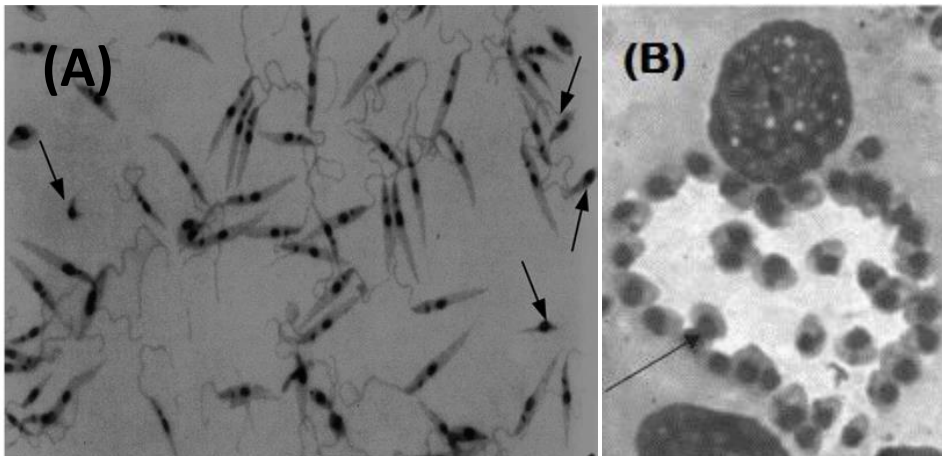


Fig. 3. Estadios de *Leishmania*. (A) Promastigotes procíclicos, alargados móviles que se replican extracelularmente en el intestino medio de la mosca de la arena. Los promastigotes metacíclicos (señalados con flechas) son los que se inyectan junto con la saliva de la mosca de arena en la piel, donde entran en las células diana y establecen la infección en macrófagos y células dendríticas. (B) Amastigotes no móviles que se replican dentro del compartimento fagolisosómico de un macrófago infectado. La flecha indica amastigotes dentro de la vacuola parasitófora. (A) Tomado de Saraiva, *et al.* 2005; (B) Modificado de Soong, 2009).

1.2.1 Ciclo de vida

Los parásitos de *Leishmania* tienen un ciclo de vida dimórfico, trasladándose entre el tracto alimentario de la mosca de arena como promastigotes extracelulares flagelados y como amastigote intracelular dentro de los fagolisosomas de células mononucleares del hospedero mamífero. La mosca de arena de la subfamilia Phlebotominae es el único vector natural conocido de *Leishmania* spp. responsable por la infección a humanos. La hembra de la mosca requiere de alimentarse de sangre para poder oviponer, ya que los nutrientes encontrados en la sangre son necesarios para el desarrollo de los huevos, lo que permite al vector la transmisión de *Leishmania* (Inbar *et al.*, 2017).

En el hospedero mamífero, la biología del desarrollo del parásito es relativamente simple: los promastigotes metacíclicos (formas infecciosas) se introducen en la piel por la picadura de la mosca de la arena (Figura 4) (Gossage *et al.*, 2003). En esta fase, los promastigotes son inyectados por la probóscide de la mosca, y son fagocitados por los macrófagos. En estas células, se transformarán en amastigotes dentro de fagolisosomas, donde se multiplicarán por fisión binaria. Después de varias rondas de replicación, los amastigotes lisan el macrófago por carga parasitaria, siendo liberados para poder infectar a otras células fagocíticas mononucleares y permanecer en el hospedero mamífero (Handman y Bullen, 2002).

El ciclo continúa cuando una mosca ingiere células de un individuo infectado, en donde los amastigotes entran por la probóscide, y se desarrollan en el intestino medio formando promastigotes procíclicos altamente replicativos. Killick-Kendrick *et al.* (1974) reportaron que la ultraestructura de *Leishmania* en las moscas de arena ha mostrado la adhesión de los promastigotes a las microvellosidades del intestino medio mediante la inserción de los flagelos de los parásitos. Eventualmente, los promastigotes procíclicos dejan de replicarse y migran a la probóscide, donde se transforman en promastigotes metacíclicos, que son las formas infectivas, no replicativas. Cuando la mosca pica a un mamífero transmite los promastigotes metacíclicos, completándose así el ciclo de vida del parásito. En 2007,

Cohen-Freue *et al.* reportaron que *Leishmania* puede permanecer latente durante décadas o durante toda la vida del mamífero.

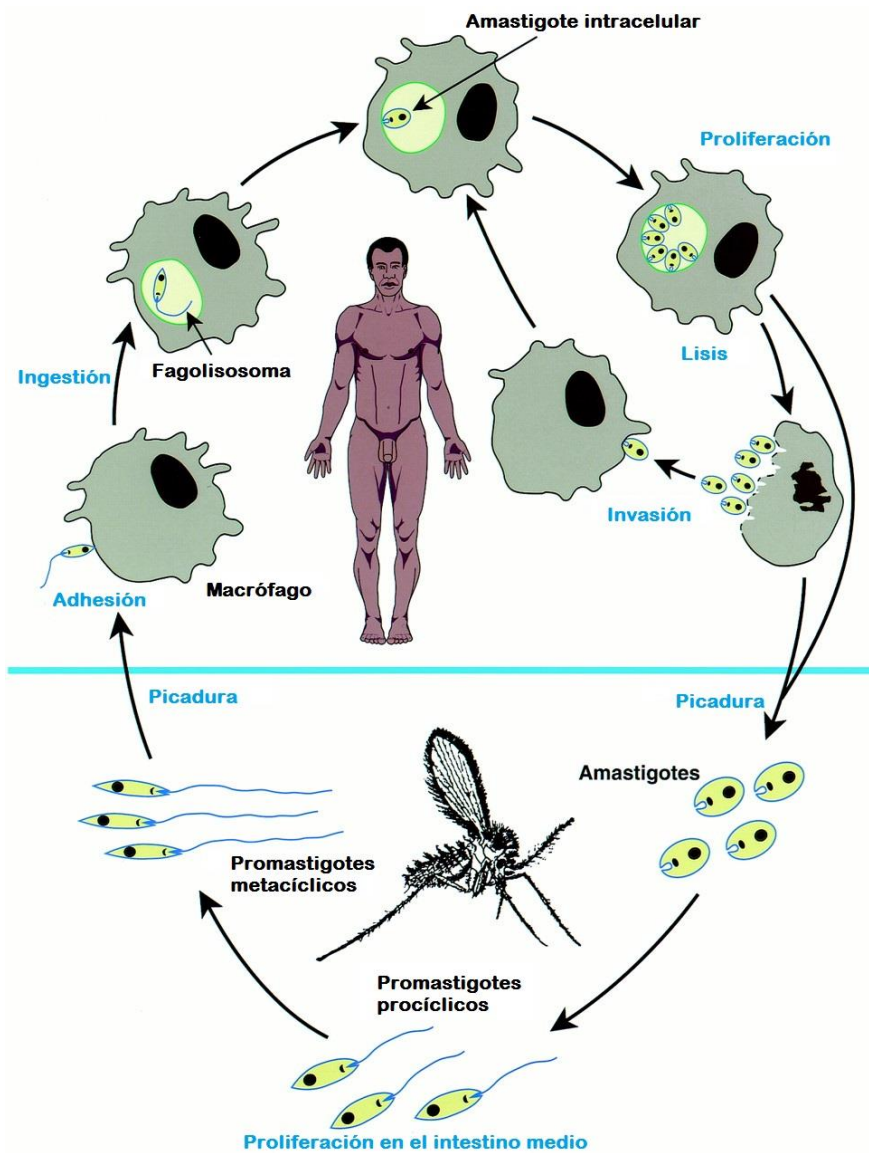


Fig. 4 Ciclo de vida digenético de *Leishmania*. La mosca, al alimentarse de la sangre de un mamífero infectado, ingiere los amastigotes, los cuales en el intestino medio proliferan como promastigotes procíclicos. Posteriormente, se convierten en promastigotes metacíclicos, que son las formas infectivas y que emigran hasta la probóscide. La mosca al volver a alimentarse inyectará los parásitos, los cuales son fagocitados por los macrófagos, en donde comienzan a proliferar como amastigotes. Modificado de Handman, 2001.

1.2.2 Leishmaniasis

Los flagelados de *Leishmania* se transmiten a los vertebrados y con frecuencia son hospedados por cánidos, roedores, marsupiales, mangostas, y murciélagos; por lo tanto, la enfermedad puede ser: 1) una zoonosis, enfermedad que se transmite de manera natural de un animal al ser humano; 2) una antroponosis, enfermedad que afecta principalmente a los animales pero que puede transmitirse a humanos; o 3) una antroposis, en donde el agente causante de la enfermedad es portado por el humano y se transmite a otros animales, aunque pocas especies son estrictamente antropónicas. Sólo una minoría de humanos infectados desarrolla la enfermedad, pues la mayoría se infecta a nivel subclínico. Las diversas manifestaciones clínicas de *Leishmania* son el resultado de la interacción entre el tipo de especie infectante y la respuesta inmune del hospedero (Singh *et al.*, 2002; Pace, 2014).

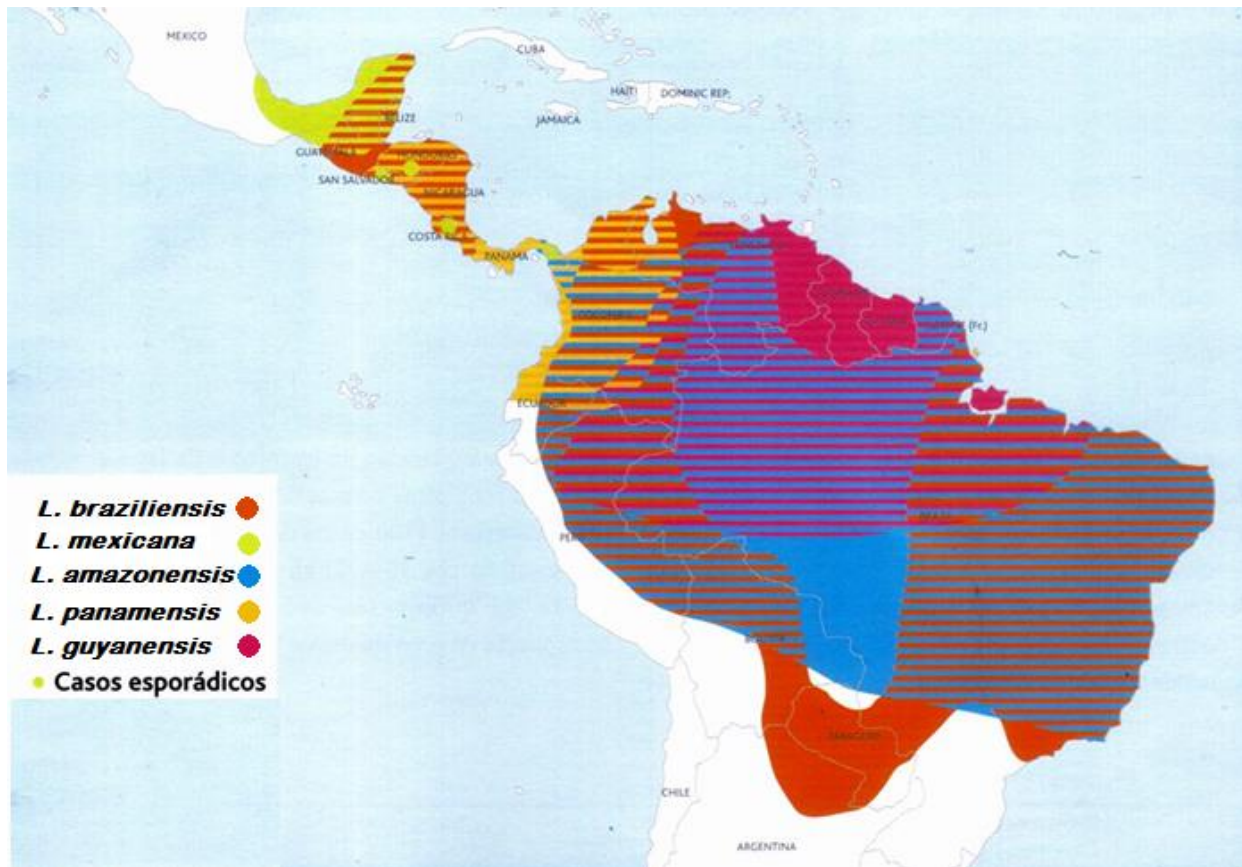


Fig. 5 Distribución de las diferentes especies responsables por leishmaniasis cutánea en América. Modificado de Magill, 1995.

Las infecciones por *Leishmania* pueden variar de asintomáticas a enfermedades clínicamente abiertas que son muy variadas, aunque se reconocen tres tipos principales de leishmaniasis: visceral, cutánea y mucocutánea.

Los síntomas comunes de la **leishmaniasis visceral** o kala-azar (LV) son fiebre, anorexia, pérdida de peso, y distensión abdominal y debilidad, la cual progresa de semanas a meses. Esta enfermedad es producida generalmente por la infección de *L. donovani*. La diseminación de los parásitos en los órganos puede producir esplenomegalia, hepatomegalia, palidez y daño a la médula ósea. Una enfermedad cutánea asociada conocida como leishmaniasis dermal postkala-azar, puede desarrollarse. El número de casos de LV se calcula que alcanza hasta 0.2-0.4 millones de personas por año, con más del 90% de estos en India (principalmente en el estado de Bihar), Bangladesh, Sudán y Etiopía y Brasil. La mortalidad resultante se estima en 10-20%, especialmente en áreas pobres (Pace, 2014; Handler *et al.*, 2015).

La **leishmaniasis cutánea** (LC) es la más común de las tres variedades y se caracteriza por la presencia de úlceras en el sitio de picadura del insecto transmisor, y es causada por *L. major* y *L. mexicana*, entre otras especies. Más del 50% de los casos sanan sin tratamiento a los seis meses de la infección. Un estimado de 0.7-1.2 millones de casos de LC ocurren principalmente en el litoral del mediterráneo, América y Asia occidental, cada región contribuyendo con un 30% de los casos, aunque el 75% de éstos ocurre en Brasil, Siria y Afganistán (Figuras 5 y 6) (Pace, 2014; Hailu *et al.*, 2016).

Las lesiones causadas por la **leishmaniasis mucocutánea** (LMC) son las más desfigurantes, ya que son producto de la destrucción de las membranas mucosas de la nariz y boca, y de tejidos periféricos. Ésta es causada principalmente por *L. braziliensis*, *L. panamensis* y *L. peruviana*, entre otras. El tratamiento para LC y LMC puede ser local o con compuestos antimoniales, dependiendo de la gravedad de las lesiones. Alrededor de 35 mil casos de LMC ocurren anualmente, principalmente en Brasil, Perú y Bolivia (Pace, 2014; Hailu *et al.*, 2016).

La Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que cada año ocurren más de 1.2 millones de casos de leishmaniasis cutánea en 98 países y territorios en los cinco continentes. En su forma visceral, que afecta a 400,000 personas en todo el mundo cada año, la tasa de mortalidad es de 10%, lo que la convierte en la segunda infección parasitaria tropical más mortal del mundo después de la malaria (Alvar *et al.*, 2012).

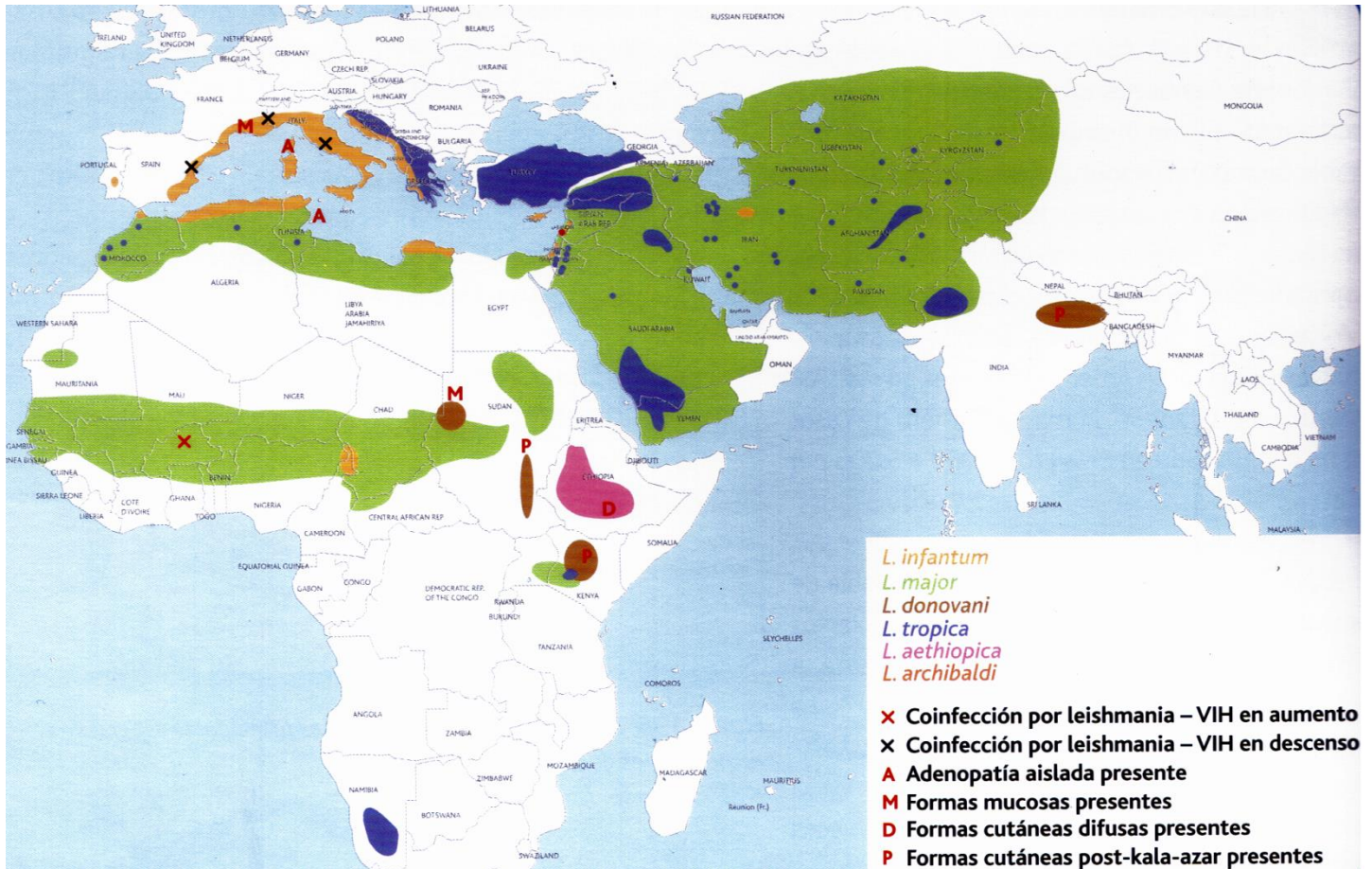


Fig. 6. Distribución de las diferentes especies responsables de leishmaniasis cutánea en el Viejo Mundo. Modificado de Magill, 1995.

Además de su gran importancia médica, los miembros de la familia Trypanosomatidae son de gran interés en el ámbito de la biología molecular, debido a los mecanismos atípicos de expresión de su genoma, por lo que resultan de gran interés biológico. En nuestro laboratorio, estamos interesados en el estudio de los mecanismos de transcripción de RNA Pol III en estos eucariontes de divergencia temprana.

1.3 Transcripción en eucariontes

La transcripción es la primera etapa de la expresión génica y se define como la síntesis de RNA a partir de un molde de DNA, a través de enzimas especializadas denominadas RNA polimerasas.

La transcripción en eucariontes está regulada por un gran número de proteínas, que incluyen factores secuencia-específicos de unión a DNA, reguladores de cromatina, la maquinaria de transcripción general y sus reguladores. Su función colectiva es expresar un subconjunto de genes según lo dictado por una interacción compleja de señales ambientales que se comprende sólo en parte (Venters y Pugh, 2009).

El inicio de síntesis de RNA requiere la formación de complejos de preinicio (PIC) de la transcripción, los cuales se ensamblan en las regiones especiales del DNA conocidas como promotores. Los factores generales de transcripción (GTF) son proteínas que no forman parte de la RNA Polimerasa (RNA Pol), pero que son necesarias para el inicio de la transcripción. Éstos reconocen elementos de secuencia específicos en los promotores, para que posteriormente pueda ser reclutada la RNA Pol y finalmente se permite la apertura del DNA para comenzar la transcripción. La RNA Pol se desplaza a lo largo del molde, sintetizando RNA hasta que alcanza una secuencia de terminación. Al producto inmediato de la transcripción se le denomina transcrito primario. Éste consiste en RNA que se extiende desde el promotor hasta el terminador y posee los extremos 5' y 3' originales. Sin embargo, el transcrito primario es casi siempre inestable y debe ser procesado para generar un RNA maduro (Lewin, 2008; Vannini y Cramer, 2012).

Las RNA polimerasas son complejos proteicos que están presentes en todos los organismos vivos. La maquinaria básica de transcripción de moléculas de RNA evolucionó antes del último ancestro de todos los organismos existentes. Arqueas y bacterias cuentan

con una RNA Pol, mientras que en eucariontes existen tres RNA Polimerasas que sintetizan distintas clases de RNA.

1.3.1 RNA Polimerasa I

La RNA polimerasa I (RNA Pol I) produce RNA ribosomal (rRNA), un componente esencial de los ribosomas, estructuras especializadas en la síntesis de proteínas. La síntesis de rRNA por RNA Pol I se produce en el nucléolo, que es también el sitio del ensamblaje de las subunidades del ribosoma. Este proceso implica la incorporación de los rRNA producidos por RNA Pol I junto con el rRNA 5S, producido por RNA polimerasa III (RNA Pol III), y muchas proteínas ribosómicas. En los mamíferos, el pre-rRNA 47S producido por RNA Pol I se procesa en rRNA 18S, 5.8S y 28S maduros (Goodfellow y Zomerdijk, 2012).

Los genes del rRNA (rDNA) presentan características distintivas. En levaduras, están formados por varios cientos de repeticiones en tándem de aproximadamente 10 kb que se agrupan en el nucléolo. En las células en crecimiento activo, la transcripción del rDNA representa el 60% de la actividad transcripcional total, que se correlaciona con un alto contenido de ocupación de la RNA Pol I en los genes del rRNA. Como consecuencia, la transcripción del rDNA es un punto importante de control para regular el crecimiento celular (Moss y Stefanovsky, 2002; Fernández-Tornero, 2018).

Los promotores de los genes de rRNA eucarióticos contienen dos elementos reguladores importantes para dirigir el inicio de la transcripción de manera precisa y eficiente: el promotor central y el elemento de control río arriba (UCE, por sus siglas en inglés *upstream control element*) (Figura 7). El promotor central es suficiente para la transcripción basal por RNA Pol I en la mayoría de las especies. El UCE se encuentra en la posición -156 a -107 en relación con el sitio de inicio de la transcripción (SIT, +1) de los genes rRNA humanos y es importante para estimular la transcripción del promotor central (Goodfellow y Zomerdijk, 2012).

El inicio de la transcripción del rDNA en levaduras requiere el ensamblaje secuencial de factores en los diferentes elementos promotores. El factor de activación río arriba (UAF, *upstream activation factor*) se une al UCE, mientras que el factor central (CF, *core factor*) se une al elemento central (CE, *core element*). El ensamblaje completo de la enzima y los factores en los promotores constituye el PIC, que pasa de un complejo cerrado a uno abierto tras la apertura de la doble hebra del DNA (Fernández-Tornero, 2018).

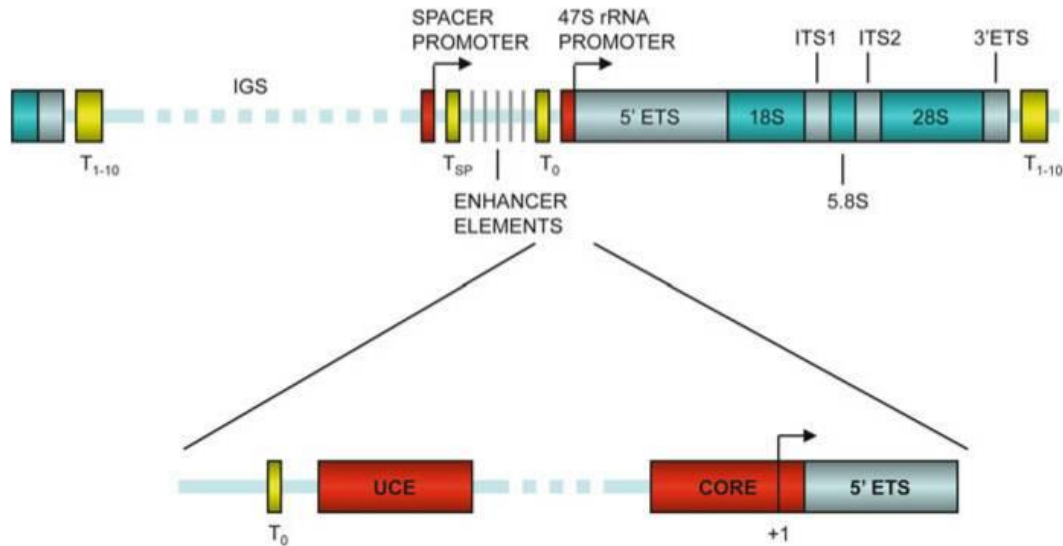


Fig. 7. Repetidos y promotor de rDNA de mamíferos. El panel superior ilustra los elementos clave y la organización general de un repetido de rDNA de mamíferos. El espaciador intergénico (IGS) incluye el promotor del espaciador y los promotores del rRNA, las repeticiones potenciadoras y los sitios de unión de TTF-I (Factor de terminación de transcripción I) T_0 y T_{sp} . Las flechas indican los sitios de inicio y la dirección de la transcripción. La región de codificación contiene los espaciadores transcritos externos (ETS) 5' y 3' y dos espaciadores transcritos internos (ITS), junto con las regiones que codifican los rRNA 18S, 5,8S y 28S. Los elementos terminadores (T_{1-10}) río abajo del gen rRNA 28S también están indicados. El panel inferior ilustra la disposición del promotor rRNA 47S, que dirige el ensamblaje del PIC de Pol I y consiste en un elemento de control río arriba (UCE) y un elemento promotor central que se superpone al SIT. Tomado de Goodfellow y Zomerdiijk, 2012.

La RNA Pol I de levadura está formada por 14 subunidades con una masa total de 590 kDa (Figura 8). La enzima conserva la forma general de pinza de cangrejo definida para otras RNA polimerasas de múltiples subunidades, con una hendidura central que se une al DNA río abajo (Neyer *et al.*, 2016).

El núcleo de RNA Pol I incluye las dos subunidades más grandes, A190 y A135, que forman la hendidura de unión al DNA, más cinco subunidades presentes en todas las polimerasas

de RNA nucleares (Rpb5, Rpb6, Rpb8, Rpb10 y Rpb12) y el heterodímero AC40-AC19, compartido con RNA Pol III y homóloga a Rpb3 – Rpb11 en Pol II. El núcleo enzimático se completa con A12.2, una subunidad formada por dos dedos de zinc que participan en la división del RNA (Figura 8) (Fernández-Tornero *et al.*, 2013).

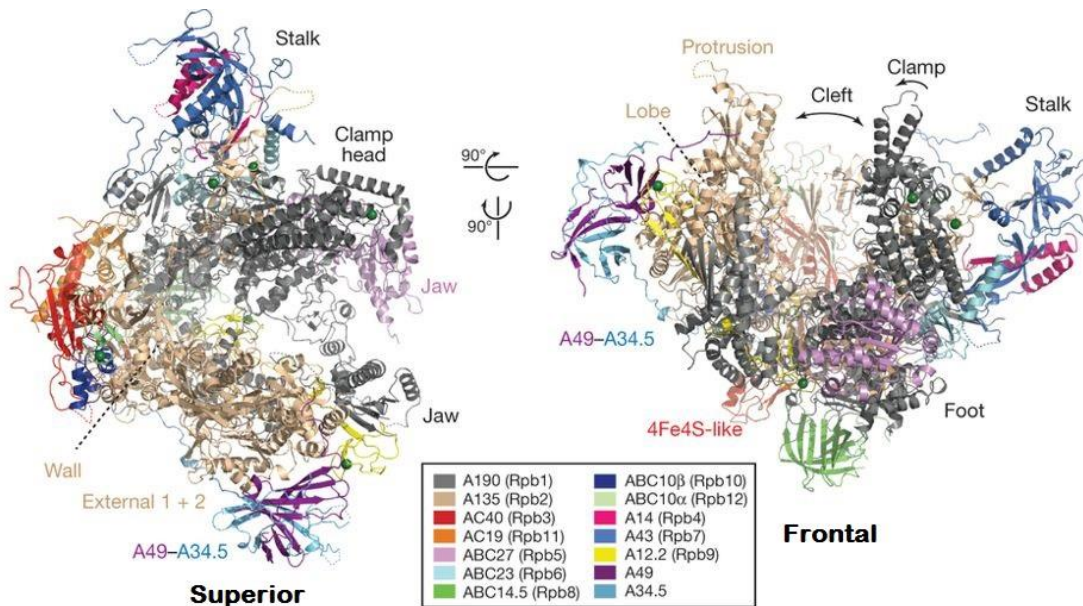
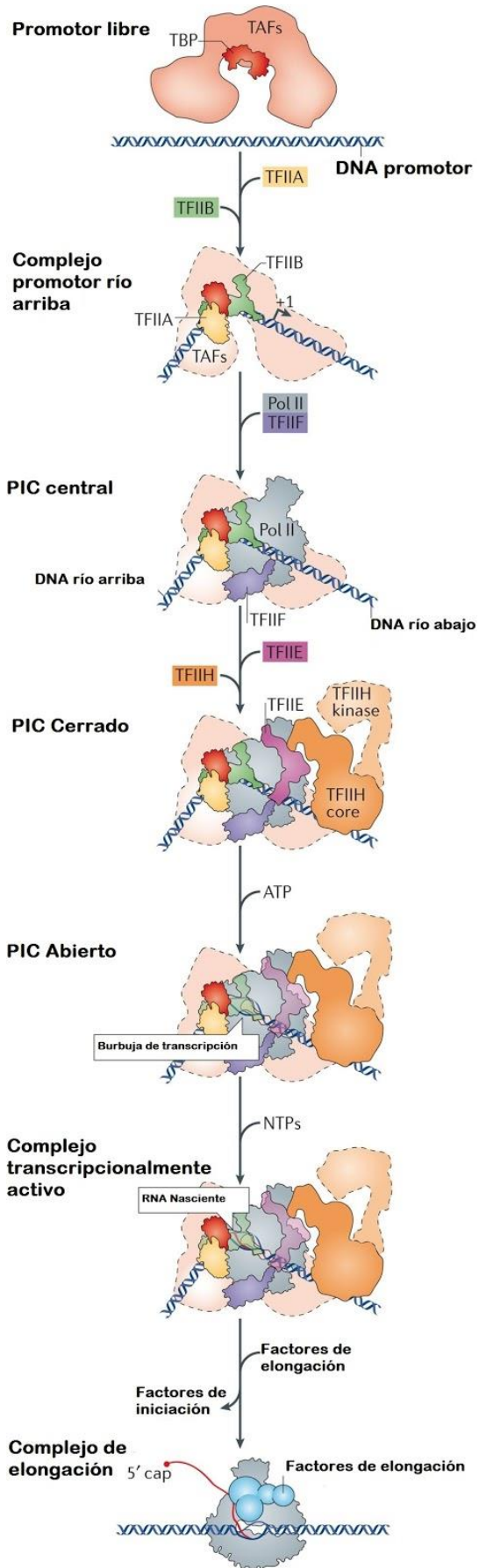


Fig. 8 Vista superior y frontal de la estructura cristalina de RNA Pol I. Las 14 subunidades se encuentran diferenciadas por colores, y las subunidades correspondientes a RNA Pol II se muestran entre paréntesis. Tomado de Fernández-Tornero *et al.*, 2013.

1.3.2 RNA Polimerasa II

La RNA Polimerasa II (RNA Pol II) es un complejo conformado por 12 subunidades con una masa total de 500 kDa. Es la encargada de la síntesis de los RNA mensajeros (mRNAs) a partir de los genes que codifican para proteínas. La actividad de esta enzima está controlada principalmente por la diferenciación celular y por la respuesta a los cambios ambientales. Para el inicio de la transcripción, RNA Pol II necesita del ensamble de seis factores generales de transcripción que se unen al promotor para formar el PIC: TFIIA, TFIIB, TFIID, TFIIE, TFIIIF Y TFIIH (Figura 9).



La proteína de unión a caja TATA (TBP, *TATA binding protein*), subunidad de TFIID, inicia la formación del PIC (Vannini y Cramer, 2012). Posteriormente se unen TFIIA, TFIIB y TFIIF. Estos factores permiten la unión de RNA Pol II al sitio de inicio de la transcripción. Finalmente, se unen TFIIE y TFIIH para formar un PIC completo, lo que facilita la apertura del DNA y el escape de la RNA Pol II del promotor para realizar la síntesis del RNA (Figura 9) (Grünberg y Hahn, 2013; Sainsbury *et al.*, 2015).

La transición de la iniciación a un complejo de elongación estable ocurre cuando la transcripción alcanza una longitud de aproximadamente 25 residuos. En este punto, la mayoría, si no todos, los GTF se liberan. El movimiento hacia adelante de la polimerasa es impulsado por la unión de nucleósidos trifosfatos (NTP) (Liu *et al.*, 2012).

Fig. 9. Modelo canónico para el ensamblaje del PIC paso a paso a partir de GTF (varios colores) y RNA Pol II (gris) en el DNA promotor. Los nombres de los complejos intermedios que se forman durante la transición de inicio-elongación se proporcionan a la izquierda de las imágenes. TFIID o su subunidad TBP, se une al DNA promotor, induciendo un doblez. El complejo TBP-DNA se estabiliza luego por TFIIB y TFIIA, que flanquean a TBP en ambos lados. Después se une el complejo RNA Pol II-TFIIF, lo que lleva a la formación del PIC central. La unión posterior de TFIIE y TFIIH completa el PIC. En presencia de ATP, el DNA se abre (formando la burbuja de transcripción) y comienza la síntesis de RNA. Finalmente, la disociación de los factores de iniciación permite la formación del complejo de elongación de RNA Pol II, que se asocia con los factores de elongación de la transcripción (azul). NTP, nucleósido trifosfato; TAF, factor asociado a TBP. Modificado de Sainsbury *et al.*, 2015.

1.3.3 RNA Polimerasa III

La RNA polimerasa III (RNA Pol III) está dedicada a la transcripción de una colección de genes cuyas características comunes principales son que codifican RNAs estructurales o catalíticos y que, por regla general, son más cortos que 400 pares de bases. Este límite de longitud es consistente con las propiedades de elongación de la RNA polimerasa III, que reconoce una simple serie de residuos de T como una señal de terminación (Schramm y Hernández, 2002).

La RNA Pol III media la transcripción de RNAs pequeños, como los RNAs de transferencia (tRNAs), que son los que acarrear a los aminoácidos al ribosoma durante la traducción; el RNA pequeño nuclear U6 (U6 snRNA), componente de la snRNP (ribonucleoproteína pequeña nuclear), que en complejo con varias otras proteínas ensambla el *spliceosoma*, un gran complejo que cataliza la escisión de intrones del pre-mRNA; el rRNA 5S, componente integral de la subunidad grande de todos los ribosomas citoplasmáticos; el RNA 7SL, componente de la partícula de reconocimiento de señal (SRP, *signal recognition particle*), la cual dirige integralmente proteínas membranales y secretoras a la maquinaria de translocación de proteínas celulares durante la traducción; el RNA pequeño nucleolar snR52, RNA no codificante (ncRNA) que participa en la modificación de los snRNAs; los componentes RNA de SRP1 que median la importación de proteínas nucleares; y RNase P (RPR1), una endonucleasa que escinde los pre-tRNA para producir extremos 5' maduros (Turowski y Tollervey, 2016; Hoffmann *et al.*, 2015). La RNA Pol III ha sido ampliamente caracterizada en *S. cerevisiae* (Kassavetis y Geiduschek, 2006; Turowski y Tollervey, 2016).

1.3.3.1 Estructura y función

RNA Pol III es la más grande de las tres RNA polimerasas, conteniendo 17 subunidades (de las cuales 5 son únicas de RNA Pol III) (Figura 10) con un peso molecular total de 0.7 MDa. Por su parte, las RNA Pol I y RNA Pol II están compuestas de 14 y 12 subunidades, respectivamente. La arquitectura del núcleo de 10 subunidades está conservado entre

todas las RNA polimerasas eucariotas. De las 17 subunidades de RNA Pol III, 16 son esenciales para la viabilidad celular (Schramm y Hernández, 2002; Hoffmann *et al.*, 2015; Geiduschek y Kassavetis, 2001).

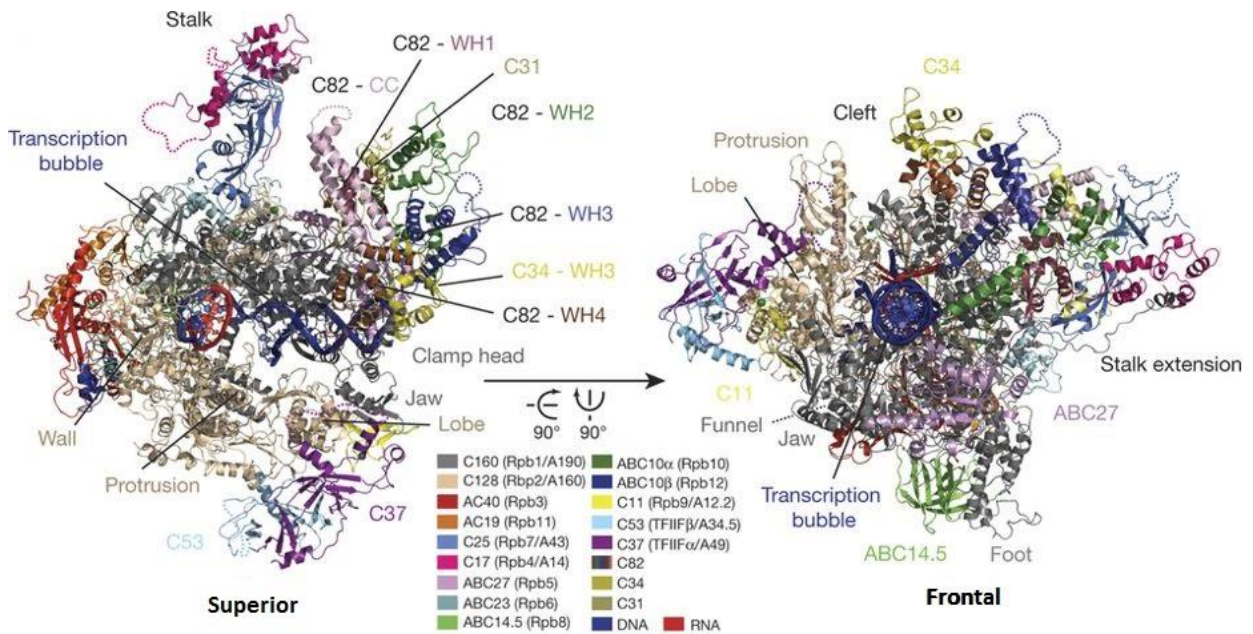


Fig. 10. Vista superior y frontal de la RNA Pol III. Los dominios y elementos individuales están etiquetados. El código de color está representado en los cuadros correspondientes. Modificado de Hoffmann *et al.*, 2015.

Las subunidades C34, C31 y C82 forman un subcomplejo necesario para el inicio de la transcripción que no tiene una contraparte en alguna de las otras RNA polimerasas. Se ha demostrado que la subunidad C34 interactúa con la subunidad Brf1 del factor de transcripción TFIIB, y que esta unión es determinante en el reconocimiento del complejo de preiniciación. C34 también influencia la formación de un complejo abierto del promotor, jugando un rol esencial en la iniciación de la transcripción (Brun *et al.*, 1997; Schramm y Hernandez, 2002).

1.3.3.2 Promotores

Existen tres clases principales de promotores que reconoce la RNA Pol III, llamados Tipo 1, 2 y 3 (Figura 11). El promotor tipo 1 se encuentra en el gen de rRNA 5S (Sakonju *et al.*,

1980). Estos promotores se componen de elementos intragénicos que consisten en una Caja A, un elemento intermedio y una Caja C, juntos conforman la región de control interno (RCI).

Los promotores de tipo 2 están constituidos por dos elementos, una Caja A y una Caja B. Estos promotores están bien conservados en los genes de tRNA de varias especies y al igual que los de tipo 1 son intragénicos (Schramm y Hernández, 2002).

Los promotores de tipo 3, a diferencia de los anteriores, se caracterizan por una composición de elementos extragénicos, tales como una caja TATA, un elemento de secuencia proximal (ESP) y un elemento de secuencia distal (ESD). Estos promotores están presentes en el gen de snRNA U6 de mamíferos (Figura 11) (Krol *et al.*, 1987).

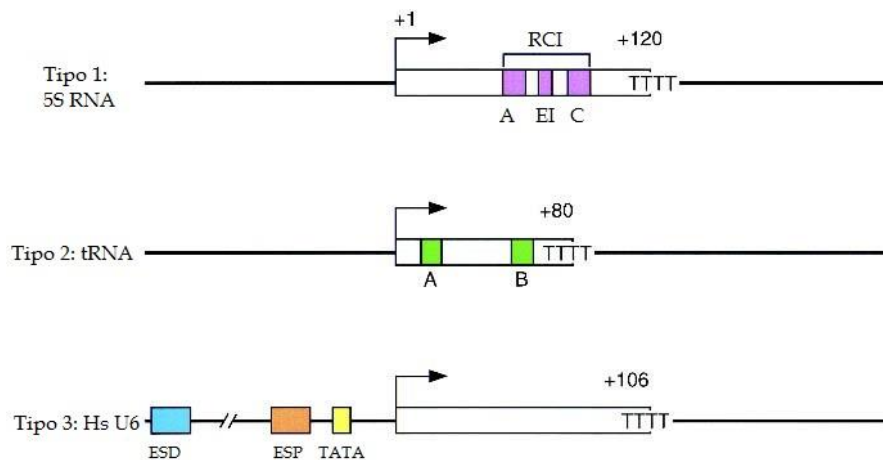


Fig. 11. Promotores de la RNA Pol III. En la imagen se ilustran las diferentes secuencias consenso. La flecha indica el sitio de inicio de la transcripción. La región de Ts indica el sitio de término de la transcripción.

1.3.3.3 Factores de transcripción

Para la formación del PIC es necesario el reclutamiento de RNA Pol III por los factores generales de transcripción. Diez genes esenciales codifican las subunidades de los factores de iniciación de la transcripción de RNA Pol III en *S. cerevisiae*: TFIIA, TFIIC (compuesto

por seis subunidades) y TFIIB (formado por tres subunidades) (Figura 12). TFIIB es el factor de reclutamiento central de RNA Pol III, y está integrado por TBP, Brf1 (subunidad relacionada con TFIIB) y Bdp1. TFIIC recluta a TFIIB a sus sitios en el DNA río arriba del inicio de la transcripción (Kassavetis *et al.*, 1990; Geiduschek y Kassavetis, 2001).

TFIIIA, proteína que presenta nueve dedos de zinc, es el miembro fundador de la familia de proteínas que contienen este dominio de unión al DNA. En *S. cerevisiae*, el único rol esencial de TFIIIA es la transcripción de los genes de rRNA 5S, ya que forma la plataforma para unir a TFIIC a estos genes. TFIIIA se une directamente al elemento RCI del promotor tipo 1 (Schramm y Hernandez, 2002).

TFIIB es una proteína de unión a DNA que puede reclutarse río arriba del sitio de inicio de la transcripción de dos maneras: mediante interacción directa con una caja TATA (a través de su subunidad TBP) en los promotores tipo 3, o a través de la interacción con TFIIC anclado al DNA, en los promotores tipos 1 y 2. En cualquier caso, TBP termina en contacto con, o muy cerca del DNA. Una vez unida TBP, el complejo es reconocido por Brf1. Después se asocia Bdp1 mediante interacciones proteína-proteína (con Brf1 y TBP) y proteína-DNA (interactuando con la caja TATA o secuencias cercanas al sitio de inicio) (Figura 12) (Schramm y Hernandez, 2002).

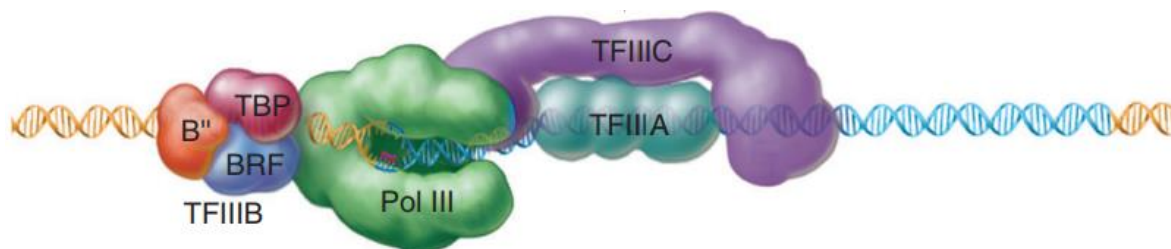


Fig. 12. PIC de la transcripción de la RNA Pol III. Se muestran los factores de transcripción utilizados para el reclutamiento de RNA Pol III al sitio de inicio de la transcripción.

El reclutamiento de la RNA Pol III se genera principalmente por la interacción entre Brf1 y la subunidad C34 de la RNA Pol. Sorprendentemente, TBP también interactúa con la subunidad Tau60 de TFIIC, que sirve como enlazador flexible entre los dominios de unión a las cajas A y B (Geiduschek y Kassavetis, 2001).

1.3.3.4 TFIIC

TFIIC reconoce elementos promotores (ya sea directamente en el caso de los promotores de tipo 2, o con la ayuda de TFIIIA en el caso de los promotores de tipo 1), recluta a TFIIB y contribuye así al reclutamiento de RNA Pol III (Schramm y Hernandez, 2002).

En levadura, TFIIC se conforma por seis subunidades con una masa total de 520 kDa: Tau55 (Tfc7), Tau60 (Tfc8), Tau91 (Tfc6), Tau95 (Tfc1), Tau131 (Tfc4) y Tau138 (Tfc3) (Figura 13). Las seis subunidades son esenciales *in vivo*, y están organizadas en dos dominios globulares, Tau A y Tau B, llamados así por su respectiva unión a cajas A y B en los promotores de genes de tRNA. Las subunidades que forman Tau A son Tau95, Tau55 y Tau131, mientras que Tau B está integrado por Tau60, Tau91 y Tau138 (Figura 13). Los dos dominios se encuentran conectados por una región flexible sensible a proteólisis. La flexibilidad de TFIIC le permite unirse a tRNAs que presentan una distancia muy variable entre sus cajas A y B (Geiduschek y Kassavetis 2001). La unión de Tau B a la caja B es predominante sobre la interacción de baja afinidad de Tau A con la caja A. No obstante, el dominio Tau A es esencial para la activación de la transcripción y la selección del sitio de inicio, ya que regula el ensamblaje de TFIIB, dirigiendo fuertemente su posición de unión al DNA río arriba de la región transcrita (Jourdain *et al.*, 2003). En humanos, se han identificado los ortólogos de las seis subunidades de levadura, con una similitud de secuencia más alta entre las subunidades de Tau A (Male *et al.*, 2015).

Se han realizado diversos estudios sobre las distintas subunidades de TFIIC. Taylor *et al.* (2013a) caracterizaron un dominio de fosfatasa de Tau55 en *S. cerevisiae*, el cual puede contribuir a la regulación de la maquinaria de transcripción mediante el equilibrio entre

eventos de fosforilación y desfosforilación. Además, se ha sugerido que el heterodímero Tau95/Tau55 forma un complejo independiente de TFIIC, que parece desfosforilar componentes de la maquinaria de transcripción *in vitro*, complementando la actividad de Tau55 unida a TFIIC. Taylor *et al.* (2013b), estudiaron la organización estructural del heterodímero Tau95/Tau55 en *Schizosaccharomyces pombe* mediante la obtención de su estructura cristalina, donde se determinaron los dominios y la similitud que tiene con el heterodímero Rap30/Rap74 de TFIIF. Mylona *et al.* (2006) presentaron la estructura cristalina de Tau60 en unión con el fragmento C-terminal de Tau91.

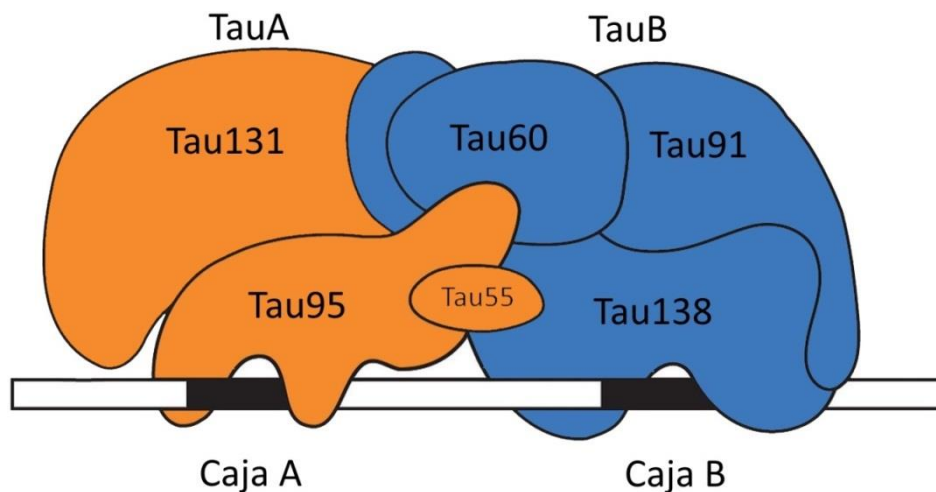


Fig. 13. Subunidades de TFIIC y su unión al DNA. En tono naranja se ilustra las subunidades correspondientes al subdominio Tau A, y en azul las que pertenecen a Tau B.

1.3.3.4.1 Tau95

En levadura, Tau95 es una subunidad de 95 kDa, producto de la transcripción del gen *TFC1*. Es la subunidad de TFIIC que interactúa directamente con la Caja A de genes de tRNA y 5S rRNA, ayudando a la determinación de los sitios de inicio de la transcripción en cooperación con TFIIB. En levadura, no hay evidencia de que Tau95 interactúe con componentes de TFIIB, pero en humano sí se ha demostrado que Tau95 interactúa con TBP, Brf1 y con la RNA Pol III (Jourdain *et al.*, 2003). En un estudio de Jourdain *et al.* (2003)

encontraron que el mutante $\tau 95\text{-E447K}$ influye en la ubicación de Tau131 río arriba del sitio de inicio, afectando el posicionamiento de TFIIIB y la selección del sitio de inicio.

En 1998, Manaud *et al.* encontraron que Tau95 y Tau55 forman un heterodímero, y que éste puede formar subcomplejos dentro de TFIIIC o independientemente de éste, uniéndose a otras proteínas. En 2013(b), Taylor *et al.* realizaron una caracterización estructural y funcional del heterodímero Tau95/Tau55 en *S. pombe*, el cual se forma mediante un dominio de barril triple β . En este estudio se encontraron algunos detalles interesantes sobre estas subunidades. Primero, se obtuvo el cristal del heterodímero y se encontró que Tau95 está conformado por dos dominios unidos por un enlazador sensible a proteólisis. El primer dominio se denominó dominio de dimerización; el segundo es el dominio de unión en DNA (DBD), compuesto por un subdominio conocido como *winged helix*. En este estudio se realizó una búsqueda de similitud y se encontró que este heterodímero tiene una conformación estructural muy similar a la de las subunidades Rap30/Rap74 de TFIIIF. Se ha propuesto a Tau95 funciona como un enlazador entre los dominios Tau A y Tau B, basado en experimentos de co-inmunoprecipitación que muestran la unión de esta subunidad a la subunidad Tau138 (Jourdain *et al.*, 2003).

1.3.4 Expresión genética en tripanosomátidos

En 2005 se publicaron los proyectos de secuenciación genómica de tres tripanosomátidos: *T. cruzi*, *T. brucei* y *L. major*. Esto representó un avance científico significativo para el estudio de la biología de estos organismos. Los genomas de los tripanosomátidos se organizan en grandes agrupaciones de genes policistrónicos, esto es, decenas a cientos de genes codificantes de proteínas acomodados secuencialmente en la misma cadena de DNA (Martínez-Calvillo *et al.*, 2010).

Análisis comparativos entre los tres genomas de estos tripanosomátidos, han revelado que comparten 6158 genes que codifican proteínas. Además, estos genes existen en

grandes bloques sinténicos, es decir, que el orden de los genes está altamente conservado (Kissinger, 2006).

1.3.4.1 Organización de los genes

El DNA nuclear de *L. major* está distribuido en 36 cromosomas y tiene una longitud de 32.8 megabases (Mb). La organización inusual de genes en tripanosomátidos, en forma de agrupaciones o *clusters* de genes policistrónicos, se observó por primera vez en el cromosoma 1 de *L. major* (el primer cromosoma completamente secuenciado en tripanosomátidos), que contiene 85 genes organizados en dos *clusters* divergentes, con los primeros 32 genes agrupados en la hebra inferior y los 53 genes restantes agrupados en la hebra superior (Myler *et al.*, 1999).

Leishmania y otros tripanosomátidos presentan muy pocos intrones, ya que solo se han observado en dos genes. Como consecuencia de la transcripción policistrónica, los genes están densamente agrupados y separados por regiones intergénicas cortas, ricas en trectos de pirimidinas que son importantes para el procesamiento del mRNA y la regulación de los genes. Los arreglos en tándem de genes de rRNA se encuentran entre los grandes *clusters* de genes policistrónicos.

Los genes de tRNA se organizan en *clusters* ubicados principalmente en los límites de los *clusters* de genes policistrónicos (De Gaudenzi *et al.*, 2011). En *L. major*, los 83 genes de tRNA están distribuidos en 31 loci, en 19 cromosomas diferentes. La mayoría de los genes de tRNA están organizados en grupos de dos a diez genes, en la cadena superior o inferior, que pueden contener otros genes transcritos de RNA Pol III. Los 11 genes de 5S rRNA encontrados en el genoma de *L. major* se distribuyen en seis cromosomas, y siempre están asociados a genes de tRNA (Padilla-Mejía *et al.*, 2009).

1.3.4.2 Transcripción policistrónica de la RNA Pol II

La mayoría de los cromosomas en tripanosomátidos tienen al menos dos unidades policistrónicas, que se transcriben mediante la RNA Pol II, generando transcritos policistrónicos que se procesan por *trans-splicing* y poliadenilación para producir los mRNA maduros (Figura 14) (Martínez-Calvillo *et al.*, 2018). Los genes de una unidad policistrónica generalmente no codifican para proteínas relacionadas funcionalmente, completamente opuesto a lo que se observa con los operones en bacterias. Además, los mRNAs de los genes que se encuentran en una misma unidad pueden mostrar concentraciones diferentes, 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.

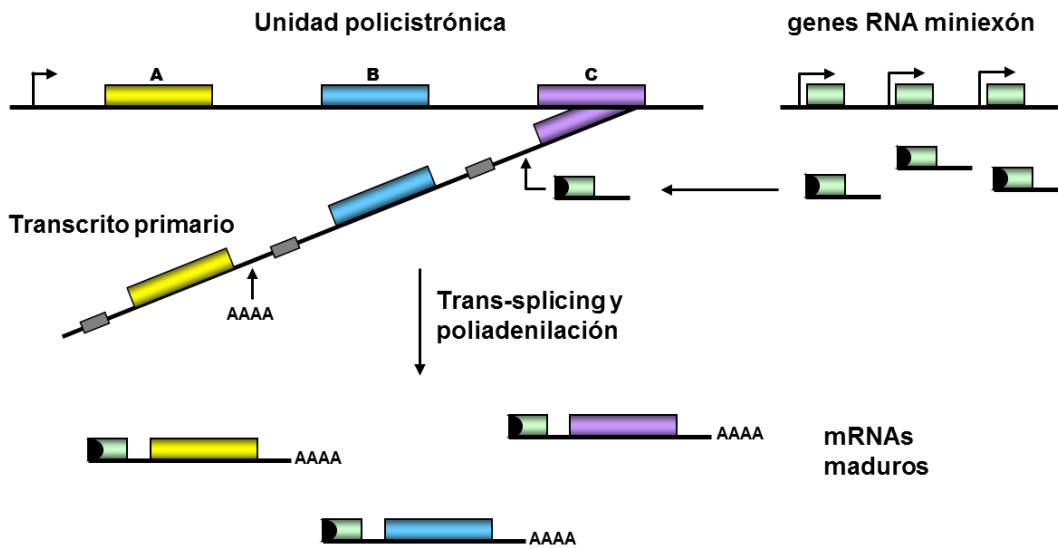


Fig. 14. Transcripción policistrónica, *trans-splicing* y poliadenilación en tripanosomátidos. Tomado de Martínez-Calvillo *et al.*, 2012.

El *trans-splicing* consiste en la adición de un RNA de 39 nucleótidos (llamado miniexón o *spliced-leader*) al extremo 5' de todos los mRNAs (Figura 14). El *spliced-leader* es necesario para la estabilidad del mRNA, pues contiene una estructura cap. El dinucleótido AG en el sitio de empalme 3' y un tracto de poli-pirimidinas son las secuencias más prominentes y altamente conservadas que son requeridas para el correcto *trans-splicing* del pre-mRNA.

La reacción se puede dividir en dos pasos, análogos a las dos reacciones de transesterificación del *cis-splicing* y son llevados a cabo por un complejo de RNPs denominado empalmosoma (Figura 15). Este complejo está formado por las snRNPs U1, U2, U4/U6 y U5, cada una asociado a proteínas Sm, las cuales permiten a las snRNP su transporte de vuelta al núcleo y aumentar la eficiencia con la que reconocen a los pre-mRNA. En el *trans-splicing* se forma una estructura intermedia con forma de "Y" (Figura 15) (Martínez-Calvillo et al., 2012). La RNA Pol II es la encargada de transcribir los genes del *spliced-leader* (Gilinger y Bellofatto, 2001). El control de la abundancia de los transcritos puede ser determinado por elementos *cis* que afectan el procesamiento y la estabilidad del mRNA (Campbell et al., 2003).

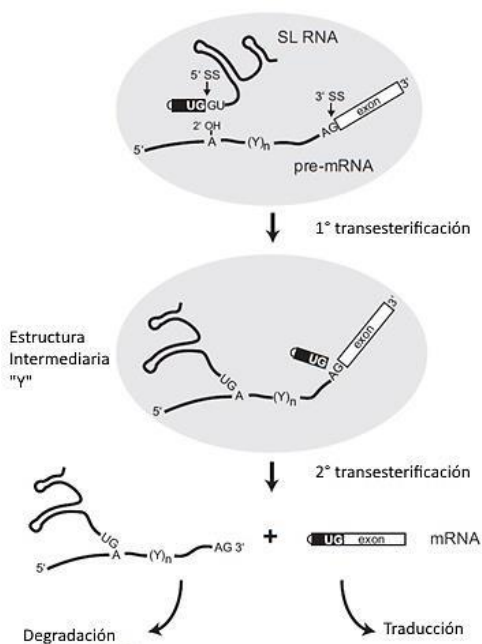


Fig. 15. Mecanismo de *trans-splicing*. Se señala el SL RNA, pre-mRNA, incluyendo el punto de ramificación (A), tracto de polipirimidinas (Y)_n y el exón. Tomado de Preusser et al., 2012.

1.3.4.3 RNA Pol I

Como en otros organismos, la RNA Pol I sintetiza los rRNA en *Leishmania* y el resto de los tripanosomátidos. Una característica distintiva de estos organismos es la

multifragmentación del rRNA tipo 28S en seis moléculas independientes: 24S- α , 24S- β , srRNA1, srRNA2, srRNA3 y srRNA4 (Zhang *et al.*, 2016).

La organización general, pero no la secuencia, del promotor de rRNA se conserva entre tripanosomátidos. La transcripción se inicia ~1 kb río arriba del gen 18S rRNA en *L. donovani*, *L. chagasi*, *L. amazonensis*, *T. cruzi* y *C. fasciculata*, pero la secuencia que rodea este sitio es bastante diferente entre los distintos géneros. En *L. donovani*, los elementos esenciales para la función promotora se identificaron en -69 a -57, -46 a -27 y -6 a +4, en relación con el sitio de inicio de la transcripción (+1). Así, el promotor del rRNA en *Leishmania* es mucho más pequeño que en otros eucariontes, donde el promotor de rRNA está formado generalmente por cuatro dominios (Yan *et al.*, 1999).

Además de transcribir los genes del rRNA, la RNA Pol I en *T. brucei* tiene la extraordinaria capacidad de sintetizar los mRNAs de dos de las proteínas más abundantes del parásito: las glicoproteínas variables de superficie (VSGs) en la forma sanguínea, y las prociclinas en el estadio procíclico (Das *et al.*, 2007; Park *et al.*, 2011).

1.3.4.4 RNA Pol III

La RNA Pol III, como se ha mencionado antes, funciona para sintetizar moléculas pequeñas de RNA en células eucarióticas, incluido el rRNA 5S, los tRNAs, los snoRNAs y un conjunto de los snRNAs ricos en uracilo. Esta importante enzima y sus factores asociados no se han caracterizado en detalle en los tripanosomátidos. El análisis bioinformático ha descubierto homólogos en tripanosomátidos de muchas de las subunidades de RNA Pol III (Das *et al.*, 2007).

En 2007, Martínez-Calvillo *et al.*, realizaron una caracterización de la RNA Pol III en *L. major*, donde se confirmó mediante purificación por afinidad en tándem y espectrometría de masas, la presencia de las siguientes subunidades: C160, C128, C82, C34, C53, C37, C17

ABC27, ABC23, ABC14.5, ABC10 β , AC40 y AC19. Otras subunidades como ABC10 α , C25 y C11, fueron encontradas mediante BLAST, sin embargo la subunidad C31 no fue encontrada por ningún método. También se documentó que el genoma de *L. major* contiene una copia truncada de C82 que no está presente en *T. brucei* o *T. cruzi*, y parece haber surgido durante una recombinación entre los extremos de los cromosomas 2 y 27, lo que resultó en la duplicación de varios otros genes. Es probable que esta copia represente un pseudogen.

En lo referente a los promotores de RNA Pol III, se han establecido las secuencias consenso de las Cajas A y B de los genes de tRNA en tripanosomátidos. Asimismo, se encontraron características especiales en los Cajas A y B de los genes tRNA-Sec (Selenocisteína), lo que sugiere que los mecanismos que regulan su transcripción podrían ser diferentes de los de otros genes tRNA (Padilla-Mejía *et al.*, 2009).

También se ha demostrado que las Cajas A y B de los genes de tRNA funcionan como promotores de algunos snRNA. En 1994, Nakaar *et al.* demostraron que la expresión de U6 snRNA y 7SL depende de las Cajas A y B localizadas río arriba, dentro de genes de tRNA. El snRNA U6 requiere el promotor del gen tRNA además de su propio elemento intragénico. De la misma manera, se ha encontrado que la transcripción del U2 snRNA de *L. major* depende de las cajas A y B del promotor del gen de un tRNA-like cercano, así como de la caja B del tRNA-Ala ubicado río arriba (Rojas-Sánchez *et al.*, 2016).

Los genes de tRNAs han sido asociados también con los genes de 5S rRNA, los cuales, en la gran mayoría de los casos, están precedidos a una corta distancia por genes de tRNA. Se ha considerado que, además de los promotores internos, las cajas A y B de los genes cercanos de tRNA podrían participar en la regulación transcripcional de los genes de 5S rRNA (Moreno-Campos *et al.*, 2016).

1.4 Antecedentes

En nuestro laboratorio, estamos interesados en el estudio de los mecanismos moleculares de la transcripción de la RNA Pol III en tripanosomátidos. De los tres factores generales de transcripción de RNA Pol III, sólo ha sido identificado y caracterizado TFIIIB, del cual se han estudiado sus tres subunidades: TBP, Brf1 y Bdp1. En 2015, Vélez-Ramírez *et al.*, encontraron que Brf1 es esencial para la viabilidad de formas procíclicas de *T. brucei*; el *knock-down* de la proteína por interferencia de RNA (RNAi) produjo una reducción en la transcripción de los genes dependientes de la RNA Pol III. Además, mediante purificaciones por afinidad en tándem con TBP como blanco, se demostró la interacción entre TBP y Brf1 (Schimanski *et al.*, 2005). Bdp1 fue caracterizado en *L. major*, y se encontró que posee el característico dominio SANT extendido, y que se asocia a las regiones promotoras que regulan la transcripción de RNA Pol III, además de ser esencial para el crecimiento de promastigotes (Román-Carraro *et al.*, 2019). También ha sido estudiado el represor de la transcripción Maf1 en *T. brucei*, encontrándose que es un regulador negativo de la transcripción, función que se ha conservado en múltiples organismos desde levaduras hasta plantas y vertebrados. Al inhibir la transcripción de los genes dependientes de RNA Pol III, disminuye el crecimiento de las células en su forma procíclica; además se evidenció una disminución en la transcripción de prociclinas y genes de SL RNA (Romero-Meza *et al.*, 2017). TFIIIC, otro factor de transcripción de la RNA Pol III, ya ha sido estudiado desde hace algunas décadas en humano (Lassar *et al.*, 1983; Yoshinaga *et al.*, 1987; Wang *et al.*, 2000) y en levaduras (Marzouki *et al.*, 1986; Parsons y Weil, 1990; Huang *et al.*, 2000). Sin embargo, en tripanosomátidos no se encuentra evidencia reportada de la presencia del factor TFIIIC.

La técnica de purificación por afinidad en tándem, usando una etiqueta PTP, ha sido una herramienta ampliamente utilizada en la caracterización de complejos transcripcionales en los tripanosomátidos. La etiqueta PTP consiste en un epítipo de proteína A (ProtA) duplicado, un sitio de corte de la proteasa del virus del tabaco (TEV) y el epítipo de la proteína C (ProtC) (Shimanski *et al.*, 2005). Una vez que se obtiene la construcción

plasmídica en la que el gen de interés se fusiona con el péptido de extracción PTP, se introduce en el organismo de interés, logrando con esto la expresión de la proteína recombinante. A nivel celular la proteína marcada interacciona libremente con las proteínas de su complejo. Posteriormente se realizan dos cromatografías de afinidad (en matrices con inmunoglobulina G y ProtC) para purificar la proteína blanco y las proteínas asociadas a ella. Las proteínas purificadas son después analizadas por SDS-PAGE y por espectrometría de masas.

Mediante el uso de esta técnica, usando como blanco a la subunidad C82 de la RNA Pol III, identificamos recientemente en nuestro laboratorio a un probable ortólogo de la subunidad Tau95 en *L. major* (LmTau95) (datos no publicados). Resulta ahora necesario estudiar la estructura y función de esta proteína para confirmar su papel en la transcripción de la RNA Pol III en este grupo de organismos de divergencia temprana. Por todo lo anterior, en el presente trabajo se analizó *in silico* la secuencia y estructura de LmTau95 para determinar la presencia de secuencias características de ortólogos de Tau95. Asimismo, se llevaron a cabo ensayos de purificación por afinidad en tándem para identificar otras subunidades del factor de transcripción TFIIC en *L. major*.

2. Objetivos

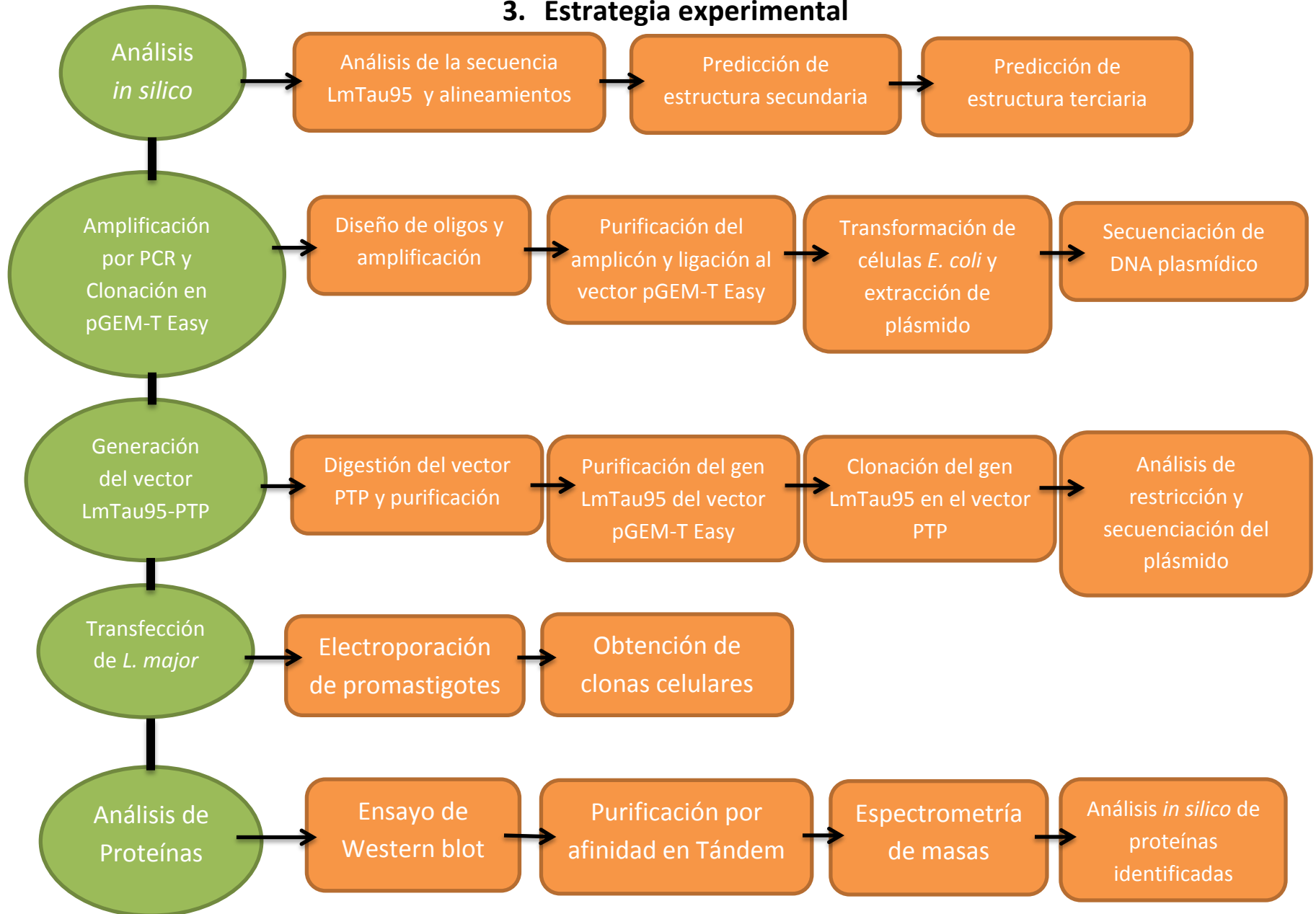
2.1 Objetivo General

Identificar el complejo proteico asociado con la proteína recombinante Tau95-PTP en promastigotes de *L. major*.

2.2 Objetivos particulares

- Realizar un análisis *in silico* de la secuencia de LmTau95.
- Producir un vector en el que el gen de LmTau95 se fusione a la bandera PTP.
- Transfectar promastigotes de *L. major* con el vector resultante y obtener clonas celulares.
- Verificar la expresión de la proteína recombinante LmTau95-PTP en las clonas celulares.
- Identificar las proteínas con las que se asocia LmTau95-PTP mediante ensayos de purificación por afinidad en tándem.

3. Estrategia experimental



4. Metodología

4.1 Análisis *in silico*

Las secuencias de los genomas de *L. major* y de otros tripanosomátidos se encuentran disponibles en TriTrypDB (<http://tritrypdb.org/tritrypdb/>). Se realizaron alineamientos para el análisis de la secuencia de aminoácidos de Tau95 comparando *L. major* con distintas especies de tripanosomátidos (*L. infantum*, *L. mexicana*, *L. donovani*, *L. panamensis*, *L. braziliensis*, *T. brucei* y *T. cruzi*), así como de otros eucariontes (*Homo sapiens*, *Mus musculus*, *Drosophila melanogaster*, *S. cerevisiae* y *Schizosaccharomyces pombe*) usando el programa Clustal Ω (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>). Para la predicción de estructura secundaria se utilizaron los programas Swiss-Model (disponible en el sitio web <https://swissmodel.expasy.org/>) y Phyre² (disponible en el sitio web <http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/html/page.cgi?id=index>). Para el modelado tridimensional por homología se utilizó el programa PyMOL 2.2, usando como molde los cristales de *S. pombe* (PDB: 4bji y 4bjj).

4.2 Cultivo de *L. major*

Promastigotes de la cepa *L. major* Friedlin fueron crecidos a 28°C en medio líquido BM que contiene: medio M199 0.5x, bicarbonato de sodio 1.1 g/l, 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 resembrados una vez que alcanzaron la fase estacionaria.

Las células de *L. major* se contaron haciendo una dilución 1:10 (para esto se tomaron 50 μ l de cultivo y se llevaron a 500 μ l con PBS-formaldehído al 2%). De esta dilución se tomaron 10 μ l y se colocaron en una cámara de Neubauer, contando el número de células observado dentro de los cuadros en diagonal de los cuadrantes de cada esquina. La suma total de células se multiplicó por 10^5 para obtener el número de parásitos por ml de

cultivo, de esta manera los cultivos se contaron y resembraron cada 3 o 4 días a una densidad inicial de 5×10^6 células/ml.

4.3 Amplificación por PCR

El gen codificante de LmTau95 (LmjF.21.1100) de 2100 pb (sin codón de paro) se amplificó mediante reacciones de PCR. Los oligonucleótidos empleados fueron LmTau95-*Xma*I-For (5'-ACCCGGGCCATGACCGCTCCACACGGC-3') y LmTau95-*Xba*I-Rev (5'-CGGCGGACGACGACGACGAGTCTAGAC-3'). Estas secuencias además contienen los sitios de restricción para *Xma*I (CCCGGG) y *Xba*I (TCTAGA) respectivamente en el extremo 5'. El diseño de estos oligonucleótidos se realizó con base en la secuencia de Tau95 de *L. major* obtenida de TriTrypDB. Las reacciones se llevaron a cabo en tubos de PCR empleando las condiciones mostradas en la Tabla 1.

Para la reacción de PCR se utilizaron 100 ng de DNA genómico de la línea celular *L. major wild type* como molde, DNA Taq Polimerasa Kapa HiFi, buffer de reacción Kapa HiFi 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 utilizó el termociclador Bio-Rad T100 para la amplificación de la secuencia.

No. de ciclos	Condiciones
1	95°C por 3 min.
30	Desnaturalización: 98°C por 30 seg. Alineamiento: 66, 68.4 y 70°C por 30 seg. Extensión: 72°C por 150 seg.
1	72°C por 7 min.

Tabla 1. Condiciones para la amplificación del gen LmTau95 por PCR.

4.4 Clonación en el vector pGEM-T-Easy

El producto de PCR obtenido se precipitó utilizando 0.1 volumen de acetato de sodio 3M (pH 5.5) y 2.5 volúmenes de etanol absoluto, manteniendo a -20°C toda la noche. Al siguiente día se centrifugó a 13,000 rpm por 15 min. Una vez obtenida la pastilla se resuspendió en 30 µl de agua bidestilada y se separó en un gel de agarosa al 0.8% por ~2 h a 100 voltios. Con ayuda de un transiluminador UVP (M-26) se identificó la banda de interés y se cortó el fragmento de gel que la contenía. Se colocó en tubos Eppendorf de 1.5 ml, se midió la masa del fragmento 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 adenilación o adición de A-terminal usando ~140 ng de DNA, adicionando 1 µl (2.5 U) de DNA Taq Pol (Kapa Biosystems), Buffer Kapa B Taq 1×, y 1 µl de dATP 2 mM en un volumen final de 10 µl, durante 30 min, a una temperatura de 70°C. El DNA fue adenilado, para poder realizar la ligación del amplicón al vector pGEM-T-Easy (Promega).

La ligación se realizó con 77.7 ng de DNA adenilado en una proporción 7:1 inserto:vector usando 1U de enzima T4 DNA ligasa (Promega), buffer de ligación 1× y 37.5 ng de vector en un volumen final de 10 µl, y se incubó toda la noche a 4°C.

4.5 Transformación de células competentes

Con el vector pGE-LmTau95 se transformaron células competentes de *Escherichia coli* cepa JM109 de alta eficiencia (1×10^8) (Promega), siguiendo las recomendaciones del fabricante. Las células transformadas fueron plaqueadas en LB agar que contenía ampicilina 100 µg/ml, 100 µl de IPTG (100 mM) y 20 µl de Xgal (50 mg/ml), incubando toda la noche a 37°C. Se seleccionaron dos colonias blancas y se inocularon en 5 ml de medio LB con ampicilina 100 µg/ml, incubando a 37°C con agitación de 250 rpm. Posteriormente, se purificó DNA de plásmido de los cultivos obtenidos, empleando el Kit

NucleoSpin Plasmid (Macherey-Nagel). El DNA de plásmido purificado fue digerido para liberar el inserto de LmTau95 del vector. Para ello, se realizaron digestiones enzimáticas dobles con las enzimas *Xba*I y *Xma*I y digestiones sencillas con la enzima *Eco*RI. El resultado fue analizado mediante electroforesis.

Las construcciones obtenidas se enviaron a secuenciar a 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, mediante el método “BIG DYE Terminator Fluorescent Based Sequencing”, con un equipo ABI 3100. Así, se generó y caracterizó el vector pGE-LmTau95.

4.6 Generación del vector PTP

Para subclonar el inserto de LmTau95 al vector PTP, se digirió el vector pB6-PTP con las enzimas *Xba*I y *Xma*I para así liberar dos fragmentos: El gen RPB6 (507 pb) y el vector PTP de 6.7 kb. El inserto de LmTau95 se liberó del vector pGE-LmTau95 mediante la digestión con las enzimas *Xba*I y *Xma*I. El inserto y el vector fueron separados y purificados de un gel de agarosa al 0.8% empleando el kit NucleoSpin Gel and PCR clean-up Extract II.

Se utilizó una proporción de 7:1 del inserto LmTau95 y el vector PTP, usando 100 y 200 ng del vector, con 232 y 440.8 ng de inserto, respectivamente. Para cada reacción se adicionó 1U de enzima T4 DNA ligasa (Promega) y buffer de ligación 1x en un volumen final de 10 µl. Las reacciones se dejaron incubando durante toda la noche a 4°C. El producto de ligación se empleó para electroporar células de *E. coli* electrocompetentes ElectroMax DH5αE (Invitrogene®) y, una vez transformadas, se plaquearon en LB agar con ampicilina 100 µg/ml. Posteriormente, se tomaron cinco colonias para su análisis mediante la extracción del DNA plasmídico, para su digestión con enzimas de restricción y secuenciación.

El DNA de plásmido que se secuenció, fue extraído empleando el kit comercial para miniprep NucleoSpin Plasmid (Macherey-Nagel) siguiendo las instrucciones y recomendaciones del fabricante.

Posteriormente, se hizo un midiprep para la obtención de DNA plasmídico a mayor escala. Para ello se inocularon 500 ml de medio LB más ampicilina 100 µg/ml con las células transformadas con LmTau95-PTP y se incubaron 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, mediante electroforesis, el tamaño correcto de vector e inserto. Este DNA fue utilizado 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 BM. Para realizar la transfección por electroporación, 1×10^8 células se centrifugaron a 4,000 rpm durante 10 min a 4°C. Posteriormente, la pastilla se lavó con 10 ml de PBS-G (NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM, Na₂HPO₄ 10 mM, KH₂PO₄ 2 mM, complementado con 6 mM de glucosa, pH 7.4) y se centrifugó nuevamente. La pastilla se resuspendió en 10 ml de amortiguador cytomix (HEPES 25 mM pH 7.6, KCl 120 mM, CaCl₂ 0.15 mM, K₂HPO₄/ KH₂PO₄ 10 mM pH 7.6, EDTA 2 mM, MgCl₂ 5 mM). Las células fueron centrifugadas y resuspendidas en 400 µl de amortiguador cytomix y transferidas a una cubeta de electroporación de 4 mm (Electroporation Cuvettes Plus™, BTX®) previamente enfriada, donde se agregaron 25 µg de DNA plasmídico LmTau95-PTP. Se mezcló suavemente y se incubó en hielo por 10 min. Se aplicó un pulso de 1600 volts, 25 ohms y 50 µF en un equipo ECM Electro Cell Manipulator (BTX®). Inmediatamente después se colocaron en hielo por 10 min. Ya realizada la electroporación, los cultivos se transfirieron a tubos cónicos de 50 ml con 10 ml de medio BM y se incubaron a 40 rpm y 28°C. 24 h después se adicionó la droga G418 a una concentración de 25 µg/ml. 24 h

después se volvió a adicionar G418, para obtener una concentración final de 50 µg/ml. Las células fueron monitoreadas hasta su recuperación y se trasladaron a cajas de cultivo de 25 cm², para obtener así las poblaciones transfectantes estables.

4.8 Obtención de clonas celulares

Una vez que se obtuvieron cultivos transfectados estables se continuo con la clonación, para esto las poblaciones se resembraron cada 24 horas al menos tres veces para mantenerlos en fase media logarítmica, posteriormente se continuó con la obtención de clonas celulares en medio BM con agarosa al 0.8% (SeaPlaque GTG, Cambrex®). Una vez hecho el conteo celular, se prepararon diluciones de 2000, 1000, 500, 200 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 BM, SFB 20%, agarosa SeaPlaque GTG al 0.8% y G418 50µg/ml) expandiéndose de manera homogénea sobre toda la superficie. La temperatura de incubación fue de 28°C con 5% de CO₂. Los cultivos se monitorearon hasta la aparición de las primeras colonias (aprox. 16 días), las cuales, se seleccionaron y transfirieron a cajas de cultivo de 25 ml con medio BM más G418 y se crecieron a 28°C.

Para la crio-preservación de las líneas celulares se tomaron 1×10⁸ células por cada clona, se centrifugaron a 4,000 rpm durante 10 min a 4°C. Las pastillas se resuspendieron cada una en 1 ml de suero fetal bovino con 10% de glicerol y se transfirieron a crioviales que se almacenaron a -70°C por 24 h. Al día siguiente se transfirieron a un tanque con nitrógeno líquido. 48 h después, los crioviales se descongelaron y se diluyeron con 4 ml de medio BM sin drogas de selección. 24 h después se les agregó la mitad de la concentración de G418 y 48 h después se les adicionó la concentración final de la droga.

4.9 Análisis de la expresión de proteínas recombinantes

Mediante un ensayo de Western blot, se llevó a cabo el análisis de expresión de las proteínas recombinantes en poblaciones y clonas celulares. Primero, se extrajeron las proteínas empleando el buffer RIPA. Para ello se tomó una muestra de 100×10^6 células de la línea LmTau95-PTP y se centrifugaron a 4000 rpm por 10 min y fue lavada con 500 μ l de PBS frío dos veces. Se resuspendió en 100 μ 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 1 \times). Se incubó posteriormente en hielo por 30 min, vortexeando cada 5 min durante 5 seg. Se centrifugó a 14,000 rpm durante 20 min. Posteriormente se analizó la fracción soluble, que corresponde a las proteínas, mediante cuantificación por Bradford.

Después, las proteínas extraídas se desnaturalizaron, agregando 5 μ l de muestra con buffer Laemmli 1 \times (Tris-HCl 22 mM pH 6.8, SDS 2%, azul de bromofenol 0.02%, glicerol 10% y β -Mercapto etanol 5%), se colocaron en tubos de 1.5 ml y se mantuvieron durante 10 min en agua en ebullición. Inmediatamente después se transfirieron a hielo durante cinco minutos. Las muestras se fraccionaron en un gel de poliacrilamida con dodecil sulfato sódico (SDS-PAGE, por sus siglas en inglés), el cual es un sistema discontinuo de dos geles: un gel 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%). Así, las proteínas migran dependiendo de su masa molecular. La electroforesis se realizó con buffer de corrida 1 \times (Tris 24.76 mM, glicina 191.82 mM, SDS 0.1%) a 80 voltios hasta que el frente de corrida entrara al gel separador (\sim 30 min) y posteriormente a 100 voltios por \sim 1.5 h.

Una vez finalizada la electroforesis, las proteínas fraccionadas se transfirieron a membranas de PVDF (Immun-Blot™ PVDF, BIO-RAD) con buffer de transferencia 1 \times (Tris 24.76 mM, glicina 191.82 mM, metanol 20%). La transferencia se llevó a cabo a 100 voltios durante \sim 2 h a 4°C.

Después, la membrana fue bloqueada toda la noche a 4°C con una solución de leche descremada al 5% en PBS-Tween-20 0.05% (en PBS). Posteriormente, se adicionó el

anticuerpo primario Anti-Proteína C (Delta biolabs) en una dilución de 1:3000. Este anticuerpo reconoce al epítipo de Proteína C de la bandera PTP. Se incubó por una hora a temperatura ambiente y después se realizaron 3 lavados de 10 min con pBSTween-20 0.05%. Después, se incubó por una hora a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario HRP anti-conejo en una dilución 1:3000. Después se repitieron los lavados. Finalmente, con el kit de detección Immobilon™ Western (Millipore) se realizaron los revelados de las placas.

4.10 Purificación por afinidad en Tándem

Para los experimentos de purificación por afinidad en tándem se usaron 3L de cultivo celular en fase media logarítmica (4×10^7 céls/ml). Primero, los cultivos se centrifugaron a 4500 g por 10 min a 4°C. La pastilla celular se lavó con 200 ml de PBS-G y se resuspendió en solución IPP-150 (Tris-HCl 10 mM pH 8.0, NaCl 150 mM, NP40 al 0.1%) e inhibidores de proteasas a una concentración final de 2× (“Protease Inhibitor Cocktail for Plants and Tissue Extract”, Sigma). Para la lisis, se adicionó 1% de Triton X-100 y se incubó en hielo (~20 min). Posteriormente se dieron 60 golpes con un homogenizador (Wheaton) de 30 ml hasta que las células estuvieron completamente lisadas. Para aclarar el lisado celular se centrifugó a 12,000 g, durante 15 min a 4°C. El sobrenadante se colocó en una columna de cromatografía desechable Econo-Pac® (BIO-RAD) de 20 ml con 350 µl de perlas de Sefarosa-IgG (“IgG Sepharose™ 6 Fast Flow”, Amersham), y se incubó por 4 h 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 2 ml de amortiguador de proteasa AcTEV (KCl 150 mM, Tris-HCl 20 mM pH 7.7, MgCl₂ 3 mM, DTT 0.5 mM, Tween 20 al 0.1%, EDTA 0.5 mM) durante toda la noche a 4°C, rotando la columna en un ángulo de 45°. 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, MgCl₂ 3 mM, DTT 0.5 mM, Tween 20 al 0.1 %, CaCl₂ 1 mM), equivalente al volumen muerto de las perlas de Sefarosa-IgG. Posteriormente, el eluido conteniendo los complejos proteicos se aforó a 6 ml con buffer PC-150 más CaCl₂ a una

concentración final de 3 mM, e inhibidores de proteasas a una concentración final de 1×, antes de transferirlo 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 horas a 4°C en rotación suave, se drenó por flujo de gravedad y se lavó 6 veces con 5 ml de PC-150. Finalmente, se realizaron ocho eluciones, cada una con 250 µl de buffer de elución (Tris-HCl 5 mM pH 7.7, EGTA 10 mM, EDTA 5 mM e inhibidores de proteasas 1×).

4.11 Preparación de las muestras para el análisis de espectrometría de masas

Como primer paso, las proteínas purificadas se concentraron. Para ello, 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 min repetidamente hasta reducir el volumen de la muestra a ~40 µl. La muestra concentrada se colocó en un tubo Eppendorf de 1.5 ml y se procesó en un equipo *speed vac* para reducir a 25 µl el volumen final. Posteriormente, se tomaron 5 µl de la muestra concentrada para analizarla mediante electroforesis en un gel de gradiente prefabricado (4-15% de poliacrilamida, Mini-PROTEAN® TGX™). Después de la electroforesis, el gel se colocó en solución de fijación (metanol 50%, ácido acético 7%) dos veces en agitación suave por 30 min. Después, se retiró la solución e incubó ahora durante 12 h. en solución SYPRO® Ruby Protein Gel Stain (Invitrogen™, Molecular Probes™). Posteriormente, se realizó un lavado en un recipiente diferente con una solución de metanol al 10% y ácido acético al 7%, en agitación suave. Finalmente, el gel se lavó por 5 min con agua bidestilada. El análisis del gel se realizó en un fotodocumentador (BioSens SC 645). Por último, el volumen restante de la muestra proteica se corrió en un gel de poliacrilamida al 10% preparado con soluciones filtradas hasta que la muestra penetrara aproximadamente 1 cm del gel. Después, el gel se tiñó con GelCode Blue Stain Reagent (Pierce) durante 2 h a temperatura ambiente y se lavó con agua destilada durante 2 h. Las proteínas purificadas se mostraron como una banda grande, la cual se cortó en dos

fragmentos que correspondieron a 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 (USAII), UNAM.

5. Resultados

5.1 Análisis de la secuencia de LmTau95

En *L. major*, Tau95 es codificado por un gen de copia única (gen ID: LmjF.21.1100) localizado en el cromosoma 21. Se predice que la proteína está constituida por 700 aminoácidos y tiene un peso molecular de 76.5 kDa. Con el objeto de determinar el grado de conservación de la secuencia de aminoácidos de LmTau95 en relación a ortólogos de la proteína en otras especies, se realizó un alineamiento de secuencias (Figura 16). La comparación reveló que Tau95 es una proteína cuya secuencia es poco conservada en la escala evolutiva. El número de aminoácidos entre las especies es considerablemente diferente, siendo LmTau95 la secuencia más larga con 700 aminoácidos, mientras que Tau95 de *S. pombe* es de tan solo 456 aminoácidos. El peso predicho de esta proteína es de 52 kDa en *S. pombe* y de 76 kDa en *L. major*. Se calcularon también los porcentajes de identidad y LmTau95 comparte la mayor similitud con *S. pombe* con 18.8% y humano con 17.76% (Tabla 2).

Lm	(123) SRAFPPTVAKRTAVQAVHGVAGQRTELHLLTRHHHXYCTVPIFSGWRSTNWTGS	178
Sc	(37) SLELPLNVST-----KHSSIQKAIKMGCGIEK-----	64
Sp	(12) LIEHPGFA-----NNKDAFFQTLGCVQS-----	35
Hs	(25) CVEYPGVV-----RDVAKMLPTLGGEEG-----	48
Mm	(25) CVEYPGVV-----RNEAKMLQTLGGES-----	48
Dm	(14) LIEYPRGV-----VNPDRMIATLGGIIN-----	37
Lm	DEEDEGDRASDSGVGRDGCADAEDAEGAHLPAQKRRRREVFASMEPQ-----	226
Sc	-----VKEAFKEHGPIESQHGLQLYLNDDDRDRGSKSYFNEHP	102
Sp	-----IQKACQTSFQNPQKALLELNLRPKDK-----YHHP	65
Hs	-----VSRIYAD-----PTKRLELYFRPKDP-----YCHP	73
Mm	-----VSRIYTD-----PTKRLELYFRPKDP-----YCHP	73
Dm	-----VSKVLGD-----EVKRLALHFHPENP-----YNKP	62
Lm	LLVN--GYRNDLLLRMRQRRRIRRYRDPVTNAVLRREEVDSAEEGQGGSAHGDKDAR--	282
Sc	VIGKRVPRDESIVLKVTMPKGTLSKNN-----NSVKDSIK-	138
Sp	VQARVQSR--NDLLVTIKKMD-----NS-----	86
Hs	VCANRFST--SSLLLRIRKRT-----RRQKGVLT	101
Mm	VCANRFST--SSLLLRIRKRT-----RRRRGVLT	101
Dm	TFGDCTDK--TGVLSTTVRR-----HKKD-----	85
Lm	GTARTSGLSAEVVGVVSREMEIARPADETFALFTPEQLQAAPSLC-----	327
Sc	SLKDSNKLRTVPSIVDNTIKPREMSDFQIKLDNVPSAREFKSSFGSLEWNNFKSFVNSV	198
Sp	-----VQNVSRIRQVFLFRDMADFQYSTQNSPFVQKLDSTLRVLDYNAIN-----	131
Hs	EAHSEVTFDMEILIGIISTIKYKFGMSDFQYLAVHTEAGGKHTSMYDKVL----ML----R	153
Mm	EAHPQVTFNLEILIGIISTIKYKFGMSDFQYLAVHTEAGGKHVSMYDRVL----MR----K	153
Dm	-KQRPEYFVRVILGHCSRSTFETLDFQYLPWSTPKSDNANAQELTYALDQL----K	140

Lm	-----GADVFPQHFLGARAPFEVRYEPGRDPNTAVATVS	362
Sc	PDNDSQPQENIGNLILDRSVKIPSTDFQLPPPKLSMVGFPFLYKYPANPFAKKKNGV-	257
Sp	-KF-----SID-----LTPVQ-RKHVDMPPPVFSQTSPLMSYNFLQNPLVGR--VRL-	175
Hs	P-----EK-----EAFFH-QELPLYIPPIFSRLDAPVDYFYRPETQHREGYNNP-	197
Mm	P-----EK-----EEFFH-QELPLYIPPIFSRLDTPVDYFYRPETQHREGYHNP-	197
Dm	PKN-----TTD-----LDYFKRRHSQLLALPELFTHVDTVYAGTYRIDPSED-G-----	183
Lm	ATAAPRDDRLAVDANGDSAVAQYDFATLPTISISAEEESTVLPTRQAAHNSFLHSM-----	417
Sc	----T-----EVKGTY---IKNYQ--LFVH-DLSDKTVIPSQAHEQVLYDFEVAKKT	300
Sp	----PNGKTTIVNLKGQC--R-----VWIIITNMGVESVPTCRHS---KLG-----	212
Hs	----PISGENLIGLSRAR---RPHNA--IFVNFEDDEVKQPLEAAAQTWRRV-----	241
Mm	----TISGENLIGLSRAR---RPHNA--IFVNFEDTEVPEQPLEAAVQTWKK-----	241
Dm	-----QHEVLGVQSKS---SYDNQ--GVVSFNM--VDSFPTQADSQNLKRL-----	222
Lm	---GSSLD-GGLDTPPEVQMMVRLAVRPSVWVQDLQDAMLQSGLCPRAYRNKQVMQCF	473
Sc	VYPGTKSDSKFYESLEECLKILRELFARRPIWVKRHLDGIVPKK----IHHTMKIALALI	356
Sp	-----EPKTIQEVIEALKPLFEKRPVWTRRALNHLDP-----YTHYKLFALPYL	259
Hs	-----CTNPVDRKVEEELRKLFDIRPISRNAVKANISV----HPDKIKVLLPFI	287
Mm	-----CTNPIDQKVEEELRKLFDIRPVWSRNAVKSNSV----HPDKIKILLPYM	287
Dm	-----KVKYVSDQLALVKKLFDDCPIWTRIALQYESGL----TNDKIKCITPSL	268
Lm	TYLIRNGPENRLRLRLGDPYASASSVYERITVRLRSDVGVRL-----RDVRS	525
Sc	SYRFTMGPRNNTYIKFGTDPRSSVEYAQQYQTEYFKIERKLLSSPIVKKNP-----KP	409
Sp	SYLWTSGPFRDITYTRFGYDPRKDSNAAAYQALFFKLLKNGKHKGTKT-----	306
Hs	AYYMITGPRSLWIRFGYDPRKNPDAKIYQVLDFRIRCGMKHGYAPS-DLPVKAKRSTYN	346
Mm	AYYMITGPRSLWIRFGYDPRKHPDAKIYQVLDFRIRCGMKYGYGSR-DMPVKAKRSTYN	346
Dm	AFYFNSGPRTLYVRFYDPRKDFNSRYIQTDFRLRFSTGLSEFVYAKKFKVQORRAANA	328
Lm	PHIESVLRLLERDRRERVEYKSL-----PAH-----ACRQTILEMQCRNIRRGQLYIP	574
Sc	P--PLV-----FESD-----TPGG-----IDSRFKFDGKRIPW	435
Sp	-----HVPDGGKTLFP	316
Hs	YSLPITVK---KTSSQLVTMHDLKQGLGSPSGTGARKPASSKYKLDKDSVYIFREGALPP	402
Mm	YSLPITVK---KTSNQPMTMHDLKQGLGSPSGTDGPRKLTYNKYKLDKDSVYIFREGALPP	402
Dm	PFAPI-----EDRVSDLVQDIDYPYFDEHKLPR	356
Lm	FQ-LADVMDPYMADVARCVEPATAPMELARCGRRGWLSEAAYSRAMAHYSEALAALE	633
Sc	YLMQI-DLLIGEPNIAEVFHNV---EYLDKANELTGWFKELDVKIRRIKYLGCMMQ	491
Sp	-TNRVYQVCDIVDPTIAPLLKDT---QLRSECHRDTGWYRSGRYKVRDLMREKLFALIE	372
Hs	YRQMFYQLCDLNVHEELQKIHRND--GAENSCTERDGWCLPKTSDELDRDTMSLMIRQTI	460
Mm	YRQMFYQLCDLNVHEELQKIVHRND--GTETVCTERDGWCLPKTTDHLDRDTMSLMILQTI	460
Dm	SRQCMLRYCDVRMTRIQEMLEKIPTPLTGAVCNERTGWLPPGFDAQVRQIVCASISELLR	416
Lm	EEVEPLLRLKLG-----EEDAEGNATNADKAAESST-----SSLRDEE--	671
Sc	GNYEYNKYKLYFKTMLFVKESMVPENKNSEEEMGVNANKDADGDINMDAGSQMSSNAIE	551
Sp	GEMPSEV----AVNMIL-----NAE----- (34)	422
Hs	SKRPALF----SSAKA-----DGGKE---QLTYESGDEDEDEE--	492
Mm	SERPALF----SNTGKA-----DRGKE---QLMFESGEEEEEE--	492
Dm	NHYRKEN-----L-----TAEVE---AV-TQADEDEDEA--	442
Lm	---LEDEDEDDSAMFSV--SAGDLSFAADDDDE	700
Sc	(25) ALENEEMDTDQNLKVPASIDDDVDDVDADEEEQE	649
Sp	INDLMRNLMKRSQHEHEGFEDLEHIDDDYDDIFGD	456
Hs	--EEEEEEEDFKPSD-----GSENEMETEILDYV	519
Mm	-EEEEEEEDFKPSD-----GSENEMETEILDYV	520
Dm	-EDEETQEEDEMLEDETQAM----GNSQFVDND (10)	480

Fig. 16. Comparación de secuencia de aminoácidos de Tau95 en diferentes especies. Se muestran los ortólogos de Tau95 en *L. major* (Lm), *S. cerevisiae* (Sc), *S. pombe* (Sp), humano (Hs), *Mus musculus* (Mm) y *Drosophila melanogaster* (Dm). Los residuos conservados y semiconservados se muestran sombreados en negro y gris, respectivamente. Los aminoácidos ácidos, ácido aspártico (D) y ácido glutámico (E), están resaltados en amarillo. En la extrema derecha se indica el conteo de aminoácidos de la secuencia. Entre paréntesis se indica el número de aminoácidos no mostrados en la secuencia.

El extremo C-terminal de varios ortólogos de Tau95 presenta una región rica en aminoácidos ácidos: ácido aspártico (D) y ácido glutámico (E) (Figura 16). De manera similar, el extremo C-terminal de LmTau95 también presenta la región rica en aminoácidos ácidos, conteniendo 11 Ds y siete Es (Figura 16). Recientemente se demostró en *S. pombe* que esta región regula la capacidad de unión de Tau95 al DNA (Taylor *et al.*, 2013b).

	Lm	Sc	Sp	Hs	Mm	Dm
Lm	100	16.70	18.80	17.76	16.23	17.38
Sc		100	23.42	20.81	20.97	19.47
Sp			100	24.21	25.61	25.24
Hs				100	85.36	27.95
Mm					100	28.10
Dm						100

Tabla 2. Porcentajes de identidad de ortólogos de Tau95 en *L. major* (Lm), *S. cerevisiae* (Sc), *S. pombe* (Sp), humano (Hs), *Mus musculus* (Mm) y *Drosophila melanogaster* (Dm).

5.1.1 Dominios conservados y estructura secundaria predicha de LmTau95

Los ortólogos de Tau95 se caracterizan por la presencia de dos dominios conservados: el dominio de dimerización con Tau55 y el dominio de unión al DNA. Para determinar la presencia de estos dos dominios en LmTau95, se realizó una comparación con la secuencia ya estudiada de Tau95 de *S. pombe* (SpTau95) (Taylor *et al.*, 2013b). En la figura 17 se observa la comparación de ambas secuencias y la predicción de su estructura secundaria. El porcentaje de identidad entre las dos secuencias es relativamente bajo (con un valor de 18.69%). Sin embargo, estructuralmente hay cierta similitud entre ambas proteínas. Primero se encuentra el dominio de dimerización (Figura 17, región en rojo), el cual presenta cinco α -hélices y cuatro láminas β -plegadas en LmTau95, a diferencia de las tres α -hélice y siete láminas β -plegadas presentes en SpTau95. Este dominio participa en la formación de un heterodímero con Tau55, que es otra de las subunidades de TFIIC en *S. pombe*.

Desde la región central y hacia el extremo C-terminal de SpTau95 se localiza el dominio de unión a DNA, el cual se divide en dos subdominios: una hélice alada (*winged helix*) (Figura 17, región en azul) y una región llamada WHI (Figura 17, región en verde). Las hélices aladas conforman una subfamilia del dominio hélice-vuelta-hélice, y su función está asociada con la unión al DNA (Gajiwala y Burley, 2000). La estructura canónica de este dominio es: α - β - α - α - β - β . El dominio de hélice alada de SpTau95 presenta esta estructura canónica, con una lámina β -plegada extra al inicio de la secuencia (marcada como β_0 en la figura 17). La estructura secundaria predicha del subdominio de hélice alada de LmTau95 es casi idéntica a la de SpTau95. La única diferencia significativa es la presencia de una pequeña α -hélice adicional en LmTau95 (Figura 17).

Por su parte, el subdominio WHI presenta una estructura que no tiene similitud con ningún dominio descrito hasta ahora. En SpTau95 está formado por cinco α -hélices y dos β -plegadas (Figura 17, región en verde). En general, esta estructura está conservada en el subdominio WHI de LmTau95, aunque éste presenta varias pequeñas β -plegadas extras (Figura 17, región en verde).

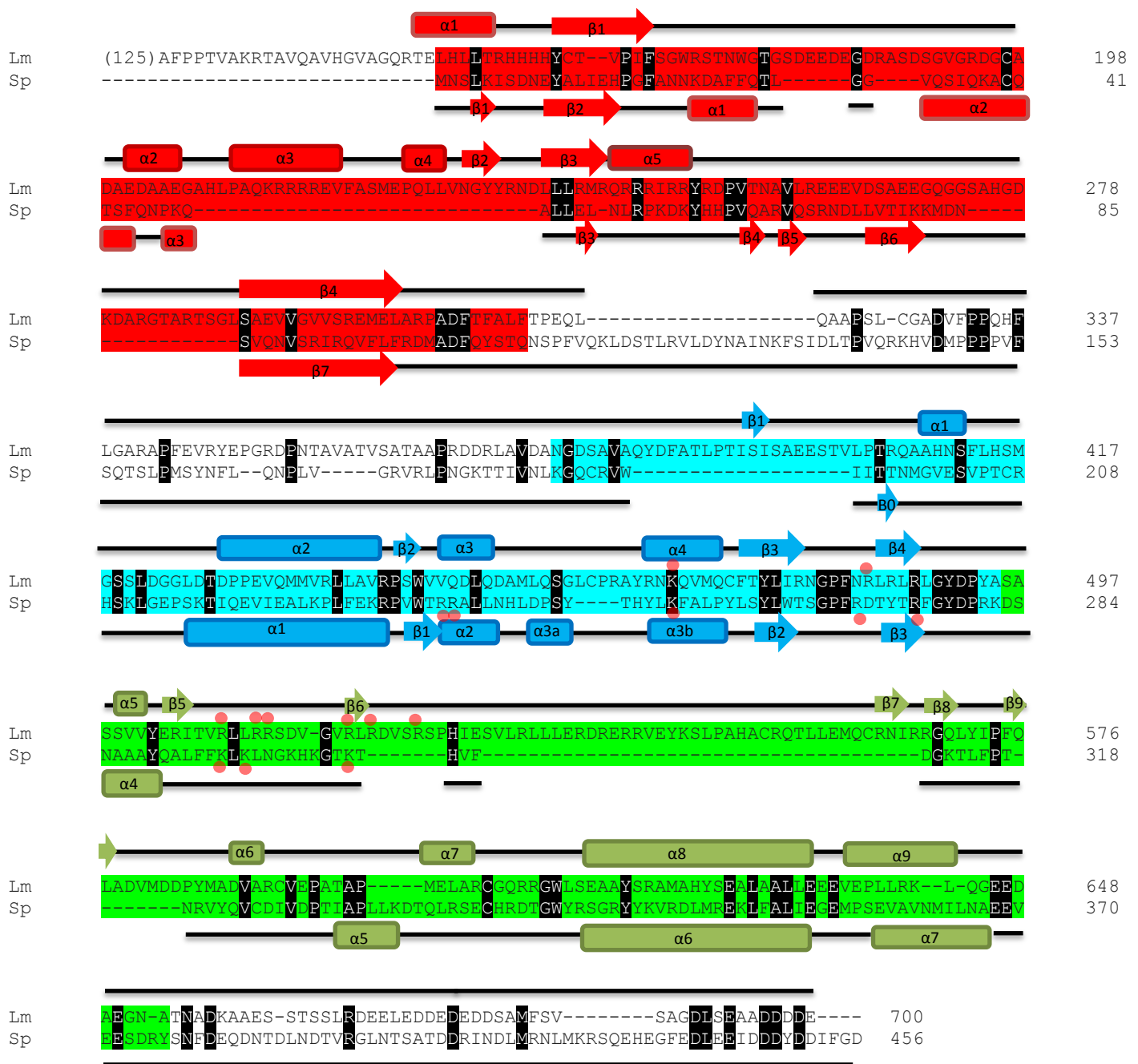


Fig. 17. Comparación de secuencia y estructura secundaria de Tau95 entre *L. major* (Lm) y *S. pombe* (Sp). Las secuencias de aminoácidos de Tau95 de *L. major* (LmTau95) y de *S. pombe* (SpTau95) fueron alineadas con el programa Clustal W. Los residuos conservados están sombreados en negro. El número a la derecha indica el número de aminoácidos de la secuencia. El dominio de dimerización está señalado en rojo, mientras que el dominio de unión a DNA se señala en azul (subdominio de hélice alada) y verde (subdominio WHI). Los puntos de color rojo representan los aminoácidos en *S. pombe* reportados con una carga positiva en la superficie de la molécula que presentan interacción con el DNA (Taylor *et al.*, 2013b); y en *L. major* se muestran los probables residuos con la misma función de otorgar una región cargada en la superficie de la molécula. Los elementos predichos de la estructura secundaria de LmTau95 se muestran arriba del alineamiento; abajo se muestra la estructura secundaria ya reportada para SpTau95 (Taylor *et al.*, 2013b). Las cadenas β se representan con flechas y las α -hélices con rectángulos redondeados, y están coloreados de acuerdo con el dominio conservado donde se encuentran.

5.1.2 Determinación *in silico* de la estructura terciaria de LmTau95

Posteriormente se determinó la probable estructura tridimensional de LmTau95, usando como molde los cristales de SpTau95 ya reportados (PDB: 4BJJ y 4BJI) (Taylor *et al.*, 2013). Para facilitar el análisis, los dos dominios se examinaron de manera independiente (Figuras 18 y 19). La estructura del dominio de dimerización de LmTau95 mostró cierta similitud con la de SpTau95, observándose una separación entre la región C-terminal (rica en α -hélices) y la región N-terminal (rica en β -plegadas) (Figura 18). La región N-terminal es la que hace contacto directo con Tau55 en *S. pombe*. Por su parte, el dominio de unión a DNA de LmTau95 adopta una topología muy similar a la SpTau95 (Figura 19), mostrándose una clara separación entre los dos subdominios. En resumen, estos resultados indican que, mientras el dominio de dimerización de LmTau95 está relativamente poco conservado, el dominio de unión al DNA está muy conservado a nivel de estructura secundaria y tridimensional.

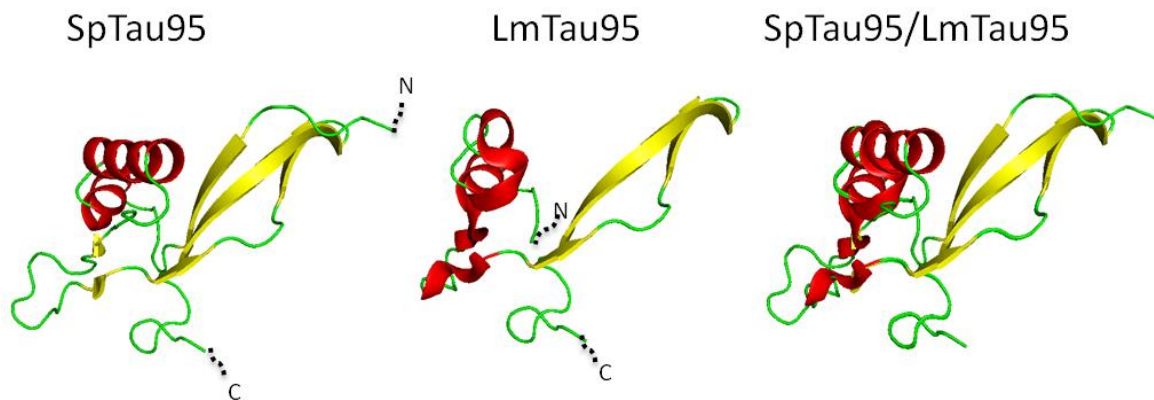


Fig. 18. Estructura secundaria del dominio de dimerización LmTau95 y SpTau95. SpTau95 representa la estructura secundaria reportada para *S. pombe*. Se muestra también la estructura secundaria predicha para *L. major* y el empalme de ambas. En color rojo se muestran las hélices y en amarillo las β -plegadas. Se indica el amino (N) y carboxilo (C) terminal.

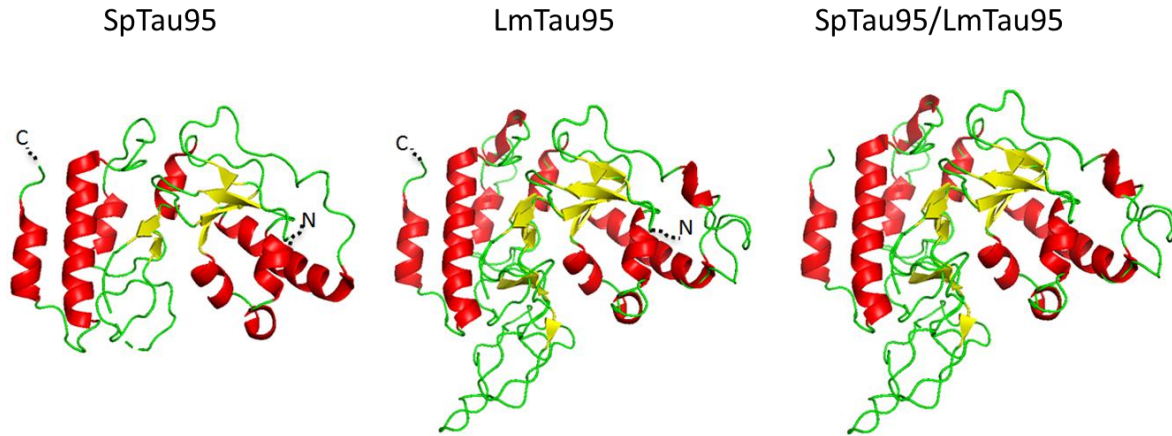


Fig. 19. Estructura tridimensional del dominio de unión a DNA de SpTau95 y LmTau95. Se ilustra la estructura secundaria reportada para *S. pombe* (SpTau95). Se muestra también la estructura secundaria predicha para *L. major* (LmTau95) y el empalme de ambas. En color rojo se muestran las hélices y en amarillo las β -plegadas. Se indica el amino (N) y carboxilo (C) terminal.

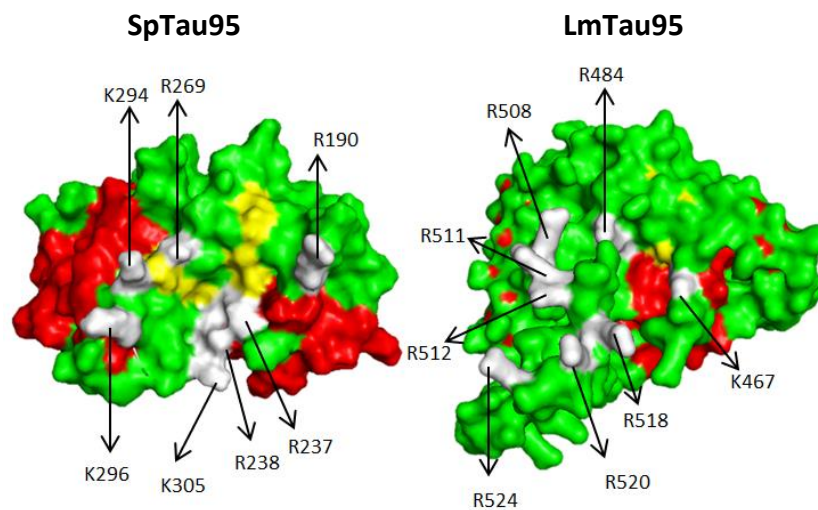


Fig. 20. Estructura globular de SpTau95 y LmTau95. Se muestra el modelo reportado de SpTau95 y la estructura predicha de LmTau95. En color rojo se indica el área que corresponde a las α -hélices, en amarillo las β -plegadas, y en blanco los residuos positivamente cargados. Las flechas señalan a los residuos y la posición en que se encuentran en el péptido.

Taylor *et al.* (2013b) hicieron una inspección del potencial electrostático de superficie en Tau95 de *S. pombe*, donde se identificaron algunos aminoácidos básicos que podrían interactuar con el DNA (Figura 17, puntos rojos; y Figura 20). Mediante mutagénesis dirigida y ensayos EMSA se confirmó que muchos de estos aminoácidos sí se unen al DNA. Un análisis de potencial electrostático de superficie en LmTau95 permitió la identificación de aminoácidos básicos localizados en la superficie de la molécula, en posiciones similares a los de SpTau95, que potencialmente podrían participar en la unión al DNA (Figuras 17 y 20).

5.1.3 Tau95 en *Leishmania* spp.

Para determinar el grado de conservación de Tau95 entre distintas especies del género *Leishmania*, se realizó un alineamiento con sus secuencias de aminoácidos (Figura 21). Como se esperaba, la secuencia está altamente conservada dentro de género *Leishmania*. Los porcentajes de identidad de LmTau95 se observaron en un rango de 81.7% (con *L. braziliensis*) a 92.9% (con *L. donovani*) (Tabla 3). La mayor identidad se presentó entre los ortólogos de *L. infantum* y *L. donovani*, con un 99.5%. Aunque toda la secuencia está conservada, la mayor identidad se presentó en el dominio de unión a DNA. De igual manera, todos los ortólogos de Tau95 de *Leishmania* son ricos en aminoácidos ácidos en el extremo carboxilo terminal (Figura 21).

Lm	MTAPHGSPAA--AGREKHAIPAFRSYISVELPFAVTPTVTTSSAMLDGADHPSTSAHAGE	58
Li	MTAPHDSPAA--AGSEKPAMPFRSYISVELPFAVTPTVTTSSAMLDGADHPSTSAHAGE	58
Lmx	MAAPHGSPAA--AGSEKPAMPFRSYISVELPFAVTPTVTTSSAMLDGTDHPSTSAHAGE	58
Ld	MTAPHDSPAT--AGSEKPAMPFRSYISVELPFAVTPTVTTSSAMLDGADHPSTSAHAGE	58
Lp	MTAPHDSPAA--AGSEKPAMPFRSYISVELPFAVTPTVTTSSAMLDGADQLSTSAHAGE	60
Lb	MTAPHDSPAA--AGSEKPAMPFRSYISVELPFAVTPTVTTSSAMLDGADQLSTSAHAGE	60
Lm	RREVEAFLPASFVVPCLHRAMPQQTARGDAGATHDSAEPEEGDDEGDDVPSSSSGGD	118
Li	RREVEAFLPASFVVPCLHRATPQQTASRGDAGAAHDSAEPEEGDDEGDDVPSSSSGGD	117
Lmx	RREVEAFLPASFVVPCLHRATPQQTARGDAGAAHDSAEPEEGDDEGDDVPSSSSGGD	116
Ld	RREVEAFLPASFVVPCLHRATPQQTASRGDAGAAHDSAEPEEGDDEGDDVPSSSSGGD	117
Lp	RREVEAFLPASFVVPCLHHPTPQQTARSVDVSGAHDNGEPEEGEESG-DDMPSNSSGD	119
Lb	RREVEAFLPASFVVPCLHHPTPQQTARSVDVSGAHDNGEPEEGEESG-DDMPSNSSGD	119

Lm	SGESASRAFPPTVAKRTAVQAVHGVAGQRTLELLTRHHHHYCTVPIFSGWRSTNWGTGS	178
Li	SDESASRAFPPTVAKRTAVQTARGVGRQRTALELLTRHHHHYCTVPIFSGWRSTNWGSGS	177
Lmx	SDESASRALPPTVAKRTAVQAARGVGGQRTLELLTRHHHHYCTVPIFSGWRSTNWGSGS	176
Ld	SDESASRAFPPTVAKRTAVQTARGVGRQRTALELLTRHHHHYCTVPIFSGWRSTNWGSGS	177
Lp	SDESASRAFPPTVVKRPAVQAARDGGSORRALLELLTRYHRHYCTVPIFSGWRSTNWGSGG	179
Lb	SDESASRAFPPTVVKRPAVQAARDGGSORRALLELLTRYHRHYCTVPIFSGWRSTNWGSGG	179

Lm	DEEDEGDRASDSGVGRDGCADAEDAEEGAHLPAQKRRRREVFASMEPQLLVNGYYRNDLL	238
Li	DEEDEEDRASGTVGGDGCADAHDAAAAHLQAQKRRRREVFASMEPQLLVNGYYRNDLL	237
Lmx	DEEDEGDRASDITGVSGDRCADQDAEEAAHLQAQKRRRREVFASMEPQLLVNGYYRNDLL	236
Ld	DEEDEEDRASGTVGGDGCADAHDAAAAHLQAQKRRRREVFASMEPQLLVNGYYRNDLL	237
Lp	DEEDEEYWASDSGVGGGG-----AEAHLQAQKRRRREAFASMEPQLLVNGYYRNDLL	233
Lb	DEEDEEYWASDSGVGEGGG-----AEAHLQAQKRRRREAFASMEPQLLVNGYYRNDLL	233

Lm	LRVRQRRRIRRYRDPVTNAVLREEEVDSAEEGQGGSAHGDKDARGTARTSGLSAEVVGVV	298
Li	LRVRQRRHIRRYRDPVTNAVLREEEVDSAEEGQGGSAHGDKDARGTARTSDLSAEVVGVV	297
Lmx	LRVRQRRRIRRYRDPVTNAVLREEEVDSAEEGQGGSAHDDTDARDTARTSGLSAEVVGVV	296
Ld	LRVRQRRHIRRYRDPVTNAVLREEEVDSAEEGQGGSAHGDKDARGTARTSDLSAEVVGVV	296
Lp	LQVRQCRHIRRYRDPVTNAVLREEEVDNVEEGQGGSAHDDKDAGTARTSSVSAEVVGVV	293
Lb	LQVRQRRHIRRYRDPVTNAVLREEEVDNVEEGQGGSAHDDKDARDTARTSSVSAEVVGVV	293

Lm	SREMELARPADFTFALFTPEQLQAAPSLCGADVFPQHFLGARAPFEVRYEPGRDENTAV	358
Li	SREMELARPADFTFALFTPEQLQAAPSLCGADVFPQHFLSARAPFEVRYEPGRDENTAV	357
Lmx	SREMELARPADFTFALFTPEQLQAAPSLCGADVFPQHFLSARAPFEVRYEPGRDENTAV	356
Ld	SREMELARPADFTFALFTPEQLQAAPSLCGADVFPQHFLSARAPFEVRYEPGRDENTAV	356
Lp	SREMELARPADFTFALFTPEQLQAAPSLCGAGVFPQHFLSARAPFEVRYEPGRDLNTAV	353
Lb	SREMELARPADFTFALFTPEQLQAAPSLCGAGVFPQHFLSARAPFEVRYEPGRDLNTAV	353

Lm	ATVSATAAPRDRLAVDANGDSAVAQYDFATLPTISISAEESTVLPTRQAAHNSFLRSMG	418
Li	ATVSATAAPRDDRLAGDANGGSAQAQYDFATLPTISISAEESAVLPTRQAAHNSFLRSMG	417
Lmx	ATVSATAAPRDRLAVDANGDAAAQYDFATLPTISISAEESTVLPTRQAAHNSFLRSMG	416
Ld	ATVSATAAPRDRLAGDANGGSAQAQYDFATLPTISISAEESAVLPTRQAAHNSFLRSMG	416
Lp	AAASAATAPGGDRLAVDANDDSAAQYDLATLPTISVSAEESVLPTRQAAHNSFLRSMG	413
Lb	AAASAATAPGGDRLAVDANDDSAAQYDLATLPTISVSAEESVLPTRQAAHNSFLRSMG	413

Lm	SSLDGGLDTPPEVQMMVRLLAERPSWVVQDLQDAMLQSGLCPRAYRNKQVMQCFTYLIR	478
Li	SSLDGGLDTPPEVQMMVRLLAERPSWVVQDLQDAMLQSGLCPRAYRNKQVMQCFTYLIR	477
Lmx	SSLDGGLDTPPEVQMMVRLLAERPSWVVQDLQDAMLQSGLCPRAYRNKQVMQCFTYLIR	476
Ld	SSLDGGLDTPPEVQMMVRLLAERPSWVVQDLQDAMLQSGLCPRAYRNKQVMQCFTYLIR	476
Lp	SSLDGGLDTPPEVQMMVRLLAERPSWVVQDLQDAMLQSGLCPRAYRNKQVMQCFTYLIR	473
Lb	SSLDGGLDTPPEVQMMVRLLAERPSWVVQDLQDAMLQSGLCPRAYRNKQVMQCFTYLIR	473

Lm	NGPFNRLRLRLGYDPYASASSVYERITVRLLRSDVGVRLRDVSRSPHIESVLRLLLER	538
Li	NGPFNRLRLRLGYDPYASASSVYERITVRLLRSDVGVRLRDVSRSPHIESVLRLLLER	537
Lmx	NGPFNRLRLRLGYDPYASASSVYERITVRLLRSDVGVRLRDVSRSPHIESVLRLLLER	536
Ld	NGPFNRLRLRLGYDPYASASSVYERITVRLLRSDVGVRLRDVSRSPHIESVLRLLLER	536
Lp	NGPFNRLRLRLGYDPYASASSAVYERIAVRLLRSDVGVRLRDVSRSPHIESVLRLLLER	533
Lb	NGPFNRLRLRLGYDPYASASSAVYERIAVRLLRSDVGVRLRDVSRSPHIESVLRLLLER	533

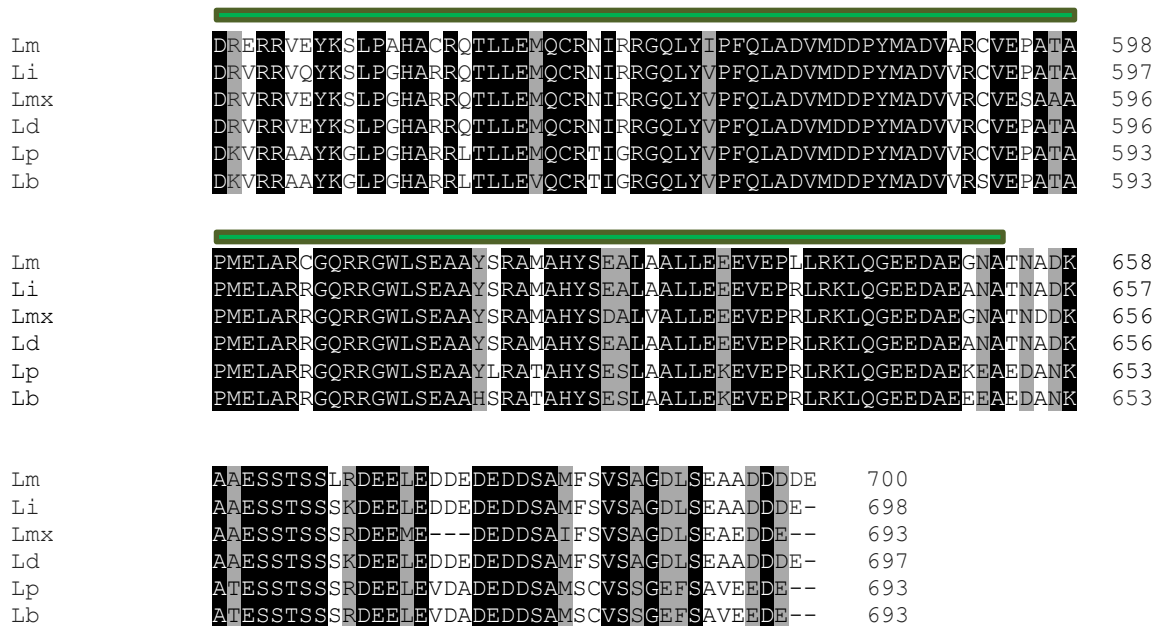


Fig. 21. Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de Tau95 en diferentes especies de *Leishmania*. Se muestran las secuencias de *L. major* (Lm), *L. infantum* (Li), *L. mexicana* (Lmx), *L. donovani* (Ld), *L. panamensis* (Lp) y *L. braziliensis* (Lb). Los residuos conservados y semiconservados se encuentran sombreados en negro y gris, respectivamente. La posición de los dominios conservados se muestra con una barra en la parte superior de las secuencias: de color rojo para el dominio de dimerización, azul para el subdominio de hélice alada y verde para el subdominio WHI. A la derecha se indica el número de aminoácidos de las secuencias.

	Lm	Li	Lmx	Ld	Lp	Lb
Lm	100	92.84	92.64	92.97	82.05	81.77
Li		100	93.36	99.57	84.93	84.49
Lmx			100	93.50	83.67	83.53
Ld				100	84.76	84.33
Lp					100	98.56
Lb						100

Tabla 3. Porcentaje de identidad de la secuencia de Tau95 entre distintas especies del género *Leishmania*. Se analizaron las secuencias de *L. major* (Lm), *L. infantum* (Li), *L. mexicana* (Lmx), *L. donovani* (Ld), *L. panamensis* (Lp) y *L. braziliensis* (Lb).

5.2 Clonación en el vector pGEM-T Easy

Como primer paso para estudiar experimentalmente a LmTau95, su región codificante se amplificó mediante PCR para ser clonada en el vector pGEM-T Easy. Posteriormente, el gen de LmTau95 sería subclonado en el vector PTP para llevar a cabo las purificaciones por afinidad en tándem y así identificar algunas de las proteínas con las que interactúa LmTau95.

Así, en primera instancia se diseñaron oligonucleótidos que permitieran la amplificación del gen completo de LmTau95, sin el codón de paro. Se utilizó DNA genómico de *L. major* como molde y se realizó la reacción de PCR con la enzima Kapa HiFi HotStart DNA polimerasa, que es de alta fidelidad, utilizando distintas temperaturas de *annealing*: 66°C, 68.4°C y 70°C. Para comprobar que se hubiese amplificado el gen de manera correcta, se verificó el producto de PCR mediante una electroforesis, lo que mostró el amplicón del tamaño esperado de 2100 pb (Figura 22a).

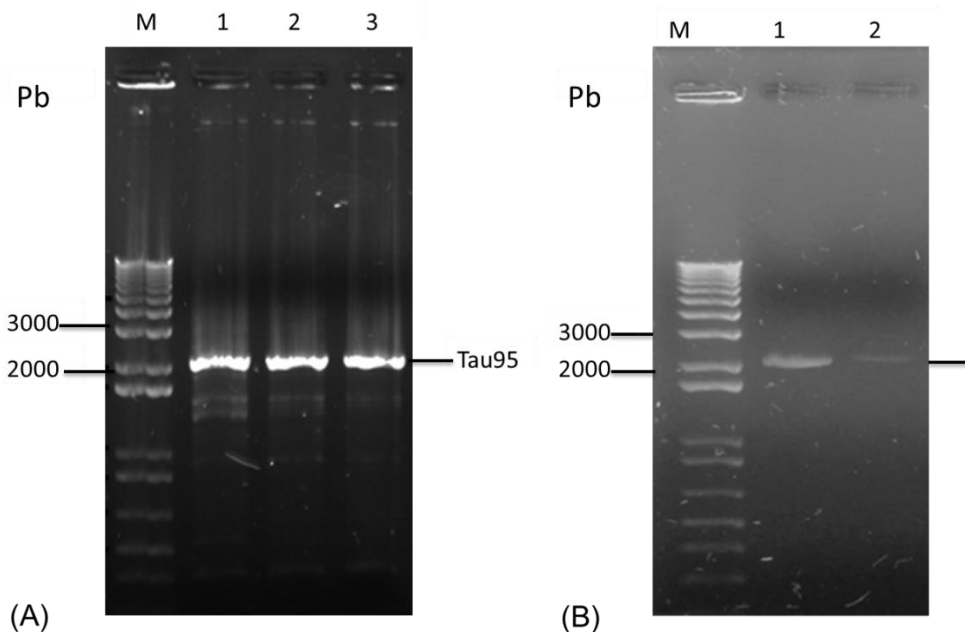


Fig. 22. (A) Amplificación por PCR del gen LmTau95 de *L. major* con la enzima Kapa HiFi HotStart DNA polimerasa. M: Marcador 1 Kb Plus (Invitrogen); 1: 66°C; 2: 68.4°C; 3: 70°C. **(B)** Purificación de producto de PCR de Tau95. Se muestran la primera y segunda elución (Carriles 1 y 2, respectivamente). Gel de agarosa al 1 % teñido con Midory Green.

El DNA obtenido fue posteriormente purificado mediante el kit nucleoSpin gel and PCR clean-up (Figura 22b) y adenilado para continuar con su ligación en el vector pGEM-T Easy. El producto de las reacciones de ligación se utilizó después para la transformación de células de *E. coli* JM109. De las colonias obtenidas, y que presumiblemente contenían al vector, se hizo una extracción del DNA plasmídico mediante minipreps (Figura 23). Con el DNA obtenido se realizó un análisis de restricción doble utilizando las enzimas *Xma*I y *Xba*I, cuyos sitios de corte se adicionaron a los oligonucleótidos diseñados para la amplificación del gen. El análisis de las restricciones reveló las dos bandas esperadas de 2.1 kb (gen LmTau95) y 3 kb (vector pGEM-T Easy) (Figura 24a).

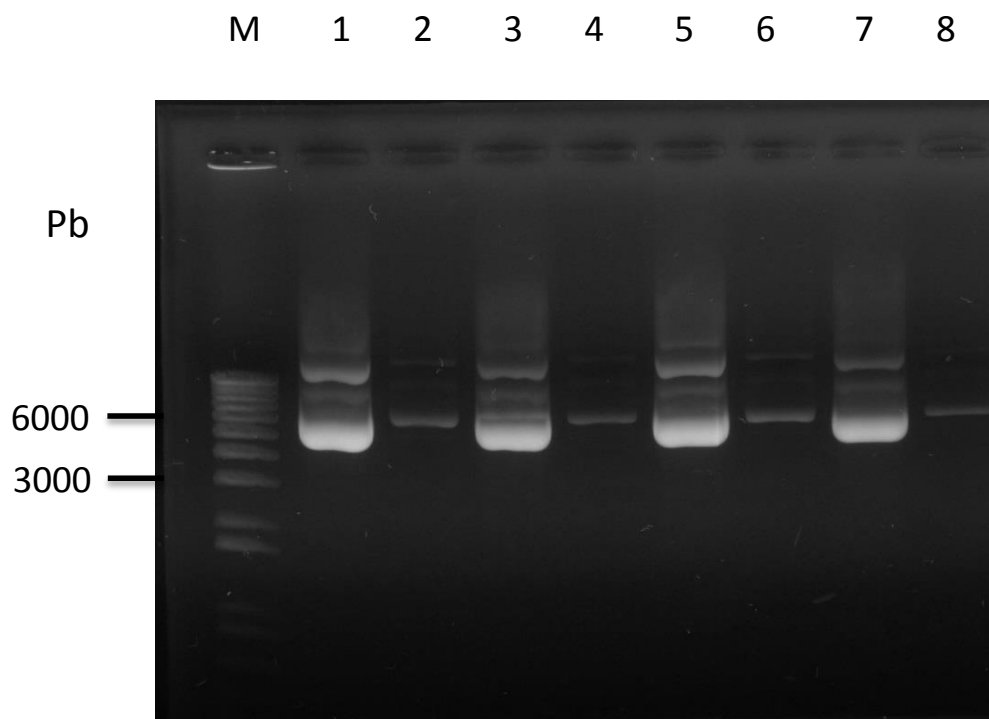


Fig. 23. DNA de plásmidos aislados de las colonias positivas. Se purificó plásmido de 4 clonas por duplicado. Se observa una primera elución con una gran cantidad de plásmido (Carriles 1, 3, 5 y 7) y una segunda elución (Carriles 2, 4, 6 y 8) con menor cantidad de DNA de plásmido. El marcador de peso molecular (carril M) corresponde a la escala de 1 Kb Plus de Invitrogen. Gel de agarosa al 0.8% teñido con Midory Green.

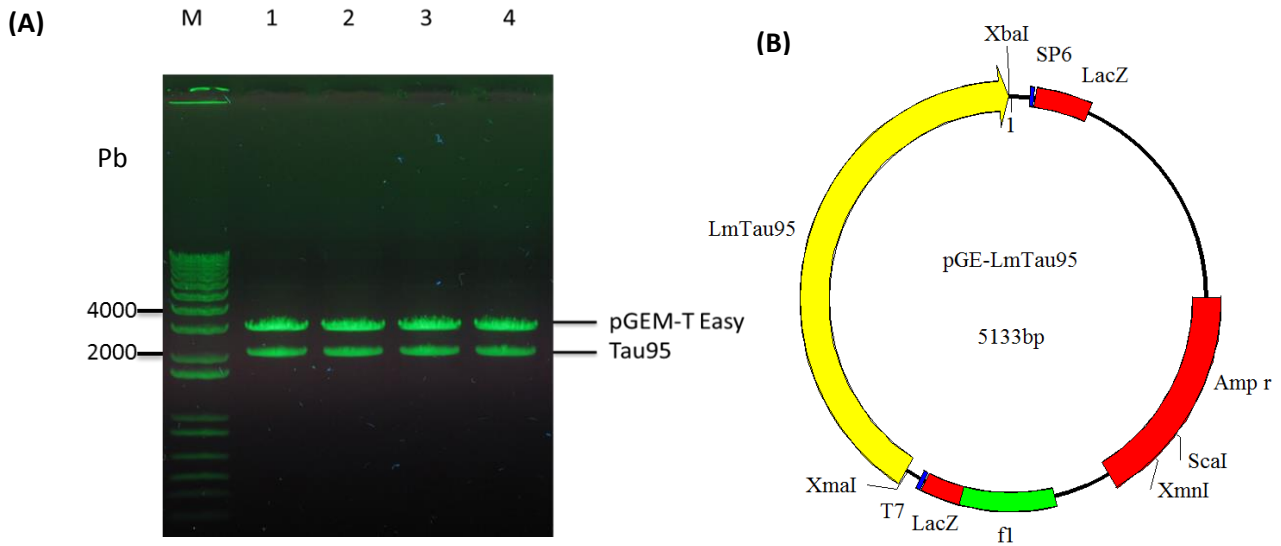


Figura 24. Clonación de LmTau95 en pGEM-T Easy. **(A)** Análisis de restricción de cuatro clonas resultado de la ligación de LmTau95 en pGEM-T Easy. Se muestra el resultado de la digestión de los vectores con las enzimas *XmaI* y *XbaI* (carril 1-4), donde fue posible liberar el gen de LmTau95 del vector pGEM –T Easy, mostrando las bandas esperadas de 2.1 kb y 3 kb respectivamente. Gel de agarosa al 1% teñido con Midory green. **(B)** Mapa del vector pGE-LmTau95. Se indican los sitios de corte de las principales enzimas de restricción, la secuencia de resistencia a ampicilina y el inserto de LmTau95.

De las clonas obtenidas, se seleccionó una para enviar a secuenciar. Con el resultado obtenido se confirmó que el gen no presentó ninguna mutación. De esta forma se generó el vector pGE-LmTau95 (Figura 24b).

5.3 Subclonación de LmTau95 en el vector PTP

Con el vector pGE-LmTau95 se procedió a la generación del vector pLMTau95-PTP. Como primer paso el vector pGE-LmTau95 fue digerido con las enzimas *XbaI* y *XmaI* para liberar el inserto de DNA LmTau95 (Figura 25a). El gen de LmTau95 se purificó a partir de un gel de agarosa (Figura 25b).

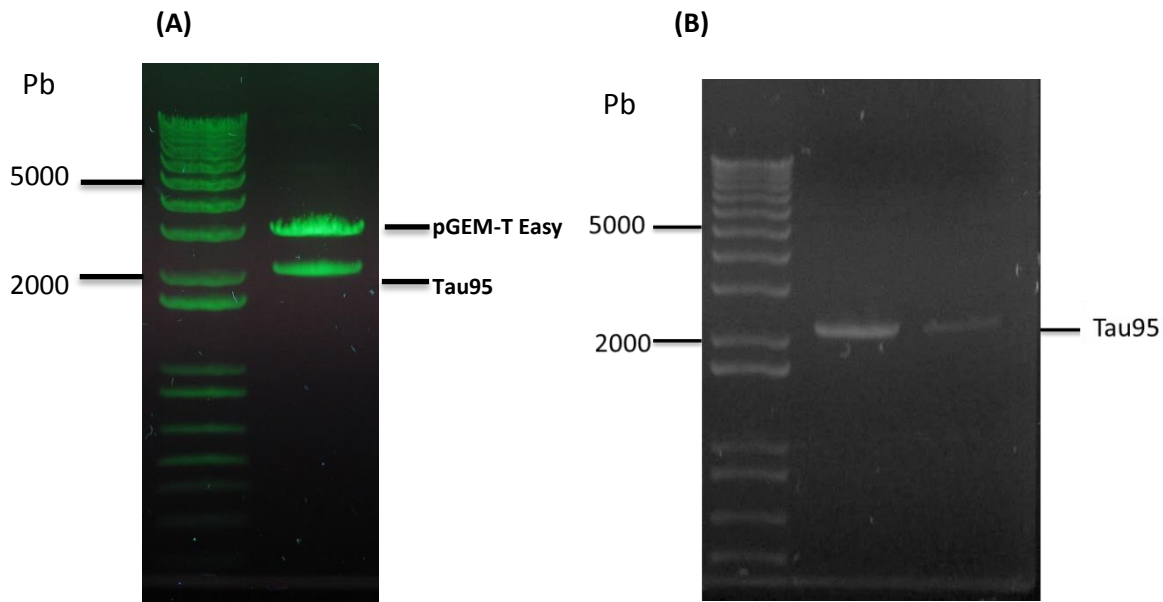


Fig. 25. A Electroforesis de DNA de plásmido digerido con enzimas *XbaI* y *XmaI*. **B** Inserto LmTau95 purificado de 2.1 Kb. En ambos caso se usó el Marcador 1Kb Plus (Invitrogen). Gel de agarosa al 1% teñido con midory green.

Posteriormente, el vector pB6-PTP fue digerido con las enzimas *XbaI* y *XmaI* para separar el gen de RPB6 (Figura 26A), y el cuerpo del vector PTP de 6.7 KB se purificó a a partir de un gel de agarosa (Figura 26B).

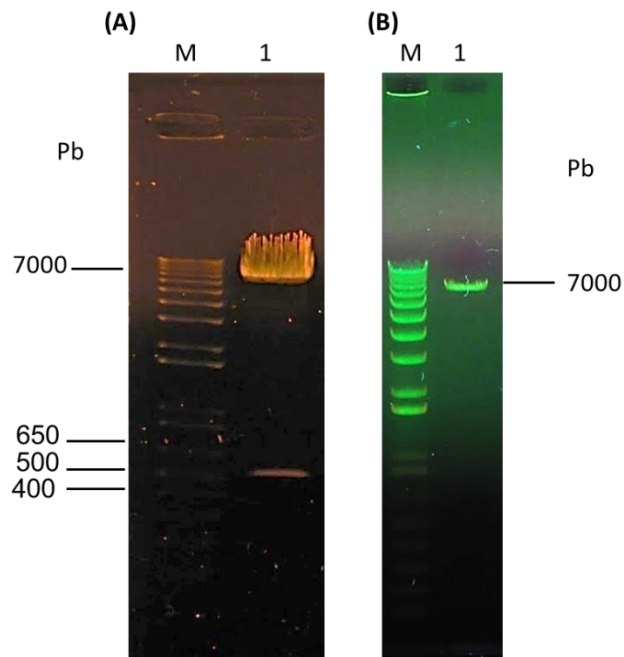


Fig. 16. Electroforesis del plásmido pB6-PTP. **A:** DNA del vector pB6-PTP digerido con las enzimas *XbaI* y *XmaI*, se observa el cuerpo del vector de 6.7 Kb y el gen liberado de RPB6 de 520 pb (1). M: Marcador 1 Kb Plus (Invitrogen); Gel de agarosa al 0.8% teñido con bromuro de etidio. **B:** cuerpo del vector PTP purificado (1) M: Marcador 1 Kb Plus (Invitrogen). Gel de agarosa al 1% teñido con midory green.

Con el vector PTP y el inserto LmTau95 purificados, se realizaron dos ligaciones empleando 100 o 200 ng de vector, así como 230 o 440 ng de inserto respectivamente. Con los productos de ligación se transformaron células electrocompetentes ElectroMax DH5 α E de *E. coli* y se obtuvieron 58 colonias con la ligación de 100 ng de vector y 65 colonias a partir de la ligación de 200 ng.

De las colonias obtenidas se analizaron 5 (colonias 43, 45, 50, 101 y 105) mediante obtención de DNA por miniprep y analisis de restricción con las enzimas *XbaI* y *XmaI*. Se pudieron observar los fragmentos esperados de 6.7 kb (vector PTP) y 2.1 kb (gen LmTau95) en cuatro de las colonias (Figura 27).

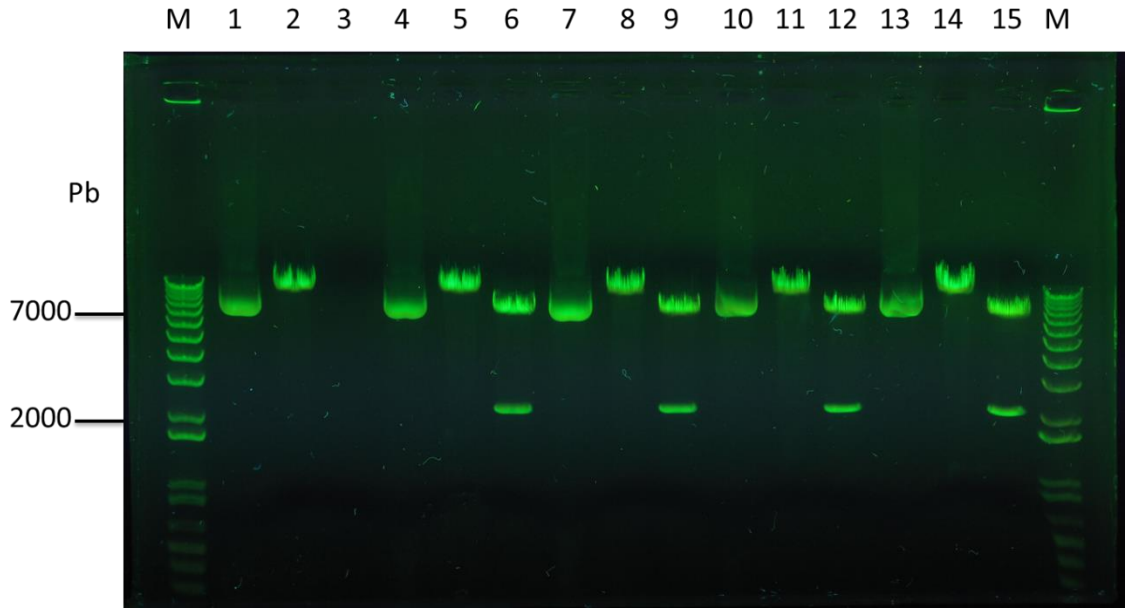


Fig. 27. Análisis de restricción de las colonias obtenidas para LmTau95-PTP. Colonia 43 (carril 1: DNA sin digerir, carril 2: DNA digerido con *XbaI* y carril 3: DNA digerido con *XbaI* y *XmaI*). Colonia 45 (carril 4: DNA sin digerir, carril 5: DNA digerido con *XbaI* y carril 6: DNA digerido con *XbaI* y *XmaI*). Colonia 50 (carril 7: DNA sin digerir, carril 8: DNA digerido con *XbaI* y carril 9: DNA digerido con *XbaI* y *XmaI*). Colonia 101 (carril 10: DNA sin digerir, carril 11: DNA digerido con *XbaI* y carril 12: DNA digerido con *XbaI* y *XmaI*) y Colonia 105 (carril 13: DNA sin digerir, carril 14: DNA digerido con *XbaI* y carril 15: DNA digerido con *XbaI* y *XmaI*). M: Marcador 1kb Plus (Invitrogen).

De las colonias obtenidas, se seleccionaron las clonas 45 y 50 para enviar a secuenciación. Con el análisis de las secuencias se comprobó que no hubo ningún cambio o mutación, y que el gen de LmTau95 se encontraba en marco con la bandera PTP (Figura 28). De esta forma se obtuvo el vector pLmTau95-PTP (Figura 29).

```

1      GCCGGCGACCTCTCCGAAGCGGGCAGCAGCAGCAGAGTCTAGAGGTTCCGACGGCGAA
1      A G D L S E A A D D D D E S R G S D G E

61     GATCAGGTGGATCCTCGTCTTATTGATGGGAAATATGATATTCCAACACTGCTAGCGAG
21     D Q V D P R L I D G K Y D I P T T A S E

121    AATTTGTATTTTCAGGGTGAGCTCAAACCGCGGCTCTTGCGCAACACGATGAAGCCGTG

```

41 N L Y F Q G E L K T A A L A Q H D E A V

181 GACAACAAATTCAACAAAGAACAACAAAACGCGTTCTATGAGATCTTACATTTACCTAAC

61 D N K F N K E Q Q N A F Y E I L H L P N

241 TTAAACGAAGAACAACGAAACGCCTTCATCCAAAGTTTAAAAGATGACCCAAGCCAAAGC

81 L N E E Q R N A F I Q S L K D D P S Q S

301 GCTAACCTTTTAGCAGAAGCTAAAAAGCTAAATGATGCTCAGGCGCCGAAAGTAGACAAC

101 A N L L A E A K K L N D A Q A P K V D N

361 AAATTCACAAAGAACAACAAAACGCGTTCTATGAGATCTTACATTTACCTAACTTAAAC

121 K F N K E Q Q N A F Y E I L H L P N L N

421 GAAGAACAACGAAACGCCTTCATCCAAAGTTTAAAAGATGACCCAAGCCAAAGCGCTAAC

141 E E Q R N A F I Q S L K D D P S Q S A N

481 CTTTTAGCAGAAGCTAAAAAGCTAAATGGTGCTCAGGCGCCGAAAGTAGACGCGAATTCC

161 L L A E A K K L N G A Q A P K V D A N S

541 GCGGGGAAGTCAACCCAATTGGATTATAAAGATGATGATGATAAATAA

181 A G K S T Q L D Y K D D D D K *

Fig. 28. Secuencia de LmTau95 unido a la bandera PTP. Se muestra la secuencia de DNA y la secuencia predicha de aminoácidos. En esta última se observa que la secuencia de LmTau95 está en marco con la bandera PTP. En azul se señala el extremo C-terminal de LmTau95, en amarillo se muestra el epítipo de Prot C, en morado el sitio de corte de la proteasa TEV y en verde los dos epítipes de Prot A.

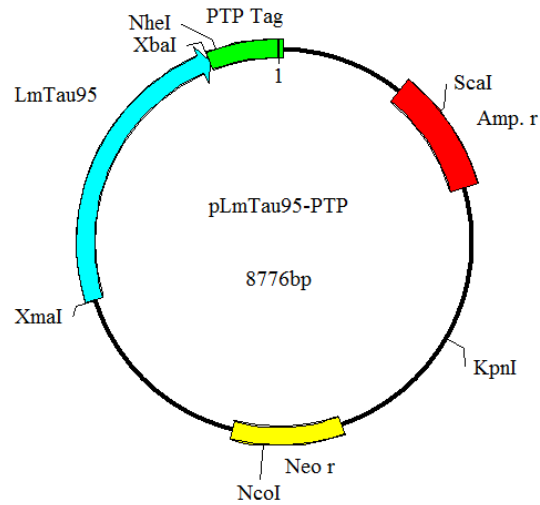


Fig. 29. Mapa del vector pLmTau95-PTP.

5.4 Generación de la línea celular LmjF-Tau95-PTP

El vector pLmTau95-PTP se preparó a gran escala por midiprep (Figura 30A). Se hicieron pruebas de restricción con las enzimas *XbaI* y *XmaI* para verificar el tamaño de vector e inserto, obteniéndose los fragmentos esperados de 6.7 Kb y 2.1 kb respectivamente (Figura 30B).

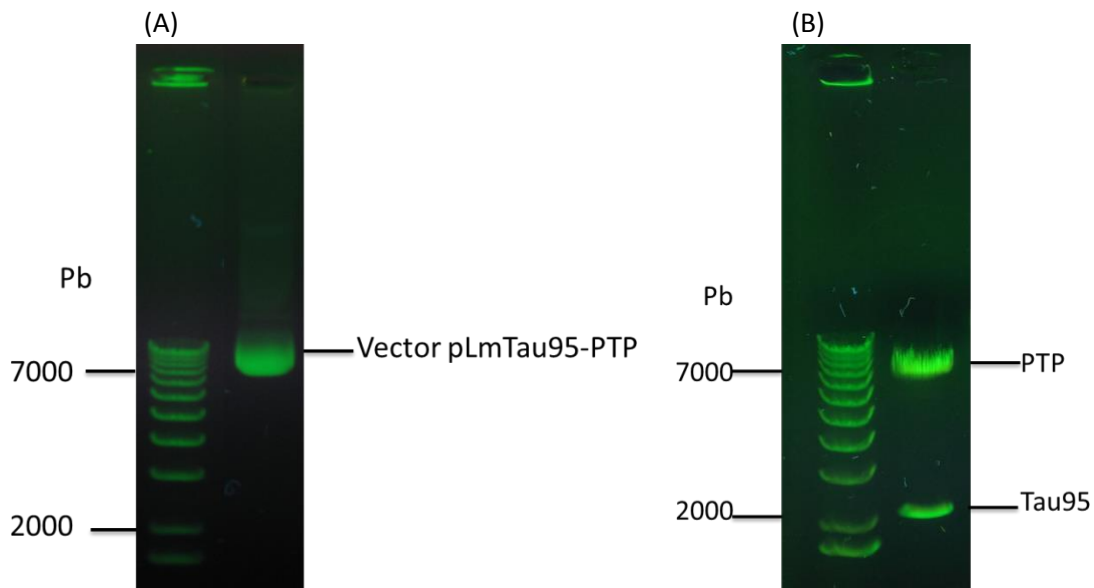


Fig. 30. Obtención de DNA por midiprep. **(A)** Se muestra el vector extraído pLmTau95-PTP. **(B)** Vector pLmTau95-PTP digerido con las enzimas *XbaI* y *XmaI*.

La transfección de promastigotes de *L. major* se realizó con 25 µg del plásmido pLmTau95-PTP. Las células fueron seleccionadas con el fármaco G418, hasta que se observó una población transfectada establemente, aproximadamente 28 días después de la electroporación. Posteriormente, la población se resembró cada cuatro días o al entrar en fase de crecimiento estacionario. Para la clonación celular, cultivos en fase media logarítmica se resembraron cada 24 horas (tres resiembras) y se plaquearon en cajas petri con medio semisólido, para así obtener las clonas celulares con que se trabajaría más adelante.

5.5 Análisis de la expresión de las proteínas recombinantes

Para verificar que las clonas celulares obtenidas expresaran en efecto la proteína recombinante LmTau95 fusionada con la bandera PTP, se realizó un ensayo tipo Western blot. Se utilizó para esto el anticuerpo anti-Prot C, que reconoce el dominio de Proteína C incluido en el péptido de extracción.

El ensayo se realizó con cinco clonas celulares. LmTau95-PTP tiene un peso aproximado de 93 kDa. Al realizar el revelado de la placa, se observó señal inespecífica en todas las clonas (Figura 31). Sin embargo, se apreció la señal de una proteína del tamaño esperado en tres de las clonas (Figura 31, clonas 2, 3 y 5), confirmándose la expresión adecuada de la proteína recombinante LmTau95-PTP. Las otras bandas observadas podrían corresponder a uniones inespecíficas del anticuerpo o a productos de degradación de la proteína LmTau95-PTP (Figura 31).

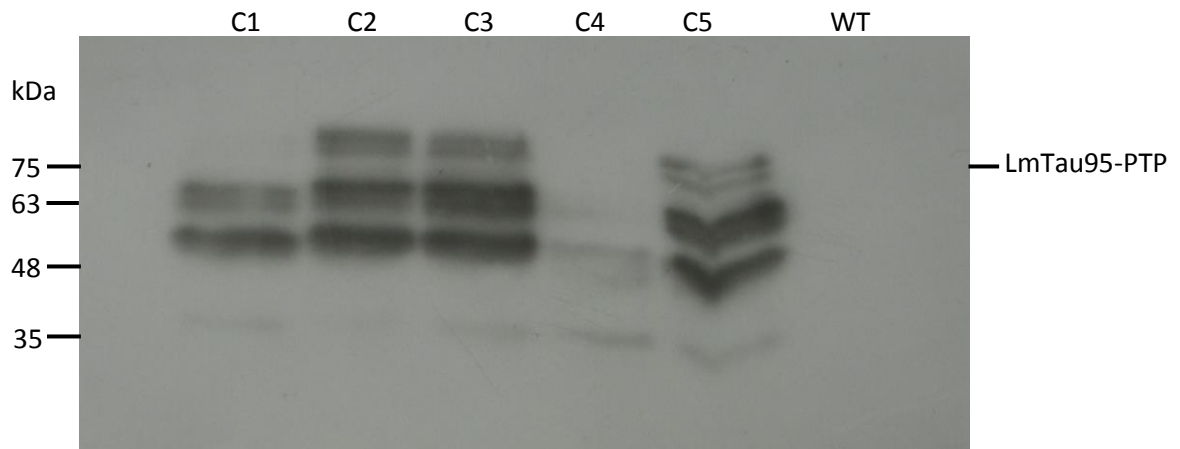


Fig. 31. Ensayo Western blot. Se analizaron las clonas 1-5 transfectantes de *L. major* con Tau95-PTP (C1 a C5), así como células silvestres (WT). Se usó el anticuerpo anti-Prot C. Se utilizó el marcador para proteínas CSL-BBL de Cleaver Scientific®.

5.6 Purificación por afinidad en tándem

Los experimentos de purificación por afinidad en tándem se llevaron a cabo para el aislamiento de complejos proteicos de LmTau95. Para estos ensayos se usó la clona 2. El extracto proteico se transfirió a una columna cromatográfica que contenía una matriz de Sefarosa-IgG. Después de un período de tres horas de incubación a 4°C, se incubó con la proteasa TEV durante toda la noche a 4°C, para liberar el complejo proteico de las perlas. Posteriormente se transfirió el eluido a una nueva columna cromatográfica con una matriz de afinidad de Prot C. Los complejos proteicos se liberaron usando agentes quelantes, y el eluido final fue concentrado y analizado mediante electroforesis (Figura 32).

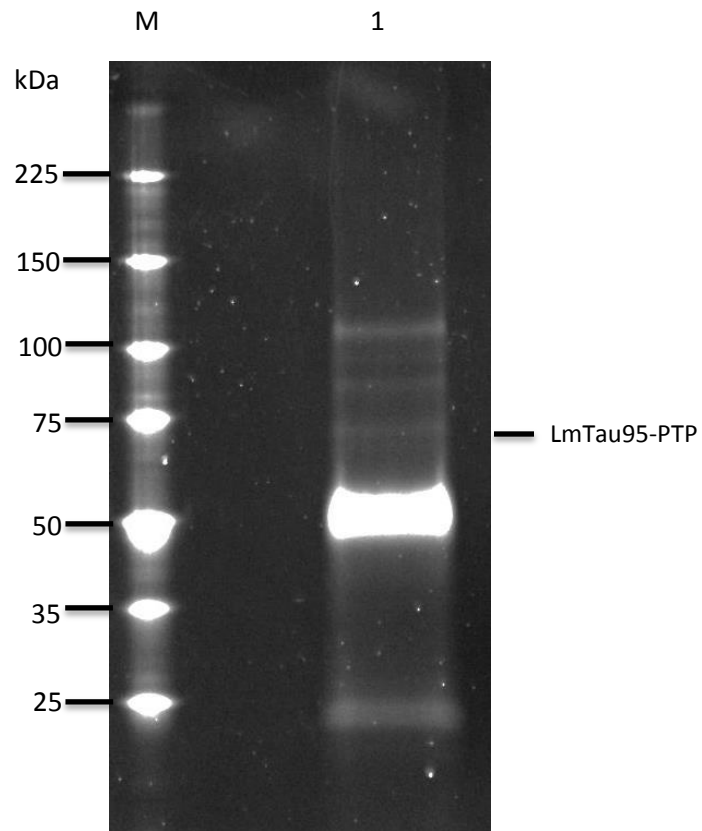


Fig. 32. Proteínas obtenidas mediante purificación por afinidad en tándem de LmTau95-PTP. La muestra utilizada corresponde a una alícuota del material total concentrado. Gel de gradiente (4-15%) de poliacrilamida (Mini-PROTEAN® TGX™ Precast Gel) teñido con Sypro Ruby. Marcador Broad Range Protein Molecular Weight Markers PROMEGA. La flecha indica a la proteína blanco probable, LmTau95-PTP, cuyo peso molecular es de ~75 kDa. M: marcador; 1: muestra.

En el gel se lograron observar al menos siete bandas, con tamaños que van desde ~25 hasta ~120 kDa (Figura 32). Entre estas bandas se puede observar una de alrededor de 75 kDa, que podría corresponder a LmTau95-PTP, que tiene un tamaño predicho de 74 kDa, más 3.5 kDa del dominio de proteína C.

5.7 Identificación de las proteínas que se asocian con LmTau95

Para conocer la identidad de las proteínas que co-purificaron con LmTau95-PTP, la muestra que contenía este complejo proteico fue concentrada y analizada mediante espectrometría de masas. Para esto, se realizó una electroforesis corta para introducir la muestra completa en un gel de poliacrilamida, interrumpiendo la electroforesis una vez que la muestra había corrido aproximadamente 1 cm. Este gel fue teñido con GelCode Blue Stain Reagent. Posteriormente, se cortó en dos partes el fragmento del gel que contenía todas las proteínas, las cuales se enviaron a analizar a la Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigación y a la Industria (USAI) de la UNAM. Los péptidos obtenidos se identificaron comparando su secuencia con la base de datos del genoma de *L. major*.

Además de LmTau95, se identificaron dos proteínas (LmjF.27.0990 y LmjF.12.0560) (Tabla 4), anotadas como proteínas hipotéticas en la base de datos, que podrían corresponder a las subunidades Tau55 y Tau131 de TFIIC (ver Discusión).

Asimismo se purificaron nueve proteínas adicionales (Tabla 4), las cuales, de acuerdo con su función, pueden clasificarse en tres grupos:

- Proteínas relacionadas al citoesqueleto y flagelo: α -tubulina y β -tubulina.
- Proteínas de respuesta a estrés y plegamiento: Proteína *heat shock* 70 (Hsp70), Proteína *heat shock* 83 (Hsp83), Proteína *heat shock* DNAJ, proteína 1 relacionada a proteína *heat shock* 70 mitocondrial (Hsp70.1) y proteína regulada de glucosa 78.
- Síntesis de proteínas: Factor 1 β de elongación de la traducción, proteína 40S ribosomal SA.

Algunas de estas proteínas podrían interactuar con LmTau95. Sin embargo, otras de ellas podrían ser contaminantes. Experimentos futuros nos permitirán confirmar estos resultados.

ID	Proteína	mW (Da)	Péptidos	Cobertura (%)
LmjF.21.1100	Tau95	76501	82	59.5714
LmjF.12.0560	Tau131	148953	17	19.6494
LmjF.27.0990	Tau55	29848	13	77.8571
LmjF.13.0370	α -tubulina	49727	11	25.9423
LmjF.33.0806	β -tubulina	49707	16	38.3747
LmjF.28.2780	Proteína <i>heat shock</i> 70 (Hsp70)	71608	31	47.8723
LmjF.27.2400	Proteína <i>heat shock</i> DNAJ	43573	7	26.0101
LmjF.30.2460	proteína 1 relacionada a proteína <i>heat shock</i> 70 mitocondrial (Hsp70.1)	68905	13	23.622
LmjF.33.0355	Proteína <i>heat shock</i> 83 (Hsp83)	80484	20	30.0999
LmjF.28.1200	Proteína regulada por glucosa 78	71896	11	23.7082
LmjF.36.5010	Proteína 40S ribosomal SA	27482	5	20.3252
LmjF.36.1430	Factor 1 β de elongación de la traducción.	23286	2	10.9005

Tabla 4. Proteínas identificadas en la espectrometría de masas.

6. Discusión

Los tripanosomátidos son un grupo de protozoos que representan un problema de salud para el ser humano en zonas tropicales y subtropicales del planeta, pues producen enfermedades graves que pueden ser mortales, como la leishmaniasis o la enfermedad de Chagas, las cuales han sido catalogadas dentro de las enfermedades tropicales desatendidas. Los estudios moleculares de procesos cardinales como la replicación, la transcripción y la traducción ayudarán a obtener un mejor conocimiento de la biología básica de estos organismos, lo cual es necesario para desarrollar estrategias de control de estos parásitos y sus vectores a mediano y largo plazo. En todos los seres vivos, la transcripción es realizada por las RNA Polimerasas, enzimas especializadas en la lectura del DNA para generar moléculas de RNA. Las bacterias y las arqueas solo tienen una RNA Pol, mientras que los eucariontes tienen distintos tipos de RNA polimerasas, cada una responsable de la síntesis de un conjunto distinto de RNAs.

La RNA Pol III cumple un papel fundamental en el desarrollo celular de los eucariontes. Se encarga de la transcripción de genes que generalmente codifican para RNAs estructurales que son esenciales para la viabilidad celular, tales como los tRNAs, 5S rRNAs, U6 snRNA, snRNP, 7SL RNA, entre otros.

Para que se dé el inicio de la transcripción es indispensable tener condiciones necesarias para la formación del PIC. Los factores de transcripción son aquellas moléculas que regulan el nivel de transcripción a través de la unión directa al DNA y que generarán las condiciones óptimas para la unión de la RNA Pol al DNA para que inicie la transcripción de un gen.

TFIIIC es un factor de transcripción de la RNA Pol III que ha sido estudiado ampliamente en levadura y humano. Sin embargo, no se ha descrito su presencia en tripanosomátidos, por lo que en este estudio se hizo un análisis molecular de Tau95, una subunidad de TFIIIC, en *L. major*.

El análisis *in silico* de la secuencia de LmTau95 demostró que existe poca similitud con sus ortólogos en levaduras y vertebrados, lo que sugiere que es una proteína poco conservada a lo largo de la escala evolutiva (Figura 16). Aún entre organismos relacionados como *S. pombe* y *S. cerevisiae* existe una identidad de sólo 23.4% entre los ortólogos de Tau95. Una excepción la constituye Tau95 de vertebrados, pues se presenta una identidad de 85.3% entre humano y ratón (Tabla 2). Asimismo, entre diferentes especies de *Leishmania* se observa una alta conservación en la secuencia de Tau95 (Figura 21 y Tabla 3). En Tau95 de *S. pombe*, se han descrito dos dominios conservados: el dominio de dimerización en el N-terminal y el dominio de unión a DNA en el C-terminal. A su vez, el dominio de unión a DNA se divide en dos subdominios: hélice alada y WHI. La región más conservada de Tau95 es el dominio de unión a DNA. Topológicamente, el motivo de hélice alada es una estructura compacta formada por tres α -hélices y tres cadenas β , dispuestas en el orden $\alpha 1$ - $\beta 1$ - $\alpha 2$ - $\alpha 3$ - $\beta 2$ - $\beta 3$ (Gajiwala y Burley, 2000). Se pueden encontrar algunas estructuras específicas antes de la hélice $\alpha 1$ (como la hélice $\alpha 0$) o entre las hélices $\alpha 2$ y $\alpha 3$. El motivo hélice alada está presente tanto en procariontes como en eucariontes, y se encuentra en proteínas que participan en diferentes procesos celulares, desde la regulación de la transcripción hasta el procesamiento del RNA. Principalmente se ha descrito como un dominio de unión a DNA, y recientemente, ha demostrado estar involucrado en la apertura del DNA. Se cree también que el motivo hélice alada es uno de los dominios más antiguos relacionados con la transcripción, y como tal está ampliamente representado en múltiples factores de transcripción (Gajiwala y Burley, 2000; Teichmann *et al.*, 2012). En este estudio, se predijo la estructura secundaria de LmTau95 y se realizó un modelo tridimensional que sugiere una conformación similar a la reportada en *S. pombe*. El dominio de hélice alada conserva la estructura en ambos modelos, siendo la región más conservada en comparación del resto de la proteína (Figuras 17 y 19), lo que podría indicar una función similar a la que se le ha otorgado a este tipo de dominios en otros organismos.

El análisis *in silico* reveló también que el extremo C-terminal de LmTau95 puede tener una función importante, ya que presenta una región rica en aminoácidos ácidos (Figura 16),

que ya ha sido reportada antes en *S. pombe* (Taylor *et al.*, 2013b), y que puede conferir una actividad autoinhibitoria de la unión del complejo Tau95/Tau55 al DNA, incrementando así la especificidad de reconocimiento del DNA, previniendo uniones no específicas.

En 1990, Bartholomew *et al.* demostraron por primera vez que Tau95 se une a la Caja A en genes de SUP4 tRNA en *S. cerevisiae*. Posteriormente se han realizado diversos experimentos, para determinar el papel que ocupa dentro del factor de transcripción TFIIC. Manaud *et al.* (1998) reportaron que Tau95 interactúa con Tau55 en *S. cerevisiae*. Realizaron ensayos de doble híbrido para estudiar las interacciones de Tau55 con los demás componentes del sistema de Pol III, y determinaron que el extremo C-terminal de Tau55 es esencial para la interacción con Tau95. Recientemente, Taylor *et al.* (2013b) obtuvieron el cristal del heterodímero Tau55/Tau95 en *S. pombe*, donde se demuestra la unión de estas dos subunidades. Este complejo se parece mucho al heterodímero reportado para dos subunidades del factor de transcripción TFIIIF, Rap30/Rap74. De manera interesante, estas dos subunidades se unen mediante una configuración de barril triple β , que en conjunto se compone de 16 β -plegadas y 4 α -hélices, al igual que Tau95/Tau55 (Gaiser *et al.*, 2000).

Además de LmTau95, ninguna otra subunidad de TFIIC ha sido identificada en *L. major*. De manera interesante, una de las proteínas reportadas en nuestros experimentos de purificación por afinidad en tándem es LmjF.27.0990 (Tabla 4), un probable ortólogo de Tau55 en *L. major* (LmTau55). La comparación de la secuencia de LmTau55 con SpTau55 (Figura 33) mostró una identidad del 22.15% entre ambas secuencias. A nivel de estructura secundaria se pudo predecir que ambas proteínas comparte tres β -plegadas en una región conservada del extremo C-terminal, conocida como motivo nuclear (*core motif*) (Dumay-Odelot *et al.*, 2007). Además, esta región de 34 aminoácidos (del 35-68) en *S. pombe* es la que más residuos comparte con *L. major*, y en general conserva parte de la estructura secundaria reportada por Taylor *et al.* (2013b) para *S. pombe*. Así, es probable

que en *L. major*, como en otras especies, Tau95 y Tau55 formen un heterodímero que participe activamente en el inicio de la transcripción de la RNA Pol III.

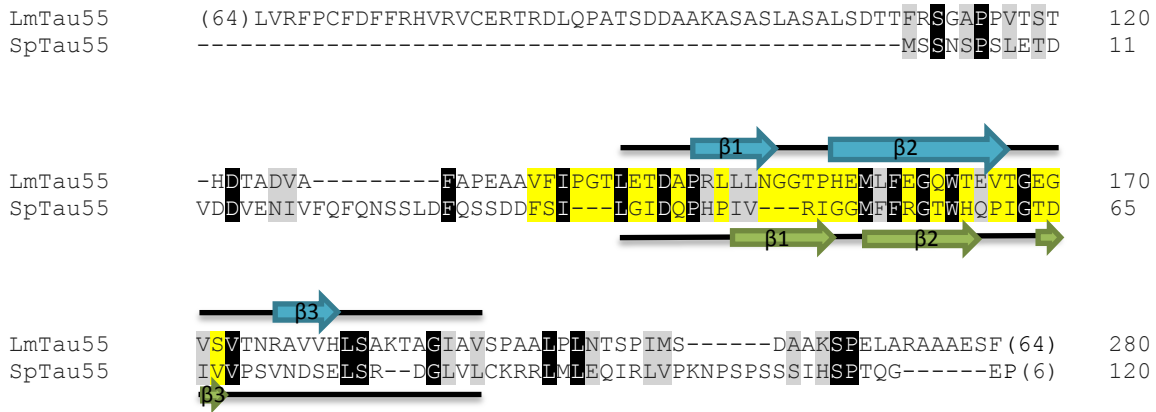


Fig. 33. Comparación de secuencias de aminoácidos entre Tau55 de *L. major* (LmTau55) y *S. pombe* (SpTau55). Los residuos conservados y semiconservados se encuentran sombreados en negro y gris, respectivamente. La región sombreada en amarillo (residuos 35-68) corresponde al motivo nuclear. Se ilustran las β -plegadas predichas para LmTau55 en color azul y en color verde las reportadas para SpTau55.

Además de Tau95 y Tau55, el dominio TauA de TFIIC está formado por Tau131, que es la subunidad más grande de TauA. Estudios en levadura han demostrado que Tau131 contiene repetidos de tetratricopéptidos (TPRs) y que participa en el reclutamiento de TFIIB, por lo que tiene un papel importante en el ensamble del complejo de preiniciación de la transcripción. Se considera una subunidad bastante flexible, pues se extiende desde la Caja A hasta el sitio de unión de TFIIB y presenta cambios conformacionales importantes durante el ensamble de TFIIB sobre el DNA (Dumay-Odelot *et al.*, 2002). En 2015, Male *et al.* obtuvieron el cristal de Tau131 de los residuos 123-566 de *S. cerevisiae* donde se confirmó la existencia de 10 TPRs, además se predijeron otros nueve en el extremo C-terminal. Esta serie de repetidos ha sido definida como una plataforma de acoplamiento, ya que será esta región en donde se llevarán a cabo diferentes interacciones con Brf1, que a su vez provee los sitios de unión para TBP y finalmente para Bdp1, el cual además compite por sitios de unión con Tau138 de TauB. También encontraron una unión de los TPRs predichos en el extremo C-terminal de Tau131 con Tau95. Jourdain *et al.* (2002) sugirieron que Tau95 puede participar en la interconexión

entre TauA y TauB, además puede tener influencia en el posicionamiento de la subunidad Tau131.

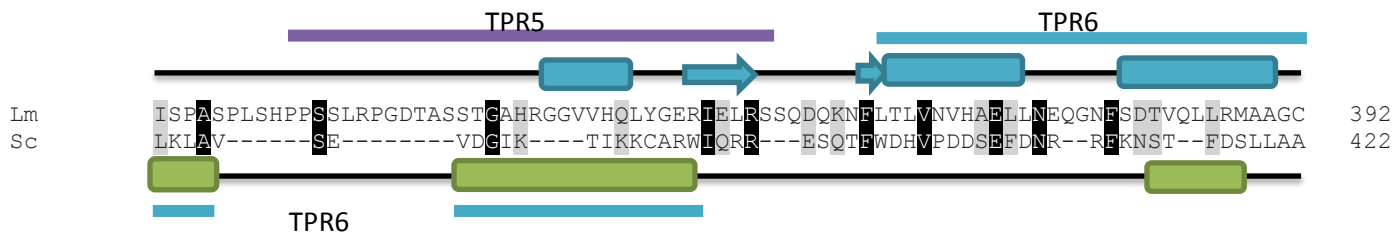
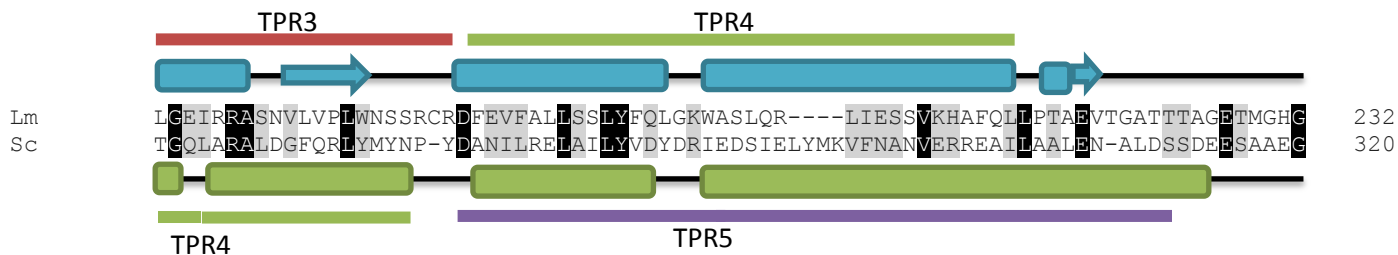
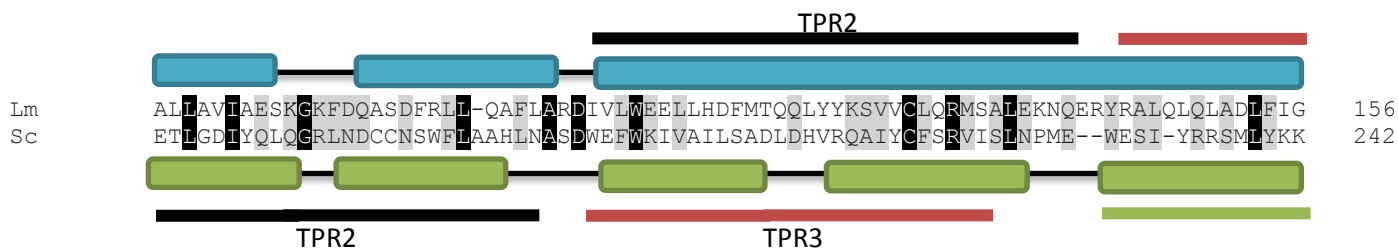
Otra proteína identificada en el ensayo de purificación por afinidad en tándem es LmjF.12.0560 (Tabla 4), la cual parece ser el ortólogo de Tau131 en *L. major* (LmTau131). La comparación de secuencia entre LmTau131 y el ortólogo de Tau131 en *S. cerevisiae* mostró un porcentaje de identidad de 20.68%. Este análisis reveló que la región N-terminal se conserva en *L. major*, ya que el arreglo de las α -hélices es muy similar al reportado para *S. cerevisiae* (Figura 34). Se ilustró el arreglo de los TPRs encontrados en el cristal *S. cerevisiae* y los predichos para *L. major* utilizando la herramienta TPRpred (Zimmermann *et al.*, 2018). Se lograron predecir 12 TPRs en *L. major*, los cuales se encuentran alineados con los de *S. cerevisiae* (Figura 34). Aunque hay dos TPRs predichos adicionales en *L. major*, la estructura general se conserva, por lo cual, es probable que la función de LmTau131 dentro del complejo de transcripción sea muy similar a la de sus ortólogos en levadura y otras especies. La unidad canónica de los motivos TPR adopta una conformación de hélice-giro-hélice, formada por dos α -hélices antiparalelas (Zeytuni y Zarivach, 2012). En concordancia, la predicción aquí reportada sugiere la presencia de dos α -hélices en la mayoría de los TPRs en LmTau131 (Figura 34).

Los ensayos de purificación por afinidad en tándem sugirieron también la unión de LmTau95 a la proteína 40S ribosomal SA y al factor de elongación 1β (Tabla 4). Es de esperar que proteínas ribosomales (PR) sean encontradas en los ribosomas. Sin embargo, no están limitadas a éstos, pues se ha reportado en diversos organismos que las PR pueden cumplir con diferentes funciones extraribosomales, incluyendo la regulación de la transcripción. Brogna *et al.* en 2002 hallaron mediante inmunotinción e hibridación *in situ* alrededor de 20 PR y dos factores de traducción en promotores de RNA Pol II en *D. melanogaster*. También, De *et al.* en 2011 reportaron la unión de tres PRs en genes de tRNAs en *S. pombe*, y que esta asociación puede no solo deberse pasivamente a su afinidad electrostática, sino que aparentemente están involucradas en la biogénesis de tRNAs. Asimismo, se ha visto que algunas proteínas ribosomales co-purifican con complejos transcripcionales de Pol III y que interactúan con genes de tRNA y 5S rRNA,

aunque no se ha determinado con precisión el rol que cumplen (Dieci *et al.*, 2009). De esta manera, la presencia de la proteína 40S ribosomal SA y el factor de elongación 1β en los complejos de LmTau95 sugiere su participación en la transcripción de la RNA Pol III en *L. major*.

Una familia grande de proteínas muy conservadas es la de las proteínas de plegamiento o chaperonas moleculares. Éstas ayudan a otras proteínas nacientes a alcanzar su pliegue final, proteger subunidades del choque térmico durante el ensamblaje de los complejos, evitar la agregación de proteínas o mediar el despliegue específico. Su mayor expresión en respuesta al estrés es un factor clave en la salud de la célula. Las chaperonas son máquinas moleculares que operan en una amplia gama de sustratos. Son cruciales para mitigar los efectos nocivos del plegamiento y agregación de proteínas que, por mecanismos inciertos, pueden causar la muerte celular (Saibil, 2013). Dentro de este grupo se encuentran las proteínas *heat shock*. En este estudio se encontraron al menos cinco diferentes proteínas de este grupo (Tabla 4), que debido a su alta abundancia en la célula podrían asociarse inespecíficamente al complejo de proteínas de LmTau95 y copurificar con éste. Sin embargo, no podemos descartar su participación en la transcripción de la RNA Pol III.

Otras proteínas muy abundantes en la célula que se encuentran muy conservadas desde bacterias hasta humano son las tubulinas. Estas proteínas son una parte esencial del citoesqueleto y forman la estructura interna de cilios y flagelos. Al ser proteínas tan abundantes en la célula, es frecuente su copurificación con diversos complejos proteicos (Casimeris, 2015). Así, consideramos que la α -tubulina y la β -tubulina identificadas en nuestros experimentos no interaccionan *in vivo* con LmTau95, sino que son proteínas contaminantes. Trabajos futuros permitirán confirmar o descartar la interacción entre LmTau95 y las proteínas identificadas en este trabajo.



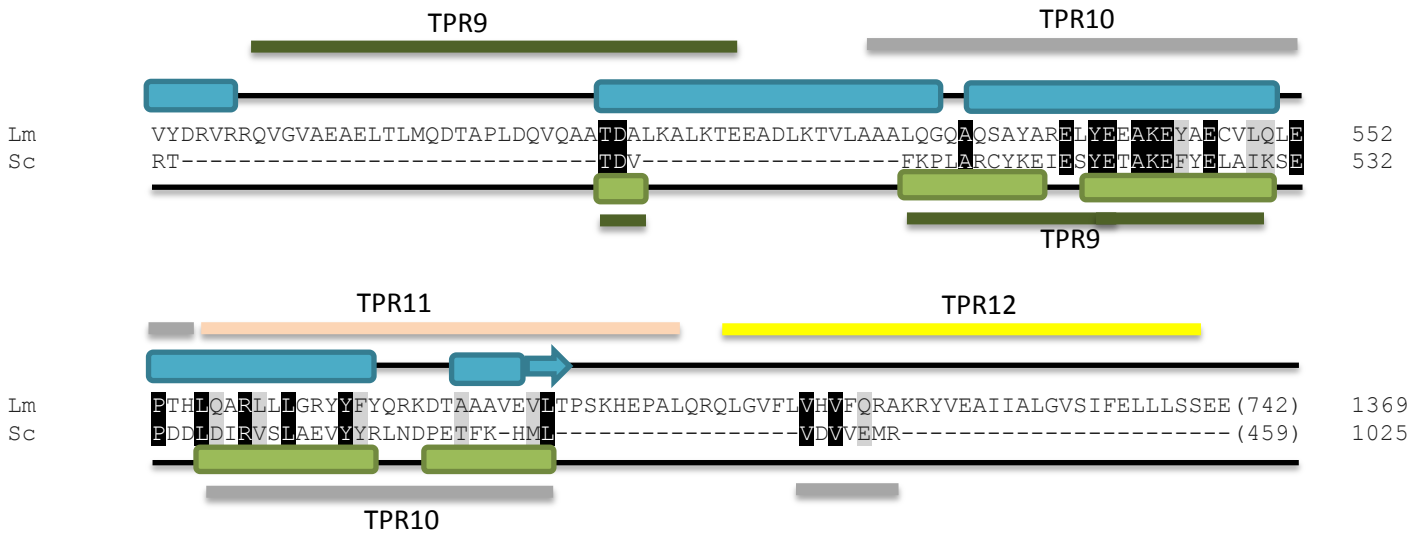


Fig. 34. Análisis de secuencia de aminoácidos de Tau131 entre *L. major* (Lm) y *S. cerevisiae* (Sc). Los aminoácidos conservados y semiconservados se encuentran sombreados en negro y gris, respectivamente. En la parte superior del alineamiento se ilustran como rectángulos redondeados y flechas las α -hélices y β -plegadas predichas para *L. major* y en la parte inferior las reportadas para *S. cerevisiae*. También se señalan mediante barras de distinto color los TPRs confirmados para *S. cerevisiae* y los predichos para *L. major*. Los números entre paréntesis, al inicio y al final de las secuencias, corresponden a aminoácidos omitidos.

7. Logros y conclusiones

- LmTau95 presenta los dominios conservados en los ortólogos de otras especies: el dominio de dimerización, el dominio de unión a DNA y una región rica en aminoácidos ácidos.
- La estructura tridimensional predicha de LmTau95 es muy similar a la reportada para Tau95 de *S. pombe*. La más alta conservación se observó en el motivo de hélice alada en el dominio de unión a DNA.
- Se obtuvieron líneas celulares que expresan a la proteína LmTau95 fusionada a la etiqueta PTP.
- Ensayos de purificación por afinidad en tándem, usando como blanco a LmTau55, permitieron la identificación de las subunidades Tau55 y Tau131 de TFIIC. Esto indica que en *L. major* sí está presente el subcomplejo TauA.
- Se identificaron otras proteínas que presumiblemente se asocian con LmTau95.

8. Bibliografía

- Alemayehu, B. y Alemayehu, M. 2017. Leishmaniasis: A review on Parasite, Vector and Reservoir Host. *Health Science Journal*, 11 (4): 519.
- Alvar J., Vélez ID, Bern C, Herrero M, Desjeux P, *et al.* 2012. Leishmaniasis Worldwide and Global Estimates of Its Incidence. *PLoS ONE*, 7(5): e35671. doi:10.1371/journal.pone.0035671.
- Bauer, S. y Morris, M. T. 2017. Glycosome biogenesis in trypanosomes and the *de novo* dilema. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 11 (4): e0005333.
- Bartholomew, B., Kassavetis, G. A., Braun, R. y Geiduschek, P. 1990. The subunit structure of *Saccharomyces cerevisiae* transcription factor IIIC probed with a novel photocrosslinking reagent. *The EMBO Journal*, 9 (7): 2197-2205.
- Bernardes, L. S. C., Zani, C. L. y Carvalho, I. 2013. Trypanosomatidae Diseases: From the Current Therapy to the Efficacious Role of Trypanothione Reductase in Drug Discovery. *Current Medicinal Chemistry*, 20: 2673-2696.
- Brogna, S., Sato, T. y Rosbash, M. 2002 Ribosome Components Are Associated with Sites of Transcription. *Molecular Cell*, 10: 93-104.
- Brun, I., Sentenac, A. y Werner, M. 1997. Dual role of the C34 subunit of RNA polymerase III in transcription initiation. *The EMBO Journal*, 16 (18): 5730–5741.
- Campbell, D. A., Thomas, S. y Sturm, N. R. 2003. Transcription in kinetoplastid protozoa: why be normal? *Microbes and infection*, 5: 1231-1240.
- Casimeris, L. 2015. Microtubules. En *Lewin's cells*, Ed. Jones & Bartlett Learning LLC: EUA. 3ra Ed., 514-518.
- 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.
- Das, A., Banday, M. y Bellofatto, V. 2007. RNA Polymerase Transcription Machinery in Trypanosomes. *Eukaryot Cell*, 7 (3): 429–434.

- De, S., Varsally, W., Falciani, F. y Brogna, S. 2011. Ribosomal proteins' association with transcription sites peaks at tRNA genes in *Schizosaccharomyces pombe*. *RNA*, 17(9): 1713–1726.
- De Souza, W. 2002a. Basic Cell Biology of *Trypanosoma cruzi*. *Current Pharmaceutical Design*, 8: 269-285.
- De Souza, W. 2002b. From the cell biology to the development of new chemotherapeutic approaches against trypanosomatids: dreams and reality. *Kinetoplastid Biology and Disease*, 1:3.
- Dieci, G., Ruotolo, R., Braglia, P., Carles, C., Carpentieri, A., Amoresano, A. y Ottonello, S. 2009. Positive modulation of RNA polymerase III transcription by ribosomal proteins. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 379: 489–493.
- Docampo, R., de Souza, W., Miranda, K., Rohloff, P. y Moreno, S. N. 2005. Acidocalcisomes - conserved from bacteria to man. *Nature Reviews Microbiology*, 3: 251–261.
- De Gaudenzi, J. G., Noé, G., Campo, V. A., Frasc, A. C. y Cassola, A. 2011. Gene expression regulation in trypanosomatids. *Essays in Biochemistry*, 51: 31-46. doi:10.1042/BSE0510031.
- Dumay-Odelot, H., Acker, J., Arrebola, R., Sentenac, A. y Marck, C. 2002. Multiple Roles of the τ 131 Subunit of Yeast Transcription Factor IIIC (TFIIIC) in TFIIIB Assembly. *Molecular Cell Biology*, 22 (1): 298-308.
- Dumay-Odelot, H., Marck, C., Durrieu-Gaillard, S., Lefebvre, O., Jourdain, S., Prochazkova, M., Pflieger, A. y Teichmann, M. 2007. Identification, Molecular Cloning, and Characterization of the Sixth Subunit of Human Transcription Factor TFIIIC. *Journal of Biological Chemistry*, 282(23):17179-17189.
- 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.

- Fernández-Tornero C. 2018. RNA polymerase I activation and hibernation: unique mechanisms for unique genes. *Transcription*, 9(4), 248-254.
- Gaiser, F., Tan, S. y Richmond, T. J. 2000. Novel dimerization fold of RAP30/RAP74 in human TFIIIF at 1.7Å Resolution. *Journal of Molecular Biology*, 302: 1119-1127.
- Gajiwala, K. S. y Burley, S. K. 2000. Winged Helix Proteins. *Current Opinion in Structural Biology*, 10: 110-116.
- Geiduschek, E. P. y Kassavetis, G. A. 2001. The RNA Polymerase III Transcription Apparatus. *Journal of Molecular Biology*, 310: 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: 1556-1564.
- Gluezn, E., Wheeler, R. J., Hughes, L. y Vaughan, S. 2015. Scanning and three-dimensional electron microscopy methods for the study of *Trypanosoma brucei* and *Leishmania mexicana* flagella. En *Methods in Cell Biology*, 127 (pp. 509-542). Ed. Elsevier.
- Goodfellow, S. J. y Zomerdijs, J. C. 2012. Basic mechanisms in RNA polymerase I transcription of the ribosomal RNA genes. *Sub-cellular biochemistry*, 61, 211-36.
- Gossage, S. M., Rogers, M. E. y Bates, P. A. 2003. Two separate growth phases during the development of *Leishmania* in sand flies: implications for understanding the life cycle. *International journal for parasitology*, 33 (10): 1027-34.
- Grünberg, S. y Hahn, S. 2013. Structural insights into transcription initiation by RNA polymerase II. *Trends in Biochemical Sciences*, 38 (12): 603-611.
- Hailu, A., Argaw, D. D. y Boelaert, M. 2016. Leishmaniasis. En *Neglected tropical diseases – Sub-Saharan Africa* (pp. 87 - 112). Ed. Springer.
- Handler, M. Z., Patel, P. A., Kapila, R., Al-Qubati, Y. y Schwartz, R. A. 2015. Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis: Clinical perspectives. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 73 (6): 897-908.
- Handman, E. 2001. Leishmaniasis: Current Status of Vaccine Development. *Clinical Microbiology Reviews*, 14 (2): 229–243. DOI: 10.1128/CMR.14.2.229–243.2001

- Handman E. y Bullen DV. 2002. Interaction of *Leishmania* with the host macrophage. *Trends in Parasitology*, 18:332–334
- Hoffmann, N. A., Jakobi, A. J., Moreno-Morcillo, M., Glatt, S., Kosinski, J., Hagen, W. J. H., Sachse, C. y Müller, C. W. 2015. Molecular structures of unbound and transcribing RNA polymerase III. *Nature*, 528: 231–236.
- Huang, Y., Hamada, M. y Maraia, R.J. 2000. Isolation and cloning of four subunits of a fission yeast TFIIC complex that includes an ortholog of the human regulatory protein TFIIC β . *The Journal of Biological Chemistry*, 275: 31480–31487.
- Inbar E., Hughitt, V.K., Dillon L. A. L., Ghosh K., El-Sayed N. S. y Sacks D. L. 2017. The Transcriptome of *Leishmania major* Developmental Stages in Their Natural Sand Fly Vector. *mBio* 8 (2) e00029-17; DOI: 10.1128/mBio.00029-17.
- Jamdhade, M. D., Pawar, H., Chavan, S., Sathe, G., Umasankar, P. K., Mahale, K. N., Dixit, T., Madugundu, A. K., Prasad, T. S. K., Gowda, H., Pandey, A. y Patole, M. S. 2015. Comprehensive Proteomics Analysis of Glycosomes from *Leishmania donovani*. *OMICS: A Journal of Integrative Biology*, 19 (3): 157-170.
- Jourdain, S., Acker, J., Ducrot, C., Sentenac, A. y Lefebvre, O. 2003. The τ 95 Subunit of Yeast TFIIC Influences Upstream and Downstream Functions of TFIIC-DNA Complexes. *The Journal of Biological Chemistry*, 278: 10450-10457.
- Kassavetis, G. A, Braun, B. R., Nguyen, L. H. y Geidushek, E. P. 1990. *S. cerevisiae* TFIIB Is the Transcription Initiation Factor Proper of RNA Polymerase III, While TFIIA and TFIIC Are Assembly Factors. *Cell*, 60: 235-245.
- Kassavetis, G. A. y Geiduschek, E. P. 2006. Transcription factor TFIIB and transcription by RNA polymerase III. *Biochemical Society Transactions*, 34: 1082-1087.
- Killick-Kendrick R., Molyneux D. H., Ashford R. W. 1974. *Leishmania* in phlebotomid sandflies. I. Modifications of the flagellum associated with attachment to the mid-gut and oesophageal valve of the sandfly. *Proceedings of the Royal Society B*, 187, 409-419
- Kissinger, J. C. 2006. A tale of three genomes: the kinetoplastids have arrived. *Trends in parasitology*, 22 (6): 240-243.

- 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.
- Krol, A., Carbon, P., Ebel, J. P. y Appel, B. 1987. *Xenopus tropicalis* U6 snRNA genes transcribed by Pol III contain the upstream promoter elements used by Pol II dependent U snRNA genes. *Nucleic Acids Research*, 15: 2463–2478.
- Lassar, A. B., Martin, P. L. y Roeder, R. G. 1983. Transcription of class III genes: formation of the preinitiation complexes. *Science*, 222: 740-748.
- Lewin, B. 2008. Genes IX. McGraw Hill Interamericana: México, D.F.
- Liu, X., Bushnell, D. A. y Kornberg, R. D. (2012). RNA polymerase II transcription: structure and mechanism. *Biochimica et biophysica acta*, 1829 (1): 2-8.
- Magill, A. J. 1995. Epidemiology of the leishmaniases. *Dermatologic Clinics*, 13 (3): 505-523.
- Male, G., von Appen, A., Glatt, S., Taylor, N. M. I., Cristovao, M., Grötsch, H., Beck, M. y Müller, C. 2015. Architecture of TFIIC and its role in RNA polymerase III pre-initiation complex assembly. *Nature Communications*, 6: 7387.
- Manaud, N., Arrebola, R., Buffin-Meyer, B., Lefebvre, H. V., Riva, M., Conesa, C. y Sentenac, A. 1998. A Chimeric Subunit of Yeast Transcription Factor III C Forms a Subcomplex with t95. *Molecular and Cellular Biology*, 18 (6): 3191-3200.
- Martínez-Calvillo, S., Saxena, A., Green, A., Leland, A. y Myler, P. J. 2007. Characterization of the RNA polymerase II and III complexes in *Leishmania major*. *International journal for parasitology*, 37 (5): 491-502.
- Martínez-Calvillo, S., Vizuet-de-Rueda, J. C., Florencio-Martínez, L. E., Manning-Cela, R. G. y Figueroa-Angulo, E. E. 2010. Gene Expression in Trypanosomatid Parasites. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2010: 525241.
- 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: 140-149.

- 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
- Marzouki, N., Camier, S., Ruet, A., Moenne, A. y Sentenac, A. 1986. Selective proteolysis defines two DNA binding domains in yeast transcription factor tau. *Nature*, 323: 176–178.
- Maslov, D. A., Podlipaev, S. A., & Lukes, J. 2001. Phylogeny of the *kinetoplastida*: taxonomic problems and insights into the evolution of parasitism. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 96 (3): 397-402.
- 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.
- Moss, T. y Stefanovsky, V.Y. 2002. At the center of eukaryotic life. *Cell*, 109: 545–548.
- Myler P. J., Audleman L., de Vos, T., Hixson, G., Kiser, P., Lemley, C., Magness, C., Rickel, E., Sisk, E., Sunkin, S., Swartzell, S., Westlake, T., Bastien, P., Fu, G., 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.
- Mylona, A., Fernández, C., Tornero P., Legrand, M., Haupt, A., Sentenac, J. A. y Müller C. W. 2006. Structure of the $\tau 60/\Delta\tau 91$ Subcomplex of Yeast Transcription Factor IIIC: Insights into Preinitiation Complex Assembly. *Journal for Molecular Cell*, 24: 221-232.
- 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.

- Neyer, S., Kunz, M., Geiss, C., Hantsche, M., Hodorau, V., Seybert, A., Engel, C., Scheffer, M., Cramer, P., y Frangakis, A. S. 2016. Structure of RNA polymerase I transcribing ribosomal DNA genes. *Nature*, 540: 607-610.
- Nguyen, T. N., Schimanski, B. y Günzl, A. 2007. Active RNA Polymerase I of *Trypanosoma brucei* Harbors a Novel Subunit Essential for Transcription. *Molecular and Cellular Biology*, 6254–6263.
- Opperdoes, F. R. y Szikora, J. P. 2006. *In silico* prediction of the glycosomal enzymes of *Leishmania major* and trypanosomes. *Molecular and biochemical Parasitology*, 147 (2): 193-206.
- Pace, D. 2014. Leishmaniasis. *Journal of Infection*, 69: 10-18.
- Padilla-Mejía, N. M., 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: 232.
- Park, S. H., Nguyen, T. N., Kirkham, J. K., Lee, J. H. y Günzl, A. 2011. Transcription by the multifunctional RNA polymerase I in *Trypanosoma brucei* functions independently of RPB7. *Molecular and biochemical parasitology*, 180 (1): 35–42.
- Parsons, M. C. y Weil, P. A. 1990. Purification and characterization of *Saccharomyces cerevisiae* Transcription factor TFIIIA. *Journal of Biological Chemistry*, 264, 1092-1099.
- Preusser, C., Jaé, N. y Bindereif, A. 2012. mRNA splicing in trypanosomes. *International Journal of Medical Microbiology*, 4-5: 221-224.
- 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.

- Román-Carraro, F. C., Florencio-Martínez, L. E., Romero-Meza, G., Nepomuceno-Mejía, T., Carrero J. C., Arroyo, R., Ortega-López, J., Manning-Cela, R. y Martínez-Calvillo, S. 2019. TFIIIB Subunit Bdp1 Participates in RNA Polymerase III Transcription in the Protozoan Parasite *Leishmania major*. *BioMed Research International*, 2019: 14.
- 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.
- Saibil, H. 2013. Chaperone machines for protein folding, unfolding and disaggregation. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 14(10): 630-642.
- Sainsbury, S., Bernecky, C. y Cramer, P. 2015. Structural basis of transcription initiation by RNA polymerase II. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 16: 129-143.
- Sakonju, S., Bogehagen, D. F. y Brown, D. D. 1980. A control region in the center of the 5S RNA gene directs specific initiation of transcription: I. The 5' border of the region. *Cell*, 19 (1): 13-25.
- Saraiva, E. M., Pinto-da-Silva, L. H., Wanderley, J. L. M., Bonomo, A. C., Barcinski, M. A. y Moreira, M. E. C. 2005. Flow cytometric assessment of *Leishmania* spp metacyclic differentiation: Validation by morphological features and specific markers. *Experimental Parasitology*, 110: 39-47
- 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): 1942-50.
- Schramm, L. y Hernandez, N. 2002. Recruitment of RNA polymerase III to its target promoters. *Genes & Development*, 16: 2593–2620.
- Singh, S., Kumari, V., Singh, N., 2002. Predicting kala-azar disease manifestations in asymptomatic patients with latent *Leishmania donovani* infection by detection of antibody against recombinant K39 antigen. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 9: 568-572.
- Soong, L. 2009. Leishmaniasis. En *Vaccines for Biodefense and Emerging and Neglected Diseases* (pp. 1275-1289). Ed. Elsevier.

- Taylor, N. M. I., Glatt, S., Hennrich, M. L., von Scheven, G., Grötsch, H., Fernández-Tornero, C., Rybin, V., Gavin, A. C., Kolb, P. y Müller C. W. 2013a. Structural and Functional Characterization of a Phosphatase Domain within Yeast General Transcription Factor IIIC. *The Journal of Biological Chemistry*, 288 (21): 15110-15120.
- Taylor, N. M. I., Baudin, F., von Scheven, G. y Müller, C.W. 2013b. RNA polymerase III-specific general transcription factor IIIC contains a heterodimer resembling TFIIF Rap30/Rap74. *Nucleic Acids Research*, 41 (19): 9183-9196
- Teichmann, M., Dumay-Odelot, H. y Fribourg, S. 2012. Structural and functional aspects of winged-helix domains at the core of transcription initiation complexes. *Transcription*, 3 (1): 2-7. DOI: 10.4161/trns.3.1.18917
- Turowski, T. W. y Tollervey, D. 2016. Transcription by RNA polymerase III: insights into mechanism and regulation. *Biochemical Society Transactions*, 44: 1367–1375.
- Vaidyanathan, R. 2005. Isolation of a Myoinhibitory Peptide from *Leishmania major* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) and its Function in the Vector Sand Fly *Phlebotomus papatasi* (Diptera: Psychodidae). *Journal of Medical Entomology*, 42 (2): 142-152.
- Vannini, A. y Cramer, P. 2012. Conservation between the RNA Polymerase I, II, and III Transcription Initiation Machineries. *Molecular Cell*, 45: 439-446.
- Vélez-Ramírez, D. E., Florencio-Martínez, L. E., Romero-Meza, G., Rojas-Sánchez, S., Moreno-Campos, R., Arroyo, R., Ortega-López, J., Manning-Cela, R. y Martínez-Calvillo, S. BRF1, a subunit of RNA polymerase III transcription factor TFIIB, is essential for cell growth of *Trypanosoma brucei*. *Parasitology*, 142: 1563-1573.
- Venters B. J. y Pugh B. F. 2009. How eukaryotic genes are transcribed. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 44 (2-3): 117–141. doi:10.1080/10409230902858785.
- Wang, Z., Bai, L., Hsieh, Y.J. y Roeder, R.G. 2000. Nuclear factor 1 (NF1) affects accurate termination and multiple round transcription by human RNA polymerase III. *EMBO Journal*, 19: 6823–6832.

- 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.
- Yoshinaga, S.K., Boulanger, P.A. y Berk, A.J. 1987. Resolution of human transcription factor TFIIC into two functional components. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 84: 3585–3589.
- Zeytuni, N. y Zarivach, R. 2012. Structural and functional discussion of the tetra-trico-peptide repeat, a protein interaction module. *Structure*, 20 (3):397-405. doi: 10.1016/j.str.2012.01.006.
- Zhang X., Lai M., Chang W., Yu I., Ding K., Mrazek J., Ng H.L., Yang O.O., Maslov D.A. y Zhou Z.H. 2016. Structures and stabilization of kinetoplastid-specific split rRNAs revealed by comparing leishmanial and human ribosomes. *Nature Communications*, 18 (7): 13223.
- Zimmermann, L., Stephens, A., Nam, S.Z., Rau, D., Kübler, J., Lozajic, M., Gabler, F., Söding, J., Lupas, A.N. y Alva, V. 2018. A Completely Reimplemented MPI Bioinformatics Toolkit with a New HHpred Server at its Core. *Journal of Molecular Biology*, 430: 2237-2243.