



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA
DE MÉXICO



Caracterización molecular de líneas celulares
knock-down de la subunidad C82 de la RNA
polimerasa III en el parásito *Trypanosoma brucei*

TESIS

Para obtener el título de:

BIÓLOGO

PRESENTA

Adrián Javier Romero Chaveste

DIRECTOR DE TESIS

Dr. Santiago Martínez Calvillo



Los Reyes Iztacala, Edo. Méx. 2019



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Agradecimientos

A la Universidad Nacional Autónoma de México, por ser mi *alma máter*, lo cual es causa de un gran honor y orgullo. *“Por mi raza hablara el espíritu”*.

Al Dr. Santiago Martínez Calvillo por darme la oportunidad de trabajar en su laboratorio y por sus aportaciones intelectuales en la realización de este trabajo.

A mis compañeros y técnico académico del Laboratorio de biología molecular de parásitos de la UBIMED por sus enseñanzas técnicas y compañía en especial a la Dra. Fiordaliso que me guío en el camino experimental y por su gran amistad.

A mis revisores de tesis por sus valiosas aportaciones intelectuales la Dra. Yolanda Irasema Chirino López, Dr. Luis Enrique Arias Romero, Dr. Tomás Nepomuceno Mejía y en especial al Dr. Ignacio Peñalosa Castro quien fue un gran tutor y guía en mi toda mi carrera, agradezco su tiempo, enseñanzas y consejos.

Al PAPIIT (DGAPA, UNAM) por la beca de Titulación otorgada (proyecto IN207118).

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.

Agradecimientos personales

A mis padres Maria del Carmen Chaveste Becerra y Adrián Javier Romero Colín por sus grandes enseñanzas de vida, amor, apoyo incondicional y guía en mi camino. Gracias por acompañarme en este camino que hemos recorrido juntos superando cualquier adversidad, sin ustedes este trabajo no hubiera sido posible los amo.

A mi hermano Diego por su compañía, apoyo incondicional, consejos, hermano siempre has sido una parte importante de mi vida y agradezco que hayas estado presente en todos lo momentos difíciles y gratos de mi vida. Gracias por traer al mundo a Regina la cual ha llegado a traer felicidad y amor a nuestra casa.

A mi familia por apoyarme, guiarme y enseñarme a ser una persona integra e inculcarme el amor por la UNAM, por su compañía, risas y convivencias. Este logro es de todos nosotros.

Hugo Quiroz gracias por impulsarme y enseñarme el camino de la lectura y la ciencia. Por creer en mi cuando más lo necesitaba y darme tu apoyo en situaciones difíciles y felices de mi vida.

Oscar Quiroz fuiste y serás un ejemplo a seguir gracias por tus enseñanzas, apoyo incondicional y guía hacia un camino mejor.

Arturo Quiroz por tu apoyo en todo momento, por ser una guía, por inculcarme el amor por los deportes y estar ahí siempre que lo necesito.

Gerardo Quiroz gracias por tus consejos de vida, por impulsarme y orientarme hacia una vida de responsabilidad y trabajo.

Ines Becerra tía te agradezco todo tu cariño y amor que me has proporcionado, tus consejos, platicas y apoyo en todo momento.

A mi novia Alondra por tu compañía, amor, risas y apoyo incondicional. Gracias bebé por estar ahí en todo momento mostrandome tu soporte y amor.

A mis amigos de la universidad por su compañía, debates científicos, trabajo en equipo y momentos inolvidables. En especial a Rafael, Carlos, Sam, Lupe, Priscila.

Dedicatoria

A mi mamá, Mary Carmen Chaveste Becerra.

A mi papá, Adrián Javier Romero Colín.

A mi hermano, Diego Alberto Romero Chaveste.

A mi familia.

“Nada tiene sentido en la biología si no es a la luz de la evolución”

Theodosius Dobzhansky

“Carpe diem”

Poeta romano Horacio

Índice general

Agradecimientos	I
Índice general	IV
Lista de figuras y tablas	VI
Abreviaturas	IX
Resumen	X
1. Introducción	1
1.1 Tripanosomátidos y sus características	1
1.2 Evolución de los tripanosomátidos	2
1.3 Biología de <i>Trypanosoma brucei</i>	3
1.3.1 Ciclo de vida	4
1.3.2 Tripanosomiasis Humana Africana	6
1.3.3 Enfermedad de Nagana	8
1.4 Transcripción en eucariontes	10
1.4.1 Biogénesis de las RNA polimerasas	14
1.4.2 RNA POL I	16
1.4.2.1 Composición, estructura y transcritos	
1.4.3 RNA POL II	18
1.4.3.1 Composición, estructura y transcritos	
1.4.4 RNA POL III	19
1.4.4.1 Composición, estructura y transcritos	
1.4.4.2 Promotores	21
1.4.4.3 Factores de transcripción	22
1.4.4.4 Inicio de la transcripción	23
1.4.4.5 Elongación, término y reiniciación de la transcripción	24
1.4.4.6 Heterotrímero C82/C31/C34	25
1.4.4.7 Subunidad C82	27
1.4.4.8 Evolución de las RNA polimerasas y factores de transcripción generales	29
1.5 Expresión genética en <i>T. brucei</i>	31
1.5.1 Transcripción en tripanosomatidos	33

1.5.2	Transcripción de RNA POL I	34
1.5.3	Transcripción de RNA POL II	35
1.5.4	Promotores y factores de transcripción de la RNA POL II en tripanosomátidos	35
1.5.5	Transcripción de Pol III	36
1.5.6	Antecedentes	38
2.	Hipótesis y objetivos	39
2.1	Hipótesis	39
2.2	Objetivo general	39
2.3	Objetivos particulares	39
3.	Metodología	40
3.1	Análisis bioinformáticos	40
3.2	Extracción de DNA	41
3.3	Cultivo de <i>T. brucei</i>	41
3.4	Análisis de cultivo celular <i>knock-down</i> de <i>T. brucei</i>	41
3.5	Extracción de RNA	42
3.6	Ensayos RT-PCR	42
3.7	Análisis de la abundancia de proteína	43
3.8	Inmunoflorecencia indirecta	44
4.	Resultados	45
4.1	Análisis <i>in silico</i>	45
4.2	Análisis de cultivos <i>knock-down</i> de <i>T. brucei</i> .	50
4.3	Extracción de RNA de los cultivos <i>knock-down</i> de <i>T. brucei</i>	52
4.4	Análisis de la abundancia de mRNA con ensayos RT-PCR	52
4.5	Análisis de la abundancia proteína TbC82	53
4.6	Localización celular de la proteína TbC82	54
5.	Discusión	56
6.	Conclusiones	61
7.	Referencias	62

Lista de Figuras y tablas

Figura 1. Los tres dominios de la vida.

Figura 2. Tripanosomátidos.

Figura 3. Relaciones filogenéticas de tripanosomátidos.

Figura 4. *Typanosoma brucei*.

Figura 5. Morfología celular de *T. brucei*.

Figura 6. La mosca tse-tsé es el vector de *T. brucei*.

Figura 7. Ciclo de vida de *T. brucei*.

Figura 8. Distribución geográfica de las infecciones reportadas de tripanosomiasis africana humana.

Figura 9. Enfermedad del sueño.

Figura 10. Enfermedad de Nagana.

Figura 11. Estructura del DNA y dogma central de la biología molecular.

Figura 12 Diagrama general simplificado de las distintas zonas en las que se dividen las RNA polimerasas.

Figura 13. Las tres RNA polimerasas eucariontes.

Figura 14. Biogénesis de la RNA POL II.

Figura 15. Estructura de RNA POL I.

Figura 16. Estructura, transcripción y procesamiento de la unidad del rRNA.

Figura 17. Promotor y factores de transcripción de la RNA POL I.

Figura 18. Estructura tridimensional de la RNA POL II de levadura.

Figura 19. Representación esquemática de las rutas de ensamblaje del PIC de RNA POL II en humano y levadura.

Figura 20. El promotor basal de la RNA polimerasa II.

Figura 21. Estructura tridimensional de la RNA POL III de *Sacharomyces cerevisiae*.

Figura 22. Los tres tipos de promotores de la RNA POL III.

Figura 23. Promotores de la RNA POL III de mamífero con sus respectivos factores de transcripción.

Figura 24. Los cuatro pasos de la transcripción de la RNA POL III.

- Figura 25.** Comparación de las subunidades homólogas del heterotrímero. C34/C31/C82 y factores de transcripción de las tres RNA POL.
- Figura 26.** Estructura general de C82 (hRPC62) en humano.
- Figura 27.** Estructura de las RNA polimerasas en bacterias, arqueas y eucariontes.
- Figura 28.** Cinco eventos de posibles divergencias de TBP y TFIIB .
- Figura 29.** Similitud estructural entre los dominios WH de C82 de humano (hRPC62) y el factor TFE de arqueas .
- Figura 30.** Transcripción y procesamiento de mRNAs en tripanosomátidos.
- Figura 31.** Esquema de los eventos que conducen al inicio de la transcripción, incluida la unión del complejo de preiniciación y el reclutamiento del RNA POL II al promotor del gen del mini exón RNA SL en *T. brucei*.
- Figura 32.** Estrategia experimental.
- Figura 33.** Alineamiento de la secuencia de aminoácidos de C82 en diferentes especies.
- Figura 34.** Alineamiento de secuencias de C82 de *T. brucei* y *Homo sapiens*.
- Figura 35.** Alineamiento de la secuencia de la proteína C82 de Tripanosomátidos.
- Figura 36.** Estructura tridimensional predicha de C82 de *T. brucei* y *H. sapiens*.
- Figura 37.** Sitios de fosforilación predichos en C82 de *T. brucei*
- Figura 38.** Gráfica de crecimiento del cultivo *T. brucei*/pC82-2T7 en presencia (DOX+) o ausencia (DOX-) de doxiciclina.
- Figura 39.** Gráfica de crecimiento del cultivo de *T. brucei* silvestre en presencia (DOX+) o ausencia (DOX-) de doxiciclina.
- Figura 40.** Análisis del RNA total del cultivo *T. brucei*/pC82-PZJM.
- Figura 41.** Ensayo RT-PCR para verificar la abundancia del mRNA de TbC82 en el cultivo *T. brucei*/pC82-ZJM induciendo con doxiciclina.
- Figura 42.** Análisis electroforético de proteínas totales de cultivos *knock-down* de *T. brucei*.
- Figura 43.** Ensayo Western blot para el análisis de la abundancia de proteína C82 en los cultivos *knock-down*.

Figura 44. Inmunolocalización de la subunidad C82 de la RNA POL III en formas procíclicas de *T. brucei*.

Tabla 1. Nomenclatura de las diferentes subunidades de las RNA polimerasas.

Tabla 2. Resumen de las características del genoma nuclear de los megacromosomas de *T. brucei*.

Tabla 3. Matriz de porcentaje de identidad de las secuencias de aminoácidos de C82.

Tabla 4. Matriz de porcentaje de identidad de las secuencias de C82 de tripanosomátidos.

Abreviaturas

cDNA	DNA obtenido de un proceso de retrotranscripción
DNA	Ácido desoxiribonucleico
dsRNA	RNA de doble cadena
Fig.	Figura
FGT	Factores generales de la transcripción
gDNA	DNA genómico
Kb	Kilobases
KDa	Kilodaltones
M	Molar
µm	Micrómetros
µg	Microgramos
mRNA	RNA mensajero
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
pH	Potencial de hidrógenos
PIC	Complejo de preinicio
RNA	Ácido ribonucleico
RNAi	RNA de interferencia
RNA POL	RNA polimerasa
RNA POL II	RNA polimerasa II
RNA POL III	RNA polimerasa III
rRNA	RNA ribosomal
RT-PCR	PCR a partir de una retrotranscripción
snRNA	RNA pequeño nuclear
snoRNA	RNA pequeño nucleolar
TbC82	Proteína C82 de <i>T. brucei</i>
tRNA	RNA de transferencia
TFE	Factor de transcripción en arqueas

Resumen

Trypanosoma brucei es un parásito diploide causante de la tripanosomiasis africana. Se caracteriza por presentar mecanismos de expresión genética atípicos, como la transcripción policistrónica y el trans-splicing. La RNA polimerasa III (RNA POL III) se encarga de sintetizar moléculas de RNA esenciales para la viabilidad celular, como rRNA 5S, tRNAs, 7SL RNA y U6 snRNA. Está compuesta por 17 subunidades, algunas de las cuales son exclusivas. Entre éstas se encuentra C82, que junto con C34 y C31, forma un subcomplejo esencial en el inicio de la transcripción, al promover la formación del complejo de pre-inicio y la apertura del promotor. En el presente trabajo se inició el estudio estructural y funcional de la subunidad C82 de *T. brucei* (TbC82). Mediante análisis *in silico* se encontró que la secuencia y estructuras secundaria y tridimensional de TbC82 están conservadas en relación con el ortólogo de humano. Para estudiar la función de TbC82, se generaron líneas celulares *knock-down* en las que es posible inducir la degradación del mRNA de TbC82 con doxiciclina por medio de RNAi. La disminución en la abundancia del mRNA y de la proteína TbC82 se confirmó mediante ensayos RT-PCR y Western blot, respectivamente. La subunidad TbC82 de *T. brucei* es esencial para la viabilidad celular de formas procíclicas del parásito, como se demostró al monitorear el crecimiento de los cultivos celulares *knock-down*. La proteína TbC82 en *T. brucei* se localiza en el núcleo.

1. Introducción

1.1. Tripanosomátidos y sus características

Los parásitos nos rodean y son responsables directos de más de 1 millón de muertes humanas en todo el mundo cada año (Ofir-Birin y Regev-Rudzki, 2019). Los miembros de la familia Trypanosomatidae, conocidos como los tripanosomátidos, son un grupo de protozoos flagelados de divergencia temprana en la evolución de los eucariontes (Haag, 1998) (Fig. 1).

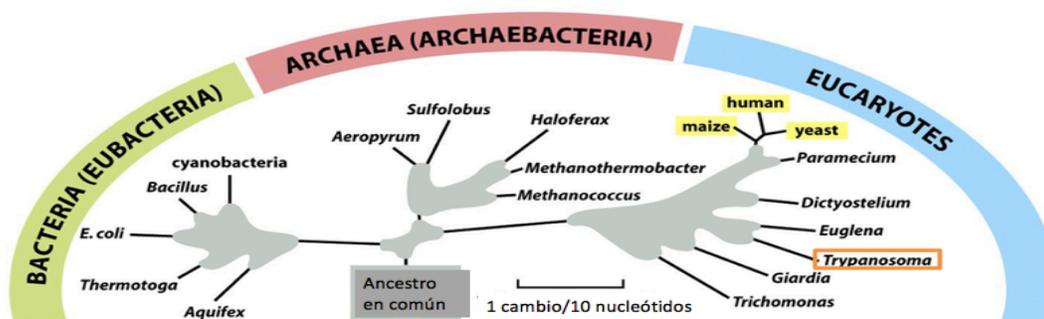


Figura 1. Los tres dominios de la vida. Tomado de Alberts et al., 2016.

La familia Trypanosomatidae pertenece a un grupo biológico peculiar del súper reino *Eukaryota*, clase *Euglenozoa*, orden *Kinetoplastida* (Baldauf et al., 2000). Todos los miembros de este orden están caracterizados por presentar únicamente una mitocondria alargada que abarca toda la célula, cuyo DNA se condensa en un cuerpo masivo llamado cinetoplasto. Otras características distintivas de los tripanosomátidos incluyen la edición del RNA mitocondrial, el aislamiento de enzimas de la glucólisis en organelos llamados glicosomas, el uso del bolsillo flagelar para el tráfico molecular hacia dentro y fuera de la célula, y un citoesqueleto único formado por microtúbulos subpeliculares. Estas características atestiguan la antigüedad y el aislamiento de estos organismos (El-Sayed et al., 2005).

Entre los tripanosomátidos (Fig. 2) se reconocen varios géneros que incluyen parásitos de invertebrados solamente (*Crithidia* y *Leptomonas*, entre otros), parásitos de plantas e invertebrados (*Phytomonas*), y parásitos de vertebrados e invertebrados (*Trypanosoma* y *Leishmania*) (Lukeš et al., 2018).

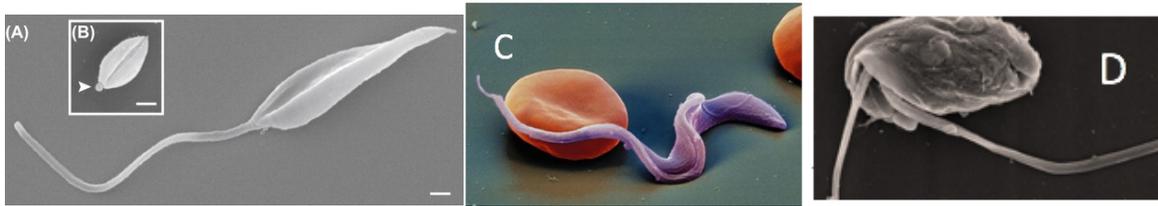


Figura 2. Tripanosomátidos. Micrografías electrónicas de barrido de promastigote (A) y amastigote (B) de *Leishmania mexicana*, tripomastigote de *Trypanosoma cruzi* (C) y *Bodo saltans* (D). Tomado de Gluenz et al., 2015.

1.2 Evolución de los tripanosomátidos

Los tripanosomátidos más estudiados son *Trypanosoma brucei*, *Trypanosoma cruzi* y *Leishmania major*, los cuales son patógenos de humanos que causan enfermedades marcadamente distintas. Estas tres especies exhiben una sorprendente conservación del orden de sus genes, a pesar de que divergieron hace alrededor de 200 millones de años. Los pocos sitios de reorganización del genoma entre estas especies están marcados por la presencia de elementos similares a retrotransposones, lo que sugiere que éstos pueden haber jugado un papel importante en la configuración de la organización de los genomas de los tripanosomátidos (Ghedini et al., 2004).

Las técnicas de secuenciación molecular (especialmente del gen del RNA ribosomal de la subunidad pequeña) ahora están cambiando radicalmente las ideas anteriores sobre la filogenia de estos organismos (Fig. 3). Grandes distancias genéticas (12% de divergencia) separan a *T. brucei* y *T. cruzi*, mientras que las distintas especies de *Leishmania* están separadas por distancias muy cortas (menos del 1% de divergencia) (Kaufer et al., 2017). Los tripanosomátidos parecen poder adaptar con facilidad su metabolismo energético a la disponibilidad de sustratos y oxígeno, y esto puede darles la capacidad de instituir nuevos ciclos de vida si los patrones de comportamiento del hospedero lo permiten. Los procesos sexuales, aunque presentes en al menos algunos tripanosomátidos, o la autofertilización en caso de *T. brucei* (Tait et al., 1996), pueden haber desempeñado un papel menor en la generación de diversidad durante la evolución de los tripanosomátidos.

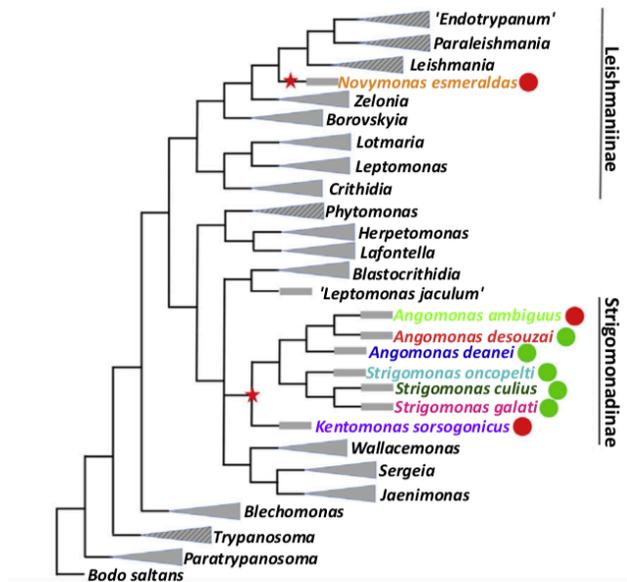


Figura 3. Relaciones filogenéticas de los tripanosomátidos. El eubodonido *Bodo saltans* sirvió como un grupo externo. Los géneros y especies monoxenos están marcados con triángulos y rectángulos grises, respectivamente, mientras que los triángulos están sombreados para los géneros dixenos. Dos orígenes independientes de la endosimbiosis en Trypanosomatidae están marcados con estrellas rojas. Tomado de (Lukeš et al., 2018).

1.3 Biología de *T. brucei*

T. brucei (Bruce, D. 1895) es un protozooario parásito diploide (Fig. 4), flagelado que es causante de la enfermedad del sueño, también conocida como tripanosomiasis humana africana. Existen dos subespecies, que son la forma progresiva lenta *T. brucei gambiense*, que es endémica del oeste y centro de África, y la forma progresiva rápida *T. brucei rhodesiense* que se ubica en el este y sur del mismo continente. Ambas subespecies infectan a humanos y a otros mamíferos, debido a que son resistentes a la apolipoproteína A1 (Cullen et al., 2017). El parásito es transmitido por medio del piquete de un vector díptero hematófago del género *Glossina*, conocido comúnmente como mosca tse-tsé.

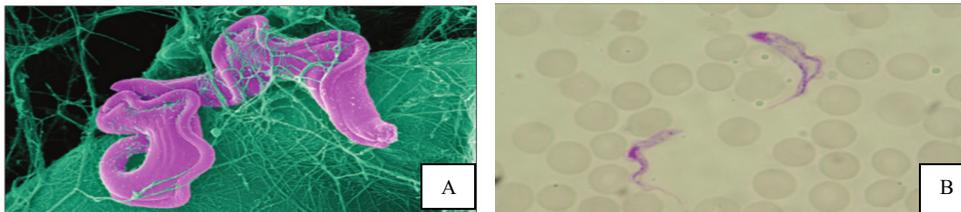


Figura 4. *T. brucei*. (A) Micrografía electrónica de barrido de *T. brucei* (morado) sobre hepatocitos de ratón. (B) Tinción Giemsa de *T. brucei*. Tomado de Búscher et al., 2017.

T. brucei es un organismo unicelular eucarionte que presenta una forma de hoja alargada con dimensiones aproximadas de 20-30 μm de largo y 12 μm de ancho (Fig. 5). Posee un flagelo que se extiende a lo largo de la membrana celular formando la llamada membrana ondulante. El flagelo contiene un axonema con una configuración típica de 9 + 2, que promueve el movimiento flagelar y por lo tanto su desplazamiento. La reproducción es por fisión binaria longitudinal (Vaughan y Gull, 2008).

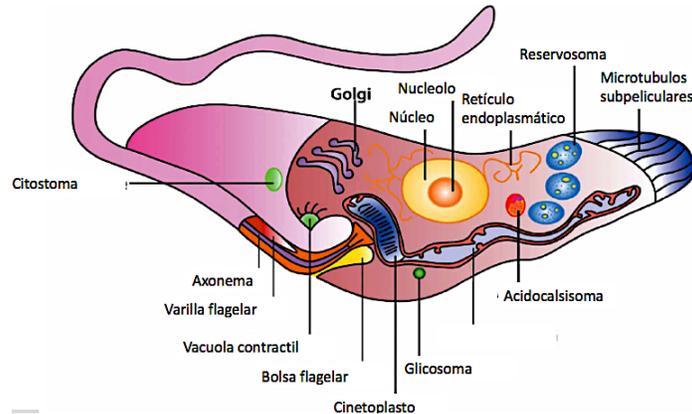


Figura 5. Morfología celular de *Trypanosoma brucei*.

1.3.1 Ciclo de vida

El ciclo de vida del parásito se alterna entre un hospedero mamífero y la mosca tsetse (Fig. 6). Cuando la mosca se alimenta de un mamífero infectado, los parásitos en su forma de tripomastigote sanguíneo llegan al tracto digestivo del insecto, y en un lapso de 3 a 5 semanas ocurre una diferenciación celular a su forma de tripomastigotes procíclicos (Fig. 7) (Brun *et al.*, 2010). Éstos se multiplican y se transforman en epimastigotes, los cuales migran a las glándulas salivales de la mosca en donde se multiplican nuevamente y se transforman en tripomastigotes metacíclicos, que son la forma infectiva. Éstos permanecen ahí hasta que la mosca vector vuelve a alimentarse de otro mamífero, infectándolo. Dentro del nuevo hospedero, en el torrente sanguíneo ocurre otra diferenciación celular dando paso a los tripomastigotes sanguíneos, los cuales se multiplican e invaden el sistema nervioso central (Fig. 7) (Stuart *et al.*, 2008).

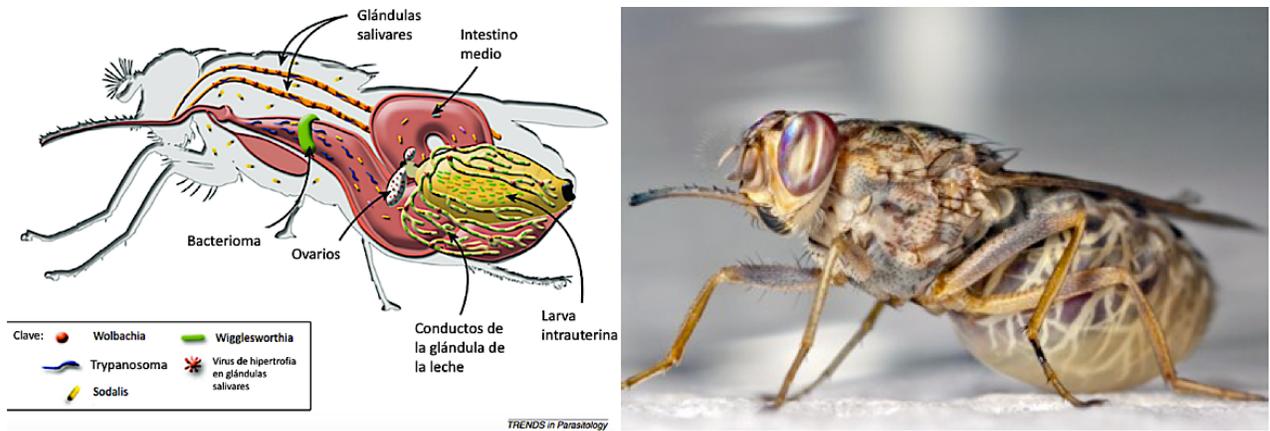


Figura 6. La mosca tse-tse es el vector de *T. brucei*. Izquierda: esquema de *Glossina sp.* Se señalan algunos de sus órganos internos y organismos simbiotes como las bacterias *Wolbachia* y *Wigglesworthia* que contiene. Figura tomada de Aksoy, et al., 2013. Derecha: fotografía de una mosca tse-tse hembra embarazada (*Glossina morsitans*) de una colonia mantenida en la Escuela de Salud Pública de Yale en New Haven, CT. Foto de Geoffrey M. Attardo.

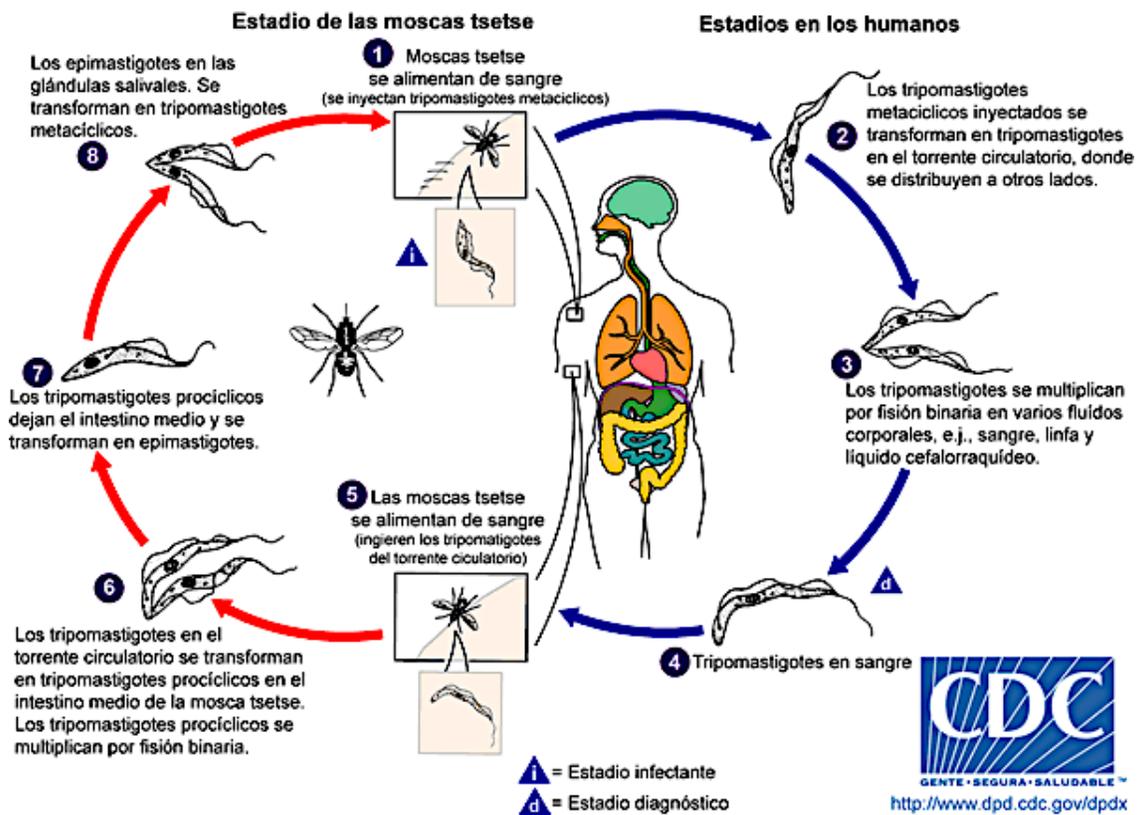


Figura 7. Ciclo de vida de *T. brucei*. Tomado de: <https://www.cdc.gov/parasites/sleepingsickness/biology.html> Abril 2019.



1.3.2 Tripanosomiasis Humana Africana

Existen dos formas de esta enfermedad: la infección crónica y la infección aguda. *Trypanosoma brucei gambiense* se encuentra en 24 países en África occidental y central (Fig. 8), representa actualmente el 98% de los casos reportados de enfermedad del sueño y causa la infección crónica (Büscher *et al.*, 2014). Por otro lado *Trypanosoma brucei rhodesiense* se encuentra en 13 países del este y sur de África (Fig. 8). Hoy en día, esta forma representa menos del 2% de los casos reportados y causa la infección aguda. Los primeros signos y síntomas se observan unos meses o semanas después de la infección (Bottieau *et al.*, 2019).

El cuadro clínico de la enfermedad puede dividirse en tres etapas, las cuáles están íntimamente relacionadas con el ciclo de vida del parásito. La primera etapa comienza con la picadura de la mosca tse-tsé en el humano (Fig. 9); en el sitio afectado se genera una inflamación cutánea, seguida de fiebre que incluye pérdida de peso, debilidad y prurito, el parásito circula en el torrente sanguíneo, un ambiente rico en nutrientes con temperatura y pH constantes y una alta concentración de glucosa (Büscher *et al.*, 2017). Posteriormente, en la segunda etapa *T. brucei* invade el sistema nervioso atravesando la barrera hematoencefálica y permaneciendo en el líquido cefalorraquídeo, con una sintomatología que incluye alteraciones del ciclo sueño-vigilia, desordenes motores, sensoriales y psicológicos (Fig. 9). Finalmente en la tercera etapa el paciente cae en coma y muere (Büscher *et al.*, 2014). El diagnóstico y tratamiento de la enfermedad son complejos y exigen la intervención de personal especializado. Por ejemplo para la segunda etapa el fármaco recetado es Melarsoprol, que es un derivado del arsénico y produce muchos efectos colaterales indeseables, como la encefalopatía reactiva (síndrome encefalopático), que puede ser mortal (entre 3% y 10%) (OMS, 2019).

Los esfuerzos de control sostenido han reducido el número de nuevos casos. En 2009, el número reportado cayó por debajo de 10 000 por primera vez en 50 años, y en 2015 se registraron 2804 casos (WHO, 2018). Mediante el establecimiento de programas de salud pública, se planea que para el 2020 se reduzcan los casos de tripanosomiasis africana humana causada por *T. b. gambiense* a menos de un caso

por cada 10 000 personas por año, y se planea su eliminación completa para 2030 (Sutherland *et al.*, 2017).

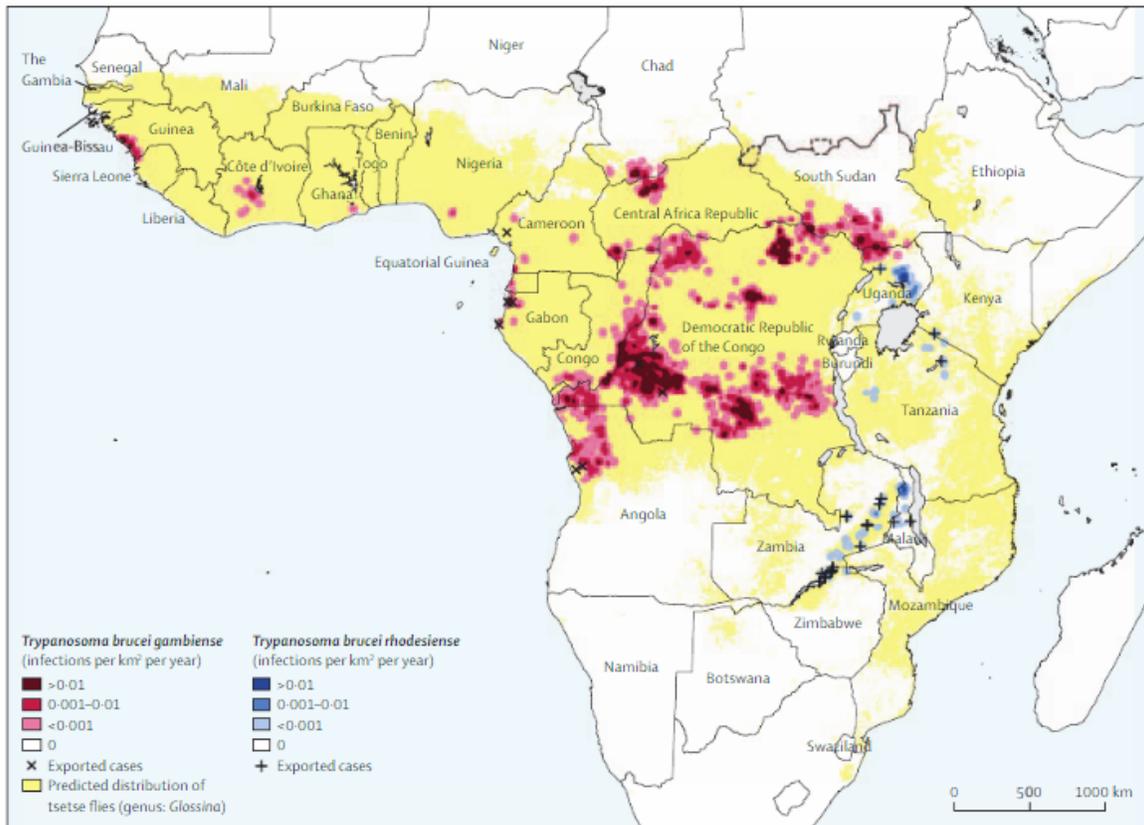


Figura 8. Distribución geográfica de las infecciones reportadas de tripanosomiasis africana humana (período del informe 2010-2014). La enfermedad producida por *T. brucei gambiense* se encuentra en África occidental y central, mientras que la enfermedad causada por *T. brucei rhodesiense* se encuentra en África oriental y meridional. Tomado de Büscher *et al.*, 2017.

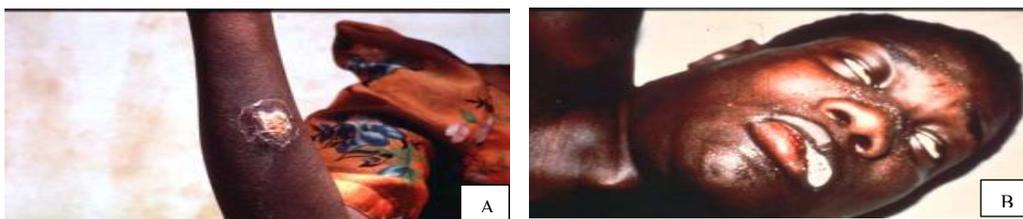


Figura 9. Enfermedad del sueño. (A) Adolescente en Uganda con enfermedad del sueño que muestra el chancro característico en su brazo, ubicando el sitio de la inoculación de la mosca tse-tsé. (B) Un paciente masculino en las etapas finales de la enfermedad del sueño africana, que finalmente termina con su muerte. Imágenes tomadas de <https://web.stanford.edu/group/parasites/ParaSites2001/trypanosomiasis/trypano.htm> (Noviembre 2018).

Si bien la tripanosomiasis africana animal, o nagana, está extendida de 36 países de África subsahariana, que son áreas infestadas por la mosca tse-tsé, la



tripanosomiasis africana humana se caracteriza por una distribución marcadamente focal (Fig. 8). Esta distribución parcheada es el resultado de interacciones complejas entre parásitos, vectores, hospederos y el medio ambiente, que aún no se comprenden completamente. La enfermedad se encuentra usualmente en áreas rurales con hábitats adecuados para la mosca tse-tsé, en donde ésta tiene contacto frecuente con los humanos. Las áreas periurbanas también pueden verse afectadas, especialmente cuando las especies de moscas tse-tsé ribereñas se han adaptado a ambientes antrópicos (Brun *et al.*, 2010).

Las personas pueden infectarse mientras pastorean, cultivan, pescan, cazan, recolectan agua o madera, o participan en cualquier otra actividad que los exponga a la picadura de una mosca tse-tsé infecciosa. Todos los grupos de edad y ambos sexos están en riesgo, aunque la prevalencia es mayor en adultos, y la distribución por sexo varía en función de las actividades de riesgo específicas del género (Welburn *et al.*, 2010).

Los casos exportados de tripanosomiasis africana humana se deben en su mayoría a la enfermedad producida por *T. b. rhodesiense* en turistas que han visitado parques nacionales y reservas de caza en Tanzania, Kenia, Malawi, Uganda, Zambia y Zimbabue. Los casos de enfermedad causada por *T. b. gambiense* son más raros e incluyen a migrantes, refugiados y expatriados a largo plazo. Períodos excepcionalmente largos (hasta 30 años, y posiblemente más) pueden separar la infección y el diagnóstico; por lo tanto, debe considerarse que todas las personas que han vivido en países endémicos de la enfermedad se realicen un diagnóstico para evitar su propagación (Büscher *et al.*, 2017).

1.3.3 Enfermedad de Nagana

El nombre Nagana se deriva de "anagana", la palabra Zulú para la tripanosomiasis transmitida por la mosca tse-tsé, así como para otras enfermedades debilitantes que afectan a los animales domésticos. Dos subespecies de tripanosomas, *T. b. rhodesiense* y *T. b. gambiense* infectan a humanos y animales silvestres, así como a animales domésticos, como cerdos y perros. Otra subespecie, *T. b. brucei*, así como *T. congolense* y *T. vivax* infectan el ganado, causando la enfermedad de Nagana (Fig. 10).

Debido a las infecciones provocadas, estos parásitos afectan la producción ganadera y causan pérdidas económicas masivas, por lo cual tienen implicaciones en el ámbito socio-económico en zonas en desarrollo rural en países Africanos con pérdidas de alrededor de \$4.5 billones de dólares anuales (Kristjanson *et al.*, 1999).

Los animales pueden hospedar los parásitos que son patógenos para el ser humano, especialmente *T. b. rhodesiense*; por lo tanto, los animales domésticos y los animales silvestres son un reservorio importante. Los animales también pueden infectarse con *T. b. gambiense* y servir de reservorio en menor medida (OMS, 2019).

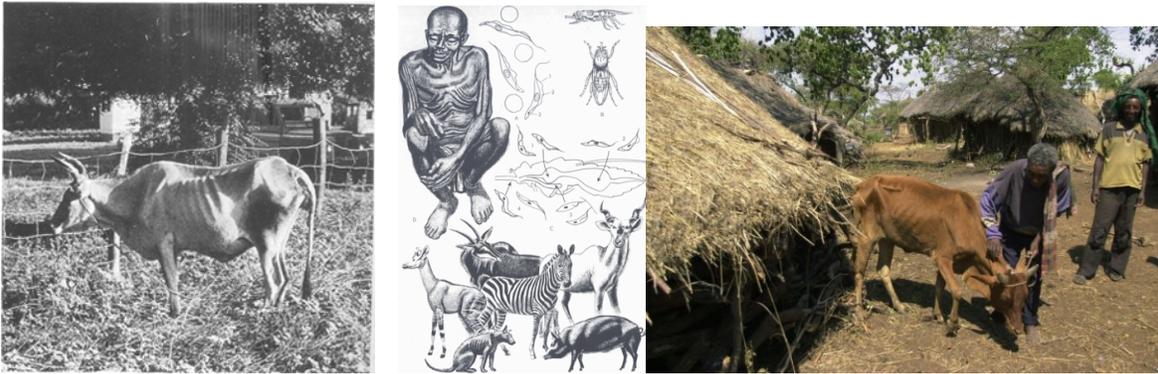


Figura 10. Enfermedad de Nagana. Vaca hembra anciana con tripanosomiasis crónica (imagen de la izquierda). Reservorios de la enfermedad de nagana (imagen central). Ganado infectado con nagana (imagen derecha). Imágenes tomadas de <http://www.yalescientific.org/2013/05/waking-up-to-the-mechanism-of-african-sleeping-sickness-serendipitous-discovery-yields-new-clues-for-prevention/> Septiembre 2019

A lo largo de su ciclo de vida complejo las especies de tripanosomas como *T. brucei* debe adaptarse a condiciones ambientales muy diversas, con temperatura y pH cambiantes, para sobrevivir y diferenciarse en múltiples formas de desarrollo lo cual lo hace un blanco de investigación interesante (Devaux *et al.*, 2006). Para poder adaptarse, el parásito debe regular de forma muy precisa la expresión de sus genes. Así, en nuestro laboratorio estamos interesados en el estudio de la transcripción atípica que presentan *T. brucei* y otros tripanosomátidos. En particular, nuestro trabajo se ha enfocado al estudio de la transcripción de la RNA polimerasa III (RNA POL III), la cual sintetiza moléculas pequeñas de RNA que son esenciales para diversas funciones celulares que incluyen la síntesis de proteínas y procesamiento de RNAs (Martínez-Calvillo *et al.*, 2010).



1.4 Transcripción en eucariontes

El “dogma central” de la biología molecular explica el flujo de información de la vida en tres niveles (Crick, 1970) (Fig. 11). El DNA es una molécula que contiene la información expresada con cuatro bases nitrogenadas (adenina, timina, citosina, guanina). Cada secuencia es única y caracteriza a cada una de las especies vivas que existen en el planeta, la cual se tiene que heredar a sus descendientes y por ende se tiene que replicar para así asegurar la permanencia de su información (Fig. 11). Este proceso es llamado replicación del DNA (Meselson y Stahl, 1958). El siguiente flujo de información es la transcripción génica, en la que la secuencia del DNA tiene que ser transformada a moléculas de RNA. Éste es un proceso fundamental de la vida realizado por un conjunto de proteínas altamente dinámicas, con la RNA polimerasa (RNA POL) como componente central (Fig. 12) (Losick y Chamberlin, 1976). La regulación de la expresión génica es esencial para la homeostasis celular y para el desarrollo coordinado de organismos multicelulares. En eucariontes, la expresión génica nuclear se logra mediante tres RNA polimerasas dependientes de DNA: RNA POL I, II y III (Roeder y Rutter 1969, 1970) (Fig. 13). Existen regiones promotoras específicas para cada RNA polimerasa. Un promotor está definido como la secuencia de nucleótidos necesaria para el inicio de la transcripción que está conservada y se encuentra 50 pb río arriba del inicio de la transcripción (Boeger *et al.*, 2005). La transcripción se realiza en el nucleoplasma y el nucléolo, la cromatina tiene que estar en estructura abierta, así que los nucleosomas deben de ser removidos de la secuencia promotora, que es la región de DNA a la que se unen los factores generales de transcripción (FGT) y la RNA POL (Konberg, 2007). Los FGT con dominios de unión a DNA son los primeros en unirse al promotor. Posteriormente otras familias de FGT que tienen afinidad por proteínas interactúan con los FGT de unión a DNA y secuencialmente se recluta la enzima RNA POL para formar un complejo de preiniciación (PIC) que lleva a cabo la apertura de la cadena de DNA para así sintetizar una molécula de RNA (Xu *et al.*, 2017).

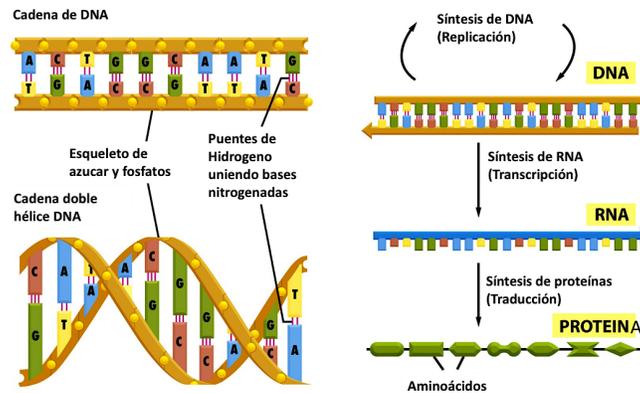


Figura 11. Estructura del DNA (izquierda) y dogma central de la biología molecular (derecha). Modificado de Alberts et al., 2016.

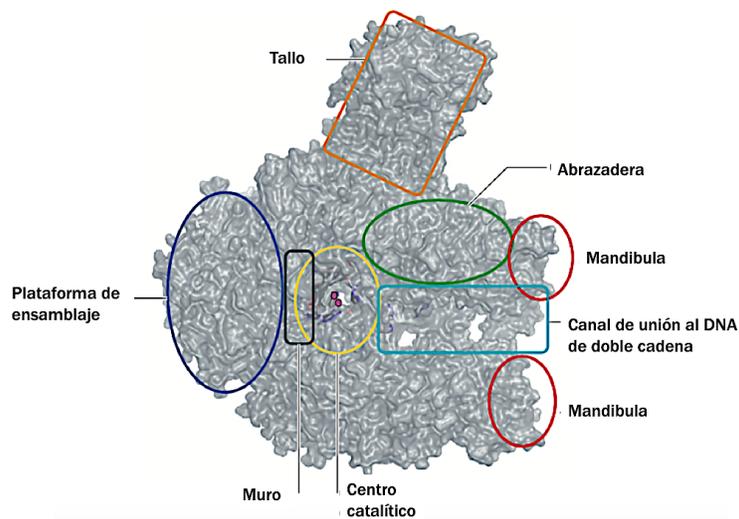


Figura 12. Diagrama general simplificado de las distintas zonas en las que se dividen las RNA polimerasas. Modificado de Werner y Grohmann, 2010.

Las RNA POL, I, II y III de eucariontes catalizan la transcripción dependiente de DNA en distintos productos de RNA por el mismo mecanismo presente en bacterias y arqueas. La RNA POL I sintetiza principalmente RNA ribosomales (rRNAs) 18S, 28S y 5.8S; es de localización nucleolar y está constituida por 14 subunidades (Vannini et y Cramer P, 2012). La RNA POL II se encarga de sintetizar RNA mensajeros (mRNAs) los cuales son elementales para la síntesis de proteínas, ya que contienen la secuencia de la proteína a traducir, además de RNAs largos no codificantes (lncRNA); está ubicada en el nucleoplasma y conformada por 12 subunidades (Qu y Adelson, 2012). La RNA POL III se encarga de la transcripción de genes de RNAs de transferencia (tRNAs), los cuales son un elemento fundamental ya que acarrean a los aminoácidos necesarios hacia el ribosoma para la síntesis de proteínas. Asimismo, la

RNA POL III sintetiza el rRNA 5S, el cual forma parte de la subunidad mayor del ribosoma y se encuentra en el núcleo catalítico, el 7SL RNA y el RNA pequeño nuclear (snRNA) U6, entre otros RNAs pequeños. Está compuesta por 17 subunidades, de las cuales tres son específicas: C82, C31, C34 (Hoffman *et al.*, 2015).

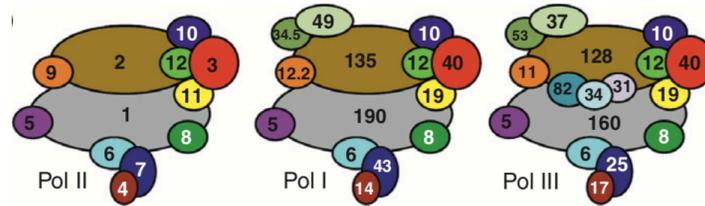


Figura 13. Las tres RNA polimerasas eucariotas. Se indica el nombre de cada subunidad. Tomado de Wild y Cramer, 2012.

Bacteria	Arquea RNA POL	RNA POL I*	RNA POL II*	RNA POL III*
β	Rpo1 (RpoA)	A190	Rpb1	C160
β	Rpo2 (RpoB)	A135	Rpb2	C128
α	Rpo3 (RpoD)	AC40	Rpb3	AC40
α	Rpo11 (RpoL)	AC19	Rpb11	AC19
ω	Rpo6 (RpoK)	Rpb6	Rpb6	Rpb6
	Rpo5 (RpoH)	Rpb5	Rpb5	Rpb5
	Rpo8 (RpoG)	Rpb8	Rpb8	Rpb8
	Rpo10 (RpoN)	Rpb10	Rpb10	Rpb10
	Rpo12 (RpoP)	Rpb12	Rpb12	Rpb12
	Rpo7 (RpoE)	A43	Rpb7	C25
		A12	Rpb9	C11
	Rpo4 (RpoF)	A14	Rpb4	C17
		A34.5	*TFIIF β	C53
			*TFIIE α	C82
		A49 C-terminal	*TFIIE β	C34
		A49 N-terminal	*TFIIF α	C37
				C31

Tabla 1. Nomenclatura de las diferentes subunidades de las RNA polimerasas. *Factores de transcripción *S. cerevisiae* que son homólogos a algunas subunidades de las RNA POL.



1.4.1 Biogénesis de las RNA polimerasas

En las células eucariotas, el núcleo aísla la información genética y provoca la separación espacial y temporal de la replicación del DNA y la transcripción de la síntesis de proteínas citoplásmicas (Fried *et al.*, 2003). La biogénesis y transporte de las RNA polimerasas es del citoplasma (donde se sintetizan las subunidades) hasta el núcleo (donde efectúan el proceso de transcripción). La delección de cualquier subunidad de la RNA POL II tiene como consecuencia la acumulación citoplasmática de Rpb1, lo que sugiere que la RNA POL II debe estar ensamblada completamente para su importación nuclear (Boulon *et al.*, 2010).

Actualmente se sabe muy poco sobre la biogénesis de las RNA POL y sólo se ha podido reconstruir la biogénesis de la RNA POL II (Fig. 14). Las subunidades se derivan de la síntesis de proteínas en el citoplasma o del reciclaje de subunidades después del desmontaje de RNA POL II en el núcleo. El ensamblaje es facilitado por proteínas llamadas factores de ensamblaje. La RNA POL II totalmente ensamblada, que probablemente aún contiene algunos factores de ensamblaje, es transportada al núcleo por el adaptador de importación conservado Iwr1 (Wild y Cramer, 2012).

Hay poca información disponible sobre la biogénesis de RNA POL III. Se describió una posible secuencia de 16 aminoácidos cerca del extremo amino terminal de la subunidad C128, y su supresión llevó a su acumulación citoplásmica (Hardeland y Hurt, 2006). Esto también condujo a la acumulación citoplásmica de un subconjunto de subunidades, como C160, C53 y C11, mientras que otras subunidades (C82, AC40 y C25) permanecieron nucleares. Estos resultados sugieren que el núcleo de RNA POL III se ensambla en el citoplasma, mientras que los subconjuntos adicionales, en particular C17-C25 y C82-C34-C31, se unen al centro catalítico de la enzima en el núcleo celular (Lane *et al.*, 2011). Diversas evidencias sugieren que las subunidades del núcleo de todas las RNA polimerasas usan una ruta similar de ensamblaje (Wild y Cramer 2012).

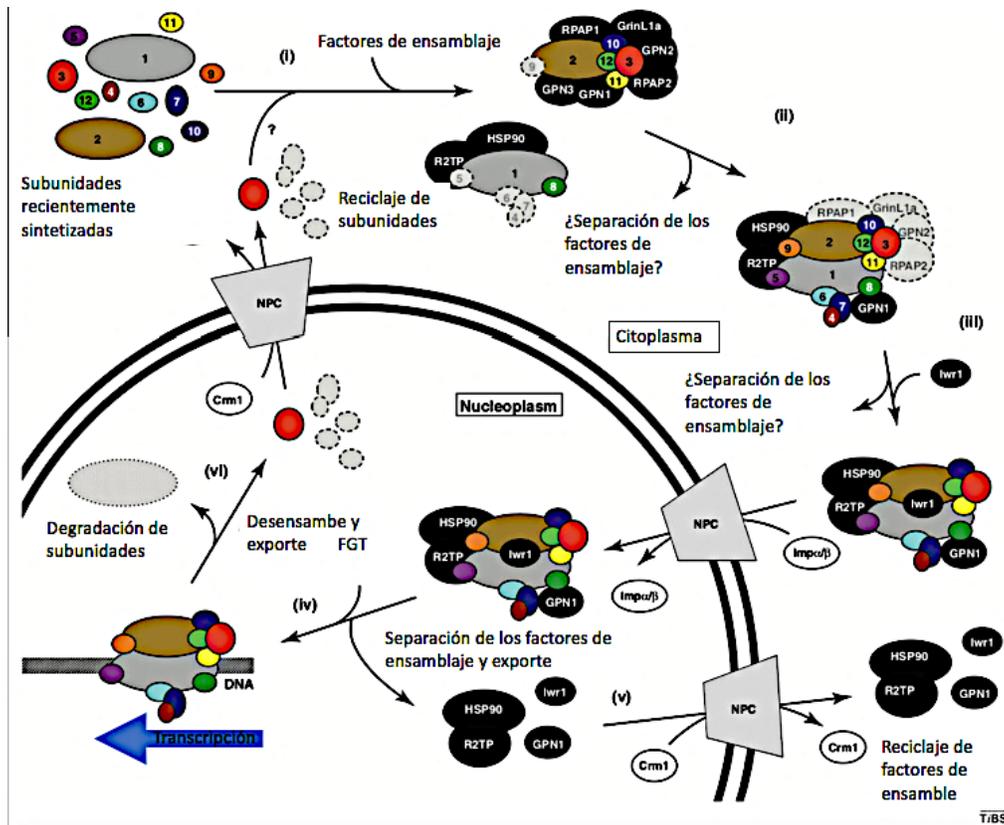


Figura 14. Biogénesis de la RNA POL II. (i) Ensamblaje de subunidades de la RNA POL II por proteínas ensambladoras. (ii) Desacoplamiento de factores de ensamble y unión de subunidades faltantes de la RNA POL II. (iii) Unión de proteínas chaperonas y de transporte como Iwr1 para formar un complejo proteico y el transporte de la RNA POL II que se encuentra en citoplasma hacia el núcleo ingresando a través de los poros nucleares. (iv) Liberación de proteínas chaperonas y unión de factores generales de la transcripción para iniciar la transcripción. (v) Exporte y reciclaje de factores de ensamble hacia el citoplasma. (vi) Degradación, exporte y reciclaje de factores de transcripción. Modificado de (Wild y Cramer 2012).

Finalmente, es probable que el ensamblaje de las tres RNA polimerasas esté coordinado, ya que contienen cinco subunidades comunes: Rpb5, Rpb6, Rpb8, Rpb10 y Rpb12. En *Schizosaccharomyces pombe*, las subunidades comunes son al menos siete veces más abundantes que la subunidad específica de RNA POL II Rpb3. La disponibilidad de la subunidad común Rpb5 puede ser un paso limitante de la velocidad en el ensamblaje debido a su baja abundancia (Wild y Cramer 2012).

1.4.2 Transcripción de la RNA POL I

La síntesis de ribosomas eucariontes es un proceso complejo que está íntimamente relacionado a muchos aspectos del metabolismo de la célula. Algunos cálculos han demostrado que la síntesis de ribosomas es de las actividades más costosas energéticamente del crecimiento celular. En efecto, más del 60% del total de la transcripción celular se lleva a cabo por la RNA POL I (Schneider, 2012).

La RNA POL I (Fig. 15) está compuesta de 14 subunidades que tienen una masa molecular de 589 KDa en levadura. Comparte cinco subunidades con RNA POL II y RNA POL III (Rpb5, Rpb6, Rpb8, Rpb10 y Rpb12) que junto con las subunidades A190, A135, AC40, AC19 y A12.2 forman el núcleo de la enzima (Tabla 1). Cuatro subunidades adicionales completan la enzima: A43/A14 (el tallo heterodimérico) y el heterodímero A49/A34.5 (Fernandez-Tornero *et al.*, 2013). Si bien la organización general de las subunidades es similar en todas las RNA POL eucarióticas, RNA POL I y III han incorporado subunidades similares a factores de transcripción de RNA POL II durante la evolución (Tabla 1) (Vannini y Cramer, 2012).

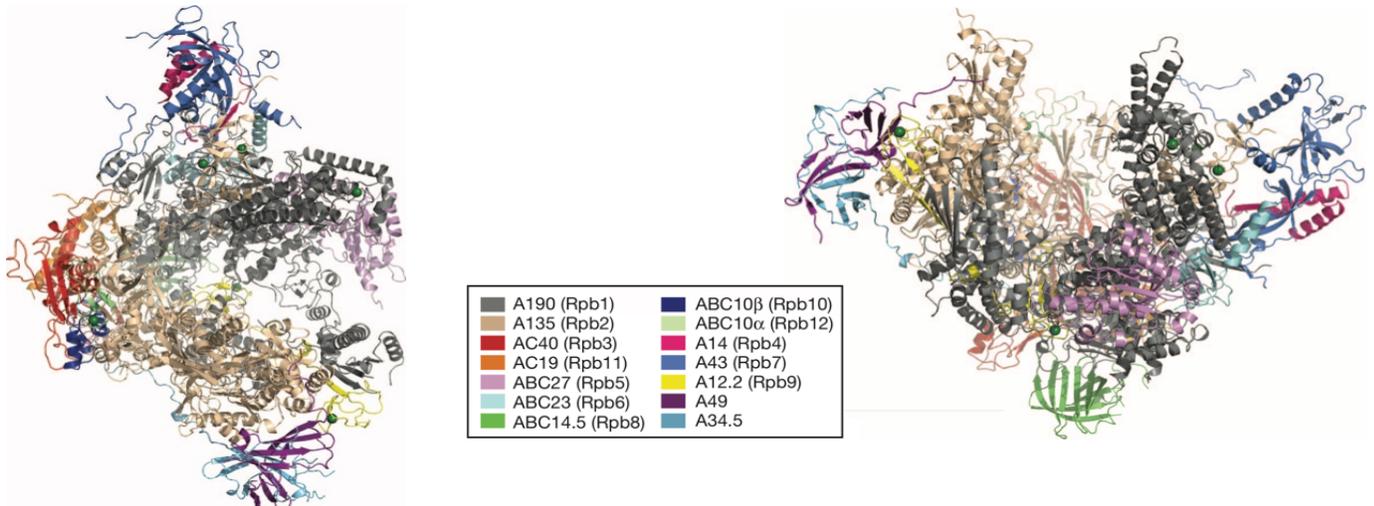


Figura 15. Estructura tridimensional generada por microscopía cryo-electrónica de las 14 subunidades de la RNA POL I de *S. cerevisiae*. Cada color representa una subunidad y aparecen entre paréntesis los nombres de sus homólogos de RNA POL II. Tomado de Fernandez-Tornero *et al.*, 2013.

Las células de mamífero contienen 100 o más copias por genoma haploide de los genes de rRNA repetidos en tándem. La síntesis del rRNA se realiza en el nucléolo, zona donde reside la RNA POL I y el DNA ribosomal (rDNA) (Grummt, 2016). Los genes de los rRNA 18S, 5.8S y 28S forman la unidad del rRNA y se transcriben

juntos generando un precursor que debe ser procesado para producir las tres moléculas de rRNA independientes (Hoffman *et al.*, 2017) (Fig. 16).

El promotor de la unidad del rRNA está relativamente conservado a lo largo de la evolución. Está integrado por dos regiones: un dominio núcleo que incluye el sitio de inicio de la transcripción y el elemento promotor “río arriba” (Fig. 17). Dos factores de transcripción, UBF y SL1, son necesarios para reclutar a la RNA POL I. UBF se une al elemento río arriba, mientras que SL1 (con su subunidad TBP) reconoce al dominio núcleo (Cramer *et al.*, 2008).

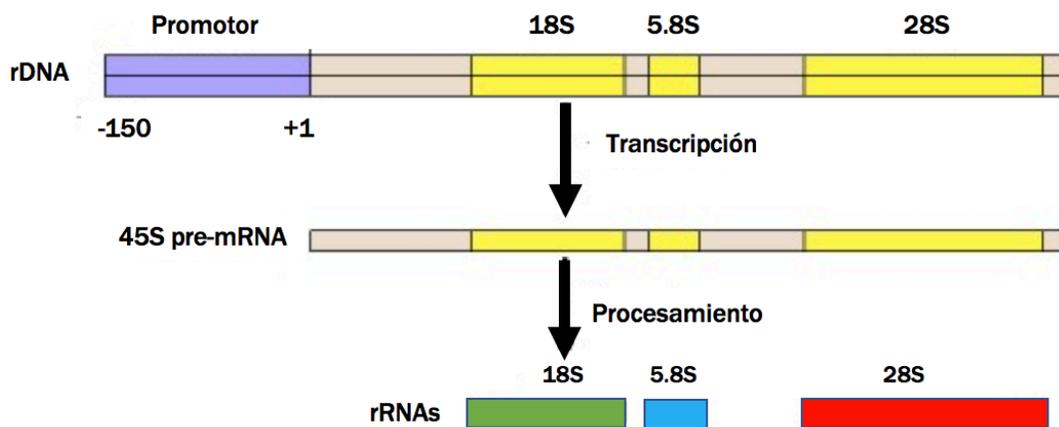


Figura 16. Estructura, transcripción y procesamiento de la unidad del rRNA.

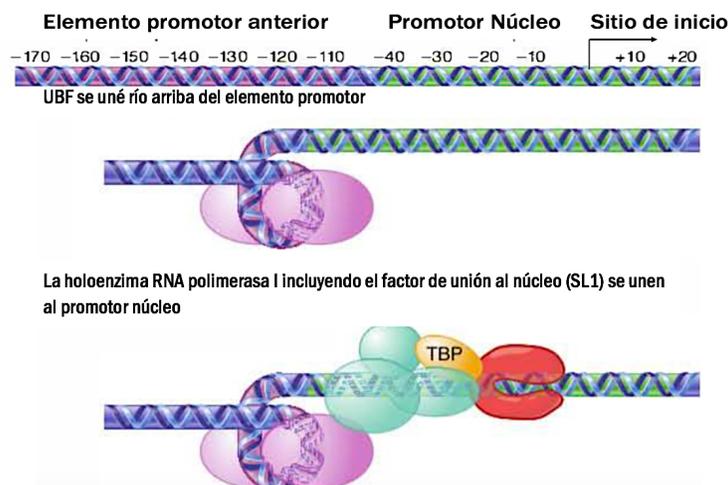


Figura 17. Promotor y factores de transcripción de la RNA POL I (Modificado de Krebs *et al.*, 2014).

1.4.3 Transcripción de la RNA POL II

La RNA POL II es la enzima central que cataliza la síntesis todos los RNA pre-mensajeros (mRNA), los RNA largos no codificantes (lncRNA), la mayoría de los RNA nucleares pequeños (snRNA) y los RNA pequeños nucleolares (snoRNA), así como la gran mayoría de los microRNA (miRNA) (Schanen y Li, 2011; Vorländer *et al.*, 2018). RNA POL II (Fig. 18) consiste en un núcleo catalítico de 10 subunidades y un complejo de dos subunidades, Rpb4/7, que se requiere para el inicio de la transcripción. Es un complejo multiproteico asimétrico y grande con un peso molecular total de 0.5 MDa. Tiene un dominio carboxilo terminal (CTD) que alberga una secuencia consenso de 7 aminoácidos que se repite en levadura alrededor de 26 veces y en mamíferos 50 veces (Cramer, 2004).

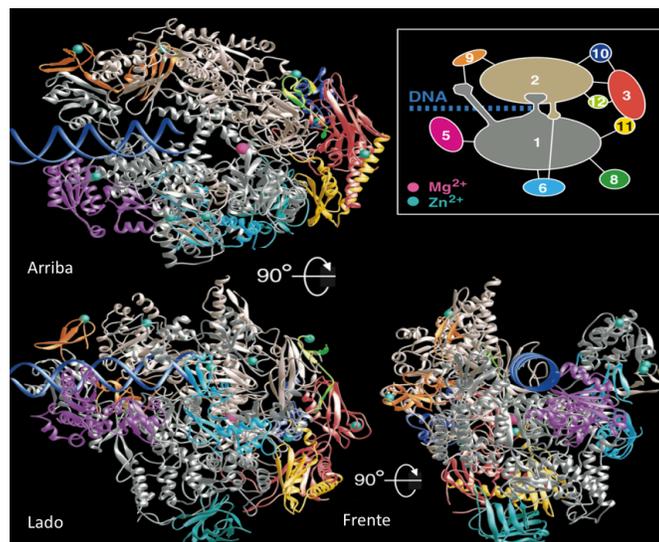


Figura 18. Estructura tridimensional de la RNA POL II de levadura. En el cuadro de la derecha superior se representan gráficamente las 12 subunidades de la enzima y se numeran acorde con la tabla 1 (Modificada de Cramer *et al.*, 2001).

En cada promotor, antes del inicio de la transcripción, la RNA POL II se ensambla con seis factores generales de transcripción llamados TFIIA, -B, -D, -E, -F, and -H (Fig. 19) y un complejo mediador para formar el PIC. Esta enzima tiene una eficiencia de síntesis de 60, 000 moléculas de RNA por cada generación (Lesniewska y Boguta, 2017). Este complejo responde a señales reguladoras y sintetiza las primeras moléculas cortas del RNA llamado abortivo (Bushnell *et al.*, 2004).

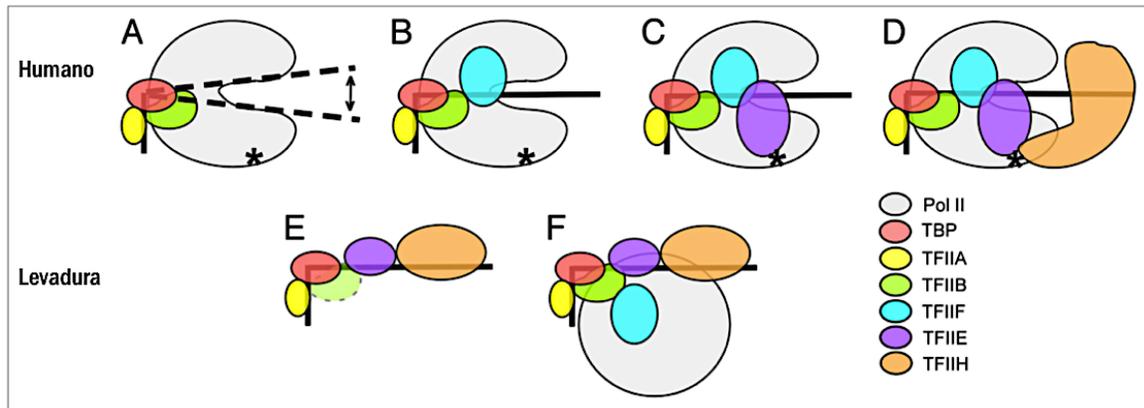


Figura 19. Representación esquemática de las rutas de ensamblaje del PIC de RNA POL II en humano y levadura. Se requieren cinco factores de transcripción generales (FGT), denominados TFIIB, -D, -E, -F y -H, para el inicio de la transcripción de la RNA POL II. Los FGT se ensamblan con la enzima y el promotor en un complejo de preiniciación (PIC). Tomado de Cramer, 2001.

Los promotores de la RNA POL II (Fig. 20) están constituidos por elementos basales como la caja TATA (secuencia consenso TATAA, localizada de 25 a 30 nucleótidos río arriba del sitio de inicio de la transcripción), el elemento promotor río abajo (DPE) y/o un elemento de reconocimiento a TFIIB (BRE). La caja TATA es reconocida por el factor de transcripción TFIID, que está constituido por la proteína de unión a TATA (TBP) y otras proteínas (Smale y Kadonaga, 2003).

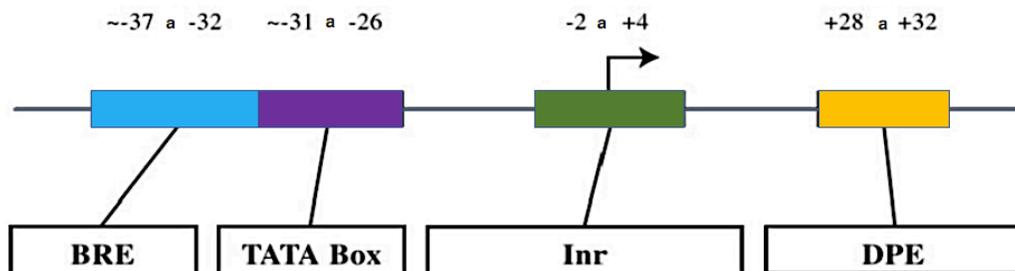


Figura 20. El promotor basal de la RNA polimerasa II. Tomado de Smale, 2003.

1.4.4. Transcripción de la RNA POL III

1.4.4.1 Composición, estructura y transcritos

La RNA POL III transcribe aproximadamente el 5% del genoma de *S. cerevisiae*, tiene un peso molecular de 700 KDa y está constituida por 17 subunidades (Tabla 1) (Fig. 21) (Harismendy, 2003). De éstas, nueve forman el núcleo estructural: C160, C128, AC40, AC19, Rpb5, Rpb6, Rpb8, Rpb10 y Rpb12. Asimismo se compone de

subunidades que están organizadas en tres subcomplejos específicos de la RNA POL III: C17/C25, involucrado en el inicio de la transcripción; C82/C34/C31, que participa en inicio y elongación de la transcripción; y C57/C37/C11, que funciona en el inicio y terminación de la transcripción. De manera interesante, varias de estas subunidades específicas están relacionadas evolutivamente con FGT de la RNA POL II y con RNA POL I (Tabla 1) (Hoffman *et al.*, 2015).

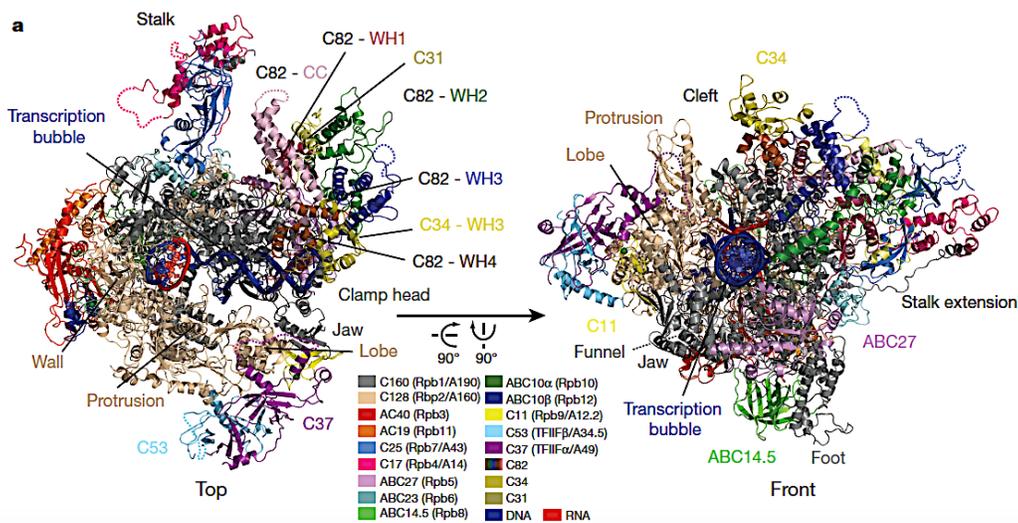


Figura 21. Estructura tridimensional de la RNA POL III de *S. cerevisiae*. Tomado de Hoffman *et al.*, 2015.

La RNA POL III es la encargada de transcribir moléculas de RNA esenciales no codificantes, que incluyen todo el conjunto de RNAs de transferencia (tRNAs) (que participan en la síntesis de proteínas), el rRNA 5S (constituyente estructural y funcional de la subunidad mayor del ribosoma), el RNA pequeño nuclear (snRNA) U6 (que forma parte del empalmosoma que procesa los mRNAs) algunos microRNAs (que regulan la expresión genética) y el RNA de la RNasa P (que procesa el extremo 5' de los tRNAs), entre otros (Nikitina y Tishchenko, 2005). La alta eficiencia de la RNA POL III permite altos niveles de transcripción, con un máximo de 3 millones de moléculas de tRNA producidas por generación en *S. cerevisiae* (Lesniewska y Boguta, 2017).

1.4.4.2 Promotores

Los promotores de la RNAPOL III están clasificados en tipos I, II y III, dependiendo de su ubicación y composición (Fig. 22) (Willis, 1993).

El promotor de tipo I está constituido por un elemento de control interno (ECI) que contiene tres elementos promotores: una caja A localizada entre +50 y +64 (en relación al sitio de inicio de la transcripción, +1), un elemento intermedio (IE) entre +67 y +72 pb, y una caja C en una región de +80 a +97 (Geiduschek *et al.*, 1998). Este tipo de promotor está presente en los genes del rRNA 5S (Fig. 22).

El promotor Tipo II es característico de los genes de tRNA, y está formado por una caja A y una caja B muy conservadas. La caja A está localizada cerca de la posición +1 (entre +10 y +20), lo que sugiere que este elemento promotor participa en la selección del sitio de inicio de la transcripción. La caja B se localiza a una distancia variable de 30 a 60 pb río abajo de la caja A (Fig. 22).

En el promotor Tipo III los elementos promotores se ubican específicamente río arriba del gen del snRNA U6, gen prototipo con este tipo de promotor. Las secuencias requeridas para una eficiente expresión son una caja TATA entre los nucleótidos -20 y -25, un elemento proximal (PSE) entre -66 y -47 y un elemento distal (DSE) entre -244 y -214 (Schramm y Hernández, 2002) (Fig. 22).

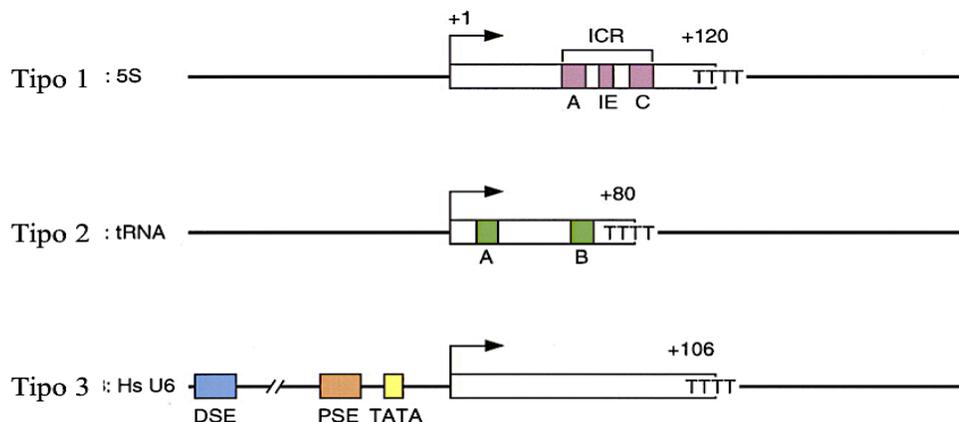


Figura 22. Los tres tipos de promotores de la RNA POL III. Modificado de Schramm y Hernández, 2002.



1.4.4.3 Factores de transcripción de RNA POL III

Las secuencias promotoras son reconocidas por numerosos factores de transcripción, para el posterior reclutamiento de la RNA POL III y así proceder al inicio de la transcripción. Existen tres factores de iniciación principales: TFIIIA, TFIIIB y TFIIIC (Fig. 23) (Krebs *et al.*, 2014).

TFIIIA es un factor constituido por solamente un polipéptido de alrededor de 44 KDa en *A. thaliana*. En vertebrados, TFIIIA se caracteriza por la presencia de 9 dedos de zinc, por medio de los cuales reconoce el promotor de los genes del rRNA 5S. TFIIIA recluta a TFIIIC, quien a su vez se une a TFIIIB para finalmente reclutar a la RNA POL III (Geiduschek y Kassavetis, 2001).

TFIIIC es un complejo proteico constituido por seis subunidades que se divide en dos dominios: TauA (formado por las subunidades Tfc1, Tfc4 y Tfc7) y TauB (constituido por Tfc3, Tfc6 y Tfc8). TauA se une a la caja A, mientras que TauB reconoce la caja B en los genes de tRNA. La distancia entre las cajas A y B puede variar en 40 pb o más, dependiendo de si el gen del tRNA tiene un intrón, y de la longitud del brazo variable en el tRNA (Male *et al.*, 2015).

TFIIIB es un factor requerido para reclutar a la RNA POL III en los tres tipos de promotores. Está constituido por tres subunidades: la proteína de unión a TATA (TBP), el factor 1 relacionado con TFIIIB (Brf1) y B doble prima 1 (Bdp1). TFIIIB está posicionado para unirse al DNA reconociendo la caja TATA, en el caso de los genes con promotor tipo III, o a TFIIIC en el caso de promotores tipo I y II (Gouge *et al.*, 2017). Mediante interacciones de la región C-terminal de TFIIIB y la subunidad C34 de RNA POL III se lleva a cabo el reclutamiento de la enzima al promotor de DNA. TFIIIB se conserva de levadura a humanos, y sus componentes muestran homología con factores de transcripción generales de otras RNA polimerasas. TBP se comparte entre las maquinarias de transcripción de las tres RNA POL (Kassavetis *et al.*, 1997). En los promotores tipo III, el elemento proximal interactúa con un factor de transcripción llamado SNAPc. El elemento distal consta de un sitio SPH y una

En su estructura tridimensional, el PIC de RNA POL III se parece al PIC de RNA POL II, mientras que el PIC de RNA POL I es más divergente. Las estructuras presentadas revelan los mecanismos moleculares que subyacen a los primeros pasos de la transcripción de RNA POL III y también los mecanismos generales conservados de la iniciación de la transcripción de todos los genes (Abascal-Palacios *et al.*, 2018).

1.4.4.5 Elongación, término y reiniciación de la transcripción

La apertura del promotor induce una serie de cambios conformacionales en la enzima, que afectan principalmente a los subcomplejos específicos de RNA POL III y al tallo, para así iniciar la etapa de elongación. El tallo se mueve hacia el RNA que sale, mientras que ambos subcomplejos se reorganizan y avanzan hacia el DNA en el canal de unión y se sintetiza el RNA a una velocidad de aproximadamente 20 nt/seg (Matzusaki *et al.*, 1994).

El reordenamiento más fuerte involucra al subcomplejo C31/C82/C34 que se aleja del tallo dirigiéndose hacia el canal de unión al DNA y la subunidad Rpb5, que forma una de las mandíbulas de la RNA polimerasa. En el lado opuesto del canal de unión al DNA, la región alrededor del lóbulo y los elementos salientes, donde se adjunta el subcomplejo C37/C53, también se mueven hacia el canal. Todos estos cambios producen un mejor agarre de la RNA POL III en el DNA y, por lo tanto, se cree que mejoran la procesividad de la enzima (Fig. 24) (Lane *et al.*, 2011).

En la estructura del complejo de elongación, se conecta el módulo de dimerización C37/C53 con el DNA río abajo. Esta posición podría ser crucial para el reconocimiento de la secuencia del terminador, ralentizando la elongación y permitiendo así cambios conformacionales que conduzcan al desprendimiento de RNA POL III de la plantilla de DNA y del producto de RNA (Fig. 24) (Fernández-Tornero *et al.*, 2011).

RNA POL III dirige varias rondas de transcripción en el mismo gen una vez unido al DNA, un evento conocido como reiniciación facilitada (Fig. 24). Se han postulado cambios conformacionales que probablemente afectan al heterotrímero y al tallo, lo

que permite un nuevo reclutamiento de RNA POL III al el sitio de inicio, ayudado por TFIIB que se mantiene unido al promotor (Dieci y Sentenac, 1996).

1.4.4.6 Heterotrímero C82/C34/C31

La RNA POL III contiene un subcomplejo de tres subunidades específicas, llamadas C82, C34 y C31, que forman un heterotrímero y están constituidas de proteínas que contienen dominios de “hélice alada” (WH), que constituyen una subfamilia dentro del dominio de unión a DNA conocido como hélice-vuelta-hélice (Gajiwala y Burley, 2000). El heterotrímero C82/C34/C31 participa en la iniciación de la transcripción y el reclutamiento de la RNA POL III mediante TFIIB. El subcomplejo dirige la unión de la RNA POL III al complejo TFIIB-DNA a través de las interacciones entre TFIIB y C34 (Wang *et al.*, 1997). El heterotrímero C82/C34/C31 se encuentra en la parte superior de la abrazadera y se considera que es homólogo al factor de transcripción general TFIIE de RNA POL II (Wu *et al.*, 2012). C34 contiene tres dominios WH, pero los dos primeros están desordenados en las estructuras de criomicroscopía electrónica (crio-EM) disponibles (Hoffman *et al.*, 2015). Se ha demostrado que C34 es importante para la interacción con TFIIB (Bdp1) y la formación de complejos abiertos (Maraia y Arimbasseri, 2015). Para entender cómo interactúan las subunidades RNA POL III y facilitan el inicio de la transcripción, es necesario estudiarlas en el contexto del PIC que contiene a TFIIB. La proteína C34 también está involucrada en la elongación de la transcripción (Brun *et al.*, 1997).

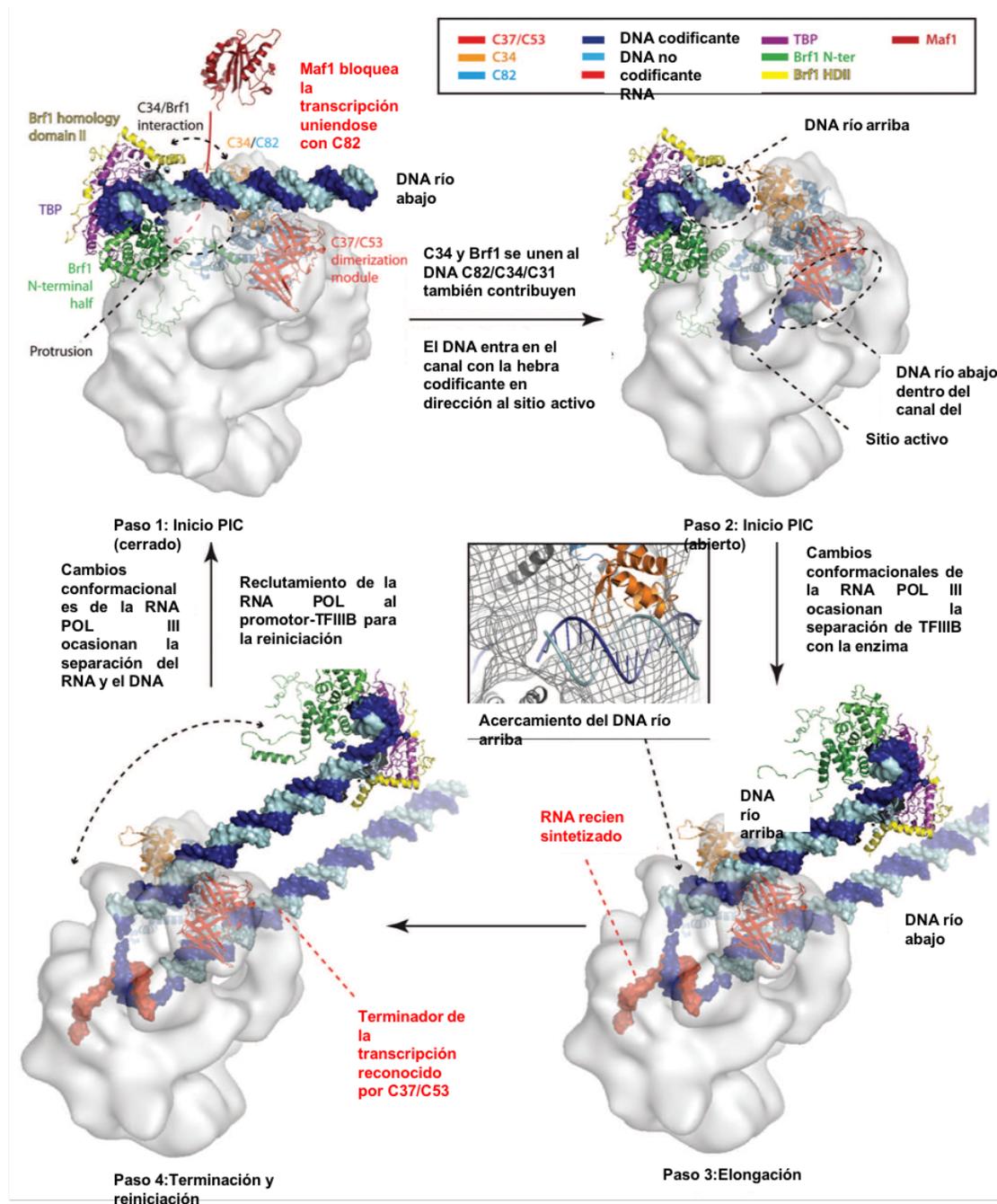


Figura 24. Los cuatro pasos de la transcripción de la RNA POL III. Basado en su estructura tridimensional se muestran las subunidades del factor TFIIB, el regulador Maf1 y subunidades específicas de la RNA POL III. Modificado de Fernández-Tornero *et al.*, 2011.

El análisis de las mutaciones que afectan a las subunidades C31 y C160 de RNA POL III sugiere que C31 es la subunidad principal que mantiene al heterotrímero en el núcleo de la enzima, ya que se ubica cerca de la base del tallo (Thuillier *et al.*, 1995).

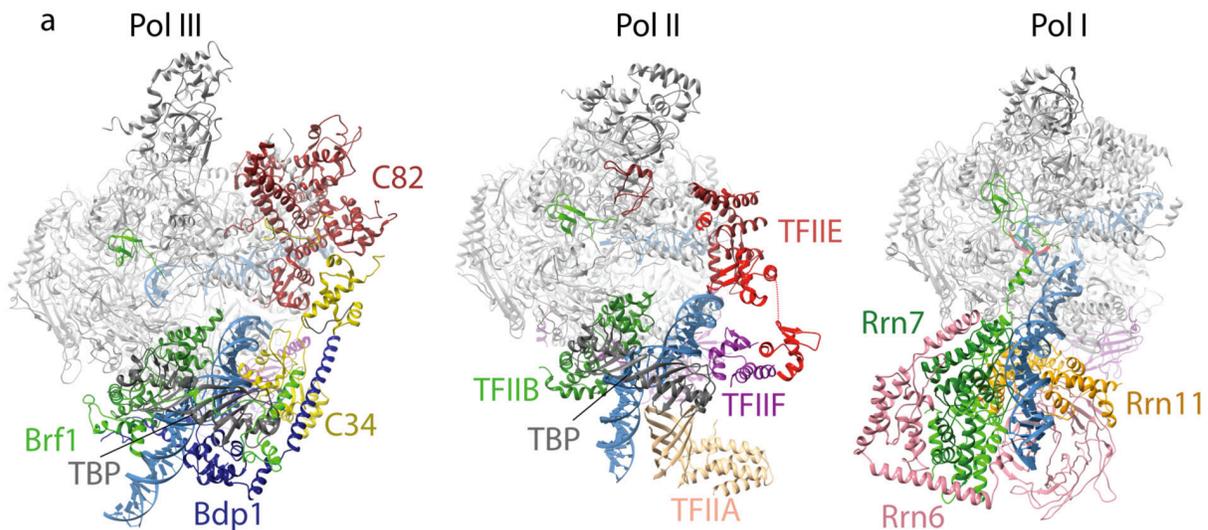


Figura 25. Comparación de las subunidades homólogas del heterotrímero C34/C31/C82 y factores de transcripción de las tres RNA POL. Tomado de Boguta, 2013.

1.4.4.7 Subunidad C82

La subunidad C82 de la RNA POL III está constituida por cuatro dominios WH (WH1-4) que son un tipo específico de dominios de hélice-vuelta-hélice, y un dominio de hélice súper enrollada localizado en la zona C-terminal de la subunidad (Boissier *et al.*, 2015). Los dominios de hélice alada extendida de C82 en humanos (hRPC62) se localizan cerca del canal de unión al DNA y en el núcleo de la abrazadera, mientras que la hélice súper enrollada se encuentra cerca de C160. C82 está conservada en estructura y función con el factor TFIIIE de la RNA POL II, además de con el factor TFE en Arqueas, ambos relacionados con el inicio de la transcripción. Esto indica un origen evolutivo en común, dado que los dominios WH tienen la capacidad de interacción proteína-proteína (contacto entre amino ácidos) y también de interactuar con DNA (contacto aminoácidos-DNA) (Lefèvre *et al.*, 2011).

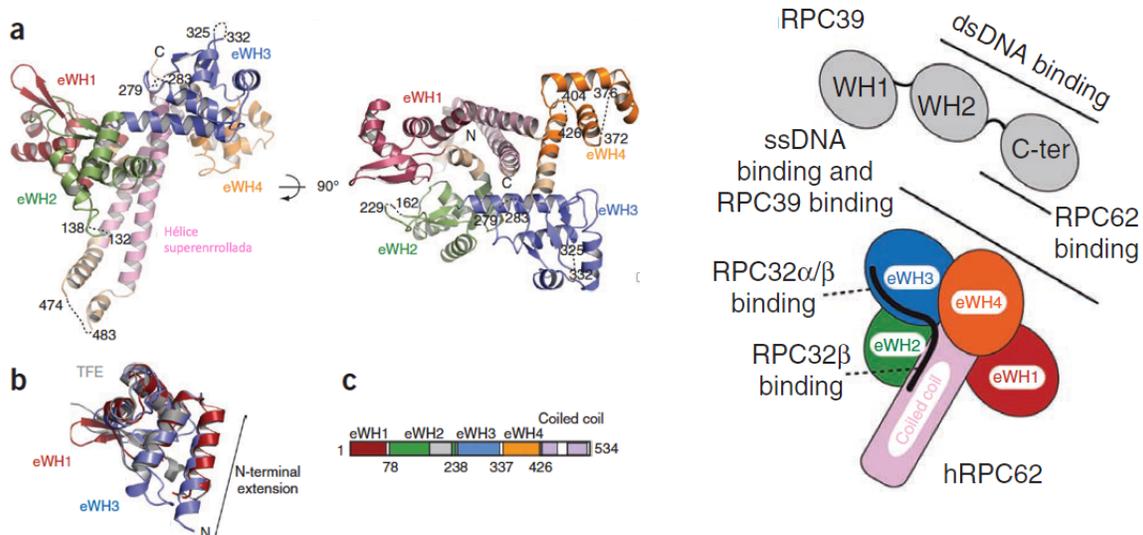


Figura 26. Estructura general de C82 (hRPC62) en humano. (a) Se muestran dos vistas (giro de 90°) de la estructura de hRPC62. Los cuatro dominios de hélice alada extendida (eWH) se muestran en rojo (eWH1), verde (eWH2), azul (eWH3) y naranja (eWH4). Los cuatro dominios eWH forman una cabeza globular, mientras que las dos hélices α C-terminales largas que sobresalen de la proteína forman la cola C-terminal. Las líneas de puntos representan segmentos de proteínas indefinidos y se marcan con el número de aminoácidos en esa posición. Las dos orientaciones están relacionadas por una rotación horizontal de 90°. (b) Similitud estructural entre eWH1, eWH3 y TFE (el homólogo arqueal de TFIIEx). Se muestra una superposición 3D de eWH1 (rojo), eWH3 (azul) y TFE (gris, código PDB 1Q1H) (c) Organización de los dominios de hRPC62. El primer eWH1 abarca los residuos 1-78; eWH2, 88-237; eWH3, 239-337; eWH4, 338-426; y el dominio de bobina enrollada, 428-457 y 493-534. Tomado de Lefèvre *et al.*, 2011.

La sumoilación de C82 dependiente del regulador de respuesta de nutrientes del complejo de rapamicina 1 (TORC1) en particular se requiere para la transcripción de tRNAs. De manera mecánica, la sumoilación de C82 es importante para el ensamblaje de la holoenzima RNA POL III y el reclutamiento de C82 en los genes de tRNA (Chymkowitch *et al.*, 2017). Otra proteína reguladora negativa de la RNA POL III llamada Maf1 transmite diversas señales negativas a la maquinaria RNA POL III interactuando con C82 y ejerciendo un impedimento estérico con el promotor para así evitar la transcripción (Boguta, 2013).

1.4.4.8 Evolución de los factores de transcripción y subunidades de las RNA polimerasas

El número de subunidades de las RNA POL ha aumentado durante la evolución, de 5 en eubacterias a 12 en arqueas. En eucariotas, que tienen al menos tres RNA POL, el número de subunidades se ha expandido de 12 en la RNA POL II a 14 en la RNA POL I y a 17 en la RNA POL III (Carter y Drouin, 2009). Estudios recientes de las tres maquinarias de transcripción eucarióticas, bacterianas y de arqueobacterias revelaron que todos los complejos de iniciación comparten un núcleo catalítico conservado (Fig. 27). Este núcleo consiste en la RNA POL (I, II o III), la proteína TBP y los factores de transcripción TFIIB, TFIIE y TFIIF (para RNA POL II) o proteínas relacionadas estructural y funcionalmente (para RNA POL I y III) (Lane y Darst, 2009).

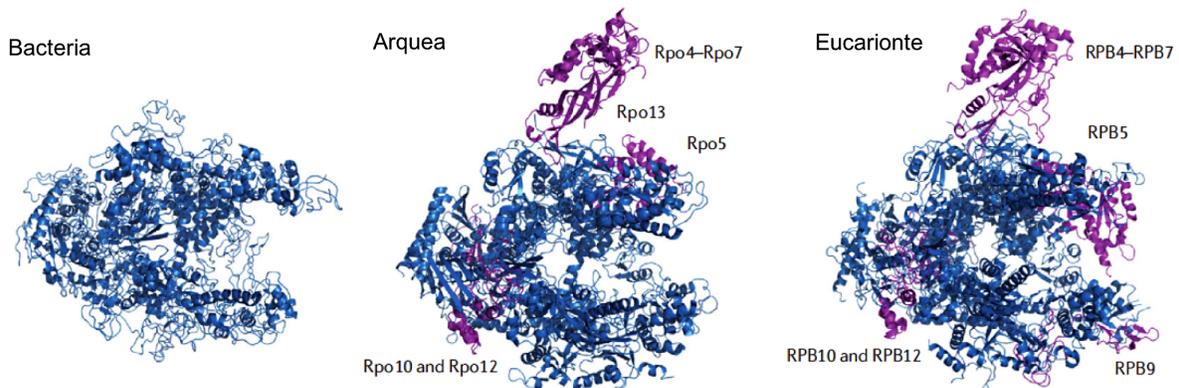


Figura 27. Estructura de las RNA polimerasas en bacterias, arqueas y eucariotes. Se muestra en azul el núcleo catalítico conservado, y en magenta las subunidades adquiridas por la RNA POL de arquea y la RNA POL II eucariote. Modificado de Werner y Grohmann, 2011.

El núcleo conservado de las RNA POL estabiliza la unión al promotor y favorece la apertura del DNA para iniciar la síntesis de RNA. La periferia del complejo de iniciación del núcleo está formada por factores adicionales específicos de cada RNA POL que explican las diferencias funcionales en el reconocimiento y apertura del promotor, y la regulación específica de cada clase de genes (Werner y Grohmann, 2011).

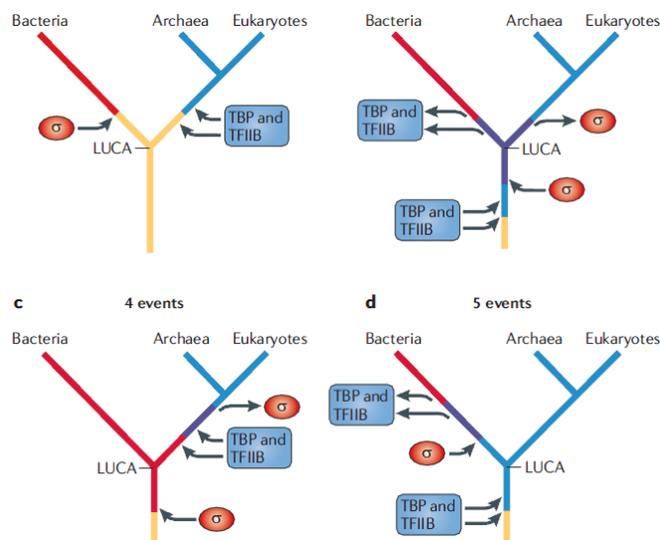


Figura 28. Cinco eventos de posibles divergencias de TBP y TFIIB. Tomado de Werner y Grohmann, 2010

Probablemente las RNA polimerasas eucariontes provengan de la evolución de la RNA POL de archeas, ya que su estructura y función del núcleo catalítico es muy similar en todas ellas, además de la homología que hay entre los factores de transcripción (Fig. 28). El análisis de homología que hay entre la subunidad C82 de RNA POL III, el factor de transcripción de RNA POL II TFIIE y TFE (que es factor de transcripción de arqueobacterias), además de las similitudes estructurales y funcionales, sugieren que esta subunidad y los factores de transcripción tienen un origen en común (Fig. 29). Además se sugiere que las ahora subunidades específicas del heterotrímero C82/C34/C31, que funcionaban anteriormente como factores de transcripción preexistentes (Tabla 1), se unieron a la RNA POL III para hacer más eficiente la transcripción (Carter y Drouin, 2009).

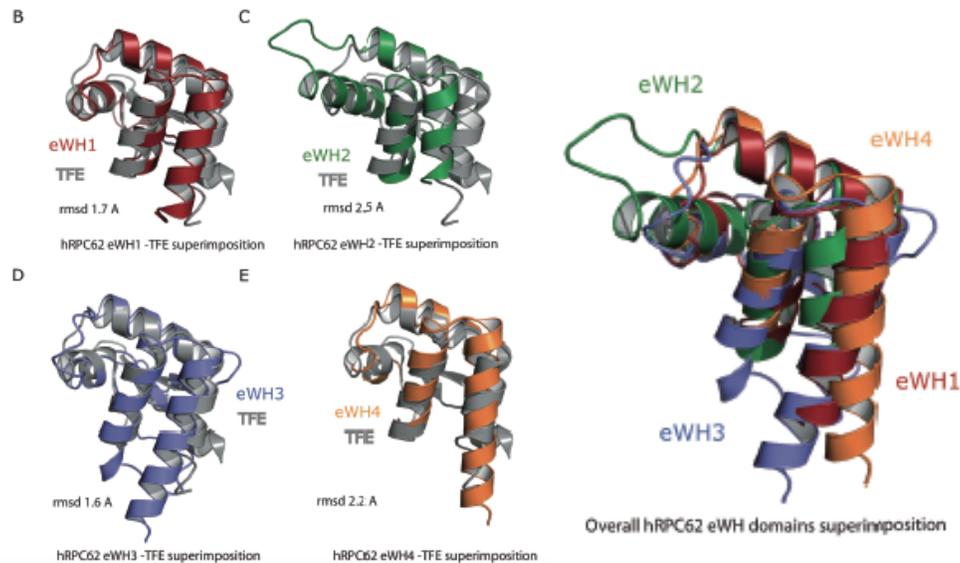


Figura 29. Similitud estructural entre los dominios WH de C82 de humano (hRPC62) y el factor TFE de arqueas. Se muestra el sobrelape de cada uno de los 4 dominios WH de C82 con el dominio WH del factor de transcripción TFE. Tomado de Lefèvre *et al.*, 2011.

1.5 Expresión genética en *T. brucei*

Además de ser organismos de interés médico, los tripanosomátidos son también importantes en el área de la biología molecular por mostrar una organización génica muy particular y por los mecanismos atípicos de expresión genética que presentan (Martínez-Calvillo *et al.*, 2010). El genoma de los tripanosomátidos está organizado en grupos largos de genes policistrónicos (PGCs), que contienen de decenas a cientos de genes codificantes de proteínas arreglados secuencialmente en la misma cadena de DNA (Fig. 30). Esta inusual organización genómica fue reportada primero en el cromosoma 1 de *L. major* (el primer cromosoma secuenciado totalmente en tripanosomátidos). Una vez secuenciados los genomas completos de *T. brucei*, *T. cruzi* y *L. major* se encontró que la gran mayoría de los genes de estos parásitos están organizados en grandes PGCs (El-Sayed *et al.*, 2005). En el 2005 se dio a conocer que el genoma de *T. brucei* consta de 26 megabases organizadas en 11 cromosomas (Berriman *et al.*, 2005). Contiene 9068 genes predichos de proteínas (1700 genes específicos de *T. brucei*), incluidos 900 pseudogenes (Tabla 2). Las regiones subteloméricas grandes contienen un grupo de 806 genes de glicoproteínas variables de superficie (VSG, por sus siglas en inglés) que son transcritos por la RNA



POL I y son utilizados por el parásito para evadir el sistema inmunitario de los mamíferos (Hutchinson *et al.*, 2007). La mayoría de las secuencias codificantes de VSGs son pseudogenes, que pueden usarse para generar genes de mosaico expresados mediante recombinación ectópica. Una comparación de las vías metabólicas codificadas por los genomas de *T. brucei*, *T. cruzi* y *L. major* reveló la menor capacidad metabólica general en *T. brucei* y la mayor en *L. major*. La transferencia horizontal de genes de origen bacteriano ha contribuido a algunas de las diferencias metabólicas en estos parásitos, y se han identificado varios posibles nuevos objetivos farmacológicos (Berriman *et al.*, 2005).

Característica	
Tamaño del genoma (Mb)	26
Número de megacromosomas	11
Genes de proteínas	9068
Genes de rRNA	56
Genes de tRNA	66
Genes de snRNA	5
Genes de snoRNA	353
Genes de <i>Splice leader</i> o mini-exón	>28
Densidad génica por Mb	317
Contenido de G+C (%)	46.4

Tabla 2. Resumen de las características del genoma nuclear de los megacromosomas de *T. brucei*. Tomado de (Berriman *et al.*, 2005 y Padilla-Mejía *et al.*, 2009).

Una comparación del contenido de genes y la arquitectura genómica de *T. brucei*, *T. cruzi* y *L. major*, reveló un proteoma central conservado de aproximadamente 6200 genes ordenados en grandes agrupaciones de genes policistrónicos sinténicos (que conservan el orden de los genes). Gran cantidad de genes especie-específicos, especialmente las familias de antígenos variables de superficie, se encuentran en las regiones subteloméricas e internas de los cromosomas. Los elementos transponibles y los RNA estructurales a menudo se asocian con discontinuidades sinténicas que, junto con la divergencia, adquisición y pérdida de genes dentro de las regiones sinténicas, han dado forma a los genomas de cada parásito. Estos organismos son diploides, aunque algunos cromosomas son aneuploides (El-Sayed *et al.*, 2005).

1.5.1 Transcripción en tripanosomátidos

A diferencia de la mayoría de los organismos eucarióticos, la transcripción en tripanosomátidos es policistrónica (Fig. 29). La mayoría de los cromosomas contienen al menos dos PGCs, que pueden transcribirse de forma divergente (hacia los telómeros) o transcribirse de manera convergente (alejándose de los telómeros). Los genes de una unidad policistrónica en tripanosomátidos generalmente no codifican proteínas funcionalmente relacionadas. Esto difiere del funcionamiento de los operones en las bacterias y nemátodos (Vanhamme y Pays, 1995).

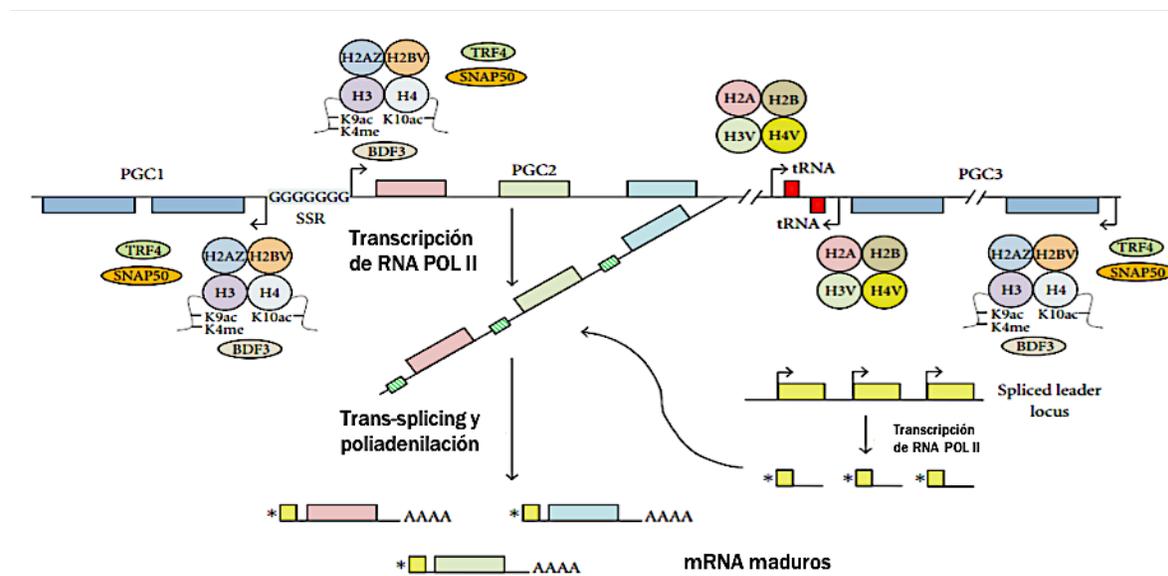


Figura 30. Transcripción y procesamiento de mRNAs en tripanosomátidos. En la parte superior se representa un cromosoma hipotético con tres PGCs (del 1 al 3). La transcripción de RNA POL II inicia río arriba del primer gen de PGC (flechas), en secuencias enriquecidas de Gs presentes en la región de cambio de cadena (SSR). Los nucleosomas ubicados cerca de las regiones de iniciación de la transcripción contienen variantes de histonas H2AZ y H2BV. La cola N-terminal de la histona H3 en dichos nucleosomas se acetila en K9 / K14 (etiquetada como K9ac en la figura) y se metila en K4 (K4me). La cola N-terminal de la histona H4 se acetila en K10 (K10ac), y en K5 / K8 / K12 / K16 (no se muestra en la figura). El factor de bromodominio BDF3 y los factores de transcripción TRF4 (TBP) y SNAP50 también se unen en las regiones de inicio de la transcripción. La transcripción de RNA POL II de algunas PGC termina cerca de los genes de tRNA (región de cambio de cadena convergente entre PGC2 y PGC3), en regiones de DNA que contienen nucleosomas con variantes de histonas H3V y H4V. La transcripción de un PGC produce un transcrito primario (que se muestra solo para PGC2) que se procesa mediante corte y poliadenilación para generar los mRNA maduros. Mediante trans-splicing, se agrega el RNA SL (recuadro amarillo) al extremo 5' de cada mRNA. En el locus del RNA SL (ubicado en un cromosoma diferente) cada gen posee una región promotora de RNA POL II (flechas). El cap en el RNA SL está indicada por un asterisco en el extremo 5' del RNA. El RNA policistrónico contiene regiones ricas en pirimidinas (indicadas por un recuadro rayado en las regiones intergénicas) que son necesarias tanto para el trans-splicing como para la poliadenilación. Las regiones ricas en pirimidina



también están presentes en el DNA, pero no se muestran en la figura. Las cuatro As que se encuentran en el extremo 3´ de los mRNA maduros representan la cola de poli-A. Modificado Martínez-Calvillo *et al.*, 2010.

Los mRNA nucleares maduros se generan a partir de transcritos primarios largos mediante *trans-splicing* y poliadenilación (Fig. 30). El *trans-splicing* es un proceso que agrega un RNA *spliced-leader* (SL) o miniexon de 39 nucleótidos al extremo 5´ de los mRNA. Al igual que el *splicing* en cis, el *trans-splicing* se produce a través de dos reacciones de transesterificación, pero implica la formación de una estructura intermedia en forma de Y, en lugar de una estructura en forma de lazo. Un dinucleótido AG en el sitio de empalme 3´ y una región rica en pirimidinas corriente arriba son las secuencias más conservadas requeridas para este proceso. El *trans-splicing* y la poliadenilación de genes adyacentes están aparentemente vinculados, ya que la selección de un sitio de empalme para un gen influye en la elección de un sitio de poliadenilación para el gen corriente arriba (Martínez-Calvillo *et al.*, 2010).

1.6.1 Transcripción de la RNA POL I

Como en otros organismos, la RNA POL I de los tripanosomátidos transcribe los genes del rRNA. Sin embargo, la RNA POL I de *T. brucei* tiene la extraordinaria capacidad de transcribir también los mRNA que codifican para dos de las proteínas más abundantes del parásito: las glicoproteínas variables de superficie (VSG) y las prociclinas. Las primeras se expresan en la forma sanguínea del parásito, mientras que las segundas se expresan en las formas procíclicas. Las formas sanguíneas de *T. brucei* evaden la respuesta inmune de los mamíferos por la variación antigénica de su capa de superficie celular que consiste en aproximadamente 10 millones de moléculas de VSG idénticas expresadas a partir de un solo gen. La variación se produce cuando los parásitos cambian a la expresión de un gen VSG diferente, seleccionado de un gran repertorio de genes VSG. La expresión de todo el recubrimiento de VSG a partir de un solo gen requiere niveles de expresión extremadamente altos y se ha determinado que la tasa de transcripción del gen de VSG activo es aproximadamente 50 veces mayor que la de un gen de tubulina (Günzl *et al.*, 2003).



1.6.2 Transcripción de la RNA POL II

Todos los genes que forman parte de una PGC se transcriben al mismo nivel, como consecuencia de la transcripción policistrónica. Sin embargo, los mRNA maduros de genes adyacentes pueden mostrar concentraciones muy diferentes y / o expresión estadio específica. Esto se debe a que la expresión génica en tripanosomátidos se regula principalmente a nivel post-transcripcional, a nivel de procesamiento y estabilidad del mRNA (Campbell *et al.*, 2003).

Las secuencias en la región 3´ no traducida (3´-UTR) de un mRNA desempeñan un papel clave en la expresión génica. Por ejemplo, el 3´-UTR del mRNA de amastina en *L. infantum* tiene una región de 450 pb que confiere expresión génica específica de amastigote por un mecanismo que aumenta la traducción del mRNA (Boucher *et al.*, 2002).

El mRNA de la fosfoglicerato cinasa PGKB en *T. brucei* contiene un elemento regulador rico en AU en el 3´-UTR que desestabiliza el mRNA en las formas sanguíneas, pero no en las formas procíclicas. Además, la región 3´-UTR del mRNA de prociclina EP contiene elementos 16-mer y 26-mer que contribuyen a la estabilidad del mRNA y la eficiencia de la traducción. Curiosamente, un número creciente de informes han demostrado que la cantidad del mRNA y la abundancia de la proteína que codifica no siempre se correlacionan, lo que indica que el control traduccional y post-traduccional juegan un papel importante en las tripanosomátidos (Quijada *et al.*, 2002).

1.6.3 Promotores y factores de transcripción de la RNA POL II en tripanosomátidos.

Ortólogos de la mayoría de las 12 subunidades que conforman a la RNA Pol II en levadura han sido identificados en los tripanosomátidos. RPB1, la subunidad más grande de la enzima, es codificada por dos genes en *T. brucei*, cuya secuencia varía sólo en cuatro aminoácidos (Das *et al.*, 2006). En cuanto a las regiones promotoras de la RNA POL II, el único promotor que ha sido ampliamente caracterizado es el del RNA SL (miniexón), el cual se conforma de dos dominios río arriba llamados elemento -30 y elemento -60 en *Leishmania* (Saito *et al.*, 1994). Las regiones SSR, donde inicia la transcripción policistrónica de los genes codificantes de proteínas, no

contienen ningún elemento promotor típico de la RNA POL II, como las cajas TATA. Varios factores de transcripción de la RNA POL II que se unen al promotor del RNA SL han sido identificados y estudiados en *T. brucei* (Fig. 31). Entre éstos se encuentra: TBP, TFIIA, TFIIB, TFIIE, TFIIF y TFIIH. Además se ha caracterizado SNAPc y el complejo mediador, lo que indica que los tripanosomátidos poseen el juego completo de factores de transcripción de la RNA POL II (Srivastava *et al.*, 2017).

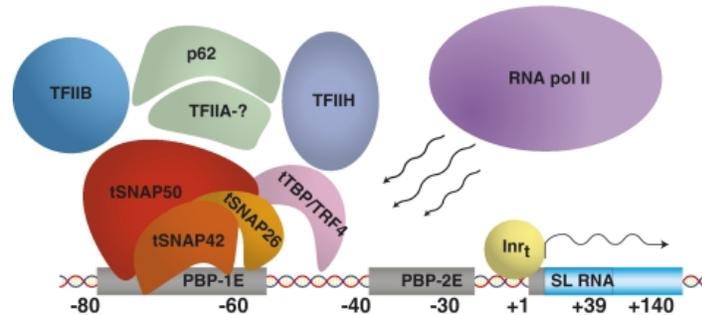


Figura 31. Esquema de los eventos que conducen al inicio de la transcripción, incluida la unión del complejo de preiniciación y el reclutamiento del RNA POL II al promotor del gen del RNA SL en *T. brucei*.

1.6.4 Transcripción de la RNA POL III

Además de sintetizar los tRNAs y el rRNA 5S, la RNA POL III en *T. brucei* y otros tripanosomátidos transcribe todos los snRNAs (U1 a U6). Esto es diferente a lo reportado en otros organismos, donde la RNA POL III sólo transcribe al snRNA U6, mientras que el resto es sintetizado por la RNA POL II (Nakaar *et al.*, 1997).

Los genomas de los tripanosomátidos contienen un número relativamente bajo de genes de tRNAs. La mayoría de los genes de tRNA están distribuidos en grupos de 2 a 10 genes en la cadena superior o inferior, en donde pueden estar presentes otros genes transcritos por la RNA POL III (El-Sayed *et al.* 2005).

En contraste con otros eucariontes, los genes de tRNA en los genomas de *L. major* y *T. brucei* no se distribuyen de forma aleatoria, sino que están confinados a un subconjunto de cromosomas (Padilla-Mejia *et al.*, 2015). Los genes 5S rRNA en *T. brucei* y *T. cruzi* están organizados en tándem, en contraste con *L. major*, donde están dispersos por todo el genoma y siempre están asociados con los genes tRNA (Moreno-Campos *et al.*, 2016).



Poco se sabe en los tripanosomátidos acerca de las secuencias que regulan la transcripción de la RNA POL III. Los genes de tRNA contienen cajas A y B similares a las presentes en tRNAs de otros organismos (Padilla-Mejia *et al.*, 2015). Asimismo, los genes del rRNA 5S presentan secuencias parecidas a la caja A, el elemento intermedio y la caja C (Moreno-Campos *et al.*, 2016), aunque no han sido analizadas funcionalmente. De manera interesante, la expresión de los snRNAs y el ncRNA 7SL en *T. brucei* y *L. major* está controlada por cajas A y B presentes en tRNAs o tRNA-like (secuencias parecidas a tRNA) que son transcritos de manera divergente y que se localizan alrededor de 100 pb río arriba (Rojas-Sánchez *et al.*, 2017).

La caracterización molecular de BRF1 en *T. brucei* (TbBRF1), y el análisis *in silico* permitió la detección en TbBRF1 de los tres dominios conservados ubicados en la región N-terminal de todos los ortólogos de BRF1, es decir, un motivo de cinta de zinc y dos repeticiones de ciclina. El modelo de homología sugirió que, de manera similar a otras proteínas BRF1 y TFIIB, los repetidos de ciclina de TbBRF1 muestran la estructura característica de cinco hélices α por repetición. Su localización es nuclear. El *knock-down* de TbBRF1 por la interferencia de RNA (RNAi) mostró que esta proteína es esencial para la viabilidad de las formas procíclicas del parásito, ya que la ausencia de TbBRF1 condujo a la detención del crecimiento de los parásitos. Los análisis de PCR en tiempo real demostraron que la transcripción de todos los genes dependientes de RNA POL III analizados se redujo, a diferentes niveles, después del *knock-down* de TbBRF1 (Vélez-Ramírez *et al.*, 2015).

Una molécula reguladora negativa de la transcripción de RNA POL III llamada Maf1 fue caracterizada en *T. brucei* (Romero-Meza *et al.*, 2017). La proteína TbMaf1 tiene las tres secuencias conservadas y se prevé que se pliegue en una estructura globular. A diferencia de la levadura, TbMaf1 se localiza en el núcleo en formas procíclicas de *T. brucei* en condiciones normales de crecimiento. Curvas de crecimiento con líneas celulares *knock-down* (en las que la expresión de TbMaf1 se redujo en un 75%) o que sobreexpresan TbMaf1 revelaron que TbMaf1 participa en la regulación del crecimiento celular de *T. brucei*. Los análisis de inmunoprecipitación de cromatina y

de *run-on* nuclear demostraron que TbMaf1 reprime la transcripción de RNA POL III de tRNAs y del snRNA U2 al asociarse con sus promotores. Los niveles del rRNA 5S no cambian después de la sobreexpresión de TbMaf1. Asimismo, TbMaf1 regula la transcripción de RNA POL I del gen de prociclina y la transcripción de RNA POL II de los genes de SL RNA (Romero-Meza *et al.*, 2017).

1.6.5 Antecedentes

Empleando el método de TAP-tag fueron aislados complejos transcripcionales en *L. major*, identificándose 12 de las 17 subunidades de la RNA POL III (Martínez-Calvillo *et al.*, 2007). El análisis *in silico* de las secuencias genómicas de *L. major* y *T. brucei*, permitió la identificación de probables ortólogos de algunas otras subunidades. Entre las subunidades identificadas se encuentra C82, subunidad específica de RNA POL III, que no tiene una contraparte en las otras dos RNA polimerasas. En nuestro laboratorio hemos iniciado el estudio de C82 en *T. brucei*, generando líneas celulares *knock-down* en las que es posible inducir con doxiciclina la degradación del mRNA de C82 mediante RNA de interferencia (RNAi). Resulta ahora necesario caracterizar dichas líneas celulares para verificar la reducción en la expresión de C82 tanto a nivel de mRNA como de proteína. Asimismo, se determinará si C82 es una proteína esencial para la viabilidad de *T. brucei*. El estudio de C82 en *T. brucei* permitirá ahondar nuestro conocimiento de la transcripción de la RNA POL III en los tripanosomátidos, organismos de divergencia temprana que se caracterizan por presentar mecanismos inusuales de regulación transcripcional.



2. Hipótesis

Si se deleta la subunidad C82 de la RNA POL III de *T. brucei* entonces se verá afectado el crecimiento celular de formas procíclicas del parásito.

2.1.1 Objetivo general:

Determinar si la subunidad C82 de la RNA Polimerasa III es esencial para el crecimiento de formas procíclicas de *T. brucei*.

2.1.2 Objetivos particulares:

1. Realizar un análisis *in silico* de la secuencia y estructura de C82 de *T. brucei*.
2. Estudiar el efecto del *knock-down* de la subunidad C82 en el crecimiento de formas procíclicas de *T. brucei*.
3. Verificar la degradación de C82 en los cultivos *knock-down*, a nivel de mRNA y proteína.

3. Metodología

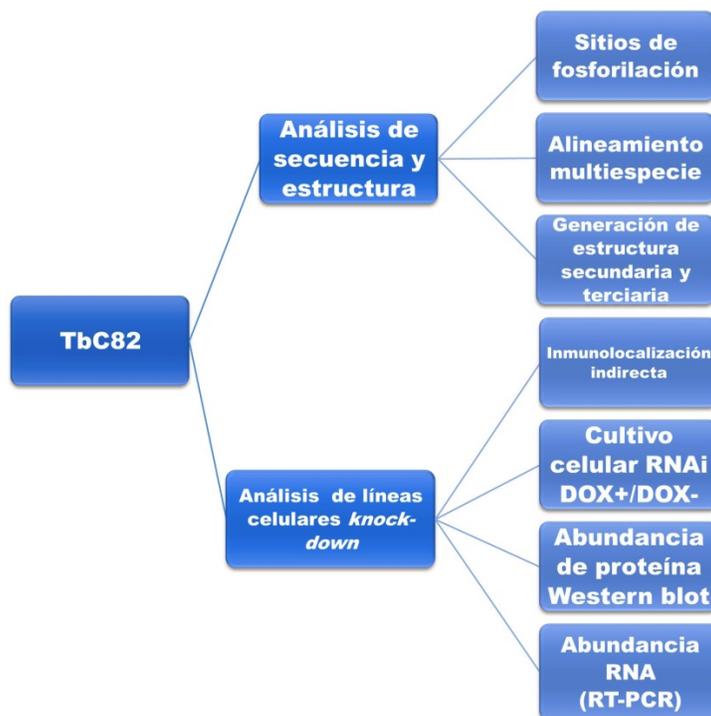


Figura 32. Estrategia experimental.

3.1 Análisis *in silico*

Se obtuvieron las secuencias de nucleótidos y aminoácidos de la subunidad C82 de LA RNA POL III de *T. brucei* (TbC82) y sus ortólogos (Pluta *et al.*, 2001) de las base de datos de TritypDB (<https://tritypdb.org/tritypdb/>) y NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Para el alineamiento se utilizaron las secuencias de aminoácidos homólogas usando el programa T-Coffe, que hace alineamientos de acuerdo a la estructura terciaria de las proteínas. La búsqueda de señales de localización nuclear, probables aminoácidos fosforilados, y predicción de estructura secundaria y tridimensional se realizó con las herramientas bioinformáticas disponibles en los sitios SwissProt (<http://expasy.org/sprot/>), Phyre2 (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/~phyre2/html/page.cgi?id=index>) Netphos (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/>) y Jalview (<http://www.jalview.org/>).

Se hizo el análisis de C82 comparando *T. brucei* con distintas especies de los diferentes dominios de la vida (*L. major*, *B. ayali*, *A. thaliana*, *E. histolytica*, *C. elegans*, *D. melanogaster* y *H. sapiens*) para ver su nivel de conservación a través de la



evolución, así mismo se realizó un alineamiento de tripanosomátidos (*T. b. brucei*, *T. b. gambiense*, *T. congolense*, *T. vivax*, *T. cruzi*, *L. major* y *L. mexicana*) usando el programa Clustal Ω (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) y T-Coffee (www.tcoffe.crg.cat).

3.2 Extracción de DNA génomico de *T. brucei*.

Un total de 3×10^8 células de *T. brucei* en fase estacionaria se centrifugaron a 4,500 rpm por 10 minutos (min) a 4°C. Las células se resuspendieron en 5 mL de buffer de lisis el cual contiene SSC 0.5× (NaCl 3 M, acetato de sodio 0.3 M), TNE 1× (Tris 40 mM pH 7.6, EDTA 1 mM pH 8, NaCl 15 mM), sarcosyl 1 % y 100 μ M y 100 μ g de proteasa K. Después de una incubación de 2 h a 55°C se realizó una extracción con fenol-cloroformo y la pastilla se resuspendió en 300 μ l de buffer TE (Tris 10 mM pH 7.6, EDTA 0.2 mM pH 8).

3.3 Cultivo celular de *T. brucei*

Para estos experimentos se utilizaron parásitos procíclicos de *T. brucei* cepa 29-13, que expresan constitutivamente la RNA polimerasa del fago T7 y el represor de tetraciclina (Wirtz *et al.*, 1997). Estas células fueron transfectadas con vectores que producen la interferencia del mRNA de C82. Los cultivos se crecieron en medio SDM-79 (Carruthers *et al.*, 1992) suplementado con suero fetal bovino al 10% con selección de higromicina (50 μ g/mL), phleomicina (2.5 μ g/mL) y G418 (15 μ g/mL) a una temperatura de 28°C.

3.4 Análisis de cultivos *knock-down* de *T. brucei*

Se iniciaron cultivos celulares en fase media logarítmica a partir de clonas celulares originadas por Daniel Vélez para expresar un RNA de interferencia (RNAi) del gen TbC82 en el vector pC82-ZJM (datos no publicados). Se iniciaron cultivos de parásitos en fase media logarítmica a una densidad inicial de 2×10^6 cél/mL. Cada cultivo fue dividido en dos partes, y a una de ellas se le agregó doxiciclina a una concentración final de 2 μ g/mL para inducir la expresión de la doble cadena de RNA. Por otro lado bajo las mismas condiciones como control experimental se iniciaron cultivos de *T.*



brucei 29-13 silvestre. Se hizo un conteo celular con cámara de Neubauer cada 24 h, resembrando a una densidad celular de 2×10^6 cél/mL. El procedimiento se repitió durante 6 días. Los datos obtenidos se recolectaron, graficaron, y se analizaron estadísticamente (Alsford *et al.*, 2011).

3.4 Extracción de RNA total

En RNA total se extrajo por el método TRIzol. Se centrifugaron 1×10^8 células en fase media logarítmica a 8000 rpm durante 10 min a 4°C. Se recuperaron la células y se resuspendieron en 1.5 mL de reactivo TRI (Sigma) a las cuales se les adicionó posteriormente 400 µl de cloroformo y se centrifugaron durante 15 min a 12, 000 rpm a 4°C. Se recuperó el sobrenadante o fase acuosa (cuidando de no tocar la fase intermedia para evitar contaminaciones) y posteriormente se agregaron 500 µL de isopropanol (2-propanol) y se agitó vigorosamente para su siguiente centrifugación a 12000 rpm a 4°C. Una vez recuperada la pastilla (RNA) se precipitó con 1 mL de etanol absoluto y se resuspendió en 100 µl de H₂O tratada con dietilpirocarbonato (DEPC) (Invitrogen).

3.5 Ensayos RT-PCR

Se usaron 10 µg de RNA total tratado con 1 U de DNAasa (Ambion). Se agregaron 5 µl de la mezcla de buffer 5×, DTT 0.01 M, 25 mM de cada dNTP, oligonucleótido Nested-dT 10 mM y 200 U de la enzima retrotranscriptasa Super Script II (Invitrogen). La reacción se llevó a cabo de la siguiente manera: 10 min de polimerización a 42°C y 15 min a 70°C para inactivar la reacción. Los productos de amplificación se resolvieron en geles de agarosa al 2% teñidos con Midory green, y se estimó su tamaño con el marcador de peso molecular (escalera de 1 kb, Invitrogen).

El cDNA resultante se utilizó como templado para detectar los transcritos mediante PCR. Para cada reacción se usaron 1U de polimerasa (Sigma), buffer 1×, MgCl₂ 2 mM, 25 mM de cada dNTP, 100 ng de cada oligonucleótido requerido. Se usaron 15 ciclos 20 seg de desnaturalización a 92°C, 30 seg de alineamiento a 45°C y 45 seg de elongación a 72°C. Los productos de amplificación se resolvieron por electroforesis en geles de agarosa teñidos con Midory green.



3.6 Análisis de la abundancia de la proteína C82

Se realizó un análisis tipo Western blot para verificar los niveles de expresión de proteína de la subunidad C82 en los cultivos *knock-down*. Para esto, se aisló proteína total de cultivos celulares *knock-down* inducidos por diferentes tiempos (24-96 horas) con buffer RIPA, a partir de 3×10^8 células que fueron centrifugadas a 4,000 rpm por 10 min y lavadas con 500 μ l de PBS frío dos veces. Se resuspendieron las proteínas en 500 μ l de buffer RIPA (Tris 50 mM, EDTA 5 mM, NaCl 150 mM, NP40 1%, deoxicolato de sodio 0.5%, SDS 0.1% e inhibidores de proteasas 1 \times). Las muestras se incubaron en hielo por 30 min agitando con vortex cada 5 min y se centrifugaron a una velocidad de 14,000 rpm durante 20 min a 4°C.

Las proteínas totales se desnaturalizaron adicionando 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%) y se colocaron en H₂O en ebullición por 10 min. Posteriormente se transfirieron a hielo durante 5 min. Las proteínas se fraccionaron por electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS empleando 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%). De esta forma, las proteínas migraron de acuerdo únicamente a 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 (~30 min) y posteriormente a 100 voltios por ~1.5 horas.

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

La membrana fue bloqueada con una solución de leche descremada al 5% con Tween- 20 al 0.05% (en PBS), toda la noche a 4°C. Posteriormente se adicionó el anticuerpo primario Anti-C82, que reconoce a la proteína C82, con una dilución



1:100. Se incubó durante una hora a temperatura ambiente, después se realizaron 3 lavados de 10 minutos con Tween-20 al 0.05% (en PBS) y se incubó con el anticuerpo secundario HRP-anti-ratón (dilución 1:3000) durante una hora. Finalmente se repitieron los lavados de la misma forma. Para el revelado se utilizó el kit de detección Immobilon™ Western (Millipore).

3.7 Inmunofluorescencia indirecta

Células TbPZJM-C82-CA6 en fase logarítmica se empastillaron a 6000 rfc durante 10 minutos a 4 °C y se lavaron dos veces con PBS frío; se resuspendieron para que quedaran a una densidad de 300,000 células/ μ L, se expandieron en un área de aproximadamente 0-5cm² sobre un portaobjetos previamente tratado con Poli-L-lisina; se dejaron 15 minutos a temperatura ambiente procurando no dejar secar la muestra ; las células con una solución de paraformaldehído al 4% por 30 minutos a 4 °C; se realizaron 2 lavados de 5 minutos a temperatura ambiente con PBS en agitación suave; las células se permeabilizaron con 50 μ l de Tritón X-100 al 0.05% por 2 minutos a temperatura ambiente; inmediatamente después se realizaron 4 lavados adicionales; las células se bloquearon con 50 μ l de BSA al 2% y gelatina de peces de agua fría (G7765-250ML de Sigma) al 1% incubando una hora a temperatura ambiente en cámara húmeda; se incubó el anticuerpo primario a-TbC82 a un una dilución 1:25 usando la solución de bloqueo, incubando 1 hora a temperatura ambiente en cámara húmeda; se realizaron 3 lavados con PBS frío otros 2 lavados adicionales con PBS con Tween 20 al 0.05% en oscuridad; la muestra se dejó secar en oscuridad; se cubrió con Vectashield con DAPI (Vector Laboratories INC.); la laminilla se tapó con un cubreobjetos y el borde se selló con barniz de uñas. Las imágenes se obtuvieron con el equipo Leica SP5, DM 16000, Mo y se utilizó el programa LAS AF software para hacer el procesamiento de las micrografías.

4. Resultados

4.1. Análisis *in silico*

Ortólogos de la subunidad C82 de la RNA POL III han sido identificados en muchas especies. Con el objeto de determinar el grado de conservación de esta proteína a lo largo de la escala evolutiva se realizó un alineamiento multiespecie (Fig. 33). En primera instancia, se encontró que el tamaño de C82 varía entre las diferentes especies, presentando un rango de 499 aminoácidos (57.28 kDa) en *E. histolytica* a 604 aminoácidos (65.36 kDa) en *L. major*. Además, se encontró que la secuencia de C82 es en general poco conservada (Fig. 33), observándose porcentajes de identidad relativamente bajos (Tabla 3). Por ejemplo, entre los ortólogos de *T. brucei* y *L. major* hay 30.7% de identidad, mientras que entre *T. brucei* y *H. sapiens* hay sólo 16.5% (Tabla 3). Asimismo, C82 de humano mostró identidades del 33.8 y 25.4% con los ortólogos de *D. melanogaster* y *C. elegans*, respectivamente (Tabla 3).

	Lm	Tb	Ba	At	Eh	Ce	Dm	Hs
Lm	100.00	30.77	34.70	17.71	17.26	14.17	10.94	17.38
Tb		100.00	38.63	17.20	17.59	11.98	14.83	16.59
Ba			100.00	18.42	15.93	15.27	13.46	16.91
At				100.00	15.71	20.17	17.51	21.49
Eh					100.00	17.27	19.31	19.67
Ce						100.00	21.77	25.45
Dm							100.00	33.86
Hs								100.00

Tabla 3. Matriz de porcentaje de identidad de las secuencias de aminoácidos de C82 multiespecie en *T. brucei* (Tb), *L. major* (Lm), *B. ayali* (Ba), *A. thaliana* (At), *C. elegans* (Ce), *D. melanogaster* (Dm), *H. sapiens* (Hs) y *E. histolytica* (Eh).

C82 de humano se caracteriza por la presencia de cuatro dominios de hélice alada (WH, por *winged helix*) y un dominio de hélice superenrollada (CC, por *coiled coil*) (Lefèvre et al., 2011). Para determinar si C82 de *T. brucei* posee estos dominios conservados, se realizó un alineamiento con la secuencia de aminoácidos de ambos ortólogos, y se generó la estructura secundaria predicha con el programa Jalview (Fig. 34). Esta comparación de secuencias confirmó que existe poca similitud entre ambas (16.5% de identidad). Sin embargo, se observó que C82 de *T. brucei* sí presenta los cuatro dominios WH, formados por varias α -hélices y β -plegadas, y el dominio CC, constituido por dos α -hélices (Fig. 34).

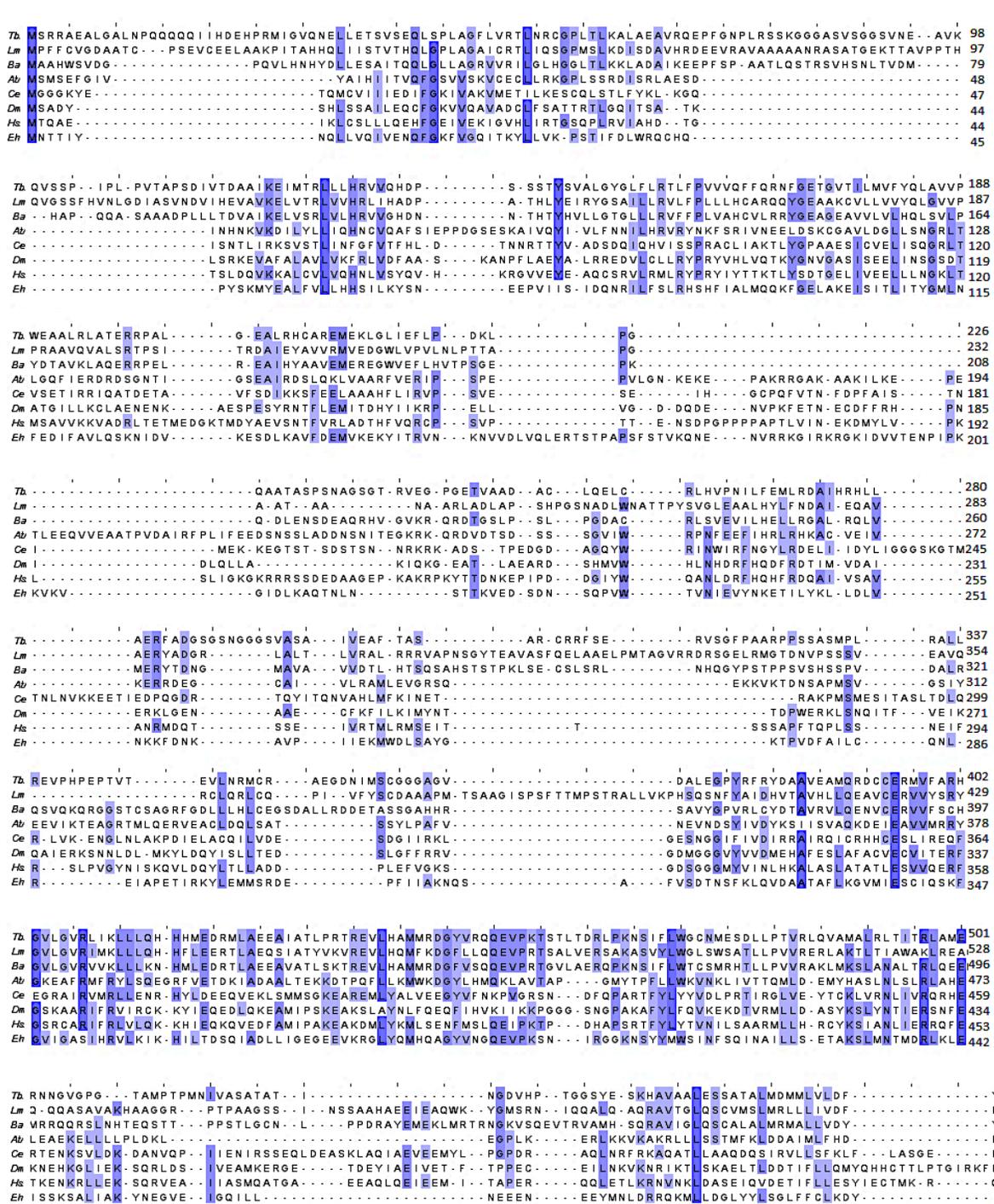


Figura 33. Alineamiento de la secuencia de aminoácidos de C82 en diferentes especies. *T. brucei* (Tb), *L. major* (Lm), *B. ayali* (Ba), *A. thaliana* (At), *C. elegans* (Ce), *D. melanogaster* (Dm) *H. sapiens* (Hs) y *E. histolytica* (Eh). Los aminoácidos resaltados en azul oscuro están conservados y en azul más claro los semi-conservados. Los dominios WH y CC se presentan encerrados en cajas.



A continuación se procedió a determinar el nivel de conservación de C82 entre diferentes parásitos tripanosomátidos, para lo cual se realizó un alineamiento de secuencias de aminoácidos (Fig. 35). Como se anticipaba, la homología entre los diferentes ortólogos fue alta, observándose porcentajes de identidad entre TbC82 y los ortólogos en *T. congolense* y *T. cruzi* de 69.5 y 62.5%, respectivamente (Tabla 4). Notablemente, la identidad entre *L. major* y *L. mexicana* es del 95.5% (Tabla 4). Todos los tripanosomátidos analizados presentaron los cuatro dominios WH y el dominio CC (Fig. 35).

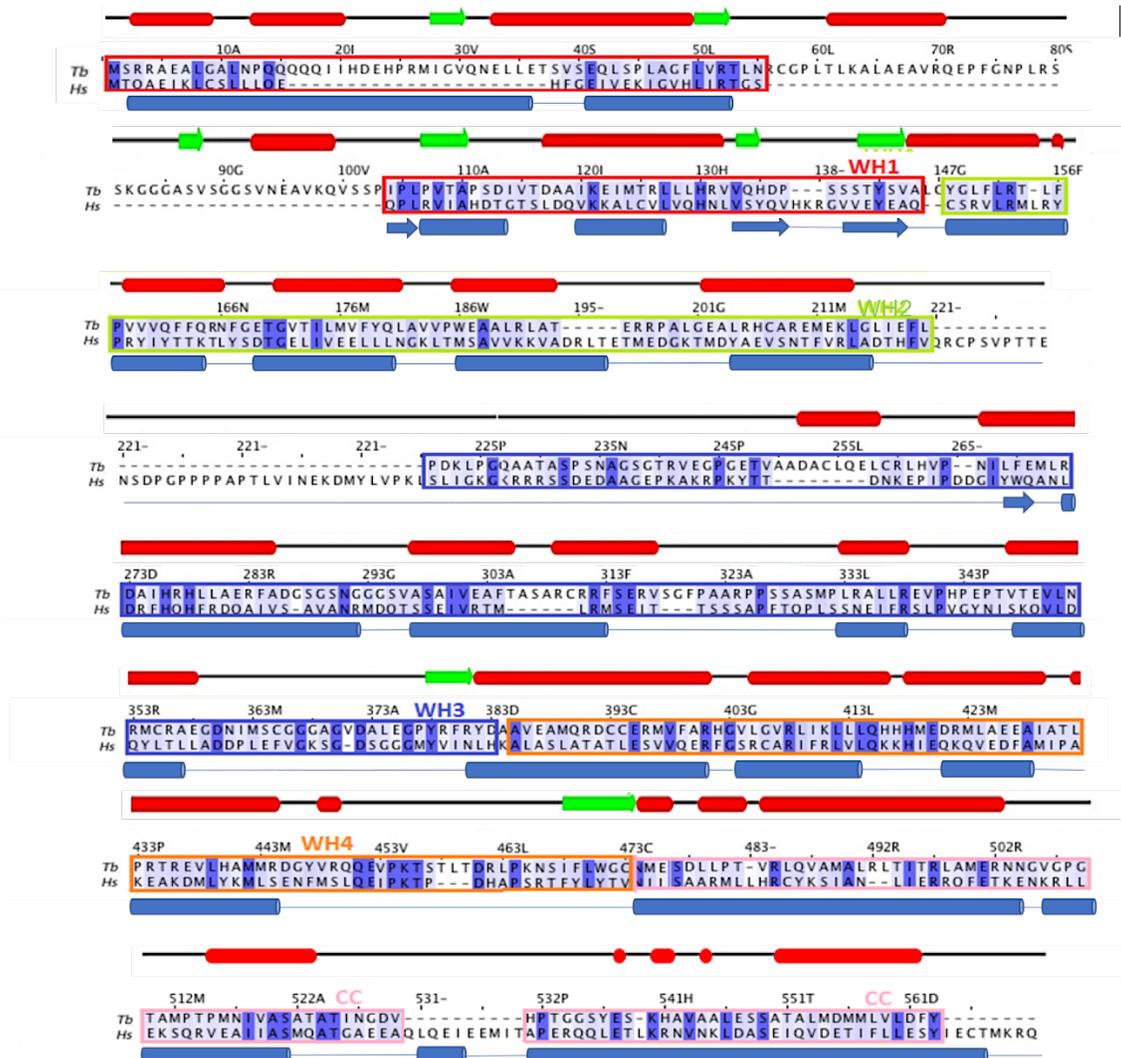


Figura 34. Alineamiento de secuencias de C82 de *T. brucei* y *H. sapiens*. Los aminoácidos resaltados están conservados y en azul más claro los semi-conservados en ambas especies. Las flechas muestran β -plegadas y los cilindros ejemplifican α -hélices. Los dominios WH y CC se presentan encerrados en cajas.



También se generó una estructura tridimensional de la secuencia de aminoácidos de C82 de *T. brucei*, mediante modelado por homología, utilizando como templado la estructura del cristal de C82 de humano (Fig. 36). Aunque se aprecian ciertas diferencias como el volumen de la proteína, en general se observó que las dos estructuras son muy parecidas, presentando una estructura globular en la que las α -hélices se localizan en la parte externa (Fig. 36). El programa T-Coffe arrojó un 60% de parecido estructural entre ambas proteínas.

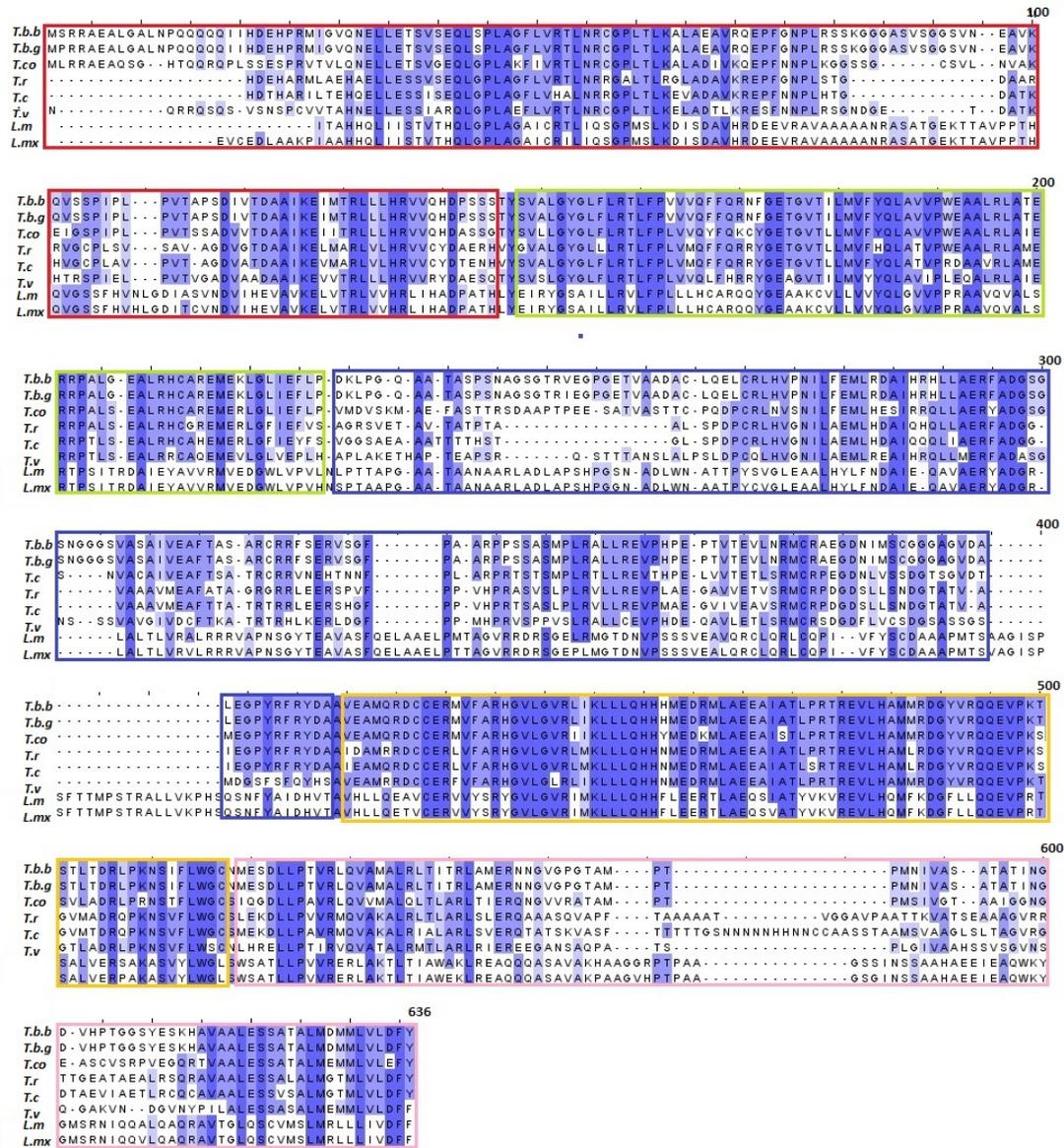


Figura 35. Alineamiento de la secuencia de la proteína C82 de Tripanosomátidos. *T. b. brucei* (Tbb), *T. b. gambiense* (Tbg), *T. congolense* (Tco), *T. vivax* (Tv), *T. cruzi* (Tc), *T. rangieli* (Tr), *L. major* (L.m) y *L. mexicana* (L.mx).

En su conjunto, estos resultados indican que a pesar de que la secuencia de TbC82 es poco parecida a la de su ortólogo en *H. sapiens*, TbC82 presenta los dominios característicos de otros ortólogos de C82 y muestra una alta conservación tanto en su estructura secundaria como terciaria. Cabe señalar que los dominios WH que los conforman participan en unión al DNA. Dichos dominios parecen ser evolutivamente muy antiguos, ya que están presentes también en el factor TFE de archeas (Lefèvre *et al.*, 2011).

	Lm	Lmx	Tr	Tc	Tv	Tbb	Tbg	Tco
Lm	100.00	95.52	34.06	34.86	30.98	31.55	31.55	31.91
Lmx		100.00	32.81	33.99	29.62	30.21	30.21	29.98
Tr			100.00	80.38	60.32	63.37	63.37	62.77
Tc				100.00	61.19	62.45	62.45	62.85
Tv					100.00	58.58	58.58	59.32
Tbb						100.00	99.64	69.51
Tbg							100.00	69.51
Tco								100.00

Tabla 4. Matriz de porcentaje de identidad de las secuencias de C82 de tripanosómátidos. *T. b. brucei* (Tbb), *T. b. gambiense* (Tbg), *T. congolense* (Tc), *T. vivax* (Tv), *T. cruzi* (Tc), *T. rangieli* (Tr), *L. major* (Lm) y *L. mexicana* (Lmx).

Se sabe que la función de C82 en otros organismos se regula mediante fosforilación (Korver *et al.*, 1997; Lefèvre *et al.*, 2011). Con el objeto de determinar la posible fosforilación de TbC82, se analizó su secuencia de aminoácidos en el programa NetPhos 3.1. Se identificaron varios residuos con un score alto (mayor a 0.88), lo que sugiere que posiblemente sean fosforilados *in vivo*. Éstos corresponden a: S 38, S 44, S 80, S 81, S 92 y S 112 (Fig. 3).

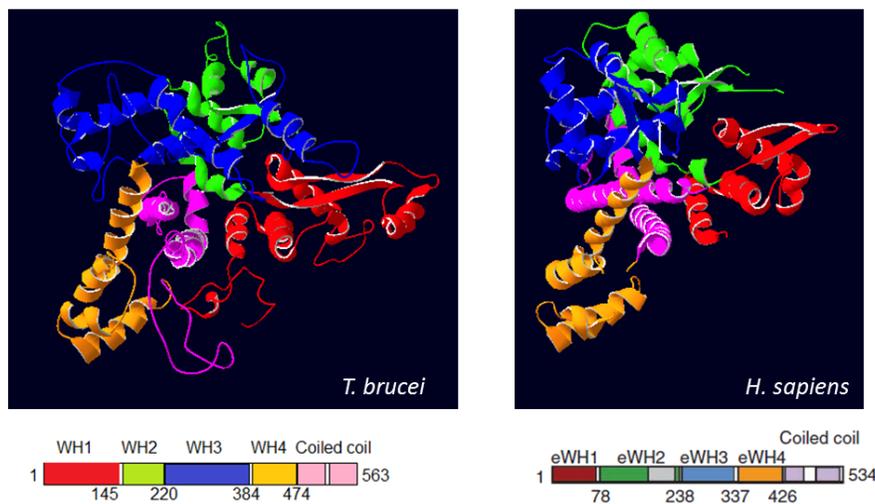


Figura 36. Estructura tridimensional predicha de C82 de *T. brucei* y *H. sapiens*.

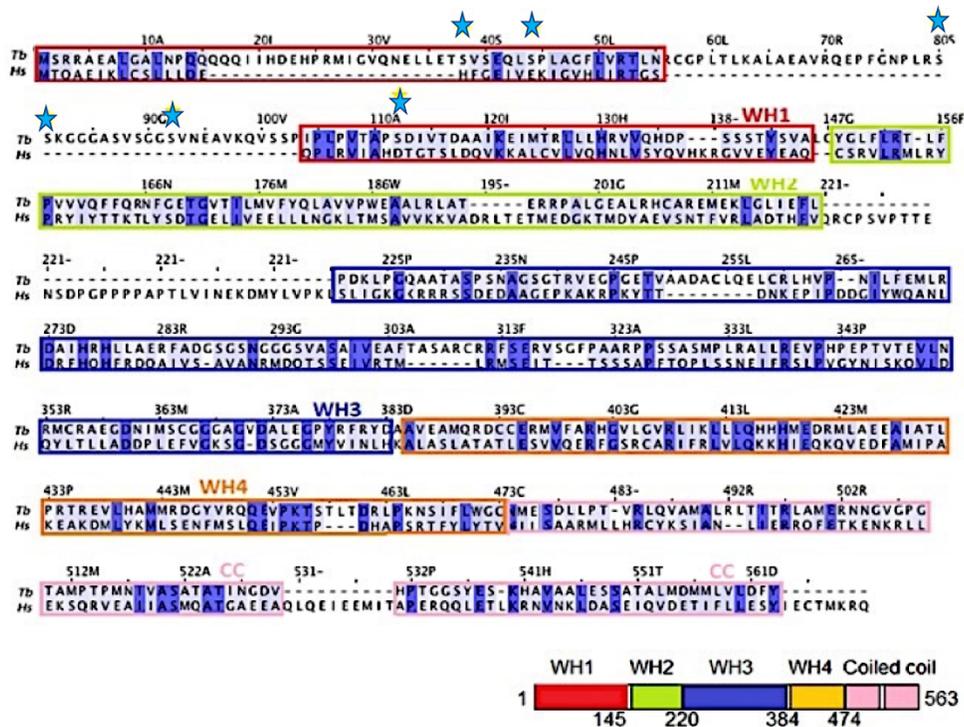


Figura 37. Sitios de fosforilación predichos en C82 de *T. brucei*. Los aminoácidos que probablemente se fosforilan se marcan con una estrella.

4.2 Análisis de cultivos *knock-down* de *T. brucei*

Previamente, en nuestro laboratorio fue generado el vector pC82-ZJM, en el cual fue clonado un fragmento de 407 pb del gen de TbC82. El vector fue transfectado en formas procíclicas de *T. brucei*, obteniéndose la línea celular *T. brucei*/pC82-ZJM (datos no publicados). El fragmento del gen de TbC82 está flanqueado por dos promotores de la RNA polimerasa del fago T7 que son inducibles con doxiciclina. De esta manera, al adicionar doxiciclina al cultivo *T. brucei*/pC82-ZJM se induce la síntesis de RNA de doble cadena que potencialmente degradaría el mRNA de C82 por interferencia de RNA (RNAi).

En el presente trabajo se inició la caracterización de la línea celular *T. brucei*/pC82-ZJM. En primera instancia se quiso determinar si el *knock-down* de TbC82 tiene algún efecto en el crecimiento del parásito. Para ello se realizaron ensayos de RNAi por triplicado, induciendo con doxiciclina (DOX+) la degradación del mRNA de C82. A la par se analizó el crecimiento del cultivo sin inducir (DOX-) (Fig. 38). Las curvas de crecimiento se realizaron durante siete días. Como se anticipaba, la inducción con

doxiciclina produjo una disminución en el crecimiento celular a partir del día 3, y los cultivos dejaron de crecer gradualmente hasta que murieron en el día 6 (Fig. 38). Como control se analizaron de células *T. brucei* silvestres (WT), observándose que la adición de doxiciclina no tuvo ningún efecto en el crecimiento celular (Fig. 39). Así, estos resultados sugieren fuertemente que TbC82 es un gen esencial para la viabilidad de formas procíclicas de *T. brucei*.

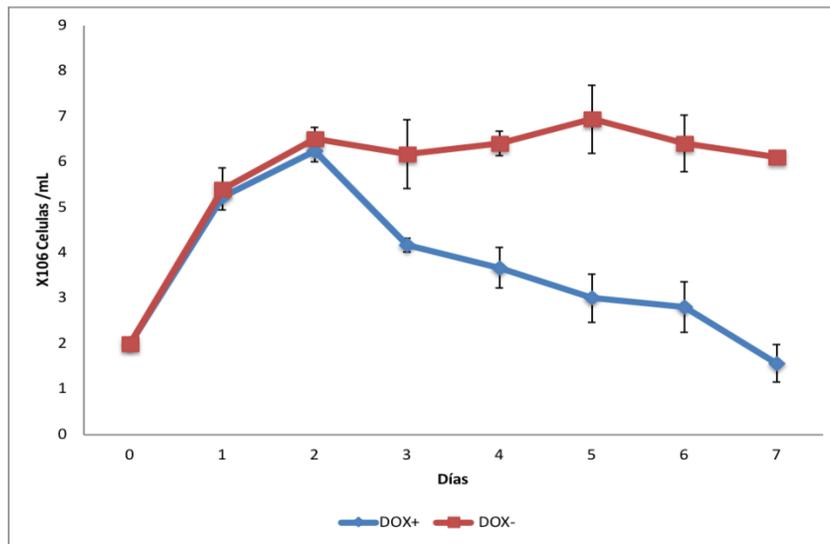


Figura 38. Gráfica de crecimiento del cultivo *T. brucei*/pC82-2T7 en presencia (DOX+) o ausencia (DOX-) de doxiciclina. El experimento se realizó por triplicado. Se muestra la desviación estándar.

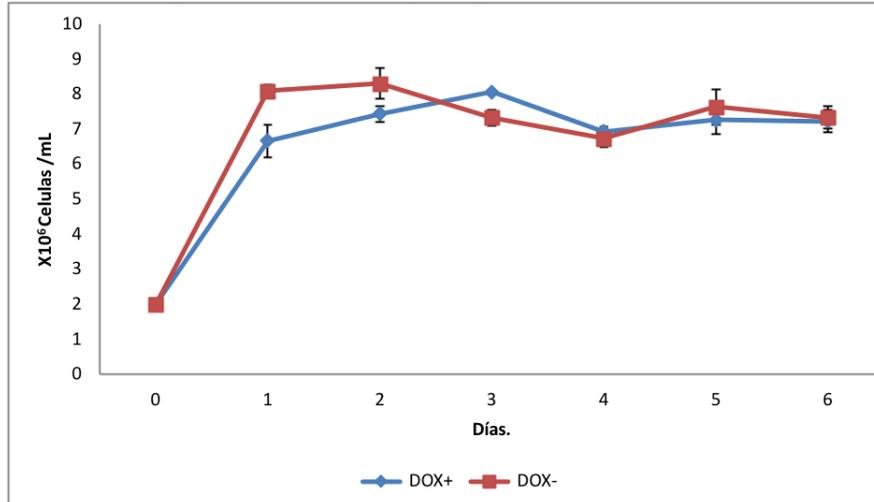


Figura 39. Gráfica de crecimiento del cultivo de *T. brucei* silvestre en presencia (DOX+) o ausencia (DOX-) de doxiciclina. El experimento se realizó por triplicado. Se muestra la desviación estándar.

4.4. Extracción de RNA de los cultivos *knock-down* de TbC82 de *T. brucei*

Para confirmar la disminución en la abundancia del mRNA en los cultivos *knock-down*, se realizaron ensayos de RT-PCR. Para ello, inicialmente se llevó a cabo la extracción de RNA total de cultivos no inducidos e inducidos por diferentes tiempos (0 a 4 días: T0, T1, T2, T3, T4, respectivamente). Las muestras de RNA se cuantificaron en un Nanodrop (Thermo), obteniéndose alrededor 300 µg por muestra. El análisis en un gel de agarosa reveló que el RNA es de buena calidad (Fig. 40).

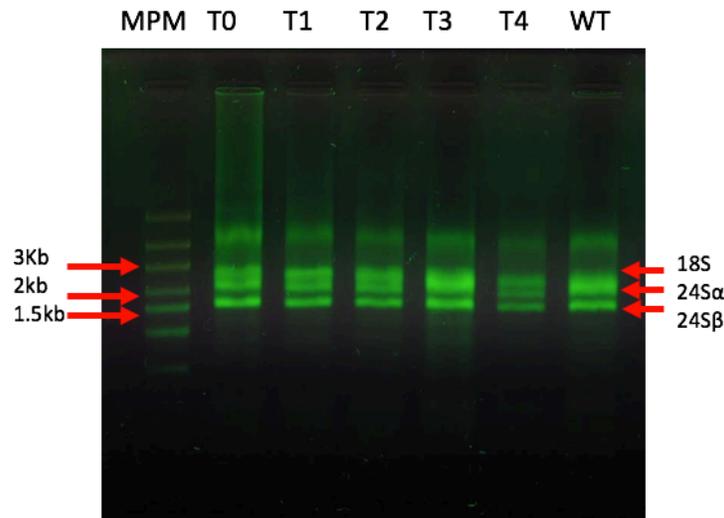


Figura 40. Análisis del RNA total del cultivo *T. brucei*/pC82-PZJ no inducido (T0) o inducido con doxiciclina por 1 día (T1), 2 días (T2), 3 días (T3) o 4 días (T4). También se analizó RNA de células silvestres (WT). Se señalan las tres moléculas de RNA ribosomales mayores. Gel de agarosa 0.8% teñido con Midory Green. El marcador de peso molecular (MPM) corresponde a RiboRuler High Range RNA Ladder (Thermo).

4.5 Análisis de la abundancia del mRNA de C82 por ensayos RT-PCR

Para medir la abundancia de mRNA de C82 en el cultivo *knock-down* se utilizó el método de RT-PCR. Para el procedimiento se preparó cDNA a partir de las muestras de RNA total extraídas en diferentes tiempos de RNAi (0-4 días), con el oligonucleótido Nested dT (que reconoce la cola de poli A de los mRNAs). Posteriormente se hizo un PCR con el oligonucleótido TbC82-C-PTP-NotI-3/1-21 antisentido (que se encuentra en la región final de la secuencia del gen de C82) y el oligo Nested dT, observándose la banda del tamaño esperado (1568 pb) en el T0 y T1, pero no así en los otros tiempos de inducción (T2 a T4) (Fig.41). Así, con este ensayo se confirmó la degradación del mRNA de C82 a partir de los dos días de inducción con doxiciclina.

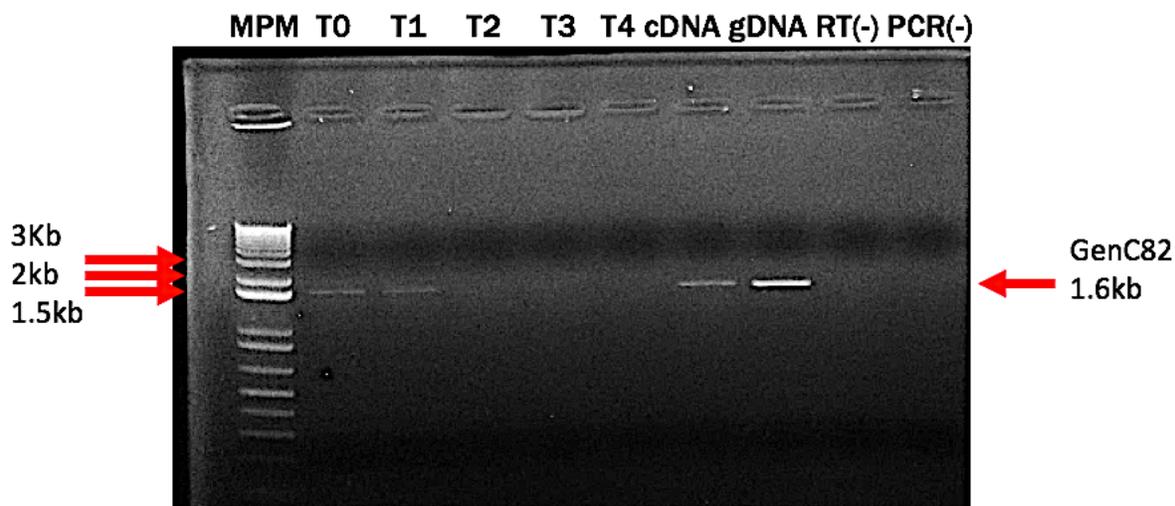


Figura 41. Ensayo RT-PCR para verificar la abundancia del mRNA de TbC82 en el cultivo *T. brucei*/pC82-ZJM induciendo con doxiciclina por 0 (T0), 1 (T1), 2 (T2), 3 (T3) o 4 días (T4). Como control positivo se muestra un RT-PCR utilizando RNA total WT (cDNA) y control negativo de la retrotranscripción en el que se utilizó H₂O en lugar de enzima (RT-). Asimismo se muestran controles de la reacción de PCR: DNA genómico WT (gDNA) y control negativo con H₂O (PCR-).

4.7 Análisis de la abundancia proteína C82 en los cultivos *knock-down*

A continuación se procedió a realizar un ensayo de Western blot para confirmar la disminución de la proteína C82 en el cultivo *knock-down*. Para ello se obtuvo proteína total de cultivos no inducidos e inducidos por diferentes tiempos (0 a 4 días: T0, T1, T2, T3, T4, respectivamente). El análisis en geles de poliacrilamida indicó que los niveles de las proteínas eran óptimos en todos los casos (Fig. 42). Para el ensayo Western blot se usó un anticuerpo contra C82 de *T. brucei* previamente producido en el laboratorio. El resultado mostró una disminución en la abundancia de la proteína C82 del T0 al T4 de casi el 80% (Fig. 43). Como control se empleó un anticuerpo contra β -tubulina, el cual demostró que todos los carriles contienen una cantidad de proteína muy similar (Fig. 43). Con este resultado, y el análisis de abundancia del mRNA, se confirmó el funcionamiento exitoso del sistema de RNAi que se activa de manera específica con doxiciclina, produciendo que los niveles de mRNA disminuyan, lo que a su vez reduce los niveles de proteína C82. Como consecuencia, los cultivos *knock-down* dejan de crecer y eventualmente mueren, lo que demuestra que la subunidad TbC82 es una proteína esencial para la viabilidad celular en formas procíclicas de *T. brucei*.

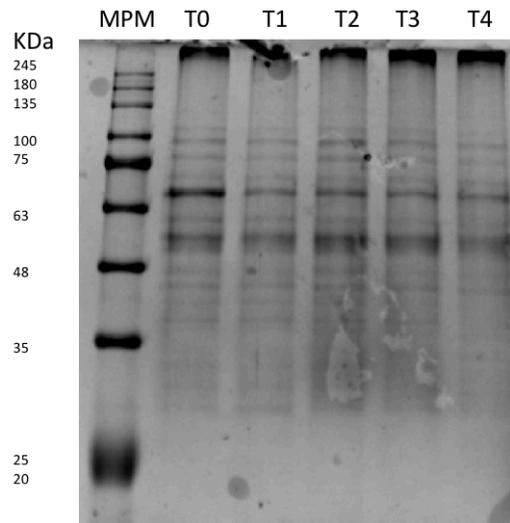


Figura 42. Análisis electroforético de proteínas totales de cultivos *knock-down* de *T. brucei* no inducidos (T0) o inducidos con doxiciclina por 1 día (T1), 2 días (T2), 3 días (T3) o 4 días (T4). Los cultivos corresponden a *T. brucei*/pC82-ZJM. Gel discontinuo SDS PAGE al 10%, teñido con azul de Commasie.

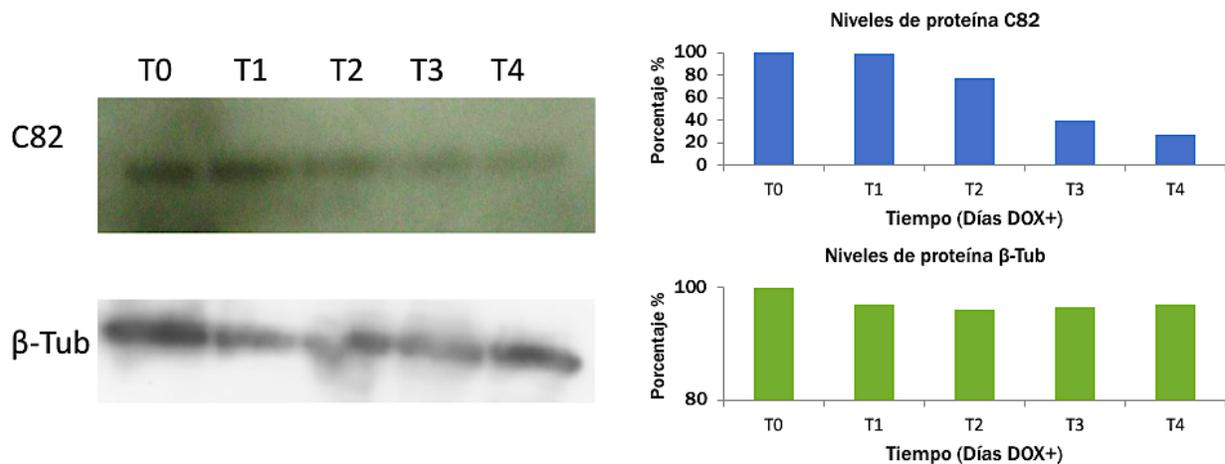


Figura 43. Ensayo Western blot para el análisis de la abundancia de proteína C82 en los cultivos *knock-down*. Se muestran los distintos tiempos de inducción utilizando el anticuerpo α -TbC82 en dilución 1:100. Para graficar se consideró como 100% la señal del tiempo 0, ya que no está inducido con doxiciclina. Como control de carga se utilizó β -Tubulina, tomando el tiempo 0 como 100%.

4.8 Localización celular de C82

Se determinó la localización celular de la subunidad C82 de la RNA POL III en formas procíclicas de *T. brucei* mediante inmunofluorescencia indirecta, utilizando como anticuerpo primario α -TbC82 acoplado a Alexa 488. En las imágenes obtenidas (Fig. 44) se puede apreciar que la subunidad TbC82 se localiza en el núcleo, como es de

esperarse de una subunidad de la RNA POL III. La señal de TbC82 es uniforme en el núcleo, similar a lo reportado para TFIIB y TFIIC en humano y *S. pombe* (Haeusler y Engelke, 2006).

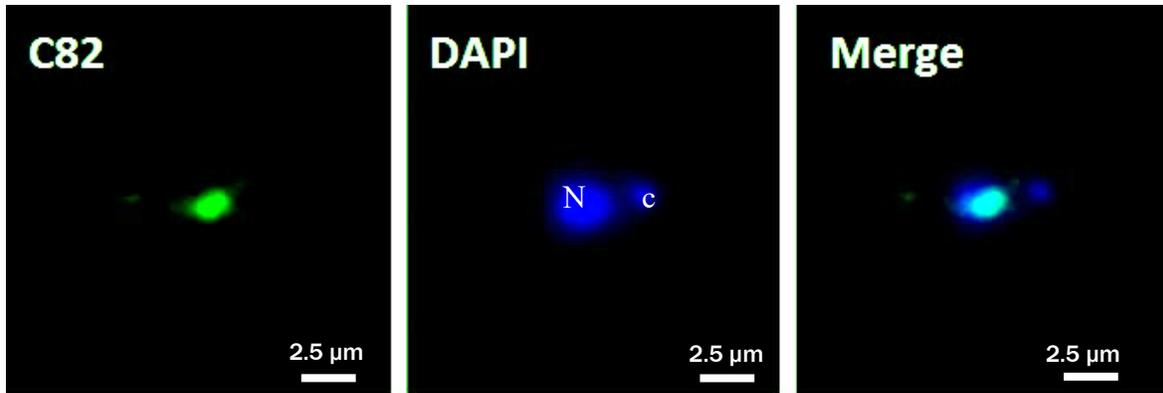


Figura 44. Inmunolocalización de la subunidad C82 de la RNA POL III en formas procíclicas de *T. brucei*. Se muestra en verde a la proteína C82 y en azul el DNA teñido con DAPI en el núcleo (N) y en el cinetoplasto (c). Además se muestra el empalme de las dos imágenes. Los resultados indican una localización nuclear. Se utilizó un microscopio Leica (SP5, DM16000, Mo), con un objetivo 100x. Las imágenes se analizaron con el programa LAS AF software.



5 Discusión

El estudio de las enfermedades parasitarias tropicales, así como de los organismos que las causan, debe ser prioritario en el área de la salud pública debido a sus altas tasas de morbilidad y mortalidad. Además, su estudio se ha hecho más relevante en años recientes, debido a que el calentamiento global está incrementando las temperaturas del planeta Tierra y con ello se aumentan las zonas de distribución e infección de los organismos que son vectores de estas enfermedades (Gallana *et. al.*, 2013). En esta situación se encuentran los vectores transmisores de los parásitos tripanosomátidos, que en los últimos años han invadido nuevas zonas geográficas.

Los trabajos dirigidos al estudio de aspectos básicos de la biología molecular de los tripanosomátidos, como la transcripción del DNA, aportan información importante que ayudará al control de las enfermedades que producen estos parásitos a mediano o largo plazo. Dentro de la familia de los tripanosomátidos, *T. brucei* es el organismo más usado para estudios funcionales debido a que es el único tripanosomátido que cuenta naturalmente con el sistema de RNAi, y para el cual se han desarrollado plásmidos que facilitan los *knock-downs* génicos. Por esto, *T. brucei* es un excelente modelo para el estudio de la función de los genes por RNAi. En cambio, para llevar a cabo estudios funcionales en otros tripanosomátidos como *Leishmania* y *T. cruzi* se deben realizar *knock-outs* génicos, los cuales requieren de mucho tiempo y recursos, y no permiten el estudio de genes esenciales para la viabilidad celular. De esta forma, es posible extrapolar los datos funcionales obtenidos en *T. brucei* hacia otros tripanosomátidos que causan enfermedades en nuestro país como *L. mexicana* que causa leishmaniasis y *T. cruzi*, causante de la enfermedad de Chagas. El hecho de que todos los tripanosomátidos presentan mecanismos de expresión genética muy parecidos facilita la extrapolación de los datos funcionales (Martínez-Calvillo *et al.*, 2010).

Este trabajo se centró en el estudio de la subunidad C82 de la RNA POL III en *T. brucei*. El estudio de esta proteína es muy importante si tomamos en cuenta el papel esencial que lleva a cabo en la síntesis de tRNAs, 5S rRNA y snRNAs. Estas moléculas de RNA realizan funciones cardinales para la biología de todos los organismos eucariontes (Müller, 2015).

El análisis *in silico* demostró que el gen de *T. brucei* que corresponde a la proteína TbC82 (Tb927.2.2990) se encuentra localizado en el cromosoma 2, en la posición 567494 - 569217, y que posee las características de secuencia, estructura y función distintivas de los ortólogos de C82 en otras especies. Esto es, TbC82 presenta los cuatro dominios WH típicos y una hélice súper enrollada (Fig. 34), cuya estructura tridimensional predicha es muy parecida a la del cristal de su ortólogo humano (Fig. 36) (Boissier *et al.*, 2015).

También se demostró mediante alineamientos que la secuencia y estructura de TbC82 están muy conservadas entre tripanosomátidos (Fig. 35). Esto resulta muy interesante, tomando en consideración que se estima que los géneros *Leshmania* y *Trypanosoma* divergieron, a partir de un ancestro común, hace entre 400 y 600 millones de años (Ghedini *et al.*, 2004). Esta divergencia es anterior a la aparición de los mamíferos, que se dio hace cerca de 165 millones de años. Esto indica que la subunidad C82 ya estaba presente en el ancestro común de los tripanosomátidos y que ha evolucionado de manera similar en estos organismos (Martínez-Calvillo *et al.*, 2010). Cabe señalar que el genoma de *L. major* posee una segunda copia del gen de C82. Sin embargo, éste podría corresponder a un pseudogen, ya que es más pequeño debido a la presencia de deleciones de algunas secuencias.

El alto costo energético de la biogénesis de tRNAs, el rRNA 5S y los snRNAs requiere una regulación estricta que en buena medida es controlada por la fosforilación de varios de los componentes de la maquinaria transcripcional, como el regulador negativo Maf1, las subunidades Brf1 y Bdp1 de TFIIB, y las subunidades C160 y C82 de la RNA POL III. En TbC82 fueron localizados varios probables sitios fosforilables (Fig. 37), los cuales se encuentran en el dominio WH1 en las posiciones S 38, S 44, S



80, S 81, S 92 y S 112. Cabe resaltar que al dominio WH1 se le atribuye la unión a DNA de cadena sencilla (ss-DNA), paso requerido para el inicio de la transcripción. Esto fue confirmado por experimentos de mutagénesis dirigida en los que los aminoácidos KK en la posición 51-52 de dicho dominio fueron sustituidos por EE, lo que llevó a la disminución de la interacción de C82 con el ss-DNA (Lefèvre *et al.*, 2011). En humano, C82 es fosforilado en los residuos S204 y S205 de acuerdo con la base de datos Phosphosite Plus (Grosstessner-Hain *et al.*, 2011; Hsu *et al.*, 2011), lo que abre la posibilidad de que TbC82 sea también fosforilado.

Las similitudes estructurales y funcionales que existen entre la subunidad C82 de RNA POL III, el factor de transcripción TFIIE de RNA POL II, y el factor TFE de arqueobacterias, sugieren que esta subunidad y los factores de transcripción tienen un origen común. También sugieren que la ahora subunidad específica C82 podría haber funcionado anteriormente como un factor de transcripción independiente, que a lo largo de la evolución se incorporó a la RNA POL III para hacer más eficiente el inicio de la transcripción de esta enzima (Carter y Drouin, 2009).

Con los ensayos RT-PCR se demostró que los niveles del mRNA de TbC82 disminuyen claramente al aplicar doxiciclina por diferentes tiempos (0-96 hrs) (Fig. 41). Esto significa que en los parásitos *knock-down* está funcionando eficientemente el sistema de RNAi, produciéndose el RNA de doble cadena que induce la degradación del mRNA de TbC82. En concordancia con este resultado, el ensayo de Western blot demostró que la proteína TbC82 fue degradada después de adicionar doxiciclina, observándose una disminución del 70% a los 4 días de inducción (Fig. 43). Esta reducción en la cantidad de TbC82 ocasionó una disminución en el crecimiento y la eventual muerte de los cultivos *knock-down*. De esta manera, nuestros resultados en conjunto demuestran que TbC82 es esencial para la viabilidad celular de formas procíclicas de *T. brucei*.

La ausencia de TbC82 produciría una RNA POL III incompleta y no funcional en los cultivos inducidos con doxiciclina, lo que generaría la falta de tRNAs, 5S rRNA, snRNAs y otras moléculas de RNA sintetizadas por la RNA POL III. La carencia de



estas moléculas de RNA impediría procesos básicos y fundamentales de la célula, como la traducción de proteínas y el procesamiento de los mRNAs, lo que conduciría a la muerte celular.

Otro aspecto a considerar es que la ausencia de la subunidad TbC82 afectaría la biogénesis de la RNA POL III, ya que el heterotrímero C82/C34/C31 es pre-ensamblado en el citoplasma y unido al resto de la enzima para su posterior importación al núcleo. Así, al no estar presente C82, la RNA POL III no podría importarse al núcleo. En humano, se reportó que la eliminación de cualquier subunidad de la RNA POL II tiene como consecuencia la acumulación citoplasmática de Rpb1, lo que sugiere que la RNA POL II debe estar ensamblada completamente para su importación nuclear (Boulon *et al.*, 2010). Se esperaría una situación similar para la RNA POL III (Wild y Cramer 2012).

En levadura también se ha reportado que C82 es esencial para la viabilidad celular. Se ha propuesto que la falta de C82 evita la incorporación de la subunidad Brf1 de TFIIIB al complejo de preinicio, pues el dominio WH3 de C82 interactúa directamente con Brf1. La falta del complejo de preinicio completo impide la transcripción de los genes dependientes de la RNA POL III, lo que induce la muerte celular en *S. cerevisiae* (Khoo *et al.*, 2017).

En ensayos *knock-down* realizados con la subunidad Brf1 de TFIIIB en *T. brucei* se observó un efecto similar, ya que la eliminación de Brf1 provocó la muerte celular. En ese trabajo se demostró además, mediante ensayos de run-on nuclear, que la inducción con doxiciclina provocó la disminución de los niveles de los RNAs sintetizadas por la RNA POL III (Vélez-Ramírez *et al.*, 2015). Un efecto a la inversa se encontró con la supresión del regulador negativo de la RNA POL III Maf1 en cultivos *knock-down* de *T. brucei*, ya que la inhibición de la producción de la proteína Maf1 ocasionó un aumento de la actividad de la RNA POL III, debido a que Maf1 actúa como un regulador negativo (Romero-Meza *et al.*, 2015).



Los ensayos de inmunofluorescencia revelaron que TbC82 se localiza en el núcleo celular (Fig. 44). Cabe destacar que no se encontró ningún antecedente de la localización celular de la proteína C82 en otras especies. No obstante, la subunidad C128 se localizó también dentro del organelo nuclear en *S. cerevisiae* (Haeusler y Engelke, 2006).



6. Conclusiones

La subunidad TbC82 presenta las secuencias características de los ortólogos de otras especies: cuatro dominios WH y un dominio CC. Las estructuras secundaria y terciaria predichas para TbC82 son muy similares a las reportadas para C82 de humano. TbC82 se localiza en el núcleo celular. En los cultivos *knock-down*, la abundancia del mRNA y la proteína TbC82 disminuyó significativamente al inducir la expresión de un RNAi dirigido contra el mRNA de esta proteína con doxiciclina, lo que a su vez provocó la muerte celular. Estos resultados demuestran que la subunidad C82 en *T. brucei* es esencial para el crecimiento de formas procíclicas del parásito.



7. Referencias

Abascal-Palacios, G., Ramsay, E. P., Beuron, F., Morris, E., Vannini, A. (2018). Structural basis of RNA polymerase III transcription initiation. *Nature*, 553(7688), 301–306. doi:10.1038/nature25441

Aksoy, S., Caccone, A., Galvani, A. P., Okedi, L. M. (2013). *Glossina fuscipes* populations provide insights for human African trypanosomiasis transmission in Uganda. *Trends in Parasitology*, 29(8), 394–406. doi:10.1016/j.pt.2013.06.005

Alberts, B., Alexander J., Julian L., Martin R., Keith R., Peter W. (2014). *Molecular Biology of the Cell*. New York: Garland Science.

Arimbasseri, A., Rijal, K., Maraia, R. (2014). Comparative overview of RNA polymerase II and III transcription, cycles with focus on RNA polymerase III termination and reinitiation. *Transcription*. 5(1) doi:10.4161/trns.27369

Arimbasseri, A. G., Maraia, R. J. (2016). RNA Polymerase III Advances: Structural and tRNA Functional Views. *Trends in Biochemical Sciences*, 41(6), 546–559. doi:10.1016/j.tibs.2016.03.003

Baldauf S, Roger A, Wenk-Siefert I, Doolittle W. (2000). A kingdom-level phylogeny of eukaryotes based on combined protein data. *Science*, 290(5493),972-977.

Berriman, M., Ghedin E., Hertz C., Blandin G., Renaud H. , Bartholomeu, et al., El-Sayed N. (2005). The genome of the African trypanosome *Trypanosoma brucei*. *Science* 309, 416–422.

Baldauf S, A Roger, I. Wenk-Siefert, W. Doolittle. (2000). A Kingdom-Level Phylogeny of Eukaryotes Based on Combined Protein Data. *Science* Vol. 290, Issue 5493, pp. 972-977 DOI:10.1126/science.290.5493.972



Boada-Sucre, A., Rossi Spadafora, M., Tavares-Marques, L., Finol, H. & Reyna-Bello, A. (2016). Trypanosoma vivax Adhesion to Red Blood Cells in Experimentally Infected Sheep. *Pathology Research International*, 2016, pp.1-9.

Bottieau, E., Clerinx, J. (2019). Human African Trypanosomiasis. *Infectious Disease Clinics of North America*, 33(1), 61–77. doi:10.1016/j.idc.2018.10.003.

Boulon, S., Pradet-Balade, B., Verheggen, C., Molle, D., Boireau, S., Georgieva, M., K. et al., Bertrand, E. (2010). HSP90 and Its R2TP/Prefoldin-like Cochaperone Are Involved in the Cytoplasmic Assembly of RNA Polymerase II. *Molecular Cell*, 39(6), 912–924. doi:10.1016/j.molcel.2010.08.023.

Bruce, D. (1895). Preliminary report on the tsetse-fly disease or nagana in Zululand. Durban: Bennet and Davis
<https://ia802602.us.archive.org/23/items/b21364655/b21364655.pdf>

Brun, I., Sentenac, A., & Werner, M. (1997). Dual role of the C34 subunit of RNA polymerase III in transcription initiation. *EMBO Journal*, 16(18), 5730–5741. doi: 10.1093/emboj/16.18.5730 .

Brun R., Blum J., Chappuis F., Burri C. (2010). Human African trypanosomiasis. *Lancet*. 375(9709): 148–159.

Boissier, F., Dumay-Odelot, H., Teichmann, M., Fribourg, S. (2015). Structural analysis of human RPC32 β –RPC62 complex. *Journal of Structural Biology*, 192(3), 313–319. doi:10.1016/j.jsb.2015.09.004.

Boeger, H., Bushnell, D. A., Davis, R., Griesenbeck, J., Lorch, Y., Strattan, J. S., et al., Kornberg, R. D. (2004). Structural basis of eukaryotic gene transcription. *FEBS Letters*, 579(4), 899–903. doi:10.1016/j.febslet.2004.11.027.



Boguta, M. (2013). Maf1, a general negative regulator of RNA polymerase III in yeast. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms*, 1829(3-4), 376–

Boucher, N., Wu, Y., Dumas, C., Dube, M., Sereno, D., Breton, M., Papadopoulou, B. (2002). A common mechanism of stage-regulated gene expression in *Leishmania* mediated by a conserved 3'-untranslated region element. *J Biol Chem* 277: 19511–19520.

Bushnell, D. A., Westover D., Davis E., Kornberg D. (2004). Structural Basis of Transcription: An RNA Polymerase II-TFIIB Cocystal at 4.5 Angstroms. *Science*, 303(5660), 983–988. doi:10.1126/science.1090838.

Büscher, P., Mertens, P., Leclipteux, T., Gilleman, Q., Jacquet, D., Mumba-Ngoyi, D., et al., Lejon, V. (2014). Sensitivity and specificity of HAT Sero-K-SeT, a rapid diagnostic test for serodiagnosis of sleeping sickness caused by *Trypanosoma brucei gambiense*: a case-control study. *The Lancet Global Health*, 2(6), e359–e363. doi:10.1016/s2214-109x(14)70203-7.

Büscher, P., Cecchi, G., Jamonneau, V., & Priotto, G. (2017). Human African trypanosomiasis. *Lancet*, 390, pp.2397–409. 384. doi:10.1016/j.bbagr.2012.11.004 z.

Chymkowitch, P., Nguéa P, A., Aanes, H., Robertson, J., Klungland, A., Enserink, J. M.(2017).TORC1- dependent sumoylation of Rcp82 promotes RNA polymerase III assembly and activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 114(5), 1034-1044. doi: 10.1073/pnas.1615093114.

Carter, R., Drouin, G. (2009). Structural differentiation of the three eukaryotic RNA polymerases. *Genomics*, 94(6), 388–396. doi:10.1016/j.ygeno.2009.08.011.

Clancy, S. (2008). DNA transcription. *Nature Education*, 1(1), 41.



Campbell, D. A., Thomas, S., Sturm, N. R. (2003). Transcription in kinetoplastid protozoa: why be normal?. *Microbes and Infection*, 5(13), 1231–1240. doi:10.1016/j.micinf.2003.09.005.

Cramer, P. (2001). Structural Basis of Transcription: RNA Polymerase II at 2.8 Angstrom Resolution. *Science*, 292(5523), 1863–1876. doi:10.1126/science.1059493.

Cramer, P. (2004). Structure and Function of RNA Polymerase II. *Proteins in Eukaryotic Transcription*, 1–42. doi:10.1016/s0065-3233(04)67001-x.

Cramer, P., Armache, K.-J., Baumli, S., Benkert, S., Brueckner, F., Buchen, C., et al., Vannini, A. (2008). Structure of Eukaryotic RNA Polymerases. *Annual Review of Biophysics*, 37(1), 337–352. doi:10.1146/annurev.biophys.37.032807.130008.

Carruthers V., Cross G. 1992. High-efficiency clonal growth of bloodstream- and insect-form *Trypanosoma brucei* on agarose plates. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 89; :1–4.

Crick, F. (1970). Central Dogma of Molecular Biology. *Nature*, 227(5258), 561–563. doi:10.1038/227561a0.

Cullen, D., Mocerino, M. (2017). A Brief Review of Drug Discovery Research for Human African Trypanosomiasis. *Current Medicinal Chemistry*, 24(7), 701–717. doi:10.2174/0929867324666170120160034.

Devaux, S., Lecordier, L., Uzureau, P., Walgraffe, D., Dierick, J.-F., Poelvoorde, P., Vanhamme, L. (2006). Characterization of RNA polymerase II subunits of *Trypanosoma brucei*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 148(1), 60–68. doi:10.1016/j.molbiopara.2006.02.020.



Das, A., Li, H., Liu, T., y Bellofatto, V. (2006). Biochemical characterization of *Trypanosoma brucei* RNA polymerase II. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 150(2), 201–210. doi:10.1016/j.molbiopara.2006.08.002.

Dieci, G., Sentenac, A. (1996). Facilitated Recycling Pathway for RNA Polymerase III. *Cell*, 84(2), 245–252. doi:10.1016/s0092-8674(00)80979-4.

Dumay-Odelot, H., Durrieu-Gaillard, S., Da Silva, D., Roeder, R. G., & Teichmann, M. (2010). Cell growth- and differentiation-dependent regulation of RNA polymerase III transcription. *Cell Cycle*, 9(18), 3711–3723. doi:10.4161/cc.9.18.13203.

El-Sayed N., Myler P., Blandin G., Berriman M., Crabtree J., Aggarwal G., Caler E., et. al, Hall N.(2005). Comparative Genomics of Trypanosomatid Parasitic Protozoa. *Science*, 309(5733), 404–409. doi:10.1126/science.1112181.

Engel, C., Sainsbury, S., Cheung, A. C., Kostrewa, D., Cramer, P. (2013). RNA polymerase I structure and transcription regulation. *Nature*, 502(7473), 650–655. doi:10.1038/nature12712.

Fernández-Tornero, C., Böttcher, B., Rashid, U. J., & Müller, C. W. (2011). Analyzing RNA polymerase III by electron cryomicroscopy. *RNA Biology*, 8(5), 760–765. doi:10.4161/rna.8.5.16021.

Fried, H., Kutay, U. (2003). Nucleocytoplasmic transport: taking an inventory. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 60(8), 1659–1688. doi:10.1007/s00018-003-3070-3.

Gallana, M., Ryser-Degiorgis, M.-P., Wahli, T., & Segner, H. (2013). Climate change and infectious diseases of wildlife: Altered interactions between pathogens, vectors and hosts. *Current Zoology*, 59(3), 427–437. doi:10.1093/czoolo/59.3.427.

Gajiwala, K. S., Burley, S. K. (2000). Winged helix proteins. *Current Opinion in Structural Biology*, 10(1), 110–116. doi:10.1016/s0959-440x(99)00057-3.

Geiduschek, E., Kassavetis, G. (2001). The RNA polymerase III transcription apparatus¹¹ Edited by P. E. Wright. *Journal of Molecular Biology*, 310(1), 1–26. doi:10.1006/jmbi.2001.4732.

Geiduschek, E. P., & Tocchini-Valentini, G. P. (1988). Transcription by RNA Polymerase III. *Annual Review of Biochemistry*, 57(1), 873–914. doi:10.1146/annurev.bi.57.070188.004301.

Ghedin, E., Bringaud, F., Peterson, J., Myler, P., Berriman, M., Ivens, A., El-Sayed, N. M. . (2004). Gene synteny and evolution of genome architecture in trypanosomatids. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 134(2), 183–191. doi:10.1016/j.molbiopara.2003.11.012.

Gluenz, E., Wheeler, R., Hughes, L., Vaughan, S. (2015). Scanning and three-dimensional electron microscopy methods for the study of *Trypanosoma brucei* and *Leishmania mexicana* flagella. *Methods in Cilia & Flagella*, pp.509-542.

Grosstessner-Hain, K., Hegemann, B., Novatchkova, M., Rameseder, J., Joughin, B. A., Hudecz, O., et al., Mechtler, K. (2011). Quantitative Phospho-proteomics to Investigate the Polo-like Kinase 1-Dependent Phospho-proteome. *Molecular & Cellular Proteomics*, 10(11), M111.008540. doi:10.1074/mcp.m111.008540.

Gouge, J., Guthertz, N., Kramm, K., Dergai, O., Abascal-Palacios, G., Satia, K., et al., Vannini, A. (2017). Molecular mechanisms of Bdp1 in TFIIB assembly and RNA polymerase III transcription initiation. *Nature Communications*, 8(1). doi:10.1038/s41467-017-00126-1.

Grummt, I. (2003). Life on a planet of its own: regulation of RNA polymerase I transcription in the nucleolus. *Genes & Development*, 17(14), 1691–1702. doi:10.1101/gad.1098503r.



Günzl, A., Bruderer, T., Laufer, G., Schimanski, B., Tu, L.-C., Chung, H.-M., et al., Lee, M. G.-S. (2003). RNA Polymerase I Transcribes Procyclin Genes and Variant Surface Glycoprotein Gene Expression Sites in *Trypanosoma brucei*. *Eukaryotic Cell*, 2(3), 542–551. doi:10.1128/ec.2.3.542-551.2003.

Haag, J. (1998). The molecular phylogeny of trypanosomes: evidence for an early divergence of the *Salivaria*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 91(1), 37–49. doi:10.1016/s0166-6851(97)00185-0.

Haeusler, R. A., Engelke, D. R. (2006). Spatial organization of transcription by RNA polymerase III. *Nucleic Acids Research*, 34(17), 4826–4836. doi:10.1093/nar/gkl656.

Harismendy, O. (2003). Genome-wide location of yeast RNA polymerase III transcription machinery. *The EMBO Journal*, 22(18), 4738–4747. doi:10.1093/emboj/cdg466.

Hardeland, U., & Hurt, E. (2006). Coordinated Nuclear Import of RNA Polymerase III Subunits. *Traffic*, 7(4), 465–473. doi:10.1111/j.1600-0854.2006.00399.x.

Hoffmann, N. A., Jakobi, A. J., Moreno-Morcillo, M., Glatt, S., Kosinski, J., Hagen, W. J. H., et al., Müller, C. W. (2015). Molecular structures of unbound and transcribing RNA polymerase III. *Nature*, 528(7581), 231–236. doi:10.1038/nature16143.

Hoffmann, N. A., Jakobi, A. J., Vorländer, M. K., Sachse, C., Müller, C. W. (2016). Transcribing RNA polymerase III observed by electron cryomicroscopy. *The FEBS Journal*, 283(15), 2811–2819. doi:10.1111/febs.13732.

Hoffmann A., Jakobi A., Moreno-Morcillo M., Glatt S., Kosinski J., Hagen H., Sachse C.,



Khatter, H., Vorländer, M. K., & Müller, C. W. (2017). RNA polymerase I and III: similar yet unique. *Current Opinion in Structural Biology*, 47, 88–94. doi:10.1016/j.sbi.2017.05.008.

Hsu, P. P., Kang, S. A., Rameseder, J., Zhang, Y., Ottina, K. A., Lim, D., et al., Sabatini, D. M. (2011). The mTOR-Regulated Phosphoproteome Reveals a Mechanism of mTORC1-Mediated Inhibition of Growth Factor Signaling. *Science*, 332(6035), 1317–1322. doi:10.1126/science.1199498.

Kassavetis, G. A., Bardeleben, C., Kumar, A., Ramirez, E., Geiduschek, E. P. (1997). Domains of the Brf component of RNA polymerase III transcription factor IIIB (TFIIIB): functions in assembly of TFIIIB-DNA complexes and recruitment of RNA polymerase to the promoter. *Molecular and Cellular Biology*, 17(9), 5299–5306. doi:10.1128/mcb.17.9.5299.

Kaufer, A., Ellis, J., Stark, D., Barratt, J. (2017). The evolution of trypanosomatid taxonomy. *Parasites & Vectors*, 10(1), 2-17. doi:10.1186/s13071-017-2204-7.

Krebs, J. E., Lewin, B., Kilpatrick, S. T., Goldstein, E. S. (2014). *Lewin's genes XI*. Burlington, Mass: Jones & Bartlett Learning.

Kristjanson, P., Swallow, B., Rowlands, G. J., Kruska, R., de Leeuw, P. (1999). Measuring the costs of African animal trypanosomosis, the potential benefits of control and returns to research. *Agricultural Systems*, 59(1), 79–98. doi:10.1016/s0308-521x(98)00086-9.

Kornberg, R. (2007). The molecular basis of eukaryotic transcription. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(32), 12955–12961. doi:10.1073/pnas.0704138104.

Khoo, S.-K., Wu, C.-C., Lin, Y.-C., Chen, H.-T. (2017). The TFIIIE-related Rpc82 subunit of RNA polymerase III interacts with the TFIIIB-related transcription factor Brf1 and the



polymerase cleft for transcription initiation. *Nucleic Acids Research*, 46(3), 1157–1166. doi:10.1093/nar/gkx1179.

Lane, W. y Darst, S. (2019). Molecular Evolution of Multisubunit RNA Polymerases: Structural Analysis. *Journal of Molecular Biology*, 395(4), 686–704. doi:10.1016/j.jmb.2009.10.063.

Lane, L. A., Fernández-Tornero, C., Zhou, M., Morgner, N., Ptchelkine, D., Steuerwald, U., Robinson, C. V. (2011). Mass Spectrometry Reveals Stable Modules in holo and apo RNA Polymerases I and III. *Structure*, 19(1), 90–100. doi:10.1016/j.str.2010.11.009.

Lefèvre, S., Dumay-Odelot, H., El-Ayoubi, L., Budd, A., Legrand, P., Pinaud, N., Teichmann, M., Fribourg, S. (2011). Structure-function analysis of hRPC62 provides insights into RNA polymerase III transcription initiation. *Nature Structural & Molecular Biology*, 18(4), pp.516-516.

Leśniewska, E., Boguta, M. (2017). Novel layers of RNA polymerase III control affecting tRNA gene transcription in eukaryotes. *Open Biology*, 7(2). doi:10.1098/rsob.170001.

Lukeš, J., Butenko, A., Hashimi, H., Maslov, D., Votýpka, J., Yurchenko, V. (2018). Trypanosomatids Are Much More than Just Trypanosomes: Clues from the Expanded Family Tree. *Trends in Parasitology*, 34(6), 466–480. doi:10.1016/j.pt.2018.03.002

Losick, R., & Chamberlin, M. (1976). RNA polymerase. *Cold Spring Harbor Monograph Series* 6.

Maraia R., Arimbasseri A. (2015). Mechanism of Transcription Termination by RNA Polymerase III Utilizes a Non-template Strand Sequence-Specific Signal Element. *Mol Cell*. 2015; 58:1124–1132. [PubMed: 25959395].



Male, G., von Appen, A., Glatt, S., Taylor, N. M. I., Cristovao, M., Groetsch, H., et al., Müller, C. (2015). Architecture of TFIIIC and its role in RNA polymerase III pre-initiation complex assembly. *Nature Communications*, 6(1). doi:10.1038/ncomms8387.

Matthews, K. R.(2005). The developmental cell biology of *Trypanosoma brucei*. *J. Cell Sci.*118, 283-290.

Matsuzaki, H., Kassavetis, G. A., Gelduschek, E. P. (1994). Analysis of RNA Chain Elongation and Termination by *Saccharomyces cerevisiae* RNA Polymerase III. *Journal of Molecular Biology*, 235(4), 1173–1192. doi:10.1006/jmbi.1994.1072.

Meselson, M., Stahl, F. W. (1958). The replication of DNA in *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 44(7), 671–682. doi:10.1073/pnas.44.7.671.

Moreno-Campos R., Florencio-Martínez L., Nepomuceno-Mejía T., Rojas-Sánchez S., Vélez D., Padilla-Mejía N., Martínez-Calvillo S. (2016). Molecular characterization of 5S ribosomal RNA genes and transcripts in the protozoan parasite *Leishmania major*. *Parasitology*, 143(14), 1917–1929. doi:10.1017/s0031182016001712.

Martínez-Calvillo S., Saxena A., Green A., Leland A., Myler P. 2007. Characterization of the RNA polymerase II and III complexes in *Leishmania major*. *International Journal of Parasitology*. 37(5):491-502.

Martínez-Calvillo S., Vizuet-de-Rueda J., Florencio-Martínez, L., Manning-Cela R., Figueroa-Angulo, E. (2010). Gene expression in trypanosomatid parasites. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2010, 1-15.

Müller C. 2015. Molecular structures of unbound and transcribing RNA polymerase III. *Nature*. 528(7581): 231–236.



Nakaar, V., Günzl, A., Ullu, E., Tschudi, C. (1997). Structure of the *Trypanosoma brucei* U6 snRNA gene promoter. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 88(1-2), 13–23. doi:10.1016/s0166-6851(97)00078-9.

Nikitina, T. V., Tishchenko, L. I. (2005). RNA polymerase III transcription machinery: Structure and transcription regulation. *Molecular Biology*, 39(2), 161–172. doi:10.1007/s11008-005-0024-x.

Ofir-Birin., Regev-Rudzki .(2019). Extracellular vesicles in parasite survival. *Science*, 363(6429):817-818. doi: 10.1126/science.aau4666.

Padilla-Mejía, N. E., Florencio-Martínez, L. E., Moreno-Campos, R., Vizuet-de-Rueda, J. C., Cevallos, A. M., Hernández-Rivas, R., et al., Martínez-Calvillo, S. (2014). The Selenocysteine tRNA Gene in *Leishmania major* Is Transcribed by both RNA Polymerase II and RNA Polymerase III. *Eukaryotic Cell*, 14(3), 216–227. doi:10.1128/ec.00239-14.

Qu Z., & Adelson D. (2012). Evolutionary conservation and functional roles of ncRNA. *Frontiers in Genetics*, 3. doi:10.3389/fgene.2012.00205.

Quijada L., Guerra-Giraldez C., Drozd M., Hartmann C., Irmer H., Ben-Dov C., Cristodero M, Ding M., Clayton C.(2002). Expression of the human RNA-binding protein HuR in *Trypanosoma brucei* increases the abundance of mRNAs containing AU-rich regulatory elements. *Nucleic Acids Research*, 30(20), 4414–4424. doi:10.1093/nar/gkf577.

Roeder, R.G., Rutter, W.J. (1969). Multiple forms of DNA-dependent RNA polymerase in eukaryotic organisms. *Nature* 224, 234–237.

Roeder, R.G., Rutter, W.J. (1970). Specific nucleolar and nucleoplasmic RNA polymerases. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 65, 675–682.



Rojas-Sánchez, S., Figueroa-Angulo, E., Moreno-Campos, R., Florencio-Martínez, L. E., Manning-Cela, R. G., Martínez-Calvillo, S. (2016). Transcription of *Leishmania major* U2 small nuclear RNA gene is directed by extragenic sequences located within a tRNA-like and a tRNA-Ala gene. *Parasites & Vectors*, 9(1). doi:10.1186/s13071-016-1682-3.

Romero-Meza, G., Vélez-Ramírez, D. E., Florencio-Martínez, L. E., Román-Carraro, F. C., Manning-Cela, R., Hernández-Rivas, R., Martínez-Calvillo, S. (2016). Maf1 is a negative regulator of transcription in *Trypanosoma brucei*. *Molecular Microbiology*, 103(3), 452–468. doi:10.1111/mmi.13568.

Saito, R.M., Elgort, M.G. Campbell, D.A. (1994). A conserved upstream element is essential for transcription of the *Leishmania tarentolae* mini-exon gene. *EMBO J.* 13, 5460–5469.

Simarro, P., Franco, J., Diarra, A., Jannin, J. (2014). Epidemiology of human African trypanosomiasis. *Clinical Epidemiology*, 257. doi:10.2147/clep.s39728.

Schneider, D. A. (2012). RNA polymerase I activity is regulated at multiple steps in the transcription cycle: Recent insights into factors that influence transcription elongation. *Gene*, 493(2), 176–184. doi:10.1016/j.gene.2011.08.006

Schanen, B. C., Li, X. (2011). Transcriptional regulation of mammalian miRNA genes. *Genomics*, 97(1), 1–6. doi:10.1016/j.ygeno.2010.10.005.

Schramm, L., Hernández N. (2002). Recruitment of RNA polymerase III to its target promoters. *Genes & Development*, 16(20), 2593–2620.

Smale, S. T., Kadonaga, J. T. (2003). The RNA Polymerase II Core Promoter. *Annual Review of Biochemistry*, 72(1), 449–479. doi:10.1146/annurev.biochem.72.121801.161520.



Srivastava, A., Badjatia, N., Lee, J. H., Hao, B., Günzl, A. (2017). An RNA polymerase II-associated TFIIIF-like complex is indispensable for SL RNA gene transcription in *Trypanosoma brucei*. *Nucleic Acids Research*, 46(4), 1695–1709. doi:10.1093/nar/gkx1198.

Stuart K., Brun R., Croft S., Fairlamb A., Gurtler R., McKerrow J., Reed S., Tarleton, R. (2008). Kinetoplastid related protozoan pathogens, different diseases. *Journal of Clinical Investigation*. 118(4), 1301-1310. doi: 10.1172/JCI33945.

Sutherland, C., Stone, C., Steinmann, P., Tanner, M., Tediosi, F. (2017). Seeing beyond 2020: an economic evaluation of contemporary and emerging strategies for elimination of *Trypanosoma brucei gambiense*. *The Lancet Global Health*, 5(1), 69-79. doi: 10.1016/S2214-109X(16)30237-6.

Tait, A., Buchanan, N., Hide, G., Turner, C. M. R. (1996). Self-fertilisation in *Trypanosoma brucei*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 76(1-2), 31–42. doi:10.1016/0166-6851(95)02528-6.

Thuillier, V., Stettler, S., Sentenac, A., Thuriaux, P., Werner, M. (1995). A mutation in the C31 subunit of *Saccharomyces cerevisiae* RNA polymerase III affects transcription initiation. *The EMBO Journal*, 14(2), 351–359. doi:10.1002/j.1460-2075.1995.tb07009.x.

Vaughan, S., Gull, K. (2008). The structural mechanics of cell division in *Trypanosoma brucei*. *Biochemical Society Transactions*, 36(3), 421–424. doi:10.1042/bst0360421.

Vannini, A., Cramer P., (2012). Conservation between the RNA Polymerase I, II, and III Transcription Initiation Machineries. *Molecular Cell*, 45(4), 439–446. doi:10.1016/j.molcel.2012.01.023.



Vickerman, K. (1994). The evolutionary expansion of the trypanosomatid flagellates. *International Journal for Parasitology*, 24(8), 1317–1331. doi:10.1016/0020-7519(94)90198-8.

Vanhamme, L., Pays, E.(1995) “Control of gene expression in trypanosomes,” *Microbiological Reviews*, vol. 59, no. 2, pp. 223–240.

Vélez-Ramírez D., Florencio L., Romero G., Rojas S., Moreno R., Arroyo R., Ortega J., Manning-Cela R., Martínez-Calvillo S. (2015). BRF1, a subunit of RNA polymerase III transcription factor TFIIIB, is essential for cell growth of *Trypanosoma brucei*. *Parasitology*. 142(13):1563-1573.

Xu, J., Lahiri, I., Wang, W., Wier, A., Cianfrocco, M. A., Chong, J., ... Wang, D. (2017). Structural basis for the initiation of eukaryotic transcription-coupled DNA repair. *Nature*. doi:10.1038/nature24658

Wei, Y.-Y., & Chen, H.-T. (2017). Functions of the TFIIIE-Related Tandem Winged-Helix Domain of Rpc34 in RNA Polymerase III Initiation and Elongation. *Molecular and Cellular Biology*, 38(4). doi:10.1128/mcb.00105-17

Welburn, J. P. I., Vleugel, M., Liu, D., Yates, J. R., Lampson, M. A., Fukagawa, T., & Cheeseman, I. M. (2010). Aurora B Phosphorylates Spatially Distinct Targets to Differentially Regulate the Kinetochores-Microtubule Interface. *Molecular Cell*, 38(3), 383–392. doi:10.1016/j.molcel.2010.02.034.

Werner, M., Chaussivert, N., Willis, I.M. Sentenac, A.(2010) Interaction between a complex of RNA polymerase III subunits and the 70-kDa component of transcription factor III B. *J. Biol. Chem.* 268, 20721–20724.

Werner, F., Grohmann, D. (2011). Evolution of multisubunit RNA polymerases in the three domains of life. *Nature Reviews Microbiology*, 9(2), 85–98. doi:10.1038/nrmicro2507.

Wild T. y Cramer P. (2012).Biogenesis of multisubunits of RNA polymerases. *Cell Press*, 37(3): 99-104.

Wirtz L., Lorenz P., Clayton C. 1997. Vectors for inducible expression of toxic gene products in bloodstream and procyclic *Trypanosoma brucei*. *Molecular & Biochemical Parasitology*. 85(1):99-112.

Willis, I M. (1993). RNA polymerase III. Genes, factors and transcriptional specificity. *Eur. J. Biochem* 212, 1-11.

Wang, Z., Roeder, R.G. (1997). Three human RNA polymerase III-specific subunits forma subcomplex with a selective function in specific transcription initiation. *Genes Dev.* 11, 1315–1326

Wu, C.-C., Herzog, F., Jennebach, S., Lin, Y.-C., Pai, C.-Y., Aebersold, R., et al., Chen, H.-T. (2012). RNA polymerase III subunit architecture and implications for open promoter complex formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(47), 19232–19237. doi:10.1073/pnas.1211665109.