



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

**Estudio molecular de la subunidad Tau131 del factor de transcripción TFIIC
en *Leishmania major***

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

GINO STEFANO VILLA DELAVEQUIA

TUTOR(A) PRINCIPAL DE TESIS: DR. SANTIAGO MARTÍNEZ CALVILLO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA, UNAM

COMITÉ TUTOR: DRA. REBECA GEORGINA MANNING CELA

CINVESTAV, IPN

DRA. MARITZA OMAÑA MOLINA

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA, UNAM

LOS REYES IZTACALA, TLALNEPANTLA, ESTADO DE MÉXICO, FEBRERO 2024



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

Estudio molecular de la subunidad Tau131 del factor de transcripción TFIIC
en *Leishmania major*

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

GINO STEFANO VILLA DELAVEQUIA

TUTOR(A) PRINCIPAL DE TESIS: DR. SANTIAGO MARTÍNEZ CALVILLO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA, UNAM

COMITÉ TUTOR: DRA. REBECA GEORGINA MANNING CELA

CINVESTAV, IPN

DRA. MARITZA OMAÑA MOLINA

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA, UNAM

LOS REYES IZTACALA, TLALNEPANTLA, ESTADO DE MÉXICO, FEBRERO 2024

COORDINACIÓN GENERAL DE ESTUDIOS DE POSGRADO
COORDINACIÓN DEL POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA
OFICIO: CGEP/CPCB/ FESI /0929/2023
ASUNTO: Oficio de Jurado

M. en C. Ivonne Ramírez Wence
Directora General de Administración Escolar, UNAM
P r e s e n t e

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Subcomité de Biología Experimental del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día **21 de agosto de 2023** se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** en el campo de conocimiento de - **Biología Experimental** del estudiante **VILLA DELAVEQUIA GINO STEFANO** con número de cuenta **415118031** con la tesis titulada **“Estudio molecular de la subunidad Tau131 del factor de transcripción TFIIC en *Leishmania major*”**, realizada bajo la dirección del **DR. SANTIAGO MARTÍNEZ CALVILLO**, quedando integrado de la siguiente manera:

Presidente: DRA. ROSA LAURA CAMARENA MEJÍA
Vocal: DR. TOMÁS NEPOMUCENO MEJÍA
Vocal: DRA. ANA MARÍA CEVALLOS GAOS
Vocal: DRA. MARÍA ROSALÍA LIRA CARMONA
Secretario: DRA. REBECA GEORGINA MANNIG CELA

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”
Ciudad Universitaria, Cd. Mx., a 23 de noviembre de 2023

COORDINADOR DEL PROGRAMA



DR. ADOLFO GERARDO NAVARRO SIGÜENZA

c. c. p. Expediente del alumno

AGNS/GGM/EARR/ggm



Agradecimientos institucionales

Al Posgrado en Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Autónoma de México

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, por haberme otorgado la beca nacional para realizar los estudios de posgrado.

Al PAPIIT (DGAPA, UNAM) por financiar este proyecto de investigación con los donativos IN207118 e IN214221 otorgados al Dr. Santiago Martínez Calvillo.

Al Dr. Santiago Martínez Calvillo por abrirme las puertas de su grupo de trabajo, por sus enseñanzas y apoyo incondicional durante la dirección de este trabajo.

A los miembros del Comité Tutor, la Dra. Rebeca Manning Cela y la Dra. Maritza Omaña Molina, por sus sugerencias y enriquecedoras aportaciones.

Agradecimientos a título personal

A todo el equipo del laboratorio 1 de la UBIMED, Andrés, Fabiola, Luis Alberto, Dr. Tomás, por sus consejos y pláticas que siempre fueron constructivas.

Al Biol. Luis Enrique Florencio Martínez por el apoyo técnico, toda la enseñanza y disciplina durante la realización de la fase experimental del proyecto que sin duda me hicieron mejorar.

A mi familia que su apoyo siempre ha estado presente y me han impulsado a nunca detenerme.

A Claudia por ser una guía y apoyo en muchos aspectos de mi vida y siempre me ha ayudado a perseguir mis sueños.

A mis amigos Aldo, Brito, Fernando entre otros amigos que han hecho que los momentos difíciles sean solo pasajeros y los mejores momentos sean inolvidables.

Índice

.....	i
1. Introducción.....	3
1.1. Familia Trypanosomatidae.....	3
1.1.1. <i>Leishmania</i>	7
1.1.1.1. Ciclo de vida de <i>Leishmania</i>	8
1.1.2. Leishmaniasis.....	9
1.2. Transcripción en eucariontes.....	11
1.2.1 RNA polimerasa I.....	13
1.2.2 RNA Polimerasa II.....	14
1.2.3 RNA Polimerasa III.....	17
1.2.3.1 Promotores de la RNA Pol III.....	19
1.2.3.2 Factores de transcripción de la RNA Pol III.....	20
1.2.3.3 Función de TFIIIC.....	22
1.2.4 Transcripción en Tripanosomátidos.....	26
1.2.4.1 RNA Polimerasa III.....	27
1.3. Antecedentes.....	28
2. Objetivos.....	30
2.1. Objetivo general.....	30
2.2. Objetivos Particulares.....	30
3. Estrategia Experimental.....	31
4. Metodología.....	32
4.1. Análisis <i>in silico</i>	32
4.2. Amplificación por PCR.....	32
4.3. Clonación en el vector pGEM-T Easy.....	33
4.4. Transformación de células competentes.....	34
4.5. Generación de vectores de sobre-expresión.....	34
4.6. Cultivo de <i>L. major</i>	35
4.7. Transfección de <i>L. major</i> por electroporación.....	36
4.8. Obtención de clonas celulares.....	36

4.9. Análisis de la sobre-expresión de LmTau131.....	37
4.9.1.Extracción de RNA Total	37
4.9.2.Síntesis de cDNA.....	37
4.9.3.PCR en tiempo real	37
5. Resultados	39
5.1. Análisis de la secuencia LmTau131	39
5.2. Clonación en el vector pGEM-T Easy	44
5.3. Subclonación de LmTau131 en los vectores de sobre-expresión.....	47
5.4. Transfección de <i>L. major</i>	52
5.5. Obtención de clonas celulares.....	56
5.6. Análisis de la sobre-expresión.....	58
6. Discusión	64
7. Logros y conclusiones.....	70
8. Referencias bibliográficas.....	70

Lista de figuras y tablas

- Figura 1. Diagrama de las distintas morfologías de los tripanosomátidos.
- Figura 2. Esquema de la morfología de los tripanosomátidos.
- Figura 3. Estadios morfológicos principales de *Leishmania*.
- Figura 4. Ciclo de vida de *Leishmania*.
- Figura 5. Formas clínicas de leishmaniasis.
- Figura 6. Estructura tridimensional de la RNA Pol I.
- Figura 7. Ciclo de transcripción de la RNA Pol II.
- Figura 8. Vista superior y frontal de la RNA Pol III.
- Figura 9. Arquitectura de los promotores para la RNA Pol III.
- Figura 10. Esquema del PIC de la transcripción de la RNA Pol III.
- Figura 11. Subunidades de TFIIC y su unión al DNA.
- Figura 12. Motivo canónico hélice-giro-hélice de un tetratricopéptido.
- Figura 13. Imagen cristalográfica de TauA de levadura.
- Figura 14. Transcripción policistrónica, *trans-splicing* y poliadenilación en tripanosomátidos.
- Figura 15. Amplicón de LmTau131.
- Figura 16. Resultados de HHPred.
- Figura 17. Resultados de TPRPred.
- Figura 18. Alineamiento de secuencias de Tau131 en *L. major* y *Saccharomyces cerevisiae*.
- Figura 19. Estructura tridimensional de Tau131.
- Figura 20. Amplificación por PCR del gen LmTau131 con la enzima Kapa HiFi DNA polimerasa.
- Figura 21. PCR de colonia.
- Figura 22. Extracción de DNA plasmídico de colonias por miniprep.
- Figura 23. Mapa del vector pGE-LmTau131SE.
- Figura 24. Digestión de pGE-Tau131SE con *Bam*HI.

Figura 25. Digestión de pGE-LmTau131SE/*Bam*HI con *Sca*I.

Figura 26. Purificación de LmTau131.

Figura 27. Vectores pNBUC y pLMRIB purificados de gel.

Figura 28. Análisis de restricción del vector pN-LmTau131 con *Bam*HI.

Figura 29. Análisis de restricción del vector pLMRIB-LmTau131 con *Bam*HI.

Figura 30. Mapa de los vectores pN-LmTau131 y pL-LmTau131.

Figura 31. Análisis del DNAg extraído de células de *L. major* transfectadas

Figura 32. Sitio de unión de oligonucleótidos en vectores pN-LmTau131 y pL-LmTau131.

Figura 33. Análisis de PCR de poblaciones de *L. major*.

Figura 34. Caracterización de poblaciones de *L. major* transfectadas con pN-Tau131 y pL-Tau131.

Figura 35. Integridad de DNAg de clonas celulares de *L. major*.

Figura 36. Análisis de clonas celulares.

Figura 37. RNA total aislado de *L. major*.

Figura 38. PCR de RNA total tratado con DNAsa I.

Figura 39. Expresión relativa de LmTau131 en las líneas celulares pN-LmTau131 y pL-LmTau131.

Figura 40. Optimización de condiciones de PCR

Figura 41. Expresión relativa de genes dependientes de la RNA Pol III en las líneas que sobre-expresan a LmTau131.

Figura 42. Crecimiento celular.

Tabla 1. Oligonucleótidos empleados para la amplificación de LmTau131.

Tabla 2. Condiciones de PCR para la amplificación de LmTau131.

Tabla 3. Lista de oligonucleótidos empleados para reacciones de PCR cuantitativa.

Tabla 4. Oligonucleótidos utilizados para caracterizar clonas de *L. major*.

Resumen

El género *Leishmania* constituye un grupo de parásitos flagelados que pertenece a la familia Trypanosomatidae. En el humano produce un grupo de enfermedades conocidas como leishmaniasis, que afectan a millones de personas en todo el mundo. Además de su importancia médica, estos parásitos son relevantes por presentar mecanismos de transcripción atípicos. En nuestro laboratorio nos interesa el estudio de la transcripción de la RNA Polimerasa III (RNA Pol III), encargada de sintetizar los RNAt y el RNAr 5S, entre otras moléculas esenciales para la viabilidad celular. El factor de transcripción TFIIIC es necesario para el reclutamiento de la RNA Pol III a los promotores. En este estudio, se caracterizó la subunidad Tau131 de TFIIIC de *Leishmania major* (LmTau131). Mediante análisis *in silico* se determinó que la secuencia de LmTau131 está constituida principalmente por repetidos de tetratricopéptidos, característicos de los ortólogos de Tau131. Además, se encontró que la estructura secundaria y tridimensional de LmTau131 tiene una gran similitud con la de Tau131 de levadura. Se generaron líneas celulares de parásitos que sobre-expresan a LmTau131. Para ello se amplificó el gen de LmTau131 mediante PCR y se clonó en los vectores pNBUC y pLMRIB. Los plásmidos generados se electroporaron en células de *L. major* y se obtuvieron poblaciones transfectadas estables. A partir de las poblaciones se generaron clonas celulares, las cuales se analizaron mediante RT-qPCR para determinar la abundancia del RNAm de LmTau131. Las clonas celulares generadas mostraron un aumento de entre 32 y 60 veces en la abundancia de los transcritos de LmTau131, en relación con el cultivo silvestre. Con esto se confirmó la sobre-expresión de LmTau131 a nivel de RNAm. También se analizó la abundancia relativa de algunos transcritos dependientes de la RNA Pol III, observándose un incremento en la línea pLMRIB, pero una ligera disminución con la línea pNBUC. Mediante curvas de crecimiento se determinó que el crecimiento celular no se afectó por la sobre-expresión de LmTau131. Los cultivos que sobre-expresan aquí generados ayudarán a determinar algunas de las funciones que realiza Tau131 en *Leishmania*.

Abstract

The genus *Leishmania* constitutes a group of flagellated parasites that belongs to the Trypanosomatidae family. In humans it produces a group of diseases known as leishmaniasis, which affect millions of people worldwide. In addition to their medical importance, these parasites are relevant for presenting atypical transcription mechanisms. In our laboratory, we are interested in the study of the transcription of RNA Polymerase III (RNA Pol III), responsible for synthesizing tRNAs and 5S rRNA, among other molecules essential for cell viability. The transcription factor TFIIIC is necessary for the recruitment of RNA Pol III to promoters. In this study, the Tau131 subunit of TFIIIC from *Leishmania major* (LmTau131) was characterized. Through *in silico* analysis, it was determined that the LmTau131 sequence is mainly made up of tetratricopeptide repeats, characteristic of Tau131 orthologs. Furthermore, the secondary and three-dimensional structure of LmTau131 was found to have high similarity to yeast Tau131. Parasite cell lines that overexpress LmTau131 were generated. To do this, the LmTau131 gene was amplified by PCR and cloned into the pNBUC and pLMRIB vectors. The generated plasmids were electroporated into *L. major* cells and stable transfected populations were obtained. Cell clones were generated from the populations, which were analyzed by RT-qPCR to determine the abundance of LmTau131 mRNA. The cell clones generated showed a 32- to 60-fold increase in the abundance of LmTau131 transcripts, relative to the wild type. This confirmed the overexpression of LmTau131 at the mRNA level. The relative abundance of some RNA Pol III-dependent transcripts was also analyzed, observing an increase in the pLMRIB line, but a slight decrease with the pNBUC line. Using growth curves, cell growth was determined to not be affected by the overexpression of LmTau131. The overexpressing cultures generated here will help determine some of the functions that Tau131 performs in *Leishmania*.

1. Introducción

1.1. Familia Trypanosomatidae

Los miembros de la familia Trypanosomatidae (conocidos comúnmente como los tripanosomátidos) son un grupo de parásitos protozoos que se caracterizan por la presencia de un solo flagelo (Fig. 1). Esta familia toma su importancia principalmente de dos géneros, *Trypanosoma* y *Leishmania*, que son patógenos del ser humano. Su ciclo de vida es digenético obligado y son transmitidos por insectos hematófagos (Kaufer *et. al.*, 2017). Las enfermedades que transmiten estos tripanosomátidos son la enfermedad de Chagas (*Trypanosoma cruzi*), enfermedad del sueño (*Trypanosoma brucei*) y la leishmaniasis (*Leishmania* spp.) (Nussbaum *et al.*, 2010). Estos padecimientos son considerados enfermedades desatendidas y constituyen un serio problema de salud, principalmente en países tropicales en vías de desarrollo.

En los tripanosomátidos se pueden identificar cuatro estadios morfológicos de desarrollo principales a lo largo de su ciclo de vida: tripomastigote, promastigote, epimastigote y amastigote (Fig. 1). En los tripomastigotes, el cinetoplasto se encuentra en una posición posterior al núcleo, cerca de la porción terminal del cuerpo celular. El flagelo emerge de la parte posterior y recorre el cuerpo entero del parásito, adherido a la superficie de la célula, formando una membrana ondulante, hasta que alcanza la parte anterior donde es libre. En los epimastigotes, el cinetoplasto se localiza en la región central del cuerpo, en la parte anterior al núcleo. El flagelo emerge de la zona central del parásito y forma una pequeña membrana ondulada. Los epimastigotes tienen forma alargada (20-40 μm de largo, 2-5 μm de ancho) y son menos móviles que los tripomastigotes. Los promastigotes son de forma delgada elipsoidal. En la parte anterior del núcleo se encuentra el cinetoplasto que, junto con el origen del flagelo, definen la región anterior del parásito. Los amastigotes son similares en la posición de los organelos a los promastigotes, pero éstos son de forma redonda a ovalada, además carecen de flagelo libre, este

organelo no se extiende más allá del límite celular (Sandri *et al.*, 2021; Sunter & Gull, 2017).

Durante la división celular, el flagelo de los tripanosomátidos permanece intacto y se genera un flagelo nuevo junto al viejo. El flagelo es importante para la patogenicidad del parásito. También, es fundamental para la motilidad en la sangre de los mamíferos y en el insecto, además realiza funciones claves en la morfogénesis celular (Gluezn *et al.*, 2015). Recientemente, ha tomado importancia el estudio de la bolsa flagelar, pues se ha visto que es una parte fundamental del sistema de endomembranas y tiene muchas funciones, incluida la adquisición de nutrientes, la secreción de proteínas y la evasión inmunitaria (Halliday *et al.*, 2021).

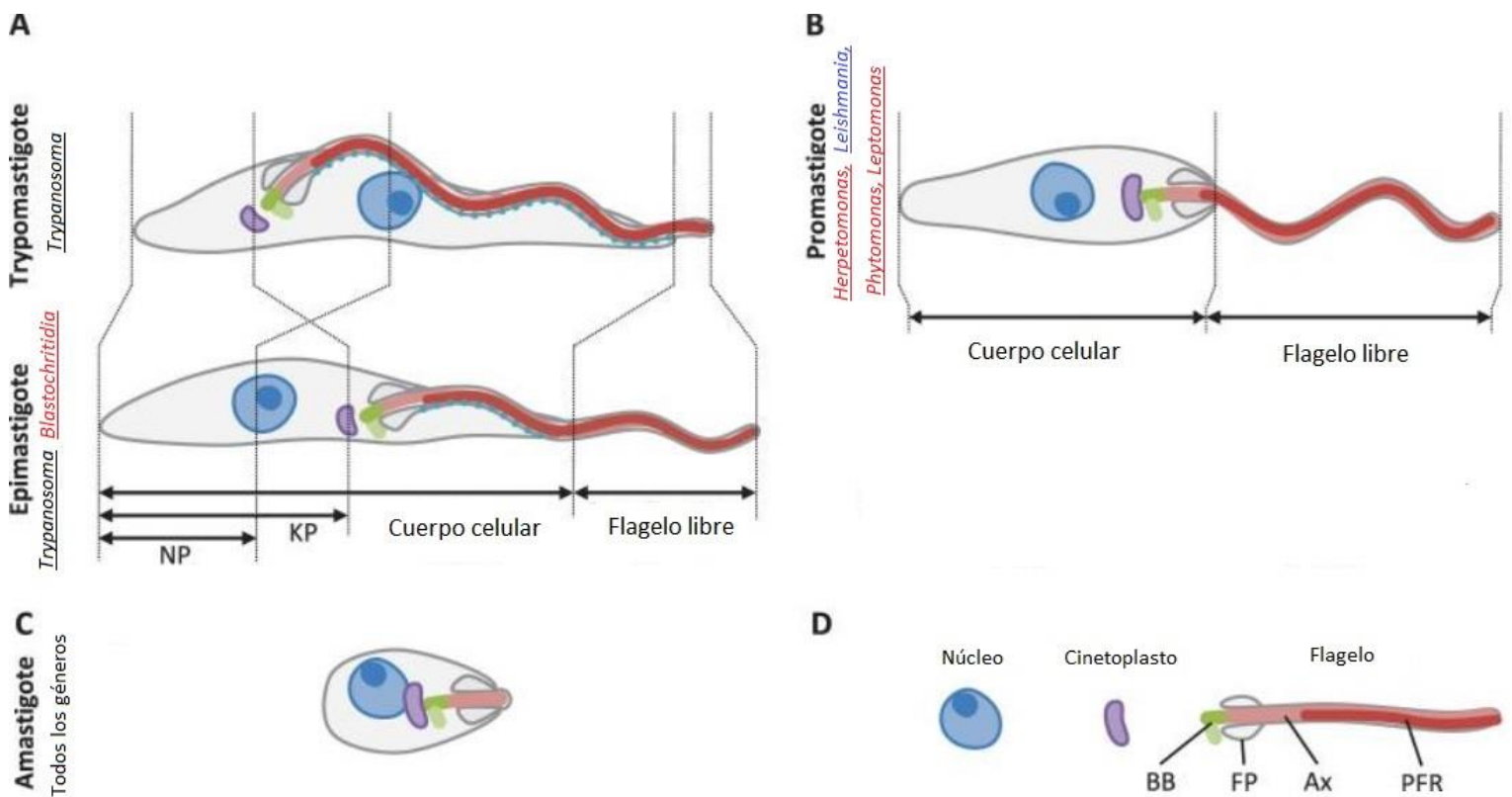


Figura 1. Diagrama de las distintas morfologías de los tripanosomátidos. A. Células con el flagelo lateralmente adherido al cuerpo celular (tripomastigote y epimastigote). B. Promastigote, con flagelo libre (sin unión lateral del flagelo al cuerpo celular que se extiende más allá del cuello de la bolsa flagelar). Se indican las métricas utilizadas para registrar la morfología celular: longitud del cuerpo

celular, longitud del flagelo libre, distancia cinetoplasto-posterior (KP) y distancia núcleo-posterior (NP). C. Amastigote, que no tiene un flagelo. D. Se indican las estructuras asociadas con el flagelo: cuerpo basal (BB), bolsa flagelar (FP), axonema (Ax) y barra paraflagelar (PFR). Modificado de Wheeler *et al.*, 2013.

Otra particularidad de los tripanosomátidos es la matriz subpelicular o microtúbulos subpeliculares que recubren todo el cuerpo del parásito y definen su forma (Fig. 2). Además, tienen un papel importante en la locomoción, ya que muestran un alto grado de plasticidad en su capacidad para moldearse en forma de ondas celulares durante la motilidad (Sandri *et al.*, 2021; Sinclair & de Graffenried, 2019).

Este grupo de organismos posee solamente una mitocondria que se extiende a lo largo de toda la célula (Fig. 2). El DNA mitocondrial, llamado cinetoplasto o DNAk, consta de una red entrelazada de aproximadamente 50 maxicírculos (con un tamaño de 20-25 kb) y de cerca de 5000 minicírculos (1 kb) (Gibson *et al.*, 2011). Esto contrasta marcadamente con el DNA mitocondrial que se encuentra en las células metazoarias, que normalmente existe como un solo círculo de DNA. Los maxicírculos codifican los genes mitocondriales habituales, por ejemplo, rRNAs mitocondriales, así como subunidades de los complejos de la cadena de transporte de electrones. De manera interesante estos pre-mRNAs deben editarse extensamente (mediante la inserción y deleción de uridinas) para generar una forma traducible de RNAm. El proceso de edición del RNA depende de los RNA guía (RNAg), codificados por los minicírculos, que actúan como plantillas para la edición (Ogden & Melby, 2009).

En los tripanosomátidos se detectó por primera vez la presencia de orgánulos llamados acidocalcisomas (Fig. 2). Éstos contienen una alta concentración de cationes como magnesio y calcio además de un alto contenido de fósforo (pirofosfato y polifosfato) y en otros organismos participan en varias funciones como la regulación osmótica y el mantenimiento del pH intracelular. Se encontró que las membranas de los acidocalcisomas de tripanosomátidos presentan un gran número de bombas e intercambiadores, lo que sugiere una actividad metabólica similar a la de otras células (Docampo *et al.*, 2005).

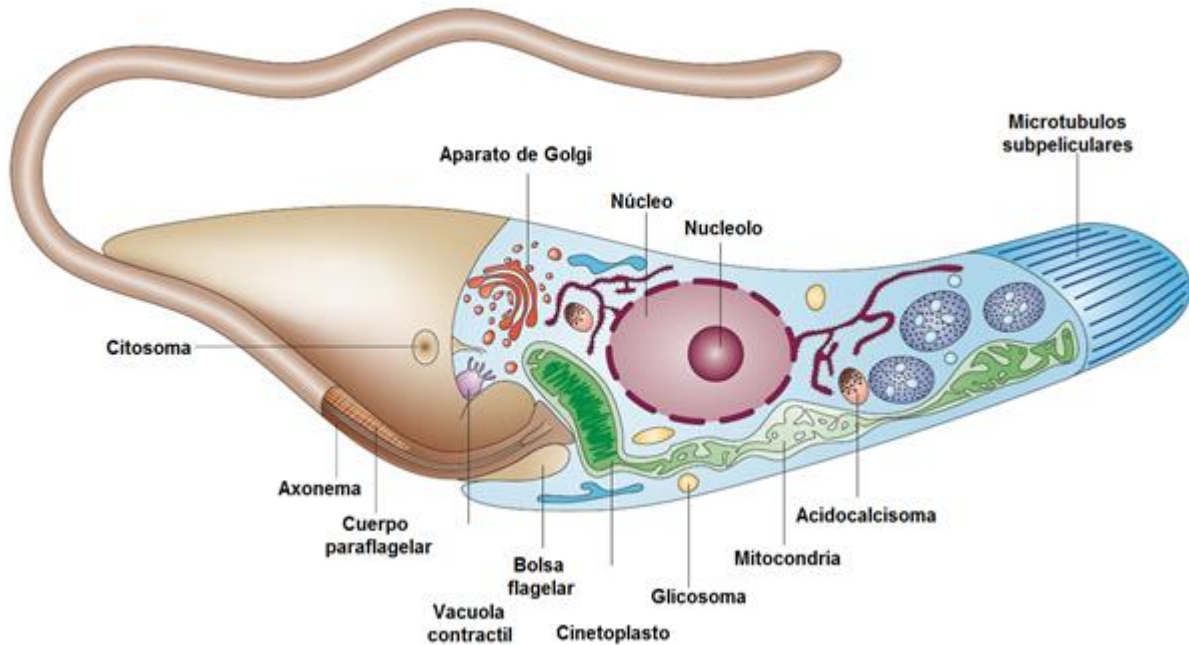


Figura 2. Esquema de la morfología de los tripanosomátidos. Modificado de Docampo *et al.*, 2005.

Otra particularidad de estos organismos es la presencia de glicosomas (Fig. 2), que son un tipo de peroxisomas especializados. Los glicosomas de los tripanosomátidos, en conjunto con los glioxisomas en plantas y los cuerpos de Woronin en hongos, son llamados microcuerpos. El sello distintivo de los glicosomas es que albergan la mayoría de las enzimas glucolíticas y gluconeogénicas, aunque también poseen moléculas de otras vías catabólicas y anabólicas importantes. El intercambio de metabolitos entre los compartimentos glicosomal y citosólico es otro aspecto importante de la biología de estos orgánulos, ya que contienen proteínas formadoras de canales involucradas en la transferencia selectiva de elementos a través de la membrana única que rodea los orgánulos, como se ha visto en peroxisomas humanos y de levadura.

En tripomastigotes de *T. brucei* se han reportado aproximadamente 60-65 glicosomas, con un diámetro promedio de 0.27 μm . Éstos se encuentran distribuidos por todo el cuerpo celular, a menudo en grupos, y el número aumenta a 120 durante el crecimiento del parásito hasta la división celular. Asimismo, los promastigotes de *L. major* poseen aproximadamente 20 glicosomas por célula, mientras que los

amastigotes contienen aproximadamente 10 (Allmann & Bringaud, 2017; Cull *et al.*, 2014; Joshi & Subramani, 2013).

1.1.1. *Leishmania*

El género *Leishmania* está constituido por un grupo de parásitos intracelulares que se transmite por la picadura de un vector flebótomo conocido como mosca de la arena. Este protozoo presenta dos estadios morfológicamente distintos: el amastigote y el promastigote. Este último a su vez se divide en promastigote procíclico y promastigote metacíclico. Los amastigotes son de forma redonda a ovalada con un diámetro de 2 a 10 μm (Fig. 3) y son el estadio presente en los mamíferos, en los que parasitan los fagocitos mononucleares, principalmente los macrófagos, manteniéndose de manera intacelular. La forma alargada del promastigote móvil se encuentra dentro de las hembras de los flebótomos (de los géneros *Phlebotomus* y *Lutzomyia*), que son los únicos vectores conocidos. Los promastigotes son variables en longitud (15-25 μm) y forma (de elipsoide a delgada) (Melby *et al.*, 2019).

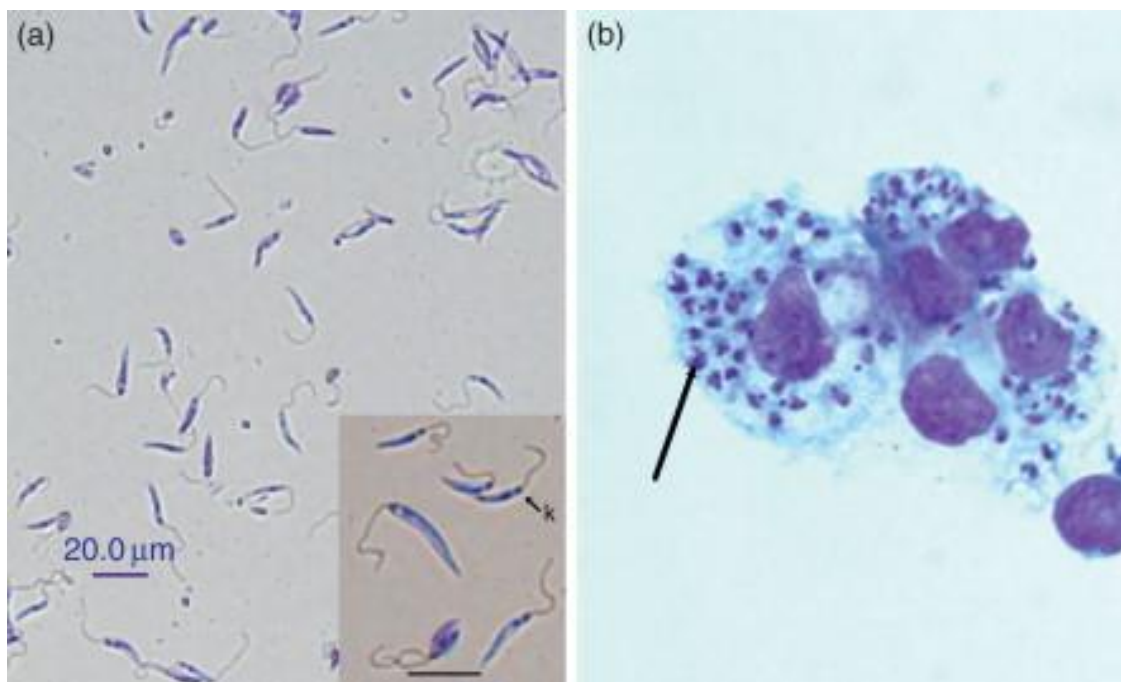


Figura 3. Estadios morfológicos principales de *Leishmania*. (a) Se muestran las formas alargadas de promastigotes de *L. donovani*. Una flecha apunta a un cinetoplasto (k). (b) Muestra los amastigotes de *L. donovani* intracelulares que infectan células de bazo de hámster después de la

tinción con giemsa. Cada uno de los cuerpos teñidos de violeta dentro del citoplasma de la célula es un amastigote (flecha). Tomado de Ogden & Melby, 2009.

1.1.1.1. Ciclo de vida de *Leishmania*

El ciclo de vida de *Leishmania* comienza cuando una mosca de la arena hembra infectada pica al humano y transmite formas infecciosas de promastigote metacíclico (Fig. 4). Éstos son fagocitados por macrófagos y otras células fagocíticas mononucleares. Dentro de este hospedero, el parásito sufre un proceso de diferenciación (amastigogénesis) que da lugar a amastigotes redondeados que se multiplican dentro de una vacuola parasitófora y pueden infectar otros fagocitos al ser liberados después de la muerte de la célula hospedera. *Leishmania* sp., el hospedero y otros factores determinan si la infección se vuelve sintomática y si se produce leishmaniasis cutánea o visceral. El ciclo continúa cuando los flebótomos toman células infectadas y amastigotes libres durante la ingestión de sangre. Dentro del insecto vector se transforman en promastigotes procíclicos en el intestino medio, donde se multiplican por fisión binaria. Las formas procíclicas finalmente migrarán hacia el intestino anterior donde se diferencian en formas metacíclicas (metaciclogénesis) capaces de infectar a otro hospedero (Fig. 4) (de Pablos *et al.*, 2016).

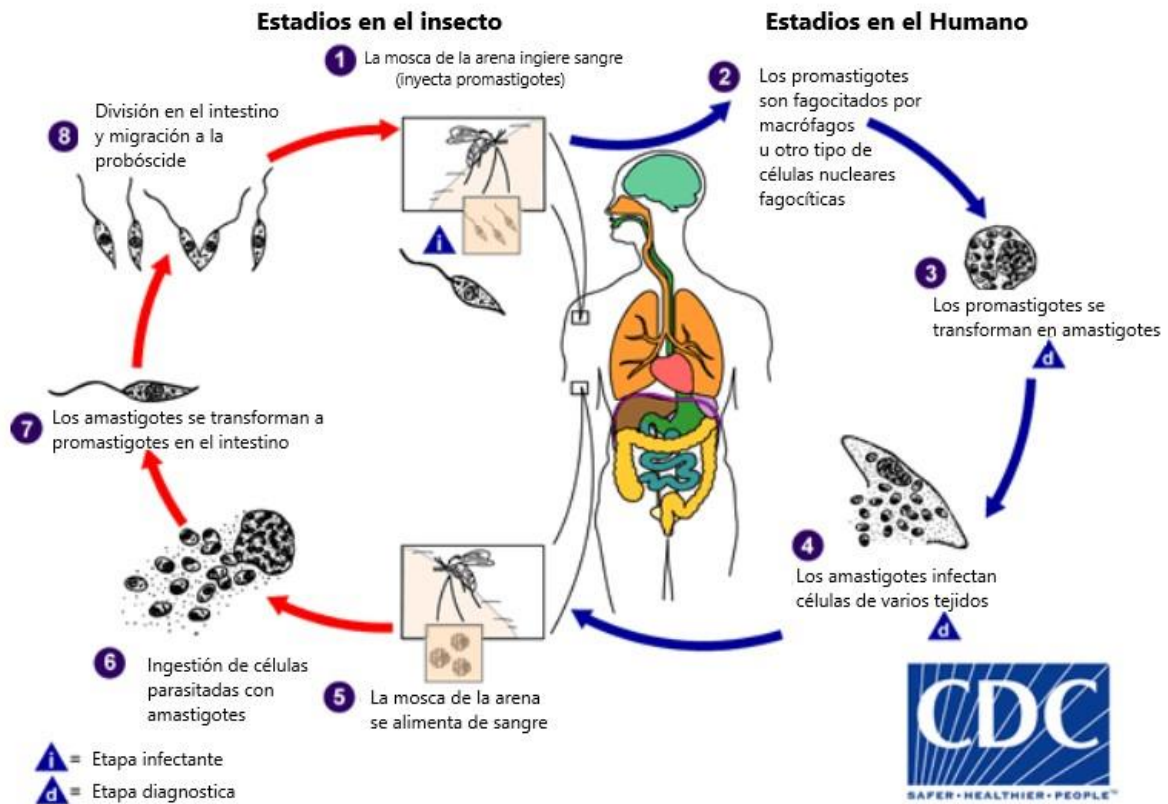


Figura 4. Ciclo de vida de *Leishmania*. Modificado de CDC, 2020.

1.1.2. Leishmaniasis

La leishmaniasis es la enfermedad producida por alrededor de 20 especies del género *Leishmania*. Es considerada una *enfermedad desatendida* y se encuentra principalmente en países tropicales y subtropicales, en vías de desarrollo, de todo el mundo. Este padecimiento infeccioso se encuentra en alrededor de 100 países y es endémica de Asia, África, la región del mediterráneo y América. Anualmente, alrededor de 1.5 a 2 millones de personas contraen esta infección y 350 millones viven en riesgo de adquirirla. En general, la mayoría de las personas infectadas desarrollan la enfermedad a nivel subclínico, sin presentar complicaciones. Las manifestaciones clínicas están determinadas por la especie infectante y la respuesta inmune del hospedero. Los principales reservorios de esta enfermedad

suelen ser mamíferos como roedores, cánidos y el ser humano (Pace, 2014; Torres-Guerrero *et al.*, 2017).

Dentro de la leishmaniasis existen manifestaciones clínicas variadas, aunque se reconocen principalmente tres tipos: cutánea, mucocutánea y visceral (Fig. 5).

La leishmaniasis cutánea es la más común de todas y aparece en regiones del cuerpo que están expuestas a la picadura de la mosca, donde la zona de las orejas es la más afectada, seguido de la nariz, labios, mejillas, piernas, manos, brazos y tobillos. La incubación del parásito se da entre 1-4 semanas. Esta infección se caracteriza por la aparición de una pápula en el sitio de la picadura (cuyo tamaño varía de 1 a 10 mm de diámetro), un aumento local de la temperatura e hinchazón. Después de algunos días se forma una pústula, y cuando se rompe, ya sea de forma espontánea o por traumatismo por rascado, resulta en una úlcera redondeada con bordes nodulares y gruesos o con bordes afilados y puntiagudos. Estas úlceras pueden durar desde 3-5 meses hasta 20 años. No son dolorosas si no hay una infección secundaria (Torres-Guerrero *et al.*, 2017). Las principales especies que provocan esta forma de la enfermedad son *L. mexicana*, *L. amazonensis* y *L. major*.

La leishmaniasis mucocutánea resulta de una diseminación linfática o hematogena del parásito a partir de una lesión cutánea, que puede surgir al mismo tiempo de la picadura o incluso meses o años después, afectando las mucosas del tracto respiratorio y oral. La leishmaniasis mucocutánea se manifiesta como nódulos e infiltrados del cartílago nasal que conducen a la obstrucción de las vías respiratorias. Generalmente se presenta daño al tabique nasal, la faringe, el paladar, el labio superior y la laringe, lo que puede resultar en una severa destrucción del tejido y una gran desfiguración. *L. braziliensis* y *L. panamensis* son los principales agentes causales de esta variedad de la enfermedad (Guerra *et al.*, 2011; Pace, 2014).

La leishmaniasis visceral se caracteriza por una fiebre irregular persistente y esplenomegalia. Son frecuentes la pancitopenia, la hepatomegalia y la pérdida de peso. Esta variedad de la enfermedad es letal si no es tratada a tiempo. En 2015, siete países reportaron más del 90% de todos los casos a nivel mundial de

leishmaniasis visceral: Brasil, Etiopía, India, Kenia, Somalia, Sudán del Sur, Sudán. Los seres humanos son el principal reservorio de la leishmaniasis visceral, debida a *L. donovani* y *L. infantum* (Burza *et al.*, 2018).



Figura 5. Formas clínicas de Leishmaniasis. A Úlcera característica de la leishmaniasis cutánea. B Leishmaniasis en su forma mucocutánea. C Se observa una inflamación de hígado y bazo en un infante, causado por la leishmaniasis visceral. Tomado de (Torres-Guerrero *et al.*, 2017; OPS, 2021).

Además de la importancia médica de estos organismos, también son un sistema modelo importante para el estudio de los procesos básicos de la biología molecular, debido a la expresión atípica de su genoma. En nuestro laboratorio estamos interesados en el estudio de la transcripción mediada por la RNA Polimerasa III de estos organismos.

1.2. Transcripción en eucariontes

La transcripción es el primer paso en la expresión génica. Su regulación se da por procesos celulares fundamentales, incluida la diferenciación, la reprogramación y la respuesta inmunitaria. La transcripción está relacionada con el crecimiento y la

división celular, la arquitectura y reparación del genoma. La síntesis de RNA la llevan a cabo las RNA Polimerasas, enzimas que utilizan un molde de DNA para generar copias complementarias de RNA.

El ciclo de transcripción incluye tres fases: iniciación, elongación y terminación. La iniciación implica el reconocimiento del promotor de DNA, la apertura del DNA y la síntesis de un oligómero de RNA inicial corto. Durante la elongación, la polimerasa usa la plantilla de DNA para extender la cadena de RNA en crecimiento de manera progresiva. Finalmente, el DNA y el RNA se liberan durante la terminación y la polimerasa se puede reciclar y reiniciar la transcripción. Las RNA polimerasas eucariontes no pueden realizar el ciclo de transcripción por sí solas. Requieren de factores de transcripción generales (GTF) para el inicio y otros factores conservados para el control de la elongación y la terminación (Cramer, 2019).

Los principales reguladores de la transcripción génica son los factores de transcripción (TF), que se definen como proteínas que pueden unirse a secuencias específicas de DNA (promotores). En los eucariontes, varios TF interactúan con sus motivos de DNA afines y reclutan cofactores transcripcionales para alterar el entorno de la cromatina. Los GTF, requeridos para la expresión de todos los genes, son los encargados de reclutar a la RNA polimerasa al promotor para formar el complejo de preiniciación (PIC) e iniciar la síntesis del RNA (Mitsis *et al.*, 2020).

Las RNA Polimerasas son complejos proteicos que están presentes en todos los organismos vivos. La maquinaria básica de transcripción de moléculas de RNA evolucionó antes del último ancestro de todos los organismos existentes. Arqueas y bacterias cuentan con una RNA polimerasa, mientras que en eucariontes existen principalmente tres RNA polimerasas: RNA Pol I, RNA Pol II y RNA Pol III. Cada una de ellas se encarga de sintetizar distintas clases de moléculas de RNA.

1.2.1 RNA polimerasa I

A diferencia de las RNA Pol II y III, que sintetizan una gran variedad de RNAs, la RNA Pol I se encarga de producir únicamente los RNA ribosomales (RNAr), que por sí solos forman alrededor del 75% del RNA total en la célula. En mamíferos, la RNA Pol I produce el pre-RNAr 47S, que es procesado para formar los RNAr maduros 18S, 5.8S y 28S, los cuales son los componentes esenciales y funcionales de los ribosomas, organelos responsables de la síntesis de proteínas. El contenido de ribosomas es un determinante crítico de la acumulación de proteínas y, por lo tanto, del crecimiento y la división celular. La abundancia de ribosomas dentro de una célula depende de la disponibilidad de RNAr (Goodfellow & Zomerdijk, 2013).

La RNA Pol I es una enzima de 14 subunidades (Fig. 6), de las cuales comparte cinco con Pol II y III (Rpb5, Rpb6, Rpb8, Rpb10 y Rpb12), que junto con A190, A135, AC40, AC19 y A12.2 forman el núcleo de la enzima. Aunque se conserva la forma general del núcleo, la hendidura de unión al DNA de RNA Pol I adopta la conformación más ancha reportada, pues en comparación con otras RNA polimerasas, la hendidura de Pol I está aproximadamente 10 Å más abierta. Cuatro subunidades adicionales completan la enzima: el heterodímero A43-A14, que forma el tallo que proporciona una plataforma para los factores de iniciación e interactúa con el RNA recién sintetizado, y el heterodímero A49-A34.5 (Fernández-Tornero *et al.*, 2013; Tafur *et al.*, 2016).

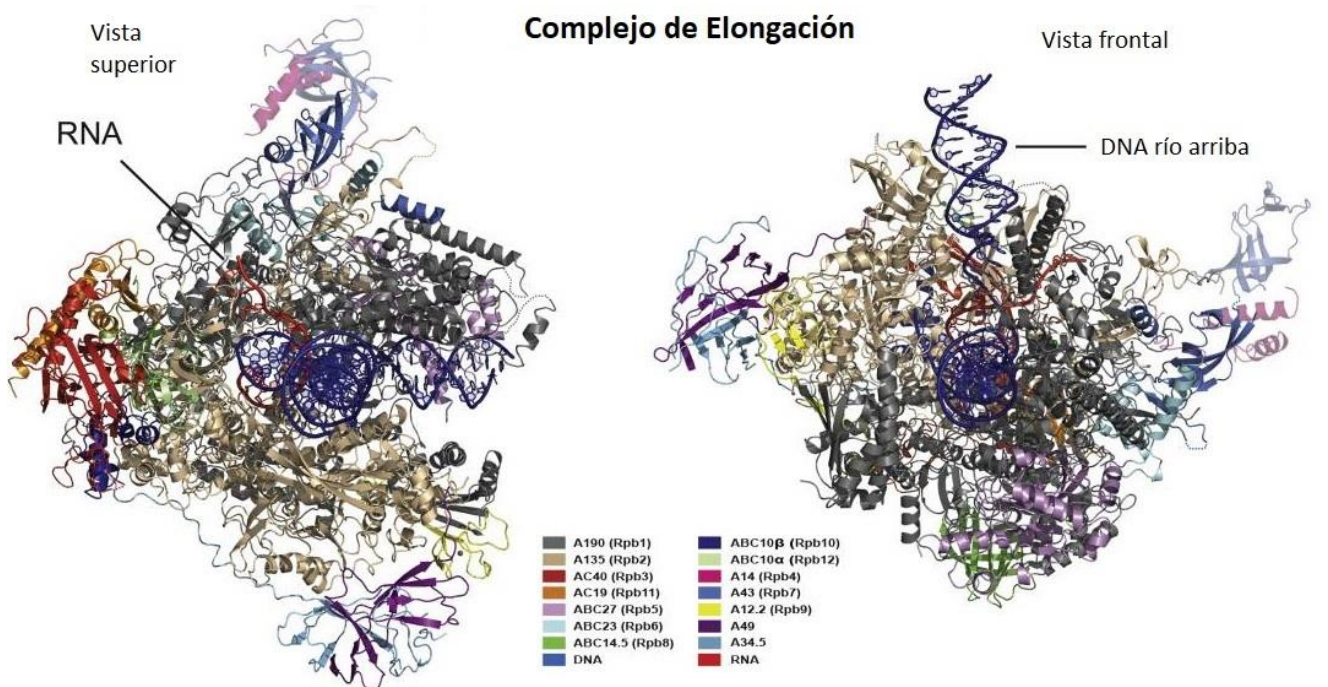


Figura 6. Estructura tridimensional de la RNA Pol I, en donde se indican las 14 subunidades que la conforman. Modificado de Tafur *et al.*, 2016.

1.2.2 RNA Polimerasa II

La RNA polimerasa II es la enzima que se encarga universalmente de transcribir las regiones codificantes de proteínas y otras no codificantes del genoma eucariota. La RNA Pol II es una enzima de 12 subunidades de alrededor de 500 kDa que está muy conservada en organismos simples y complejos. Rpb1 y Rpb2 son las subunidades más grandes y forman el núcleo de la enzima con subunidades más pequeñas dispuestas alrededor de la superficie, que son Rpb3, Rpb5, Rpb6, Rpb8, Rpb9, Rpb10, Rpb11 y Rpb12. Rpb4 y Rpb7 forman heterodímeros para el inicio de la transcripción y que pueden disociarse del núcleo catalítico (Edwards *et al.*, 1991)

La característica principal de la enzima es un canal profundo donde se sintetiza el RNA. Aproximadamente 12 pares de bases (pb) de DNA se desnaturalizan durante la transcripción y la plantilla monocatenaria yace en este canal central, en el que forma un híbrido con aproximadamente nueve nucleótidos en el extremo 3' de la

cadena de RNA en crecimiento. La hebra de DNA que no es plantilla (la cadena codificante) se desplaza a la superficie de la enzima.

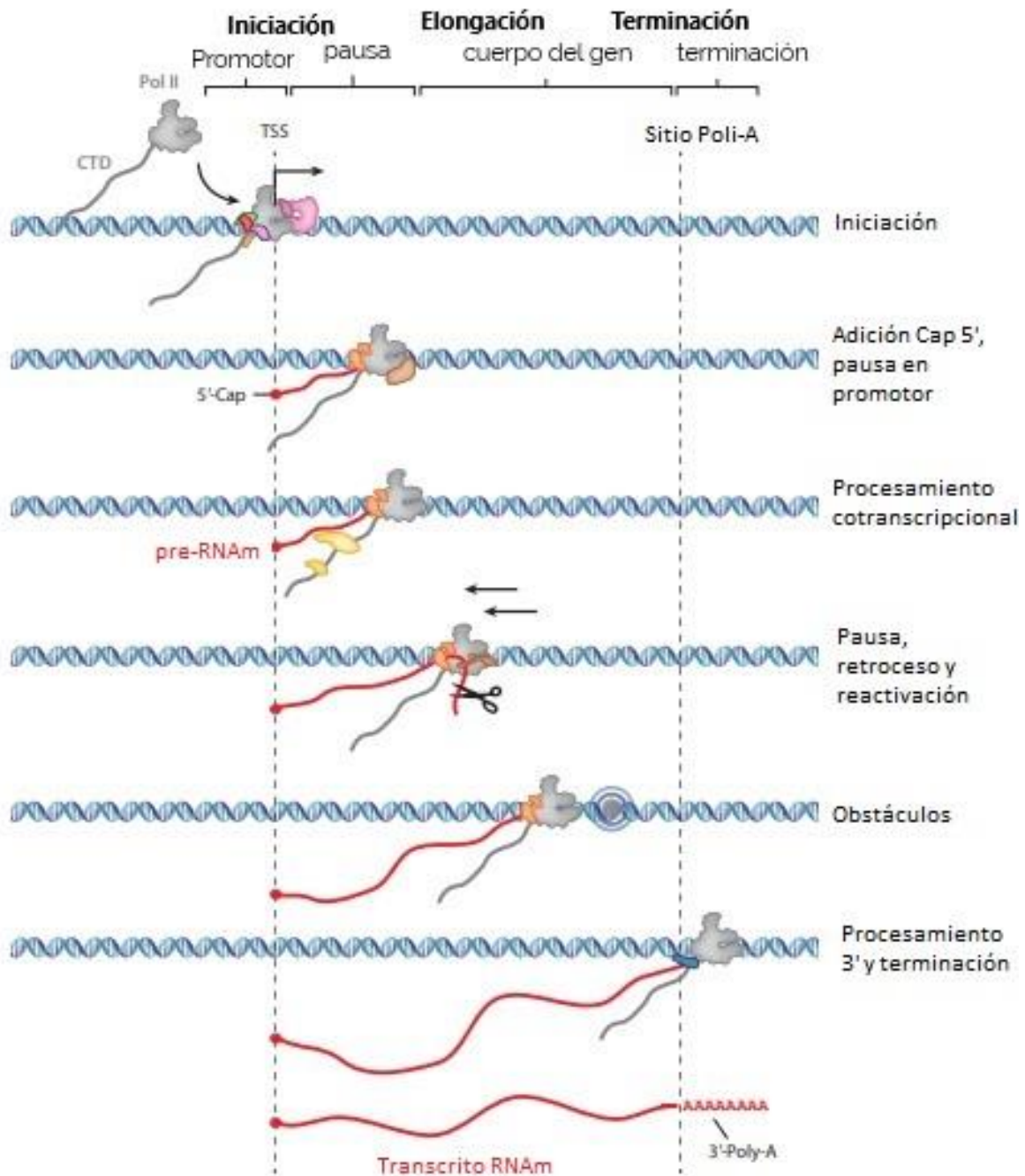


Figura 7. Ciclo de transcripción de la RNA Pol II. La transcripción de RNA Pol II sigue un ciclo definido que comienza con la iniciación en la región del promotor; en este ciclo, RNA Pol II y los GTF se ensamblan para coordinar el inicio de la síntesis de RNA. Después de la iniciación, RNA Pol II escapa del promotor para extender su producto de RNA. Durante la elongación, tienen lugar procesos cotranscripcionales tales como la adición del Cap del extremo del 5', la pausa próxima al promotor y la liberación de la pausa, el retroceso y la reactivación y la navegación de los obstáculos. Finalmente, RNA

Pol II termina el ciclo de transcripción, liberando al RNAm maduro. Abreviaturas: CTD, repetido de dominio C-terminal; GTF, factor de transcripción general; TSS, sitio de inicio de la transcripción. Modificado de Osman y Cramer, 2020.

Esta disposición crea una burbuja de DNA monocatenario que se desliza a través y alrededor del canal central de la polimerasa a medida que la doble hélice se separa progresivamente frente a la enzima y luego se vuelve a hibridar después de la transcripción. Principalmente se reconocen tres fases en la transcripción por la RNA Pol II: iniciación, elongación y terminación (Fig. 7). El ciclo de transcripción comienza con el ensamble del complejo de preiniciación (PIC), el cual contiene a los GTFs en las regiones promotoras y a la RNA Pol II. El PIC abre el DNA promotor e inicia la síntesis de RNA. La RNA Pol II escapa de la región promotora y comienza a extender el producto de pre-RNAm. Asimismo, la RNA Pol II favorece el reclutamiento de factores que van a ayudar a madurar contrascriptionalmente al producto de pre-RNAm. Éste es después cortado y poliadenilado para liberar un producto maduro de RNAm y es exportado del núcleo hacia el citoplasma, donde será traducido para la producción de proteínas (Corden, 2021; Osman & Cramer, 2020).

Para iniciar la síntesis de RNA, la RNA Pol II necesita de varios GTFs: TFIIA, TFIIB, TFIID, TFIIE, TFIIIF y TFIIH. Éstos actúan de manera que forman el PIC en el promotor. Algunos autores mencionan que TFIIA no es un GTF en el sentido más estricto, pero se ha visto que TFIIA estabiliza las interacciones TBP-DNA y que altera la capacidad del complejo TFIID para interactuar con el elemento TATA (Luse, 2014). TFIID tiene una subunidad llamada TBP (*TATA-box binding protein*, proteína de unión a caja TATA) que se unirá directamente a la caja TATA si está presente y accesible, aunque también es capaz de reconocer otras secuencias similares. En el siguiente paso, entra TFIIB al PIC, uniéndose al complejo TFIID-DNA. TFIIB es de un solo polipéptido, cuenta con un dominio de unión a zinc y contiene varios dominios que interactúan con la RNA Pol II y TFIID. El complejo TFIIA-TFIID-TFIIB-RNA Pol II es estabilizado mediante el reclutamiento de TFIIIF, el cual es un heterotetrámero compuesto por dos subunidades grandes (TFIIIF α /RAP74) y dos subunidades pequeñas (TFIIIF β /RAP30). TFIIIF es requerido para la unión posterior

de TFIIE (heterotetrámero de dos subunidades grandes TFIIE α y dos pequeñas TFIIE β) y éste a su vez para el reclutamiento de TFIIH, el factor más grande de todos con una masa comparable a la de RNA Pol II. TFIIH tiene funciones enzimáticas como helicasa de DNA dependiente de ATP y cinasa dependiente de ciclina. Así, finalmente se consigue formar el PIC (Corden, 2021; Woychik & Hampsey, 2002). Un modelo clásico sugiere la formación de un complejo Pol II-TFIIF que se une a un complejo promotor TFIIIB-TFIID-DNA preformado, lo que da como resultado la formación de un complejo de iniciación central. El complejo de iniciación central se une a TFIIE y TFIIH para formar un PIC completo (Sainsbury *et al.*, 2015).

1.2.3 RNA Polimerasa III

La RNA Polimerasa III es la más grande de las tres polimerasas, con 17 subunidades y un peso de alrededor de 700 kDa. Igual que las RNA Pol I y II, cuenta con un núcleo catalítico de 10 subunidades (Fig. 8). El núcleo catalítico tiene la forma característica de pinza de cangrejo que encierra una hendidura central que alberga el DNA y tiene dos canales, uno para el sustrato, los nucleótidos trifosfato (NTPs) y otro para el producto de RNA. Todas las subunidades de RNA Pol III, con excepción de C37, son esenciales para la viabilidad celular (Khatter *et al.*, 2017; Schramm & Hernandez, 2002).

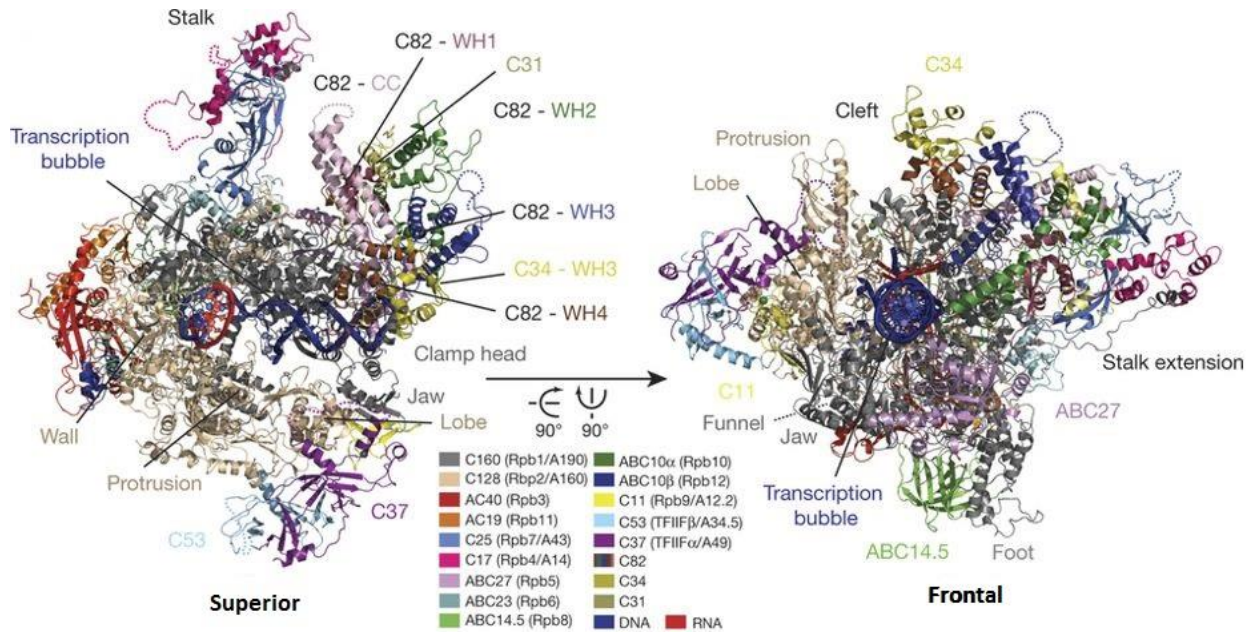


Figura 8. Vista superior y frontal de la RNA Pol III. Los dominios y elementos individuales están etiquetados. El código de color está representado en los cuadros correspondientes. Modificado de Hoffmann *et al.*, 2015.

La RNA Pol III se encarga de la transcripción de RNAs pequeños. Los productos más abundantes son las distintas especies de RNAs de transferencia (RNAt), que son funcionalmente diferentes entre sí debido a la habilidad que tienen de acarrear diferentes aminoácidos correspondientes a diferentes anticodones, y el RNAr 5S. Estos RNAs, en conjunto con otros transcritos por la RNA Pol I, RNAr 5.8S, 28S y 18S, son componentes fundamentales de la maquinaria de síntesis de proteínas. Además de la transcripción de RNAs no codificantes (RNAnc) encargados de la traducción, la RNA Pol III también sintetiza otros RNAnc esenciales diferentes. Entre ellos encontramos al RNA pequeño nuclear U6 (U6 RNAsn), componente del *spliceosoma*, complejo molecular que se encarga de remover intrones de los pre-RNAm; el RNA 7SL, elemento de la partícula de reconocimiento de señal (SRP, *signal recognition particle*), la cual dirige proteínas membranales y secretoras a la maquinaria de translocación de proteínas celulares durante la traducción; el RNA pequeño nucleolar snR52, que participa en la modificación de los RNAsn; los componentes RNA de SRP1 que median la importación de proteínas nucleares; RNase P (RPR1), una endonucleasa que escinde los pre-RNAt para producir extremos 5' maduros; RNAs bóveda (*Vault RNAs*), moléculas pequeñas de

alrededor de 100 nt de largo contenidas en partículas grandes de ribonucleoproteína citoplasmática que se cree que están involucradas en el ensamblaje y/o transporte macromolecular (Dieci *et al.*, 2013; Turowski & Tollervey, 2016).

1.2.3.1 Promotores de la RNA Pol III

Los promotores son regiones del DNA que controlan el inicio de la transcripción, además son reconocidas por proteínas mediante secuencias específicas necesarias para su unión y que forman el PIC para que posteriormente se pueda dar comienzo a la transcripción. La RNA Pol III cuenta principalmente con tres tipos de promotores, denominados promotores tipo I, II y III (Fig. 9).

Uno de los primeros en ser descrito fue el del gen 5S RNAr de *Xenopus laevis* (Sakonju *et al.*, 1980). Este promotor se caracteriza por la presencia de las cajas A y C, y un elemento intermedio entre ambas. Éste es un promotor intragénico, es decir, está localizado dentro de la región transcrita (Fig. 9A).

Posteriormente también se describieron los promotores de algunos genes de RNAt en *X. laevis* y *Drosophilla melanogaster*. En estas secuencias con actividad promotora también se identificaron las cajas A y una caja B. Estos elementos intragénicos están bien conservados entre especies, ya que codifican para los bucles T y D de los RNAt, necesarios para su función, aunque la distancia entre ambos puede variar (Fig. 9B) (Galli *et al.*, 1981; Hofstetter *et al.*, 1981; Sharp *et al.*, 1981).

Por último, se encuentran el promotor tipo III (Fig. 9C), que se caracteriza por la presencia de un elemento de secuencia distal (DSE), un elemento de secuencia proximal (PSE) y una caja TATA. A diferencia de otros promotores, éste es un promotor extragénico, lo que quiere decir que sus elementos se encuentran río arriba del sitio de inicio de la transcripción. Este tipo de promotor fue originalmente descrito en el gen de RNAsn U6. También se ha visto en otros genes en humano como el RNA 7SK, RNAsa P y RNAsa MRP (Schramm & Hernandez, 2002).

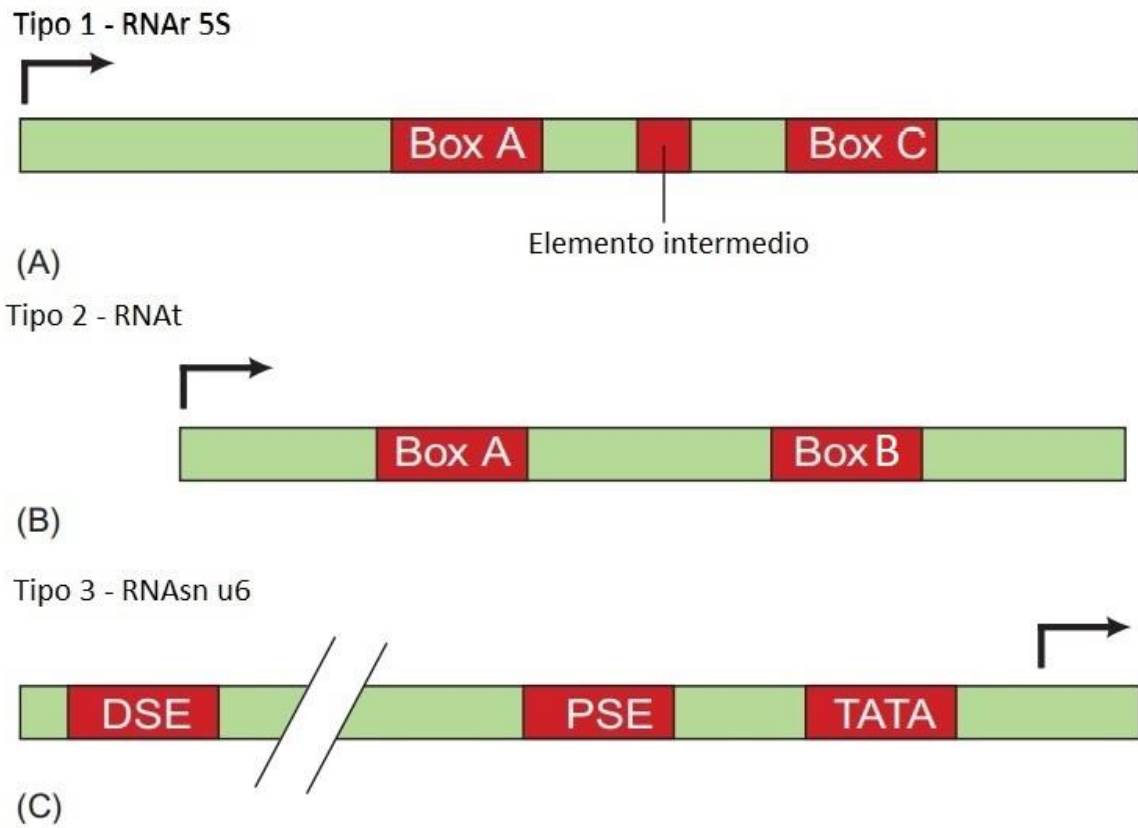


Figura 9. Arquitectura de los promotores para la RNA Pol III. Las cajas rojas contienen los elementos promotores. La flecha indica el sitio de inicio de la transcripción. Box A: Caja A. Box B: Caja B. Box C: Caja C. DSE: elemento de secuencia distal. PSE: elemento de secuencia proximal. TATA: Caja TATA. Modificado de Shen, 2019.

1.2.3.2 Factores de transcripción de la RNA Pol III

Los mecanismos básicos de la transcripción de la RNA Pol III se conocen con detalle. Se sabe que esta enzima necesita principalmente de tres factores de transcripción generales: TFIIIA, TFIIIB y TFIIIC (Fig. 10). TFIIIA está conformado de una sola proteína, y es específico para la transcripción del gen de RNAr 5S. TFIIIA es la proteína fundadora de la familia de dedos de zinc y cuenta con nueve de estos dominios. En levadura, la única función de TFIIIA es la transcripción del RNAr 5S. Como se mencionó, estos genes cuentan con una caja A y una caja C, siendo esta última donde se une una TFIIIA, para así facilitar la unión de TFIIIC y más adelante

reclutar a TFIIIB y a la RNA Pol III. TFIIIA fue el primer factor de transcripción eucarionte que se aisló (Schramm & Hernandez, 2002; Turowski & Tollervey, 2016).

TFIIIB es un complejo que consta de tres subunidades: TBP, factor relacionado a TFIIIB (Brf1) y B doble prima (Bdp1). TFIIIB se une al DNA río arriba del sitio de inicio de la transcripción y es capaz de dirigir varias rondas de transcripción. Este factor se encuentra conservado desde levaduras hasta humano. La subunidad TBP se comparte con las RNA Pol I y II. Por su parte, Brf1 en su extremo amino tiene homología con el factor general TFIIIB, mientras que su extremo carboxilo está poco conservado, pero es el que mantiene la interacción del complejo trimérico TBP-Brf1-Bdp1 (Orioli *et al.*, 2012; Vorländer *et al.*, 2018). La principal función de TFIIIB es el reclutamiento de la RNA Pol III al sitio de inicio de la transcripción.

En promotores de tipo II, se encuentran las cajas A y B, TFIIIC se une a esta región, lo que permite más adelante reclutar a TFIIIB, el cual a su vez recluta a la RNA Pol III. Una vez unida TBP, el complejo es reconocido por Brf1. Después se asocia Bdp1 mediante interacciones proteína-proteína (con Brf1 y TBP) y proteína-DNA (interactuando con la caja TATA o secuencias cercanas al sitio de inicio). El reclutamiento de la RNA Pol III se genera principalmente por la interacción entre Brf1 y la subunidad C34 de la RNA Pol III. TBP también interactúa con la subunidad Tau60 de TFIIIC, que sirve como enlazador flexible entre los dominios de unión a las cajas A y B (Geiduschek & Kassavetis, 2001; Schramm & Hernandez, 2002).

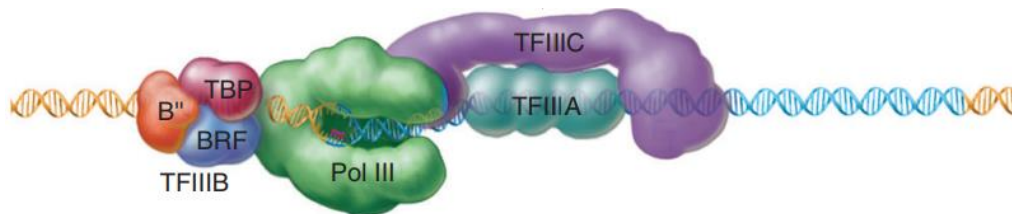


Figura 10. Esquema del PIC de la transcripción de la RNA Pol III. Se muestran los factores de transcripción utilizados para el reclutamiento de RNA Pol III al sitio de inicio de la transcripción.

1.2.3.3 Función de TFIIIC

En levadura, TFIIIC está compuesto de seis subunidades (Fig. 11) que en conjunto tienen un peso molecular de 520 kDa. Este complejo se une a las cajas A y B, en los genes de RNAt. En el caso de los genes del RNAr 5S, TFIIIC también se une a la región de control interno. Las seis subunidades se dividen en dos subcomplejos, denominados Tau A y Tau B. Tau A está compuesto de las subunidades Tau131, Tau95 y Tau55, mientras que Tau B está conformado por Tau138, Tau91 y Tau60. Tau A se une con baja afinidad a la caja A y es responsable del reclutamiento de TFIIIB; y Tau B se une con gran afinidad al promotor caja B (Vorländer *et al.*, 2020). Se cree que Tau A y Tau B se conectan mediante una región enlazadora flexible, debido a la distancia variable que puede haber entre las cajas A y B de los genes de RNAt (Geiduschek & Kassavetis, 2001). En humanos, se han identificado los ortólogos de las seis subunidades de levadura, con una similitud de secuencia más alta entre las subunidades de Tau A (Male *et al.*, 2015).

Además de su función como factor de transcripción, TFIIIC tiene otros papeles importantes, como la remodelación tridimensional del genoma. La unión de TFIIIC fuera del PIC de la transcripción se da en sitios llamados extra TFIIIC (ETC). Estos loci en el genoma de levadura están ocupados por TFIIIC, pero no por otros componentes de la maquinaria de la RNA Pol III (Moqtaderi & Struhl, 2004). Todos los loci ETC muestran una secuencia de caja B canónica seguida de algunos nucleótidos adicionales que son invariantes entre los elementos ETC, pero lo importante es que carecen de una caja A de alta calidad y no se transcriben, con la notable excepción de ETC5, cuya transcripción por RNA Pol III produce un ncRNA de 170 nt de función desconocida (Olivas *et al.*, 1997). Otro estudio mostró además que una caja B (ETC6) ubicada en la región promotora del gen de Tau91 de *S. cerevisiae*, que codifica para una subunidad del propio complejo TFIIIC, regula negativamente la transcripción de Tau91 dependiente de RNA Pol II mediante la unión de TFIIIC (Kleinschmidt *et al.*, 2011).

TFIIIC tiene la capacidad de reclutar a cohesina y condensina II, regulando así la formación de bucles de cromatina. En humano se ha visto la unión de TFIIIC a elementos Alu, controlando así la expresión mediante bucles de cromatina y acetilación de histonas (Büchel *et al.*, 2017; Yuen *et al.*, 2022).

Actualmente TFIIIC se encuentra relativamente bien caracterizado en levadura y se han reportado cristales de todas sus subunidades (Mylona *et al.*, 2006; Taylor, Baudin, *et al.*, 2013; Taylor, Glatt, *et al.*, 2013; Vorländer *et al.*, 2020).

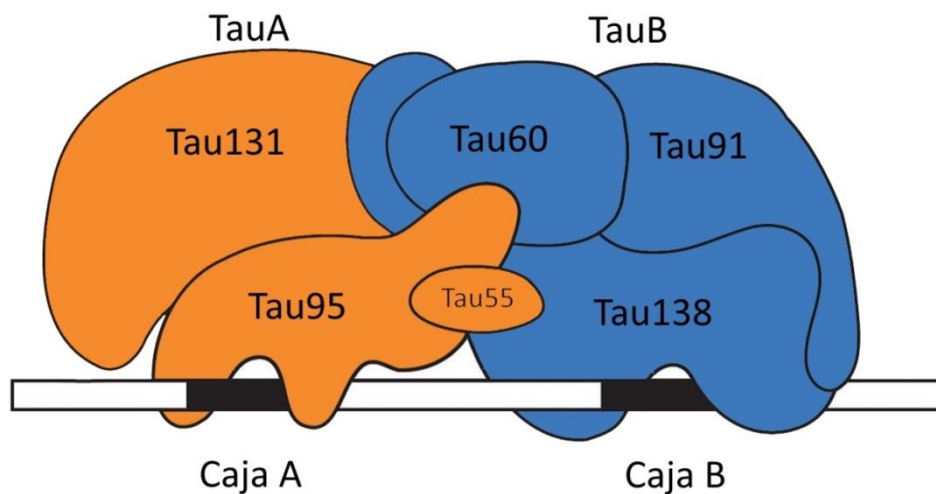


Figura 11. Subunidades de TFIIIC y su unión al DNA. En tono naranja se ilustra las subunidades correspondientes al subdominio Tau A, y en azul las que pertenecen a Tau B.

1.2.3.3.1.1 Subunidad Tau131

Tau131 forma parte del subcomplejo TauA (junto con Tau95 y Tau55), cuya función principal es el reconocimiento de la caja A. Tau131 se caracteriza por la presencia de repetidos de tetratricopéptidos (TPR), los cuales funcionan como plataforma de anclaje para otras subunidades.

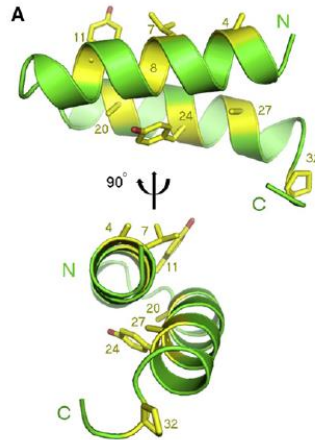


Figura 12. Motivo canónico hélice-giro-hélice de un tetratricopéptido. Modificada de Zeytuni & Zarivach, 2012.

La unidad canónica del motivo TPR adopta un pliegue hélice-giro-hélice (Fig. 12). Las unidades de TPR adyacentes forman una serie de hélices alfa antiparalelas repetidas debido a su empaquetamiento paralelo, lo que produce una estructura de superhélice general que se puede ver afectada por el tipo de residuos que se encuentran entre los motivos TPR adyacentes. En la naturaleza, los motivos TPR se pueden encontrar como matrices en tándem de 3-16 motivos estructurales dentro de una proteína determinada (Zeytuni y Zarivach, 2012). En levadura, se ha visto que Tau131 es de gran importancia para la flexibilidad de unión entre los subcomplejos TauA y TauB de TFIIC e influye en el posicionamiento de TFIIB río arriba del sitio de inicio de la transcripción (Dumay-Odelot *et al.*, 2002). Recientemente se publicó la estructura cristalográfica del subcomplejo TauA de levadura, donde se determinaron 10 TPR en el extremo amino y 7 en el extremo carboxilo de Tau131 (Fig. 13). Estos motivos repetidos son importantes para el

reclutamiento de subunidades de TFIIIB para la formación del PIC. El ensamble comienza con la unión de Brf1 al complejo TFIIIC-DNA a través del arreglo de TPR en el extremo amino de Tau131. Posteriormente se une TBP y finalmente entra Bdp1 al complejo, guiado por los sitios de unión en el arreglo amino de TPR de Tau131, así como por Brf1 y TBP (Vorländer *et al.*, 2020).

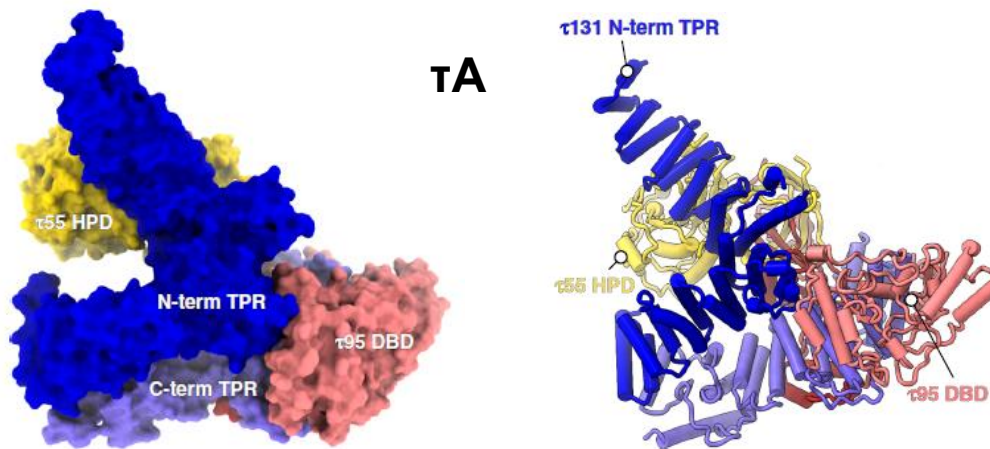


Figura 13. Imagen cristalográfica de TauA de levadura. Los dominios TPR de Tau131 se muestran en azul (N-terminal) y violeta (C-terminal). Figura tomada de Vorländer *et al.*, 2020.

Estudios en levadura indicaron que no todos los repetidos son esenciales *in vivo*: la eliminación de TPR2, TPR3, TPR4, TPR8 o TPR9 genera un fenotipo condicional, mientras que la eliminación de TPR1, TPR5, TPR6, TPR7 o TPR10 es letal (Chaussivert *et al.*, 1995; Dumay-Odelot, 2002). El fenotipo letal condicional generado por la eliminación de TPR2 o TPR8 se puede rescatar mediante la sobre-expresión de diferentes factores de la Pol III: Δ TPR2 se rescata mediante la sobre-expresión de Bdp1 (Dumay-Odelot *et al.*, 2002), mientras que Δ TPR8 se rescata con la sobre-expresión de Brf1, TBP y Tau95. De particular interés, la eliminación de TPR2 disminuye la unión a Brf1, mientras aumenta significativamente la unión tanto de Bdp1 como de ABC10 α (Chaussivert *et al.*, 1995; Dumay *et al.*, 1999).

1.2.4 Transcripción en Tripanosomátidos

En 2005 se completó la secuenciación genómica de tres tripanosomátidos: *T. cruzi*, *T. brucei* y *L. major* (Berriman *et al.*, 2005; El-Sayed *et al.*, 2005; Ivens *et al.*, 2005). Esto representó un avance científico significativo para el estudio de la biología de estos organismos. De manera interesante, se encontró que los genomas de los tripanosomátidos están organizados en grupos de genes policistrónicos, es decir, de decenas a cientos de genes que codifican para proteínas están organizados en la misma hebra de DNA de manera continua y son transcritos en un solo mensajero (Martínez-Calvillo *et al.*, 2010). Las unidades de transcripción pueden tener más de 100 kb de longitud, y el orden de los genes está parcialmente conservado entre los diferentes tripanosomátidos. A diferencia de los operones bacterianos, la función de las proteínas codificadas en las unidades policistrónicas no está relacionada entre sí. La terminación de la transcripción ocurre donde convergen dos unidades policistrónicas o en regiones transcritas por otras polimerasas (p. ej., genes de RNAt y RNAr). El transcrito primario largo se procesa en RNAm individuales mediante *trans-splicing*, añadiendo un cap por el *spliced leader* (SL) en el extremo 5, y por poliadenilación del 3' (Fig. 14).

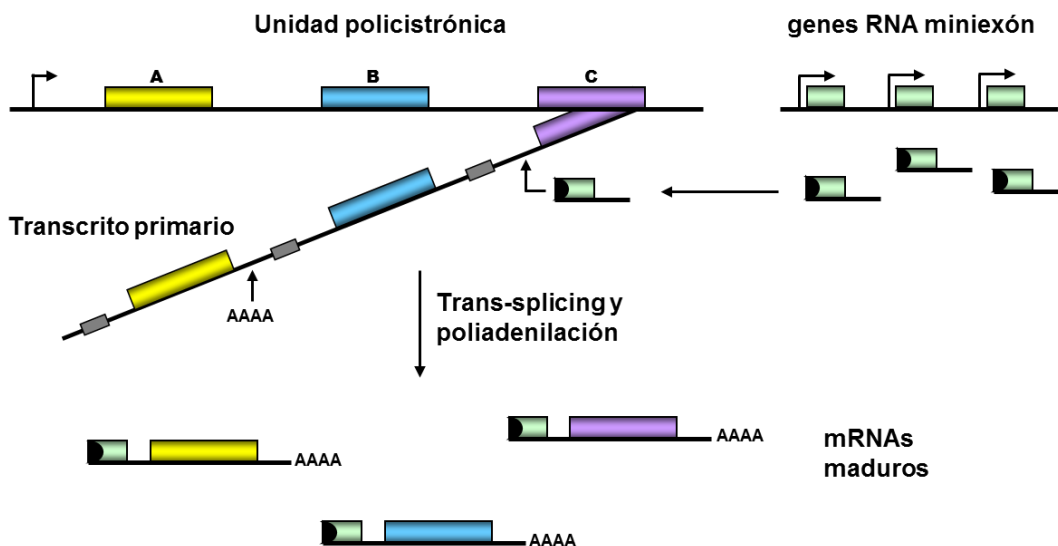


Figura 14. Transcripción policistrónica, *trans-splicing* y poliadenilación en tripanosomátidos. Tomado de Martínez-Calvillo *et al.*, 2012.

Análisis comparativos entre los tres genomas de estos tripanosomátidos, han revelado que comparten 6158 genes que codifican proteínas. Además, estos genes existen en grandes bloques sinténicos, es decir, que el orden de los genes está altamente conservado (Kissinger, 2006).

La mayoría de los genes de RNAt están organizados en grupos de 2 a 10 genes, en la hebra superior o inferior, que pueden contener otros genes transcritos por la RNA Pol III; la mayoría están ubicados en los límites de las unidades de transcripción de la RNA Pol II. Los genes de RNAr 5S en *T. brucei* y *T. cruzi* están organizados en arreglos en tándem mientras que en *L. major* están dispersos por todo el genoma y siempre están asociados con genes de RNAt (Martínez-Calvillo *et al.*, 2010).

1.2.4.1 RNA Polimerasa III

La RNA Pol III es la encargada de la síntesis de moléculas pequeñas de RNA, dentro de las que destacan el RNAr 5S, los RNAt y el RNAsn U6. Esta importante enzima y sus factores asociados no se han caracterizado en detalle en los tripanosomátidos. Análisis bioinformáticos han revelado homólogos en tripanosomátidos de 16 de las 17 subunidades de la RNA Pol III (Das *et al.*, 2007; Ivens *et al.*, 2005)

En 2007, Martínez-Calvillo *et al.*, caracterizaron la RNA Pol III en *L. major*, donde se confirmó mediante purificación por afinidad en tándem y espectrometría de masas, la presencia de las siguientes subunidades: C160, C128, C82, C34, C53, C37, C17, ABC27, ABC23, ABC14.5, ABC10 β , AC40 y AC19. Otras subunidades como ABC10 α , C25 y C11, fueron encontradas mediante BLAST. Sin embargo, la subunidad C31, que forma un subcomplejo con C82 y C34, no ha sido encontrada por ningún método. También se documentó que el genoma de *L. major* contiene una copia truncada de C82 que no está presente en *T. brucei* o *T. cruzi*, y parece haber surgido durante una recombinación entre los extremos de los cromosomas 2 y 27, lo que resultó en la duplicación de varios otros genes. Es probable que esta copia represente un pseudogen.

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

También se ha demostrado que las cajas A y B de los genes de RNA_t funcionan como promotores de algunos RNAsn. En 1994 Nakaar *et al.*, observaron que la expresión de U6 RNAsn y 7SL depende de las cajas A y B localizadas río arriba dentro de genes de RNA_t. Además, U6 requiere de un elemento intragénico propio. De la misma manera, se reportó que la transcripción del U2 RNAsn de *L. major* depende de las cajas A y B de un RNA_t-like cercano, así como de la caja B del RNA_t-Ala ubicado río arriba (Rojas-Sánchez *et al.*, 2016).

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

1.3. Antecedentes

Hasta hace poco tiempo, de los tres factores de transcripción generales de la RNA Pol III, sólo se había identificado y caracterizado TFIIIB (Vélez-Ramírez *et al.*, 2015; Schimanski *et al.*, 2005; Román-Carraro *et al.*, 2019). Sin embargo, el aislamiento de complejos transcripcionales de RNA Pol III mediante ensayos de purificación por afinidad en tándem llevados a cabo en nuestro laboratorio, permitió la identificación

de los posibles ortólogos de Tau95 y Tau131 en los tripanosomátidos (Villa-Delavequia, 2019). De igual forma, mediante la purificación por afinidad en tándem que se realizó usando como blanco a la subunidad Brf1 de *L. major*, se encontró un péptido identificado como Tau131 (Florencio-Martínez *et al.*, 2021).

En este trabajo, iniciamos el análisis y caracterización de la subunidad Tau131 en *L. major* (LmTau131), para confirmar su participación en la transcripción de la RNA Pol III en este parásito protozoo. Decidimos determinar las similitudes y diferencias entre LmTau131 y sus ortólogos, tomando en consideración que los tripanosomátidos divergieron tempranamente del linaje principal de los eucariontes, como una primera aproximación al estudio molecular de esta subunidad. Para esto, planteamos los siguientes objetivos.

2. Objetivos

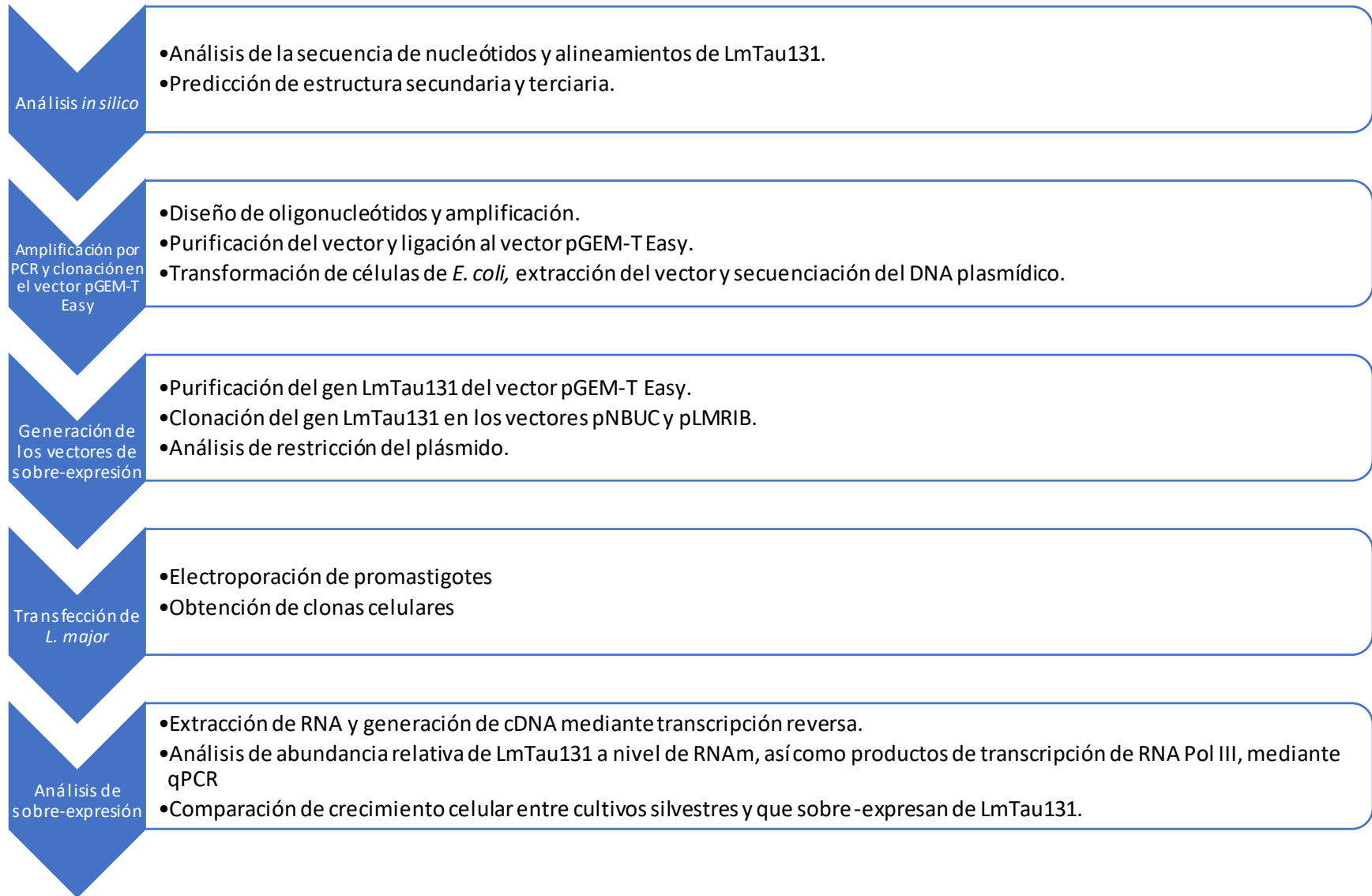
2.1. Objetivo general

Obtener y caracterizar líneas celulares de *L. major* que sobre-expresen a la subunidad Tau131 del factor de transcripción TFIIIC.

2.2. Objetivos Particulares

- Realizar un análisis *in silico* de la secuencia y estructura de LmTau131.
- Construir los vectores necesarios para la sobre-expresión de LmTau131.
- Obtener clonas celulares de promastigotes de *L. major* que sobre-expresen a la subunidad LmTau131.
- Verificar la sobre-expresión de LmTau131 a nivel de RNAm, y analizar la abundancia de transcritos dependientes de la RNA Pol III.
- Comparar el crecimiento de clonas celulares que sobre-expresen a LmTau131 con el cultivo silvestre.

3. Estrategia Experimental



4. Metodología

4.1. Análisis *in silico*

La secuencia de aminoácidos de LmTau131 se obtuvo de la base de datos dedicada a tripanosomátidos llamada TriTrypDB (disponible en: <http://tritrypdb.org>). Se realizaron análisis de identidad de secuencia utilizando diferentes herramientas públicas, que pueden predecir con confianza dominios y características de la proteína blanco, como HHPred (<https://toolkit.tuebingen.mpg.de/tools/hhpred>), Interpro (<https://www.ebi.ac.uk/Interpro>) y TPRPred (<https://toolkit.tuebingen.mpg.de/tools/hhpred>). Se utilizó también la herramienta Clustal Omega (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) para realizar un alineamiento comparativo entre las secuencias de *L. major* y *S. cerevisiae*. Para la predicción de estructuras secundaria y terciaria se utilizó Phyre² (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/>). Para el modelado tridimensional de LmTau131 se utilizó el programa PyMOL, empleando el cristal de Tau131 en *S. cerevisiae* (PDB: 6YJ6). Las estructuras obtenidas se evaluaron con la herramienta Errat (<https://saves.mbi.ucla.edu/>).

4.2. Amplificación por PCR

La secuencia del gen de Tau131 de *L. major* (ID: LmjF.12.0560) de 4110 pb más una región 5' UTR que contiene el dinucleótido AG para el correcto procesamiento del transcrito se amplificó mediante reacciones de PCR. Los oligonucleótidos empleados fueron LmTau131-SE-F (5'-GGATCCTAGGTTTGGCGCAGGTGCCTA) y LmTau131-SE-R (5'-GGATCCTCAAGGTGTACGCTGACTCGG) (Tabla 1). La secuencia de ambos cebadores contiene el sitio de corte para la endonucleasa *Bam*HI en el extremo 5'. El diseño de estos oligonucleótidos se realizó mediante la herramienta Primer-Blast de NCBI con base en la secuencia de Tau131 de *L. major* obtenida de TriTrypDB. El tamaño del fragmento obtenido es de 4484 pb (Fig. 15).

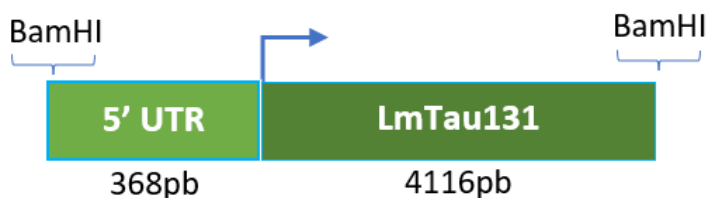


Figura 15. Amplificación de LmTau131.

	Secuencia (5'->3')	Longitud	Inicio	Fin	Tm	GC%
LmTau131-SE-F	GGATCCTAGGTTTGGCGCAGGTGCCTA	27	1	27	77.2	59
LmTau131-SE-R	GGATCCTCAAGGTGTACGCTGACTCGG	27	4484	4458	75.4	55
Longitud del producto	4484					

Tabla 1. Oligonucleótidos empleados para la amplificación de LmTau131.

Para la reacción de PCR se utilizaron 100 ng de DNA genómico extraído de *L. major* cepa Friedlin silvestre como molde, DNA Taq Polimerasa Kapa HiFi (KAPA Biosystems), buffer de reacción Kapa HiFi 1x, 1 µl de mezcla de dNTPs (10 mM) y 1 µl de oligonucleótidos sentido y antisentido (10 µM) en un volumen final de 50 µl. Las condiciones del PCR se muestran en la Tabla 2.

No. de ciclos	Condiciones
1	95°C por 3 min.
30	Desnaturalización: 95°C por 30 seg. Alineamiento: 66°C por 30 seg. Extensión: 72°C por 4 min.
1	72°C por 7 min.

Tabla 2. Condiciones de PCR para la amplificación de LmTau131.

4.3. Clonación en el vector pGEM-T Easy

El producto de PCR obtenido se precipitó utilizando 0.1 volumen de acetato de sodio 3M (pH 5.5) y 2.5 volúmenes de etanol absoluto. La mezcla se mantuvo a -20°C durante la noche. Al siguiente día se centrifugó a 17,000 g por 10 min. Una vez obtenida la pastilla se resuspendió en 30 µl de agua bidestilada y se cargó en un gel de agarosa al 0.8% para su separación y se dejó correr por ~2 h a 100 V. Utilizando el transiluminador UVP (M-26) se identificó la banda de interés de 4.4 kb y se cortó la región del gel que la contenía. Se colocó en tubos Eppendorf de 1.5 ml, se determinó la masa del fragmento y se purificó con el kit *NucleoSpin Gel and PCR clean-up extract II* (Macherey-Nagel), siguiendo las instrucciones del fabricante. Con el DNA purificado, se realizaron reacciones de adenilación o adición de A-terminal usando ~840 ng de DNA, 1 µl (2.5 U) de DNA Taq Pol (Kapa Biosystems), Buffer

Kapa B Taq 10x, y 1 μ l de dATP 2 mM en un volumen final de 10 μ l, durante 30 min, a una temperatura de 70°C. El DNA de LmTau131 fue adenilado, para poder realizar la ligación del amplicón al vector pGEM-T Easy (Promega).

4.4. Transformación de células competentes

Una vez obtenido el vector pGE-Tau131SE se transformaron células electrocompetentes de *Escherichia coli* DH5 α E (Invitrogene®), siguiendo las recomendaciones del fabricante. Las células transformadas fueron plaqueadas en LB agar que contenía ampicilina 100 μ g/ml, 100 μ l de IPTG (100 mM) y 20 μ l de X-gal (50 mg/ml), incubando durante la noche a 37°C. Se seleccionaron cuatro colonias blancas y se inocularon en 5 ml de medio LB con ampicilina 100 μ g/ml, incubando a 37°C con agitación de 250 rpm. Posteriormente, se purificó DNA de plásmido de los cultivos obtenidos, empleando el Kit NucleoSpin Plasmid (Macherey-Nagel). El DNA de plásmido purificado fue digerido para liberar el inserto de LmTau131SE del vector. Para ello, se realizaron digestiones enzimáticas con la enzima *Bam*HI. El resultado fue analizado mediante electroforesis. Las construcciones obtenidas se enviaron a secuenciar para descartar la presencia de mutaciones.

4.5. Generación de vectores de sobre-expresión

Los vectores de sobre-expresión pNBUC y pLMRIB fueron previamente linearizados con la enzima *Bam*HI y desfosforilados para prevenir que se volvieran a circularizar. El inserto de LmTau131SE fue liberado del vector pGE-LmTau131SE mediante la digestión con la enzima *Bam*HI. Para ello se digirieron 20 μ g de DNA plasmídico con *Bam*HI y se realizó una segunda digestión con *Scal* para poder digerir al vector pGEM-T Easy y lograr así una completa separación de ambos fragmentos. Posteriormente, se realizó una electroforesis en un gel de agarosa al 0.8% durante 2.5 h para extraer el fragmento de LmTau131.

Para la ligación se utilizó una proporción inserto:vector de 8:1, usando ~800 ng de inserto LmTau131 y ~200 ng de vector pNBUC o pLMRIB. Para cada reacción se adicionó

1U de enzima T4 DNA ligasa (Promega) y buffer de ligación 2x en un volumen final de 10 µl. Las reacciones se dejaron incubando durante toda la noche a 4°C. El producto de ligación se empleó para electroporar células de *E. coli* electrocompetentes ElectroMax DH5αE (Invitrogene®) y, una vez transformadas, se plaquearon en LB agar con ampicilina 100 µg/ml. Posteriormente, se tomaron 22 colonias para el vector pNBUC-LmTau131 (pN-LmTau131) y 14 colonias para el vector pLMRIB-LmTau131 (pL-LmTau131). De todas estas clonas se extrajo el DNA plasmídico (con el kit de Macherey-Nagel), y la caracterización se realizó por digestión con enzimas de restricción y secuenciación.

Posteriormente, se hizo un midiprep para la obtención de DNA plasmídico a mayor escala. Para ello se inocularon 500 ml de medio LB más ampicilina 100 µg/ml con las células transformadas con pN-LmTau131 y pL-LmTau131 y se incubaron a 250 rpm a 37°C. La extracción se realizó empleando el kit Nucleo Bond Xtra Midi plus (Macherey-Nagel), siguiendo las recomendaciones del fabricante. Se hicieron pruebas de restricción con la enzima *Bam*HI para verificar, mediante electroforesis, el tamaño correcto de vector e inserto. Este DNA fue utilizado para electroporar células de *L. major* en cultivo.

4.6. Cultivo de *L. major*

Promastigotes de la cepa *L. major* Friedlin fueron crecidos a 28°C en medio líquido BM que contiene medio M199 0.5x, bicarbonato de sodio 1.1 g/l, infusión de cerebro corazón 0.25x, suero fetal bovino inactivado 10% (Byproducts), HEPES 40 mM, hemina 0.01 mg/ml, biotina 2 mg/l y penicilina (100 U/ml)-estreptomina (0.1 mg/ml). Los cultivos fueron resembrados una vez que alcanzaron la fase estacionaria.

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

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

4.7. Transfección de *L. major* por electroporación

Para realizar la transfección por electroporación, 1×10^8 promastigotes de la fase media logarítmica se centrifugaron a 4,000 rpm durante 10 min a 4°C. La pastilla se lavó con 10 ml de PBS-G (NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM, Na_2HPO_4 10 mM, KH_2PO_4 2 mM, complementado con 6 mM de glucosa, pH 7.4) y se centrifugó nuevamente. Los parásitos fueron resuspendidos en 10 ml de amortiguador Cytomix (HEPES 25 mM pH 7.6, KCl 120 mM, CaCl_2 0.15 mM, $\text{K}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$ 10 mM pH 7.6, EDTA 2 mM, MgCl_2 5 mM). Las células fueron centrifugadas, resuspendidas en 400 μl de amortiguador cytomix y transferidas a una cubeta de electroporación de 4 mm (Electroporation Cuvettes Plus™, BTX®) donde se mezclaron con 25 μg de DNA plásmidico pN-LmTau131 o pL-LmTau131. Después de incubar en hielo por 10 min, se aplicó un pulso de 1600 volts, 25 ohms y 50 μF en un equipo ECM Electro Cell Manipulator (BTX®). Posteriormente, se colocaron en hielo por 10 min. Ya realizada la electroporación, los cultivos se colocaron en tubos cónicos de 50 ml que contenían 10 ml de medio BM, se incubaron a 28°C con agitación de 40 rpm. 24 h después se adicionó el fármaco Bleomicina a una concentración de 12.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$. 24 h después se volvió a adicionar Bleomicina, para obtener una concentración final de 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Las células fueron monitoreadas hasta su recuperación y se trasladaron a cajas de cultivo de 25 cm^2 , para obtener así las poblaciones transfectantes estables.

4.8. Obtención de clonas celulares

Una vez que se obtuvieron cultivos transfectados estables (con un ritmo de crecimiento constante) se continuó con la clonación celular. Para esto, las poblaciones se resemebraron cada 24 horas al menos tres veces para mantenerlas en fase media logarítmica. Una vez hecho el conteo celular, se prepararon diluciones de 2000, 1000, 500, 200 y 100 células de las poblaciones transfectantes en 0.5 ml de medio BM. Una vez realizadas las diluciones, las células se expandieron homogéneamente sobre cajas Petri que contenían el medio de cultivo semisólido (agarosa SeaPlaque GTG al 0.8%, suero fetal bovino 20%, Bleomicina 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) y medio BM). La temperatura de incubación fue de 28°C

con 5% de CO₂. Los cultivos se monitorearon hasta la aparición de las primeras colonias (aproximadamente 10 días), las cuales se seleccionaron y transfirieron a placas de 24 pozos con 1 ml de medio BM más Bleomicina. Las placas se dejaron en incubación a 28°C con 5% de CO₂ hasta que se notó un crecimiento celular. Posteriormente, las clonas celulares se transfirieron a cajas de cultivo de 25 ml con medio BM más Bleomicina y se crecieron a 28°C.

Para crio-preservar las líneas celulares, se tomaron 1×10^8 células de cada clona, se centrifugaron a 4,000 rpm durante 10 min a 4°C y cada pastilla fue resuspendida en 1 ml de suero fetal bovino con 10% de glicerol. Las suspensiones celulares se transfirieron a crioviales que se almacenaron a -70°C por 24 h, posteriormente en nitrógeno líquido. 48 h después, algunos crioviales se descongelaron y se diluyeron con 4 ml de medio BM sin fármacos de selección. 24 h después se les agregó la mitad de la concentración de Bleomicina y 48 h después se les adicionó la concentración final del fármaco (5 µg/µL).

4.9. Análisis de la sobre-expresión de LmTau131

4.9.1. Extracción de RNA Total

Se extrajo RNA total de *L. major* de las líneas celulares pN-LmTau131, pL-LmTau131 y silvestre mediante el uso de Trizol (TRI Reagent®, Sigma), siguiendo las recomendaciones del fabricante. Posteriormente, el RNA fue tratado con DNAsa I de Thermo Scientific para eliminar cualquier traza de DNA contaminante.

4.9.2. Síntesis de cDNA

Utilizando 1 µg de RNA tratado con DNAsa I se realizó la síntesis de cDNA para cada una de las muestras, utilizando hexámeros al azar y la transcriptasa reversa SuperScript III Reverse Transcriptase de Invitrogen.

4.9.3. PCR en tiempo real

El cDNA generado se analizó mediante PCR en tiempo real utilizando el kit Platinum Sybr Green qPCR SuperMix-UDG de Invitrogen, y un equipo CFX Touch™ Real-Time PCR Bio-Rad. Los oligonucleótidos empleados para estas reacciones se muestran en la Tabla 3. Todas las reacciones se llevaron a cabo por triplicado, usando oligonucleótidos y

condiciones optimizadas para obtener un producto único y del tamaño correcto. Los datos fueron analizados por el método de $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Los datos se normalizaron utilizando el gen de α -tubulina como el gen de referencia y se graficaron en relación con células silvestres.

Nombre del gen	Nombre de los oligonucleótidos	Secuencia 5' -> 3'	Temperatura de alineamiento	Tamaño del amplicón
LmTau131	LmTau131SE-F8 LmTau131SE-R2	TACTGGGAAAGGCGGGTTTC CGCAAAGTGAGTGAGTGCGA	60°C	116 pb
α -tubulina	Alfa-tub-5' a-tub Lmjrvs	AGAAGTCCAAGCTCGGCTACAC GGTCGTAGATGGCCTCATTG	63° C	147 pb
RNAr 5S	rRNA 5s – 5' rRNA 5s – 3'	GTCGAGTACGACCACACTTG AAGAGTACGGCACTCAGGGT	57° C	119 pb
RNAr-Arg	tRNA-Arg-5' LmtRNAArg-Rv2	ATGTCCGTGTGGCTCAATGG CATCCGTGACAGGATTCG	52° C	72 pb
RNAr-Ala	LmtRNAAla-Fw2 LmtRNAAla-Rv2	GGGGATGTAGCTCAGATGGT TGGAGAAGTTGGGTATCG	53° C	73 pb
RNAr-Met	LmtRNAMet-Fw2 LmtRNAMet-Rv2	GCGAGCGTAGCGCAGTCG TGCGACCGGTGAGGATCG	56° C	72 pb
RNAsn U4	U4 – 5' LmsnRNAU4-Rv2	AAGCCTTGCGCAGGGAGATGT CCCGTGGTGGGATCAAATA	55° C	111 pb

Tabla 3. Lista de oligonucleótidos empleados para reacciones de qPCR.

5. Resultados

5.1. Análisis de la secuencia LmTau131

Tau131 de *L. major* es codificada por un gen de copia única (ID: LmjF.12.0560) localizado en el cromosoma 12. El tamaño del gen es de 4110 pb, con una secuencia predicha de proteína de 1369 aminoácidos y un peso molecular de 149 kDa. Con el objeto de confirmar la identidad de este gen, se realizaron análisis bioinformáticos. El primero de estos fue con HHPred, programa que busca homólogos remotos en una variedad de bases de datos a partir de la secuencia y la estructura predicha de una proteína. Con esta herramienta se determinó con 100% de probabilidad (valor de $E = 5.3E-42$) que nuestra proteína es el ortólogo de Tau131 de *S. cerevisiae* (Fig. 16).

Hitlist

Show Entries Search:

Nr	Hit	Name	Probability	E-value	Score	SS	Aligned cols	Target Length	
<input checked="" type="checkbox"/>	1	6YJ6_A	Transcription factor tau 131 kDa subunit; TFIIIC, tauA, Transcription initiation, Pol III, TFIIIB, Transcription factor,	100	5.3e-42	462.21	70.6	819	1029
<input type="checkbox"/>	2	6AF0_A	Ctr9 protein; Transcription elongation Paf1 Ctr9 Cdc73 crystal structure, TRANSCRIPTION; 2.88A {Myceliophthora thermophi	99.97	2.4e-27	319.94	62.9	456	939
<input type="checkbox"/>	3	4BUJ_F	SUPERKILLER PROTEIN 3; HYDROLASE, DEXH BOX HELICASE, RNA DEGRADATION, TPR, PROTEIN COMPLEX; HET: S04; 3.7A {SACCHAROMYCE	99.97	9.9e-26	317.94	70.1	369	1436
<input type="checkbox"/>	4	6EOU_A	UDP-N-acetylglucosamine--peptide N-acetylglucosaminyltransferase 110 kDa subunit; intellectual disability associated poi	99.96	2.5e-26	276.51	47.9	368	388
<input type="checkbox"/>	5	4M59_B	Chloroplast pentatricopeptide repeat protein 10; pentatricopeptide repeats, superhelical, RNA binding protein, RNA, RNA	99.96	2.2e-24	277.33	63.4	652	718

Figura 16. Resultados de HHPred. En esta lista se muestran las secuencias que pueden ser homólogos a la secuencia blanco, en este caso LmTau131. Se puede ver que el primero de los resultados coincide con Tau131 de *S. cerevisiae* con un valor de E de $5.3E-42$.

Como ya se mencionó, Tau131 cuenta con motivos característicos denominados TPR. La herramienta bioinformática TPRPred sirve para hacer una predicción de la presencia de estos motivos en una proteína de interés. Este programa utiliza una representación de las repeticiones conocidas para detectar TPR y calcula su significancia estadística. Así, en LmTau131 se predijeron 12 motivos TPR en el extremo amino (aminoácidos 41-625), y 6 motivos TPR en el extremo carboxilo (aminoácidos 1069-1292). Se obtuvo un valor de $p=2.8E-17$ de que sí corresponden a TPR y una probabilidad del 100%, y se obtuvo el valor de p de cada repetido individual (Fig. 17).

The sequence name: **LmjF.12.0560**

Per-protein P-value for being TPR: **2.8E-17**

Probability for being TPR: **100.00%**

Repeat	Begin	Alignment	End	P-value
TPR	41	--FEAHVTAAQNSFLRGDSQAAEHEAVQALRIRPTA--	74	2.1e-03
TPR	107	--IVLWEEELLHDFMTQQLYYKSVVCLQRMSALEKNQ--	140	1.3e-03
TPR	144	--RALQLQLADLFIGLGEIRRASNVLVPLWNSRRCR--	177	3.3e-02
TPR	179	--FEVFALLSSLYFQLGKWASLQRLTIESSVKHAFQL--	212	2.4e-04
TPR	322	--PPSSLRPGDTASSTGAHRGGVWHQLYGERIELRS--	355	9.0e-02
TPR	363	--LTLNVHAEELLNEQGNFSDTVQLLRMAAGCLDVD--	396	1.7e-03
TPR	404	--LLVRLGVAYAFLLGGVYEQPCRDFVQLVAHCSME--	437	1.5e-01
TPR	440	--GDVLLDAAMSLQKVSMAEAAQVYVTLARYHQFV--	473	1.9e-03
TPR	480	--QVGVAEAEITLMQDTAPLDQVQAATDALKALKTE--	513	6.2e-01
TPR	522	--AAALQGQASAYARELYEEAKEYAEQVQLLEPTH--	555	8.0e-07
TPR	556	--LQARLLLGRYYFYQRKDTAAAVEVLTPSKHEPAL--	589	3.6e-03
TPR	592	--IQLGVFLVHVFQRAKRYVEAIALGVSIFELLLSS--	625	2.9e-03
TPR	1069	--IALAVAVVECYSAVGFTEAREFAFVALTHFAQK--	1102	9.9e-04
TPR	1111	--GLERPLRLAVLRAALAAAGESEDAYRVGLRLLQQD--	1144	2.6e-01
TPR	1148	--DKRHEVVELMHVSNRCYDRSSILYRAVADGYND--	1181	5.4e-01
TPR	1182	--PALLVLLANRYHQTRSYTRVLNLYLMALRERPSD--	1215	2.9e-06
TPR	1218	--LNFVGLSYLFCSHRKRTRSREACVSAAIYYLTQ--	1251	5.0e-02
TPR	1259	--LEPAVGIGEVLYNIARTLQFLKLYLICIPLYERV--	1292	1.4e-02

Figura 17. Resultados de TPRPred. Predicción de la localización de motivos de TPR a lo largo de LmTau131.

Posteriormente se realizaron alineamientos de las secuencias de Tau131 de *L. major* y *S. cerevisiae*, mediante la herramienta ClustalW para conocer el grado de conservación de los aminoácidos (Fig. 18). El porcentaje de identidad encontrado entre ambas proteínas fue de 20.66%, el cual es relativamente bajo. Sin embargo, en general las secuencias de los factores de transcripción en tripanosomátidos son poco conservadas en relación con otros eucariontes (Srivastava *et al.*, 2018). En la Figura 18 se pueden observar los aminoácidos conservados sombreados en negro y los semiconservados en gris. Debido a que la

secuencia de Tau131 es muy grande, en los alineamientos se analizaron por separado los dominios TPR N-Terminal y TPR C-Terminal. La estructura de LmTau131 fue predicha con la herramienta Phyre², la cual toma la secuencia blanco y hace modelado por homología mediante una búsqueda en bases de datos de cristales ya reportados y arroja resultados de la estructura secundaria y la estructura tridimensional de la proteína blanco. Con esta herramienta se obtuvo la estructura secundaria de los dominios TPR N-Terminal y TPR C-Terminal; sin embargo, la unión de estos dominios, que corresponde al llamado dominio helicoidal, se predijo mediante el programa PsiPred. Como se observa en la Figura 18, tanto en levadura como en *L. major*, Tau131 se conforma principalmente de hélices alfa, las cuales forman los motivos repetidos TPR. A pesar de la poca conservación de los residuos, se puede observar que gran parte de los TPR predichos en *L. major* conservan la posición y la estructura en relación con *S. cerevisiae* (Fig. 18).

La estructura tridimensional de LmTau131 se obtuvo en dos partes, basadas en dos estructuras cristalográficas reportadas en levadura: el dominio TPR N-Terminal (PDB ID: 5AIO) y el dominio TPR C-Terminal (PDB ID: 6YJ6). Para estos modelos se utilizó la herramienta Errat para calcular la calidad de la predicción. En general, se observó que la estructura tridimensional predicha de LmTau131 es muy parecida a la del ortólogo en levadura, pues la mayoría de las hélices alfa coinciden en ambas especies, y las regiones TPR N-terminal y TPR C-terminal forman dominios bien definidos (Fig. 19).

TPR N-Terminal

Lm (23) RREGQRSEFSSSAHSTFEAHVTAQNSFLRGRDSCAADHEAVQARRIRPTAHLR---ALLAVYTAESKQKFDQASDFRLLT-QAFLDARLIVLWEEILLHDFMTQQLYYKSVVGLQRMSAIFKNOERYRALQLQLAD 152
 Sc (120) -----ERVLDPEVAQLLSCANEAFVRNQLQVAERLFNEVI--KKDARNAAAYETLGDITYQLGRLLNDCNSWELAAHLNASTWEEFKIVAILSADLDHVROAIYCESRWISLNPMI--WESTI-YRSM 238

Lm 284 LKIGLQIRIRASNVIVFVNSSRCRDFEVEFALLSSLYFOLGKQWASLQR---LIESVVKHAFQLPTAETVIGAITTAGETMGGHGAATAQVSSSTPGTEQQLSSPPPISSISEQRVSKRVRFEGNDAGEDGAAAPV 284
 Sc 350 LKKKTQLARALDGRFLMYNP-YDANILRELAILYVDYDIEDSIELYMKVFNNVVERREALAALEN-ALDSSDEESAAEGELAD-----EKEEL-EQ-DEEDROMFPDINWKKIDAKY 350

Lm 420 TADLTAPTAPMSLSPAAASDDEFRFDDLISPSPLSHPPSSLRPGDTASSTGAHRGGVVHOLYGERTELRSSQDQKNELTLNVNHPDILNEQGNESDTVQLIRMAAGCLDVLIELPFDLIVRLGVAIAGEGVYD 420
 Sc 450 -----KCIPEHDWSSLNI-LAE---LFTKLAIV---SEV-----DGIKT---IKKCARWTORRE---SDFNDHWFPDSEEDNR--RKNST--FDSLLAAEKEKSYNIFIDIVFVRLGHLRLRINTDNIVE 450

Lm 556 QPCRDFVQCHVAHCSMEIYGDVLLDAMSTQKVSMAEAAQVYVITARYHOFVYDVRVRQVGVAEAEELTMQDTAPLDQVQAATDALKALKTEEADLKTVLAALGGQASAYARLIYBAKEYAEQCVLQLEETHI 556
 Sc 536 A--LNHFQCLY-DEIFSDVADLYEAAATLRAEKYKEAIFFTFLLSLEEWRTTD-----V-----FKPIARCYKEIETSYETAKEYELALAKSEDDI 536

Lm 910 QARILLGRYFYQRKDTIAA---VEVITPSKHE--PALQRTQLGVFLVHVFORAKRYVEAALGVSIFELLSSIEE 230) KDRSRADALRPPVVKRYRGGERNVITDAAAEAGVVKISSIMEGKGVGKRTKASA 910
 Sc 648 DIRVSAEVIYRLNDPEIFKHMLVIVEMRKHQVDEILRLISNE-----KSSN----- (21) KKRTPYDAERERLER---ERRI-----TRWVVDKYEAMKFFELNSGLNEAK- 648

Lm 1043 GAAVGRFNNTIVGQRDRDLAELEGFLIEAEIASAEAEAEASSGNAREVAAGPDRDDEOHDDAMDALPESYEPSPSEVSKQFQIDAMAQLFLAASSFTPGGGVRSVGGGDSACNFWALDABANHNASAAPG--- 1043
 Sc 742 ---QASININW-SGLVDIIFSSVKNFEMKSR---KRVGILRRIKKFNTE-LDF--QIERISKIAFGDSVFEGLMERVITLISA-----TELRGLSYEQFELMEL----- 742

Lm 1169 LPAGTGLEDKVTLREAVVYDGGAGFTALAVVVECYSAVQCFTEA---REAFVVAIHFACKR--RRROMGSGLERPLR---DAVLRALAAAGESEDAYRVGLRLLQQDTAEDKRHEVVELMHSVLRNRCYDR 1169
 Sc 854 -----SIVIAKYQSVEDGLSVVEIAQEVNVEFDPERVYKMFVVKLAIVLCMDDEEEAEENLRGLLNQFQFNKRYLOVEMYSLCRGPSS-----LNILSSTIQK---FFLR-QLKAFDSRYN 854

Lm 1297 -----SSILYRAVA---DGYNDPALLVLLANRYHQRSYTRVILNLYLMALRERPSDILNFMVGLSYLFCSHRRKRTSRREACVSAATYYITQYQODRLADEPAVIGIGVLYNIAARTLQFLKLYYLCTPIYQVYVD 1297
 Sc 990 TEVNGQASITNKEVYVNPVKKSSPYLYIYVWLLYSRGGFSLAQYLTRLEEDPEDDPMVNLMLGLSHIHRAMQRLTAQRHFQIFHGIRLYRYRHKIRKSLYTDLEKQCADYNGRAFHLIGLVSTATEYVNVLEN 990

Lm 1369 LCPPEECTIADQRAARVNLVYVYVWASGNRILALATALQPRSVPNGIAYASPRPPSPFRLKTDGKILNVPSQRTP 1369
 Sc 1025 YDDGK-----LKKHAYNSIIYYQQ-SGNVELADHLMK-----YLSI----- 1025

TPR C-Terminal

1369
1025



Figura 18. Alineamiento de secuencias de Tau131 en *L. major* y *S. cerevisiae*. La secuencia de *L. major* (Lm) y *S. cerevisiae* (Sc) se alinearon y dividieron en tres dominios. Las hélices alfa están representadas por rectángulos y las hojas beta por flechas, arriba para Lm y abajo para Sc. En rojo se indican los aminoácidos que forma parte de motivos de TPR. En el recuadro azul se señala el dominio TPR N-Terminal, donde se encontraron 12 motivos de TPR en *L. major*, comparado con levadura que tiene 10. En amarillo se indica el dominio helicoidal, conformado por hélices alfa pequeñas. En verde se muestra el dominio TPR C-terminal, que en *L. major* contiene seis TPR mientras que en levadura siete. Los aminoácidos conservados están sombreados en negro, y los semiconservados en gris. Los números al extremo derecho corresponden al conteo de aminoácidos en la secuencia. Los números entre los dominios TPR N-terminal y helicoidal corresponden a los aminoácidos no incluidos en el alineamiento.

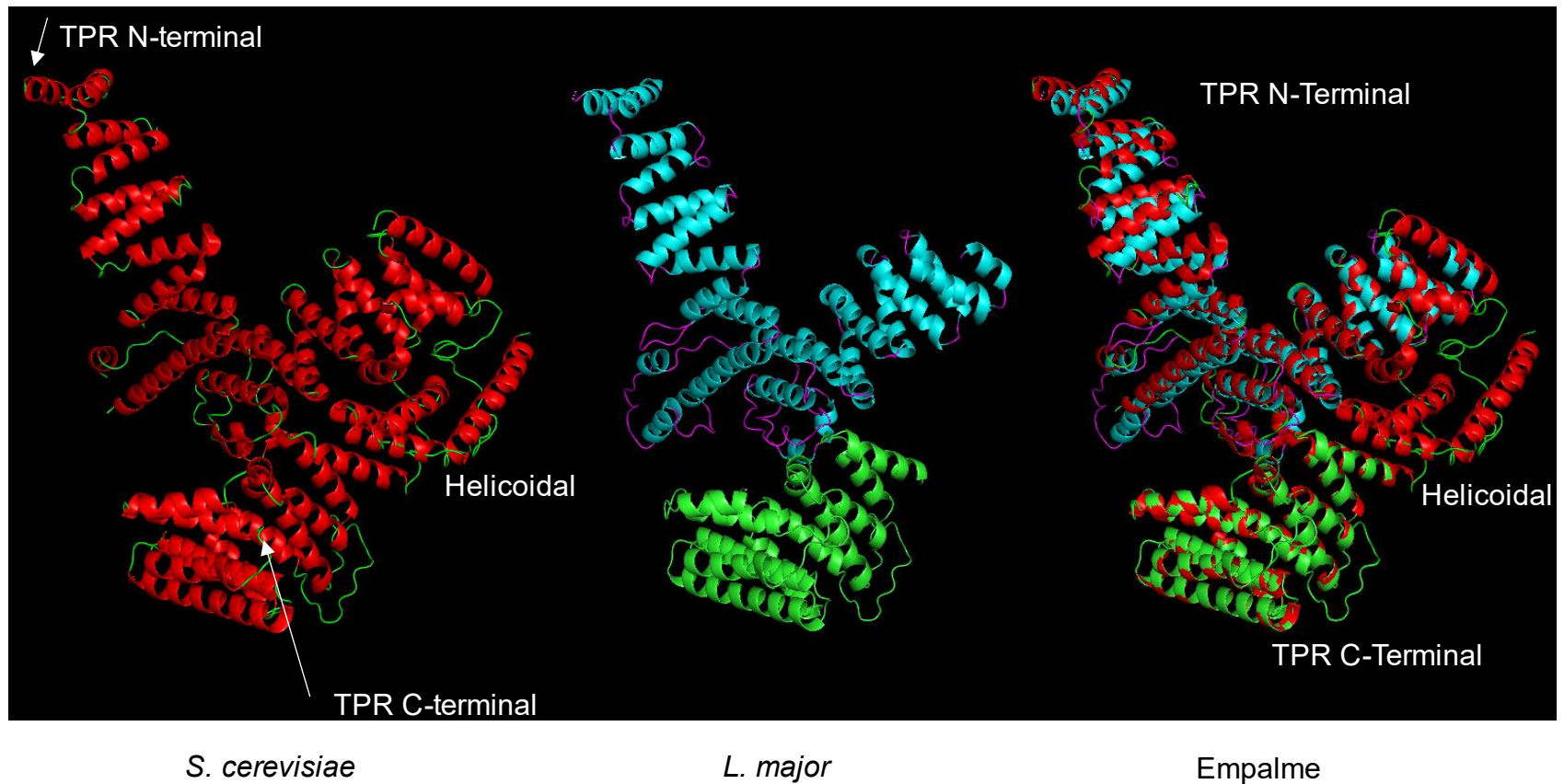


Figura 19. Estructura tridimensional de Tau131. En la imagen de la izquierda se observa la estructura cristalográfica reportada de Tau131 en levadura. En el centro se muestra la estructura predicha para LmTau131, en azul el dominio TPR N-terminal (score 72.08) y en verde el dominio TPR C-terminal (score 66.67). La estructura del dominio helicoidal de LmTau131 no pudo ser predicha. Del lado derecho se muestra el empalme de ambas imágenes.

5.2. Clonación en el vector pGEM-T Easy

Como primer paso para estudiar experimentalmente a Tau131 de *L. major*, su secuencia codificante y su región flanqueante 5' (que contiene el dinucleótido AG y una región rica en pirimidinas que son necesarias para el correcto procesamiento del transcrito por *trans-splicing*) se amplificó mediante PCR para ser clonada en el vector pGEM-T Easy. La región flanqueante 3' no se amplificó ya que los vectores de sobre-expresión donde será insertado el gen ya cuentan con ésta.

Para la amplificación del fragmento se usó DNA genómico de *L. major* como molde y la enzima Kapa HiFi DNA polimerasa, que es de alta fidelidad, a una temperatura de alineamiento de 66°C. Para comprobar que se hubiese amplificado el gen de manera correcta, el producto de PCR se analizó mediante electroforesis, lo que mostró el amplicón del tamaño esperado de 4484 pb (Fig. 20, carril 1).

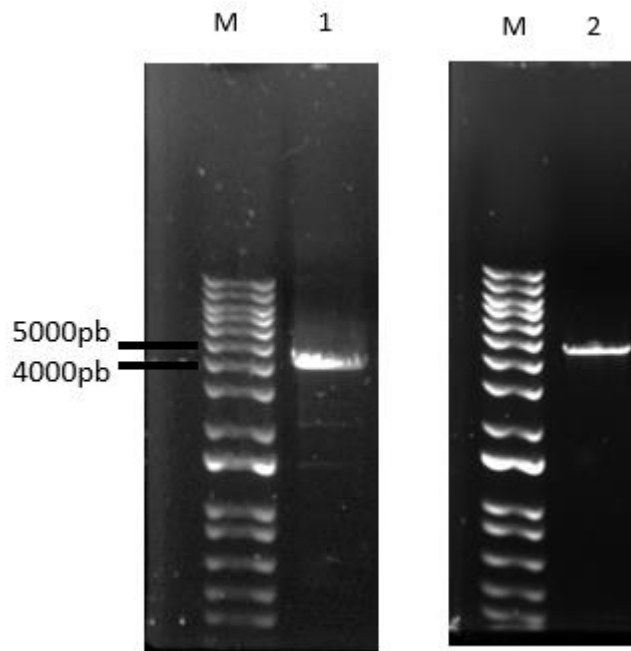


Figura 20. Amplificación por PCR del gen LmTau131 con la enzima Kapa HiFi DNA polimerasa. Carril 1: Producto de PCR de LmTau131. Carril 2: Purificación de producto de PCR de LmTau131. M: Marcador 1 Kb Plus (Invitrogen). Geles de agarosa al 0.8% teñidos con Midory Green.

El DNA obtenido fue posteriormente purificado mediante kit (Fig. 20, carril 2) y adenilado para después ligarlo en el vector pGEM-T Easy. El producto de las reacciones de ligación

se utilizó para la transformación de células electrocompetentes de *E. coli* DH5αE (Invitrogene®). De seis de las colonias obtenidas, y que presumiblemente contenían al vector, se hizo primero un análisis por PCR de colonias, observándose el inserto esperado en cinco de ellas (Fig. 21).

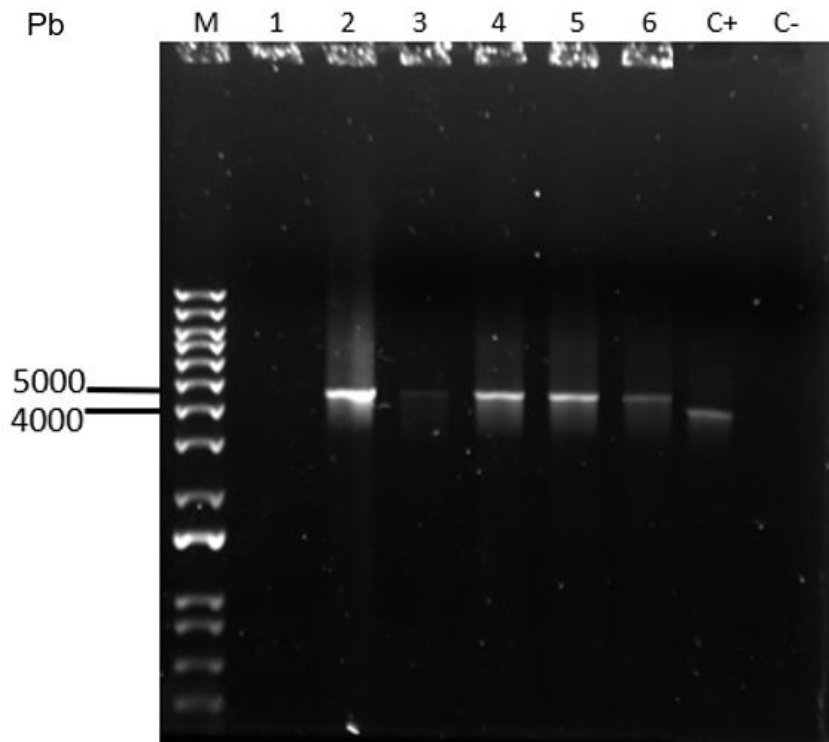


Figura 21. PCR de colonias. Carriles 2-6 muestran una banda positiva para LmTau131. La colonia 1 no mostró amplificación. C+ Control positivo (se utilizó como molde DNA genómico de *L. major*), C- control negativo (se utilizaron todos los componentes para el PCR, sin adicionar ningún DNA molde). El marcador de peso molecular (carril M) corresponde a la escalera de 1 Kb Plus de Invitrogen. Números en pares de bases. Gel de agarosa al 0.8% teñido con Midory Green.

De las colonias positivas se hizo la extracción del DNA plasmídico mediante miniprep (Fig. 22A), el cual fue digerido con la enzima *Bam*HI, cuyos sitios de corte se adicionaron a los oligonucleótidos diseñados para la amplificación del gen. El análisis de las restricciones reveló las dos bandas esperadas, de 4.5 kb (gen LmTau131) y 3 kb (vector pGEM-T Easy) (Fig. 22B).

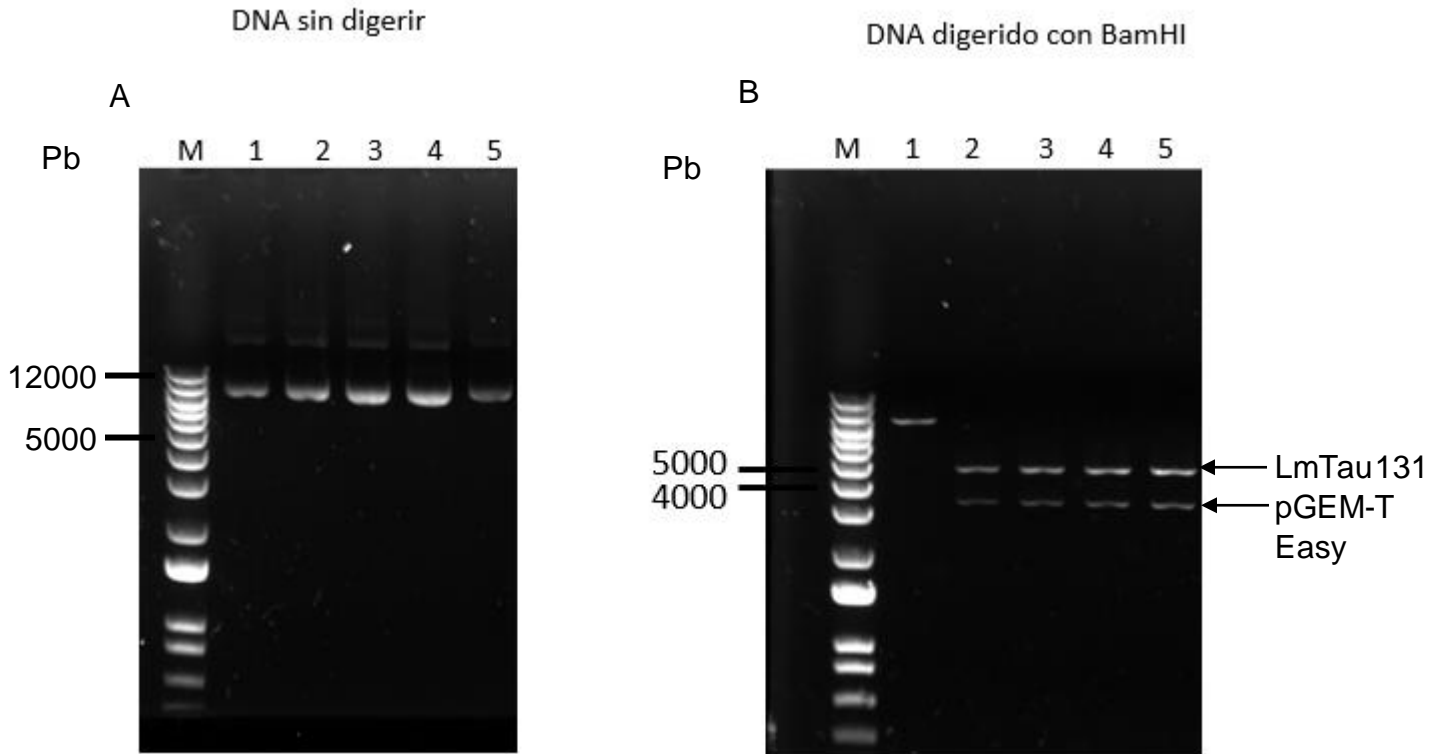


Figura 22. Extracción de DNA plasmídico de colonias por miniprep. En el panel A se observa el análisis de DNA sin digerir obtenido de las 5 colonias. En el panel B, se hizo un análisis de restricción con la endonucleasa *Bam*HI, los carriles 2-5 son positivos para Tau131 con una banda de cerca de 4.4 kb. Geles de agarosa al 0.8% teñidos con Midory Green. El marcador de peso molecular (carril M) corresponde a la escalera de 1 Kb Plus de Invitrogen.

De las clonas obtenidas se seleccionó una al azar y se envió a secuenciar. Con base en los resultados obtenidos se comprobó que el gen amplificado, clonado y multiplicado en bacterias no contenía ninguna mutación. De esta forma, se obtuvo el vector pGE-LmTau131SE (Fig. 23).

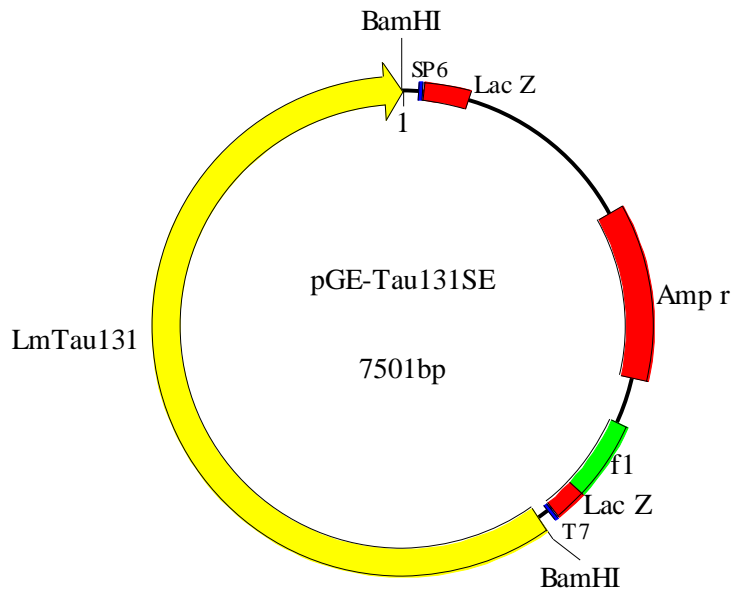


Figura 23. Mapa del vector pGE-LmTau131SE. Se indican los sitios de corte de *Bam*HI, el inserto de LmTau131 y el gen de resistencia a ampicilina.

5.3. Subclonación de LmTau131 en los vectores de sobre-expresión

Para generar los vectores de sobre-expresión con el fragmento de interés, primero se digirió el vector pGE-LmTau131SE con la enzima *Bam*HI para liberar LmTau131 (Fig. 24). Después, para asegurar que no hubiera contaminación del vector pGEM-T Easy este se digirió con la enzima *Sca*I, para conseguir una mayor separación entre las bandas y facilitar el aislamiento de LmTau131 (Fig. 25).

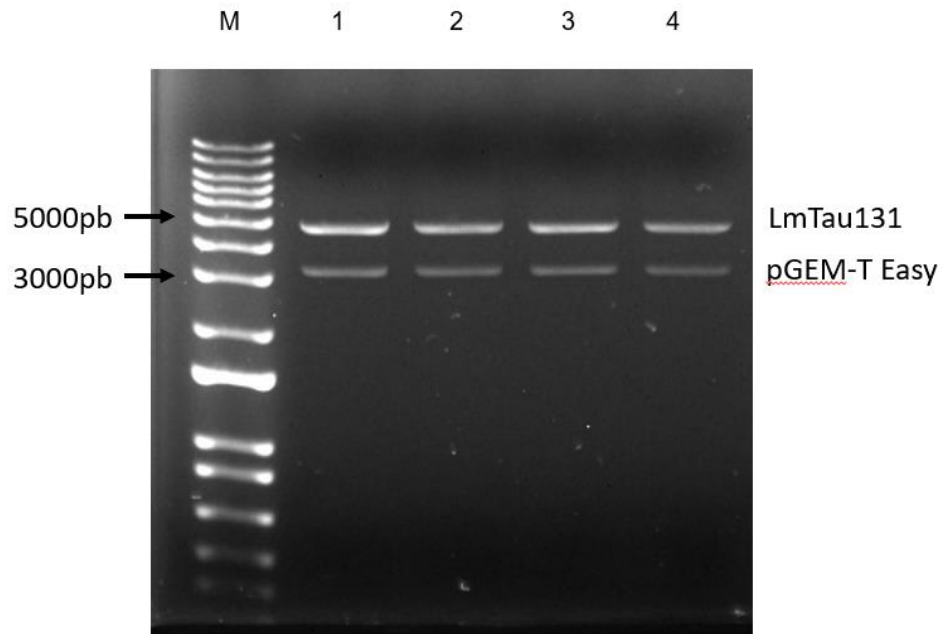


Figura 24. Digestión de pGE-Tau131SE con *Bam*HI. En los carriles 1-4 se muestra el DNA digerido de las cuatro reacciones realizadas. El marcador de peso molecular (carril M) corresponde a la escalera de 1 Kb Plus de Invitrogen. Gel de agarosa al 0.8% teñido con Midory Green.

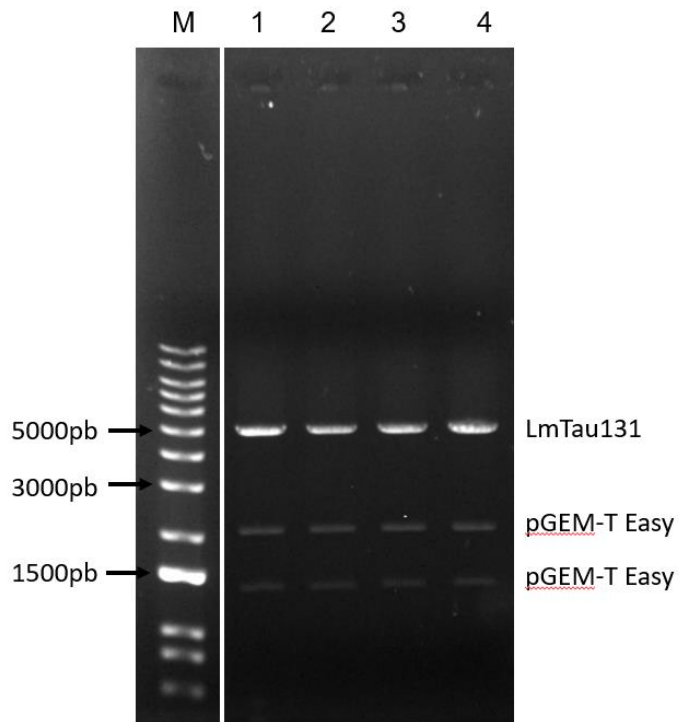


Figura 25. Digestión de pGE-LmTau131SE/*Bam*HI con *Scal*. En los carriles 1-4 se muestran las cuatro digestiones realizadas. El marcador de peso molecular (carril M) corresponde a la escalera de 1 Kb Plus de Invitrogen. Gel de agarosa al 0.8% teñido con Midory Green.

Posteriormente, se hizo la purificación del gen a partir de un gel de agarosa. Una vez purificado, se analizó por electroforesis y se confirmó que sólo se obtuvo el inserto deseado, sin contaminación del vector pGEM-T Easy (Fig. 26). Se procedió entonces a la digestión con *Bam*HI de los vectores de sobre-expresión (pNBUC y pLMRIB), y a su purificación. Se analizaron en un gel para confirmar que estaban linealizados y con el tamaño esperado, que es de 8244 pb para pLMRIB y de 7923 pb para pNBUC (Fig. 27).

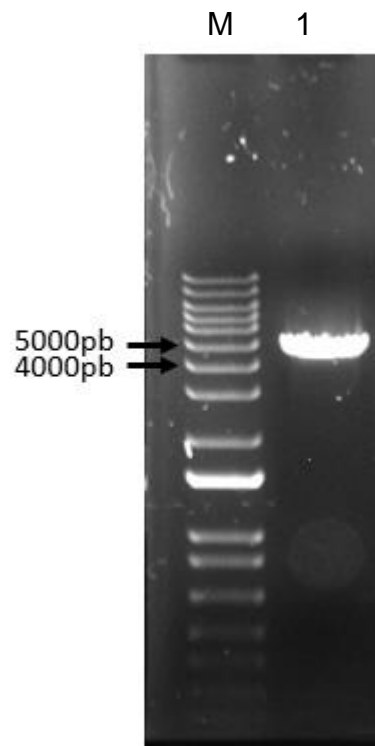


Figura 26. Purificación de LmTau131. El fragmento (carril 1) fue obtenido de la digestión del vector pGE-LmTau131SE. El marcador de peso molecular (carril M) corresponde a la escalera de 1 Kb Plus de Invitrogen. Gel de agarosa al 0.8% teñido con Midory Green.

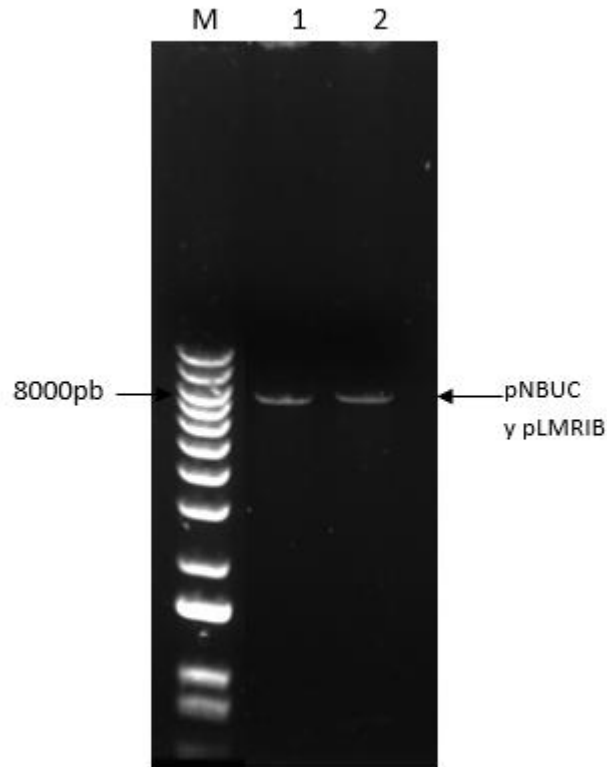


Figura 27. Vectores pNBUC (carril 1) y pLMRIB (carril 2) purificados de gel, obtenidos de la digestión con *Bam*HI. El marcador de peso molecular (carril M) corresponde a la escalera de 1 Kb Plus de Invitrogen. Gel de agarosa al 0.8% teñido con Midory Green.

El inserto de LmTau131 fue ligado en los dos vectores y se transformaron células electrocompetentes de *E. coli* DH5 α E, de las cuales se obtuvieron 31 colonias para el vector pNBUC y 17 para pLMRIB. El DNA obtenido de las colonias mediante kit de miniprep fue digerido primero con la enzima *Bam*HI para confirmar que se encontrara el inserto y se analizaron en gel. De las colonias analizadas con el vector pNBUC, 12 fueron positivas, observándose la banda del inserto (4.5 kb) y del plásmido (8 kb) (Fig. 28). Con el vector pLMRIB, siete clonas fueron positivas (Fig. 29). Así se obtuvieron los vectores pN-LmTau131 y pL-LmTau131 (Fig. 30).

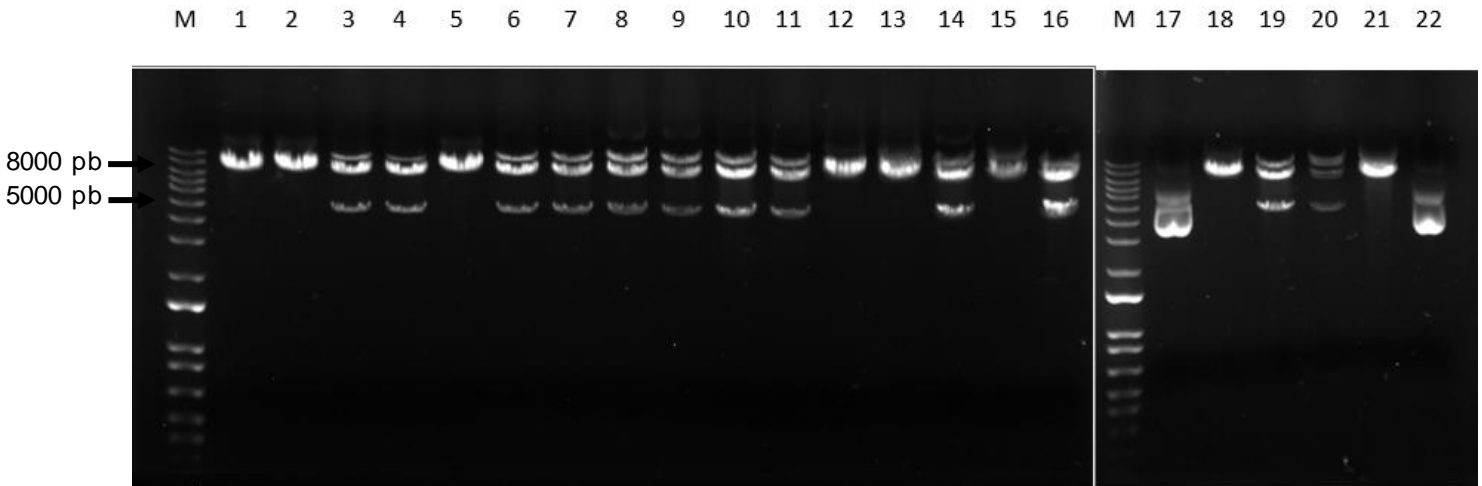


Figura 28. Análisis de restricción del vector pN-LmTau131 con *Bam*HI. Carriles 1-22 indican el número de la colonia analizada. Las colonias 3, 4, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 14, 16, 19 y 20 muestran la banda de LmTau131SE (4.5 kb) y la del vector (8 kb). El marcador de peso molecular (carril M) corresponde a la escalera de 1 Kb Plus de Invitrogen. Gel de agarosa al 0.8% teñido con Midory Green.

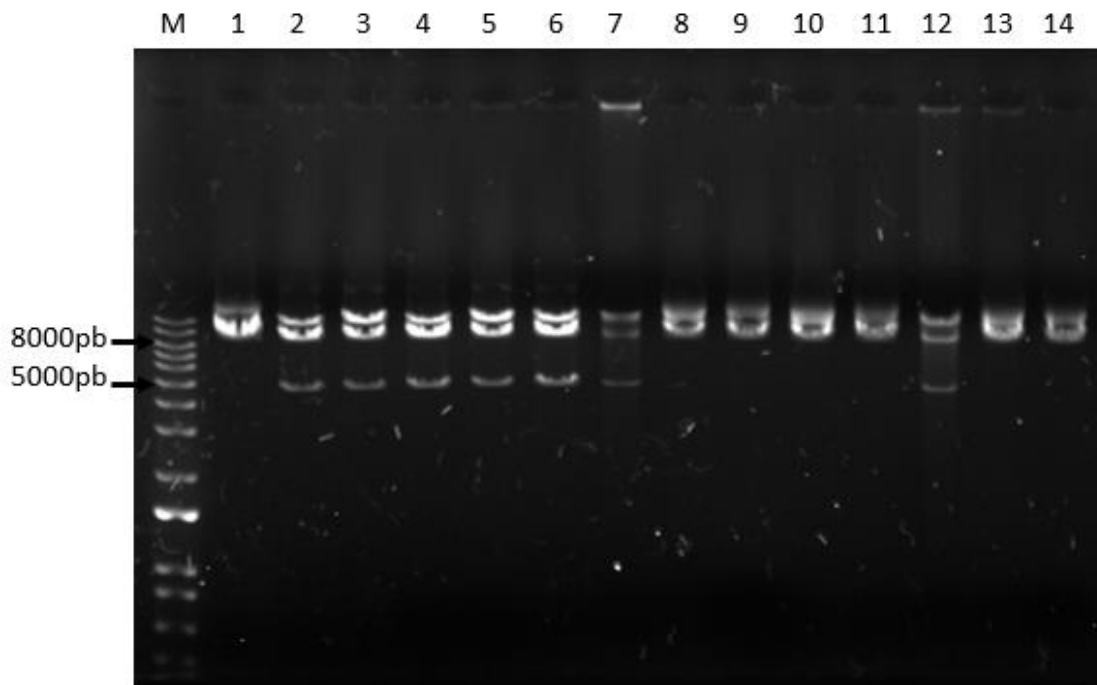


Figura 29. Análisis de restricción del vector pLMRIB-LmTau131 con *Bam*HI. Carriles 1-14 indican el número de la colonia analizada. Las colonias 2, 3, 4, 5, 6, 7 y 12 muestran la banda de LmTau131SE (4.5 kb) y la del vector (8 kb). El marcador de peso molecular (carril M) corresponde a la escalera de 1 Kb Plus de Invitrogen. Gel de agarosa al 0.8% teñido con Midory Green.

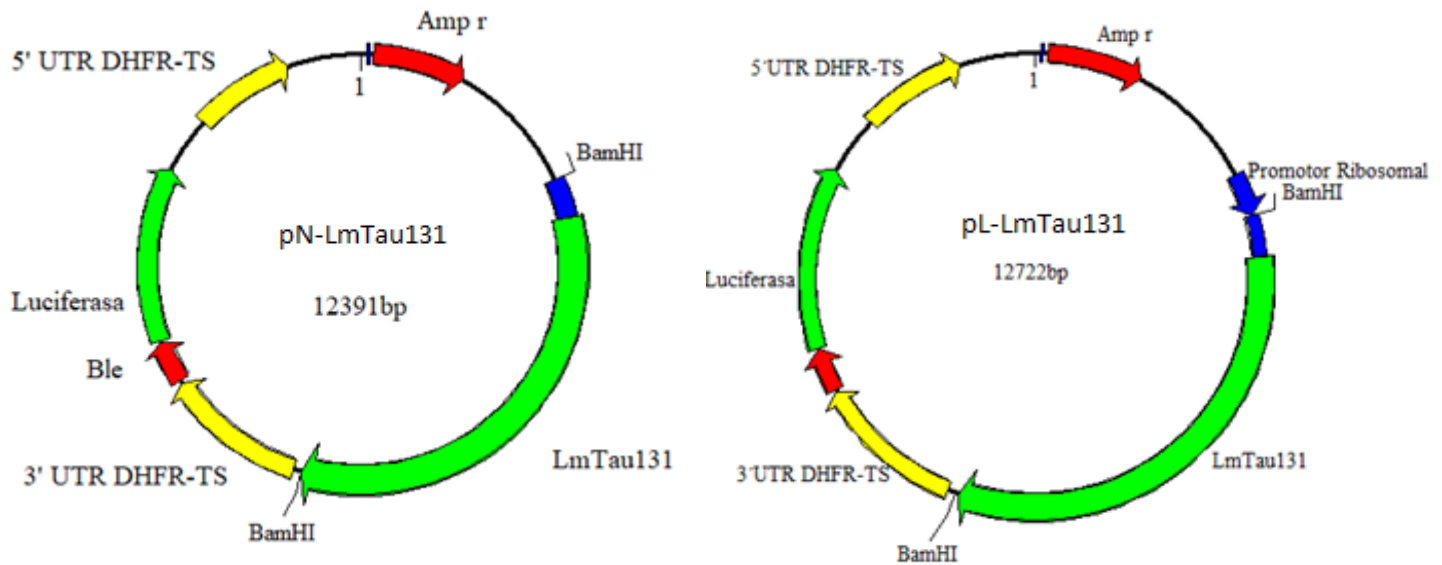


Figura 30. Mapa de los vectores pN-LmTau131 y pL-LmTau131. Se señalan los elementos del vector: el gen de resistencia a ampicilina (Amp-r), regiones UTR 5 y 3' del gen DHFR-TS, el gen de resistencia a bleomicina (Ble), el gen de luciferasa y los sitios de corte de *Bam*HI.

5.4. Transfección de *L. major*

Una vez que se confirmó que se tenían los plásmidos correctos, se procedió a transfectar, por duplicado, células de *L. major* con los vectores de sobre-expresión pN-LmTau131 y pL-LmTau131. Los cultivos transfectados fueron seleccionados con bleomicina.

Una vez que se obtuvieron los cultivos transfectados establemente, se hicieron extracciones de DNA para verificar que las células contaran con el plásmido correspondiente. En la Fig. 31 se muestra la integridad del DNA genómico (DNAg) extraído de los diferentes cultivos.

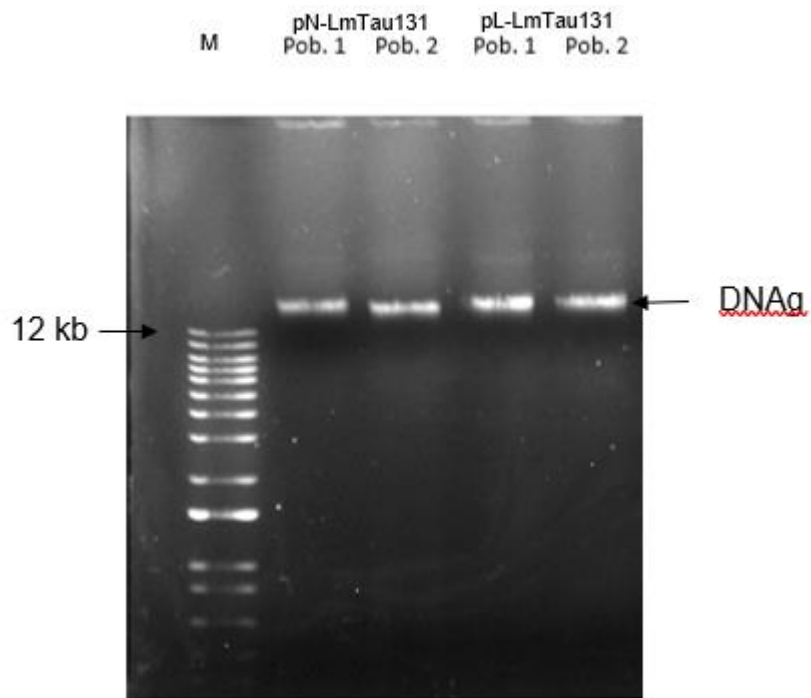


Figura 31. Análisis del DNAg extraído de células de *L. major* transfectadas. Marcador 1kb Plus. Gel de agarosa 0.8%. Pob.: Población.

Ya que se confirmó el buen estado del DNAg se procedió a caracterizar mediante PCR que las poblaciones tuvieran efectivamente los plásmidos. Para ello se utilizaron los juegos de oligonucleótidos que se muestran en la Tabla 4, que amplifican parte del vector y del gen subclonado (Fig. 32). Primero se amplificó una parte del gen de resistencia a bleomicina de 129 pb, utilizando los oligonucleótidos BleqFW y Bleq Rv. En la Fig. 33 se muestra que las poblaciones analizadas amplificaron correctamente esta parte del vector.

Vector	Oligonucleótidos	Tamaño de amplicón
pN-LmTau131	M13 Rev + LmTau131SE-R	4618 pb
	LmTau131SE-F8 + Bleq Rv	2566 pb
pL-LmTau131	M13 Rev + LmTau131SE-R	4949 pb
	LmTau131SE-F8 + Bleq Rv	2566 pb

Tabla 4. Oligonucleótidos utilizados para caracterizar clones de *L. major*.

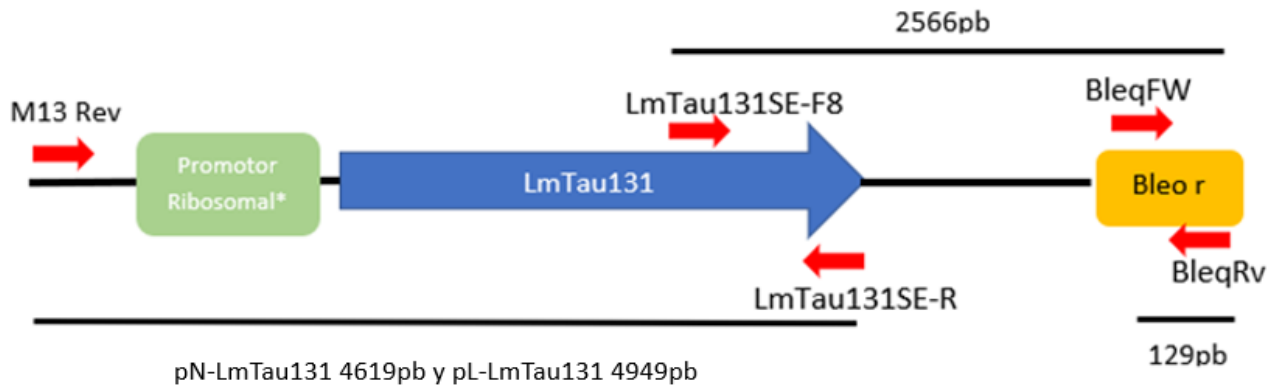


Figura 32. Sitio de unión de oligonucleótidos en las regiones de interés de los vectores pN-LmTau131 y pL-LmTau131. Se ilustra la unión de los oligonucleótidos en los vectores con el inserto, además del tamaño de los productos de PCR. *El promotor ribosomal sólo está presente en el vector pL-LmTau131.

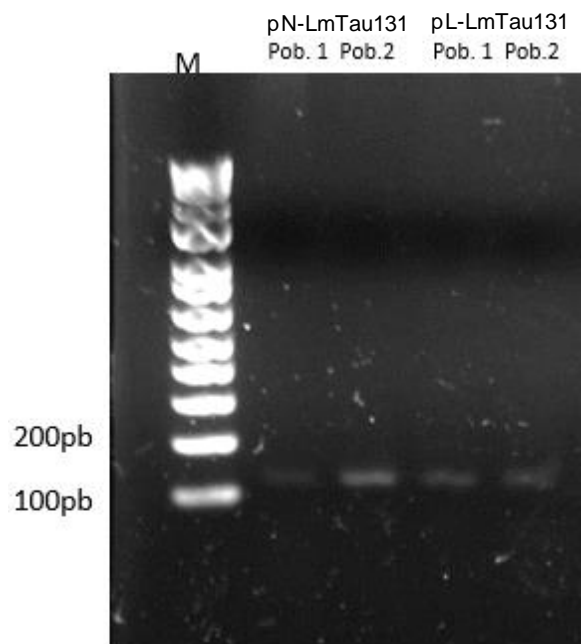


Figura 33. Análisis de PCR de poblaciones de *L. major*. Utilizando los oligonucleótidos BleqFW y Bleq Rv se amplificó una parte del gen de resistencia a bleomicina. Todas las poblaciones analizadas fueron positivas. M: Marcador 1kb Plus. Gel de agarosa 0.8%.

También se utilizaron otros pares de oligonucleótidos que amplifican parte del gen Tau131 y parte del vector (Fig. 34). Primero se utilizaron los oligonucleótidos M13 Rev y LmTau131SE-R, que amplifican una banda de 4618 pb en el vector pN-Tau131 (Fig. 34A). Para el vector pL-LmTau131 se usaron los oligonucleótidos LmTau131SE-F8 y Bleq Rv (ver

Tabla 4 y Fig. 31) que amplifican un fragmento de 2566 pb (Fig. 34B). En todos los casos se observaron las bandas esperadas.

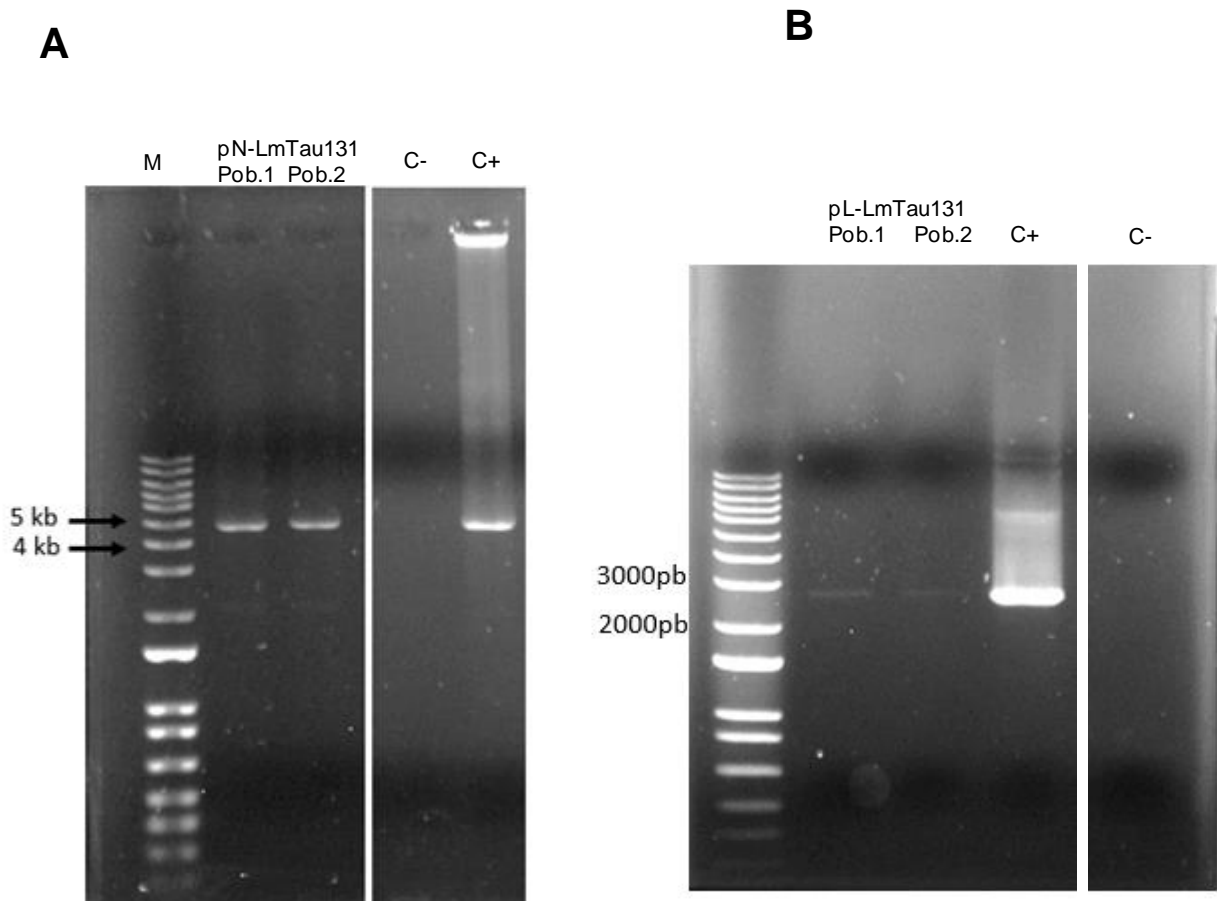


Figura 34. Caracterización de poblaciones de *L. major* transfectadas con pN-Tau131 y pL-Tau131. **(A)** Amplificación por PCR de DNAg extraído de poblaciones con el vector pN-Tau131, utilizando los oligonucleótidos M13 Rev y LmTau131SE-R. **(B)** Caracterización de poblaciones con el vector pL-Tau131-S con oligonucleótidos LmTau131SE-F8 y Bleq Rv. Marcador 1kb Plus. Geles de agarosa 0.8%.

5.5. Obtención de clones celulares

El siguiente paso fue obtener clones celulares a partir de las poblaciones transfectantes de *L. major*. Para ello se hizo plaqueo en medio semisólido y se aislaron seis colonias individuales por cada construcción. Para caracterizarlas, se tomaron dos clones por cada construcción y se analizaron tal como se hizo con las poblaciones: se realizó una extracción de DNAg (Fig. 35) y se hicieron pruebas de PCR (Fig. 36). En todos los casos se obtuvieron las bandas con los tamaños esperados. De acuerdo con el tamaño de los fragmentos obtenidos como se ilustró en la figura 32, el inserto sí se encuentra en la orientación deseada.

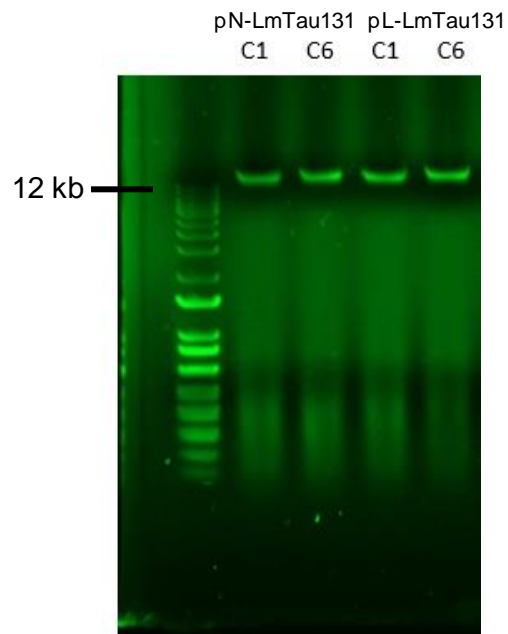


Figura 35. Integridad de DNAg de clones celulares de *L. major*. C: clona. Marcador 1kb Plus. Gel de agarosa 0.8%.

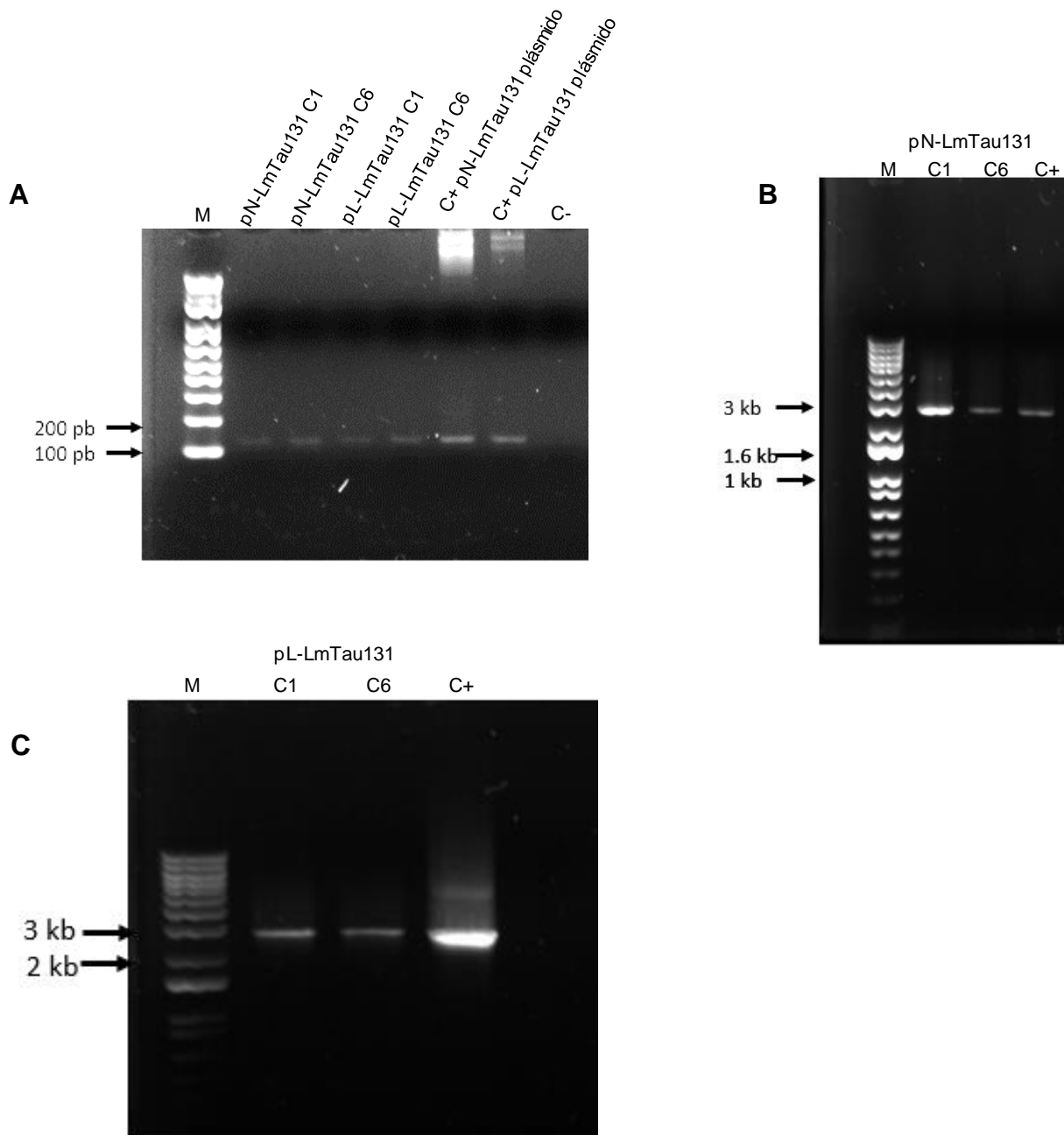


Figura 36. Análisis de clonas celulares. **(A)** PCR de clonas seleccionadas utilizando los oligonucleótidos BleqFW y Bleq RV que amplifican el gen que confiere resistencia a Bleomicina. **(B)** PCR de clonas amplificando con oligonucleótidos LmTau131SE-F8 + Bleq Rv. **(C)** PCR usando oligonucleótidos LmTau131SE-F8 + Bleq Rv.

5.6. Análisis de la sobre-expresión

Una vez que se confirmó que se contaba con clones de cultivos de *L. major* que contenían los vectores de interés con el gen de LmTau131, se procedió a hacer el análisis de la sobre-expresión. Como primer paso, se hicieron extracciones de RNA total de células de *L. major* silvestres (control) y transfectadas con las construcciones pN-LmTau131 y pL-LmTau131. En la figura 37 se observa un gel de agarosa donde se corrió el RNA total extraído para verificar su integridad.

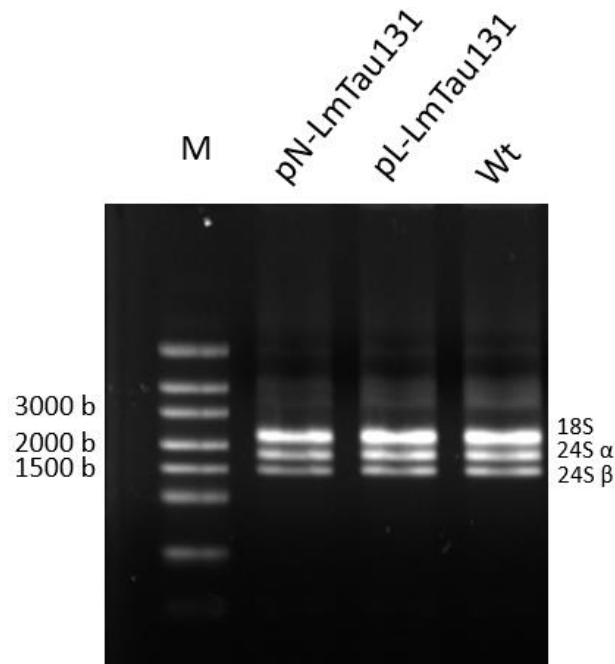


Figura 37. RNA total aislado de *L. major*. Se muestra la integridad del RNA extraído de cultivos de *L. major*. WT: silvestre. Se indican las tres moléculas mayores del RNA ribosomal. Electroforesis en un gel de agarosa al 1.2%, no desnaturizante. El marcador corresponde a Rlboruler High Range de Thermofisher.

Antes de ser retrotranscrito para obtener cDNA y realizar el análisis de sobre-expresión, el RNA fue tratado con DNAsa I para eliminar trazas de DNA contaminante. En la figura 38 se observan los resultados de un PCR utilizando los oligonucleótidos que amplifican un fragmento de 147 pb del gen de α -tubulina para comprobar que no existe DNA contaminante.

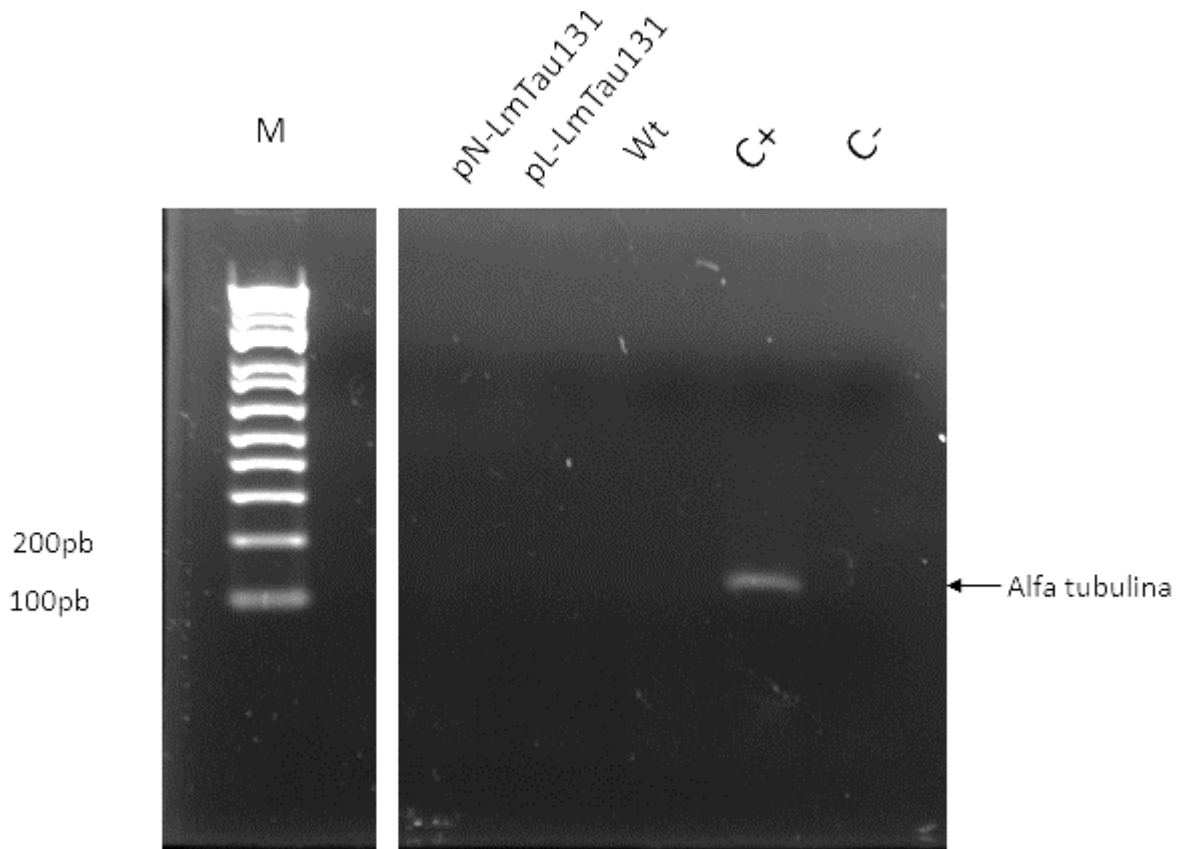


Figura 38. PCR de RNA total tratado con DNasa I. Wt: silvestre, C+: control positivo, DNAg, C-: Control negativo, agua.

Una vez que se comprobó que el RNA total no se encontraba contaminado con DNA se hizo la transcripción reversa para obtener cDNA. Ya que se obtuvo, se realizó una cuantificación relativa del gen LmTau131 mediante qPCR, para así comparar la expresión de este gen en cultivos transfectantes y silvestre. Se observó que con el vector pNBUC aumentó más de 60 veces la expresión de LmTau131, y con pLMRIB aumentó más de 32 veces, en comparación con la línea silvestre (Fig. 39). Confirmamos que las líneas celulares obtenidas sobre-expresan a LmTau131. Una vez observado este cambio en la expresión de LmTau131, se procedió a hacer la cuantificación relativa de algunos transcritos dependientes de la RNA Pol III.

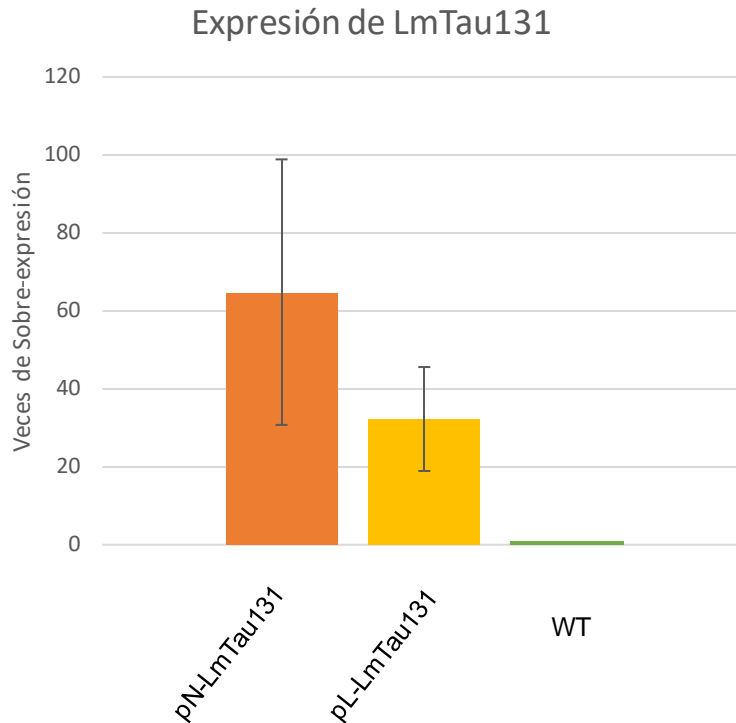


Figura 39. Expresión relativa de LmTau131 en las líneas celulares pN-LmTau131 y pL-LmTau131. Se muestra la expresión del gen LmTau131 en comparación con la línea silvestre (WT).

Los oligonucleótidos empleados para todas estas reacciones se mostraron previamente (ver tabla 3). Todas las reacciones se llevaron a cabo por triplicado, usando oligonucleótidos y condiciones que previamente habían sido optimizadas para obtener un producto único y del tamaño correcto (Fig. 40 A-F).

Todos los datos fueron analizados por el método de $2^{-\Delta\Delta C_t}$. La normalización se hizo con α -tubulina como gen de referencia. Los resultados se graficaron en relación con células silvestres (Fig. 41). Como se puede observar, en la línea celular pL-LmTau131 hubo un incremento en la abundancia del RNAr 5S, RNAt-Met, RNAt-Ala y el RNAsn U4, en comparación con el cultivo silvestre. De manera contraria, con la línea celular pN-LmTau131 se vio una ligera disminución en la abundancia de la mayoría de los transcritos analizados (Fig. 41). Los datos se analizaron estadísticamente con la prueba t de student. No se encontró diferencia significativa entre las líneas transfectadas en comparación con la silvestre.

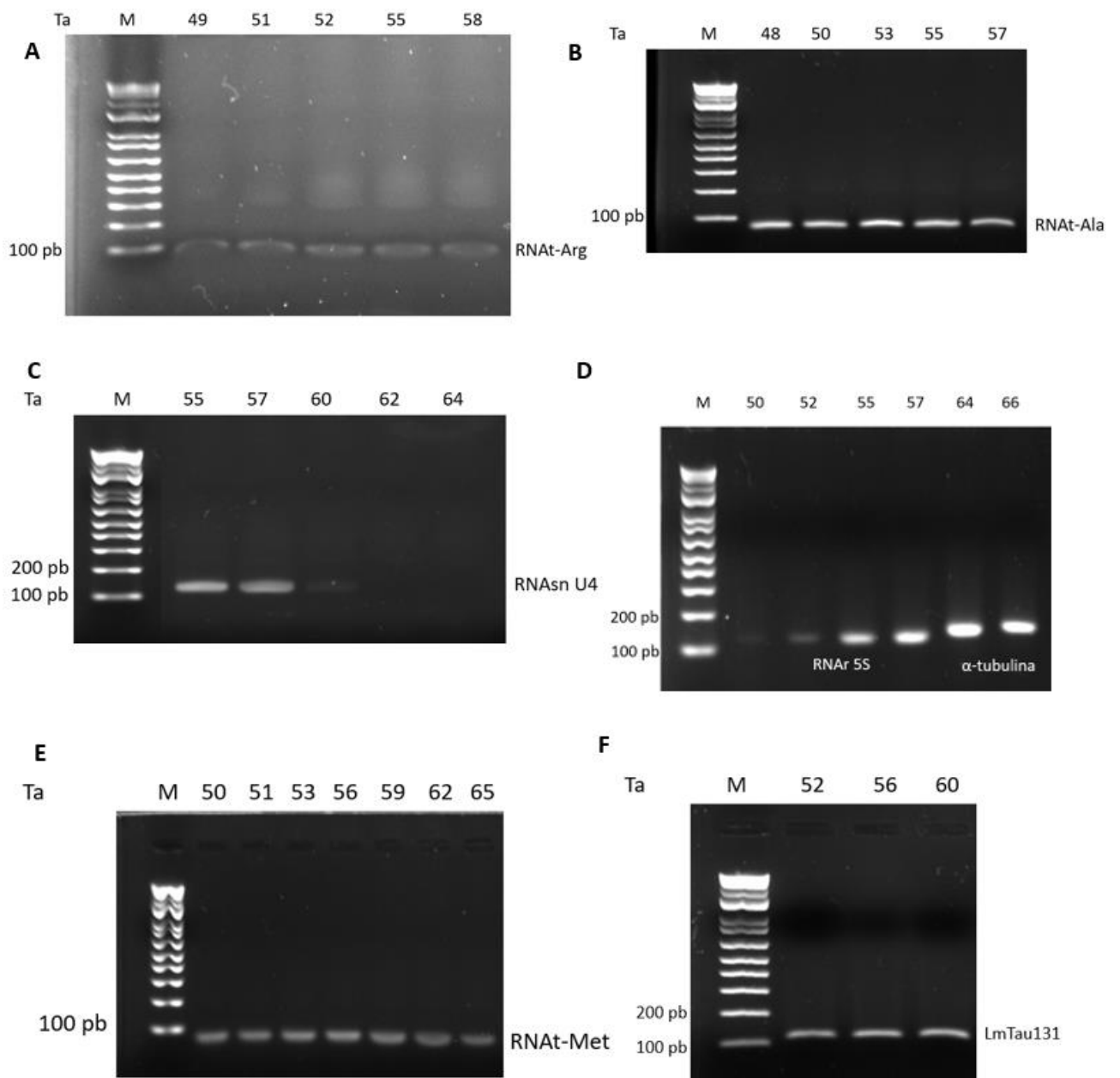


Figura 40. Optimización de condiciones de PCR. Se muestran los productos amplificados para RNAt-Arg (panel A), RNAt-Ala (B), RNAsn U4 (C), RNAr 5S y α -tubulina (D), RNAt-Met (E) y LmTau131 (F). Sobre los carriles se indica la temperatura de alineamiento. El marcador utilizado en todos los casos es 1 kb Plus de Invitrogen. Geles de agarosa al 2% teñidos con bromuro de etidio.

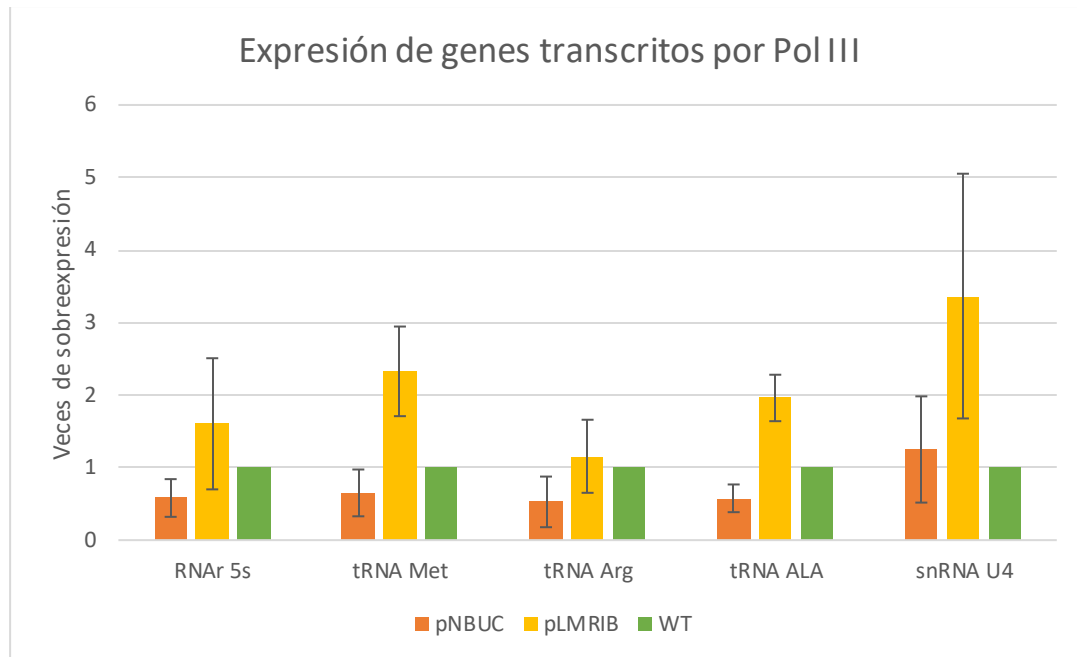


Figura 41. Expresión relativa de genes dependientes de la RNA Pol III en las líneas que sobre-expresan a LmTau131. Se muestra las veces de sobre-expresión de los genes analizados en cultivos transfectados en comparación con el silvestre. Las barras representan la desviación estándar. WT: silvestre.

Por último, se comparó el ritmo de crecimiento entre células que sobre-expresan y silvestres. Para esto se contaron las diferentes líneas celulares durante siete días, por triplicado, para ver si existía alguna diferencia (Fig. 41). Aunque las células transfectantes comenzaron con un crecimiento más lento, a las 120 horas el número de células ya era un poco mayor que en el cultivo silvestre. A las 168 horas, el número celular volvió a ser un poco menor que el control. En resumen, el crecimiento de los cultivos transfectantes fue similar al del cultivo silvestre.

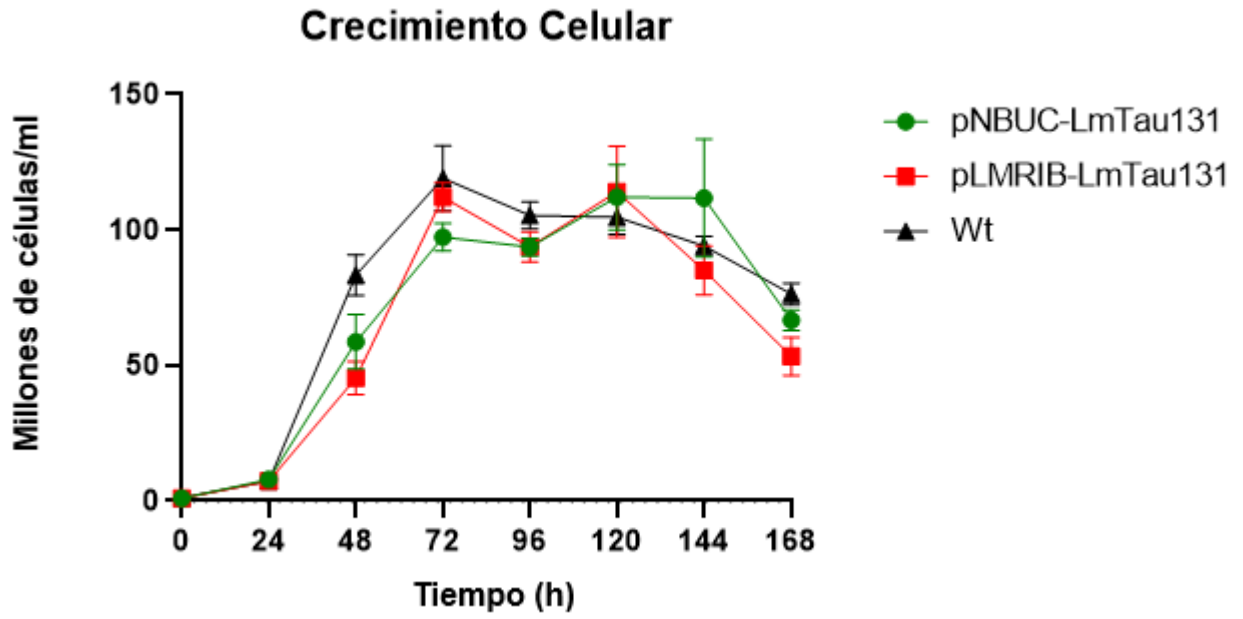


Figura 42. Crecimiento celular. Curvas de crecimiento de los distintos cultivos de *L. major*.

6. Discusión

Los tripanosomátidos son un grupo de parásitos protozoos de divergencia temprana causantes de enfermedades graves potencialmente mortales como la leishmaniasis o la enfermedad de Chagas, que la OMS clasifica como enfermedades tropicales desatendidas. Estos parásitos afectan las zonas tropicales y subtropicales de prácticamente todo el mundo. Los estudios moleculares de procesos claves y cardinales como la replicación, la transcripción y la traducción contribuyen a una mejor comprensión de la biología básica de estos organismos, lo cual es necesario para desarrollar estrategias de control a mediano y largo plazo de estos parásitos y sus vectores. En todos los organismos, la transcripción la llevan a cabo las RNA Polimerasas, enzimas que se especializan en leer el DNA para producir moléculas de RNA. Las bacterias y las arqueas tienen sólo una RNA Pol, mientras que los eucariotas tienen diferentes tipos de RNA polimerasas, cada una responsable de sintetizar un conjunto diferente de moléculas de RNA.

RNA Pol III juega un papel importante en el desarrollo de células eucariotas. Es responsable de sintetizar diversos tipos de moléculas de RNA esenciales para la viabilidad celular, como los RNAt, el RNAr 5S y el RNAsn U6, involucrados en la traducción y en el procesamiento de RNAm. Además, RNA Pol III también transcribe otras moléculas de RNA importantes, como el RNA pequeño nucleolar R52 (R52sn), el cual es un RNA no codificante que juega un papel en la modificación de los RNAsn; el RNA de la RNase P (RPR1), una endonucleasa que escinde los pre-RNAt para producir extremos 5' maduros; y el RNA 7SL, componente de la partícula de reconocimiento de señal (SRP, *signal recognition particle*), la cual dirige integralmente proteínas membranales y secretoras a la maquinaria de translocación de proteínas celulares durante la traducción (Turowski y Tollervey, 2016; Hoffmann *et al.*, 2015).

Para iniciar la transcripción, deben darse las condiciones necesarias para la formación del PIC. Los factores de transcripción son moléculas que regulan el nivel de transcripción, uniéndose directamente al DNA para crear las condiciones óptimas para que la RNA Pol se una al promotor y así iniciar la transcripción génica. TFIIIC es un factor general de transcripción de la RNA Pol III que se ha estudiado ampliamente en levaduras y humanos. Su principal función es reconocer elementos promotores (ya sea directamente en el caso

de los promotores de tipo 2, o con la ayuda de TFIIIA en el caso de los promotores de tipo 1), para reclutar a TFIIIB y contribuir así al acarreamiento de RNA Pol III. TFIIIC tiene otros papeles importantes, como la remodelación tridimensional del genoma, la cual logra al reclutar a cohesina y condensina II, regulando así la formación de bucles de cromatina. Además, en humano se ha visto la unión de TFIIIC a elementos Alu, controlando así la expresión mediante bucles de cromatina y acetilación de histonas. Sin embargo, el conocimiento que se tiene sobre TFIIIC en organismos de divergencia temprana como los tripanosomátidos es prácticamente inexistente. De hecho, el análisis inicial de la secuencia de los genomas de los tripanosomátidos indicó que estos organismos no presentaban ninguna de las seis subunidades de TFIIIC (Berriman *et al.*, 2005; El-Sayed *et al.*, 2005; Ivens *et al.*, 2005).

Sin embargo, resultados de nuestro grupo de trabajo permitieron la identificación de ortólogos probables de las subunidades Tau95 y Tau131 en *L. major* (Florencio-Martínez *et al.*, 2021). Así, en el presente trabajo se inició el estudio molecular de Tau131 en este parásito.

Los análisis *in silico* de la secuencia de LmTau131 que se realizaron demostraron que existe una gran probabilidad de que efectivamente se trate de un ortólogo de Tau131 de *S. cerevisiae*, pues con la herramienta de HHPred se obtuvo un valor de $E = 5.3E-42$ y probabilidad del 100% (Fig. 16). Con base en estos primeros hallazgos se realizaron otros análisis. Como se mencionó, Tau131 ha sido descrito ya en levadura y se caracteriza principalmente por motivos TPR, que son repetidos de secuencias que se encuentran en gran parte de la proteína. TPRPred es una herramienta que, mediante el análisis de una secuencia blanco, predice la presencia de los motivos de TPR y calcula su significancia estadística. En el caso de LmTau131 se encontraron 12 motivos TPR en el extremo amino, que van de los aminoácidos 41 a 625, y seis en el extremo carboxilo, que abarcan de los aminoácidos 1069 a 1292 (Fig. 17). Para cada uno de ellos se obtuvo también su valor estadístico. Esto reveló una gran similitud con lo reportado en *S. cerevisiae*, donde se encontró un dominio de TPRs en el extremo amino que contiene 10 repetidos, y un segundo dominio de TPRs en el extremo carboxilo que incluye 7 repetidos. Ambos dominios están separados por la región helicoidal (Vorländer *et al.*, 2020).

La comparación entre las secuencias de LmTau131 y Tau131 de *S. cerevisiae* arrojó un porcentaje de identidad de 20.66%, que es relativamente bajo, pero similar al que se ha observado al comparar otros factores de transcripción de los tripanosomátidos con los de levadura o vertebrados (Florencio-Martínez *et al.*, 2021; Vélez-Ramírez *et al.*, 2015; Villa-Delavequia, 2019). Sin embargo, como se puede observar en la figura 18, en la estructura secundaria, muchas de las hélices alfa predichas para LmTau131 coinciden con las que se encuentran en Tau131 de *S. cerevisiae*, formando los dominios de TPR en los extremos amino y carboxilo. Asimismo, podemos observar que en la estructura tridimensional predicha de LmTau131 (Fig. 19) se conservan las mismas regiones, distinguiendo ambos dominios. Los motivos TPR se caracterizan por pliegues del tipo hélice-giro-hélice, los cuales se ordenan en series de hélices alfa antiparalelas repetidas produciendo una estructura de superhélice. En general, los motivos TPR se pueden encontrar como repetidos de 3 a 16 motivos secuenciales dentro de una proteína determinada (Zeytuni y Zarivach, 2012). En levadura, se observó que Tau131 es de gran importancia para la flexibilidad de unión entre los subcomplejos TauA y TauB de TFIIIC y que influye en el posicionamiento de TFIIIB río arriba del sitio de inicio de la transcripción (Dumay-Odelot *et al.*, 2002). Vorländer *et al.* (2020) sugieren que estos repetidos son importantes para el reclutamiento de subunidades de TFIIIB para la formación del PIC. El proceso inicia por el ensamble de Brf1 al complejo TFIIIC-DNA a través del arreglo de TPR en el extremo amino de Tau131; después continúa la unión de TBP y finalmente entra Bdp1 al complejo, guiado por los sitios de unión en los TPRs del extremo amino de Tau131, así como por interacciones con Brf1 y TBP. En este estudio se encontraron características de la subunidad LmTau131 que comparte con Tau131 de levadura y que le puedan brindar funciones similares dentro del complejo de TFIIIC, como lo son la presencia de hélices alfa en pares de forma antiparalela formando los dominios de TPR en los extremos amino y carboxilo.

La sobre-expresión es una técnica que comenzó a ser usada poco después del desarrollo de métodos de transformación de levadura y actualmente es una herramienta muy útil para estudiar la función de proteínas. Dependiendo del modelo y objetivos, existen diferentes técnicas para, por ejemplo, sobre-expresar proteínas silvestres, mutantes, recombinantes, así como también, para identificar blancos terapéuticos, y crear redes de interacción, entre otros (Prelich, 2012).

En este trabajo se obtuvieron clonas transfectadas con los vectores pN-LmTau131 y pL-LmTau131 que sobre-expresaran LmTau131. En estos vectores se clonó un fragmento de 4484 pb (Fig. 15) que contiene al gen de LmTau131 (4116 pb) más una región 5' UTR (368 pb). El tamaño del extremo flanqueante 5' UTR se tomó con base en la información sobre los sitios de procesamiento que se encuentran en la base de datos de tripanosomátidos TriTrypDB (<http://tritrypdb.org>). Ahí se menciona que el dinucleótido AG dominante o sitio aceptor del mini exón putativo, necesario para el correcto *trans-splicing*, se encuentra a 133 pb río arriba del codón de inicio de la traducción. Entonces, el fragmento se encuentra flanqueado con las secuencias necesarias para su procesamiento tanto en el extremo 5', como en el extremo 3', donde se encuentra el 3' UTR del gen DHFR-TS en ambos vectores de sobre-expresión.

Previamente, en el laboratorio se utilizaron estos vectores para la sobre-expresión del represor de la transcripción Maf1, donde mediante Northern blot se observó un aumento considerable en la abundancia del RNAm de esta proteína. Utilizando el vector pNBUC, el aumento fue de casi cinco veces y usando pLMRIB fue de casi seis veces, en comparación con células silvestres, por lo que sí se pudo obtener una sobre-expresión significativa (Ortega-Ortiz, 2022). En este trabajo se empleó una técnica más sensible, el RT-qPCR, para determinar la abundancia de los transcritos de LmTau131 en los cultivos que sobre-expresan. En la figura 39 se observa que con el vector pN-LmTau131 hubo una mayor transcripción (>60 veces) de LmTau131 que con pL-LmTau131 (>20 veces), en comparación con la línea silvestre. Cabe señalar que se esperaba una mayor abundancia del transcrito de LmTau131 en la línea celular pL-LmTau131, considerando que el vector empleado tiene el promotor fuerte de los genes del RNAr de *L. major*, a diferencia de pN-LmTau131, que no contiene ninguna región promotora. La razón por la que obtuvimos el resultado opuesto no la conocemos. Es importante indicar que no disponemos de un anticuerpo específico contra LmTau131, por lo que no pudimos determinar la abundancia de LmTau131 a nivel de proteína. Aunque una mayor cantidad de transcrito suele sugerir una mayor cantidad de proteína, esto no siempre es cierto, pues hay reportes en los que no se ha observado concordancia en la abundancia de ambos tipos de moléculas (Cortazzo da Silva *et al.*, 2022). Así, una vez que analicemos los niveles de la proteína LmTau131 en los

cultivos que sobre-expresan tendremos más herramientas para tratar de explicar los resultados obtenidos.

Mediante ensayos de RT-qPCR también se analizó la abundancia de algunos transcritos dependientes de la RNA Pol III, observando diferencias entre ambos vectores de sobre-expresión (Fig. 41). En general, aunque estadísticamente no se observó una diferencia significativa, se ve una tendencia en el aumento de los niveles de estos transcritos en la línea pLMRIB, pero disminuyeron en la línea pNBUC. Pareciera que la muy elevada cantidad de transcritos (y quizá de la proteína) de LmTau131 en la línea pNBUC reprimió la transcripción de la RNA Pol III, mientras que un aumento moderado en la cantidad de los transcritos en la línea pLMRIB incrementó la transcripción de la RNA Pol III. Otra posibilidad es que el procesamiento de los transcritos se haya realizado de forma diferente en ambos vectores mediante *trans-splicing* alternativo, ya que se ha visto en *Leishmania* que de 8981 genes que se estudiaron, 8777 (~98%) usaron más de un sitio de *trans-splicing*. De hecho, el *trans-splicing* alternativo se dio en un 88, 56 y 18% usando al menos 5, 10 o 20 sitios alternativos, respectivamente. Esta observación indica que *L. major* exhibe un grado mayor de *trans-splicing* alternativo que incluso especies relacionadas como *T. cruzi* y *T. brucei*, donde ~90% de los genes presentan este proceso (Dillon *et al.*, 2015).

De manera interesante, el crecimiento de los cultivos transfectantes fue similar al del cultivo silvestre. Cabe mencionar que en levadura se han realizado análisis de sobre-expresión de factores de transcripción, en donde 57 de 175 factores analizados causaron una inhibición del crecimiento cuando se sobre-expresaban. De hecho, de todos los genes estudiados que inhibían el crecimiento celular, los factores de transcripción eran los más tóxicos al sobre-expresarse (Chua *et al.*, 2006).

En otro estudio realizado por Kleinschmidt *et al.* (2011) se observó una función particular de la subunidad Tau91 y en general de TFIIIC en *S. cerevisiae*. TFIIIC se une a sitios adicionales fuera del complejo de transcripción de la RNA Pol III denominados sitios extra TFIIIC (ETC). Uno de estos sitios (ETC6) se localiza río arriba del gen que transcribe para la subunidad Tau91 de este mismo factor de transcripción. Encontraron que al sobre-expresar Tau91, la ocupación de TFIIIC en estos sitios extra TFIIIC aumentaba, y al posicionarse en el ETC6 con mayor frecuencia disminuía la transcripción de Tau91 de

manera autorregulatoria, lo cual pudiera tener efecto en la regulación de la transcripción de la RNA Pol III y en el control de la transcripción de la RNA Pol II.

En el estudio de Sethy-Coraci *et al.* (1998) se encontró que la sobre-expresión de subunidades de TFIIIB no tenía ningún efecto significativo para el crecimiento celular, ni en la tasa de transcripción en la mayoría de los genes dependientes de la RNA Pol III. Sin embargo, en un grupo de genes con promotores débiles sí se observó que el nivel de transcripción aumentaba al sobre-expresar a Brf1.

Como se mencionó, se ha visto que TFIIIC tiene la capacidad de reclutar a cohesina y condensina II, regulando la formación de bucles de cromatina. En humano se reportó que la unión de TFIIIC a elementos Alu controla la expresión mediante la formación bucles de cromatina y acetilación de histonas (Büchel *et al.*, 2017; Yuen *et al.*, 2022). Por ello, al alterar la abundancia de una de las subunidades, como es LmTau131, es posible que en cierta medida se generen alteraciones en la transcripción de la RNA Pol III, como se ha podido observar en este estudio.

Los cultivos que sobre-expresan de Tau131 aquí generados serán empleados para estudiar las funciones de esta proteína en *L. major*. Con ellos se podrán realizar ensayos de RNA-seq para analizar, a nivel de transcriptoma completo, los cambios en los transcritos dependientes de la RNA Pol III al sobre-expresar Tau131. También se analizarían posibles cambios en los RNAm, considerando que en otros organismos se ha demostrado que TFIIIC influye en la transcripción de algunos genes transcritos por la RNA Pol II. Además, se podrían hacer análisis de proteómica mediante espectrometría de masas, por el método de cuantificación libre de marca (*Label-free quantification*). Así, por una parte, se determinaría si existe correlación en la abundancia de los RNAm y las proteínas, y, por otra parte, se analizarían las funciones de las proteínas más afectadas por la sobre-expresión de Tau131, lo que nos ayudaría a esclarecer los roles que juega este factor en *Leishmania*.

7. Logros y conclusiones

- Aunque el porcentaje de identidad entre las secuencias de LmTau131 y su ortólogo en levadura es relativamente bajo, LmTau131 está constituida principalmente por repetidos de tetratricopéptidos, característicos de los ortólogos de Tau131.
- Las estructuras secundaria y tridimensional predichas de LmTau131 son muy parecidas a las de Tau131 de levadura.
- Se obtuvieron clonas celulares de promastigotes de *L. major* transfectadas con los vectores pN-LmTau131 y pL-LmTau131
- En relación con el cultivo silvestre, las clonas transfectadas con los vectores de sobre-expresión sí presentaron un aumento de entre 32 y 60 veces en la abundancia de los transcritos de LmTau131.
- Las células transfectadas con el vector pL-LmTau131 mostraron un aumento en la expresión de los genes dependientes de la RNA Pol III, a diferencia de lo que se observó con el vector pN-LmTau131 donde se encontró una disminución, aunque estadísticamente no fue significativa, sí se observa una tendencia al cambio.
- La sobre-expresión de LmTau131 en células transfectadas no afectó el crecimiento.

8. Referencias bibliográficas

- Allmann, S. y Bringaud, F. (2017). Glycosomes: A comprehensive view of their metabolic roles in *T. brucei*. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 85, 85–90. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.biocel.2017.01.015>
- Berriman, M., Ghedin, E., Hertz-Fowler, C., Blandin, G., Renauld, H., Bartholomeu, D. C., Lennard, N. J., Caler, E., Hamlin, N. E., Haas, B., Böhme, U., Hannick, L., Aslett, M. A., Shallom, J., Marcello, L., Hou, L., Wickstead, B., Alsmark, U. C. M., Arrowsmith, C. y El-Sayed, N. M. (2005). The Genome of the African Trypanosome *Trypanosoma brucei*. *Science*, 309(5733), 416–422. <https://doi.org/10.1126/science.1112642>
- Büchel, G., Carstensen, A., Mak, K.-Y., Roeschert, I., Leen, E., Sumara, O., Hofstetter, J., Herold, S., Kalb, J., Baluapuri, A., Poon, E., Kwok, C., Chesler, L., Maric, H. M., Rickman, D. S., Wolf, E., Bayliss, R., Walz, S. y Eilers, M. (2017). Association with Aurora-A Controls

- N-MYC-Dependent Promoter Escape and Pause Release of RNA Polymerase II during the Cell Cycle. *Cell Reports*, 21(12), 3483–3497. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.11.090>
- Burza, S., Croft, S. L. y Boelaert, M. (2018). Leishmaniasis. *The Lancet*, 392(10151), 951–970. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(18\)31204-2](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0140-6736(18)31204-2)
- Chaussivert, N., Conesa, C., Shaaban, S. y Sentenac, A. (1995). Complex Interactions between Yeast TFIIIB and TFIIIC (*). *Journal of Biological Chemistry*, 270(25), 15353–15358. <https://doi.org/https://doi.org/10.1074/jbc.270.25.15353>
- Chua, G., Morris, Q. D., Sopko, R., Robinson, M. D., Ryan, O., Chan, E. T., Frey, B. J., Andrews, B. J., Boone, C. y Hughes, T. R. (2006). Identifying transcription factor functions and targets by phenotypic activation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(32), 12045–12050. <https://doi.org/10.1073/pnas.0605140103>
- Corden, J. L. (2021). Transcription | RNA Polymerase II and its General Transcription Factors. In J. Jez (Ed.), *Encyclopedia of Biological Chemistry III (Third Edition)* (pp. 383–385). Elsevier. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-819460-7.00288-7>
- Cortazzo da Silva, L., Aoki, J. I. y Floeter-Winter, L. M. (2022). Finding Correlations Between mRNA and Protein Levels in Leishmania Development: Is There a Discrepancy? *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 12. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcimb.2022.852902>
- Cramer, P. (2019). Eukaryotic Transcription Turns 50. *Cell*, 179(4), 808–812. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.09.018>
- Cull, B., Prado Godinho, J. L., Fernandes Rodrigues, J. C., Frank, B., Schurigt, U., Williams, R. A. M., Coombs, G. H. y Mottram, J. C. (2014). Glycosome turnover in *Leishmania major* is mediated by autophagy. *Autophagy*, 10(12), 2143–2157. <https://doi.org/10.4161/auto.36438>.
- Das, A., Banday, M. y Bellofatto, V. (2007). RNA Polymerase Transcription Machinery in Trypanosomes. *Eukaryot Cell*, 7 (3): 429–434.
- De Pablos, L. M., Ferreira, T. R. y Walrad, P. B. (2016). Developmental differentiation in *Leishmania* lifecycle progression: post-transcriptional control conducts the orchestra. *Current Opinion in Microbiology*, 34, 82–89. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.mib.2016.08.004>
- Dieci, G., Conti, A., Pagano, A. y Carnevali, D. (2013). Identification of RNA polymerase III-transcribed genes in eukaryotic genomes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms*, 1829(3), 296–305. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2012.09.010>
- Dillon, L. A. L., Okrah, K., Hughitt, V. K., Suresh, R., Li, Y., Fernandes, M. C., Belew, A. T., Corrada Bravo, H., Mosser, D. M. y El-Sayed, N. M. (2015). Transcriptomic profiling of

- gene expression and RNA processing during *Leishmania major* differentiation. *Nucleic Acids Research*, 43(14), 6799–6813. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv656>
- Docampo, R., de Souza, W., Miranda, K., Rohloff, P. y Moreno, S. N. (2005). Acidocalcisomes - conserved from bacteria to man. *Nature Reviews Microbiology*, 3: 251–261.
- Dumay, H., Rubbi, L., Sentenac, A. y Marck, C. (1999). Interaction between Yeast RNA Polymerase III and Transcription Factor TFIIIC via ABC10 α and τ 131 Subunits*. *Journal of Biological Chemistry*, 274(47), 33462–33468. <https://doi.org/https://doi.org/10.1074/jbc.274.47.33462>
- Dumay-Odelot, H., Joël, A., Rosalia, A., André, S. y Christian, M. (2002). Multiple Roles of the τ 131 Subunit of Yeast Transcription Factor III C (TFIIIC) in TFIIIB Assembly. *Molecular and Cellular Biology*, 22(1), 298–308. <https://doi.org/10.1128/MCB.22.1.298-308.2002>
- El-Sayed, N. M., Myler, P. J., Bartholomeu, D. C., Nilsson, D., Aggarwal, G., Tran, A.-N., Ghedin, E., Worthey, E. A., Delcher, A. L., Blandin, G., Westenberger, S. J., Caler, E., Cerqueira, G. C., Branche, C., Haas, B., Anupama, A., Arner, E., Åslund, L., Attipoe, P. y Andersson, B. (2005). The Genome Sequence of *Trypanosoma cruzi*, Etiologic Agent of Chagas Disease. *Science*, 309(5733), 409–415. <https://doi.org/10.1126/science.1112631>
- Edwards, A. M., Kane, C. M., Young, R. A. & Kornberg, R. D. (1991). Two dissociable subunits of yeast RNA polymerase II stimulate the initiation of transcription at a promoter in vitro. *The journal of biological chemistry*, 266, 71–75.
- Fernández-Tornero, C., Moreno-Morcillo, M., Rashid, U. J., Taylor, N. M. I., Ruiz, F. M., Gruene, T., Legrand, P., Steuerwald, U. y Müller, C. W. (2013). Crystal structure of the 14-subunit RNA polymerase I. *Nature*, 502(7473), 644–649. <https://doi.org/10.1038/nature12636>
- Florencio-Martínez, L. E., Cano-Santiago, A., Mondragón-Rosas, F., Gómez-García, M., Flores-Pérez, C., Román-Carraro, F. C., Barocio-Rodríguez, L. A., Manning-Cela, R. G., Nepomuceno-Mejía, T. y Martínez-Calvillo, S. (2021). Participation of TFIIIB Subunit Brf1 in Transcription Regulation in the Human Pathogen *Leishmania major*. *Genes*, 12(2). <https://doi.org/10.3390/genes12020280>
- Galli, G., Hofstetter, H. y Birnstiel, M. L. (1981). Two conserved sequence blocks within eukaryotic tRNA genes are major promoter elements. *Nature*, 294(5842), 626–631. <https://doi.org/10.1038/294626a0>
- Geiduschek, E. P. y Kassavetis, G. A. (2001). The RNA polymerase III transcription apparatus. Edited by P. E. Wright. *Journal of Molecular Biology*, 310(1), 1–26. <https://doi.org/https://doi.org/10.1006/jmbi.2001.4732>
- Gibson, W., Lewis, M. y Miles, M. (2011). Genetic Exchange in Trypanosomatids and Its Relevance to Epidemiology. *Genetics and Evolution of Infectious Diseases*, 581–605. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384890-1.00021-2>

- Gluezn, E., Wheeler, R. J., Hughes, L. y Vaughan, S. (2015). Scanning and three-dimensional electron microscopy methods for the study of *Trypanosoma brucei* and *Leishmania mexicana* flagella. In R. Basto & W. F. Marshall (Eds.), *Methods in Cell Biology* (Vol. 127, pp. 509–542). Academic Press. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/bs.mcb.2014.12.011>
- Goodfellow, S. J. y Zomerdijk, J. C. B. M. (2013). Basic mechanisms in RNA polymerase I transcription of the ribosomal RNA genes. *Sub-Cellular Biochemistry*, 61, 211–236. https://doi.org/10.1007/978-94-007-4525-4_10
- Guerra, J. A. de O., Prestes, S. R., Silveira, H., Coelho, L. I. de A. R. C., Gama, P., Moura, A., Amato, V., Barbosa, M. das G. V. y Ferreira, L. C. de L. (2011). Mucosal Leishmaniasis Caused by *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *Leishmania (Viannia) guyanensis* in the Brazilian Amazon. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 5(3), e980-. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000980>
- Halliday, C., de Castro-Neto, A., Alcantara, C. L., Cunha-e-Silva, N. L., Vaughan, S. y Sunter, J. D. (2021). Trypanosomatid Flagellar Pocket from Structure to Function. *Trends in Parasitology*, 37(4), 317–329. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2020.11.005>
- Hoffmann, N. A., Jakobi, A. J., Moreno-Morcillo, M., Glatt, S., Kosinski, J., Hagen, W. J. H., Sachse, C. y Müller, C. W. (2015). Molecular structures of unbound and transcribing RNA polymerase III. *Nature*, 528(7581), 231–236. <https://doi.org/10.1038/nature16143>
- Hofstetter, H., Kressmann, A. y Birnstiel, M. L. (1981). A split promoter for a eucaryotic tRNA gene. *Cell*, 24(2), 573–585. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0092-8674\(81\)90348-2](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0092-8674(81)90348-2)
- Ivens, A. C., Peacock, C. S., Worthey, E. A., Murphy, L., Aggarwal, G., Berriman, M., Sisk, E., Rajandream, M.-A., Adlem, E., Aert, R., Anupama, A., Apostolou, Z., Attipoe, P., Bason, N., Bauser, C., Beck, A., Beverley, S. M., Bianchetti, G., Borzym, K. y Myler, P. J. (2005). The Genome of the Kinetoplastid Parasite, *Leishmania major*. *Science*, 309(5733), 436–442. <https://doi.org/10.1126/science.1112680>
- Joshi, S. y Subramani, S. (2013). Peroxisomes. In W. J. Lennarz & M. D. Lane (Eds.), *Encyclopedia of Biological Chemistry (Second Edition)* (pp. 425–430). Academic Press. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-378630-2.00503-X>
- Kaufer, A., Ellis, J., Stark, D. y Barratt, J. (2017). The evolution of trypanosomatid taxonomy. *Parasites & Vectors*, 10(1), 287. <https://doi.org/10.1186/s13071-017-2204-7>
- Khatter, H., Vorländer, M. K. y Müller, C. W. (2017). RNA polymerase I and III: similar yet unique. *Current Opinion in Structural Biology*, 47, 88–94. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.sbi.2017.05.008>
- Kissinger, J. C. (2006). A tale of three genomes: the kinetoplastids have arrived. *Trends in parasitology*, 22 (6): 240-243.
- Kleinschmidt, R. A., LeBlanc, K. E. y Donze, D. (2011). Autoregulation of an RNA polymerase II promoter by the RNA polymerase III transcription factor III C (TF(III)C) complex.

Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 108(20), 8385–8389. <https://doi.org/10.1073/pnas.1019175108>

- Luse, D. S. (2014). The RNA polymerase II preinitiation complex. *Transcription*, 5(1), e27050. <https://doi.org/10.4161/trns.27050>
- Male, G., von Appen, A., Glatt, S., Taylor, N. M. I., Cristovao, M., Groetsch, H., Beck, M. y Müller, C. W. (2015). Architecture of TFIIIC and its role in RNA polymerase III pre-initiation complex assembly. *Nature Communications*, 6, 7387. <https://doi.org/10.1038/ncomms8387>
- Martínez-Calvillo, S., Saxena, A., Green, A., Leland, A. y Myler, P. J. (2007). Characterization of the RNA polymerase II and III complexes in *Leishmania major*. *International journal for parasitology*, 37 (5): 491-502.
- Martínez-Calvillo, S., Vizuet-de-Rueda, J. C., Florencio-Martínez, L. E., Manning-Cela, R. G. y Figueroa-Angulo, E. E. (2010). Gene Expression in Trypanosomatid Parasites. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2010: 525241.
- Martínez-Calvillo, S., Florencio-Martínez, L. E., Rojas-Sánchez, S., Moreno-Campos, R., Vizuet-de-Rueda, J., Padilla-Mejía, N. E., Román-Carraro, F. C., Flores-Pérez, C., Manning-Cela, R. G. y Figueroa-Angulo, E. E. (2012). Estructura genómica y regulación de la expresión genética en *Leishmania major* y *Trypanosoma cruzi*. En M. E. Alvarez-Sánchez, y E. Azuara, *Genómica de parásitos, aspectos moleculares, genómicos, proteómicos y de virulencia* (pp. 47 – 79). Editorial Académica Española
- Melby, P. C., Travi, B. L. y Yaneth Osorio, E. (2019). Leishmania. In T. M. Schmidt (Ed.), *Encyclopedia of Microbiology (Fourth Edition)* (pp. 769–779). Academic Press. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801238-3.02473-9>
- Mitsis, T., Efthimiadou, A., Bacopoulou, F., Vlachakis, D., Chrousos, G. P. y Eliopoulos, E. (2020). Transcription factors and evolution: An integral part of gene expression (Review). *World Academy of Sciences Journal*, 3–8.
- Moqtaderi, Z. y Struhl, K. (2004). Genome-wide occupancy profile of the RNA polymerase III machinery in *Saccharomyces cerevisiae* reveals loci with incomplete transcription complexes. *Molecular and Cellular Biology*, 24(10), 4118–4127. <https://doi.org/10.1128/MCB.24.10.4118-4127.2004>
- Moreno-Campos, R., Florencio-Martínez, L., Nepomuceno-Mejía, T., Rojas Sánchez, S., Vélez-Ramírez, D., Padilla-Mejía, N., Figueroa, E., Manning-Cela, R. y Martínez-Calvillo, S. (2016). Molecular characterization of 5S ribosomal RNA genes and transcripts in the protozoan parasite *Leishmania major*. *Parasitology*, 143, 1–13. <https://doi.org/10.1017/S0031182016001712>
- Mylona, A., Fernández-Tornero, C., Legrand, P., Haupt, M., Sentenac, A., Acker, J. y Müller, C. W. (2006). Structure of the $\tau 60/\tau \Delta 91$ Subcomplex of Yeast Transcription Factor III C: Insights into Preinitiation Complex Assembly. *Molecular Cell*, 24(2), 221–232. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2006.08.013>

- Nussbaum, K., Honek, J., Cadmus, C. M. C. v. C. y Efferth, T. (2010). Trypanosomatid Parasites Causing Neglected Diseases. *Current Medicinal Chemistry*, 17(15), 1594–1617.
- Ogden, G. B. y Melby, P. C. (2009). Leishmania. In M. Schaechter (Ed.), *Encyclopedia of Microbiology (Third Edition)* (pp. 663–673). Academic Press.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-012373944-5.00195-4>
- Olivas, W. M., Muhlrاد, D. y Parker, R. (1997). Analysis of the yeast genome: identification of new non-coding and small ORF-containing RNAs. *Nucleic Acids Research*, 25(22), 4619–4625. <https://doi.org/10.1093/nar/25.22.4619>
- Orioli, A., Pascali, C., Pagano, A., Teichmann, M. y Dieci, G. (2012). RNA polymerase III transcription control elements: Themes and variations. *Gene*, 493(2), 185–194.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.gene.2011.06.015>
- Ortega-Ortiz, R. C. (2022). Obtención y caracterización molecular de líneas celulares de *Leishmania major* que sobre-expresen al represor de la transcripción Maf1. Tesis de licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Osman, S. y Cramer, P. (2020). Structural Biology of RNA Polymerase II Transcription: 20 Years On. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 36(1), 1–34.
<https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-042020-021954>
- Pace, D. (2014). Leishmaniasis. *Journal of Infection*, 69, S10–S18.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jinf.2014.07.016>
- Padilla-Mejía, N. M., Florencio-Martínez, L. E., Figueroa-Angulo, E. E., Manning-Cela, R. G., Hernández-Rivas, R., Myler, P. J. y Martínez-Calvillo, S. (2009). Gene organization and sequence analyses of transfer RNA genes in Trypanosomatid parasites. *BMC Genomics*, 10: 232.
- Prelich, G. (2012). Gene Overexpression: Uses, Mechanisms, and Interpretation. *Genetics*, 190(3), 841–854. <https://doi.org/10.1534/genetics.111.136911>.
- Rojas-Sánchez, S., Figueroa-Angulo, E., Moreno-Campos, R., Florencio-Martínez, L. E., Manning-Cela, R. G. y Martínez-Calvillo, S. (2016). Transcription of *Leishmania major* U2 small nuclear RNA gene is directed by extragenic sequences located within a tRNA-like and a tRNA-Ala gene. *Parasites & Vectors*, 9 (1), 401.
- Román-Carraro, F. C., Florencio-Martínez, L. E., Romero-Meza, G., Nepomuceno-Mejía, T., Carrero J. C., Arroyo, R., Ortega-López, J., Manning-Cela, R. y Martínez-Calvillo, S. (2019). TFIIIB Subunit Bdp1 Participates in RNA Polymerase III Transcription in the Protozoan Parasite *Leishmania major*. *BioMed Research International*, 2019: 14.
- Sainsbury, S., Bernecky, C. y Cramer, P. (2015). Structural basis of transcription initiation by RNA polymerase II. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 16(3), 129–143.
<https://doi.org/10.1038/nrm3952>

- Sandri, T. L., Lidani, K. C. F., Andrade, F. A., Carvalho, L. P., Fontana, P. D., de Melo, E. J. T. y Messias-Reason, I. J. de. (2021). Trypanosoma cruzi. In *Reference Module in Biomedical Sciences*. Elsevier. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-818731-9.00042-2>
- Schramm, L. y Hernandez, N. (2002). Recruitment of RNA polymerase III to its target promoters. *Genes & Development*, 16(20), 2593–2620. <http://genesdev.cshlp.org/content/16/20/2593.short>
- Sethy-Coraci, I., Moir, R. D., López-de-León, A. y Willis, I. M. (1998). A differential response of wild type and mutant promoters to TFIIIB70 overexpression in vivo and in vitro. *Nucleic Acids Research*, 26(10), 2344–2352. <https://doi.org/10.1093/nar/26.10.2344>
- Sharp, S., DeFranco, D., Dingermann, T., Farrell, P. y Söll, D. (1981). Internal control regions for transcription of eukaryotic tRNA genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 78(11), 6657–6661. <https://doi.org/10.1073/pnas.78.11.6657>
- Shen, C.-H. (2019). Chapter 3 - Gene Expression: Transcription of the Genetic Code. In C.-H. Shen (Ed.), *Diagnostic Molecular Biology* (pp. 59–86). Academic Press. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802823-0.00003-1>
- Schimanski, B., Nguyen, T. N. y Günzl, A. (2005). Highly efficient tandem affinity purification of trypanosome protein complexes based on a novel epitope combination. *Eukaryotic cell*, 4(11): 1942-50.
- Sinclair, A. N. y de Graffenried, C. L. (2019). More than Microtubules: The Structure and Function of the Subpellicular Array in Trypanosomatids. *Trends in Parasitology*, 35(10), 760–777. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.pt.2019.07.008>
- Srivastava, A., Badjatia, N., Lee, J. H., Hao, B. y Günzl, A. (2018). 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. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx1198>
- Sunter, J. y Gull, K. (2017). Shape, form, function and Leishmania pathogenicity: from textbook descriptions to biological understanding. *Open Biology*, 7(9), 170165. <https://doi.org/10.1098/rsob.170165>
- Tafur, L., Sadian, Y., Hoffmann, N. A., Jakobi, A. J., Wetzel, R., Hagen, W. J. H., Sachse, C. y Müller, C. W. (2016). Molecular Structures of Transcribing RNA Polymerase I. *Molecular Cell*, 64(6), 1135–1143. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2016.11.013>
- Taylor, N. M. I., Baudin, F., von Scheven, G. y Müller, C. W. (2013). RNA polymerase III-specific general transcription factor IIIC contains a heterodimer resembling TFIIIF Rap30/Rap74. *Nucleic Acids Research*, 41(19), 9183–9196. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt664>
- Taylor, N. M. I., Glatt, S., Hennrich, M. L., von Scheven, G., Grötsch, H., Fernández-Tornero, C., Rybin, V., Gavin, A.-C., Kolb, P. y Müller, C. W. (2013). Structural and functional

- characterization of a phosphatase domain within yeast general transcription factor III_C. *The Journal of Biological Chemistry*, 288(21), 15110–15120. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.427856>
- Torres-Guerrero, E., Quintanilla-Cedillo, M. R., Ruiz-Esmenjaud, J. y Arenas, R. (2017). Leishmaniasis: a review. *F1000Research*, 6, 750. <https://doi.org/10.12688/f1000research.11120.1>
- Turowski, T. W. y Tollervey, D. (2016). Transcription by RNA polymerase III: insights into mechanism and regulation. *Biochemical Society Transactions*, 44(5), 1367–1375. <https://doi.org/10.1042/BST20160062>
- Vélez-Ramírez, D. E., Florencio-Martínez, L. E., Romero-Meza, G., Rojas-Sánchez, S., Moreno-Campos, R., Arroyo, R., Ortega-López, J., Manning-Cela, R. y Martínez-Calvillo, S. (2015). Brf1, a subunit of RNA polymerase III Transcription Factor TFIIIB, is essential for cell growth of *Trypanosoma brucei*. *Parasitology*, 142(13), 1563–1573. <https://doi.org/doi:10.1017/s0031182015001122>
- Villa-Delavequia, G. S. (2019). Análisis molecular de la subunidad Tau95 del Factor de Transcripción TFIIIC en *Leishmania major*. Tesis de licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Vorländer, M. K., Jungblut, A., Karius, K., Baudin, F., Grötsch, H., Kosinski, J. y Müller, C. W. (2020). Structure of the TFIIIC subcomplex τ A provides insights into RNA polymerase III pre-initiation complex formation. *Nature Communications*, 11(1), 4905. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-18707-y>
- Vorländer, M. K., Khatter, H., Wetzel, R., Hagen, W. J. H. y Müller, C. W. (2018). Molecular mechanism of promoter opening by RNA polymerase III. *Nature*, 553(7688), 295–300. <https://doi.org/10.1038/nature25440>
- Wheeler, R. J., Gluenz, E. y Gull, K. (2013). The limits on trypanosomatid morphological diversity. *PloS One*, 8(11), e79581–e79581. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0079581>
- Woychik, N. A. y Hampsey, M. (2002). The RNA Polymerase II Machinery: Structure Illuminates Function. *Cell*, 108(4), 453–463. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(02\)00646-3](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(02)00646-3)
- Yuen, K. C., Slaughter, B. D. y Gerton, J. L. (2022). Condensin II is anchored by TFIIIC and H3K4me3 in the mammalian genome and supports the expression of active dense gene clusters. *Science Advances*, 3(6), e1700191. <https://doi.org/10.1126/sciadv.1700191>
- Zeytuni, N. y Zarivach, R. (2012). Structural and Functional Discussion of the Tetra-Trico-Peptide Repeat, a Protein Interaction Module. *Structure*, 20(3), 397–405. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.str.2012.01.006>