

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

CARACTERIZACION FUNCIONAL DE LA SUBUNIDAD TAU95 DEL FACTOR DE TRANSCRIPCION TFIIIC EN *TRYPANOSOMA BRUCEI*

T E S I S QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE: DOCTORA EN CIENCIAS PRESENTA: MONDRAGÓN ROSAS FABIOLA

TUTOR PRINCIPAL. DR. SANTIAGO MARTÍNEZ CALVILLO FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

LOS REYES IZTACALA, TLALNEPANTLA, ESTADO DE MÉXICO 2025



Universidad Nacional Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
Facultad de Estudios Superiores Iztacala Doctorado En Ciencias Biomédicas Caracterizacion funcional de la subunidad Tau95 del factor de transcripcion TFIIIC en Trypanosoma brucei
TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
DOCTORA EN CIENCIAS
Presenta:
MONDRAGÓN ROSAS FABIOLA
Asesor: Dr. Santiago Martínez Calvillo

Los Reyes Iztacala, Tlalnepantla, Estado de México

2025

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Santiago Martínez Calvillo, por abrirme las puertas de su laboratorio, y al resto del equipo del Laboratorio 1, por el apoyo brindado durante estos años.

A los miembros de mi comité: Dra. Yolanda Irasema Chirino López y Dra. Ana María Cevallos Gaos, por sus consejos, apoyo y sus valiosas aportaciones a lo largo de este proyecto.

A mis revisores: Dra. María Alicia González Manjarrez, Dr. Abraham Landa Piedra, Dra. Maritza Aurelia Omaña Molina, Dra. Rosaura Hernández Rivas, por sus valiosas aportaciones a este proyecto.

Al CONAHCYT por haberme otorgado la beca 925066. Este proyecto fue financiado por los donativos IN214221 e IN208224 de PAPIIT-UNAM, y CF-2023-I-820 del CONAHCYT, otorgados al Dr. Santiago Martínez Calvillo.

A mis padres, por su amor y apoyo incondicional, que ha sido mi pilar fundamental durante todos estos años. Este trabajo no solo es producto de mi esfuerzo, sino también de su dedicación y sacrificio a lo largo de mi vida.

A mis hermanos, Daniela y Carlos, por su compañía, consejos y cariño, crecer con ustedes ha sido un privilegio, gracias por conocerme y aceptarme en todas las etapas de mi vida. Son los mejores hermanos mayores que pude haber tenido.

A Andrés, por ser mi compañero durante todo el posgrado, definitivamente no habría tenido la misma experiencia sin ti. Gracias por las comidas juntos, por las risas, y por contestar todas mis preguntas por más básicas que parecieran. Estoy muy agradecida de que nos tuvimos el uno al otro durante esta experiencia, y estoy segura de que seguiremos presentes en las siguientes etapas de nuestras vidas.

A mis mejores amigas, Mariana, Itzel y Paulina. Gracias por estar conmigo desde hace más de 10 años, su amistad ha sido parte fundamental de mi vida y ustedes se han convertido parte de quien soy el dia de hoy. Nos hemos visto crecer y cambiar durante muchos años, y estoy muy feliz de que nuestra amistad cada año sea más fuerte.

CONTENIDO

Abstract		vi
Resumen		vii
Abreviatura	IS	viii
1. INTROD	UCCIÓN	1
1.1 Gene	eralidades de <i>Trypanosoma brucei</i>	1
1.1.1	Morfología	1
1.1.2	Ciclo de vida	3
1.1.3	Tripanosomiasis africana	5
1.1.4	Evolución de <i>T. brucei</i>	8
1.2 Gene	eralidades de <i>Leishmania major</i>	8
1.2.1	Ciclo de vida	9
1.2.2	Leishmaniasis	10
1.3 Trans	scripción en eucariontes	11
1.3.1	RNA polimerasa I	13
1.3.2	RNA polimerasa II	15
1.3.3	RNA polimerasa III	16
1.3	3.3.1 Factores de transcripción	17
1.3	3.3.2 TFIIIC	19
1.3	3.3.3 Tau95	20
1.4 Expre	esión genética en Trypanosoma brucei	21
1.4.1	Organización genómica	21
1.4.2	Transcripción de RNA Pol II	23
1.4	4.2.1 Transcripción policistrónica y regiones promotoras	24
1.4	4.2.2 Trans- <i>splicing</i> y poliadenilación	25
1.4	4.2.3 Regulación epigenética	28
1.4.3	Regulación mediante RNA de interferencia	29
1.4.4	Transcripción de RNA Pol I	32
1.4	4.4.1 Transcripción de genes codificadores de proteínas por	
	RNA Pol I	33
1.4.5	Transcripción de RNA Pol III	34

		1.4.5.1	Organización de genes transcritos por RNA Pol III	34
		1.4.5.2	Regiones promotoras	35
		1.4.5.3	Factores de Transcripción	36
2.	JUSTIF	FICACIĆ)N	38
3.	OBJET	IVOS		39
	3.1 Ob	ojetivo g	eneral	39
	3.2 Ob	ojetivos p	particulares	39
4.	MATE	RIALES	Y MÉTODOS	40
	4.1	Análi	sis <i>in silico</i>	40
	4.2	Cultiv	vo celular	40
	4.3	Extra	cción de DNA genómico	41
	4.4	Extra	cción de RNA	41
	4.5	Elect	roforesis	42
	4.6	Gene	ración de construcciones	42
		4.6.1	Diseño de oligonucleótidos	42
		4.6.2	PCR punto final	43
		4.6.3	Purificación de DNA a partir de gel de agarosa y	
			productos de PCR	44
		4.6.4	Ligación y transformación	44
		4.6.5	Ensayos de restricción	45
		4.6.6	Subclonación para la obtención de las líneas celulares	
			knock-down y PTP	46
	4.7	Trans	sfección y clonación celular	47
	4.8	Curva	as de crecimiento	48
	4.9	Marc	aje radioactivo	48
	4.10	North	ern blot	48
	4.11	Gene	ración de anticuerpo	49

		4.11.1	Purificación de la proteína recombinante	49
		4.11.2	Inoculación y obtención del anticuerpo	50
	4.12	Purifi	cación por afinidad en tándem y espectrometría de masas	51
	4.13	Ensa	yos de Inmunoprecipitación de la proteína	52
	4.14	Retro	o transcripción (RT)	53
	4.15	qPCF	२	53
	4.16	Inmu	nofluorescencia indirecta	55
5	RESUL	TADOS	3	56
	5.1	Análi	sis <i>in silico</i>	56
	5.2	Gene	eración de vectores para RNA de interferencia	65
	5.3	TbTa	u95 parece no ser esencial para el crecimiento celular	71
	5.4	Verifi	cación de la disminución en los niveles del mRNA de	
		TbTa	au95	73
	5.5	Verifi	cación de la disminución en los niveles del proteína de	
		TbTa	au95	76
	ł	5.5.1	Generación de anticuerpo	76
	ł	5.5.2	Western blot para verificar la disminución del nivel de	
			Proteína	83
	5.6	El int	ento de knock down de TbTau95 no fue exitoso.	84
	5.7	Gene	eración de la línea celular TbTau95-PTP	84
	5.8	Tau9	5 es una proteína nuclear	90
	5.9	TbTa	u95 se una a genes transcritos por la RNA pol III	92
	5.10	Ident	ificación de subunidades de TFIIIC en los tripanosomátidos	95
6	DISCUS	SIÓN		99
7	CONCL	USION	ES	105
8	APÉND	ICES		107
9	REFERENCIAS 120			120

Abstract

In eukaryotes, transcription is carried out by RNA polymerases (RNA Pol) I, II and III. RNA Pol III generates small non-coding RNA molecules, including tRNAs, 5S rRNA and U6 snRNA, which are involved in cardinal cellular processes. To start transcription, RNA Pol III requires transcription factors TFIIIA, TFIIIB, and TFIIIC. In mammals, TFIIIC is a six-subunit complex that associates to promoter regions in RNA Pol III-dependent genes. The knowledge about RNA Pol III transcription in the trypanosomatid parasites Leishmania major and Trypanosoma brucei is scarce. Initial analyses of the genome sequences of these parasites failed to identify homologs of any of the six subunits of TFIIIC, which indicated that this complex is absent in L. major and T. brucei. Nevertheless, a presumed TFIIIC subunit was recently annotated in the trypanosomatid databases. In this work, we have studied this subunit to show that it corresponds to the Tau95 ortholog in *L. major* (LmTau95) and *T. brucei* (TbTau95). Bioinformatic analyses demonstrated that both proteins have the characteristic Tau95 motifs: a dimerization domain and a DNA binding region. Our results also show that Tau95 is a nuclear protein in the insect stages of both parasites. Chromatin immunoprecipitation (ChIP) and gPCR experiments showed that TbTau95 associates with tRNA and U2 snRNA genes. Notably, tandem affinity purifications and mass spectrometry analyses revealed the presence of other three subunits of TFIIIC in L. major and T. brucei: Tau55, Tau131 and Tau138. Therefore, contrary to what was presumed, a TFIIIC complex is indeed present in trypanosomatids. Other putative LmTau95 and TbTau95 interacting partners were identified, including some RNA Pol II regulators.

Resumen

La RNA polimerasa III (RNA Pol III) es la encargada de la síntesis de moléculas de RNA pequeñas no codificantes que son esenciales para la viabilidad celular, como los tRNA y el rRNA 5S. Para iniciar la síntesis de RNA, la RNA Pol III requiere de tres factores generales de transcripción: TFIIIA, TFIIIB y TFIIIC. En levadura y vertebrados, TFIIIC se une a los elementos internos del promotor de los genes de tRNA y rRNA 5S, y está formado por seis subunidades diferentes. La transcripción de la RNA Pol III en el protozoo Trypanosoma brucei, así como en otros tripanosomátidos como Leishmania major, ha sido poco estudiada, y los primeros análisis del genoma de estos organismos no permitieron identificar ortólogos de ninguna de las subunidades de TFIIIC, lo que sugirió que este factor de transcripción está ausente en estos parásitos. En este trabajo, llevamos a cabo la caracterización de una subunidad de TFIIIC recientemente identificada en T. brucei y logramos demostrar que corresponde a Tau95. Algunos de los experimentos se llevaron a cabo también en L. major. Los análisis in silico revelaron que los ortólogos en los tripanosomátidos poseen los dominios típicos que Tau95 tiene en otros organismos: el dominio de unión al DNA y el dominio de dimerización. Ensayos de inmunofluorescencia indirecta demostraron que, como era de esperar para un factor de transcripción, Tau95 se localiza en el núcleo de ambos parásitos. Además, mediante ensayos de inmunoprecipitación de la cromatina encontramos que Tau95 se une a genes de tRNA y al U2 snRNA en T. brucei. De manera notable, mediante purificaciones por afinidad en tándem en ambos parásitos, identificamos ortólogos de otras tres subunidades de TFIIIC: Tau55, Tau131 y Tau138. Así, nuestros datos demostraron que, contrario a lo que se asumía, los parásitos tripanosomátidos sí poseen un complejo TFIIIC, el cual parece estar formado por cuatro subunidades. También identificamos otras proteínas que se asocian con Tau95 en T. brucei y L. major.

Abreviaturas

b	Bases
BDF3	Bromodomain Factor 3
BESs	Sitios de expresión de formas sanguíneas
CATT	Técnica de aglutinación para tripanosomiasis
CE	Core element
cél	Células
ChIP	Chromatin immunoprecipitation
CITFA	Class I transcription factor A
DBD	Dominio de unión a DNA
DPE	Elemento del promotor río abajo
DSE	Elemento de secuencia distal
dsRNA	RNA de doble cadena
DEPC	Dietilpirocarbonato
DNA	Ácido desoxi-ribonucleico
ESB	Cuerpo de sitio de expresión
gRNA	RNA guía
ICR	Región de control interna
IE	Elemento intermedio
Inr	Motivo iniciador
Kb	Kilobases
kDa	KiloDaltons
LC	Leishmaniasis cutánea
LMC	Leishmaniasis mucocutánea
LV	Leishmaniasis visceral
Mda	Millones de años
min	Minutos
Μ	Molar
μg	Microgramos
μl	Microlitos
ml	Mililitros

mRNA	RNA mensajero
mRNP	Partícula ribonucleoproteica mensajera
ORF	Marco abierto de lectura
PAGs	Genes asociados a prociclinas
PARP	Proteínas repetitivas de ácido procíclico
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PIC	Complejo de preinicio
PSE	Elemento de secuencia proximal
RNA Pol	RNA polymerase
rRNA	RNA ribosomal
RNAi	RNA de interferencia
RISC	RNA Induced Silencing Complex
RT	Retro transcripción
RHS	Retrotransposon hot spot
SIT	Sitio de inicio de la transcripción
SIF	Factor Inductor de Stumpy
siRNAs	small interfering RNAs
snRNA	RNAs pequeños nucleares
snRNP	Ribonucleoproteínas pequeñas nucleares
TAFs	TBP associated factors
TBP	Proteína de unión a la caja TATA
TetO	Operador de doxiciclina
TPR	Tetratricopéptidos
UBF	Upstream binding factor
UCR	Región de control río arriba
UE	Upstream element
UTR	Región no traducida
USE	Secuencia río arriba
VSG	Proteínas variables de superficie
WBC	Conteo de células blancas
WH	Hélice alada

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Generalidades de Trypanosoma brucei

T. brucei, causante de la tripanosomiasis africana o enfermedad del sueño, es un miembro de la familia de los tripanosomátidos, dentro de la cual se encuentran otros organismos de importancia médica como *Trypanosoma cruzi*, que produce la enfermedad de Chagas, y los organismos del género *Leishmania*, agentes etiológicos de diferentes tipos de leishmaniasis. Además de su importancia médica, estos organismos son importantes debido a sus mecanismos atípicos de expresión genética, como la organización de sus genes codificadores de proteínas en *clusters* y la transcripción policistrónica.

1.1.1 Morfología

T. brucei es un protozoo flagelado que, al igual que el resto de los tripanosomátidos, se caracteriza por la presencia de una mitocondria única, con una estructura alargada que corre del extremo posterior al extremo anterior de la célula. Dentro de ella se encuentra una red de moléculas circulares de DNA localizada en la base del flagelo que se conoce como cinetoplasto (Figura 1) (Verner et al., 2015).

El parásito tiene una morfología alargada, definida por un arreglo de microtúbulos subpeliculares con polaridad uniforme que corren longitudinalmente por debajo de la membrana plasmática y que están conservados en los organismos del orden Kinetoplastida (Figura 1). Los microtúbulos subpeliculares se encuentran unidos a la membrana plasmática mediante una serie de proteínas conocidas como Proteínas Asociadas a Microtúbulos (Sinclair et al., 2019; Ooi y Bastin, 2013). La remodelación de estos microtúbulos permite los diferentes cambios morfológicos entre los diferentes estadios de desarrollo del parásito, lo cual puede darse de dos formas: remodelación directa del citoesqueleto o división celular asimétrica (Sinclair et al., 2019).



Figura 1. Representación esquemática de la morfología de *T. brucei* (modificada de Matthews, 2015).

La diferencia morfológica más notoria entre los diversos estadios de desarrollo de *T. brucei* es la posición del cinetoplasto con respecto al núcleo: las células que tienen un cinetoplasto posterior al núcleo se llaman tripomastigotes, cuya morfología parece estar adaptada para la motilidad en torrentes sanguíneos y tejidos compactos, pues con el movimiento de su flagelo, el citoesqueleto se deforma generando "ondas celulares" que facilitan el movimiento entre las numerosas células sanguíneas y otras barreras biológicas. Las células con un cinetoplasto anterior al núcleo se llaman epimastigotes, tipo celular se da en el vector insecto del parásito, y parece estar adaptado para la adhesión del parásito a los epitelios del hospedero (Figura 2) (Ooi y Bastin, 2013; Sinclair et al., 2019).



Figura 2. Representación esquemática de los estadios de desarrollo principales dentro del ciclo de vida de *T. brucei* (modificada de Stunter y Gull, 2016).

La movilidad del parásito depende de su único flagelo, el cual emerge del extremo posterior, tiene un axonema canónico formado por 9 dobletes de microtúbulos

alrededor de un par de microtúbulos individuales (9+2), está anclado al citoplasma por medio del cuerpo basal, que tiene un arreglo de 9 microtúbulos triples periféricos sin microtúbulos centrales. Conforme se extienden al exterior de la célula, los microtúbulos triples se convierten en dobles formando la zona de transición del axonema. También está unido a lo largo de la célula mediante la "zona de unión flagelar" (o FAZ, por sus siglas en inglés), la cual consiste en una serie de fibras proteicas que liga al flagelo con la capa de microtúbulos, atravesando la membrana plasmática. Esta interacción parece ser importante para la direccionalidad del parásito (Sunter y Gull, 2016; Matthews, 2005; Langousis y Hill, 2014).

El compartimento flagelar se encuentra en el extremo posterior del parásito, en la base del flagelo y es el único sitio de endo- y exo-citosis. En formas sanguíneas del parásito, éste es importante ya que es el sitio en el cual se lleva a cabo el reciclaje de las proteínas variables de superficie (VSGs), lo que le permite evadir la respuesta inmune del hospedero (Ooi y Bastin, 2013).

Un organelo exclusivo de esta familia son los glicosomas (Figura 1), estructuras rodeadas por una sola membrana observadas por primera vez en *T. brucei,* donde se almacenan enzimas involucradas en varias rutas metabólicas, incluyendo la glucólisis (Opperdoes y Borst, 1977).

1.1.2 Ciclo de vida

T. brucei es transmitido por la mosca tse-tse del género *Glossina*, y su ciclo de vida se caracteriza por alternar entre estadios replicativos no infectivos, y no replicativos infectivos. El ciclo comienza con la picadura de la mosca tse-tse, portadora de los tripomastigotes metacíclicos, forma infectiva del parásito, a un hospedero mamífero (Figura 3). Dentro del hospedero, el parásito se replica como formas sanguíneas *slender*, y se mantiene de manera extracelular en la sangre. En el hospedero mamífero, *T. brucei* presenta una capa de VSGs, que les permite evadir la respuesta del sistema inmune (Figueroa-Angulo, 2012). Cuando la densidad de los parásitos

aumenta, se induce la diferenciación a tripomastigotes sanguíneos no replicativos o formas *stumpy*, mediante un proceso de percepción de quorum en el cual se detecta la presencia del Factor Inductor de *Stumpy* (SIF, por sus siglas en inglés), que aún no ha sido identificado. Se ha propuesto un mecanismo en el cual la presencia de oligopéptidos presentes en el suero del hospedero, como consecuencia de la liberación de peptidasas por parte del parásito, desencadena una vía de señalización activada por el receptor TbGPR89, ortólogo de la familia de receptores acoplados a proteínas G, para la inducción de esta diferenciación (Rojas et al., 2019; Solleis y Marti, 2019). Las formas *stumpy* son infectivas para el vector (Figura 3).



Figura 3. Ciclo de vida de *T. brucei* (Brun et al., 2009).

Dentro del vector, los parásitos migran al intestino medio donde se diferencian y se dividen como tripomastigotes procíclicos (también conocidos simplemente como formas procíclicas), los cuales pierden la capa de VSGs y la reemplazan por proteínas repetitivas de ácido procíclico o PARP (prociclinas). Una vez establecida la infección en el intestino medio, las formas procíclicas migran al proventrículo de la mosca, donde invaden el lumen del canal alimenticio y se diferencian a epimastigotes. Estas formas migran a las glándulas salivales, se adhieren al epitelio y proliferan, para eventualmente diferenciarse a tripomastigotes metacíclicos, formas que recuperan la capa de VSGs y son infectivas para el hospedero mamífero (Figura 3) (Figueroa-Angulo, 2012; Ooi y Bastin, 2013).

1.1.3 Tripanosomiasis africana

T. brucei es el agente causal de la tripanosomiasis africana o enfermedad del sueño, enfermedad que se distribuye en zonas rurales de 24 países de África Subsahariana (Figura 4). Existen dos variantes de la enfermedad, causadas por dos de las subespecies de *T. brucei: T. brucei gambiense*, que causa la forma crónica y más común de la enfermedad, y *T. brucei rhodesiense*, que causa la forma aguda y menos común, la cual tiene una progresión más rápida que puede ser fatal semanas después de la infección (Lejon et al., 2013). Mientras que el reservorio principal de *T. b. gambiense* es el humano, para *T. b. rhodesiense* es el ganado, aunque también puede haber animales que porten a *T. b. gambiense*. Cuando el ganado está infectado con tripanosomiasis, no puede ser utilizado para la producción de carne. Así, además de causar morbilidad y mortalidad en el humano, *T. brucei* también produce pérdidas económicas importantes (Kennedy y Rodgers, 2019).

En los últimos años los reportes de casos de tripanosomiasis africana han disminuido considerablemente. En 2015, la Organización Mundial de la Salud reportó 2804 casos de tripanosomiasis africana, de los cuales 2733 fueron causados por *T. b. gambiense* y 71 por *T. b. rhodesiense* (Figura 4), mientras que en 2018 se reportaron menos de 1000 casos, la mayoría causados por *T. b. gambiense* (Büscher et al., 2017; WHO, 2019).

5

La enfermedad tiene diversas características que pueden variar dependiendo de la subespecie que infecta, los diferentes países en donde se dio la infección, e incluso entre diferentes regiones dentro de un mismo país. A pesar de la heterogeneidad de los síntomas de la enfermedad, se han identificado los más conservados en las diferentes etapas de la enfermedad. La primera etapa, la hemo-linfática, se da las primeras tres semanas después de la transmisión del parásito y se caracteriza por la presencia de dolores de cabeza, dolor de las articulaciones, pérdida de peso, fatiga, linfoadenopatías, hepato-esplenomegalia y fiebres intermitentes, entre otros síntomas menos comunes. La segunda etapa, la meningo-encefálica, se presenta cuando el parásito logra pasar la barrera hematoencefálica hacia el sistema nervioso central. En esta etapa se presentan diferentes síntomas neurológicos, como disminución de las funciones mentales, discinecia, irritabilidad, dolores de cabeza y desórdenes del sueño, que le dan el nombre a la enfermedad (Kennedy, 2013; Kennedy y Rodgers, 2019).



Figura 4. Número de casos de tripanosomiasis africana en países endémicos (Kennedy, 2013).

El diagnóstico temprano de la enfermedad es importante, ya que el tratamiento es dependiente de la etapa de la enfermedad, y el tratamiento de la segunda etapa es considerablemente más tóxico que el de la primera. En la primera etapa el diagnóstico puede darse mediante visualización de los parásitos en la sangre, sin embargo esto es posible sólo cuando hay una densidad celular alta, lo cual no siempre ocurre en las infecciones con *T. b. gambiense*. Los métodos serológicos también pueden ser utilizados para el diagnóstico en la primer etapa; la técnica de aglutinación para tripanosomiasis (o CATT, por sus siglas en inglés), se ha utilizado ampliamente, aunque su problema principal es la alta incidencia de falsos positivos. Un prototipo para una prueba de diagnóstico rápido ha sido desarrollado, se llama SD BIOLINE HAT, y se ha demostrado que reconoce exitosamente dos antígenos (VSG LiTat 1.3 y VSG LiTat 1.5). Para el diagnóstico en la segunda etapa, el método que se utiliza actualmente en la examinación del líquido cefalorraquídeo, en el cual se busca la presencia de parásitos o un conteo de células blancas (WBC) de más de 5 WBC/µl, o ambas, de acuerdo con los criterios establecidos por la Organización Mundial de la Salud (Kennedy y Rodgers, 2019).

Existen cinco medicamentos principales en el tratamiento de esta enfermedad en sus diferentes etapas. Para el tratamiento de la primera etapa se utiliza la pentamidina, que tiene una eficacia de hasta el 98% en infecciones por *T. b. gambiense*, y suramina que es utilizada principalmente en infecciones por *T. b. rhodesiense*. El tratamiento para la segunda etapa de la enfermedad consta de una combinación de nifurtimox-eflornitina, con una eficacia del 95 a 98%, y melarsoprol. Se han reportado casos de resistencia a medicamentos; por ejemplo, para *T. b. gambiense* se reportaron casos de mutaciones que confieren resistencia a melarsoprol y pentamidina (Büscher et al., 2017).

El tratamiento, principalmente el utilizado en la segunda etapa, tiene efectos secundarios. En el caso del melarsoprol, se ha reportado un índice de mortalidad del 5-9% debido a encefalopatías post-tratamiento. En el 2018 se describió un

7

nuevo tratamiento para la tripanosomiasis africana causada por *T. b. gambiense*, el cual consiste en la administración de Fexinidazol. Este tratamiento es efectivo en ambas etapas de la enfermedad, con una efectividad del 97.9% en la primera etapa y 86.9% en la segunda etapa, aunque en este caso es un poco menos efectiva que el tratamiento con nifurtimox-eflornitina (WHO, 2019; Linder et al., 2019).

1.1.4 Evolución de T. brucei

Los organismos del orden Kinetoplastida son parte del grupo Euglenozoa, formado por protozoos flagelados ancestrales. Se estima que divergieron de un antepasado común con los organismos del orden Diplonemida hace aproximadamente 600 millones de años (mda). El orden Kinetoplastida consiste en cuatro subgrupos: tres grupos de bodonidos y los tripanosomátidos, que descienden de los bodonidos y se originaron hace 200 a 500 mda (El-Sayed et al., 2005; Simpson et al., 2006; Gualdron-López et al., 2012).

Dentro de los tripanosomátidos, la divergencia entre los géneros *Trypanosoma* y *Leishmania* se estima que ocurrió hace aproximadamente 120 mda. La separación subsecuente entre las especies del género *Trypanosoma* se dio en dos clados divergentes: uno representado por los tripanosomas africanos (también conocidos como el clado de *T. brucei*) y el otro representado por los tripanosomas americanos (el clado de *T. cruzi*), y ocurrió hace aproximadamente 100 mda, cuando se dio la separación de África de los otros continentes. En este punto ya se encontraban presentes los ancestros de muchos de los grupos de mamíferos, pero aún no se daba su diversificación mayor (Stevens et al., 1999; Hamilton et al., 2012; Fernandes et al., 2019)

1.2 Generalidades de Leishmania

Los organismos del género *Leishmania* pertenecen a la familia Tripanosomatidae y son causantes de la leishmaniasis, una enfermedad caracterizada por la presencia

de manifestaciones clínicas variables que dependen de la especie que causa la infección.

1.2.1 Ciclo de vida

Leishmania, al igual que *T. brucei*, presenta un ciclo de vida que incluye un hospedero vertebrado y uno invertebrado, alternando entre estadios replicativos no infectivos y estadios no replicativos infectivos (Figura 5) (Martínez-Calvillo et al., 2012).

Leishmania es transmitida por la mosca de la arena, que pertenece a los géneros *Phlebotomus* o *Lutzomyia*. Su ciclo de vida inicia con la picadura de una mosca infectada, durante la cual los promastigotes metacíclicos, que son las formas infectivas del parásito, se transfieren al hospedero mamífero. Estas formas son ingeridas por los macrófagos y, al principio, se encuentran en fagosomas. Mediante cambios en las condicones ambientales en las que se encuentra el parásito, se desencadena la transformación en amastigotes, que implica la pérdida del flagelo, el cierre de la bolsa flagelar y una reducción en el tamaño, estas formas son las responsables de invadir otros tejidos del mamífero (Martínez-Calvillo et al., 2012; Handman, 2000).

Cuando la mosca pica a un mamífero infectado puede adquirir a los amastigotes presentes en la sangre, y una vez que el parásito está dentro de la mosca de la arena, se produce la siguiente etapa de diferenciación, y el parásito se convierte en promastigotes procíclicos, formas replicativas. Estos promastigotes son formas del parásito con un cuerpo delgado y un flagelo que les permite moverse y les ayuda a anclarse en el intestino de la mosca de la arena, para después migrar a su aparato bucal, donde se diferencian en las formas infectivas, los promastigotes metacíclicos,

y así vuelve a iniciar el ciclo (Martínez-Calvillo et al., 2012; Sasidharan y Saudagar, 2021).



Figura 5. Ciclo de vida de Leishmania (Handman, 2000).

1.2.2 Leishmaniasis

Hay tres principales manifestaciones clínicas de la enfermedad de leishmaniasis, y como se discutió anteriormente, diferentes especies contribuyen a estos tres tipos.

Estas tres variantes de leishmaniasis son la leishmaniasis visceral (LV), la leishmaniasis cutánea (LC), y la leishmaniasis mucocutánea (LMC). De los tres tipos principales conocidos, la LV es la más letal y grave, con un gran número de muertes atribuidas a esta forma (Sasidharan y Saudagar, 2021). Esta enfermedad se caracteriza por fiebre, pérdida de peso e inflamación de órganos como bazo e hígado, y es causada por *L. donovani* o *L. infantum* (Martínez-Calvillo et al., 2012; Padilla-Mejia et al., 2013).

La variedad más común es la LC, que se caracteriza por la presencia de úlceras en el sitio de picadura del insecto, y es causada por *L. major* y *L. mexicana*, entre otras especies (Padilla-Mejía et al., 2013). Mientras que la LMC causa las lesiones más desfigurantes, ya que causa la destrucción de las membranas mucosas de la nariz y boca, así como tejidos periféricos. Esta variedad de la enfermedad la causa proncipalmente la especie *L. braziliensis* (Hailu et al, 2016).

Además de su importancia médica y evolutiva, *T. brucei, Leishmania* y el resto de los tripanosomátidos son organismos importantes en el ámbito de la biología molecular, ya que presentan mecanismos de expresión genética diferentes a los de otros eucariontes. Nuestro grupo de trabajo se dedica al estudio de la transcripción de este grupo de organismos.

1.3 Transcripción en eucariontes

La transcripción es el primer paso en la expresión genética, en el cual se sintetiza una molécula de RNA utilizando como molde una molécula de DNA (Figura 6, i). Este proceso es realizado por enzimas llamadas RNA polimerasas (RNA Pol). La síntesis consta de 3 etapas: iniciación, elongación y término. En la iniciación la RNA Pol es reclutada al promotor que se encuentra al inicio del gen, (complejo cerrado), para después separar la doble hélice de DNA (complejo abierto). La iniciación finaliza cuando los primeros nucleótidos de la cadena de RNA han sido unidos. En la elongación, después de que varios nucleótidos han sido polimerizados, la RNA Pol se separa del promotor y se mueve a lo largo de la cadena molde agregando un nucleótido a la vez al extremo 3' de la cadena de RNA naciente. La RNA Pol mantiene aproximadamente 14 pares de bases separadas de la cadena de DNA, formando la llamada burbuja de transcripción. En la terminación, la molécula de RNA completa o transcrito primario se libera de la polimerasa y ésta se separa del DNA (Lodish, 2004).

La mayoría de los genes en eucariontes están compuestos de exones (secuencias codificantes), e intrones (secuencias no codificantes). Las secuencias no codificantes deben ser removidas del transcrito primario (pre-mRNA) para generar el RNA mensajero (mRNA) maduro, en un proceso que se denomina splicing, catalizado por un complejo ribonucleoproteico llamado spliceosoma (Figura 6, ii). El proceso se basa en el reconocimiento de secuencias consenso que se encuentran en los transcritos para facilitar el reclutamiento de la maquinaria de splicing. El núcleo de esta maquinaria está compuesto por 5 ribonucleoproteínas: U1, U2, U4, U5 y U6, esenciales para que se lleve a cabo la reacción. Otro proceso clave para la generación de los transcritos maduros es la poliadenilación, en la cual se agrega una cola de adeninas de aproximadamente 200 nucleótidos al extremo 3' del transcrito. Ambos procesos ocurren cuando el RNA está siendo sintetizado, es decir son co-transcripcionales. Después, el RNA es transportado a través del complejo de poro nuclear hacia el citoplasma donde se llevará a cabo su traducción (Figura 6, iii y iv) (Nabih et al., 2017; Fredericks et al., 2015; Baralle y Baralle, 2017; Alberts et al., 2014).



Figura 6. Pasos principales de la expresión genética en eucariontes: (i) transcripción, (ii) procesamiento del pre-mRNA, (iii) exportación al citoplasma, (iv) traducción (modificada de Rambout et al., 2018).

En eucariontes existen tres RNA polimerasas: RNA Pol I, II y III, cada una encargada de la transcripción de diferentes grupos de genes. Cada tipo de genes tiene regiones promotoras características, cuya secuencia es suficiente para determinar la especificidad de cada RNA Pol. RNA Pol I, II y III tienen 14, 12 y 17 subunidades, respectivamente. Las tres comparten un núcleo de 12 subunidades compuesto por cinco polipéptidos en común (Rpb5, Rpb6, Rpb8, Rpb10 y Rpb12) y otros siete componentes parálogos. Esta estructura está presente, con algunas variaciones, en todos los linajes eucarióticos (Kwapisz et al., 2008). Ninguna de las RNA Pol puede reconocer sus promotores directamente, pues en su lugar los promotores son reconocidos por factores de transcripción específicos encargados de reclutar a la RNA Pol (Hoffman et al., 2016).

1.3.1 RNA polimerasa I

La RNA Pol I es la más especializada de las 3 RNA Pol, ya que sólo se encarga de la transcripción de la unidad del RNA ribosomal (rRNA), formada por los genes de los rRNA 18S, 5.8S y 28S. Una célula generalmente presenta cientos de repetidos en tándem de la unidad del rRNA. Su región promotora está compuesta de un elemento de control anterior o *upstream element* (UE) y el núcleo del promotor o *core element* (CE) (Figura 7). En células en crecimiento la transcripción de rRNA representa el 60% la actividad transcripcional total, lo que correlacionan con una alta ocupación de RNA Pol I sobre los genes de rRNA (Fernández-Tornero, 2018).



Promotor de los genes de rRNA

Figura 7. Elementos del promotor de la RNA polimerasa I. Se muestra el elemento de control anterior (UE) en verde y el núcleo del promotor (CE) en amarillo. La flecha marca el sitio de inicio de la transcripción (modificada de Lodish et al., 2004).

El inicio de la transcripción requiere del ensamblaje de diferentes factores sobre los elementos del promotor, formando en complejo de preinicio, compuesto por el *upstream binding factor* (UBF) y el factor de selectividad del promotor (nombrado TIF-IB en humanos y SL1 en ratones). UBF genera un doblez en el DNA, acercando el elemento de secuencia anterior al núcleo del promotor, y también es el encargado de reclutar a RNA Pol I. La especificidad de unión al promotor la brinda TIF-IB/SL1, un complejo multiproteico que contiene a la proteína de unión a la caja TATA (TBP), además de tres factores asociados a TBP específicos de RNA Pol I (Fernández-Tornero, 2018; Grummt, 2016; Hoffman et al., 2016).

La transcripción comienza cuando se agregan los primeros nucleótidos de RNA en la presencia de factores de inicio, con la subsecuente liberación de RNA Pol I para formar el complejo elongador. La elongación puede pausar si se encuentra un obstáculo en la región que está siendo transcrita. En el término de la transcripción puede presentarse una situación similar que probablemente lleva a la liberación de la enzima, que puede ser mediado por factores externos como la proteína Nsil en levadura (Fernández-Tornero, 2018).

1.3.2 RNA polimerasa II

La RNA Pol II se encarga de la transcripción de los genes codificadores de proteínas, así como la mayoría de los RNAs pequeños nucleares (snRNA) y micro RNAs, entre otros. RNA Pol II es reclutada a una gran variedad de promotores diferentes y requiere múltiples factores de transcripción generales, así como coactivadores. Aunque la región promotora es altamente variable, hay algunos elementos que se presentan con más frecuencia y componen el núcleo del promotor (Figura 8). Entre ellos se encuentra el motivo iniciador (Inr), que incluye el sitio de inicio de la transcripción (SIT); la caja TATA, que fue el primer elemento descubierto y fue nombrada por la secuencia que presenta (TATAA), la cual encuentra aproximadamente a 30 nucleótidos río arriba del SIT; los elementos de reconocimiento de TFIIB (BRE^u y BRE^d), que se encuentran a ambos lados de la caja TATA; y el elemento del promotor río abajo (DPE), que se encuentra aproximadamente a 30 nucleótidos río abajo del SIT (Figura 8) (Hoffman et al., 2016; Vo ngoc et al., 2017).



Figura 8. Elementos del promotor de la RNA polimerasa II. Se muestra el elemento de reconocimiento de TFIIB en morado, la caja TATA en verde, el elemento iniciador en amarillo y el elemento de promotor río abajo en rosa. La flecha marca el sitio de inicio de la transcripción (Vo ngoc et al., 2017).

Se han identificado seis factores de transcripción generales para esta polimerasa: TFIIA, TFIIB, TFIID, TFIIE, TFIIF y TFIIH, que junto con la RNA Pol II y el complejo mediador forman el complejo de preinicio (PIC), aunque la composición del PIC puede variar entre las diferentes clases de genes transcritos por RNA Pol II. El factor TFIID es el encargado del reconocimiento del promotor, y está compuesto por la proteína TBP y otras doce subunidades conocidas como TAFs (*TBP associated factors*). La unión de TBP dobla el DNA unos 90°, lo que genera un cambio conformacional para permitir diferentes interacciones entre los factores y estabiliza el complejo. TFIIA también ayuda a estabilizar la unión de TBP y TAFs al DNA. TFIIB selecciona el sitio de inicio de la transcripción, mientras que TFIIF recluta a RNA Pol II al promotor. TFIIE lleva a cabo el reclutamiento de TFIIH. Por último, TFIIH facilita el inicio de la transcripción mediante su actividad de helicasa, y al fosforilar a RNA Pol II para activarla. La función principal del Mediador es transmitir señales de los activadores de transcripción unidos a las regiones potenciadoras hacia la maquinaria de transcripción, ayudando en la regulacion del inicio de la transcripción. (Roeder, 1996; Schier y Taatjes, 2020; Soutourina, 2017).

1.3.3 RNA polimerasa III

La RNA Pol III es la más grande de las tres, pues cuenta con 17 subunidades y un peso molecular de 0.7 MDa. Se encarga de la transcripción de RNAs pequeños no codificantes, entre los que se encuentran: los RNAs de transferencia (tRNA), que se encargan del acarreamiento de los aminoácidos a los ribosomas para que se lleve a cabo la síntesis de proteínas; el rRNA 5S, que forma parte de la subunidad mayor de los ribosomas; el snRNA U6, parte estructural del *spliceosoma*, esencial para el procesamiento de los mRNAs; el componente de RNA de la Rnasa P, que es una ribonucleoproteína que procesa el extremo 5' de los pre-tRNAs; el RNA 7SL, que es parte de la partícula de reconocimiento del péptido señal, entre otros RNAs pequeños esenciales (Hoffman et al., 2015; Dieci et al., 2007).

A diferencia de las otras dos RNA polimerasas, algunas de las regiones promotoras de la RNA Pol III contienen elementos que se localizan río abajo del sitio de inicio de la transcripción, y se dividen en tres grupos principales, llamados tipos 1-3 (Figura 9). Los promotores de tipo 1 corresponden al rRNA 5S, y consisten de una caja A, un elemento intermedio (IE) y una caja C, que juntos forman la región de

control interna (ICR). Los de tipo 2 son característicos de los tRNAs y se conforman por una caja A y una caja B, que coinciden con dos regiones conservadas dentro de los tRNAs, el loop D y el loop T. Los promotores de tipo 3 son característicos del snRNA U6, entre otros RNAs transcritos por RNA Pol III, y se encuentran río arriba del sitio de inicio de la transcripción; están compuestos por un elemento de secuencia proximal (PSE), un elemento de secuencia distal (DSE) y una caja TATA (Figura 9) (Schramm y Hernandez, 2002; Turowski y Tollervey, 2016; Dergai y Hernández, 2019).



Figura 9. Elementos de los tres tipos principales de promotores de la RNA polimerasa III. Tipo 1: rRNA 5, contiene al elemento de control interno (ICR) que se componen de una caja A (A), una caja B (B) y un elemento intermedio (IE). Tipo 2: tRNAs, se componen de una caja A (A) y una caja B (B). Tipo 3: snRNA U6, contiene un elemento de secuencia distal (DSE), un elemento de secuencia proximal (PSE) y una caja TATA (TATA) (Schramm y Hernández, 2002).

1.3.3.1 Factores de transcripción

Al igual que el resto de las polimerasas, RNA Pol III no reconoce sus regiones promotoras directamente, sino que requiere de factores de transcripción. Los factores generales de transcripción de esta RNA Pol se conocen como TFIIIA, TFIIIB y TFIIIC (Figura 10). TFIIIA es requerida para la transcripción de los genes de rRNA 5S, en levadura se trata de una proteína de aproximadamente 40 kDa, y es de la

familia de las proteínas con dedos de zinc del tipo C₂H₂. Cuenta con 9 dedos de zinc, de los cuales usa los primeros 3 para unirse a una región de 35 pb de la caja C. Los dedos 1-7 son esenciales para el ensamblaje del resto de la maquinaria de transcripción, mientras que el dedo 1 está involucrado en el reclutamiento del factor TFIIIC (Acker et al., 2013).

TFIIIB es necesario para la transcripción de los tres tipos de promotores, y está compuesto por tres subunidades: TBP, BRF1 y BDP1. La función principal de TFIIIB es reclutar a la RNA polimerasa, lo que hace mediante interacciones entre sus subunidades y con otros factores de transcripción. Su unión al DNA requiere la presencia previa de TFIIIC, que recluta a la proteína BRF1 y después a la proteína TBP, cuya presencia estabiliza el complejo, y permite el reclutamiento de BDP1. Una vez formado el complejo, BRF1 recluta a la RNA Pol III mediante interacciones con sus subunidades C17 y C34 (Kassavetis y Geiduschek, 2006; Acker et al., 2013). Los promotores del tipo 3 requieren del factor SNAPc, quien recluta a TFIIIB y a la RNA Pol III (Figura 10).



Figura 10. Diferentes complejos de inicio de los tres tipos de promotores, en los que se reclutan diversos factores de transcripción (modificada de Dergai y Hernández, 2019).

1.3.3.2 TFIIIC

El factor de transcripción TFIIIC es un complejo de aproximadamente 500 kDa (en levadura), y está dividido en dos subcomplejos denominados τA y τB , que se encargan del reconocimiento directo de la caja A y la caja B, respectivamente, en los promotores de tRNAs (Figura 11). En total, TFIIIC está compuesto por 6 subunidades que fueron nombradas por sus respectivos pesos moleculares en levadura: el subcomplejo τA tiene a las subunidades Tau131, Tau95 y Tau55, mientras que τB está formado por las subunidades Tau138, Tau91 y Tau60 (Acker et al., 2013; Male et al., 2015).

En los promotores de tipo 2, las subunidades Tau95 y Tau138 de los subcomplejos τA y τB , respectivamente, son las que se encargar del reconocimiento directo del DNA (Figura 11), sin importar las distancias tan variables que puede haber entre ambas cajas en distintos genes de tRNA; esto es gracias a un *linker* flexible entre ambos subcomplejos. En los promotores de tipo 1, los del rRNA 5S, se necesita de la presencia del factor TFIIIA que se posiciona en la caja C del promotor y recluta a TFIIIC por medio de interacciones con sus dedos de zinc (Acker et al., 2013).



Figura 11. Unión de TFIIIC al promotor de tipo 2. El subcomplejo τA (en verde) interactúa directamente con la caja A, mientras que τB (en gris) interactúa con la caja B (modificada de Taylor et al., 2013).

Durante la formación del complejo de preinicio de la RNA Pol III, la función principal de TFIIIC es reclutar al factor TFIIIB a una región río arriba del sitio de inicio de la transcripción, mediante interacciones proteína/proteína entre diferentes subunidades de ambos. Primero, se da el reconocimiento de BRF1 con Tau131, seguido del reclutamiento de TBP vía BRF1 y Tau60, finalmente BDP1 es reclutada por Tau131 (Graczyk et al., 2018).

1.3.3.3 Tau95

La subunidad Tau95 es parte del subcomplejo τA y es la única subunidad del subcomplejo que tiene propiedades de unión al DNA, por lo que está involucrada en el reconocimiento de la caja A. En *Schizosaccharomyces pombe*, la proteína está dividida en dos dominios principales: el dominio de unión a DNA (DBD) y el dominio de dimerización (Figura 12). Este último se encuentra en el extremo N-terminal de Tau95 y con él forma un heterodímero con la proteína Tau55. Está compuesto por tres barriles β y cuatro α -hélices intercaladas, lo que sugiere que ambas proteínas deben expresarse de manera simultánea para ser plegadas. El DBD es un dominio compacto que se encuentra en el extremo C-terminal de Tau95, y se divide en dos subdominios: el subdominio de hélice alada y el subdominio de interacción con la hélice alada. El primero tiene una topología canónica α 1- β 1- α 2- α 3- β 2- β 3, más una hoja β adicional, a la que se denominó β 0. El segundo subdominio consiste de cinco α -hélices y dos hojas β , y no tiene similitud con algún otro dominio ya descrito (Taylor et al., 2013).



Figura 12. Estructura secundaria y dominios de Tau95 en *S. pombe*. En amarillo se muestra el dominio de dimerización y en rojo el dominio de unión a DNA, que a su vez está dividido en el subdominio de hélice alada (WH, por sus siglas en inglés, se muestra en rojo claro) y el subdominio de interacción con el subdominio de hélice alada (WHI, en rojo oscuro). Las flechas indican hojas β y los rectángulos α -hélices (modificada de Taylor et al., 2013).

Dentro de TFIIIC, Tau95 establece interacciones con las otras dos subunidades de τA y con las subunidades Tau138 y Tau91 de τB , por lo que ha sido propuesta como un *linker* entre ambos subcomplejos que contribuye a la estabilidad del complejo TFIIIC. También ha sido descrito que Tau95 tiene un efecto indirecto sobre el sitio de inicio de la transcripción, ya que establece interacciones con la subunidad Tau131, la encargada del reclutamiento de TFIIIB, cuyo posicionamiento río arriba ayuda a determinar el primer nucleótido transcrito (Jourdain et al., 2003; Male et al., 2015).

1.4 Expresión genética en T. brucei

Los organismos de la familia de Trypanosomatidae, además de ser de importancia médica, son de interés en el campo de la biología molecular debido a los mecanismos atípicos de expresión genética que presentan. Dentro de los que se encuentran la transcripción policistrónica de sus genes codificadores de proteínas, el trans-*splicing*, la edición de los mRNAs mitocondriales, la presencia de un rRNA polifragmentado y la transcripción de algunos genes codificadores de proteínas por la RNA Pol I.

1.4.1 Organización genómica

A pesar de que la divergencia entre el género *Leishmania* y *Trypanosoma* se dio hace aproximadamente 120 mda, el genoma de *T. brucei* es altamente sinténico (muestra conservación en el orden de los genes), comparándolo con otras especies como *L. major* y *T. cruzi*. Por ejemplo, de todos los genes de *T. brucei* y *L. major*, el 68 y 75% se mantiene en el mismo contexto genómico, respectivamente (El-Sayed et al., 2005).

El genoma de *T. brucei* es de 26 Mb y está dividido en 11 cromosomas grandes (o megacromosomas), que van de 1 a 6 Mb y contienen los genes transcripcionalmente activos. También presenta un número desconocido de cromosomas pequeños (minicromosomas, de 30 a 150 Kb) e intermedios (de hasta 700 Kb). Los genes codificadores de proteínas están organizados en grupos, conocidos como unidades policistrónicas. Dentro de los tripanosomátidos, ésto fue observado por primera vez en el cromosoma 1 de *L. major*, (el primer cromosoma de tripanosomátidos en ser secuenciado), que contiene 85 genes organizados en dos unidades policistrónicas divergentes, con 32 y 53 genes cada una. Con la publicación de los genomas de *T. brucei* y *T. cruzi* se observó que la mayoría de los genes de los tripanosomátidos tienen esta organización. Otro aspecto particular de su genoma es que los genes codificadores de proteínas no tienen intrones, y el cis*splicing* sólo se ha demostrado para dos genes, el de la enzima Poly(A) polimerasa y un gen putativo de RNA helicasa (Berriman et al., 2005; Martínez-Calvillo et al., 2010; Preußer et al, 2012).

Las unidades del rRNA se encuentran ordenadas en tándem, y están formadas por el rRNA 18S, 5.8S y 28S. Una particularidad de los tripanosomátidos es que el rRNA 28S está multifragmentado, presentando dos moléculas grandes ($24S\alpha$ y $24S\beta$) y cuatro pequeñas, cuyos genes están separados por espaciadores que son removidos de manera postranscripcional (Hernández y Cevallos, 2014; Martínez-Calvillo et al., 2019). Más del 20% del genoma de *T. brucei* codifica genes subteloméricos, de los que la mayoría son específicos de la especie y están relacionados con la variación antigénica, un mecanismo que le permite evadir la respuesta del sistema inmune en el torrente sanguíneo del hospedero mamífero. Durante la infección, *T. brucei* se cubre de una capa densa de glucoproteínas variantes de superficie o VSGs, las cuales tienen un dominio N-terminal hipervariable, que es el que se encuentra expuesto al sistema inmune, mientras que el dominio C-terminal está más conservado. En el genoma de *T. brucei*, se encuentran 2500 genes de VSGs inactivos. Estos genes tienen una organización similar, cada uno con repetidos de 70 pb en la región flanqueante 5', y homología de secuencia en el extremo 3', que incluye partes de la región codificante y la región 3' no traducida (UTR) (Berriman et al., 2005).

La mitocondria de los tripanosomátidos es peculiar, y su DNA, conocido como cinetoplasto, está formado por una red intrincada de moléculas de DNA circulares de diferentes tamaños: maxicírculos y minicírculos, que juntos forman una estructura de disco. Los maxicírculos están presentes en alrededor de 25 copias, de aproximadamente 23 kb, y codifican para dos rRNAs, un RNA guía (gRNA) y 18 genes codificadores de proteínas, de las cuales la mayoría codifica proteínas de los complejos necesarios para la fosforilación oxidativa. Doce de estos genes son criptogenes, es decir, sus transcritos primarios necesitan ser editados mediante la inserción o deleción de múltiples uridinas para generar un marco abierto de lectura. Los minicírculos representan del 80 al 90% de la masa del kDNA, tienen un tamaño de aproximadamente 1 kb y entre 5000 y 10000 copias, y cada uno codifica 3 o 4 gRNAs, flanqueados por repeticiones cortas invertidas, que aparentemente son importantes para su transcripción. El kDNA no codifica tRNAs, por lo que éstos deben ser importados del citosol (Figueroa-Angulo et al., 2012; Verner et al., 2015; Schneider y Ochsenreiter, 2018).

1.4.2 Transcripción de RNA Pol II

1.4.2.1 Transcripción policistrónica y regiones promotoras

Los genes en los tripanosomátidos se encuentran organizados en unidades policistrónicas, grupos grandes de genes localizados en la misma cadena de DNA (Figura 13). La mayoría de los cromosomas tienen al menos dos unidades policistrónicas, que pueden tener una transcripción convergente (que se dirige hacia un punto central) o divergente (en dirección opuesta). Las regiones que flanquean estas unidades se conocen como región de cambio de hebra o SSR, por sus siglas en inglés. La transcripción normalmente es bidireccional y ocurre en regiones que son marcadas por la presencia de modificaciones postraduccionales en las histonas o variantes de histonas específicas. La identificación de secuencias promotoras de RNA Pol II ha sido difícil, debido a la transcripción policistrónica. Sin embargo, se ha demostrado que la transcripción divergente de RNA Pol II inicia en las regiones SSR, y la transcripción convergente termina en estas regiones. Las regiones de inicio de la transcripción no contienen cajas TATA o algún otro elemento típico de los promotores en eucariontes, pero sí presentan características de los promotores sin caja TATA en vertebrados (o TATA-less), pues tienen múltiples sitios de inicio de la transcripción en una región de 50 a 100 pb y tractos ricos en G y C (Martínez-Calvillo et al 2010; Clayton, 2016; Martínez-Calvillo et al, 2018).

Hasta el momento, el único promotor que ha sido caracterizado es el del *spliced leader* (SL) RNA o miniexón. En *Leishmania tarentolae* está compuesto por un elemento a -60 nt del SIT y un elemento a -30 (Figura 13). En *T. brucei* está compuesto por un elemento bipartito de secuencia río arriba (USE) y una secuencia iniciadora en el SIT. Se han identificado diversos factores de transcripción involucrados en la producción del miniexón: el complejo SNAPc, que está compuesto por tres subunidades (tSNAP50, tSNAP42 y tSNAP26), el factor TFIIA, TFIIB, TBP *related protein* 4 (TRF4), TFIIH y dos homólogos putativos del factor TFIIE llamados TSP1 y TSP2 (Lee et al., 2007; Martínez-Calvillo et al., 2010;
Michaeli, 2015). Asimismo, para la expresión del miniexón se requiere del complejo Mediador (Lee et al., 2010).



Figura 13. Elementos del promotor del miniexón identificados en *L. tarentolae* (Martínez-Calvillo et al., 2010).

1.4.2.2 Trans-splicing y poliadenilación

Como consecuencia de la transcripción policistrónica, se forman transcritos primarios largos que contienen información para la síntesis de varias proteínas. Los transcritos primarios policistrónicos son procesados mediante trans-splicing y poliadenilación para generar mRNA individuales (Figura 14). El trans-splicing fue observado por primera vez en tripanosomátidos, al descubrir que todos los mRNAs de las diferentes glicoproteínas variables de superficie en T. brucei tienen una secuencia común de 39 bases en su extremo 5, que no se encontraba en su secuencia genómica correspondiente, a la que nombraron SL o miniexón. Después se descubrió que todos los mRNAs de los tripanosomátidos tienen la secuencia miniexón y maduran por trans-splicing, un proceso en el que el miniexón actúa como el exón 5' (Liang et al., 2003; Boothroyd y Cross, 1982; Preußer et al, 2012). En sólo dos genes codificadores de proteínas se ha descubierto el cis-splicing en T. brucei, el gen PAP, que codifica una poly(A) polimerasa y un gen putativo de RNA helicasa, lo que indica que el trans-splicing y el splicing coexisten en estos organismos. Ambos procesos, el cis- y el trans-splicing, se llevan a cabo mediante dos reacciones de transesterificación (Preußer et al, 2012; Liang et al., 2003).



Figura 14. Transcripción policistrónica, trans-*splicing* y poliadenilación en los tripanosomátidos (Martínez-Calvillo et al., 2012).

Durante el trans-*splicing*, se agrega el miniexón en un sitio aceptor (AG) en el premRNA que se encuentra de 30 a 70 bases río arriba del codón de inicio de la traducción (Agabian, 1990). Además del sitio aceptor, es importante una región rica en pirimidinas, ubicada entre dos regiones codificantes adyacentes, que también es necesaria para el proceso de poliadenilación de la secuencia codificante río arriba (Martínez-Calvillo et al., 2012). En general hay entre 100 y 400 bases entre el sitio de poliadenilación del gen río arriba y el sitio donde se lleva a cabo el trans-*splicing* del gel río abajo (Blumenthal, 1998). La secuencia del miniexón contiene el cap en su extremo 5', que es necesario para brindar estabilidad a los mRNAs. El cap que presentan los tripanosomátidos es el cap4, el más complejo descrito hasta ahora, que incluye la metilación 2'-O-ribosa de sus primeros cuatro nucleótidos, y metilación de las bases en la primera (m²⁶A) y cuarta (m³U) posición (Blumenthal, 1998; Michaeli, 2011).

Los procesos de trans-*splicing* y cis-*splicing* están relacionados, ya que los homólogos de las ribonucleoproteínas pequeñas nucleares (snRNP) que catalizan el cis-*splicing* en eucariontes superiores (U1, U2, U4, U5 y U6) funcionan en el trans-

splicing de tripanosomátidos (Blumenthal, 1998). Sin embargo, a diferencia del cis*splicing*, el miniexón parece tomar el papel del snRNA U1, el cual durante cis*splicing* reconoce al mRNA mediante apareamiento de bases con el sitio de *splicing* 5' (Preußer et al, 2012). Otra diferencia entre ambos procesos es que, en lugar de la formación de una estructura intermediaria conocida como lazo, en el trans-*splicing* se forma una estructura con forma de "Y" (Martínez-Calvillo et al., 2012).

Los genes en una unidad policistrónica no codifican proteínas con funciones relacionadas y todos son transcritos al mismo nivel. Sin embargo, genes que se encuentran en una misma unidad pueden mostrar concentraciones diferentes de mRNAs maduros o pueden sólo expresarse en un estadio de desarrollo; esto se debe a que la expresión genética en tripanosomátidos es regulada principalmente a nivel postranscripcional (Martínez-Calvillo et al., 2010). Los mecanismos de regulación postranscripcional se presentan a nivel de procesamiento y degradación del mRNA, así como en la traducción. Durante el trans-splicing, la eficiencia de las señales de splicing (y por lo tanto, la velocidad del mismo) dependen de la composición y el largo de la región de pirimidinas y de secuencias en la región 5' UTR del transcrito. Si la degradación del precursor se da más rápido que el splicing, el transcrito será expresado de manera deficiente. Otro punto de regulación es el exporte del mRNA al núcleo; en *T. brucei*, una de las proteínas importantes para este proceso es MEX67, cuya deleción causa acumulación de RNAs en el núcleo. También, se ha reportado que el exporte se puede iniciar de manera cotranscripcional, y cuando se inhibe el trans-splicing se forman gránulos que contienen mRNAs en el poro nuclear (Clayton y Shapira, 2007; Clayton, 2019).

La estabilidad del mRNA contribuye de manera importante en su abundancia, y la mayoría de las secuencias reguladoras de la estabilidad se encuentran en el extremo 3' UTR. Éstas tienen un promedio de 400 nt en *T. brucei,* con la capacidad de unión de al menos 13 proteínas. El comportamiento y destino de los mRNAs dependerá de la dinámica e interacciones del mRNA con las diversas proteínas que compiten para unirse a él. La combinación de mRNA y proteínas se llama "partícula

27

ribonucleoproteica mensajera" (mRNP). Un ejemplo de estos tipos de interacciones se observa en los transcritos de las proteínas EP prociclinas (entre otras), que contienen uno o más motivos U(A)U₆ en su extremo 3' UTR. En las formas sanguíneas, la proteína represora RPB10 se une estos motivos, lo que induce la degradación del mRNA. Las formas sanguíneas con esta proteína deletada presentan niveles altos de estos transcritos (Clayton, 2019).

1.4.2.3 Regulación epigenética

Los procesos epigenéticos tienen la capacidad de modificar la expresión de ciertos genes sin que haya cambios en la secuencia de los mismos. Dentro de ellos se encuentran las modificaciones postraduccionales de las histonas, las cuales influyen en diversos procesos biológicos, incluyendo la condensación de la cromatina y el reclutamiento de proteínas de unión al DNA. Como en otros organismos, las modificaciones postraduccionales son importantes para la transcripción en los tripanosomátidos. Los tripanosomátidos presentan una divergencia alta en la secuencia de las histonas, en comparación con otros eucariontes. Cuentan con múltiples copias de las cuatro histonas canónicas: H1, H2A, H2B, H3 y H4. Además, presentan cuatro variantes de histonas: H2A.Z, H2B.V, H3.V y H4.V. En *T. brucei* H2A.Z y H2B.V son esenciales para la viabilidad celular, mientras que H3.V y H4V (que parecen ser únicas de tripanosomátidos) no lo son (Martínez-Calvillo et al., 2018; Maree y Patterton, 2014).

En *T. brucei,* las regiones SSR, sitios en los que inicia la transcripción divergente de RNA Pol II, contienen diversas marcas epigenéticas, como la presencia de la histona H4 acetilada en el residuo K10, la histona H3 trimetilada en la lisina K4 y las variantes de histonas H2A.Z y H2B.V, que son marcas de cromatina transcripcionalmente activa. También se ha reportado la presencia del factor BDF3 (*Bromodomain Factor 3*), que se asocia a sitios de inicio de la transcripción (Siegel et al., 2009; Martínez-Calvillo et al., 2018).

28

Los nucleosomas que contienen a H2A.Z son menos estables que los que contienen a la canónica H2A. La cromatina en estos nucleosomas está menos condensada, lo que la hace ideal para que se lleve a cabo la transcripción. La variante H2B.V está presente en nucleosomas enriquecidos en trimetilaciones de las lisinas K4 y K76 de la histona H3, que igualmente son marcas de cromatina transcripcionalmente activa. Por otro lado, las variantes de histonas H3.V y H4.V se encuentran enriquecidas en regiones río abajo de las unidades policistrónicas, lo que sugiere que los nucleosomas con estas variantes sirven como marcas epigenéticas de la terminación de la transcripción en unidades policistrónicas (Siegel et al., 2009; Maree y Patterton, 2014).

Otras marcas epigenéticas que regulan la expresión genética son las modificaciones de DNA, una de ellas es la metilación. En tripanosomátidos sí se ha detectado la presencia de metilación en el DNA, sin embargo no se ha comprobado su participación en la regulación de la transcripción. De manera interesante, en tripanosomátidos y otros organismos relacionados, se ha reportado la presencia de la modificación de timidinas, que son hidroxiladas y glucosiladas para formar la base J (β -D-glucosil-hidroximetil-uracilo). Esta modificación se encuentra principalmente en repetidos teloméricos, sin embargo se ha encontrado también en regiones de inicio y término de la transcripción de RNA Pol II. En *T. brucei*, no parece estar involucrada en el término de la transcripción convergente, pero sí parece atenuar la fase de elongación en unidades policistrónicas específicas y regular la transcripción de genes que se encuentran río abajo (Raynolds et al., 2014; Martínez-Calvillo et al., 2018).

1.4.3 Regulación mediante RNA de interferencia

En eucariontes, el mecanismo de RNA de interferencia (RNAi) es usado como una defensa natural contra la invasión de RNAs de doble cadena (dsRNA) generados por virus o elementos genéticos móviles (Balaña-Fouce y Reguera, 2007). Éste consiste primero en el procesamiento del dsRNA para generar RNAs pequeños de

21 a 25 nt, conocidos como *small interfering* RNAs (siRNAs), que actúan como secuencias guía para la degradación del mRNA con secuencia homóloga (Ullu et al., 2002) (Figura 15).



Figura 15. Proceso de degradación de mRNAs mediante RNAi (modificado de Balaña-Fouce y Reguera,2007).

Durante este proceso están involucradas varias proteínas, siendo las principales las de las familias DICER y AGO. Todos los organismos que presentan el silenciamiento de genes mediante dsRNA presentan uno o más miembros de estas familias de proteínas. Las proteínas AGO son componentes de RISC (*RNA Induced Silencing Complex*) y tienen características conservadas: son proteínas de aproximadamente 100 kDa con dos dominios principales, el dominio PAZ con el que se une al RNA, y el dominio Piwi, localizado en el extremo C-terminal con el que pueden unirse a DICER y es posible que tenga funciones adicionales (Ullu et al., 2004). Por otro lado, las proteínas DICER son pertenecientes a las enzimas RNasas III, y son requeridas para la biogénesis de los siRNAs (Shi et al., 2006).

T. brucei fue el primer parásito protozoario en el que se demostró la funcionalidad del RNAi, en un estudio realizado por Ngô y colaboradores (1998) en el que transfectaron células de tripanosomas con dsRNA con la secuencia homologa de la región 5' UTR del gen de α -tubulina. Encontraron que el mRNA del gen era degradado, llevando a un déficit en la síntesis de α -tubulina, lo que generó células multinucleadas con alteraciones morfológicas que no podían llevar a cabo la citocinesis. Este fenómeno no se observó al transfectar RNA de cadena sencilla.

En el genoma de *T. brucei* están presentes dos miembros de la familia AGO conocidos como TbPIWII y TbAGO1. El primero parece no estar involucrado en la vía de RNAi, mientras que TbAGO1 es esencial para ésta, pero no para la viabilidad celular del parásito. TbAGO1 tiene dos dominios: el dominio PAZ y el dominio PIWI, que tiene actividad de RNasa tipo H y corresponde al sitio activo de la enzima. Es predominantemente citoplasmática y se encuentra en una partícula ribonucleoproteica con los siRNAs. Su *knock out* lleva a la pérdida de RNAi y a la disminución de la abundancia de siRNAs a niveles casi indetectables (Shi et al., 2003; Durand-Dubief y Bastin, 2003; Balaña-Fouce y Reguera, 2007).

También está presente una enzima DICER conocida como TbDcl1, la cual tiene un dominio PAZ que se une a RNA seguido de dos dominios de RNasa III (RNasa IIIa y RNasa IIIb) que sirven para degradar el dsRNA a siRNAs. Debido a la distancia entre el dominio PAZ y los dominios RNasa III, se estima que el tamaño de los siRNAs en *T. brucei* es de 25 nt. Aunque en las proteínas DICER los dominios RNasa III están localizados en el extremo C-terminal, en el caso de TbDcl1, RNasa IIIa se encuentra cerca del N-terminal y RNasa IIIb está en el centro de la molécula. Esta organización de dominios es específica de tripanosomátidos (Shi et al., 2006; Balaña-Fouce y Reguera, 2007).

La función biológica del RNAi en *T. brucei* se ha estudiado mediante la caracterización del repertorio de siRNAs presentes en el parásito. Djikeng y colaboradores (2001) secuenciaron más de 1,300 RNAs pequeños, de los cuales el

31% correspondía a retrotransposones, principalmente de tipo INGI y SLACS. Éstos últimos interrumpen los genes de RNA miniexón y están presentes en alrededor de 10 copias en el genoma. El elemento INGI contiene un solo marco abierto de lectura (ORF) con homología a una transcriptasa reversa, mientras que SLACS contienen dos ORFs: ORF1 no tiene una función conocida y ORF2 tiene homología con una transcriptasa reversa. Estos resultados sugieren que los siRNAs derivados de retrotransposones están involucrados en el silenciamiento de los transcritos de los mismos mediante RNAi.

También se ha identificado la presencia de siRNAs provenientes de pseudogenes (incluyendo pseudogenes de VSGs), que son capaces de unirse por apareamiento de bases con el transcrito del gen codificador de proteínas provocando su degradación mediante RNAi. Esto fue evidente, ya que con un *knock down* de TbDcl1 aumentó la abundancia de los transcritos de estos genes, mientras que los siRNAs disminuyeron. Esto sugiere que los transcritos de pseudogenes en *T. brucei* pueden provocar la degradación de los respectivos transcritos de los genes codificadores de proteínas (We, et al., 2011).

Con el descubrimiento de que *T. brucei* cuenta con la maquinaria para degradar mRNAs específicos con la presencia del dsRNA homólogo, se han generado vectores inducibles para la generación de dsRNA y degradación del mRNA homólogo. Esto ha permitido avanzar en el estudio de la función de los genes en este parásito. Actualmente, el RNAi es el mejor método para disminuir la expresión en *T. brucei*, ya sea de genes específicos o de todo el genoma. Existen dos estrategias principales para esto, la primera conciste en la expresión de una estructura de *hairpin* del gen de interés, mientras que la segunda se trata de la clonación de un fragmento del gen de interés entre dos promotores opuestos de la RNA Pol T7 (Ullu et al., 2004; Kolev et al., 2011).

1.4.4 Transcripción de RNA Pol I

Al igual que en el resto de los eucariontes, en los tripanosomatidos la gran mayoría de la transcripción corresponde a la de los rRNAs, la cual es llevada a cabo a partir de genes que sólo comprenden menos del 1% del genoma nuclear. En *T. brucei*, el promotor de los genes de rRNA está compuesto por un elemento núcleo bipartito (Figura 16, I y II), un elemento distal (Figura 16, III) y una región de control río arriba a aproximadamente -250 nt del sitio de inicio de la transcripción (UCR); esta última tiene una influencia menor sobre la eficiencia de la transcripción (Martínez-Calvillo et al., 2010; Hernández y Cevallos, 2014).

1.4.4.1 Transcripción de genes codificadores de proteínas por RNA Pol I

La RNA Pol I en *T. brucei* no sólo se encarga de la transcripción de los rRNAs, sino que también tiene la capacidad de sintetizar mRNAs, siendo la única RNA Pol I descrita hasta ahora que realiza esta función. La comparación de la sensibilidad de la transcripción a alfa amanitina reveló que los genes de VSGs y prociclinas son transcritos por RNA Pol I, que es resistente a alfa amanitina, mientras que otros genes codificadores de proteínas son transcritos por una RNA Pol II convencional, sensible a la droga (Kooter y Borst, 1984; Clayton et al., 1990). Otras evidencias de este fenómeno incluyen que el promotor de los genes de rRNA puede dirigir la transcripción de estos genes en *T. brucei*, que los promotores de rRNA y las prociclinas tienen regiones río arriba que son intercambiables funcionalmente, que la RNA Pol I colocaliza con los genes de VSG activos fuera del nucleolo (en un compartimento nuclear llamado el cuerpo de sitio de expresión o ESB) y finalmente, que la deleción de RNA Pol I de extractos nucleares elimina la transcripción *in vitro* de los genes de rRNA, VSGs y prociclina (Günzl et al., 2003).

La expresión de las VSGs se da en los sitios de expresión de formas sanguíneas (BESs), que se encuentran en regiones subteloméricas y tienen alrededor de 12 genes asociados, llamados ESAGs. Para que una VSG se exprese normalmente tiene que ser duplicada a algún BES, pues sólo un sitio de expresión está activo a

la vez (Berriman et al., 2005). El promotor de las VSGs sólo contiene un elemento núcleo bipartito en la posición -67 (Figura 16). Cuando las formas sanguíneas se transforman en procíclicas se cambia la capa de VSGs por una de prociclinas. Los genes de prociclinas están organizados en unidades policistrónicas de 5 a 10 kb en los cromosomas VI y X. Cada locus tiene dos genes de prociclinas seguidos por genes asociados a prociclinas (PAGs). La región promotora de estos genes es muy similar a la de los rRNA, pues está compuesta por cuatro dominios que se extienden hasta el nucleótido -246 (Figura 16) (Martínez-Calvillo et al., 2010).



Figura 16. Regiones promotoras de los genes transcritos por RNA Pol I en *T. brucei* (Martínez-Calvillo et al., 2010).

El estudio de la maquinaria de transcripción de RNA Pol I ha revelado la presencia de al menos 10 subunidades de la RNA Pol, así como un factor de transcripción basal denominado *Class I transcription factor* A o CITFA. Inicialmente se había reportado como un factor de transcripción de 6 subunidades (CITFA-1 a 6), más la cadena ligera de dineína, DYNLL1. Más tarde, se reportó la presencia de una séptima subunidad, CITFA-7, un componente esencial del factor de transcripción (Brandenburg et al., 2007; Nguyen et al., 2012; Hernández y Cevallos, 2014).

1.4.5. Transcripción de la RNA Pol III

1.4.5.1. Organización de genes transcritos por RNA Pol III

La RNA Pol III también presenta aspectos atípicos en tripanosomátidos, ya que aparte de hacerse cargo de la transcripción del rRNA 5S y los tRNAs, también se encarga de la síntesis de todos los snRNAs (no sólo el snRNA U6, como en otros organismos) (Fantoni et al., 1994; Nakaar et al., 1997).

La organización de los genes de tRNA en *T. brucei*, así como en *L. major*, parece no ser al azar, ya que su distribución se limita a un grupo de cromosomas. En *T. brucei*, los 65 genes de tRNA están localizados en 26 loci distribuidos en 8 cromosomas diferentes. Al igual que en *L. major*, los grupos de genes de tRNA se encuentran en regiones que separan dos unidades policistrónicas, en grupos que van de 2 a 10 genes junto con otros genes transcritos por RNA Pol III, como los snRNA o el RNA 7SL. Sólo 11 genes de tRNA se presentan solos, como genes independientes (Padilla-Mejía et al., 2009; Ersfeld, 2011). Los genes del rRNA 5S en *T. brucei* y *T. cruzi* están organizados en tándem y se estima que hay 1,500 copias del gen, a diferencia de *L. major*, en donde se encuentran distribuidos al azar en el genoma y sólo cuenta con 11 copias (Hasan et al., 1984; Figueroa-Angulo, 2012; Moreno-Campos et al., 2016).

1.4.5.2 Regiones promotoras

Las regiones promotoras de los genes de snRNA también tienen características atípicas, pues se componen de elementos internos y externos, y es necesaria la presencia de las cajas A y B de un tRNA contiguo en su extremo 5' para que se lleve a cabo la transcripción del snRNA (Fantoni et al., 1994; Nakaar et al., 1997).

En un estudio realizado por Rojas-Sánchez y colaboradores (2016) se caracterizó la región promotora del gen de snRNA U2 en el tripanosomátido *L. major*. En este estudio se confirmó la importancia de cuatro regiones principales: las cajas A y B de un gen tRNA-like, la caja B del gen de tRNA de alanina localizado río arriba, y los primeros nucleótidos de la región codificante del snRNA U2. Aún se desconoce la

manera en la que estas secuencias están involucradas en la transcripción del snRNA U2, pero se piensa que las cajas A y B pueden regular la expresión de los snRNA de manera indirecta reclutando a factores de transcripción, resultando en cambios en la estructura de la cromatina que permitirían la transcripción del snRNA.

Los promotores de los genes de rRNA 5S y tRNAs aún no han sido caracterizados funcionalmente, pero mediante análisis bioinformáticos se identificaron las regiones de control interno típicas en otros organismos eucariontes (Padilla-Mejía et al., 2009). Una excepción es el gen del tRNA de selenocisteína (tRNA-Sec).

En vertebrados, tRNA-Sec es transcrito por RNA Pol III, sin embargo, a diferencia del resto de los tRNAs, su promotor está compuesto por una caja B interna y tres secuencias extragénicas: una caja TATA, un elemento de secuencia proximal y un elemento activador (Padilla-Mejía et al., 2015). En el caso de los tripanosomátidos, la transcripción de este gen presenta más características peculiares. *T. brucei* presenta dos copias del gen de tRNA-Sec. A diferencia de los otros tRNAs, éstos se encuentran entre genes codificadores de proteínas adyacentes en una unidad policistrónica, no presentan las secuencias consenso de las cajas A y B internas, ni los elementos extragénicos del promotor, y son transcritos por RNA Pol II (Aeby et al., 2010). En *L. major*, sólo hay una copia del gen y también se encuentra dentro de una unidad policistrónica. Aunque este organismo tampoco presenta las secuencias extragénicas consenso, se encontró una caja B y una secuencia caja A*like* río arriba del gen, y se demostró que es transcrito tanto por RNA Pol II (Padilla-Mejía et al., 2015).

1.4.5.3 Factores de transcripción

Mediante análisis de secuencia se ha logrado identificar al factor TFIIIB con homólogos de sus tres subunidades: TBP, BRF1 y BDP1. Ruan y colaboradores (2004) describieron al factor asociado a TBP (TBP-*related factor* 4, o TRF4) en *T. brucei*, aunque la proteína sólo tiene un 31% de identidad con el dominio *core* de

TBP, y varios residuos clave para la unión a la caja TATA no están conservados, el *knock down* de esta proteína por RNAi reveló que tiene un papel esencial en la transcripción de las tres polimerasas. Mediante inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP) se pudo mostrar que TRF4 es reclutada a regiones promotoras de las prociclinas transcritas por RNA Pol I, del RNA miniexón, transcrito por RNA Pol II, y de los genes de snRNAs y 7SL, transcritos por RNA Pol III.

La subunidad BRF1 en *T. brucei* (TbBRF1) es una proteína nuclear y presenta los dominios típicos de los ortólogos de BRF1: un dominio de unión a zinc y los dos repetidos de ciclina en su región N-terminal, así como el primer bloque de homología de su región C-terminal. Utilizando RNAi para generar el *knock down* de TbBRF1, se demostró que es esencial para la viabilidad celular y para la transcripción de RNA Pol III, ya que dos días después de la inducción de la interferencia se vio una disminución considerable en los transcritos de RNA Pol III y se detuvo el crecimiento celular (Vélez-Ramírez et al., 2015).

Por último, la subunidad BDP1 fue caracterizada en *L. major* (LmBDP1) (Román-Carraro et al, 2019). Mediante análisis bioinformáticos se demostró que LmBDP1 contiene los dominios característicos de otros ortólogos de esta proteína, como un dominio SANT extendido, aunque también tiene características distintivas, como la presencia de un sólo residuo aromático en la región N-linker. Esta subunidad también es esencial para la viabilidad celular y participa en la transcripción de RNA Pol III, ya que mediante ensayos ChIP demostraron que se une a los genes de rRNA 5S, tRNAs y snRNAs (Román-Carraro et al, 2019).

Otra proteína importante es Maf1, un regulador negativo de la transcripción de RNA Pol III que está conservada desde levadura hasta humano. En *T. brucei* está codificada por dos genes casi idénticos, ambos generan proteínas de 30 kDa con un 95% de identidad. Se ha demostrado que tiene un papel en el control del crecimiento celular del parásito y que actúa como regulador negativo de la transcripción de RNA Pol III. De manera inesperada, se descubrió que también regula la transcripción de los genes de prociclinas (transcritas por RNA Pol I) y del SL RNA (transcrito por RNA Pol II) (Romero-Meza et al., 2016).

Hasta hace poco, sólo se había identificado el factor TFIIIB en los tripanosomátidos. Sin embargo, en nuestro laboratorio se logró identificar un posible ortólogo de la subunidad Tau95 de TFIIIC. Para ello se generó una línea celular que expresa a la proteína C82 (subunidad de la RNA Pol III) unida a una bandera PTP. Mediante ensayos de purificación por afinidad en tándem, utilizando esta proteína como blanco, se obtuvieron los complejos transcripcionales de RNA Pol III en *T. brucei,* y se identificaron a las proteínas pertenecientes a ellos mediante espectrometría de masas, dentro de las cuales se encontró al posible ortólogo de Tau95 (datos no publicados). Resulta ahora necesario confirmar la participación de Tau95 en la regulación de la transcripción de la RNA Pol III en *T. brucei.*

2. JUSTIFICACIÓN

Tau95, al igual que las otras subunidades de TFIIIC, es necesaria para la formación del complejo de preinicio de la transcripción de la RNA Pol III en los genes de tRNAs y de rRNA 5S, transcritos indispensables para la viabilidad celular. Tau95 es la única proteína del subcomplejo τ A que establece contacto directo con el DNA, reconociendo específicamente la caja A. También se ha propuesto un papel para esta proteína en la apertura del promotor. Así, considerando las funciones relevantes de Tau95 en otras especies, resulta importante su estudio en los tripanosomátidos, organismos que divergieron tempranamente del linaje principal de los eucariontes y que presentan mecanismos de expresión genética atípicos. Así, en este trabajo se caracterizó TbTau95, confirmando su localización nuclear y su asociación con genes dependientes de RNA Pol III. Ensayos de purificación por afinidad en tándem, usando como blanco a TbTau95, permitieron la identificación de tres subunidades más del complejo TFIIIC, factor que se pensaba ausente en este parásito. Algunos de los experimentos se realizaron también en *L. major*, para poder determinar similitudes y diferencias con *T. brucei*.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo general

Analizar la participación de la subunidad Tau95 de TFIIIC en la trascripción de la RNA Pol III en el protozoario parásito *T. brucei*.

3.2 Objetivos particulares

- Analizar *in silico* la secuencia y la estructura de TbTau95.
- Obtener líneas celulares en las que se induzca el knock down de TbTau95 por medio de RNA de interferencia.
- Determinar el efecto del knock down de TbTau95 en el crecimiento celular y en la transcripción.
- Obtener líneas celulares en las que se expresa la proteína recombinante TbTau95-PTP.
- Establecer la localización celular de TbTau95.
- Identificar otras subunidades de TFIIIC, así como otras proteínas con las que interactúa TbTau95.
- Identificar las regiones del DNA a las que se une TbTau95.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Análisis in silico

Mediante el uso de programas bioinformáticos se determinó inicialmente si Tau95 de T. brucei posee las características de secuencia y estructura presentes en ortólogos de Tau95 en otras especies. La secuencia de los ortólogos de Tau95 en otras especies de eucariontes se obtuvo de la base de datos NCBI (http://www. ncbi.nlm.nih.gov), mientras que para T. brucei y el resto de los tripanosomátidos se utilizó la base de datos TriTrypDB (http://tritrypdb. org/tritrypdb/). Los alineamientos se hicieron con el programa Clustal Ω (http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clusta- lo/), y la predicción de la estructura secundaria y la identificación de los dominios se realizó con el programa Phyre2 (http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/~phyre2). También se realizó modelado por homología con los programas Phyre2, I-TASSER un (https://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/) V Swiss-Model (http://swissmodel.expasy.org/interactive). Los modelos se visualizaron con el programa PyMol V 2.1.1 (https://pymol.org/2/). Los dominios TPR se identificaron con el programa TPRpred (https://toolkit.tuebingen.mpg.de/tools/tprpred). Las proteínas hipotéticas identificadas mediante espectrometría de masas se analizaron con el programa HHpred (https://toolkit.tuebingen.mpg.de/tools/hhpred).

4.2 Cultivo celular

Se utilizaron parásitos de la línea celular *T. brucei* cepa 29-13, que expresa constitutivamente la RNA polimerasa del fago T7 y el represor de tetraciclina (Biebinger et al., 1997). Los parásitos se cultivan en medio SDM-79 (Carruthers y Cross, 1992), suplementado con suero fetal bovino a una concentración del 10% con selección de higromicina (50 μ g/ml) y G418 (15 μ g/ml), a 27°C. Para llevar a cabo la selección de los parásitos, se utilizó fleomicina (2.5 μ g/ml) en el caso de la línea celular *knock down*, y blasticidina (2.5 μ g/ml) para la línea celular PTP.

En el caso de *L. major,* se utilizó la cepa Friedlin. Los parásitos se crecieron a 27°C en medio líquido BM (infusión de cerebro-corazón 0.25x, medio M199 0.5x, HEPES 40 mM, hemina 10 µg/ml, biotina 0.08μ M, biopterina 1.25μ g/ml, penicilina 100 U/ml, estreptomicina 0.1 mg/ml, suplementado con suero fetal bovino al 10%).

4.3 Extracción de DNA genómico

Se utilizaron 3×10^8 células de *T. brucei* y la extracción se llevó a cabo por el método de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico. Las células se centrifugaron a 5,000 rpm por 10 min a 4°C y la pastilla se resuspendió en 5 ml de buffer de lisis, que contiene 5 µl de SSC 1× (NaCl 3M y citrato de sodio 0.6 M), 5 ml de TNE pH 8.0 (Tris 40 mM, EDTA 1mM y NaCl 15 mM), sarcosil 0.5% y 100 µg de proteinasa K. Se agitaron las muestras con un vortex (Daigger Genie 2) y se incubaron a 55°C durante 2 h. Se adicionaron 0.5 volúmenes de fenol y 0.5 volúmenes de cloroformo para después centrifugar a 4,000 rpm durante 10 min a 4°C. La fase superior fue transferida a un tubo nuevo y se precipitó la muestra con 0.1 volúmenes de acetato de sodio 3 M y 2.5 volúmenes de etanol absoluto a -20°C toda la noche. Posteriormente se centrifugó la muestra a 9,000 rpm durante 15 min a 4°C y se lavó la pastilla dos veces con etanol al 70%. Finalmente, el DNA se resuspendió en 300 µl deTris-EDTA pH7.8 (Tris-HCl 10 mM y EDTA 0.2 mM).

4.4 Extracción de RNA

La extracción de RNA total se hizo por el método de TRIzol. Para ello, se centrifugaron 1×10^8 células de *T. brucei* en fase media logarítmica a 8,000 rpm durante 10 min a 4°C, se resuspendieron en 1.5 ml del reactivo TRI (Sigma) y se les adicionaron 400 µl de cloroformo. Se agitaron las muestras con un vortex (Daigger Genie 2) y se incubaron a temperatura ambiente por 15 min, para después centrifugarlas a 12,000 rpm a 4°C durante 15 min. Se recuperó la fase acuosa, se transfirió a un tubo nuevo y se agregaron 500 µl de isopropanol. Las muestras fueron centrifugadas por 10 min a 12,000 rpm a 4°C y se precipitó la pastilla con 1 ml de

etanol absoluto. Finalmente, el RNA fue resuspendido en 100 μ l de agua tratada con dietilpirocarbonato (DEPC, Invitrogen).

4.5 Electroforesis

El DNA y RNA producto de los distintos experimentos se analizaron en geles de agarosa (Agarose D-1 low EEO PRONADISA) preparados a distintas concentraciones con TBE 0.5× (Tris-base-HCI 5.4%, ácido bórico 2.74% y EDTA 0.46%) y teñidos con Midori Green Advance (para DNA) o Bromuro de etidio (para RNA) (Sigma). Los geles se corrieron con TBE 0.5× en una cámara de electroforesis Gel XL Ultra V-2 Labnet, a 100 V. Las muestras se prepararon con buffer de carga 6×, y se utilizó el marcador de paso molecular 1 Kb plus (Invitrogen) para DNA y RiboRuler High Range (Thermo Scientific) para RNA. Los geles fueron fotografiados en un sistema de documentación de geles Bio Sens SC645 con el software PS Remote V 1.6.3 y analizados con el programa Bio Sens Image System V 1.7.6.

4.6 Generación de construcciones

4.6.1 Diseño de oligonucleótidos

Para los vectores de RNAi, se seleccionó una región de 383 pb del gen Tb427.10.980 (gen que codifica para Tau95 en *T. brucei*). Se diseñaron oligonucleótidos para amplificar el fragmento seleccionado (Tabla 1). Al oligonucleótido sentido (TbTau95RNAi-F) se le agregaron los sitios de corte *Bam*HI y *Hind*III, y al oligonucleótido antisentido (TbTau95RNAi-R) se le agregó el sitio de corte *Xho*I, para poder subclonar el fragmento en los vectores inducibles pZJM y p2T7.

Los oligos diseñados para obtener la línea celular con TbTau95 unida a una bandera PTP amplifican un fragmento de 563 pb de la región C-terminal de TbTau95, y se agregaron los sitios de corte de las enzima de restricción *Apa*l y *Not*l, que facilitarían la subclonación de este fragmento en el vector pC-PTP-BLA (Tabla 1).

Para generar el anticuerpo se diseñaron oligonucleótidos para amplificar todo el marco abierto de lectura de TbTau95, sin el codón de paro (Tabla 1). Al oligonucleótido sentido (TbTau95-F) se le agregó el sitio de corte de la enzima *Bam*HI, mientras que al antisentido (TbTau95-R) se le agregó el sitio de corte de la enzima *Xba*I, esto con la finalidad de facilitar la subclonación del inserto en el vector de expresión pCold.

Región	Nombre	Secuencia					
amplificada							
Secuencia	TbTau95RNAi-F	BamHI HindIII					
blanco para		GGATCC/AAGCTT/AATAAAAAGGCTGTGGCGTGC					
RNAi	ThTau95RNAi-R	XhoI					
		CTCGAG/AAGGCGTCATCACTCACATCA					
Proteína	ThTau95PTP-Anal-F	ApaI					
recombinante		GGGCCC/CGTGACATTAGTCGCGTTCCC					
ThTau95-PTP	ThTau95PTP-NotI-R	NotI					
		GCGGCCGC/GCTCCGTCATCTGGATGCT					
Marco abierto	ThTau95-F	BamHI					
	15120551	GGATCC/ATGTGTATTCCCCTCTCC					
ThTau95		XbaI					
1018035	1012030-11	TCTAGA/CCCGTCATCTGGATGCT					

Tabla 1. Oligonucleótidos utilizados para la genaración de vectores.

4.6.2 PCR punto final

La amplificación de los diversos fragmentos genómicos utilizados en este proyecto se realizó mediante reacciones de PCR, cada una preparada con 100 ng de DNA genómico de la línea celular *T. brucei* 29-13 como molde. Se llevaron a cabo en tubos de PCR, con buffer KAPA Tap PCR con MgCl₂ 2 mM (1×), mezcla de dNTPs

(200 μ M), oligonucleótidos sentido y antisentido (200 μ M) y 1 unidad de DNA polimerasa KAPA Taq (Promega), en un volumen final de 50 μ l. Se utilizó un termociclador Bio-Rad T100, se realizaron 40 ciclos que incluyeron el paso de desnaturalización a 95°C por 1 min, la hibridación, en la que se emplearon diferentes temperaturas (dependiendo de la región a analizar) durante 30 segundos y la extensión a 72°C por 1 min por cada kilobase amplificada.

4.6.3 Purificación de DNA a partir de gel de agarosa y productos de PCR

La purificación de los fragmentos de DNA provenientes de reacciones de digestión con enzimas de restricción se hizo a partir de geles de agarosa, mientras que los provenientes de reacciones de PCR se hicieron directamente de la reacción. En ambos casos, se utilizó el kit NucleoSpin Plasmid de Macherey-Nagel, siguiendo las indicaciones del fabricante. Brevemente, partiendo de un fragmento de gel de agarosa o una reacción de PCR, se agregaron 2 volúmenes de buffer NTI y se transfirieron a una columna de purificación para después centrifugarlas. Las columnas se lavaron con 700 µl del buffer NT3, se centrifugaron por 2 min a 11,000 g y se agregaron 30 µl del buffer NE para eluir los fragmentos purificados.

4.6.4 Ligación y transformación

Las ligaciones de los diferentes pares de vector-inserto se llevaron a cabo a partir de productos de PCR purificados, utilizando la enzima DNA ligasa T4 de Promega. Todos los insertos fueron clonados inicialmente en el vector comercial pGEM-T Easy de Promega, para secuenciarlo y subclonar después en los distintos vectores. Para esto, se empleó 1 µl de la T4 ligasa 3U/µl (Promega), 5 µl del buffer Rapid Ligation 2× y 1 µl de pGEMT-Easy (50 ng), en un volumen final de 10 µl, las reacciones fueron incubadas durante 1 h a temperatura ambiente y después a 4°C por 16 h.

Para las transformaciones se utilizaron células competentes E. coli JM109 de Promega, siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, se agregaron al producto de ligación 50 µl de células competentes *E. coli* JM109 y se incubaron en hielo durante 20 min, para después someterlas a un choque térmico de 42ºC por 45 seg. La reacción fue transferida a hielo por 2 min y después se agregó 1 ml de medio SOC (triptona 2%, extracto de levadura 0.5%, NaCl 1%, KCl 2.4 mM, MgCl₂ y glucosa 2%) y se incubó durante hora y media a 37°C en agitación. Una vez terminada la incubación, las células fueron centrifugadas a 13,000 g y la pastilla fue resuspendida en 100 µl de medio SOC para inocularla en placas Petri con medio LB agar (peptona de caseína 1%, extracto de levadura 0.5%, NaCl 0.5% y agar bacteriológico al 1.2%) con ampicilina (100 μg/ml), IPTG (Isopropil β-D-1tiogalactopiranosido; 100 mM) X-Gal (5-Bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-V galactopiranosido; 50 mg/ml).

Para la extracción de DNA plasmídico de las transformaciones se utilizó el kit NucleoBond Xtra Midi Plus de Macherey-Nagel, siguiendo las indicaciones del fabricante. Brevemente, se centrifugaron 300 ml de cultivo bacteriano crecido toda la noche a 37°C y la pastilla se resuspendió en 8 ml de buffer RES. Para que se diera la lisis celular se agregaron 8 ml del buffer LYS y se incubaron a temperatura ambiente por 5 min, para después agregar 8 ml del buffer NEU y neutralizar la reacción. Por otro lado, las columnas se equilibraron agregando 12 ml del buffer EQU. Se agregaron las muestras a las columnas ya equilibradas y se lavaron con 5 ml del mismo buffer. El DNA de plásmido se recuperó de la columna con 8 ml del buffer ELU. Para evitar trabajar con un volumen tan grande, se precipitó el DNA con 3.5 ml de isopropanol, los cuales se pasaron por un finalizador NucleoBond con ayuda de una jeringa. El DNA se volvió a eluir con 500 µl de buffer TRIS. La concentración del DNA se determinó mediante espectrofotometría a 260 nm utilizando un NanoDrop One/One (ThermoFisher).

4.6.5 Ensayos de restricción

Para los ensayos de restricción se utilizaron enzimas de New England Biolabs, con sus respectivos buffers de reacción, siguiendo las indicaciones del fabricante.

4.6.6 Subclonación para la obtención de las líneas celulares *knock down* y PTP

Se utilizaron dos vectores para generar la interferencia hacia TbTau95, p2T7-177 y pZJM (Wickstead et al., 2002; Wang et al., 2000). Ambos cuentan con dos promotores T7 inducibles con doxiciclina, para generar RNA de doble cadena. El vector p2T7-177 está diseñado para integrarse en una región de repetidos de 177 pb que se localiza en los minicromosomas, mientras que el vector pZJM se integra en la región espaciadora del cistrón de los genes de rRNA (Wickstead et al., 2002; Wang et al., 2000). Se utilizaron los sitios de restricción que se agregaron a los oligos (TbTau95RNAi-F y TbTau95RNAi-R) para la subclonación en los vectores de RNAi. Para el vector p2T7-177 se utilizaron los sitios *Xho*l y *Bam*HI; mientras que para el vector pZJM se utilizaron los sitios *Xho*l y *Hind*III.

El vector pC-PTP-BLA está diseñado para integrarse al genoma de *T. brucei*, en una de las copias endógenas del gen de interés. La bandera PTP está formado por un epítope de la Proteína C, un sitio de corte para la proteasa TEV y un dominio de la Proteína A de *Staphylococcus aureus* (Schimanski et al., 2005).

Después de liberar los fragmentos con las respectivas enzimas de restricción, se purificaron a partir de gel de agarosa con el kit NucleoSpin Plasmid de Macherey-Nagel, siguiendo las instrucciones del fabricante y se ligaron en los respectivos vectores. Las dos construcciones se transformaron en células *E. coli* JM109 competentes, y una vez obtenidas las clonas se analizaron por restricción y se mandaron a secuenciar para confirmar la obtención de las construcciones p2TbTau95, pZTbTau95 y pC-TbTau95-PTP. Las clonas seleccionadas se crecieron a gran escala en 300 ml de medio LB con ampicilina 1 μ g/ml a una densidad óptica de 400/OD600 y se extrajo el DNA plasmídico con el kit NucleoBond

Xtra Midi Plus (Macherey-Nagel) siguiendo las instrucciones del fabricante. Como paso final de la extracción, se resuspendió el DNA en 500 μl de buffer TRIS y el material obtenido fue linearizado con la enzima *Not*l, para las líneas *knock down* y con la enzima *Bsw*l para la línea celular PTP, para permitir su integración al genoma de *T. brucei*.

4.7 Transfección y clonación celular

Los vectores linearizados se transfectaron en células de *T. brucei* mediante electroporación. Se centrifugaron 1×10⁸ células en fase media logarítmica a 6,000 g por 5 min a 4°C, se lavaron con 5 ml de PBS-G (PBS más glucosa al 2%) y se resuspendió la pastilla en 500 µl de buffer Cytomix (HEPES 25 mM pH 7.6, KCl 120 mM, CaCl₂ 15 mM, K₂HPO₄ 10 mM, KH₂PO₄ 10 mM pH 7.6, EDTA 2 mM, MgCl₂ 5 mM). Se transfirieron a una cubeta de electroporación de 4 mm (Electroporation Cuvettes PlusTM, de BTX) previamente enfriada, para después incubarlas con 10 µg de DNA de plásmido linearizado a 4°C por 10 min. Posteriormente se dio un pulso de 1,500 V, 500 Ω y 50 µF, empleando un electroporador ECM 630 Electroporation System (BTX), y después de 10 min de incubación en hielo se transfirieron a 5 ml de medio SDM-79. A las 24 h se agregó la mitad de la droga de selección y a las 48 h se agregó el resto de la droga (fleomicina a una concentración de 2.5 µg/ml para las lineas *knock down* y blasticidina a una concentración de 2.5 µg/ml para la línea celular PTP).

Una vez que se obtuvieron poblaciones con un crecimiento estable, se llevó a cabo la clonación celular por medio de la técnica de dilución en serie o dilución limitante. Utilizando una placa de 96 pozos, se agregaron 100 µl de medio SMD-79 (con SFB al 15%, higromicina 50 µg/ml, neomicina 15 µg/ml y fleomicina 2.5 µg/ml) a cada pozo. Se comenzó con 1,000 células que fueron inoculadas en el pozo A1. Para las diluciones, se tomaron 100 µl del pozo A1 y se depositaron en el siguiente pozo (B1), y este proceso se repitió con los pozos siguientes hasta llegar al último (H1). Con una pipeta multicanal, se hicieron las diluciones tomando 100 µl de cada pozo

e inoculando en la siguiente columna, hasta llegar a la columna 12. La placa se incubó a 28°C en una atmósfera con 5% de CO_2 y se monitoreó todos los días hasta observar crecimiento en los pozos más diluidos. Una vez obtenidas las clonas, se transfirieron los 100 µl a una placa de 24 pozos, y se agregaron 500 µl de medio fresco, para después pasarlas a cajas de cultivo de 25 cm³.

4.8 Curvas de crecimiento

Para la inducción del sistema de interferencia se utilizó doxiciclina (análogo de la tetraciclina) a una concentración final de 2 µg/ml. De un cultivo en fase media logarítmica, se iniciaron dos cultivos independientes, un cultivo al que se le agregó doxiciclina para inducir la formación del RNA de doble cadena (Dox+, inducido) y un cultivo control (Dox-, que no fue inducido), a una densidad celular de 2×10^6 células/ml. Los cultivos se contaron todos los días y se resembraron a la misma densidad celular (2×10^6 células/ml), durante 15 días consecutivos. Los datos fueron graficados obteniendo cada día el número acumulativo de células.

4.9 Marcaje radioactivo

Se utilizó el kit High Prime DNA Labelling Kit de Roche para el marcaje de la sonda, siguiendo las instrucciones del fabricante. El DNA (150 ng) fue desnaturalizado y se agregaron 4 µl de la mezcla de la mezcla de reacción del kit High Prime y 3 µl de dATP, dGTP y dTTP. Después se agregaron 50 µCi de [α -³²P]-CTP y se incubó 20 min a 37°C. Se detuvo la reacción con 2 µl de EDTA 0.2 mM.

Para remover los nucleótidos no incorporados, se utilizaron columnas de Sephadex G-50 (ProbeQuantTM G-50 Micro Columns de GE Healthcare). Para ello, se colocó la muestra en la columna y se centrifugó a 735 g por 2 min. La sonda ya marcada se cuantificó en un contador de centelleo líquido y se almacenó a -20°C.

4.10 Northern blot

Para confirmar la reducción del mRNA de TbTau95se realizaron ensayos Northern blot, utilizando RNA de cultivos Dox+ y Dox-, a diferentes días después de la inducción. Como sonda se utilizó la secuencia que se usó para generar el RNAi de TbTau95, para que se detectara tanto el mRNA de TbTau95, como la doble cadena de RNA.

Se utilizaron 20 µg de RNA total de cada muestra, el cual se desnaturalizó en formamida al 4%, formaldehído al 1.5% y buffer MOPS/EDTA 1× (MOPS 0.5M, EDTA 0.01M, pH 7.2), a 65°C por 10 min. Se corrieron las muestras en un gel desnaturalizante de agarosa-formaldehído al 1.2%, con buffer MOPS/ EDTA 1× (MOPS 0.5M, EDTA 0.01M, pH 7.2). Se transfirió el RNA por capilaridad a una membrana de nylon Hybond-XL (Amersham, GE), durante aproximadamente 20 h, con buffer SSC 10x (NaCl 3M, acetato de sodio 0.3M). Se dejaron secar las membranas y se fijó el RNA con radiación UV en un Stratalinker 800 (Stratagene) con 1.2 Kj. Se prehibridaron las membranas con solución de hibridación (formamida 50%, SSC 5×, SDS 0.2%, solución Denhardts 4× y DNA de esperma de salmón [100] μ g/ml]) por 2 h a 42°C. Se hibridaron con 5×10⁶ cpm de la sonda, utilizando la misma solución de hibridación, incubando a 42ºC de 12 a 16 h. Se realizaron 3 lavados de los filtros radioactivos en SDS 0.1% y SSC 1x, cada uno a 65°C por 30 min, después se realizaron lavados en SDS 0.1% y SSC, disminuyendo la concentración de la solución SSC en cada lavado. Se dejaron secar los filtros a temperatura ambiente y se expusieron en una placa phosphorimager por 24 h, la cual fue escaneada con un sistema phosphorimager (Fujifilm) y la densitometría se hizo con el programa Multi-Gauge.

4.11 Generación de anticuerpo

4.11.1 Purificación de la proteína recombinante

El vector pCold cuenta con un Tag de histidinas que se fusiona a la proteína de interés en su extremo N terminal. Para subclonar en este vector, se utilizaron los sitios de corte de *Bam*HI y *Xba*I, que se agregaron en los oligos (TbTau95-Fy TbTau95-R). Mediante secuenciación se confirmó la obtención de la construcción pCold-TbTau95, y este vector se transformó en células *E. coli* de la cepa BL21 (DE3).



Figura 17. Esquema general del vector pCold. Se muestra el gen de interés flanqueado por los sitios de corte agregados a los oligos de la tabla 1 (*Bam*HI y *Xba*I), la cola de histidinas (Tag Histidinas), la región promotora de la proteína, el gen de resistencia a ampicilina (AmpR) que servirá para la selección de las clonas positivas, y un origen de replicación

La expresión de la proteína se indujo mediante IPTG a una concentración de 1 mM incubando las células a 37°C por 18 h. La proteína se purificó por cromatografía de afinidad usando una columna Ni-Sepharose 6 Fast Flow matrix (GE Healthcare), siguiendo las instrucciones del fabricante.

4.11.2 Inoculación y obtención del anticuerpo

Se inocularon ratones BALB-C de 6 semanas, de manera intravenosa, usando 100 µg de proteína purificada con el adyuvante TiterMax Gold (Sigma) a una proporción de 1:1. Se recolectó el suero pre-inmune de estos ratones, así como el suero a las 6 semanas de la inmunización. La especificidad de el anticuerpo anti-TbTau95 se confirmó mediante Western blot.

4.12 Purificación por afinidad en tándem y espectrometría de masas

Para estos experimentos se utilizaron 3 L de cultivo de las líneas celulares T. brucei-Tau95-PTP y *L. major*-Tau95-PTP, a una densidad de 25 a 30×10^6 células por ml. Los cultivos se centrifugaron a 4000 g por 10 min a 4°C. La pastilla se lavó con PBS-G y se resuspendió en solución IPP-150 (Tris-HCl 10 mM pH 8.0, NaCl 150 mM, NP40 al 0.1%). Se adicionó de Triton X-100 a una concentración final de 1% y se incubó en hielo para lisar las células por 20 min. El lisado celular se centrifugó a 12,000 g, durante 15 min a 4°C y el sobrenadante se colocó en una columna de cromatografía desechable Econo-Pac (BIO-RAD) de 20 ml con 200 µl de perlas de Sepharose 6 Fast Flow (GE Healthcare), y se incubó por 3 hrs a 4°C en rotación suave. La columna se drenó y se lavó tres veces con 20 ml de solución IPP-150 fría. Se agregó 100 unidades de la proteasa AcTEV (Invitrogen) en 1 ml de buffer de proteasa AcTEV (KCI 150 mM, Tris-HCI 20 mM pH 7.7, MgCl₂ 3 mM, DTT 0.5 mM, Tween 20 al 0.1%, EDTA 0.5 mM) durante toda la noche a 4°C en rotación suave. La columna se drenó, y se realizó un lavado con 350 µl de solución PC-150 (KCl 150 mM, Tris-HCl 20 mM pH 7.7, MgCl₂ 3 mM, DTT 0.5 mM, Tween 20 al 0.1 %; CaCl₂ 1 mM). Después se llevó a un volumen final de 6 ml con PC-150 con CaCl₂ a una concentración final de 3 mM, e inhibidores de proteasas a una concentración final de 2×, antes de adicionarlo a una columna de cromatografía desechable Econo-Pac (BIO-RAD) de 10 ml conteniendo 200 μ l de matriz de afinidad α -Prot C (Roche). La columna se incubó 4 hrs a 4°C en rotación suave, para después drenarla y lavarla con 30 ml de buffer PC-150. Finalmente, se realizaron ocho eluciones, cada una con 250 µl de buffer de elución (Tris-HCl pH 7.75 mM, EGTA 10 mM, EDTA 5 mM e inhibidores de proteasas 2x).

Las proteínas eluidas se concentraron con columnas Amicon Ultracel 3K (Millipore) y por evaporación, utilizando un concentrador de vacío, para después ser analizadas por SDS-PAGE y tinción de SYPRO Ruby (Molecular Probes). Las proteínas fueron analizadas por espectrometría de masas en la universidad Upstate Medical University.

4.13 Ensayos de Inmunoprecipitación de la cromatina

Se usaron 120×10⁶ células de *T. brucei*/Tau95-PTP. Se lavaron con PBS frío, se empastillaron por centrifugación y se fijaron con PBS-formaldehido al 1% por 5 min a 37°C. La fijación se detuvo adicionando glicina (125 mM), y las células se lavaron con PBS y se empastillaron por centrifugación. Después, las células se resuspendieron en buffer de lisis (10 mM Tris-HCl pH 7.5, 3 mM CaCl₂, 2 mM MgCl₂) con inhibidores de proteasas 1x (Sigma). La lisis de las células se llevó a cabo usando un sonicador tipo politrón (Sonics Vibra Cell VCX130) (15 s on/off, 40% amplitude) por 5 min y los se limpiaron con un colchón de sacarosa (340 mM) y se empastillaron a 4°C. La pastilla fue resuspendida en buffer de sonicación (1% SDS, 10 mM EDTA, 50 mM Tris-HCl pH 8.1) y se sonicó, para obtener un tamaño promedio de DNA de entre 200 y 500 pb usando un sonicador bioruptor (Diagenode Bioruptor UCD-200) (30 s on/off, high intensity) por 40 ciclos. Posteriormente, la cromatina fue diluida en buffer de dilución (0.01% SDS, 1.1% Tritón X-100, 1.2 mM EDTA, 16.7 mM Tris-HCl pH 8.1, 167 mM NaCl) con inhibidores de proteasas 1x (Sigma y Roche). El material sonicado fue preclareado con agarosa con proteína A/G (Santa Cruz Biotechnology) por 1 h a 4°C en rotación. El 10% de la cromatina fue tomado como INPUT.

Para la inmunoprecipitación, se utilizó 20 µg de anticuerpo anti-ProtA (Sigma-Aldrich) y se incubó en rotación toda la noche a 4°C con la cromatina. Los complejos proteína-DNA fueron incubados por 1 h usando agarosa con proteína A/G (Santa Cruz Biotechnology) y se adicionó DNA de esperma de salmón sonicado y se lavó con los siguientes buffers: Low Salt Wash Buffer (0.1% SDS, 1% Tritón X-100, 2 mM EDTA, 20 mM Tris-HCl pH 8.0, 150 mM NaCl); High Salt Wash Buffer (0.1% SDS, 1% Tritón X-100, 2 mM EDTA, 20 mM Tris-HCI pH 8.0, 500 mM NaCl); LiCl Wash Buffer (10 mM Tris-HCI pH 8.0, 1 mM EDTA, 1% NP-40, 1% Deoxycolate, 250 mM LiCl) y TE Buffer (10 mM Tris-HCI pH 8.0, 1 mM EDTA). Los complejos fueron eluidos de las perlas después de lavar con Elution Buffer (1% SDS, 100 mM NaHCO3) y se revirtió el cross-link con NaCl (200 mM) a 65°C por toda la noche. Finalmente, se hizo un tratamiento con RNasa A, el DNA fue precipitado y purificado usando acetato de sodio y etanol absoluto para ser cuantificado. El experimento fue realizado por triplicado.

4.14 Retro transcripción (RT)

Para analizar la abundancia de diferentes transcritos, se realizaron ensayos de retro transcripción, utilizando 1 µg de RNA total tratado con 1 U de DNAsa I (Ambion). Se agregaron 5 µl de la mezcla de buffer 5×, DTT 0.01M, 25 mM de cada dNTP, 50 ng de oligonucleótido Nested-dT o *Random hexamers* (Invitrogen) y 200 U de la enzima SuperScript II (Invitrogen). La reacción se hizo siguiendo las instrucciones del fabricante. El cDNA resultante se utilizó como templado para detectar los transcritos mediante qPCR.

4.15 qPCR

Estos experimentos se llevaron a cabo con el kit Platinum SYBR Green qPCR Super-Mix-UDG (Invitrogen) con las siguientes condiciones de reacción: 2 ng de DNA inmunoprecipitado o 200 ng de cDNA como templado, 7.5 µl de la solución Super-Mix, 0.3 µl de cada uno de los oligonucleótidos sentido y antisentido (10 µM) (Tabla 2), en un volumen final de 15 µl. Todas las reacciones se realizaron por duplicado y la especificidad de la amplificación fue analizada con las curvas de desnaturalización. El método estadístico usado fue el 2- $\Delta\Delta$ Cq.

Tabla 2. Oligonucleótidos usados	s para las reacciones de qPCR.
----------------------------------	--------------------------------

Oligonucleotido	Secuencia					
18SUSE5	CACCCTCAAGACCGTAGCTC					

18SUSE3	ACCCGTCCCTTATCAACACA				
18SProm5	CTGTGGGGAACACACAAACA				
18SProm3	CCCTGTAGAGGGAAACACCA				
Lm-rRNA18S5'	5'CGGCCTCTAGGAATGAAGG				
Lm-rRNA18S3'	CCCCTGAGACTGTAACCTC				
TubqFw	GGGCTTCCTCGTGTATCA				
TubqRv	GCTTGGACTTCTTGCCATAG				
SL-promoter-F	CTACCGACACATTTCTGGC				
SL-promoter-R	GCTGCTACTGGGAGCTTCTCATACC				
SL-inter-F	ATGGCTTATACGTGCTCGTTTCTCC				
SL-inter-R	AGCAGACTTTAAAGCGCCTATATGTG				
rRNA5S-5′	GTCGAGTACGACCACACTTG				
5SrRNA-R1	GAGTACGGCACTCAGGGTT				
AlaqFw	GGGGATGTAGCTCAGATGG				
AlaqRv	TGGAGAAGTTGGGTATCGATC				
ArgqFw	GGTCTCGTGGCGCAATG				
ArgqRv	CGATCCCGGCAGGACTC				
InterAla5'	CACTCTCCCGAGAATCGAAG				
InterAla3'	TGGGTGTGGAGTCGACTTTT				
InterArg5'	GGCTGAAAATAGCGGAAGTG				
InterArg3'	GCTAGCCCGTGTCGTTAGTC				
U2qFW	CTCGGCTATTTAGCTAAGATCAAGT				
U2qRV	CGGGACAGCCAACAGTTT				
U2Prom5'	CACAACCTGTAGTGGCGGTA				
TbU2R	GCATATCTTCTCGGCTATT				
TbTau95-RNAi-F	GGATCCAAGCTTAATAAAAAGGCTGTGGCGTGC				
Tb-Tau95-R2	CTCCTCTGAGCCTCGCTT				
Procyclin-5	ATGGCACCTCGTTCCCTTTA				
ProcqRv	CTTTGCCTCCCTTCACGATAAC				
Tf2bqFw	GAACAGGGAACGCACATTAG				
Tf2bqRv	TTGTTGACTTTGGTCACTTCC				

4.16 Inmunofluorescencia indirecta

Para los experimentos de inmunofluorescencia se utilizaron 7×10⁶ células *T. brucei*-Tau95-PTP y *L. major*-Tau95-PTP. Las células se lavaron en PBS y se empastillaron, para después ser adheridas a portaobjetos tratados con Poly-L-Lysine por 15 min. Posteriormente, las células fueron fijadas por 30 min a 4°C usando PBS con paraformaldehido al 4% y se lavaron con PBS. Las células fueron permeabilizadas con 0.1% Tritón X-100 por 10 min y se bloqueó usando PBS-BSA 2% por 30 min. Se utilizaron las siguientes diluciones de anticuerpos: Nop56 1:100 y Proteína C (Delta biolabs) 1:25; se incubó durante 2 h y se hicieron lavados con PBS. Los anticuerpos secundarios fueron Goat Anti-Rabbit Alexa 488 (Life Technologies) y Anti-Mouse Alexa 568 (Thermo Fisher scientific) ambos con una dilución 1:500. Las imágenes se obtuvieron con un microscopio de fluorescencia Carl Zeiss Axio Vert.A1 y se utilizó el software Zen de Carl Zeiss para el procesamiento de las imágenes.

5. RESULTADOS

5.1 Análisis in silico

El gen de Tau95 en *T. brucei* (Tb927.10.980) se encuentra en el cromosoma 10, y la proteína tiene un tamaño predicho de 647 aminoácidos, el cual es mayor al de sus ortólogos en *Schizosaccharomyces pombe* y *Homo sapiens*, de 456 y 519 aminoácidos respectivamente, pero un poco menor al de *Saccharomyces cerevisiae*, con 649 aminoácidos. El ortólogo de Tau95 más grande hasta ahora reportado, con un tamaño de 724 aminoácidos, es el de *Naegleria fowleri* (Tabla 3).

Con el fin de determinar si la secuencia proteica de Tau95 en *T. brucei* tiene las características distintivas de sus ortólogos en otras especies, se inició un análisis bioinformático. Para esto, se comparó la secuencia de Tau95 en T. brucei con sus ortólogos en diferentes especies de eucariones, incluyendo a S. pombe, S. cerevisiae, H. sapiens, Mus musculus, Rattus norvegicus, Arabidopsis thaliana, Oryza sativa, Caenorhabditis elegans, Plasmodium falciparum, Toxoplasma gondii, y N. fowleri (ver apéndice 1). El análisis reveló que, en general, Tau95 es una proteína poco conservada a lo largo de la escala evolutiva. Así, Tau95 de T. brucei mostró porcentajes de identidad que van desde 13.98% con C. elegans hasta 17.25% con S. pombe (Tabla 3). Entre los ortólogos de las levaduras S. pombe y S. cerevisiae hay 23.44% de identidad, mientras que entre los de los apicomplexa P. falciparum y T. gondii hay 21.18% de identidad (Tabla 3). Para las especies de plantas (Arabidopsis thaliana y Oryza sativa) la identidad fue un poco mayor, de 36.88%. Los mamíferos presentaron la conservación más alta, ya que Tau95 en H. sapiens tiene porcentajes de identidad de 85.36 y 83.88% con M. musculus y R. norvegicus, respectivamente (Tabla 3).

Tabla 3. Porcentajes de identidad de la secuencia de Tau95 en diferentes organismos eucariontes: *Trypanosoma brucei* (Tb), *Schizosaccharomyces pombe* (Sp), *Saccharomyces cerevisiae* (Sc), *Homo sapiens* (Hs), *Mus musculus* (Mm), *Rattus norvegicus* (Rn), *Arabidopsis thaliana* (At), *Oryza sativa* (Os), *Caenorhabditis elegans* (Ce), *Plasmodium falciparum* (Pf), *Toxoplasma gondii* (Tg) y *Naegleria fowleri* (Nf).

	Tb	Sp	Sc	Hs	Mm	Rn	At	Os	Се	Pf	Tg	Nf
	647 aa	456 aa	649 aa	519 aa	520 aa	515 aa	578 aa	724 aa	433 aa	722 aa	637 aa	742 aa
Tb	100.00	17.25	16.71	16.16	16.44	16.71	16.62	15.09	13.98	16.56	16.41	15.91
Sp		100.00	23.44	27.79	28.65	27.87	23.44	22.60	24.69	21.25	19.40	24.69
Sc			100.00	18.02	18.53	18.27	20.75	17.96	18.78	17.92	18.95	18.11
Hs				100.00	85.36	83.88	22.33	23.64	27.51	20.28	21.95	26.80
Mm					100.00	95.15	22.83	23.90	27.99	20.05	21.20	27.42
Rn						100.00	22.39	22.92	28.23	20.05	21.70	27.84
At							100.00	36.88	18.84	19.34	20.53	22.55
Os								100.00	17.11	16.90	23.51	21.79
Ce									100.00	21.91	19.84	23.41
Pf										100.00	21.18	19.92
Тg											100.00	22.70
Nf												100.00

Para la determinación de los dominios conservados y la estructura secundaria, se utilizó como molde la estructura cristalográfica del ortólogo de Tau95 en *S. pombe*, con la que tuvo una mayor identidad, y que fue reportada por Taylor y colaboradores en el 2013.

Entre *S. pombe* y *T. brucei,* los dominios característicos de Tau95, el dominio de dimerización con Tau55 y el dominio de unión al DNA, mostraron porcentajes de identidad de 23.04 y 20.29%, respectivamente. Esta conservación es un poco mayor a la observada al comparar las proteínas completas (17.25%). Niveles de conservación similares se observaron al comparar estos dominios entre *S. pombe* y otras especies. Por ejemplo, con *S. cerevisiae* se obtuvieron porcentajes de 23.5 y 24.4%, mientras que con *H. sapiens* se obtuvo una conservación un poco mayor, con 23.8 y 30.1% de similitud para el dominio de dimerización y el de unión al DNA, respectivamente.

A continuación, se procedió a determinar la estructura secundaria predicha de Tau95 en *T. brucei*. Los resultados mostraron que, aunque la conservación a nivel de secuencia es baja, la estructura de los dominios de Tau95 está relativamente conservada entre *T. brucei* y *S. pombe* (Figuras 17-20). Según lo reportado en *S. pombe*, el dominio de dimerización se compone por 8 hojas β y 4 α hélices. Nuestro análisis indicó que en *T. brucei* se conservan 2 hojas β y 3 α hélices (Figura 17). Al realizar el modelo de la estructura terciaria se encontró que, aunque no se conserva la mayoría de las estructuras, los dos modelos son similares (Figura 18).



Figura 17. Secuencia y estructura secundaria predicha del dominio de dimerización de Tau95. En amarillo se muestran las estructuras de *S. pombe* (Sp) y en azul las de *T. brucei* (Tb). Las flechas indican hojas β y los barriles α hélices. Los residuos conservados se indican con sombreado negro y fuente blanca, las sustituciones conservadas se indican con sombrado gris oscuro, y las semiconservadas con sombreado gris claro. Se compara también la secuencia de *L. major* (Lm).



Figura 18. Predicción de la estructura terciaria del dominio de dimerización de Tau95. Se muestra la estructura de *T. brucei* (azul), *S. pombe* (amarillo) y una sobreposición de ambas estructuras.

En cuanto al dominio de unión al DNA, la conservación es mucho mayor. En *S. pombe* se reportó una estructura de hélice alada (WH) con una topología canónica $\alpha 1$ - $\beta 1$ - $\alpha 2$ - $\alpha 3$ - $\beta 2$ - $\beta 3$, con una hoja adicional denominada $\beta 0$ y la alfa hélice 3 fragmentada en $\alpha 3a$ y $\alpha 3b$. También se reportó que la segunda parte del dominio (subdominio WHI) se compone de 5 α hélices y 2 hojas β . De manera interesante, las 6 hojas β de *S. pombe* se conservan en *T. brucei* (Figura 19). Asimismo, la mayoría de las α hélices están conservadas en *T. brucei* (Figura 19). En consecuencia, el modelo de la estructura terciaria predicha reveló una gran similitud entre estas proteínas (Figura 20).



Figura 19. Secuencia y estructura secundaria predicha del dominio de unión al DNA de Tau95. En verde se muestran las estructuras de *S. pombe* (Sp) y en rojo las de *T. brucei* (Tb). Los subdominios están marcados por cajas: rosa para el subdominio de hélice alada (WH) y rojo oscuro para el subdominio de interacción con la hélice alada (WHI). Las flechas indican hojas β y los barriles α hélices. Los residuos conservados se indican con sombreado negro y fuente blanca, las sustituciones conservadas se indican con sombrado gris oscuro, y las semiconservadas con sombreado gris claro. Se compara también la secuencia de *L. major* (Lm).



Figura 20. Predicción de la estructura terciaria del dominio de unión al DNA de Tau95. En verde se muestran las estructuras de *S. pombe* (verde claro para el subdominio de hélice alada o WH, y verde oscuro para el subdominio de interacción con la hélice alada o WHI). Se muestran las estructuras de *T. brucei* (rosa para el subdominio de hélice alada, y rojo oscuro para el subdominio de interacción con la hélice alada). A la derecha se muestra la sobreposición de ambas estructuras.
También se realizó un alineamiento de TbTau95 con diferentes especies de tripanosomátidos (Figura 21), el cual reveló una alta conservación en la secuencia de la proteína entre especies del género *Trypanosoma*, que va desde un porcentaje de identidad de 47% con *T. cruzi* hasta 99.5% con *T. evansi.* Con las especies del género *Leishmania* el porcentaje obtenido fue más bajo, desde 32% con *L. tarentolae* hasta 34.5% con *L. mexicana* (Tabla 4). Las regiones de la proteína que están más conservadas se encuentran dentro de los dominios (el dominio de dimerización y el dominio de unión al DNA), mientras que las regiones más variables son el inicio y la región terminal de la proteína. El tamaño de los ortólogos es variado entre las diferentes especies de tripanosomátidos, en el caso del género *Trypanosoma* éste va de los 587 aminoácidos en *T. vivax*, a 647 en *T. brucei.* El género *Leishmania* cuenta con los ortólogos más grandes dentro de los tripanosomátidos, y su tamaño va de los 693 aminoácidos en *L. mexicana* a 719 en *L. tarentolae*.

TeV MC	TARE 10
TcoNI GPHERFVAVELEPILPT VINVISSHPPSQYDTLQEETRRMIERVE PASISSCMODTTP	2GGE 68
TcISDGNGLKEEDRNWDARVESSINGNSGVAPHERVSVDAPCLPVETRRSPISDGNGLKEEDRNWDARVESSIRPTLOEVFL	GFGE 64
TVGONVTSLPQTTROLLEASTSPSSLRPCLOOTPR	ZEYD 67
LmxMAAPHGSPAA-AGSEKPAMPAFESYISVEAPEAVTPEVTTSSAMLDGTDHPSTSAHAGEREVEASLEASEVVPCLHRATP	20TT 84
LdMTAPHDSPATAGSEKPAMPAFESYISVEAPEAVTPUTTSSAMLGGADHPSTSAHAGEREVEAELEASEVVPCLHRATP	20TT 84
LinMTAPHDSPAA-AGSEKPAMPAFESYISVEAPEAVTPAYTTSSAMLGGADHPSTSAHAGERREVEABLEASEVVPCLHRATP	20TA 84
LbrMTAPHDSPTAASTGGEQLAMPAPESYISVEADETVTPEYTTSSAMLDGADQLSTSAHAGEREVEASLASEVVPCLHHPTP	20TM 86
ImjMTAPHGSPAA-AGREKHAIPAFESYISVEADEAVTEVTTSSAMLDGADHPSTSAHAGEREVEASIEASEVVPCIHRAMP	20TT 84
Lta MSSSFRPPPRKRGWEEPLQHTVRVLCCVMAAPHGSPAGGGSETHTWPAFRSYISVELEFTVTPEVTTSSMILDDPDHQRTSPHARERQVBABLEVSSVVPCLHRPTP	20TS 11:

тb	KAERGEGGNDTAGKGE	PKEMLGIATTERCIGE PSONRSLDE DADLESRLEGTA-DGNRSKLTTTA	173
Tev	KAERQEGGNDTAGKGE	PKEMLGIATTTENCTGEIPSONRSLLEGTA-DGNRSKLTTTA	173
Tco	KVVQQEGLLTNTE	SKEKLGIAVESEYKTGEVESGARPLDF DEGLEAEDTQVNDTGTGRRLATLL	133
TC	GTGKETAETPTGNVAIGKKQ	FKHRAAIASASEYYTSEYESGARPLDFEAEEDKMQEKDSKQILLRLA	13
Tv	KELKKNAPNK	LSDVLSIASPSHYYSGEISSGARALDEATDDTHSKQETG-GTVVTGLTRSV	12
Lmx	ARGDAGAAHDSAEEP-G-DDDGADD	VPSSSS-GSDSDESASRALPPTVAKRTAVQAARGVGGQRTELHLLTRHHHHCTVPIESGARSTWGSGSDEEDEGDRASDTGVSGDRCADEQ	195
Ld	SRGDAGAAHDSAEEPEG-DDEGDDD	VPSSSS-GGDSDESASRAFPPTVAKRTAVQTARGVRGQRTALRLLTRHHRHCTVPIESGARSTWGSGSDEEDEEDRASGTGVGGDGCADAH	20(
Lin	SRGDAGAAHDSAEEPEG-DDEGDDD	VPSSSS-GGDSDESASRAFPPTVAKRTAVQTARGVRGQRTALRLLTRHHRHTCTVPIESGARSTWGSGSDEEDEEDRASGTGVGGDGCADAH	200
Lbr	ARSDVSGAHDNGEEPEGEEESG-DD	MPSRNS-SGDSDESASRAFPYTVVKRPAVQAARDGGSQRRALRLLTRYHRHYCTVPIPSGARSTWGSGGDEEDEEYWASDSGVGEGGGA	199
Lmj	ARGDAGATHDSAEEPEGGDDEGDDD	VPSSSS-GGDSGESASRAFPPTVAKRTAVQAVHGVAGQRTELHLLTRHHHHCTVPIESGARSTWGTGSDEEDEGDRASDSGVGRDGCADAE	203
T.t.a	ARGOVOTAHOSAGEPEGDDVGGN-D	UPOR SSSCGDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSDSD	231

DOMINIO DE DIMERIZACIÓN

тъ	NEEGEAERERIR	PSITERLULOEFFSNEL	VEVKRIERVKELNVE	GRAVKETYVDGGTDHKQTGVTVLGVVSEEVDIVKSAD5CESPEISENIE	273
Tev	NEEGEAERERIR	PSITECLULOGFFENDLL	VEVKRIRRVKBLENVET	GRAVKETYVDGGTDHKQTGVTVLGVVSEEVDIVKPADECESPETSENIE	273
TCO	GDEQNAERERIR	PTFVECILLOGFYBNDLL	LEVRERRVKEVEENAT	GRAVESTLLSDGNECGEAQGTVICVISEDVSIVERADECESPETSENVS	232
TC	GEEGMCERERMR	PSFTECVILLOGFYENDVL	LEVIRTRRVKELEDPVE	SGRWVKEMFLQEDEGSQSKATVVGVVSEEVDLVRPADECEGPESKDVLA	231
Tv	CEEGREOREEOR	PSLVECVILLEEFWENDVL	VEVTRIRRIKELSGRDI	IGOWVHESYVOLETRDAATRATAVGIVSEEVNIVRPADECESSETREEAA	227
Lmx	DAAEAAHLQAQKERR.	ASMERCLLLNCYYBNELL	LRVRORRR IRSY OPVI	INAMLREEVDSAEEGOGGSAHDDTDARDTARTSGLSAEVVGVVSEEMELARPADETEALETPEOLO	319
Ld	DAAAAAHLQAOKRRR 00VB/	ASTERCLEVNOYYRNDLL	LRVRORRHIRSYNDPVI	INAMLRE-EVDSAEEGQGGSAHGDKDARGTARTSDLSAEVVGVVSREMELARPADETEALETPEQLQ	319
Lin	DAAAAAHLQAQKERR	ASTERCLEVNOYYRNDLE	LRVRORRHIRSYRDPVI	INAMLEBEEVDSAEEGQGGSAHGDKDARGTARTSDLSAEVVGVVSBEMELARPADETEALETPEQLQ	320
Lbr	EAAHLQAOKERR	ASIERCLUVNCYYRNDLL	LOVRORRHIRSYRDPFT	INAMLEBEEVDNVEEGQGGSAHDDKDARDTARTSSVSAEVVGVVSBEMELARPADETEALETPEQLQ	316
Lmj	DAAEGAHLPAOKRRR COVE	ASMERCLEVNCYYBNELL	LRMRORRR IREY OPVI	INAMLREEVDSAEEGQGGSAHGDKDARGTARTSGLSAEVVGVVSEEMELARPADETSALETPEQLQ	323
Lta	DAAEAAHLOADKRRREVE/	ASMERCLEVNEYYSNEL	LOVRORHYIRSYSDPVI	INAMLREEVINSEEGOEGSAHGTARTSGLSAEVINV95AMELARPADETALETPEOVK	345

тb	SFEELSSGNINGERSPENALVYDSHSGKRDMDRL-D-NTATSFNCDEAPLNEFEGNER LIMANGDPNIFEPPSQADMDIURRINESFDEQGCIENRAVKALLE	382
Tev	SPEELSSON FPEGHEIGERSPFEMALVYDSHSGKRDMDRL-D-NTATSFNCDEAPLWEFEGVERLTMANGDPNIPEPPSQAQMDIERRINEGFDEQGCIENRAVKAMPEE	382
Tco	SMEDLESGNIEPEVHELSEKALIENTPGAGPPAMSSTSGAVDOADDLFTDTTAPLWEYEGIERLAVMADDPNIPELMSPLGEETERLATGCGAEGCVENOKVRMADE	342
TC	AAEALSSGTLEPEAHELAEKNPFENECDFGGHFQLEVSKPPGGDVTRDDKEEGPLENDFEVMERLSVMETDSSIPEPMLPAGEDLERRINGGDAEKECVENRTTKKALEE	341
Tv	AAEERSTNYEPETHEIMERTPLEVTCGFHHSDCGDEECAENOTVRAMEE	326
Lmx	AAESLCGADVEPECHELSARAPFEARYEPGRDPNTAVATVSATAAPRDDRLAVDANGDAAAACYDFATLEAISISNEESTYLETROAAHNSFURSMGSSLDGGLDTDPPEAOMMVRMAAE	439
Ld	AAESLGADVERECHELSARAPFENRYEPGRDPNTAVATVSATAAPRDDRLAGDANGGSAAACYDFATLEAISISNEESANLETROAAHNSFURSMGSSLDGGLDTDPPENOMWRMAAE	439
Lin	AAESLGADVERECHELSARAPFENRYEPGRDPNTAVATVSATAAPRDDRLAGDANGGSAAACYDFATLETISISTEESAVLETROAAHNSFURSMGSSLDGGLDTDPFENOMWRADAE	440
Lbr	AAESLGAGVEPECHELSSRAPFEXRYEPGRDLNTAVAAASAATAPGGDRLAVDANDDSSAACYDLATLET ISVSNEESSYLETROAAHNNFURSMGSSLDGGLDTDPFEXOMMVRMAAE	436
Lmj	AAESLEGADVERECHELGARAPFEARYEPGRDPNTAVATVSATAAPRDDRLAVDANGDSAVACVIFATLEAISISTEESTVLETROAAHNSFURSNSSSLDGGLDTDPFEAOMMVRMAAV	441
Lta	GAESLEGADVERECHELSSEAPFENRYEPGRDANTAVAIISAAAAPRNDELAVDANGDLAAACYDFATLEAISISNEESSYLETROAAHNSFURSMSSELDGGLDTDPFENOIMVRANAE	465

Tb Tev Tco Tv Lmx Ld Lin Lbr Lmj Lta	REV®VTKDUIDAIFETSVCPRTHINKKAVACLTYIIKNGPFNRMRTRMGFNEVANESACLORIAVKICRRSELGTCLRDISRVEVIDEVLOEILDSKSHKRGSEE-DSGAFKRESSLEY REV®VTKDUIDAIFETSVCPRTHINKKAVACLTYIIKNGPFNRMRTRMGFNEVANESACLORIAVKICRRSELGTCLRDISRVEVIDEVLOEILDSKSHKRGSEE-DSGVFKRESSLEY REV®TAKDULDAIFOSCLOPTHINKKAVACLTYIIKNGPFNRMRTRMGFNEVANESACLORIAVKICRRSELGTLRDISRVEVIDEVLOEILDSKSHKRGSEE-DSGVFKRESSLEY REV®TAKDULDAIFOSCLOPTHINKKAVACLTYIIKNGPFNRMRTRIGFNEVACHTSAALORIALKISRRSELGTLRDISRVEVIDEVLOEILDSKSHKRGSEE-DSGVFKRESSLEY REV®TAKDULDAIFOSCLOPTHINKKAVACLTYIIKNGPFNRMRTRIGFNEVACHTSAALORIALKISRRSELGTLRDISRVEVIDEVLOEILDSKSHKRGSEE-DSGVFKRESSLEY REV®TAKDULDAIFOSCLOPTHINKKAVACLTYIIKNGPFNRMRTRIGFDEVACHTSAALORIALKISRRSELGTLRDISRVEVIDEVLOEILDSKSHKRGSEE-DSGVFKRESSLEY REV®TACDULDAILOSCLOPTHINKKAVACLTYIIKNGPFNRMRTRIGFDEVASHKTASLORIVLKINRRSELGTLRDISRVEVIDEVLOEILDAVKEDEMKVTEGASFSTRVTPQSEY RES®VVQDLODAMLOSCLOPTAINKOVMOCFTYLIRNGEFNRMRTRIGFDEVASASSVYDETTVRLLRRSDVGVRLRDVSRSEHIESVLRLLERDRVRRVEYKSLPGH RES®VVQDLODAMLOSCLOPTAYNKOVMOCFTYLIRNGEFNRMRTRIGFDEVASASSVYDETTVRLLRRSDVGVRLRDVSRSEHIESVLRLLERDRVRRVEYKSL	501 458 456 446 550 551 547 552 576
	DOMINIO DE UNIÓN AL DNA	
Tb Tev Tco Tv Lmx Ld Lin Lbr Lbr Lta	RPRGTLFERLARAIGLOUYVALOLIDVSDAAFLQELLSTVSA-DAETPLEDRTWRCGWIGSGCYQRAINHIISTFTTFIREEVEPVLQRRRS-GQENDQVGESAGE RPRGTLFERLARAIGLOUYVALOLIDVSDAAFLQELLSTVSA-DAETPLEDRTWRCGWIGSGCYQRAINHIISTFTTFIREEVEPVLQRRRS-GQEN	606 564 565 655 655 655 655 655 652 657 681
Tb Tev Tco Tv Lmx Ldn Lbr Lbr Lbr Lta	RSPYASSTSSVSPESY-GDDDNEDSLESVSPVDDLSQHPDDG 647 RSPYASSTSSVSPESY-GDDDNEDSLESVSPVDDLSQHPDDG 647 PSPCASSASTSRSASY-GNGDDADPLESTSSVTTSPPQEN 603 PSQGESNTNNDEEE-EDEKEVDSLNSAASAAL	

Figura 21. Alineamiento de las secuencias de Tau95 en diferentes tripanosomátidos. Tb, *T. brucei*; Tev, *T. evansi*; Tco, *T. congolense*; Tc, *T. cruzi*; Tv, *T. vivax*; Lmx, *Leishmania mexicana*; Lbr, *L. braziliensis*; Lin, *L. infantum*; Lta, *L. tarentolae*; Ld, *L. donovani;* Lmj, *L. major*. Se marcan los dominios conservados, en rojo el dominio de dimerización con Tau55 y en negro el dominio de unión al DNA.

Tabla 4. Porcentajes de identidad de la proteína Tau95 en diferentes especies de tripanosomátidos. Tb, *T. brucei*; Tev, *T. evansi*; Tco, *T. congolense*; Tc, *T. cruzi*; Tv, *T. vivax*; Lmx, *Leishmania mexicana*; Lbr, *L. braziliensis*; Lin, *L. infantum*; Lta, *L. tarentolae*; Ld, *L. donovani;* Lmj, *L. major*.

	Tb 647 aa	Tev 647 aa	Tco 603 aa	Tc 597 aa	Tv 587 aa	Lmx 693 aa	Lbr 693 aa	Lin 698 aa	Lta 719 aa	Ld 697 aa	Lmj 700 aa
Tb	100.00	99.54	54.85	47.95	48.23	34.72	34.33	34.39	32.69	34.44	33.83
Tev		100.00	55.02	48.12	48.23	35.06	34.67	34.72	33.01	34.78	34.00
Тсо			100.00	46.06	45.94	34.31	34.36	33.45	33.96	33.50	32.71
Тс				100.00	50.09	36.78	36.95	36.52	35.66	36.59	35.94
Τv					100.00	34.29	34.72	33.87	32.14	33.93	33.15
Lmx						100.00	83.53	93.36	85.09	93.50	92.64
Lbr							100.00	84.49	80.15	84.33	81.77
Lin								100.00	84.13	99.57	92.84
Lta									100.00	84.26	83.14
Ld										100.00	92.97
Lmj											100.00

5.2 Generación de vectores para RNA de interferencia

Con el objeto de determinar si TbTau95 es una proteína esencial para la viabilidad de *T. brucei*, así como para tratar de dilucidar las funciones que lleva a cabo en este parásito, se procedió a la obtención de vectores que serían usados para inducir la degradación del mRNA de TbTau95 por RNAi. Para estos ensayos se utilizaron los vectores inducibles pZJM y p2T7 (Wickstead et al., 2002; Wang et al., 2000) para la síntesis de RNA de doble cadena. Se obtuvo la secuencia de Tau95 de *T. brucei* de la base de datos (TritrypDB: http://tritrypdb.org/tritrypdb/) y se seleccionó una región de 383 pb, del nucleótido 1218 al 1601, para clonar en los dos vectores. Esta secuencia es exclusiva de TbTau95, para así evitar el *knock down* inespecífico de alguna otra región del genoma de *T. brucei*.

Los fragmentos se amplificaron por PCR a partir de DNA genómico de *T. brucei*, utilizando oligonucleótidos que contienen sitios de corte de *Hind*III y *Bam*HI (TbTau95RNAiR) y *Xho*I (TbTau95RNAiF) para facilitar su clonación en los vectores pZJM y p2T7. Para la amplificación se utilizó un gradiente de temperatura de 58 a 69°C, obteniendo una banda única del tamaño esperado en todas las temperaturas utilizadas (Figura 22). Al haber obtenido una banda única con buena cantidad de DNA, se procedió a purificar los fragmentos de PCR (Figura 23), y se llevó a cabo su ligación en el vector pGEMT-Easy. Con las ligaciones se transformaron células competentes JM109 de *E. coli* y se purificó el plásmido de varias colonias obtenidas.



Figura 21. Amplificación por PCR del fragmento de TbTau95 para RNAi. Se utilizó un gradiente de temperatura de 58°C a 69°C, con los oligonucleótidos de la tabla 1. Gel de agarosa al 1.2%, 1) marcador de peso molecular (escalera 1 Kb plus de Invitrogen). C- representa el control negativo en el que no se utiliza DNA templado, por lo que no debe haber amplificación.





Se realizó un análisis de restricción para verificar la presencia del inserto y la integridad de los sitios de corte en dos de las colonias obtenidas. Se hicieron

digestiones dobles con las enzimas *Hind*III y *Xho*I, y *Bam*HI y *Xho*I. De las clonas analizadas, dos presentaron las bandas con los tamaños esperados, liberando un inserto de 400 pb y el cuerpo de vector de 3 kb (Figura 24). Éstas se secuenciaron para verificar que no hubiera errores en el fragmento clonado. Se realizaron alineamientos de las secuencias y se obtuvo una clona positiva sin errores en la secuencia (Figura 25), obteniéndose así el vector pTbTau95RNAi (Figura 26).



Figura 24. Análisis de restricción de las clonas 1 y 2, obtenidas de la transformación con la ligación de pGEMT-Easy y el fragmento de TbTau95 para RNAi. 2) Clona 1, digestión con *Bam*HI y *Xho*I; 3) Clona 1, digestión con *Hind*III y *Xho*I; 4) Clona 2, digestión con *Bam*HI y *Xho*I; 5) Clona 2, digestión con *Hind*III y *Xho*I. Gel de agarosa al 1.2%, el marcador de peso molecular es 1 Kb plus de Invitrogen.

Clona 1 Tau95RNAi	TACGCATGGCATGCTCCGGCCGCCATGGCGGCCGCGGGAATTCGAT <mark>CTCGAGAAGGCGTC</mark> C <mark>CTCGAGAAGGCGTC</mark> ************
Clona 1 Tau95RNAi	ATCACTCACATCAATTAACTGAAGGGCGACATAAAGTTGTCCTAGCCCAATAGCCCTTGC ATCACTCACATCAATTAACTGAAGGGCGACATAAAGTTGTCCTAGCCCAATAGCCCTTGC *******************************
Clona 1 Tau95RNAi	GAGCCTCTCGAAAAGTGTTCCCCGTGGGCGGTATGGCAGCGAACTTGGCCGTTTGAAAAC GAGCCTCTCGAAAAGTGTTCCCCGTGGGCGGTATGGCAGCGAACTTGGCCGTTTGAAAAC *********************************
Clona 1 Tau95RNAi	ACCGCTATCCTCCTCTGAGCCTCGCTTGTGGGATTTACTGTCAAGTATTTCTTGCAGCAC ACCGCTATCCTCCTCTGAGCCTCGCTTGTGGGATTTACTGTCAAGTATTTCTTGCAGCAC **********
Clona 1 Tau95RNAi	CTCATTGATGTAGGGAACGCGACTAATGTCACGCAGGCATGTACCTAACTCAGAGCGACG CTCATTGATGTAGGGAACGCGACTAATGTCACGCAGGCATGTACCTAACTCAGAGCGACG **********
Clona 1 Tau95RNAi	GCAGATCTTCACAGCGATTCTTTGCAGGCATGCTGAGCTGGGGTTGGCATATGGGTTGAA GCAGATCTTCACAGCGATTCTTTGCAGGCATGCTGAGCTGGGGTTGGCATATGGGTTGAA ***********
Clona 1 Tau95RNAi	CCCCATACGGATGCGCATCCTATTAAACGGCCCATTTTTAATGATATACGTCAAGCACGC CCCCATACGGATGCGCATCCTATTAAACGGCCCATTTTTAATGATATACGTCAAGCACGC ***********
Clona 1 Tau95RNAi	CACAGCCTTTTTATTAAGCTTGGATCC CACAGCCTTTTTATTAAGCTTGGATCC ***********************************

Figura 25. Alineamiento de la secuencia de la clona 1, obtenida de la transformación con la ligación de pGEMT-Easy y el fragmento de TbTau95 para RNAi (Clona 1) y la secuencia genómica del fragmento de TbTau95 seleccionado (Tau95RNAi).



Figura 26. Mapa del plásmido pTbTau95RNAi. El fragmento de TbTau95 está flanqueado por los sitios de corte de *Xho*l, *Hind*III y *Bam*HI para facilitar la subclonación en los vectores pZJM y p2T7.

Posteriormente se llevó a cabo la purificación del inserto para la subclonación en los vectores de interferencia pZJM y p2T7, digiriendo el vector pTau95RNAi con *Xhol* y *Hind*III para pZJM, y *Xhol* y *Bam*HI para p2T7 (Figura 27A). Los vectores fueron digeridos con las mismas enzimas para su purificación (Figura 27B). Se ligó el inserto en los vectores, con las mezclas de ligación se transformaron células competentes JM109 de *E. coli*, y se purificó el plásmido de varias colonias obtenidas.

Mediante un análisis de restricción (utilizando *Hind*III y *Xho*I para pZJM y *Bam*HI y *Xho*I para p2T7) se verificó la presencia del inserto y la integridad de los sitios de restricción añadidos (Figuras 28 y 29). Se seleccionaron dos clonas de cada vector y se mandaron a secuenciar para verificar que no hubiera ningún error en la secuencia del inserto. Una vez verificada la integridad de la secuencia del inserto en ambos vectores, se confirmó la obtención de los vectores pZTbTau95 y p2TbTau95 (Figura 30).



Figura 27. Clonación de TbTau95 en los vectores para RNAi. A) Purificación del inserto liberado del vector pTau95RNAi, utilizando las enzimas *Xho*l y *Hind*III para

pZJM, y *Xho*l y *Bam*HI para p2T7. B) Purificación de los vectores de interferencia, que fueron digeridos con las mismas enzimas (*Xho*l y *Hind*III para pZJM, y *Xho*l y *Bam*HI para p2T7). Gel de agarosa al 1.2%, marcador de peso molecular 1 Kb plus de Invitrogen.



Figura 28. Análisis de restricción con *Hind*III y *Xho*I del vector pZJM con el fragmento para interferencia. 1) Clona 1, plásmido sin digerir. 2) Clona 1, plásmido digerido. 3) Clona 2, plásmido sin digerir. 4) Clona 2, plásmido digerido. 6) Clona 3, plásmido sin digerir. 7) Clona 3, plásmido digerido. 8) Clona 4, plásmido sin digerir. 9) Clona 4, plásmido digerido. Gel de agarosa al 1.2%, en el carril 5 se muestra el marcador de peso molecular (1 Kb plus de Invitrogen).



Figura 29. Análisis de restricción con *Bam*HI y *Xho*I del vector p2T7 con el fragmento para interferencia. 1) Clona 1, plásmido sin digerir. 2) Clona 1, plásmido digerido con *Xho*I y *Bam*HI. 3) Clona 2, plásmido sin digerir. 4) Clona 2, plásmido digerido. 6) Clona 3, plásmido sin digerir. 7) Clona 3, plásmido digerido. 8) Clona 4,

plásmido sin digerir. 9) Clona 4, plásmido digerido. Gel de agarosa al 1.2%, en el carril 5 se muestra el marcador de peso molecular (1 Kb plus de Invitrogen).



Figura 30. Mapa de los plásmidos pZTbTau95 (A) y p2TbTau95 (B). En cada vector, el fragmento del gen de TbTau95 (TbTau95RNAi) está flanqueado por regiones promotoras del fago T7 y secuencias del operador de doxiciclina (TetO). pZTbTau95 está diseñado para integrarse en el espaciador de los genes del rRNA, mientras que p2TbTau95 se integra en las secuencias repetidas de 177 pb.

5.3 TbTau95 parece no ser esencial para el crecimiento celular

Se realizaron ensayos de restricción para linearizar los vectores y con ellos transfectar formas procíclicas de *T. brucei* cepa 29-13, la cual expresa constitutivamente la RNA polimerasa del fago T7 y el represor de doxiciclina. Se utilizó la enzima *Not*l, que corta dentro de las secuencias que servirán para que el vector se integre en el genoma (Figura 30).

Se llevaron a cabo las tranfecciones de formas procíclicas de *T. brucei*, utilizando 5 y 10 μ g de DNA de vector linearizado. La selección se llevó a cabo adicionando fleomicina (2.5 μ g/ml) al medio de cultivo. Una vez obtenidas las poblaciones transfectadas establemente se procedió a la clonación celular mediante la técnica de dilución limitante.

Se realizaron las curvas de crecimiento con una clona de cada línea celular, contando los cultivos y resembrando a 2×10^6 todos los días. Los ensayos de

interferencia se llevaron a cabo con doxiciclina a una concentración de 2 μ g/ml (Dox+). También se analizaron cultivos sin inducir (Dox-).

Las curvas se llevaron a cabo durante 15 días. Como se observa en las Figuras 31 y 32, en ninguna de las dos líneas celulares se apreció una disminución significativa en el crecimiento de los cultivos inducidos con doxiciclina. A continuación se procedió a realizar ensayos de Northern blot para verificar que el sistema de interferencia estuviera funcionando de manera adecuada.



Figura 31. Curva de crecimiento de la línea celular pZTbTau95. Se muestra el crecimiento celular de dos cultivos, uno inducido (Dox+) y uno sin inducir (Dox -). El conteo celular se llevó a cabo durante 15 días, se muestra el promedio de tres experimentos independientes.



Figura 32. Curva de crecimiento de la línea celular p2TbTau95. Se muestra el crecimiento celular de dos cultivos, uno inducido (Dox+) y uno sin inducir (Dox -). El conteo celular se llevó a cabo durante 15 días, se muestra el promedio de tres experimentos independientes.

5.4 Verificación de la disminución en los niveles del mRNA de TbTau95

Se llevaron a cabo ensayos de interferencia por un periodo de 4 días, obteniendo RNA tanto del cultivo inducido (Dox+) como del cultivo sin inducir (Dox-). La interferencia se indujo con doxiciclina a una concentración de 2 μ g/ml. Se extrajo el RNA de los cultivos cada 24 horas.

Para los ensayos de Northern blot se corrieron 20 μ g de RNA total de las dos líneas celulares en geles desnaturalizantes de agarosa al 1.2%, se transfirieron a membranas de *nylon* y éstas se hibridaron con la sonda de TbTau95, que correspondió al mismo fragmento clonado en los vectores de interferencia, por lo que además de reconocer al mRNA de TbTau95, también reconoce al RNA de doble cadena. Se utilizó como control de carga un fragmento del gen de α -tubulina.



Figura 33. Ensayo de Northern blot de la línea celular p2TbTau95. Se muestra el RNA de *T. brucei* 29-13 silvestre (WT), así como el RNA de la línea celular p2TbTau95 inducida con doxiciclina (+) y sin inducir (-), a diferentes días. Como control de carga se hibridó la membrana con una sonda del gen de α -Tubulina.



Figura 34. Ensayo de Northern blot de la línea celular pZTbTau95. Se muestra el RNA de *T. brucei* 29-13 silvestre (WT), así como el RNA de la línea celular pZTbTau95 inducida con doxiciclina (+) y sin inducir (-), a diferentes días. Como control de carga se hibridó la membrana con una sonda del gen de α -Tubulina.

Para ambas líneas celulares (p2TbTau95, Figura 33; y pZTbTau95, Figura 34) se observó la expresión de la doble cadena desde las 24 horas después de la inducción con doxiciclina (bandas de alrededor de 350 y 500 bases). La disminución del mRNA (~3000 bases) fue evidente desde las 24 horas después de la inducción. La densitometría reveló una disminución de hasta el 66.5% en el caso de la línea p2TbTau95, y 91% para la línea pZTbTau95. Este resultado indica que el sistema de interferencia está funcionando de manera adecuada y se está induciendo la degradación del mRNA de TbTau95.

Debido a que no se pudo realizar el resto de las repeticiones del experimento Northern blot, se decidió corroborar la disminución del mRNA de TbTau95 mediante RT-qPCR. Con 1 µg de RNA total de la línea celular pZTbTau95, antes de la inducción con doxiciclina, a las 24 horas y a las 96 horas después de la inducción, se realizaron reacción de transcipción reversa (RT), utilizando un oligo d(T), que reconoce a la cola de poli-A, para generar cDNA de todos los mRNAs. Posteriormente se realizaron ensayos de qPCR con este cDNA, usando oligos específicos para TbTau95 y α -tubulina. Estos experimentos se realizaron por triplicado.

A pesar de que con el Northern blot se observó una disminución de hasta el 91%, con el RTqPCR sólo se logró observar una disminución de hasta el 58% a las 96 horas después de la inducción con doxiciclina (Figura 35).



Horas después de la inducción

Figura 35. Ensayos de RT-qPCR de la línea celular pZTbTau95. Se muestra la abundancia del mRNA de TbTau95 de la línea celular pZTbTau95 inducida con doxiciclina (+) y sin inducir (-), a las 24 y 96 horas de la inducción. Experimentos realizados por triplicado.

5.5 Verificación de la disminución en los niveles de la proteína de TbTau95

5.5.1 Generación de anticuerpo

Para analizar la abundancia de la proteína TbTau95 en los cultivos *knock down* se realizaron ensayos Western blot. Para estos experimentos fue necesaria la obtención de un anticuerpo anti-TbTau95. Como primer paso para la generación del anticuerpo, se diseñaron oligonucleótidos para amplificar el gen de TbTau95 completo (sin el codón de paro), agregando los sitios de corte de las enzimas de restricción *Bam*HI y *Xba*I (Tabla 1), los cuales servirán para la subclonación del gen en el vector de expresión pCold. En este vector, el gen de TbTau95 se clonaría en marco con un tag de histidinas y río abajo del promotor de la proteína de respuesta a *cold shock, cspA*.

La amplificación de los fragmentos se llevó a cabo usando DNA genómico de la línea celular *T. brucei wild-type* como molde (Figura 36) y se procedió a purificar los fragmentos de PCR para llevar a cabo la ligación en el vector pGEMT-Easy.



Figura 36. Análisis de PCR para amplificar el gen completo de TbTau95, usando los oligonucleotidos indicados en la tabla 1, con un gradiente de temperatura de 58°C a 63°C. Gel de agarosa al 1%. 1) marcador de peso molecular 1 Kb plus de Invitrogen. C- representa el control negativo en el que no se utiliza DNA templado, por lo que no debe haber amplificación.

Con las ligaciones se transformaron células competentes JM109 de *E. coli* y se purificó el plásmido de varias colonias obtenidas. Se analizaron las clonas mediante ensayos de restricción para verificar la presencia del inserto y la integridad de los sitios de corte (Figura 37), en todos los casos se obtuvieron las bandas esperadas, de 3 kb para el cuerpo del vector y 1953 pb para el inserto. De éstas, se mandaron a secuenciar 2 de ellas para confirmar que no hubiera algún error en la secuencia. Una de las clonas tuvo un resultado positivo, sin cambios en la secuencia, por lo que se continuó trabajando con ella. Con estos resultados se comprobó la obtención del vector pG-TbTau95 (Figura 38).



Figura 37. Análisis de restricción de las clonas obtenidas de la transformación con la ligación de pGEMT-Easy y el gen de TbTau95. Se muestran 4 de las 8 clonas analizadas. Para cada clona se muestra DNA de plásmido sin digerir, DNA digerido con la enzima *Eco*RI, y DNA digerido con las enzimas *Xba*I y *Bam*HI. Gel de agarosa al 1%, M: marcador de peso molecular (1 Kb plus de Invitrogen).



Figura 38. Mapa del plásmido pG-TbTau95. El gen de TbTau95 está flanqueado por los sitios de corte de *Bam*HI *y Xba*I para facilitar su subclonación posterior en el vector pCold.

Después se llevó a cabo la purificación del fragmento de TbTau95 mediante ensayos de restricción con las enzimas *Bam*HI *y Xba*I (Figura 39). Posteriormente se realizó la subclonación en el vector pCold (digerido con las mismas enzimas) (Figura 40) y se transfectaron células JM109. Se extrajo el DNA plasmídico de 7 de las clonas obtenidas y se analizó por restricción con las enzimas *Bam*HI y *Xba*I para verificar la presencia del inserto (Figura 41). Todas las clonas mostraron las bandas de los tamaños esperados (4.3 kb para el cuerpo del vector y 1953 pb para el inserto), y se decidió mandar a secuenciar dos de ellas. Una de las clonas no presentó ningún cambio en la secuencia del gen de TbTau95. Además, la secuenciación confirmó que el gen se clonó en marco de lectura con respecto al tag de histidinas presente en el vector (Figura 42).



Figura 39. Clonación de TbTau95 en pCold. A) Análisis de restricción del vector pG-TbTau95 con las enzimas *Bam*HI y *Xba*I. B) Inserto purificado. Gel de agarosa al 1%. M: marcador de peso molecular (1 Kb plus de Invitrogen).



Figura 40. Preparación del vector pCold. 1) Restricción del vector pCold con las enzimas *Bam*HI y *Xba*I. Después de la digestión, se separa un fragmento de 36 pb del polilinker que no se observa en el gel. 2) Vector purificado. Gel de agarosa al 1%. M: marcador de peso molecular (1 Kb plus de Invitrogen).



Figura 41. Análisis de restricción con las enzimas *Bam*HI y *Xba*I de las 7 clonas obtenidas (C1 – C7) de la transformación con la ligación del vector pCold y el gen de TbTau95. Gel de agarosa al 1%. M: marcador de peso molecular (1 Kb plus de Invitrogen).

ATG	AAT	CAC	AAA	GTG	CAT	CAT	CAT	CAT	CAT	'CA'	ATC	GAA	GGT	AGG	CAT	ATG	GAG	CTC	GGT
М	Ν	Η	Κ	V	н	Η	Η	Н	Η	Η	I	Ε	G	R	Η	М	E	L	G
ACC	СТС	GAG	GGA	TCC	ATG	TGT	ATT	CCC	CTC	TCC	CTCI	CTC	TTT	TGC	CAT	TGT	CCT	'TAT	ACA
Т	L	Ε	G	S	М	С	Ι	Ρ	L	S	S	L	F	С	Η	С	Ρ	Y	т
CAT	TGT	TGT	CCC	GTG	TAT	TCT	CCC	CGC	ATT	TCI	TTC	ATC	ATA	CAT	GTA	ACA	TGC	CAT	GTC
Н	С	С	Ρ	V	Y	S	Ρ	R	I	S	F	I	I	Η	V	Т	С	Η	V
GCG	AGC	AAG	GGT	TGG	GGT	ATG	GCC	GCC	GTG	GAG	GCCA	TAC	AGA	CGC	TTT	GTG	TCG	ATA	GAG
А	S	Κ	G	W	G	М	Α	А	V	Е	Р	Y	R	R	F	V	S	I	E
CTT	CCC	TTT	TGC	CTT	CCT	GTA	ACG	GTG	GAA	ACC	CAAC	ACC	GAC	GGT	ACC	CAT	TCC	TCA	TGT
L	Р	F	С	\mathbf{L}	Р	V	Т	V	Е	Т	Ν	Т	D	G	Т	Η	S	S	С
GCC	ACG	GCC	ACG	GCG	GAT	CGC	CGC	ACG	GTA	GAG	GCA	TTT	GTT	CCC	CCG	TCA	TTC	CTT	CGA
GCC A	ACG T	GCC A	ACG T	GCG A	GAT D	CGC R	CGC R	ACG T	GTA V	GAG E	GCA A	TTT F	'GTT V	CCC P	CCG P	TCA S	TTC F	CTT L	CGA R
GCC A CCT	ACG T TGT	GCC A ATC	ACG T GAC	GCG A GAC	GAT D ATC	CGC R ACA	CGC R CCG	ACG T ACG	GTA V GCA	IGAC E ICGC	GGCA A GGAG	TTT F AAG	GTT V GCG	CCC P GAA	CCG P CGT	TCA S CAG	TTC F GAA	CTT L .GGA	CGA R .GGT
GCC A CCT P	ACG T TGT C	GCC A ATC I	ACG T GAC D	GCG A GAC D	GAT D ATC I	CGC R ACA T	CGC R CCG P	ACG T ACG T	GTA V GCA A	IGAC E ICGC R	GCA A GGAG E	TTT F AAG K	GTT V GCG A	CCC P GAA E	CCG P CGT R	TCA S CAG Q	TTC F GAA E	CTT L .GGA G	CGA R .GGT G
GCC A CCT P AAC	ACG T TGT C GAC	GCC A ATC I ACC	ACG T GAC D GCG	GCG A GAC D GGA	GAT D CATC I LAAG	CGC R ACA T GGT	CGC R CCG P GAA	ACG T ACG T .CCG	GTA V GCA A AAG	IGAG E ICGG R GAA	GGCA A GGAG E AATG	TTT F AAG K TTG	GTT V GCG A GGT	CCC P GAA E ATT	CCG P CGT R GCA	TCA S CAG Q ACA	TTC F GAA E ACG	CTT L GGA G ACG	CGA R .GGT G GAA
GCC A CCT P AAC N	ACG T TGT C GAC D	GCC A ATC I ACC T	ACG T GAC D GCG A	GCG A GAC D GGA G	GAT D ATC I AAG K	CGC R ACA T GGT G	CGC R CCG P GAA E	ACG T ACG T CCG P	GTA V GCA A AAC K	IGAG E ICGG R GAA E	GGCA A GGAG E AATG M	TTT F AAG K TTG L	GTT V GCG A GGT G	CCC P GAA E ATT I	CCG P CGT R GCA	TCA S CAG Q ACA T	TTC GAA E ACG T	CTT L GGA G ACG T	CGA R .GGT GAA E
GCC A CCT P AAC N TAT	ACG T TGT C GAC D TGC	GCC A ATC I ACC T ACG	ACG T GAC D GCG A GGG	GCG A GAC D GGA G GAA	GAT D CATC I AAAG K ATA	CGC R ACA T GGT G TTC	CGC R CCG P GAA E TCA	ACG T ACG T .CCG P .GGG	GTA V GCA A SAAG K TGG	IGA (E ICG (R GA <i>F</i> E GCG (GCA A GGAG E AATG M GTCG	TTT F AAG K TTG L GCTG	GTT V GCG A GGT G GAT	CCC P GAA E ATT I TTT	CCG P CGT R GCA A GAC	TCA S CAG Q ACA T SGCG	TTC GAA E ACG T GAT	CTT L GGA G ACG T CTG	CGA R GGT GAA E GAG
GCC A CCT P AAC N TAT Y	ACG T TGT GAC D TGC C	GCC A ATC I ACC T ACG T	ACG T GAC D GCG A GGG G	GCG A GAC D GGA G GAA E	GAT D ATC I AAAG K ATA I	CGC R ACA T GGT G TTC F	CGC R CCG P GAA E TCA S	ACG T ACG CCG P .GGG G	GTA GCA A AAG K TGG W	IGAC E ICGC R GGA <i>P</i> E GCGC R	GCA A GGAG E AATG M GTCG S	TTT F AAG K TTG L CTG L	GTT V GCG GGT GGT GAT D	CCC P GAA E ATT I TTT F	CCG P CGT R GCA A GAC D	TCA S CAG Q ACA T GCG A	TTC GAA E ACG T GAT D	CTT L GGA G ACG T CTG L	CGA R GGT GAA E GAG E
GCC A CCT P AAC N TAT Y AGT	ACG TGT C GAC D TGC C CGT	GCC A ATC I ACC T ACG T TTG	ACG T GAC D GCG A GGG G GAG	GCG A GAC D GGA GAA E GGA	GAT D CATC I AAAG K ATA I ACT	CGC R ACA T GGT G TTC F GCC	CGC R CCG P GAA E TCA S GAC	ACG T ACG T CCG P GGG GGA	GTA GCA A GAAG K TGG W AAC	IGAC E ICGC R GGA E GCGC R CGI	GCA A GGAC E AATG M GTCG S CAGC	TTT F AAG K TTG L GCTG L CAAG	GTT V GCG GGT G GAT D CTG	CCC P GAA E ATT I TTT F ACG	CCCG P CGT R GCA GACA D GACT	TCA S CAG Q ACA T GCG A ZACG	TTC F GAA E ACG T GAT D GCA	CTT L GGA G ACG T CTG L AAT	CGA R GGT GAA GAA GAA GAA

Figura 42. Resultado de la secuenciación del vector pCold unido al gen de TbTau95. Una vez obtenida la secuencia de DNA del vector se predijo la secuencia de aminoácidos. En rojo se marca la metionina inicial, en verde el tag de histidinas y en azul el inicio de la proteína TbTau95, la cual se encuentra en marco de lectura con respecto al tag de histidinas.

Una vez obtenido el vector de expresión pCold-TbTau95 (Figura 43), se transformaron células de *E. coli* BL21 y se llevó a cabo la inducción de la expresión de la proteína agregando IPTG al medio de cultivo a 37°C por 18 h. La proteína fue purificada mediante cromatografía por afinidad a una columna de níquel y fue utilizada para inmunizar ratones BALB-C de manera intravenosa.



Figura 43. Mapa del plásmido pCold-TbTau95. El gen de TbTau95 está flanqueado por los sitios de corte de *Bam*HI *y Xba*I.

El suero fue colectado a las 6 semanas después de la inmunización y analizado mediante Western blot. Como se puede observar en la Figura 44, se logró obtener una banda del tamaño esperado para TbTau95 (~73 kDa).



Figura 44. Análisis de la expresión de la proteína TbTau95 mediante Western blot utilizando el anticuerpo policional contra la misma.

5.5.2 Western blot para verificar la disminución del nivel de proteína

Una vez obtenido el anticuerpo policional contra TbTau95, se utilizo para corroborar la disminución de la proteína en la línea célular de interferencia pZTbTau95. Para ello, se extrajo proteína total del cultivo celular pZTbTau95 a las 0, 24, 48, 72 y 96 horas después de la inducción del RNAi con doxiciclina. Estos experimentos se realizaron por triplicado. Como se puede observar en la Figura 45, no se obtuvo disminución en la abundancia de la proteína TbTau95, incluso a las 96 horas después de la inducción del RNAi.



Figura 45. Ensayos de Western blot de la línea celular pZTbTau95. En la parte superior se muestra un Western blot representativo, usando el anticuerpo anti-TbTau95. Se muestra la abundancia de la proteína de TbTau95 en cultivos sin inducir (0 h) e inducidos con doxiciclina por 24, 48, 72 y 96 h. Como control de carga se usó un anticuerpo contra β -tubulina. En la parte inferior se muestra la cuantificación de tres experimentos independientes. Se muestra la desviación estándar.

5.6 El intento de knock down de TbTau95 no fue exitoso

Para analizar el efecto del *knock down* de TbTau95 en la transcripción, se llevaron a cabo ensayos de RT-qPCR utilizando RNA total de la línea celular pZTbTau95, antes de la inducción (0 h) y a las 96 horas después de la inducción. Se generó cDNA usando un oligo de *Random hexamers* para generar cDNA del repertorio completo de RNAs y evaluar la abundancia transcritos sintetizados por la RNA pol III (tRNA-Ala, tRNA-Arg, 5S rRNA, y U2 snRNA), por RNA pol II (TFIIB) y RNA pol I (prociclina) No logramos obsevar disminución en la abundancia de ningun RNA, como se observa en la Figura 46. Estos resultados indican que el intento de *knock down* de TbTau95 no fue exitoso.





5.7 Generación de la línea celular TbTau95-PTP

Se amplificó un fragmento de 577 pb del extremo 3' del gen de TbTau95 mediante PCR usando los oligonucleótidos indicados en la tabla 1 (Figura 47, panel A). Este fragmento fue purificado con un kit comercial y se clonó en el vector pGEMT-Easy. El DNA plasmídico obtenido se analizó mediante ensayos de restricción con la

enzima *Eco*RI para liberar el inserto, y se obtuvo un fragmento del tamaño esperado (Figura 47, panel B). Se mandó a secuenciar el DNA plasmídico, y una vez obtenido un resultado positivo se purificó el inserto y se subclonó en el vector pC-PTP-Bla, que está diseñado para integrarse en el genoma de *T. brucei*, reemplazando una copia endógena del gen de interés. De igual manera, el DNA plasmídico se analizó mediante ensayos de restricción, esta vez usando las enzimas *Apa*I y *Not*I, que liberan el fragmento de TbTau95 clonado. Como se observa en el panel C de la Figura 47, se obtuvieron los fragmentos de interés: fragmento de 577 pb y vector de ~5 kb. Este DNA se mandó a secuenciar y se confirmó que el fragmento clonado no presenta cambios y que se encuentra en marco de lectura con respecto a la bandera PTP (Figura 48). Con estos resultados se confirmó la obtención del vector pC-TbTau95-PTP (Figura 49).



Figura 47. Clonación de TbTau95 en pGEMT-Easy y en el vector PTP. A) Amplificación del fragmento seleccionado del gen de TbTau95, utilizando los oligonucleótidos indicados en la tabla 1. B) Ensayo de restricción del vector pG-TbTau95-PTP con *Eco*RI. C) Vector pC-TbTau95-PTP digerido con *Apa*l y *Not*l. Gel de agarosa al 1%. M: marcador de peso molecular 1 Kb plus de Invitrogen.

El vector pC-TbTau95-PTP se transfectó en parásitos de *T. brucei* 29-13 mediante electroporación y la selección se realizó con blasticidina. Una vez que se obtuvo una población con crecimiento estable, se llevó a cabo la clonación por el método de dilución limitante y se obtuvieron 7 clonas que fueron analizadas mediante PCR y Western blot.

	TbTau95																		
cca	gag	agt	tat	ggt	gat	gat	gat	aat	gag	gac	tca	ctc	gag	agt	gtt	agt	cct	gta	gac
Р	Е	S	Y	G	D	D	D	Ν	Е	D	S	L	Е	S	V	S	Р	V	D
	Prot C																		
gat	ttg	tcc	cag	cat	cca	gat	gac	gga	gcg	cgg	ccg	ctg	gaa	gat	cag	gtg	gat	cct	cgt
D	L	S	Q	Н	Р	D	D	G	А	R	Ρ	L	E	D	Q	V	D	Р	R
	Tev site																		
ctt	att	gat	ggg	aaa	tat	gat	att	cca	act	act	gct	agc	gag	aat	ttg	tat	ttt	cag	ggt
L	I	D	G	K	Y	D	I	Р	Т	Т	A	S	Е	Ν	L	Y	F	Q	G
gag	ctc	aaa	acc	gcg	gct	ctt	gcg	саа	cac	gat	gaa	gcc	gtg	gac	aac	aaa	ttc	aac	aaa
Ε	L	Κ	Т	А	A	L	А	Q	Н	D	Е	A	V	D	Ν	Κ	F	Ν	K
gaa	caa	caa	aac	gcg	ttc	tat	gag	atc	tta	cat	tta	cct	aac	tta	aac	gaa	gaa	caa	cga
Е	Q	Q	Ν	А	F	Y	Е	I	L	Η	L	Р	Ν	L	Ν	Е	Е	Q	R
									Pro	tΑ									
aac	gcc	ttc	atc	caa	agt	tta	aaa	gat	gac	сса	agc	caa	agc	gct	aac	ctt	tta	gca	gaa
Ν	Α	F	I	Q	S	L	Κ	D	D	Р	S	Q	S	A	Ν	L	L	А	Е
gct	aaa	aag	cta	aat	gat	gct	cag	gcg	ccg	aaa	gta	gac	aac	aaa	ttc	aac	aaa	gaa	caa
А	Κ	Κ	L	Ν	D	А	Q	A	Р	Κ	V	D	Ν	Κ	F	Ν	Κ	Е	Q
caa	aac	gcg	ttc	tat	gag	atc	tta	cat	tta	cct	aac	tta	aac	gaa	gaa	caa	cga	aac	gcc
Q	Ν	Α	F	Y	Е	I	L	Н	L	Р	Ν	L	Ν	Е	Е	Q	R	Ν	Α
									Pro	ot A									
ttc	atc	саа	agt	tta	aaa	gat	gac	cca	agc	caa	agc	gct	aac	ctt	tta	gca	gaa	gct	aaa
F	I	Q	S	L	Κ	D	D	Р	S	Q	S	А	Ν	L	L	Α	Е	А	Κ
aag	cta	aat	ggt	gct	cag	gcg	ccg	aaa	gta	gac	gcg	aat	tcc	gcg	ggg	aag	tca	acc	tga
Κ	L	Ν	G	А	Q	А	Ρ	Κ	V	D	A	Ν	S	A	G	Κ	S	Т	-

Figura 48. Resultados de la secuenciación del vector pC-TbTau95-PTP. Se muestra la secuencia de DNA y los nucleótidos que codifica cada triplete. En verde se muestra el fragmento final de TbTau95, en amarillo se muestra la secuencia del epítopo de proteína C, y en azul los dos epítopos de proteína A. En rosa se muestra el sitio de corte de la proteasa TEV.



Figura 49. Mapa del plásmido pC-TbTau95-PTP. Un fragmento del gen de TbTau95 está flanqueado por los sitios de corte de *Apal y Not*l, y la bandera PTP se encuentra al final del gen.

Para demostrar que el vector se hubiera integrado en el genoma de *T. brucei* de manera correcta, reemplazando una copia engógena del gen de TbTau95, se llevó a cabo una reacción de PCR usando un oligonucleótido que se alínea al inicio del gen de TbTau95 y uno que se une al sitio de corte de la proteasa TEV en la bandera PTP, de tal manera que sólo veríamos amplificación si el vector se integró correctamente (Figura 50). Como se observa en la figura 51, se obtuvo el fragmento del tamaño esperado de 2046 pb tanto en la población como en las 7 clonas analizadas, a diferencia de la línea celular silvestre (WT) en la que no hubo amplificación, como se anticipaba. Con estos resultados se confirmó la integración correcta de vector en el genoma de *T. brucei*, reemplazando una copia engódena del gen de TbTau95.



Figura 50. Representación esquemática del fragmento amplificado y los oligonucleótidos utilizados para las reacciones PCR. Se muestra el mapa de células wild-type y del vector pC-TbTau95-PTP (en donde no se observaría amplificación), y del locus en el que se dio la integración correcta del plásmido, donde se amplificaría un fragmento de 2046 pb.



Figura 51. Análisis de PCR para amplificar el gen de TbTau95 y un fragmento de la bandera PTP en las clonas transfectadas con el vector PTP. Se usaron los oligonucleotidos indicados en la Figura 50, con DNA de la población (Pob) y de 7

clonas (C1 a C7). Se analizó también DNA de células silvestres (WT). C- representa el control negativo en el que no se utilizó DNA templado. El primer carril muestra el marcador de peso molecular (1 Kb plus de Invitrogen). Gel de agarosa al 1%.

Como siguiente paso de la caracterización de la línea celular, se realizaron ensayos de Western blot para verificar la expresión de la proteína recombinante TbTau95-PTP. Para esto, se utilizó lo equivalente a 12×10^6 células de la población y las clonas, así como de células silvestres, y se utilizó un anticuerpo que reconoce el epítopo de proteína C presente en la bandera PTP. Posteriormente, se desnudó la membrana y se puso a interactuar con anticuerpo anti- β -tubulina. Como se observa en la Figura 52, tanto con la población como con las clonas obtuvimos una banda del tamaño esperado (92.8 kDa), la cual no está presente con la línea silvestre (WT). Por otro lado, con β -tubulina, logramos ver la banda del tamaño esperado en todos los carriles. Con estos experimentos, logramos confirmar la obtención de la línea celular *T. brucei* Tau95-PTP, que fue utilizada en diferentes experimentos posteriores.



Figura 52. Experimento Western blot utilizando proteína total de la población (Pob) y 6 de las clonas (C1-C6) obtenidas de la línea celular *T. brucei* Tau95 – PTP, así como de la línea celular silvestre (WT). Como control de carga se empleó un anticuerpo contra β -tubulina.

5.8 Tau95 es una proteína nuclear

Una vez comprobada la expresión de la proteína recombinante TbTau95-PTP, utilizamos esta línea celular para realizar experimentos de inmunofluorescencia indirecta y determinar la localización celular de TbTau95. Para esto, usamos un anticuerpo anti-Proteína C que reconoce una región presente en la bandera PTP. Como se observa en la Figura 53, la señal de TbTau95 se encuentra localizada en el núcleo, como es de esperarse para un factor de transcripción.



Figura 53. Inmunofluorescencia indirecta con la línea celular *T. brucei* Tau95-PTP. Se muestra el DNA teñido con DAPI en azul, la señal de Tau95-PTP en verde, el sobrelape y el campo claro. La barra de tamaño representa 5 μ m.

Por otro lado, analizamos la localización celular de Tau95 en *L. major* (LmTau95), utilizando una línea celular obtenida con anterioridad en el laboratorio, en la que

LmTau95 está fusionada a la bandera PTP. Primero se realizaron experimentos Western blot para confirmar la correcta expresión de la proteína recombinante, usando el anticuerpo anti-Proteína C. Con estos experimentos observamos una banda del tamaño esperado de 97 kDa que no se observó al usar células silvestres de *L. major*, confirmando la expresión correcta de la proteína recombinante LmTau95-PTP (Figura 54a). Posteriormente, se llevaron a cabo los experimentos de inmunofluorescencia indirecta, en los que se observó una localización nuclear para LmTau95 (Figura 54), similar a la observada con TbTau95 (Figura 53).



Figura 54. Análisis de la línea celular LmTau95-PTP. A) Experimento Western blot usando proteína total de la línea celular LmTau95-PTP y células silvestres (WT). Como control de carga se empleó un anticuerpo contra β -tubulina. B) Inmunofluorescencia indirecta donde se muestra el DNA teñido con DAPI en azul, la señal de LmTau95-PTP en verde, la señal de la proteína nucleolar Nop56 en rojo, el sobrelape y el campo claro. La barra de tamaño representa 5 μ m.

5.9 TbTau95 se une a genes transcritos por la RNA pol III

A continuación procedimos a analizar las regiones del DNA a las que se une TbTau95, mediante ensayos de inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP), utilizando la línea celular TbTau95-PTP y un anticuerpo que reconoce al epítopo de proteína A presente en la bandera PTP. Para estos experimentos, se llevan a cabo pasos secuenciales de lisis celular, obtención los núcleos y posteriormente sonicación del DNA a un tamaño ideal de 200 a 500 pb (Figura 55).



Figura 55. DNA sonicado de la línea celular TbTau95-PTP (carril 1). M: marcador de peso molecular (1 Kb plus de Invitrogen). Gel de agarosa al 1%.

Antes de la inmunoprecipitación con el anticuerpo anti-proteína A, se tomó 10% de las muestras y se guardó como INPUT, representando el repertorio completo de DNA. Se trabajó con dos muestras por separado, una se puso a interactuar con 10 µg del anticuerpo anti-Proteína A, y la otra se usó como control negativo, poniéndola a interactuar con suero de conejo no específico. El DNA inmunoprecipitado se purificó y se analizó por qPCR, usando los oligonucleótidos específicos para genes transcritos por las tres RNA polimerasas (Figura 56A).

Para la RNA pol I se seleccionaron dos regiones del promotor del locus del rRNA (la región de control río arriba, y la región I/II), así como un fragmento del gen del rRNA 18S. Para la RNA pol II se seleccionó la región promotora del locus del RNA spliced leader (SL prom), una región intergénica del mismo locus (SL inter), y un fragmento de la región codificante del gen de α-tubulina. Finalmente, para la RNA pol III, se seleccionó el gen del rRNA 5S, los genes de tRNA de arginina y alanina, así como una región intergénica de cada locus (Ala inter y Arg inter), y el gen del snRNA U2 y su región promotora (Figura 56A).

En la Figura 56B se muestran los resultados de tres experimentos independientes del ChIP y las reacciones de qPCR. Como se observa, TbTau95 mostró enriquecimiento en las regiones transcritas por la RNA pol III, como lo son los tRNAs de alanina y arginina, y sus regiones flanqueantes, y el snRNA U2 y su región promotora. De manera inesperada, no logramos ver enriquecimiento de esta proteína en el gen del rRNA 5S. Por lo que podemos concluir que, a excepción del rRNA 5S, TbTau95 se asocia a regiones transcritas por la RNA pol III.

De manera interesante, logramos observar un ligero enriquecimiento de TbTau95 en la región UCR del promotor de la unidad del rRNA (transcrita por RNA pol I) y en el promotor del SL RNA (transcrita por RNA pol II) (Figura 56).



Figura 56. Ensayos ChIP y qPCR con la línea celular TbTau95-PTP. A) Representación esquemática de las regiones seleccionadas para analizar mediante

qPCR. B) Gráfica de los resultados de las reacciones de qPCR que muestran las veces de enriquecimiento de TbTau95 sobre el control negativo. Se muestra el promedio de tres experimentos independientes.

5.10 Identificación de subunidades de TFIIIC en los tripanosomátidos

Para identificar a las proteínas con las que interactúa Tau95 en *T. brucei* y *L. major*, se llevaron a cabo dos ensayos de purificación por afinidad en tándem, usando las líneas celulares que expresan a las proteínas recombinantes TbTau95-PTP y LmTau96-PTP, así como líneas celulares silvestres (WT) de ambos parásitos. Una alícuota de 1/5 parte de las proteínas purificadas se analizó mediante electroforesis en geles de gradiente de poliacrilamida teñidos con Sypro Ruby (Figura 57). En el caso de TbTau95-PTP, se observaron alrededor de 17 bandas, con un tamaño entre ~15 y 225 kDa (Figura 57A). Por su parte, en las muestras de LmTau95-PTP se apreciaron cerca de 10 bandas, cuyo tamaño va de ~25 a ~120 KDa (Figura 57B). El resto de las muestras se mandó a analizar mediante espectrometría de masas.

La espectrometría de masas y los análisis bioinformáticos permitieron identificar múltiples proteínas (Tablas 5 y 6). Dentro de las proteínas más abundantes que purificaron con TbTau95 se encontró a la proteína Tb927.1.3860, que de acuerdo con un análisis bioinformático con el programa HHpred, corresponde al ortólogo de la subunidad Tau131 de TFIIIC de levadura, con un 100% de probabilidad y un *E-value* de 3.7×10^{-56} . De igual manera, el ortólogo de Tb927.1.3860 en *L. major*, LmjF.12.0560, fue una de las proteínas más abundantes co-purificadas con LmTau95. Estos resultados indican que Tb927.1.3860 y LmjF.12.0560 son los ortólogos de Tau131 en *T. brucei y L. major*, respectivamente.

De manera interesante, también logramos identificar ortólogos para otras dos subunidades de TFIIIC, que co-purificaron con Tau95 en ambos parásitos, siendo de las proteínas más abundantes y que están anotadas como proteínas hipotéticas en la base de datos TriTrypDB. Por un lado, como ortólogos de Tau55 se

identificaron a las proteínas Tb927.11.1590 (probabilidad de 82.9%, *E-value* de 1.8) y LmjF.27.0990 (probabilidad de 84.2%, *E-value* de 1.5). Asimismo, las proteínas LmjF.13.0270 (probabilidad de 30.2%, *E-value* de 240) y Tb927.11.4520 (probabilidad de 78.9%, *E-value* de 13), se identificaron como probables ortólogos de Tau138. No se logró identificar ortólogos de las subunidades Tau60 y Tau91.



Figura 57. Proteínas obtenidas mediante la purificación por afinidad en tándem de las líneas TbTau95-PTP (A) y LmTau95-PTP (B). La muestra utilizada corresponde a una alícuota de 3 µl del material total concentrado. Geles de gradiente (4-15%) de poliacrilamida (Mini-PROTEAN TGX Precast Gel) teñidos con Sypro Ruby. Marcador Broad Range Protein Molecular Weight Markers PROMEGA.

Además de las subunidades de TFIIIC, se identificaron diferentes proteínas con funciones diversas que se dividieron en los siguientes grupos: subunidades de las RNA polimerasas, reguladores de la transcripción y/o remodeladores de la cromatina, replicación del DNA, proteínas de unión al RNA, proteínas nucleolares, y otras funciones (Tablas 5 y 6). Tanto con TbTau95 como con LmTau95 se purificó la subunidad AC40, la cual se comparte entre RNA pol III y RNA pol I, así como
DNA helicasas RuvB-like y varias subunidades del factor C de replicación. Además, con TbTau95 se identificó la subunidad C82 de RNA pol III (con un número muy alto de péptidos y alta cobertura, similar a la de las subunidades de TFIIIC), la proteína retrotransposon hot spot 5 (RHS5), la CTD fosfatasa estimulada por TFIIF, una proteína con un dominio de interacción con SUMO, y varias proteínas hipotéticas (Tabla 5). Por su parte, con LmTau95 copurificó la subunidad C17 de RNA pol III, una subunidad del complejo PAF, la asparaginil tRNA sintetasa, dos proteínas nucleolares, y una proteína con repetidos HEAT (Tabla 6).

Tabla 5. Proteín	as que co-purifica	ron con TbTau95 ^a
------------------	--------------------	------------------------------

TriTrypDB ID	Función de la proteína	Tamaño (kDa)	Péptidos ^b	Cobertura (%) ^c
Subunidades de	TFIIIC			
Tb927.10.980	TFIIIC subunidad Tau95	67.4	133, 111	72, 72
Tb927.11.4520	TFIIIC subunidad Tau138	155.0	101, 116	58, 53
Tb927.1.3860	TFIIIC subunidad Tau131	131.4	93, 58	53, 39
Tb927.11.1590	TFIIIC subunidad Tau55	25.8	73, 63	84, 88
Subunidades de	la RNA polimerasa			
Tb927.2.2990	C82/RPC3 (RNAP III)	61.1	67, 51	76, 65
Tb927.10.15370	AC40/RPAC1 (RNAP I and III)	37.3	12, 7	36, 31
Reguladores de	a transcripción y/o remodeladores de	la cromatina		
Tb927.2.1080	Retrotransposon hot spot protein 5	76.6	17, 13	27, 22
	(RHS5)			
Tb927.4.2000	RuvB-like DNA helicasa	52.6	12, 2	36, 5
Tb927.4.1270	RuvB-like DNA helicasa	49.9	11, 7	35, 20
Tb927.2.4830	TFIIF-stimulated CTD fosphatasa	38.8	10, 3	34, 9
Replicación del I	DNA			
Tb927.11.5650	Factor de replicación C, subunidad 1	65.0	13, 9	26, 21
Tb927.11.9550	Factor de replicación C, subunidad 4	37.6	13, 1	56, 5
Tb927.6.3890	Factor de replicación C, subunidad 2	38.8	11, 8	30, 28
Tb927.10.7990	Factor de replicación C subunidad 3	38.7	9, 3	43, 14
Proteínas de unio	ón al RNA			
Tb927.11.10550	Proteína hipotética (probable	90.5	40, 25	45, 33
	proteína de unión a ácidos nucleicos)			
Tb927.6.4440	Proteína de unión a RNA 42	37.7	5, 5	24, 17
Otras funciones				
Tb927.8.770	Proteína con motive de interacción	70.7	57, 40	74, 67
	SUMO, putativa			
Tb927.9.8880	Actina B	41.8	20, 6	65, 28
Tb11.v5.0718	Protein cinasa	40.3	17, 3	56, 16
Tb927.6.4320	Proteína de función desconocida (DUF2817)	44.4	10, 5	35, 18

^a Las proteínas que probablemente sean contaminantes (incluyendo múltiples proteínas ribosomales, factores de traducción, tubulinas, proteínas de choque térmico y proteínas mitocondriales) no se incluyeron.

^b Cada dígito indica el número de péptidos identificados en dos purificaciones de afinidad tándem diferentes.

^c Cada número denota la cobertura encontrada en dos experimentos diferentes. Solo se muestran las proteínas que muestran una cobertura de al menos el 20%, en promedio.

TriTrypDB ID	Función de la proteína	Tamaño (kDa)	Péptidos ^b	Cobertura (%) ^c
Subunidades de	TFIIIC			
LmjF.21.1100	TFIIIC subunidad Tau95	76.5	183, 108	77, 63
LmjF.13.0270	TFIIIC subunidad Tau138	207.3	49, 14	30, 10
LmjF.27.0990	TFIIIC subunidad Tau55	29.9	37, 12	87, 29
LmjF.12.0560	TFIIIC subunidad Tau131	149.0	39, 7	34, 7
Subunidades de	e la RNA polimerasa			
LmjF.19.0660	AC40/RPAC1 (RNAP I and III)	47.4	9, 2	30, 9
LmjF.03.0790	C17/RPC9 (RNAP III)	45.4	3, 4	12, 16
Reguladores de	la transcripción y/o remodeladores o	de la cromatina		
LmjF.29.1110	Nueva subunidad del complejo PAF1	68.5	10, 1	25, 3
LmjF.34.2610	DNA helicasa RuvB-like	53.6	8, 2	21, 6
Replicación del	DNA			
LmjF.30.2630	Factor de replicación C, subunidad 2	38.4	7, 1	34, 5
LmjF.24.0990	Factor de replicación C, subunidad 1	71.7	7, 1	18, 2
Proteínas nucle	olares			
LmjF.05.0140	RNA helicasa nucleolar II	73.4	12, 1	18, 2
LmjF.10.0210	Nop56, procesamiento del rRNA	52.7	8, 2	25, 7
Otras funciones				
LmjF.34.2340	Asparaginil-tRNA sintetasa	99.4	11, 2	16, 4
LmjF.18.0700	Repetidos HEAT	77.3	10, 1	19, 3
LmjF.36.5880	GTPasa Ras-like pequeña	40.6	7, 1	27, 3
LmjF.31.2030	Proteína de fusión a ubiquitina	14.6	5, 2	37, 14
LmjF.04.1230	Actina	42.1	5, 1	25, 3

^a Las proteínas que probablemente sean contaminantes (incluyendo múltiples proteínas ribosomales, factores de traducción, tubulinas, proteínas de choque térmico y proteínas mitocondriales) no se incluyeron.

^b Cada dígito indica el número de péptidos identificados en dos purificaciones de afinidad tándem diferentes.

^c Cada número denota la cobertura encontrada en dos experimentos diferentes. Solo se muestran las proteínas que muestran una cobertura de al menos el 10%, en promedio.

6. DISCUSIÓN

TFIIIC ha sido ampliamente estudiado en organismos que van desde la levadura hasta los vertebrados (Dieci et al. 2013; Talyzina et al. 2023). Sin embargo, el conocimiento sobre este factor de transcripción en eucariontes ancestrales es prácticamente inexistente. En este trabajo, caracterizamos la subunidad Tau95 de TFIIIC en los parásitos unicelulares *T. brucei y L. major*. Nuestros resultados indican que la secuencia de aminoácidos de Tau95 está débilmente conservada a lo largo de la evolución (Tabla 3). No obstante, estas proteínas contienen un dominio de unión al DNA bien conservado y un dominio de dimerización relativamente conservado (Figuras 17 y 19). En la región C-terminal de los ortólogos de Tau95, se conserva una serie de residuos ácidos. En *S. pombe*, esta cola ácida inhibe la unión al DNA de Tau95 (Taylor et al. 2013a). Es importante destacar que tanto TbTau95 como LmTau95 poseen la cola ácida en la región C-terminal (Apéndice 2).

Se generaron líneas celulares de *T. brucei* y *L. major* que expresan a Tau95 fusionada a una bandera PTP en el extremo C-terminal. Experimentos de inmunofluorescencia indirecta con estas líneas celulares demostraron que, como era de esperar para un factor de transcripción, Tau95 se localiza en el núcleo en ambos parásitos. Curiosamente, mientras se observó un patrón en forma de anillo en la mayoría de las células de *T. brucei* (Figura 53), la señal de Tau95 se distribuye por todo el nucleoplasma en las células de *L. major* (Figura 54). Un estudio a nivel genómico que mapeó la localización subcelular de la mayoría de las proteínas de *T. brucei* también informó de una localización nuclear para TbTau95 marcada con GFP en el extremo C-terminal, mientras que una etiqueta en el extremo N promovió la relocalización de la proteína a endosomas y citoplasma (Billington et al. 2023) (datos disponibles en la base de datos TrypTag, http://tryptag.org). Las proteínas Tau55 (Tb927.11.1590) y Tau138 (Tb927.11.4520) etiquetadas se encontraron en el núcleo, aunque también se observó algo de señal en el citoplasma. El estudio no reportó la localización de Tau131 (Tb927.1.3860) (Billington et al. 2023).

En algunas ocasiones, el etiquetado de proteínas puede modificar su función. Sin embargo, nuestros resultados indican que las funciones generales de las proteínas de fusión Tau95-PTP no se vieron alteradas en los cultivos transgénicas de *T. brucei* y *L. major*. Dentro de estas observaciones se encuentra la localización nuclear de la proteína, la interacción de TbTau95-PTP con genes de tRNA y snRNA, y su asociación con otras subunidades de TFIIIC y con RNA Pol III. No obstante, la etiqueta podría haber afectado algunas funciones específicas de Tau95, como su asociación con genes de rRNA 5S (Figura 56B).

Los ensayos de ChIP realizados con la línea celular TbTau95-PTP mostraron una alta ocupación de TbTau95 en genes de tRNA y sus regiones adyacentes (Figura 56B). También se encontró un enriquecimiento significativo de TbTau95 en el gen de U2 snRNA y en su promotor, compuesto por cajas A y B ubicadas dentro de una región similar a tRNA río arriba del gen. Esto concuerda con el hecho de que, a diferencia de otros organismos, en los tripanosomátidos todos los genes de snRNA son transcritos por RNA Pol III, y su expresión está controlada por genes de tRNA (o similares a tRNA) río arriba (Nakaar et al. 1994), por lo que es de esperarse que TFIIIC participe en la transcripción de genes de snRNA en estos parásitos. Es interesante destacar que no se observó ocupación de TbTau95 en el gen de rRNA 5S, como se ha encontrado en otros organismos (Acker et al. 2013). En cuanto a los genes dependientes de RNA Pol I y II, se encontró una baja ocupación de TbTau95 en la región promotora de rRNA y en la región promotora de SL RNA (Figura 56). También, es importante señalar que anteriormente se ha observado la ocupación de la subunidad Brf1 de TFIIIB en genes transcritos por RNA Pol I y II en L. major (Florencio-Martínez et al. 2021). Por lo tanto, es posible que algunos factores de transcripción de RNA Pol III participen en la regulación de la transcripción global en los tripanosomátidos. Serían necesarios experimentos de ChIP-Seq para explorar la posible asociación de TFIIIC y/o TFIIIB con genes dependientes de RNA Pol I y II en estos organismos. Es interesante destacar que

se ha informado con anterioridad que TFIIIC se asocia a múltiples sitios de inicio de la transcripción de RNA Pol II en líneas celulares de neuroblastoma (Büchel et al. 2017).

Se realizaron experimentos de purificación por afinidad en tándem con las líneas TbTau95-PTP y LmTau95-PTP, seguidos de espectrometría de masas y análisis bioinformáticos. Identificamos proteínas que son contaminantes comunes en ensayos de purificación por afinidad tándem (Mellacheruvu et al. 2013), tales como queratinas humanas y varias proteínas ribosomales de tripanosomátidos, proteínas de choque térmico y otras chaperonas, factores de elongación de la traducción, proteínas mitocondriales, α y β -tubulinas, entre otras proteínas, que no fueron incluidas en las Tablas 5 y 6.

Por otro lado, estos ensayos nos permitieron identificar ortólogos de las subunidades de TFIIIC Tau55, Tau131 y Tau138 en tripanosomatidos (Tablas 5 y 6). Tau55 presenta una secuencia conservada de 34 aminoácidos ubicada dentro del dominio de dimerización con Tau95 (Dumay-Odelot et al. 2007), y esta secuencia fue identificada en TbTau55 y LmTau55 (Apéndice 3). Un dominio de histidin-fosfatasa, aparentemente no involucrado en la transcripción de RNA Pol III, ha sido observado en la región N-terminal de Tau55 en *S. cerevisiae* y otros hemiascomicetos, pero no en otros eucariotas (Taylor et al. 2013b). Por lo tanto, como se esperaba, este dominio no está presente en TbTau55 y LmTau55. Es interesante destacar que la arquitectura general del heterodímero Tau95-Tau55 es muy similar a la de las subunidades Rap30-Rap74 del factor de transcripción TFIIF de la RNA Pol II, ya que el dominio de dimerización en ambos heterodímeros consiste en un dominio de triple barril β ; y las regiones C-terminales de Tau95 y Rap30 poseen dominios de hélice alada como dominios de unión al DNA (Taylor et al. 2013a).

Tau131 presenta la mayor conservación estructural de las subunidades de TFIIIC, ya que está compuesta principalmente por repetidos de tetratricopéptidos (TPR)

(Apéndice 3). Los primeros 10 TPR, en la región N-terminal, se dividen en dos grupos: el brazo izquierdo (TPR 1-5) y el brazo derecho (TPR 6-10) (Male et al. 2015). La región C-terminal contiene un dominio helicoidal y un conjunto adicional de TPR con siete repetidos (Vorlander et al. 2020). Nuestros resultados predicen que TbTau131 y LmTau131 contienen 10 y 12 repeticiones de TPR en la región N-terminal, respectivamente, y seis TPR en la región C-terminal. Por lo tanto, la organización distintiva de dominios de Tau131 se conserva en los tripanosomátidos.

En el subcomplejo TB, Tau138 se une a la caja B de los genes de tRNA. A pesar de este papel importante, Tau138 es la subunidad de TFIIIC menos caracterizada (Male et al. 2015). Tau138 presenta una conservación limitada de secuencia en los eucariotas, ya que la proteína de *S. cerevisiae* está relacionada con el ortólogo de *S. pombe*, pero no con el de los humanos. Mientras que Tau138 de levadura contiene varios dominios de hélice alada y un motivo HMG (Male et al. 2015), el Tau138 humano tiene dominios de dedo de zinc e histona acetiltransferasa (Vezzoli et al. 2023). TbTau138 y LmTau138 muestran similitud con un dominio central extendido de hélice alada de Tau138 de *S. cerevisiae*, que es la única región de la proteína cuya estructura cristalina se ha determinado. Este dominio también está moderadamente conservado entre levadura y humano y es esencial para la viabilidad celular en levadura (Male et al. 2015).

No logramos identificar candidatos para los ortólogos de Tau60 y Tau91 en tripanosomátidos. Tanto Tau60 como Tau91 se caracterizan por la presencia de dominios WD40 (Mylona et al. 2006), que son repeticiones de siete hojas β que forman una rosquilla y participan en interacciones proteína-proteína (Schapira et al. 2017). Se ha propuesto que Tau60 y Tau91 forman una plataforma para la interacción con Tau138, regulando así la unión de Tau138 a la caja B (Mylona et al. 2006). Entre las proteínas más abundantes que copurificaron tanto con TbTau95 como con LmTau95 (que representarían los candidatos más obvios para las subunidades que faltan), no encontramos proteínas con homología a Tau60 y Tau91, y ninguna de ellas se predice que contenga repeticiones WD40. Por ejemplo,

la proteína hipotética Tb927.11.10550, que copurificó con TbTau95 con un alto número de péptidos y cobertura (Tabla 5), muestra solo una débil homología con algunas proteínas de unión a ácidos nucleicos, pero no con Tau60 o Tau91. Se observó una situación similar con Tb927.8.770, anotada como una proteína putativa que contiene un motivo de interacción con SUMO. Dado que estas proteínas no muestran similitud con las subunidades de TFIIIC ni con ningún otro factor de transcripción conocido, podrían representar reguladores específicos de la transcripción en tripanosomátidos. Por lo tanto, nuestros datos sugieren fuertemente que los ortólogos de Tau60 y Tau91 están ausentes en tripanosomatidos. Cabe mencionar que en nuestros experimentos tampoco se identificó un ortólogo de TFIIIA, caracterizado por la presencia de múltiples dedos de zinc.

Varias otras proteínas relacionadas con la transcripción de RNA Pol III fueron identificadas mediante los análisis de espectrometría de masas con uno o ambos parásitos. Estas incluyen subunidades de RNA Pol III, subunidades de TFIIIB (Brf1 y TBP), y el represor transcripcional Maf1 (aunque con una baja cobertura, por lo que no se muestran en las Tablas 5 y 6). De manera interesante, se identificaron algunas proteínas relacionadas con la transcripción por RNA Pol II, que podrían interactuar con TbTau95 y LmTau95 (Tablas 5 y 6). De manera similar, anteriormente se reportó que proteínas que regulan la transcripción por las tres RNA Pol copurificaron con la subunidad Brf1 de TFIIIB en *L. major* (Florencio-Martínez et al. 2021). Es importante destacar que ensayos de inmunoprecipitación llevaron a la identificación de modificadores de la cromatina y reguladores de la transcripción por RNA Pol II y I como posibles proteínas de interacción con Tau91 en la levadura (Bhalla et al. 2019b). Por lo tanto, es posible que TFIIIC y TFIIIB participen en interacciones con las maquinarias de transcripción de las tres RNA Pol nucleares para regular la transcripción global.

En cuanto a la transcripción de genes codificadores de proteínas, se identificó una subunidad del complejo PAF1 (Tabla 6). Este complejo está implicado en el control

de la expresión génica de RNA Pol II y RNA Pol I en múltiples etapas, incluyendo la elongación y terminación de la transcripción, el procesamiento del RNA y su exportación (Francette et al. 2021). Notablemente, recientemente se demostró que el complejo PAF1 de levadura también interactúa con complejos de transcripción de RNA Pol III para reprimir la expresión de genes de tRNA (Bhalla et al. 2019a). En *T. brucei*, la subunidad CTR9 del complejo PAF1 es una proteína esencial cuya reducción provoca defectos en la expresión génica (Ouna et al. 2012).

Con ambos parásitos también identificamos helicasas de DNA RuvB-*like*, que forman parte de complejos multiproteicos grandes, como NuA4 e INO80, que participan en la remodelación de la cromatina y la transcripción (Ohdate et al. 2003). Además, se copurificó con TbTau95 la *retrotransposon hot spot protein* 5. Es interesante destacar que estas proteínas son factores específicos de tripanosomas que interactúan con RNA Pol II (Das et al. 2006), y su disminución afecta la síntesis de mRNA (Florini et al. 2019). Previamente, se encontró la interacción de TFIIIC con proteínas que regulan la transcripción de RNA Pol II, como N-MYC y Aurora-A, en líneas celulares de neuroblastoma, donde TFIIIC es necesario para la liberación del promotor dependiente de N-MYC y la liberación de la pausa de RNA Pol II (Büchel et al. 2017).

Además de su papel como factor de transcripción general, en algunos organismos TFIIIC está involucrado en la organización de dominios de cromatina al unirse a miles de secuencias conocidas como sitios extra de TFIIIC, que son independientes de la transcripción de RNA Pol III (Donze 2012). Estos sitios adicionales de TFIIIC suelen localizarse en los límites de dominios topológicos, donde TFIIIC interactúa con complejos de cohesina y condensina (Van Bortle et al. 2014; Yuen et al. 2017). Es interesante destacar que entre las proteínas que copurificaron con TbTau95-PTP, (aunque con una cobertura de menos del 20%, por lo que no se muestran en las Tablas 5 y 6) encontramos las subunidades SMC1 (Tb927.9.11850, cobertura promedio del 10%) y SMC3 (Tb927.5.3510, cobertura del 5%) del complejo de cohesina, así como un posible ortólogo de la proteína asociada a cohesina Pds5

(probabilidad HHpred del 100%, valor E 2.9×10^{-102}) (Tb927.11.6420, cobertura del 4.5%). Además, identificamos la subunidad SMC2 (Tb927.10.10340, cobertura del 4%) del complejo de condensina. Por lo tanto, es posible que TFIIIC participe en la organización tridimensional de los cromosomas en *T. brucei*, como se ha informado en otras especies. Futuros estudios de ChIP-seq con TbTau95 ayudarán a establecer si los sitios adicionales de TFIIIC están presentes en el genoma de *T. brucei*. Cabe destacar que no se copurificaron subunidades de cohesina ni de condensina con LmTau95.

También se encontraron factores involucrados en la replicación del DNA (Tablas 5 y 6), lo que sugiere que la transcripción y la replicación del DNA están acopladas en los parásitos tripanosomátidos, como se describe en otros organismos (Chen et al. 2019). En nuestros experimentos, actina copurificó con TbTau95 y LmTau95. Aunque es una proteína abundante que se considera una contaminante común en ensayos de purificación por afinidad, se ha demostrado que la actina se asocia de manera estable con RNA Pol III y es necesaria para la transcripción del U6 snRNA humano en un sistema de transcripción *in vitro* (Hu et al. 2004). Por lo tanto, no podemos descartar la posibilidad de que actina interactúe con Tau95 en tripanosomátidos para regular la transcripción de RNA Pol III.

7. CONCLUSIONES

En este trabajo demostramos que el complejo TFIIIC está presente en los parásitos tripanosomatidos *T. brucei* y *L. major.* Las purificaciones por afinidad en tándem utilizando TbTau95-PTP y LmTau95-PTP como señuelos permitieron la identificación de las subunidades Tau55 y Tau131, que junto con Tau95 constituyen el subcomplejo τ A de TFIIIC. Tau138 fue la única subunidad del subcomplejo τ B que identificamos. Aunque no podemos descartar la presencia de nuevas subunidades de TFIIIC en tripanosomátidos, nuestros datos sugieren fuertemente que sólo cuatro subunidades integran TFIIIC en *T. brucei* y *L. major.* Varios otros factores copurificaron con estas proteínas, incluyendo varias subunidades y

reguladores de la transcripción de las RNA Pol III y II. Por lo tanto, es factible que TFIIIC esté involucrado en el control y la coordinación de la transcripción global en los tripanosomátidos. Además, la asociación de TbTau95 con subunidades de cohesina y condensina respalda el papel de TFIIIC en la organización de dominios de cromatina en los tripanosomátidos, como se ha reportado en otros organismos.

8. APÉNDICES

Sp	S-IDLTPVQRKHVDMPPPPVZSQTSLPMSYNFLQNPLVGRVRLPN-GKN-GK	179
Sc	LLYKYKANPFAKKKKN-GVTEVKGTYIPSTDFQLPPPPKISMVGFPLLYKYKANPFAKKKKN-GVTEVKGTYIPSTDFQLPPPPKI	265
Tb	WRSLDFDADLESRLEGTADGNRSKLTTTANEEGEAERERIRRESFPSITPQLLIQGFFRNDLLVEVKRTRRVKRLRNVETGRV-VKETYVDGGTDHKQTGVTV	246
Hs	VDYFYRPETQHREGYNN-PPISGEN-L-I-GLSRARRPHQELPLYIPPPIFSRLDAPVDYFYRPETQHREGYNN-PPISGEN-L-I-GLSRARRP	213
Mm	VDYFYRPETQHREGYHN-PTISGEN-L-I-GLSRARRPHQELPLYIPPPIFSRLDTPVDYFYRPETQHREGYHN-PTISGEN-L-I-GLSRARRP	213
Rn	VDYFYRPETQHREGYHN-PSISGEN-L-I-GLSRARRPHQELPLYIPPPIFSRLDTPVDYFYRPETQHREGYHN-PSISGEN-L-I-GLSRARRP	213
At	K-NDLMDMADEDVMMLLPQFSPKDRPDNLVLRLPVTSSPKKKDE-ELTQNLYE	211
Os	TKIALLPSSNALSKSMQR-GVVQHBHLCNDNEDVMMLVPPL	204
Ce	STKILGRETDHTEKTKN-AQKKGYG-Q-NLRVERKSVATPLFLPPYQESRYLTPSTKILGRETDHTEKTKN-AQKKGYG-Q-NLRVERKSVATPLFLPPYQESRYLTPSTKILGRETDHTEKTKN-AQKKGYG-Q-NLRVERK	206
Pf	YRNISMNSSKNIMNNKPTELNANTGLPEFPPYEQESSFPYHNEEVELLYKQLLDKKIFKDDDLSYDNNNNNN-NNNMDRERSYSSDESE	279
Τg	Streppersection and the second	292
Nf	YSNELSDATSTVLPSRASLQNPHTGKGTKTHKAMLDLPPPI P SRFDMPMDYAFKQNPLTEIVPIVSNDGTSKKYKRL-L-KPSK-QYMTHKAMLDLPPPIP	366

Sp	TTIVNLKGQCRVV	191
Sc	YQLFVHDLSDKTVIPKTVIP	282
Тb	LGVVSREVDIVKPADFCFSPFTSENIESFPELCSGNIFPPGIFPPG	292
Hs	HNAHNA	216
Mm	HNAHNA	216
Rn		216
At	ETIMFFLKPVVAELMILVKTRN	233
Os		205
Ce	ALS	209
Pf	AYEL-HCSIHSKCINPYDYKSYESHITNKYIREYKHIISKFSPPIN-SKEEIKQGDLEFFLKRLIHTTSNDLMSNVSINTTNDMNNKNDHVGNINKYNHNYDYNHIIPNVNNS	390
Tg	PAEL-ASTTSSLCYSSSGSASACDASLFSASKTAGDREAEEADGETLAAGRKDNVNRVSVRLEPGTGAS	360
Nf	PHCPHC	369

Sp	PTCRHSKLGEPSKTIQEVIEALKPLFEKR	232
Sc	TKVYPGTKSDSKFYESLEECLKILRELFARR	329
Tb	KSPFEVALVYDSHSGKRDMDRLDNTATSFNCDEAPLWEFEGVPTLTMAAGDPNIPPPPSQAQMDILRRLNEGFDEQGCIEVRAVKALLEER	383
Hs	IFVNFEDEEVPKQPLEAAAQTWRRVCTNPVDRKVEEELRKLFDIR	261
Mm	IFVNFEDTEVPEQPLEAAVQTWKKACTNPIDQKVEEELRKLFDIR	261
Rn	IFVNFEDTEVPEQPLEAAVQTWKKACTNPIDQKVEEELRKLFDIR	261
At	PKILKPKILKTSNQWKWQVAVSALFEER	281
Os	LFYCCPVKFAFFPMFPM	237
Ce	VTVN-AKEEFPLEPSQEAVDEAMFRCKHDEPHRLLRELFDER	250
Pf	NEDHNQMDPITIDELYNEENNLMLNKKSKNEDINNYSNKIIVTKKPVHCNPIAKYDDEHLPINPFESALKKYVSDELYNRVKLLFEIR	478
Τg	ETDGDAPVSGDGSRDEQK-APQEETGDAERLRARARSEEEKKVGEEFNAVARFGDAEFPSLPPPAAMKASADERLLSRLRHLLAEQ	445
Nf	VEINFEDE-VPTAPPDEIVTAKDKDLYKDVENRVRYLFGYPSDDQEGVAQLGSSHSLIDKSRLIR	433

Sp	PVMTRRALLNHLDPSYTHYLKFALPYLSYLWTSGEFRDTYTRFGYDERKDSNAAAYGALFFKLKLNGKHKGTKTHSYTHYLKFALPYLSYLWTSGEFRDTYTRFGYDERKDSNAAAYGALFFKLKLNGKHKGTKTH	307
Sc	PINVKRHLDGIVPKKIHHTMKIALALISYRFTMGEWRNTYIKFGIDERSSVEYAQYGTEYFKIERKLLSSPIVKKNVPKPPPPPP	409
Tb	PVWVTKDLIDAIFETGVCPRTHINKKAVACLTYIIKNGERNRMRIRMGENEVANPSSACLERIAVKICRRSELGTCLR-DISRVPYINEVLQEILDSKS	481
Hs	PINSRNAVKANISVHPDKLKVLLPFIAYYMITCEWRSLWIRFCYDERKNPDAKIYCVLDFRIRCGMKHGYAPSDLPVKA-K-RSTYNY-SLPITVKKT	356
Mm	PVWSRNAVKSNVSVHPDKLKILLPYMAYYMITCEWRSLWIRFCYDERKHPDAKIYCVLDFRIRCGMKYGYGSRDMPVKA-K-RSTYNY-SLPITVKKT	356
Rn	PINSRNAVKSNVSVHPDKLKILLPYMAYYMITGEWRSLWIRFGYDERKHPDAKIYGVLDFRIRCGMKYGYGSRDMPVKA-K-RSTYNY-SLPITVKKT	356
At	PVWTRDSIVQRLLDKGLTCTHHMLNRFLLRAAYYFSGEFLRFWIKRGYDERKDPESRVFERVPPELKGYCDSNATNKSKKKKK	365
Os	-AMFLSHVTHESMMHGHD-RYIDEAQLLFRAGYYFSTGEFGKFWIRRGYDERKDPDSRMFGRIDFRMPPELRNLPRKERRRRPPPPP	316
Ce	PMATRMGLLYRTRIDDSLLRSILQKYAFYILSGEWGRLWCKFGYDERTDRNGGLYGTIMVSFRQHGSIPERQRLKVSSSS	327
Pf	PINCKDVLLEHVE-NISTYCLKSCFSKICFYFADEFWRRTYCKYGYDERKDPTSYIYETIDFRYNLSREIKSKDIEEINKCISKKKLYIDTTITNLLKKRKKNKVSNIMVQHHNKNN	594
Τg	PLALRSSLDLHLPAEFTAWRKKPAYAKTCTLFADErWRGCLCRLGYDERLHPESRFSETLDFRDAFFRNVNWRRLRNRKRPGTLPSLFPAPGTLPSLFPAP	536
Nf	PINSKNAISSKFESRKDKWKLRMVLPRVAYHYKNGEWRMLWVRYGYDEKKDIAASYYGLLDFRVPHELRPKIHSLTGKRKEDE-RETNKFRRLPRR-K	529

Sp	VFDGKTLFPTN	318
Sc	PPLVFESDTP-GGIDSRFKFDGKRI	433
Tb	KRPSSLPYRPRGTLFERLARAIGLQLY	521
Hs	REPASSKYKLKDSVYIFREGALPPYRQ	405
Mm	RKLTYNKYKLKDSVYIFREGALPPYRQ	405
Rn	RKLTYNKYKLKDSVPSQPVTMHD-LKQGLFREGALPPYRQ	405
At	PSWDDICAFKVFPFKCQ	382
Os	EKWTEMCKLEVMPSKSF	333
Ce	QTINHTADVSEPVTYMYEPGKLPRIRQ	358
Pf	PDNLMNDNFKKREYEINYDKRNNIINSHYNVQNIINDGNNIMYGETPNSSNDFNSYLINKESHNYNIYQNEIYDKEENIFFHKDEEINEILQFLKKSNTISLMEHFRSEAHFSVTPLKLS	714
Tg	VPMPRNASYLEQHFLIAPTRPS	575
Nf	SSTAHHTEHE-ENASYEFNSIPTQIQ	589

Sp	RVYQVCDIVDPTIAPLIKDTQLRSECHRDTGWYRSGRYYKVRDLMREKLFALIEGEMPSEVAVNMILNAEEV-EESDRYSN	398
Sc	PWYLMLQIDLLIGEPNIAEVFHNVYNKYKLEYLDKANELTGWFKELDLVKIRRIVKYELGCMVQGNYEYNKYKL	501
Tb	VALQLIDVSDDAFLQELLSTVSADAEIPLEDRTWRCGWIGSGCYQRAINHIISTFTTFIREEVEPVL-QRRRSGQENI	QV 600
Hs	MFYQLCDLNVEELQKIIRPALFSSSAKADGGKEQI	JTY 482
Mm	MFYQLCDINVEEIQKIVRPALFSNTGKADRGKEQI	.MF 482
Rn	MFYQLCDINVEEIQKIVRPALFSNTGKADHGKEQI	.MF 482
At	TFLQLFELDDEYIQQEIRKPEDVFKSIQEEFERSEKTRIQKDAI	.QP 466
Os	IFLQLFELKDDFIQAEIRKPKNFLRNAYELIERSKKQEALCRS	QL 417
Ce	MWYCVMDVRLPQAMNELVAVVSAELEGI	.MN 424
Pf	TMYQFIDIYDNNVMNFLLNL	772
Τg	LLYQLREIQDEGVQKLIREAHATSPALAAPCKETGNFSAATMKTLRELLAMKSQRMREKGDVHATSHATS	637
Nf	VFYQLCDIRIAPAONIILADKDETIAITYGVISGVKSSEELDLREPVWNNTGECDPKYGWYNHHALEQIRYVMKKKVEEWIENGEENDPEILSDT	684

Sp	FDEQDNTDDDTVRGLNTSATDDRINDLMRNLMKRSQEH	453
Sc	NKDADGDINMDAGSQMSSNAIEEDKGIAAGDDFDDNGAITEEPDDAALENEEMDTDQNL	588
тb	GESAGERSPYASSTSSVSPESYGDDDNEDSLESVSPVDDLSQHPDDGVDDLSQHPDDG	647
Hs	ESGEDEEDEE-EEEEEEDFKPSDGSENEMETEILDYV	519
Mm	ESGEEEEEEEEEEEEEEEFKPSDGSENEMETEILDYV	520
Rn	ESGEEEEEEEEEEFKPSDGSENEMETEILDYV	515
At	SQRNHQETTKDMKKLDDEYEEACKNTNKEKDDDVNADDDSEDTTKDMKKLDDEYEEACKNTNKEKDDDVNADDDSED	508
Os	KENKGMPKAQGRWLPVCMDECRYLLVFFFFQRCL-TTCDLVVKSFSPEAS-DRHNGTEDQAGGNNSDSEDAEDDEEEDKESDGYESP	502
Ce	DTAPGEEEF	433
Pf		772
Τg		637
Nf	IEEIEPPESSRSTLDKSILNSSKGDEQEIHNNNKEQDVMSDTDEEDTDEEDTDEE	729

Sp	F	456
Sc	KVPASIDDDVDDVDADEEEQESFDVKTASFQDIINKIAFVDEVDL	649
Tb		647
Hs		519
Mm		520
Rn		515
At	ANDDDISISSHGYGDMENNSRTYLQGLFNRFPSSASALYGSANDDNDSDGEYPIYEQESNALDDDKEDDE	578
Os	PMADDVPDFTLDDPYTSGEGFSNGYLEEMLRNFPLHEDGQNKPGDAPNNTEASDGEFEIYEQPSDDEESSDDCCWQCTGSRCSPTTSRTTPGTSRGSSRERTRPFKTSIVFAHDRESSDDCCWQCTGSRCSPTTSRTTPGTSRGSSRTTPFKTSIVFAHDRESSDDCCWQCTGSRCSPTTSRTTPGTSRGSSRTTPFKTSIVFAHDRESSDDCCWQCTGSRCSPTTSRTTPGTSRGSSRTTPFKTSIVFAHDRESSDDCCWQCTGSRCSPTTSPTTSRTTPGTSRGSSRTTPFKTSPTTPGTSRTTPGTSRTTPGTSRTTPGTSRTTPGTSRTTPGTSRTTPGTSRTTPGTSRTTPGTSRTTPGTSRTTPGTSPTTSRTTPGTSRTTPGTSRTTPGTSPTTPGTSRTTPGTSRTTPGTSRTTPGTSRTTPGTSRTTPGTSRTTPGTSRTTPGTSRTTPGTSPTTSPTTSPTTSPTTSPTTPGTSRTTPGTSRTTPGTSRTTPGTSRTTPGTSRTTPGTSPTTSPTTTPGTSRTTPGTSRTTPGTSRTTPGTSRTTPGTSRTTPGTSPTTPGTSRTTPGTSRTTPGTSPTTPGTSPTTPGTSPTTPGTSPTTTPGTSPTTTPGTSPTTSPT	618
Ce		433
Pf		772
Tg		637
Nf	PIKDGADVFIESQ	742

Sp		456
Sc		649
тb		647
Hs		519
Mm		520
Rn		515
At		578
Os	${\tt GTSVLFKVLSAFAFRDISLTKIESRPHRHRPIQFVDGANVGTAKHFEYMFYIDFQASMAEVRAVGDTGVHLLPPRARQLPHGHDAMDDDRSTRLMLKFSRHKKET$	724
Ce		433
Pf		772
Tg		637
Nf		742

Apéndice 1. Alineamiento multiespecie de la secuencia proteica de diferentes ortólogos de Tau95. *Trypanosoma brucei* (Tb), *Schizosaccharomyces pombe* (Sp), *Saccharomyces cerevisiae* (Sc) y Homo sapiens (Hs), *Mus musculus* (Mm), *Rattus norvegicus* (Rn), *Arabidopsis thaliana* (At), *Oryza sativa* (Os), *Caenorhabditis elegans* (Ce), *Plasmodium falciparum* (Pf), *Toxoplasma gondii* (Tg) y *Naegleria fowleri* (Nf).

Τ.	brucei	558	GWIGS-(48) -ASSTSSVSPESYGDDDNEDSLESVSPVDDLSQHPDDG	647
L.	major	609	GWLSE-(46) - ESSTSSLRDEELEDDEDEDDSAMFSVSAGDLSEAADDDDE	700
5.	pombe	349	GWYRS-(82) -EHEGFEDLEEIDDDYDDIFGD	456
s.	cerevisiae	468	GWFKE-(122)-DDDVDDVDADEEEQE -(40)-	649
Н.	sapiens	437	GWCLP-(41) -ESGEDEEDEEEEEEEDFKPSDGSENEMETEILDYV	519

Apéndice 2. Alineamiento de la secuencia de los residuos de la cola acídica de Tau95 de *T. brucei, L. major, S. pombe, S. cerevisiae* and *H. sapiens*. Los residuos acídicos se muestran en rojo.

Tb927.11.1590

Anotada como proteína hipotética Ortólogo probable de Sfc7(Tau55) de *S. pombe*. Probabilidad: 82.97%. E-value: 1.8



Sobrelape

LmjF.27.0990

Anotada como proteína hipotética Ortólogo probable de Sfc7(Tau55) de *S. pombe*. Probabilidad: 84.25%. E-value: 1.5



Sobrelape

Tb927.1.3860

Anotada como proteína hipotética

Ortólogo probable de Tau131 de *S. cerevisiae*. Probabilidad: 100%. E-value: 3.7e-





ScTau131

TbTau131



Sobrelape

LmjF.12.0560

Anotada como proteína hipotética

Ortólogo probable de Tau131 de *S. cerevisiae*. Probabilidad: 100%. E-value: 1.3e-37







ScTau131

LmTau131



Sobrelape

Tb927.11.4520

Anotada como proteína hipotética Ortólogo probable de Tau138 de *S. cerevisiae*. Probabilidad: 78.91%. E-value: 13



LmjF.13.0270

Anotada como proteína hipotética Ortólogo probable de Tau138 de *S. cerevisiae*. Probabilidad: 30.23%. E-value: 240



Apéndice 3. Análisis de secuencia y estructura de los presuntos ortólogos de Tau55, Tau131 y Tau138 en *T. brucei* y *L. major*. Se utilizaron los programas HHpred (https://toolkit.tuebingen.mpg.de/tools/hhpred) y Swiss-Model (http://swissmodel.expasy.org/interactive) para analizar la secuencia y predecir la estructura tridimensional de las tres proteínas. Los dominios conservados se indican en las alineaciones de secuencia. En el caso de Tau131, la alineación mostrada corresponde a las primeras 10 repeticiones TPR (en la región N-terminal de la proteína); la región C-terminal no se presenta.

REFERENCIAS

- Acker, J., Conesa, C. y Lefebvre, O. 2013. Yeast RNA polymerase III transcription factors and effectors. Biochim Biophys Acta. 1829(3-4): 283-95.
- Aeby, E., Ullu, E., Yepiskoposyan, H., Schimanski, B., Roditi, I., Mühlemann, O. y Schneider, A. 2010. tRNA-Sec is transcribed by RNA polymerase II in *Trypanosoma brucei* but not in humans. Nucleic Acid Research. 38(17): 5833-5843.
- Agabian, N. 1990. Trans *splicing* of nuclear pre-mRNAs. Cell. 61 (7): 1157-1160.
- Alberts, B., Bray, D., Hopkin, K., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. y Walter, P. 2014. Essential Cell Biology. USA. Garland Science.
- Balaña-Fouce, R. y Reguera, R. M. 2007. RNA interference in *Trypanosoma brucei*: a high-throughput engine for functional genomics in trypanosomatids? Trends Parasitol. 23(8): 348-51.
- Bhalla, P., Shukla, A., Vernekar, D. V., Arimbasseri, A. G., Sandhu, K. S. y Bhargava, P. 2019a. Yeast PAF1 complex counters the pol III accumulation and replication stress on the tRNA genes. Sci Rep, 9(1), 12892.
- Bhalla, P., Vernekar, D. V., Gilquin, B., Couté, Y. y Bhargava, P. 2019b. Interactome of the yeast RNA polymerase III transcription machinery constitutes several chromatin modifiers and regulators of the genes transcribed by RNA polymerase II. Gene, 702, 205–214.
- Barelle, M. y Barelle, F. E. 2018. The *splicing* code. Biosystems. 164:39-48.
- 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., Arrowsmith, C., Atkin, R. J., Barron. A. J., Bringaud, F., Brooks, K., Carrington, M., Cherevach, I., Chillingworth, T. J., Churcher, C., Clark, L. N., Corton, C. H., Cronin, A., Davies, R. M., Doggett, J., Djikeng, A., Feldblyum, T., Field, M. C., Fraser, A., Goodhead, I., Hance, Z., Harper, D., Harris, B. R., Hauser, H., Hostetler, J., Ivens, A., Jagels, K., Johnson, D., Johnson, J., Jones, K., Kerhornou, A. X., Koo, H., Larke, N., Landfear, S., Larkin, C., Leech, V., Line, A., Lord, A., Macleod, A., Mooney, P. J., Moule, S., Martin, D. M., Morgan, G. W., Mungall, K., Norbertczak, H., Ormond, D., Pai, G., Peacock, C. S., Peterson, J., Quail, M. A., Rabbinowitsch, E., Rajandream, M. A., Reitter, C., Salzberg, S. L., Sanders, M., Schobel, S.,

Sharp, S., Simmonds, M., Simpson, A. J., Tallon, L., Turner, C. M., Tait, A., Tivey, A. R., Van Aken, S., Walker, D., Wanless, D., Wang, S., White, B., White, O., Whitehead, S., Woodward, J., Wortman, J., Adams, M. D., Embley, T. M., Gull, K., Ullu, E., Barry, J. D., Fairlamb, A. H., Opperdoes, F., Barrell, B. G., Donelson, J. E., Hall, N., Fraser, C. M., Melville, S. E. y El-Sayed, N. M. 2005. The genome of the African trypanosome Trypanosoma brucei. Science. 309(5733):416-422.

- Biebinger, S., Wirtz, L. E., Lorenz, P. y Clayton, C. Vectors for Inducible Expression of Toxic Gene Products in Bloodstream and Procyclic *Trypanosoma Brucei*. Mol Biochem Parasitol. 85(1):99-112.
- Billington, K., Halliday, C., Madden, R., Dyer, P., Barker, A. R., Moreira-Leite, F. F., Carrington, M., Vaughan, S., Hertz-Fowler, C., Dean, S., Sunter, J. D., Wheeler, R. J. y Gull, K. 2023. Genome-wide subcellular protein map for the flagellate parasite Trypanosoma brucei. Nat Microbiol, 8(3), 533–547.
- Blumenthal, T. 1998. Gene clusters and polycistronic transcription in eukaryotes. BioEssays. 20 (6): 480-487.
- Boothroyd, J. C. y Cross, G. A. 1982. Transcripts coding for variant surface glycoproteins of *Trypanosoma brucei* have a short, identical exon at their 5' end. Gene. 20 (2): 281-289.
- Brandenburg, J., Schimanski, B., Nogoceke, E., Nguyen, T. N., Padovan, J. C., Chait, B. T., Cross, G. A. M. y Günzl, A. 2007. Multifunctional class I transcription in *Trypanosoma brucei* depends on a novel protein complex. EMBO J: 26(23): 4856-66.
- Brun, R., Blum, J., Chappuis, F., & Burri, C. (2009). Human African trypanosomiasis. Lancet, 375(9709), 148–159.
- Büscher, P., Cecchi, G., Jamonneau, V. y Priotto, G. 2017. Human African trypanosomiasis. Lancet. 390: 2397–409.
- Carruthers, V. B. y Cross, G. A. High-efficiency Clonal Growth of Bloodstream- And Insect-Form *Trypanosoma Brucei* on Agarose Plates. Proc Natl Acad Sci USA. 89(18):8818-21.
- Chen, Y. H., Keegan, S., Kahli, M., Tonzi, P., Fenyö, D., Huang, T. T. y Smith, D. J. 2019. Transcription shapes DNA replication initiation and termination in human cells. Nat Struct Mol Biol, 26(1), 67–77.
- Clayton, C. E., Fueri, J. P., Itzhaki, J. E., Bellofato, V., Sherman, D. R., Wisdom, G. S., Vijayasarathy, S. y Mowatt, M. R. 1990. Transcription of the Procyclic Acidic Repetitive Protein Genes of *Trypanosoma brucei*. Mol Cell Biol. 10(6): 3036-47.
- Clayton, C. E. 2016. Gene expression in Kinetoplastids. Curr Opin Microbiol. 32:46-51.

- Clayton, C. y Shapira, M. 2007. Post-transcriptional regulation of gene expression in trypanosomes and leishmanias. Mol Biochem Parasitol. 156(2):93-101.
- Clayton, C. 2019. Regulation of gene expression in trypanosomatids: living with polycistronic transcription. Open Biol. 9(6):190072.
- Das, A., Li, H. y Liu, T., Bellofatto, V. 2006. Biochemical characterization of Trypanosoma brucei RNA polymerase II. Mol Biochem Parasitol, 150(2), 201–210.
- Dieci, G., Fiorino, G., Castelnuovo, M., Teichmann, M. y Pagano, A. 2007. The expanding RNA polymerase III transcriptome. Trends in Genetics. 23 (12): 614-622.
- Dieci G., Bosio M. C., Fermi B. y Ferrari R. (2013) Transcription reinitiation by RNA polymerase III. Biochim Biophys Acta. 1829(3-4):331–341.
- Dergai, O. y Hernandez, N. 2019. How to Recruit the Correct RNA Polymerase? Lessons from snRNA Genes. Trends Genet. 35(6): 457-469.
- Djikeng, A., Shi, H., Tschudi, C. y Ullu, E. 2001. RNA interference in *Trypanosoma brucei*: cloning of small interfering RNAs provides evidence for retroposon-derived 24-26-nucleotide RNAs. RNA. 7(11): 1522-30.
- Donze, D. 2012. Extra-transcriptional functions of RNA polymerase III complexes: TFIIIC as a potential global chromatin bookmark. Gene, 493(2), 169–175.
- Dumay-Odelot, H., Marck, C., Durrieu-Gaillard, S., Lefebvre, O., Jourdain, S., Prochazkova, M., Pflieger, A. y Teichmann, M. 2007. Identification, molecular cloning, and characterization of the sixth subunidad of human transcription factor TFIIIC. J Biol Chem, 282(23), 17179–17189.
- Durand-Dubief, M. y Bastin, P. 2003. TbAGO1, an Argonaute protein required for RNA interference, is involved in mitosis and chromosome segregation in *Trypanosoma brucei*. BMC Biol. 1:2.
- El-Sayed, N. M., Myler, P. J., Blandin, G., Berriman, M., Crabtree, J., Aggarwal, G., Caler, E., Renauld, H., Worthey, E. A., Hertz-Fowler, C., Ghedin, E., Peacock, C., Bartholomeu, D. C., Haas, B. J., Tran, A. N., Wortman, J. R., Alsmark, U. C., Angiuoli, S., Anupama, A., Badger, J., Bringaud, F., Cadag, E., Carlton, J. M., Cerqueira, G. C., Creasy, T., Delcher, A. L., Djikeng, A., Embley, T. M., Hauser, C., Ivens, A. C., Kummerfeld, S. K., Pereira-Leal, J. B., Nilsson, D., Peterson, J., Salzberg, S. L., Shallom, J., Silva, J. C., Sundaram, J., Westenberger, S., White, O., Melville, S. E., Donelson, J. E., Andersson, B., Stuart, K. D. y Hall, N. 2005. Comparative genomics of trypanosomatid parasitic protozoa. Science. 309(5733):404-409.
- Ersfeld, K. 2011. Nuclear architecture, genome and chromatin organisation in Trypanosoma brucei. Research in microbiology. 162: 626-636.

- Fantoni, A., Dare, A. O. y Tshudi, C. 1994. RNA Polymerase III-Mediated Transcription of the Trypanosome U2 Small Nuclear RNA Genels Controlled by both Intragenic and Extragenic Regulatory Elements. Mol Cell Biol. 14(3): 2021-2018.
- Fernandes, P. M., Kinkead, J., McNae, L. W., Vásquez-Valdivieso, M., Wear, M. A., Michels, P. A. M. y Walkinshaw, M. D. 2019. Kinetic and structural studies of *Trypanosoma* and *Leishmania* phosphofructokinases show evolutionary divergence and identify AMP as a switch regulating glycolysis versus gluconeogenesis. FEBS J. 287(13):2847-2861.
- Fernández-Tornero, C. 2018. RNA polymerase I activation and hibernation: unique mechanisms for unique genes. Transcription. 9(4):248-254.
- Figueroa-Angulo, E. E., Vélez-Ramísez, D. E., Romero-Meza, G. y Martínez-Calvillo, S. 2012. Trypanosoma brucei: Mecanismos atípicos de expresión génica y variación antígena. En M. E. Alvarez-Sánchez, y E. Azuara, Genómica de parásitos, aspectos moleculares, genómicos, proteómicos y de virulencia (pp. 80 – 113). Editorial Académica Española.
- 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 subunidad Brf1 in transcription regulation in the human pathogen *Leishmania major*. Genes. 12(2): 280.
- Fredericks, A. M., Cygan, K. J., Brown. B. A. y Fairbrother, W. G. 2015. RNA-Binding Proteins: *Splicing* Factors and Disease. Biomolecules. 5(2):893-909.
- Graczyk, D., Cieśla, M. y Boguta, M. 2018. Regulation of tRNA synthesis by the general transcription factors of RNA polymerase III - TFIIIB and TFIIIC, and by the MAF1 protein. Biochim Biophys Acta Gene Regul Mech. 1861(4): 320-329.
- Grummt, I. 2016. Life on a planet of its own: regulation of RNA polymerase I transcription in the nucleolus. Genes & Development. 17 (14): 1691-1702.
- Gualdrón-López, M., Brennand, A., Hannaert, V., Quiñones, W., Cáceres, A. J., Bringaud, F., Concepción, J. L. y Michels, P. A. M. 2012. When, how and why glycolysis became compartmentalised in the Kinetoplastea. A new look at an ancient organelle. Int J Parasitol. 42(1):1-20.
- Günzl, A., Bruderer, T., Laufer, G., Schimanski, B., Tu, L. C., Chung, H. M., Lee, P. T. y Lee, M. G. S. 2003. RNA Polymerase I Transcribes Procyclin Genes and Variant Surface Glycoprotein Gene Expression Sites in Trypanosoma brucei. Eukaryot cell. 2 (3): 542-51.
- Hailu, A., Argaw, D. D. y Boelaert, M. 2016. Leishmaniasis. En Neglected tropical diseases Sub-Saharan Africa (pp. 87 112). Editorial Springer.

- Hamilton, P. B., Teixeira, M. M. G. y Stevens, J. R. 2012. The evolution of *Trypanosoma cruzi*: the 'bat seeding' hypothesis. Trends Parasitol. 28(4):136-41.
- Handman, E. 2000. Cell biology of *Leishmania*. Advances in parasitology. 44: 1-39.
- Hasan, G., Turner, M. J. y Cordingley, J. S. 1984. Ribosomal RNA genes of *Trypanosoma brucei*: Mapping the regions specifying the six small ribosomal RNAs. Gene. 27(1): 75-86.
- Hernández, R. y Cevallos, A. M. 2014. Robosomal RNA gene transcription in trypanosomes. Parasitol Res. 113(7):2415-24
- Hoffmann, N. A., Jakobi, A. J., Moreno-Morcillo, M., Glatt, S., Kosinski, J., Hagen, W. J., Sachse, C. y Müller, C. W. 2015. Molecular structures of unbound and transcribing RNA polymerase III. Nature. 528(7581):231-236.
- Hoffmann, N. A., Sadian, Y., Tafur, L., Kosinski, J. y Müller, C. W. 2016. Specialization versus conservation: How Pol I and Pol III use the conserved architecture of the pre- initiation complex for specialized transcription. Transcription. 7(4): 127-132.
- Hu, P., Wu, S. y Hernandez, N. 2004. A role for beta-actin in RNA polymerase III transcription. Genes Dev. 18(24): 3010–3015.
- Jourdain, S., Acker, J., Ducrot, C., Sentenac, A. y Lefebvre O. 2003. The tau95 subunidad of yeast TFIIIC influences upstream and downstream functions of TFIIIC.DNA complexes. J Biol Chem. 278(12): 19450-7.
- Kassavetis, G. A. y Geiduschek, E. P. 2006. Transcription factor TFIIIB and transcription by RNA polymerase III. Biochemical Society Transactions. 34 (6): 1082-1087.
- Kennedy, P. G. E. 2013. Clinical features, diagnosis, and treatment of human African trypanosomiasis (sleeping sickness). Lancet Neurol. 12(2): 186-194.
- Kennedy, P. G. E. y Rodgers, J. 2019. Clinical and neuropathogenic aspects of human african tripanosomiasis. Fron Immunol. 10:39.
- Kolev, N. G., Tshudi, C. y Ullu, E. 2011. RNA Interference in Protozoan Parasites: Achievements and Challenges. Eucaryot cel. 10(9): 1156-1163.
- Kooter, J. M. y Borst, P. 1984. Alpha-amanitin-insensitive Transcription of Variant Surface Glycoprotein Genes Provides Further Evidence for Discontinuous Transcription in Trypanosomes. Nucleic Acids Res. 12(24): 9457-72.
- Kwapisz, M., Beckouët F. y Thuriaux P. 2008. Early evolution of eukaryotic DNA-dependent RNA polymerases. Trends in Genetics. 24 (5): 211-215.
- Langousis, G. y Hill, K. L. 2014. Motility and more: the flagellum of *Trypanosoma brucei.* Nat Rev Microbiol. 12(7): 505-518.

- Liang, X., Haritan, A., Uliel, S. y Michaeli, S. 2003. Trans and cis *splicing* in Trypanosomatids: Mechanism, Factors, and Regulation. Eukaryotic cell. 2 (5): 830-840.
- Lindner, A. K., Lejon, V., Chappuis, F., Seixas, J., Kazumba, L., Barrett, M. P., Mwamba, E., Erphas, O., Akl, E. A., Villanueva, G., Bergman, H., Simarro, P., Kadima Ebeja, A., Priotto, G. y Franco, JR. 2019. New WHO guidelines for treatment of gambiense human African trypanosomiasis including fexinidazole: substantial changes for clinical practice. Lancet Infect Dis. 20(2): e38-e46.
- Lee, J. H., Nguyrn, T. N., Schimanski, B. y Günzl, A. 2007. Spliced Leader RNA Gene Transcription in *Trypanosoma brucei* Requires Transcription Factor TFIIH. Eukaryot cell. 6(4): 641-9.
- Lee, J. H., Cai, G., Panigrahi, A. K., Dunham-Ems, S., Nguyen, T. N., Radolf, J. D., Asturias, F. J. y Günzl, A. 2010. A TFIIH-Associated Mediator Head Is a Basal Factor of Small Nuclear Spliced Leader RNA Gene Transcription in Early-Diverged Trypanosomes. Mol Cell Biol. 30(23):5502-13.
- Lejon, V., Bentivoglio, M. y Franco, J. R. 2013. Human African trypanosomiasis. En Handbook of Clinical Neurology. Neuroparasitology and Tropical Neurology. 114.
- Lodish, H., Berk, A., Kaiser, C., Krieger, M., Bretscher, A., Ploegh, H., Amon, A. y Martin, K. 2004. Molecular Cell Biology. New York: W.H. Freeman and Company.
- Male, G., von Appen, A., Glatt, S., Taylor, N. M., 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. Nat Commun. 6:7387.
- Maree, J. P. y Patterton, H. G. The epigenome of *Trypanosoma brucei:* a regulatory interface to an unconventional transcriptional machine. Biochim Biophys Acta. 1839(9): 743-50.
- Martínez-Calvillo, S., Vizuet-de-Rueda, J. C., Florencio-Martínez, L. E., Manning-Cela, R. G. y Figueroa-Angulo, E. E. 2010. Gene expression in Trypanosomatid parasites. Journal of Biomedicine and Biotechnology. 2010: 1-15.
- Martínez-Calvillo, S., Florencio-Martínez, L. E., Rojas-Sánchez, S., Moreno-Campos, R., Vizuet-de-Rueda, J., Padilla-Mejía, N. E., Román-Carraro, F. C., Flores-Pérez, C., Manning-Cela, R. G. y Figueroa-Angulo, E. E. 2012. Estructura genómica y regulación de la expresión genética en Leishmania major y Trypanosoma cruzi. En M. E. Alvarez-Sánchez, y E. Azuara, Genómica de parásitos, aspectos moleculares, genómicos, proteómicos y de virulencia (pp. 47 79). Editorial Académica Española.

- Martínez-Calvillo, S., Romero-Meza, G., Vizuet de Rueda, J. C., Florencio-Martínez, L. E., Manning-Cela, R. y Nepomuceno-Mejía, T. 2018. Epigenetic Regulation of Transcription in Trypanosomatid Protozoa. Curr Genomics. 19(2):140-149.
- Martínez-Calvillo, S., Florencio-Martínez, L. E. y Nepomuceno-Mejía, T. 2019. Nucleolar Structure and Function in Trypanosomatid Protozoa. Cells. 8(5): 421.
- Matthews, K. R. (2005). The developmental cell biology of *Trypanosoma brucei*. Journal of Cell Science. 118(2): 283–290.
- Mellacheruvu, D., Wright, Z., Couzens, A. L., Lambert, J. P., St-Denis, N. A., Li, T., Miteva, Y. V., Hauri, S., Sardiu, M. E., Low, T. Y., Halim, V. A., Bagshaw, R. D., Hubner, N. C., Al-Hakim, A., Bouchard, A., Faubert, D., Fermin, D., Dunham, W. H., Goudreault, M., Lin, Z. Y., Badillo, B. G., Pawson, T., Durocher, D., Coulombe, B., Aebersold, R., Superti-Furga, G., Colinge, J., Heck, A. J., Choi, H., Gstaiger, M., Mohammed, S., Cristea, I. M., Bennett, K. L., Washburn, M. P., Raught, B., Ewing, R. M., Gingras, A. C., y Nesvizhskii, A. I. 2013. The CRAPome: A contaminant repository for affinity purificationmass spectrometry data. Nature Methods. 10(8): 730–736.
- Michaeli, S. 2011. Trans-*splicing* in trypanosomes: machinery and its impact on the parasite transcriptome. Future Microbiol. 6(4):459-74.
- Michaeli, S. 2015. The response of trypanosomes and other eukaryotes to ER stress and the spliced leader RNA silencing (SLS) pathway in Trypanosoma brucei. Crit Rev Biochem Mol Biol. 50(3):256-67.
- Moreno-Campos, R., Florencio-Martínez, L. E., Nepomuceno-Mejía, T., Rojas-Sánchez, S., Vélez-Ramírez, D. E., Padilla-Mejía, N. E., Figueroa-Angulo, E., Manning-Cela, R. y Martínez-Calvillo, S. 2016. Molecular characterization of 5S ribosomal RNA genes and transcripts in the protozoan parasite *Leishmania major*. Parasitology. 143(14): 1917-1929.
- Nabih, A., Sobotka, J. A., Wu, M. Z., Wedeles, C. J. y Claycomb, J. M. 2017. Examining the intersection between *splicing*, nuclear export and small RNA pathways. Biochim Biophys Acta Gen Subj. 1861(11 Pt B): 2948-2955.
- Nakaar, V., Dare, A. O., Hong, D., Ullu, E. y Tschudi, C. 1994. Upstream tRNA genes are essential for expression of small nuclear and cytoplasmic RNA genes in trypanosomes. Mol Cell Biol. 14(10): 6736–6742.
- Nakaar, V., Günzl, A., Ullu, E. y Tschudi, C. 1997. Structure of the *Trypanosoma brucei* U6 snRNA gene promoter. Mol Biochem Parasitol. 88(1-2): 13-23.
- Ngô, H., Tschudi, C., Gull, K. y Ullu, E.1998. Double-stranded RNA induces mRNA degradation in *Trypanosoma brucei*. Proc Matl Acad Sci. 95(25): 14687-14692.

- Nguyen, T., Nguyen, B. N., Lee, J. H., Panigrahi, A. K. y Günzl, A. 2012. Characterization of a Novel Class I Transcription Factor A (CITFA) Subunidad That Is Indispensable for Transcription by the Multifunctional RNA Polymerase I of *Trypanosoma brucei*. Eukaryot Cell. 11(12): 1573-81.
- Ohdate, H., Lim, C. R., Kokubo, T., Matsubara, K., Kimata, Y. y Kohno, K. 2003. Impairment of the DNA binding activity of the TATA-binding protein renders the transcriptional function of Rvb2p/Tih2p, the yeast RuvB-like protein, essential for cell growth. J Biol Chem. 278(17): 14647–14656
- Ooi, C. P. y Bastin, P. 2013. More than meets the eye: understanding Trypanosoma brucei morphology in the tsetse. Front Cell Infect Microbiol. 13; 3:71.
- Opperdoes, F. R. y Borst, P. 1977. Localization of nine glycolytic enzymes in a microboy-like organelle in Trypanosoma brucei: The glycosome. FEBS Letters. 80 (2): 360-364.
- Padilla-Mejía, N. E., Florencio-Martínez, L. E., Figueroa-Angulo, E. E., Manning-Cela, R. G., Hernández-Rivas, R., Myler, P. J. y Martínez-Calvillo, S. 2009. Gene organization and sequence analyses of transfer RNA genes in Trypanosomatid parasites. BMC Genomics. 10 (232).
- Padilla-Mejía, N. E., Gómez-Hurtado, C. M., Sánchez-Santamaría, I. I., Florencio-Martínez, L. E., Manning-Cela, R. G. y Martínez-Calvillo, S. 2013. Comparative genomics of *Leishmania* parasites. En C. López-Camarillo y L. A. Marchat, Comparative genomics in neglected human parasites (pp. 59-80). Nova Biomedical.
- Padilla-Mejía, N. E., Florencio-Martínez, L. E., Moreno-Campos, R., Vizuet de Rueda, J. C., Cevallos, A. M., Hernández-Rivas, R., Manning-Cela, R. y Martínez-Calvillo, S. 2015. The Selenocysteine tRNA Gene in *Leishmania major* Is Transcribed by both RNA Polymerase II and RNA Polymerase III. Eukaryotic Cell. 14(3): 216-227.
- Preußer, C., Jaé, N. y Bindereif, A. 2012. mRNA *splicing* in trypanosomes. Int J Med Microbiol. 302(4-5):221-224.
- Rambout, X., Dequiedt, F. y Maquat, L. E. Beyond Transcription: Roles of Transcription Factors in Pre- mRNA *Splicing*. 2018. Chem Rev. 118(8): 4339-4364.
- Reynolds, D., Cliffe, L., Förstner, K. U., Hon, C. C., Siegel, N. y Sabatini, R. 2014. Regulation of Transcription Termination by Glucosylated Hydroxymethyluracil, Base J, in *Leishmania Major* and *Trypanosoma Brucei*. Nucleic Acids Res. 42(15):9717-29.
- Roeder, R. G. 1996. The role of general initiation factors in transcription by RNA polymerase II. Trends in Biochemical Sciences. 21 (9): 327-335.

- Rojas, F., Silvester, E., Young, J., Milne, R., Tettey, M., Houston, D. R., Walkinshaw, M. D., Pérez-Pi, I., Auer, M., Denton, H., Smith, T.K., Thompson, J. y Matthews, K. R. 2019. Oligopeptide Signaling through TbGPR89 Drives Trypanosome Quorum Sensing. Cell. 176(1-2):306-317.
- Rojas-Sánchez, S., Figueroa-Angulo, E., Moreno-Campos, R., Florencio-Martínez, L. E., Manning-Cela, E. 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. G. y Martínez-Calvillo, S. 2019. TFIIIB Subunidad Bdp1 Participates in RNA Polymerase III Transcription in the Protozoan Parasite *Leishmania major*. Biomed Res Int. 2019:1425281.
- Romero-Meza, G., Velez-Ramírez, D. E., Florencio-Martínez, L. E., Román-Carraro, F. C., Manning-Cela, R., Hernández-Rivas, R. y Martínez-Calvillo, S. 2017. Maf1 is a negative regulator of transcription in *Trypanosoma brucei*. Molecular Microbiology. 103(3): 452-468.
- Ruan, J. P., Arhin, G. K., Ullu, E. y Tschudi, C. 2004. Functional Characterization of a Trypanosoma brucei TATA-Binding Protein-Related Factor Points to a Universal Regulator of Transcription in Trypanosomes. Mol Cell Biol. 24 (21): 9610-8.
- Sasidharan, S. y Saudagar, P. 2021. Leishmaniasis: where are we and where are we heading? Parasitol Res. 120(5):1541-1554.
- Schapira, M., Tyers, M., Torrent, M. y Arrowsmith, C. H. 2017. WD40 repeat domain proteins: a novel target class? Nat Rev Drug Discov. 16(11): 773– 786.
- Schier, A. C. y Taatjes, D. J. 2020. Structure and mechanism of the RNA polymerase II transcription machinery. 34(7-8):465-488.
- Schimanski, B., Nguyen, T. N., Günzl, A. 2005. Highly Efficient Tandem Affinity Purification of Trypanosome Protein Complexes Based on a Novel Epitope Combination. Eukaryotic Cell. 4(11):1942-50.
- Schneider, A. y Ochsenreiter, T. 2018. Failure is not an option mitochondrial genome segregation in trypanosomes. J of cell sci. 131(18).
- Schramm, L. y Hernandez, N. 2002. Recruitment of RNA Polymerase III to its target promoters. Genes and Development. 16 (20): 2593–2620.
- Shi, H., Djikeng, A., Tschudi, C. y Ullu, E. 2004. Argonaute Protein in the Early Divergent Eukaryote *Trypanosoma brucei*: Control of Small Interfering RNA Accumulation and Retroposon Transcript Abundance. Molecular and cellular biology. 24(1): 420–427.

- Shi, H., Tschudi, C. y Ullu, E. 2006. An unusual Dicer-like1 protein fuels the RNA interference pathway in *Trypanosoma brucei*. RNA. 12(12):2063-72.
- Siegel, T. N., Hekstra, D. R., Kemp, L. E., Figueiredo, L. M., Lowell, J. E., Fenyo, D., Wang, X., Dewell, S. y Cross, G. A. M. 2009. Four histone variants mark the boundaries of polycistronic transcription units in *Trypanosoma brucei*. Genes Dev. 23(9):1063-76.
- Simpson, A. G. B., Stevens, J. R. y Lukes, J. The evolution and diversity of kinetoplastid flagellates. 2006. Trends Parasitol. 22(4): 168-74.
- Sinclair, A. N. y Graffenried, C. L. 2019. More than microtubules: The structure and function of the subpellicular Array in Trypanosomatids. Trend Parasitol. 35(10):760-777.
- Solleis, L. y Marti, M. 2019. A major step towards defining the elusive stumpy inducing factor in Trypanosoma brucei. Trend Parasitol. 35(1):6-8.
- Soutourina, J. 2017. Transcription regulation by the Mediator complex. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 19(4), 262–274.
- Stevens, J. R., Noyes, H. A., Dover, G. A. y Gibson, W. C. 1999. The Ancient and Divergent Origins of the Human Pathogenic Trypanosomes, *Trypanosoma brucei* and *T. cruzi*. Parasitology. 118(pt 1): 107-16.
- Sunter, J. D. y Gull, K. 2016. The flagellum Attachment Zone: 'The cellular ruler' of Trypanosome morphology. Trends Parasitol. 32(4): 309-324.
- Talyzina, A., Han, Y., Banerjee, C., Fishbain, S., Reyes, A., Vafabakhsh, R. y He, Y. 2023. Structural basis of TFIIIC-dependent RNA polymerase III transcription initiation. Mol Cell. 83(15): 2641–2652.e7.
- Taylor, N. M., Baudin, F., von Scheven, G. y Müller, C. W. 2013a. RNA polymerase III-specific general transcription factor IIIC contains a heterodimer resembling TFIIF Rap30/Rap74. Nucleic Acids Res. 41(19): 9183-96.
- Taylor, N. M., Glatt, S., Hennrich, M. L., von Scheven, G., Grötsch, H., Fernández-Tornero, C., Rybin, V., Gavin, A. C., Kolb, P., y Müller, C. W. 2013b. Structural and functional characterization of a phosphatase domain within yeast general transcription factor IIIC. The Journal of Biological Chemistry. 288(21): 15110–15120.
- Turowski, T. W. y Tollerver. 2016. Transcription by RNA polymerase III: insights into mechanism and regulation. Biochem Soc Trans. 44(5): 1367-1375.
- Ullu, E., Djikeng, A., Shi, H. y Tschudi, C. 2002. RNA interference: advances and questions. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci. 357(1417): 65-70.
- Ullu, E., Tschudi, C. y Chakraborty, T. 2004. RNA interference in protozoan parasites. Cellular Microbiology. 6(6): 509-519.

- Van Bortle, K., Nichols, M. H., Li, L., Ong, C. T., Takenaka, N., Qin, Z. S. y Corces, V. G. 2014. Insulator function and topological domain border strength scale with architectural protein occupancy. Genome Biol. 15(6): R82.
- Vélez-Ramírez, D. E., Florencio-Martínez, L. E., Romero-Meza, G., Rojas-Sánchez, S., Moreno-Campos, Arroyo, R., Ortega-López, J., Manning-Cela, R., y Martínez-Calvillo, S. 2015. BRF1, a subunidad of RNA polymerase III transcription factor TFIIIB, is essential for cell growth of Trypanosoma brucei. Parasitology. 142 (13): 1563-1573.
- Verner Z., Basu S., Benz C., Dixit S., Dobáková E., Faktorová D., Hashimi H., Horáková E., Huang Z., Paris Z., Peña-Diaz P., Ridlon L., Týč J., Wildridge D., Zíková A. y Lukeš J. 2015. Malleable mitochondrion of *Trypanosoma brucei*. Int Rev Cell Mol Biol. 315:73-151.
- Vezzoli, M., de Llobet Cucalon, L. I., Di Vona, C., Morselli, M., Montanini, B., de la Luna, S., Teichmann, M., Dieci, G. y Ferrari, R. 2023. TFIIIC as a potential epigenetic modulator of histone acetylation in human stem cells. Int J Mol Sci. 24(4): 3624.
- Vo ngoc, L., Wang, Y. L., Kassavetis, G. A. y Kadonaga, J. T. 2017. The punctilious RNA polymerase II core promoter. Genes & Development. 31:1289-1301.
- Wen, Y. Z., Zheng, L. L., Liao, J. Y., Wang, M. H., Wei, Y., Guo, X. M., Qu, L. H., Ayala, F. J. y Lun, Z. R. 2011. Pseudogene-derived small interference RNAs regulate gene expression in African *Trypanosoma brucei*. Proc Natl Acad Sci USA. 108(20): 8345-50.
- World Health Organization. 2019. WHO interim guidelines for the treatment of gambiense human African trypanosomiasis. https://www.who.int/trypanosomiasis_african/resources/9789241550567/en/.
- Yuen, K. C., Slaughter, B. D. y Gerton, J. L. 2017. Condensin II is anchored by TFIIIC and H3K4me3 in the mammalian genome and supports the expression of active dense gene clusters. Sci Adv. 3(6) e1700191.