



**Centro de Investigación y de Estudios Avanzados  
del Instituto Politécnico Nacional**

UNIDAD ZACATENCO

Departamento de Biomedicina Molecular

**"Estudio y caracterización molecular del regulador negativo de la  
transcripción Maf1 en *Trypanosoma brucei*"**

Tesis que presenta

**M. en C. Gabriela Romero Meza**

para obtener el grado de

**Doctora en Ciencias**

en la especialidad de  
**Biomedicina Molecular**

Directores de tesis:

Dra. Rosaura Hernández Rivas

Dr. Santiago Martínez Calvillo

Ciudad de México

Agosto, 2016

## Resumen

La tripanosomiasis africana humana es una enfermedad crónica causada por la infección del parásito flagelado *Trypanosoma brucei*. Se conoce poco sobre la regulación de la expresión genética en *T. brucei*. Un candidato como regulador de la transcripción es Maf1, una proteína identificada en *Saccharomyces cerevisiae* como un represor de la transcripción de la RNA Polimerasa III (Pol III). Análisis *in silico* previos nos permitieron identificar dos genes de Maf1 en el genoma de *T. brucei* (TbMaf1), los cuales presentan un 95% de identidad. Mediante RT-PCR se verificó la expresión de los dos genes de TbMaf1 en formas procíclicas del parásito. Para analizar la función de TbMaf1 se generaron líneas *knock-down* por RNA de interferencia (RNAi) y mediante ensayos tipo *Northern blot* se confirmó la degradación del mRNA de TbMaf1 en ~70%. En el presente trabajo se determinó que TbMaf1 posee una probable estructura globular muy similar a la de Maf1 de humano. Se encontró que TbMaf1 es una proteína nuclear, y no principalmente citoplásmica como en otras especies. Para analizar los niveles de proteína en el cultivo *knock-down* de TbMaf1 generamos un anticuerpo policlonal, con el cual se determinó que la proteína TbMaf1 disminuyó un 80% después de la inducción del RNAi. Mediante experimentos de *run-on* en líneas celulares *knock-down*, demostramos que TbMaf1 no sólo regula negativamente la expresión de genes transcritos por Pol III, sino también la de algunos genes transcritos por Pol I y por Pol II. Estos resultados se corroboraron con líneas celulares de parásitos en donde se indujo la sobre-expresión de TbMaf1. Por medio de experimentos de inmunoprecipitación de la cromatina, comprobamos que TbMaf1 se une a regiones promotoras de las tres RNA polimerasas para reprimir su transcripción. Así, nuestros resultados demuestran que TbMaf1 es un regulador negativo de la transcripción global en formas procíclicas de *T. brucei*.

## Abstract

Human African Trypanosomiasis is a chronic disease caused by the infection of the parasite *Trypanosoma brucei*. Little is known about the regulation of gene expression in *T. brucei*. A strong candidate for a transcriptional regulator is Maf1, which was first identified as a RNA Polymerase III (Pol III) negative regulator in *Saccharomyces cerevisiae*. By *in silico* analysis, we previously identified two Maf1 genes in *T. brucei* (TbMaf1), which show 95% identity. By RT-PCR we confirmed the expression of both genes in procyclic forms of the parasite. To analyze the function of TbMaf1 we generated knock-down lines by RNA interference (RNAi). Northern blot assays showed that the TbMaf1 mRNA level was decreased by ~70% in the knock-down culture. In the present study we determined that, similarly to human Maf1, TbMaf1 is predicted to fold into a globular structure. While Maf1 is mainly located in the cytoplasm in other species, our data show that TbMaf1 is a nuclear protein. To analyze the TbMaf1 protein levels in the knock-down culture, we generated a polyclonal antibody against TbMaf1. As expected, the TbMaf1 protein decreased by 80% after RNAi induction. Nuclear run-on experiments with knock-down cell lines showed that TbMaf1 not only regulates Pol III transcription, but also controls the expression of some genes transcribed by Pol I and Pol II. These results were corroborated in parasite cell lines where the TbMaf1 overexpression was induced. Interestingly, chromatin immunoprecipitation experiments revealed that TbMaf1 binds to promoter regions of the three RNA polymerases to repress transcription. Thus, our results show that TbMaf1 is a negative regulator of global transcription in procyclic forms of *T. brucei*.

## Índice de figuras y tablas

- Figura 1** Distribución geográfica de la tripanosomiasis africana
- Figura 2** Parásito de *T. b. gambiense* en sangre de paciente infectado
- Figura 3** Arquitectura celular de las formas sanguíneas de *T. brucei*
- Figura 4** El cinetoplasto cambia de posición durante el ciclo de vida de *T. brucei*
- Figura 5** Ciclo de vida de *T. brucei*
- Figura 6** Representación esquemática de la estructura de los VSGs
- Figura 7** Microscopía electrónica del núcleo de *T. brucei*
- Figura 8** Representación esquemática de la RNA polimerasa III
- Figura 9** Regiones promotoras y factores de iniciación de la transcripción de genes transcritos por Pol III
- Figura 10** Estructura terciaria de Maf1
- Figura 11** Representación esquemática de la regulación de Maf1 en levadura
- Figura 12** Transcripción policistrónica y procesamiento de los mRNAs en *T. brucei*
- Figura 13** Diagrama representativo de los promotores identificados en *T. brucei* y otros tripanosomátidos
- Figura 14** Estructura secundaria de TbMaf1-4 y TbMaf18
- Figura 15** Predicción de la estructura tridimensional de TbMaf1 y HsMaf1
- Figura 16** Alineamiento de la secuencia de aminoácidos de TbMaf1-4 y TbMaf1-8
- Figura 17** Ubicación de los residuos con alta probabilidad de ser fosforilados en TbMaf1 en su estructura terciaria
- Figura 18** Clonación de Maf1-r en el vector pGEX4T-3
- Figura 19** Obtención de la proteína recombinante GST-TbMaf1
- Figura 20** Ensayo de *Western blot* con el anticuerpo anti-GST
- Figura 21** Ensayo de *Western blot* con el anticuerpo anti-TbMaf1
- Figura 22** Ensayo de *Western blot* del *knock-down* de TbMaf1
- Figura 23** Electroforesis de pDNA de fragmentos usados para ensayos de *run-on*
- Figura 24** Efecto del *knock-down* de Maf1 en la transcripción de las tres RNA polimerasas en *T. brucei*
- Figura 25** Clonación del fragmento Maf1-s
- Figura 26** Ensayo RT-PCR para verificar la sobre-expresión de TbMaf1
- Figura 27** Ensayo tipo *Western blot* de la sobre-expresión de TbMaf1

- Figura 28** Patrón de crecimiento de células de *T. brucei* que sobre-expresan a TbMaf1
- Figura 29** Efecto de la sobre-expresión de TbMaf1 en la transcripción de las tres RNA polimerasas en *T. brucei*
- Figura 30** Representación esquemática de la bandera PTP a escala
- Figura 31** Clonación del fragmento Maf1-C
- Figura 32** Comprobación de la integración del vector pC-TbMaf1 en parásitos de *T. brucei*
- Figura 33** Ensayo tipo *Southern blot* de parásitos TbMaf1-PTP
- Figura 34** Ensayo tipo *Southern blot* de parásitos TbMaf1-PTP
- Figura 35** Ensayo tipo *Western blot* de parásitos TbMaf1-PTP
- Figura 36** Ensayo de inmunofluorescencia indirecta con el anticuerpo anti-ProtC en parásitos de *T. brucei* que expresan la proteína TbMaf1-PTP.
- Figura 37** Ensayo de *Western blot* con fracciones proteicas nucleares y citoplásmicas de parásitos silvestres de *T. brucei*
- Figura 38** Patrón de sonicación obtenido a partir de parásitos de *T. brucei* TbMaf1
- Figura 39** Representación esquemática a escala de los loci de *T. brucei* evaluados mediante ChIP-qPCR
- Figura 40** Amplificación por PCR de punto final de los fragmentos a analizar por ChIP-qPCR
- Figura 41** Gráficas de los resultados del análisis de experimentos ChIP-qPCR
- 
- Tabla 1** Resumen de las características principales del genoma nuclear de *T. brucei*
- Tabla 2** Oligonucleótidos utilizados para la construcción del vector de sobre-expresión
- Tabla 3** Oligonucleótidos usados en los experimentos RT-PCR
- Tabla 4** Sondas radioactivas utilizadas en este trabajo
- Tabla 5** Anticuerpos utilizados en este trabajo
- Tabla 6** Oligonucleótidos utilizados para clonar a Maf1 en vector de expresión
- Tabla 7** Oligonucleótidos utilizados para amplificar el extremo 3' de Maf1
- Tabla 8** Oligonucleótidos usados en experimentos qPCR

## Abreviaturas

ACC1	Acetil Coenzima A carboxilasa
AKT	Proteín cinasa B
b	Bases
BARP	Proteínas ricas en alaninas de <i>brucei</i>
BES	Sitio de expresión de la forma sanguínea
BF	Forma sanguínea
BLAST	Herramienta de búsqueda y alineamiento local básica
Brf1	Factor relacionado a TFIIIB 1
Brf2	Factor relacionado a TFIIIB 2
cAMP	Adenosín monofosfato cíclico
CDKN1	Cinasa dependiente de ciclinas 1
cél	Células
ChIP	Inmunoprecipitación de la cromatina
CIAP	Fosfatasa alcalina de intestino de carnero
CIFTA	Factor de transcripción A clase I
CK2	Proteín cinasa 2
cm <sup>3</sup>	Centrímetros cúbicos
cpm	Cuentas por minuto
DEPC	Dietilpirocabonato
DNA	Ácido desoxi-ribonucleico
DSE	Elemento distal
dsDNA	DNA de doble cadena
ESAG	Genes de expresión sitio-asociados
g	Gravedades
GFT	Factores generales de la transcripción
GPI	Glicofosfatidilinositol
GST	Glutación S-transferasa
HAT	Tripanosomiasis africana humana
Ig	Inmunoglobulina
IPTG	Isopropil $\beta$ -D-1-thigalactopiranosida
Kb	Kilobases
kDa	KiloDaltons
Kj	Kilojoules
M	Molar
Mb	Megabases
$\mu$ Cu	MicroCuries
MDa	Mega Daltons
$\mu$ g	Microgramos
$\mu$ l	Microlitos
$\mu$ m	Micrometros
$\mu$ s	Microsegundos
min	Minutos
ml	Mililitros

mM	Milimolar
MPM	Marcador de peso molecular
mRNA	Ácido ribonucleico mensajero
ncRNA	Ácido ribonucleico no codificante
OMS	Organización Mundial de la Salud
PAGs	Genes asociados a prociclina
PARP	Promotor de prociclinas de repetidos acídicos
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PFGE	Electroforesis de campos pulsados
PI3K	Cinasa fosfoinositide-3
PKA	Proteín cinsasa A
Pol I	RNA polimerasa I
Pol II	RNA polimerasa II
Pol III	RNA polimerasa III
PP2A	Proteín fosfatasa 2A
PP4A	Proteín fosfatasa 4A
PSE	Elemento proximal
PTM	Modificación postraduccional
RNA	Ácido ribonucleico
RNAi	Ácido ribonucleico de interferencia
Rb	Retinoblastoma
rpm	Revoluciones por minuto
rRNA	Ácido ribonucleico ribosomal
RT-PCR	Retro-transcripción acoplada a reacción en cadena de la polimerasa
SE	Sitio de expresión
SIF	Factor de formas cortas
SINE	Elemento corto intercalado nuclear
SIT	Sitio de inicio de la transcripción
SL	<i>Spliced-leader</i>
SLN	Señal de localización nuclear
snoRNA	Ácido ribonucleico pequeño nucleolar
snRNA	Ácido ribonucleico pequeño nuclear
SSR	Sitio de cambio de hebra
TBP	Proteína de unión a cajas TATA
TORC1	Coactivador transcripcional de CREB1
tRNA	Ácido ribonucleico de transferencia
UCR	Región de control río arriba
UTR	Región no traducida
VIH	Virus de la inmunodeficiencia humana
vol	Volúmenes
VSG	Glucoproteínas variables de superficie
°C	Grados Celsius

# Contenido

<b>Resumen</b>	i
<b>Abstract</b>	ii
<b>Índice de figuras y tablas</b>	iii
<b>Abreviaturas</b>	iv
<b>Introducción</b>	1
1. Tripanosomiasis africana	1
2. Morfología de <i>T. brucei</i>	8
3. Organización genómica	14
4. Transcripción en eucariontes	17
5. Maf1, regulador negativo de la transcripción de Pol III	25
6. Expresión genética en <i>T. brucei</i>	35
<b>Antecedentes directos</b>	46
<b>Hipótesis</b>	48
<b>Objetivo general</b>	48
<b>Objetivos particulares</b>	48
<b>Estrategia experimental</b>	49



<b>Materiales y métodos</b>	49
1. Análisis <i>in silico</i>	49
2. Cultivo de parásitos de <i>T. brucei</i>	50
3. Extracción de proteínas	50
4. Extracción de DNA genómico de <i>T. brucei</i>	51
5. Construcción de vectores de sobre-expresión de TbMaf1	51
6. Transfección de <i>T. brucei</i>	54
7. Extracción de RNA total	56
8. Experimentos tipo <i>Northern blot</i>	57
9. Marcaje de sondas radioactivas	57
10. Obtención del anticuerpo TbMaf1	58
11. Experimentos tipo <i>Western blot</i>	62
12. Ensayos de <i>run-on</i> nuclear	63
13. Obtención de parásitos que expresan a TbMaf1 fusionado a PTP	64
14. Experimentos tipo <i>Southern blot</i>	67
15. Inmunofluorescencia Indirecta	67
16. Inmunoprecipitación de la cromatina	68
<b>Resultados</b>	71
1. Determinación <i>in silico</i> de las estructuras secundaria y terciaria de TbMaf1	71
2. Generación del anticuerpo policlonal anti-TbMaf1	75
3. Análisis de los niveles de proteína TbMaf1 en clonas <i>knock-down</i>	80

4. Efecto del <i>knock-down</i> en la transcripción	81
5. Sobre-expresión de TbMaf1	84
6. Localización celular de TbMaf1	90
7. Inmunoprecipitación de la cromatina en parásitos TbMaf1-PTP	101
<b>Discusión</b>	106
<b>Conclusiones</b>	112
<b>Perspectivas</b>	112
<b>Referencias</b>	113

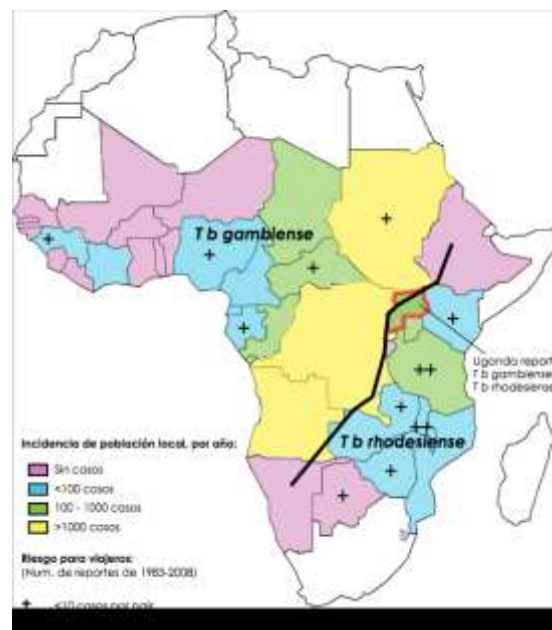
## Introducción

Los parásitos protozoarios de la familia Trypanosomatidae poseen características morfológicas, moleculares y bioquímicas poco comunes (Lopes, 2010). Además, provocan graves enfermedades de importancia médica y veterinaria que se encuentran dentro del grupo de enfermedades tropicales desatendidas de la Organización Mundial de la Salud (OMS). Entre éstas se encuentra la leishmaniasis en sus variantes visceral, cutánea y mucocutánea, causada por parásitos del género *Leishmania*, la tripanosomiasis africana y enfermedad de Chagas, causados por miembros del género *Trypanosoma*. Una de las especies incluidas en este último género es *Trypanosoma brucei*, agente causal de la tripanosomiasis africana humana (HAT por sus siglas en inglés: *Human African Trypanosomiasis*), o enfermedad del sueño (Barrett, 2003). Esta enfermedad genera un impacto social y económico importante sin que actualmente se cuente con un tratamiento eficaz para ella. Los mecanismos para combatir esta enfermedad dependen del desarrollo de nuevos blancos terapéuticos, para lo cual es necesario conocer a detalle la biología del patógeno y su relación con el vector y el hospedero (Subramaniam, 2006).

### 1. Tripanosomiasis africana

La tripanosomiasis africana o enfermedad del sueño es una enfermedad crónica de desenlace fatal si no es tratada a tiempo. Afecta a habitantes de regiones rurales periurbanas del África sub-Sahariana. Hay dos sub-especies patogénicas de *T. brucei*: *T. b. gambiense*, que infecta en las regiones centrales y del oeste de África; y *T. b. rhodesiense*, causante de una enfermedad más aguda en el este y sur del continente (Brun, 2010) (Figura 1). Existen otras subespecies de *T. brucei* en el continente africano, como *T. b. brucei*, *T. b. congolense* y *T. b. evansi*, las cuales sólo afectan animales domésticos y de vida libre. Estas especies no generan infección en los humanos, ya que son sensibles al factor lítico tripanosomial, componente del sistema inmune innato de los primates, el cual está formado por lipoproteínas de alta densidad que tienen la capacidad de formar poros en la membrana de los parásitos para eliminarlos efectivamente

(Thomson, 2009). Por su parte, *T. b. gambiense* y *T. b. rhodesiense* son resistentes al factor lítico tripanosomial. El 90% de la tripanosomiasis africana es generada por infecciones por *T. b. gambiense*. El parásito es transmitido por un insecto hematófago conocido como mosca *tsetse*, perteneciente al género *Glossina*, que habita en el continente africano entre los desiertos de Sahara y Kalahari. El ganado contribuye a propagar la enfermedad al ser un reservorio del parásito (Welburn, 2001)



**Figura 1.** Distribución geográfica de la tripanosomiasis africana, el color amarillo indica los países con más alto número de casos, la línea negra marca la división entre las zonas afectadas por *T. brucei gambiense* y *T. brucei rhodesiense* (modificado de Brun, 2010).

## 1.1. Epidemiología

La tripanosomiasis africana es considerada como una amenaza a la salud pública por la OMS ya que afectan a poblaciones que viven en pobreza y generan pérdidas económicas anualmente, por la cual es necesario establecer medidas de control (World Health Organization, 2013).

Hasta la fecha se han reportado 4 epidemias de tripanosomiasis africana. La más reciente sucedió en el año 2008, después de que en la década de los 90 hubo un relajamiento en el control de los casos nuevos reportados, debido a la disminución

en el financiamiento a la investigación y desarrollo de fármacos dirigidos contra la enfermedad del sueño. Con este antecedente, se comprobó la importancia del avance en áreas de investigación relacionadas con la enfermedad, como son el diagnóstico y tratamiento, la interacción parásito-hospedero y particularidades sobre la biología del parásito. Los adelantos en estas áreas permitirán desarrollar herramientas que eviten el resurgimiento de la enfermedad (García, 2006).

Se sabe que hay 300,000 personas bajo vigilancia médica epidemiológica porque presentaron la enfermedad del sueño en algún momento. Anualmente se reportan más de 10,000 casos nuevos. Con estos datos, se estima que existen al menos 70 millones de individuos en el continente africano en riesgo de contraer la enfermedad, a pesar de los esfuerzos realizados en favor del control del vector y desarrollo de programas de vigilancia epidemiológica (Jacobs, 2011). De forma alarmante, estos datos podrían estar subestimados, ya que la mayoría de los casos de tripanosomiasis africana se presentan en comunidades remotas con pobre infraestructura médica donde es difícil realizar el diagnóstico, por lo que puede haber casos que no se estén considerando (Simarro, 2011).

## **1.2. Evolución clínica, patogenia e histopatología**

La transmisión de la enfermedad del sueño ocurre cuando una mosca *tsetse* infectada inyecta la forma infectiva de *T. brucei* en la piel del hospedero, causando un nódulo o úlcera inflamatoria dolorosa llamada chancro tripanosómico, que se cura 10 días después de la infección. Esta lesión aparece después de la picadura del insecto con más frecuencia en las infecciones causadas por *T. b. rhodesiense*. Los parásitos inoculados proliferan en el sitio de la mordida o picadura y posteriormente migran inicialmente al nódulo linfático más cercano y después al torrente sanguíneo, dando inicio al primer estadio de la enfermedad conocido como hemo-linfático, cuyo signo característico es la fiebre intermitente. Las manifestaciones hematológicas de la HAT son leucocitosis moderada, trombocitopenia y anemia. Una característica frecuente son la concentración elevada de inmunoglobulinas (IgM policlonal, anticuerpos heterófilos, anticuerpos anti-DNA) y factor reumatoide. La concentración elevada

de complejos antígeno-anticuerpo también participa en la lesión histológica y la mayor permeabilidad vascular que facilita la diseminación de los parásitos. En la infección por *T. b. gambiense* se observa linfadenopatía pronunciada. Los ganglios linfáticos se encuentran separados, son móviles pero no dolorosos, y tienen una consistencia elástica. Los ganglios cervicales a menudo son visibles y puede aparecer el signo de Winterbottom o hipertrofia de los ganglios en el triángulo cervical posterior. Con frecuencia hay prurito y eritema maculopapular. Otros síntomas pueden ser malestar general, cefalea, artralgias, pérdida de peso, edema, hepatoesplenomegalia y taquicardia. La linfadenopatía y esplenomegalia extendidas reflejan proliferación linfocítica e histiocítica e invasión de células nodulares (plasmacitos productores de IgM). En los ganglios linfáticos y el bazo se observa endarteritis con infiltración perivascular tanto de parásitos como de linfocitos. Frecuentemente, las poblaciones afectadas por HAT también están en riesgo de contraer otras enfermedades infecciosas como VIH, malaria y fiebre tifoidea, por lo que es probable encontrar pacientes con coinfección (Longo, 2012). En la infección por *T. b. rhodesiense* el cuadro clínico es más agudo, los signos sistémicos de infección como fiebre, malestar y cefalea se presentan de forma temprana. Por ejemplo, en turistas se ha visto que estos signos ocurren incluso antes de culminar su viaje. Frecuentemente se observan complicaciones cardíacas graves como taquicardia persistente independiente de los cuadros febriles, llegando a causar la muerte por arritmias, pancarditis, insuficiencia cardíaca congestiva y edema pulmonar (Barrett, 2003).

En el segundo estadio de la tripanosomiasis africana, llamado meningoencefálico, los parásitos invaden órganos internos y migran hacia el sistema nervioso central. Este fenómeno ocurre de forma más lenta (meses o años) en la infección por *T. b. gambiense*. Esta fase se caracteriza por la presencia inconstante de manifestaciones neurológicas variables que se acompañan de anomalías progresivas en el líquido cefalorraquídeo como hipertensión intracraneal, proteínas elevadas y pleocitosis, además de la presencia de parásitos. El cuadro clínico característico incluye indiferencia, somnolencia diurna progresiva que en ocasiones alterna con inquietud e insomnio nocturno. La pérdida de la espontaneidad se acompaña de una mirada indiferente y el

lenguaje es entrecortado. Los signos extrapiramidales comprenden movimientos coreiformes, temblores y fasciculaciones. Es frecuente observar ataxia y el paciente puede presentar signos que evocan a la enfermedad de Parkinson: los pies se arrastran al caminar, hay hipotonía y temblores. En la fase final de la enfermedad, la deficiencia neurológica progresiva e irreversible degenera en coma. Sin tratamiento la enfermedad es fatal (Malvy, 2011 y Longo, 2012). El impacto en la calidad de vida en las personas infectadas es devastador, los pacientes son incapaces de continuar con su vida laboral por años, lo que propicia pobreza y exclusión social, por lo que el diagnóstico y tratamiento oportuno son vitales (Bonnet, 2015).

### **1.3 Diagnóstico**

El diagnóstico de la enfermedad generalmente ocurre en el segundo estadio, al observar la sintomatología. El estándar de oro es la identificación del parásito en fluidos corporales del paciente en un examen al microscopio (Figura 2). Estos pueden provenir de exudados del chancro, sangre, aspirados de médula ósea o líquido cefalorraquídeo. La detección se puede hacer por dos técnicas, que se usan de forma indistinta dependiendo de su disponibilidad en la región. La primera consiste en una preparación fresca, tomada del fluido corporal para observarse directamente al microscopio y es útil para hallar parásitos móviles. La segunda preparación consiste en hacer una tinción con Giemsa en una muestra previamente fijada, lo que permite hacer una observación más detallada del parásito (Simarro, 2011). Usualmente los parásitos son poco abundantes en los fluidos corporales, por lo que existen técnicas para concentrarlos antes de hacer el examen microscópico. Algunas de las técnicas usadas son la centrifugación de la muestra, el mini intercambio-anion/centrifugación y la técnica cuantitativa de capa leucocitaria o QBC por sus siglas en inglés (*Quantitative Buffy Coat*). En países con alto riesgo se realizan búsquedas masivas en la población con pruebas serológicas para identificar individuos con anticuerpos contra antígenos de *T. brucei* (Checchi, 2011).

A pesar de que no se cuenta con una prueba específica, hay varios algoritmos diagnósticos que frecuentemente incluyen la Prueba con Tarjetas de Aglutinación para Tripanosomiasis o CATT por sus siglas en inglés (*Card Agglutination Test for Trypanosomiasis*), para la cual se requiere una muestra de sangre, plasma o líquido cefalorraquídeo (Checchi, 2008). Existen tres pruebas serológicas disponibles: micro-CATT, wb-CATT y wb-LATEX (*Latex agglutination test*). La primera requiere de muestras de sangre fijada, es fácil de usar en el campo y permite la recolección y almacenaje de muestras para su posterior análisis. Ésta puede usarse para vigilancia en zonas con alto riesgo. Las otras dos pruebas deben hacerse en muestras sanguíneas totales, y la diferencia entre ambas es el soporte donde se lleva a cabo la aglutinación. Estudios recientes han demostrado que la wb-CATT es la más eficiente, mientras que la wb-LATEX es la indicada en casos que requieran de una alta sensibilidad (Truc, 2002). Actualmente hay intentos de desarrollar técnicas de diagnóstico molecular rápidas y costeables. La mayoría se basa en la amplificación de fragmentos específicos del genoma de *T. brucei*. Estos estudios continúan evaluándose (Migchelsen, 2011).



**Figura 2.** Parásito de *T. b. rhodesiense* en sangre de un paciente infectado (tomado de Longo, 2012).

#### 1.4. Tratamiento

Hasta la fecha no se cuenta con un tratamiento exitoso para la tripanosomiasis africana, ya que la administración de los fármacos indicados es difícil, prolongada y requiere de instalaciones médicas para su aplicación. Antes de comenzar el tratamiento debe demostrarse la presencia del parásito en fluidos corporales, ya



que los fármacos indicados tienen efectos secundarios graves. El tratamiento actual usado para el estadio hemolinfático de la enfermedad es pentamidina intravenosa o intramuscular (indicada en casos de infección con *T. b. gambiense*) o suramina intravenosa (para *T. b. rhodesiense*). La pentamina es bien tolerada y genera pocos efectos adversos como hipoglicemia, náusea, vómito y dolor en el sitio de administración. En cambio, la suramina genera efectos adversos graves como nefrotoxicidad, hematuria y neuropatías periféricas (Simarro, 2012).

Para el segundo estadio de la enfermedad (fase neurológica) se recomienda eflornitina intravenosa, aunque también se utiliza melarsoprol intravenoso, solo o en combinación con nifurtimox oral (Masocha, 2007) Se sabe que el melarsoprol es el único medicamento que puede usarse para las dos formas de tripanosomiasis africana, sin embargo uno de sus efectos adversos es el síndrome fatal de encefalopatía. Todos estos tratamientos requieren de vigilancia clínica durante su aplicación. Este es uno de los mayores inconvenientes para las personas que no tienen acceso a centros de salud (Priotto, 2008).

Además de los graves efectos adversos, en los últimos años se ha visto un aumento en la resistencia del parásito a los fármacos, principalmente al melarsoprol, por lo que el desarrollo de un nuevo fármaco efectivo es esencial en la lucha contra la tripanosomiasis africana (Munday, 2014).

Recientemente se han propuesto dos nuevos fármacos candidatos. El primero es el fexinidazol, descubierto en 1980, el cual ha demostrado propiedades tripanocidas con una administración oral de corto tiempo en ambas fases de la enfermedad. Actualmente este compuesto está en la fase 2/3 de pruebas clínicas y promete evadir los largos periodos de hospitalización que requiere la administración de otros fármacos contra la tripanosomiasis africana (Tarral, 2014). El otro candidato es el benzoxaborol, que se encuentra en fase 1 de estudios clínicos como un fármaco de administración oral de una sola toma, lo que lo convertiría en el tratamiento ideal para la erradicación de la enfermedad, si resulta exitoso (Jacobs, 2011).

## 1.5 Profilaxia

La enfermedad del sueño es un problema de salud pública y de zoonosis en África. La prevención de la enfermedad se ha logrado por medio de programas de erradicación del vector y de diagnóstico y tratamiento oportuno a personas infectadas. Las únicas medidas que hasta el momento existen para prevenir un contagio es evitar acudir a regiones donde hay moscas infectadas o en su caso usar ropa protectora y repelente contra insectos. Debido a los severos efectos secundarios de los fármacos usados en el tratamiento de la HAT no se recomienda administrarlos como quimioprofilaxis y lamentablemente hasta el momento no existe una vacuna contra la enfermedad (Longo, 2012).

## 2. Morfología de *T. brucei*

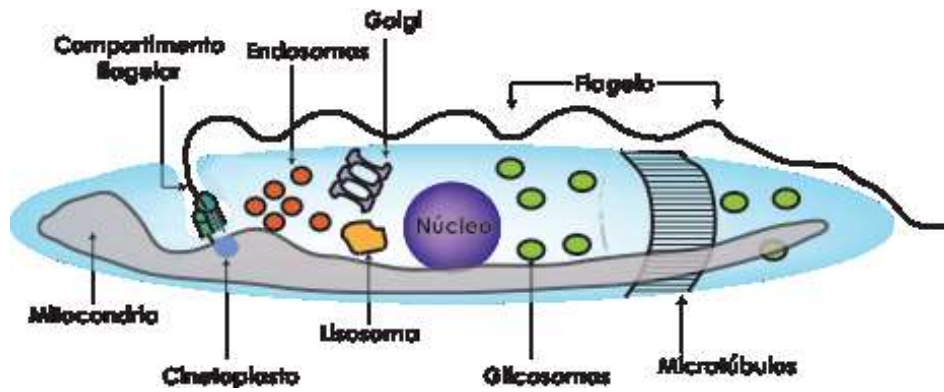
El agente causal de la tripanosomiasis africana, *T. brucei*, es un organismo unicelular polimórfico de entre 15 y 30  $\mu\text{m}$  de longitud con una estructura celular típica de las células eucariontes y algunas características inusuales, como una mitocondria única que contiene al cinetoplasto (DNA estructurado en una red compleja de moléculas circulares) (Figura 3). El parásito tiene una forma alargada y un citoesqueleto altamente polarizado compuesto principalmente por microtúbulos. Éste define la forma de la célula y se mantiene intacto durante el ciclo celular. Durante la división celular, el citoesqueleto de microtúbulos de la célula hija se ensambla e intercala entre los microtúbulos ya existentes, así que la herencia del citoesqueleto es semiconservativa (Sherwin, 1989). Los microtúbulos muestran una polaridad uniforme, pues los extremos negativos son anteriores y los positivos son posteriores (Robinson, 1995).

Organelos únicos como el compartimento flagelar, el flagelo, el cinetoplasto, la mitocondria y el núcleo se concentran en el polo posterior y en el centro de la célula. La estructura más posterior es el compartimento flagelar, de donde emerge el flagelo y es el sitio donde ocurre la endo y exo-citosis, las cuales son dependientes de clatrina (Hung, 2004). El aparato de Golgi en el parásito es un buen modelo para estudiar la biogénesis de este organelo en eucariontes, dada

su posición restringida entre el núcleo y el compartimento flagelar y el elevado tráfico del sistema endocítico a pesar de ser una célula pequeña (He, 2004). El parásito posee un flagelo largo con una estructura axonémica convencional y una membrana ondulante que se inicia cerca del cinetoplasto y continúa a lo largo de toda la membrana celular (Fenn, 2007).

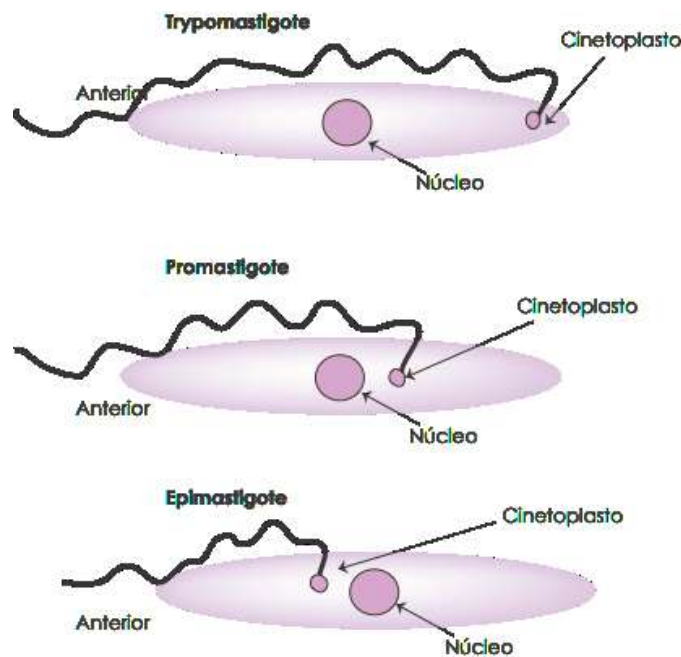
La motilidad del parásito depende de su único flagelo, el cual está asociado al asta paraflagelar, una estructura semi-rígida encontrada en euglenoides y tripanosomátidos que contribuye a la motilidad, quizás ayudando al flagelo a moverse eficientemente en la sangre viscosa de los mamíferos (Vaughan, 2003). La tripanina, una proteína relacionada a una subunidad del complejo motor de dineína, contiene un dominio de unión a microtúbulos que estabiliza la interacción entre el flagelo y el citoesqueleto en una región denominada como zona de unión al flagelo. Esta unión le da direccionalidad al parásito (Kohl, 2003). Durante la división celular, el flagelo naciente de la célula hija se apila sobre el flagelo viejo para que la información estructural se transfiera del flagelo viejo al nuevo (Briggs, 2004).

El flagelo de *T. brucei* se origina en el cuerpo basal, que a su vez está unido a través de la membrana mitocondrial al genoma mitocondrial o cinetoplasto. Esta unión se da a través de un complejo de unión tripartita que debe atravesar la membrana celular y mitocondrial (Gull, 2003). La mitocondria es una estructura elongada que va de la parte posterior a la parte anterior de la célula. En los estadios sanguíneos del parásito es una estructura tubular desprovista de crestas; esto refleja la ausencia de respiración mitocondrial en estas fases, en las que la energía se genera en unos organelos especializados conocidos como glicosomas. En contraste, la forma procíclica posee una mitocondria activa.



**Figura 3.** Arquitectura celular de formas sanguíneas de *T. brucei* (modificado de Lopes, 2010).

La diferencia más clara entre los diversos estadios de vida de *T. brucei* es la posición del cinetoplasto en relación a la parte posterior de la célula. En los tripomastigotes (formas sanguíneas) el cinetoplasto se encuentra cercano a la parte posterior de la célula (Figura 4). En los promastigotes (formas procíclicas) el cinetoplasto se localiza a la mitad, entre el núcleo y el extremo posterior celular. En cambio, en los epimastigotes (formas procíclicas) el cinetoplasto se localiza en la parte anterior de la célula. Las razones por las que suceden estos cambios morfológicos en el parásito se desconocen hasta el momento (Matthews, 2005).



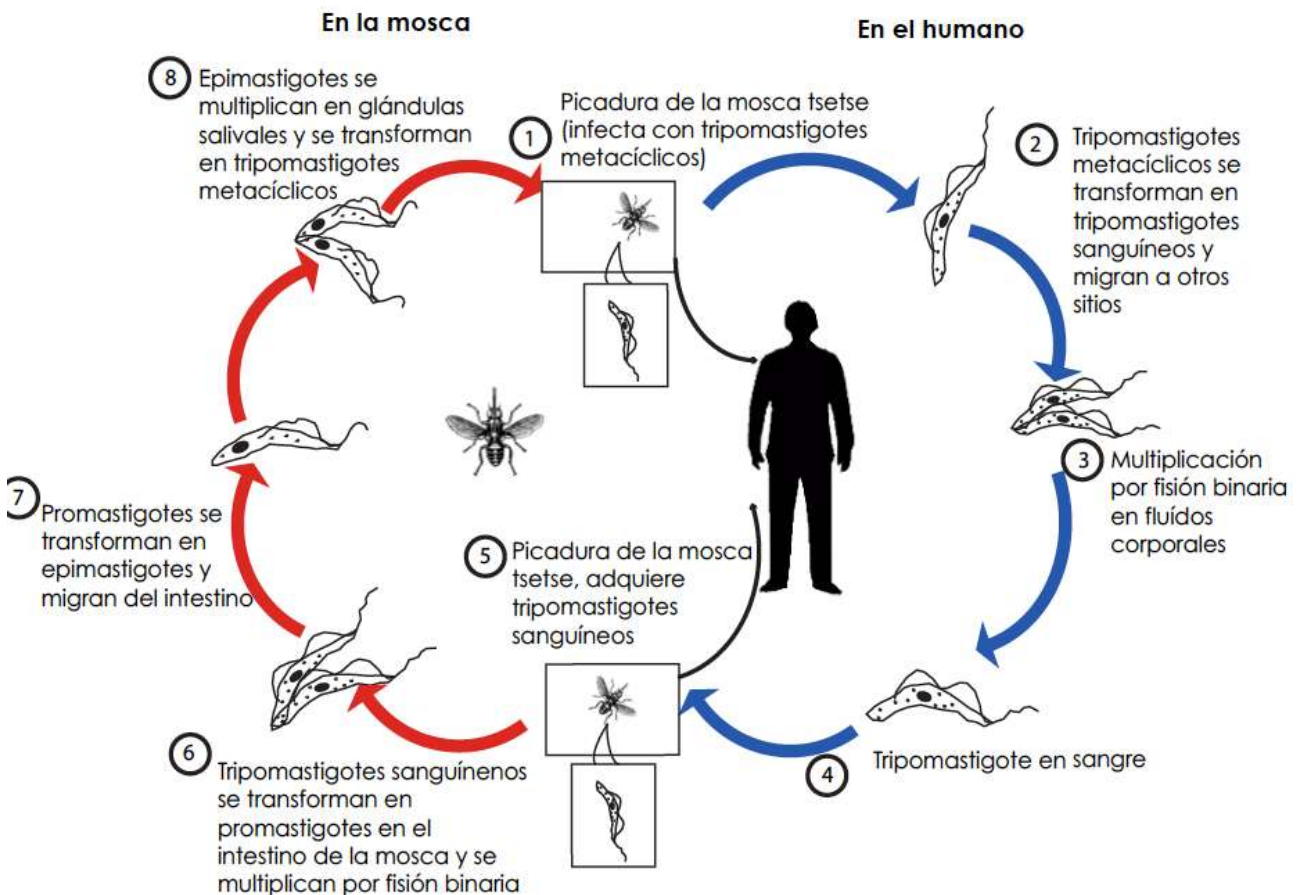
**Figura 4.** Representación esquemática de como el cinetoplasto cambia de posición durante el ciclo de vida de *T. brucei*. Las formas sanguíneas corresponden a los tripomastigotes y las formas procíclicas a los promastigotes y epigastigotes (modificado de Fenn, 2007).

## 2.1. Ciclo de vida de *T. brucei*

El ciclo de vida de *T. brucei* comienza cuando una mosca *tsetse* infectada inyecta tripomastigotes metacíclicos, la forma infectiva del parásito, en la piel del hospedero mamífero (Figura 5). Los parásitos inyectados se transforman en tripomastigotes sanguíneos, y migran a fluidos corporales como sangre, linfa y líquido cefalorraquídeo, donde se multiplican por fisión binaria. Al ingresar al hospedero mamífero, *T. brucei* adquiere una morfología larga y delgada que no resulta infecciosa para el insecto. Estas formas delgadas o *slender* se dividen rápidamente en el torrente sanguíneo antes de transformarse en formas cortas y gordas o *stumpy*, las cuales no pueden dividirse pero sí son infectivas para la mosca y sobreviven poco tiempo en la sangre (Savill, 2004). Se ha propuesto que la transformación de formas delgadas a cortas es desencadenada por una detección de alta densidad celular, al liberar el parásito un factor o metabolito llamado factor inductor de formas cortas o SIF por sus siglas en inglés (*stumpy induction factor*) que actúa vía cAMP para provocar el arresto celular antes de completarse la transformación (Vassella, 1997).

El ciclo de vida continúa cuando una mosca *tsetse* se alimenta de un hospedero infectado y adquiere tripomastigotes sanguíneos, los cuales pasan al intestino de la mosca, donde se convierten en promastigotes procíclicos. Específicamente las formas cortas son las que pueden realizar esta transformación, la cual ocurre gracias a un proceso finamente regulado donde uno de los principales eventos es el intercambio de proteínas variables de superficie o VSGs por prociclinas. Esto ocurre en un espacio de tiempo de una a dos divisiones celulares (Janz, 1994). Más adelante hablaremos de las características e importancia de estas proteínas. Otros cambios importantes ocurren a nivel de metabolismo, al activarse nuevamente la mitocondria en las formas procíclicas. Estos parásitos, después de multiplicarse en el intestino medio/proventrículo, migran hacia las glándulas salivares, dando lugar a una división celular asimétrica generando epimastigotes largos y cortos. Se cree que sólo los epimastigotes cortos pueden adherirse y proliferar a las glándulas salivares del insecto, donde las prociclinas EP continúan expresándose a niveles casi indetectables y otras proteínas de superficie

comienzan a expresarse: las proteínas ricas en alaninas de *brucei* o BARP por sus siglas en inglés (*brucei alanine rich proteins*), aunque su función no ha sido determinada aún (Urwyle, 2007). Se cree que en las líneas celulares de epimastigotes puede existir intercambio sexual ya que se han detectado híbridos en las glándulas salivales de moscas después de marcar con diferentes fluorocromos reporteros. Finalmente, los parásitos maduran a formas metacíclicas y readquieren la capa de VSGs. Después de despegarse de la pared de las glándulas salivales, estos parásitos son infectivos para los mamíferos y se expulsan cuando la mosca se alimenta (Gibson, 2006).



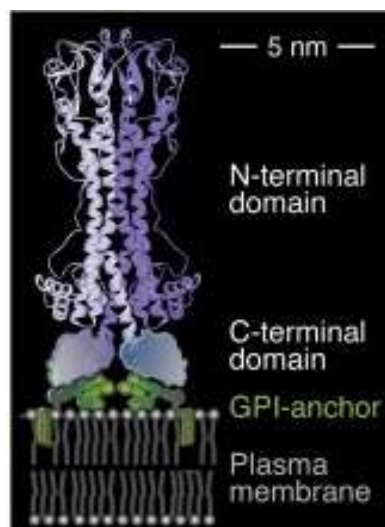
**Figura 5.** Ciclo de vida de *T. brucei*. Las flechas azules se refieren a lo que ocurre en el hospedero mamífero y las flechas rojas a los eventos en el insecto (modificado de CDC, 2010).

### 2.2.1. Proteínas variables de superficie (VSGs) y prociclinas

En las formas sanguíneas de *T. brucei*, tanto en formas *stumpy* como *slender*, la membrana celular está cubierta de una capa densa de aproximadamente  $10^7$  copias de una glucoproteína variable de superficie o VSGs por sus siglas en inglés (*Variable surface glycoprotein*) de aproximadamente 400 aminoácidos que le

ayuda a escapar de la respuesta antigénica del hospedero, ya sea protegiendo contra la vía alterna del complemento o cambiando los determinantes antigénicos que el sistema inmune del hospedero puede reconocer. Las proteínas VSGs son altamente inmunogénicas y provocan una respuesta inmune rápida y eficiente que disminuye la población parasitaria. Sólo sobrevivirán los tripanosomas que hayan cambiado eficientemente la expresión de una VSG por otra, estructuralmente similar pero inmunogénicamente distinto (Batram, 2014). Las VSGs son glicoproteínas homodiméricas con anclaje glicofosfatidil-inositol (GPI) de un peso de 58 kiloDaltones (kDa), con una estructura secundaria predominante de hoja  $\alpha$ -hélice y con secuencias altamente variables en su extremo amino-terminal (Manna, 2014). Después de su biosíntesis, las VSGs, gracias a un péptido señal hidrofóbico en su extremo amino-terminal, viajan hacia el lumen del retículo endoplásmico, donde comienzan su maduración por acción de las enzimas residentes. El péptido señal es cortado y el resto de la proteína se N-glicosila en tres sitios (Barlowe, 2013 y Parodi, 1993). Las proteínas VSGs tienen también un péptido señal en su extremo carboxilo-terminal, el cual es cortado y substituido por el ancla GPI. Sólo las VSGs que tienen correctamente anclado el GPI pueden llegar a la superficie de la célula (Triggs, 2003) (Figura 6).

**Figura 6.** Representación esquemática de la estructura de las VSGs. Las estructuras en morado



señalan el VSG, la fracción variable es la más apical. Las estructuras en verde al anclaje GPI (tomado de Engstler, 2007).

La capa densa de VSGs se reemplaza por una capa de prociclinas en el intestino del vector con una dinámica similar que asegura su subsistencia en el insecto (Stanne, 2010). Las VSGs se pierden por la acción de una metaloendoproteasa (MSP-B), que las corta cerca de su extremo carboxilo-terminal, y una fosfolipasa C-GPI (Gruszynski, 2006). Existen dos grupos grandes de prociclinas o proteínas procíclicas con repetidos acídicos (PARP): Los EP y GPEET. Estos nombres provienen de los residuos que forman los repetidos ácidos, que son ácido glutámico/prolina para los primeros y glicina/prolina/ácido glutámico/ácido glutámico/tirosina para los segundos (Mowatt, 1989). Típicamente hay tres pares de genes de prociclinas EP y un par que codifican las GPEET. Las prociclinas EP están más relacionadas entre sí, difiriendo solamente en el número de repetidos y en la presencia o ausencia de un sitio de N-glicosilación. Las prociclinas GPEET son las mayormente expresadas a nivel de proteína en cultivos de laboratorio, sobre todo cuando estos cultivos se han mantenido por varios meses. Así como las proteínas VSGs, las prociclinas también sufren de modificaciones post-traduccionales, incluyendo el corte de secuencias señal, N-glicosilación (como se ya se ha mencionado) y la adición del ancla GPI (Treumann, 1997). Además se ha reportado que las prociclinas GPEET pueden fosforilarse dentro de los repetidos ácidos (Mehlert, 1999).

La complejidad del ciclo de vida del parásito requiere de una regulación fina de la expresión genética para lograr adaptarse a los cambios ambientales. Particularmente *T. brucei* posee mecanismos atípicos de la expresión de genes comparado con otros eucariontes, lo que hace relevante su estudio.

### **3. Organización genómica**

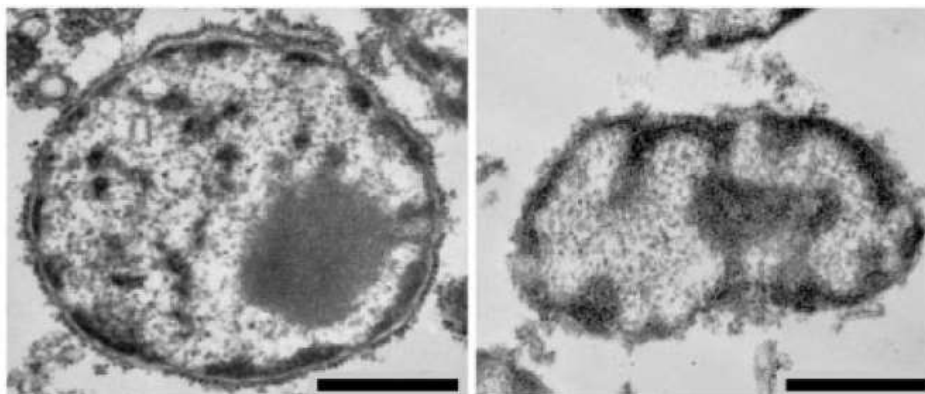
Los tripanosomas son organismos diploides, cuyo genoma nuclear está organizado en tres subclases de cromosomas, de acuerdo a su movilidad en geles de electroforesis de campo pulsado (PFGE): minicromosomas, cromosomas intermedios y megacromosomas (Ogbadoyi, 2000). El parásito tiene aproximadamente 100 minicromosomas lineales, cuyo tamaño varía entre 30 y 150 kilobases (kb). Por el contrario, los cromosomas intermedios son de hasta 700



kb. Las poblaciones de minicromosomas y cromosomas intermedios son aneuploides y se heredan en una forma no mendeliana (Alsford, 2001). Estos cromosomas contienen repertorios silenciosos de VSGs y contribuyen a la variación antigénica, ya que presentan secuencias repetitivas palindrómicas de 177 pares de bases (pb) altamente susceptibles a la recombinación. Los 11 megacromosomas presentes en el parásito, cuyo tamaño varía de 1 a 6 Mb, contienen a los genes transcripcionalmente activos (Berriman, 2005). Se ha observado que estos cromosomas no condensan durante la mitosis, sin embargo, poseen cierto grado de organización subnuclear que muestra variabilidad durante el ciclo de vida del parásito. Los telómeros se posicionan también diferencialmente durante el ciclo celular y el ciclo de vida de *T. brucei*. En imágenes de microscopía electrónica se ha visto que los tripanosomas tienen pocos cinetocoros, por lo que se propone que los cromosomas se segregan por un modelo de apilamiento lateral (Alsford, 2012).

### **3.1. Estructura del núcleo de *T. brucei***

La información genética del parásito, de ~35 Mb, está dentro de un núcleo de ~2.5 micrómetros ( $\mu\text{m}$ ) de diámetro. Mediante microscopía electrónica el núcleo no se observa con subcompartimentos estructurados como en eucariontes superiores, sin embargo sí se distinguen áreas de apariencia fibrilar y granular. También se ha visto que en las formas procíclicas el núcleo es redondo con una envoltura nuclear claramente definida, un nucléolo grande, y zonas de heterocromatina organizada en áreas pequeñas. En cambio, el núcleo en formas sanguíneas se ve irregular y más pequeño, con una envoltura nuclear no muy definida, el nucléolo es más pequeño y las zonas de heterocromatina están continuas (Rout, 2001) (Figura 7).



**Figura 7.** Microscopía electrónica del núcleo de *T. brucei*. El panel izquierdo muestra un núcleo de formas procíclicas y el panel derecho el núcleo de un parásito de formas sanguíneas. Las zonas de heterocromatina corresponden a las zonas electrodensas mientras que las zonas de eucromatina corresponden a las zonas electrolúcidas (tomado de Rout, 2001).

Se han identificado varias nucleoporinas en tripanosomátidos, pero éstas tienen poca homología en su estructura primaria con las de eucariontes superiores. En cambio, su estructura terciaria es muy similar, lo que hace pensar que, como en otros eucariontes, participan en el transporte núcleo-citoplasma. Entre las proteínas encontradas está NUP92, la cual contiene repetidos TPR y durante la interfase se localiza en el complejo del poro nuclear y se cree que participa en el transporte de moléculas hacia el núcleo. Durante la mitosis parece ser un lugar de anclaje del huso mitótico. Otra proteína, NUP-1, se ha identificado como uno de los componentes de la lámina nuclear. Se encuentra en las fibras de la envoltura nuclear interna y es necesaria para mantener el complejo del poro nuclear y posicionar a los telómeros (DuBois, 2012).

El estudio de la secuencia genómica de *T. brucei* permitió determinar algunas características de su genoma (Tabla1). Cerca del 20% del genoma codifica para genes subteloméricos, la mayoría de los cuales son específicos de *T. brucei* y están relacionados con la capacidad del parásito de generar variación antigénica durante la infección al hospedero mamífero (Berriman, 2005).

<b>Característica</b>	
<b>Tamaño del genoma (Mb)</b>	26
<b>Número de megacromosomas</b>	11
<b>Genes de proteínas</b>	9068
<b>Genes de rRNA</b>	56
<b>Genes de tRNA</b>	66
<b>Genes de snRNA</b>	5
<b>Genes de snoRNA</b>	353
<b>Genes de <i>Splice leader</i> o mini-exón</b>	>200
<b>Densidad génica por Mb</b>	317
<b>Contenido de G+C (%)</b>	46.4

**Tabla1.** Resumen de las características principales del genoma nuclear de *T. brucei* (Se consideran únicamente los megacromosomas) (Tomado de Berriman, 2005 y Padilla-Mejia, 2009).

A partir de que se secuenció el genoma de *T. brucei* y la obtención de estos datos, el estudio de los procesos celulares en el parásito se simplificó. Desde entonces ha habido un auge en la publicación de trabajos de investigación sobre el estudio de los VSGs, biología celular y molecular. En particular, nuestro grupo de trabajo está centrado en estudiar uno de los procesos más complejos y relevantes en los organismos: la transcripción, especialmente aquella mediada por la RNA Polimerasa III.

#### **4. Transcripción en eucariontes**

La transcripción es un proceso complejo que requiere de interacciones DNA-proteína y proteína-proteína para su regulación. Para que un gen se transcriba, se necesita que la maquinaria de transcripción se ensamble en su región promotora; para esto, proteínas modificadoras y remodeladoras de la cromatina remueven o alteran los nucleosomas para dejar al descubierto secuencias de reconocimiento fuertemente conservadas que se localizan en el corazón del promotor para permitir la unión de factores de transcripción y formar el complejo de pre-inicio de

la transcripción. Existen otros elementos reguladores como los elementos proximales que pueden encontrarse a unas 200 pb río arriba del sitio de inicio de la transcripción (*Upstream control elements*) o incluso los elementos distales que pueden estar a kilobases de distancia de este sitio, como son potenciadores, silenciadores, regiones de control de locus o insuladores (Boeger, 2005).

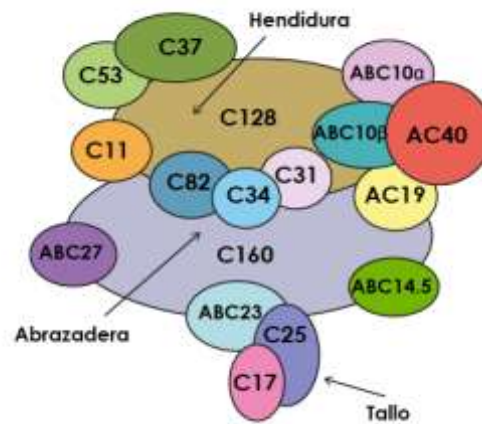
Para que se lleve a cabo la transcripción se requiere de la enzima RNA polimerasa. Hay tres RNA polimerasas nucleares principales en eucariontes, cada una de las cuales se encarga de transcribir distintos genes. La RNA polimerasa I (Pol I), que se encuentra en el nucléolo, y se encarga de la síntesis de los RNAs ribosomales (rRNA) 18S, 28S y 5.8S. La RNA polimerasa II (Pol II), localizada en el nucleoplasma, transcribe todos los RNAs mensajeros (mRNAs), los RNAs pequeños nucleolares (snoRNAs), algunos RNAs pequeños nucleares (snRNAs) y los microRNAs. La RNA polimerasa III (Pol III), también encontrada en el nucleoplasma, es responsable de la síntesis de moléculas importantes como los RNAs de transferencia (tRNAs) que sirven como adaptadores entre los mRNAs y los aminoácidos durante la síntesis de proteínas; el rRNA 5S, un componente de la subunidad grande de los ribosomas, y algunos snRNAs, involucrados en el proceso de *splicing* (Martin, 2001).

Con la incorporación de nucleótidos radioactivos a RNAs nacientes, se descubrió que los lugares en donde ocurre la transcripción en el núcleo no están distribuidos al azar, sino que la transcripción ocurre en regiones discretas. En estos *foci*, denominados como fábricas de transcripción, co-localizan formas activas de las RNA polimerasas y los genes transcritos. Estos sitios compartimentalizados de transcripción se consideran necesarios para asegurar la producción eficiente de RNAs, incrementando la disponibilidad temporal y espacial de moléculas involucradas en el control de la expresión génica. Además, se sabe que los genes pueden compartir fábricas de transcripción y que puede haber fábricas especializadas para ciertos tipos de genes (Weipoltshammer, 2016).

#### 4.1. Transcripción por la RNA Polimerasa III

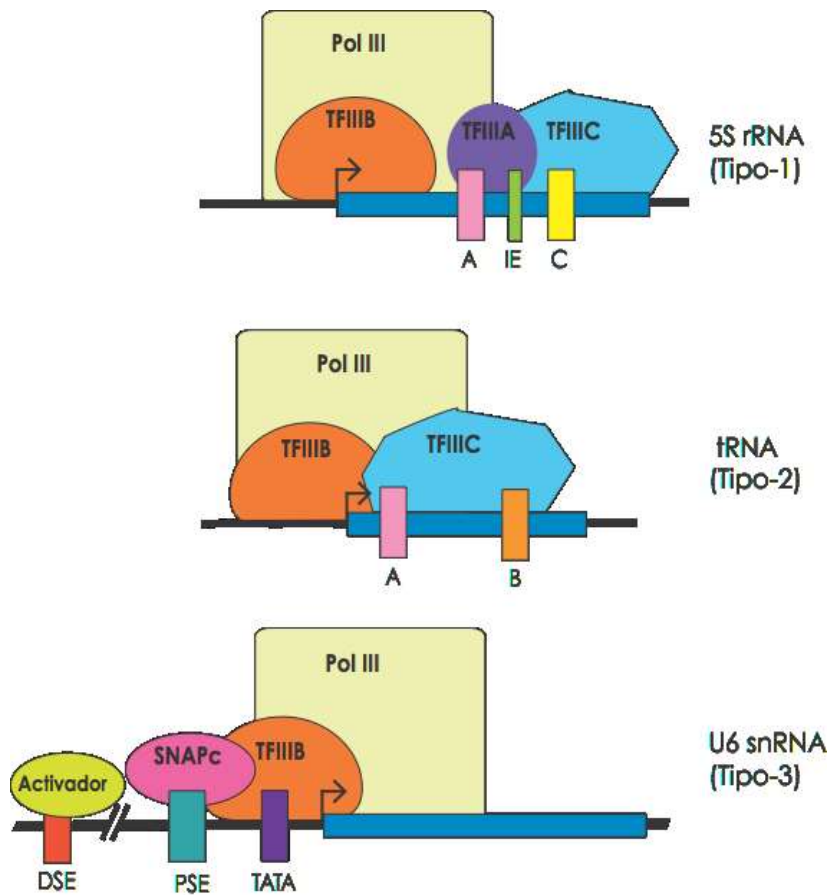
La RNA Pol III es la más grande de las polimerasas nucleares, pues está formada por 17 subunidades con un peso total de 0.7 mega Daltones (MDa). Pol I y Pol II están conformadas por 14 y 12 subunidades, respectivamente. La arquitectura central de las tres polimerasas, formada de 10 subunidades, está conservado entre ellas. La Pol III tiene las subunidades de mayor tamaño, C160 y C128, las cuales forman el sitio activo. Las 5 subunidades restantes, ABC27, ABC23, ABC14.5, ABC10 $\beta$  y ABC10 $\alpha$  se comparten entre las tres polimerasas. Las subunidades AC40 y AC19 son comunes entre Pol I y Pol III y se relacionan mucho con las contrapartes de Pol II, Rpb3 y Rpb11. La última subunidad del centro de Pol III es C11, involucrada en la terminación de la transcripción y la liberación del RNA. Es equivalente a la subunidad A12.2 de Pol I y las dos son homólogas de una proteína de fusión que comprende el amino-terminal de la subunidad Rpb9 y el extremo carboxilo-terminal de TFIIIS (Jasiak, 2006).

El tallo de Pol III está formado por las subunidades C17 y C25 (Figura 8), involucradas en el inicio de la transcripción y en la unión a RNA de cadena simple. El heterodímero C53/C37 está involucrado en inicio y término de la transcripción y está relacionado evolutivamente con las subunidades A49-A34.5 de Pol I y con TFIIH de Pol II. Este heterodímero ocupa un espacio amplio en el centro de Pol III del lado opuesto al tallo y se extiende hasta la hendidura de unión al DNA. Finalmente, el heterotrímero C82/C34/C31 forma un subcomplejo estable, posicionado en el dominio de la abrazadera de C160 en proximidad con el tallo (Figura 8). Está involucrado en inicio de la transcripción y reclutamiento del factor de transcripción TFIIIB, además están relacionadas evolutivamente con TFIIIE $\alpha$  y TFIIIE $\beta$  (Hoffmann, 2015).



**Figura 8.** Representación esquemática de la RNA polimerasa III. Se señalan sus 17 subunidades con diferentes colores (modificado de Wild, 2012).

Los genes transcritos por Pol III se clasifican según la estructura de su promotor, dependiendo del tipo y localización de sus elementos en *cis* (Figura 9). Los genes del Tipo-1, cuyo ejemplo es el gen rRNA 5S, tienen tres regiones intragénicas: una caja A, un elemento intermedio y una caja C, los cuales abarcan una región de 50 pb comenzando en la posición +45. Los genes Tipo-2, representados por los genes de tRNAs, contienen una caja A intragénica muy cercana al sitio de inicio de la transcripción (10 a 20 pb) y una caja B con localización variable río abajo de la caja A (Figura 9). Los genes Tipo-3 se caracterizan por tener secuencias ubicadas solamente río arriba de la región codificante. El gen representativo es el snRNA U6, que contiene una caja TATA cerca de la posición -30, un elemento proximal (PSE) cerca de la posición -60, y un elemento distal (DSE) ubicado a kilobases de distancia (Figura 9). Existen otros genes transcritos por Pol III cuyas secuencias promotoras no se ajustan a ninguno de los tipos descritos anteriormente, el promotor del tRNA de selenocisteína de *Xenopus laevis* donde se requiere de la caja B intragénica y 3 elementos extragénicos: una caja TATA, un elemento proximal y un elemento distal denominado SPH-like. Dadas estas características, a los promotores de estos genes se les considera como mixtos (Willis, 1993).



**Figura 9.** Regiones promotoras y factores de iniciación de la transcripción de genes transcritos por Pol III. Los genes representativos de los tres tipos de promotores se indican del lado derecho (modificado de (Geiduschek, 2001)).

#### 4.1.1. Factores de iniciación de la transcripción de Pol III

Cada uno de los elementos en *cis* recluta distintas proteínas para que la transcripción ocurra. Más de veinte proteínas están involucradas en la formación del complejo de inicio de la transcripción en genes transcritos por Pol III (Figura 9). Para la mayoría de estos genes, la subunidad TFIIB recluta a Pol III y dirige el inicio de la transcripción. Esta subunidad está compuesta por 3 proteínas esenciales para la transcripción, como han demostrado estudios *in vitro*: la proteína de unión a la caja TATA o TBP (*TATA Box Binding Protein*), Bdp1 (la cual contiene un dominio SANT) y una subunidad relacionada a TFIIB, que puede ser Brf1 (*TFIIB related factor*) o Brf2. Dependiendo del tipo del gen transcrito por Pol III, se unen otros factores a secuencias específicas de los promotores y guían a TFIIB a su sitio de unión. Estos otros factores son TFIIA, TFIIC o SNAPc (Schramm, 2002). TFIIC es un complejo de seis proteínas que reconoce elementos de control internos (las cajas

A y B) en los genes de tRNAs. En la cromatina, TFIIIC muestra plasticidad, ya que se acomoda en un rango de distancia amplia abarcando la caja A, la caja B y la señal de término. Las seis subunidades de TFIIIC están organizados en dos dominios globulares:  $\tau$ A (Tfc1p, Tfc4p y Tfc7p) y  $\tau$ B (Tfc3p, Tfc6p y Tfc8p).  $\tau$ B se une específicamente a la caja B con alta afinidad y favorece la unión de  $\tau$ A a la caja A. La secuencia consenso de la caja B (GWTC**R**ANNC) contiene una citocina altamente conservada (marcada en negritas) la cual es vital para la unión de TFIIIC (Korde, 2014). Estudios estructurales de alta resolución han mostrado que la subunidad Tfc4p de TFIIIC interacciona con Brf1 y Bdp1 para reclutar a TFIIIB (Male, 2015).

Para los genes tipo-1 es necesario que el factor TFIIIA se posicione en la caja A del promotor y el que complejo TFIIIC llegue a la caja C; ambos reclutan a TFIIIB hacia la región de inicio de la transcripción, lo cual atrae a la RNA polimerasa III. En el caso de los genes Tipo-3, que tienen elementos de control externos, el factor SNAPc se coloca en el PSE y al DSE se unen activadores transcripciones como ZNF143 y POU2F1 (también conocido como Oct1 y SBF). Además, la subunidad Brf2 reemplaza a Brf1 en TFIIIB en estos genes (Figura 9) (Arimbasseri, 2016).

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



subunidades de TFIIIB. En particular, análisis estructurales del complejo Brf1-TBP-DNA indican que el dominio de homología II se posiciona a lo largo de las superficies laterales convexas de TBP y el bloque también interactúa parcialmente con Bdp1. Además de estas conexiones descritas, Brf1 interactúa con la subunidad Tfc4 de TFIIIC y las subunidades C34 y C17 de Pol III (Khoo, 2014).

Bdp1 es una subunidad única de la transcripción de Pol III y no tiene homología con otras proteínas de la maquinaria de Pol II ó Pol I. Bdp1 se asocia muy débilmente con las otras subunidades de TFIIIB en la ausencia de DNA. Se conoce poco sobre la estructura de Bdp1 ya que no existen estructuras tridimensionales de la proteína, pero varios estudios evidencian que tiene un dominio SANT que interactúa con el dominio carboxilo-terminal de Brf1 y es esencial para la transcripción. Junto con la región amino-terminal de Brf1 se une a Pol III para formar el complejo de pre-inicio de la transcripción. Estudios recientes han descubierto que una porción de Brf1 se posiciona entre Bdp1 y TBP, río arriba de la caja TATA. Bdp1 atraviesa al DNA cerca del amino-terminal de TBP para unirse río abajo de la caja TATA (Kang, 2016).

#### **4.1.2 Terminación de la transcripción de Pol III**

Análisis bioquímicos indican que hay dos distintos mecanismos de término de la transcripción de Pol III. El primer mecanismo involucra a la holoenzima de 17 subunidades y es dependiente del sub-complejo C53/C37/C11 y funciona con una señal de terminación que consiste en un tracto de 5 a 7 timinas (encontradas en la mayoría de los genes transcritos por Pol III). El largo de la señal de término es crítica, ya que el ~85% de las señales de término en *Saccharomyces cerevisiae* tiene un rango de 5 a 7 timinas (Arimbasseri, 2015). El heterodímero C53/C37 promueve la terminación disminuyendo el rango de elongación de Pol III y previniendo el arresto en la parte proximal de la señal de término. Mientras que hay estudios que indican que C11 promueve el corte del RNA durante la terminación, hay otros estudios que demuestran que el corte es independiente de C11. El segundo mecanismo es independiente de C53/C37/C11, pero requiere de un tracto de 8 a 9 timinas para que esto suceda.

### 4.1.3. Reguladores negativos de la transcripción de Pol III

En eucariontes superiores, la transcripción de la RNA Pol III consume una cantidad considerable de la energía metabólica celular destinada a la expresión génica, y responde a factores como la tasa de crecimiento, la fase de desarrollo y el ciclo celular (con una actividad máxima durante las fases S y G2) (Scott, 2000). Además, se sabe que la transcripción de Pol I y Pol III representa el 80% de la transcripción total de una célula y por lo tanto estos dos sistemas deben de tener una regulación coordinada estricta que sucede gracias a mecanismos celulares complejos. Hallazgos recientes evidencian que un desbalance en esta regulación puede derivar en expresión anormal de genes de Pol III y por consiguiente en transformación oncogénica (White, 2008). En los últimos años se han logrado elucidar los mecanismos moleculares responsables de elevar la transcripción de Pol III en células transformadas: 1) sobre-expresión de factores de transcripción de Pol III; 2) activación de factores de transcripción mediante modificaciones post-traduccionales por oncogenes cuya expresión está desregulada; y 3) la liberación de represores que controlan los niveles de transcripción en células sanas (White, 2004).

Se han descrito varios reguladores negativos y positivos de la transcripción de Pol III en eucariontes como Rb, p53, Erk y c-myc, los cuales sólo se han encontrado en eucariontes superiores y, al haberseles vinculado con transformación oncogénica, se han estudiado ampliamente. Sus mecanismos de acción son variados, por ejemplo, Brl es fosforilado y activado por Erk, derivando en un aumento en la unión a genes de Pol III (Felton-Edkins, 2003). Erk es parte de la vía de cinasas activadoras de mitógeno (MAPK), por lo tanto permite que la transcripción de Pol III responda a señales de mitosis (Goodfellow, 2007). Por otro lado, la proteína Ras induce la expresión de TBP, que es un componente esencial de TFIIIB, resultando en un incremento de la transcripción de Pol III en algunas situaciones. Por su parte, c-myc fomenta la unión de TFIIIB a genes de Pol III al interactuar con este factor de transcripción. TFIIIB también es blanco de p53 al unirse ésta directamente a TBP y así bloquear la interacción con Pol III (Gjioda, 2013). El supresor de tumores Rb

también puede unirse a TFIIB bloqueando la interacción con TFIIC y Pol III (Ruggero, 2009).

Además de estos reguladores, en *S. cerevisiae* se describió un regulador negativo de la transcripción de Pol III llamado Maf1, el cual inicialmente se relacionó con el control de la síntesis de tRNAs (Pluta, 2001).

## **5. Maf1, regulador negativo de la transcripción**

Maf1 fue identificado en *S. cerevisiae* como un represor de la transcripción de la RNA Polimerasa III en respuesta a múltiples condiciones de estrés, al interaccionar de forma directa con la maquinaria de transcripción.

Inicialmente, se identificó en un panel de colonias de levadura con una deficiencia en la eficacia del tRNA supresor SUP11. A esta colonia se le llamó *maf-1* y mostraba además de la anti-supresión, disminución del crecimiento en medio escaso en nutrientes o en una temperatura elevada. Al analizar con más detalle esta colonia, se encontró que tenía incrementados los niveles de tRNAs. Con estos datos, se propuso que se trataba de una proteína que no había sido estudiada con anterioridad. Hasta ese momento, no se le pudo dar explicación a la anti-supresión, pero otro hecho importante fue que la colonia que rescataba el fenotipo de *maf-1*, contenía una mutación en la subunidad C160 de Pol III y que ésta restauraba los niveles normales de tRNAs. Todo esto hizo que se realizaran más experimentos para esclarecer los mecanismos en los que estaba involucrada esta nueva proteína a la que llamaron Maf1 (Boguta, 1997).

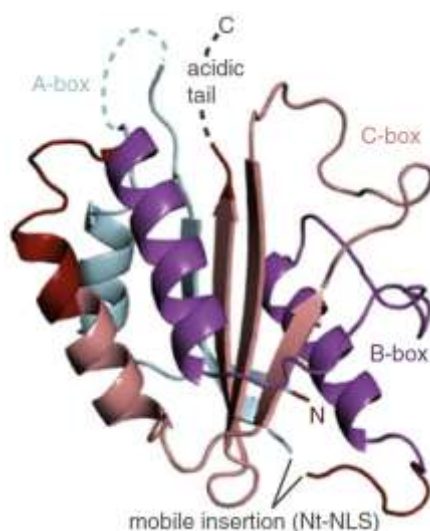
En levadura, Maf1 es una proteína hidrofílica, rica en residuos de serina y asparagina, que posee dos probables señales de localización nuclear (SLN). Por su posición se les denominó SLN amino-terminal y SLN carboxilo-terminal. Análisis de secuencia han revelado que Maf1 presenta tres dominios altamente conservados, llamados cajas A, B y C. Dentro de las cajas B y C se encontraron péptidos con secuencias muy conservadas entre varios organismos (PDYDFS en la caja B y WSxxYFFYNKKxKR en la caja C). Gracias a estos análisis bioinformáticos se

concluyó que Maf1 podría estar presente en todos los eucariontes, desde levadura hasta humano (Ciesla, 2008).

Las primeras evidencias de que Maf1 interacciona con Pol III se obtuvieron gracias a experimentos de co-inmunoprecipitación hechos con extractos proteicos de levadura, los cuales confirmaron que el extremo amino-terminal de C160 interactúa con el dominio A de Maf1 (Pluta, 2001). Experimentos posteriores han logrado co-inmunoprecipitar a otras subunidades de Pol III como C128, C82, AC40, C34, AC19, C17 y ABC14.5 (Oficjalska-Pham, 2006). Otros trabajos demostraron *in vitro* que si bien Maf1 no interacciona con ninguna subunidad de TFIIIC, sí interacciona con TFIIIB, específicamente con Bfr1 y que para reprimir la transcripción de Pol III, la interacción de Maf1-Bfr1 debe ocurrir antes de que se forme el complejo de pre-inicio de la transcripción (Desai, 2005). Otros estudios encontraron que la caja B de Maf1 es la encargada de interactuar con Bfr1. Los primeros grupos que trabajaron con Maf1 en humano, lograron descubrir que Maf1 es capaz de reprimir también la transcripción de otras clases de genes de Pol III y no sólo los tRNAs. Al evaluar la transcripción del snRNA U6 y el RNA no codificante (ncRNA) 7SL, observaron que Maf1 también reprimía su transcripción y que además se unía a Bfr2, subunidad de TFIIIB que substituye a Bfr1 para la transcripción de estos genes (Reina, 2006). Otros experimentos hechos con clorpromazina (fármaco que se une a Bfr1 e impide que ésta se una a otras proteínas) ayudaron a concluir que Maf1 puede bloquear el reclutamiento de TFIIIB hacia sus secuencias blanco de DNA o el reclutamiento de la Pol III a complejos TFIIIB-DNA ya ensamblados (Desai, 2005).

La estructura terciaria de Maf1 se determinó mediante cristalografía y rayos X de una proteína recombinante de levadura y de humano. Análisis de proteólisis limitada de esta proteína reveló dos regiones flexibles, que corresponden a la llamada inserción móvil (región localizada entre la caja A y B), y al extremo carboxilo-terminal; por lo que se decidió cristalizar la proteína que carecía de estas regiones. La estructura de Maf1 es globular con un centro formado por cinco hojas  $\beta$ -plegadas anti-paralelas flanqueadas por una hoja  $\alpha$ -hélice de un

lado y tres hojas  $\alpha$ -hélices del otro (Figura 10). Esta estructura proteica es común, pero no se observa frecuentemente en proteínas que estén involucradas en transcripción. También se observó que las dos SLN de Maf1 se encuentran expuestas (Figura 10) (Vannini, 2010). La región denominada como inserción móvil es también conocida como región *linker* y su tamaño varía según la especie. Se piensa que no es vital para la interacción con Pol III o TFIIIB, pero puede sufrir de modificaciones post-traduccionales que participen en la regulación de la actividad de Maf1 (Willis, 2007). Además, en el mismo estudio se determinó que Maf1, al unirse al extremo amino-terminal de la subunidad mayor de Pol III, produce un rearrreglo en el complejo C82/C34/C31, provocando un debilitamiento en la interacción entre Pol III y TFIIIB, e impidiendo que la transcripción de Pol III ocurra (Vannini, 2010).



**Figura 10.** Estructura terciaria de Maf1 en humano. La caja A está indicada en color azul, la caja B en color rojo y la caja C en rosa. Las regiones *linker* y carboxilo-terminal se removieron para realizar la cristalografía por lo que no están representadas (tomado de Vannini et al., 2010).

Un estudio de todo el genoma (*genome wide*) en células de humano sometidas a estrés nutricional reveló que Maf1 incrementa su presencia en genes de Pol III bajo estas condiciones, prefiriendo los genes en donde ya se encuentra la Pol III posicionada. De forma interesante, estos genes presentan marcas epigenéticas de activación transcripcional, lo que apoya la idea de que se trata de genes

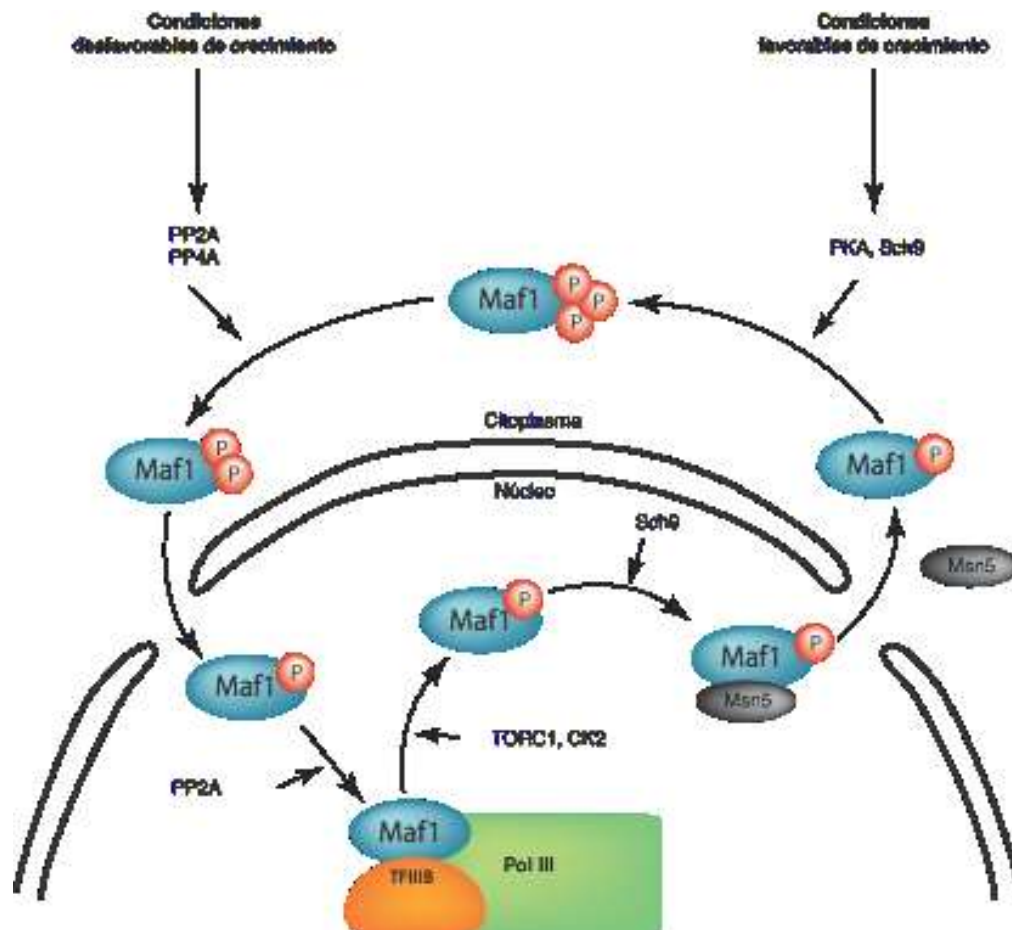
activos. Además, se encontró que Maf1 se une preferentemente a genes de Pol III de los tipos 2 y 3 (Orioli, 2016).

### 5.1 Modificaciones post-traduccionales de Maf1

Búsquedas *in silico* de sitios probables de fosforilación lograron identificar cerca de 30 posibles residuos fosforilables en Maf1 de *S. cerevisiae* (Turowski, 2012). Estudios experimentales han demostrado que Maf1 tiene diferentes grados de fosforilación y que al someter a las células a condiciones de estrés nutricional, estrés osmolar, choque térmico, estrés oxidativo o al tratarlas con rapamicina (fármaco que inhibe al complejo TOR1) Maf1 se desfosforila. En su forma desfosforilada es como ejerce su acción represora (Roberts, 2006; Moir, 2006 y Oficjalska-Pham, 2006). Tal como sucede en levadura, Maf1 en humano también sufre de fosforilaciones, las cuales se pierden al someter a las células a estrés osmótico o al tratarlas con rapamicina (Goodfellow, 2008; Reina, 2006 y Rollins, 2007).

Algunas de las fosfatasas que se ha comprobado que desfosforilan a Maf1 son PP2A, PP4A y Pkc1. Al inactivar, mutar o delatar estas enzimas, Maf1 es incapaz de ir al núcleo y reprimir la transcripción de Pol III (Figura 11) (Oler, 2012; Roberts, 2006 y Oficjalska-Pham, 2006).

Las cinasas encargadas de fosforilar y por lo tanto, de inactivar a Maf1 han sido ampliamente estudiadas. La proteína cinasa A (PKA) fosforila a Maf1 en levadura en diferentes sitios (S90, S101, S177/178 y S209/210), todos contenidos dentro de la región *linker* de la proteína (Moir, 2006). También en levadura se encontró que la cinasa Sch9 fosforila a Maf1 en los mismos sitios blanco de PKA, por lo que se propuso que la regulación de la transcripción de Pol III se logra gracias a diferentes vías de señalización (Lee, 2009). También se encontró que uno de los sitios de fosforilación de PKA/Sch9 está cercano a la SLN amino-terminal y quizás el “apagado” de esta señal esté regulado por fosforilación por estas dos cinasas (Figura 11) (Wei, 2010).



**Figura 11.** Representación esquemática de la regulación de Maf1 en levadura. Maf1 se encuentra hiperfosforilado en el citoplasma en condiciones normales de crecimiento. Al existir condiciones desfavorables, Maf1 se defosforila para viajar al núcleo y reprimir la transcripción de Pol III. Cuando su función ya no es necesaria, se fosforila para unirse a su translocador Msn5 y regresar al citoplasma (modificado de Boguta & Graczyk, 2011).

Maf1 también es blanco de TOR1, cinasa que regula el crecimiento celular promoviendo la transcripción y la traducción. Según resultados experimentales, TOR1 fosforila a la serina 75 de Maf1 en humano, sito que es relevante para la acción represora de Maf1. Cuando los nutrientes son abundantes TOR1 se transloca al nucléolo y se une al promotor del 5S rRNA para promover su transcripción por Pol III al fosforilar a Maf1 e inhibir su acción represora. Es

probable que otros residuos blanco de esta cinasa sean S60, T64 y S68 (Shor, 2010 y Kantidakis, 2010).

Otra cinasa implicada en la fosforilación de Maf1 es la caseína cinasa II (CK2). Un grupo de trabajo demostró mediante experimentos *in vitro* que CK2 fosforila a Maf1 y que en cepas de levadura *knock-out* de Maf1, CK2 no mostraba ningún efecto en regular la transcripción de Pol III; por lo que se concluyó que el papel de CK2 en la regulación de esta polimerasa era gracias a Maf1 (Graczyk, 2011). Sin embargo, otro grupo de trabajo utilizó cepas mutadas en CK2 y no se observaron cambios en el estado de fosforilación de Maf1. Hasta la fecha, este tema continúa siendo controversial (Moir, 2012).

Además de ser fosforilada, se sabe que Maf1 puede ser SUMOilada en la lisina 35 en células de humano. Este residuo parece estar conservado entre diferentes especies, lo que hace pensar que la modificación podría no ser exclusiva de mamíferos. En este estudio se encontró que al impedirse la SUMOilación de Maf1 mediante mutación sitio-dirigida de la lisina blanco, Maf1 ya no es capaz de reprimir la transcripción de Pol III al perder la habilidad de interactuar con ella y que esta PTM no está relacionada con las condiciones de crecimiento de la célula (Rohira, 2013).

## **5.2. Localización celular de Maf1**

De forma similar a varios factores de transcripción, Maf1 se regula al cambiar su localización entre el citoplasma y el núcleo (Figura 11). Estudios de inmunofluorescencia han revelado que la localización de Maf1 es principalmente citoplasmática, pero se enriquece en el núcleo después de someter a las células a condiciones de estrés o después de tratarlas con rapamicina y por tanto, desfosforilarse (Wei, 2010). Como se mencionó con anterioridad, la fosforilación de Maf1 por PKA/Sch9 regula el “encendido/apagado” de la SLN amino-terminal de Maf1. Sin embargo, esta fosforilación no es suficiente para retener a Maf1 en el citoplasma, por lo que se propone que la regulación de la localización resulta de una acción coordinada entre varias vías que pueden fosforilar diferentes residuos



en la proteína. Maf1 puede volver al citoplasma gracias a la unión con el translocador Msn5 (Towpik, 2008). A pesar de que en un inicio se pensó que al mutar a Msn5, Maf1 ya no podría volver al citoplasma y estaría reprimiendo constitutivamente a Pol III, los experimentos mostraron que Maf1 en efecto se mantenía en el núcleo pero no ejercía su acción represora. Por ello, se concluyó que Maf1 comienza a fosforilarse en el núcleo, lo cual la inactiva y facilita su interacción con Msn5, para poder viajar nuevamente hacia el citoplasma (Wei, 2009).

### **5.3. Maf1 regula la transcripción de las tres RNA polimerasas.**

Los primeros estudios parecían indicar que Maf1 sólo regulaba a Pol III, sin embargo un estudio reportó que Maf1 en humano podía regular negativamente la transcripción de las tres RNA polimerasas (Johnson, 2007). En este trabajo se observó que al incrementar la expresión de Maf1 en células de glioblastoma aumentaban los niveles de transcripción de algunos genes transcritos por Pol I y por Pol II. Estos datos fueron confirmados al sobre-expresar a Maf1 y observar el efecto contrario. Uno de los genes transcritos por Pol II que mostró una disminución considerable por la sobre-expresión de Maf1 fue TBP. Mediante ensayos CHIP se comprobó que Maf1 es capaz de unirse al sitio de unión a Elk-1 contenido dentro del promotor de TBP, lo que reprime su expresión; de esta forma, al ser TBP un factor de transcripción que se requiere para la transcripción de las tres RNA polimerasas, Maf1 tiene también un impacto en la transcripción de Pol I (Johnson, 2007).

En *Caenorhabditis elegans*, se encontró que los niveles de Maf1 también modifican los niveles de expresión de TBP y de otros genes transcritos por Pol II que están relacionados con el metabolismo de lípidos como FASN y ACC1 (Khanna, 2014). En contraste, el ratón *knock-out* de Maf1 no mostró diferencias en los niveles de TBP, sin que hasta el momento se sepa la razón por lo que esto ocurre, pero sí se observó un aumento en los niveles de tRNAs de acuerdo a lo que se conoce sobre la función de Maf1 (Bonhoure, 2015).

En células de *S. cerevisiae* que tienen mutado el gen Maf1 hay un aumento en la transcripción de genes involucrados en la gluconeogénesis como FBP1 y PCK1, los cuales son transcritos por la RNA Polimerasa II. Aunque las razones por las que este aumento sucede no fueron dilucidadas, los investigadores han propuesto que estos genes, al encontrarse cercanos a un gen de tRNA, se ven indirectamente afectados por la regulación negativa de Maf1 hacia estos genes (Morawiec, 2013). Un fenómeno similar se observó en células de humano. Datos de microarreglos de células *knock-down* de Maf1 mostraron que más de 200 genes se encontraban des-regulados, entre ellos, genes transcritos por Pol II relacionados con proliferación celular. Uno de estos genes, CDKN1A, está involucrado en otros procesos celulares como diferenciación, apoptosis, metástasis y supervivencia. Mediante experimentos de *run-on* se comprobó que Maf1 puede regular negativamente la expresión de este gen y que si además se hacía un *knock-down* de la subunidad C160 de Pol III, esta represión ya no ocurría. Haciendo un análisis detallado de los elementos en *cis* que constituyen al promotor de CDKN1A se encontró un elemento corto nuclear intercalado o SINE por sus siglas en inglés. Este SINE es transcrito por Pol III y a su promotor se une Maf1, lo que regula indirectamente la expresión del gen contiguo, en este caso, CDKN1. Se evaluaron más genes que habían mostrado des-regulación según los datos de los microarreglos y en todos los casos evaluados, encontraron que existía un SINE aledaño, explicando de esta forma cómo es que Maf1 puede regular indirectamente la transcripción de Pol II. Además, datos obtenidos de experimentos ChIP también revelaron que al estar Maf1 ausente, se facilita el reclutamiento de Pol III al elemento SINE, lo que promueve la unión de la RNA Pol II al promotor del gen aledaño y el reclutamiento de enzimas modificadoras de histonas como p300, PCAF y CFP1, lo que provoca un aumento en marcas de activación transcripcional como H3K4me3, H3K9Ac y H3K27Ac promoviendo su transcripción (Lee, 2015).

Un trabajo reciente reveló que Maf1 puede unirse al promotor de PTEN, un supresor de tumores. A la fecha, la mayoría de los trabajos sobre Maf1 lo han catalogado como un represor transcripcional, sin embargo, este estudio ha dado evidencia experimental de que Maf1 puede actuar como activador. La unión de

Maf1 promueve la acetilación del promotor de PTEN y por tanto su actividad transcripcional. Estudios más detallados podrán elucidar cómo es que sucede esta regulación (Li, 2016).

Sorprendentemente, a la fecha no han sido encontrados motivos de unión a ácidos nucleicos en Maf1, pero varios trabajos han podido identificar a Maf1 unido a promotores de Pol I, Pol II y Pol III, sin que se haya determinado si esta interacción sucede de forma indirecta (a través de otros factores de transcripción) o si Maf1 puede unirse directamente al DNA (Johnson, 2007; Lee, 2015 y Roberts, 2006).

#### **5.4. Maf1 en el metabolismo y la transformación oncogénica**

Además de estar implicado en la regulación negativa de Pol III, Maf1 en *Drosophila melanogaster* se le ha descrito como un mediador muy importante del crecimiento y desarrollo de las larvas de mosca. Actúa de forma dependiente de nutrientes, ya que cuando la disponibilidad de nutrientes es alta, la inhibición de Maf1 promueve la síntesis de tRNAs, derivando en un incremento del crecimiento del organismo al estimularse la señalización de insulina sistémica, permitiendo así que el desarrollo de la larva sea superior en tamaño (Rideout , 2012). Éste fue el primer reporte en el que Maf1 se veía involucrado en el metabolismo. En *C. elegans*, Maf1 influye en la expresión de enzimas de la lipogénesis como FASN y ACC1, como se mencionó con anterioridad. Los cambios de expresión de estas enzimas lipogénicas tienen un impacto importante en el metabolismo de lípidos en este organismo y en otros procesos relacionados con la reproducción (Khanna, 2014). El mismo fenómeno fue reportado también para células de humano (Palian, 2014).

Aun cuando el ratón *knock-out* de Maf1 no mostró cambios importantes en la transcripción, un dato interesante es que los animales eran resistentes a la obesidad y al desarrollo de hígado graso al presentar una deficiencia en el metabolismo de lípidos, lo que propone a Maf1 como un modulador que podría proteger contra la obesidad y enfermedades asociadas (Bonhoure, 2015).

Maf1 también podría estar involucrado en el incremento de la longevidad, ya que datos obtenidos de estudios en *C. elegans* han identificado que la ausencia de Maf1 en este organismo extiende la tolerancia al estrés e incrementa la respuesta a éste; particularmente se evaluó el estrés oxidativo, la respuesta a proteínas mitocondriales mal plegadas (UPR<sup>mt</sup>) y la autofagia. Esta resistencia al estrés se correlacionó con un incremento en la longevidad (Cai, 2016).

Varios análisis experimentales apuntan a que Maf1 también está implicado en el procesamiento de los tRNAs. En levadura se ha observado que al estar el gen de Maf1 mutado o ausente, algunos tRNAs se encuentran hipomodificados (Turowski, 2012). Además, se vio que podía existir una acumulación de tRNAs inmaduros en el núcleo a pesar de que la proteína encargada de transportar a los tRNAs, Los1, se encontraba normal (Karkusiewicz, 2011). Estos datos, aunados al hecho de que la cepa donde se encontró a Maf1 mutado presentaba anti-supresión, llevaron a hacer estudios enfocados en el proceso de maduración de tRNAs. Se encontró que en células deficientes en Maf1, la modificación N<sub>2</sub>,N<sub>2</sub>-dimetil G26 (m<sub>2</sub><sup>2</sup>G26) que ocurre en ciertos tRNAs estaba disminuida. A pesar de que se consideró la posibilidad de que Maf1 participara en modificar a los tRNAs, evidencias experimentales revelaron que no es así. La ausencia de Maf1 conlleva a un aumento en los niveles de tRNAs, sobrepasando la capacidad de la enzima Trm1, encargada de la modificación m<sub>2</sub><sup>2</sup>G26. Esta modificación volvía a niveles normales al sobre-expresar a Trm1. El tRNA supresor debe tener esta modificación m<sub>2</sub><sup>2</sup>G26 para ser funcional. Por eso, gracias a este estudio se sabe que esta es la razón de que se pierda el efecto de los tRNAs supresores en células que carecen de Maf1 (Arimbasseri, 2015).

En varios estudios se ha relacionado a Maf1 con transformación oncogénica. Se ha visto que al no estar presente Maf1 hay un aumento en la síntesis de tRNAs y rRNA 5S. Anteriormente ya se ha determinado que el aumento de la transcripción de Pol III es uno de los eventos clave en la tumorigénesis (White, 2005). Datos experimentales han sugerido que Maf1 es blanco de PTEN. Después de que PTEN es inactivado, los niveles de Maf1 disminuyen, lo que le confiere a Maf1 un papel también como supresor de tumores. Esto se comprobó al observar que la sobre-

expresión de Maf1 puede disminuir la formación de tumores en ratones. Los cambios en la expresión de Maf1 son mediados por la vía de señalización PI3K/AKT/FoxO1. La activación de esta vía mediante el aumento de lípidos en la dieta, reduce la expresión de Maf1, regulando a su vez la expresión de genes transcritos por Pol III (Palian, 2014).

Nuestro grupo de trabajo tiene interés particular en el estudio de la transcripción de Pol III, una de las RNA polimerasas menos estudiada en estos parásitos a pesar de su importante papel en la expresión genética, ya que es la encargada de sintetizar moléculas de RNA pequeñas que son esenciales para la viabilidad celular.

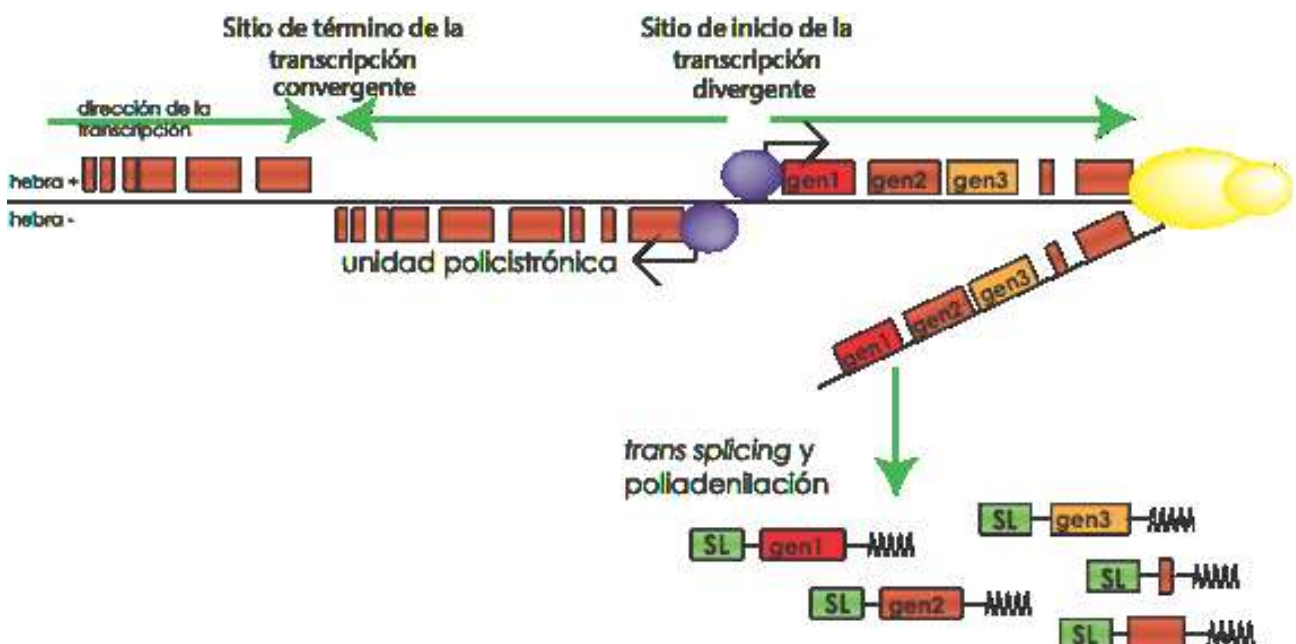
## **6. Expresión genética en *T. brucei***

La transcripción de genes codificadoras de proteínas y la maduración de los mRNAs en tripanosomátidos incluyen mecanismos distintos a los observados en la mayoría de los eucariontes. Cada mRNA en *T. brucei* contiene dos exones, un mini-exón o *spliced leader* (SL) RNA en el extremo 5' y un exón principal codificante (Nelson, 1983). Estos dos exones provienen de dos genes diferentes: el SL RNA 5' es común para todos los mRNAs, tiene un tamaño de 39 nucleótidos, contiene un *cap* atípico y deriva de un RNA donador de 140 nucleótidos, el cual es codificado por un gen que tiene más de 200 copias en el genoma. Mediante *trans-splicing* se une el SL RNA al exón codificante para generar mRNAs maduros (Sutton, 1986). El mecanismo de *trans-splicing* es bioquímicamente similar al *cis-splicing*, con una reacción de dos pasos que incluye corte y posterior ligación. En este proceso participan secuencias importantes como el sitio aceptor del SL RNA (secuencia AG localizado río arriba del codón de inicio de la traducción) y una región rica en pirimidinas (ubicada río arriba del sitio aceptor) (Myung, 2002). En el primer paso, el sitio de ramificación en el pre-mRNA participa en un ataque nucleofílico con el sitio de *splicing* 5', generando un corte en este sitio y generando un intermediario ramificado 2'-5' con una estructura en forma de Y. Posteriormente, se da el corte en el sitio de *splicing* 3' y la ligación de los dos exones (Murphy, 1986).

El extremo 5' del SL RNA tiene una estructura *cap* hipermodificada conocida como "cap 4". Consiste en una guanosina metilada en la posición 7, como en el resto de los eucariontes conocida como m<sup>7</sup>G, seguida de modificaciones adicionales en cada uno de los posteriores nucleótidos transcritos. La secuencia de estos nucleótidos es m<sup>7</sup>Gpppm<sup>6</sup><sub>2</sub>AmAmCm<sup>3</sup>U, representando metilaciones 2'-O ribosa en los cuatro primeros nucleótidos (AACU) y metilaciones adicionales en la primera (m<sup>6</sup><sub>2</sub>) y cuarta (m<sup>3</sup>U) posición (Zamudio, 2006).

### 6.1. Transcripción de la RNA Polimerasa II en *T. brucei*

En los cromosomas de *T. brucei*, los genes codificadores de proteínas están organizados en grupos grandes de genes, no relacionados funcionalmente entre sí, localizados en una misma cadena de DNA. A esto se le conoce como unidades policistrónicas (Figura 12). Cada cromosoma contiene dos o más unidades policistrónicas, las cuales pueden transcribirse de forma divergente (hacia los telómeros) o convergente (alejándose de los telómeros) (Martinez-Calvillo, 2001). De esta forma, los transcritos policistrónicos contienen información para sintetizar varias proteínas (Campbell, 2003). Estos transcritos se procesan en mRNAs individuales mediante *trans-splicing* y poliadenilación, generando así mRNA maduros (Figura 12) (Parsons, 1984).



**Figura 12.** Transcripción policistrónica y procesamiento de los mRNAs en *T. brucei*. Se señala la dirección de la transcripción con las flechas verdes. Los factores de transcripción se representan con círculos morados mientras que la Pol II está representada en amarillo (modificado de Siegel, 2011).

La eficiencia con la que se presenta el *trans-splicing* y la poliadenilación es un factor muy importante para la expresión de un gen determinado, ya que se propone que al ser “constitutiva” la transcripción de las unidades policistrónicas, la regulación de la expresión genética debe ocurrir principalmente de forma post-transcripcional. Esto incluye el procesamiento de los mRNA, la estabilización o la degradación de los mRNA y la eficiencia de la traducción (Kramer, 2012). Varios estudios indican que secuencias en las regiones 3’ no traducidas (UTR), juegan un rol en el control de la estabilidad de los mRNAs y la eficacia de traducción al existir proteínas, RNAs y metabolitos que reconocen secuencias o estructuras en los mRNAs (Haile, 2007) Por ejemplo, la expresión diferencial de proteínas de unión al RNA en los diferentes estadios de vida del parásito permite a su vez la expresión de genes estadio-específicos como prociclinas y cinasas al unirse a sus mRNAs y protegerlos de ribonucleasas para permitir que su vida media se alargue y esté disponible para traducirse (Utter, 2011). Una proteína que tiene esta función es PUF9, la cual se une a un heptámero contenido en la región 3’-UTR de varios mRNAs y al unirse los estabiliza durante la fase S en el ciclo celular. Dentro de los mRNAs que regula PUF9, se encuentran genes involucrados en replicación como PNT2, una proteína que se redistribuye en el huso mitótico durante la mitosis (Archer, 2009).

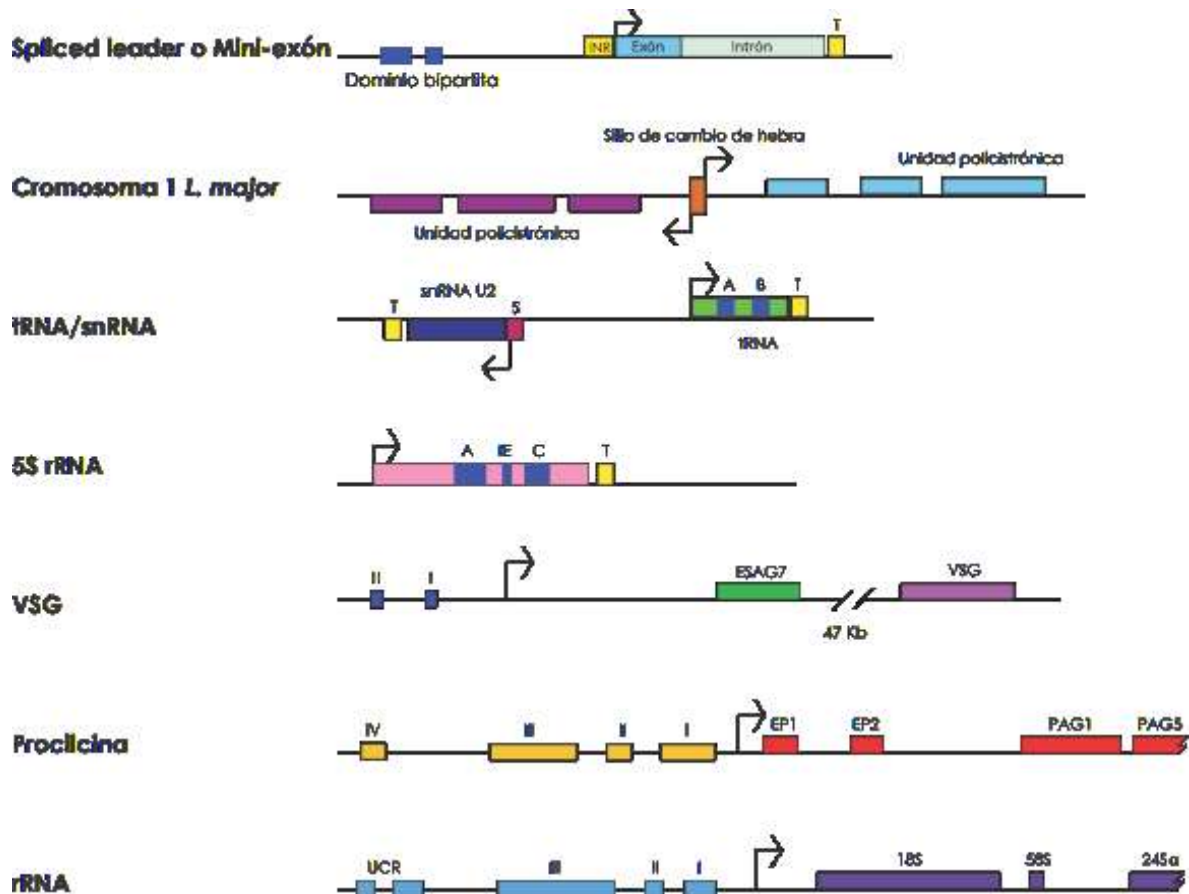
A causa de la transcripción policistrónica, la identificación de regiones promotoras de Pol II se ha visto dificultada en *T. brucei*. En consecuencia, se sabe poco sobre promotores de genes codificadores de proteínas o unidades policistrónicas. Hasta ahora el único conocimiento que se tiene acerca de una región similar a un promotor se identificó en un organismo relacionado, *Leishmania major*, donde la transcripción del cromosoma 1 completo depende de una región de aproximadamente 100 pb que contiene secuencias esenciales para que ocurra la transcripción de las dos unidades policistrónicas contenidas en

ese cromosoma (Martínez-Calvillo, 2004). El único promotor de Pol II descrito hasta el momento es el del gen que codifica para el *SL* RNA (Figura 13).

### **6.1.1. Transcripción del *Spliced leader* RNA**

El promotor del *SL* RNA ha sido estudiado en varias especies de tripanosomátidos, siendo el único promotor de Pol II caracterizado hasta la fecha en estos organismos. Dicho promotor está formado por tres dominios: 1) el elemento -60 (también conocido como USE), que se encuentra entre los sitios -67 y -58 relativo al sitio de inicio de la transcripción (SIT); 2) el elemento -30, que se encuentra entre los sitios -41 y -58; y 3) un dominio denominado INR, que se localiza en la región de inicio de la transcripción (Figura 13) (Campbell, 2000). Para que la transcripción ocurra, factores de transcripción como SNAPc se unen al USE. SNAPc es parte de un complejo proteico grande formado otras proteínas como TBP, TFIIA y TFIIB. A este complejo se le ha denominado complejo general de factores de transcripción (GFT). TFIIA y TFIIB son proteínas altamente divergentes en comparación con sus contrapartes en otros eucariontes, pero se sugiere que en tripanosomátidos forman un complejo de pre-inicio de la transcripción en el promotor del *SL* RNA muy similar al canónico (Lee, 2009). Esto llevó a la realización de nuevos estudios que lograron determinar de forma experimental que factores como TFIIE, TFIIH y el complejo mediador que son importantes para la transcripción del *SL* RNA (Hope, 2014).





**Figura 13.** Diagrama representativo de los promotores identificados en *T. brucei* y otros tripanosomátidos (modificado de (Martínez-Calvillo, 2010)).

### 6.1.2. Regulación epigenética en *T. brucei*

Como en el resto de los eucariontes, la regulación del inicio de la transcripción incluye cambios dinámicos en la estructura de la cromatina en los que se engloban remodelación de la cromatina dependiente de ATP, modificaciones covalentes en los extremos amino-terminal de las histonas y el reemplazo de una o más histonas canónicas por variantes de histonas en los nucleosomas. En *T. brucei* se han identificado a las histonas H2A, H2B, H3 y H4 y a pesar de que sus secuencias divergen significativamente en comparación con otros eucariontes se ha sugerido que tienen una estructura similar a la de otros organismos (Gottesdiener, 2012). Algunos de los residuos de histonas que son sustratos de modificaciones covalentes post-traduccionales también se encuentran conservados. El análisis de los genomas de tripanosomátidos ha revelado la existencia de enzimas modificadoras de histonas, enzimas remodelados de la

cromatina y proteínas lectoras del código de histonas (Figueiredo, 2009). Otros estudios sugieren que las variantes de histonas y las modificaciones de histonas juegan un papel crucial en el inicio y término de la transcripción, ya que al carecer los tripanosomátidos de promotores eucariontes canónicos, se ha propuesto que mecanismos epigenéticos tienen una participación vital en la regulación de la transcripción en estos parásitos. Por ejemplo, en *T. brucei* la primera variante de histona identificada fue H2AZ, asociada a otra variante que no había sido descrita en otros organismos y ahora se propone que pueda ser exclusiva de parásitos: la variante H2BV (Lowell, 2005). Estudios posteriores demostraron que las regiones de cambio de hebra o SSR, que se proponen son los sitios de inicio de la transcripción de Pol II, muestran un enriquecimiento de esta variante de histonas H2AZ. Los nucleosomas que poseen estas variantes son menos estables, haciendo que la estructura de la cromatina esté más relajada para facilitar la transcripción. También, se encontró que las variantes H3.V y H4.V, exclusivas de tripanosomátidos, se encuentran enriquecidas en los probables sitios de término de la transcripción de la RNA Pol II (Siegel, 2009).

Un dato interesante es que tanto en formas sanguíneas de *T. brucei* como en otros tripanosomátidos tienen una modificación de DNA única: la  $\beta$ -D-glucopiranosiloximetiluracil o Base J, una modificación más voluminosa que la modificación del DNA más estudiada, la 5-metil-citocina. La base J se encuentra principalmente en repetidos teloméricos y a ella se le unen dos proteínas, JBP1 y JBP2, que son necesarias para su síntesis (Borst, 2008). Más recientemente se ha visto que esta base está enriquecida en los sitios de término de la transcripción y que en su ausencia aparecen RNAs antisentido cerca de estos sitios (Schulz, 2016).

## **6.2. Transcripción de la RNA Polimerasa I en *T. brucei***

*T. brucei* posee la única RNA polimerasa I capaz de transcribir genes que codifican para proteínas. En 1984 se demostró que la transcripción de genes que codifican para las proteínas VSG no se inhibía después de la adición de  $\alpha$ -amanitina (inhibidor potente de Pol II), lo que sugería que estos genes eran transcritos por otra RNA polimerasa (Kooter, 1984). Un fenómeno similar ocurría en

la transcripción de los genes PARP o prociclinas (Brown, 1992). Estudios posteriores comprobaron que estos genes, los VSG y los PARP, son transcritos por la misma Pol I que transcribe el cistrón del rRNA (Chung, 1992; Laufer, 1999 y Nakaar, 1994). De esta forma, la transcripción de Pol I está íntimamente ligada con la diferenciación entre estadios del ciclo de vida y con la supervivencia en el hospedero mamífero.

### **6.2.1. Transcripción de las proteínas VSGs y prociclinas**

*T. brucei* posee cerca de 2,500 genes y pseudogenes de VSG. Éstos están localizados en las regiones subteloméricas de los 11 megacromosomas, en 5 cromosomas intermedios y en ~100 minicromosomas, lo que corresponde al 30% del genoma (Glover, 2014). La expresión de los VSGs es monoalélica, esto es, sólo uno de los genes se expresa en un momento determinado. El gen VSG expresado se localiza al final de una unidad policistrónica de ~50 kb conocida como sitio de expresión de la forma sanguínea, o BES por sus siglas en inglés (*Bloodstream-form expression site*). Existen cerca de ~15 de estos sitios de expresión BES y están localizados en los telómeros. Se cree que el mecanismo de variación antigénica puede involucrar la activación de otro BES mediante un mecanismo epigenético de silenciamiento y activación transcripcional. Un dato importante sobre el control de la transcripción de estos genes es que el promotor del gen del VSG activo no tiene nucleosomas asociados (Stanne, 2010). Alternativamente los rearrreglos de DNA, incluyendo la conversión génica o el intercambio telomérico, permiten insertar uno de muchos genes silenciosos de VSG en el BES activo. Además, los genes de VSG con secuencias altamente variables pueden moverse empleando recombinación homóloga. La homología es provista por las secuencias repetidas de 70 pb encontradas en la región 5' de la región codificante y por secuencias conservadas en los extremos 3' de los genes VSG (Morrison, 2009). La variación de VSGs ocurre de manera espontánea a una tasa de  $10^{-4}$  por división (Aitchison, 2005 y Batram, 2014). Los BES contienen de 8 a 12 genes adicionales que se co-transcriben con el VSG activo. Los otros genes se conocen como genes de expresión sitio-asociados o ESAGs por sus siglas en inglés (*Expression Site-associated Genes*), los cuales están sujetos al mismo control transcripcional que el gen de VSG activo. Estos genes codifican para diversas

proteínas, como subunidades de un receptor de transferrina (ESAG6 y 7), o una proteína transmembranal tipo receptor con actividad adenilato-ciclasa que ayuda a inhibir el sistema inmune innato del hospedero (ESAG4) (Morrison, 2015). El BES activo se transcribe fuera del nucléolo en un compartimento pequeño denominado cuerpo del sitio de expresión o ESB por sus siglas en inglés (*Expression site body*) (Navarro, 2001).

La región promotora de los genes VSG de formas sanguíneas contiene sólo dos elementos cortos que se extienden hasta la posición -67. Los dos elementos que conforman el promotor se requieren para la unión eficiente de factores de transcripción (Figura 13) (Günzl, 2015). La región codificante del gen VSG se encuentra a ~50 kb río abajo de la región promotora.

Por otro lado, los tripanosomas metacíclicos expresan una VSG de forma monocistrónica, pues su BES no contiene genes asociados, sino únicamente el VSG localizado en los telómeros. El promotor de este gen se localiza de 1 a 4 kb río arriba de la región codificante (Cross, 2014).

Los genes de prociclinas están presentes en unidades policistrónicas de 5-10 kb que incluyen varios genes conocidos como genes asociados a prociclinas o PAGs (*Procyclin Associated Genes*) con un total de 3 a 6 genes. Estas unidades se encuentran dentro de los cromosomas 6 y 10. El promotor de los genes de las prociclinas tiene dos regiones importantes, un elemento central bipartita en las posiciones -14 a -43 y -64 a -73 y un elemento de control río arriba en las posiciones -94 a -143 (Figura 13). Desde su caracterización, fue notorio su parecido a los promotores ribosomales (Janz, 1994).

### **6.2.2. Transcripción de los genes de RNA ribosomal**

Como en el resto de los eucariontes, Pol I transcribe los precursores de rRNAs en *T. brucei*. Los genes ribosomales en tripanosomátidos presentan diferencias importantes con respecto a otros eucariontes. Por ejemplo, el rRNA mayor (tipo 28S) de la subunidad grande del ribosoma se procesa atípicamente, generando

dos moléculas grandes (24S $\alpha$ /LSU $\alpha$  y 24S $\beta$ /LSU $\beta$ ) y cuatro rRNAs pequeños (S1/sr1/ $\gamma$ , S2/sr2/ $\delta$ , S4/sr4/ $\epsilon$  y S6/sr6/ $\zeta$ ). De forma particular, *L. major* contiene dos copias del rRNA S6/sr6/ $\zeta$  (Martínez-Calvillo, 2001). Estas regiones codificantes de rRNA están separadas por espaciadores ribosomales transcritos (Hernández, 2014).

En *T. brucei*, el promotor del rRNA contiene un elemento central bipartita (dominios I y II en la Figura 13) y un dominio distal (dominio III); además de contener una región de control río arriba (UCR o dominio IV) que se extiende hasta la posición -250, la cual es similar a la encontrada en el promotor del SL RNA, pero en sentido opuesto. Datos experimentales han revelado que incluso a esta región se puede unir SNAPc, un factor de transcripción que participa en la síntesis del SL RNA (Schimanski, 2004).

Mediante técnicas de purificación por afinidad en tándem en *T. brucei* se han aislado 10 subunidades de Pol I: A190, A135, A12, ABC23, ABC27, ABC14.5, ABC10 $\beta$ , ABC10 $\alpha$ , AC19 y AC40 (Walgraffe, 2005). Además, ha sido identificada una subunidad de Pol I, llamada RP31, que es exclusiva de los tripanosomátidos (Nguyen, 2007). En este grupo de parásitos no están presentes los factores de transcripción SL1 y UBF1, que típicamente participan en la transcripción de la unidad de rRNA en otros eucariontes. Sin embargo, recientemente fue purificado y caracterizado en *T. brucei* un nuevo factor de transcripción, el factor de transcripción A clase I o CITFA (*Class I Transcription Factor A*). El complejo CITFA no tiene parecido con otras proteínas en eucariontes superiores. Se sabe que se une específicamente a los promotores del rRNA, VSG y prociclinas y que puede hacer más eficientes los sistemas de expresión inducibles en las formas sanguíneas del parásito (Park, 2011). CITFA está formado por ocho subunidades diferentes, denominadas CITFA 1-7 y LC8. Experimentos de *knock-down* demostraron que la subunidad CITFA-2 es indispensable para la transcripción de Pol I (Nguyen, 2012). CITFA-7 es parte de un complejo que se une a los promotores ribosomales, es la subunidad encargada de reconocer al promotor y por lo tanto su *knock-down*

reduce la síntesis de pre-RNAs ribosomales. Todos estos datos han generado atención especial a este nuevo factor de transcripción (Nguyen, 2014).

El factor de elongación 3b o ELP3b regula negativamente la transcripción de los genes rRNA en *T. brucei*, esto quizás para facilitar la reparación del DNA. De manera interesante, ELP3b se localiza sólo en el nucléolo, y no en el cuerpo de sitio de expresión de las VSG (Alsford, 2011).

Se tienen algunas evidencias sobre importancia de la regulación epigenética en los genes de rRNA. Por ejemplo, la histona H3 está reducida en la región río abajo del promotor y los niveles de ésta van aumentando paulatinamente hasta verse incrementados en los espaciadores (Stanne, 2010). Análisis ChIP en el parásito relacionado, *L. major*, han revelado que las marcas epigenéticas de activación H3K14ac, H3K23ac y H3K27ac están enriquecidas en la región promotora de los rRNAs mientras que la marca H4K20me3, marca de represión, está ausente (Vizuet-de-Rueda, 2016).

### **6.3. Transcripción de la RNA Polimerasa III en *T. brucei***

Como ocurre en otros eucariontes, se presume que en *T. brucei* la regulación de la expresión de genes sintetizados por Pol III ocurre a nivel de inicio de la transcripción. De manera similar a otros organismos, la Pol III sintetiza los tRNAs, el rRNA 5S y el ncRNA 7SL. Particularmente, en *T. brucei* la Pol III sintetiza todos los snRNAs. En este parásito ya han sido caracterizados los promotores de algunos snRNAs y del ncRNA 7SL. Estos genes tienen un gen de tRNA contiguo hacia su extremo 5' y localizado en la cadena opuesta del DNA. Sorprendentemente, las cajas A y B del tRNA vecino son esenciales para la expresión del snRNA y del ncRNA 7SL. En la mayoría de los casos también se requieren secuencias intragénicas del snRNA y del ncRNA 7SL para lograr un nivel de expresión óptimo (Nakaar, 1994). Aunque no es muy claro cómo es que las cajas A y B del tRNA promueven la expresión del snRNA, se ha propuesto un modelo de "asa de DNA" en el que los sitios de inicio de la transcripción de los genes de snRNA y del tRNA son aproximados de manera tal que el factor TFIIIB facilita la llegada de Pol III en

ambos sitios. Aunque no se ha llevado a cabo el análisis funcional de los promotores de los genes del tRNA y del rRNA 5S en tripanosomátidos, el análisis de las secuencias reveló que contienen las regiones de control interno típicas de otros eucariontes (Padilla-Mejia, 2009).

La mayoría de las subunidades de Pol III fueron identificadas en tripanosomátidos mediante análisis tipo BLAST. Además, mediante la técnica de Purificación por Afinidad en Tándem (TAP-tag), usando a ABC23 como blanco, fueron aislados complejos transcripcionales de Pol III en el tripanosomátido *L. major*. El análisis de espectrometría de masas de dichos complejos permitió la identificación de 12 subunidades de Pol III: C160, C128, C82, C53, C37, C34, C17, AC40, AC19, ABC27, ABC23 Y ABC14.5 (Martínez-Calvillo, 2007).

Resulta interesante el hecho de que hasta el momento no se han identificado ortólogos de TFIIIA ni TFIIIC en tripanosomátidos. En cambio, en este grupo de parásitos ya fueron identificadas las tres subunidades que forman parte del factor TFIIIB: TBP, Brf1 y Bdp1 (Ghedin, 2004). Mediante experimentos de *knock-down* inducible se encontró que la subunidad Brf1 es esencial para el crecimiento de *T. brucei* y que está involucrada en la expresión de genes de Pol III (Vélez-Ramírez, 2015).

## Antecedentes directos

En nuestro laboratorio estamos interesados en conocer más acerca los mecanismos de regulación de la transcripción en *T. brucei*, dado que se conoce poco hasta el momento sobre mecanismos o proteínas involucradas en la regulación de la transcripción. Un análisis *in silico* del genoma de *T. brucei* nos permitió establecer que Maf1 está presente en este parásito.

Durante el trabajo de maestría se identificaron dos genes de Maf1 en el genoma del parásito, uno localizado en el cromosoma 4 (TbMaf1-4) y otro en el cromosoma 8 (TbMaf1-8). La secuencia de nucleótidos de los genes mostró 94.3% de identidad entre sí, mientras que a nivel de aminoácidos la identidad es del 96.2%. Un dato interesante fue que la homología de la región 5' UTR es del 98%, mientras que la de la región 3'-UTR es del 34%, lo cual podría hablar de una regulación post-transcripcional diferencial. Análisis adicionales confirmaron la presencia de los tres dominios conservados reportados en otras especies (cajas A, B y C) en las secuencias de aminoácidos de las dos copias de TbMaf1, además de la presencia de probables señales de localización nuclear. También evaluamos mediante bioinformática que existen 11 sitios probables de fosforilación a lo largo de las secuencias de TbMaf1. Lo anterior sugiere que la proteína podría ser regulada mediante fosforilación también en *T. brucei* como se ha determinado que sucede en otras especies. Mediante un ensayo RT-PCR se verificó la expresión de los dos genes de TbMaf1 en formas procíclicas de *T. brucei* que es el estadio que trabajamos en el laboratorio.

Para comenzar a evaluar la función de TbMaf1 se generaron líneas *knock-down* inducibles por RNA de interferencia (RNAi). Para eso, se clonó un fragmento del marco abierto de lectura (ORF) en vectores de RNAi con promotores inducibles con doxicilina. Para evaluar por separado si TbMaf1-4 y TbMaf1-8 tienen funciones diferentes, también se clonó en vectores de RNAi inducibles, fragmentos de las regiones específicas 3'-UTR de los dos genes de TbMaf. Todas



las construcciones se transfectaron en parásitos de *T. brucei* 29-13 para generar las líneas celulares p2T-Maf1, pZ-Maf1, pZ-Maf1-4 y pZ-Maf1-8. Mediante ensayos tipo *Northern blot* se confirmó la expresión de la doble cadena de RNA en todas las líneas celulares. La degradación del mRNA de TbMaf1 sólo se observó en las líneas celulares p2T-Maf1 y pZ-Maf1 (que abaten las dos copias de TbMaf1), con una disminución del 75%. No se observó degradación del mRNA de Maf1 en las líneas pZ-Maf1-4 (que abaten a TbMaf1-4) y pZ-Maf1-8 (que abaten a TbMaf1-8), por lo que el trabajo posterior sólo se realizó con clones de p2T-Maf1 y pZ-Maf1. Se evaluó si la disminución del mRNA generaba algún cambio en el crecimiento de las líneas en donde se indujo el *knock-down* de TbMaf1. Las líneas pZ-Maf1 mostraron un aumento en el crecimiento celular del ~30% en comparación con las líneas no inducidas. Las líneas celulares p2T-Maf1 también mostraron un aumento en el crecimiento celular pero en menor porcentaje (~20%), por lo que decidimos realizar los experimentos posteriores únicamente con parásitos pZ-Maf1 (Romero-Meza, 2012). Hasta este punto, ya contábamos con los elementos necesarios para comenzar a estudiar la función de TbMaf1 en *T. brucei* y determinar si está involucrada en la regulación de la transcripción en este protozoario parásito.

## **Hipótesis**

La proteína Maf1 está implicada en la regulación negativa de la expresión de genes transcritos por las tres RNA polimerasas en *T. brucei*.

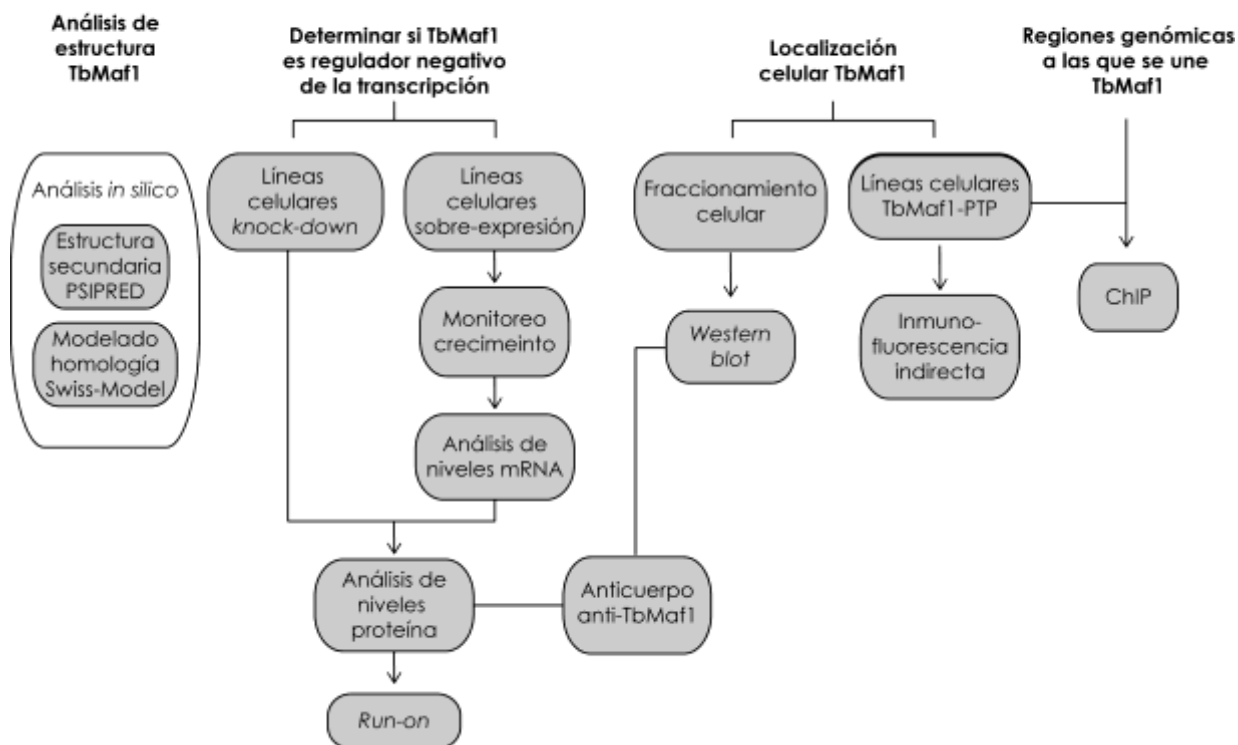
## **Objetivo general**

Estudiar la participación de Maf1 en la regulación de la expresión de genes transcritos por las tres RNA polimerasas en *T. brucei*.

## **Objetivos particulares**

1. Determinar la estructura secundaria y terciaria de TbMaf1 mediante análisis *in silico*.
2. Comprobar que Maf1 en *T. brucei* es un regulador negativo de la transcripción.
3. Conocer la localización celular de Maf1 en *T. brucei*.
4. Identificar las regiones promotoras a las cuales se une Maf1 en *T. brucei*.

## Estrategia Experimental



## Materiales y métodos

### 1. Análisis *in silico*

La secuencia del genoma de *T. brucei* se encuentra disponible en TriTrypDB versión 27 (<http://tritrypdb.org/tritrypdb/>). El gen de Maf1 se identificó mediante un análisis tipo BLAST utilizando las secuencias de otros organismos reportadas en la literatura (Pluta, 2001), obtenidas a partir de la base de datos GeneBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Las secuencias se alinearon usando el programa Clustal  $\Omega$  (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>). Las secuencias de nucleótidos y aminoácidos obtenidas se analizaron con las herramientas bioinformáticas disponibles en los sitios SwissProt (<http://expasy.org/sprot/>). Para la

predicción de estructura secundaria se utilizó el programa PSIPRED: Protein Sequence Analysis Workbench (<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/>). El modelado por homología se realizó con Swiss-Model (<http://swissmodel.expasy.org/interactive>) y Swiss-PDBViewer (<http://www.expasy.org/spdbv/>). La predicción de sitios de fosforilación se hizo con los servidores NetPhos (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/>) y PhosTryp (<http://phostryp.bio.uniroma2.it>).

## **2. Cultivo de parásitos de *T. brucei***

Para todos los experimentos se utilizaron parásitos procíclicos de *T. brucei* cepa 29-13. Esa cepa expresa constitutivamente la RNA polimerasa del fago T7 y el represor de tetraciclina (Wirtz, 1997). El parásito se creció en medio SDM-79 (Carruthers, 1992) suplementado con suero fetal bovino al 10% con selección de higromicina (50 µg/ml) y neomicina (15 µg/ml) a una temperatura de 27°C. Los parásitos *knock-down* de TbMaf1 previamente obtenidos (Romero-Meza, 2012) se cultivaron con selección adicional de fleomicina a una concentración final de 2.5 µg/ml.

## **3. Extracción de proteínas**

### **3.1. Extracción de proteína total**

Se centrifugaron  $3 \times 10^8$  células (cél) de *T. brucei* en fase logarítmica a 6,000 gravedades (g) por 10 minutos (min) a 4°C y se resuspendieron en buffer RIPA 1X (Tris 50 mM pH 7.4, NaCl 150 mM, EDTA 5 mM, NP-40 1%, Deoxicolato 0.5%, SDS 0.1%, Inhibidores de proteasas 1X [Sigma]) incubándose a 4°C por 30 min y agitándolos cada 5 min. Pasado este tiempo se centrifugó a 21,000 g por 20 min a 4°C y se recuperó el sobrenadante.

### **3. 2. Extracción de proteína nuclear y citoplasmática**

$1.8 \times 10^8$  cél se centrifugaron a 6,000 g durante 10 min a 4°C y se lavaron en 10 ml de buffer de lisis (Tris 10 mM pH 7, CaCl<sub>2</sub> 3 mM, MgCl<sub>2</sub> 2 mM) para después ser

resuspendidas en buffer de lisis con NP-40 al 0.5% y 1× de inhibidores de proteasas. Las células se transfirieron a un homogenizador de mazo de teflón pre-enfriado y se lisaron aplicando de 15 a 20 golpes. Para colectar el material, los tubos se centrifugaron a 4,000 rpm por 10 min a 4°C y el sobrenadante donde estaban contenidas las proteínas citoplasmáticas se recuperó y guardó a -20°C. Los núcleos se resuspendieron en 1 ml de buffer C (HEPES 20 mM, NaCl 420 mM, EDTA 1mM, EGTA 1 mM, DTT 0.5 mM, 1× inhibidores de proteasas) y se centrifugaron a 6,000 g por 10 min a 4°C. La pastilla se resuspendió en 50 µl de buffer C y se incubó en rotación constante por 40 min a 4°C. Pasado este tiempo se centrifugó a 21,000 g por 15 min a 4°C y el sobrenadante con las proteínas nucleares contenidas fue recuperado y guardado a -70°C.

#### **4. Extracción de DNA genómico de *T. brucei***

Un total de  $3 \times 10^8$  cél de *T. brucei* en fase media logarítmica se centrifugaron a 6,000 g por 10 min a 4°C. Las células se resuspendieron en 5 ml de buffer de lisis, el cual contiene SSC 0.5× (NaCl 3 M, acetato de sodio 0.3 M), TNE 1× (Tris 40 mM pH 7.6, EDTA 1 mM pH 8.0, NaCl 15 mM), Sarcosyl 1% y 100 µg de proteinasa K. Después de una incubación de 2 horas (h) a 55°C se realizó una extracción con fenol-cloroformo y la pastilla se resuspendió en 300 µl de buffer TE (Tris 10 mM pH 7.6, EDTA 0.2 mM pH 8).

#### **5. Construcción de vectores de sobre-expresión de TbMaf1**

##### **5.1. Amplificación del marco abierto de lectura de TbMaf1**

Para la sobre-expresión del gen TbMaf1-8 se utilizó la secuencia íntegra del marco abierto de lectura de TbMaf1-8. El fragmento se amplificó a partir de DNA genómico de *T. brucei* por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando los oligonucleótidos señalados en la Tabla 2. Cada oligonucleótido contiene una secuencia de reconocimiento de enzimas de restricción diferentes para facilitar la posterior sub-clonación en el vector correspondiente. La amplificación del fragmento se llevó a cabo usando 1 unidad (U) de la DNA polimerasa Herculasa II

(Stratagene), buffer de reacción 1×, MgCl<sub>2</sub> 2 mM; 25 mM de cada desoxinucleótido (dNTP), 10 μM del oligonucleótido sentido, 10 μM del oligonucleótido antisentido y 100 ng de DNA genómico en un volumen final de 50 μl. El termociclador Corbet Research se programó con un ciclo previo de desnaturalización a 94°C por 5 min, seguido de 35 ciclos de 30 s a 94°C de desnaturalización reversible del DNA, 30 s a 50°C para permitir la alineación de los oligonucleótidos, un ciclo de 45 s a 72°C para la polimerización y un ciclo final de 5 min a 72°C para la polimerización complementaria.

Oligonucleótido	Secuencia 5'-3'
Maf8-HindS	AAGCTTTTCTAATGGAGTTCGTC
Maf1-BamHI	GGATCCTCACGGGCGATAATAATA

**Tabla 2.** Oligonucleótidos utilizados para la construcción del vector de sobre-expresión

## 5.2. Clonación del amplicón en el vector pGEMT-Easy

Para permitir la fusión del amplicón al vector pGEMT-Easy (Promega), se realizaron reacciones de adición de A-terminal usando 1 U de DNA Taq (KAPA), dATP 25 μM de y MgCl<sub>2</sub> 25 mM en un volumen final de 10 μl durante 30 min a una temperatura de 72°C. Para las ligaciones se usó 1 U de la enzima T4 ligasa (Promega) por cada una de las reacciones en buffer de reacción 1× y se incubaron por 12 h a 4°C. Las construcciones generadas se transformaron mediante choque térmico en células competentes de *E. coli* JM109 de alta eficiencia (Promega). Las bacterias se incubaron a 4°C por 20 min con 5 μl de la reacción de ligación y posteriormente se les dio un choque térmico de 42°C por 45 segundos (s). Después de una incubación de 2 min a 4°C se crecieron en 900 μl de medio SOC (triptona 2%, extracto de levadura 0.5%, NaCl 1 mM, MgCl<sub>2</sub> 1 mM y glucosa 2 mM) por 1 h a 37°C a 200 rpm. Transcurrido este tiempo se plaqueó una dilución (1:10) del cultivo en cajas de LB agar/ampicilina (triptona 1%, extracto de levadura 0.5%, NaCl 0.5 mM, agar 1.5%, ampicilina 100 μg/ml, X-Gal 50 mg/ml, IPTG 100 mM) y se incubó a 37°C por 18 h. Las colonias obtenidas se inocularon en 5 ml de medio LB con ampicilina (triptona 1%, extracto de levadura 0.5%, NaCl 0.5 mM, ampicilina 100 μg/ml) y se crecieron a 37°C a 220 rpm. De estos cultivos se extrajo DNA

plasmídico usando el Kit NucleoSpin Plasmid QuickPure (Macherey-Nagel). Para ello 5 ml de medio LB-ampicilina saturado de *E. coli* se centrifugó durante 1 min a 11,000 g y el botón celular se resuspendió en 250 µl del Buffer A1, se añadieron 250 µl del Buffer A2 para lisar las células durante 5 min de incubación a temperatura ambiente y posteriormente se añadieron 300 µl del Buffer A3 para neutralizar la reacción. El lisado se centrifugó por 10 min y el sobrenadante obtenido se decantó en una columna de purificación. La columna se lavó con 600 µl del Buffer A4 y después de centrifugar la columna por 2 min a 21,000 g para eliminar el exceso de etanol, se añadieron 50 µl del Buffer de Elusión para obtener plásmido. El DNA obtenido se analizó mediante enzimas de restricción y por secuenciación (en el servicio de secuenciación de DNA de la FES Iztacala).

### **5.3. Subclonación del ORF de TbMaf1-8 en el vector de sobre-expresión**

El fragmento de TbMaf1-8 se subclonó en el vector de sobre-expresión pLew100v5-BSD con ayuda de los sitios *Hind*III y *Bam*HI (New England Biolabs). Para liberar los fragmentos se utilizaron las enzimas de restricción correspondientes, siguiendo las recomendaciones del fabricante. El inserto se purificó a partir de gel de agarosa haciendo uso del kit NucleoSpin Extract II (Macherey-Nagel). Para ello se agregaron 2 volúmenes (vol) de Buffer NTI y la muestra se agregó a una columna de purificación y se centrifugó. La columna se lavó con 700 µl del Buffer NT3 y después de centrifugarse por 2 min a 21,000 g, se agregaron 30 µl del Buffer NE para obtener el fragmento purificado el cual fue ligado en el vector pLew100v5-BSD.

El vector pLew100v5-BSD está diseñado para integrarse en la región espaciadora no transcrita del cistrón del rRNA (<http://tryps.rockefeller.edu>). La construcción fue transformada en células competentes de *E. coli* JM109 con el procedimiento antes descrito. Las colonias bacterianas que contenían el plásmido se analizaron por secuenciación. El DNA plasmídico de las clonas seleccionadas se extrajo a gran escala usando el kit NucleoBond Xtra Midi Plus (Macherey-Nagel). Para ello 300 ml de medio LB-ampicilina con *E. coli* a una densidad óptica de 0.600 OD se centrifugó y el botón celular se resuspendió con 8 ml del Buffer RES, después se

añadieron 8 ml de Buffer LYS para la lisis celular y se incubó durante 5 min a temperatura ambiente. Pasado ese tiempo se agregaron 8 ml del Buffer NEU para neutralizar la reacción. El lisado se agregó a una columna de purificación equilibrada con 12 ml del Buffer EQU y posteriormente se lavó con 5 ml del mismo buffer. Se agregaron 8 ml del buffer ELU para recuperar el DNA de plásmido. Al tratarse de un volumen muy grande, la muestra se precipitó con 3.5 ml de isopropanol y se pasó por un finalizador NucleoBond colocado en una jeringa. El DNA se volvió a recuperar pasando 500  $\mu$ l del Buffer TRIS por el finalizador. El DNA de alta pureza obtenido para transfección se linearizó con la enzima *NotI* para permitir su integración en el genoma del parásito (Liang, 2003).

## **6. Transfección de *T. brucei***

Se transfectaron  $10 \times 10^7$  cél en fase media logarítmica mediante electroporación. Después de centrifugar a 6,000 g por 5 min a 4°C las células se resuspendieron en 500  $\mu$ l de buffer Cytomix (HEPES 25 mM pH 7.6, KCl 120 mM, 15 CaCl<sub>2</sub>, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 10 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 10 mM pH 7.6, EDTA 2 mM, MgCl<sub>2</sub> 5 mM) se incubaron a 4°C por 10 min con 10  $\mu$ g de DNA plasmídico linearizado y posteriormente se dio un pulso de 1500 V, 500  $\Omega$  y 50  $\mu$ F por 100  $\mu$ s en un electroporador ECM 630 *Electroporation System* (BTX). 24 h después de la electroporación los parásitos transfectados se seleccionaron con blasticidina a una concentración de 10  $\mu$ g/ml. La inducción del sistema de interferencia se realizó con doxiciclina (un análogo de la tetraciclina) a 2  $\mu$ g/ml (Shi, 2000).

### **6.1. Clonación celular de parásitos transfectados**

Una vez seleccionada y recuperada la población transfectada, la clonación celular se llevó a cabo por dilución en serie o limitada. En una placa de 96 pozos se agregaron 100  $\mu$ l de medio SDM-79 (15 % de SFB, 50  $\mu$ g/ml de higromicina, 15  $\mu$ g/ml de neomicina) y el antibiótico de selección correspondiente (blaticidina a 50  $\mu$ g/ml) a cada pozo. En el pozo A1 se inocularon 1,000 parásitos en fase media logarítmica en 100  $\mu$ l de medio fresco. Para hacer las diluciones se tomaron los 100  $\mu$ l del pozo A1 y se depositaron en el



siguiente pozo B1. Este procedimiento se repitió hasta completar la columna en el pozo H1. Utilizando una pipeta multicanal se hicieron las diluciones en el resto de la placa tomando 100  $\mu$ l de cada pozo e inoculándolo en la columna siguiente hasta completar todas las columnas. La placa se incubó a 28°C en una atmósfera con 5% de CO<sub>2</sub> y se monitoreó diariamente hasta que se observó crecimiento en algunos de los pozos, lo cual ocurrió generalmente después de 3 semanas. Las clonas seleccionadas se tomaron de su inóculo inicial de 100  $\mu$ l y se llevaron a un volumen final de 500  $\mu$ l con medio fresco con los correspondientes antibióticos en una placa de 24 pozos donde se mantuvieron hasta alcanzar densidades de 20 $\times$ 10<sup>6</sup> cél/ml, para entonces cultivarse en cajas de cultivo de 25 cm<sup>3</sup>.

## **6.2. Monitoreo del crecimiento de parásitos de sobre-expresión de Maf1**

Se iniciaron cultivos de parásitos transfectados en fase media logarítmica a una densidad inicial de 2 $\times$ 10<sup>6</sup> cél/ml. A uno de los cultivos se le agregó doxiciclina a una concentración final de 2  $\mu$ g/ml para inducir la expresión de la doble cadena de RNA (para los parásitos RNAi) o la expresión de la copia exógena del gen de Maf1 (para los parásitos de sobre-expresión). Como controles se mantuvieron cultivos transfectados no inducidos. Los cultivos se contaron diariamente a la misma hora aproximadamente y se diluyeron a la densidad inicial de 2 $\times$ 10<sup>6</sup> cél/ml. La dilución se hizo con la finalidad de que el cultivo continuara dividiéndose, pues las altas densidades celulares que se alcanzan después de 48 h comprometerían la disponibilidad de nutrientes en el cultivo. Por otro lado, la dilución diaria de los cultivos facilita el conteo de los parásitos, evitando errores que se presentan al contar cultivos muy densos (Bellofatto, 2008). El procedimiento se realizó durante 10 días consecutivos y los datos obtenidos se recolectaron, se graficaron y se analizaron estadísticamente (Alsford, 2011). El análisis de los datos se realizó obteniendo para cada día el número acumulativo de células. Así es como en la literatura se presentan los datos para este tipo de experimentos en *T. brucei*, ya que así es posible observar diferencias entre cultivos inducidos y no inducidos cuando se trabaja con genes esenciales (Alsford, 2005).

## **7. Extracción de RNA total**

El RNA total se extrajo por el método del TRIzol. Brevemente, se centrifugaron  $1 \times 10^8$  células en fase media logarítmica a 14,000 g durante 10 min a 4°C; las células se resuspendieron en 1.5 ml de reactivo TRI (Sigma) a las cuales se les adicionó 400  $\mu$ l de cloroformo y se centrifugaron durante 15 min a 20,000 g a 4°C. Se recuperó la fase acuosa y después de adicionar 500  $\mu$ l de isopropanol se centrifugó por 10 min a 20,000 g a 4°C. La pastilla obtenida se precipitó con 1 ml de etanol absoluto y se resuspendió en 100  $\mu$ l de agua tratada con dietilpircabonato (DEPC) (Invitogen).

### 7.1. Ensayos RT-PCR

Se trataron 10  $\mu$ g de RNA con 1 U de DNAsa I (Ambion) por 30 min a 37°C en un vol de 50  $\mu$ l. Pasado este tiempo se agregaron 0.1 vol del agente inactivador y se incubó a temperatura ambiente por 2 min. Se centrifugó por 1.5 min a 16,000 g y se transfirió el RNA tratado a un tubo nuevo. A un total de 50  $\mu$ g de RNA tratado se le agregó una mezcla de buffer 2 $\times$ , 10  $\mu$ M de cada oligonucleótido específico para el amplicón de interés (Tabla 3) y 200 U de la mezcla de enzimas SuperScript III RT/Platinum Taq (Invitrogen) en un volumen final de 50  $\mu$ l. La reacción se llevó a cabo como sigue: 1 ciclo de 50°C por 30 min, 1 ciclo de 94°C por 2 min, seguido de 40 ciclos de 94°C por 15 s, 30 s de alineamiento a 55°C y 45 s de polimerización a 72°C. Como control negativo se agregó a la mezcla 1 U de enzima Platinum Taq. Los productos de amplificación se resolvieron por electroforesis en geles de agarosa al 2% teñidos con bromuro de etidio al 0.05%.

Oligonucleótido	Secuencia 5'-3'
Maf8-HindS	AAGCTTTTCTAATGGAGTTCGTC
Maf1-BamHI	GGATCCTCACGGGCGATAATAATA
Alfa-tub-5'	AGAAGTCCAAGCTCGGCTACAC
Alfa-tub-3'	GTAGTTGATGCCGCACTTGAAG

**Tabla 3.** Oligonucleótidos usados en los experimentos RT-PCR

## 8. Experimentos tipo Northern blot

Para el análisis del mRNA de Maf1 en la sobre-expresión inducible, 10 µg de RNA total se desnaturalizaron a 60°C con 10 µl de formamida durante 2 min. Después, se fraccionó mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1.2%. Terminada la corrida el gel se sumergió en una solución de NaOH 7.5 mM por 10 min en agitación, repitiendo el lavado con solución fresca por otros 10 min. El RNA se transfirió mediante capilaridad ascendente a una membrana de nylon Hybond-XL (Amersham, GE) durante 20 h en buffer NaOH 7.5 mM. Después de la transferencia, la membrana fue neutralizada en buffer SSC 2× durante 5 min, se dejó secar a temperatura ambiente y los ácidos nucleicos se fijaron mediante radiación con UV en un Stratalinker 800 con 1.2 Kj. El filtro se hibridó con 2×10<sup>6</sup> de cuentas por minuto (cpm) de la sonda radioactiva en 25 ml de solución de hibridación II (SDS 7%, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.5 M pH 7.2, Dextrán sulfato 2%) durante 20 h a 55°C. El filtro se lavó dos veces a 60°C en SDS 0.1% y SSC 0.5× por 30 min. Después del secado de los filtros a temperatura ambiente se expusieron en una placa de phosphorimager por 72 h. Finalmente, la placa se escaneó en un sistema phosphorimager (Fujifilm) y la densitometría se realizó con el programa ImageJ64 (versión 2.1.4.6, NIH).

## **9. Marcaje de sondas radioactivas**

Los diferentes fragmentos que se usaron como sonda de hibridación se indican en la tabla 4. Éstos se obtuvieron a partir de purificación de gel de agarosa usando el kit NucleoSpin Plasmid QuickPure (Machery-Nagel) después de su liberación del vector pGEMT-Easy. Para marcar radioactivamente 150 ng de DNA se utilizaron 50 µCi de [α-<sup>32</sup>P]-CTP mediante la técnica de marcaje al azar usando el Kit High Prime (Roche). Para ello el DNA desnaturalizado se mezcló con 4 µl de la mezcla de reacción High Prime y 3 µl de la mezcla de dATP, dGTP y dTTP. Después de agregar el nucleótido radioactivo en la cantidad indicada la mezcla se incubó por 20 min a 37°C. La reacción se detuvo al añadir 2 µl de EDTA 0.2 mM. Los nucleótidos no incorporados se eliminaron con columnas de sefadex G-50 (ProbeQuant G-50, Amersham, GE) colocando la muestra en una columna de purificación previamente resuspendida y centrifugándola por 2 min a 735 x g. La

sonda radioactiva se recuperó y se almacenó a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

Sonda	Tamaño (pb)	Ubicación
Maf1 ORF	543	Del nucleótido 90 al 632 del ORF de Maf1
$\alpha$ -tubulina	584	De nucleótido 488 al 1049 del ORF del gen $\alpha$ -tubulina
Maf1-4 UTR	304	Del nucleótido 13 al 317 del UTR 3' de Maf1-4
Maf1-8 UTR	286	Del nucleótido 8 al 304 del UTR 3' de Maf1-8

**Tabla 4.** Sondas radioactivas utilizadas en este trabajo

## 10. Obtención del anticuerpo TbMaf1

### 10.1. Clonación del marco abierto de lectura de Maf1

El marco abierto de lectura del gen TbMaf1-8 se amplificó a partir de DNA genómico de *T. brucei* por PCR utilizando los oligonucleótidos señalados en la Tabla 6. Cada oligonucleótido contiene una secuencia de reconocimiento de enzimas de restricción diferentes para facilitar la posterior sub-clonación de la región deseada. La amplificación se llevó a cabo usando 1 U de la DNA polimerasa KAPA (KAPA Biosystems), buffer de reacción B 1 $\times$ ,  $\text{MgCl}_2$  1 mM; 25 mM de cada dNTP, oligonucleótido sentido 10  $\mu\text{M}$ , oligonucleótido antisentido 10  $\mu\text{M}$  y DNA genómico 100 ng, en un volumen final de 50  $\mu\text{l}$ . El termociclador Corbet Research se programó con un ciclo previo de desnaturalización a  $94^{\circ}\text{C}$  por 5 min, seguido de 35 ciclos de 30 s a  $94^{\circ}\text{C}$  de desnaturalización reversible del DNA, 30 s a  $55^{\circ}\text{C}$  para permitir la alineación de los oligonucleótidos, un ciclo de 45 s a  $72^{\circ}\text{C}$  para la polimerización y un ciclo final de 7 min a  $72^{\circ}\text{C}$  para la polimerización complementaria.

Oligonucleótido	Secuencia 5'-3'
Maf1BamHls	CGGGATCCATGGAGTTCGTCCCCCTCGAG
Maf1NotIas	ATAGTTTAGCGGCCGCTCACGGGCGATAATAATAATG

**Tabla 6.** Oligonucleótidos utilizados para clonar a Maf1 en vector de expresión

### 10.1.1. Clonación de TbMaf1-8 en el vector pGEMT-Easy

Para permitir la fusión del amplicón al vector pGEMT-Easy (Promega) se purificó el fragmento utilizando el Kit NucleoSpin Extract II (Machery-Nagel). Para la reacción de ligación se usó 1 U de la enzima T4 ligasa (Promega) en buffer de reacción 1× y se incubó por 12 h a 4°C. El plásmido resultante se transformó mediante choque térmico en células competentes de *E. coli* JM109 de alta eficiencia (Promega) con la metodología antes indicada. Las colonias obtenidas se inocularon en 5 ml de medio LB con ampicilina y se crecieron a 37°C a 220 rpm. De estos cultivos se extrajo DNA plasmídico usando el Kit NucleoSpin Plasmid QuickPure (Macherey-Nagel). El DNA obtenido se analizó mediante enzimas de restricción y por secuenciación.

### 10.1.2. Subclonación del gen TbMaf1-8 en el vector pGEX-4T3

El fragmento deseado se subclonó en el vector de expresión pGEX-4T3 (GE Healthcare) previamente digerido con las enzimas *Bam*HI y *Not*I (New England Biolabs). Estas mismas enzimas se utilizaron para liberar al gen de Maf1-8 del vector de clonación siguiendo las recomendaciones del fabricante. El inserto se purificó a partir de gel de agarosa haciendo uso del kit NucleoSpin Extract II (Machery-Nagel). Una vez obtenido el DNA de alta pureza se realizó la ligación utilizando 1 U de la enzima T4 ligasa (Promega) en buffer de reacción 1× y la reacción se incubó por 12 h a 4°C .

El vector pGEX-4T3 permite la fusión del gen de interés a una bandera de Glutación-S-transferasa en el extremo amino terminal. La construcción resultante de la ligación, a la que se le llamó pGST-TbMaf1 se transformó en bacterias competentes de *E. coli* JM109 con el procedimiento antes descrito. Las colonias bacterianas que contenían el plásmido con las construcciones deseadas se

analizaron por secuenciación después de obtenerse DNA plasmídico de alta pureza con el kit NucleoSpin Plasmid QuickPure (Macherey-Nagel).

## **10.2. Obtención de la proteína recombinante GST-TbMaf1**

### **10.2.1 Inducción de la proteína recombinante**

Una colonia bacteriana que contenía el plásmido pGST-TbMaf1 se inoculó en 50 ml de medio LB con ampicilina y se creció durante 18 h a 30°C a 220 rpm. Pasado este tiempo, 10 ml de este cultivo se inocularon en 1 L de medio LB con ampicilina y se incubó a 30°C, 220 rpm hasta alcanzar una densidad óptica a 600 nm de 0.6. La inducción de la proteína recombinante se permitió al agregar isopropil-D-tiogalactosa (IPTG) a una concentración final de 0.5 mM. Debido a que la expresión del gen fusionado a la bandera de GST en el vector pGEX-4T3 está bajo el control del promotor *lac*, al añadir un análogo de la lactosa, IPTG, se permite la transcripción del GST fusionado al gen de Maf1-8. Este cultivo se incubó 4 h a 30°C a 220 rpm. Concluido este tiempo las bacterias se centrifugaron durante 20 min a 8,000 g a 4°C. El sobrenadante se eliminó y la pastilla con las bacterias inducidas se utilizó para purificar la proteína recombinante.

### **10.2.2. Purificación de la proteína GST-TbMaf1**

La pastilla con las bacterias inducidas se resuspendió en 50 ml de buffer salino con fosfatos o PBS (NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 10 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.8 mM) 1× frío y lisozima 100 µg/ml, se dejó incubar por 15 min a 4°C. A esta mezcla se le adicionó DTT a una concentración final de 100 mM y sarcosyl 10%, se agitó por 5 s y posteriormente las bacterias se lisaron por sonicación en un aparato Sonios Vibra-Cell 3 con 3 ciclos de 1 min (50 de amplitud, ciclos de 10 seg) a 4°C. Entre cada ciclo se permitió 1 min de reposo para evitar que se calentara la muestra y desnaturalizaran las proteínas. El lisado resultante se centrifugó por 30 min a 16,000 g a 4°C. El sobrenadante que contenía la proteína de interés se recuperó y se filtró a través de una membrana de 0.45 µm y se le agregó Tritón X-100 a una concentración final al 10%. A este sobrenadante se le agregaron 600 µl de perlas

Glutathione Sepharose 4B (Amersham Biosciences) y se mantuvo en agitación durante 18 h a 4°C. Las perlas se sedimentaron por centrifugación durante 5 min a 4,000 g a 4°C, se lavaron 5 veces durante 10 min con PBS 1× y la proteína fusionada a GST se liberó de las perlas al adicionar 1 vol de buffer Laemmli y manteniendo la muestra a 100°C por 5 min. La proteína recombinante se resolvió en un gel discontinuo SDS-PAGE al 10 % para confirmar la expresión de la proteína de interés en el tamaño esperado. Para esto, una vez terminada la corrida del gel de poliacrilamida, éste se fijó y tiñó con azul brillante de Coomasie (metanol: ácido acético glacial: agua, en una proporción 50:10:40 vol/vol) por 1 h en agitación constante. Posteriormente, el gel se sumergió en solución de destinción (ácido acético 7%, etanol 25%). Una vez confirmada su expresión de la proteína GST-TbMaf1, la banda correspondiente al peso esperado se seccionó del gel de poliacrilamida y maceró haciéndolo pasar por diferentes calibres de agujas y agregándole PBS 1× hasta quedar en solución semi-líquida.

### **10.3. Inoculación de ratones con GST-TbMaf1 y obtención del anticuerpo anti-TbMaf1**

Se seleccionaron 6 ratones BALB/C hembras de 4 semanas de edad para estos experimentos. El manejo de los ratones contó con la aprobación de la Comisión Institucional para Cuidado Animal (CICUAL) del Centro de Investigación y Estudios Avanzados (CINVESTAV) del Instituto Politécnico Nacional. Antes de iniciar las inoculaciones se obtuvo suero de cada uno de los ratones para usarlo en ensayos de *Western blot* y corroborar que todos los individuos fueran útiles para la obtención del anticuerpo. A este suero se le denominó pre-inmune. El anticuerpo policlonal anti-TbMaf1 se obtuvo inoculando a los ratones intraperitonealmente con 30 µg de la proteína GST-TbMaf1 junto con adyuvante de Freund completo (Sigma) en proporción 1:1 en la primera inoculación y adyuvante de Freund incompleto (Sigma) en la misma proporción en las inoculaciones posteriores con intervalo de 10 días cada una hasta completar un total de 4 inoculaciones. El suero de los ratones se colectó 10 días después de la última inoculación y se utilizó en ensayos de *Western blot* con extractos totales de *T. brucei* para confirmar su especificidad antes de usarlo en el resto de los experimentos.

## 11. Experimentos tipo *Western blot*

Para evaluar si la proteína TbMaf1 disminuía por el *knock-down* de Maf1 o aumentaba por la sobre-expresión se utilizaron de 50 a 80 µg de proteína total. Para el análisis de la localización celular de TbMaf1 se utilizaron cantidades similares de proteína nuclear y citoplasmática. Para la comprobación de la producción de proteínas recombinantes se utilizó un lisado total de 1 ml de cultivo de bacteria o de 60-90 µg de proteína total de parásitos transfectados. Las proteínas a analizar se resuspendieron en buffer Laemmli 1× (2-mercaptoehanol 0.1%, azul de bromofenol 0.0005%, glicerol 10%, SDS 2%, Tris-HCl 63 mM pH 6.8) y se separaron mediante electroforesis en un gel desnaturizante de poliacrilamida en condiciones reductoras (SDS-PAGE) discontinuo conformado por gel separador (acrilamida-bis acrilamida 10%, Tris 0.375 M pH 8.8, SDS 0.1%, persulfato de amonio (PSA) 0.05%, TEMED 0.005%) y gel concentrador (acrilamida-bis acrilamida 4%, Tris 0.375 M pH 6.8, SDS 0.1%, PSA 0.05%, TEMED 0.005%) en buffer de corrida 1× (glicina 14.4 g, Tris 3 g, 10 ml de SDS 10% en un volumen final de 1 L) . Al término de la corrida las muestras de proteínas se transfirieron a una membrana de polifluoruro de vinilideno o PVDF (*Immun-Blot® PVDF Membrane For Protein Blotting* de Bio-Rad) en buffer de transferencia 1× (Tris 25 mM, glicina 192 mM, SDS 3.5 mM, metanol 20%) a 90 V durante 2 h a 4°C. Para corroborar la eficiencia de la transferencia, al término de ésta la membrana se tiñó con una solución de rojo de Ponceau 0.5% y ácido acético 2%. La membrana con las proteínas contenidas se bloqueó en solución de bloqueo (leche libre de grasa 5%, Tween-20 0.05% en PBS) durante 2 h a temperatura ambiente en agitación constante. El anticuerpo primario (Tabla 4) se incubó durante 20 h a 4°C en agitación constante a la dilución correspondiente en solución PBS-T (leche libre de grasa 2%, Tween-20 0.05% en PBS). Pasado este tiempo la membrana se lavó 3 veces por 10 min en solución PBS-T para incubar el anticuerpo secundario correspondiente (Tabla 4) por 2 h a temperatura ambiente en solución PBS-T en agitación constante. Finalmente, se realizaron 3 lavados con solución PBS-T durante 10 min en agitación. Para identificar la señal de las proteínas buscadas la membrana se incubó durante 1 min en una mezcla volumen a volumen de los reactivos 1 y 2 del kit ECL (Amersham™ ECL™ *Western Blotting Detection Reagents* de GE



Healthcare) antes de exponerlas a una película autorradiográfica (Amersham Hyperfilm™ MP de GE Healthcare) en oscuridad. Para revelar la señal se utilizaron soluciones de revelado y fijación (Kodak) y las placas se escanearon en un sistema de documentación BioSens SC 645 (Shanghai Bio-Tech). De forma alternativa se utilizó el sistema ChemiDocMP (BioRad) para capturar la señal quimioluminiscente. Para realizar la densitometría de las señales obtenidas se utilizó el programa Image J64.

Anticuerpo	Dilución	Tipo	Organismo de procedencia
α-GST (casero)	1:50000	Policlonal	Ratón
α-TbMaf1 (casero)	1:2500	Policlonal	Ratón
α-H3K18ac (Abcam)	1:25000	Policlonal	Conejo
α-PfAldolasa (Abcam)	1:25000	Policlonal	Conejo
α-β tubulina (Invitrogen)	1:1000	Policlonal	Ratón
α-ProtC (Delta Biolabs)	1:200	Policlonal	Conejo
α-Ratón-HRP (Biolegend)	1:7500	Policlonal	Cabra
α-Conejo-HRP (Biolegend)	1:7500	Policlonal	Burro

**Tabla 5.** Anticuerpos utilizados en este trabajo

## 12. Ensayos de *run-on* nuclear

Para conocer el impacto del *knock-down* y de la sobre-expresión de Maf1 en la transcripción, se aislaron núcleos de  $250 \times 10^6$  células de *T. brucei* en fase media logarítmica. Para ello, las células se resuspendieron en buffer de lisis (Tris-HCl 10 mM pH 7.5, CaCl<sub>2</sub> 3 mM, MgCl<sub>2</sub> 2 mM, NP-40 0.5%). Las células se rompieron usando un homogenizador de mazo de teflón. Los núcleos se recuperaron y se resuspendieron en 100 µl de buffer run-on mix (Tris-HCl 100 mM pH 7.5, glicerol 25%, espermidina 0.15 mM, DTT 2 mM, RNasin 40 U (Promega), MgCl<sub>2</sub> 2 mM, MnCl<sub>2</sub> 4

mM, NaCl 50 mM, KCl 50 mM, ATP 2 mM, GTP 2 mM, UTP 2 mM, CTP 10  $\mu$ M y 300  $\mu$ Ci de [ $\alpha$ - $^{32}$ P]-CTP) y se incubaron a 26°C por 6 min. Después de agregar 10 U de DNasa I se incubó la mezcla por 5 min a 37°C. El RNA total se extrajo usando fenol-cloroformo y se separaron los nucleótidos no incorporados con columnas de sefadex G-50 (ProbeQuant G-50, Amersham, GE) siguiendo las recomendaciones del producto. El RNA marcado se usó para hibridar los filtros previamente preparados durante 48 h a 50°C en 25 ml de solución de hibridación. Se realizaron 3 lavados de los filtros radioactivos en SDS 0.1% y SSC 1 $\times$  cada uno a 65°C por 30 min. Después del secado de los filtros a temperatura ambiente se expusieron a una placa de phosphorimager por 48 h, la cual se escaneó en un sistema phosphorimager (Fujifilm). La densitometría se realizó con el programa ImageJ64.

### **12.1. Experimento tipo *Dot blot***

Cada filtro contenía DNA de doble cadena (dsDNA) correspondiente a genes transcritos por las tres RNA Polimerasas (clonados en el vector pGEM-T Easy). Para ello, cada uno de los plásmidos generados se fijó a filtros de nylon (Hybond-XL, Amersham, GE) por la técnica de *Dot blot*. Brevemente, 2  $\mu$ g de dsDNA se desnaturalizó bajo condiciones alcalinas con NaOH 1 N y se hirvió por 10 min. Para neutralizar la reacción se añadió SSC 6 $\times$  y se mantuvo a 4°C. Cada una de las muestras se aplicó en una ranura del aparato de microfiltración Bio-Dot SF (BioRad) para someterlas a bajo vacío provisto por un aspirador de agua. El filtro se lavó 1 vez con SSC 6 $\times$  y se aplicó vacío nuevamente. El dsDNA se fijó covalentemente al filtro de nylon usando luz ultravioleta en el Stratalinker 800 con 1.2 Kj y se almacenó a 4°C.

## **13. Obtención de parásitos que expresan a TbMaf1 fusionado a PTP**

### **13.1. Clonación del extremo 3' del marco abierto de lectura de TbMaf1-8**

Los últimos 486 nucleótidos del marco abierto de lectura del gen Maf1-8 se amplificaron por PCR a partir de DNA genómico de *T. brucei* utilizando los

oligonucleótidos señalados en la Tabla 7. Cada oligonucleótido contiene una secuencia de reconocimiento de enzimas de restricción diferentes para facilitar la posterior sub-clonación de la región deseada. Además, el oligonucleótido reverso contiene bases adicionales para asegurar que el gen clonado quedara en marco con la bandera PTP. La amplificación se llevó a cabo usando la enzima KAPA con las condiciones anteriormente descritas en el termociclador Corbet Research programando un ciclo de 94°C por 5 min, seguido de 35 ciclos de 30 s a 94°C, 30 s a 55°C, 45 s a 72°C y un ciclo final de 7 min a 72°C.

Oligonucleótido	Secuencia 5´-3´
Maf18-C-PTP-ApaI-S	GGGCCCCTAACAGCATTATGGTGAG
Maf18-C-PTP-NotIas	GCGGCCGCGCCGGGCGATAATAATAATGTAC

**Tabla 7.** Oligonucleótidos utilizados para amplificar el extremo 3´ de Maf1

### 13.2. Clonación del amplicón en el vector pGEMT-Easy

El amplicón obtenido se purificó con el Kit NucleoSpin Extract II (Machery-Nagel) y se unió al vector pGEMT-Easy (Promega) en una reacción de ligación con las condiciones anteriormente descritas. El plásmido resultante se transformó mediante choque térmico en células competentes de *E. coli* JM109 de alta eficiencia (Promega) con la metodología antes indicada. Las colonias obtenidas se inocularon en 5 ml de medio LB con ampicilina y se crecieron a 37°C a 220 rpm. De estos cultivos se extrajo DNA plasmídico usando el Kit NucleoSpin Plasmid QuickPure (Macherey-Nagel). El DNA obtenido se analizó mediante enzimas de restricción y por secuenciación.

### 13.3. Subclonación del extremo 3´ del marco abierto de lectura de Maf1-8 en el vector pC-PTP-Bla

El fragmento deseado se subclonó en el vector pC-PTP-Bla previamente digerido con las enzimas *ApaI* y *NotI* (New England Biolabs). Estas mismas enzimas se utilizaron para liberar al gen de Maf1-8 del vector pGEMT-Easy, el cual fue purificado a partir de un gel de agarosa con el kit NucleoSpin Extract II (Machery-

Nagel) y utilizado en una reacción de ligación con el vector antes mencionado.

El vector pC-PTP-Bla permite la fusión del gen de interés a una bandera de PTP (ProtC-TEV-ProtA) en el extremo carboxilo terminal (Schimanski, 2005). Esta bandera consiste, como lo indican sus siglas en dos dominios de unión a la inmunoglobulina G (IgG) de la proteína A de *Staphylococcus aureus* (Prot A) seguido de regiones espaciadoras y un sitio de corte de la proteasa del virus del mosaico del tabaco (TEV por *tobacco etch virus*) y el epítipo corto de 12 aminoácidos de la proteína C (ProtC), derivado de la proteína C humana producida en hepatocitos. La construcción resultante de la ligación, pC-Maf1-PTP, se transformó en bacterias competentes de *E. coli* JM109 y las colonias bacterianas que contenían el plásmido con las construcciones deseadas se analizaron por secuenciación después de obtenerse DNA plasmídico de alta pureza con el kit NucleoSpin Plasmid QuickPure (Macherey-Nagel). Después de comprobar que el gen Maf1-8 se encontraba en marco con la bandera PTP, el plásmido fue digerido con la enzima NcoI, cuya secuencia de reconocimiento se encuentra en el nucleótido 230 de la región 3' del marco abierto de lectura de Maf1-8, lo que permite linearizar el plásmido pC-Maf1-PTP y promover la integración del vector en una de las copias del gen de Maf1 en el parásito ( Lee, 1990). El plásmido fue transfectado en parásitos *T. brucei* 23-13 con la metodología descrita anteriormente y seleccionados con blasticidina a una concentración de 10 µg/ml. Después de recuperar una población estable, los parásitos se clonaron por dilución limitada como se describió antes. A estos parásitos se les denominó TbMaf1-PTP

#### **13.4. Corroboración de la correcta integración al genoma del vector pC-Maf1-PTP**

Para comprobar que el vector transfectado se hubiera integrado a la región deseada se extrajo DNA genómico de 2 clonas de parásitos TbMaf1-PTP con el método ya descrito y se utilizó en reacciones de PCR utilizando el oligonucleótido Maf1BamHIs (Tabla 5), que alinea en el inicio del gen de Maf1, y el oligonucleótido TEV3` (GCTCACCCCTGAAAATACAAATTCTC) que alinea dentro de la región TEV en la bandera PTP. La región amplificada con este par de

oligonucleótidos sólo estaría contenida en el DNA genómico de parásitos transfectados que hayan integrado la bandera PTP en el extremo 3' en alguna de las copias de Maf1. La amplificación se llevó a cabo usando la enzima KAPA con las condiciones anteriormente descritas en el termociclador Corbet Research programando un ciclo de 94°C por 5 min, seguido de 35 ciclos de 30 s a 94°C, 30 s a 60°C, 60 s a 72°C y un ciclo final de 7 min a 72°C.

#### **14. Experimentos tipo Southern blot**

Se trataron 5 µg de DNA genómico proveniente de parásitos TbMaf1-PTP con las enzimas de restricción *Agel*, *BamHI*, *MfeI* y *SphI* (New England Biolabs) de acuerdo a las recomendaciones del fabricante y después se fraccionó mediante electroforesis en un gel de agarosa al 0.8%. Una vez terminada la corrida el gel se lavó durante 2 min con agua desionizada y posteriormente fue sumergido en solución despurinizante (HCl 4.4 ml en 400 ml volumen final) durante 10 min en agitación, se lavó en dos ocasiones con agua desionizada antes de tratarlo con solución neutralizante (NaCl 35.6 g, Tris 26.64 g en 400 ml de agua, pH 7) durante 30 min en agitación. Finalmente el gel se transfirió mediante capilaridad a una membrana de nylon Hybond-XL (Amersham, GE) con buffer SSC 10×, en las condiciones descritas anteriormente. Los filtros se hibridaron con  $3 \times 10^6$  cpm de la sonda radioactiva en 25 ml de solución de hibridación I y se realizaron 3 lavados en SDS 0.1% y SSC 1×, cada uno a 65°C por 30 min. Después del secado de los filtros a temperatura ambiente se expusieron en una placa de phosphorimager por 24 h. Finalmente, la placa se escaneó en un sistema phosphorimager (Fujifilm).

#### **15. Inmunofluorescencia Indirecta**

Para conocer a localización celular de TbMaf1-PTP, parásitos en fase media logarítmica se centrifugaron a 5,000 g por 10 min y se resuspendieron en PBS 1× a una densidad de 300,000 células/µl. Aproximadamente  $1.5 \times 10^6$  células se expandieron sobre un portaobjetos previamente tratado con Poli-L-lisina y después de permitir que sedimentaran por 15 min a temperatura ambiente, se fijaron con paraformaldehído al 4% durante 30 min a 4°C. Las células se

permeabilizaron con Tritón X-100 al 0.05% por 2 min exactos a temperatura ambiente y se bloquearon con solución de bloqueo (BSA 2%, gelatina de peces de agua fría 1%) incubando 1 h a temperatura ambiente en cámara húmeda. El anticuerpo primario ( $\alpha$ -ProtC conejo, Delta Biolabs) se incubó a una dilución de 1:25 en solución de bloqueo, incubando 1 hora a temperatura ambiente. Posteriormente se realizaron 3 lavados con PBS 1 $\times$  y 2 lavados con PBS-T durante 5 min cada uno. El anticuerpo secundario (Alexa488 cabra anti-conejo, Life technologies) se incubó a una dilución de 1:300 en solución de bloqueo durante 1 h a temperatura ambiente en cámara húmeda en oscuridad. Se repitió la serie de lavados antes descritos en oscuridad y se cubrió con Vectashield con DAPI (Vector Laboratories INC). Las imágenes se obtuvieron con un equipo Axio Vert.A1, cámara AxioCam MRc (Zeiss) y fueron procesadas con los programas ZEN 2 e Image J64.

## **16. Inmunoprecipitación de la cromatina**

Se utilizaron  $1 \times 10^8$  parásitos Tb-Maf1-PTP en fase media logarítmica, los cuales se centrifugaron a 6,000 g por 10 min a 4°C y se fijaron con solución de formaldehído al 1% incubando por 5 min a 37°C. La reacción se detuvo con 110  $\mu$ l de glicina 1.25 M a temperatura ambiente por 5 min en rotación. Después de realizar 2 lavados con PBS a 4°C la muestra se resuspendió en buffer de lisis (Tris 10 mM pH 8, CaCl<sub>2</sub> 3 mM, MgCl<sub>2</sub> 2 mM, inhibidores de proteasas 1 $\times$ ) y se sonicó en un equipo tipo politrón Vibra Cell VXCX130 (Sonics) con 40% de amplitud con ciclos de 15 s con 15 s de descanso durante 8 min a 4°C. Para eliminar los restos celulares se hizo un gradiente de sacarosa 0.34 M y se centrifugó por 5 min a 4°C a 16,000 g. La muestra colectada se resuspendió en buffer de sonicación (SDS 1%, EDTA 10 mM, Tris 50 mM pH 8) y se sometió a sonicación en un equipo Bioruptor Standard sonication (Diagenode) por 10 ciclos de 30 s con 30 s de descanso en nivel alto a 4°C. Terminados los ciclos, la muestra se centrifugó a 16,000 g por 10 min a 4°C y se diluyó 10 veces con buffer de dilución de cromatina (SDS 0.01%, Tritón X-100 1%, EDTA 1.2 mM, Tris 16.7 mM pH 8, NaCl 167 mM, inhibidores de proteasas 1 $\times$ ) y se incubó por 1 h a 4°C en rotación constante con perlas de proteína A/C (Santa cruz Biotechnology). Pasado el tiempo de incubación la muestra se centrifugó a

6,000 g por 1 min a 4°C y se recuperó el sobrenadante, al cual se le agregaron 2.5 µl de anticuerpo anti-Proteína A (Sigma) para incubarse durante 20 h en rotación a 4°C. Después de este tiempo se agregaron perlas de proteína A/G y 2 µg de DNA de esperma de salmón sonicado (Invitrogen) y se incubaron en rotación a 4°C por 2 h. El complejo perlas-anticuerpo-cromatina se lavó durante 5 min en rotación a 4°C con los siguientes buffers (1 lavado con cada buffer): *Low Salt Immune Complex Wash Buffer* (SDS 0.1 %, Tritón X-100 1 %, EDTA 2 mM pH 8.0, Tris 20 mM pH 8, NaCl 150 mM), *High Salt Immune Complex Wash Buffer* (SDS 0.1 %, Tritón X-100 1 %, EDTA 2 mM pH 8, Tris 20 mM pH 8, NaCl 500 mM), *LiCl Immune Complex Wash Buffer* (LiCl 0.25 M, NP-40 1 %, Deoxicolato 1 %, EDTA 1 mM pH 8.0, Tris-HCl 10 mM pH 8). Finalmente se lavó en 2 ocasiones con buffer TE (Tris 10 mM pH 8, EDTA 1 mM H 8.0). Entre cada lavado se centrifugó por 1 min a 6,000 g a 4°C. Para la elución de los complejos se agregaron 100 µl de buffer de elución (SDS 1 %, NaHCO<sub>3</sub> 100 mM) y se incubaron a temperatura ambiente por 15 min, recuperando el sobrenadante por centrifugación a 6,000 g por 1 min. Este procedimiento se repitió para recuperar 200 µl totales. Con la finalidad de revertir la fijación de las proteínas al DNA el material recuperado se incubó a 65°C por 20 h con 8 µl de NaCl 5 M; pasado este tiempo se incubó por 1 h a 37°C con 1 U de RNasa A (Invitrogen) y finalmente se agregaron 4 µl EDTA 0.5 M, 8 µl Tris 1 M pH 6.5, 4 µl proteinasa K 10mg/ml y se incubó durante 1 h a 45°C. Para purificar el DNA inmunoprecipitado se realizó una extracción con fenol-cloroformo y se resuspendió en 20 µl de agua desionizada.

### 15.1. PCR en tiempo real cuantitativo

Para analizar el DNA inmunoprecipitado se utilizó el kit Platinum SYBR Green qPCR Super-Mix-UDG (Invitrogen) con las siguientes condiciones de reacción: 2 ng de DNA inmunoprecipitado como templado, 7.5 µl de la solución Super-Mix, 0.3 µl de cada uno de los oligonucleótidos sentido y antisentido que se encuentran a una concentración de 10 µM, en un volumen final de 15 µl. Los oligonucleótidos usados en estos experimentos se resumen en la tabla 6. Los parámetros fijados en el termociclador Corbett Research Rotor Gene 3000 fueron: un ciclo de 50°C por 2 min, seguido de un ciclo de 95°C por 2 min y 40 ciclos de: 95°C por 15 s, 60°C por

30 s , 72°C por 30 s. Todas las reacciones se realizaron por triplicado y la especificidad de la amplificación fue analizada con las curvas de desnaturalización. El método estadístico usado fue  $2^{-\Delta\Delta Cq}$  para conocer las veces de enriquecimiento.

Oligonucleótido	Gen o secuencia amplificada	Secuencia 5´-3´
AlaqFw	tRNA Alanina	GGGGATGTAGCTCAGATGG
AlaqRv	tRNA Alanina	TGGAGAAGTTGGGTATCGATC
ArgqFw	tRNA Arginina	GGTCTCGTGGCGCAATG
ArgqRv	tRNA Arginina	GATCCCGGCAGGACTC
GPEET-promoter-F	Promotor de prociclina	TGATAGGTATCTCTTATTAGTATAG
GPEET-promoter-R	Promotor de prociclina	GTACTCACCCGATAACCCC
Procyclin-5	Gen de prociclina	ATGGCACCTCGTCCCTTTA
ProcqRv	Gen de prociclina	CTTGCCTCCCTTCACGATAAC
rRNA5S-5´	Gen del rRNA 5S	GTCGAGTACGACCACACTTG
rRNA5S-3´	Gen del rRNA 5S	AAGAGTACGGCACTCAGGGT
SL-inter-F	Región intergénica SL RNA	ATGGCTTATACGTGCTCGTTTCTCC
SL-inter-R	Región intergénica SL RNA	AGCAGACTTTAAAGCGCCTATATGTG
SL-promoter-F	Promotor SL RNA	CTACCGACACATTCTGGC
SL-promoter-R	Promotor SL RNA	GCTGCTACTGGGAGCTTCTCATACC
TubqFw	Gen $\alpha$ -tubulina	GGGCTTCCTCGTGTATCA
TubqRv	Gen $\alpha$ -tubulina	GCTTGGACTTCTTGCCATAG
U2qFw	Gen snRNA U2	CTCGGCTATTAGCTAAGATCAAGT
U2qRv	Gen snRNA U2	CGGGACAGCCAACAGTTT

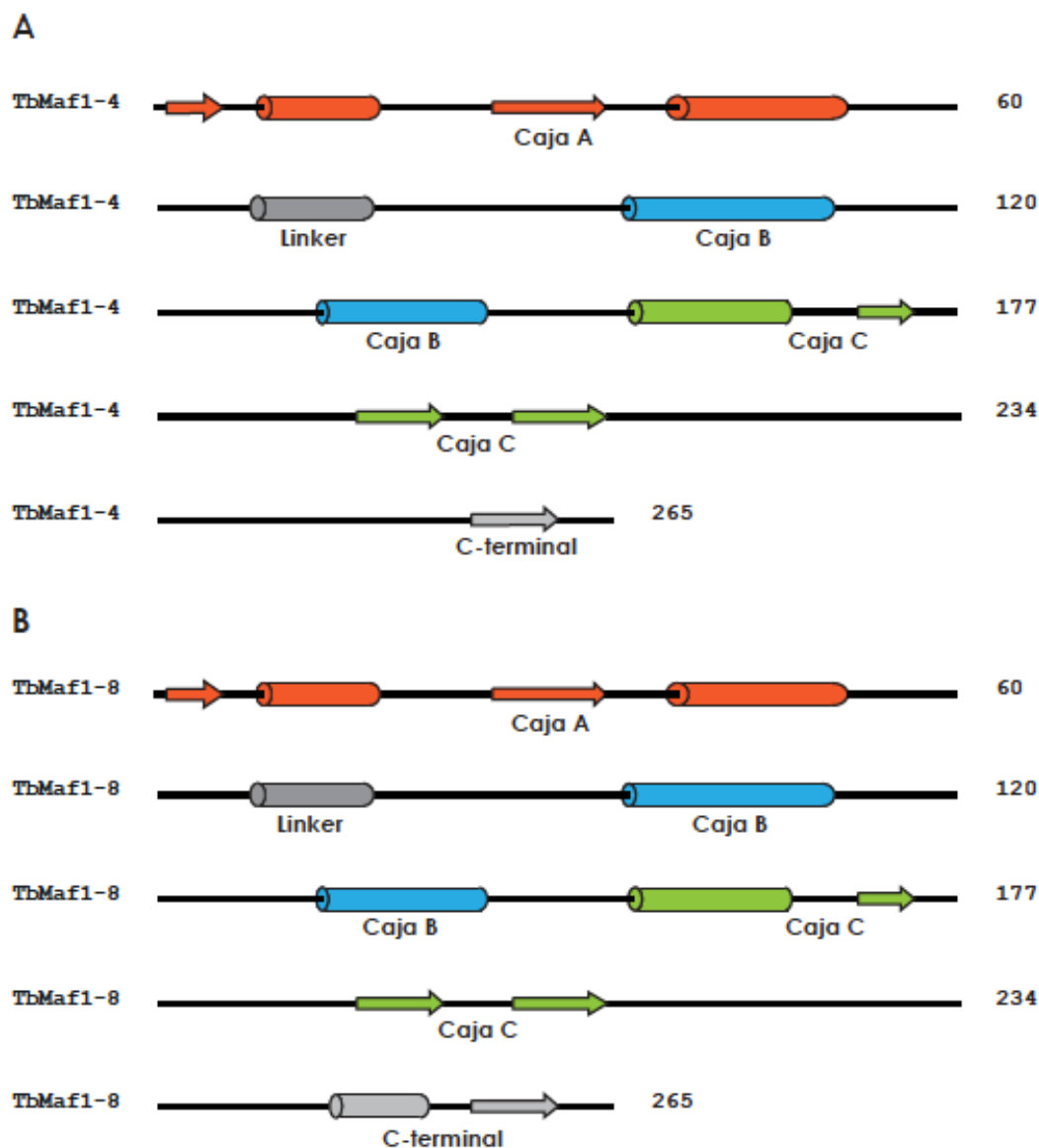
**Tabla 8.** Oligonucleótidos usados en experimentos qPCR



## Resultados

### 1. Determinación *in silico* de las estructuras secundaria y terciaria de TbMaf

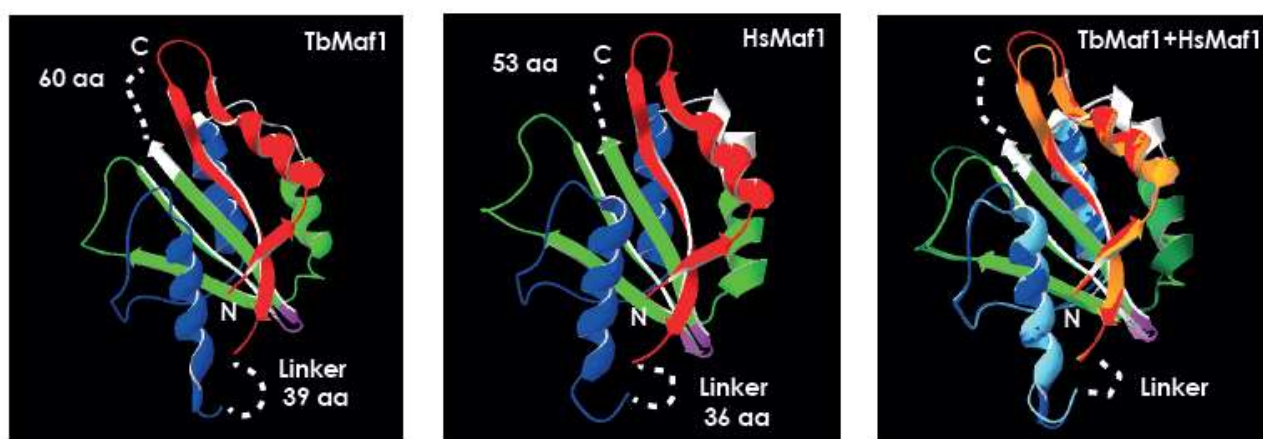
Anteriormente, determinamos que *T. brucei* posee dos genes de TbMaf1 que tienen más del 90% de identidad a nivel de proteína (Romero-Meza, 2012). Para tener más elementos que apoyaran la idea de que habíamos encontrado al ortólogo de Maf1 en *T. brucei*, decidimos determinar las probables estructuras secundaria y terciaria de TbMaf1, y compararlas con las estructuras predichas para Maf1 de humano (Vannini, 2010). Los resultados mostraron que la caja A está conformada por una hoja  $\beta$ -plegada inicial, seguida de una hoja  $\alpha$ -hélice, una segunda hoja  $\beta$ -plegada y otra hoja  $\alpha$ -hélice (Figura 14). En la región *linker*, que corresponde a la región entre las cajas A y B, se predice una única hoja  $\alpha$ -hélice. La caja B está conformada por dos hojas  $\alpha$ -hélices, y finalmente la caja C predice una hoja  $\alpha$ -hélice seguida de tres hojas  $\beta$ -plegadas. En el extremo carboxilo-terminal se predice estructuras diferentes en TbMaf1-4 y TbMaf1-8, debido a que la mayoría de los aminoácidos diferentes entre las dos proteínas se encuentran en el carboxilo-terminal. Para TbMaf1-4 solamente se predice una hoja  $\beta$ -plegada mientras que para TbMaf1-8 se predice una hoja  $\alpha$ -hélice antes de la hoja  $\beta$ -plegada (Figura 14). Es importante mencionar que la confianza de predicción de la región carboxilo-terminal es baja (20%), por lo que únicamente con evidencia experimental podríamos asegurar que esta diferencia de estructura predicha entre las dos proteínas de TbMaf1 realmente ocurre y sobretodo si es importante para su función.



**Figura 14.** Estructura secundaria predicha de TbMaf1-4 y TbMaf18. Las estructuras de la caja A se señalan en rojo, las de la caja B en azul y las de la caja C en verde. La estructura en gris oscuro corresponde a la región *linker* y las gris claro a las del extremo carboxilo-terminal. Las flechas representan estructuras de hojas  $\beta$ -plegada y los cilindros estructuras hojas  $\alpha$ -hélice.

La cristalografía de Maf1 de humano fue hecha con una fracción de la proteína que carecía de la región *linker* y del extremo carboxilo-terminal, por lo que para la predicción de la estructura terciaria de TbMaf1, al tomar como base esta cristalografía (PDB id: 3nr5), descartamos estas regiones. Los resultados obtenidos se muestran en la figura 15, en donde se observa que la estructura de TbMaf1 es globular, presentando cuatro hojas  $\beta$ -plegadas en el centro, las cuales están

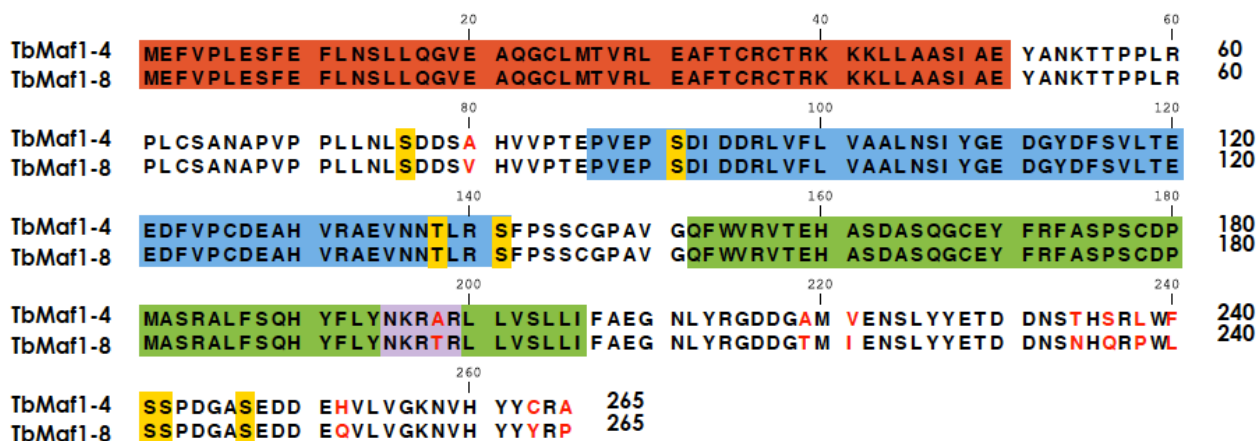
rodeadas por cuatro hojas  $\alpha$ -hélices. No se encontraron diferencias entre la predicción tridimensional de TbMaf1-4 y TbMaf1-8. A la par, realizamos la predicción de la estructura de Maf1 de humano, la cual presenta la estructura globular que ya había sido reportada (Figura 10). Al sobreponer las estructuras predichas de Maf1 de humano (HsMaf1) y de *T. brucei* (TbMaf1) se observa que son muy similares, pues prácticamente todas las estructuras empalman casi perfectamente, excepto por algunas regiones de espirales al azar. Quizás la diferencia más notoria sea el tamaño de la primera  $\alpha$ -hélice de la caja C, ya que en humano es de mayor longitud que en *T. brucei* (Figura 14). Estos datos apoyan la teoría de que TbMaf1 es en realidad el ortólogo de Maf1 y que su función podría estar conservada.



**Figura 15.** Predicción de la estructura tridimensional de TbMaf1 y HsMaf1. La región correspondiente a la caja A se encuentra coloreada en rojo, la caja B en azul y la C en verde. La probable SLN se indica en color morado. Las regiones correspondientes al *linker* y al extremo carboxilo-terminal se indican con líneas blancas punteadas. Las flechas representan estructuras  $\beta$ -plegada y los espirales corresponden a estructuras  $\alpha$ -hélice.

Otro elemento importante a buscar dentro de las secuencias de TbMaf1 era una probable señal de localización nuclear (SLN). En *S. cerevisiae* se encontraron dos SLN en Maf1, una en las posiciones K205-K208, denominada como amino-terminal, y otra en los aminoácidos R328-R223, llamada carboxilo-terminal (Moir, 2006); ésta última se localiza dentro de la caja C de Maf1. En otros organismos, como humano o plantas, sólo se ha encontrado la SLN carboxilo-terminal (Khanna, 2015 y Soprano, 2013). Considerando que en *T. brucei* ya ha sido descrita una SLN consenso (Marchetti, 2000), hicimos un alineamiento entre ésta y las secuencias

de TbMaf1. Encontramos que TbMaf1 tiene una probable SLN en la posición 195-NKRA/TR-199 (Figura 16). Este dato sugiere que la localización de TbMaf1 podría ser nuclear.

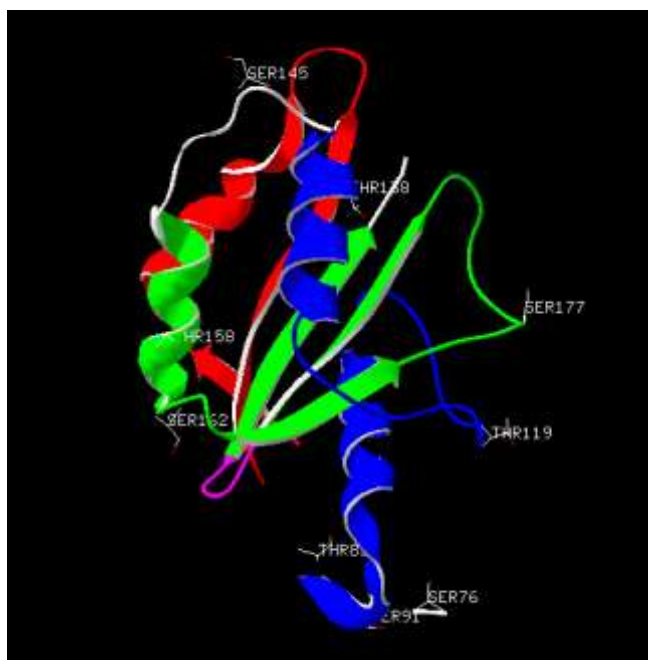


**Figura 16.** Alineamiento de la secuencia de aminoácidos de TbMaf1-4 y TbMaf1-8. Los residuos diferentes entre ambas proteínas se encuentran señalados en letras de color rojo. La caja A se enmarca en rojo, la caja B en azul y la C en verde. La SLN se indica en color morado. Los residuos fosforilables predichos *in silico* se muestran enmarcadas en amarillo.

Además, para tener datos que nos indicaran que esta secuencia pudiera ser funcional, fue importante identificar si la probable SLN en TbMaf1 estaba accesible estructuralmente. La SLN se localiza en el inicio de la última hoja  $\beta$ -plegada de la caja C, región claramente accesible en la estructura tridimensional (Figura 15), lo que apoya la idea de que esta SLN sería funcional. Por lo que todos estos datos aportan evidencia adicional que indica que los genes encontrados son los ortólogos de Maf1.

Resultados de análisis *in silico* realizados previamente, revelaron que TbMaf1 presenta probables sitios de fosforilación. Esta predicción se realizó con dos servidores diferentes, NetPhos y PhosTryp. De acuerdo con los datos obtenidos, los residuos con más probabilidades de fosforilarse *in vivo* son: S76, S91, T138, S141, S242 y S247 (Figura 16) (Romero-Meza, 2012). Resulta interesante el hecho de que la mayoría de los sitios de fosforilación predichos se encontraron fuera de los tres dominios conservados, principalmente entre los dominios A, B y en el extremo carboxilo-terminal, después de la caja C. Sólo dos de ellos, T138 y S141, se

encuentran en la caja B. Ninguno de los sitios se encontró cercano a la probable SLN. Un dato que nos ayudaría a saber si estos sitios se fosforilan *in vivo* fue determinar su accesibilidad haciendo uso de la predicción de la estructura terciaria de TbMaf1. La mayoría de los residuos se encuentran en las estructuras externas de TbMaf1 y ninguno de ellos está dentro de las hojas  $\beta$ -plegadas centrales, lo que indica que estos sitios resultarían accesibles para las cinasas (Figura 17). Es importante tomar en consideración que hay estudios que han mostrado que una PTM puede generar un cambio conformacional en las proteínas, lo que hace accesible a sitios que previamente estaban ocultos (Roskoski, 2015). Ensayos experimentales podrán determinar si estas predicciones realmente ocurren *in vivo* y cuál es su implicación biológica.



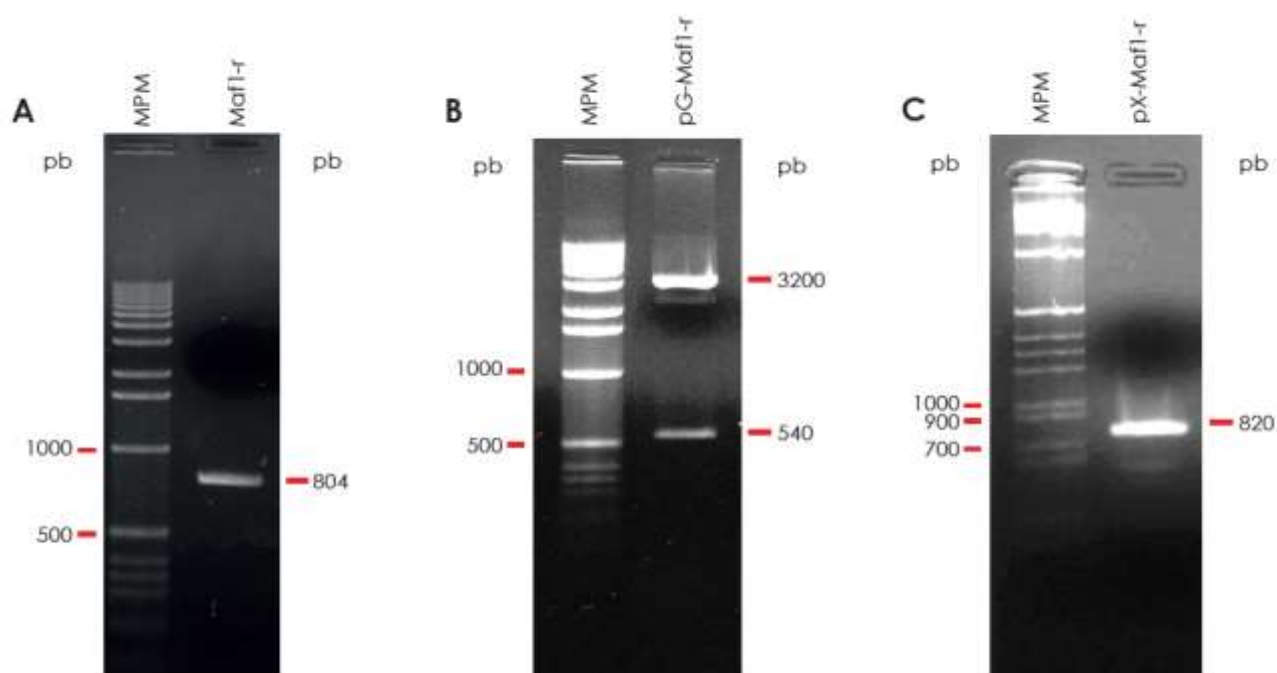
**Figura 17.** Ubicación de los residuos con alta probabilidad de ser fosforilados en TbMaf1 en su estructura terciaria. Los colores corresponden a los mismos que en la figura 15.

## 2. Generación del anticuerpo policlonal anti-TbMaf1

Experimentos anteriores demostraron que en el *knock-down* inducible que generamos en el laboratorio se lograba una disminución del 75 % de los niveles de mRNA, después de 48 h de inducción con el sistema de RNAi. Era importante demostrar que los niveles de proteína de TbMaf1 también disminuían, para así

poder evaluar su función. Dada la baja homología que TbMaf1 tiene con sus ortólogos en otras especies (~15-20%) decidimos generar un anticuerpo policlonal en ratón específico para TbMaf1, para realizar experimentos de *Western blot* con proteína de cultivos *knock-down*. Para esto, el marco abierto de lectura de TbMaf1-8 se amplificó y se clonó en el vector pGEMT-easy para su posterior subclonación en el vector de expresión pGEX4T-3. Este vector permite producir en bacterias una proteína recombinante fusionada a GST en su extremo amino-terminal bajo la inducción de IPTG.

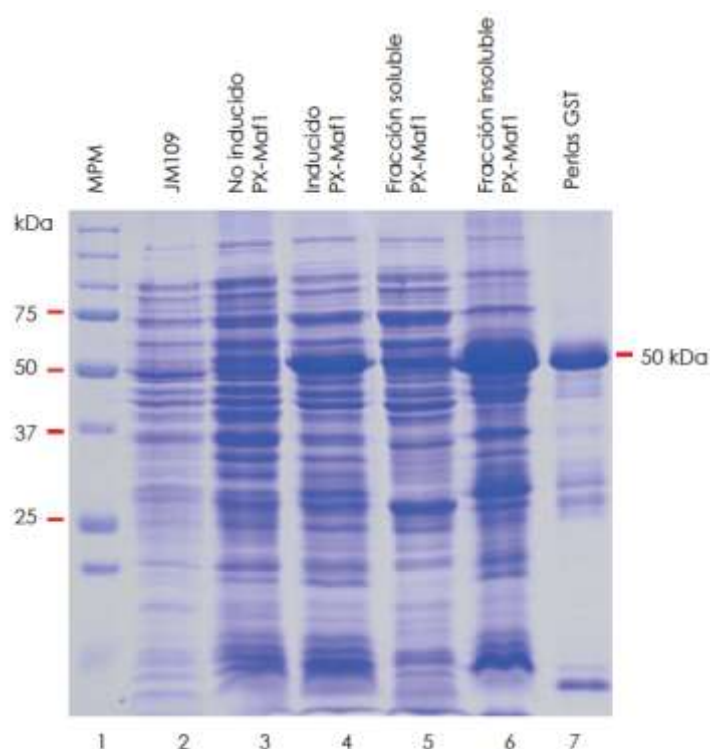
El fragmento seleccionado se denominó Maf1-r y se amplificó por PCR con oligonucleótidos específicos, obteniéndose el tamaño esperado de 804 pb (Figura 18, panel A). El amplicón obtenido se clonó en el vector pGEMT-easy y de las colonias resultantes se obtuvo DNA plasmídico (pDNA) mediante mini-preparación alcalina para analizarse por restricción con la enzima *NcoI*. Esta digestión dio como resultado dos fragmentos esperados de 3200 y 540 pb (Figura 18, panel B). Después de comprobar que se obtuvo el patrón indicado se generó pDNA de alta pureza con un kit comercial de extracción. El plásmido obtenido se digirió con las enzimas *BamHI* y *NotI* para liberar el inserto Maf1-r y clonarlo en el vector pGEX4T-3 previamente digerido con el mismo par de enzimas. Las colonias resultantes de la transformación se analizaron por PCR de colonia usando un par de oligonucleótidos que alinean dentro del sitio múltiple de clonación del vector. Una de las colonias amplificó positivamente el fragmento esperado de 820 pb (Figura 18 panel C). Después de purificarse el pDNA de esta colonia, se envió a secuenciar para corroborar que el inserto estuviese íntegro y en marco con GST.



**Figura 18.** Clonación de Maf1-r en el vector pGEX4T-3. Panel A. Amplificación del fragmento Maf1-r. Panel B. Digestión del vector pG-Maf1-r con la enzima *NcoI*. Panel C. PCR de colonia de bacterias transformadas con el vector pX-Maf1-r. Geles de agarosa al 1%. El marcador de peso molecular (MPM) corresponde a 1 Kb Invitrogen en los páneces A y B y a 1 Kb de Fermentas en el panel C.

Los resultados de secuenciación comprobaron que no había ningún cambio de nucleótido y que GST estaba en marco con Maf1-r, por lo que se indujo la expresión de la proteína recombinante TbMaf1-GST con IPTG. Justo antes de agregar IPTG al cultivo se guardó una alícuota del mismo para poder analizarlo posteriormente como “no inducido” (Figura 19, carril 3). Transcurrido el tiempo de inducción se analizó la proteína bacteriana en un gel de poliacrilamida para comprobar la expresión de la proteína recombinante (Figura 19, carril 4). De esta forma se observó que en comparación con proteínas de bacterias no inducidas y no transformadas (Figura 19, carril 2), hubo un enriquecimiento en la fracción inducida de una banda del tamaño predicho para GST-TbMaf1, de 50 kDa. Después de comprobar la inducción de la proteína de interés, ésta se purificó. Para lograr su purificación, era importante determinar en qué fracción proteica bacteriana se encontraba GST-TbMaf1, si en la fracción insoluble o en la fracción

soluble. Después de lisar las bacterias inducidas, se tomaron alícuotas correspondientes a ambas fracciones del lisado y se analizaron en un gel de poliacrilamida (Figura 19, carriles 5 y 6). De esta forma, determinamos que GST-TbMaf1 se encontraba en la fracción insoluble al observar la banda de 50 kDa sólo en el carril correspondiente. Para la purificación de GST-TbMaf1, se incubó la fracción insoluble con perlas de glutatión. La proteína purificada resultante también se analizó en un gel de poliacrilamida para comprobar su pureza (Figura 19, carril 7). Se observó que la proteína de 50 kDa estaba enriquecida en el carril correspondiente a las perlas de GST.

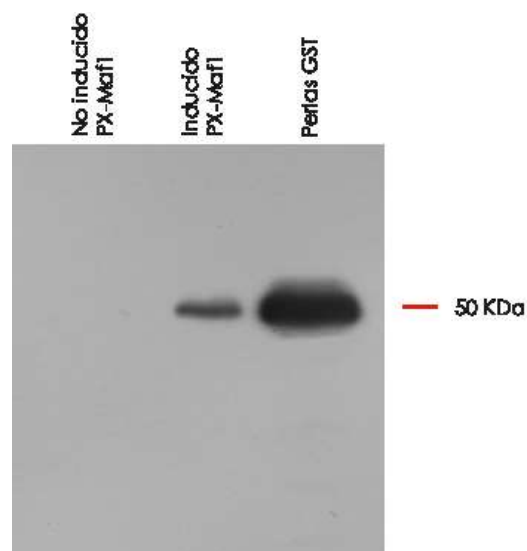


**Figura 18.** Obtención de la proteína recombinante GST-TbMaf1. Gel de poliacrilamida al 10% teñido con azul de Coomassie con proteína de bacterias *E. coli* JM109 sin transformar, transformadas con el vector pX-Maf1 sin inducir, inducidas por 4 h con IPTG, fracción soluble de bacterias inducidas, la fracción insoluble de las mismas y perlas GST que se usaron para purificar la proteína GST-TbMaf1, la cual tiene un peso de 50 kDa. MPM: Biorad All Blue.

Para comprobar que la banda de 50 kDa que se observó en la fracción insoluble de bacterias inducidas y en las perlas de GST correspondía realmente a GST-TbMaf1 realizamos un ensayo de *Western blot* utilizando un anticuerpo anti-GST con proteínas de bacterias no inducidas, inducidas y las perlas de GST. El



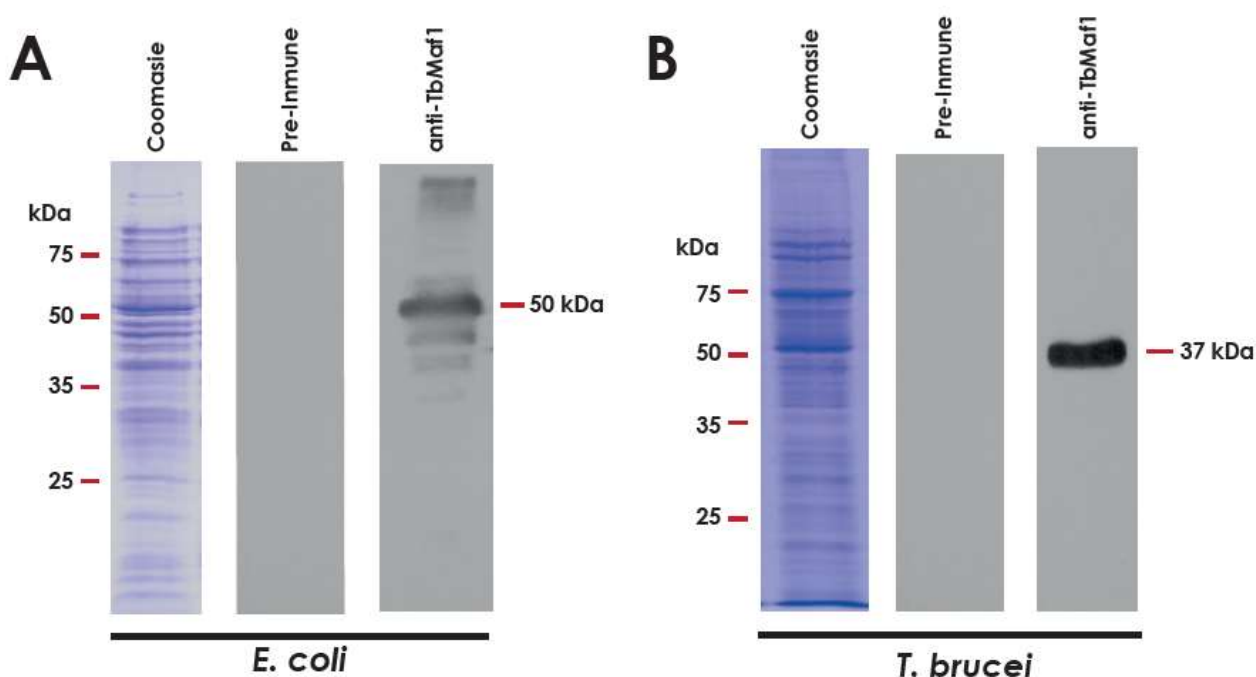
resultado mostró una banda de 50 kDa en el carril de proteína inducida y en las perlas GST, indicando que la proteína de interés, GST-TbMaf1, se expresó y se purificó exitosamente con perlas de GST (Figura 20).



**Figura 20.** Ensayo de *Western blot* con proteína de bacterias transformadas con el vector pX-Maf1-r sin inducir e inducidas con IPTG y perlas de GST incubadas con el anticuerpo anti-GST.

Una vez que se purificó la proteína GST-TbMaf1, ésta se utilizó para inocular a seis ratones hembra BALB-C para obtener anticuerpos específicos. Antes de la primera inoculación, se extrajo suero de los ratones para poder ser usado posteriormente como control “no inmune”. Después de cuatro inoculaciones, los ratones se sacrificaron y se recuperó el suero para utilizarlo en ensayos de *Western blot*. Para estos experimentos se utilizó proteína total de bacterias transformadas con el vector pX-Maf1-r e inducidas. Esto con la finalidad de verificar que el anticuerpo contenido en el suero de los ratones reconociera la proteína que se utilizó como antígeno. En el resultado de estos experimentos se observó una banda principal de 50 kDa que corresponde al peso de GST-TbMaf1 (Figura 21, panel A). Al utilizar el suero pre-inmune en estas mismas membranas no se obtuvo ninguna señal, lo cual indica que el anticuerpo reconoce específicamente a la proteína GST-TbMaf1 (Figura 21, panel A). Para corroborar que el anticuerpo también reconociera a TbMaf1 se usó un extracto proteico total de parásitos *T. brucei* 29-13 en ensayos de *Western blot*, revelando una banda única de 37 kDa (Figura 21, panel B). El peso predicho de TbMaf1 es de ~29 kDa. Como se describió en la

introducción, se sabe que Maf1 puede sufrir varias modificaciones post-traduccionales como fosforilación y SUMOilación, lo que retarda su corrimiento en geles de poliacrilamida, observándose entonces de un tamaño mayor al predicho (Ciesla, 2008 y Rohira, 2013). Esto podría explicar por qué observamos a TbMaf1 en un peso molecular más alto. Como control, se incubaron membranas que contenían proteína total de *T. brucei* con el suero pre-inmune. En estos experimentos no se observó ninguna señal, lo que indica que el anticuerpo policlonal reconoce específicamente a TbMaf1 (Figura 21, panel B).

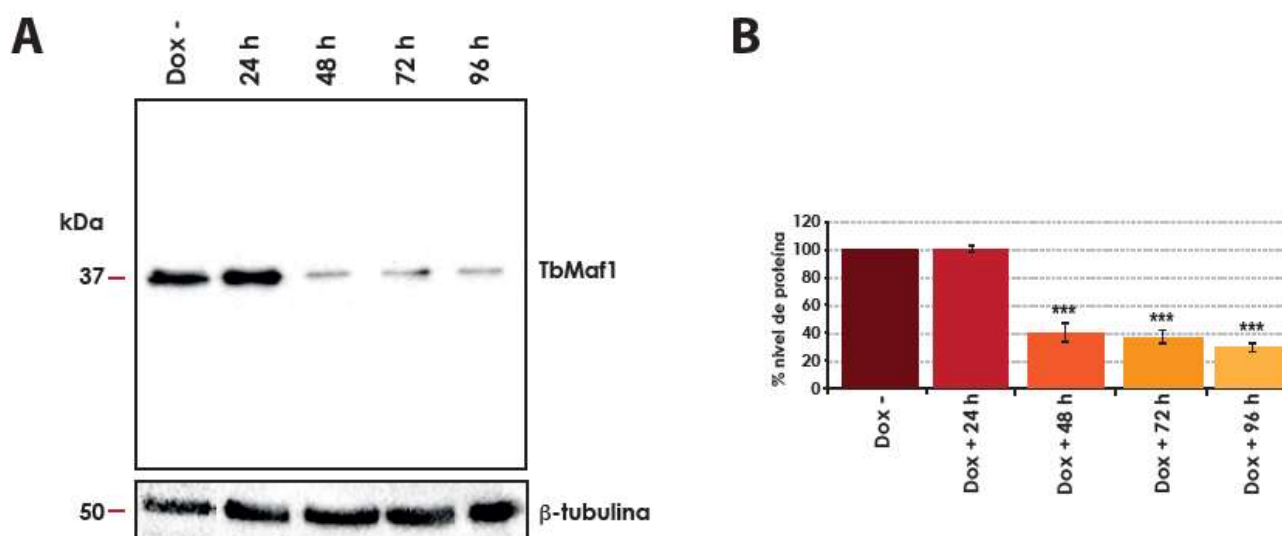


**Figura 21.** Ensayo de *Western blot* con el anticuerpo anti-TbMaf1. En el panel A se utilizó proteína de bacterias transformadas con el vector pX-Maf1-r inducidas. En el panel B se muestra el resultado con proteína total de *T. brucei*. Como control, las membranas se incubaron también con el suero pre-inmune. La proteína usada para los experimentos se muestra en geles de poliacrilamida al 10% teñidos con azul de Coomassie.

### 3. Análisis de los niveles de proteína TbMaf1 en clonas *knock-down*

Al contar ya con el anticuerpo específico, pudimos analizar si el *knock-down* inducible afectaba el nivel de la proteína TbMaf1. Para esto se realizaron experimentos de *Western blot*, con proteína total de parásitos transfectados con el vector pZ-Maf1 sin inducir (Dox-) e inducidos durante 24, 48, 72 y 96 h. Como

resultado observamos una reducción del 60% de la proteína TbMaf1 a partir de las 48 h de inducción, reduciéndose hasta un 70% a las 96 h, según los datos densitométricos (Figura 22). Como control de carga, la membrana fue reincubada con un anticuerpo anti  $\beta$ -tubulina, el cual no mostró cambios significativos en los niveles de proteína en las diferentes condiciones. Con este resultado comprobamos que el *knock-down* inducible de TbMaf1 reduce hasta en un 70% los niveles de proteína.



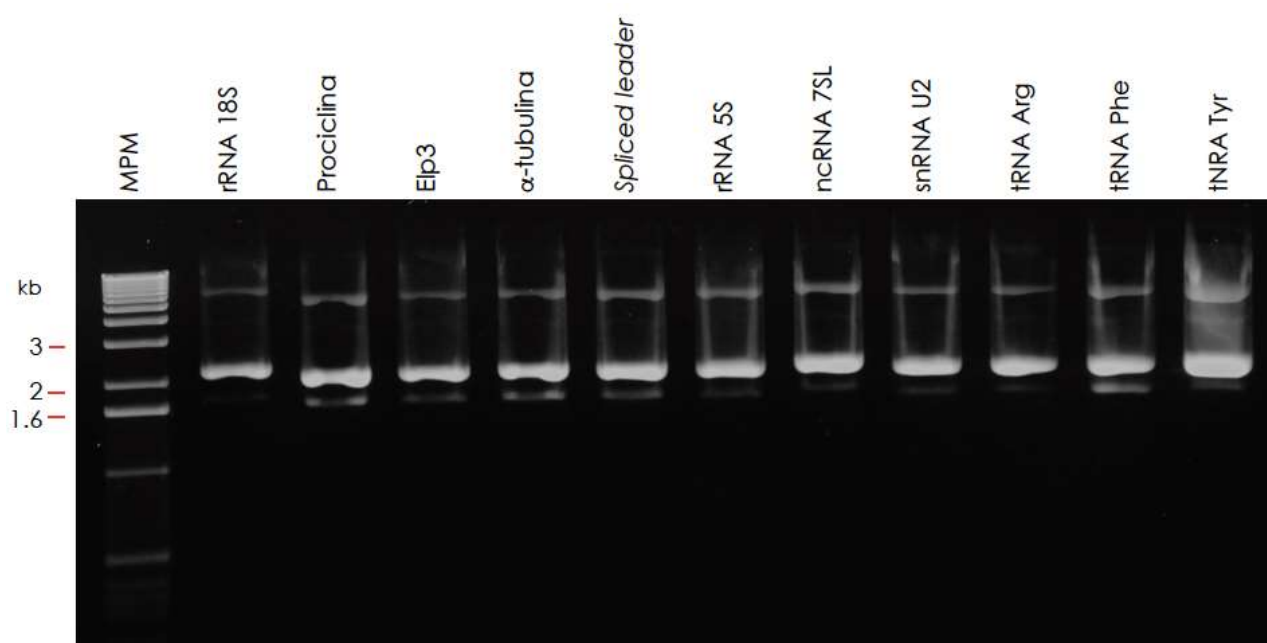
**Figura 22.** Ensayo tipo *Western blot* del *knock-down* de TbMaf1. El anticuerpo primario usado fue anti-TbMaf1 (Panel A). Se analizaron cultivos de *T. brucei* 29-13 transfectados con el vector pZ-Maf1 sin inducir (Dox-) e inducidos por diferentes tiempos con doxiciclina. Como control de carga, la membrana fue reincubada con un anticuerpo anti- $\beta$ -tubulina. Los resultados densitométricos de tres experimentos independientes se muestran en el panel B, los valores se normalizaron con el valor de  $\beta$ -tubulina y se analizaron con el método estadístico T-test de una muestra, \*\*\*  $p < 0.0001$ .

#### 4. Efecto del *knock-down* de TbMaf1 en la transcripción

Para analizar el efecto del *knock-down* de TbMaf1 en la transcripción en *T. brucei* se realizaron ensayos de *run-on* nuclear. Para ello se seleccionaron genes transcritos por las tres RNA Polimerasas. De la RNA Pol III se escogieron el rRNA 5S, el ncRNA 7SL, el snRNA U2 y tres genes de tRNA: tRNA-Phe, tRNA-Ala, tRNA-Tyr. Los genes transcritos por Pol I analizados fueron el rRNA 18S y procliclina y por Pol II  $\alpha$ -

tubulina, Elp3b y SL RNA. Todos estos genes ya habían sido clonados en el vector pGEMT-easy previamente en el laboratorio. Para asegurarnos de que estuviéramos usando los vectores correctos, éstos fueron digeridos con la enzima de restricción *EcoRI* la cual libera el fragmento clonado del vector y se reenviaron a secuenciar. En todos los casos, los insertos clonados tuvieron el tamaño y la secuencia correctos.

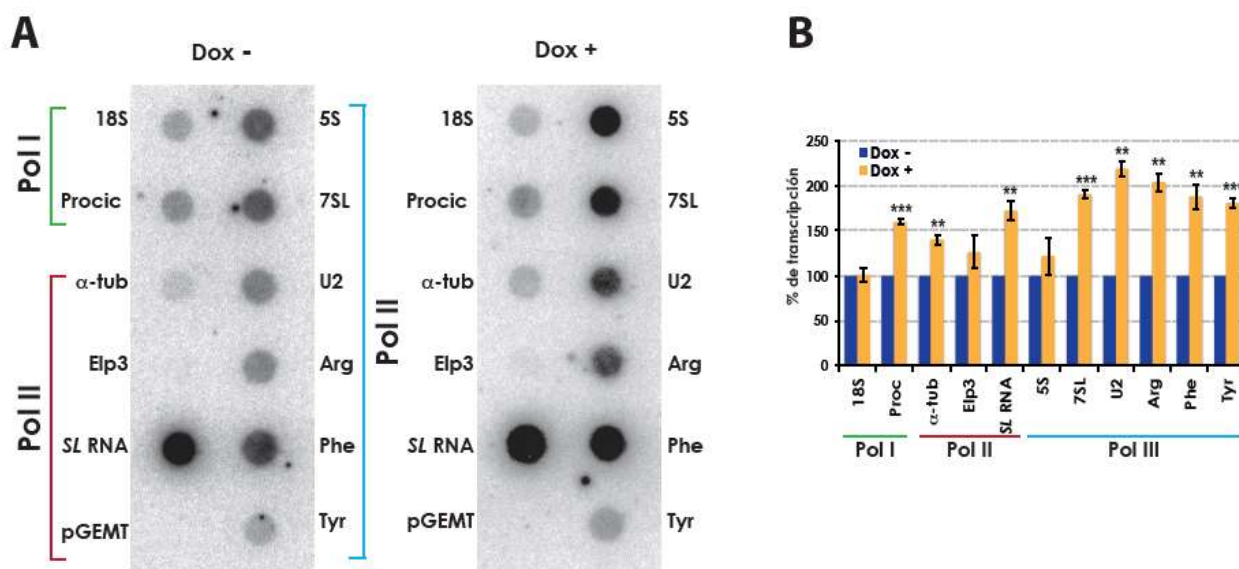
Una vez que se verificaron las secuencias de los fragmentos a usar, se obtuvo una maxi-preparación de pDNA de alta pureza y se cuantificaron mediante espectrofotometría. Para verificar la calidad de la preparación y la cantidad de cada una de las construcciones, éstas se resolvieron mediante electroforesis (Figura 23).



**Figura 23.** Electroforesis de muestras de pDNA de los fragmentos usados para ensayos de *run-on* clonados en el vector pGEMT-easy. Gel de agarosa al 0.8% con 2  $\mu$ g de DNA de plásmido. MPB: 1 Kb plus de Invitrogen.

Los vectores se fijaron en membranas de nylon usando un aparato de *Dot blot*. Estas membranas se hibridaron con el RNA naciente marcado radioactivamente generado mediante *run-on* nuclear con cultivos de *knock-down* de TbMaf1 inducidos con doxiciclina por 96 h (Dox +). Como control se usaron cultivos no

inducidos (Dox -). El resultado observado mostró un aumento en todos los transcritos de Pol III (Figura 24). La mayoría de ellos aumentó más del 50%, por ejemplo: el ncRNA 7SL aumentó 90%, el snRNA U2 en 110%, el tRNA-Arg 100% , el tRNA-Phe en 80% y el tRNA Tyr 75% (Figura 24). El rRNA 5S aumentó un 20%, sin embargo, esta diferencia no fue estadísticamente significativa (Figura 24, panel B). Un fenómeno similar ha sido reportado en humano donde se ha visto que Maf1 reprime genes de los clase 1 y 3 que son transcritos por la RNA Pol III (Reina et al., 2006). De manera interesante, nuestro ensayo de *run-on* mostró también un ligero aumento en la señal de algunos genes transcritos de Pol I y Pol II: prociclina un 50%,  $\alpha$ -tubulina 40% y el SL RNA 65%. El aumento en los niveles de Elp3b del 25% no resultó estadísticamente significativo. Curiosamente, el rRNA 18S no mostró diferencia alguna entre los cultivos inducidos y los no inducidos, lo que sugiere que TbMaf1 no estaría participando en la regulación de la transcripción de este gen (Figura 24). Como se mencionó en la introducción, análisis hechos en células de *H. sapiens* y *C. elegans* demostraron que el *knock-down* de Maf1 afecta la transcripción de genes de las tres RNA polimerasas (S. S. Johnson et al., 2007) (Palian et al., 2014), por lo que nuestros resultados sugieren un fenómeno similar en *T. brucei*.



**Figura 24.** Efecto del *knock-down* de Maf1 en la transcripción de las tres RNA polimerasas en *T. brucei*. Panel A. Ensayo de *run-on* nuclear de células de *T. brucei* *knock down* de TbMaf1, en presencia (Dox +) por 96 h o ausencia (Dox -) de doxiciclina. Panel B. La intensidad de las señales obtenidas en el panel A y en dos experimentos independientes fue determinada por densitometría y graficada. Las barras azules representan los cultivos sin inducir y las barras amarillas los cultivos

inducidos, los valores se normalizaron con el valor del rRNA 18S y se analizaron con el método estadístico T-test de una muestra, \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.001$ , \*\*\*  $p < 0.0001$ .

## 5. Sobre-expresión de TbMaf1

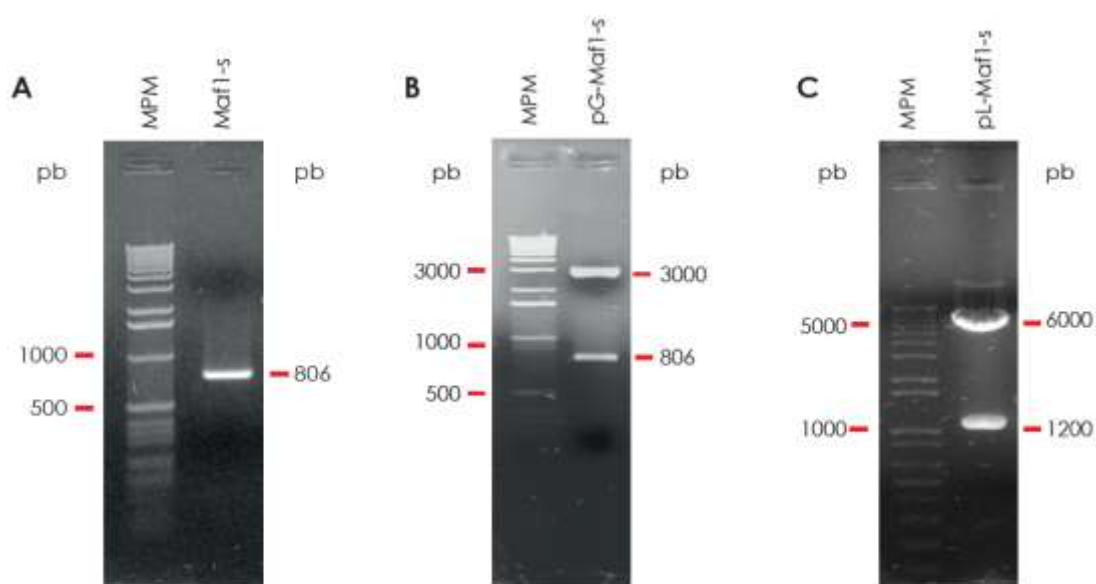
Los resultados observados en los ensayos de *run-on* nuclear de células *knock down* de TbMaf1 sugieren que esta proteína podría participar en regular la transcripción general en *T. brucei*. Con la finalidad de comprobar estos datos generamos parásitos que sobre-expresan a TbMaf1 para su análisis.

### 5.1 Generación de vectores de sobre-expresión de TbMaf1

El vector seleccionado para cumplir con esta estrategia experimental fue pLew100v5BSD. Este vector tiene una estructura muy similar a la de pZJM (Romero-Meza, 2012), se integra al espaciador ribosomal no transcrito y tiene una secuencia de resistencia a blasticidina. El marco abierto de lectura del gen que se desea sobre-expresar, se clona después de un promotor inducible de la RNA Polimerasa del Fago T7. Después de este promotor se encuentra una secuencia del operador de Tetraciclina (tetO), al que se une el represor de tetraciclina (tetR), impidiendo la transcripción del gen clonado, en este caso TbMaf1 (Orth, 2000). Al agregar doxiciclina al cultivo, el tetR se despega de su secuencia blanco y permite que la RNA Pol T7 transcriba una copia exógena de TbMaf1 y, por lo tanto, se induce la sobre-expresión de TbMaf1 (Wirtz, 1999).

El marco abierto de lectura de TbMaf1-8 se amplificó por PCR y después de verificar que se obtuviera sólo un producto de amplificación del tamaño esperado de 806 pb (Figura 25, panel A), el amplicón, denominado Maf1-s, se purificó con un kit comercial y se clonó en el vector pGEMT-easy. De las colonias obtenidas de esta clonación se extrajo pDNA para ser analizado mediante restricción con la enzima EcoRI, la cual libera el inserto clonado. De esta digestión se obtuvieron dos bandas, una de 3000 pb correspondiente al vector y otra de 806 pb que coincide con el tamaño de la región clonada (Figura 25, panel B). El

fragmento Maf1-s se liberó del vector de clonación con el par de enzimas *Bam*HI y *Hind*III, sitios con los que se clonó de forma sitio dirigida en el vector pLew100v5BSD previamente digerido con las mismas enzimas. Las colonias resultantes se analizaron con la enzima *Nco*I, la cual generó dos fragmentos, de 6000 y 1200 pb (Figura 25, panel C). Al obtener el patrón esperado con este análisis, el plásmido fue enviado a secuenciar para corroborar que el ORF de TbMaf1 no presentara ningún cambio. De esta forma se generó el vector pL-Maf1-s.



**Figura 25.** Clonación del fragmento Maf1-s. Panel A. Amplificación del fragmento Maf1-s, gel de agarosa al 1%. Panel B. Digestión del vector pG-Maf1-s con la enzima *Eco*RI, gel de agarosa al 0.8%. Panel C. Análisis de restricción del vector pL-Maf1-s con la enzima *Nco*I, gel de agarosa al 0.8%. MPB: escalera de 1 Kb de Invitrogen.

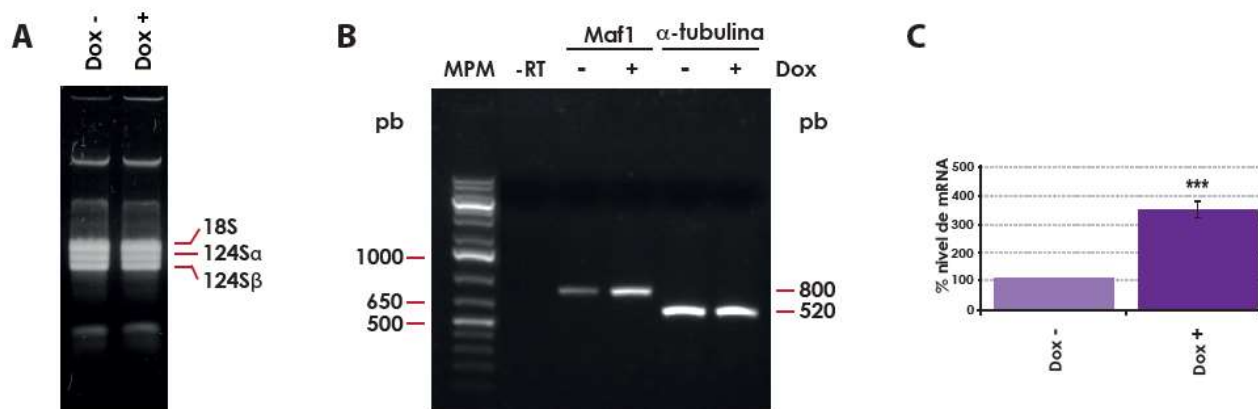
## 5.2. Transfección y selección de clonas celulares de sobre-expresión de TbMaf1

El vector pL-Maf1-s se transfectó en parásitos de *T. brucei* 29-13. Esta cepa expresa constitutivamente la RNA Pol T7 y el tetR, elementos necesarios para lograr que el sistema inducible de sobre-expresión funcione (Romero-Meza, 2012). La transfección se realizó mediante electroporación y la selección se realizó con blasticidina. Siete días después se obtuvieron poblaciones estables, las cuales se clonaron mediante dilución limitada. Se recuperaron 5 clonas para su posterior

análisis. La sobre-expresión de TbMaf1 se indujo con doxiciclina a una concentración de 2 µg/ml.

### 5.3. Análisis de los niveles de mRNA de TbMaf1 en clones de sobre-expresión

Como una primera aproximación, para saber si nuestro sistema de sobre-expresión inducible funcionaba, se aisló RNA total después de inducir la expresión de la copia exógena de TbMaf1 por 48 h en una de las clonas de parásitos transfectados con el vector pL-Maf1-s. Como control, también se extrajo RNA total de cultivos transfectados no inducidos. Los RNAs extraídos fueron tratados con DNAsa I, y su integridad se verificó mediante una electroforesis en gel de agarosa (Figura 26, panel A). Estos RNAs se utilizaron en experimentos de RT-PCR. Al realizar los experimentos con oligonucleótidos que amplifican el ORF de TbMaf1, observamos una mayor amplificación a partir de RNA de cultivos inducidos por 48 h (Dox +), en comparación de RNA proveniente de cultivos sin inducir (Dox -) (Figura 26, panel B). Mediante densitometría, se calculó que el aumento fue de casi el 300% (Figura 26, panel C). Como control, un segundo par de oligonucleótidos amplificó una región del gen de  $\alpha$ -tubulina, con los cuales observamos los niveles de amplificación muy similares a partir de RNA de ambas condiciones (Figura 26, panel B). Este resultado nos reveló que el sistema de sobre-expresión inducible funcionaba y que a 48 h de inducción los niveles de mRNA de TbMaf1 aumentaban significativamente.



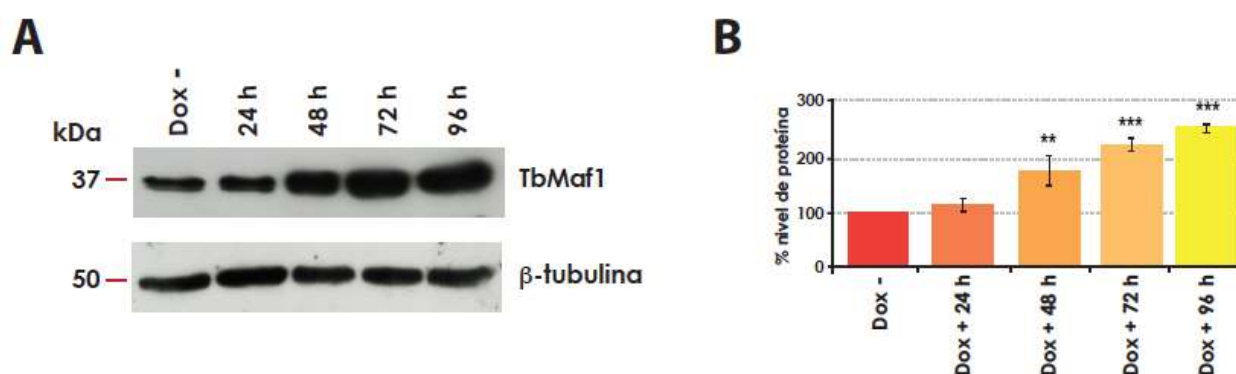
**Figura 26.** Ensayo RT-PCR para verificar la sobre-expresión de TbMaf1. Panel A. Gel de agarosa al 0.8% con 3 µg de RNA extraído de parásitos pL-Maf1-s sin inducir (Dox -) e inducidos (Dox +). Los tres rRNA principales están indicados. Panel B. Resultado del experimento RT-PCR que muestra la



sobre-expresión de TbMaf1. Como control de carga se amplificó  $\alpha$ -tubulina. El carril 2 muestra el control negativo sin transcriptasa reversa. MPM de Fermentas 1 Kb Panel C. Cuantificación densitométrica de tres experimentos independientes, los valores se normalizaron con el valor de  $\alpha$ -tubulina y se analizaron con el método estadístico T-test de una muestra, \*\*\*  $p < 0.0001$ .

#### 5.4. Análisis de los niveles de proteína de TbMaf1 en clones de sobre-expresión

Después de comprobar que el mRNA de TbMaf1 aumenta significativamente con el sistema de sobre-expresión inducible, era importante saber si los niveles de proteína también aumentaban. Para esto realizamos experimentos de *Western blot* utilizando proteína total de parásitos de sobre-expresión de TbMaf1 inducidos con doxiciclina durante diferentes tiempos: 24, 48, 72 y 96 h utilizando el anticupero anti-TbMaf1. El resultado obtenido muestra un aumento de los niveles de proteína en un 90% a partir de las 48 h de inducción. Los niveles continúan aumentando hasta llegar a un 150% después de 96 h de inducción (Figura 27). Para asegurarnos que este aumento no era producto de una mayor cantidad de proteína cargada, la membrana fue re-incubada con un anticuerpo anti  $\beta$ -tubulina, cuya señal no se modifica y se utilizó para normalizar la señal de TbMaf1. Estos datos muestran que después de inducir el sistema de sobre-expresión, los niveles de proteína de TbMaf1 aumentan hasta 150%.

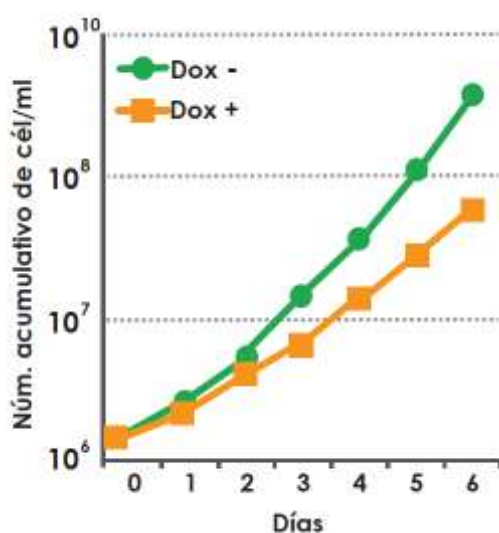


**Figura 27.** Ensayo tipo *Western blot* de la sobre-expresión de TbMaf1 (Panel A). Se analizó proteína de parásitos de sobre-expresión de TbMaf1 inducidos por diferentes tiempos con doxiciclina y sin inducir (Dox -). Como control de carga, la membrana fue reincubada con un anticuerpo anti- $\beta$ -tubulina. Los resultados densitométricos de tres experimentos independientes se muestran en el

panel B, los valores se normalizaron con el valor de  $\beta$ -tubulina y se analizaron con el método estadístico T-test de una muestra, \*\*  $p < 0.001$ , \*\*\*  $p < 0.0001$ .

### 5.5 Efecto de la sobre-expresión de TbMaf1 en crecimiento celular

Los experimentos anteriores comprobaron que contábamos con parásitos que sobre-expresan a TbMaf1. Con la finalidad de evaluar si este fenómeno tenía un impacto en el crecimiento celular de los parásitos, realizamos curvas de crecimiento. Éstas se realizaron de la misma manera que las curvas de los cultivos *knock-down*, comparando cultivos inducidos (Dox +) y sin inducir (Dox -) a una densidad inicial de  $5 \times 10^6$  cél/ml. Los cultivos se contaron diariamente a la misma hora aproximadamente y se diluyeron a la densidad inicial (Romero-Meza, 2012). Al graficar los datos observamos que los cultivos inducidos muestran un menor crecimiento (~30%) en comparación con los cultivos sin inducir (Figura 28). Esto concuerda con lo observado en nuestros parásitos *knock-down*, en los que los parásitos inducidos mostraban un mayor crecimiento celular. Así, al existir una sobre-expresión de TbMaf1 habría una represión mayor de la transcripción de Pol III (y quizás de las otras RNA polimerasas), lo que disminuiría los niveles de transcripción en general del parásito y esto generaría una disminución en el crecimiento de los cultivos.

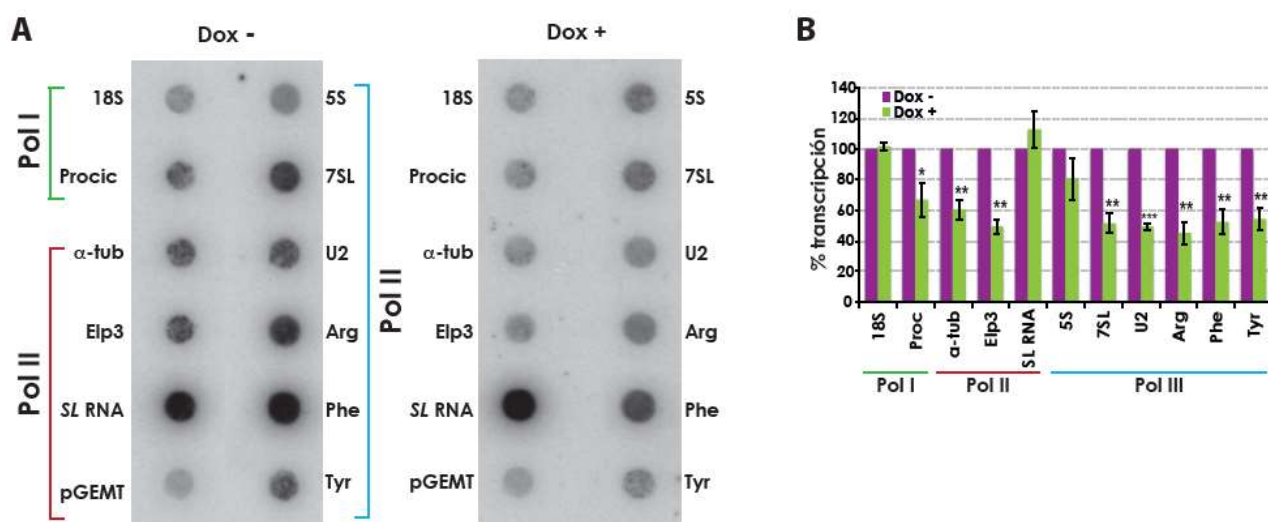


**Figura 28.** Patrón de crecimiento de células de *T. brucei* que sobre-expresan a TbMaf1, en ausencia (Dox -) o presencia (Dox +) de doxiciclina. Se muestra una gráfica representativa de tres experimentos realizados.

## 5.6. Efecto de la sobre-expresión de TbMaf1 en la transcripción

Para analizar el efecto del aumento de los niveles de TbMaf1 en la transcripción de Pol III en *T. brucei* se volvieron a realizar ensayos de *run-on* nuclear. Una batería de varios genes se utilizaron en estos ensayos. Los vectores que contenían secuencias correspondientes a los genes seleccionados se fijaron en membranas de nylon, las cuales se hibridaron con el RNA nascente marcado radioactivamente generado mediante *run-on* nuclear con cultivos de sobre-expresión de TbMaf1 inducidos con doxiciclina por 48 h (Dox +). Como control se usaron cultivos no inducidos (Dox -).

Se observó una disminución de ~50% en la señal de la mayoría de los genes transcritos por Pol III analizados, como el ncRNA 7SL, snRNA U2, y los tres tRNAs analizados (Figura 29). Nuevamente, el resultado obtenido con el gen del rRNA 5S no es concluyente, ya que éste mostró una disminución del 20% que no es estadísticamente significativa, evaluada con el método T-test de una muestra. Este dato, junto con los datos obtenidos en cultivos *knock-down*, sugiere que probablemente la regulación de TbMaf1 sobre la transcripción del rRNA 5S no sea tan estricta. El gen de prociclina, transcrito por la RNA Pol I mostró una disminución significativa del 35%, lo cual sugiere fuertemente que TbMaf1 podría regular la transcripción de este gen. Los genes transcritos por Pol II,  $\alpha$ -tubulina y Elp3b, disminuyeron entre un 40 y 50% después de la sobre-expresión de TbMaf1. Contradictoriamente, la señal del SL RNA aumentó un ~15%, aunque este aumento no resultó estadísticamente significativo. En los cultivos *knock-down* de TbMaf1, este gen mostró un aumento de más del 50%. Sin duda, con otro tipo de experimentos se podrá determinar si TbMaf1 participa en la regulación de la transcripción de este gen. Con estos resultados, comprobamos que TbMaf1 es un regulador general de la transcripción en el parásito.



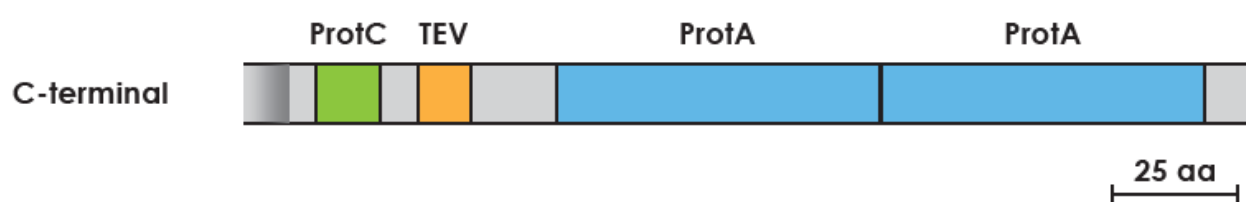
**Figura 29.** Efecto de la sobre-expresión de TbMaf1 en la transcripción de las tres RNA polimerasas en *T. brucei*. Panel A. Ensayo de *run-on* nuclear de células de *T. brucei* que sobre-expresan a TbMaf1, en presencia (Dox +) durante 48 h o en ausencia (Dox -) de doxiciclina. Panel B. La intensidad de las señales obtenidas en dos experimentos independientes fue determinada por densitometría y graficada: La señal de los cultivos inducidos o Dox + se muestran en verde y la de los no inducidos o Dox - en morado, los valores se normalizaron con el valor del rRNA 18S y se analizaron con el método estadístico T-test de una muestra, \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.001$ , \*\*\*  $p < 0.0001$ .

## 6. Localización celular de TbMaf1

En *S. cerevisiae* se identificó a Maf1 como una proteína principalmente citoplasmática, la cual se enriquecía en el núcleo bajo condiciones de crecimiento desfavorables (Oficjalska-Pham et al., 2006). En experimentos hechos en células de humano se observó que Maf1 es una proteína principalmente nuclear (Rollins, 2007). Para determinar la localización celular de TbMaf1, inicialmente intentamos realizar experimentos de inmunofluorescencia indirecta (IF) en parásitos *T. brucei* 29-13 con el anticuerpo anti-TbMaf1. Sin embargo, el anticuerpo generado en el laboratorio no fue útil en estos ensayos, ya que no mostró ninguna señal. Para sobreponer esta dificultad experimental, decidimos etiquetar a la proteína TbMaf1 para utilizar en los experimentos de IF un anticuerpo dirigido hacia la etiqueta o bandera. La bandera que seleccionamos fue PTP, la cual ha sido ampliamente usada en *T. brucei* por varios grupos de trabajo (Denninger, 2014; Koch, 2016 y Schimanski et al., 2005).

## 6.1. Generación de parásitos pC-TbMaf1-PTP

La bandera PTP consiste en un epítipo de proteína C de humano (ProtC) y dos dominios de proteína A (ProtA) de *Staphylococcus aureus* separados por un sitio de corte de la proteasa del virus del tabaco (TEV) (Figura 30) (G nzl & Schimanski, 2001). Existen anticuerpos comerciales que reconocen a los dominios de ProtC y ProtA. Para lograr la fusión de la proteína TbMaf1 a la bandera PTP se seleccionó una región de ~500 pb del extremo 3' del ORF de TbMaf1 para ser clonado en el vector pC-PTP, el cual permite la fusión de la bandera PTP en el extremo carboxilo-terminal de TbMaf1. Este vector está diseñado para integrarse en una de las copias endógenas del gen de interés mediante recombinación homóloga. La integración se dirige con el fragmento del gen clonado, en este caso, TbMaf1. Así, los parásitos transfectados expresarían una copia endógena de TbMaf1 fusionada a PTP en su extremo carboxilo-terminal. Es importante señalar que el vector incluye sitios de procesamiento de genes con una alta expresión en *T. brucei*, pues el sitio aceptor del SL RNA es del gen de prociclina y el extremo 3'-UTR es de la subunidad mayor de la RNA Pol I, C190. Esto con la finalidad de que el gen etiquetado tenga una alta expresión (Schimanski et al., 2005).

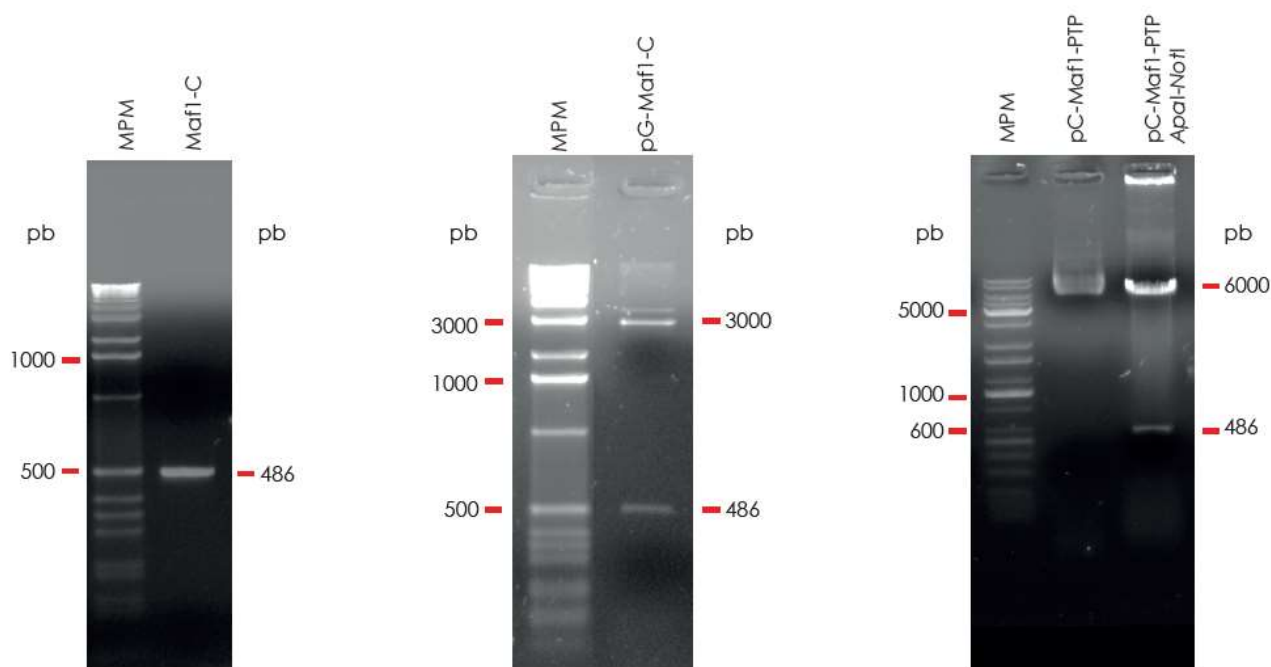


**Figura 30.** Representación esquemática de la bandera PTP. El final del ORF del gen etiquetado se esquematiza con el cuadro gris obscuro. El dominio de Proteína C se encuentra en color verde, el sitio de corte de la proteasa del virus del tabaco en amarillo y los dominios de Proteína A se representan en azul. Figura a escala.

### 6.1.1. Obtención del vector pC-TbMaf1-PTP

Un fragmento de 486 pb del extremo 3' del ORF de TbMaf1-8 fue amplificado mediante PCR (Figura 31, panel A). El fragmento, denominado Maf1-C, fue

purificado con un kit comercial y clonado en el vector pGEMT-easy. De las colonias obtenidas, se obtuvo pDNA y mediante análisis de restricción con la enzima *EcoRI*, se verificó que una de las colonias seleccionadas contuviera el inserto Maf1-C (Figura 31, panel B). El inserto fue liberado con las enzimas *NotI* y *ApaI* para clonar de forma sitio dirigida en el vector pC-PTP previamente digerido con el mismo par de enzimas. Así se generó el vector pC-PTP-Maf1. Una de las colonias resultantes de la clonación se analizó por restricción para verificar que contuviera el inserto (Figura 31, panel C) y posteriormente se envió a secuenciar para verificar la integridad del fragmento Maf1-C y que éste se encontrara en marco con la bandera PTP.

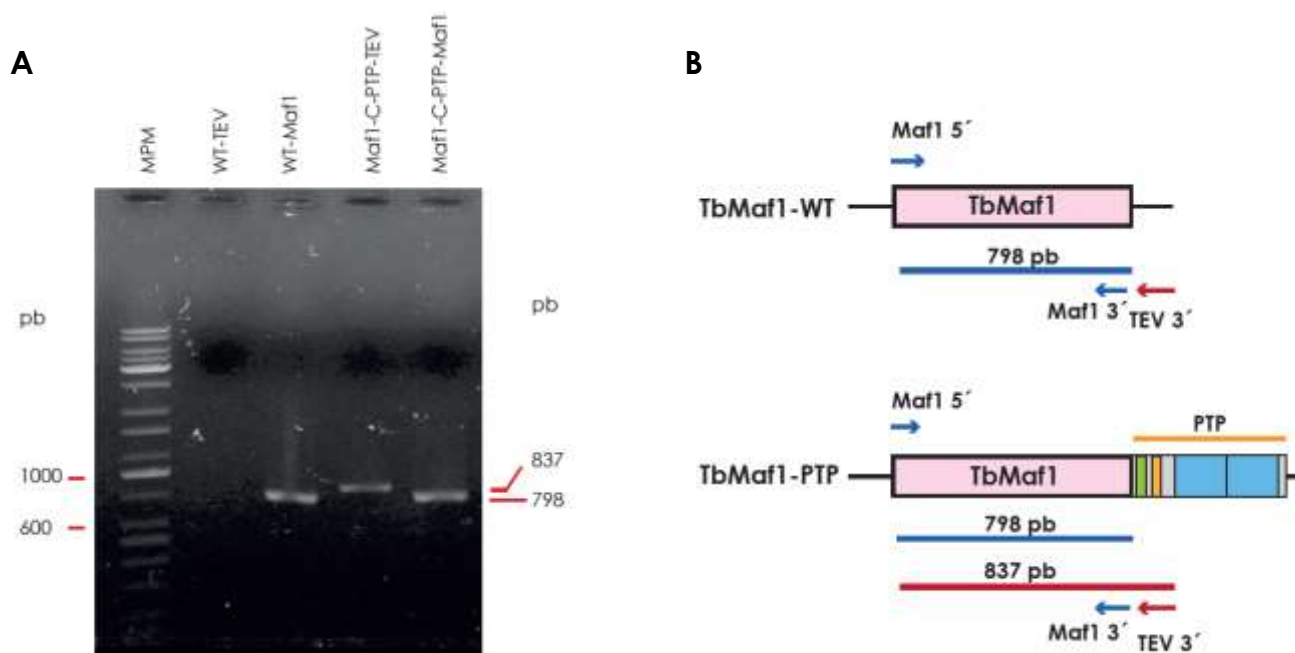


**Figura 31.** Clonación del fragmento Maf1-C. Panel A. Amplificación del fragmento Maf1-C, gel de agarosa al 1.5%. Panel B. Digestión del vector pG-Maf1-C con la enzima *EcoRI*, gel de agarosa al 0.8%. Panel C. Análisis de restricción del vector pC-Maf1-PTP con las enzimas *NotI* y *ApaI*, gel de agarosa al 0.8%. MPP: escalera de 1 Kb plus de Invitrogen.

### 6.1.2. Transfección del vector pC-TbMaf1-PTP y caracterización de clonas positivas

El plásmido pC-TbMaf1-PTP se transfectó en parásitos de *T. brucei* 29-13 mediante electroporación y la selección se realizó con blasticidina. Siete días después se obtuvieron poblaciones estables las cuales se clonaron mediante dilución

limitada. Se recuperaron 10 clonas para su posterior análisis. Como se explicó anteriormente, este vector debe de recombinar en una de las copias endógenas de TbMaf1. Se ha observado en parásitos de *T. brucei* que con baja frecuencia pueden ocurrir eventos de recombinación en sitios distintos a los sitios blanco, sin que hasta el momento haya una explicación a este fenómeno (Asbroek, 1993). Por lo anterior, era importante determinar si las clonas obtenidas, resistentes a blasticidina, tenían integrado el vector pC-TbMaf1 en el sitio correcto. Para demostrarlo, seleccionamos inicialmente una de las clonas obtenidas e hicimos experimentos de PCR con dos pares de oligonucleótidos distintos. Uno para amplificar el ORF de TbMaf1 de ~800 pb y el segundo para amplificar el ORF de TbMaf1 y una parte de la bandera PTP correspondiente a las regiones ProtC y TEV. El tamaño de este amplicón es de 837 pb (Figura 32, panel B). A partir de gDNA de parásitos sin transfectar y de clonas de parásitos pC-TbMaf1-PTP se realizaron estos experimentos logrando amplificar el ORF de TbMaf1 con el primer par de oligonucleótidos (Maf1-5' y Maf13') en ambas muestras, como era esperado. Utilizando el segundo par de oligonucleótidos (Maf1-5' y TEV) sólo obtuvimos amplificación con gDNA de parásitos transfectados, mientras que con gDNA de parásitos silvestres no se obtuvo ninguna amplificación, ya que estos parásitos no contienen la secuencia blanco del oligonucleótido TEV (Figura 32, panel A). Esto demuestra que la clona seleccionada de parásitos pC-TbMaf1 integró exitosamente el vector en una de las copias endógenas de TbMaf1.

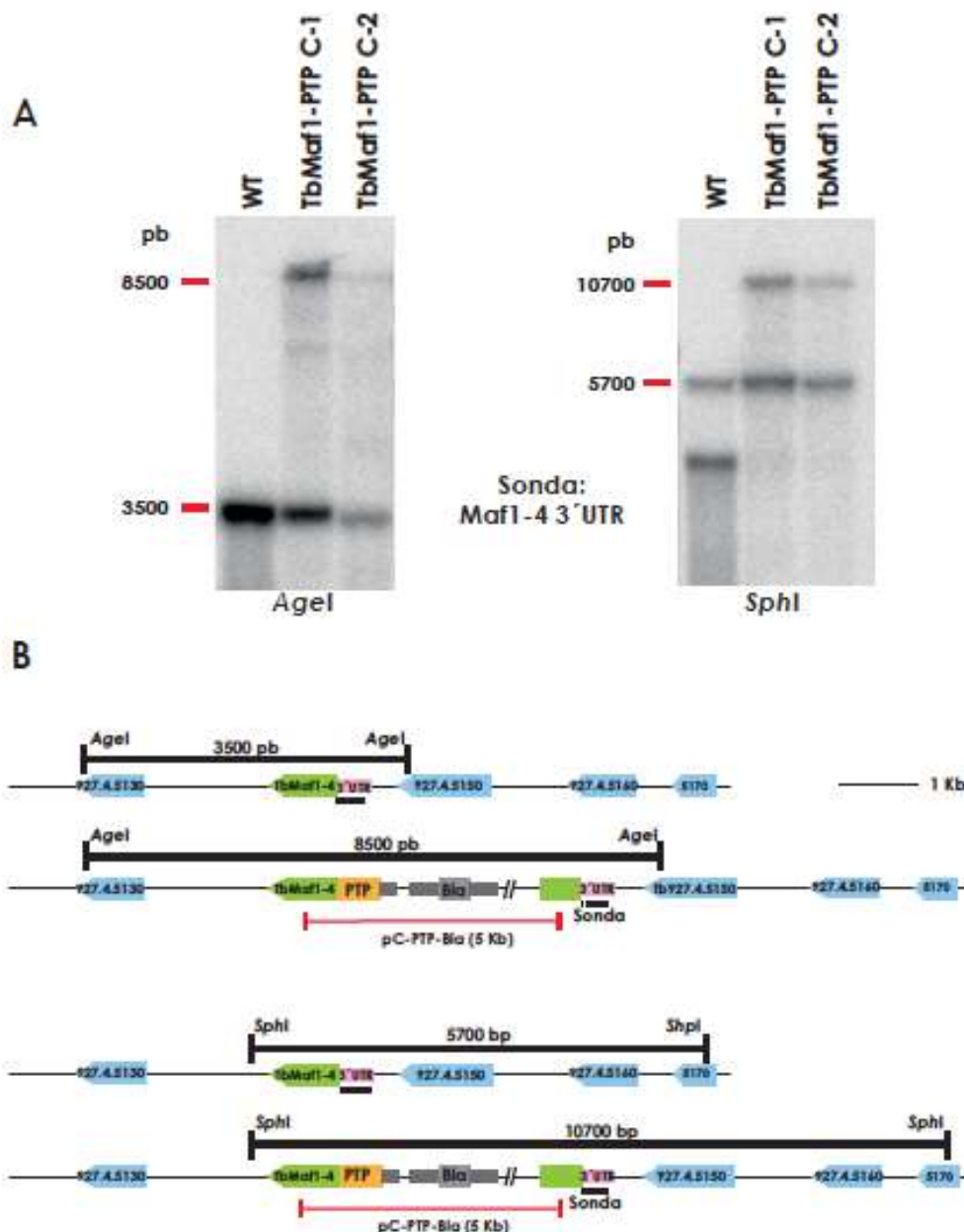


**Figura 32.** Comprobación de la integración del vector pC-TbMaf1 en parásitos de *T. brucei*. Panel A. Gel de agarosa al 1% con la amplificación del ORF de TbMaf1 de 798 pb a partir de gDNA de parásitos sin transfectar (WT-Maf1) y transfectados con el vector indicado (Maf1-C-PTP-Maf1). Se amplificó también el ORF de TbMaf1 fusionado al PTP (837 pb) en parásitos transfectados (Maf1-C-PTP-TEV). Como control negativo se intentó la misma amplificación a partir de gDNA de parásitos silvestres (WT-TEV). Se muestra un experimento representativo de diez. Panel B. Esquema representativo de los fragmentos amplificados en este experimento y los oligonucleótidos utilizados. MPM: escalera de 1 kb de Invitrogen.

De las diez 10 clonas obtenidas, solamente dos de ellas mostraron la integración correcta del vector pC-TbMaf1-PTP (Figura 32 y datos no mostrados), por lo que los experimentos posteriores se realizaron con estas dos clonas, a las que denominamos C-1 y C-2. Es importante recordar que *T. brucei* posee 2 copias de TbMaf1, una en el cromosoma 8 y otra en el cromosoma 4. Además, el parásito es un organismo diploide, por lo que existían cuatro sitios probables de integración del vector. Por lo anterior, era necesario determinar en qué copia de TbMaf1 ocurrió la recombinación en las dos clonas obtenidas. Para responder esto, realizamos un experimento de *Southern blot*, tratando el gDNA con distintas enzimas de restricción, con lo cual se observaría un patrón diferente dependiendo de donde hubiese ocurrido la integración del vector pC-TbMaf1-PTP. Las membranas se hibridaron con sondas correspondientes a las regiones 3'-UTR de TbMaf1-4 (304 pb) o de TbMaf1-8 (286 pb).



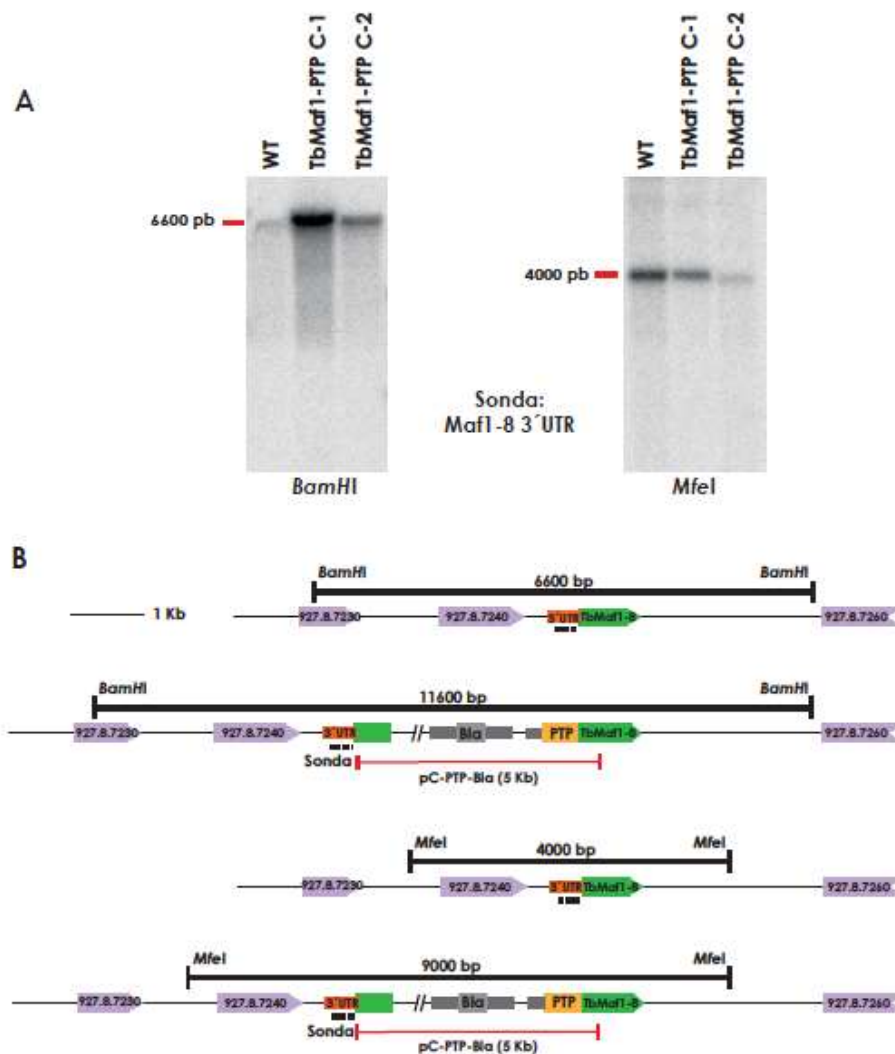
El resultado del *Southern blot* usando como sonda un fragmento del 3'-UTR del gen *TbMaf1-4* muestra en el carril correspondiente a parásitos sin transfectar (WT) una banda de 3500 pb con la enzima *Agel* y con *SphI* una banda de 5700 pb, lo cual coincide con el patrón predicho (Figura 33, panel B). Al analizar el gDNA proveniente de parásitos transfectados (*TbMaf1-PTP*) el patrón obtenido con la enzima *Agel* muestra una banda de 8500 pb y con la enzima *SphI* una banda de 10700 pb (Figura 33, panel A), fragmentos esperados en caso de haber ocurrido la integración del vector de 5 kb en esta copia. Este resultado demuestra que la integración del vector pC-*TbMaf1-PTP* ocurrió en el gen *TbMaf1-4*. Las dos clonas analizadas mostraron el mismo patrón.



**Figura 33.** Ensayo tipo *Southern blot* de parásitos TbMaf1-PTP. Panel A. Membranas hibridadas con un fragmento del extremo 3'-UTR de TbMaf1-4. La primera membrana muestra el resultado de gDNA digerido con la enzima *Agel* y la segunda membrana contiene gDNA digerido con *SphI*. Panel B. Representación esquemática de la ubicación de los sitios de corte utilizados en este experimento en el locus de TbMaf1-4 y genes aledaños. Se indica el tamaño de los fragmentos de restricción esperados.

Para comprobar este resultado, se hizo otro experimento de *Southern blot* utilizando como sonda un fragmento del 3'-UTR de TbMaf1-8 con gDNA tratado con otras enzimas de restricción. En este experimento, observamos en todos los carriles, tanto de parásitos silvestres (WT) como en las dos clonas analizadas de parásitos transfectados (TbMaf1-PTP) una única banda de 6600 pb con la enzima

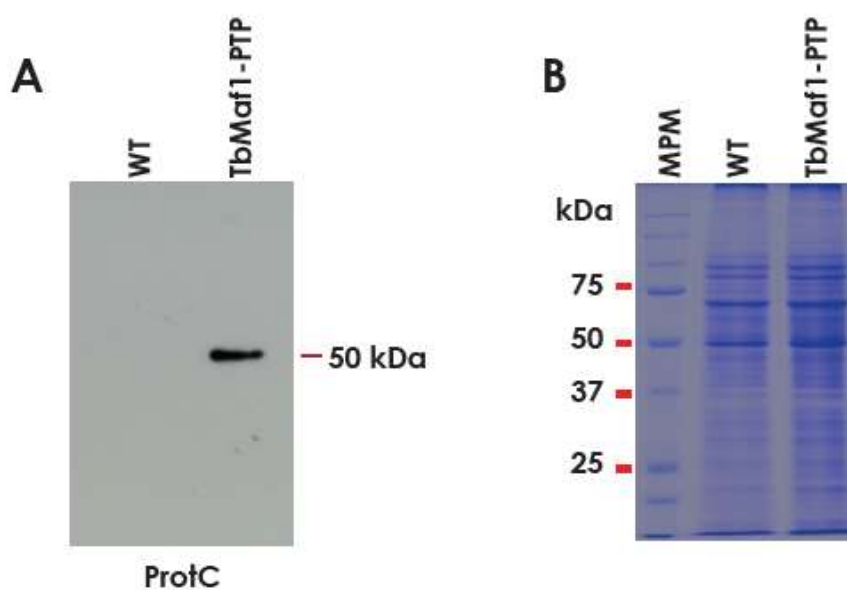
*Bam*HI (Figura 34, panel A). Este resultado se comprobó al tratar el gDNA con la enzima *Mfe*I y observar en todos los carriles una única banda de 4000 pb, lo cual coincide con el patrón predicho (Figura 34, panel B). Este resultado comprueba que la integración del vector pC-TbMaf1-PTP ocurrió en el gen TbMaf1-4 en las dos clonas obtenidas.



**Figura 34.** Ensayo tipo *Southern blot* de parásitos TbMaf1-PTP. Panel A. Membranas hibridadas con un fragmento del extremo 3'-UTR de TbMaf1-8. La primera membrana muestra el resultado de gDNA digerido con la enzima *Bam*HI y la segunda membrana corresponde a gDNA digerido con *Mfe*I. Panel B. Representación esquemática de la ubicación sitios de corte utilizados en este experimento en el locus de TbMaf1-8 y genes aledaños. Se indica el tamaño de los fragmentos de restricción esperados.

El siguiente paso a determinar era si la proteína de fusión TbMaf1-PTP se estaba expresando en las clonas seleccionadas. Para contestar esta pregunta,

realizamos experimentos de *Western blot*, utilizando el anticuerpo anti-ProtC que reconoce una región de la bandera PTP (Figura 30). Se utilizó proteína total de parásitos sin transfectar (WT) y tranfectados con el vector pC-TbMaf1-PTP. El resultado nos reveló la expresión de la proteína TbMaf1-PTP con un peso de 50 kDa, el cual coincide con el esperado (Figura 35, panel A). Como se esperaba, en el carril correspondiente a proteína proveniente de parásitos silvestres no se observó ninguna señal. Un gel de poliacrilamida que contenía la misma cantidad de proteína se tiñó con azul de Coomassie para comprobar que en ambos carriles se cargaron cantidades similares de proteína (Figura 35, panel B). Las dos clonas obtenidas mostraron el mismo resultado y la expresión de la proteína recombinante en proporciones similares, por lo que los siguientes experimentos se realizaron únicamente con la clona C-1.

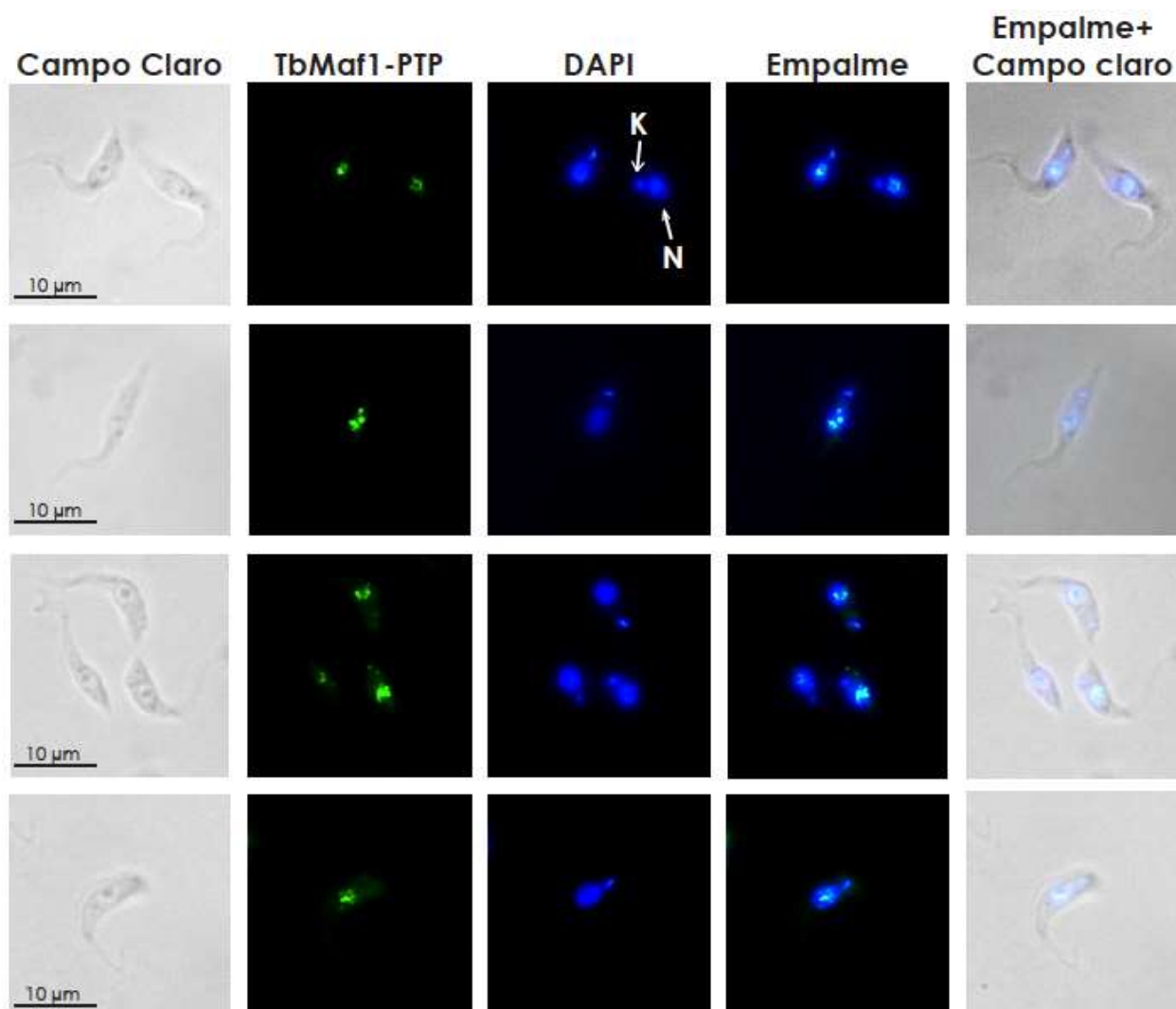


**Figura 35.** Ensayo tipo *Western blot* de parásitos TbMaf1-PTP (Panel A). Membrana con proteína de parásitos silvestres (WT) y parásitos transfectados con el vector pC-TbMaf1-PTP incubada con el anticuerpo anti-ProtC. Panel B. Gel de poliacrilamida al 10% teñido con azul de Coomassie que contiene 80 µg de proteína de parásitos sin transfectar y transfectados con el vector pC-TbMaf1-PTP. Experimento representativo de dos realizados. MPM: All blue de Biorad.

## 6.2. Inmunofluorescencia indirecta en parásitos TbMaf1-PTP

Después de comprobar la expresión de la proteína recombinante TbMaf1-PTP, utilizamos a estos parásitos para realizar experimentos de IF y así poder determinar

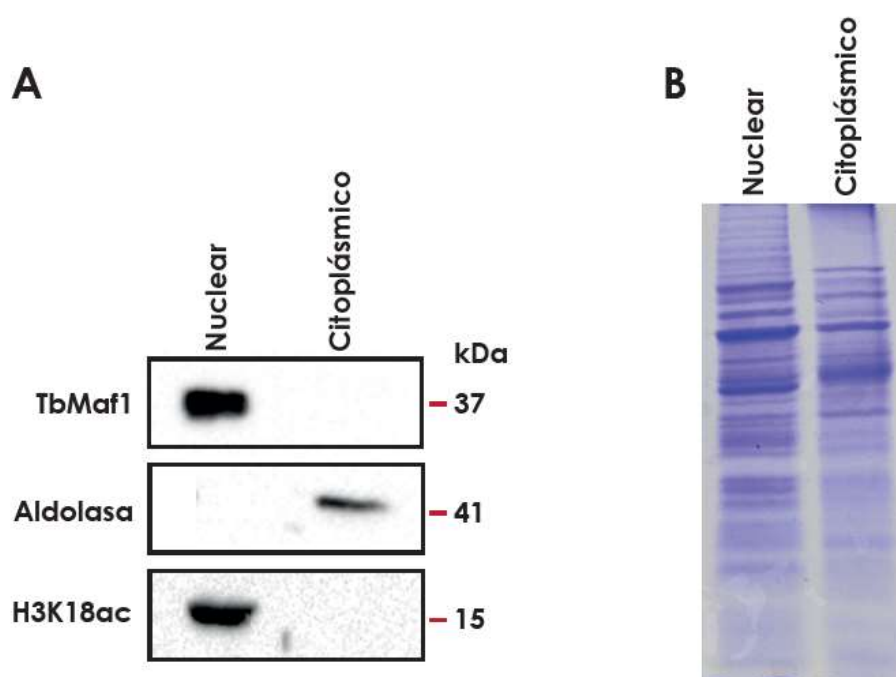
la localización celular de TbMaf1-PTP. En estos experimentos se utilizó el anticuerpo anti-ProtC, el cual está dirigido a esta región contenida en la bandera PTP (Figura 30). Como control negativo se utilizaron células silvestres que no expresan la proteína TbMaf1 fusionado a PTP. En estas células no observamos señal. Por el contrario, en las células TbMaf1-PTP observamos señales con un patrón puntuada que empalma con la señal de DAPI en el núcleo de parásitos *T. brucei*. Este resultado indica que la localización celular de TbMaf1 es nuclear (Figura 36).



**Figura 36.** Ensayo de inmunofluorescencia indirecta con el anticuerpo anti-ProtC en parásitos de *T. brucei* que expresan la proteína TbMaf1-PTP. La señal de TbMaf1-PTP se identifica en verde, los núcleos (N) y el cinetoplasto (K) se tiñeron con DAPI y se encuentran en azul. Se muestran imágenes representativas de 3 experimentos independientes.

### 6.3. Localización celular de TbMaf1 en parásitos silvestres

Los experimentos de inmunofluorescencia indirecta nos indicaron que la proteína de fusión TbMaf1-PTP se localiza en el núcleo. Sin embargo, quisimos conocer si la proteína TbMaf1 en parásitos silvestres también se encontraban en el núcleo. Como se mencionó anteriormente, el anticuerpo policlonal anti-TbMaf1 no fue útil en los experimentos de IF, por lo que para responder esta interrogante hicimos un fraccionamiento celular para extraer proteína nuclear y citoplásmica. Estas fracciones proteicas se utilizaron en experimentos de *Western blot*. Como control nuclear se usó un anticuerpo contra la histona H3 acetilada en la lisina 18 (H3K18ac), la cual tiene un peso de 15 kDa. Como era esperado, con este anticuerpo sólo obtuvimos señal en el carril correspondiente a extractos nucleares (Figura 37, panel A). Como control citoplasmático se utilizó un anticuerpo que reconoce a una aldolasa de 41 kDa; la señal de esta proteína sólo se observa en la fase citoplasmática como esperábamos (Figura 37, panel A). Estos resultados indicaban que las fracciones proteicas se encontraban puras. Al incubar estas mismas membranas con el anticuerpo específico de TbMaf1, observamos la señal de esta proteína únicamente en la fracción nuclear, con un peso esperado de 37 kDa (Figura 37, panel A). Para demostrar que la ausencia de señal de TbMaf1 en la fracción citoplasmática no se debía a la cantidad de proteína cargada, un gel de poliacrilamida con las mismas cantidades de fracciones proteicas usadas en los ensayos de *Western blot* se tiñó con azul de Coomassie (Figura 37, panel B). Con este resultado comprobamos que la localización de TbMaf1 es nuclear, no sólo en parásitos TbMaf1-PTP sino también en parásitos silvestres.



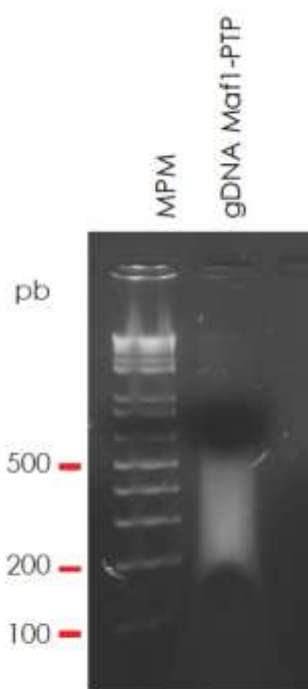
**Figura 37.** Ensayo de *Western blot* con fracciones proteicas nucleares y citoplásmicas de parásitos silvestres de *T. brucei*. Panel A. Experimento de *Western blot* utilizando el anticuerpo anti-TbMaf1. Los anticuerpos anti-aldolasa y anti-H3K18ac se usaron como control de pureza. Panel B. Gel de poliacrilamida al 10% con 80  $\mu$ g de proteína nuclear y citoplásmica teñido con azul de Coomassie.

## 7. Inmunoprecipitación de la cromatina en parásitos TbMaf1-PTP

Nuestros resultados demuestran que TbMaf1 es una proteína nuclear que regula negativamente la transcripción general en *T. brucei*. Esto nos llevó a preguntarnos a qué regiones del genoma se une TbMaf1, directa o indirectamente, para ejercer su acción represora. La estrategia experimental para responder esta pregunta se realizaron experimentos de inmunoprecipitación de la cromatina o ChIP. Estos experimentos requieren de un anticuerpo altamente selectivo y específico, por lo que no era recomendable utilizar el anticuerpo casero anti-TbMaf1PTP. La otra alternativa era utilizar un anticuerpo comercial anti-Maf1 de humano. Sin embargo, el porcentaje de identidad entre Maf1 de humano y de *T. brucei* es bajo (23%), por lo que la probabilidad de que funcionara exitosamente era reducida. Para superar estos problemas, decidimos utilizar los parásitos que expresan a la proteína de fusión TbMaf1-PTP para los experimentos tipo ChIP, e inmunoprecipitar la cromatina con un anticuerpo dirigido a la región de Prot A

contenida en la bandera PTP (Figura 30). Otros grupos de investigación han utilizado este anticuerpo en parásitos que expresan la bandera PTP exitosamente (Lee, 2009a).

Los núcleos de parásitos que expresan la proteína de fusión TbMaf1-PTP se sonicaron para obtener fragmentos de entre 200 a 500 pb, tamaño ideal para analizar las regiones de DNA inmunoprecipitado (Figura 38). Después, una fracción de la cromatina sonicada se puso a interactuar con 10  $\mu$ g del anticuerpo anti-ProtA. Como control negativo, cromatina sonicada también se incubó con suero de conejo. Después de realizar varios lavados y revertir los enlaces covalentes generados en el paso de fijación, el DNA inmunoprecipitado se purificó y se recuperó para analizarse por PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR).

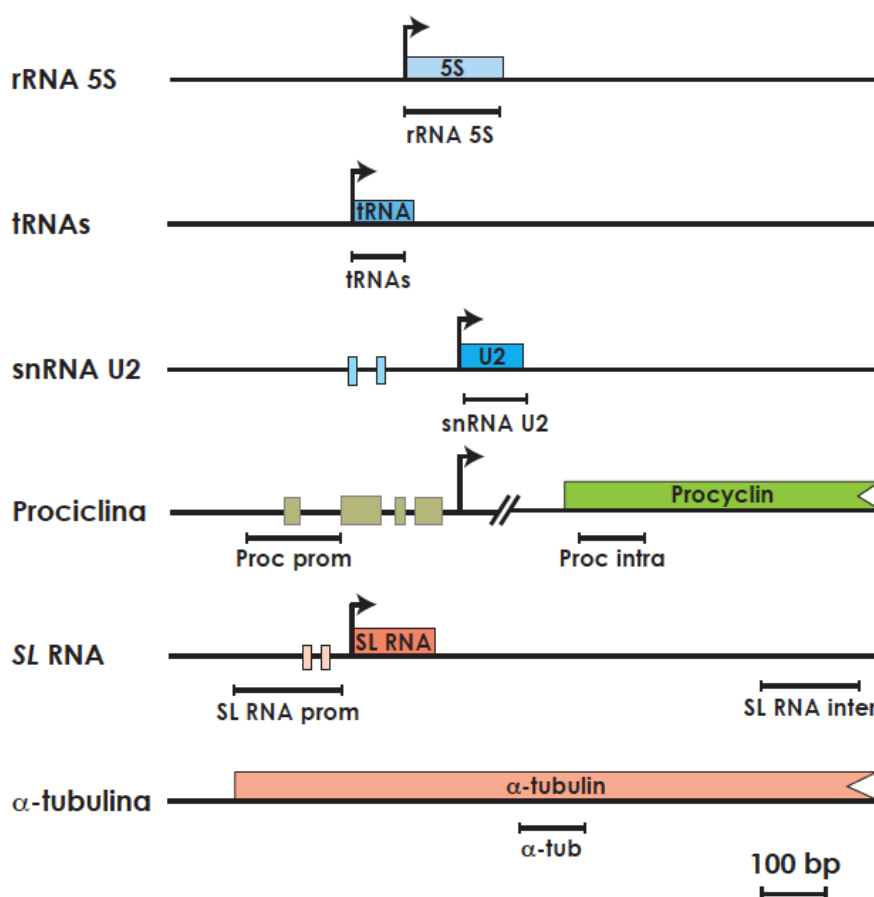


**Figura 38.** Patrón de sonicación obtenido a partir de parásitos de *T. brucei* TbMaf1-PTP. Gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio. MPM: escalera de 1 kb de Invitrogen.

Para el análisis de qPCR se seleccionaron fragmentos correspondientes a genes transcritos por las tres RNA polimerasas, tanto de regiones promotoras como de regiones codificantes o intergénicas como control (Figura 39). Para la RNA Pol I se seleccionó el promotor de prociclina (Prom proc) y como control una región del



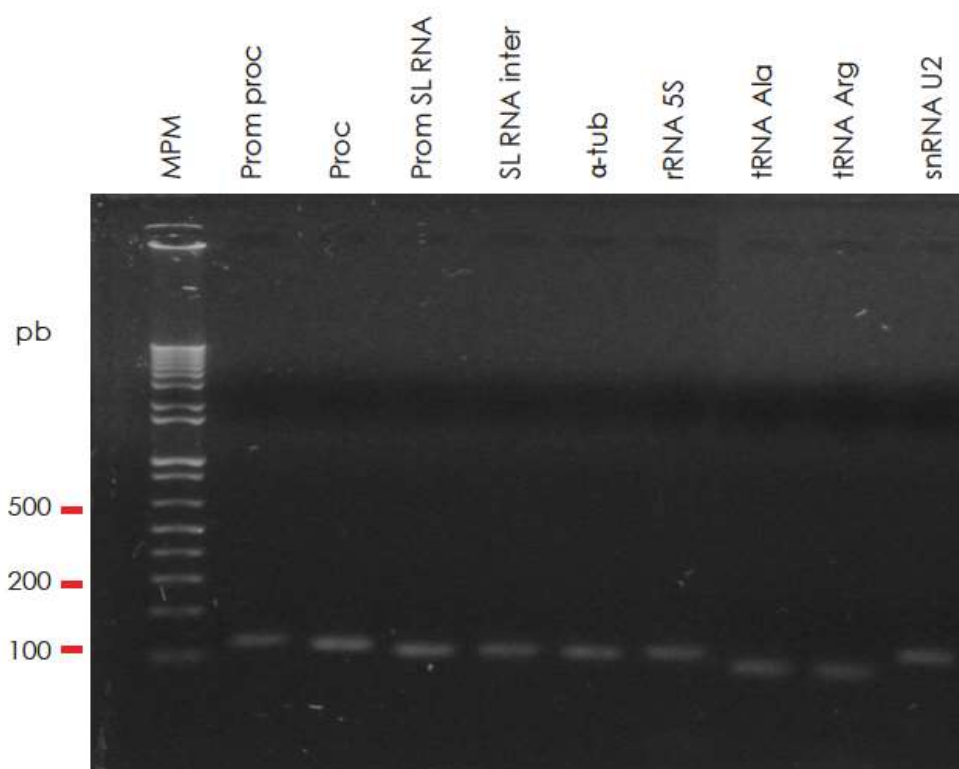
gen de prociclina (Proc). Como se mencionó en la introducción, el único promotor de la RNA Pol II caracterizado hasta el momento en *T. brucei* es el del gen del SL RNA (Prom SL RNA), por lo que se seleccionó esta región para su análisis. Como controles, se amplificó una región intergénica del tándem de genes SL RNA (SL RNA inter) y además una región del gen de  $\alpha$ -tubulina ( $\alpha$ -tub). Para Pol III se seleccionaron genes de las tres tipos de Pol III. De la tipo 1 se evaluó el rRNA 5S, del tipo 2 se analizaron dos genes de tRNA, el de alanina (Ala) y el de Arginina (Arg). Por último se evaluó al snRNA U2, perteneciente al tipo 3. Cabe mencionar que la región amplificada de este gen corresponde a la región codificante, la cual no contiene la región promotora (Figura 8), por lo que ese fragmento fue seleccionado como control negativo.



**Figura 39.** Representación esquemática a escala de los loci de *T. brucei* evaluados mediante ChIP-qPCR.

Como se recomienda, los fragmentos amplificados tuvieron un tamaño de entre 80 y 130 pb. Esto para asegurar que en un ciclo de amplificación se complete la

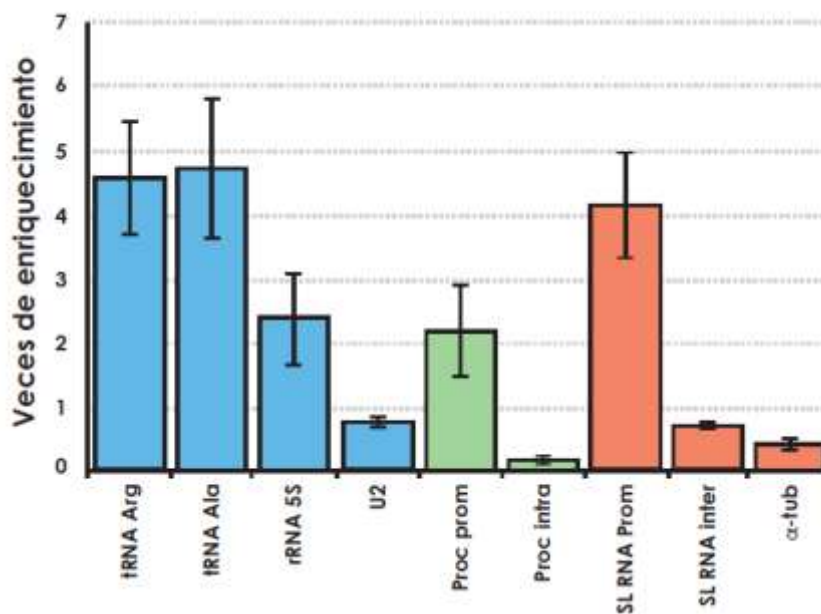
síntesis del amplicón. Además, al realizar estos experimentos con DNA fragmentado, amplicones pequeños aseguran que la secuencia blanco a analizar esté íntegra (y no fragmentada) y los resultados no se vean afectados por esta razón (AppliedBiosystems, 2012). Antes de realizar los experimentos en qPCR, realizamos PCRs de punto final para estar seguros que los oligonucleótidos seleccionados amplificaban un sólo producto del tamaño esperado (Figura 40). Varios amplicones pueden generar resultados poco confiables.



**Figura 40.** Amplificación por PCR de punto final de los fragmentos a analizar por ChIP-qPCR. Gel de agarosa al 2.5% teñido con bromuro de etidio. MPM: escalera de 1 kb de Invitrogen.

Una vez que comprobamos que los oligonucleótidos seleccionados generaban un sólo producto de PCR, los utilizamos en experimentos de qPCR. Después de obtener los valores de  $C_t$ , el método estadístico para realizar el análisis fue el de  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  para conocer las veces de enriquecimiento de TbMaf1-PTP sobre el control negativo. El análisis mostró que TbMaf1-PTP está enriquecido en las regiones promotoras de las tres RNA Polimerasas: en los tRNAs y en el gen del rRNA 5S (cuyos promotores son intragénicos), en la región promotora del SL RNA transcrito por Pol II y en la región promotora de prociclina, transcrito por Pol I (Figura 41). Este

enriquecimiento no se observó en regiones que no corresponden a regiones promotoras. Este resultado sugiere fuertemente que TbMaf1-PTP se une a las regiones promotoras de las tres RNA polimerasas para regular negativamente la transcripción en *T. brucei*.



**Figura 41.** Gráficas de los resultados del análisis de experimentos ChIP-qPCR que muestran las veces de enriquecimiento de TbMaf1-PTP sobre el control negativo en las diferentes regiones genómicas. Se muestra el promedio de tres experimentos independientes.

## Discusión

Los parásitos tripanosomátidos generan enfermedades mortales como leishmaniasis y tripanosomiasis que tienen un gran impacto en la salud y economía en zonas tropicales y subtropicales de todo el mundo. A pesar de eso, hay pocas iniciativas farmacéuticas interesadas en desarrollar un tratamiento efectivo contra ellas. Se espera que los estudios tendientes a conocer aspectos básicos de la biología molecular de este grupo de organismos aporten información importante que a mediano plazo ayude al control de las enfermedades que producen. Entre los tripanosomátidos, *T. brucei* es el organismo más ampliamente usado para estudiar la función de los genes, pues es el único tripanosomátido que cuenta naturalmente con el sistema de RNAi. Esto lo convierte en un excelente modelo de estudio para generar *knock-downs* de genes de interés y así evaluar su función. En contraste, para llevar a cabo estudios funcionales en *Leishmania* y *T. cruzi* es necesario realizar *knock-outs* génicos, los cuales requieren de mucho tiempo y no permiten el estudio de genes esenciales para la viabilidad celular. De esta forma, es posible extrapolar los datos funcionales obtenidos en *T. brucei* hacia otros tripanosomátidos que causan enfermedades en nuestro país como *L. mexicana* que causa leishmaniasis y *T. cruzi*, causante de la enfermedad de Chagas.

Maf1 fue identificado inicialmente en levadura como un represor de la transcripción de Pol III. Estudios posteriores demostraron que también está presente en metazoarios y que puede regular negativamente a las RNA Polimerasas I y II, además de participar en otros procesos metabólicos (Khanna, 2015). En este trabajo caracterizamos al ortólogo de Maf1 en *T. brucei*, un eucarionte que divergió muy tempranamente del linaje principal, por lo que es probable que Maf1 haya estado presente en el antecesor común de todos los organismos eucariontes, lo que sugeriría que los mecanismos de represión de la transcripción en los que participa son evolutivamente muy antiguos.

*T. brucei* posee dos genes de TbMaf1, TbMaf1-4 y TbMaf1-8, y la homología entre ambos es muy alta (95% de identidad). Al hacer un análisis tipo BLAST en los

genomas de otros tripanosomátidos con la secuencia de TbMaf1, encontramos ortólogos putativos en *Leishmania braziliensis*, *Leishmania infantum*, *Leishmania major*, *Leishmania mexicana*, *Trypanosoma congolense*, *Trypanosoma cruzi*, *Trypanosoma evansi* y *Trypanosoma vivax*. De forma interesante, la única especie de *Leishmania* que mostró dos genes probables de Maf1 fue *L. braziliensis*, uno localizado en el cromosoma 17 y otro en el cromosoma 31. A diferencia de lo que ocurre en *T. brucei*, las dos copias de Maf1 de *L. braziliensis* son idénticas, incluyendo sus regiones UTR, lo cual sugiere que la duplicación del gen en este organismo ocurrió más recientemente que en *T. brucei*. Otro dato interesante es que el único tripanosomátido en el que no encontramos un gen (o pseudogen) de Maf1 es *Trypanosoma rangeli*. Trabajos futuros determinarán el probable significado funcional de la ausencia de Maf1 en esta especie. Cabe mencionar que la sintenia de los genes putativos de Maf1 entre los organismos del género *Leishmania* es muy alta, pero no así entre los del género *Trypanosoma*.

Se han caracterizado varios reguladores negativos de Pol III en metazoarios, como Myc, p53 y Rb, los cuales han sido estudiados ampliamente al estar involucrados en procesos de transformación oncogénica (White, 2004). Resulta interesante el hecho de que ninguno de estos reguladores parece estar presente en los tripanosomátidos o en algún otro grupo de parásitos (Fernandes, 2008). Esto sugiere que Maf1 es el único regulador negativo de la transcripción en parásitos. De aquí la importancia de su estudio en *T. brucei* y otros parásitos.

La estructura secundaria de los dominios A, B y C de TbMaf1 resultó muy similar a la reportada para Maf1 de humano (HsMaf1) (Vannini, 2010). Sin embargo, el extremo carboxilo-terminal mostró una estructura diferente entre TbMaf1-4 y TbMaf1-8, ya que ésta última posee una estructura de hélice antes de una estructura de  $\beta$ -plegada. TbMaf1-4 únicamente tiene una  $\beta$ -plegada en esta región. En el extremo carboxilo-terminal es donde se localiza la mayoría de los aminoácidos diferentes entre estas proteínas, por lo que resulta lógico que la estructura pueda ser diferente, dado que algunos de los residuos pertenecen a diferentes grupos. En particular, en la posición 251 TbMaf1-4 presenta una histidina (H), que pertenece al grupo de los aminoácidos polares positivos, y TbMaf1-8 una

glutamina (Q), que es un aminoácido sin carga. Se ha visto que algunas proteínas pueden sufrir un cambio conformacional al modificar sólo algunos átomos de un aminoácido en particular (Albet, 2007). Realizando la cristalografía de ambas proteínas de TbMaf1 podremos determinar si este cambio estructural está presente *in vivo* y principalmente cual es su implicación a nivel funcional.

La predicción de la estructura terciaria también resultó muy similar a la reportada para HsMaf1, presentando una estructura globular, sin que los dominios conservados correspondan a dominios estructurales definidos. Al haberse realizado la cristalografía de HsMaf1 sin las regiones *linker* y carboxilo-terminal, fue complicado determinar qué estructura podrían tener estas regiones en *T. brucei*, ya que el programa utilizado no predice una estructura terciaria definida en estas regiones. A la fecha no hay evidencia experimental de si estas regiones son relevantes para la función de Maf1, aunque su baja homología entre especies sugiere que no son importantes (Pluta, 2001).

Al ser las modificaciones post-traduccionales un elemento importante en la regulación de Maf1 en otras especies, fue importante co-relacionar los datos de fosforilación obtenidos *in silico* anteriormente con la estructura tridimensional de TbMaf1. En este análisis observamos que varios de los sitios probables de fosforilación de TbMaf1 quedan accesibles estructuralmente, lo que nos sugiere que pueden ser fosforilados *in vivo*. En el laboratorio se realizaron varios experimentos de *Western blot* usando el anticuerpo específico para TbMaf1 con proteínas totales tratadas con una fosfatasa alcalina de intestino de ternero (CIAP) y como control, proteína no tratada. El resultado esperado era observar que el tratamiento con CIAP modificara el corrimiento de TbMaf1. Lamentablemente, a pesar de varios intentos con diferentes condiciones, no tuvimos resultados contundentes que nos ayudaran a determinar si TbMaf1 se fosforila *in vivo*. Existe un reporte en el que se determinaron varias proteínas fosforiladas en *T. brucei* (Nett, 2009). Desafortunadamente, este reporte tampoco contiene dentro de la lista de proteínas con esta modificación a ninguna de las dos formas de TbMaf1. Una posibilidad es que TbMaf1 no se fosforile y se regule por otros mecanismos.

HsMaf1 es SUMOilada en la lisina 35 y si esta modificación es relevante para su acción represora hacia Pol III (Rohira, 2013). De forma significativa, este residuo no está conservado en TbMaf1, lo que podría sugerir que esta modificación post-traducciona no ocurre en TbMaf1. A pesar de que se ha reportado que existe SUMOilación en *T. brucei* (Liao, 2010), hasta el momento no existe un programa que prediga los sitios susceptibles de SUMOilación en el parásito. Utilizando programas de predicción disponibles en la red, no encontramos residuos que puedan tener esta modificación en TbMaf1, lo cual apoya nuestra teoría. Utilizando anticuerpos específicos para el grupo SUMO de *T. brucei* (López-Farfán, 2010), podríamos tratar de determinar mediante experimentos de *Western blot* con proteína TbMaf1 purificada, si nuestra hipótesis es cierta.

Un dato importante que determinamos en este trabajo es la localización celular de TbMaf1. Aunque la SLN hallada en la secuencia primaria de la proteína sugería que se trataba de una proteína nuclear, no sabíamos si realmente ocurría así. Nuestros experimentos de inmunofluorescencia indirecta lograron determinar que TbMaf1 es una proteína nuclear principalmente y que no transloca del núcleo hacia el citoplasma, como ocurre en levadura (Towpik, 2008). Este resultado podría suponer dos escenarios: 1) que TbMaf1 esté ayudando a modular la transcripción en el parásito continuamente; y 2) que sólo bajo ciertos estímulos TbMaf1 se active y ejerza su acción represora. Además es interesante que la regulación de TbMaf1 es distinta a la descrita en levadura, en donde debe translocarse al núcleo para actuar.

Los resultados obtenidos anteriormente con el *knock down* de TbMaf1 nos sugirieron que TbMaf1 participa en la regulación general de la transcripción en el parásito. En los últimos años, han sido publicados reportes donde observan regulación de Maf1 hacia algunos genes transcritos por Pol II (Khanna, 2014; Lee, 2015 y Palian, 2014), sin embargo, cuando nosotros comenzamos con este trabajo, había muy pocas evidencias experimentales de esto (Johnson, 2007). Por esta razón, era de suma importancia comprobar nuestros resultados con otra estrategia experimental. Lo que observamos con nuestros análisis de sobre-expresión es que, en efecto, TbMaf1 actúa como un represor de la transcripción

en general al observar una disminución en la señal varios de los genes analizados mediante *run-on*. Nuestros experimentos de ChIP mostraron que esta regulación está dada por la unión de TbMaf1 hacia regiones promotoras de las tres RNA polimerasas. Lo que queda por determinar es si esta interacción es de forma directa o indirecta. A pesar de que Maf1 no posee dominios de unión a DNA, hay un reporte que asegura que la proteína se une directamente a las regiones promotoras de Pol II (Lee, 2015). Experimentos de retardamiento, utilizando la proteína purificada GST-TbMaf1 y una sonda de DNA correspondiente a una región promotora, nos podrán ayudar a responder esta pregunta. En caso de no observar retardamiento con estas condiciones experimentales, podríamos suponer que la interacción se da de forma indirecta, mediante la unión de TbMaf1 con otras proteínas de la maquinaria de transcripción, como por ejemplo Brf1, que ya ha sido caracterizado en *T. brucei* (Vélez-Ramírez, 2015). Estudios futuros permitirán determinar si la proteína Maf1 de otros tripanosomátidos lleva a cabo una función similar o idéntica a la que encontramos en *T. brucei*.

En el parásito, los genes codificadores de proteínas se encuentran en tándem y son transcritos de forma policistrónica. Por lo tanto, si TbMaf1 regula la transcripción de estas unidades policistrónicas, estaría regulando una batería de genes transcritos por Pol II mucho más extensa, lo cual sería muy diferente a lo descrito en otros organismos hasta el momento. A la fecha no se ha logrado determinar cuáles son los nucleótidos relevantes para el inicio de la transcripción de Pol II en las unidades policistrónicas. Datos epigenéticos sugieren que las modificaciones post-traduccionales de las histonas y las variantes de histonas favorecen la transcripción (Siegel, 2009). Un mecanismo mediante el cual TbMaf1 podría regular negativamente la transcripción de Pol II, es desfavoreciendo la unión de proteínas modificadoras de histonas que escriben marcas de activación transcripcional o de complejos remodelados de la cromatina que realizan el intercambio de histonas canónicas por variantes de histonas. Este fenómeno ya ha sido observado en humano (Lee, 2015). Otro de los genes transcritos por Pol II en *T. brucei*, cuyo promotor está bien caracterizado, es el *SL* RNA. A pesar de que los datos del *run-on* sobre-expresando a TbMaf1 no fueron estadísticamente significativos en lo que concierne a este gen en particular, los experimentos de



ChIP comprobaron que sí hay unión de TbMaf1 al promotor del *SL* RNA. Al ser este gen de suma importancia para la biología del parásito, es probable que durante la sobre-expresión de TbMaf1 existan mecanismos compensatorios que impidan que los niveles de transcripción de este gen disminuyan a niveles que pondrían en riesgo la subsistencia del parásito.

La regulación de TbMaf1 sobre la transcripción de la RNA Pol I es muy interesante. Se ha observado que la regulación de HsMaf1 hacia Pol I es de forma indirecta. HsMaf1 se une a una región del promotor del gen de TBP reprimiendo su transcripción. Al ser TBP parte de la maquinaria de transcripción de las tres RNA polimerasas, se ve indirectamente influenciada la RNA Pol I (Johnson, 2007). Nuestros resultados sugieren la unión de TbMaf1 al promotor de Pol I de la prociclina. Así, este es el primer reporte en donde se observa represión directa de Maf1 hacia la RNA Pol I.

En nuestros resultados no observamos cambios en los niveles de transcripción de *de novo* del rRNA 18S al estar TbMaf1 disminuido o aumentado, a diferencia del gen de prociclina, también transcrito por Pol I, que sí se ve afectado. A pesar de que los promotores del cistrón ribosomal y los genes de prociclina son muy similares, no son idénticos (Janz, 1994). El elemento distal en estos promotores es totalmente diferente (Schimanski, 2004). Quizás este elemento marque la diferencia en el reclutamiento de TbMaf1 u otras proteínas que favorezcan su unión. Otra posibilidad es que TbMaf1 regule negativamente la expresión de la unidad policistrónica donde está contenido el gen de TPB, conocido como TRF4 en *T. brucei*. Se ha visto que esta proteína participa en la transcripción de prociclina y no del cistrón ribosomal (Ruan, 2004). De esta forma, TbMaf1 regularía la expresión de los genes de prociclina y no la de los genes ribosomales.

Como hemos mencionado anteriormente, no podemos descartar que la regulación negativa de TbMaf1 sea gracias a las proteínas que se reclutan a los diferentes promotores. Por este motivo, sería interesante conocer cuáles son las proteínas que se asocian a TbMaf1. Utilizando los parásitos que expresan a TbMaf1 fusionado a la bandera PTP, se podrán realizar experimentos de purificación por

afinidad en tándem que nos ayuden a identificar las proteínas con las que interactúa TbMaf1. La identificación de dichas proteínas ayudaría a entender los mecanismos por los que TbMaf1 regula la transcripción general en *T. brucei*.

## Conclusiones

Nuestros resultados muestran que el ortólogo de Maf1 en *T. brucei* tiene una estructura globular conservada y está localizado en el núcleo en formas procíclicas del parásito. La desregulación de TbMaf1, ya sea por *knock-down* o por sobre-expresión, muestra que TbMaf1 reprime la transcripción de las tres RNA Polimerasas al unirse a sus regiones promotoras. Es notorio mencionar, que este trabajo constituye el primer reporte de un regulador negativo de la transcripción en parásitos.

## Perspectivas

Determinar experimentalmente si las dos formas de Maf1 en *T. brucei*, TbMaf1-4 y TbMaf1-8, se expresan a nivel de proteína.

Identificar si TbMaf1 sufre modificaciones post-traduccionales *in vivo*.

Definir si TbMaf1 es parte de una vía de señalización para ser activada.

Establecer si la unión de TbMaf1 a las regiones promotoras es de forma directa o a través de otras proteínas.

Realizar experimentos de RNA-seq o ChIP-seq para conocer cuáles son los genes que se desregulan en el *knock down* o la sobre-expresión de TbMaf1.

Conocer las proteínas con las que interacciona TbMaf1 para ejercer su acción.

## Referencias

- Aitchenson, N., Talbot, S., Shapiro, J., Hughes, K., Adkin, C., Butt, T., Sheader, K., Rudenko, G. (2005). *Molecular Microbiology*, 57 (6), 1608-22.
- Alsford, S., Horn, D. (2011). Elongator protein 3b negatively regulates ribosomal DNA transcription in african trypanosomes. *Molecular and Cellular Biology*, 31(9), 1822–1832.
- Albets, B., *et al.* (2007). *Molecular Biology of the Cell*. 6ta. edición. Garland Science, New York.
- Alsford, S., duBois, K., Horn, D., Field, M. C. (2012). Epigenetic mechanisms, nuclear architecture and the control of gene expression in trypanosomes. *Expert Reviews in Molecular Medicine*, 14, e13.
- Alsford, S., Kawahara, T., Glover, L., Horn, D. (2005). Tagging a *T. brucei* rRNA locus improves stable transfection efficiency and circumvents inducible expression position effects. *Molecular & Biochemical Parasitology*, 144(2), 142–148.
- Alsford, S., Wickstead, B., Ersfeld, K., Gull, K. (2001). Diversity and dynamics of the minichromosomal karyotype in *Trypanosoma brucei*. *Molecular & Biochemical Parasitology*, 113(1), 79–88.
- AppliedBiosystems. (2012). Real-time PCR handbook (pp. 1–70)
- Archer, S. K., Luu, V.-D., de Queiroz, R. A., Brems, S., Clayton, C. E. (2009). *Trypanosoma brucei* PUF9 Regulates mRNAs for Proteins Involved in Replicative Processes over the Cell Cycle. *PLoS Pathogens*, 5(8), e1000565.
- Arimbasseri, A. G., Maraia, R. J. (2015). Mechanism of Transcription Termination by RNA Polymerase III Utilizes a Non-template Strand Sequence-Specific Signal Element. *Molecular Cell*, 58(6), 1124–1132.
- Arimbasseri, A. G., Maraia, R. J. (2016). RNA Polymerase III Advances: Structural and tRNA Functional Views. *Trends in Biochemical Sciences*, 1–14.
- Arimbasseri, A. G., Blewett, N. H., Iben, J. R., Lamichhane, T. N., Cherkasova, V., Hafner, M., Maraia, R. J. (2015). RNA Polymerase III Output Is Functionally Linked to tRNA Dimethyl-G26 Modification. *PLoS Genetics*, 11(12), e1005671–22.
- Asbroek, ten, A. L., Mol, C. A., Kieft, R., & Borst, P. (1993). Stable transformation of *Trypanosoma brucei*. *Molecular & Biochemical Parasitology*, 59(1), 133–142.

- Barlowe, C. K., & Miller, E. A. (2013). Secretory Protein Biogenesis and Traffic in the Early Secretory Pathway. *Genetics*, 193(2), 383–410.
- Barrett, M. P., Burchmore, R. J. S., Stich, A., Lazzari, J., Frasch, A. C., Cazzulo, J. J., & Krishna, S. (2003). The trypanosomiasis. *Lancet*, 362, 1–12.
- Batram, C., Jones, N. G., Janzen, C. J., Markert, S. M., & Engstler, M. (2014). Expression site attenuation mechanistically links antigenic variation and development in *Trypanosoma brucei*. *eLife*, 3, e02324–18.
- Berriman, M. (2005). The Genome of the African Trypanosome *Trypanosoma brucei*. *Science*, 309(5733), 416–422.
- Boeger, H., Bushnell, D. A., Davis, R., Griesenbeck, J., Lorch, Y., Strattan, J. S., et al. (2005). Structural basis of eukaryotic gene transcription. *FEBS Letters*, 579(4), 899–903.
- Boguta, M., Graczyk, D. (2011). RNA polymerase III under control: repression and de-repression. *Trends in Biochemical Sciences*, 36(9), 451–456.
- Boguta, M., Czerska, K., Zoladek, T. (1997). Mutation in a new gene *MAF1* affects tRNA suppressor efficiency in *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene*, 185, 1–6.
- Bonhoure, N., Byrnes, A., Moir, R. D., Hodroj, W., Preitner, F., Praz, V., et al. (2015). Loss of the RNA polymerase III repressor *MAF1* confers obesity resistance. *Genes & Development*, 29(9), 934–947.
- Bonnet, J., Boudot, C., Courtioux, B. (2015). Overview of the Diagnostic Methods Used in the Field for Human African Trypanosomiasis: What Could Change in the Next Years? *BioMed Research International*, 2015(1), 1–10.
- Borst, P., Sabatini, R. (2008). Base J: Discovery, Biosynthesis, and Possible Functions. *Annual Review of Microbiology*, 62(1), 235–251.
- Briggs, L. J. (2004). The flagella connector of *Trypanosoma brucei*: an unusual mobile transmembrane junction. *Journal of Cell Science*, 117(9), 1641–1651.
- Brown, S. D., Huang, J., Van der Ploeg, L. H. (1992). The promoter for the procyclic acidic repetitive protein (PARP) genes of *Trypanosoma brucei* shares features with RNA polymerase I promoters. *Molecular and Cellular Biology*, 12(6), 2644–2652.
- Brun, R., Blum, J., Chappuis, F., Burri, C. (2010). Human African trypanosomiasis.

*Lancet*, 375(9709), 148–159.

Cai, Y., Wei, Y.H. (2016). Stress resistance and lifespan are increased in *C. elegans* but decreased in *S. cerevisiae* by *mafr-1/maf1* deletion. *Oncotarget*, 7(10),

Campbell, D. A., Sturm, N. R., Yu, M. C. (2000). Transcription of the kinetoplastid spliced leader RNA gene. *Parasitology Today*, 16(2), 78–82.

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

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

Checchi, F., Chappuis, F., Karunakara, U., Priotto, G., Chandramohan, D. (2011). Accuracy of Five Algorithms to Diagnose Gambiense Human African Trypanosomiasis. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 5(7), e1233.

Checchi, F., Filipe, J. A. N., Barrett, M. P., Chandramohan, D. (2008). The Natural Progression of Gambiense Sleeping Sickness: What Is the Evidence? *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 2(12), e303.

Chung, H.-M., Lee, M. G.-S., Van der Ploeg, L. H. T. (1992). RNA polymerase I-mediated protein-coding gene expression in *Trypanosoma brucei*. *Parasitology Today*, 8(12), 414–418.

Ciesla, M., Boguta, M. (2008). Regulation of RNA polymerase III transcription by Maf1 protein. *Acta Biochimica Polonica*, 1–11.

Cross, G. A., Kim, H.-S., Wickstead, B. (2014). Capturing the variant surface glycoprotein repertoire (the VSGnome) of *Trypanosoma brucei* Lister 427. *Molecular & Biochemical Parasitology*, 195(1), 59–73.

Denninger, V., Rudenko, G. (2014). FACT plays a major role in histone dynamics affecting VSG expression site control in *Trypanosoma brucei*. *Molecular Microbiology*, 94(4), 945–962.

Desai, N., Lee, J., Upadhyaya, R., Chu, Y., Moir, R. D., Willis, I. M. (2005). Two Steps in Maf1-dependent Repression of Transcription by RNA Polymerase III. *Journal of Biological Chemistry*, 280(8), 6455–6462.

- DuBois, K. N., Alsford, S., Holden, J. M., Buisson, J., Swiderski, M., Bart, J.-M., *et al.* (2012). NUP-1 Is a Large Coiled-Coil Nucleoskeletal Protein in Trypanosomes with Lamin-Like Functions. *PLOS Biology*, 10(3), e1001287–20.
- Engstler, M., Pfohl, T., Herminghaus, S., Boshart, M., Wiegertjes, G., Heddergott, N., Overath, P. (2007). Hydrodynamic Flow-Mediated Protein Sorting on the Cell Surface of Trypanosomes. *Cell*, 131(3), 505–515.
- Felton-Edkins, Z. A., Fairley, J. A., Graham, E. L., Johnston, I. M., White, R. J., Scott, P. H. (2003). The mitogen-activated protein (MAP) kinase ERK induces tRNA synthesis by phosphorylating TFIIIB. *EMBO Journal*, 22(10), 2422–2432.
- Fenn, K., Matthews, K. R. (2007). The cell biology of *Trypanosoma brucei* differentiation. *Current Opinion in Microbiology*. 10, 539-546.
- Fernandes, A. D., Atchley, W. R. (2008). Biochemical and Functional Evidence of p53 Homology Is Inconsistent with Molecular Phylogenetics for Distant Sequences. *Journal of Molecular Evolution*, 67(1), 51–67.
- Figueiredo, L. M., Cross, G. A., Janzen, C. J. (2009). Lysine Acetylation: Elucidating the Components of an Emerging Global Signaling Pathway in Trypanosomes. *Nature Reviews Microbiology*, 2012(7), 504–513.
- Garcia, A., Courtin, D., Solano, P., Koffi, M., Jamonneau, V. (2006). Human African trypanosomiasis: connecting parasite and host genetics. *Trends in Parasitology*, 22(9), 405–409.
- Geiduschek, E. P., Kassavetis, G. A. (2001). The RNA polymerase III transcription apparatus. *Journal of Molecular Biology*, 310(1), 1–26.
- Ghedin, E., Bringaud, F., Peterson, J., Myler, P. J., Berriman, M., Ivens, A., *et al.* (2004). Gene synteny and evolution of genome architecture in trypanosomatids. *Molecular & Biochemical Parasitology*, 134(2), 183–191.
- Gibson, W., Peacock, L., Ferris, V., Williams, K., Bailey, M. (2006). Analysis of a cross between green and red fluorescent trypanosomes. *Biochem Soc Trans*, 34 (4), 557-559.
- Gjidoda, A., Henry, R. W. (2013). RNA polymerase III repression by the retinoblastoma tumor suppressor protein. *Gene Regulatory Mechanisms*, 1829(3-4), 385–392.
- Glover, L., Horn, D. (2014). Locus-specific control of DNA resection and suppression

of subtelomeric VSG recombination by HAT3 in the African trypanosome. *Nucleic Acids Research*, 42(20), 12600–12613.

Goodfellow, S. J., White, R. J. (2007). Regulation of RNA polymerase III transcription during mammalian cell growth. *Cell Cycle*, 6(19), 2323–2326.

Goodfellow, S. J., Graham, E. L., Kantidakis, T., Marshall, L., Coppins, B. A., Oficjalska-Pham, D., *et al.* (2008). Regulation of RNA Polymerase III Transcription by Maf1 in Mammalian Cells. *Journal of Molecular Biology*, 378(3), 481–491.

Gottesdiener, K. M., Goriparthi, L., Masucci, J. P., Van der Ploeg Lex H. T. (2012). A Proposed Mechanism for Promoter-Associated DNA Rearrangement Events at a Variant Surface Glycoprotein Gene Expression Site. *Molecular and Cellular Biology*, 12(10), 4784–4795.

Graczyk, D., Debski, J., Muszynska, G., Bretner, M., Lefebvre, O., Boguta, M. (2011). Casein kinase II-mediated phosphorylation of general repressor Maf1 triggers RNA polymerase III activation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(12), 49–26–4931

Gruszynski, A. E., van Deursen, F. J., Albareda, M. C., Best, A., Chaudhary, K., Cliffe, L. J., *et al.* (2006). Regulation of surface coat exchange by differentiating African trypanosomes. *Molecular & Biochemical Parasitology*, 147(2), 211–223.

Gull, K. (2003). Host–parasite interactions and trypanosome morphogenesis: a flagellar pocketful of goodies. *Current Opinion in Microbiology*, 6(4), 365–370.

Günzl, A., Schimanski, B. (2001). Tandem Affinity Purification of Proteins. (J. E. Coligan, B. M. Dunn, D. W. Speicher, & P. T. Wingfield, Eds.) (pp. 1–16). Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc

Günzl, A., Kirkham, J. K., Nguyen, T. N., Badjatia, N., Park, S. H. (2015). Mono-allelic VSG expression by RNA polymerase I in *Trypanosoma brucei*: Expression site control from both ends? *Gene*, 556(1), 68–73.

Haile, S., Papadopoulou, B. (2007). Developmental regulation of gene expression in trypanosomatid parasitic protozoa. *Current Opinion in Microbiology*, 10(6), 569–577.

He, C. Y., Ho, H. H., Malsam, J., Chalouni, C., West, C. M., Ullu, E., *et al.* (2004). Golgi duplication in *Trypanosoma brucei*. *Journal of Cell Biology*, 165(3), 313–321.

Hernández, R., Cevallos, A. M. (2014). Ribosomal RNA gene transcription in

trypanosomes. *Parasitology Research*, 113(7), 2415–2424.

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

Hope, R., Ben-Mayor, E., Friedman, N., Voloshin, K., Biswas, D., Matas, D., *et al.* (2014). Phosphorylation of the TATA-binding protein activates the spliced leader silencing pathway in *Trypanosoma brucei*. *Science Signaling*, 7(341), ra85.

Hung, C. H., Qiao, X., Lee, P. T., Lee, M. G.-S. (2004). Clathrin-Dependent Targeting of Receptors to the Flagellar Pocket of Procyclic-Form *Trypanosoma brucei*. *Eukaryotic Cell*, 3(4), 1004–1014.

Jacobs, R. T., Nare, B., Wring, S. A., Orr, M. D., Chen, D., Sligar, J. M., Jenks, M, X, *et al.* SCYX-7158, an Orally-Active Benzozaborole for the Treatment of Stage 2 Human African Trypanosomiasis. *PLOS Neglected Tropical Diseases*. 5 (6), e1151.

Janz, L., & Clayton, C. E. (1994). The PARP and rRNA promoters of *Trypanosoma brucei* are composed of dissimilar sequence elements that are functionally interchangeable. *Molecular and Cellular Biology*, 14(9), 5804–5811.

Jasiak, A. J., Armache, K.-J., Martens, B., Jansen, R.-P., Cramer, P. (2006). Structural Biology of RNA Polymerase III: Subcomplex C17/25 X-Ray Structure and 11 Subunit Enzyme Model. *Molecular Cell*, 23(1), 71–81.

Johnson, S. S., Zhang, C., Fromm, J., Willis, I. M., Johnson, D. L. (2007). Mammalian Maf1 Is a Negative Regulator of Transcription by All Three Nuclear RNA Polymerases. *Molecular Cell*, 26(3), 367–379.

Kang, J. J., Kang, Y. S., Stumph, W. E. (2016). TFIIIB subunit locations on U6 gene promoter DNA mapped by site-specific protein-DNA photo-cross-linking. *FEBS Letters*, 1–10.

Kantidakis, T., Ramsbottom, B. A., Birch, J. L., Dowding, S. N., White, R. J. (2010). mTOR associates with TFIIIC, is found at tRNA and 5S rRNA genes, and targets their repressor Maf1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(26), 11823–11828.

Karkusiewicz, I., Turowski, T. W., Graczyk, D., Towpik, J., Dhungel, N., Hopper, Boguta, M. (2011). Maf1 Protein, Repressor of RNA Polymerase III, Indirectly Affects tRNA Processing. *Journal of Biological Chemistry*, 286(45), 39478–39488.



- Khanna, A., Johnson, D. L., Curran, S. P. (2014). Physiological roles for *mafr-1* in reproduction and lipid homeostasis. *CellReports*, 9(6), 2180–2191.
- Khanna, A., Pradhan, A., Curran, S. P. (2015). Emerging Roles for Maf1 beyond the Regulation of RNA Polymerase III Activity. *Journal of Molecular Biology*, 427(16), 2577–2585.
- Khoo, S. K., Wu, C. C., Lin, Y. C., Lee, J. C., Chen, H. T. (2014). Mapping the Protein Interaction Network for TFIIB-Related Factor Brf1 in the RNA Polymerase III Preinitiation Complex. *Molecular and Cellular Biology*, 34(3), 551–559.
- Koch, H., Raabe, M., Urlaub, H., Bindereif, A., Preußner, C. (2016). The polyadenylation complex of *Trypanosoma brucei*: Characterization of the functional poly(A) polymerase. *RNA Biology*, 13(2), 221–231.
- Kohl, L., Robinson, D., Bastin, P. (2003). Novel roles for the flagellum in cell morphogenesis and cytokinesis of trypanosomes. *EMBO Journal*, 22(20), 5336–5346.
- Kooter, J. M., Borst, P. (1984).  $\alpha$ -Amanitin-insensitive transcription of variant surface glycoprotein genes provides further evidence for discontinuous transcription in trypanosomes. *Nucleic Acids Research*, 12(24), 9457–9472.
- Korde, A., Rosselot, J. M., Donze, D. (2014). Intergenic Transcriptional Interference Is Blocked by RNA Polymerase III Transcription Factor TFIIB in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 196, 427–438.
- Kramer, S. (2012). Developmental regulation of gene expression in the absence of transcriptional control: the case of kinetoplasts. *Molecular & Biochemical Parasitology*, 181(2), 61–72.
- Laufer, G., Schaaf, G., Bollgönn, S., Günzl, A. (1999). In vitro analysis of alpha-amanitin-resistant transcription from the rRNA, procyclic acidic repetitive protein, and variant surface glycoprotein gene promoters in *Trypanosoma brucei*. *Molecular and Cellular Biology*, 19(8), 5466–5473.
- Lee, J. H., Jung, H. S., Günzl, A. (2009a). Transcriptionally active TFIIB of the early-diverged eukaryote *Trypanosoma brucei* harbors two novel core subunits but not a cyclin-activating kinase complex. *Nucleic Acids Research*, 37(11), 3811–3820.
- Lee, J., Moir, R. D., Willis, I. M. (2009b). Regulation of RNA polymerase III transcription involves SCH9-dependent and SCH9-independent branches of the target of

rapamycin (TOR) pathway. *Journal of Biological Chemistry*, 284(19), 12604–

Lee, M. G., Van der Ploeg Lex H. T. (1990). Homologous Recombination and Stable Transfection in the Parasitic Protozoan *Trypanosoma brucei*. *Science*, 1–5

Lee, Y.-L., Li, Y.-C., Su, C.-H., Chiao, C.-H., Lin, I.-H., Hsu, M.-T. (2015). MAF1 represses CDKN1A through a Pol III-dependent mechanism. *eLife*, 4, 400–21.

Li, Y., Kwan Tsang, C., Wang, S., Li, X., Yang, Y., Fu, L., et al. (2016). MAF1 Suppresses AKT-mTOR Signaling and Liver Cancer through Activation of PTEN Transcription. *Hepatology* (7), 1-14.

Liao, S., Wang, T., Fan, K., Tu, X. (2010). The small ubiquitin-like modifier (SUMO) is essential in cell cycle regulation in. *Experimental Cell Research*, 316(5), 704–715.

Liang, X-H., Quing, L., Michaeli, S. (2003). Small nucleolar RNA interference induced by antisense or double-stranded RNA in trypanosomatids. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100 (13), 7521-7526.

Longo, D., Fauci, A., Kasper, D., Hauser, S., Jameson, J., Loscalzo, J. (2012). *Harrisons Manual of Medicine*, 18th Edition. McGraw Hill Professional.

Lopes, A. H., Souto-Padrón, T., Dias, F. A., Gomes, M. T., Rodrigues, G. C., Zimmermann, L. T., et al. (2010). Trypanosomatids: Odd Organisms, Devastating Diseases. *The Open Parasitology Journal*, 4, 1–30.

Lowell, J. E., Kaiser, F., Janzen, C. J., Cross, G. A. (2005). Histone H2AZ dimerizes with a novel variant H2B and is enriched at repetitive DNA in *Trypanosoma brucei*. *Journal of Cell Science*, 118(24), 5721–5730.

López-Farfán, D., Bart, J.-M., Rojas-Barros, D. I., Navarro, M. (2014). SUMOylation by the E3 ligase TbSIZ1/PIAS1 positively regulates VSG expression in *Trypanosoma brucei*. *PLoS Pathogens*, 10(12), e1004545.

Male, G., Appen, von, A., Glatt, S., Taylor, N. M. I., Cristovao, M., Groetsch, H., et al. (2015). Architecture of TFIIIC and its role in RNA polymerase III pre-initiation complex assembly. *Nature Communications*, 6, 1–11.

Malvy, D., Chappuis, F. (2011). Sleeping sickness. *Clinical Microbiology and Infection*, 17(7), 986–995.

Manna, P. T., Boehm, C., Leung, K. F., Natesan, S. K., Field, M. C. (2014). Life and

times: synthesis, trafficking, and evolution of VSG. *Trends in Parasitology*, 30(5), 251–258.

Marchetti, M. A., Tschudi, C., Kwon, H., Wolin, S. L., Ullu, E. (2000). Import of proteins into the trypanosome nucleus and their distribution at karyokinesis. *Journal of Cell Science*, 113 ( Pt 5), 899–906

Martin, M. P., Gerlach, V. L., & Brown, D. A. (2001). A Novel Upstream RNA Polymerase III Promoter Element Becomes Essential When the Chromatin Structure of the Yeast U6 RNA Gene Is Altered. *Molecular and Cellular Biology*, 21(19), 6429–6439.

Martínez-Calvillo, S., Nguyen, D., Stuart, K., Myler, P. J. (2004). Transcription Initiation and Termination on *Leishmania major* Chromosome 3. *Eukaryotic Cell*, 3(2), 1–12.

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

Martínez-Calvillo, S., Sunkin, S. M., Yan, S., Fox, M., Stuart, K., Myler, P. J. (2001). Genomic organization and functional characterization of the *Leishmania major* Friedlin ribosomal RNA gene locus. *Molecular & Biochemical Parasitology*, 116(2), 147–157.

Martínez-Calvillo, S., Vizuet-de-Rueda, J. C., Florencio-Martínez, L. E., Manning-Cela, R. G., & Figueroa-Angulo, E. E. (2010). Gene Expression in Trypanosomatid Parasites. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2010(2), 1–16.

Masocha, W., Rottenber, M. E., Kristensson, K. (2007). Migration of African Trypanosomes across the blood-brain barrier. *Physiology & Behavior*. 92 (1), 110-114.

Matthews, K. R. (2005). The developmental cell biology of *Trypanosoma brucei*. *Journal of Cell Science*, 118(2), 283–290.

Mehlert, A., Treumann, A., Ferguson, M. A. (1999). *Trypanosoma brucei* GPEET-PARP is phosphorylated on six out of seven threonine residues. *Molecular & Biochemical Parasitology*, 98(2), 291–296.

Migchelsen, S. J., Büscher, P., Hoepelman, A. I. M., Schallig, Adams, E. R. (2011). Human African trypanosomiasis: a review of non-endemic cases in the past 20 years. *International Journal of Infectious Diseases*, 15(8), e517–e524.

- Moir, R. D., Lee, J., Willis, I. M. (2012). Recovery of RNA polymerase III transcription from the glycerol-repressed state: revisiting the role of protein kinase CK2 in Maf1 phosphoregulation. *Journal of Biological Chemistry*, 287(36), 30833–30841.
- Moir, R. D., Lee, J., Haeusler, R. A., Desai, N., Engelke, D. R., Willis, I. M. (2006). Protein kinase A regulates RNA polymerase III transcription through the nuclear localization of Maf1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(41), 15044–15049.
- Morawiec, E., Wichtowska, D., Graczyk, D., Conesa, C., Lefebvre, O., Boguta, M. (2013). Maf1, repressor of tRNA transcription, is involved in the control of gluconeogenic genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene*, 526(1), 16–22.
- Morrison, L. J., Marcello, L., McCulloch, R. (2009). Antigenic variation in the African trypanosome: molecular mechanisms and phenotypic complexity. *Cellular Microbiology*, 11(12), 1724–1734.
- Morrison, L. J., McCulloch, R., Hall, J. P. J. (2015). DNA Recombination Strategies During Antigenic Variation in the African Trypanosome. *Microbiology Spectrum*, 3(2), 1–25.
- Mowatt, M. R., Wisdom, G. S., Clayton, C. E. (1989). Variation of tandem repeats in the developmentally regulated procyclic acidic repetitive proteins of *Trypanosoma brucei*. *Molecular and Cellular Biology*, 9(3), 1332–1335.
- Munday, J. C., Eze, A. A., Baker, N., Glover, L., Clucas, C., Aguinaga Andres, D., et al. (2014). *Trypanosoma brucei* aquaglyceroporin 2 is a high-affinity transporter for pentamidine and melaminophenyl arsenic drugs and the main genetic determinant of resistance to these drugs. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 69(3), 651–663.
- Murphy, W. J., Watkins, K. P., Agabian, N. (1986). Identification of a novel Y branch structure as an intermediate in trypanosome mRNA processing: Evidence for Trans splicing. *Cell*, 47(4), 517–525.
- Myung, K. S., Beetham, J. K., Wilson, M. E., Donelson, J. E. (2002). Comparison of the Post-transcriptional Regulation of the mRNAs for the Surface Proteins PSA (GP46) and MSP (GP63) of *Leishmania chagasi*. *Journal of Biological Chemistry*, 277(19), 16489–16497.
- Nakaar, V., Dare, A. O., Hong, D., Ullu, E., Tschudi, C. (1994). Upstream tRNA genes are essential for expression of small nuclear and cytoplasmic RNA genes in

trypanosomes. *Molecular and Cellular Biology*, 14(10), 6736–6742.

Navarro, M., Gull, K. (2001). A pol I transcriptional body associated with VSG mono-allelic expression in *Trypanosoma brucei*. *Nature*, 414(6865), 759–763.

Nelson, R. G. G., Parsons, M., Barr, P. J., Stuart, K., Selkirk, M., Agabian, N. (1983). Sequences homologous to the variant antigen mRNA spliced leader are located in tandem repeats and variable orphans in *Trypanosoma brucei*. *Cell*, 34(3), 901–909.

Nett, I. R. E., Martin, D. M. A., Miranda-Saavedra, D., Lamont, D., Barber, J. D., Mehlert, A., Ferguson, M. A. J. (2009). The phosphoproteome of bloodstream form *Trypanosoma brucei*, causative agent of African sleeping sickness. *Molecular & Cellular Proteomics : MCP*, 8(7), 1527–1538.

Nguyen, T. N., Müller, L. S. M., Park, S. H., Siegel, T. N., Günzl, A. (2014). Promoter occupancy of the basal class I transcription factor A differs strongly between active and silent VSG expression sites in *Trypanosoma brucei*. *Nucleic Acids Research*, 42(5), 3164–3176.

Nguyen, T. N., Nguyen, B. N., Lee, J. H., Panigrahi, A. K., Günzl, A. (2012). Characterization of a Novel Class I Transcription Factor A (CITFA) Subunit That Is Indispensable for Transcription by the Multifunctional RNA Polymerase I of *Trypanosoma brucei*. *Eukaryotic Cell*, 11(12), 1573–1581.

Nguyen, T. N., Schimanski, B., Günzl, A. (2007). Active RNA Polymerase I of *Trypanosoma brucei* Harbors a Novel Subunit Essential for Transcription. *Molecular and Cellular Biology*, 27(17), 6254–6263.

Oficjalska-Pham, D., Harismendy, O., Smagowicz, W. J., Gonzalez de Peredo, A., Boguta, M., Sentenac, A., Lefebvre, O. (2006). General Repression of RNA Polymerase III Transcription Is Triggered by Protein Phosphatase Type 2A-Mediated Dephosphorylation of Maf1. *Molecular Cell*, 22(5), 623–632.

Ogbadoyi, E., Ersfeld, K., Robinson, D., Sherwin, T., Gull, K. Architecture of the *Trypanosoma brucei* nucleus during interphase and mitosis. (2000). *Chromosoma*. 100, 501-513.

Oler, A. J., Cairns, B. R. (2012). PP4 dephosphorylates Maf1 to couple multiple stress conditions to RNA polymerase III repression. *EMBO Journal*, 31(6), 1440–1452.

Orioli, A., Praz, V., Lhôte, P., Hernandez, N. (2016). Human MAF1 targets and represses active RNA polymerase III genes by preventing recruitment rather

than inducing long-term transcriptional arrest. *Genome Research*, 1–13.

- Orth, P., Schnappinger, D., Hillen, W., Saenger, W., Hinrichs, W. (2000). Structural basis of gene regulation by the tetracycline inducible Tet repressor-operator system. *Nature Structural Biology*, 7(3), 215–219.
- Padilla-Mejia, N. E., Florencio-Martínez, L. E., Figueroa-Angulo, E., Manning-Cela, R. G., Hernandez-Rivas, R., Myler, P. J., Martínez-Calvillo, S. (2009). Gene organization and sequence analyses of transfer RNA genes in Trypanosomatid parasites. *BMC Genomics*, 10(1), 232.
- Palian, B. M., Rohira, A. D., Johnson, S. A. S., He, L., Zheng, N., Dubeau, L., *et al.* (2014). Maf1 Is a Novel Target of PTEN and PI3K Signaling That Negatively Regulates Oncogenesis and Lipid Metabolism. *PLoS Genetics*, 10(12), e1004789.
- Park, S. H., Nguyen, T. N., Günzl, A. (2011). Development of an efficient in vitro transcription system for bloodstream form *Trypanosoma brucei* reveals life cycle-independent functionality of class I transcription factor A. *Molecular & Biochemical Parasitology*. 13 (6), 785-795.
- Parsons, M., Nelson, R. G., Watkins, K. P., Agabian, N. (1984). Trypanosome mRNAs share a common 5' spliced leader sequence. *Cell*, 38 (1), 309-16.
- Parodi, A. J. (1993). N-glycosylation in trypanosomatid protozoa. *Glycobiology*, 3(3), 193–199.
- Pluta, K., Lefebvre, O., Martin, N. C., Smagowicz, W. J., Stanford, D. R., Ellis, S. R., *et al.* (2001). Maf1p, a Negative Effector of RNA Polymerase III in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Cellular Biology*, 21(15), 5031–5040.
- Priotto, G., Pinoges, L., Fursa, I. B., Burke, B., Nicolay, N., Grillet, G., *et al.* (2008). Safety and effectiveness of first line eflornithine for *Trypanosoma brucei* gambiense sleeping sickness in Sudan: cohort study. *Bmj*, 336(7646), 705–708.
- Reina, J. H., Azzouz, T. N., Hernandez, N. (2006). Maf1, a New Player in the Regulation of Human RNA Polymerase III Transcription. *PLoS ONE*, 1(1), e134.
- Rideout, E. J., Marshall, L., Grewal, S. S. (2012). *Drosophila* RNA polymerase III repressor Maf1 controls body size and developmental timing by modulating tRNA<sup>Met</sup> synthesis and systemic insulin signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(4), 1–6.
- Roberts, D. N., Wilson, B., Huff, J. T., Stewart, A. J., Cairns, B. R. (2006).

Dephosphorylation and Genome-Wide Association of Maf1 with Pol III-Transcribed Genes during Repression. *Molecular Cell*, 22(5), 633–644.

Robinson, D. R., Sherwin, T., Ploubidou, A., Byard, E. H., Gull, K. (1995). Microtubule polarity and dynamics in the control of organelle positioning, segregation, and cytokinesis in the trypanosome cell cycle. *Journal of Cell Biology*, 128(6), 1163–1172.

Rohira, A. D., Chen, C. Y., Allen, J. R., Johnson, D. L. (2013). Covalent Small Ubiquitin-like Modifier (SUMO) Modification of Maf1 Protein Controls RNA Polymerase III-dependent Transcription Repression. *Journal of Biological Chemistry*, 288(26), 19288–19295.

Rollins, J., Veras, I., Cabarcas, S., Willis, I. M., Schramm, L. (2007). Human Maf1 negatively regulates RNA Polymerase III transcription via the TFIIB family members Brf1 and Brf2. *International Journal of Biological Sciences*, 1–11.

Romero-Meza, G. (2012, August 9). Caracterización molecular de Maf1, probable regulador negativo de la transcripción de la RNA Polimerasa III, en *Trypanosoma brucei*. (S. Martínez-Calvillo, R. Hernández-Rivas). Tesis de Maestría. CINVESTAV. México.

Roskoski, R., Jr. (2015). A historical overview of protein kinases and their targeted small molecule inhibitors. *Pharmacological Research*, 100, 1–23.

Rout, M. P., Field, M. C. (2001). Isolation and characterization of subnuclear compartments from *Trypanosoma brucei*. Identification of a major repetitive nuclear lamina component. *Journal of Biological Chemistry*, 276(41), 38261–

Ruan, J.-P., Arhin, G. K., Ullu, E., Tschudi, C. (2004). Functional Characterization of a *Trypanosoma brucei* TATA-Binding Protein-Related Factor Points to a Universal Regulator of Transcription in Trypanosomes. *Molecular and Cellular Biology*, 24(21), 9610–9618.

Ruggero, D. (2009). The Role of Myc-Induced Protein Synthesis in Cancer. *Cancer Research*, 69(23), 8839–8843.

Savill, N. J., Seed, J. R. (2004). Mathematical and statistical analysis of the *Trypanosoma brucei* slender to stumpy transition. *Parasitology*, 128(1), 53–67.

Schimanski, B., Laufer, G., Gontcharova, L., Günzl, A. (2004). The *Trypanosoma brucei* spliced leader RNA and rRNA gene promoters have interchangeable TbSNAP50-binding elements. *Nucleic Acids Research*, 32(2), 700–709.

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, 1942–1950.

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

Schulz, D., Zaringhalam, M., Papavasiliou, F. N., Kim, H.-S. (2016). Base J and H3.V Regulate Transcriptional Termination in *Trypanosoma brucei*. *PLoS Genetics*, 12(1), e1005762–21.

Scott, P. H. (2000). Regulation of RNA Polymerase III Transcription during Cell Cycle Entry. *Journal of Biological Chemistry*, 276(2), 1005–1014.

Sherwin, T., Gull, K. (1989). Visualization of detyrosination along single microtubules reveals novel mechanisms of assembly during cytoskeletal duplication in trypanosomes. *Cell*, 57(2), 211–221.

Shi, H., Djikeng, A., Mark, T., Wirtz, E., Tschudi, C., Ullu, E. (2000). Genetic interference in *Trypanosoma brucei* by heritable and inducible double-stranded RNA. *Rna*, 6(7), 1069–1076.

Shor, B., Wu, J., Shakey, Q., Toral-Barza, L., Shi, C., Follettie, M., Yu, K. (2010). Requirement of the mTOR Kinase for the Regulation of Maf1 Phosphorylation and Control of RNA Polymerase III-dependent Transcription in Cancer Cells. *Journal of Biological Chemistry*, 285(20), 15380–15392.

Siegel, T. N., Hekstra, D. R., Kemp, L. E., Figueiredo, L. M., Lowell, J. E., Fenyo, D., et al. (2009). Four histone variants mark the boundaries of polycistronic transcription units in *Trypanosoma brucei*. *Genes & Development*, 23(9), 1063–1076.

Simarro, P. P., Diarra, A., Ruiz Postigo, J. A., Franco, J. R., Jannin, J. G. (2011). The Human African Trypanosomiasis Control and Surveillance Programme of the World Health Organization 2000–2009: The Way Forward. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 5(2), e1007.

Simarro, P. P., Franco, J., Diarra, A., Postigo, J. A. R., Jannin, J. (2012). Update on field use of the available drugs for the chemotherapy of human African trypanosomiasis. *Parasitology*, 139(07), 842–846.

Soprano, A. S., Abe, V. Y., Smetana, J. H. C., Benedetti, C. E. (2013). Citrus MAF1, a Repressor of RNA Polymerase III, Binds the *Xanthomonas citri* Canker Elicitor PthA4 and Suppresses Citrus Canker Development. *Plant Physiology*, 163(1),



- Stanne, T. M., Rudenko, G. (2010). Active VSG expression sites in *Trypanosoma brucei* are depleted of nucleosomes. *Eukaryotic Cell*, 9(1), 136–147.
- Subramaniam, C., Veazey, P., Redmond, S., Hayes-Sinclair, J., Chambers, E., Carrington, M., *et al.* (2006). Chromosome-Wide Analysis of Gene Function by RNA Interference in the African Trypanosome. *Eukaryotic Cell*, 5(9), 1539–1549.
- Sutton, R. E., Boothroyd, J. C. (1986). Evidence for Trans splicing in trypanosomes. *Cell*, 47(4), 527–535.
- Tarral, A., Blesson, S., Mordt, O. V., Torreele, E., Sassella, D., Bray, M. A., *et al.* (2014). Determination of an Optimal Dosing Regimen for Fexinidazole, a Novel Oral Drug for the Treatment of Human African Trypanosomiasis: First-in-Human Studies. *Clinical Pharmacokinetics*, 53(6), 565–580.
- Thomson, R., Samanovic, M., & Raper, J. (2009). Activity of trypanosome lytic factor: a novel component of innate immunity. *Future Microbiology*, 4(7), 789–796.
- Towpik, J., Graczyk, D., Gajda, A., Lefebvre, O., & Boguta, M. (2008). Derepression of RNA Polymerase III Transcription by Phosphorylation and Nuclear Export of Its Negative Regulator, Maf1. *Journal of Biological Chemistry*, 283(25), 17168–17174.
- Treumann, A., Zitzmann, N., Hülsmeier, A., Prescott, A. R., Almond, A., Sheehan, J., Ferguson, M. A. (1997). Structural characterisation of two forms of procyclic acidic repetitive protein expressed by procyclic forms of *Trypanosoma brucei*. *Journal of Molecular Biology*, 269(4), 529–547.
- Triggs, V. P., Bangs, J. D. (2003). Glycosylphosphatidylinositol-Dependent Protein Trafficking in Bloodstream Stage *Trypanosoma brucei*. *Eukaryotic Cell*, 2(1), 76–83.
- Truc, P., Lejon, V., Magnus, E., Jamonneau, V., Nangouma, A., Verloo, D., *et al.* (2002). Evaluation of the micro-CATT, CATT/*Trypanosoma brucei gambiense*, and LATEX/T. *b. gambiense* methods for serodiagnosis and surveillance of human African trypanosomiasis in West and Central Africa. *Bulletin of the World Health Organization*, (80), 882–886.
- Turowski, T. W., Karkusiewicz, I., Kowal, J., Boguta, M. (2012). Maf1-mediated repression of RNA polymerase III transcription inhibits tRNA degradation via RTD

pathway. *RNA*.

- Urwyler, S., Studer, E., Renggli, C. K., Roditi, I. (2007). A family of stage-specific alanine-rich proteins on the surface of epimastigote forms of *Trypanosoma brucei*. *Molecular Microbiology*, 63(1), 218–228.
- Utter, C. J., Garcia, S. A., Milone, J., Bellofatto, V. (2011). Poly(A)-Specific Ribonuclease (PARN-1) Function in Stage-Specific mRNA Turnover in *Trypanosoma brucei*. *Eukaryotic Cell*, 10(9), 1230–1240.
- Vannini, A., Ringel, R., Kusser, A. G., Berninghausen, O., Kassavetis, G. A., Cramer, P. (2010). Molecular Basis of RNA Polymerase III Transcription Repression by Maf1. *Cell*, 143(1), 59–70.
- Vassella, E., Reuner, B., Yutzy, B., Boshart, M. (1997). Differentiation of African trypanosomes is controlled by a density sensing mechanism which signals cell cycle arrest via the cAMP pathway. *Journal of Cell Science*, 110 ( Pt 21), 2661–2671.
- Vaughan, S., Gull, K. (2003). The trypanosome flagellum. *Journal of Cell Science*, 116(Pt 5), 757–759.
- Vélez-Ramírez, D. E., Florencio-Martínez, L. E., Romero-Meza, G., Rojas-Sánchez, S., Moreno-Campos, R., Arroyo, R., et al. (2015). BRF1, a subunit of RNA polymerase III transcription factor TFIIIB, is essential for cell growth of *Trypanosoma brucei*. *Parasitology*, 142(13), 1563–1573.
- Vizuet-de-Rueda, J. C., Florencio-Martínez, L. E., Padilla-Mejía, N. E., Manning-Cela, R. G., Hernandez-Rivas, R., Martínez-Calvillo, S. (2016). Ribosomal RNA Genes in the Protozoan Parasite *Leishmania major* Possess a Nucleosomal Structure. *Annals of Anatomy*, 167(2), 121–135.
- Walgraffe, D., Devaux, S., Lecordier, L., Dierick, J.-F., Dieu, M., Van den Abbeele, J., et al. (2005). Characterization of subunits of the RNA polymerase I complex in *Trypanosoma brucei*. *Molecular & Biochemical Parasitology*, 139(2), 249–260.
- Wei, Y., Zheng, X. F. S. (2010). Maf1 regulation. *Nucleus*, 1–4.
- Wei, Y., Tsang, C. K., Zheng, X. F. S. (2009). Mechanisms of regulation of RNA polymerase III-dependent transcription by TORC1. *EMBO Journal*, 28(15), 2220–2230.

- Weipoltshammer, K., Schöfer, C. (2016). Morphology of nuclear transcription. *Histochemistry and Cell Biology*, 145(4), 343–358.
- Welburn, S.C., Fèvre, E. M., Coleman, P. G., Odiit, M. Maudlin, I. (2011). Sleeping sickness: a tale of two diseases. *Trends in Parasitology*, 17 (1), 19-24.
- White, R. J. (2004). RNA polymerase III transcription and cancer. *Oncogene*, 23(18), 3208–3216.
- White, R. J. (2005). RNA polymerases I and III, growth control and cancer. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 6(1), 69–78.
- White, R. J. (2008). RNA polymerases I and III, non-coding RNAs and cancer. *Trends in Genetics*, 24(12), 622–629.
- Wild, T., Cramer, P. (2012). Biogenesis of multisubunit RNA polymerases. *Trends in Biochemical Sciences*, 37(3), 99–105.
- Willis, I. M. (1993). RNA polymerase III. *European Journal of Biochemistry*, 212(1), 1–11.
- Willis, I. M., Moir, R. D. (2007). Integration of nutritional and stress signaling pathways by Maf1. *Trends in Biochemical Sciences*, 1–3.
- Wirtz, E., Leal, S., Ochatt, C., Cross, G. A. (1999). A tightly regulated inducible expression system for conditional gene knock-outs and dominant-negative genetics in *Trypanosoma brucei*. *Molecular & Biochemical Parasitology*, 99, 1–13.
- Wirtz, E., Lorenz, P., Clayton, C. E. (1997). Vectors for inducible expression of toxic gene products in bloodstream and procyclic *Trypanosoma brucei*. *Molecular & Biochemical Parasitology*, 1–14.
- World Health Organization. (2013). *Control and surveillance of human African trypanosomiasis* (No. 984) (pp. 1–250).
- Zamudio, J. R., Mitra, B., Zeiner, G. M., Feder, M., Bujnicki, J. M., Sturm, N. R., & Campbell, D. A. (2006). Complete Cap 4 Formation Is Not Required for Viability in *Trypanosoma brucei*. *Eukaryotic Cell*, 5(6), 905–915.