



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**



Facultad de Estudios Superiores Iztacala

**Obtención de líneas celulares *knock-out*
de Brf1, subunidad del factor de
transcripción TFIIIB, en el parásito
*Leishmania major***

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I Ó L O G A

Presenta:

MARICARMEN GÓMEZ GARCÍA

Asesor: Dr. Santiago Martínez Calvillo

Los reyes Iztacala, 2015





Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Agradecimientos

A la Universidad Nacional Autónoma de México, por albergarme durante los últimos años, por permitirme crecer de manera física e intelectual y por permitirme vivir las más grandes experiencias de la vida siempre de la mano de ésta, mi amada Universidad.

A la Dirección General de Cooperación e Internacionalización, por la Beca de Movilidad Estudiantil Internacional otorgada y por ampliar mis horizontes hasta lugares inesperados.

A la Universidad de Antioquia, por dejarme hacer de esta, mi “*Alma mater*”; por abrir mi mente, por brindarme una hermosa experiencia académica, cultural y personal que llevaré conmigo toda la vida.

Al Dr. Santiago Martínez Calvillo, mi asesor de tesis por permitirme formar parte de su grupo de trabajo, por el apoyo y las facilidades brindadas durante la realización de este proyecto.

A todos los que conforman el Laboratorio 1 de la UBIMED por sus oportunos consejos durante la experimentación, especialmente a Daniel Vélez Ramírez y Juan Carlos Vizuet de Rueda por su apoyo en la realización de las técnicas de hibridación de membranas y al Técnico Académico, Biol. Luis Enrique Florencio Martínez por sus valiosas enseñanzas, sin las que este trabajo no sería posible.

A mis revisores: la Dra. Yolanda Irasema Chirino López, el Dr. Sergio Vaca Pacheco, la Dra. Martha Ofelia Salcedo Álvarez y el Dr. Juan Manuel Arias Montaña, por sus recomendaciones y observaciones para el enriquecimiento del presente trabajo.

Esta tesis se realizó en el Laboratorio de Biología Molecular de Parásitos de la Unidad de Biomedicina de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala, UNAM, financiado por el donativo 128461 de CONACyT, y por los donativos IN210712 e IN214715 de PAPIIT (DGAPA, UNAM).

*“El camino más sencillo y más fácil
para obtener los bienes de este mundo
y los del otro es el de la ciencia.”*

Las mil y una noches

Agradecimientos personales

A mí mamá. No cabe duda que muy a tu pesar y muy a tu manera, siempre has estado ahí apoyándome, sin importar la distancia, ni las dificultades que se puedan presentar en el camino. Gracias por confiar en mí, por tus consejos y tu ayuda a lo largo de estos años, pero sobre todo gracias por creer en mí aun cuando yo misma he dejado de hacerlo.

A mis hermanos: Iván Oswaldo y David Emmanuele. Aunque muy en el fondo y de alguna manera muy, muy, pero muy extraña, han estado ahí conmigo, viéndome crecer y ayudándome en la medida de lo posible. Gracias por dejarme ver lo que quiero y lo que no quiero ser en la vida.

A Sophie. Siempre logras arrancarme una sonrisa, es un placer que compartas conmigo tu gracia infinita. ¡Sin duda alguna eres mi persona favorita!

A Nicolás. Es un gusto aprender contigo cada día, siempre maravillándonos de lo que nos rodea y pensando en lo desconocido, no tengo duda de que contigo el límite es la imaginación.

A mis amigos:

Anahí. Parece increíble cómo han pasado los años, cómo hemos crecido, cómo hemos cambiado, pero sobre todo, cómo se ha conservado nuestra amistad. Gracias por todos estos años, por todos los momentos compartidos y por todas esas sonrisas que me sigues sacando cada que nos vemos.

Obed y Ana. Desde que dejamos el CCH, no ha sido fácil. Sin embargo, aquí seguimos, tan amigos como siempre. ¿Cómo podría olvidarme de ustedes? Si han estado ahí para mí en algunos de los momentos más importantes, siempre arrancándome carcajadas. Gracias por todos esos momentos de diversión y risas a su lado, solo me resta hacerles una pregunta: ¿Qué hora es?

Sandra, Laura, Brenda y Olga. De alguna manera, siempre han estado ahí, apoyándome en mis locuras, aliviando mis tristezas y escuchando todos mis traumas. No cabe duda que han sido un gran apoyo para mí todo este tiempo.

Tomás. Durante los últimos años, si alguien me ha visto llorar, patalear, hacer berrinche, pero también reír y crecer, ese eres tú. Gracias por seguir ahí conmigo

a pesar de todo, por permitirme compartir contigo estos últimos años tanto lo bueno, como lo malo; gracias por dejarme aprender de ti; pero sobre todo, gracias por aparecer siempre en el momento más oportuno sin importar la distancia como todo buen amortiguador. ¡No sé qué haría sin ti!

Lú, Norma, Gaby, Juan Carlos y Daniel. Sin duda se han convertido en personas muy especiales para mí, gracias por escucharme y por dejar que yo los escuchara a ustedes; pero sobre todo gracias por ayudarme a mantener la cordura haciendo más ameno este proceso. Sin ustedes no lo hubiera logrado...

Esteban. ¡Parce! Gracias por demostrarme que la madurez, no necesariamente está peleada con la edad y como dice la canción: *“Fue tan bonito verte cruzar, al menos por un ratito por mi camino...”*.

A Luis Enrique. No tengo forma alguna de agradecer todo lo que has hecho por mí. Has sido tú quien me ha guiado a lo largo de este proceso, siempre reconoceré tu disposición para dejarme aprender de ti, todos tus consejos y palabras de aliento en los momentos desesperados, en verdad valoro todas tus enseñanzas, mismas que hacen posible este trabajo.

A Andrea, Manuela y Doña Mary. Gracias por hacer de mi estancia en Colombia la más maravillosa experiencia. No cabe duda, no pude estar en un mejor momento y ni lugar; ¡mucho menos con mejores personas! ¡Ahora entiendo porque dicen que una vez que estás en Colombia, el riesgo es querer quedarse! *“Colombia te quiero, te adoro, te siento...”*

A Pedro. Hace tanto que no sé de ti, tanto que siento que tan sólo somos un par de extraños... No importa cómo pasaron las cosas porque a pesar de todo en verdad te quise profundamente. Sólo quiero agradecerte por el tiempo que compartimos y lo mucho que aprendí de ti mientras fuimos amigos. Gracias por ser para mí, uno de los recuerdos más dulces (lo cual responde a la pregunta que alguna vez me hiciste, supongo que sabías como terminaría la historia...).

A todas aquellas personas que en algún momento formaron parte importante de mi vida y que por alguna razón se han alejado. Son parte de mí y de la persona que soy hoy por hoy.

Dedicatoria

A mi mamá, Ma. Del Carmen,

Porque sin ti y sin tu apoyo, esto simplemente no sería posible... Sólo tú sabes lo que hemos tenido que pasar para llegar a este punto. Te quiero.

“On ne voit bien qu’avec le cœur. L’essentiel est invisible pour les yeux”

Le petit Prince
(Antoine de Saint-Exupéry)

Índice

Lista de figuras	VIII
Lista de tablas	XI
Abreviaturas	XII
Resumen	XIV
1. Introducción	1
1.1. Generalidades de <i>Leishmania</i>	1
1.2. Clasificación taxonómica	3
1.3. Ciclo biológico	3
1.4. Morfología	5
1.5. Clínica y epidemiología	6
1.5.1. Leishmaniasis visceral (LV)	7
1.5.2. Leishmaniasis mucocutánea (LMC).....	8
1.5.3. Leishmaniasis cutánea (LC)	8
1.6. Tratamiento	10
1.7. Transcripción de la RNA Pol III en eucariontes	11
1.7.1. Subunidad Brf1 de TFIIIB.....	14
1.8. Organización genómica en <i>Leishmania</i>	15
1.9. Transcripción en <i>Leishmania</i>	16
1.9.1. Transcripción policistrónica	16
1.9.2. <i>Trans-splicing</i>	17
1.9.3. Poliadenilación.....	17
1.9.4. Transcripción de RNA Pol III	17
1.9.4.1. Brf1	18
1.10. Eliminación de genes en <i>L. major</i>	18
2. Hipótesis	21
3. Objetivos	22
4. Materiales y métodos	23
4.1. Cultivo y conteo de parásitos	23
4.2. Extracción de RNA total	24
4.3. Extracción de DNA genómico	24

4.4.	Electroforesis y purificación de DNA en geles de agarosa	25
4.5.	Marcaje radioactivo de DNA.....	25
4.6.	Experimentos tipo <i>northern-blot</i>	26
4.6.1.	Ensayo con actinomicina D	26
4.6.2.	Electroforesis de RNA en geles desnaturalizantes	27
4.6.3.	Transferencia de RNA a membranas Hybond	27
4.6.4.	Pre-hibridación e hibridación de membranas	28
4.6.5.	Lavado de membranas radioactivas	28
4.7.	Amplificación de DNA por medio de reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	28
4.8.	Ligación.....	29
4.9.	Transformación	30
4.10.	Purificación de plásmidos.....	31
4.11.	Construcción de vectores para <i>knock-outs</i>	31
4.12.	Electroporación de promastigotes de <i>L. major</i>	32
4.13.	Obtención y caracterización de las clonas celulares	33
4.14.	Experimento tipo <i>Southern-blot</i>	34
4.15.	Experimento tipo <i>western-blot</i>	34
5.	Resultados	36
5.1.	Determinación del tamaño del transcrito de Brf1	36
5.2.	Análisis de la vida media del transcrito de Brf1	37
5.3.	Obtención de cultivos <i>knock-out</i> de Brf1	40
5.3.1.	Clonación de las regiones UTR-5' y UTR-3' del gen Brf1	40
5.3.2.	Obtención de los vectores <i>knock-out</i>	43
5.3.3.	Obtención y caracterización de cultivos <i>knock-out</i> sencillo de Brf1 ...	47
5.3.4.	Ensayos para la obtención de cultivos <i>knock-out</i> doble de Brf1	53
5.3.5.	Adición de una copia episomal de Brf1 en parásitos con el <i>knock-out</i> sencillo.....	54
6.	Discusión.....	57
6.1.	Determinación del tamaño y abundancia del transcrito de Brf1	57
6.2.	Obtención y caracterización de cultivos <i>knock-out</i> sencillo de Brf1	58
6.3.	Ensayos para la obtención de cultivos <i>knock-out</i> doble de Brf1	60
7.	Conclusiones y logros	62
8.	Perspectivas.....	63
9.	Referencias	64

Apéndice I. Mapa metodológico.....	73
Apéndice II. Secuencia del vector pG-Brf1-5'-pac.....	74
Apéndice III. Secuencia del vector pG-Brf1-5'-hyg.....	76
Apéndice IV. Secuencia del vector pG-Brf1-3'.....	78
Apéndice V. Secuencia del vector pΔBrf1-Pac.....	80
Apéndice VI. Secuencia del vector pΔBrf1-Hyg.....	82
Apéndice VII. Secuencia del <i>locus</i> de Brf1 en <i>L. major</i>.....	84
Apéndice VIII. Secuencia del <i>cassette</i> de resistencia a puromicina.....	90

Lista de figuras

Figura 1	Microscopía electrónica del cinetoplasto de <i>Leishmania</i>	1
Figura 2	Representación esquemática de un tripanosomátido en estadio promastigote	2
Figura 3	Ciclo de vida de <i>Leishmania</i>	4
Figura 4	Morfología del género <i>Leishmania</i>	6
Figura 5	Paciente con leishmaniasis visceral	7
Figura 6	Pacientes con Leishmaniasis mucocutánea	8
Figura 7	Pacientes con leishmaniasis cutánea	9
Figura 8	Organización de los tres tipos de promotores empleados por Pol III	12
Figura 9	Factores de transcripción relacionados con la RNA Polimerasa III	13
Figura 10	Hiperfosforilación de Brf1 durante la mitosis	15
Figura 11	Representación esquemática de la transcripción policistrónica y el <i>trans-splasing</i>	16
Figura 12	Esquema de la cámara de Neubauer	23
Figura 13	Mapa del vector pGEM-T Easy y sus puntos de referencia	30
Figura 14	Mapa del vector pBluescript SK- y sus puntos de referencia.	32
Figura 15	Digestión del vector pG-Brf1-5'-pac con <i>EcoRI</i> e Inserto UTR-5' purificado de pGEM-T Easy	36
Figura 16	Análisis del mRNA de Brf1 mediante <i>northern-blot</i>	37
Figura 17	Cinética de decaimiento del mRNA de Brf1 en fase media logarítmica y en fase estacionaria	38

Figura 18	Representación gráfica de la cinética de decaimiento del mRNA de Brf1 de <i>L. major</i>	38
Figura 19	Cinética de decaimiento del mRNA de α -tubulina en fase media logarítmica	39
Figura 20	Representación gráfica de la cinética de decaimiento del mRNA de α -tubulina de <i>L. major</i> en fase media logarítmica	39
Figura 21	Ensayo <i>northern-blot</i> con el rRNA 18S	40
Figura 22	Clonación de las regiones UTR-5' y UTR-3' de Brf1 en el vector pGEM-T Easy	41
Figura 23	Digestión de vectores	42
Figura 24	Mapas de los vectores pG-Brf1-5'-pac, pG-Brf1-5'-hyg y pG-Brf1-3'	42
Figura 25	Purificación de los genes de resistencia a fármacos y Obtención del vector pBluescript	43
Figura 26	Análisis de restricción del vector p Δ Brf1-Pac	44
Figura 27	Análisis de restricción del vector p Δ Brf1-Hyg	45
Figura 28	Mapa de los vectores p Δ Brf1-Pac y p Δ Brf1-Hyg	46
Figura 29	Extracción de DNA por maxiprep del vector p Δ Brf1-Pac, Digestión del vector p Δ Brf1-Pac y Purificación del <i>cassette</i> de pac	46
Figura 30	Extracción de DNA por maxiprep del vector p Δ Brf1-Hyg, Digestión del vector p Δ Brf1-Hyg y Purificación del <i>cassette</i> de hyg	47
Figura 31	Representación esquemática del gen Brf1 endógeno y de la substitución del gen Brf1 por el gen <i>pac</i>	48
Figura 32	Extracción de DNA genómico de los cultivos <i>knock-out</i> sencillo de Brf1	48
Figura 33	Análisis por PCR del <i>knock-out</i> sencillo de Brf1	49

Figura 34	Mapa de restricción del <i>locus</i> de Brf1 de <i>L. major</i>	50
Figura 35	Electroforesis de DNAs genómicos digeridos	51
Figura 36	Experimento tipo <i>Southern-blot</i> para comprobar la substitución de una copia del gen Brf1 por el gen puromicina en <i>L. major</i>	52
Figura 37	Curva de crecimiento de <i>L. major</i>	53
Figura 38	Mapa del vector pBrf1-PTP	54
Figura 39	Análisis tipo <i>western-blot</i> de las poblaciones de <i>L. major</i> con el <i>knock-out</i> sencillo de Brf1 transfectadas con el vector pBrf1-PTP	55
Figura 40	Análisis tipo <i>western-blot</i> de las clonas de <i>L. major</i> con el <i>knock-out</i> sencillo de Brf1 transfectadas con el vector pBrf1-PTP	56

Lista de tablas

Tabla 1	Clasificación taxonómica de <i>Leishmania</i> propuesta por Moreira <i>et al.</i>	3
Tabla 2	Oligonucleótidos empleados en la amplificación de las regiones intergénicas 5' y 3' del gen Brf1 en <i>L. major</i>	28

Abreviaturas

<i>Amp</i>	Gen de resistencia a ampicilina
CTD	Extremo carboxilo terminal
dCTP	Desoxicitidina trifosfato
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EI	Elemento intermedio
ESD	Elemento secuencial distal
ESP	Elemento secuencial proximal
<i>Hyg</i>	Gen de resistencia a higromicina B
kb	Kilobases
LC	Leishmaniasis cutánea
LMC	Leishmaniasis mucocutánea
LV	Leishmaniasis visceral
MK2	Proteína cinasa activada por MAPK2
mRNA	RNA mensajero
<i>Neo</i>	Gen de resistencia a geneticina (G418)
NMT	N-miristoiltransferasa
NTD	Extremo amino terminal
<i>Pac</i>	Gen de resistencia a puromicina
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
<i>Phleo</i>	Gen de resistencia a fleomicina

PP2A	Proteína fosfatasa 2A
ProtA	Proteína A de <i>Staphylococcus aureus</i>
PTP	ProtC-TEV-ProtA
RNA	Ácido ribonucleico
RNA Pol	RNA Polimerasa
rRNA	RNA ribosomal
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida con duodecil sulfato sódico
SNAPc	Complejo Proteico activador de snRNA
snRNA	RNA pequeño nucleolar
SPH	Homología post-octámero Sph1
TBP	Proteína de unión a la caja TATA
TF	Factor de transcripción
tRNA	RNA de transferencia
Ufc	Unidad formadora de colonia
UTR	Región no traducida
WHO	Organización Mundial de la Salud

Resumen

Leishmania spp. es un protozooario flagelado que produce leishmaniasis en el humano. Además de su relevancia médica, el parásito es importante por presentar mecanismos de expresión genética atípicos. Nuestro grupo de trabajo está interesado en el estudio de la transcripción de la RNA Pol III, encargada de sintetizar moléculas de RNA esenciales para la viabilidad celular, como los tRNAs y el rRNA 5S. Un factor de transcripción necesario para la función de la RNA Pol III es TFIIIB, el cual está formado por tres subunidades: Brf1, Bdp1 y TBP. En *Leishmania* es posible realizar *knock-outs* génicos mediante recombinación homóloga con el fin de obtener información sobre la expresión génica y la función de las proteínas en el contexto del parásito intacto. Dado que *L. major* es un organismo diploide, para obtener dicha información es necesaria la eliminación de ambas copias del gen en el parásito. Así, el objetivo del presente trabajo fue generar y caracterizar líneas celulares *knock-out* del gen Brf1 presente en el parásito *L. major*. Para ello se construyeron vectores que permitieran la sustitución de las dos copias alélicas del gen de Brf1 por los genes de resistencia a puromicina (*pac*) o higromicina (*hyg*). Para producir estos vectores fue necesario amplificar por PCR las regiones UTR-5' y UTR-3' del gen de Brf1, así como el gen *pac* e *hyg*. Estos fragmentos fueron inicialmente clonados en el vector pGEM-T y posteriormente subclonados en el vector pBluescript. Con el vector *pac* fueron transfectados promastigotes de *L. major* y seleccionados en presencia de puromicina. Posteriormente se obtuvieron y analizaron clones celulares con el *knock-out* sencillo mediante experimentos tipo *Southern-blot*, corroborando así la sustitución de una copia del gen Brf1 por el gen *pac*. En un ensayo para eliminar la segunda copia del gen de Brf1, clones celulares con el *knock-out* sencillo fueron transfectadas con el vector *hyg*. Lo anterior generó células no viables, las cuales murieron al poco tiempo de adicionada la concentración final del fármaco. Esto sugiere que Brf1 es un gen esencial en promastigotes de *L. major*. Teniendo en cuenta estos resultados, a los parásitos *knock-out* sencillo se les adicionó una copia episomal del gen Brf1 (pBrf1-PTP). En esta nueva línea celular se probará eliminar la segunda copia endógena de Brf1. Se espera que con el *knock-out* doble, como se ha observado en algunos casos de manipulación genética en *Leishmania*, se presenten posibles alteraciones morfológicas y afectación del crecimiento celular. Además, considerando el papel de Brf1 dentro del reclutamiento de la RNA Pol III mediante la unión a Bdp1 y a subunidades del factor TFIIIC, se prevé que la eliminación del gen Brf1 afectará la síntesis de todos los snRNAs, los tRNAs, el rRNA 5S y el RNA 7SL.

1.Introducción

1.1. Generalidades de *Leishmania*

Leishmania es un protozoo parásito que pertenece a la familia Trypanosomatidae, del orden Kinetoplastida, grupo que a la vez incluye a *Trypanosoma cruzi* y *Trypanosoma brucei*. Estos organismos unicelulares y hemoflagelados comparten varias características estructurales y funcionales. Sin embargo, cada uno es transmitido por un insecto distinto, tiene sus propias características en cuanto a su ciclo de vida y posee diferentes tejidos blancos. Además, estos parásitos producen enfermedades diferentes en sus respectivos hospederos mamíferos, como las distintas formas de leishmaniasis producidas por *Leishmania*, la enfermedad del sueño en África causada por *T. brucei*, y la enfermedad de Chagas causada por *T. cruzi* (Westergaard, 2011). Sus ciclos de vida, además del hombre, involucran reservorios vertebrados como el perro (*Canis familiaris*), el oso perezoso (*Choloepus* spp. y *Bradypus* spp.), la zarigüeya (*Didelphis marsupialis*) y algunos roedores, entre otros (Muskus y Marin, 2002).

Los protozoos pertenecientes al orden *Kinetoplastida* se caracterizan por la presencia de un DNA mitocondrial llamado cinetoplasto, formado por una red compleja de moléculas circulares concatenadas denominadas maxicírculos y minicírculos que se replica independientemente del DNA nuclear (Figura 1) (Simpson *et al.*, 1980).

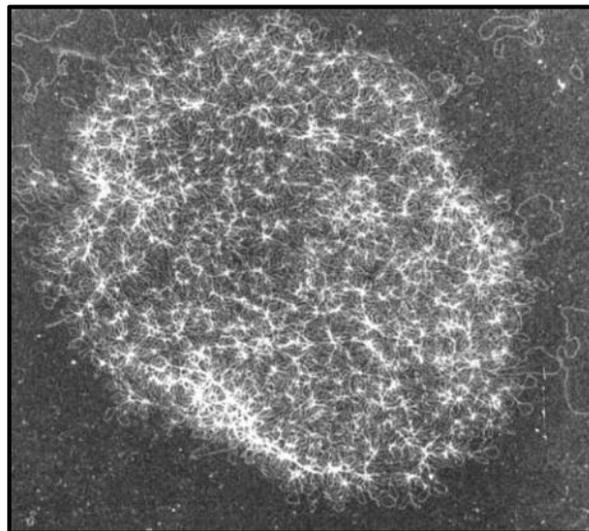


Figura 1. Microscopía electrónica del cinetoplasto de *Leishmania*. Tomada de Barker, 1987.

El cinetoplasto tiene forma de disco con un diámetro de 1-2 μm , está situado dentro de la membrana mitocondrial, en la base del flagelo, y representa hasta el 20% del DNA total del parásito (Simpson, 1979). Los maxicírculos contienen los genes que codifican para el complejo respiratorio, mientras que los minicírculos codifican para los RNA guías, moléculas pequeñas de RNA que participan en la edición de RNA mensajero (mRNA) mitocondrial (Maslov *et al.*, 2001; Liu *et al.*, 2005).

Otra de las características distintivas de esta familia, es la presencia de estructuras subcelulares llamadas glicosomas (Figura 2), las cuales contienen la mayoría de las enzimas glicolíticas (Oppenheimer y Borst, 1977). Además, este grupo de parásitos presenta microtúbulos subpelícula (polímeros lineales de alfa y beta tubulina), adosados a la membrana citoplásmica, conformando un citoesqueleto periférico de gran rigidez, excepto en el área donde emerge el flagelo, conocida como saco flagelar (Figura 2) (Landfear e Ignatushchenko, 2001). Por otro lado, el flagelo es el encargado de otorgar movilidad al organismo en algunos estadios celulares y consiste en un motor axonemal tubular, pero que incluye una estructura paracrística llamada cuerda paraflagelar que se encuentra posicionada a lo largo del axonema (Figura 2) (Fridberg *et al.*, 2006).

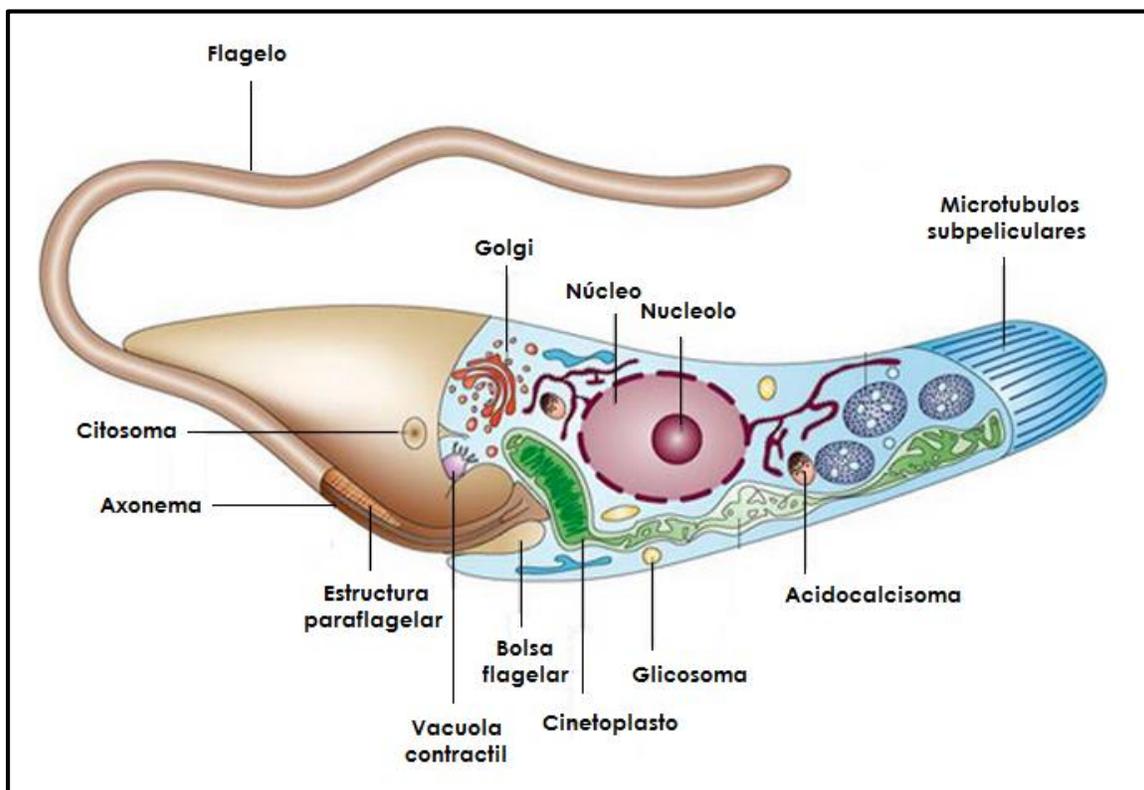


Figura 2. Representación esquemática de un tripanosomátido en estadio promastigote.

1.2. Clasificación taxonómica

Leishmania fue descrito en 1903 por Leishman, Donovan y Wrighty. El parásito es transmitido al hombre por insectos dípteros conocidos como mosca de la arena (*Phlebotomus* en el Viejo Mundo, *Lutzomyia* en el Nuevo Mundo). Las especies pertenecientes al género *Leishmania* se agrupan en tres subgéneros, dependiendo del sitio donde se desarrollan en el insecto vector. En el subgénero *Leishmania* se encuentran las especies que se desarrollan en el intestino medio del insecto, las cuales son causantes de leishmaniasis cutánea y visceral. Por su parte, en el subgénero *Viannia* se agrupan las especies desarrolladas en el intestino posterior del insecto, a la altura del triángulo pilórico, y éstas están asociadas a la leishmaniasis cutánea y mucocutánea (Musculus y Marín, 2002). Finalmente el subgénero *Sauroleishmania* afecta únicamente a algunos reptiles (Padilla-Mejía *et al.*, 2013). La clasificación propuesta por Moreira *et al.* (2004) para este parásito se presenta en la Tabla 1.

Tabla 1. Clasificación taxonómica de *Leishmania* propuesta por Moreira *et al.* (2004).

Reino: Protista
Subreino: Protozoa
Phylum: Euglenozoa
Clase: Kinetoplastea
Subclase: Metakinoplastina
Orden: Trypanosomatida
Familia: Trypanosomatidae
Género: <i>Leishmania</i>
Subgénero: <i>Leishmania</i>
Subgénero: <i>Viannia</i>
Subgénero: <i>Sauroleishmania</i>
Especie: <i>Leishmania maior</i>

1.3. Ciclo biológico

Leishmania es un parásito digénico, lo que significa que parte de su ciclo biológico lo realiza en el tubo digestivo de un hospedero invertebrado (en forma flagelar o promastigote) y otra parte en el hospedero vertebrado (en forma aflagelar o amastigote) (Morales, 2002).

El ciclo de vida de *Leishmania* inicia cuando la forma infecciosa del parásito, el promastigote metacíclico, es transmitido a un hospedero vertebrado por la picadura de la mosca de la arena (Figura 3). Estas formas son fagocitadas por los macrófagos y dentro de los fagolisosomas se diferencian a amastigotes, los cuales invaden a otros tejidos del mamífero. Posteriormente los amastigotes presentes en la sangre son tomados por el insecto al alimentarse del organismo infectado (Bates y Rogers, 2004). El cambio de condiciones al moverse del hospedero mamífero a la probóscide del insecto dispara la diferenciación del parásito en el vector hacia el promastigote procíclico, el cual es una forma replicativa (Pimenta *et al.*, 1997). Estas formas se unen a la pared del intestino medio para luego liberarse y migrar al aparato bucal de la mosca, diferenciándose a promastigotes metacíclicos infectivos (Handman, 1999).

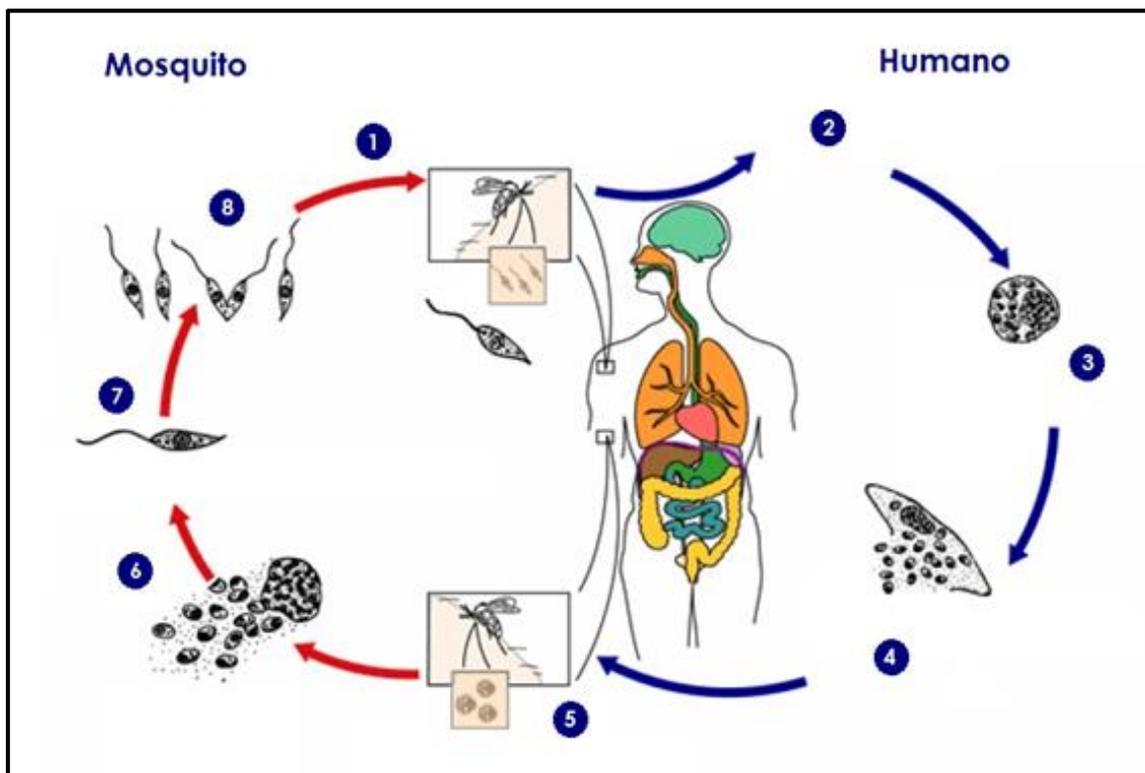


Figura 3. Ciclo de vida de *Leishmania*. 1) Los promastigotes metacíclicos son transmitidos al hombre por la picadura de la mosca de la arena. 2) Los promastigotes son fagocitados por los macrófagos. 3) Diferenciación de promastigotes a amastigotes dentro de fagolisosomas. 4) Invasión de los amastigotes a otros tejidos del mamífero. 5) Otra mosca pica a una persona infectada ingiriendo los amastigotes presentes en la sangre. 6) Ingestión de células parasitadas. 7) En el intestino de la mosca los amastigotes se transforman en promastigotes procíclicos, formas replicativas. 8) Los promastigotes procíclicos se unen a la pared del intestino medio para luego liberarse y migrar al aparato bucal de la mosca, diferenciándose entonces a promastigotes metacíclicos infectivos Tomado de CDC (Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades).

1.4. Morfología

Durante el desarrollo del parásito en el tracto digestivo del vector invertebrado, se han descrito diferentes morfologías, las cuales se encuentran asociadas con cambios genéticos y bioquímicos que en algunos casos modulan funciones biológicas (Chares y Matlashewski, 1994; Langford *et al.*, 1994). Se conoce como metaciclogénesis a la serie de cambios que conlleva a la transformación de promastigotes procíclicos no infectivos, en promastigotes metacíclicos infectivos en el insecto vector, y que les permite sobrevivir en un nuevo ambiente dentro del hospedero mamífero (Muskus y Marin, 2002).

El primer paso en el desarrollo del parásito en el vector, después de 18 a 24 h de la ingestión, es la transformación de amastigote a promastigote, con un tamaño de 15-24 μm \times 2-4 μm , y la presencia de un único flagelo (Figura 4) (Killick-Kendrick *et al.*, 1974). Para que el promastigote se transforme de procíclico a metacíclico, el parásito debe ser capaz de atravesar algunas barreras potenciales en el insecto vector, como las enzimas proteolíticas empleadas para digerir la sangre ingerida y la membrana peritrófica, la cual funciona como barrera temprana para la migración del parásito hacia el epitelio intestinal. Pasar esta barrera le permite al promastigote unirse al intestino del vector para no ser barrido con la eliminación de la sangre digerida y así transformarse en un promastigote metacíclico altamente infectivo y con pre-adaptación para sobrevivir a los diferentes mecanismos microbicidas del sistema inmune del hospedero vertebrado (Muskus y Marin, 2002).

La adhesión de los promastigotes al intestino del vector es una propiedad inherente de los promastigotes procíclicos, la cual se pierde durante la transformación a promastigote metacíclico, lo que permite la liberación y migración del parásito infectivo hacia la probóscide del insecto, para así ser transmitido durante una nueva picadura. Una vez que el promastigote ha sido inoculado en el hospedero vertebrado el cuerpo comienza a redondearse (Walters, 1993), y ya en el macrófago el amastigote adquiere la forma ovalada típica durante las primeras 24 horas, con un tamaño de 2-3 μm y carente de flagelo (Figura 4).

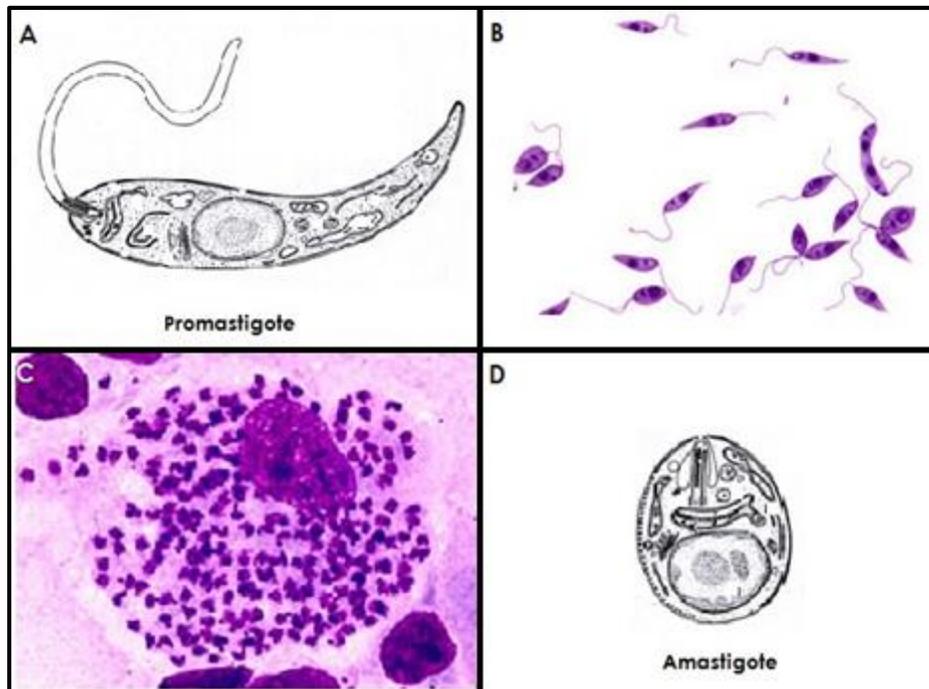


Figura 4. Morfología del género *Leishmania*. A. Representación esquemática del estadio promastigote. B. Promastigotes. C. Macrófago repleto de amastigotes. D. Representación esquemática del estadio amastigote.

1.5. Clínica y epidemiología

Hasta ahora se han identificado 22 especies diferentes de *Leishmania* que producen en el hombre la leishmaniasis, 15 de ellas están presentes en América (Organización Panamericana de la Salud, 2013). La leishmaniasis, comprende un grupo amplio de enfermedades que exponen diferentes manifestaciones clínicas, que dependen no sólo de la especie que infecta, sino también de la salud general y la estructura genética del hospedero (Alexander *et al.*, 1999). Los tres principales tipos de leishmaniasis son: visceral, mucocutánea y cutánea.

La leishmaniasis se distribuye ampliamente en el mundo, existiendo en todos los continentes con excepción de Oceanía. En América la forma más frecuente es la cutánea. La enfermedad se encuentra asociada principalmente con la penetración o residencia cercana de grupos humanos en regiones selváticas, reportándose casos en México, Centroamérica, Sudamérica y Texas. En el caso de México, la leishmaniasis se ha identificado al menos en 22 entidades federativas, entre ellas Veracruz, Tabasco, Campeche, Yucatán, Quintana Roo, Chiapas, Oaxaca, Guerrero, Michoacán, Jalisco, Nayarit, San Luis Potosí, Morelos, Puebla, Coahuila, Nuevo León, Tamaulipas e Hidalgo (Monroy-Ostria y Sanchez-Tejeda, 2002 y Secretaría de Salud, 2015).

1.5.1. Leishmaniasis visceral (LV)

El 90% de los casos se ha reportado en Bangladesh, India, Nepal y Sudán. Los agentes etiológicos pertenecen al complejo *L. donovani*. En México, los estados en los cuales se han detectado casos de LV son Chiapas, Puebla, Guerrero, Oaxaca, Morelos y Tabasco. Los reportes de LV corresponden a *L. chagasi*, principalmente en Chiapas y Guerrero, y se identificó *L. mexicana* en un paciente inmuno- comprometido de Tabasco. La infección puede ser asintomática, aguda o crónica (Secretaría de Salud, 2015).

En países en desarrollo, los niños con algún grado de desnutrición y los sujetos VIH positivos son la población en mayor riesgo de adquirir la enfermedad progresiva. El tiempo de incubación es de meses, a veces años (Pagliano *et al.*, 2005; Mueller *et al.*, 2006). En algunos casos (especialmente en África), aparece un granuloma primario sobre la piel como único signo inicial, antes de que aparezcan los signos sistémicos. Los síntomas más comunes de la LV son fiebre ondulante prolongada, pérdida de peso, disminución del apetito, signos de anemia y distensión abdominal con esplenomegalia y hepatomegalia (Figura 5). Otros síntomas pueden ser tos, diarrea crónica, oscurecimiento de la piel, linfadenopatía y en muchos casos, signos de enfermedad renal crónica. Los casos leves que presentan pocos síntomas pueden resolverse espontáneamente, mientras que el resto, a menos que sean tratados, pueden llegar a ser mortales debido a infecciones secundarias y otras complicaciones. Cabe mencionar que las personas con infecciones tratadas exitosamente continúan siendo portadoras del parásito y la enfermedad puede volver si se inmunodeprimen (Singh *et al.*, 2006 y Rico *et al.*, 2013).



Figura 5. Paciente con leishmaniasis visceral. Sudán 2013. Tomada de WHO.

1.5.2. Leishmaniasis mucocutánea (LMC)

La LMC generalmente está presente en Latinoamérica, registrándose la mayoría de los casos en Bolivia, Brasil y Perú. La característica destacada de las especies causantes de LMC es que producen metástasis en la mucosa de la boca y las vías respiratorias altas por diseminación linfática o hematógena. Dicha enfermedad es producida principalmente por *L. braziliensis* y con menor frecuencia, por *L. panamensis*. Según estudios brasileños, dicha enfermedad puede presentarse desde varios meses hasta más de 20 años después de una lesión cutánea causada por estos organismos (WHO, 2010), aunque también se puede observar mientras las lesiones cutáneas están aún presentes, aumentando el riesgo si estas se presentan por encima de la cintura, son grandes o múltiples y presentan curación retardada. Como signos iniciales se pueden observar ulceraciones en los orificios nasales, seguidos por inflamación destructiva que puede extenderse hasta afectar el septo nasal y en ocasiones, la faringe o la laringe (Figura 6) y en algunos casos más severos, es posible que estén involucrados los genitales. A diferencia de la LV leve, la LMC no se cura de forma espontánea (Bailey y Lockwood, 2007).



Figura 6. Pacientes con Leishmaniasis mucocutánea. Tomado de WHO (2010).

1.5.3. Leishmaniasis cutánea (LC)

La leishmaniasis cutánea es la forma más común de la enfermedad y es causada por especies como *L. major*, *L. tropica* y *L. mexicana*. Más de las dos terceras partes de los casos nuevos aparecen en países como Afganistán, Argelia, Brasil, Colombia, República Islámica de Irán y República Árabe Siria. Se calcula que

cada año se producen en el mundo entre 0.7 y 1.3 millones de casos nuevos (WHO, 2010).

En México, la leishmaniasis cutánea se ha identificado en 22 entidades federativas, entre las cuales destacan Chiapas, Oaxaca, Tabasco, Veracruz, Campeche, Yucatán y Quintana Roo (Monroy-Ostria y Sanchez-Tejeda, 2002, Secretaría de Salud, 2015). Aunque dicha enfermedad afecta a ambos sexos, se reporta con mayor frecuencia en hombres en edad productiva de 15 a 44 años debido a su exposición al vector al adentrarse a las áreas selváticas por motivo de trabajo (Dirección General de Epidemiología, 2011 y Secretaría de Salud, 2015).

La LC se caracteriza por presentar una lesión clásica que comienza en el punto de inoculación. El periodo de incubación puede variar de días a meses. Según la especie de *Leishmania*, se pueden observar úlceras, nódulos lisos, placas planas o lesiones hiperqueratósicas similares a las verrugas. Las lesiones iniciales que aparecen en la piel que estuvo expuesta a moscas de arena generalmente son pápulas. Muchas lesiones permanecen localizadas, pero en algunos casos, los parásitos pueden propagarse a través de los vasos linfáticos y producir lesiones secundarias en la piel o, en ocasiones, en la mucosa de otras partes del cuerpo (WHO, 2010). La LC es generalmente indolora a menos que haya infecciones secundarias en las lesiones y las úlceras permanecen limitadas a la piel sin afectar los tejidos subcutáneos. La mayoría de las lesiones cutáneas se curan espontáneamente. Sin embargo, la velocidad de cicatrización varía según las especies de *Leishmania* infectantes; en algunos casos, puede llevar desde varios meses a un año o más (Bailey y Lockwood, 2007).



Figura 7. Pacientes con leishmaniasis cutánea. Tomado de WHO (2010).

1.6. Tratamiento

El tratamiento sólo se debe administrar una vez confirmada la enfermedad y determinada la extensión de la infección, pues ello puede influir en la elección del tratamiento etiológico o de apoyo. En algunas regiones el diagnóstico debe llegar hasta la especie (por ejemplo, en la leishmaniasis cutánea del Nuevo Mundo) (WHO, 2010). Actualmente existen varios medicamentos eficaces para atacar a los parásitos cuyo costo es muy elevado, como los derivados del antimonio, la anfotericina B y la pentamidina (Desjeux, 2004; Murray *et al.*, 2005).

Antimoniales pentavalentes

Hay dos antimoniales pentavalentes: el antimoniato de meglumina y el estibogluconato de sodio. Para tratar la leishmaniasis cutánea, los antimoniales pentavalentes pueden ser administrados directamente en las lesiones. Comúnmente se presentan efectos colaterales como anorexia, vómitos, náuseas, dolor abdominal, malestar, mialgias, artralgias, cefaleas, sabor metálico y letargo. Algunos efectos graves, pero poco frecuentes son la cardiotoxicidad y la muerte súbita; mientras que la elevación de las enzimas pancreáticas es frecuente (Vélez *et al.*, 2010 y Chrusciak-Talhari *et al.*, 2011).

Desoxicolato de anfotericina B

La anfotericina B es un antibiótico poliénico empleado como una alternativa al tratamiento habitual con antimoniales, especialmente por la alta resistencia que se reporta a éstos (Hernández-Flores *et al.*, 2007). Las reacciones frecuentes son la fiebre alta y los escalofríos, al igual que la tromboflebitis. También es común la nefrotoxicidad, llevando así a la interrupción del tratamiento en algunos pacientes. Otros efectos tóxicos poco frecuentes, pero graves, son la hipopotasemia o hipokalemia y la miocarditis (Wortmann *et al.*, 2010; Saldanha, 2009 y Motta, 2012).

Formulaciones lipídicas de la anfotericina B

Las formulaciones lipídicas son empleadas como una alternativa al tratamiento habitual con antimoniales, así como al tratamiento con desoxicolato de anfotericina B, debido a que representa una menor toxicidad. Se han utilizado varias formulaciones, como la anfotericina B liposómica, el complejo lipídico de anfotericina B o la dispersión coloidal de anfotericina B, cuya eficacia es similar a la del desoxicolato de anfotericina B. En algunos pacientes se producen reacciones leves como fiebre, escalofríos y dolor de espalda. Ocasionalmente se observan nefrotoxicidad o trombocitopenia transitorias (Desjeux, 2004, Lambertucci y Silva 2008).

Isetionato de pentamidina

La pentamidina es un derivado diamidino aromático que interactúa directamente con el DNA del cinetoplasto, interfiriendo en su replicación y transcripción, además de modificar su conformación estructural (Basselin *et al.*, 1998). El significado de estos cambios no está perfectamente claro, pero se ha propuesto el término “transkinetoplastidia” para explicar cómo ante la presencia de estos fármacos, se produce un cambio en la replicación de los minicírculos, que conduce a que las familias minoritarias, tras varios ciclos de replicación, sean las mayoritarias (Lee *et al.*, 1993). Su empleo se ve limitado por efectos adversos graves como diabetes mellitus, hipoglucemia grave, miocarditis, nefrotoxicidad, anemia, hipotensión, hipercalcemia y choque anafiláctico, entre otros (Neves *et al.*, 2011).

Hasta ahora no existe ningún fármaco, ni vacuna eficaz en la prevención de la leishmaniasis y la resistencia a los medicamentos empleados en su tratamiento es elevada ya que los parásitos se han vuelto menos sensibles a estos. En nuestro laboratorio estamos interesados en el estudio de los aspectos básicos de la biología de *L. major*. En particular estamos interesados en el análisis de la transcripción de la RNA polimerasa III en este protozoo parásito.

1.7. Transcripción de la RNA Pol III en eucariontes

La transcripción es el proceso mediante el cual las moléculas de RNA son sintetizadas, usando como molde al DNA. En los organismos eucariontes se han descrito tres enzimas generales que catalizan este proceso y son conocidas como RNA Polimerasas (RNA Pol) I, II y III. Cada una de éstas sintetiza distintos tipos de RNA. La RNA Pol I está involucrada en la producción de los RNA ribosomales (rRNA) 18S, 5.8S y 28S (Smid *et al.*, 1995). La RNA Pol II es la responsable de la transcripción de todos los mRNA y la mayoría de los RNA pequeños nucleares (snRNA), mientras que la RNA Pol III transcribe moléculas de RNA involucradas en procesos metabólicos fundamentales para la célula, específicamente componentes del aparato de síntesis de proteínas, como el rRNA 5S y los RNAs de transferencia (tRNA). La RNA Pol III también sintetiza al snRNA U6, el cual participa en el procesamiento (*splicing*) de los mRNA. Otros RNAs sintetizados por la Pol III son: RNA de la RNasa MRP que participa en la maduración de los pre-tRNAs (Gupta y Reddy, 1991); RNA telomerasa que funciona como molde en la síntesis de los telómeros (Romero y Blackburn, 1991); y el 7SL RNA, que participa en la importación de proteínas al retículo endoplásmico (Kiss *et al.*, 1991); así como otros RNAs con funciones aún desconocidas (Proshkina *et al.*, 2006).

Existen tres clases de promotores que reconoce la RNA Pol III para que la transcripción pueda llevarse a cabo, los cuales han sido denominados tipo 1, 2 y 3 (Figura 8). El promotor tipo 1, presente en los genes del rRNA 5S, es intragénico y consiste en una caja A, un elemento intermedio (EI) y una caja C. Los promotores tipo 2 son característicos de los tRNA, y de igual manera que los tipo 1, son intragénicos y consisten en una caja A y una caja B (Galli *et al.*, 1981). Los promotores tipo 3 contienen, a diferencia de los primeros, elementos de control extragénicos que se encuentran localizados río arriba del gen del snRNA U6 y consisten de una caja TATA, un elemento de secuencia proximal (ESP) y un elemento de secuencia distal (ESD) (Smid *et al.*, 1995).

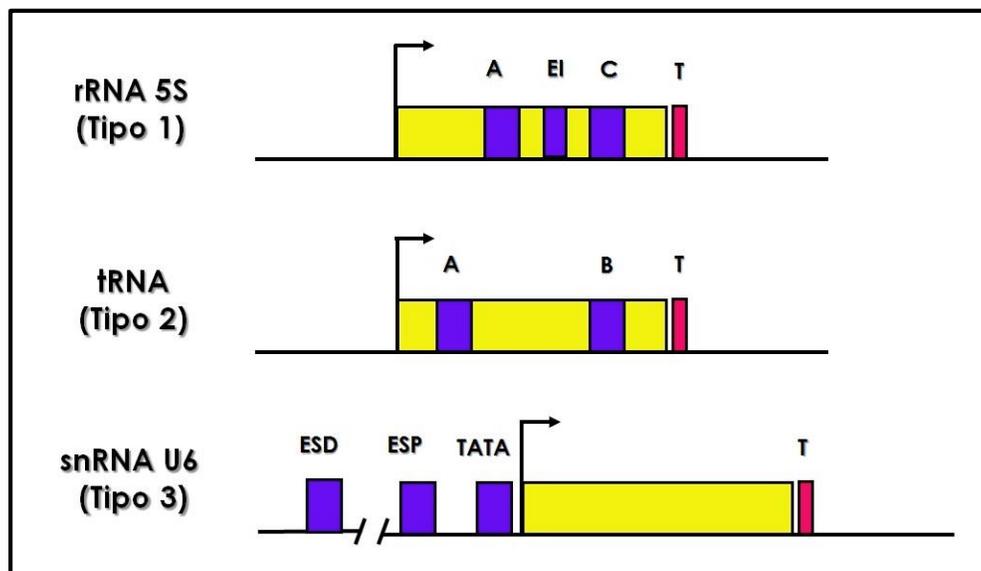


Figura 8. Organización de los tres tipos de promotores empleados por Pol III. Las flechas indican el sitio de inicio de la transcripción. A, B y C corresponden a las cajas A, B y C respectivamente. Los recuadros amarillos corresponden a los genes. EI (Elemento Intermedio); ESD (Elemento de Secuencia Distal); ESP (Elemento de Secuencia Proximal) y T (sitio de término de la transcripción). Basado en Willis, 1993.

Para que se pueda llevar a cabo la transcripción de moléculas de RNA de manera específica y correcta debe darse un arreglo y colaboración precisa de proteínas que comprenden a las RNA Polimerasas y los factores de transcripción (Huang y Maraia, 2001). Se han caracterizado tres principales factores de transcripción de la RNA Pol III que permiten el reconocimiento y anclaje de la RNA Polimerasa a sus genes específicos: TFIIIA, TFIIIB y TFIIIC. El factor TFIIIA contiene nueve dedos de zinc y es específico de los promotores de rRNA 5S. TFIIIC está compuesto por seis subunidades agrupadas en dos subdominios, y TFIIIB es un factor

indispensable para que la RNA Pol III pueda ubicarse correctamente en la región de inicio y pueda comenzar el proceso de la transcripción.

TFIIIB, un factor de transcripción común para todos los promotores de la RNA Pol III, está compuesto por tres subunidades: Brf1, Bdp1 y TBP (una proteína de unión a caja TATA) (Kenneth *et al.*, 2008). En los promotores tipo 1, el factor TFIIIA reconoce las cajas A, C, y el elemento intermedio. El complejo formado dirige al factor TFIIIC hacia el promotor del rRNA 5S. Posteriormente TFIIIB se une al complejo, permitiendo el reclutamiento de la RNA Pol III. En el caso de los promotores tipo 2, el factor TFIIIC reconoce a las cajas A y B, lo cual permite el reclutamiento del factor TFIIIB, favoreciendo a su vez el reclutamiento de la RNA Pol III.

En los promotores tipo 3, el complejo SNAPc reconoce el ESP, mientras que la caja TATA es reconocida por TFIIIB. Por su parte el ESD posee un octámero en su secuencia que funciona como sitio de unión a Oct1 y una secuencia SPH que recluta a STAF. La unión de SNAPc y el factor TFIIIB permiten el reclutamiento de la RNA Pol III (Schramm y Hernandez, 2002).

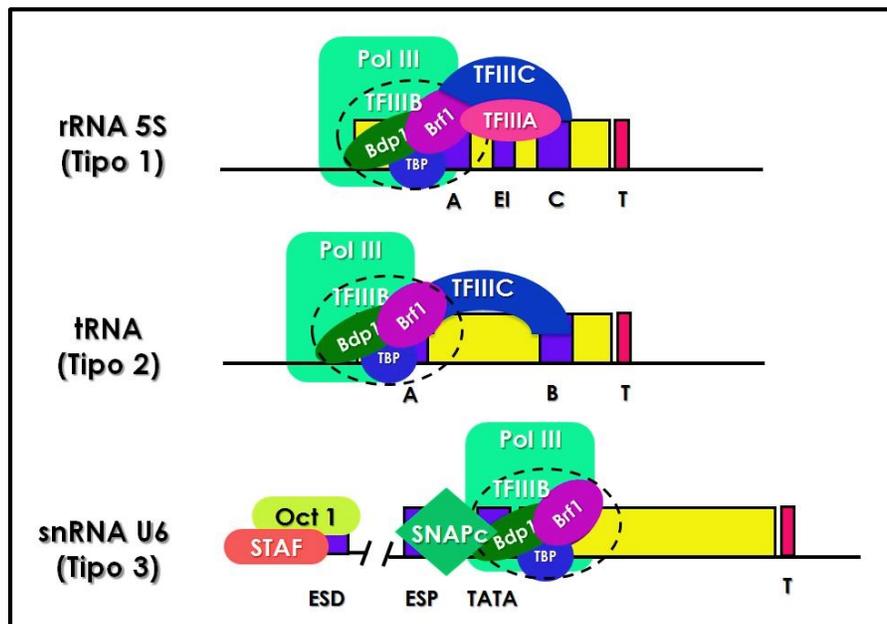


Figura 9. Factores de transcripción relacionados con la RNA Polimerasa III. Se muestran los tres tipos de promotores y los factores reclutados en cada uno de ellos. Basado en Oler *et al.*, 2011.

1.7.1. Subunidad Brf1 de TFIIIB

Brf1 es un factor relacionado con TFIIIB, importante en la formación del complejo de inicio de la transcripción y esencial para el reclutamiento de la RNA Pol III. En levadura se han identificado varios dominios funcionales. El extremo amino terminal de Brf1 (NTD) (aminoácidos 1-286) comparte características prominentes con el segmento correspondiente de TFIIIB, incluyendo un dominio de dedo de zinc seguido de dos dominios repetidos de ciclina (Kassavetis y Geiduschek, 2006). Aunque la secuencia del NTD puede variar entre ortólogos de Brf1, su estructura secundaria es muy conservada, pues el dedo de zinc forma una estructura β -plegada, mientras que cada uno de los repetidos de ciclina se pliega en cinco α -hélices. El NTD de Brf1 resulta esencial para la actividad transcripcional de TFIIIB, ya que el dedo de zinc es necesario para la apertura del promotor. Por su parte, los repetidos de ciclina son necesarios para la interacción de Brf1 con la subunidad t131 del factor TFIIIC (Chaussivert *et al.*, 1996; Dumay *et al.*, 1999; Liao *et al.*, 2006) y con las subunidades C34 y C17 de la RNA Pol III (Brun *et al.*, 1997).

Se sabe que el extremo carboxilo terminal (CTD) (aminoácidos 498-596) de Brf1 es una porción variable de la proteína, aunque en levaduras (*Candida albicans*, *Kluyveromyces lactis*, *Saccharomyces pombe* y *S. cerevisiae*) se han identificado tres dominios relativamente conservados, denominados Brf I, II y III. Algunos estudios han revelado que TBP se une principalmente al dominio Brf II, dentro del CTD (Buratowski y Zhou, 1993). Bdp1, la tercera subunidad de TFIIIB, también se une al CTD de Brf1. Sin embargo, se ha encontrado que la interacción entre Bdp1 y Brf1 es relativamente débil, pues al someter al complejo TFIIIB a una purificación por cromatografía de afinidad y a ensayos tipo *pull down*, se observa la separación del complejo en 2 partes: TBP y Brf1, y Bdp1 (Kassavetis *et al.*, 2006; Saïda, 2008). En humanos Brf presenta dos isoformas, Brf1 y Brf2. La primera participa en la transcripción de los promotores tipo 1 y 2 de Pol III, mientras que la segunda es requerida para la transcripción de los genes del snRNA U6, que contiene un promotor del tipo 3.

Durante la mitosis, existe una represión generalizada de la expresión génica. En las células HeLa, esta represión está mediada por la cinasa MK2 (Dupé, 2013) y es antagonizada por la proteína fosfatasa 2A (PP2A). Brf1 es hiperfosforilado en las células en metafase, lo que hace que pierda afinidad por Pol III y por Bdp1. Así, Brf1 hiperfosforilada permanece asociada sólo a TBP, pudiendo también interactuar con TFIIIC en los promotores en los cromosomas condensados (Fairley *et al.*, 2003).

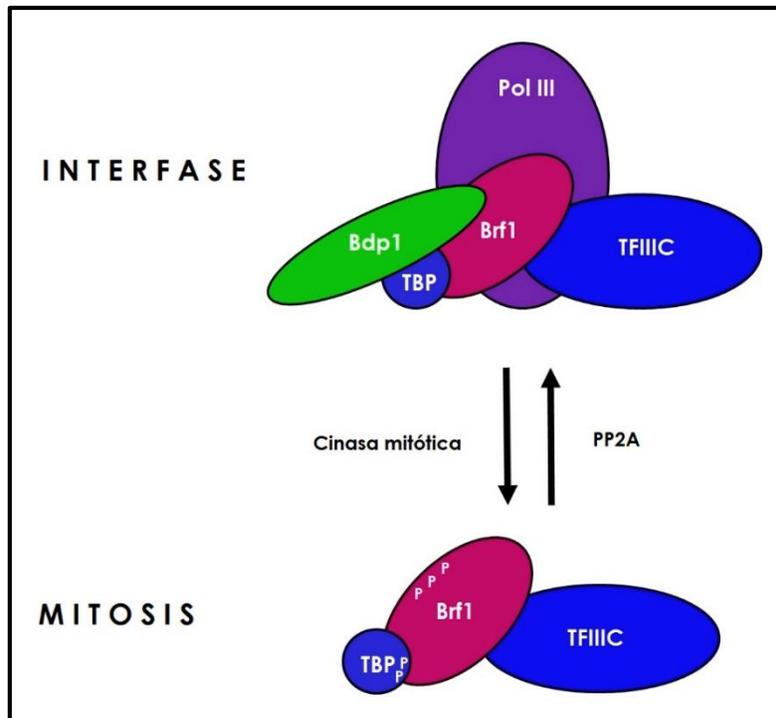


Figura 10. Hiperfosforilación de Brf1 durante la mitosis. PP2A: proteína fosfatasa 2. Basado en Fairley *et al.*, 2003.

1.8. Organización genómica en *Leishmania*

En el 2005 se finalizó la secuencia del genoma de *L. major* (Ivens *et al.*, 2005), revelando que la gran mayoría de los 8300 genes identificados están organizados en grupos grandes de genes localizados en una misma cadena de DNA, formando unidades policistrónicas largas (100-300 kb) (Johnson *et al.*, 1987; Myler *et al.*, 2000; Martínez-Calvillo *et al.*, 2003). *L. major* tiene un genoma de 32.8 megabases (Mb), distribuido en 36 cromosomas relativamente pequeños.

Se sabe que la mayoría de los genes de *L. major* no tiene similitud con genes de otros organismos, a excepción de otros tripanosomátidos, por lo que es probable que muchos de estos genes tengan funciones específicas del parásito (Myler *et al.*, 1999; Worthey *et al.*, 2003).

1.9. Transcripción en *Leishmania*

1.9.1. Transcripción policistrónica

A diferencia de la mayoría de los organismos eucariontes, la transcripción en los tripanosomátidos es policistrónica, formándose transcritos primarios largos que contienen información para sintetizar varias proteínas (Figura 11) (Johnson *et al.*, 1987; Martínez-Calvillo *et al.*, 2003). La transcripción policistrónica ha dificultado la identificación de regiones promotoras de la RNA Pol II en este grupo de organismos (McAndrew *et al.*, 1998). Hasta ahora, el único promotor de Pol II que ha sido caracterizado es el del gen que codifica para el RNA miniexón. Tanto en *T. brucei* como en *L. tarentolae* y *Leptomonas seymouri*, el promotor del RNA miniexón está formado por un dominio bipartita río arriba y un dominio localizado en la región de inicio de la transcripción (Saito *et al.*, 1994; Gunzl *et al.*, 1997; Luo *et al.*, 1999). Los factores de transcripción identificados hasta ahora para Pol II son: 1) TRF4, factor universal de transcripción relacionado con TBP, 2) SNAPc, 3) TFIIA, 4) TFIIB y 5) TFIIH.

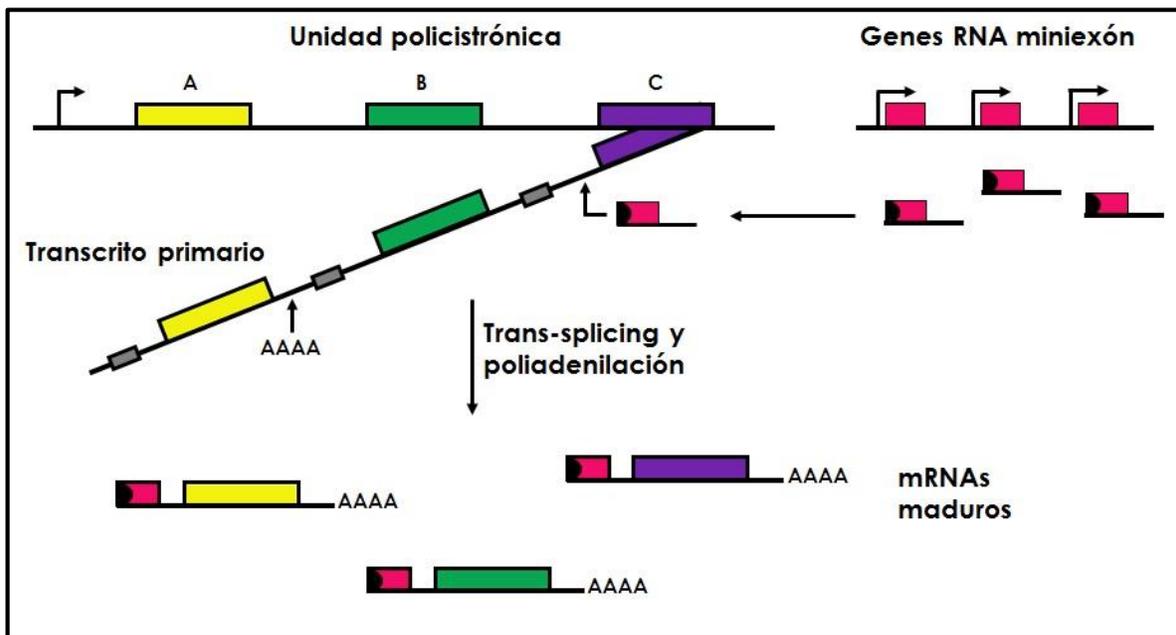


Figura 11. Representación esquemática de la transcripción policistrónica y el *trans-splicing*. Formación del transcrito policistrónico (izquierda); transcripción y procesamiento de una repetición en tándem del gen RNA miniexón (derecha). En el centro se muestra el proceso de poliadenilación y *trans-splicing* para generar los mRNAs maduros.

1.9.2. *Trans-splicing*

Los parásitos tripanosomatidos se caracterizan por presentar rasgos particulares en sus procesos regulatorios, entre los que se encuentra el proceso de *trans-splicing* (Figura 11) (D'Orso, 2003). Éste es un proceso de adición de una secuencia de 39 bases, conocida como RNA miniexón o *spliced-leader*, al extremo 5' de todos los mRNA, región que posee un sitio AG que actúa como aceptor del *miniexón* durante el procesamiento del pre-mRNA (Gunzl, 2010). El miniexón porta un cap en su extremo 5', por lo que protege al mRNA de la acción de nucleasas, prolongando así su vida media, además de asegurar la traducción del RNA, ya que hace del mRNA una estructura reconocible por los ribosomas (Kelly *et al.*, 1992; Kelly, 1995; Freedman y Beverley, 1993; Kapler *et al.*, 1990).

1.9.3. Poliadenilación

La maduración del mRNA finaliza con la adición de una cola de poli A en su extremo 3'. La poliadenilación y el *trans-splicing* son procesos que se encuentran acoplados (LeBowitz *et al.*, 1993; Borst y Ulbert, 2001). Regiones ricas en pirimidinas ubicadas en las regiones intergénicas son necesarias para la poliadenilación del gen localizado río arriba, y para el *trans-splicing* del gen localizado río abajo (Papadopoulou *et al.*, 2003).

1.9.4. Transcripción de RNA Pol III

En tripanosomátidos, todos los snRNAs son sintetizados por Pol III, además de los tRNAs, el rRNA 5S y el RNA 7SL. Esta polimerasa muestra una resistencia intermedia a la α -amanitina (ID50 = 150 μ g/mL). El análisis de la secuencia de los genes de tRNA y del sRNA 5S ha permitido la identificación de los dominios de control interno (cajas A, B y C), aunque ninguna región promotora ha sido caracterizada funcionalmente a la fecha en *Leishmania*.

La mayoría de las subunidades de Pol III fueron identificadas en el genoma de los tripanosomátidos mediante búsquedas tipo Blast (Ivens *et al.*, 2005) y mediante cromatografías de afinidad en tándem (Martínez-Calvillo *et al.*, 2007): RPC1 (C160), RPC2 (C128), RPC3 (C82), RPC4 (C53), RPC5 (C37), RPC6 (C34), RPC9 (C17), RPAC1 (AC40) y RPAC2 (AC19). Sin embargo, hasta ahora ningún factor de transcripción de Pol III ha sido caracterizado en *L. major*, aunque el

análisis de su secuencia genómica ha revelado la presencia de tres genes que presentan similitud con las tres subunidades del factor TFIIIB: TBP, Bdp1 y Brf1.

1.9.4.1. Brf1

El gen Brf1 se ubica entre los nucleótidos 140,947 y 143,058 del cromosoma 25 de *L. major*, tiene un tamaño de 2,112 pb y codifica para una proteína predicha de 77.3 kDa (NCBI).

Mediante análisis tipo Blast han sido identificados ortólogos de Brf1 en *L. braziliensis*, *L. infantum*, *T. brucei* y *T. cruzi*, determinándose que la identidad entre *L. major* y otras especies de *Leishmania* es muy alta (92-97%), siendo menor al comparar con *T. cruzi* y *T. brucei* (~58%). En cambio, se ha observado que los porcentajes de identidad de Brf1 entre *L. major* y eucariontes como *C. elegans* y *H. sapiens* son bajos (10-26%).

El análisis *in silico* han determinado que el NTD de la proteína Brf1 presenta un alto grado de conservación en *L. major* y que el dedo de zinc y los dos dominios repetidos de ciclina están presentes en dicho organismo. Brf1 en *L. major* también contiene secuencias conservadas que potencialmente podrían interactuar con TFIIIC y la subunidad C34 de Pol III (Flores, 2011).

1.10. Eliminación de genes en *L. major*

La introducción en una célula eucarionte de fragmentos de DNA que inducen un cambio en la expresión génica es denominada transfección. Existen dos tipos básicos de transfección: 1) los métodos químicos basados en la formación de complejos de DNA con compuestos incorporados por la células mediante la ruta endocítica o por afinidad con las membranas celulares; y 2) los métodos físicos, basados en la introducción mecánica de las moléculas al interior de la célula (microinyección, *biolistic particle delivery* y electroporación) (Laban *et al.*, 1990; Papadopoulou y Dumas, 1997). La eficiencia de una transfección puede variar entre y dentro de especies de protozoarios, por lo cual las condiciones técnicas óptimas deben ser determinadas para cada cepa y estadio. Entre los parámetros variables para la transfección en *Leishmania* por electroporación se encuentran: la densidad celular, la concentración y pureza de DNA, las condiciones de selección de las células transfectadas, la duración del pulso eléctrico, y la composición iónica del medio (Kapler *et al.*, 1990).

La creación de líneas celulares transfectadas de manera estable es la ruta más empleada en los estudios cuantitativos y funcionales. La transfección permanente se logra con la introducción de episomas o por integración de DNA al genoma (Price *et al.*, 2003).

Transfección estable con episomas

Los episomas son vectores circulares de DNA auto-replicativos que contienen un gen de resistencia a un fármaco que funciona como marcador de selección, además de las regiones intergénicas y el gen de interés o reportero. La resistencia conferida por el marcador de selección permite que las células transfectadas sean seleccionadas. Entre los marcadores de selección más empleados se encuentran los genes *neo^r*, *phleo^r*, *hyg^r* y *pac^r*, que confieren resistencia a geneticina (G418), fleomicina, higromicina B y puromicina, respectivamente (Laban *et al.*, 1990; Kelly *et al.*, 1992 y Freedman y Beverley, 1993).

Transfección permanente por integración al genoma

Para realizar una transfección permanente por integración de DNA al genoma, el vector debe ser linearizado con enzimas de restricción dentro de secuencias idénticas a las del sitio propuesto para la integración en el genoma. Dado que *Leishmania* es un organismo diploide, usualmente se requieren dos marcadores para la eliminación de los dos alelos (Price *et al.*, 2003).

Es importante considerar los factores que influyen en la frecuencia de recombinación homóloga entre el vector introducido y la secuencia del DNA cromosómico, como: la cantidad y naturaleza de secuencias homólogas, el *locus* genético, el número de copias del blanco y el diseño del vector. El tamaño mínimo para obtener una recombinación homóloga eficiente en *Leishmania* ha sido establecido entre 150 y 200 pb (Papadopoulou y Dumas, 1997).

Para efectuar la eliminación de un gen completo, las regiones UTR-5' y UTR-3' del gen blanco se integran al vector a ambos lados del marcador de selección. Un *knock-out* de ambas copias de un gen requiere dos rondas de eliminación, con diferentes marcadores de selección. La ausencia del gen se comprueba mediante técnicas de hibridación de membranas. Por otro lado, la re-expresión del producto del gen por complemento de los genes eliminados, restaura su actividad (Sengupta, *et al.*, 2003 y Selvapandiyan *et al.*, 2001).

La eliminación de algunos genes en *Leishmania* ha permitido la caracterización de varias proteínas transductoras de señal, chaperonas y enzimas involucradas en la virulencia y resistencia a diferentes fármacos. Además, se han evaluado los

efectos de la eliminación de dominios esenciales para la actividad enzimática (Chang y McGwire, 2002).

En el presente trabajo se inició la caracterización funcional de Bf1 en *L. major*. Para ello se produjeron líneas celulares de promastigotes del parásito en las que se eliminaron una o las dos copias alélicas del gen Bf1 mediante *knock-outs* génicos por recombinación homóloga.

2. Hipótesis

La substitución de una copia alélica del gen Brf1 por un gen de resistencia a algún fármaco en *L. major* no afectará la viabilidad y proliferación del parásito. Sin embargo, la substitución de la segunda copia alélica producirá células con alteraciones morfológicas y se afectará el crecimiento celular. La síntesis de todos los snRNAs, los tRNAs, el rRNA 5S y el RNA 7SL será afectada debido a la función de Brf1 en el reclutamiento de la RNA Pol III.

3. Objetivos

Objetivo general

Generar y caracterizar líneas celulares *knock-out* de Brf1 en el parásito protozoario *Leishmania major*.

Objetivos particulares

1. Determinar el tamaño de los transcritos de Brf1 en cultivos de *L. major* en fase media de crecimiento logarítmico y en fase estacionaria.
2. Establecer la vida media del mRNA de Brf1 en *L. major*.
3. Construir plásmidos que permitan la eliminación de las dos copias alélicas del gen Brf1 en *L. major*.
4. Generar y caracterizar clonas celulares en la que una (*knock-out* sencillo) o las dos copias (*knock-out* doble) del gen Brf1 hayan sido eliminadas por recombinación homóloga.
5. Determinar el efecto del *knock-out* de Brf1 en el crecimiento celular.

4. Materiales y métodos

4.1. Cultivo y conteo de parásitos

Los promastigotes procíclicos de la cepa de *L. major* Friedlin fueron crecidos a 27°C en medio líquido BM pH 7.4 (suero fetal bovino 10%, infusión de cerebro corazón 0.25X, medio 199 0.5X, HEPES 40 mM, hemina 0.01 mg/mL, biotina 0.02%, biopterina 1.25X, penicilina 100 U/mL, estreptomycin 0.1 mg/mL) hasta alcanzar la fase media logarítmica. Para mantener a los parásitos en dicha fase se tomaron 0.5 mL de cultivo y se diluyeron en 4.5 mL de medio BM fresco dejando incubar a 27°C.

Para contar los parásitos se tomaron 50 µL de cultivo diluyéndolos en 450 µL de formaldehído al 2%. De dicha dilución se colocaron 10 µL en una cámara de Neubauer, contando el número de parásitos ubicados en los cuadros en diagonal de cada cuadrante de la esquina (Figura 12); el resultado se multiplicó por 10^4 para obtener el número de parásitos por mL de cultivo.

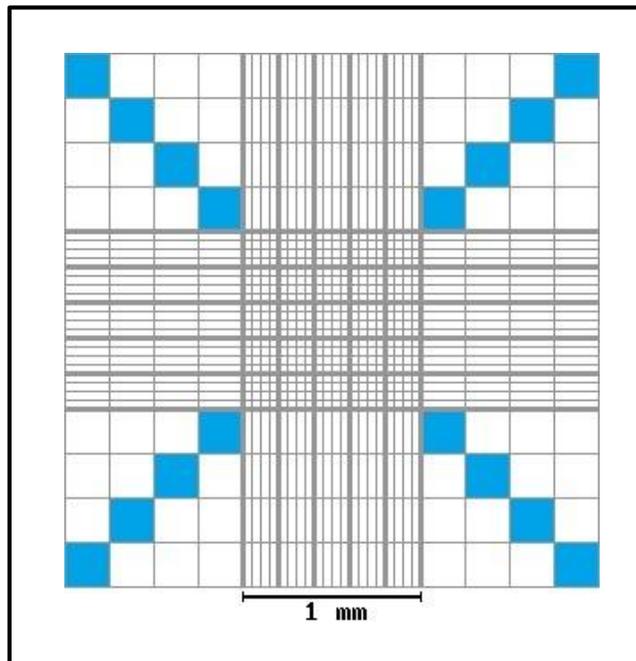


Figura 12. Esquema de la cámara de Neubauer. En azul se señalan las áreas en donde se realizó el conteo de parásitos.

Para su mantenimiento a largo plazo, los cultivos fueron congelados en nitrógeno líquido como se explica a continuación: 8×10^7 células en fase media logarítmica fueron centrifugadas a 4,000 rpm durante 12 min a 4°C; la pastilla fue resuspendida en 2 mL de suero fetal bovino con 10% de dimetilsulfóxido. Las células fueron transferidas a un criovial y se mantuvieron a -70°C durante toda la noche. Finalmente, los crioviales fueron almacenados en nitrógeno líquido.

4.2. Extracción de RNA total

Los cultivos celulares en fase media logarítmica fueron centrifugados a 5,000 rpm durante 10 min a 4°C, eliminando el sobrenadante y lisando el pellet restante con 750 μ L del reactivo TRIZOL-LS (Invitrogen) por cada 5×10^7 células. La muestra se pipeteó suavemente para homogenizar y se incubó a temperatura ambiente durante 5 min; posteriormente se adicionaron 200 μ L de cloroformo por cada 750 μ L de TRIZOL-LS, agitando vigorosamente durante 15 s para después incubarlo por 15 min a temperatura ambiente y centrifugarlo a 12,000 g durante 15 min a 4°C. A continuación se tomó la fase superior (acuosa) que contenía el RNA y se transfirió a un tubo Eppendorf nuevo. La muestra se mezcló con 500 μ L de alcohol isopropílico por cada 750 μ L de TRIZOL-LS ocupado anteriormente. Después se incubó a temperatura ambiente por 10 min y se centrifugó a 7,500 rpm a 4°C, se retiró el sobrenadante y la pastilla de RNA se lavó con etanol al 75%. Se dejó secar por 10 min a temperatura ambiente para finalmente resuspender el RNA en un volumen de 20-50 μ L de agua tratada con dietilpirocarbonato (DEPC). La concentración del RNA se determinó con un espectrofotómetro a 260 nm (1 D.O. a 260 nm = 40 μ g/mL).

4.3. Extracción de DNA genómico

La extracción del DNA genómico se realizó a partir de 3×10^8 promastigotes empleando el método convencional de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (25:24:1). Para esto se partió de cultivos de promastigotes en fase media logarítmica, centrifugando las células a 5,000 rpm durante 10 min a 4°C, y resuspendiendo la pastilla en 5 mL de solución de lisis que contiene 5 μ L de SSC 1X (NaCl 3 M y citrato de sodio 0.6 M), 5 mL de TNE pH 8.0 (Tris 40 mM, EDTA 1 mM y NaCl 15 mM), Sarcosyl 0.5 % y 100 μ g de proteinasa K. Las muestras se agitaron en vórtex (Daigger Genie 2) y se mantuvieron a 55°C durante 2 h. Posteriormente se adicionaron 0.5 volúmenes de fenol y 0.5 volúmenes de cloroformo y se centrifugó a 4,000 rpm durante 10 min a 4°C; se transfirió la fase

superior acuosa a un tubo nuevo y se precipitó con 0.1 volúmenes de acetato de sodio 3 M y 2.5 volúmenes de etanol absoluto a -20°C toda la noche. Al día siguiente se centrifugó a 9,000 rpm durante 15 min a 4°C y se lavó la pastilla dos veces, la primera con etanol al 70% y la segunda con etanol absoluto. Finalmente el DNA se resuspendió en 300 µL de Tris- EDTA pH 7.8 (Tris-HCl 10 mM y EDTA 0.2 mM). La concentración y calidad del DNA genómico extraído se evaluó por espectrofotometría a 260 nm (1 D. O. a 260 nm= 50 µg/mL) y electroforesis en geles de agarosa al 1% con amortiguador TBE 1X y Midori Green Advance como agente intercalante para visualizar los ácidos nucleicos bajo la luz UV; dichos geles fueron fotografiados en un sistema de documentación de geles BioSens SC645 con el software PSRemote V 1.6.3 y analizados con el programa Bio Sens Image System V 1.7.6.

4.4. Electroforesis y purificación de DNA en geles de agarosa

El DNA fue analizado en geles de agarosa (Agarose D-1 low EEO PRONADISA) preparado a una concentración de 1% con amortiguador TBE 1X (Tris Base-HCl 5.4%, ácido bórico 2.74% y EDTA 0.46%) y teñido con Midori Green Advance. Los geles se dejaron polimerizar durante 20 min y se corrieron inmersos en TBE en una cámara de electroforesis Gel XL Ultra V-2 Labnet, durante 30 min a 100 V. Las muestras fueron resuspendidas en buffer de carga 6X, además se emplearon marcadores de peso molecular (escalera de 1 kb de Invitrogen); la visualización de las muestras se llevó a cabo mediante un Transiluminador de luz UV (Transilluminator M-26 UVP) para posteriormente ser fotografiadas. La purificación de las muestras de DNA se realizó con ayuda del Kit NucleoSpin Extract II (Machereil Nagel), siguiendo las indicaciones del fabricante. Este método además remueve enzimas y dNTPs de las muestras de DNA.

4.5. Marcaje radioactivo de DNA

El marcaje de la región UTR-5' de Brf1, del gen α -tubulina de *Trypanosoma brucei* y del gen del rRNA 18S de *L. major*, se realizó con el kit High Prime (Roche), tomando 100 ng de DNA previamente purificado de geles de agarosa, llevando a un volumen final de 12 µL con agua desionizada, el cual fue desnaturizado en agua hirviendo por 10 min. Se adicionaron 4 µL de la solución High Prime y 4 µL de [α -³²P]-dCTP (3,000 Ci/mmol, Amersham), se mezcló y se centrifugó para

posteriormente incubar a 37°C durante 25 min. La reacción se detuvo adicionando 2 µL de EDTA 0.2 M con pH 8.0. Finalmente la reacción se pasó por una columna Sefadex G-50 (ProbeQuant G50, Amersham) para remover los nucleótidos no incorporados al DNA y fue cuantificada en el contador de centelleo Wallac 1450 MicroBeta (Perkin Elmer). El gen α -tubulina se obtuvo digiriendo el vector pGEM-Tbatub, mientras que el fragmento del gen del rRNA 18 se obtuvo del vector pGEM-T 18s; ambos vectores fueron digeridos con la enzima *EcoRI*.

4.6. Experimentos tipo *northern-blot*

4.6.1. Ensayo con actinomicina D

Se realizaron ensayos *northern-blot* para determinar la vida media del mRNA de Brf1. Para esto, se agregó actinomicina D (inhibidor de la transcripción) a una concentración de 10 µg/mL en cultivos de promastigotes procíclicos en fase media y en fase estacionaria para bloquear la transcripción. Posteriormente se tomaron alícuotas a distintos tiempos (0, 1, 2, 4, 8 y 16 h) para extraer el RNA lisando con TRIZOL. Inicialmente, se analizó la concentración y calidad del RNA extraído en un gel desnaturizante de agarosa.

El RNA total extraído de promastigotes de *L. major*, en fase media logarítmica y estacionaria, fue precipitado con 0.1 volúmenes de acetato de sodio y 2.5 volúmenes de etanol, resuspendiendo 12 µg en 2 µL de agua DEPC. Posteriormente las muestras fueron corridas en geles desnaturizantes de agarosa y transferidas a membranas de nylon para su posterior hibridación con una sonda radioactiva correspondiente a la región UTR-5' del gen Brf1 o con el gen α -tubulina de *Trypanosoma brucei*, empleando como control de carga un fragmento del gen del rRNA 18S de *L. major*. Para obtener las imágenes se emplearon placas IPs (imaging plates) y un sistema el Lase-Scanning Molecular Imager FLA-5000 Series (FUJI) que permite además detectar la emisión de diferentes radioisótopos como ^{14}C , ^{32}P , ^{33}P , ^{35}S , ^{125}I , ^3H .

Después de la hibridación, la intensidad de las bandas correspondientes al mRNA de Brf1 y α -tubulina fue cuantificada por densitometría con ayuda del programa MultiGauge V 6.0 y representada en una gráfica de dispersión para establecer el tiempo en el que dicho transcrito reduce su concentración a la mitad.

4.6.2. Electroforesis de RNA en geles desnaturalizantes

Las muestras de RNA se corrieron en un gel desnaturalizante al 1%. Para preparar dicho gel se disolvió agarosa (SIGMA), buffer Mops/EDTA 10X pH 7.0 (Mops 0.5 M y EDTA 0.001 M), formaldehído al 37% y agua DEPC. El RNA fue adicionado con 2 μ L de buffer A (Mops/EDTA 10X pH 7.0 y agua DEPC), 2 μ L de formaldehído, 5 μ L de Formamida y 2 μ L de GLB (*gel loading buffer*). Se utilizó un marcador de corrida de RNA de 10 Kb (MILLENIUM) y la corrida se realizó a 80 V. Finalizada la corrida, la parte del gel que contenía el marcador de peso molecular se tiñó con bromuro de etidio (0.5 μ g/mL) durante 5 min y se fotografió junto con una regla con ayuda del equipo FLA-5000 de FUJIFILM, mientras que el resto del gel fue transferido a una membrana de nylon.

4.6.3. Transferencia de RNA a membranas Hybond

Los geles de agarosa con RNA fueron sometidos a transferencia por capilaridad, usando como buffer de transferencia SSC 10X (3.0 M de NaCl, 0.3 M de acetato de sodio a pH 7.0). Para esto se colocaron en el interior de un recipiente de vidrio dos cristales forrados con dos capas de papel Whatman como soporte y se adicionó solución de transferencia para humedecer el papel. Después se colocó el gel de manera invertida y sobre el gel una membrana de Hybond (Amersham) del mismo tamaño del gel, previamente hidratada con solución de transferencia, seguida de dos capas de papel Whatman del tamaño de la membrana, previamente hidratadas. Por encima de este conjunto se colocó una capa gruesa de papel absorbente, de aproximadamente 7 cm, y sobre ella se superpuso un cristal con un peso encima. Se adicionaron aproximadamente 500 mL de buffer de transferencia y se dejó toda la noche. Al día siguiente se reemplazó la capa de sanitas por una más delgada y se continuó con la transferencia por varias horas más. Posteriormente se desmontó el *blot*; antes de quitar la membrana, se marcó cada pozo. A continuación la membrana se enjuagó dos veces en 250 mL de SSC 2X por un minuto. La membrana se dejó secar durante 5 min, para finalmente fijar el DNA a la membrana en el horno de luz UV Stratalinker 1800 (Stratagene). La membrana se dejó secar y se envolvió con papel Whatman, para guardarse a temperatura ambiente.

4.6.4. Pre-hibridación e hibridación de membranas

Las membranas fueron pre-hibridadas por 2 horas a 42°C en 25 mL de solución de hibridación (formamida 50%, SSC 5X, SDS 2% y solución Denhardtts 4X –Ficoll 400 0.08%, PVP 0.08% y albúmina sérica bovina 0.08%-), adicionando 250 µL de DNA de esperma de salmón previamente desnaturalizado. A continuación las membranas fueron hibridadas con $\sim 2.5 \times 10^6$ cmp (cuentas por minuto) de DNA marcado con $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{-dCTP}$ (previamente desnaturalizado) en la misma solución de hibridación, durante 24 horas.

4.6.5. Lavado de membranas radioactivas

Posterior a la hibridación de las membranas, se realizó su lavado. El primer lavado se hizo en SSC 2X y SDS al 1% durante 5 min a temperatura ambiente. Luego se hicieron dos lavados, uno con SSC 2X y SDS al 1% y otro con SSC 0.5X y SDS al 1%, a 65 °C durante 15 min. Para finalizar se hicieron dos lavados más, uno con SSC 0.2X y SDS al 1% y otro con SSC 0.1X y SDS al 1%, a 65 °C durante 30 min. Terminados los lavados, las membranas se pusieron a secar sobre papel Whatman y se envolvieron en plástico. Para obtener la autorradiografía, las membranas se expusieron en una placa IP durante 18 horas, por último la placa fue escaneada con ayuda del aparato FUJIFILM FLA-5000. En el caso de las membranas empleadas en la determinación de la vida media del mRNA de Brf1, fue necesario eliminar la radiactividad adherida para poder llevar a cabo la re-hibridación de las membranas con la sonda de α -tubulina y 18S. Lo anterior se realizó haciendo dos lavados de 2 min con una solución hirviendo de SDS 0.1% y EDTA 10 mM.

4.7. Amplificación de DNA por medio de reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Para la amplificación de secuencias específicas de DNA, se efectuaron múltiples reacciones de PCR. Las reacciones se llevaron a cabo en tubos de PCR, donde se adicionó buffer KAPA Taq PCR con MgCl_2 2 mM (1X), mezcla de dNTPs (200 µM), oligonucleótidos sentido y antisentido (200 µM), el DNA molde (100 ng), y de 1 a 3 U de DNA polimerasa KAPA Taq (Promega) dependiendo del fragmento a amplificar, llevando con agua destilada a un volumen final de 50 µL. El perfil térmico empleado consistió en 30 ciclos, incluyendo la desnaturalización a 95°C

durante un minuto, la hibridación entre 50-60°C durante un minuto, la extensión a 72°C durante 1-3 min y un ciclo de extensión final a 72°C durante 7 min. Dichas reacciones se realizaron en el termociclador Corbett Research. En la Tabla 2 se muestran los oligonucleótidos que fueron empleados en las amplificaciones.

Tabla 2. Oligonucleótidos empleados en la amplificación de las regiones intergénicas 5' y 3' del gen Brf1 en *L. major*.

Oligonucleótido	Secuencia	Tamaño del amplificado	Región amplificada
Brf1-5'-for-XbaI	ATCTAGAACGGCACACATCTACTCGCG	545 pb	UTR-5' para ligar a <i>pac</i>
Brf1-5'-rev-EcoRI	AGAATTCGGTGAAGCGTCAACTGCTGG		
Brf1-5'-for-XbaI	ATCTAGAACGGCACACATCTACTCGCG	545 pb	UTR-5' para ligar a <i>hyg</i>
Brf1-5'-rev-SpeI	AACTAGTGGTGAAGCGTCAACTGCTGG		
Brf1-3'-for-SacI	AGAGCTCCGAATACGCTGCCAGAGTAG	518 pb	UTR-3' para ligar a <i>pac</i> o <i>hyg</i>
Brf1-3'-rev-XhoI	ACTCGAGAGCTTTCGTCTCTTAGGCC		

4.8. Ligación

Las secuencias de DNA amplificadas por PCR y purificadas fueron ligadas en pGEM-T Easy (Promega), un vector utilizado para la clonación directa de productos de PCR que posee dos genes de selección para bacterias transformadas (resistencia a ampicilina y el gen LacZ, que codifica para la enzima β -galactosidasa). El mapa del vector, incluyendo el *polylinker* o sitio de clonación múltiple, se muestra a continuación (Figura 13).

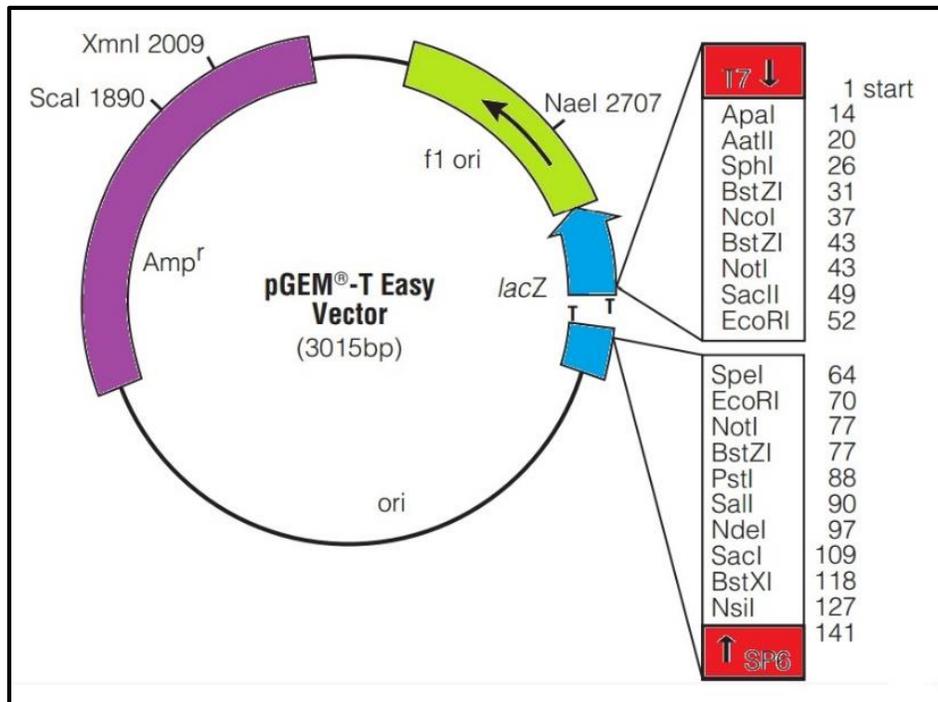


Figura 13. Mapa del vector pGEM-T Easy y sus puntos de referencia.

4.9. Transformación

Para la transformación fueron empleadas células competentes de *E. coli* JM109 ($1 > 10^7$ ufc/ μ g de DNA, Promega) que se encontraban a -70°C , de las cuales 200 μL fueron transferidos al fondo de un tubo cónico de 15 mL (Falcon) colocado previamente en hielo. Después se añadieron 5 μL del producto de ligación, mezclando suavemente e incubando en hielo durante 20 min. Posteriormente se efectuó un choque térmico durante 45 s en un baño de agua a 42°C , para posteriormente colocar el tubo en hielo nuevamente por 2 min. En seguida se adicionaron 800 μL de medio SOC (triptona 2%, extracto de levadura 0.5%, NaCl 1%, KCl 2.4 mM, MgCl_2 1% y glucosa 2%) y se incubó a 37°C con una agitación constante de 200 rpm durante 1.5 horas. Finalmente las células fueron centrifugadas durante 2 min a 7000 rpm, la pastilla resuspendida en 100 μL de medio SOC, para posteriormente ser esparcidas en cajas Petri con medio LB agar (Peptona de caseína 1%, extracto de levadura 0.5% y NaCl 0.5%) suplementado con ampicilina (0.01%), IPTG (100 mM) y X-Gal (50 mg/mL). Las células se dejaron crecer toda la noche a 37°C .

4.10. Purificación de plásmidos

Para la purificación de los plásmidos, fue necesaria la selección de colonias de *E. coli* blancas, es decir, resistentes a ampicilina y sin capacidad de digerir X-Gal. Dichas colonias fueron empleadas para inocular 5 mL de medio LB con ampicilina (100 µg/mL) en tubos de ensayo, los cuales fueron incubados a 37°C toda la noche, con agitación constante de 200 rpm. En la purificación fue empleado el kit NucleoSpin Plasmid (Macherey Nagel), siguiendo las indicaciones del fabricante. Los plásmidos a gran escala (maxipreps) fueron preparados con el kit QIAfilter™ Plasmid Maxi Kit de QIAGEN®, siguiendo las indicaciones del fabricante.

Los insertos de interés fueron liberados del vector pGEM-T Easy, esto mediante la reacción de digestión con diferentes enzimas, las cuales son endonucleasa que crean extremos cohesivos al reconocer y seccionar una secuencia específica.

4.11. Construcción de vectores para *knock-outs*

Las dos copias del gen Brf1 fueron reemplazadas por los genes de resistencia a puromicina (*pac*) e higromicina (*hyg*) por recombinación homóloga, siguiendo una estrategia previamente descrita (Martínez-Calvillo *et al.*, 2005). Para ello se generaron vectores en los que los genes de los marcadores de selección quedarían flanqueados por las regiones intergénicas 5' y 3' de Brf1. Dichas regiones intergénicas se generaron mediante la amplificación por PCR y la clonación en el vector pGEM-T de los fragmentos 5'-UTR y 3'-UTR de Brf1 y los genes *pac* e *hyg*. Los insertos fueron enviados a secuenciar para verificar su identidad. La secuenciación de los diferentes vectores se llevó a cabo en la Unidad de Biotecnología y Prototipos (UBIPRO) de la FES Iztacala. Las muestras se procesaron en el Secuenciador Automático 3100, Genetic Analyser de Applied Biosystems. Posteriormente la región UTR-5', el gen *pac* o *hyg* y la región UTR-3' fueron ligados y clonados en el vector pBluescript SK- (Figura 14). Los vectores resultantes fueron usados para transfectar promastigotes de *L. major*.

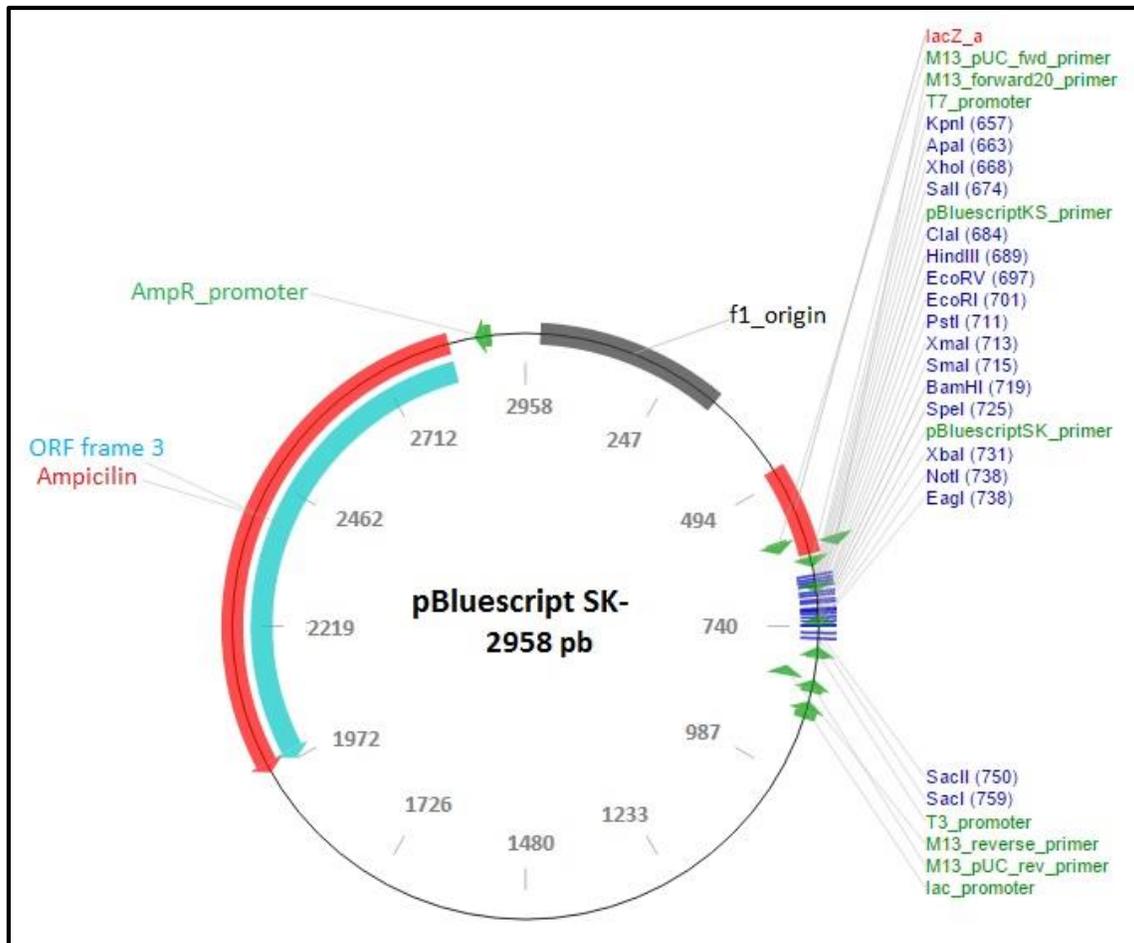


Figura 14. Mapa del vector pBluescript SK- y sus puntos de referencia.

4.12. Electroporación de promastigotes de *L. major*

Fueron empleados 1×10^8 promastigotes de *L. major* por electroporación. Los parásitos fueron centrifugados por 12 min a 4000 rpm a 4°C. La pastilla fue resuspendida en 10 mL de PBS-G. En seguida se centrifugó nuevamente y la pastilla fue resuspendida en 10 mL de buffer Cytomix (Hepes 25 mM, KCl 120 mM, CaCl₂ 0.15 mM, K₂HPO₄ 10 mM, EDTA 2 mM y NaCl 5 mM); las células fueron centrifugadas y resuspendidas en 400 µL del mismo buffer. Las células se transfirieron a una celdilla de electroporación con gap de 4 mm (BTX) previamente enfriada. Posteriormente se agregaron de 5 a 10 µg del DNA a transfectar en el caso del DNA lineal o 25 µg para el caso del DNA circular y se mezcló, manteniendo en hielo por 10 min. Con ayuda del electroporador BTX, se dio una carga eléctrica de 1600 V, 25 ohms y 50 µF, y las celdillas fueron colocadas inmediatamente en hielo durante 10 min, luego de los cuales fueron transferidas a tubos cónicos de 50 mL con 10 mL de medio sin fármaco; dejándolas crecer a

27°C con agitación suave. Durante los dos días posteriores a la transfección, se adicionó una dosis de 12.5 µM de puromicina (*knock-out* sencillo), o bien una dosis de 12.5 µM de puromicina, una dosis de 16 µg/mL de higromicina (*knock-out* doble) y una dosis de 25 µg/mL de G418 (células con una copia episomal del gen Brf1).

Los cultivos se mantuvieron bajo vigilancia hasta observar crecimiento celular a simple vista, para posteriormente ser transferidos a una caja de cultivo. Los cultivos fueron reseleccionados en medio con fármaco cada que fue necesario.

4.13. Obtención y caracterización de las clonas celulares

Las poblaciones de los cultivos transfectados fueron diluídas de manera que en 0.5 mL de medio se tuvieran 2000, 1000, 500 y 250 células. Dichas diluciones fueron transferidas de forma homogénea sobre la superficie de cajas Petri que contenían medio de cultivo semisólido (con suero fetal bovino al 20%, agarosa SeaPlaque GTG al 0.8 % y 25 mg/mL de puromicina). Las cajas fueron colocadas en la incubadora con CO₂ al 5% a 27°C.

En estas condiciones, los promastigotes crecen formando colonias sobre el medio de cultivo semisólido. Una vez crecidas las colonias, fueron seleccionadas 6 de ellas para crecerlas en 0.5 mL de medio con fármaco en una placa multipozo; reseleccionando cada que fue necesario. Una vez recuperados los cultivos, fueron transferidos a una caja de cultivo.

En primera instancia, fueron analizados la morfología y el crecimiento celular de las clonas *knock-out* sencillo de Brf1 mediante la realización de una curva de crecimiento, esto para tratar de encontrar alguna diferencia con respecto al cultivo silvestre. Para esto, se colocaron cultivos de 5 mL con una densidad de 5×10⁶ células por mL, los cuales fueron contados cada 24 horas durante 5 días.

Las clonas fueron también analizadas mediante PCR con el fin de corroborar que una de las dos copias de Brf1 hubiera sido sustituida por el gen *pac*. Posteriormente se realizaron *Southern-blots* para verificar que uno de las dos copias del gen Brf1 hubiese sido eliminado.

4.14. Experimento tipo *Southern-blot*

Se emplearon 20 U de las enzimas *BsmI*, *NotI*, *SalI* y *SpeI*, para digerir 5 µg del DNA genómico de *L. major*, en un volumen final de 20 µL. Las muestras se incubaron a 37°C toda la noche, esto considerando las indicaciones recomendadas por NE-Biolabs.

El DNA digerido fue fraccionado por electroforesis en un gel de agarosa al 0.8%, corrido a 80V por 5 horas, hasta que el primer colorante recorrió tres cuartas partes del gel. Una vez terminada la corrida, se hizo una muesca al gel en la parte superior izquierda, quedando el marcador en el primer carril. El gel fue fotografiado y posteriormente fue enjuagado dos veces con 150 mL de H₂O desionizada durante 1 min, agitando suavemente. A continuación el gel fue colocado en solución despurinizante (4.4 mL de HCl y 395.6 mL de agua desionizada) durante 10 min en agitación suave y posteriormente se enjuagó 3 veces con 150 mL de agua desionizada. Después se transfirió el gel a una solución desnaturadora (35.06 g de NaCl, 8 g de NaOH y agua desionizada a un volumen final de 400 mL) durante 50 min en agitación suave. Al finalizar, se enjuagó 2 veces con 150 mL de agua desionizada. Posteriormente el gel fue sumergido en solución neutralizante (35.6 g de NaCl, 26.64 g de Tris Base, agua desionizada a un volumen final de 400 mL; pH 7.0) durante 30 min en agitación suave. Finalmente el gel quedó listo para ser transferido a la membrana de nylon como se indicó anteriormente en la sección de *northern-blot*. La pre-hibridación, hibridación y lavado de membranas se hizo como se señala en la sección de *northern-blot*.

4.15. Experimento tipo *western-blot*

La técnica seguida fue una electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato sódico (SDS-PAGE, por sus siglas en inglés); la cual consta de un sistema discontinuo, en el que se empleó un gel separador de poliacrilamida (Promega) al 10% con Tris-HCl 1.9 M, SDS 0.5%, TEMED 0.25% y glicerol 25%; y un gel concentrador de poliacrilamida al 3.9% con Tris-ácido fosfórico 160.6 mM pH 6.8, SDS 0.12%, azul de bromofenol 0.55% y TEMED 0.06%. Se prepararon muestras con diferente número de células: 5, 10 y 20×10⁶, las cuales fueron centrifugas a 5000 rpm a 4°C, las pastillas fueron lavadas con PBS y finalmente resuspendidas en 20 µL de PBS + buffer Laemmli 1X (Tris-HCl 83 mM pH 6.8; SDS 118 mM; azul de bromofenol 99.5 µM; glicerol 33.3%). Además de las muestras, se cargó marcador de peso molecular (Broad Range Protein Molecular Weight Markers, Promega). Para realizar el fraccionamiento de la muestra se empleó buffer de

corrida 1X (Tris base 24.76 mM; glicina 191.82 mM; SDS 3.54 mM); el voltaje empleado fue de 80 V con 15 mAmp constantes por 2 h.

La transferencia de las proteínas fraccionadas mediante SDS-PAGE a la membrana de PVDF se realizó empleando buffer de transferencia 5X (Tris base 25 mM; glicina 191.8 mM; metanol 20%) con pH 8.3. Las condiciones para la transferencia fueron 90 V y 500 mAmp, durante 2 h. La membrana fue bloqueada previamente con 50 mL de una solución de leche descremada al 0.5% y PBS Tween 0.1%, durante toda la noche a 4°C. Posteriormente se realizó una dilución del anticuerpo 1:300 en una solución de leche descremada al 0.1% y PBS Tween 0.1% con la cual se incubó la membrana. El anticuerpo empleado fue PAP (Sigma-Aldrich), el cual reconoce el epítipo de ProtA del PTP tag. Finalmente, se empleó el sistema ECL™ Western Blotting Detection Reagents (GE Healthcare, Amersham) para el revelado (Martínez-Calvillo *et al.*, 2007).

La metodología antes descrita se resume en el Apéndice I.

5. Resultados

El análisis de la secuencia de Brf1 en las bases de datos NCBI y GeneDB, mostró que en *L. major* el gen Brf1, cuyo nombre oficial es LmjF.25.0440, se ubica entre los nucleótidos 140947 y 143058 del cromosoma 25 del parásito. El gen tiene un tamaño de 2112 pb y codifica para una proteína predicha de 77.3 kDa.

5.1. Determinación del tamaño del transcrito de Brf1

Se realizó un experimento tipo *northern-blot* para determinar el tamaño del transcrito de Brf1 en *L. major*. Para este ensayo, se extrajo el RNA total de cultivos de promastigotes en fase media logarítmica, el cual se corrió en un gel de agarosa-formaldehído, que posteriormente por capilaridad fue transferido a una membrana de nylon. La membrana fue hibridada con una sonda radioactiva (marcada con P^{32}) que corresponde a la región UTR-5' del gen Brf1 (Figura 15), obtenida mediante digestión del vector pG-Brf1-5'-pac con *EcoRI* (la generación de este vector se describe más adelante). La membrana fue lavada y expuesta en placa de rayos X para obtener la autorradiografía (Figura 16). El transcrito observado tuvo un tamaño de ~2.85 Kb, el cual se encuentra dentro de lo esperado, considerando que el gen tiene un tamaño de ~2.1 Kb.

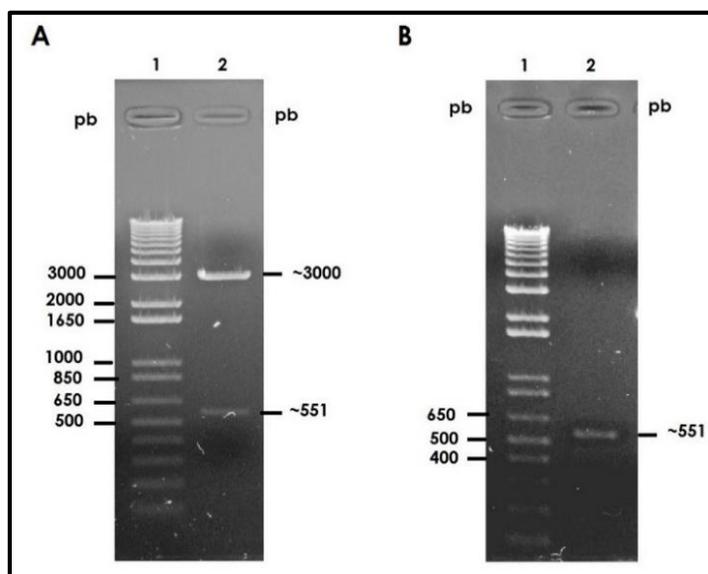


Figura 15. A Digestión del vector pG-Brf1-5'-pac con *EcoRI*. **C** Inserto UTR-5' purificado de pGEM-T Easy. En el carril 1 de los dos paneles se presenta el marcador de peso molecular (escala de 1 kb de Invitrogen). Pb: pares de bases.

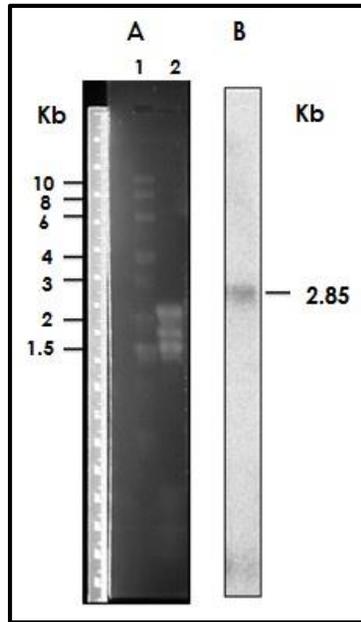


Figura 16. Análisis del mRNA de Brf1 mediante *northern-blot*. A) Electroforesis del marcador de peso molecular de RNA (1) y RNA total de *L. major* (2). B) Autorradiografía del transcrito de Brf1 de *L. major*. La sonda radioactiva correspondió a la región UTR-5' del gen Brf1.

5.2. Análisis de la vida media del transcrito de Brf1

Se determinó la vida media del mRNA de Brf1 en células en fase media logarítmica y células en fase estacionaria, para lo cual se realizaron ensayos tipo *northern-blot*, usando actinomicina D como inhibidor de la transcripción. El ensayo consistió en la extracción del RNA total a partir de cultivos en los que se bloqueó la transcripción por diferentes tiempos: 1, 2, 4, 8 y 16 horas. El RNA total fue corrido en un gel de agarosa y posteriormente fue transferido a una membrana de nylon para hibridar con la región UTR-5' de Brf1 marcada radioactivamente con ^{32}P , lo que permitió determinar la abundancia y vida media del mRNA de Brf1. Como control se empleó una muestra de RNA extraída de un cultivo crecido por 8 horas en presencia de DMSO, compuesto en el cual se preparó la actinomicina D. En la Figura 17 se observa la autorradiografía obtenida para la fase media logarítmica (A) y la fase estacionaria (B).

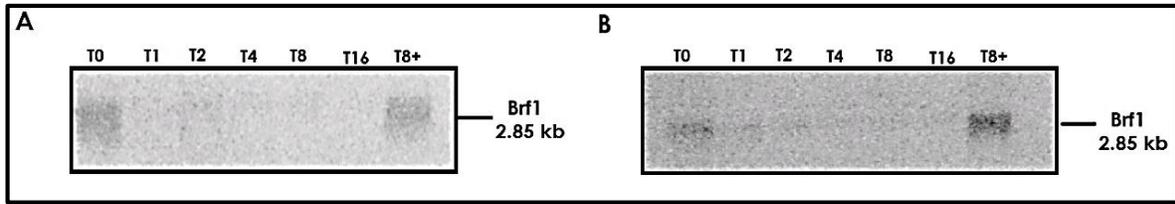


Figura 17. Cinética de decaimiento del mRNA de Brf1 en fase media logarítmica (A) y en fase estacionaria (B). Se analizó mediante *northern-blot* RNA total aislado de cultivos crecidos a distintos tiempos con actinomicina D: 0, 1, 2, 4, 8 y 16 horas (T0, T1, T2, T4, T8 y T16, respectivamente). El carril T8+ contiene RNA extraído después de incubar un cultivo por 8 horas con DMSO, compuesto en el que se preparó la actinomicina D. La sonda radioactiva correspondió a la región UTR-5' del gen Brf1.

Para la determinación de la vida media de los transcritos de Brf1 de *L. major*, se realizó una densitometría empleando el programa Multi Gauge V 6.0. La señal obtenida en el tiempo cero (T0) fue considerada como el 100 %, comparando dicha señal con la obtenida a los distintos tiempos después de la adición de la actinomicina D. Los datos fueron graficados para determinar el tiempo en el que la abundancia del transcrito se redujo a la mitad. La vida media de Brf1 se determinó en ~55 min para la fase media logarítmica y ~60 min para la fase estacionaria (Figura 18).

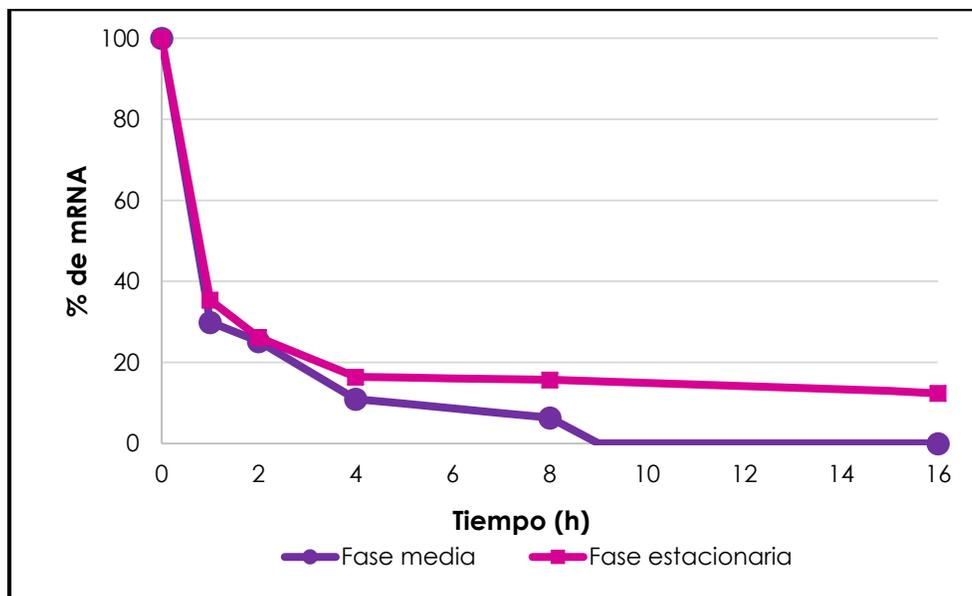


Figura 18. Representación gráfica de la cinética de decaimiento del mRNA de Brf1 de *L. major*. Las bandas obtenidas en el *northern-blot* de la figura 17 fueron sometidas a una densitometría. La señal obtenida en el tiempo cero (T0) fue considerada como el 100%. La línea azul representa la fase media logarítmica y la verde la fase estacionaria.

Para poder comparar la vida media de los transcritos de Brf1, una de las membranas fue lavada y re-hibridada con un fragmento del gen α -tubulina, obtenido previamente en el laboratorio, marcado radioactivamente (Figura 19). La cuantificación de las señales obtenidas permitió determinar que la vida media del transcrito de α -tubulina en fase media logarítmica es de ~7 horas (Figura 20).

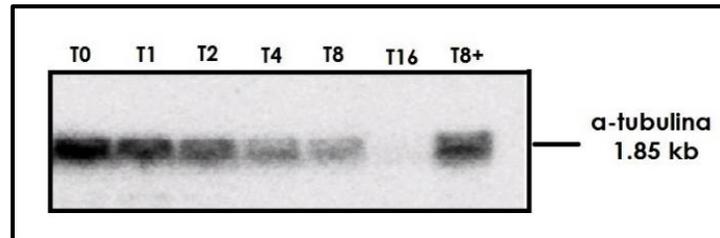


Figura 19. Cinética de decaimiento del mRNA de α -tubulina en fase media logarítmica. Se analizó mediante *northern-blot* RNA total aislado de cultivos crecidos a distintos tiempos con actinomicina D: 0, 1, 2, 4, 8 y 16 horas (T0, T1, T2, T4, T8 y T16, respectivamente). El carril T8+ contiene RNA extraído después de incubar un cultivo por 8 horas con DMSO, compuesto en el que se preparó la actinomicina D.

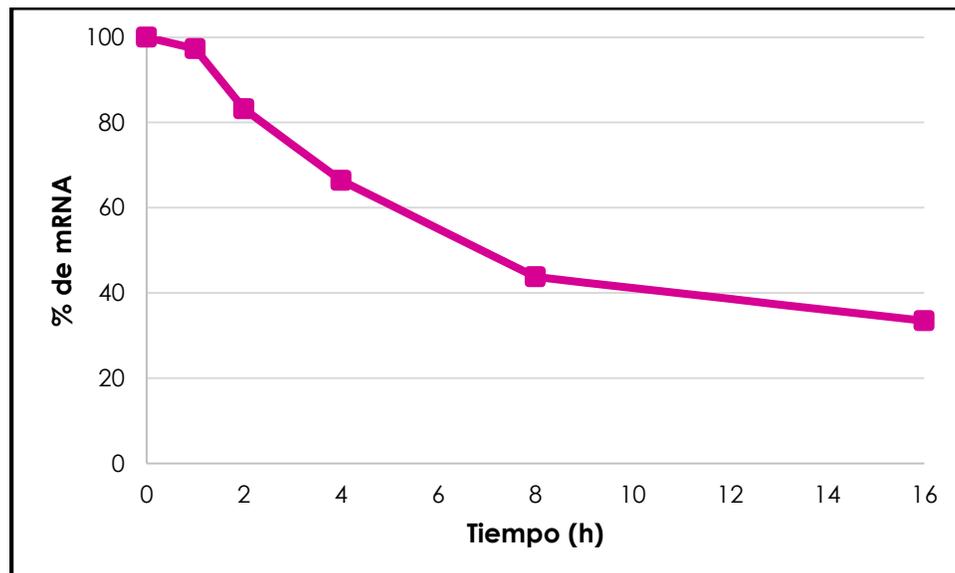


Figura 20. Representación gráfica de la cinética de decaimiento del mRNA de α -tubulina de *L. major* en fase media logarítmica. Las bandas obtenidas en el *northern-blot* de la figura 19 fueron sometidas a una densitometría. La señal obtenida en el tiempo cero (T0) fue considerada como el 100%.

Como control de carga las membranas fueron re-hibridadas con el gen del rRNA 18S marcado radiactivamente con ^{32}P . Como puede observarse en la Figura 21, la señal obtenida en todos los carriles fue muy similar, lo cual indica que se cargaron cantidades similares de RNA en todos los carriles.

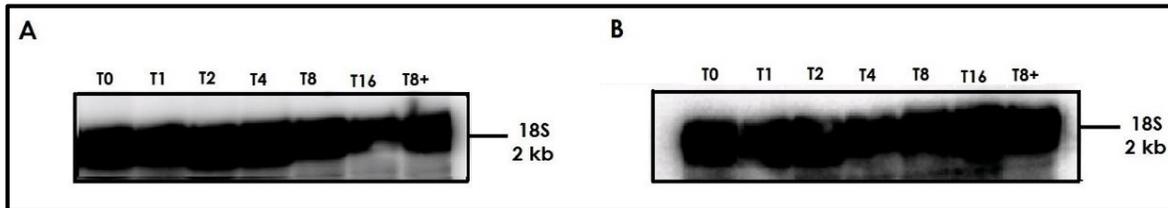


Figura 21. Ensayo *northern-blot* con el rRNA 18S. Las membranas empleadas para el experimento mostrado en la figura 2 fueron lavadas y re-hibridadas con un fragmento del gen del rRNA 18S marcado radioactivamente, para emplear como control de carga. A) Fase media logarítmica. B) Fase estacionaria.

5.3. Obtención de cultivos *knock-out* de Brf1

Con el objeto de estudiar la función de Brf1 en *L. major*, se procedió a generar cultivos en los que una copia de Brf1 (*knock-out* sencillo) o las dos copias de Brf1 (*knock-out* doble) fueran reemplazadas por los genes de resistencia a puromicina (*pac*) e higromicina (*hyg*). Para ello fue necesario amplificar las regiones UTR-5' y UTR-3' del gen Brf1 para clonaras primero en el vector pGEM-T Easy y después en los vectores *knock-out*, en los que estarían flanqueando a los genes de resistencia a los fármacos.

5.3.1. Clonación de las regiones UTR-5' y UTR-3' del gen Brf1

Para el vector *knock-out* con el gen *pac* se requeriría la región UTR-5' de Brf1 con extremos *Xba*I y *Eco*RI (UTR-5'-*Pac*) y la región UTR-3' con extremos *Sac*I y *Xho*I. Para el vector *knock-out* con *hyg* se necesitaría la misma región UTR-3' de Brf1 (con extremos *Sac*I y *Xho*I), pero una región UTR-5' de Brf1 con extremos *Xba*I y *Spe*I (UTR-5'-*Hyg*). Estas a regiones UTR-5' y UTR-3' del gen Brf1 de *L. major* fueron inicialmente clonadas en el vector pGEM-T Easy. Para esto, fueron amplificadas por PCR con los oligonucleótidos Brf1-5'-for-*Xba*I y Brf1-5'-rev-*Eco*RI (UTR-5'-*Pac*), Brf1-5'-for-*Xba*I y Brf1-5'-rev-*Spe*I (UTR-5'-*Hyg*), y Brf1-3'-for-*Sac*I y Brf1-3'-rev-*Xho*I (UTR-3') a partir de DNA genómico de *L. major*. Los productos de PCR tuvieron el tamaño esperado de 545 pb para las regiones UTR-5' y 518 pb para la región UTR-3' (Figura 22A), por lo que los tres fragmentos fueron ligados

por separado en el vector pGEM-T Easy. Las mezclas de ligación fueron empleadas para transformar células competentes JM109 de *E. coli*, para posteriormente aislar el plásmido de varias colonias por el método de miniprep (Figura 22B). Dichos plásmidos fueron digeridos con las enzimas *Xba*I y *Eco*RI (UTR-5'-Pac), *Xba*I y *Spe*I (UTR-5'-Hyg) y *Sac*I y *Xho*I (UTR-3') para separar el inserto del vector de clonación (Figura 23A). Se seleccionaron dos clones de cada construcción que presentaron el inserto con el tamaño esperado, las cuales fueron mandadas a secuenciar para verificar la identidad de las regiones con los oligos T7 y Sp6. El análisis de las secuencias obtenidas no mostró cambios en las mismas al comparar con la secuencia genómica. De esta forma fueron obtenidos los vectores pG-Brf1-5'-pac, pG-Brf1-5'-hyg y pG-Brf1-3' (Figura 24) (Apéndices II, III y IV). A partir de estos dos vectores se purificaron los insertos UTR-5' y UTR-3' (Figura 23B).

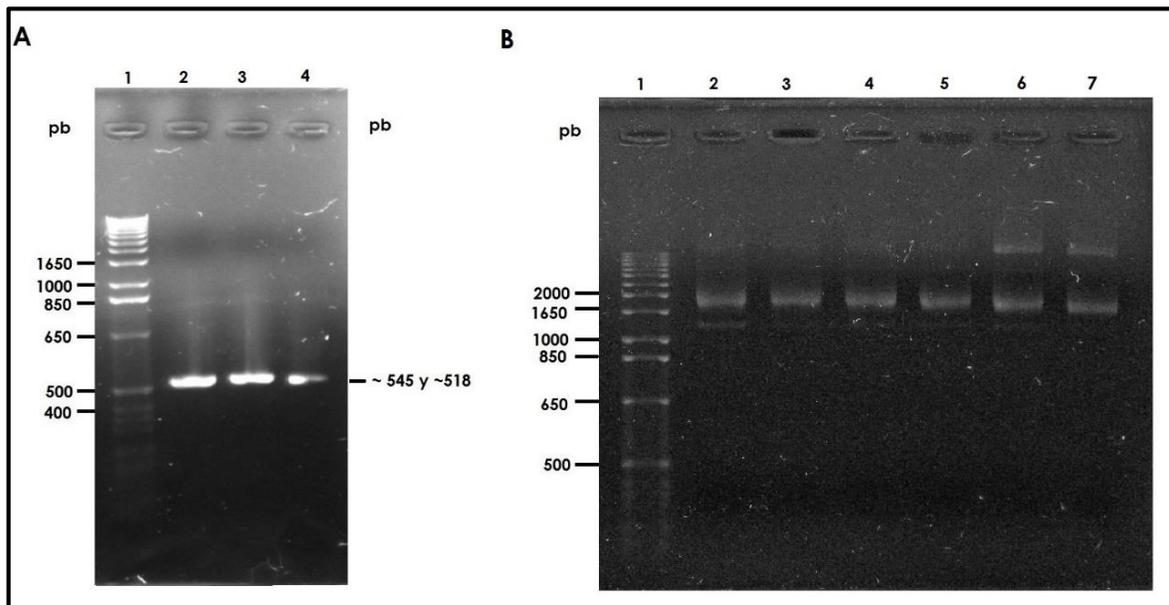


Figura 22. Clonación de las regiones UTR-5' y UTR-3' de Brf1 en el vector pGEM-T Easy. El pánel A muestra la amplificación por PCR de la región UTR-5' del gen Brf1 para el vector pac (carril 2), la región UTR-5' del gen Brf1 para el vector Hyg (3), y la región UTR-3' (4). El pánel B muestra DNA de plásmido obtenido por miniprep del vector pG-Brf1-5'-pac (carriles 2 y 3), DNA de plásmido obtenido por miniprep del vector pG-Brf1-5'-hyg (4 y 5), y DNA de plásmido obtenido por miniprep del vector pG-Brf1-3' (6 y 7). Los carriles 1 de ambos pánels muestran el marcador de peso molecular (escalera de 1 kb de Invitrogen). Geles de agarosa al 1%. Pb: pares de bases.

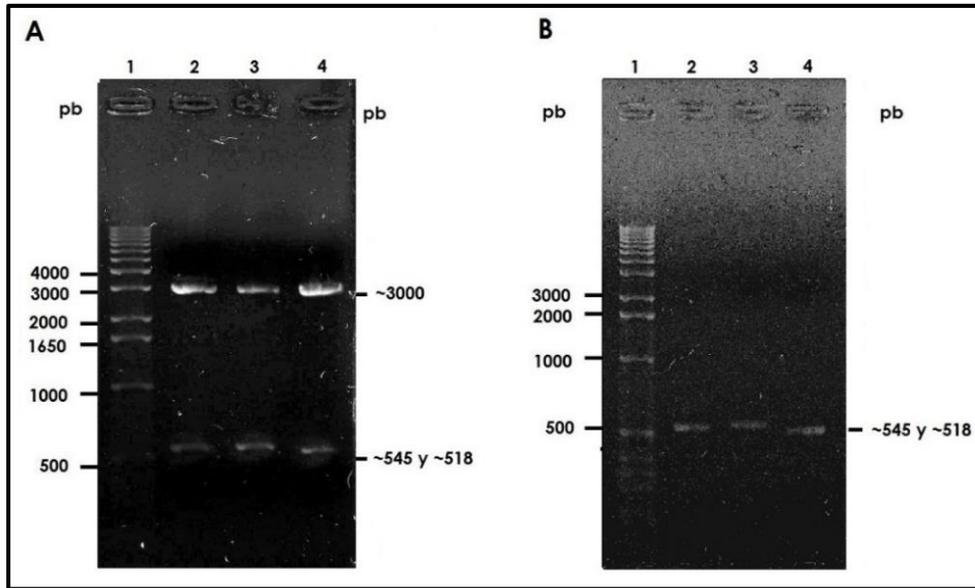


Figura 23. A) Digestión de vectores. pG-Brf1-5'-pac digerido con las enzimas *Xba*I y *Eco*RI (2), pG-Brf1-5'-hyg digerido con las enzimas *Xba*I y *Spe*I (3) pG-Brf1-3' digerido con las enzimas *Sac*I y *Xho*I (4). **B) Purificación de insertos.** UTR-5' purificado de pG-Brf1-5'-pac (2), UTR-5' purificado de pG-Brf1-5'-hyg (3), UTR-3' purificado de pG-Brf1-3' (3). El marcador de peso molecular (escalera de 1kb de Invitrogen) se muestra en los carriles 1 de ambos paneles. Geles de agarosa al 1%. Pb: pares de bases.

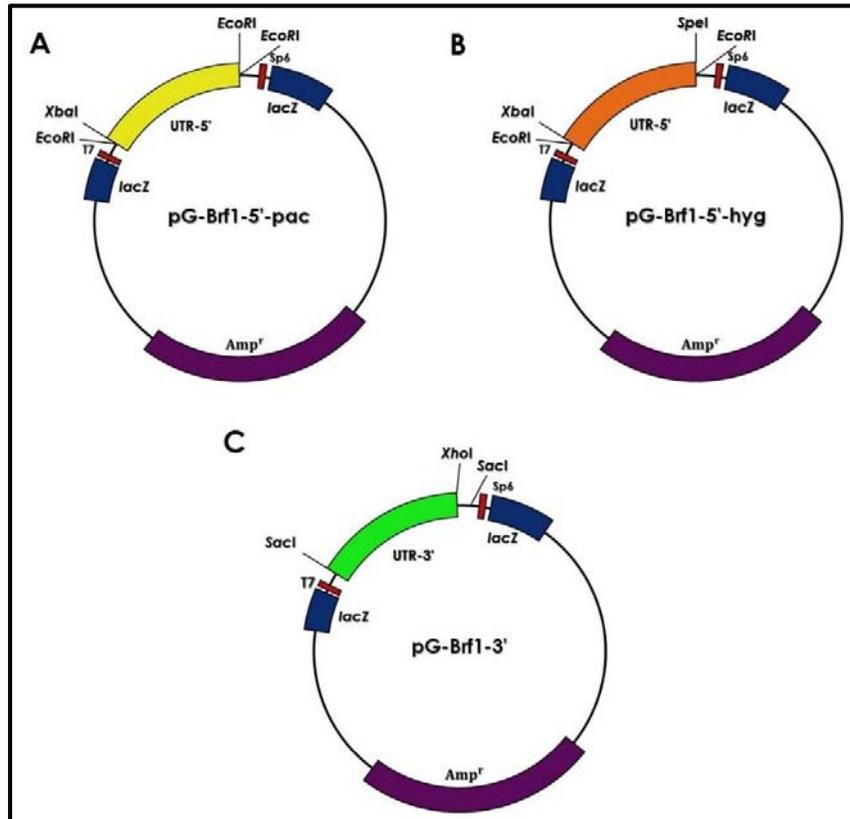


Figura 24. Mapas de los vectores pG-Brf1-5'-pac (A), pG-Brf1-5'-hyg (B) y pG-Brf1-3' (C). La secuencia completa de los vectores se muestra en los Apéndices II, III y IV.

5.3.2. Obtención de los vectores *knock-out*

Los genes de puromicina (~1.7 kb) e higromicina (~1.8 kb) fueron obtenidos a partir de los vectores p Δ 71-pac y p Δ 71-hyg respectivamente (Figura 25A), generados previamente en el laboratorio (Martínez-Calvillo *et al.*, 2005). Asimismo el vector de clonación, pBluescript SK- (~3 kb), fue digerido con las enzimas *Xba*I y *Xho*I y posteriormente purificado de un gel de agarosa (Figura 25B). Una vez que se contó con todos los insertos requeridos se procedió a hacer las mezclas de ligación para obtener los vectores *knock-out*. Para el caso del vector con puromicina (p Δ Brf1-Pac) se ligaron los siguientes fragmentos en pBluescript SK-: UTR-5'-Pac, UTR-3' y el gen puromicina. Para el vector con higromicina (p Δ Brf1-Hyg) se ligaron los siguientes fragmentos en el vector pBluescript SK-: UTR-5'-Hyg, UTR-3' y el gen higromicina. Con estas ligaciones fueron transformadas células competentes JM109 de *E. coli*, para posteriormente aislar el plásmido de varias colonias por el método de miniprep.

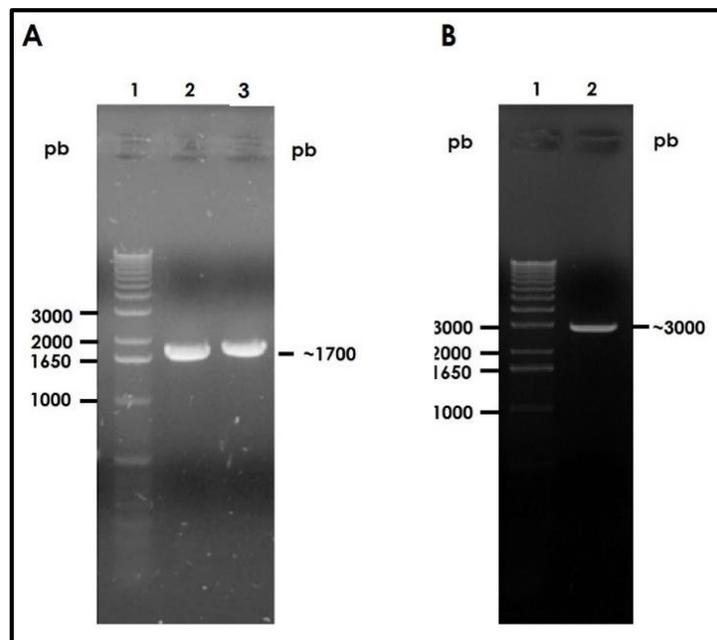


Figura 25. A) Purificación de los genes de resistencia a fármacos. El gen *pac* (carril 2) fue obtenido del vector p Δ 71-pac, mientras que el gen *hyg* (3) fue obtenido del vector p Δ 71-hyg. **B) Obtención del vector pBluescript.** El plásmido pBluescript SK- fue digerido con las enzimas *Xho*I y *Xba*I y purificado (carril 2). El marcador de peso molecular (escalera de 1kb de Invitrogen) se muestra en los carriles 1 de ambos paneles. Geles de agarosa al 1%. Pb: pares de bases.

Se realizó un análisis de restricción con diferentes enzimas para determinar que el plásmido contenido en varias de las colonias obtenidas tuviera el patrón esperado, correspondiente a la ligación correcta de los tres fragmentos en el vector. En el

caso del vector p Δ Brf1-Pac se realizaron digestiones dobles (Figura 26) con las enzimas *Xba*I y *Eco*RI (esperándose fragmentos de 545 y 5176 pb) (carriles 4 y 5), *Eco*RI y *Sac*I (1700, 530 y 3471 pb) (carriles 6 y 7) y *Sac*I y *Xho*I (518, 2273 y 2936 pb) (carriles 8 y 9). En todos los casos se observaron las bandas esperadas. Por otro lado, con el vector p Δ Brf1-Hyg se realizaron digestiones simples (Figura 27) con las enzimas *Xba*I (5821 pb) (carril 2), *Xho*I (5821 pb) (carril 3), *Xmn*I (4721 y 1100 pb) (carril 4) y una triple digestión con las enzimas *Xba*I, *Xho*I y *Xmn*I (3058, 1663 y 1100 pb) (carril 5). De igual forma, en todas las digestiones se observaron las bandas esperadas.

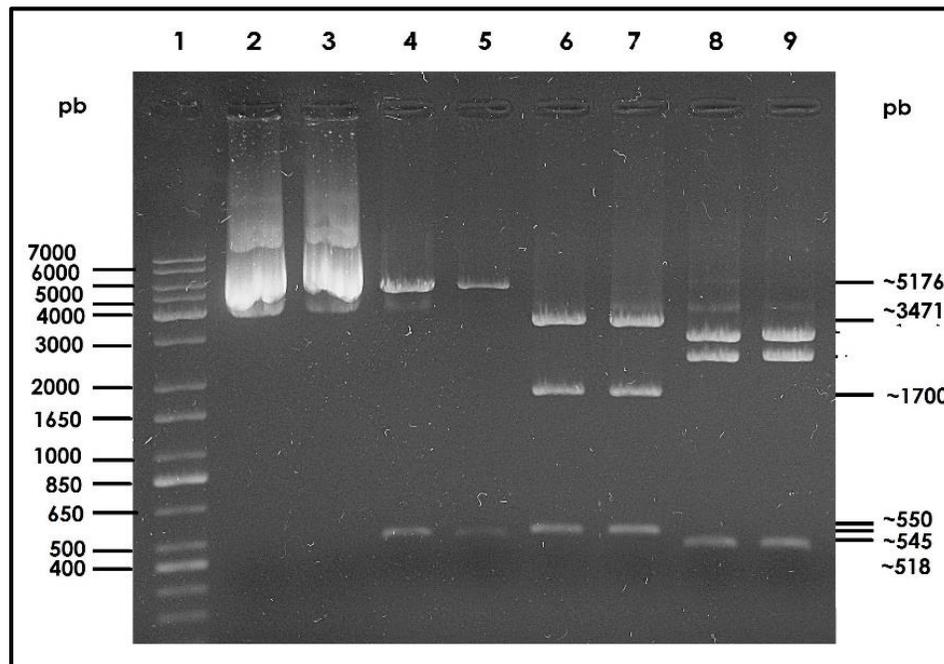


Figura 26. Análisis de restricción del vector p Δ Brf1-Pac. 1) Marcador de peso molecular (escalera de 1 kb de Invitrogen). 2 y 3) Vector sin digerir. 4 y 5) Digestión con las enzimas *Xba*I y *Eco*RI (545 y 5176 pb). 6 y 7) Digestión con las enzimas *Eco*RI y *Sac*I (1700, 530 y 3471 pb). 8 y 9) Digestión con las enzimas *Sac*I y *Xho*I (518, 2273 y 2936 pb). Pb: pares de bases.

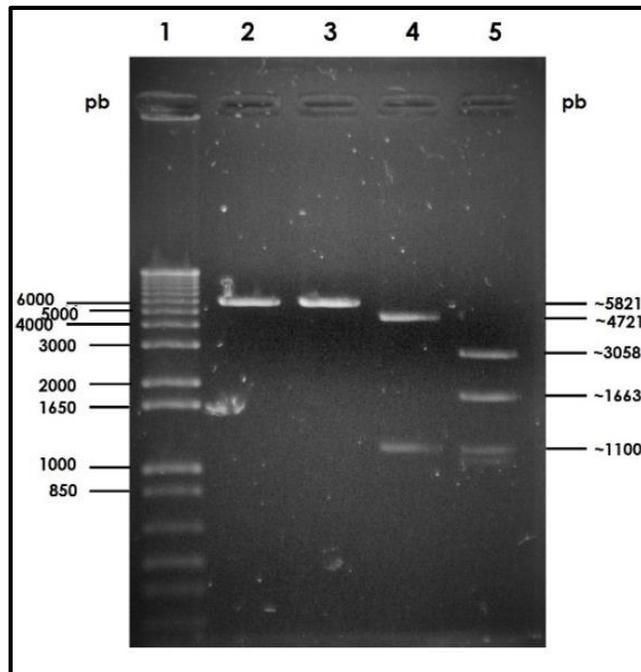


Figura 27. Análisis de restricción del vector pΔBrf1-Hyg. 1) Marcador de peso molecular (escala de 1 kb de Invitrogen). 2) Digestión con la enzima *XbaI* (5821 pb). 3) Digestión con la enzima *XhoI* (5821 pb). 4) Digestión con la enzima *XmnI* (4721 y 1100 pb). 5) Digestión con las enzimas *XbaI*, *XhoI* y *XmnI* (3058, 1663 y 1100pb). Pb: pares de bases.

Los plásmidos fueron enviados a secuenciar con los oligonucleótidos T3 y T7, confirmándose que el orden y la orientación de los insertos eran correctos, obteniendo así los vectores pΔBrf1-Pac y pΔBrf1-Hyg (Figura 28) (Apéndices V y VI). Posteriormente se procedió a preparar los dos vectores por maxiprep y a confirmar el patrón de restricción, digiriendo pΔBrf1-Pac con *XbaI*, *XhoI* y *SacI* (Figura 29), y pΔBrf1-Hyg con *XbaI*, *XhoI* y *XmnI* (Figura 30). En Ambas digestiones se observó el patrón esperado de tres bandas, siendo la banda más grande (de 2.7 ó 3 kb) la que contiene el gen de resistencia flanqueado por las regiones UTR-5' y 3' de Brf1, y que a partir de este punto denominaremos *cassette* de *pac* o *cassette* de *hyg*.

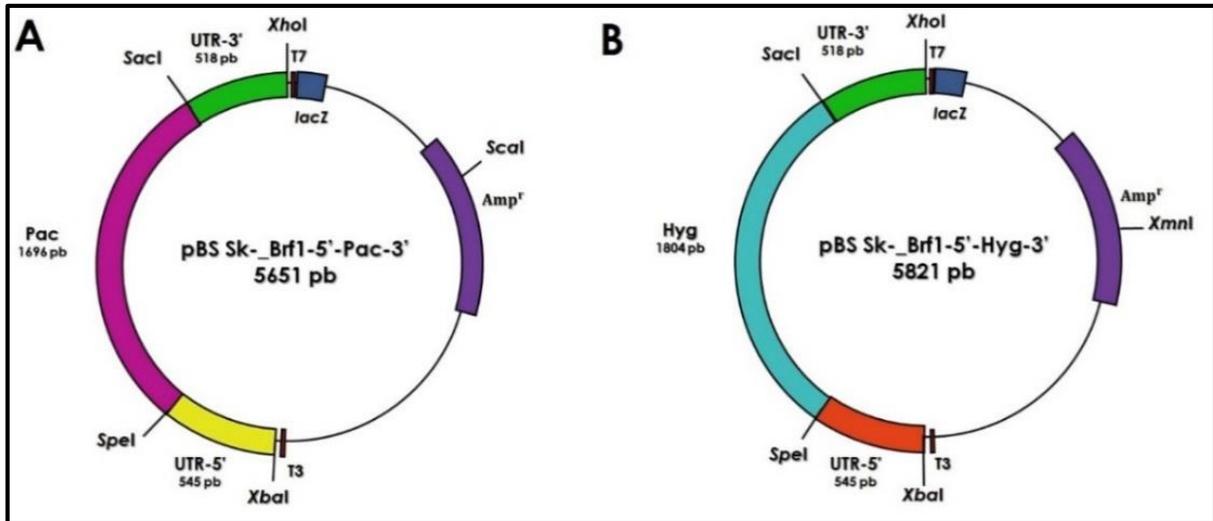


Figura 28. Mapa de los vectores pΔBrf1-Pac (A) y pΔBrf1-Hyg (B). La secuencia completa de los vectores se muestra en los apéndices V y VI. v

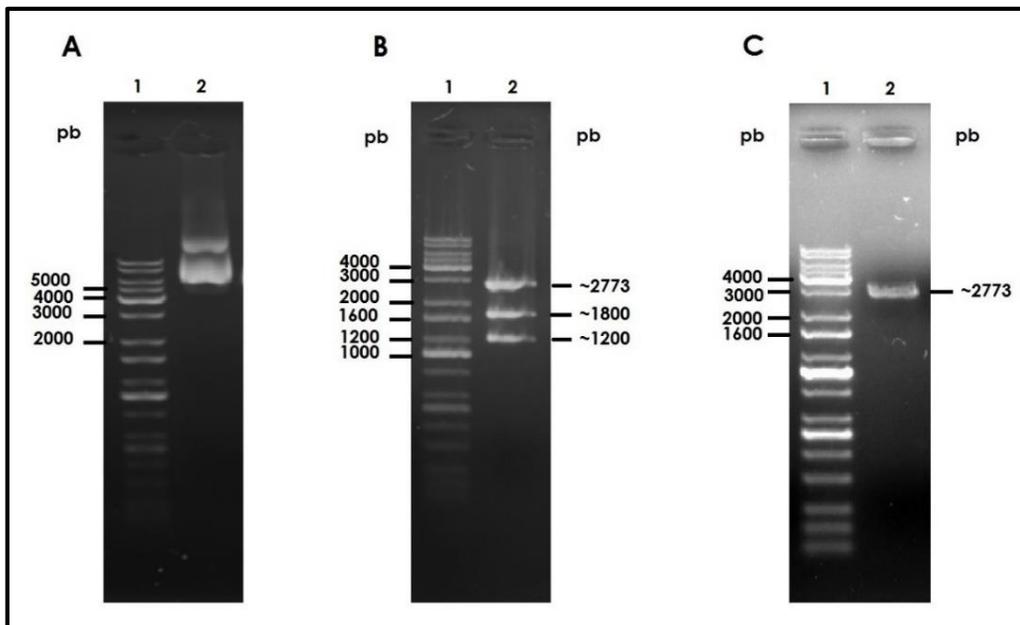


Figura 29. A) Extracción de DNA por maxiprep del vector pΔBrf1-Pac (carril 2). B) Digestión del vector pΔBrf1-Pac con las enzimas *XbaI*, *XhoI* y *SacI* para liberar el inserto completo del vector de clonación. C) Purificación del *cassette* de *pac*. El inserto de 2.7 kb fue purificado (carril 2) El marcador de peso molecular (escala de 1kb de KAPA) se muestra en los carriles 1 de los tres paneles. Geles de agarosa al 1%. Pb: pares de bases.

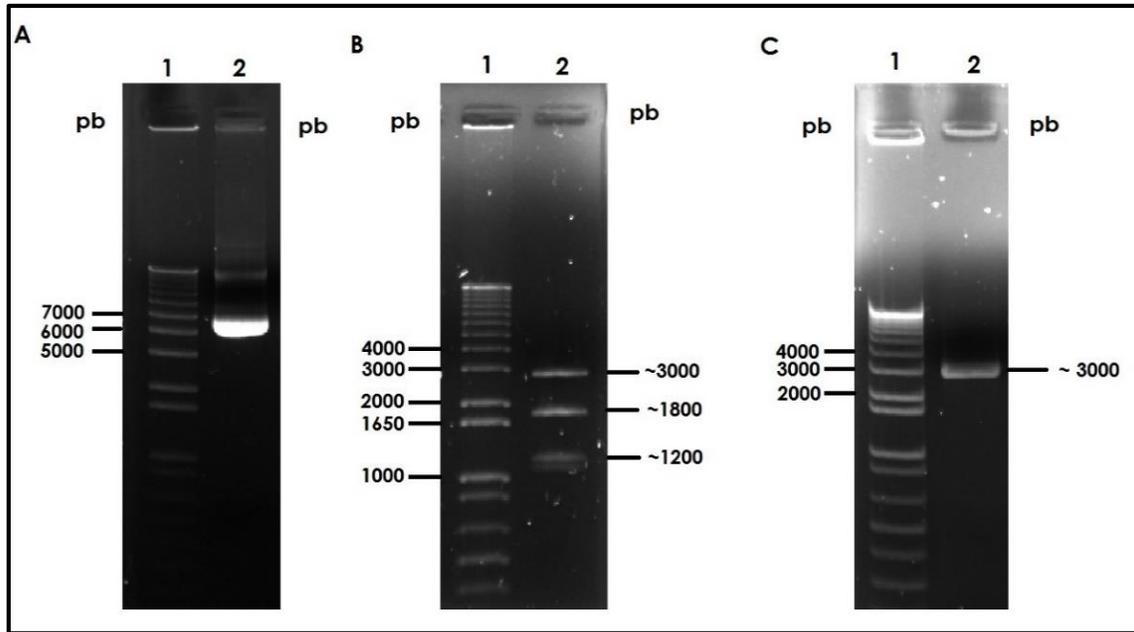


Figura 30. A) Extracción de DNA por maxiprep del vector p Δ Brf1-Hyg (carril 2). B) Digestión del vector p Δ Brf1-Hyg con las enzimas *Xba*I, *Xho*I y *Xmn*I para liberar el inserto completo del vector de clonación. C) Purificación del *cassette* de *hyg*. El inserto de 3 kb fue purificado (carril 2) El marcador de peso molecular (escalera de 1kb de KAPA) se muestra en los carriles 1 de los tres paneles. Geles de agarosa al 1%. Pb: pares de bases.

5.3.3. Obtención y caracterización de cultivos *knock-out* sencillo de Brf1

Para obtener el *knock-out* sencillo de Brf1, p Δ Brf1-Pac fue digerido con *Xba*I, *Xho*I y *Scal*I, y el *cassette* de *pac* fue purificado (Figura 29C). Aproximadamente 10 μ M de dicho *cassette* fueron empleados para transfectar promastigotes de *L. major*, los cuales fueron seleccionados en presencia de puromicina.

Alrededor de dos semanas después de la electroporación se obtuvo una población transfectada establemente, la cual se mantuvo con una concentración de 45 μ M de puromicina. A partir de dicha población se obtuvieron seis clonas celulares mediante plaqueo en cajas con medio de cultivo. Tanto la población como las clonas fueron analizadas mediante PCR con el fin de corroborar que una de las dos copias de Brf1 hubiese sido sustituida por el gen *pac*. En la Figura 31 se muestra una representación esquemática de los amplificadores esperados con los oligonucleótidos Brf1-5'-for-*Xba*I y Brf1-3'-rev-*Xho*I: una banda de ~3.1 kb para la copia endógena del gen Brf1, y una banda de ~2.3 kb para el *locus* en el que se substituyó el gen Brf1 por el gen de resistencia a puromicina. Como molde se utilizó DNA genómico purificado de cada uno de los cultivos (Figura 32) y como

control se usó DNA genómico de células silvestres y DNA del plásmido p Δ Brf1-Pac.

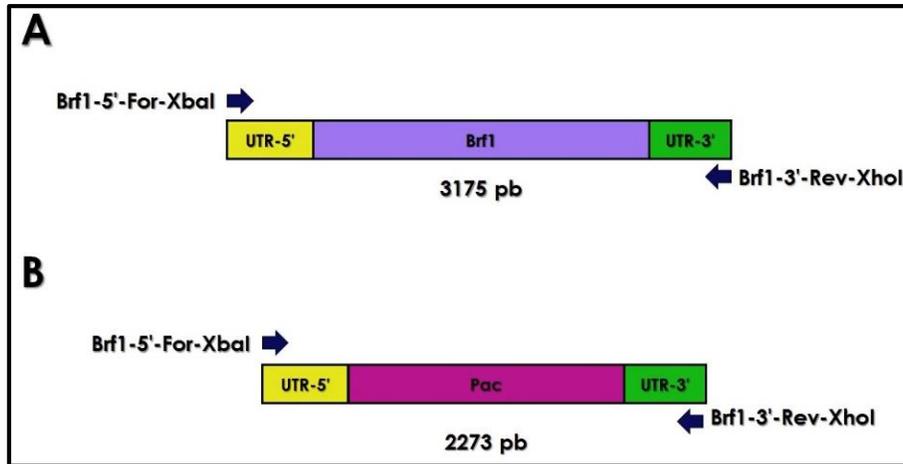


Figura 31. Representación esquemática del gen Brf1 endógeno (A) y de la sustitución del gen Brf1 por el gen *pac* (B). Se muestran los oligonucleótidos empleados para las reacciones amplificación por PCR y el tamaño esperado de los productos. Pb: pares de bases.

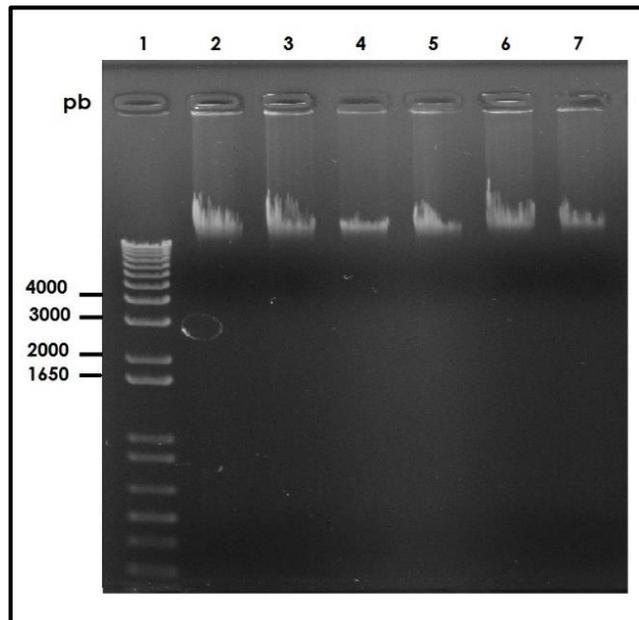


Figura 32. Extracción de DNA genómico de los cultivos *knock-out* sencillo de Brf1. 1) Marcador de peso molecular (escala de 1kb de Invitrogen). 2-7) Clonas 1-6. Gel de agarosa al 1%. Pb: pares de bases.

El análisis en gel de agarosa de los productos de PCR (Figura 33A), mostró la banda esperada de ~3.1 kb con el DNA genómico de células silvestres (carril 2), así como la banda esperada de ~2.7 kb con el DNA de plásmido (carril 3). Con el DNA genómico de la población *knock-out* se apreciaron los dos amplificados, con los tamaños antes mencionados (carril 4). Asimismo, estas dos bandas fueron observadas usando DNA genómico de las 6 clonas celulares del *knock-out* sencillo (Figura 33B, carriles 4-9). Lo anterior indicó que, como se esperaba, en los cultivos *knock-out* una copia alélica de Brf1 fue sustituida por el gen *pac*.

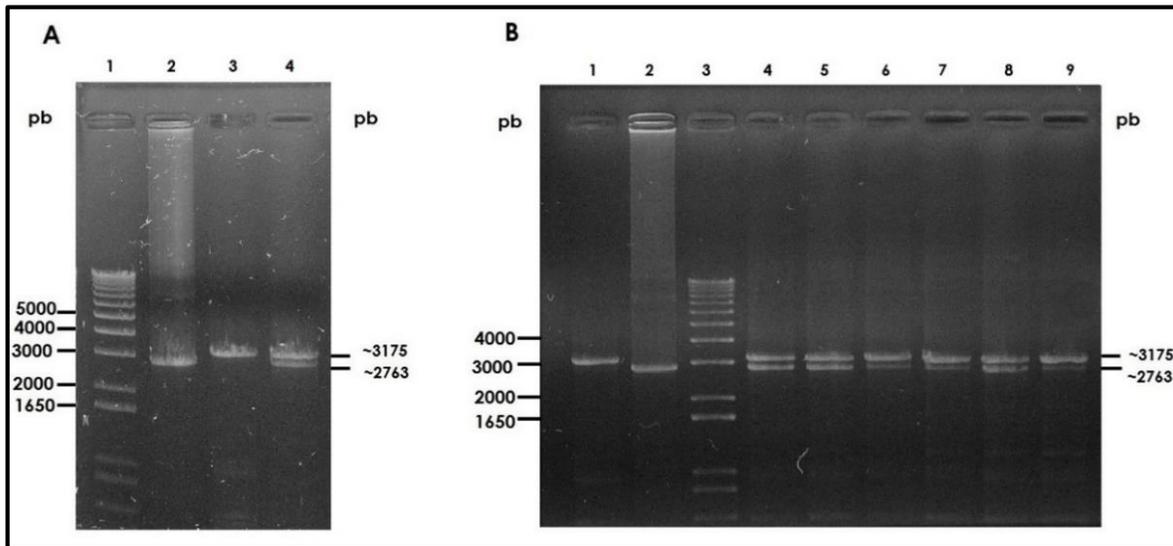


Figura 33. Análisis por PCR del *knock-out* sencillo de Brf1. **A** 1) Marcador de peso molecular (escalera de 1 kb de Invitrogen). Como molde se usó: DNA del plásmido pΔBrf1-Pac (2), DNA genómico de células silvestres (3), y DNA genómico de la población del *knock-out* sencillo (4). **B** Como molde se usó DNA genómico de células silvestres (1), DNA del plásmido pΔBrf1-Pac (2), y DNA genómico de las clonas 1-6 del *knock-out* sencillo de Brf1 (4-9). El carril 3 muestra el marcador de peso molecular (escalera de 1kb de Invitrogen). Geles de agarosa al 1%. Pb: pares de bases.

Para confirmar la eliminación de una copia de Brf1 de los cultivos *knock-out*, se realizaron *Southern-blots* con la población y dos de sus clonas. Para esto, se empleó como sonda la región UTR-5' del gen de Brf1, la cual ya había sido clonada en el vector pG-Brf1-5'-pac, digerida con *EcoRI* y purificada de geles de agarosa (Figura 15). Dicho fragmento fue marcado con [α - 32 P]-dCTP.

Para seleccionar las enzimas de restricción empleadas en el *Southern-blot*, fue analizada la secuencia del *locus* de Brf1 en *L. major* (Apéndice VII y VIII) y se construyó un mapa de restricción considerando tanto el gen (Figura 34A), como su sustitución por el gen *pac* (Figura 34B). Las enzimas *BsmI*, *NotI*, *Sall* y *SphI* fueron seleccionadas, mostrándose en la figura 20 los tamaños de las bandas esperados para cada una de ellas. En todos los casos se esperarían dos bandas,

una correspondiente al gen endógeno, y la otra correspondiente al gen de puromicina que reemplazó al gen Brf1.

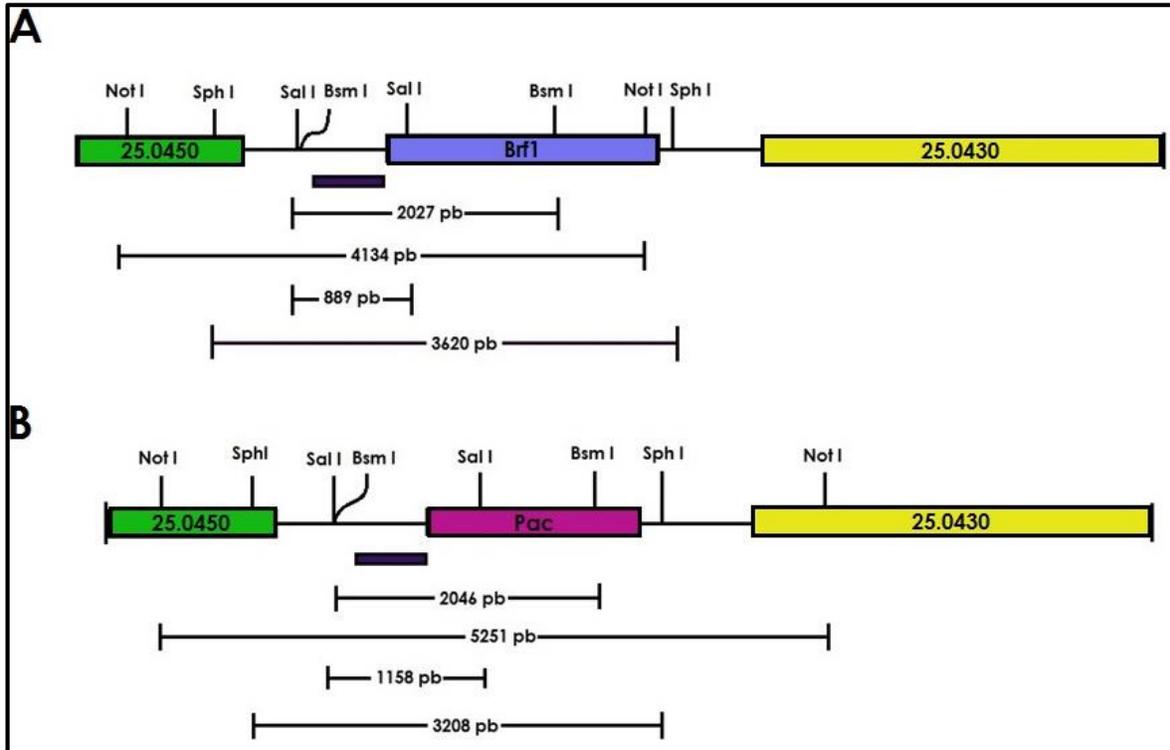


Figura 34. Mapa de restricción del locus de Brf1 de *L. major*. A) Sitios de restricción del gen Brf1 y genes vecinos. B) Sitios de restricción esperados para el *knock-out* sencillo de Brf1. Las líneas con números indican el tamaño de los fragmentos de restricción esperados. La caja que se observa debajo de los genes representa la región UTR-5' de 551 pb empleada como sonda en los *Southern-blot*s. La secuencia completa de estos *loci* se muestra en los Apéndices VII y VIII. Pb: pares de bases.

El ensayo inició con la extracción de DNA genómico de los cultivos *knock-out* (la población y dos clonas), del cual se digirieron 5 µg con las enzimas ya mencionadas. La digestiones fueron fraccionadas por electroforesis en un gel de agarosa al 0.8% y el gel fue fotografiado (Figura 35). En la imagen se observa que todas las enzimas cortaron el DNA genómico, aunque *SalI* y *SphI* lo hicieron de manera parcial.

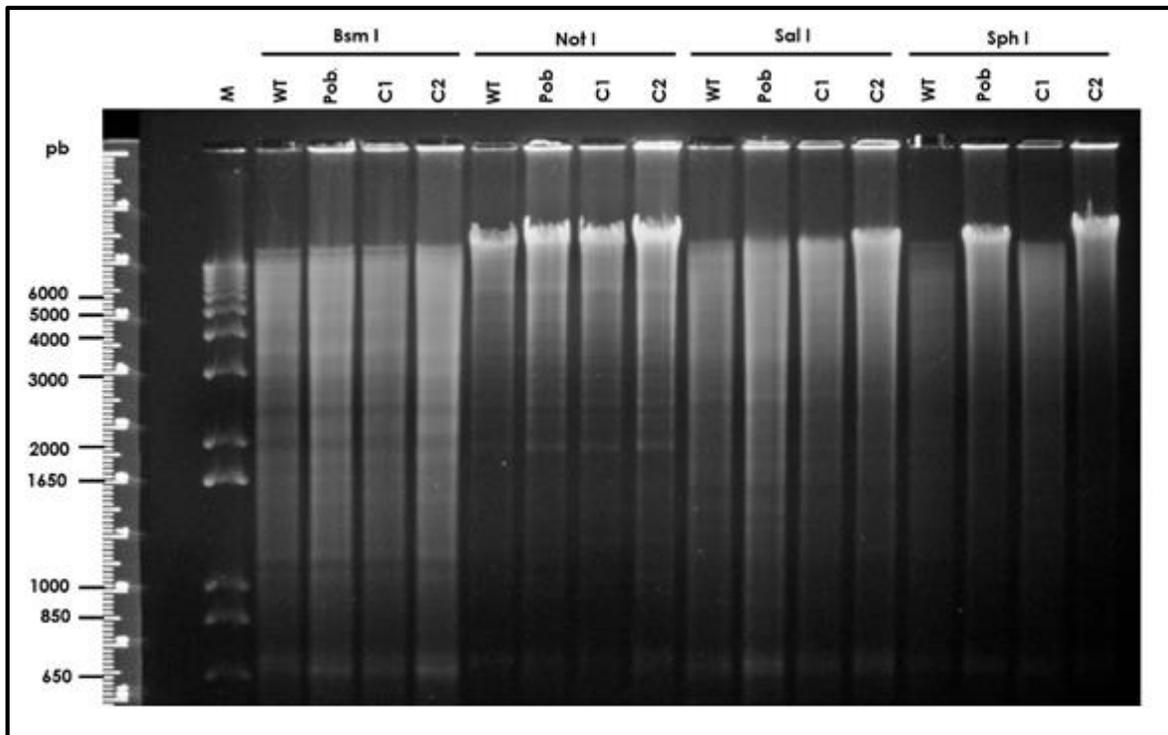


Figura 35. Electroforesis de DNAs genómicos digeridos. Se muestra DNA de células silvestres (WT), de la población del *knock-out* sencillo (Pob), y de las clonas 1 y 2 del *knock-out* sencillo (C1 y C2). Como se indica, el DNA fue digerido con las enzimas *BsmI*, *NotI*, *SalI* y *SphI*. M) Marcador de peso molecular (escalera de 1kb de Invitrogen). Gel de agarosa al 0.8%. Pb: pares de bases.

El DNA genómico digerido fue transferido del gel a una membrana de nylon, la cual se hibridó con la región UTR-5' del gen *Brf1* marcada con ^{32}P . Después de ser lavada, la membrana fue expuesta en una placa IP para obtener la autorradiografía (Figura 36). En todos los casos se observan bandas del tamaño esperado, con lo cual se confirmó que en las células con el *knock-out* de *Brf1*, se presenta una copia del gen *Brf1* y la substitución de la segunda copia de *Brf1* por el gen puromicina. Cabe mencionar que para las enzimas *SalI* y *SphI*, se observa una serie de bandas inesperadas, las cuales son atribuidas a la digestión parcial del DNA genómico. Con *BsmI* las dos bandas esperadas tienen tamaños muy parecidos que no pudieron separarse en la electroforesis.

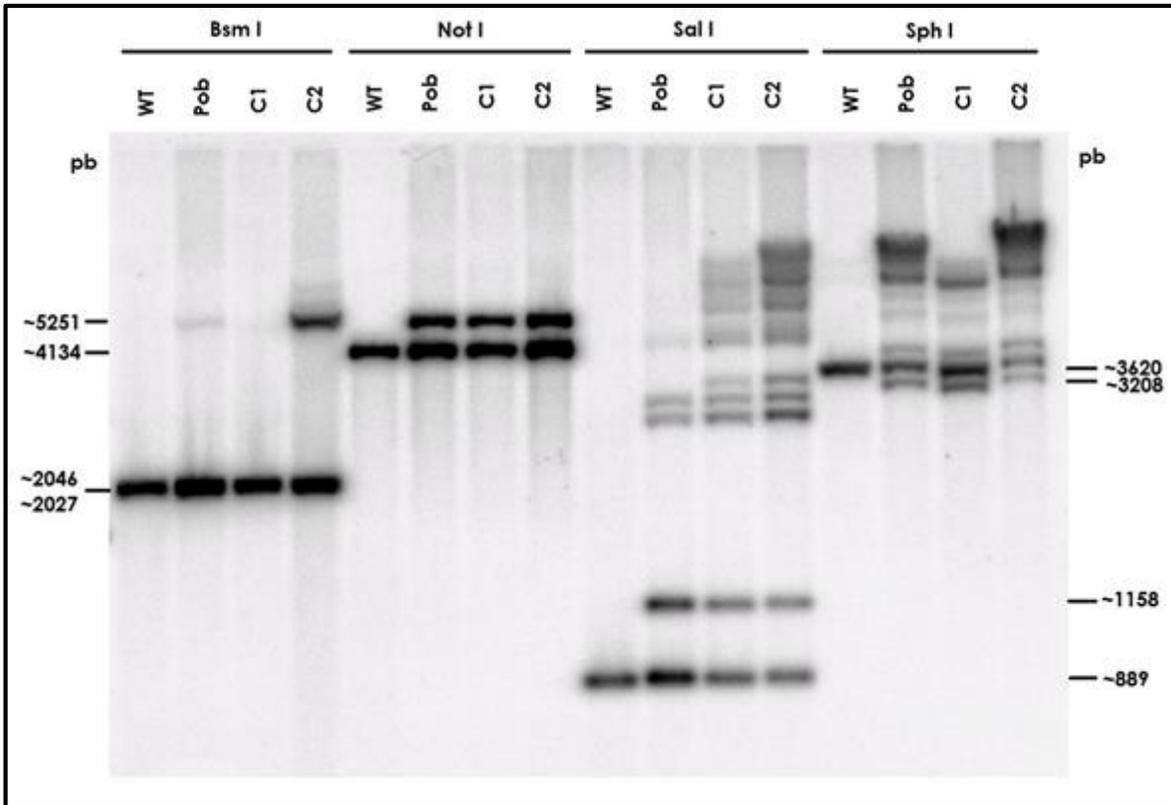


Figura 36. Experimento tipo *Southern-blot* para comprobar la sustitución de una copia del gen *Brf1* por el gen de resistencia a puomicina en *L. major*. Las membranas contenían DNA genómico de *L. major* digerido con las enzimas *BsmI*, *NotI*, *SalI* y *SphI* y fueron hibridadas con la región UTR-5' de *Brf1* marcada con ^{32}P . WT) células silvestres. Pob) Población *knock-out* de *Brf1*. C1) Clona 1 *knock-out* de *Brf1*. C2) Clona 2 *knock-out* de *Brf1*. Pb: pares de bases.

Para determinar un posible efecto de la eliminación de una de las dos copias de *Brf1* en el crecimiento de *L. major*, se realizó una curva de crecimiento empleando células silvestres y células con el *knock-out* sencillo (clona 1). Sin embargo, no se apreciaron diferencias entre ambos cultivos (Figura 37).

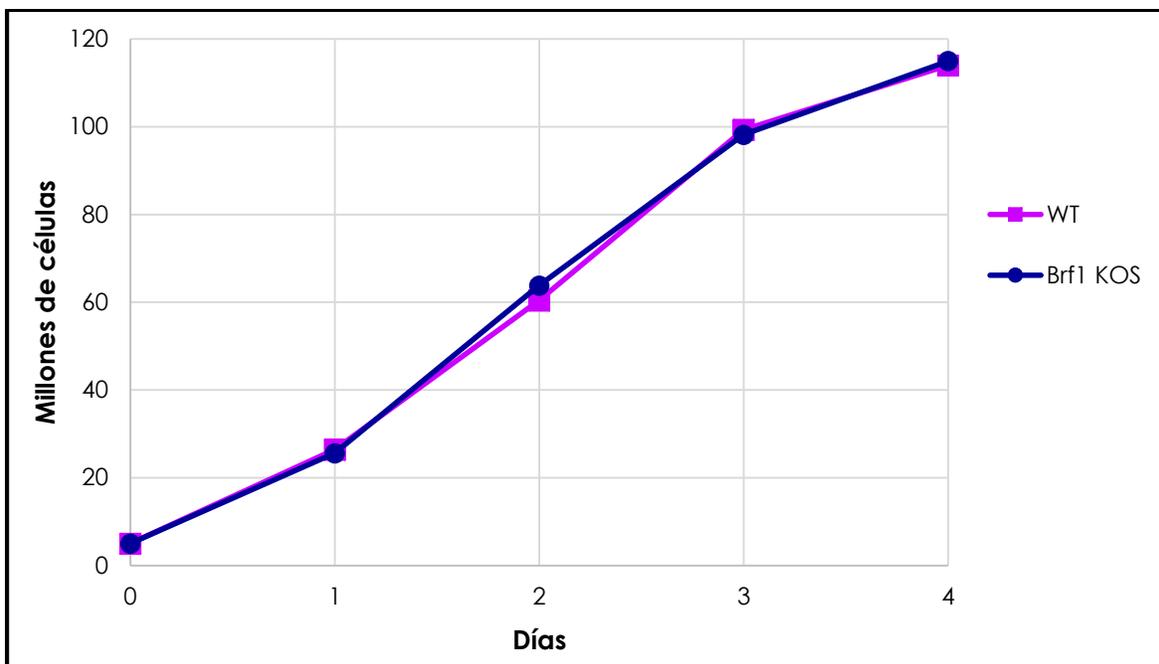


Figura 37. Curvas de crecimiento de *L. major*. La línea violeta representa células silvestres (WT), mientras que la línea azul marino representa la clona 1 del *knock-out* sencillo de Brf1.

5.3.4. Ensayos para la obtención de cultivos *knock-out* doble de Brf1

Una vez comprobado que las células presentan una copia del gen Brf1 y la sustitución de la segunda copia de Brf1 por el gen de resistencia a puromicina, la clona 1 fue seleccionada y se realizó por duplicado la transfección con 5 µg del *cassette* purificado del vector pG-Brf1-5'-hyg (Figura 30C). La transfección con el *cassette* de higromicina generó células no viables, las cuales murieron al poco tiempo de adicionada la concentración final del fármaco (32 µg/mL).

Se realizó una segunda transfección por duplicado, pero esta vez empleando 10 µg del *cassette* hyg. Como en el caso anterior, no fue posible seleccionar células en presencia del fármaco. Estos resultados sugirieron que el gen Brf1 es esencial para la supervivencia celular, por lo que no es posible eliminar sus dos copias.

5.3.5. Adición de una copia episomal de Brf1 en parásitos con el *knock-out* sencillo

Con el objeto de determinar si efectivamente Brf1 es un gen esencial para la viabilidad de *L. major*, se decidió realizar lo siguiente: el cultivo *knock-out* sencillo de Brf1 sería transfectado con el vector pBrf1-PTP, para generar una línea celular en la que se tuvieran copias episomales de Brf1; después se ensayaría el *knock-out* de la segunda copia alélica, esperando que al haber copias episomales de Brf1, fuera posible eliminar la segunda copia alélica de Brf1.

Para esto, los parásitos con el *knock-out* sencillo de Brf1 fueron transfectados con 25 µg del vector pBrf1-PTP (Figura 38) generado previamente en el laboratorio (Flores, 2011). Este vector contiene el gen Brf1 fusionado a una bandera PTP, y contiene secuencias UTR-5' y -3' diferentes a las del gen endógeno de Brf1. Así, el *cassette* de higromicina no sería capaz de recombinar con estas copias episomales de Brf1.

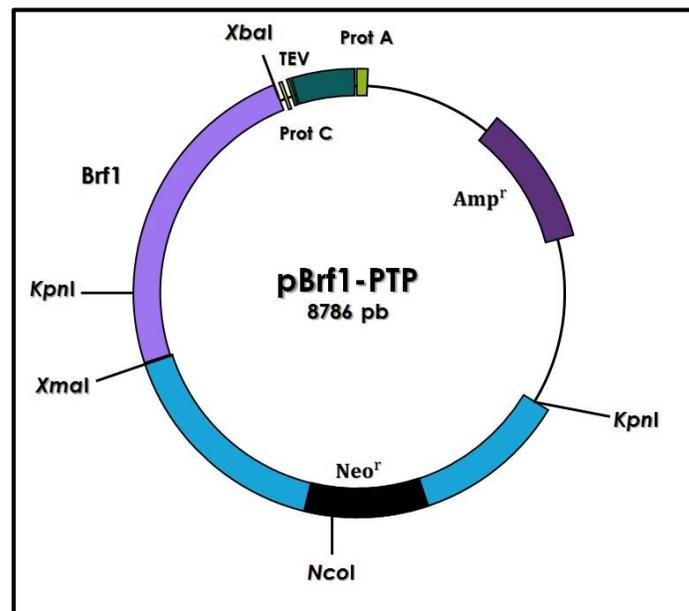


Figura 38. Mapa del vector pBrf1-PTP. El gen Brf1 se encuentra fusionado a la bandera formada por dos dominios de unión a IgG de la Proteína A (Prot A) y un dominio de la proteína C (Prot C), separados por un sitio de corte de la proteasa TEV. Pb: pares de bases.

Alrededor de dos semanas después de la electroporación se obtuvieron dos poblaciones transfectadas establemente, las cuales se mantuvieron con una concentración de 45 µM de puomicina y 50 µg/mL de G418. Ambas poblaciones

fueron analizadas mediante *western-blot* con el fin de corroborar la presencia de la proteína recombinante Brf1-PTP, usando un anticuerpo contra la bandera PTP (Figura 39). Tanto la población 1 (carriles 1-3) como la población 2 (carriles 4-6) mostraron la banda esperada de ~100 kDa. Como control negativo se analizaron células silvestres de *L. major* (carril 7), y como control positivo se usaron células de *L. major* transfectadas con el vector pC128-PTP, donde se observa la proteína esperada de ~148 kDa (carril 8).

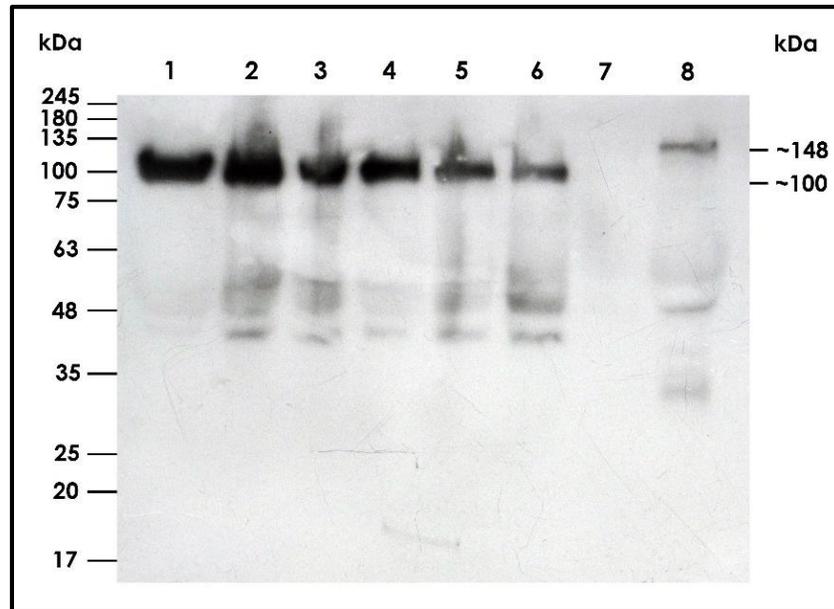


Figura 39. Análisis tipo *western-blot* de las poblaciones de *L. major* con el *knock-out* sencillo de Brf1 transfectadas con el vector pBrf1-PTP. Se analizaron 20, 10 y 5 millones de células de la población 1 (carriles 1-3, respectivamente), y 20, 10 y 5 millones de células de la población 2 (carriles 4-6, respectivamente). Control negativo se analizaron 10 millones de células silvestres (carril 7) y como control positivo se analizaron 10 millones de células de *L. major* transfectadas con el vector pC128-PTP (carril 8). Las muestras se fraccionaron en un gel de poliacrilamida al 10 %, se transfirieron a una membrana de PVDF y se trataron con el anticuerpo PAP. kDa: Kilo Daltones.

La población 1 fue seleccionada debido a que se observa una mayor expresión de la proteína. A partir de dicha población se obtuvieron seis clones celulares mediante plaqueo en cajas con medio de cultivo. Las clones fueron analizadas mediante *western-blot*, empleando como control la población 1 y células silvestres de *L. major* (Figura 40). Las seis clones mostraron la señal correspondiente a la proteína recombinante Brf1-PTP (carriles 1-6).

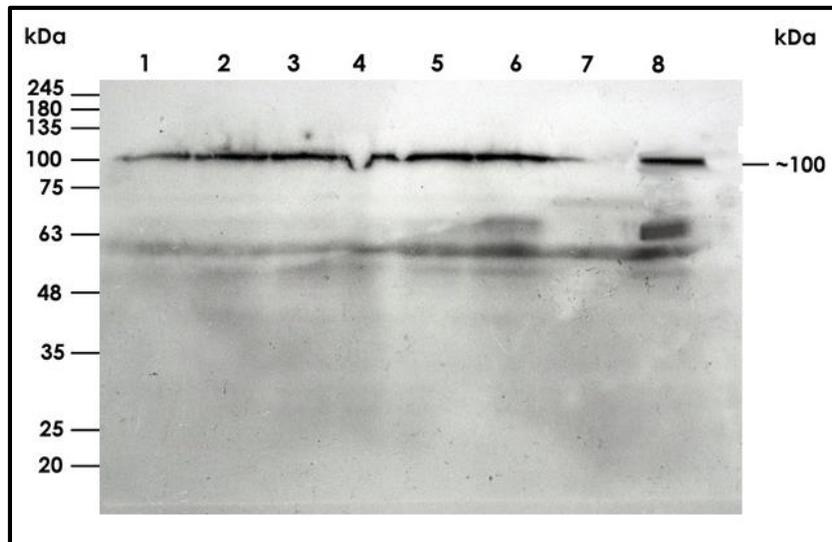


Figura 40. Análisis tipo *western-blot* de las clonas de *L. major* con el *knock-out* sencillo de *Brf1* transfectadas con el vector p*Brf1*-PTP. En los carriles 1-6 se presentan 10 millones de células de las clonas 1 a 6. Control negativo, 10 millones de células silvestres (carril 7). Control positivo, 10 millones de células de la Población 1. Las muestras se fraccionaron en un gel de poliacrilamida al 10 %, se transfirieron a una membrana de PVDF y se trataron con el anticuerpo PAP. kDa: Kilo Daltones.

Una vez comprobada la presencia de una copia episomal en células con el *knock-out* sencillo de *Brf1*, la clona1 fue seleccionada para, en experimentos futuros, tratar de obtener el cultivo *knock-out* doble de *Brf1*.

6. Discusión

6.1. Determinación del tamaño y abundancia del transcrito de Brf1

En cuanto a factores de transcripción se refiere, TFIIIA y TFIIIC no han sido encontrados en tripanosomátidos (Martínez-Calvillo, *et al.*, 2010). Esto resulta inesperado, considerando que estos factores son esenciales para el crecimiento celular en otros organismos. En contraste, los genes que codifican para las tres subunidades del factor de transcripción TFIIIB (TBP, Brf1 y Bdp1), ya han sido identificadas en este grupo de parásitos (Thomas *et al.*, 2009). Teniendo en cuenta que TFIIIB desempeña un papel importante en la transcripción de Pol III, la caracterización de sus subunidades en *L. major* es necesaria para incrementar nuestro conocimiento sobre inicio y regulación de la transcripción de Pol III en un organismo eucarionte de divergencia temprana.

Así, uno de los objetivos del presente trabajo consistió en determinar el tamaño del transcrito de Brf1 en promastigotes de *L. major* en fase media logarítmica por medio de experimentos tipo *northern-blot* (Figura 15). El transcrito observado tuvo un tamaño de ~2.85 Kb, el cual se encuentra dentro de lo esperado, considerando que el gen tiene un tamaño de ~2.1 Kb (Figura 16). Por otro lado se determinó la vida media del mRNA de Brf1 en células en fase media logarítmica y células en fase estacionaria, para lo cual se realizaron ensayos tipo *northern-blot*, donde se bloqueó la transcripción por diferentes tiempos (1, 2, 4, 8 y 16 horas) usando actinomicina D. Para poder comparar la vida media de los transcritos de Brf1, una de las membranas fue lavada y re-hibridada con un fragmento del gen α -tubulina, esto considerando que previamente se ha comprobado que α -tubulina se expresa de la misma manera en células en fase media logarítmica que en células en fase estacionaria (Sánchez, 2008). El ensayo mostró que la vida media del mRNA de Brf1 en fase estacionaria (~60 min) fue ligeramente mayor que en la fase media logarítmica (~55 min) (Figura 18), mientras que la vida media del transcrito de α -tubulina en fase media logarítmica es de ~7 horas (Figura 20). Estudios similares han sido realizados en *L. major* con Bdp1 (otra de las subunidades de factor de transcripción TFIIIB de Pol III) y C160 (la subunidad mayor de Pol III), obteniendo resultados similares para ambos casos, donde la vida media del transcrito de Bdp1 y el transcrito de C160 fue mayor en fase estacionaria (~2 h) que en fase media logarítmica (~1 h) (Román, 2011 y Sánchez, 2008). De esta forma, la vida media del mRNA de Brf1 es muy similar a la de otras dos proteínas relacionadas con la

transcripción de Pol III, pero mucho menor que la vida media del mRNA de α -tubulina.

Los parásitos del género *Leishmania* asumen diferentes desafíos en su paso del insecto vector al hospedero mamífero, entre los que se encuentran: la generación de proteínas disfuncionales debido al estrés térmico, los cambios morfológicos que sufre el parásito en la transformación de promastigote a amastigote, el uso de nuevos recursos nutricionales y la adaptación a un ambiente con mayor potencial de óxido-reducción. Entre las proteínas que se expresan en el parásito para superar dichas condiciones está la α -tubulina, cuyos transcritos de acuerdo con algunas investigaciones se encuentran entre los 50 más abundantes del parásito (Rastrojo *et al.*, 2013). Al ser una proteína que requieren ser altamente expresada, no es de extrañarse que una vez bloqueada la transcripción, sus transcritos tarden tanto tiempo en degradarse.

En *T. cruzi* se ha analizado la vida media de los mRNAs de algunas proteínas de mantenimiento en epimastigotes, como actina, la proteína ribosomal S4, la trifosfato isomerasa y la tripanotión reductasa (Cevallos *et al.*, 2005). En estos experimentos se observó un incremento de entre 320 y 712% en la vida media de los mRNAs en la fase estacionaria. Resulta interesante el hecho de que los epimastigotes pueden permanecer en fase estacionaria por períodos largos de tiempo, después de los cuales se transforman en tripomastigotes metacíclicos, que es un estadio no replicativo de *T. cruzi*. Se ha propuesto que los epimastigotes de fase estacionaria presentan un mecanismo de regulación global que podría proteger a los transcritos de la degradación, como una estrategia que les permitiera sobrevivir por periodos largos antes del proceso de diferenciación (Cevallos *et al.*, 2003; Cevallos *et al.*, 2005). Considerando lo anterior, se puede sugerir que los promastigotes procíclicos de *L. major* en fase estacionaria presentan un mecanismo similar que podría proteger a los transcritos de la degradación por largos periodos, antes de diferenciarse a promastigotes metacíclicos, tal y como se ha reportado en *T. cruzi*.

6.2. Obtención y caracterización de cultivos knock-out sencillo de Brf1

En los últimos años se ha logrado comprender algunos aspectos de la genómica funcional de parásitos tripanosomátidos como *Leishmania*, esto en parte gracias a los avances metodológicos en técnicas como la transfección de DNA en dichos parásitos, permitiendo la eliminación y/o complementación de genes por

recombinación; así como la posterior selección celular por medio de diferentes marcadores, generalmente de resistencia a algún fármaco (Stoecklin *et al.*, 2002).

En *Leishmania* es posible realizar *knock-outs* génicos mediante recombinación homóloga (Martínez-Calvillo *et al.*, 2005) con el fin de obtener información sobre la expresión génica y la función de las proteínas en el contexto del parásito intacto. Para esto, es necesario conocer el número de copias de un gen determinado, ya que se requiere eliminar todas las copias del gen de estudio para observar su efecto en la célula, de manera que se pueda inferir la función de dicho gen. Esto se debe a que las unidades policistrónicas pueden contener múltiples copias de un gen en tándem, así como también genes relacionados o no relacionados entre sí (Graham, 1995). Mientras mayor sea el número de copias de un gen, mayor número de construcciones con distintos marcadores de selección serán necesarias para eliminarlas. Sin embargo, gracias a que la secuenciación del genoma de *Leishmania major* se finalizó en el 2005 (Ivens *et al.*), se sabe que dicho organismo contiene sólo dos copias alélicas del gen Brf1, subunidad del factor de transcripción TFIIB.

Actualmente se sabe que para efectuar la eliminación de un gen completo, las regiones UTR-5' y UTR-3' del gen blanco deben ser integradas al vector en ambos lados del marcador de selección (Sengupta *et al.*, 2003 y Selvapandiyan *et al.*, 2001), y que el tamaño mínimo para obtener una recombinación homóloga eficiente en *Leishmania* ha sido establecido entre 150 y 200 pb (Papadopoulou y Dumas, 1997). Considerando lo anterior, para obtener el *knock-out* sencillo de Brf1 las regiones UTR-5' y UTR-3' fueron ligadas al gen *pac* o *hyg*, generando los vectores p Δ Brf1-Pac y p Δ Brf1-Hyg (Figura 28), los cuales fueron digeridos con las enzimas, para purificar el *cassette* de *pac* e *hyg*. El primer *cassette* fue empleado para transfectar promastigotes de *L. major*, los cuales fueron seleccionados en presencia de puromicina. La población obtenida fue clonada mediante plaqueo y analizada inicialmente mediante PCR con el fin de corroborar que una de las dos copias de Brf1 hubiese sido sustituida por el gen *pac* (Figura 33).

Lo anterior indicó que, como se esperaba, en los cultivos *knock-out* una copia alélica de Brf1 fue sustituida por el gen *pac*. Sin embargo, generalmente la ausencia del gen se comprueba mediante técnicas de hibridación de membranas (Sengupta, *et al.*, 2003 y Selvapandiyan *et al.*, 2001), por lo que se realizó un *Southern-blot* con la población y dos de sus clones empleando como sonda la región UTR-5' del gen Brf1 marcada con [α -³²P]-dCTP. comprobando así la presencia de una copia del gen Brf1 y la substitución de la segunda copia de Brf1 por el gen de puromicina (Figura 36).

6.3. Ensayos para la obtención de cultivos *knock-out* doble de Brf1

Dado que *L. major* es un organismo diploide, el *knock-out* sencillo no es suficiente para realizar el análisis funcional de Brf1, así como de los mecanismos que dirigen su regulación (Cortázar y Walker, 2004), por lo que fue necesario emplear un vector que permitiera la substitución de la segunda copia de Brf1 por un marcador de selección diferente a puromicina.

En un ensayo para eliminar la segunda copia del gen Brf1, clonas celulares con el *knock-out* sencillo fueron transfectadas con el *cassette* de higromicina. Una vez transfectadas dichas células se mantuvieron en presencia de puromicina e higromicina. Lo anterior generó células no viables, las cuales murieron al poco tiempo de adicionada la concentración final del fármaco. Para verificar los resultados obtenidos, se realizó una segunda transfección por duplicado, pero esta vez empleando una mayor cantidad del *cassette hyg*. Como en el caso anterior, no fue posible seleccionar células en presencia del fármaco.

Algunos estudios realizados previamente han llevado a la identificación de genes esenciales cuya pérdida no es tolerable por el organismo. Por ejemplo, en el caso de la N-miristoiltransferasa (NMT), que es expresada constitutivamente en todos los estadios del parásito y que cataliza la modificación cotraduccional de proteínas por N-miristoilación (proceso importante para la orientación subcelular y las interacciones proteína-proteína), su eliminación produjo parásitos no viables en *L. major* (Vasudevan *et al.*, 1998). Tomando en cuenta lo anterior, estos resultados sugirieron que el gen Brf1 es esencial para la supervivencia celular, por lo que no es posible eliminar sus dos copias sin afectar la viabilidad del parásito.

Considerando la función de Brf1 en la transcripción de la RNA Pol III, era de esperarse que el *knock-out* doble de esta proteína en *L. major* generara células no viables, tal y como se ha observado en otros casos. Colbert y Hahn (1992) realizaron diferentes deleciones en las regiones amino y carboxilo terminal del gen Brf1 en levadura, obteniendo tanto células viables, como no viables, esto dependiendo del lugar y tamaño de la deleción. Posteriormente analizaron la actividad transcripcional de las RNAs Polimerasas I, II, y III *in vitro*; observando que la transcripción de Pol III se ve afectada, así como disminución en la transcripción de los genes 5S y tRNAs. También se observó que dicha actividad puede ser reconstituida mediante la adición de Brf1 recombinante, sugiriendo así que Brf1 es un factor de iniciación general de Pol III.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos, para realizar el *knock-out* doble de Brf1 es necesaria la adición de una copia episomal en parásitos con el *knock-out* sencillo, a fin de mantener la expresión de la proteína para posteriormente llevar a cabo la eliminación de la segunda copia endógena. De esta manera, clonas celulares con el *knock-out* sencillo fueron transfectadas con el vector pBrf1-PTP (Figura 38), en el que el gen Brf1 fue fusionado a la bandera PTP (formada por dos dominios de unión a IgG de la Proteína A y un dominio de la proteína C, separados por un sitio de corte de la proteasa TEV). Se obtuvieron dos poblaciones transfectadas establemente, las cuales fueron analizadas mediante *western-blot* para corroborar la presencia de la proteína recombinante Brf1-PTP, usando un anticuerpo contra la bandera PTP (Figura 39). La población 1 fue clonada debido a que se observó una mayor expresión de la proteína, obteniéndose así seis clonas celulares mediante plaqueo, observándose en todos los casos la señal correspondiente a la proteína recombinante Brf1-PTP (Figura 40).

En *Trypanosoma* se ha propuesto un sistema similar al empleado en el presente trabajo para genes de una sola copia, aclarando que éste no funciona si se requiere la expresión de ambos alelos para la viabilidad y la proliferación de los tripanosomas. No obstante se han obtenido algunas líneas viables que expresan diversas proteínas esenciales exclusivamente con la copia del gen integrada en el vector PTP (Park *et al.*, 2014). En nuestro caso se esperaría que este sistema funcione, debido a que la obtención del *knock-out* sencillo ha permitido comprobar que el gen Brf1 funciona aun cuando sólo se tiene una copia alélica.

Una vez comprobada la presencia de una copia episomal en células con el *knock-out* sencillo de Brf1, una clona fue seleccionada para, en experimentos futuros, tratar de obtener el cultivo *knock-out* doble de Brf1. Si bien la eliminación de una copia alélica de Brf1 no afectó la morfología, movilidad y crecimiento celular (Figura 37), se espera que con el *knock-out* doble, como se ha observado en algunos casos de manipulación genética en *Leishmania*, se presenten posibles alteraciones morfológicas como células multinucleadas y afectación del crecimiento celular (Cortázar y Walker, 2004). Además, considerando que Brf1 juega un papel importante dentro del reclutamiento de la RNA Pol III mediante la unión a Bdp1 y a subunidades del factor TFIIIC, se prevé que la eliminación del gen Brf1 afectaría la síntesis de todos los snRNAs, los tRNAs, el rRNA 5S y el RNA 7SL (Schramm y Hernández, 2002).

7. Conclusiones y logros

- El mRNA de Brf1 de *L. major* tiene un tamaño de ~2.85 Kb, el cual se encuentra dentro de lo esperado, considerando que el gen tiene un tamaño de ~2.1 Kb.
- La vida media del transcrito de Brf1 es ligeramente mayor en la fase estacionaria (~60 min) que en la fase media logarítmica (~55 min). La vida media del mRNA de α -tubulina en fase logarítmica es de ~7 horas.
- Se construyeron los vectores p Δ Brf1-Pac y p Δ Brf1-Hyg para obtener los *knock-out* de Brf1.
- Se generaron clonas celulares de *L. major* en las que una de las dos copias del gen Brf1 (*knock-out* sencillo) fue substituida por el *cassette* de resistencia a puromicina mediante recombinación homóloga.
- La substitución de una de las dos copias de Brf1 por el gen de puromicina no afectó el crecimiento celular, ni la morfología de los parásitos.
- La metodología empleada en este trabajo no permitió la obtención de células con el *knock-out* doble del gen Brf1, sugiriendo así que dicho gen es esencial para la supervivencia celular.
- Se generaron clonas celulares de *L. major* con el *knock-out* sencillo y una copia episomal del gen Brf1. Todas las clonas mostraron la señal correspondiente a la proteína recombinante Brf1-PTP.

8. Perspectivas

- Eliminar la segunda copia del gen Brf1 por recombinación homóloga empleando células con el *knock-out* sencillo y una copia episomal del gen.
- Determinar el efecto del *knock-out* doble de Brf1 en el crecimiento y morfología celular.
- Analizar el efecto del *knock-out* de Brf1 en la actividad transcripcional de las RNA Polimerasas I, II, y III.
- Generar anticuerpos contra Brf1. Con éstos realizar ensayos ChIP para demostrar la unión de Brf1 a los genes transcritos por la RNA Pol III.

9. Referencias

- Alexander, J.; A. R. Satoskar y D. G. Russell. 1999. *Leishmania* species: models of intracellular parasitism. *Journal of Cell Science* 112 (18): 2993-3002.
- Bailey, M. S. y D. N. Lockwood. 2007. Cutaneous leishmaniasis. *Journal of Clinical Dermatology*. 25 (2): 203-211.
- Barker, D. C. 1987. DNA diagnosis of human leishmaniasis. *Parasitology Today*. 3: 177-184.
- Basselin, M.; M. Badet-Denisot y M. Robert-Gero. 1998. Modification of kinetoplast DNA minicircle composition in pentamidine-resistant *Leishmania*. *Acta Tropica*. 70: 43-61.
- Bates, A. P. y M. E. Rogers. 2004. New insights into the developmental biology and transmission mechanisms of *Leishmania*. *Current Molecular Medicine*. 4(6): 601-609.
- Borst, P. y S. Ulbert. 2001. Control of VSG gene expression sites. *Molecular and Biochemical Parasitology*. 114 (1): 17-27.
- Brun, I.; A. Sentenac y M. Werner. 1997. Dual role of the C34 subunit of RNA polymerase III in transcriptional initiation. *The EMBO journal*. 16 (18): 5730-5741.
- Buratowski, S. y H. Zhou. 1993. Functional domains of transcription factor TFIIB. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 90 (12): 5633-5637.
- Cevallos, A. M.; M. Perez-Escobar; N. Espinosa; J. Herrera; I. Lopez-Villasenor y R. Hernandez. 2005. The stabilization of housekeeping transcripts in *Trypanosoma cruzi* epimastigotes evidences a global regulation of RNA decay during stationary phase. *FEMS Microbiol Letters*. 246: 259-264.
- Cevallos, A. M.; V. I. Lopez; N. Espinosa; J. Herrera y R. Hernández. 2003. *Trypanosoma cruzi*: allelic comparisons of the actin genes and analysis of their transcripts. *Experimental Parasitology*. 103: 23-43.
- Chang, K. P. y B. McGwire. 2002. Molecular determinants and regulation of *Leishmania* virulence. *Kinetoplastid Biology and Disease*. 1: 1-7.
- Chares, H. y G. Matlashewski. 1994. Developmental gene expression in *Leishmania donovani*: differential cloning and analysis of an amastigote-stage gene. *Molecular and Cellular Biology*. 14: 2975-2984.
- Chaussivert, N.; C. Conesa; S. Shaaban y A. Sentenac. 1996. Complex interactions between yeast TFIIB and TFIIC. *The Journal of Biological Chemistry*. 23 (270): 15353-15358.
- Chrusciak-Talhari, A.; R. Dietze; C. Chrusciak-Talhari; R. M. Silva; E. Gadelha-Yamashita; G. O. Penna; P. R. L. Machado; y S. Talhari. 2011. Randomized

- Controlled Clinical Trial to Access Efficacy and Safety of Miltefosine in the Treatment of Cutaneous Leishmaniasis Caused by *Leishmania (Viannia) guyanensis* in Manaus, Brazil. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 84 (2): 255-260.
- Colbert, T. y S. Hahn. 1992. A yeast TFIIB-related factor involved in RNA polymerase III transcription. *Genes & Development*. 6: 1940-1949.
- Cortázar, T.M. y J. Walker. 2004. Manipulación genética y el estudio del parásito protozoario *Leishmania*. *Biomédica (Bogotá)*. 24 (4): 338-355.
- D'orso, I. 2003. Regulación post-transcripcional en *Trypanosoma cruzi*: Interrelación entre elementos en *cis* y proteínas de unión a ARN. "Estudio funcional-estructural". Instituto de Investigaciones Biotecnológicas. Universidad Nacional de San Martín.
- Desjeux, P. 2004. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*. 27 (5): 305-318.
- Dirección General de Epidemiología. 2011. Manual de Procedimientos Estandarizados para la Vigilancia Epidemiológica de las Enfermedades transmitidas por Vectores. 129 pp.
- Dumay, H.; I. Rubbi; A. Sentenac y C. Marck. 1999. Interaction between yeast RNA Polymerase III and transcription factor TFIIIC via ABC10alpha and tau131 subunits. *The Journal of Biological Chemistry*. 19 (274): 33462-33468.
- Dupé, A. 2013. Étude des éléments régulateurs *cis* et *trans* impliqués dans la stabilité du transcrit de l'amastine au stade intracellulaire chez *Leishmania*. Tesis de doctorado. Director: Dra. Barbara Papadopoulou. Université Laval, Quebec, Canada.
- Fairley, J. A.; P. H. Scott y R. J. White. 2003. TFIIIB is phosphorylated, disrupted and selectively released from tRNA promoters during mitosis in vivo. *The EMBO Journal*. 22 (21): 5841-5850.
- Flores, C. 2011. Identificación de los componentes proteicos del complejo transcripcional de la RNA polimerasa III en *Leishmania major*. Tesis de maestría. Director: Dr. Santiago Martínez Calvillo. Facultad de Estudios Superiores Iztacala, UNAM, México D. F.
- Freedman, D. J. y S. M. Beverley. 1993. Two more independent selectable markers for stable transfection of *Leishmania*. *Molecular and Biochemical Parasitology*. 62: 37-44.
- Fridberg, A.; K. T. Buchanan y D. M. Engman. 2006. Flagellar membrane trafficking in kinetoplastids. *Parasitology Research*. 100: 205-212.
- Galli, G.; H. Hofstetter y M. L. Birnstiel. 1981. Two conserved sequence blocks within eukaryotic tRNA genes are major promoter elements. *Nature*. 294 (5842): 626-631.

- Graham, S. V. 1995. Mechanisms of stage-regulated gene expression in Kinetoplastida. *Parasitol Today*. 11: 217-23.
- Gunzl, A. 2010. The pre-mRNA splicing machinery of trypanosomes: complex or simplified? *Eukaryotic Cell*. 9: 1159-1170.
- Gunzl, A.; E. Ullu; M. Dorner; S. P. Fragoso; K. F. Hoffmann; J. D. Milner; Y. Morita; E. K. Nguu; S. Vanacova; S. Wunsch; A. O. Dare; H. Kwon y C. Tschudi. 1997. Transcription of the *Trypanosoma brucei* spliced leader RNA gene is dependent only on the presence of upstream regulatory elements. *Molecular Biochemistry Parasitology*. 85: 67-76.
- Gupta, S. y R. Reddy. 1991. Compilation of small RNA sequences. *Nucleic Acids Research*. 19: 2073-2075.
- Handman, E. 1999. Cell biology of *Leishmania*. *Advances in Parasitology*. 44:1-39.
- Hernández-Flores, J. J.; J. J. Morales-Aguirre y A. Zamora-Chávez. 2007. Leishmaniasis visceral tratada con anfotericina Boletín Médico del Hospital Infantil de México. 64 (1): 43-48
- Huang, Y. y R. J. Maraia. 2001. Comparison of the RNA polymerase III transcription machinery in *Schizosaccharomyces pombe*, *Saccharomyces cerevisiae* and human. *Nucleic Acids Research*. 29 (13): 2675-2690.
- Ivens, A. C.; C. S. Peacock; E. A. Worthey; L. Murphy; G. Aggarwal; M. Berriman.; E. Sisk; M. A. Rajandream; E. Adlem; R. Aert; A. Anupama; Z. Apostolou; P. Attipoe; N. Bason; C. Bauser; A. Beck; S. M. Beverley; G. Bianchettin; K. Borzym; G. Bothe; C. B. Bruschi; M. Collins; E. Cadag; L. Ciarloni; C. Clayton; R. M. Coulson; A. Cronin; A. K. Cruz; R. M. Davies; G. J. De; D. E. Dobson; A. Duesterhoeft; G. Fazelina; N. Fosker; A. C. Frasch; A. Fraser; M. Fuchs; C. Gabel; A. Goble; A. Goffeau; D. Harris; C. Hertz-Fowler; H. Hilbert; D. Horn; Y. Huang; S. Klages; A. Knights; M. Kube; N. Larke; L. Litvin; A. Lord; T. Louie; M. Marra; D. Masuy; K. Matthews; S. Michaeli; J. C. Mottram; S. Muller-Auer; H. Munden; S. Nelson; H. Norbertczak; K. Oliver; S. O'neil; M. Pentony; T. M. Pohl; C. Price; B. Purnelle; M. A. Quail; E. Rabinowitsch; R. Reinhardt; M. Rieger; J. Rinta; J. Robben; L. Robertson; J. C. Ruiz; S. Rutter; D. Saunders; M. Schafer; J. Schein; D. C. Schwartz; K. Seeger; A. Seyler; S. Sharp; H. Shin; D. Sivam; R. Squares; S. Squares; V. Tosato; C. Vogt; G. Volckaert; R. Wambutt; T. Warren; H. Wedler; J. Woodward; S. Zhou; W. Zimmermann; D. F. Smith; J. M. Blackwell; K. D. Stuart; B. Barrell; y P. J. Myler. 2005. The genome of the kinetoplastid parasite, *Leishmania major*. *Science*. 309: 436-442.
- Johnson, P. J.; J. M. Kooter y P. Borst. 1987. Inactivation of transcription by UV irradiation of *T. brucei* provides evidence for a multicistronic transcription unit including a VSG gene. *Cell*. 51: 273-281.
- Kapler, G.; C. Coburn y S. Beverley. 1990. Stable transfection of the human parasite *Leishmania major* delineates a 30-kilobase region sufficient for

- extrachromosomal replication and expression. *Molecular and Cellular Biology*. 10: 1084-1094.
- Kassavetis, G. A. y E. P. Geiduschek. 2006. Transcription factor TFIIIB and transcription by RNA polymerase III. *Biochemical Society Transactions*. 34 (6): 1082-1087.
- Kassavetis, G.A.; R. Driscoll y E. P. Geiduschek. 2006. Mapping the principal interaction site of the Brf1 and Bdp1 subunits of *Saccharomyces cerevisiae* TFIIIB. *Journal Biological Chemistry*. 281: 14321-14320.
- Kelly, J. M. 1995. Trypanosomatid shuttle vectors: new tools for the functional dissection of parasite genomes. *Parasitology Today*. 11: 447-451.
- Kelly, J. M.; H. Ward; M. Miles y G. Kendall. 1992. A shuttle vector which facilitates the expression of transfected genes in *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania*. *Nucleic Acids Reserch*. 20:3963-3969.
- Kenneth, N. S.; L. Marshall y R. J. White. 2008. Recruitment of RNA polymerase III in vivo. *Nucleic Acids Research*. 36 (11): 3757-3764.
- Killick-Kendrick, R.; D. H. Molyneux; R. W. Ashford. 1974. *Leishmania* in phlebotomid sandflies. I. Modifications of the flagellum associated with attachment to the mid-gut and oesophageal valve of the sandfly. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*. 187: 409-419.
- Kiss, T.; C. Marshallsay y W. Filipowicz. 1991. Alteration of the RNA polymerase specificity of U3 snRNA genes during evolution and in vitro. *Cell*. 65: 517-526.
- Laban, A.; J. Tobin; M. Curotto y D. Wirth. 1990 Stable expression of the bacterial neogene in *Leishmania enriettii*. *Nature*. 343:572-574.
- Lambertucci, J. R. y L. S. C. Silva. 2008. Mucocutaneous leishmaniasis treated with liposomal amphotericin B. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 41(1):87-88.
- Landfear, S. M. y M. Ignatushchenko. 2001. The flagellum and flagellar pocket of trypanosomatids. *Molecular and Biochemical Parasitology*. 115: 117.
- Langford, C. K.; R. J. Burchmore; D. T. Hart; W. Wagner y S. M. Landfear. 1994. Biochemistry and molecular genetics of *Leishmania* glucose transporters. *Parasitology*. 108: 73-83.
- LeBowitz, J. H.; H. Q. Smith; L. Rusche y S. M. Beverley. 1993. Coupling of poly(A) site selection and trans-splicing in *Leishmania*. *Genes & Developed*. 7: 996-1007.
- Lee, S. T.; C. Tarn y K. P. Chang. 1993. Characterization of the switch of kinetoplast DNA minicircle dominance during development and reversion of drug resistance in *Leishmania*. *Molecular Biochemistry Parasitology*. 58: 187-203.
- Liao, Y.; R. D. Moir; I. M. Willis. 2006. Interactions of Brf1 peptides with the tetratricopeptide repeat-containing subunit of TFIIIC inhibit and promote

- preinitiation complex assembly. *Molecular and cellular Biology*. 26 (16):5946-5956.
- Liu, B.; Y. Liu; S. A. Motyka; E. E. Agbo y P. T. Englund. 2005. Fellowship of the rings: the replication of kinetoplast DNA. *Trends in Parasitology*. 21(8): 363-369.
- Luo, H.; G. Gilinger; D. Mukherjee y V. Bellofatto. 1999. Transcription initiation at the TATA-less spliced leader RNA gene promoter requires at least two DNA-binding proteins and a tripartite architecture that includes an initiator element. *Journal of Biological Chemistry*. 274: 31947-31954.
- Martínez-Calvillo, S.; A. Saxena; A. Green; A. Leland y P.J. Myler. 2007. Characterization of the RNA polymerase II and III complexes in *Leishmania major*. *International Journal for Parasitology*. 37 (5):491.
- Martínez-Calvillo, S.; J. C. Vizuet-de-Rueda; L. E. Florencio-Martínez; R. G. Manning-Cela y E. E. Figueroa-Angulo. 2010. Gene Expression in Trypanosomatid Parasites. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. 2010:1-15.
- Martínez-Calvillo, S.; K. Stuart y P. J. Myler. 2005. Ploidy changes associated with disruption of two adjacent genes on *Leishmania major* chromosome 1. *International Journal Parasitology*. 35:419-429.
- Martínez-Calvillo, S.; S. Yan; D. Nguyen; M. Fox; K. Stuart y P. J. Myler. 2003. Transcription of *Leishmania major* Friedlin chromosome 1 initiates in both directions within a single region. *Molecular Cell*. 11 (5): 1291-1299.
- Maslov, D. A.; S. A. Podlipaev y J. Lukes. 2001. Phylogeny of the Kinetoplastida: Taxonomic problems and insights into the evolution of parasitism. *Memorias del Instituto Oswaldo Cruz*. 96 (3): 397-402.
- McAndrew, M.; S. Graham; C. Hartmann y C. Clayton. 1998. Testing promoter activity in the trypanosome genome: isolation of a metacyclic-type VSG promoter, and unexpected insights into RNA polymerase II transcription. *Experimental Parasitology*. 90: 65-76.
- Monroy-Ostria, A. y G. Sanchez-Tejeda. 2002. Molecular probes and the polymerase chain reaction for detection and typing of *Leishmania* species in Mexico. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 1: 101-104.
- Morales, M. 2002. Epidemiología molecular de la coinfección por “*Leishmania*”-VIH. Memoria para optar al grado de Doctor. Director: Dr. Álvaro Ezquerra Jorge. Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Complutense de Madrid, España.
- Moreira, D.; P. López-García y K. Vickerman. 2004. An updated of kinetoplastid phylogeny using environmental sequences and a closer outgroup: proposal for a new classification of the clas *Kinetoplastea*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 54: 1861-1875.

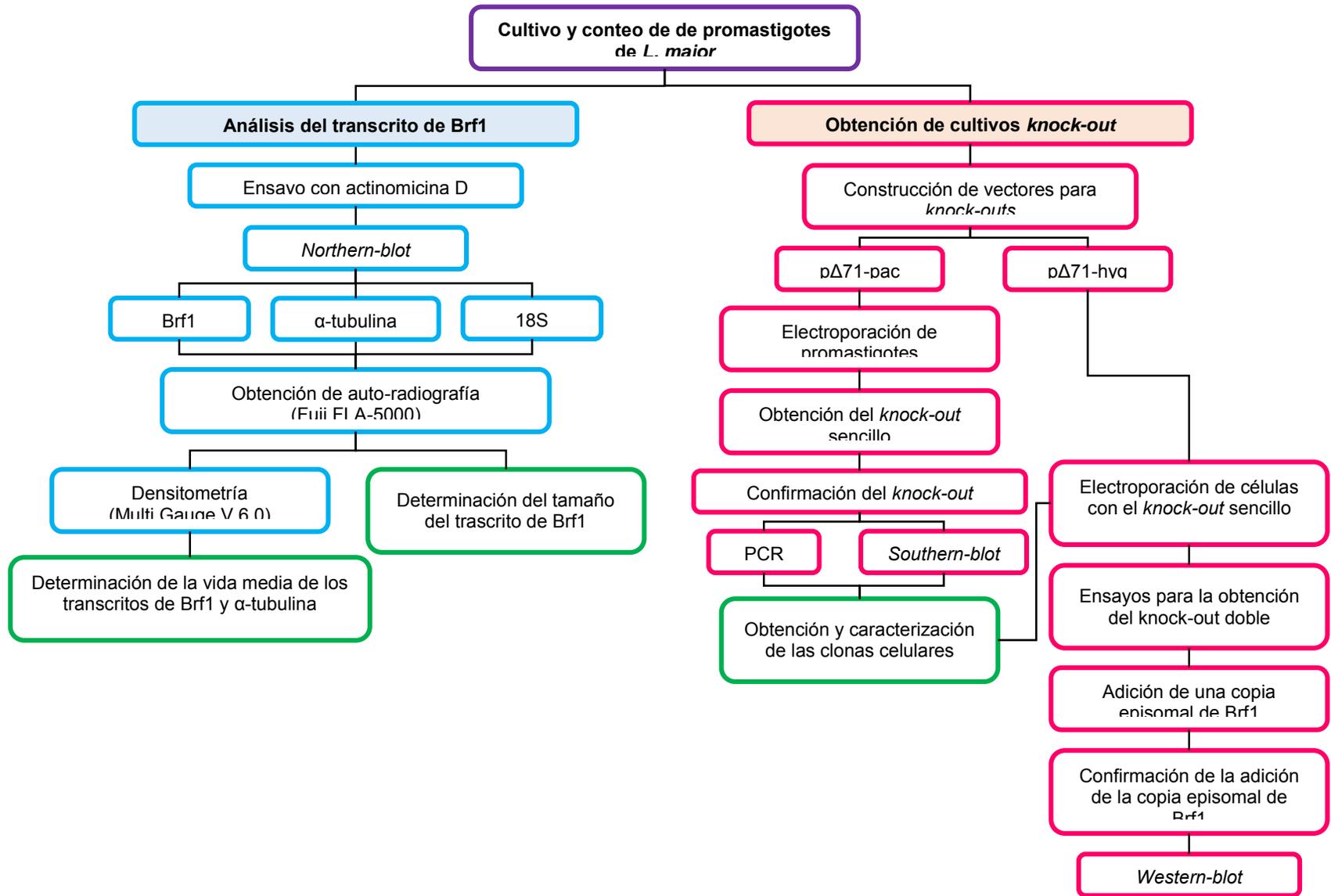
- Mueller, M.; M. Blasegaram; Y. Koummuki; K. Ritmeijerl; M. Ramirez y R. Davidson. 2006. A comparison of liposomal amphotericin B with sodium stibogluconate for the treatment of visceral leishmaniasis in pregnancy in Sudan. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 58(4): 811-815.
- Murray, H. W.; J. D. Berman; C. R. Davies y N. G. Saravia. 2005. Advances in leishmaniasis. *The Lancet*. 366 (9496): 1561-1577.
- Muskus, C. y M. Marin. 2002. Metaciclologénesis: Un proceso fundamental en la biología de *Leishmania*. *Revista. Biomédica*. 22 (2): 167-177.
- Myler, P.J.; E. Sisk; P. D. McDonagh; S. Martínez-Calvillo; A. Schnauffer; S. M. Sunkin; S. Yan; R. Yan; R. Madhubala; A. Ivens; L. y K. Stuart. 2000. Genomic organization and gene function in *Leishmania*. *Biochemical Society Transactions*. 28: 527-531.
- Myler, P.J.; L. Audleman; T. Devos; G. Hixson; P. Kiser; C. Lemley; C. Magness; E. Rickel; E. Sisk; S. Sunkin; S. Swartzell; T. Westlake; P. Bastien; G. Fu; A. Ivens y K. Stuart. 1999. *Leishmania major* Friedlin chromosome 1 has an unusual distribution of protein-coding genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences. U. S. A.* 96: 2902-2906.
- Neves, L. O.; A. C. Talhari; E. P. Gadelha; R. M. Silva y J. A. Guerra. 2011. A randomized clinical trial comparing meglumine antimoniate, pentamidine and amphotericin B for the treatment of cutaneous leishmaniasis by *Leishmania guyanensis*. *An Bras Dermatol* 86:1092-1101.
- Oler, A. J.; R. K. Alla; D. N. Roberts; A. Wong; P. C. Hollenorts; K. J. Chandler; P. A. Cassidy; C. A. Nelson; C. H. Hagedorn; B. J. Graves y B. R. Cairns. 2011. Human RNA polymerase III transcriptomes and relationships to Pol II promoter chromatin and enhancer-binding factors. *Nature Structural & Molecular Biology*. 17: 620-629.
- Opperdoes, F. R. y P. Borst. 1977. Localization on nine glycolytic enzymes in a microbody-like organelle in *Trypanosoma brucei*: The glycosome. *FEBS Letters*. 80 (2): 360-364.
- Organización Panamericana de la Salud. 2013. Leishmaniasis en las Américas. Recomendaciones para el tratamiento. Washington, D.C.
- Padilla-Mejía, N. E.; C. M. Gómez-Hurtado; I. I. Sánchez-Santamaria; L. E. Florencio-Martínez; R. G. Manning-Cela y S. Martínez-Calvillo. 2013. "Comparative genomics of *Leishmania* parasites". En: *Comparative genomics in neglected human parasites*. Editorial Nova Biomedical.
- Pagliano, P.; N. Carannante; M. Rossil; M. Gramiccia; L. Gradoni; F. S. Faella y G. B. Gaeta. 2004. Visceral leishmaniasis in pregnancy: a case series and a systematic review of the literatura. *Antimicrobial Chemotherapy*. 55 (2): 229-233.

- Papadopoulou, B. y C. Dumas. 1997. Parameters controlling the rate of gene targeting frequency in the protozoan parasite *Leishmania*. *Nucleic acids Reserch*. 25: 4278-4286.
- Papadopoulou, B.; X. F. Huang; N. Boucher y F. McNicoll. 2003. Stage-specific regulation of gene expression in *Leishmania*. *ASM News*. 69: 282-288.
- Park, S. H.; B. N. Nguyen; J. K. Kirkham; T. N. Nguyen y A. Günzl. 2014. A New Strategy of RNA Interference That Targets Heterologous Sequences Reveals CITFA1 as an Essential Component of Class I Transcription Factor A in *Trypanosoma brucei*. *Eukaryotic Cell*. 13 (6): 785–795.
- Pimenta, P. F.; G. B. Modi; S. T. Pereira; M. Shahabuddin y D. L. Sacks. 1997. A novel role for the peritrophic matrix in protecting *Leishmania* from the hydrolytic activities of the sandfly midgut. *Parasitology*. 115 (4): 359-369.
- Price, H.; M. Menon; C. Panethymitaki; D. Goulding; P. McKean y D. Smith. 2003. Myristoyl-CoA: protein Nmyristoyltransferase, an essential enzyme and potential drug target in kinetoplastid parasites. *Journal of Biological Chemistry*. 278: 7206-7214.
- Proshkina, G. M.; E. K. Shematorova; S. A. Proshkin; C. Zaros; P. Thuriaux y G. V. Shpakovski. 2006. Ancient origin, functional conservation and fast evolution of DNA-dependent RNA polymerase III. *Nucleic Acids Research*. 34 (13): 3615-3624.
- Rastrojo, A.; F. Carrasco-Ramiro; D. Martín; A. Crespillo; R.M. Reguera; B. Aguado y J. M. Requena. 2013. The transcriptome of *Leishmania major* in the axenic promastigote stage: transcript annotation and relative expression levels by RNA-seq. *BMC genomics*. 14(1):223.
- Rico, M.; F. Zamora; J. González; N. Medrano; R. Marín; R. Barín; S. Caro y A. Lorenzo. 2013. *Leishmania* y VIH, círculo de inmunodepresión. Congreso Nacional de la Sociedad Española de Medicina Interna. Enfermedades infecciosas. Póster A-178.
- Román, F. C. 2011. Caracterización molecular de Bdp1, subunidad del factor de transcripción TFIIB, en *Leishmania major*. Tesis de licenciatura. Director: Dr. Santiago Martínez Calvillo. Facultad de Estudios Superiores Iztacala, UNAM, México D. F.
- Romero, D. P. y E. H. Blackburn. 1991. A conserved secondary structure for telomerase RNA. *Cell*. 67: 343–353.
- Saïda, F. 2008. Structural Characterization of the Interaction between TFIIB Components Bdp1 and Brf1. *Biochemistry*. 47: 13197-13206.
- Saito, R. M.; M. G. Elgort y D. A. Campbell. 1994. A conserved upstream element is essential for transcription of the *Leishmania tarentolae* mini-exon gene. *EMBO Journal*. 13: 5460-5469.
- Saldanha, A. C. Clinical Cure in Diffuse Cutaneous Leishmaniasis (DCL) in Brazil. *Gazeta Médica Bahia*. 79 (3):52-61.

- Sánchez, I. I. 2008. Caracterización molecular del gen de la subunidad mayor (C160) de la RNA Pol III de *Leishmania major*. Tesis de licenciatura. Director: Dr. Santiago Martínez Calvillo. Facultad de Estudios Superiores Iztacala, UNAM, México D. F.
- Schoenberg, D. R. y L. E. Maquat. 2012. Regulation of cytoplasmic mRNA decay. *Nature Reviews Genetics*. 13: 246-259.
- Schramm, L. y N. Hernandez. 2002. Recruitment of RNA Polymerase III to its target promoters. *Genes & Development*. 16: 2593-2620.
- Secretaría de Salud. 2015. Manual para el diagnóstico, tratamiento y control de las Leishmaniasis. Centro Nacional de Vigilancia Epidemiológica y Control de Enfermedades, Dirección General de Programas Preventivos, Programa de Enfermedades Transmitidas por Vector.
- Selvapandiyar, A.; R. Duncan; A. Debrabant; S. Bertholet; G. Screenivas y N. Negi. 2001. Expression of a mutant form of *Leishmania donovani* centrin reduces the growth of the parasite. *Journal of Biological Chemistry*. 276: 43253-43261.
- Sengupta, T.; M. Mukherjee; C. Mandal; A. Das y H. Majumder. 2003. Functional dissection of the C-terminal domain of type II DNA topoisomerase from the kinetoplastid hemoflagellate *Leishmania donovani*. *Nucleic Acids Reserch*. 31: 5305-5316.
- Simpson, L. 1979. Isolation of maxicircle component of kinetoplast DNA from hemoflagellate protozoa. *Proceedings of the National Academy of Sciences. U.S.A.* 76: 1585-11588.
- Simpson, L.; A. M. Simpson, G. Kidane; L. Livingston y T. W. Spithill. 1980. The kinetoplast DNA of the hemoflagellate protozoa. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 29: 1053-1063.
- Singh, R. K.; H. P. Pandey y S. Sundar. 2006. Visceral leishmaniasis (kala-azar): challenges ahead. *Indian Journal of Medical Research*. 123 (3): 331-344.
- Smid, A.; M. Riva; F. Bouet; A. Sentenac y C. Carles. 1995. The association of three subunits with yeast RNA polymerase is stabilized by A14. *Journal of Biological Chemistry*. 270(22): 13534-13540.
- Stoecklin, G.; M. Colombi; I. Raineri; S. Leuenberger, M. Mallaun; M. Schmidlin; B. Gross, M. Lu; T. Kitamura y C. Monroni. 2002. Functional cloning of BRF1, a regulator of ARE-dependent mRNA turnover. *The EMBO Journal*. 21 (17): 4709-4718.
- Thomas S.; A. Green; N. R. Sturm; D. A. Campbell y P. J. Myler. 2009. Histone acetylations mark origins of polycistronic transcription in *Leishmania major*. *BMC Genomics*. 8 (10): 152.
- Vasudevan, G.; N. S. Carter; M. E. Drew; S. M. Beverley; M. A. Sánchez; A. Seyfang; B. Ullman y S. M. Landfear. 1998. Cloning of *Leishmania*

- nucleoside transporter genes by rescue of a transport-deficient mutant. *Proc Natl Acad Sci USA*. 95:9873-9878.
- Vélez, I.; L. López; X. Sánchez; L. Mestra; C. Rojas y E. Rodríguez. 2010. Efficacy of Miltefosine for the Treatment of American Cutaneous Leishmaniasis. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 83(2):351-356.
- Walters, L. L. 1993. *Leishmania* differentiation in natural and unnatural sand fly hosts. *Journal of Eukaryotic Microbiology*. 40:196-206.
- Westergaard, G. G. 2011. Búsqueda de potenciales blancos para el diseño de drogas anti-parasitarias en dominios de interacción proteína-proteína y proteína-ARN en *Trypanosoma cruzi*. Tesis doctoral. Director: Dr. Martín P. Vazquez. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, Argentina.
- WHO. 2010. Control of the leishmaniasis, Technical Report Series 949. (Geneva: World Health Organization).
- Willis, I. M. 1993. RNA polymerase III. *EJB Reviews*. 23-29.
- Wortmann, G.; M. Zapor; R. Ressler; S. Fraser; J. Hartzell; J. Pierson; A. Weintrob y A. Magill. 2010. Liposomal amphotericin B for treatment of cutaneous leishmaniasis. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 83 (5):1028-33.
- Worthey, E.A.; S. Martinez-Calvillo; S., A. Schnauffer; G. Aggarwal; J. Cawthra; G. Fazelinia; C. Fong; G. Fu; M. Hasebrock; G. Hixson; A. C. Ivens; P. Kiser; F. Marsolini; E. Rickel; R. Salavati; E. Sisk; S. M. Sunkin; K. D. Stuart; y P. J. Myler. 2003. *Leishmania major* chromosome 3 contains two long convergent polycistronic gene clusters separated by a tRNA gene. *Nucleic Acids Reserch*. 31: 4201-4210.

Apéndice I. Mapa metodológico



Apéndice II. Secuencia del vector pG-Brf1-5'-pac

A continuación se muestra la secuencia completa del vector pG-Brf1-5'-pac. La secuencia la región UTR-5' se muestra en amarillo. Los oligonucleótidos empleados para amplificar esta región se muestran en negritas y cursivas. Esta región fue clonada en el vector pGEM-T Easy.

```
1      AATCACTAGT GAATTTCGCGG CCGCCTGCAG GTCGACCATA TGGGAGAGCT CCCAACGCGT
61     TGGATGCATA GCTTGAGTAT TCTATAGTGT CACCTAAATA GCTTGGCGTA ATCATGGTCA
121    TAGCTGTTTC CTGTGTGAAA TTGTTATCCG CTCACAATTC CACACAACAT ACGAGCCGGA
181    AGCATAAAGT GTAAAGCCTG GGGTGCCTAA TGAGTGAGCT AACTCACATT AATTGCGTTG
241    CGCTCACTGC CCGCTTTCCA GTCGGGAAAC CTGTGCGTCC AGCTGCATTA ATGAATCGGC
301    CAACGCGCGG GGAGAGGCGG TTTGCGTATT GGGCGCTCTT CCGCTTCCTC GCTCACTGAC
361    TCGCTGCGCT CGGTCGTTCG GCTGCGGCGA GCGGTATCAG CTCACTCAAA GGCGGTAATA
421    CGGTTATCCA CAGAATCAGG GGATAACGCA GGAAAGAACA TGTGAGCAAA AGGCCAGCAA
481    AAGGCCAGGA ACCGTAAAAA GGCCGCGTTG CTGGCGTTTT TCCATAGGCT CCGCCCCCT
541    GACGAGCATC ACAAAAATCG ACGCTCAAGT CAGAGGTGGC GAAACCCGAC AGGACTATAA
601    AGATAACCAGG CGTTTCCCCC TGGAAGCTCC CTCGTGCGCT CTCCTGTTCC GACCCTGCCG
661    CTTACCGGAT ACCTGTCCGC CTTTCTCCCT TCGGGAAGCG TGGCGCTTTC TCATAGCTCA
721    CGCTGTAGGT ATCTCAGTTC GGTGTAGGTC GTTCGCTCCA AGCTGGGCTG TGTGCACGAA
781    CCCCCCGTTC AGCCCCACCG CTGCGCCTTA TCCGGTAACT ATCGTCTTGA GTCCAACCCG
841    GTAAGACACG ACTTATCGCC ACTGGCAGCA GCCACTGGTA ACAGGATTAG CAGAGCGAGG
901    TATGTAGGCG GTGCTACAGA GTTCTTGAAG TGGTGGCCTA ACTACGGCTA CACTAGAAGA
961    ACAGTATTTG GTATCTGCGC TCTGCTGAAG CCAGTTACCT TCGGAAAAG AGTTGGTAGC
1021   TCTTGATCCG GCAAACAAAC CACCGCTGGT AGCGGTGGTT TTTTTGTTT CAAGCAGCAG
1081   ATTACGCGCA GAAAAAAGG ATCTCAAGAA GATCCTTTGA TCTTTTCTAC GGGGTCTGAC
1141   GCTCAGTGGA ACGAAAACCT ACGTTAAGGG ATTTTGGTCA TGAGATTATC AAAAAGGATC
1201   TTCACCTAGA TCCTTTTAAA TTAAAAATGA AGTTTTAAAT CAATCTAAAG TATATATGAG
1261   TAAACTTGGT CTGACAGTTA CCAATGCTTA ATCAGTGAGG CACCTATCTC AGCGATCTGT
1321   CTATTTGTTT CATCCATAGT TGCCTGACTC CCCGTCGTGT AGATAACTAC GATACGGGAG
1381   GGCTTACCAT CTGGCCCCAG TGCTGCAATG ATACCGCGAG ACCCACGCTC ACCGGCTCCA
1441   GATTTATCAG CAATAAACCA GCCAGCCGGA AGGGCCGAGC GCAGAAGTGG TCCTGCAACT
1501   TTATCCGCCT CCATCCAGTC TATTAATTGT TGCCGGAAG CTAGAGTAAG TAGTTCGCCA
1561   GTTAATAGTT TGCGCAACGT TGTTGCCATT GCTACAGGCA TCGTGGTGTC ACGCTCGTCG
1621   TTTGGTATGG CTTCAATCAG CTCGGTTCC CAACGATCAA GCGGAGTTAC ATGATCCCCC
1681   ATGTTGTGCA AAAAAGCGGT TAGCTCCTTC GGTCTCCGA TCGTTGTCAG AAGTAAGTTG
1741   GCCGAGTGT TATCACTCAT GGTATGGCA GCACTGCATA ATTCTCTTAC TGTCATGCCA
1801   TCCGTAAGAT GCTTTTCTGT GACTGGTGAG TACTCAACCA AGTCATTCTG AGAATAGTGT
1861   ATGCGGCGAC CGAGTTGCTC TTGCCCGGCG TCAATACGGG ATAATACCGC GCCACATAGC
1921   AGAACTTTAA AAGTGCTCAT CATTGGAAAA CGTTCTTCGG GCGGAAAAC CTCAAGGATC
1981   TTACCGCTGT TGAGATCCAG TTCGATGTAA CCCACTCGTG CACCCAACCTG ATCTTCAGCA
2041   TCTTTTACTT TCACCAGCGT TTCTGGGTGA GCAAAAACAG GAAGGCAAAA TGCCGCAAAA
2101   AAGGGAATAA GGGCGACACG GAAATGTTGA ATACTCATA TCTTCTTTT TCAATATTAT
2161   TGAAGCATTT ATCAGGGTTA TTGTCTCATG AGCGGATACA TATTTGAATG TATTTAGAAA
2221   AATAAACAAA TAGGGGTTCC GCGCACATTT CCCCAGAAAAG TGCCACCTGA TGCGGTGTGA
```

2281 AATACCGCAC AGATGCGTAA GGAGAAAATA CCGCATCAGG AAATTGTAAG CGTTAATATT
 2341 TTGTTAAAAT TCGCGTTAAA TTTTGTGTTAA ATCAGCTCAT TTTTAAACCA ATAGGCCGAA
 2401 ATCGGCAAAA TCCCTTATAA ATCAAAAGAA TAGACCGAGA TAGGGTTGAG TGTTGTTCCA
 2461 GTTTGGAAACA AGAGTCCACT ATTAAAGAAC GTGGACTCCA ACGTCAAAGG GCGAAAAACC
 2521 GTCTATCAGG GCGATGGCCC ACTACGTGAA CCATCACCCCT AATCAAGTTT TTTGGGGTCG
 2581 AGGTGCCGTA AAGCACTAAA TCGGAACCCT AAAGGGAGCC CCCGATTTAG AGCTTGACGG
 2641 GGAAAGCCGG CGAACGTGGC GAGAAAGGAA GGAAGAAAG CGAAAGGAGC GGGCGCTAGG
 2701 GCGCTGGCAA GTGTAGCGGT CACGCTGCGC GTAACCACCA CACCCGCCGC GCTTAATGCG
 2761 CCGCTACAGG GCGCGTCCAT TCGCCATTCA GGCTGCGCAA CTGTTGGGAA GGGCGATCGG
 2821 TGCGGGCCTC TTCGCTATTA CGCCAGCTGG CGAAAGGGGG ATGTGCTGCA AGGCGATTAA
 2881 GTTGGGTAAAC GCCAGGGTTT TCCCAGTCAC GACGTTGTAA AACGACGGCC AGTGAATTGT
 2941 AATACGACTC ACTATAGGGC GAATTGGGCC CGACGTCGCA TGCTCCCGGC CGCCATGGCG
 3001 GCCGCGGGAA TTCGATT **TCT AGAACGGCAC ACATCTACTC GCGCCTCCCT TCCTTCTCTC**
 3061 **GTCACGAAAA CGCGGAGAGT ACAGTCGCGG CTCGGTGCAT GAGGATCACC GAAGGCGTTC**
 3121 **CCCCCTCTCC CAAACTCCGT GTCTCATCTC TTCTGTGTGC TCTCAAAGAG CGCCGTTTTA**
 3181 **CTAAGTTGCA TCCAGCACAG TGGAGCGCAA GCGGTGCACC ACCGATAGCC ACATCTCCCG**
 3241 **CTCTCTCCAT CGGCTCCTTC TCTATTTGTT TCCGTCCTCG TTTCTGCTCT TCCCTGCTTT**
 3301 **GGACACTTCA CGCGTATCCC TTGCGGTGCG CGGCGTGTCT ACTACCGCGA CGAGGGCAAC**
 3361 **TGCCGTCTGT AGCGCCTTGT CCTCCTGCTG ATGACCGCGC AGCGGCTGCT GACGTGACGA**
 3421 **CGTTGTCTCT CTGCTCTGGA ATCGTGCGCG TGCTTTTTGG TTTGCTCCCC ATCGGCATTG**
 3481 **CTGCTGCGGG TGTCGGCGCA GTGTGTACGG CTGCTTACCT TTTCTACCG CT **CCAGCA****
 3541 **GTTGACGCTT CACCGAATTC**

Apéndice III. Secuencia del vector pG-Brf1-5'-hyg

A continuación se muestra la secuencia completa del vector pG-Brf1-5'-hyg. La secuencia la región UTR-5' se muestra en amarillo. Los oligonucleótidos empleados para amplificar esta región se muestran en negritas y cursivas. Esta región fue clonada en el vector pGEM-T Easy.

```
1      AATCACTAGT GAATTCGCGG CCGCCTGCAG GTCGACCATA TGGGAGAGCT CCCAACGCGT
61     TGGATGCATA GCTTGAGTAT TCTATAGTGT CACCTAAATA GCTTGGCGTA ATCATGGTCA
121    TAGCTGTTTC CTGTGTGAAA TTGTTATCCG CTCACAATTC CACACAACAT ACGAGCCGGA
181    AGCATAAAGT GTAAAGCCTG GGGTGCCTAA TGAGTGAGCT AACTCACATT AATTGCGTTG
241    CGCTCACTGC CCGCTTTCCA GTCGGGAAAC CTGTGCTGCC AGCTGCATTA ATGAATCGGC
301    CAACGCGCGG GGAGAGGCGG TTTGCGTATT GGGCGCTCTT CCGCTTCCCTC GCTCACTGAC
361    TCGCTGCGCT CGGTCGTTCG GCTGCGGCGA GCGGTATCAG CTCACTCAAA GGCGGTAATA
421    CGGTTATCCA CAGAATCAGG GGATAACGCA GGAAAGAACA TGTGAGCAAA AGGCCAGCAA
481    AAGGCCAGGA ACCGTAAAAA GGCCGCGTTG CTGGCGTTTT TCCATAGGCT CCGCCCCCCT
541    GACGAGCATC ACAAAAATCG ACGCTCAAGT CAGAGGTGGC GAAACCCGAC AGGACTATAA
601    AGATAACCAGG CGTTTTCCCC TGGAAAGTCC CTCGTGCGCT CTCCTGTTCC GACCCTGCCG
661    CTTACCGGAT ACCTGTCCGC CTTTCTCCCT TCGGGAAGCG TGGCGCTTTC TCATAGCTCA
721    CGCTGTAGGT ATCTCAGTTC GGTGTAGGTC GTTCGCTCCA AGCTGGGCTG TGTGCACGAA
781    CCCCCCGTTC AGCCCCAGCG CTGCGCCTTA TCCGGTAACT ATCGTCTTGA GTCCAACCCG
841    GTAAGACACG ACTTATCGCC ACTGGCAGCA GCCACTGGTA ACAGGATTAG CAGAGCGAGG
901    TATGTAGGCG GTGCTACAGA GTTCTTGAAG TGGTGGCCTA ACTACGGCTA CACTAGAAGA
961    ACAGTATTTG GTATCTGCGC TCTGCTGAAG CCAGTTACCT TCGGAAAAAG AGTTGGTAGC
1021   TCTTGATCCG GCAAACAAAC CACCGCTGGT AGCGGTGGTT TTTTTGTTTG CAAGCAGCAG
1081   ATTACGCGCA GAAAAAAGG ATCTCAAGAA GATCCTTTGA TCTTTTCTAC GGGGTCTGAC
1141   GCTCAGTGGA ACGAAAATC ACGTTAAGGG ATTTTGGTCA TGAGATTATC AAAAAGGATC
1201   TTCACCTAGA TCCTTTTAAA TTAAAAATGA AGTTTTAAAT CAATCTAAAG TATATATGAG
1261   TAAACTTGGT CTGACAGTTA CCAATGCTTA ATCAGTGAGG CACCTATCTC AGCGATCTGT
1321   CTATTTTCGTT CATCCATAGT TGCCTGACTC CCCGTCGTGT AGATAACTAC GATACGGGAG
1381   GGCTTACCAT CTGGCCCCAG TGCTGCAATG ATACCGCGAG ACCCACGCTC ACCGGCTCCA
1441   GATTTATCAG CAATAAACCA GCCAGCCGGA AGGGCCGAGC GCAGAAGTGG TCCTGCAACT
1501   TTATCCGCCT CCATCCAGTC TATTAATTGT TGCCGGGAAG CTAGAGTAAG TAGTTCGCCA
1561   GTTAATAGTT TGCGCAACGT TGTTGCCATT GCTACAGGCA TCGTGGTGTG ACGCTCGTGC
1621   TTTGGTATGG CTTCAATCAG CTCCGGTTCC CAACGATCAA GCGGAGTTAC ATGATCCCCC
1681   ATGTTGTGCA AAAAAGCGGT TAGCTCCTTC GGTCTCCGA TCGTTGTGAG AAGTAAGTTG
1741   GCCGCAGTGT TATCACTCAT GGTATGGCA GCACTGCATA ATTCTCTTAC TGTGATGCCA
1801   TCCGTAAGAT GCTTTTCTGT GACTGGTGAG TACTCAACCA AGTCATTCTG AGAATAGTGT
1861   ATGCGGCGAC CGAGTTGCTC TTGCCCGGCG TCAATACGGG ATAATACCGC GCCACATAGC
1921   AGAACTTTAA AAGTGCTCAT CATTGGAAAA CGTTCTTCGG GCGGAAAACT CTCAAGGATC
1981   TTACCGCTGT TGAGATCCAG TTCGATGTAA CCCACTCGTG CACCCAACTG ATCTTCAGCA
2041   TCTTTTACTT TCACCAGCGT TTCTGGGTGA GCAAAAACAG GAAGGCAAAA TGCCGCAAAA
2101   AAGGGAATAA GGGCGACACG GAAATGTTGA ATACTCATA TCTTCTTTTT TCAATATTAT
2161   TGAAGCATTT ATCAGGGTTA TTGTCTCATG AGCGGATACA TATTTGAATG TATTTAGAAA
2221   AATAAACAAA TAGGGGTTCC GCGCACATTT CCCCAGAAAAG TGCCACCTGA TGCGGTGTGA
2281   AATACCGCAC AGATGCGTAA GGAGAAAATA CCGCATCAGG AAATTGTAAG CGTTAATATT
2341   TTGTTAAAAA TCGCGTTAAA TTTTTGTTAA ATCAGCTCAT TTTTAAACCA ATAGGCCGAA
2401   ATCGGCAAAA TCCCTTATAA ATCAAAAAGAA TAGACCGAGA TAGGGTTGAG TGTTGTTCCA
2461   GTTTGGAACA AGAGTCCACT ATTAAAGAAC GTGGACTCCA ACGTCAAAGG GCGAAAAACC
2521   GTCTATCAGG GCGATGGCCC ACTACGTGAA CCATCACCTT AATCAAGTTT TTTGGGGTGC
2581   AGGTGCCGTA AAGCACTAAA TCGGAACCTT AAAGGGAGCC CCCGATTTAG AGCTTGACGG
2641   GGAAAGCCGG CGAACGTGGC GAGAAAGGAA GGAAGAAAG CGAAAGGAGC GGGCGCTAGG
```

2701 GCGCTGGCAA GTGTAGCGGT CACGCTGCGC GTAACCACCA CACCCGCCGC GCTTAATGCG
 2761 CCGCTACAGG GCGCGTCCAT TCGCCATTCA GGCTGCGCAA CTGTTGGGAA GGGCGATCGG
 2821 TGCGGGCCTC TTCGCTATTA CGCCAGCTGG CGAAAGGGGG ATGTGCTGCA AGGCGATTAA
 2881 GTTGGGTAAC GCCAGGGTTT TCCCAGTCAC GACGTTGTAA AACGACGGCC AGTGAATTGT
 2941 AATACGACTC ACTATAGGGC GAATTGGGCC CGACGTCGCA TGCTCCCGGC CGCCATGGCG
 3001 GCCGCGGGAA TTCGATT **TCT AGAACGGCAC ACATCTACTC GCGCCTCCCT TCCTTCTCTC**
 3061 **GTCACGAAAA CGCGGAGAGT ACAGTCGCGG CTCGGTGCAT GAGGATCACC GAAGGCGTTC**
 3121 **CCCCTCTCCC CAAACTCCGT GTCTCATCTC TTCTGTGTGC TCTCAAAGAG CGCCGTTTTA**
 3181 **CTAAGTTGCA TCCAGCACAG TGGAGCGCAA GCGGTGCACC ACCGATAGCC ACATCTCCCG**
 3241 **CTCTCTCCAT CGGCTCCTTC TCTATTTGTT TCCGTCCCTCG TTTCTGCTCT TCCCTGCTTT**
 3301 **GGACACTTCA CGCGTATCCC TTGCGGTGCG CGGCGTGTCT ACTACCGCGA CGAGGGCAAC**
 3361 **TGCCGTCTGT AGCGCCTTGT CCTCCTGCTG ATGACCGCGC AGCGGCTGCT GACGTGACGA**
 3421 **CGTTGTCTCT CTGCTCTGGA ATCGTGCGCG TGCTTTTTTG TTTGCTCCCC ATCGGCATTG**
 3481 **CTGCTGCGGG TGTCGGCGCA GTGTGTACGG CTGCTTACCT TTTCCCTACCG CTGC **CCAGCA****
 3541 **GTTGACGCTT CACCACTAGT**

Apéndice IV. Secuencia del vector pG-Brf1-3'

A continuación se muestra la secuencia completa del vector pG-Brf1-3'. La secuencia la región UTR-3' se muestra en verde. Los oligonucleótidos empleados para amplificar esta región se muestran en negritas y cursivas. Esta región fue clonada en el vector pGEM-T Easy.

```
1      AATCACTAGT GAATTCGCGG CCGCCTGCAG GTCGACCATA TGGGAGAGCT CCCAACGCGT
61     TGGATGCATA GCTTGAGTAT TCTATAGTGT CACCTAAATA GCTTGGCGTA ATCATGGTCA
121    TAGCTGTTTC CTGTGTGAAA TTGTTATCCG CTCACAATTC CACACAACAT ACGAGCCGGA
181    AGCATAAAGT GTAAAGCCTG GGGTGCCTAA TGAGTGAGCT AACTCACATT AATTGCGTTG
241    CGCTCACTGC CCGCTTTCCA GTCGGGAAAC CTGTGCTGCC AGCTGCATTA ATGAATCGGC
301    CAACGCGCGG GGAGAGGCGG TTTGCGTATT GGGCGCTCTT CCGCTTCCCTC GCTCACTGAC
361    TCGCTGCGCT CGGTCGTTCG GCTGCGGCGA GCGGTATCAG CTCACTCAAA GGCGGTAATA
421    CGGTTATCCA CAGAATCAGG GGATAACGCA GGAAAGAACA TGTGAGCAAA AGGCCAGCAA
481    AAGGCCAGGA ACCGTAAAAA GGCCGCGTTG CTGGCGTTTT TCCATAGGCT CCGCCCCCTC
541    GACGAGCATC ACAAAAATCG ACGCTCAAGT CAGAGGTGGC GAAACCCGAC AGGACTATAA
601    AGATAACCAGG CGTTTTCCCC TGGAAAGTCC CTCGTGCGCT CTCCTGTTCC GACCCTGCCG
661    CTTACCGGAT ACCTGTCCGC CTTTCTCCCT TCGGGAAGCG TGGCGCTTTC TCATAGCTCA
721    CGCTGTAGGT ATCTCAGTTC GGTGTAGGTC GTTCGCTCCA AGCTGGGCTG TGTGCACGAA
781    CCCCCGTTTC AGCCCCACCG CTGCGCCTTA TCCGGTAACT ATCGTCTTGA GTCCAACCCG
841    GTAAGACACG ACTTATCGCC ACTGGCAGCA GCCACTGGTA ACAGGATTAG CAGAGCGAGG
901    TATGTAGGCG GTGCTACAGA GTTCTTGAAG TGGTGGCCTA ACTACGGCTA CACTAGAAGA
961    ACAGTATTTG GTATCTGCGC TCTGCTGAAG CCAGTTACCT TCGGAAAAAG AGTTGGTAGC
1021   TCTTGATCCG GCAAACAAAC CACCGCTGGT AGCGGTGGTT TTTTTGTTTG CAAGCAGCAG
1081   ATTACGCGCA GAAAAAAGG ATCTCAAGAA GATCCTTTGA TCTTTTCTAC GGGGTCTGAC
1141   GCTCAGTGGA ACGAAAATC ACGTTAAGGG ATTTTGGTCA TGAGATTATC AAAAAGGATC
1201   TTCACCTAGA TCCTTTTAAA TTAAAAATGA AGTTTTAAAT CAATCTAAAG TATATATGAG
1261   TAAACTTGGT CTGACAGTTA CCAATGCTTA ATCAGTGAGG CACCTATCTC AGCGATCTGT
1321   CTATTTTCGTT CATCCATAGT TGCCTGACTC CCCGTCGTGT AGATAACTAC GATACGGGAG
1381   GGCTTACCAT CTGGCCCCAG TGCTGCAATG ATACCGCGAG ACCCACGCTC ACCGGCTCCA
1441   GATTTATCAG CAATAAACCA GCCAGCCGGA AGGGCCGAGC GCAGAAGTGG TCCTGCAACT
1501   TTATCCGCCT CCATCCAGTC TATTAATTGT TGCCGGGAAG CTAGAGTAAG TAGTTCGCCA
1561   GTTAATAGTT TGCGCAACGT TGTTGCCATT GCTACAGGCA TCGTGGTGTG ACGCTCGTGC
1621   TTTGGTATGG CTTCAATCAG CTCCGGTTCC CAACGATCAA GCGGAGTTAC ATGATCCCCC
1681   ATGTTGTGCA AAAAAGCGGT TAGCTCCTTC GGTCTCCGA TCGTTGTGCA AAGTAAGTTG
1741   GCCGAGTGT TATCACTCAT GGTATGGCA GCACTGCATA ATTCTCTTAC TGTGATGCCA
1801   TCCGTAAGAT GCTTTTCTGT GACTGGTGAG TACTCAACCA AGTCATTCTG AGAATAGTGT
1861   ATGCGGCGAC CGAGTTGCTC TTGCCCGGCG TCAATACGGG ATAATACCGC GCCACATAGC
1921   AGAACTTTAA AAGTGCTCAT CATTGGAAAA CGTTCTTCGG GCGGAAAACT CTCAAGGATC
1981   TTACCGCTGT TGAGATCCAG TTCGATGTAA CCCACTCGTG CACCCAACTG ATCTTCAGCA
2041   TCTTTTACTT TCACCAGCGT TTCTGGGTGA GCAAAAACAG GAAGGCAAAA TGCCGCAAAA
2101   AAGGGAATAA GGGCGACACG GAAATGTTGA ATACTCATA TCTTCTTTTT TCAATATTAT
2161   TGAAGCATTT ATCAGGGTTA TTGTCTCATG AGCGGATACA TATTTGAATG TATTTAGAAA
2221   AATAAACAAA TAGGGGTTCC GCGCACATTT CCCCAGAAAG TGCCACCTGA TGCGGTGTGA
2281   AATACCGCAC AGATGCGTAA GGAGAAAATA CCGCATCAGG AAATTGTAAG CGTTAATATT
2341   TTGTTAAAAA TCGCGTTAAA TTTTTGTTAA ATCAGCTCAT TTTTAAACCA ATAGGCCGAA
2401   ATCGGCAAAA TCCCTTATAA ATCAAAAAGAA TAGACCGAGA TAGGGTTGAG TGTTGTTCCA
2461   GTTTGGAACA AGAGTCCACT ATTAAAGAAC GTGGACTCCA ACGTCAAAGG GCGAAAAACC
2521   GTCTATCAGG GCGATGGCCC ACTACGTGAA CCATCACCTT AATCAAGTTT TTTGGGGTGC
2581   AGGTGCCGTA AAGCACTAAA TCGGAACCTT AAAGGGAGCC CCCGATTTAG AGCTTGACGG
2641   GGAAAGCCGG CGAACGTGGC GAGAAAGGAA GGAAGAAAG CGAAAGGAGC GGGCGCTAGG
```

2701 GCGCTGGCAA GTGTAGCGGT CACGCTGCGC GTAACCACCA CACCCGCCGC GCTTAATGCG
 2761 CCGCTACAGG GCGCGTCCAT TCGCCATTCA GGCTGCGCAA CTGTTGGGAA GGGCGATCGG
 2821 TGCGGGCCTC TTCGCTATTA CGCCAGCTGG CGAAAGGGGG ATGTGCTGCA AGGCGATTAA
 2881 GTTGGGTAAC GCCAGGGTTT TCCCAGTCAC GACGTTGTAA AACGACGGCC AGTGAATTGT
 2941 AATACGACTC ACTATAGGGC GAATTGGGCC CGACGTCGCA TGCTCCCGGC CGCCATGGCG
 3001 GCCGCGGGAA TTCGATT **GAG CTCCGAATAC GCTGCCAGAG TAGGGCGGGG** AGCAGGGTAC
 3061 GCAGGGGTCA GCACAGCTTG GCTGTCCTGC ATCTTCTGCT CTTCGTCGTT GTGACCGCGT
 3121 TCGCTTGTTT GCTTGTGTGC ATGCGCAGCC GGCGCAAACA AAAAAGGGAG ACCAGCAACG
 3181 ACGGCGCCCC CCCCCCCCCC CCCCCTCCGC CCACTGGCGG GCGGGGGCGG CTTCCGGTGT
 3241 ATGATATGCT CCGTAAAGGC AGCGCTCATT GACGCAGGT CCATGTCGTC CCACGCTGTC
 3301 TCTCTCTCTC TCTCTCTCTT TCGAGAAAGA AGAATGGATC TTCGCGGTGC ACACCTTTTT
 3361 GTTTTAGAGG CACACGTATA CGAGTGACCA GCGCGTGGGG AGGTTGGGGG AGGAGAGTGA
 3421 GGTGATGGTG GTGTTGGTGA CACAGTTGAT GACGCGCTGT CTATCCGACA CAAGGGCTAC
 3481 TTTTCACTTG CCGGGACTCG CCTATTCTGT **C GGGCCTAAG AGACGAAAGC TCTCGAG**

Apéndice V. Secuencia del vector p Δ Brf1-Pac

A continuación se muestra la secuencia completa del vector p Δ Brf1-Pac. La secuencia la región UTR-5' se muestra en amarillo, la secuencia de la región UTR-3' en verde, y la secuencia del gen puromicina en rosa. Los oligonucleótidos empleados para amplificar estas regiones se muestran en negritas y cursivas. Dicho cassette de resistencia a pac fue clonado en el vector pBlueScript SK-.

```

1      TCGAGGGGGG GCCCGGTACC CAATTCGCCC TATAGTGAGT CGTATTACAA TTCACTGGCC
61     GTCGTTTTAC AACGTCGTGA CTGGGAAAAC CCTGGCGTTA CCCAACTTAA TCGCCTTGCA
121    GCACATCCCC CTTTCGCCAG CTGGCGTAAT AGCGAAGAGG CCCGCACCGA TCGCCCTTCC
181    CAACAGTTGC GCAGCCTGAA TGGCGAATGG AAATTGTAAG CGTTAATATT TTGTTAAAAAT
241    TCGCGTTAAA TTTTTGTTAA ATCAGCTCAT TTTTAAACCA ATAGGCCGAA ATCGGCAAAA
301    TCCCTTATAA ATCAAAAAGAA TAGACCGAGA TAGGGTTGAG TGTGTTCCTA GTTTGGAACA
361    AGAGTCCACT ATTAAAGAAC GTGGACTCCA ACGTCAAAGG GCGAAAAAACC GTCTATCAGG
421    GCGATGGCCC ACTACGTGAA CCATCACCCCT AATCAAGTTT TTTGGGGTCG AGGTGCCGTA
481    AAGACTAAA TCGGAACCCT AAAGGGAGCC CCCGATTTAG AGCTTGACGG GGAAAGCCGG
541    CGAACGTGGC GAGAAAGGAA GGAAGAAAG CGAAAGGAGC GGGCGCTAGG GCGCTGGCAA
601    GTGTAGCGGT CACGCTGCGC GTAACCACCA CACCCGCCGC GCTTAATGCG CCGCTACAGG
661    GCGCGTCAGG TGGCACTTTT CGGGGAAATG TGCGCGGAAC CCCTATTTGT TTATTTTTCT
721    AAATACATTC AAATATGTAT CCGCTCATGA GACAATAACC CTGATAAATG CTTCAATAAT
781    ATGAAAAAG GAAGAGTATG AGTATTCAAC ATTTCCGTGT CGCCCTTATT CCCTTTTTTG
841    CGGCATTTTG CCTTCCTGTT TTTGCTCACC CAGAAACGCT GGTGAAAGTA AAAGATGCTG
901    AAGATCAGTT GGGTGCACGA GTGGGTTACA TCGAACTGGA TCTCAACAGC GGTAAGATCC
961    TTGAGAGTTT TCGCCCCGAA GAACGTTTTT CAATGATGAG CACTTTTAAA GTTCTGCTAT
1021   GTGGCGCGGT ATTATCCCGT ATTGACGCCG GGCAAGAGCA ACTCGGTGCG CGCATACACT
1081   ATTCTCAGAA TGACTTGGTT GAGTACTCAC CAGTCACAGA AAAGCATCTT ACGGATGGCA
1141   TGACAGTAAG AGAATTATGC AGTGTGCCA TAACCATGAG TGATAACACT GCGGCCAACT
1201   TACTTCTGAC AACGATCGGA GGACCGAAGG AGCTAACCGC TTTTTTGCAC AACATGGGGG
1261   ATCATGTAAC TCGCCTTGAT CGTTGGGAAC CGGAGCTGAA TGAAGCCATA CCAAACGACG
1321   AGCGTGACAC CACGATGCCT GTAGCAATGG CAACAACGTT GCGCAAATA TTAAGTGGCG
1381   AACTACTTAC TCTAGCTTCC CGGCAACAAT TAATAGACTG GATGGAGCGG GATAAAGTTG
1441   CAGGACCACT CTGCGCTCGG GCCCTCCGG CTGGCTGGTT TATTGCTGAT AAATAGTGAG
1501   CCGGTGAGCG TGGGTCTCGC GGTATCATTG CAGCACTGGG GCCAGATGGT AAGCCCTCCC
1561   GTATCGTAGT TATCTACACG ACGGGGAGTC AGGCAACTAT GGATGAACGA AATAGACAGA
1621   TCGCTGAGAT AGGTGCCTCA CTGATTAAGC ATTGGTAACT GTCAGACCAA GTTTACTCAT
1681   ATATACTTTA GATTGATTTA AAACCTCATT TTTAATTTAA AAGGATCTAG GTGAAGATCC
1741   TTTTGTGATA TCTCATGACC AAAATCCCTT AACGTGAGTT TCGTTCAC TGAGCGTCAG
1801   ACCCGTAGA AAAGATCAA GGATCTTCTT GAGATCCTTT TTTTCTGCGC GTAATCTGCT
1861   GCTTGCAAAC AAAAAACCA CCGTACCAG CGGTGGTTT TTTGCCGGAT CAAGAGCTAC
1921   CAACTCTTTT TCCGAAGGTA ACTGGCTTCA GCAGAGCGCA GATACCAAAT ACTGTCCTTC
1981   TAGTGTAGCC GTAGTTAGGC CACCACTTCA AGAACTCTGT AGCACCCCT ACATACCCTCG
2041   CTCTGCTAAT CCTGTTACCA GTGGCTGCTG CCAGTGGCGA TAAGTCGTGT CTTACCGGGT
2101   TGGACTCAAG ACGATAGTTA CCGGATAAGG CGCAGCGGTC GGGCTGAACG GGGGGTTCGT
2161   GCACACAGCC CAGCTTGAG CGAACGACCT ACACCGAACT GAGATACCTA CAGCGTGAGC
2221   TATGAGAAAG CGCCACGCTT CCCGAAGGGA GAAAGGCGGA CAGGTATCCG GTAAGCGGCA
2281   GGGTCGGAAC AGGAGAGCGC ACGAGGGAGC TTCCAGGGGG AAACGCCTGG TATCTTTATA
2341   GTCTGTTCGG GTTTCGCCAC CTCTGACTTG AGCGTGCATT TTTGTGATGC TCGTCAGGGG
2401   GGCGGAGCCT ATGGA AAAACGCCAGCAACG CGGCCTTTTT ACGGTTCCTG GCCTTTTGCT
2461   GGCTTTTGC TCACATGTTT TTTCTGCGT TATCCCCTGA TTCTGTGGAT AACCGTATTA
2521   CGCCTTTGA GTGAGCTGAT ACCGCTCGC GCAGCCGAAC GACCGAGCGC AGCGAGTACG
2581   TGAGCGAGGA AGCGGAAGAG CGCCAATAC GCAAACCGCC TCTCCCCGCG CGTTGGCCGA
2641   TTCATTAATG CAGCTGGCAC GACAGGTTTC CCGACTGGAA AGCGGGCAGT GAGCGCAACG
2701   CAATTAATGT GAGTTAGCTC ACTCATTAGG CACCCAGGC TTTACTACTT ATGCTTCCGG
2761   CTCGTATGTT GTGTGGAATT GTGAGCGGAT AACAATTTCA CACAGGAAAC AGCTATGACC

```

2821 ATGATTACGC CAAGCTCGAA ATTAACCCCTC ACTAAAGGGA ACAAAGCTG GAGCTCCACC
 2881 GCGGTGGCGG CCA**TCTAGAG** **CGGCACACAT** **CTACTCGCGC** CTCCTTCCT TCTCTCGTCA
 2941 **CGAAAACGCG** GAGAGTACAG TCGCGGCTCG GTGCATGAGG ATCACCGAAG GCGTTCCCCC
 3001 TCTCCCCAAA CTCCGTGTCT CATCTCTTCT GTGTGCTCTC AAAGAGCGCC GTTTTACTAA
 3061 GTTCATCCA GCACAGTGA GCGCAAGCGG TGCACCACCG ATAGCCACAT CTCCCCTCT
 3121 CTCCATCGGC TCCTTCTCTA TTTGTTTCCG TCCTCGTTTC TGCTTTCCC TGCTTTGGAC
 3181 ACTTCACGCG TATCCCTTGC GGTGCGCGGC GTGTCTACTA CCGCGACGAG GGCAACTGCC
 3241 GTCTGTAGCG CCTTGTCTCT CTGCTGATGA CCGCGCAGCG GCTGCTGACG TGACGACGTT
 3301 GTCTCTCTGC TCTGGAATCG TGCGCGTGCT TTTTGGTTTG CTCCCATCG GCATTGCTGC
 3361 TGCGGGTGTC GGCAGTGT **GTACGGCTGC** TTACCTTTTC CTACCGCTGC **CCAGCAGTTG**
 3421 **ACGCTTCACC** **GAATTC**GAAT TCGAAAGCTC ACCTCATTCC TCCCTCCTCA CACCATCATC
 3481 GGCAATCCATA GAGACACGTG CCGTAGAAC GATACAGCTC ACGCGCACAG AGAGGCGTGT
 3541 TCTGGTCTGTG CGCATCATCG GCACAGCACT GGCGGACGAA ACTCGCACAC AGGCACGCCG
 3601 CCTCCTTTCA CCCGTATAG ATAGTTGAAT TAGACGCCCT CCTCCTCCCT CATCATCGCC
 3661 GTCGTATCC GGGTCCGAGC ACTACGGCCG CCACGACCGG TGCCGCCACC ATCCCCTGAC
 3721 CCACGCCCTT GACCCCTCAC AAGGAGACGA CCTTCCATGA CCGAGTACAA GCCCACGGTG
 3781 CGCTCGCCA CCCGCGACGA CGTCCCCCGG GCCGTACGCA CCCTCGCCGC CGCGTTCCGC
 3841 GACTACCCCG CCACGCGCCA CACCGTCGAC CCGGACCGCC ACATCGAGCG GGTCACCGAG
 3901 CTGCAAGAAC TCTTCCTCAC GCGCGTCGGG CTCGACATCG GCAAGGTGTG GGTCGCGGAC
 3961 GACGGCGCCG CGGTGGCGGT CTGGACCACG CCGGAGAGCG TCGAAGCGGG GGCGGTGTTT
 4021 GCCGAGATCG GCCCGCGCAT GGCCGAGTTG AGCGGTTCCC GGCTGGCCGC GCAGCAACAG
 4081 ATGGAAGGCC TCCTGGCGCC GCACCCGCC AAGGAGCCCG CGTGGTTTCT GGCCACCGTC
 4141 GGCTCTCGC CCGACCACCA GGGCAAGGGT CTGGGCAGCG CCGTCGTGCT CCCCAGAGTG
 4201 GAGCGGCCG AGCGCGCCGG GGTGCCCGC TTCCTGGAGA CCTCCGCGC CCGCAACCTC
 4261 CCTTCTACG AGCGGCTCGG CTTACCCGTC ACCCGGACG TCGAGGTGCC CGAAGACCG
 4321 CGCACTGGT GCATGACCCG CAAGCCCGT GCCTGAATCC CGCCCGCACC CGCGCGCGT
 4381 CAGGCCCGT GTCGTCGTG TCTTTCCATT TTTTTTTTGT GTGTGGTGGT GATTTGAGCT
 4441 GCTCTCCGTT GTGTGCTGGG GACCTCCTT CCCTCGATCT CCTCGTGGG GGTCTCCGAC
 4501 GCGCAGACGC GGTGCGTGGC AGCGTGCACG TGCTGTCGCC GTGGCTGTAG TTGCGAGCGG
 4561 AGAGAGAGAG AGAGGGAGGG AGGGAGGCA GAGGGCAGAG GACATGCGGG TGGGAACGTG
 4621 CACCGCCCTC GTCTCACGCA GCTGGAGCCC ACGAATGCCA CCACCACACC CTTCTTCCCC
 4681 CCCCCTCCCT CTTCTTCCCA CGCGCGCGAC GACGACGGGG GCTCAGCTCA CGCTTCTGTA
 4741 GGGTATTATA TTAAAGCACA TGTGCGTGTCT GTGCTTCGGC TTCTTGTTGG TGGTCGTTCC
 4801 CTTTCAAGTC CACGACTCCT GCCGTTGCTC ACCGCCGGGC TGCTTCTTT CGCCCCTCCC
 4861 TCGGTGCCCT TTCCGCCGCC GCACGCGTGC GCTGATCACG CGTCTTGGT GATGTGCCCTG
 4921 TGTGTATACA CACCGTGCAC GGAGAGAGCG AGCGAGCGAG AGAGAGAGAG GGCGAGAGGA
 4981 AGAATGGCCG GTGCCTCGCG TGGCAAGCG TGCGCGAGTT TGTCGTGTCG CTGCGCCCGG
 5041 TGGATGTCG GCAGCGCAAG ACCCCGTGGC CCTGAAACGT GAAGGGAGGT CGAGAAGCGT
 5101 **GCCGCATGAG** **GCCTTAAGGC** **AGGAAAGTGA** **AAA****GAGCTCC** **GAATACGTTG** **CCAGAGTAGG**
 5161 **GCGGGGAGCA** **GGGTACGCAG** **GGGTCAGCAC** **AGCTTGGCTG** **TCCTGCATTT** **TTTGCTTTTT**
 5221 **GTCGTTGTGA** **CCGCGTTCGC** **TTGTTTGGCT** **GTGTGCATGC** **GCAGCCGGCG** **CAAACAAAA**
 5281 **AGGGAGACCA** **GCAAAGACGG** **CGCCCCCCC** **CCCCCCCCGT** **CCGCCACTG** **GCGGGGCGGG**
 5341 **GCGGCTTCG** **GTGTATGATA** **TGCTCCGTAA** **AGGCAGCGCT** **CATTGACGCA** **GGGTCCATGT**
 5401 **CGTCCACGC** **TGTCTCTCTC** **TCTCTCTCTC** **TCTTTCGAGA** **AAGAAGAATG** **GATCTTCGCG**
 5461 **GTGCACACCT** **TTTTGTTTTA** **GAGGCACACG** **TATACGAGTG** **ACCAGCGCGT** **GGGGAGGTTG**
 5521 **GGGAGGAGA** **GTGAGGTGAT** **GGTGGTGTG** **GTGACACAGT** **TGATGACGCG** **CTGTCTATCC**
 5581 **GACACAAGGG** **CTACTTTTCA** **CTTGCCGGGA** **CTCGCCTATT** **CGTGC** **GGGCC** **TAAGAGACGA**
 5641 **AAGCTCTCGA** **G**

Apéndice VI. Secuencia del vector p Δ Brf1-Hyg

A continuación se muestra la secuencia completa del vector p Δ Brf1-Hyg. La secuencia la región UTR-5' se muestra en amarillo, la secuencia de la región UTR-3' en verde, y la secuencia del gen higromicina en azul. Los oligonucleótidos empleados para amplificar estas regiones se muestran en negritas y cursivas. Dicho cassette de resistencia a hyg fue clonado en el vector pBlueScript SK-.

```

1      TCGAGGGGGG GCCCGGTACC CAATTCGCCC TATAGTGAGT CGTATTACAA TTCACTGGCC
61     GTCGTTTAC AACGTCGTGA CTGGGAAAAC CCTGGCGTTA CCCAACTTAA TCGCCTTGCA
121    GCACATCCCC CTTTCGCCAG CTGGCGTAAT AGCGAAGAGG CCCGCACCGA TCGCCCTTCC
181    CAACAGTTGC GCAGCCTGAA TGGCGAATGG AAATTGTAAG CGTTAATATT TTGTTAAAAA
241    TCGCGTAAA TTTTTGTAA ATCAGTCAT TTTTAAACCA ATAGGCCGAA ATCGGCAAAA
301    TCCCTATAA ATCAAAGAA TAGACCGA TAGGGTTGAG TGTGTTCCA GTTTGGAACA
361    AGAGTCCACT ATTAAAGAAC GTGGACTCCA ACGTCAAAGG GCGAAAAACC GTCTATCAGG
421    GCGATGGCCC ACTACGTGAA CCATCACCCCT AATCAAGTTT TTTGGGGTCG AGGTGCCGTA
481    AAGCACTAAA TCGGAACCCT AAAGGGAGCC CCCGATTTAG AGCTTGACGG GGAAAGCCGG
541    CGAACGTGGC GAGAAAGGAA GGAAGAAAG CGAAAGGAGC GGGCGCTAGG GCGCTGGCAA
601    GTGTAGCGGT CACGCTGCGC GTAACCACCA CACCCGCCGC GCTTAATGCG CCGCTACAGG
661    GCGCGTCAGG TGGCACTTTT CGGGGAAATG TGC GCGGAAC CCCTATTTGT TTATTTTTCT
721    AAATACATTC AAATATGTAT CCGCTCATGA GACAATAACC CTGATAAATG CTTCAATAAT
781    ATTGAAAAAG GAAGAGTATG AGTATTCAAC ATTTCCGTGT CGCCCTTATT CCCTTTTTTG
841    CGGCATTTT CTTTCTGTT TTTGCTCACC CAGAAACGCT GGTGAAAGTA AAAGATGCTG
901    AAGATCAGTT GGGTGACGTA GTGGTTACA TCGAACTGGA TCTCAACAGC GGTAAAGATCC
961    TTGAGAGTTT TCGCCCCGAA GAACGTTTTT CAATGATGAG CACTTTTAAA GTTCTGCTAT
1021   GTGGCGCGGT ATTATCCCGT ATTGACGCCG GGCAAGAGCA ACTCGGTTCG CGCATACACT
1081   ATTCTCAGAA TGACTTGGTT GAGTACTCAC CAGTCACAGA AAAGCATCTT ACGGATGGCA
1141   TGACAGTAAG AGAATTATGC AGTGCTGCCA TAACCATGAG TGATAACACT GCGGCCAACT
1201   TACTTCTGAC AACGATCGGA GGACCGAAGG AGCTAACCGC TTTTTTGCAC AACATGGGGG
1261   ATCATGTAAC TCGCCTTGAT CGTTGGGAAC CCGAGCTGAA TGAAGCCATA CCAAACGACG
1321   AGCGTGACAC CACGATGCCT GTAGCAATGG CAACAACGTT GCGCAAACTA TTAAGTGGCG
1381   AACTACTTAC TCTAGCTTCC CGGCAACAAT TAATAGACTG GATGGAGGCG GATAAAGTTG
1441   CAGGACCACT TCTGCGCTCG GCCCTCCGG CTGGCTGGTT TATTGCTGAT AAATCTGGAG
1501   CCGGTGAGCG TGGGTCTCGC GGTATCATTT CAGCACTGGG GCCAGATGGT AAGCCCTCCC
1561   GTATCGTAGT TATCTACACG ACGGGGAGTC AGGCAACTAT GGATGAACGA AATAGACAGA
1621   TCGCTGAGAT AGGTGCCTCA CTGATTAAGC ATTGGTAACT GTCAGACCAA GTTTACTCAT
1681   ATATACTTTA GATTGATTTA AAACCTCATT TTTAATTTAA AAGGATCTAG GTGAAGATCC
1741   TTTTGGATAA TCTCATGACC AAAATCCCTT AACGTGAGTT TTCGTTCCAC TGAGCGTCAG
1801   ACCCGTAGA AAAGATCAAA GGATCTTCTT GAGATCCTTT TTTTCTGCGC GTAATCTGCT
1861   GCTTGCAAAC AAAAAACCA CCGCTACCAG CGGTGGTTTG TTTGCCGGAT CAAGAGCTAC
1921   CAACTCTTTT TCCGAAGGTA ACTGGCTTCA GCAGAGCGCA GATACCAAAT ACTGTCCTTC
1981   TAGTGTAGCC GTAGTTAGGC CACCACTTCA AGAACTCTGT AGCACCOCCT ACATACCTCG
2041   CTCTGCTAAT CCTGTTACCA GTGGCTGCTG CCAGTGGCGA TAAGTCGTGT CTTACCGGGT
2101   TGGACTCAAG ACGATAGTTA CCGGATAAAG CGCAGCGGTC GGGCTGAACG GGGGGTTCGT
2161   GCACACAGCC CAGCTTGAGG CGAACGACCT ACACCGAACT GAGATACCTA CAGCGTGAGC
2221   TATGAGAAAAG CGCCACGCTT CCCGAAGGGA GAAAGGCGGA CAGGTATCCG GTAAGCGGCA
2281   GGGTCGGAAC AGGAGAGCGC ACGAGGGAGC TTCCAGGGGG AAACGCCTGG TATCTTTATA
2341   GTCCTGTCGG GTTTCGCCAC CTCTGACTTG AGCGTGCATT TTTGTGATGC TCGTCAGGGG
2401   GGCGGAGCCT ATGGAAAAAC GCCAGCAACG CCGCCTTTTT ACGGTTCCTG GCCTTTTGCT
2461   GGCTTTTTC TCACATGTTT TTTCTGCGT TATCCCCTGA TTCTGTGGAT AACCGTATTA
2521   CCGCCTTTGA GTGAGCTGAT ACCGCTCGCC GCAGCCGAAC GACCGAGCGC AGCGAGTCAG
2581   TGAGCGAGGA AGCGGAAGAG CGCCAATAC GCAAACCGCC TCTCCCCGCG CGTTGGCCGA
2641   TTCATTAATG CAGCTGGCAC GACAGTTTC CCGACTGGAA AGCGGGCAGT GAGCGCAACG
2701   CAATTAATGT GAGTTAGCTC ACTCATTAGG CACCCAGGC TTTACACTTT ATGCTTCCGG

```

2761 CTCGTATGTT GTGTGGAATT GTGAGCGGAT AACAATTTCA CACAGGAAAC AGCTATGACC
 2821 ATGATTACGC CAAGCTCGAA ATTAACCCCTC ACTAAAGGGA ACAAAGCTG GAGCTCCACC
 2881 GCGGTGGCGG CCA**TCATCTA** **GAACGGCACA** **CATCTACTCG** CGCCTCCCTT CTTTCTCTCG
 2941 **TCACGAAAAC** GCGGAGAGTA CAGTCGCGG TCGGTGCATG AGGATCACCG AAGGCGTTCC
 3001 CCCTCTCCCC AAACCTCCGTG TCTCATCTCT TCTGTGTGCT CTCAAAGAGC GCCGTTTTAC
 3061 TAAGTTGCAT CCAGCACAGT GGAGCGCAAG CCGTGCACCA CCGATAGCCA CATCTCCCGC
 3121 TCTCTCCATC GGCTCCTTCT CTATTTGTTT CCGTCCTCGT TTCTGCTCTT CCCTGCTTTG
 3181 GACACTTCAC GCGTATCCCT TGCGGTCCGC GGCCTGTCTA CTACCGCGAC GAGGGCAACT
 3241 GCGCTCTGTA GCGCCTTGTC CTCCTGTGTA TGACCGCGCA GCGGCTGTG ACGTGACGAC
 3301 GTTGTCTCTC TGCTCTGGAA TCGTGCAGCT GCTTTTTTGGT TTGCTCCCCA TCGGCATTGC
 3361 TGCTGCGGGT GTCGGCGCAG TGTGTACGGC TGCTTACCTT TTCTACCGC TGC **CCAGCAG**
 3421 **TTGACGCTTC** **ACCAGTG**GAT GAAAAAGCCT GAACTCACCG CGACGTCTGT CGAGAAGTTT
 3481 CTGATCGAAA AGTTCGACAG CGTCTCCGAC CTGATGCAGC TCTCGGAGGG CGAAGAATCT
 3541 CGTGCTTTCA GCTTCGATGT AGGAGGGCGT GGATATGTCC TGCGGGTAAA TAGTCGCGCC
 3601 GATGGTTTCT ACAAAGATCG TTATGTTTAT CGGCACTTTG CATCGGCCGC GCTCCCATT
 3661 CCGGAAGTGC TTGACATTGG GGAATTCAGC GAGAGCCTGA CCTATTGCAT TCCCCGCCGT
 3721 GCACAGGGTG TCACGTTGCA AGACCTGCCT GAAACCGAAC TGCCCGCTGT TCTGCAGCCG
 3781 GTCGCGGAGG CCATGGATGC GATCGCTGCG GCCGATCTTA GCCAGACGAG CGGGTTCCGGC
 3841 CCATTCGGAC CGCAAGGAAT CGGTCAATAC ACTACATGGC GTGATTTTCA ATGCGCGATT
 3901 GCTGATCCCC ATGTGTATCA CTGGCAAAC GTGATGGACG ACACCGTCAG TGCGTCCGTC
 3961 GCGCAGGCTC TCGATGAGCT GATGCTTTGG GCCGAGGACT GCCCCGAAGT CCGGCACCTC
 4021 GTGCACGCGG ATTTCCGGCTC CAACAATGTC CTGACGGACA ATGGCCGCAT AACAGCGGTC
 4081 ATTGACTGGA GCGAGGCGAT GTTCGGGGAT TCCCAATACG AGGTCGCCAA CATCTTCTTC
 4141 TGGAGGCCGT GGTGGCTTG TATGGAGCAG CAGACGCGCT ACTTCGAGCG GAGGATCCG
 4201 GAGCTTGACG GATCGCCGCG GCTCCGGGCG TATATGCTCC GCATTGGTCT TGACCAATCT
 4261 TATCAGAGCT TGGTTGACGG CAATTTTCGAT GATGCAGCTT GGGCGCAGGG TCGATGCGAC
 4321 GCAATCGTCC GATCCGGAGC CGGGACTGTC GGGCGTACAC AAATCGCCCG CAGAAGCGCG
 4381 GCCGCTGGA CCGATGGCTG TGTAGAAGTA CTCGCCGATA GTGGAAACCG ACGCCCCAGC
 4441 ACTCGTCCGA GGGCAAAGGA ATAGATCCCG CCCGCACCCG CGCGCGCTCA GGCCGCGTGT
 4501 CGTCGTGCTC TTTCCATTTT TTTTTTGTGT GTGGTGGTGA TTTGAGCTGC TCTCCGTTGT
 4561 GTGCTGGGGA CCCTCCTTCC CTCGATCTCC TCGTGCGGGG TCTCCGACGC GCAGACGCGG
 4621 TGCGTGCGAG CGTGCACGTG CTGTCCCGCT GGCTGTAGTT GCGAGCGGAG AGAGAGAGAG
 4681 AGGGAGGGAG GGAGGGCAGA GGGCAGAGGA CATGCGGGTG GGAACGTGCA CCGGCCTCGT
 4741 CTCACGACG TGGAGCCCAC GAATGCCACC ACCACACCTT TCTTCCCCC CCCTCCCTCT
 4801 TCTTCCCAGC GCGGCACGA CGACGGGGGC TCAGCTCAGC CTCTGTAGG GTATTATATT
 4861 AAAGCACATG TGCGTGCTGT GCTTCGGCTT CTTGTTGGTG GTCGTTGCTT TTCAAGTCCA
 4921 CGACTCCTGC CGTTGCTCAC CGCCGGGCTG TCTTCTTTTCG CCCCTCCCTC GGTGCCTCTT
 4981 CCGCCGCCGC ACGCGTGCAG TGATCACGCG TCTTGCGTGA TGTGCTGTG TGTATACACA
 5041 CCGTGCACGG AGAGAGCGAG CGAGCGAGAG AGAGAGAGGG CGAGAGGAAG AATGGCCGGT
 5101 GCCTCGCGTG GGCAAGCGTG CGCGAGTTTG TCGTGTGCTG GCGCCGCGTG GATGTGCGCG
 5161 AGCGCAAGAC CCCGTGCGCC TGAAACGTGA AGGGAGGTCG AGAAGCGTGC CGCATGAGGC
 5221 CTTAAGGCAG GAAAGTGAAG A**GAGCTCCGA** **ATACGTTGCC** **AGAGTAGGGC** GGGGAGCAGG
 5281 **GTACGCAGGG** GTCAGCACAG CTTGGCTGTC CTGCATTTTT TGCTTTTTGT CGTTGTGACC
 5341 GCGTTGCTT GTTTGCTTGT GTGCATGCGC AGCCGGCGCA AACAAAAAG GGAGACCAGC
 5401 AAAGACGGCG CCCCCCCCC CCCCCCGTCC GCCACTGGC GGGCGGGGCG GGCTTCCGGT
 5461 GTATGATATG CTCCGTAAAG GCAGCGCTCA TTGACGCAGG GTCCATGTG TCCCACGCTG
 5521 TCTCTCTCTC TCTCTCTCTC TTTTCGAGAAA GAAGAATGGA TCTTCGCGGT GCACACCTTT
 5581 TTGTTTTAGA GGCACACGTA TACGAGTGAC CAGCGCGTGG GGAGGTTGGG GGAGGAGAGT
 5641 GAGGTGATGG TGGTGTGGT GACACAGTTG ATGACGCGCT GTCTATCCGA CACAAGGGCT
 5701 ACTTTTCACT TGCCGGGACT CGCCTATTCC TGC **GGGCCA** **AGAGACGAAA** **GCTCTCGAG**

Apéndice VII. Secuencia del locus de Brf1 en *L. major*

A continuación se muestra la secuencia del locus de Brf1, señalando las enzimas de restricción empleadas para el experimento *Southern-blot*.

La secuencia del gen de Brf1 se muestra en gris, la secuencia de la región UTR-5' en amarillo y la secuencia de la región UTR-3' en verde. Los oligonucleótidos empleados para amplificar estas regiones se muestran en negritas y cursivas.

Se muestra primero la secuencia del gen LmjF.25.0450, seguida del gen de Brf1 y finalmente el gen LmjF.25.0430. Para cada gen se señalan los codones de inicio y término.

```
1      CTGCGTGTCTCTGTGTGTGTCTCGACGTTGTTTCTCGCTTGTCTCCTCGATGCATCACAT
61     GCCTTACCTGTACATTCTCTTGTACGTCTCCTCTGCCTGTGCTACACACACACACACACAC
121    ACACACACACACACACACACACACACACACATACACATATACATACACACACAAGCTAAC
181    GTCACTCTGTCATCGTCCGCCCTTTACCCGTTTTGTTTTCTCTTGGCGACCTATAGGAT
241    GCTGACGCGTTTCGCTGGTGTGTGCGCGCTCGTTGCAGAGCCGTCGCCGGTGGGAGCAGCG
301    CATTGTGTCAGTGCTCTCCGAGAACAAGGAGGAGGGCGTCGATGCGGTGGCGAAACGCTT
361    CCAGCGAGTCTACAAGGAGCGCCGCTACACACCCGTGGAGGAGGCGTTTTCCACCCCTCGC
421    TGCTGCCGCNot IGCGGCCGCGCCTGGGCTGAGGTCTTCTGCCGCGAAAGAGAGCGTCGAGTCAGT
481    ACAGCAGCCCGCCAACCCGCTCGTGCTGCGCGTTGCCTTCCTTGGGCCTCAAAACGCAGG
541    AAAGACGTCCCTCGTTAATTCCATGGCGCTCAGCAATGTTGGTGTGTCAGCAACCGCTA
601    CGGCAGCACCAAGGATTGGACAAAGGCAGTCGCCACGGTACACGAAACGCAGTTGCTCCT
661    CCTTGACACACCGGGCATTGTGCCGCTGATACGCAGCGCTGCGGCGCAAGTTTCGCCTC
721    CGGCACGGCTAAGGCGTACGACGCTCTCTTCGTGTGCGACCTCGTTGTCCTAGCTCTCCC
781    CGTCGGCGTGGGATTTCGTGCGAGAAGGAACATAAGGTGGTTCGCGACGGAGGTGGTACGCCG
841    CGCCGCGGGCCGCGAACTACCCGTGGTGTGATCGCCATGACAATGATGGACAAGGTTTCAGAC
901    GCCGTGGCATCGCGAGCTGTACTTTGCCATGCGCACCGACCTTGAGTCTCTCGGGTTGCC
961    GACTGCCGCGACGCACGAGGTCAGCGTCAAGGGCGGCAGCGGACTGGTGGAGCTGAAGGA
1021   CTGCCTCTGTGTCAGTACGCGAAGCCGGGGCGTGGGAGCACTACCGCCGCGAGGCGACGGA
```

1081 TTTGAATCCACCGCAGCGCGTGGCGGAGCTGCTGCGGCAGACCTTCATGGAGCTACTCCC
 1141 GCACGAGATTCCGCACTG  GGCACCGCGTGTGGGCTGGACGCGCAAGGAGTCAGG
 1201 CACGACAGAGGTGGTGGTGGAGGCGTTCTTCGATCGCCCTGCGTACATGTTACCTTCTA
 126 CGGCAAGTTGGAGGCCATCTGTCTGCGTGCACAGCAGGTGACGGAGCGCGAGCTGGCGCC
 1321 GCAGCGGTTTCGCTTTGTTTTTCAGGCCTTCATCGCCCCAGGCGGCTCTCAAACCTCGTG
 1381 AGGTGTAAATTGTCTGTGCAGCACTTGATGTGCCCTTCCTCCTTCCCCGTCTCCAGCGGT
 1441 TCAGGTGAGGTGTCTTCACAGCTTTTCACAGTTCTGACAACGAATGTGACTTTTCTGTGT
 1501 GTGTGTATGCGTGGGCTTGGTGGGTGGATGTGTGAGCCCTGGTAGCGATGCGCGCTCACG
 1561 GCACCCGCTCTTGCTTGTCTGAAGCACCGACCCGTGGAAAGACACAGAAGCTGACAAGGAG
 1621 GAAACGCACGTTGGTGAGGTTTTTCGGCAAGGGCTTTCGTGGCACAGCACACATCGGCACT
 1681 TCTGATGAGGAGAAGCGGCGCAGAGGAGCCCCGGAGGGGTAGGAGTGGGCATCACGGCGT
 1741 GCAACGAGCGATGTGAGGTGGGGGGAGAGAGAAAAGTTCCGCGTGCCGTGT  
 1801  AATGCACGCTGTGCTCTTTACCTCCACTCCCATCCGTCCCAGAAACACAAACACACAGAC
 1861 AGACAGACAGCCGGGCGCAAATAGCCATGTCCCACACCCCTCTTGCAGACGTGTTCCCTCG
 1921 TCACATGGTAGCACATGCACCACCGTCTTTCATCTTGGCGTAACCCCTTGCTCGTCATCT
 1981 TCTCGTTCTCGAACCCGTCACCCACACAGTGTGACCAA **ACGGCACACATCTACTCGCGC**
 2041 **CTCCCTTCCCTTCTCTCGTCACGAAAACGCGGAGAGTACAGTCGCGGCTCGGTGCATGAGG**
 2101 **ATCACCGAAGGCGTTCCCCCTCTCCCCAAACTCCGTGTCTCATCTCTTCTGTGTGCTCTC**
 2161 **AAAGAGCGCCGTTTTACTAAGTTGCATCCAGCACAGTGGAGCGCAAGCGGTGCACCACCG**
 2221 **ATAGCCACATCTCCCGCTCTCTCCATCGGCTCCTTCTCTATTTGTTTCCGTCTCTGTTTC**
 2281 **TGCTCTTCCCTGCTTTGGACACTTCACGCGTATCCCTTGCGGTCGCCGGCGTGTCTACTA**
 2341 **CCGCGACGAGGGCAACTGCCGTCTGTAGCGCCTTGTCTCCTGCTGATGACCGCGCAGCG**
 2401 **GCTGCTGACGTGACGACGTTGTCTCTGCTCTGGAATCGTGCGCGTGCTTTTTGGTTTG**
 2461 **CTCCCCATCGGCATTGCTGCTGCGGGTGTGCGCGCAGTGTGTACGGCTGCTTACCTTTTC**
 2521 **CTACCGCTGC CCAGCAGTTGACGCTTCACCATG**TCCAGCTGCACCCATCCCACCTCTGCC
 2581 CTCTTCGTGGATCGGCAAAACGGGCGCACGACGTGCACCATCTGCGGCGATGTCGTCACG
 2641 ACCGACCAGTACGAGCTAGACCCTATCTTCGCCAGGGCG   CAGCCGGCCAGCGGC

2701 GGCGGCCTTCGCGGTCTTGCCGGCAGCTTCCGCCCCGCCACCTCGTATAAGGGCACCCAC
2761 ACGGGCGTGATCCACTCCCCTCCCGCCCCACCATCGACAAAGCTCGCCGAGAGATGCTG
2821 AACATCAGCCGGCAGCTCGAGATCAGCGAAGATACGGTAGAGCGCGCCCTCGGCATATAC
2881 AAGGTGGCGCTCAACCTGAACGCAGTCTCCGGCACACGGCCAAGTGTGCTATGCGCCTGC
2941 CTCTACGCAGCGTGCCGGCGGAGCGGACGTGCGACGTTATCTACGACTTCTCTGAGATC
3001 AACGGCGAGGACCCGCACACGATCTTATCGCAAATGAAGTACATCTGCCACGCCACCCAC
3061 ACCGAGGTACCCGTGATCGACCCGTGCTGCTACGTGCGAGCGGTTTGCCGAACAGATGGAC
3121 CTCGGACCGCAGACGACGGACGTGGTTGTGTGCGCTCTCAAAGTGTGCGTGCTATGCAG
3181 GATGACTGGATTAGCTGTGGCAGGCGACCGATGGGTGTGTGCGCTGCTGCTCTGCTTGTG
3241 GCGTGCTACGTTTTTGGTATTTTACGCACCCCGGAGCAGGTGTGCGGGATGGTGCGACTC
3301 ACGTCCAACACAATCGGCAAGCGACTGACCGAGTTTGCGGGCAGCCCAACGGCCCGTCTG
3361 GAGAACATCGACGACTATCAGCCGTGCGACGAGACCTTGCCACCAGCCTTCAATGATTTCG
3421 AGCCGCAAATCCACCGAGGAGGATGTGCACGCGAGTATGCGGGAGCTGTGCGCCATCTTC
3481 TACGAGCTTGTCTCCGAGGCGAAGACATCGCAGCCCGCAACGCCGGAGCGGTGTGACAAG
3541 TGGCGCCGCTTCATCATGAAGCACTGCGAGCTGGAGGGCATCACGCCGCTGGAGGAGAAT
3601 TTGGATTTGAAAGGGCTGCCGCCGGCGCAGCAGCTGCACATTTTGGGTCTACCGCACACG
3661 AAGCCCATCCCGCTGGAAGAGGTGGCGCGCAGTGTTAAGAGGGAGGAGCACCGTCTCCTC
3721 GTCAAGCGCGAGGCGTCTGCTTTCAGAACGGCAGCGACGCGGGCGGCAGCATGAGTGGCGCC
3781 CGGCAGGGGGCAGTCGCGGGGCTGCTGAACAATGCCGATGTGTGCTCCAATG**BsmI**
3841 CTTTATCTGCTGCCCCGACGAGTCGTTGGCGTCTCTGCTCGCACAGGCGTCGCCAGCGATG
3901 GGGTATGCCGACGACGGAGGTATGCACTCTTCGTGCGCCGCTGTTGGTGCCGCCTCGATG
3961 GATTGCCCGGAGCAGCTGCGGTGGATGACGGACGAGTACACGCGGCTGCTGAACAGCAAT
4021 GCGGAAGTGATGCACCTGCGCAACGACTTTGACTTCGCTGACGAGGATGACGCCAACGGG
4081 GCTGGCGGCAGCTCTGGAGGCGGCGCGGTGGCCCCGCTGTGAGCCACCCTACTCAGAAC
4141 CAGCCTTTCAGCTGCGGGCTCTCGCAGCTACGCGGCGGCAGCCCCCGCCGGGAACCCCT
4201 GCAGAGGAGGATCCATTTCGGGTTCTTTGACCGCGACGACGAGGGGACCCGTCTAGCGCTG
4261 GAGGAGATCCTCTACGACCGGAGCGGGCGACACGCCCTGCCGTGGGAGTTTCTTGTGCTA
4321 CCGCGGGTCGAGGAGGATGACTGCACGGACATCCTGTCTTACCTCGTGCTGGACAACGAG

4381 GAGCGCCTCCGACGCGAGCGCATCGGCGTCTCTCTCTACGGCGAAAAATGGAAGCGCGGG
 4441 CGCGCACGGACGGATGAGGAAATCCAAAAGCTGGAGGAGGCGCGAGCCTCGAAGCGGCGC
 4501 CGGCGCAGTGTTATTGCCGAGCCCGCG **SalI** GTCGA CGTACCAACGGCGATGGAGCGCGGTTG
 4561 **NotI** CGCGGCC GCGGCGCTGGTACGGTGAACATCTCCCAAATCGGTGAACTACTTCTCTG **GAATG**
 4621 **BsmI** CTGGAGTTCTCGAGGATGAGCCACAGGCGGACTGGGACT **TGA** **CGAATACGCTGCCAGAGT**
 4681 **AGGGCGGGGAGCAGGGTACGCAGGGGTACGCACAGCTTGGCTGTCTCTGCATCTTCTGCTC**
 4741 **TTCGTCGTTGTGACCGCGTTTCGCTTGTTCGCTTGTGTG** **SphI** **CATGC** **GCAGCCGGCGCAAACAA**
 4801 **AAAAGGGAGACCAGCAACGACGGCGCCCCCCCCCCCCCCCCCGTCCGCCACTGGCGGG**
 4861 **GCGGGGCGGCTTCCGGTGTATGATATGCTCCGTAAAGGCAGCGCTCATTGACGCAGGGTC**
 4921 **CATGTCGTCCCACGCTGTCTCTCTCTCTCTCTCTCTTTTCGAGAAAGAAGAATGGATCT**
 4981 **TCGCGGTGCACACCTTTTTGTTTTAGAGGCACACGTATACGAGTGACCAGCGCGTGGGGA**
 5041 **GGTTGGGGGAGGAGAGTGAGGTGATGGTGGTGTGGTGACACAGTTGATGACGCGCTGTC**
 5101 **TATCCGACACAAGGGCTACTTTTCACTTGCCGGGACTCGCCTATTTCGTGC** **GGGCTAAGA**
 5161 **GACGAAAGCT** **SalI** **GTCGA** CACCACGTCGCTACGTGCCTCTGCGCCTACACGTCGGGCGCAC
 5221 ACATGCTCACTTCCTTTTTCGTGTACACCTTCTTCTCTCTGTGTCCTTCTCCGTGTCTTCCC
 5281 TGCATTTTGGTG **SphI** **CATGC** GTGCGTGTGTGTGTGTGTGGGTCTCCATGTCGTTTACGACACC
 5341 CGCTTTCCTCCCACCCTTTCCTACTAGAGCCACTCATGCCGTTGGTGTAGGACCCGAAAC
 5401 CGGAACTCACGTCGTTTGTGAGGCGCTGACGATCTCGGATCATTCTCTCCACATCCG
 5461 CCGCAGTCACTGCTGCACACACTTAGCTCTCTTGTTTTTTTTTTGTTCGGTTCTCTACCC
 5521 CTTGTGGGGTCTACGAGTGTGCGTGCGCCATCTTGCCCTTGTCTACCACTCACGCTCCCC
 5581 ATCTCTTACCCTGGTACCAAAAATGG **ATG** GGAAGAACTGCTTCCGCACGCGATGGACG
 5641 CAGGAGCCTATCTTACGCGGCGGCGGTTGGCCTCTCTTGCCTTCCAGTGTGAGCCCCC
 5701 GCTGCCTCGTCCGCACTTTCGACGTCGGCCGCTGTGGAG **BsmI** **GAATGC** CTCGTCGTGGCGTGC
 5761 GCGACACCGTGAACGTGGTGCCTGCAACAAGTGGAGAGGTGCTGTGCAGGTACACGTTG
 5821 CCAGTAGAGGACGTGATTCTCCATATTGACGCCGTAACGGTGCCCCGAGGCGTCGGATGAC

5881 GACGGCAAAGACGCCGAGTCGCAGATGAGGGAGAGGCGCGCGGGAAGCGCGACGCCGGT
5941 GCCGCGGAGAAGTCGGCCACGGCGAAGAAGTCTCCCAAGAAGAAGGCCAGGGCCGGGAAG
6001 AGAGTCAAGCCGTCCGAGGGGGACGAAGAGAACGCCGTCCAAGCGGAGAAGAAGGTGGCC
6061 ACACCGTCCGTGGCGCCGTCTCAAGCGAC[▼]NotI GCGGCCGCTTCTCGAGGCGACAGGGAGCTC
6121 GCTGCACCGGCTGGCAGCTACGTTGCGGTTGGCACGCGCTCGCTGCAGGTCTACGTGTTG
6181 CGCGTTGACGCCCCGCTGGAGTTGTGCGCCTCGCCCTCGTCCTCTCCTTCAGCGGAGAAG
6241 GGTGCCGCTGCCGACGCCGCTTCTGAGGAGGGCAACACTGCAGAGGCGGAAGGCGATGAT
6301 GCGGATGTAGTCGGCGCGGCAACCGCTACCGGCACCCTTGTACAGTACTCGATCGAGCTG
6361 CAGCGGAAC TGGACGGCGGCGCAGCACGCCATCTCGGTGCTGCACTTTTCCAGAGTGGC
6421 ACCTACCTCGTCTCGGGTGCCACGGATGGCAGCGTGAAGGTGTGGAACGTTTTTCCACCAT
6481 CACCTCACGCACAAC TGGTGTGCCCCACAGCTCGCTCGTGCAGAGCGTGTGCCTCGAC
6541 CCCAGCGAGGCCTACCTCGCCGTGCGCTCCTTCGAGGGGCACGTACCCGTCTTCGACTTC
6601 GTGGCAAACGGATAGTCGCGGCAGG[▼]NotI GCGGCCGCATGTGCAGGCGGTCGAGTCCATGATC
6661 TTTAATGACGCGCTCACACACATCTACTCCATCGCCAGGGATCGCCGTCTCGCTCTCGGC
6721 AAGATGATGTTTCATCGAGAACCGCAAATCGACGGAGCTGAAGGAGGTGCGCGGATTGTG
6781 GTGAAAGAGCACGTGTCGAGCGCCGCTTCGAGAGTGCTGGGCTACTTCACGTTGGCGCC
6841 ATGGACGGCGTGGTCAGCACCTACCGCGTGAGCGAGGGCGAGGCAGTACAGGTTGTGCGC
6901 CGACTTCCGAAGCCCGCTCCGCGGACGCCGAGGACGGTGCCGAGGAAGCGTTTGTGCGC
6961 TCTCTGCTCGTGGCTGGCACGCCAAAGGGCACGGG[▼]SphI CATGC GCCGCTGCGCGGCTTTGTG
7021 GTGCACGACGTGCCGCACGCGCCGGACACCTCCTCCTTGTACGTTGGTGACGCGGGATTT
7081 AACATT CAGCACCTGCGCCCCCTCGTCGGCGGAGCGCAGCCGGTACGAGGTGACCCGCACG
7141 GTTGTGCGGCTTTCTGGATCAGCTGCTCGACGTGAAGCTGTTCCCTGAGGCCTCGCCGCTG
7201 CACCGGGCTGTGGTAACCAACAGCAAGGATGTGCGCCTGTACGCCTCGGACGGCTGCGTC
7261 TCCTCGAAGACTCTGCGCGGCCATAGTGACGTGGTGTCTGCTGCGCCGTGAGCAGTGAC
7321 GGGCGTGGATCGCCACCGGGGCCAAGGACAAGGAGGTGCGCGTGTG[▼]SalI GTCGACCGAGAGC
7381 TGCAGACGGTTCGTGCGCGGTGTTGGCGGGCACACAGCGGAGGTGACATCGCTGTCTTC

7441 AACGGGAAGCAGACGGACACCTACCTGCTGCTCTTCTCTGTCTCCAGCGACGAGAATGTG
7501 CGCATGTGGGACATCGGGCTCCCTCTGGCGGAGCGTGCCTCGGCAAAGCAGCCGCTGTGCG
7561 CGCGTGGAGGAGATACAGCACCGGAGCGGGCTGAACGCGGCCACACGGGCCCCATCTAC
7621 ACCGTGGCTGTTGCGCCCAACGACCAGTACGTGCGGACTGGCGGCAAGGATAAGTCGGTG
7681 AATGTGTGGAACATTTTCAGGCAAGAAGATGTACCGCGAGGCCTCCTTGAAGGGGCATCGG
7741 CGTGGCATCTCATCCCTTGCCCTTCTCGCCGGTTCGATCGCGTCTTGGCATCGGCCTCGAAT
7801 GACGGGTCGGTACGGCTGTGGTCGCTTGTGTGCGCTGACGTGCCTGAAGTCGATGCAAGTG
7861 GACCGCACCTCGGTGCTGCAGCTGAGCTTCTTCAACAACGGCACGCAAATTGTGACGAGC
7921 AACCGGAGGGCGTGCTGCGTGTGTGGGCCATCGCGTCTCGGAGTCGGTCTGGGCTGCG
7981 GAGGCGCACACGGAGAAGATATGGGCCTTGGCGGTTCGAGGAGCGCCCTTCTCGGGCGAG
8041 ACAATCTTCTACTCTGGTGCCGCCGACGGCGTGTGATCGCGACCGAGGACTACACCGCC
8101 GAGGAGGTGGCCCGCATCAAGGAAGACCGGCACCAGATGATCCTGCAAGAACAAGCGCTC
8161 TCCAACGCCCTTTCGAAGGGCGAGTTCTCAGAGGCGTTTATGCTGGCCCTGCGGCTGAGT
8221 CACCCGCGCCATCTCCGCCAAGTGTCTCGTGCCTGGTGCGCCAAGGACGCGCGCCAGTGC
8281 GAGAGCACGCTTCGCGGCGAGCTTCTGCCCCGCCCTTGACGCGGAGCAGATGACGCGGTTG
8341 CTGCAGTACACGCGAGAGTGGATCACGAACAGCCGTCATTGCATGGTGGCTACTCTGGTG
8401 CTCTACGTACTCATCTCCTCACGCCACTTCGAGGCCGTCGCACAGGTGCCGTCGATGGCG
8461 TCGCTGATCGAGCCGCTGCTGGCTTACACGCGCAAGCACAGTCAGCGCCAGCACGACCTG
8521 CTTTCGACGCACGTACTACATCGACTACGTTCATCCGCGGTCTTGCACCAAACGTACTGACC
8581 TCGCTTCCCCCGTTTCGTGCATCAGGGTGAGGGCCGGAGGGAGGAGCCCGCTGGCAAAG
8641 CG  GCGTCGAG TGA GCGC

Apéndice VIII. Secuencia del cassette de resistencia a puromicina

Se muestra el gen de resistencia a puromicina en color gris, flanqueado a la izquierda por la región UTR-5' (en amarillo) y a la derecha por la secuencia de la región UTR-3' de Brf1 (en color verde). Se señalan los sitios de restricción empleados en el experimento *Southern-blot*. Las secuencias río arriba de la región UTR-5' y río abajo de la región UTR-3' son idénticas a las mostradas en el Apéndice VII.

```
1      TCTCGTTCTCGAACCCGTCACCCACACGTGTGACCAAACGGCACACATCTACTCGGC
61     CTCCCTTCTCTCTCGTCACGAAAACGCGGAGAGTACAGTCGCGGCTCGGTGCATGAGG
121    ATCACCGAAGGCGTTCCCCCTCTCCCCAAACTCCGTGTCTCATCTCTTCTGTGTGCTCTC
181    AAAGAGCGCCGTTTTACTAAGTTGCATCCAGCACAGTGGAGCGCAAGCGGTGCACCACCG
241    ATAGCCACATCTCCCGCTCTCTCCATCGGCTCCTTCTCTATTTGTTTTCCGTCCCTCGTTTC
301    TGCTCTTCCCTGCTTTGGACACTTCACGCGTATCCCTTGCGGTGCGCGGCGTGTCTACTA
361    CCGCGACGAGGGCAACTGCCGTCTGTAGCGCCTTGTCTCTCTGCTGATGACCGCGCAGCG
421    GCTGCTGACGTGACGACGTTGTCTCTCTGCTCTGGAATCGTGCGCGTGCTTTTTGGTTTG
481    CTCCCCATCGGCATTGCTGCTGCGGGTGTGCGCGCAGTGTGTACGGCTGCTTACCTTTTC
541    CTACCGCTGCACAGCAGTTGACGCTTACCAATTTCGAAAGCTCACCTCATTCCTCCCTCC
601    TCACACCATCATCGGCATCCATAGAGACACGTGCGCGTAGAACGATACAGCTCACGCGCA
661    CAGAGAGGCGTGTTCTGGTCGTGCGCATCATCGGCACAGCACTGGCGGACGAAACTCGCA
721    CACAGGCACGCCGCTCCTTTCACCCGTCATAGATAGTTGAATTAGACGCCCTCCTCCTC
781    CCTCATCATCGCCGTCGTCATCCGGGTCCGAGCACTACGGCCGCCACGACCGGTGCCGCC
841    ACCATCCCCTGACCCACGCCCTGACCCCTCACAAGGAGACGACCTTCCATGACCGAGTA
901    CAAGCCCACGGTGCGCCTCGCCACCCGCGACGACGTCCCCCGGGCCGTACGCACCCTCGC
961    CGCCGCGTTCGCCGACTACCCCGCCACGCGCCACACCGTCGACCCCGGACCGCCACATCGA
1021   GCGGGTCACCGAGCTGCAAGAACTCTTCTCACGCGCGTGGGCTCGACATCGGCAAGGT
```

▼ SalI

1081 GTGGGTCGCGGACGACGGCGCCGCGGTGGCGGTCTGGACCACGCCGGAGAGCGTCAAGC
 1141 GGGGGCGGTGTTTCGCCGAGATCGGCCCGCGCATGGCCGAGTTGAGCGGTTCCCGGCTGGC
 1201 CGCGCAGCAACAGATGGAAGGCCTCCTGGCGCCGCACCGGCCCAAGGAGCCCGCGTGGTT
 1261 CCTGGCCACCGTCGGCGTCTCGCCCGACCACCAGGGCAAGGGTCTGGGCAGCGCCGTCGT
 1321 GCTCCCGGAGTGGAGGCGGCCGAGCGCGCCGGGTGCCCGCCTTCTGGAGACCTCCGC
 1381 GCCCGCAACCTCCCCTTCTACGAGCGGCTCGGCTTACCGTCACCGCCGACGTCGAGGT
 1441 GCCCGAAGGACCGCGCACCTGGTGCATGACCCGCAAGCCCGGTGCCTGAATCCCGCCCGC
 1501 ACCCGCGCGCTCAGGCCGCGTGTGTCGTGCTCTTTCCATTTTTTTTTTTGTGTGTGGT
 1561 GGTGATTTGAGCTGCTCTCCGTTGTGTGCTGGGGACCCTCCTTCCCTCGATCTCCTCGTG
 1621 CGGGGTCTCCGACGCGCAGACCGGTGCGTGCGAGCGTGCACGTGCTGTGCGCGTGGCTG
 1681 TAGTTGCGAGCGGAGAGAGAGAGAGAGAGAGGGAGGGAGGGAGGGCAGAGGGCAGAGGACATGC
 1741 GGGTGGGAACGTGCACCGGCCTCGTCTCACGCAGCTGGAGCCCACGAATGCACCACCAC
 1801 ACCCTTCTTCCCCCCCCCTCCCTCTTCTTCCACGGCGGGCAGCAGCAGGGGGCTCAGC
 1861 TCACGCTTCTGTAGGGTATTATATTAAAGCACATGTGCGTGCTGTGCTTCGGCTTCTTGT
 1921 TGGTGGTTCGTTTCGCTTCAAGTCCACGACTCCTGCCGTTGCTCACCGCCGGGCTGTCTTC
 1981 TTTGCCCCCTCCCTCGGTGCCTCTTCCGCCGCCGACGCGTGCGCTGATCACGCGTCTTG
 2041 CGTGATGTGCCTGTGTGTATACACACCGTGCACGGAGAGAGCGAGCGAGCGAGAGAGAGA
 2101 GAGGGCGAGAGGAAGAATGGCCGGTGCCTCGCGTGGGCAAGCGTGCGCGAGTTTGTGCTG
 2161 TCGCTGCGCCGCGTGGATGTGCGCGCAGCGCAAGACCCCGTGCGCCTGAAACGTGAAGGGA
 2221 GGTGAGAAGCGTGCCGCATGAGGCCTTAAGGCAGGAAAGTGAAAA**CGAATACGCTGCCA**
 2281 **GAGTAGGGCGGGGAGCAGGGTACGCAGGGGTACGACAGCTTGGCTGTCTTGCATCTTCT**
 2341 GCTCTTCGTCGTTGTGACCGGTTTCGCTTGTTCGCTTGTGTG**CATGC**GCAGCCGGCGCAA
 2401 ACAAAAAAGGGAGACCAGCAACGACGGCGCCCCCCCCCCCCCCCCCGTCCGCCACTGG
 2461 CGGGGCGGGGCGGCTTCCGGTGTATGATATGCTCCGTAAAGGCAGCGCTCATTGACGCAG

▼ BsmI

▼ SphI

