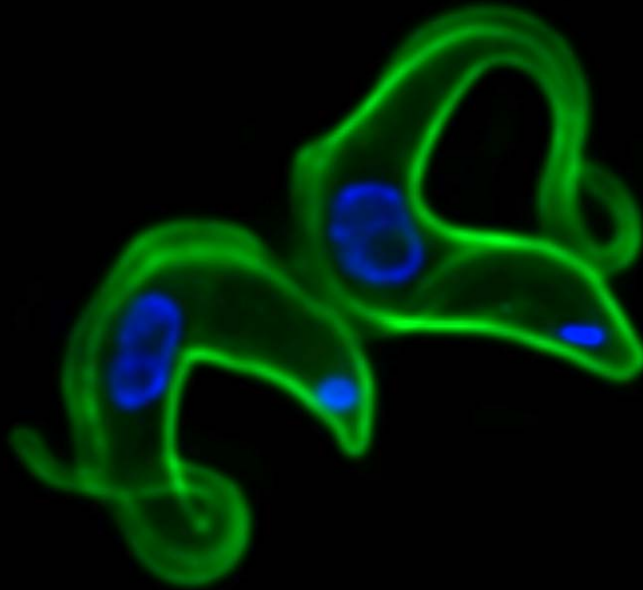


Instituto de Parasitología y Biomedicina
"López-Neyra"
CSIC

Análisis de la función de la RPB7, la SUMO E3 ligasa SIZ1
y la SUMOilación de la cromatina en la regulación del sitio
de expresión de la *VSG* en *Trypanosoma brucei*.



Diana Carolina López Farfán

Tesis Doctoral

2011



Departamento de Bioquímica y Biología Molecular
Universidad de Granada



Instituto de Parasitología y Biomedicina "López-Neyra"
Consejo Superior de Investigaciones Científicas

**Análisis de la función de la RPB7, la SUMO E3 ligasa SIZ1
y la SUMOilación de la cromatina en la regulación del sitio
de expresión de la VSG en *Trypanosoma brucei*.**

Diana Carolina López Farfán
Tesis Doctoral
Septiembre 2011

**Análisis de la función de la RPB7, la SUMO E3 ligasa SIZ1
y la SUMOilación de la cromatina en la regulación del sitio de
expresión de la VSG en *Trypanosoma brucei*.**

Memoria presentada por la licenciada
Diana Carolina López Farfán para optar al grado de
Doctor en Ciencias Biológicas.

Granada, Septiembre 2011

Diana Carolina López Farfán

Editor: Editorial de la Universidad de Granada
Autor: Diana Carolina López Farfán
D.L.: GR 1566-2012
ISBN: 978-84-9028-026-3

Esta tesis ha sido realizada en el Instituto de Parasitología y Biomedicina “López-Neyra” bajo la dirección del Doctor Miguel Navarro Carretero, Investigador Científico del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC).

Granada, Septiembre 2011

Miguel Navarro Carretero
Investigador Científico

Cubierta anterior y posterior: Fotografías de microscopía óptica de fluorescencia y análisis tridimensional por deconvolución de la forma sanguínea de *Trypanosoma brucei*. Imágenes tomadas tras una inmunofluorescencia indirecta con anticuerpos de ratón contra la glicoproteína variable de superficie VSG121 (verde), el DNA nuclear y mitocondrial es detectado mediante tinción con DAPI (azul). Autor: Jean-Mathieu B

Agradecimientos

Mi más sincero agradecimiento a Miguel Navarro, por confiar en mí desde el primer momento y haberme dado la oportunidad de hacer la tesis en su laboratorio, en especial por sus enseñanzas, el tiempo y la dedicación que me ha brindado durante estos años.

A mis amigos y compañeros de laboratorio, Manu, Isa, Jean Mathieu, Carlos, Barqui, Luis, Rose y Daria. Todos ellos han contribuido directa e indirectamente a este trabajo y sin ellos no hubiera sido posible. Muchísimas Gracias!

A Jean Mathieu por la portada y por su inmensa ayuda con las inmunofluorescencias.

A Daria, por su ayuda con las correcciones de los apartados en inglés.

A Isa, Carlos y Jose, por leer y corregir partes de la tesis.

A mis amigos en Granada por su compañía y apoyo en este camino: Paola, Jenny, Irene, Isa, Manu, Carlos C., Cavazutti, Carlos Poveda, Sole, Andreina, Linita, Christina, Barqui, Elena R. Chema y Alejo.

Especialmente gracias a Jose, por su compañía, apoyo y consejos, sin él esto hubiera sido más difícil.

A mi familia y amigos en Colombia que han permanecido conmigo a pesar de la distancia, por su apoyo, confianza y cariño incondicional.

A mi tía Blanca por venir a acompañarme y por estar siempre ahí.

A mis hermanos Liliana y Juancho, su cariño, paciencia y por ser mi soporte.

Y finalmente, quiero agradecer muy especialmente a las personas que me han permitido llegar hasta aquí, a mis padres: Martha y José, por sus enseñanzas, consejos, confianza y apoyo incondicional, todo esto es gracias a ustedes!

**"Un descubrimiento científico nunca
es el trabajo de una sola persona".
Louis Pasteur**

A mis padres

ÍNDICE

Lista de figuras y tablas

Lista de abreviaturas

1. Resumen	1
2. Introducción	2
2.1 <i>Trypanosoma brucei</i>	7
2.1.1 La enfermedad del sueño	8
2.1.2 Ciclo de vida	9
2.1.3 Variación antigénica y organización génica	11
2.1.4 Mecanismos de variación antigénica	13
2.2 Las RNA polimerasas de <i>T. brucei</i>	14
2.2.1 Estructura de las RNA polimerasas	17
2.2.2 Funciones de las subunidades RPB4 y RPB7	19
2.2.3 Factores de transcripción	21
2.3 Expresión génica en <i>T. brucei</i>	23
2.3.1 Transcripción policistrónica	23
2.3.2 Regulación transcripcional y promotores	24
2.3.3 Regulación de la expresión monoalélica de la VSG	27
2.3.3.1 Compartimentación nuclear	28
2.3.3.2 Silenciamiento telomérico	30
2.3.3.3 Regulación de la elongación-maduración del RNA	30
2.3.3.4 Estructura de la cromatina y regulación epigenética	31
2.4 Regulación de la expresión génica mediada por SUMO	33
2.4.1 La familia SUMO	33
2.4.2 Mecanismo enzimático de la SUMOilación	34
2.4.3 SUMO E3 ligasas	36
2.4.4 SUMOilación y regulación de la transcripción	38

3. Objetivos	43
4. Anexo resultados	47
4.1 La subunidad RPB7 de la RNAPII es necesaria para transcripción mediada por la RNAPI en <i>Trypanosoma brucei</i>	47
4.2 Mapeo de la distribución en la cromatina de las RNA polimerasas I, II y la subunidad RPB7 en <i>Trypanosoma brucei</i>	69
4.3 SUMOilación de proteínas asociadas a la cromatina del sitio de expresión de la VSG por TbSIZ1 en <i>Trypanosoma brucei</i>	97
5. Discusión	153
5.1 La transcripción de la RNAPI requiere la subunidad TbRPB7.....	155
5.2 TbRPB7 promueve la transcripción de la RNAPI <i>in vitro</i>	155
5.3 El complejo RNAPI interactúa con TbRPB7.....	156
5.4 Distribución de TbRPB7 en la cromatina de unidades de transcripción RNAPI y RNAPII.....	158
5.5 Posible interacción de TbRPB7 con una SUMO E3 ligasa.....	163
5.6 SUMOilación de proteínas asociadas a la cromatina del VSG-ES activo.....	165
5.7 Papel de TbSIZ1 en la SUMOilación del VSG-ES activo.....	167
6. Conclusiones	177
7. Anexo otras publicaciones	181
8. Bibliografía	185

Lista de figuras y tablas

Figura 2.1. Estructura celular de la forma sanguínea de <i>Trypanosoma brucei</i> . (Overath and Engstler, 2004).....	8
Figura 2.2. Ciclo de vida de <i>Trypanosoma brucei</i> . Tetley, L. y Barry, D. Universidad de Glasgow.....	10
Figura 2.3 Evolución de la parasitemia en el hospedador (Ross and Thomson, 1910) y evasión de la respuesta inmunitaria mediante cambio de VSG en <i>T. brucei</i>	11
Figura 2.4. Estructura de los sitios de expresión de la VSG.....	13
Figura 2.5. Mecanismos moleculares implicados en la variación antigénica en <i>Trypanosoma brucei</i>	13
Figura 2.6. Estructura cristalina de la RNAPII de levaduras representada mediante un esquema de lazo. Abajo y a la derecha, se muestra un esquema de la posición de cada subunidad dentro de la estructura (Cramer, 2004b).....	18
Figura 2.7 Esquema de la transcripción en <i>Trypanosoma brucei</i> . (Palenchar and Belloffatto, 2006).....	24
Figura 2.8 Compartimentación nuclear de la RNAPI en <i>T. brucei</i> y localización de los loci transcritos por la RNAPI: el VSG-ES activo (a), un VSG-ES parcialmente activo (b) y la <i>prociclina</i> (c), marcados con la GFP-LacI (Navarro & Gull, 2001). Inmunofluorescencia usando anticuerpos anti-RNAPI (rojo) y anti-GFP (verde), el núcleo se ve teñido con DAPI (azul) y el nucleolo es el área con menos tinción donde se localiza la RNAPI. La posición en el núcleo del locus marcado con el GFP-LacI esta indicado con una punta de flecha. El ESB (indicado con una flecha) se observa como compartimento extranucleolar de RNAPI en las imágenes a y b. (Navarro et al., 2007).....	29
Figura 2.9. Cascada enzimática de la SUMOilación (Martin et al., 2007).....	35
Tabla 2.1. Subunidades de las RNA polimerasas de bacterias, arqueas y eucariotas. Las subunidades nombradas en la misma línea horizontal están relacionadas evolutivamente. En negrita se indican las 5 subunidades comunes a las tres RNAPs eucariotas y en gris las comunes a las RNAP I y III.....	15
Tabla 2.2. Subunidades de la RNAPI identificadas en tripanosomátidos. Las subunidades nombradas en la misma línea horizontal están relacionadas evolutivamente En negrita se indican las subunidades que han sido duplicadas en tripanosomátidos y son específicas de este complejo.....	16
Tabla 2.3. Proteínas SUMOiladas identificadas por espectrometría de masas en un estudio global en <i>S. cerevisiae</i> (Wohlschlegel et al., 2004).....	40

Lista de abreviaturas

Por orden alfabético, las abreviaturas usadas en esta tesis son:

BSF	Forma sanguínea
BrUTP	Bromouridina
ChIP	Inmunoprecipitación de cromatina
ChIP- <i>seq</i>	<i>ChIP-sequencing</i>
CoIP	Coimmunoprecipitación
CTD	Dominio carboxilo terminal
CITFA	Factor de transcripción A clase I
DAPI	<i>4',6-diamidino-2-phenylindole</i>
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DNasa	Desoxirribonucleasa
DOT1	<i>disruptor of telomeric silencing</i>
ESAG	Gen asociado al sitio de expresión
ESB	Cuerpo asociado al VSG-ES activo
FACT	Complejo remodelador de la cromatina
FISH	Hibridación <i>in situ</i> de fluorescencia
FLI1	<i>Friend leukemia integration factor</i>
G0	Fase <i>Gap0</i>
G1	Fase <i>Gap1</i>
G2	Fase <i>Gap2</i>
GFP	Proteína verde fluorescente
GTF	Factores generales de transcripción
IF	Inmunofluorescencia
IP	Inmunoprecipitación
K	Cinetoplasto
M	Mitosis
mRNA	RNA mensajero
N	Núcleo
PBS	Phosphate buffered saline
Pc2	<i>Polycomb protein</i>
PF	Forma procíclica
PIAS	<i>Protein inhibitor of activated STAT</i>
PML	Promyelocytic leukemia nuclear bodies
pseVSG	Pseudogen VSG
PTU	Unidad de transcripción policistrónica
Q-PCR	PCR cuantitativa
RNAP	RNA polimerasa
RNAPI	RNA polimerasa I
RNAPII	RNA polimerasa II
RNAPIII	RNA polimerasa III
rDNA	DNA ribosomal
RNA	Ácido ribonucléico
RNAi	Interferencia de RNA
rRNA	RNA ribosomal

RT-qPCR	Retrotranscripción seguida de PCR cuantitativa
S	Fase de síntesis
SENPs	<i>Sentrin-Specific Proteases</i>
SIMs	SUMO interacting motifs
SIR	<i>Silencing Information Factors</i>
SL	<i>Spliced leader</i>
snRNAs	RNAs nucleares pequeños
snRNPs	Ribonucleopartículas nucleares pequeñas
snoRNAs	RNAs nucleolares pequeños
SP-CTD	<i>Siz/PIAS-carboxy-terminal domain</i>
SP-RING	<i>Siz, PIAS RING</i>
SSR	Región de cambio de hebra
SUMO	<i>Small Ubiquitin-like Modifier</i>
tRNA	RNA de transferencia
TAP	<i>Tandem affinity purification</i>
TPE	Efecto de la posición del telómero
Upl	<i>Ubiquitin-like protein-specific proteases</i>
UTR	Región no traducida
UV	Ultravioleta
VEGF	Secreción del factor de crecimiento endotelial vascular
VSG	Glicoproteína variable de superficie.
VSG-BC	Copia básica del gen <i>VSG</i>
VSG-ES	Sitio de expresión del gen <i>VSG</i>
Y2H	Ensayo de doble híbrido en levadura
YFP	Proteína amarilla fluorescente

Resumen

1. Resumen

Trypanosoma brucei es un parásito extracelular perteneciente a la familia Trypanosomatidae del reino protista, que causa la enfermedad del sueño o tripanosomiasis africana en humanos y la *nagana* en el ganado. Su ciclo de vida alterna entre dos hospedadores: un insecto vector del género *Glossina* (la mosca tsetse) y un hospedador mamífero (Matthews, 2005). El parásito se multiplica en el torrente sanguíneo del hospedador evadiendo la respuesta inmunitaria mediante una estrategia muy sofisticada de variación antigénica de su glicoproteína de superficie, VSG (Variant Surface Glycoprotein) (Donelson, 2003; Pays, 2006; Taylor and Rudenko, 2006). La forma sanguínea del parásito está cubierta por una capa densa de esta glicoproteína que cambia de manera estocástica con una cierta frecuencia en la población (10^{-2} – 10^{-5}). El genoma del parásito presenta más de mil copias de genes VSG, de las cuales aproximadamente 20 se encuentran en regiones conocidas como Sitios de Expresión del gen VSG (VSG-ES; VSG Expression Site) y sólo uno está activo en un momento dado. Los mecanismos moleculares que controlan la expresión monoalélica de la VSG son mayoritariamente desconocidos.

La transcripción de las dos glicoproteínas de superficie es llevada a cabo por la RNA polimerasa I (RNAPI), un complejo que normalmente no transcribe RNAs codificantes en otros eucariotas. Esta inusual característica puede estar acompañada por el reclutamiento de subunidades específicas o factores de transcripción que confieren a la RNAPI la capacidad de transcribir RNA mensajeros (mRNAs). Estudios previos realizados en nuestro laboratorio usando una línea celular doble reportera, sugieren que la transcripción mediada por RNAPI requiere de la TbRPB7, una subunidad específica de la RNAPII en eucariotas (Penate, 2007).

En esta tesis se caracteriza el papel funcional de la TbRPB7 en la transcripción de la RNAPI de *T. brucei*. Mediante experimentos de coimmunoprecipitación encontramos que TbRPB7 interactúa con TbRPA1 y TbRPB6z, dos subunidades específicas del complejo RNAPI. Ensayos de transcripción *in vivo* señalan que la transcripción de los genes VSG y 18S rDNA se reduce tras la depleción de TbRPB7 por RNA de interferencia (RNAi). Además, ensayos de transcripción *in vitro* muestran que la actividad transcripcional del promotor VSG incrementa tras la adición de proteína TbRPB7 recombinante y se reduce tras su inmunodepleción.

Posteriormente se ha analizado el perfil de ocupación de la proteína TbRPB7 mediante ensayos de inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP) y hemos detectado que TbRPB7 se asocia *in vivo* con el VSG-ES activo y no con los inactivos, de forma similar a TbRPA1, la subunidad mayor del complejo RNAPI.

En los complejos RNAPII, la RPB7 se ha visto implicada tanto en el reclutamiento de factores de procesamiento del mRNA (Mitsuzawa et al., 2003) como de factores de transcripción (Na et al., 2003; Petermann et al., 1998). Estos trabajos sugieren que en *T. brucei*, TbRPB7 podría desempeñar una función similar regulando la transcripción de los genes *VSG* y *prociclina* por la RNAPI, mediante su interacción con factores de transcripción, factores de elongación, etc. Con el fin de identificar posibles interacciones de TbRPB7 con proteínas involucradas en la regulación de la transcripción de la *VSG*, se realizó un ensayo de doble híbrido en levadura. Mediante esta aproximación se encontraron varias proteínas, incluyendo una con un dominio conservado MIZ/SP-RING, característico de las SUMO (*Small Ubiquitin-like Modifier*) E3 ligasas (Melchior et al., 2003), denominada en esta tesis TbSIZ1.

SUMO es una modificación postraduccional de proteínas que se ha visto involucrada en diversos procesos celulares en eucariotas superiores. El grupo más común de sustratos modificados por SUMO son los factores de transcripción, cuya actividad puede ser modificada positiva o negativamente como consecuencia de la SUMOilación (Lyst and Stancheva, 2007). Las enzimas SUMO E3 ligasas aparecen en el último paso de la cascada enzimática de SUMOilación, catalizando la transferencia del grupo SUMO y determinando la especificidad del sustrato (Johnson and Gupta, 2001; Takahashi et al., 2001).

La depleción de TbSIZ1 mediante RNAi reduce la señal nuclear de proteínas conjugadas con SUMO detectadas por inmunofluorescencia (IF), lo que sugiere que TbSIZ1 posee actividad SUMO ligasa *in vivo*. Asimismo análisis de IF de doble marcaje y colocalización, sugieren que regiones nucleares con alta concentración de proteínas SUMOiladas colocalizan con el VSG-ES activo en el núcleo.

Por otro lado, investigamos la presencia de proteínas SUMOiladas asociadas a la cromatina del VSG-ES por ChIP y encontramos un enriquecimiento significativo a lo largo de todo el VSG-ES activo y en la región aguas arriba del promotor activo. Por el contrario, no se detectaron proteínas SUMOiladas en los VSG-ESs inactivos ni en otros *loci* analizados como el DNA ribosomal (rDNA) o el promotor del *SL* (*Splice leader*), transcritos por la RNAPI y la RNAPII respectivamente. Estos resultados sugieren que

la SUMOilación de proteínas asociadas a la cromatina podría ser una característica singular del VSG-ES activo.

A continuación analizamos el efecto de la depleción de la SUMO E3 ligasa TbSIZ1, en la ocupación de proteínas conjugadas con SUMO detectadas en el VSG-ES activo. La depleción de TbSIZ1 reduce la señal de proteínas SUMOiladas detectadas por CHIP, lo cual se correlaciona con una disminución en los niveles de TbrPA1 en el VSG-ES activo y una reducción en la tasa de transcripción de la VSG. Sin embargo, este efecto parece ser sobre la actividad transcripcional de la RNAPI, ya que se observa una reducción similar en la ocupación de TbrPA1 y en la transcripción del gen ribosomal 18S.

En conjunto los resultados sugieren que TbSIZ1 funciona como una SUMO E3 ligasa *in vivo* y que es requerida para la SUMOilación de proteínas asociadas a la cromatina del VSG-ES activo, lo cual podría ser importante para el reclutamiento de la RNAPI, factores de transcripción o proteínas remodeladoras de la cromatina, al promotor VSG activo para su eficiente transcripción.

Introducción

2. Introducción

2.1. *Trypanosoma brucei*

Trypanosoma brucei es un parásito extracelular, perteneciente a la familia Trypanosomatidae del reino protista, que divergió del dominio Eukarya relativamente temprano. Su genoma, y el de otras dos especies de la misma familia, *Trypanosoma cruzi* y *Leishmania major*, ya han sido secuenciados (Berriman et al., 2005; El-Sayed et al., 2005; Ivens et al., 2005). Estos tres miembros de la familia Trypanosomatidae son responsables de importantes enfermedades humanas como la enfermedad del sueño (*T. brucei*), enfermedad de Chagas (*T. cruzi*) y leishmaniasis (*Leishmania spp.*)

Esta familia pertenece la clase Kinetoplastea, que se caracteriza por presentar una única mitocondria cuyo DNA se conoce como cinetoplasto, el cual se encuentra asociado al cuerpo basal del flagelo, por lo demás la estructura celular es típica de eucariota. Muchos de sus orgánulos y estructuras están presentes en una única copia (Ej. bolsillo flagelar, flagelo, cinetoplasto, Golgi, mitocondria y núcleo) y están localizados de manera precisa, concentrados entre el extremo posterior y centro de la célula (fig 2.1). Por debajo de la membrana a modo de corsé, se extiende una red de microtúbulos que forma el citoesqueleto. La superficie entera del parásito esta cubierta por una densa capa constituida por la glicoproteína variable de superficie (VSG).

Inicialmente, el estudio de estos protozoos flagelados se debió a razones de salud pública. Sin embargo, el descubrimiento en ellos de características tales como; la transcripción policistrónica, el mecanismo de *trans-splicing*, la edición exhaustiva del RNA mitocondrial, la presencia de orgánulos de copia única, la variación antigénica regulada por mecanismos de exclusión monoalélica y la endocitosis y exocitosis polarizada en *T. brucei*, los ha convertido en interesantes modelos de estudio para entender la evolución de diferentes procesos biológicos en eucariotas. Existen ejemplos de fenómenos descritos inicialmente en tripanosomátidos tales como la edición de RNA (Stuart et al., 2005) y el *trans-splicing* de mRNA (Bonen, 1993) que han sido posteriormente confirmados en organismos eucariotas superiores (Horiuchi and Aigaki, 2006; Nishikura, 2006).

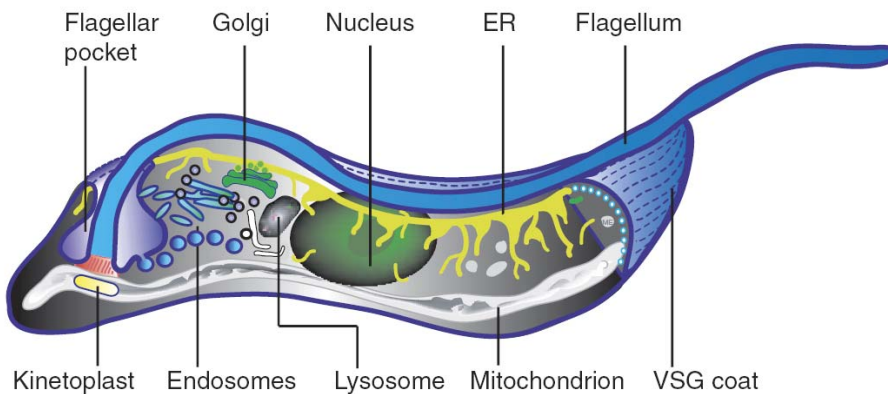


Figura 2.1. Estructura celular de la forma sanguínea de *Trypanosoma brucei* (Overath and Engstler, 2004).

2.1.1. La enfermedad del sueño

T. brucei causa la enfermedad del sueño o tripanosomiasis africana en humanos y el *Nagana* en ganado. Las dos subespecies involucradas en la enfermedad en humanos son: *T. brucei rhodesiense* presente en el este y sur de África, responsable del 5% de los casos reportados, causando infección aguda y *T. brucei gambiense* en el oeste y centro de África, responsable del 95% de los casos reportados, causando infección crónica. En África subsahariana, *T. brucei brucei* causa el *Nagana* que afecta severamente la ganadería. Esta última es la subespecie más usada para estudios en el laboratorio.

Tras la picadura de la mosca tsetse, los tripanosomas se propagan por el sistema hemolinfático ocasionando los primeros síntomas de malestar, falta de energía y fiebres intermitentes. Los ganglios linfáticos y el bazo pueden inflamarse, siendo estos síntomas tempranos de la infección aguda por *T. b. rhodesiense*. En el curso de la enfermedad también aparecen anemia y dolores de cabeza y articulaciones. Cuando el parásito atraviesa la barrera hematoencefálica, se encuentra en el líquido cefalorraquídeo y aparecen desórdenes neurológicos y endocrinos, si no se trata, la enfermedad del sueño es mortal (Stich et al., 2003).

La enfermedad del sueño se presenta en 36 países de África subsahariana donde se encuentra el vector, la mosca Tsetse (Genero *Glossina*), principal medio de transmisión de la enfermedad. En el 2009, tras continuos esfuerzos por controlar la enfermedad, el

número de nuevos casos reportados se redujo a 10.000 por primera vez en 50 años, actualmente el número estimado de casos es de 30.000 (Simarro et al., 2011).

Las enfermedades causadas por parásitos tripanosomátidos han sido clasificadas como enfermedades tropicales olvidadas, ya que no existen vacunas y los tratamientos quimioterapéuticos disponibles son deficientes debido a su toxicidad y al desarrollo de resistencia. El tratamiento en uso para las fases avanzadas de la enfermedad (fase neurológica) es mortal para el 10 % de los casos (WHO, 1998)

Los fármacos disponibles actualmente para el tratamiento de la enfermedad del sueño fueron diseñados hace más de 60 años y se desconoce el mecanismo de acción de la mayoría. Para la fase hemolinfática se emplea la Pentamidina y la Suramina, para la fase neurológica el tratamiento se basaba en el Melarsoprol, derivado del arsénico que es extremadamente tóxico, por lo cual se ha intentado reducir su uso empleando la Eflornitina y el Nifurtimox como alternativa menos tóxica (Simarro et al., 2011).

El control de la enfermedad se basa en el uso de estos fármacos obsoletos y el control vectorial, ya que las compañías farmacéuticas solo recientemente se han interesado en desarrollar nuevos fármacos para el tratamiento de estas enfermedades, puesto que el mercado potencial son países pobres. Algunos compuestos de nueva generación con capacidad tripanocida (en fase 1) son SIPI 1029, CGP 40215 y DB-289, de los cuales, sólo el último se encuentra en vías para la aprobación de su uso en humanos.

2.1.2. Ciclo de vida

El ciclo de vida de *T. brucei* es complejo y engloba diferentes formas con características morfológicas y metabólicas distintas (Figura 2.2) (Matthews, 2005). El parásito alterna entre dos hospedadores: un artrópodo o insecto vector del género *Glossina* (mosca Tsetse) y un hospedador mamífero. En su ciclo de vida las formas replicativas dan paso a otras preadaptadas al siguiente hospedador, que no tienen capacidad de división. Cuando una mosca pica a un mamífero infectado succiona parásitos con la sangre. En su forma procíclica, estos parásitos se multiplican en el intestino de la mosca. Cuando alcanzan cierta densidad, dejan de dividirse y se dirigen hacia las glándulas salivares. Allí, quedan sujetos al epitelio y vuelven a dividirse en forma de epimastigotes.

Algunos de estos parásitos se diferencian a metacíclicos, no replicativos, preadaptados al hospedador mamífero. Tras una nueva picadura, los parásitos entran en la sangre del mamífero y se diferencian a forma sanguínea alargada, replicativa. Por último, parte de la población parasitaria deja de dividirse para convertirse en forma sanguínea rechoncha, preadaptada a la mosca.

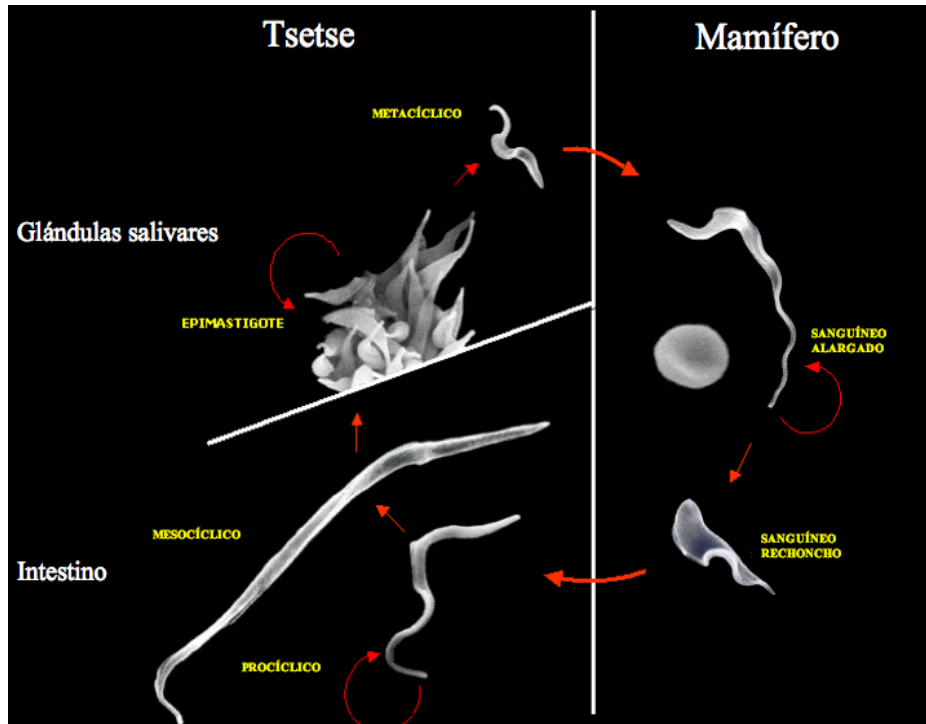


Figura 2.2. Ciclo de vida de *Trypanosoma brucei*. Tetley, L. y Barry, D., Universidad de Glasgow.

Las formas que se han conseguido cultivar *in vitro* son: forma procíclica (intestino de la mosca) y forma sanguínea alargada (sangre y líquidos tisulares del mamífero). A esta última forma nos referiremos a lo largo de esta tesis como forma sanguínea.

Algunos aislados adaptados al cultivo *in vitro* han perdido la capacidad de completar el ciclo y se conocen como monomórficos, por oposición a aquellos que mantienen esa capacidad, los pleomórficos. El trabajo experimental de esta tesis se ha realizado utilizando la cepa monomórfica, *T. brucei* 427.

2.1.3. Variación antigénica y organización génica

A diferencia de otros tripanosomátidos, *T. brucei* es un parásito extracelular que se multiplica en la sangre y líquidos tisulares, por lo tanto, se encuentra continuamente expuesto a la respuesta inmunitaria del hospedador. Su éxito como patógeno es debido a una estrategia altamente sofisticada de variación antigénica de su glicoproteína de superficie, VSG (*V*ariant *S*urface *G*lycoprotein) (Donelson, 2003; Pays, 2006; Taylor and Rudenko, 2006). La forma sanguínea del parásito está cubierta por una capa densa de esta glicoproteína ($\sim 10^7$ moléculas de un único tipo de VSG), que cambia de manera estocástica con una cierta frecuencia en la población ($10^{-2} - 10^{-5}$), permitiendo al parásito escapar de los anticuerpos específicos del hospedador contra la VSG mayoritaria, posibilitando así una infección persistente puesto que algunos parásitos que expresan otra VSG son resistentes. De esta forma se producen oscilaciones de la parasitemia en sangre, coincidiendo una alta parasitemia con los picos de fiebre característicos de la enfermedad (Figura 2.3). Así, la variación antigénica facilita el establecimiento de infecciones crónicas y dificulta el desarrollo de vacunas eficaces contra este parásito.

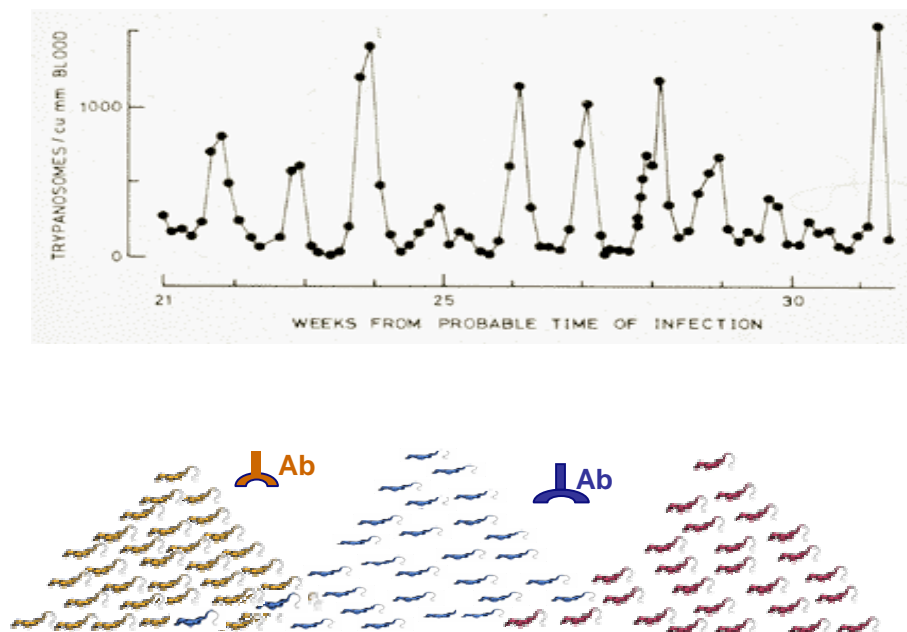


Figura 2.3 Evolución de la parasitemia en el hospedador (arriba) (Ross and Thomson, 1910), y evasión de la respuesta inmunitaria mediante cambio de VSG en *T. brucei* (abajo)

La organización genómica de *T. brucei* refleja la importancia que tiene la variación antigénica en la supervivencia del parásito. Los tripanosomas son organismos diploides, el genoma de *T. brucei* consiste en 11 pares de cromosomas megabásicos (de 1 a 6 Mb), ~5 cromosomas intermedios (de 200 a 900 Kb) y ~100 minicromosomas (de 50 a 150 Kb) (Wickstead et al., 2004). Los cromosomas megabásicos e intermedios son probablemente aneuploides, siendo heredados en una forma aparentemente no mendeliana (Wells et al., 1987). El genoma haploide es de ~35 Mb, con una variación entre distintos aislados o cepas de hasta un 25 % (El-Sayed et al., 2000), lo cual refleja la plasticidad genómica del parásito. Los cromosomas megabásicos contienen todos los genes de mantenimiento, y son diploides excepto en sus extremos (Taylor and Rudenko, 2006). Los cromosomas intermedios y los minicromosomas comparten una estructura común: una zona central palindrómica y, a ambos lados, una región subtelomérica no repetitiva, seguida de repeticiones teloméricas (Wickstead et al., 2004). Las regiones subteloméricas de ambos tipos de cromosomas contienen genes *VSG* y presentan un alto grado de homología con las zonas subteloméricas de los megacromosomas, lo cual se cree favorece la recombinación de genes *VSG* silenciados en los minicromosomas a los sitios de expresión en los megacromosomas. Cromosomas intermedios y minicromosomas constituyen más del 10 % del genoma nuclear, y se cree que existen como un reservorio genético para aumentar el repertorio de *VSGs*.

Existen más de mil copias de genes *VSG* y pseudo-*VSG* en el genoma de *T. brucei* (Berriman et al., 2005; Van der Ploeg et al., 1982), pero aproximadamente solo 20 se encuentran en regiones conocidas como sitios de expresión del gen *VSG* (*VSG-ES*, *VSG Expression Site*) (Navarro and Cross, 1996; Pays and Nolan, 1998). Las demás copias, en su mayoría dispuestas en tándem en regiones subteloméricas de los tres tipos de cromosomas, se las conoce como copias básicas (Berriman et al., 2005; Wickstead et al., 2004). Los *VSG-ESs* se localizan en regiones subteloméricas de cromosomas megabásicos e intermedios y son unidades policistrónicas de 40 a 60 Kb, que se extienden desde el promotor hasta el gen *VSG*, además contienen pseudogenes *VSG* y genes asociados a los sitios de expresión (*ESAGs*, *Expression Site Associated Genes*), la mayoría con función desconocida. (Figura 2.4).

En la forma sanguínea del parásito, sólo uno de los 20 *VSG-ESs* está activo en un momento dado, y se le conoce como *VSG-ES* activo (Borst, 2002). La expresión monoalélica es crucial para la evasión de la respuesta inmunitaria, pero los mecanismos moleculares que la regulan son mayoritariamente desconocidos.

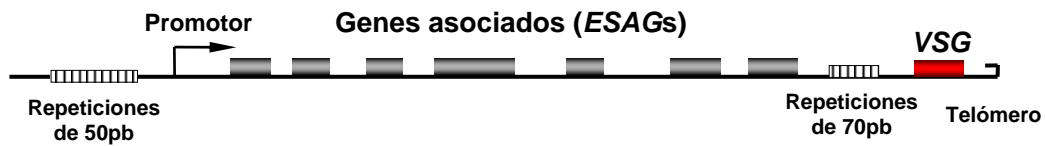


Figura 2.4. Estructura de los sitios de expresión de la VSG.

2.1.4. Mecanismos de variación antigénica

Se han identificado diferentes mecanismos moleculares que dan lugar a variación antigénica en *T. brucei* (Figura 2.5). El mecanismo más frecuente implica recombinación homóloga (Robinson et al., 1999). Dentro de este tipo, se han descrito cambios por conversión génica (un gen *VSG* donador se duplica al *VSG*-ES activo) (Robinson et al., 1999), por intercambio telomérico cuando dos *VSG*s son intercambiadas (Aitcheson et al., 2005), siendo este poco frecuente, y por conversión telomérica (el donador es un telómero con su gen *VSG* asociado) (Kooter et al., 1988). El otro mecanismo no requiere cambios en el DNA, se conoce como cambio *in situ* y consiste en la activación de un *VSG*-ES antes inactivo y la concomitante inactivación del hasta entonces *VSG*-ES activo (Cross et al., 1998). El gen *VSG* está precedido por una serie de repeticiones de ~70 pb, y el *VSG*-ES está separado a su vez del resto del cromosoma por otra serie de repeticiones de 50 pb (Figura 2.4). Se cree que estas repeticiones deben ser importantes tanto para el control de la expresión como para el alto grado de recombinación en este *locus*; sin embargo, se desconoce mediante qué mecanismos.

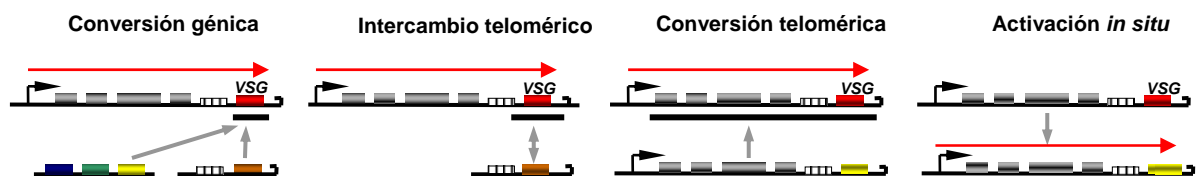


Figura 2.5. Mecanismos moleculares implicados en la variación antigénica en *T. brucei*.

En la búsqueda de los factores involucrados en la maquinaria de recombinación se ha encontrado la proteína de reparación de roturas, denominada TbRAD51, cuya delección disminuye la capacidad de recombinación (McCulloch and Barry, 1999). También se ha encontrado una topoisomerasa tipo IA (TOPO3 α) que al parecer controla la tasa de recombinación, eliminando los intermediarios de recombinación no deseados (Kim and Cross, 2010).

2.2 Las RNA polimerasas de *T. brucei*

Los eucariotas presentan tres tipos de RNA polimerasas (RNAPs) nucleares que se distinguen por su localización, su función y las subunidades que las componen, a diferencia de bacterias y arqueas que poseen una sola RNA polimerasa

Las RNAPs eucariotas, en particular las de levaduras, que son las más estudiadas, son enzimas multiméricas que comprenden 14 subunidades (RNAPI), 12 subunidades (RNAPII) y 17 subunidades (RNAPIII) (Lee and Young, 2000). Las tres polimerasas están formadas por un esqueleto de 12 subunidades, de las cuales 10 son homólogas a las encontradas en la RNAP de arqueas (Langer et al., 1995; Werner and Weinzierl, 2002) y 5 de estas, están evolutivamente relacionadas con subunidades de la RNAP de bacterias. Además, la RNAPI tiene dos subunidades adicionales específicas (RPA49 y RPA34) (Bischler et al., 2002) y la RNAPIII cinco (RPC82, RPC53, RPC37, RPC34 y RPC31) (Proshkina et al., 2006), que contribuyen a la especialización transcripcional de estas polimerasas (Tabla 2.1).

No existen homólogos en arqueas de las subunidades exclusivas de RNAPI y RNAPIII, lo que sugiere que estas dos enzimas evolucionaron a partir de una más parecida a la RNAPII (Werner and Weinzierl, 2002). En cualquier caso, dada la alta homología de subunidades y de estructura, es aceptado que las tres RNAPs eucariotas tuvieron un antecesor común.

	Bacterias (<i>E. coli</i>)	Arquea (<i>M. jannaschii</i>)	Eucariotas (<i>S. cerevisiae</i>)		
			RNAPI	RNAPII	RNAPIII
Bacterianas	β' β α' α ω	A' / A'' B' / B'' D L K	RPA190 RPA135 RPC40 RPC19 RPB6	RPB1 RPB2 RPB3 RPB11 RPB6	RPB160 RPC128 RPC40 RPC19 RPB6
Propias de Arqueobacterias y Eucariotas		F H E N P	RPA14 RPB5 RPA43 RPA12 RPB10 RPB12	RPB4 RPB5 RPB7 RPB9 RPB10 RPB12	RPC17 RPB5 RPC25 RPC19 RPB10 RPB12
Específicas de RNAPI y III			RPA34 RPA49	– –	RPC31 RPC34 RPC37 RPC53 RPC82
Específicas eucariotas			RPB8	RPB8	RPB8

Tabla 2.1. Subunidades de las RNA polimerasas de bacterias, arqueas y eucariotas. Las subunidades nombradas en la misma línea horizontal están relacionadas evolutivamente. En negrita se indican las 5 subunidades comunes a las tres RNAPs eucariotas y en gris las comunes a las RNAP I y III.

En tripanosomátidos todas las subunidades comunes y la mayoría de las homólogas han sido identificadas por análisis *in silico* y caracterización bioquímica (Das et al., 2006; Devaux et al., 2006; Kelly et al., 2005; Nguyen et al., 2006; Walgraffe et al., 2005). Sin embargo, algunas de las subunidades específicas y homólogas en los complejos RNAPI y RNAPIII, no fueron encontradas.

En el caso de la RNAPI, en *T. brucei* se han encontrado homólogos para 10 de las 14 subunidades que componen la de levaduras (Nguyen et al., 2006; Walgraffe et al., 2005), las subunidades específicas RPA34 y RPA49 no han sido identificadas, así como tampoco las subunidades RPA14 y RPA43, que son homólogos estructurales y funcionales del heterodímero RPB4/RPB7 de la RNAPII, filogenéticamente conservado en la RNAP de arqueas (subunidades E y F) (Tabla 2.2).

Por otra parte, se ha encontrado una nueva subunidad del complejo RNAPI específica de tripanosomátidos, la TbRPA31, pero ésta no presenta similitud a nivel de secuencia ni estructura con la RPA43 (Nguyen et al., 2007).

Los genomas de los tripanosomátidos contienen dos genes parálogos de las subunidades comunes RPB5, RPB6 y RPB10 (Kelly et al., 2005; Walgraffe et al., 2005), que han dado lugar a una especialización de las funciones de las isoformas de dichas

subunidades. Las isoformas TbRBP5z, TbRBP6z y TbRBP10z forman parte del complejo RNAPI (Nguyen et al., 2006), mientras que TbRBP5, TBRPB6 y TbRBP10 se encuentran en el complejo RNAPII (Das et al., 2006; Devaux et al., 2006). En el caso de las duplicaciones de las subunidades RPB5 y RPB6, las variantes TbRBP5z y TbRBP6z presentan inserciones o deleciones de regiones conservadas en sus homólogos eucariotas y se localizan en el nucleolo. La variante RPB5z presenta 3 inserciones, dos de las cuales están en el dominio N-terminal conservado en eucariotas y la variante RPB6z carece del dominio N-terminal y presenta una inserción corta en el dominio C-terminal (Devaux et al., 2007).

	RNAP I <i>S. cerevisiae</i>	RNAP I <i>T. brucei</i>
Bacterianas	RPA190 RPA135 RPC40 RPC19 RPB6	RPA1 RPA2 RPC40 RPC19 RPB6z
Propias de Arqueobacterias y Eucariotas	RPA14 RPB5 RPA43 RPA12 RPB10 RBP12	– RPB5z – RPA12 RPB10z RBP12
Específicas de RNAP I y III	RPA34 RPA49	– –
Específicas eucariotas	RPB8	RPB8
Específicas de parásitos		RPA31

Tabla 2.2. Subunidades de la RNAPI identificadas en tripanosomátidos. Las subunidades nombradas en la misma línea horizontal están relacionadas evolutivamente. En negrita se indican las subunidades que han sido duplicadas en tripanosomátidos y son específicas de este complejo.

La duplicación de las subunidades RPB5 y RPB6 ha ocurrido en múltiples linajes eucariotas, además de la familia Tripanosomatidae. Un ejemplo es *Arabidopsis thaliana*, que codifica al menos cuatro genes *RPB5-like* y dos *RPB6-like*, aunque el papel que desempeñan las subunidades parálogas no está determinado. Otros eucariotas unicelulares como *Gardia lamblia* y *Paramecium tetraurelia*, también contiene varios genes parálogos de *RPB5* y *RPB6* (Devaux et al., 2007).

En el complejo RNAPII de levaduras, RPB6 es un punto de contacto entre el heterodímero RPB4/RPB7 y el núcleo catalítico de la enzima, este contacto es mediado

principalmente por RPB4 (Tan et al., 2003), dada la posición de RPB6 en el complejo RNAPII (Cramer et al., 2000; Kettenberger et al., 2004), esta interacción podría estar mediada por el dominio N-terminal cuya orientación y estructura son desconocidos. La carencia de un ortólogo de RPA14/RPA43 en el genoma de los tripanosomas, junto con la ausencia del amino terminal en la variante RPB6z, dio lugar a proponer que la incorporación de TbRPB6z en el complejo RNAPI impide el reclutamiento de las subunidades del heterodímero (Devaux et al., 2007).

En la estructura de la RNAPII, RPB5 forma parte del canal de entrada del DNA (Cramer et al., 2000), posición que le permite interactuar con factores de transcripción como TFIIB, TFIIF y TFIIE. Las inserciones encontradas en la variante RPB5z podrían modificar la función de la polimerasa impidiendo la interacción con dichos factores de transcripción y facilitando la interacción con otros específicos del complejo transcripcional RNAPI.

La transcripción de la *VSG* y la prociclina por la RNAPI es una característica excepcional de *T. brucei*, dado que esta polimerasa normalmente no transcribe mRNAs. Esta inusual característica podría estar mediada por el reclutamiento de subunidades específicas y factores de transcripción que le confieren a esta polimerasa multifuncional la capacidad de transcribir RNAs codificantes.

Los tripanosomas presentan genes ortólogos para RPB4/RPB7, pero al parecer carecen de ortólogos para sus homólogos RPA14/RPA43, estas dos subunidades están conservadas evolutivamente en arqueas y eucariotas. Por lo tanto, una de las preguntas más importantes es, si el complejo RNAPI en tripanosomas recluta alguna subunidad adicional relacionada con las subunidades E y F (homólogos de RPB7 y RPB4) en arqueas. Estudios previos realizados en nuestro laboratorio sugieren que la transcripción mediada por RNAPI en *T. brucei* requiere de TbRPB7, una subunidad específica de la RNAPII en eucariotas.

2.2.1 Estructura de las RNA polimerasas

La RNA polimerasa II de levaduras comprende 12 subunidades que están altamente conservadas en eucariotas (Cramer et al., 2001). La enzima consiste en un núcleo catalítico de 10 subunidades y un heterodímero conformado por las subunidades RPB4/RPB7, que puede disociarse del núcleo catalítico (Armache et al.,

2003; Armache et al., 2005; Bushnell and Kornberg, 2003). La estructura cristalina de la enzima se conoce con detalle desde el año 2000, cuando se determinó la estructura del núcleo catalítico (Cramer et al., 2000) y posteriormente se describió la estructura completa de 12 subunidades (Armache et al., 2003; Bushnell and Kornberg, 2003). La conservación estructural entre las tres RNAPs eucariotas, permite usar la RNAPII como modelo para entender la arquitectura de las otras dos polimerasas.

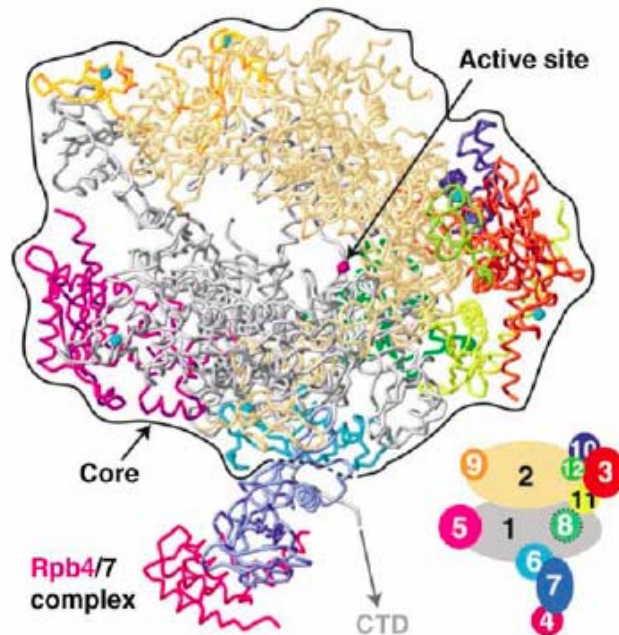


Figura 2.6. Estructura cristalina de la RNAPII de levaduras representada mediante un esquema de lazo. Abajo y a la derecha, se muestra un esquema de la posición de cada subunidad dentro de la estructura (Cramer, 2004b).

Las dos subunidades mayores de cada RNAP (RPB1 y RPB2, en el caso de la RNAPII) forman la parte central del complejo y contienen el sitio activo, definido como el sitio catalítico y los sitios de unión a DNA y RNA (Cramer, 2004a). En un lado del complejo, las dos subunidades mayores están unidas por un puente formado por RPB3, RPB10, RPB11 y RPB12 (o sus homólogos en la RNAPI y RNAPIII, ver tabla 2.1) (Cramer, 2004b; Klinger et al., 1996). RPB6, RPB5 y RPB8 se asocian a la subunidad mayor, mientras que RPB9 (o sus homólogos) se une a las dos subunidades mayores (Cramer, 2004b). Existen datos genéticos y estructurales que sugieren que RPB5 y RPB9 podrían coordinar los cambios conformacionales de la polimerasa que se producen entre los estados abierto (donde el DNA puede acceder al sitio activo) y cerrado (en

elongación) (Zaros et al., 2007). El complejo descrito hasta ahora es capaz de elongar, sin embargo, para poder iniciar la transcripción desde un promotor necesita del heterodímero RPB4/RPB7 (Figura 2.6) (Armache et al., 2003). RPB7 posee dos dominios de unión a RNA conservados y un motivo S1 de unión a ácidos nucleicos de cadena sencilla, se ha demostrado que una DNA y RNA de cadena sencilla con similar afinidad (Orlicky et al., 2001), dado que en la estructura cristalina el heterodímero está cerca al posible sitio de la salida de RNA, es probable que interactúe con los transcritos. RPB7 se une a RPB4 por sus regiones C y N terminal, de forma que mutantes con deleciones en ambas regiones son incapaces de formar el heterodímero (Sareen et al., 2005). El subcomplejo RPB4/RPB7 se une al núcleo de la RNAPII por el dominio N-terminal de RPB7 y se encuentra cerca del dominio carboxilo terminal o CTD de la RPB1 (Cramer, 2004b). La mayor parte de la superficie del heterodímero está expuesta y, por lo tanto, es accesible a interacciones con otras proteínas o ácidos nucleicos.

2.2.2 Funciones de las subunidades RPB4 y RPB7

Las subunidades RPB4 y RPB7 han sido objeto de muchos estudios. En un principio, en las purificaciones bioquímicas no aparecían en cantidades estequiométricas (McKune et al., 1993; Woychik and Young, 1989), debido a que la estequiometría de la RNAPII purificada de *S. cerevisiae* es dependiente de las condiciones de crecimiento. En fase exponencial, RPB4/RPB7 se encuentran solamente en el 20% de los complejos RNAPII, lo cual dificultó la resolución de la estructura cristalina completa de la RNAPII (Armache et al., 2003; Cramer et al., 2000), que se logró obtener después usando células en fase estacionaria donde el heterodímero parece unirse de forma estequiométrica (Bushnell and Kornberg, 2003; Choder, 2004), o mediante la reconstrucción de la estructura de 12 subunidades a partir de la purificación del núcleo catalítico de la enzima, al cual adicionaron 5 veces un exceso del heterodímero purificado (Armache et al., 2003; Armache et al., 2005).

En *S. cerevisiae* RPB7 es un gen esencial, mientras RPB4 no es necesaria en condiciones normales de crecimiento, pero resulta esencial durante estrés térmico o nutricional (Choder and Young, 1993; McKune et al., 1993; Young, 1991). La sobreexpresión de RPB7 compensa parcialmente los fenotipos bajo estrés de la carencia

de RPB4, y puede unirse a la RNAPII independientemente de RPB4, aunque su interacción no es muy estable y solo puede ser detectada cuando es sobreexpresada (Sheffer et al., 1999). El hecho de que los fenotipos de sensibilidad a altas temperaturas y los defectos en la transcripción causados por la delección de *RPB4*, sean suprimidos con la sobreexpresión de RPB7, además de que RPB7 es esencial para la viabilidad mientras RPB4 no lo es en condiciones óptimas de crecimiento, sugieren que RPB7 es indispensable para las funciones del heterodímero.

El subcomplejo RPB4/RPB7 ha sido involucrado con respuesta al estrés y es necesario para el reconocimiento del promotor en ensayos de transcripción *in vitro*, de forma similar que el factor sigma de la RNAP bacteriana (Edwards et al., 1991; Orlicky et al., 2001).

Inicialmente se pensaba que la subunidad RPB7 era solamente necesaria para la fase de iniciación de la transcripción, sin embargo, estudios recientes mediante inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP) han demostrado que RPB7 permanece asociada a la polimerasa durante la fase de elongación en levaduras y en mamíferos (Cojocarú et al., 2008; Jasiak et al., 2008). Además los experimentos de ChIP realizados bajo condiciones de estrés sugieren que RPB7 está involucrada con la estabilización del complejo RNAPII durante la transcripción (Cojocarú et al., 2008). A parte de esto, se ha descrito que RPB7 interacciona con Nrd1, una proteína de unión a RNA involucrada con el procesamiento del extremo 3' de RNAs pequeños nucleares y nucleolares (Mitsuzawa et al., 2003), posteriormente se ha encontrado que RPB4 también contribuye al reclutamiento de factores del procesamiento del extremo 3' (Runner et al., 2008). Todos estos datos sugieren que RPB4/RPB7 es parte integral de la RNAPII y es requerida en todas las fases de la transcripción e incluso en fases iniciales del procesamiento del RNA, de forma acoplada a la transcripción.

En humanos RPB7 (HsRPB7) interactúa con varios factores de transcripción, algunos de los cuales están involucrados en el desarrollo de cáncer (Petermann et al., 1998; Zhou and Lee, 2001). Se ha publicado que HsRPB7 interactúa con el receptor de ácido retinoico y reprime la transcripción de activadores transcripcionales como AP-1 (Shen et al., 1999). HsRPB7 también interactúa con la proteína VHL (*von Hippel-Lindau*), un componente del complejo ubiquitina E3 ligasa que actúa como un potente supresor de tumores y regula la transcripción y secreción del factor de crecimiento endotelial vascular VEGF, HsRPB7 aumenta la transcripción de *VEGF*, por lo tanto, VHL regula la

expresión de *VEGF* mediante la ubiquitinación y degradación de HsRBP7 (Na et al., 2003).

Estos resultados, unidos a la posición que ocupa el heterodímero en la RNAPII, han llevado a un modelo según el cual RPB4/RPB7 podría regular la expresión génica mediante su interacción con factores que promueven la transcripción, factores de elongación como TFIIF, factores que modifican el CTD, etc (Meka et al., 2005; Sampath and Sadhale, 2005).

Posteriormente, se han ido descubriendo funciones adicionales de estas dos proteínas. En situaciones de estrés RPB4 media el transporte de mRNA al citoplasma (Farago et al., 2003). En levaduras se ha descrito que el heterodímero RPB4/RPB7 se mueve entre el núcleo y el citoplasma, funcionando como transportador entre estos dos compartimentos por vía dependiente de la transcripción, en condiciones normales, y de forma independiente bajo condiciones de estrés (Selitrennik et al., 2006). Por otro lado, se ha observado que RPB4 permanece asociado al mRNA hasta su degradación en los cuerpos P en el citoplasma de levaduras (Lotan et al., 2005), donde también ha encontrado a RPB7 (Lotan et al., 2007). También se ha descrito que dado que RPB7 posee sitios de unión a RNA, esta subunidad podría estar involucrada en la maduración de mRNA (Choder, 2004).

2.2.3 Factores de transcripción

Para iniciar la transcripción, cada RNAP requiere un conjunto específico de factores de transcripción, que forman el llamado complejo de preiniciación, compuesto por el DNA molde, la RNAP y en el caso de la RNAPII de levaduras, seis factores generales de transcripción (GTFs).

En tripanosomátidos, han sido identificados varios GTFs, algunos de ellos muestran una alta identidad de secuencia con sus ortólogos en levaduras y vertebrados, mientras otros presentan un grado bajo de similitud. La mayoría de factores encontrados en *T. brucei* están principalmente involucrados en la transcripción del *SL* (*Splice leader*) por la RNAPII, estos incluyen el factor TRF4 [TBP (TATA binding protein)-related factor 4] (Das et al., 2005; Ruan et al., 2004; Schimanski et al., 2005), un ortólogo muy divergente del factor TFIIB (Palenchar et al., 2006; Schimanski et al., 2006) y el complejo SNAPc (Das and Bellofatto, 2003), esencial para la síntesis de

pequeños RNAs nucleares en humanos. Además, han sido identificadas dos subunidades del factor TFIIA (Das et al., 2005; Schimanski et al., 2005) y el factor TFIIH (Lecordier et al., 2007; Lee et al., 2007). En *T. brucei*, TFIIH está compuesto de 9 subunidades, dos de las cuales son específicas de tripanosomátidos (Lee et al., 2009). Estos datos demuestran que los tripanosomatidos poseen más GTFs de los que inicialmente se estimaron en las búsquedas *in silico*.

En cuanto a la iniciación de la transcripción de RNAPI, existen por lo menos tres factores de transcripción involucrados en la síntesis de rRNAs en levaduras y vertebrados, dentro de estos se encuentran el UBF y TIF-IB/SL1, los cuales interaccionan con la región promotora para permitir la unión de RNAPI al complejo de iniciación. Las levaduras en lugar de UBF, tienen un factor llamado UAF. La otra proteína involucrada en la iniciación de la transcripción de RNAPI es el factor Rrn3 (homólogo de TIF-IA en mamíferos) (Paule and White, 2000) que interactúa con la subunidad RPA43 de la RNAPI (Peyroche et al., 2000). Ninguno de estos factores ha sido identificado en tripanosomátidos. Sin embargo, se ha encontrado un nuevo complejo proteico llamado factor de transcripción A clase I (CITFA), recientemente purificado y caracterizado en *T. brucei* (Brandenburg et al., 2007), que se asocia específicamente a los promotores RNAPI en *T. brucei*: *VSG*, *prociclina* y rDNA. El factor CITFA consiste de una cadena ligera de dineína y seis proteínas conservadas sólo en tripanosomátidos.

El factor TRF-4 mencionado anteriormente, se ha descrito como un regulador universal que parece tener un papel esencial en la transcripción de las tres RNAPs en *T. brucei*. Sin embargo, en el caso de los promotores RNAPI, TRF-4 es detectado en el promotor de la *prociclina*, pero no en los promotores del rDNA, sugiriendo que la composición de la maquinaria transcripcional en estos dos promotores puede ser distinta (Ruan et al., 2004).

En cuanto al complejo de iniciación de RNAPIII en tripanosomátidos, sólo se han identificado dos subunidades del factor transcripción TFIIB en *L. major* (Ivens et al., 2005), los demás factores tales como TFIIA y TFIIC no han sido encontrados en estos parásitos.

2.3. Expresión génica en *T. brucei*

El genoma nuclear de *T. brucei* es transcrito por tres RNA polimerasas (RNAPs) cuyas actividades son análogas a la de las clásicas RNAPs presentes en eucariotas superiores; RNAPI, II y III, pero con algunas diferencias.

En tripanosomas, la RNAPI además de transcribir los RNA ribosomales (rRNAs), transcribe los genes codificantes para los antígenos de superficie: VSG en la forma sanguínea y prociclina en la forma procíclica (Gunzl et al., 2003; Navarro and Gull, 2001; Rudenko et al., 1989).

La RNAPIII transcribe los RNAs nucleares pequeños (snRNAs, *small nuclear RNAs*), RNAs involucrados en la traducción (tRNAs y 5S rRNAs) e implicados en otros procesos celulares (7SL RNA), además de los U-snRNAs (U2, U3 y U4) que son transcritos por la RNAPII en la mayoría de eucariotas (Gunzl et al., 1995).

La actividad de la RNAPII se encuentra conservada, encargándose de la transcripción de la mayoría de los RNAs mensajeros (mRNAs).

2.3.1 Transcripción policistrónica

La organización génica encontrada en los cromosomas megabásicos (Berriman et al., 2005), muestra que la mayoría de los genes de *T. brucei* están organizados en grandes *clusters* de genes orientados en una misma dirección que se transcriben de forma policistrónica, generando largos transcritos que contienen decenas de genes que necesitan ser procesados antes de traducirse. Esta organización recuerda a los operones bacterianos, especialmente porque las secuencias de DNA que codifican proteínas casi nunca están interrumpidas por intrones (Clayton, 2002), pero a diferencia de los operones bacterianos, en los policistrones de *T. brucei* pueden encontrarse genes sin aparente relación funcional, y con una regulación postranscripcional diferencial (Colasante et al., 2007).

El procesamiento de los transcritos policistrónicos en monocistrones requiere dos pasos acoplados: el *trans-splicing* y la poliadenilación (LeBowitz et al., 1993; Matthews et al., 1994). El *trans-splicing* consiste en la adición de una secuencia de 39 nucleótidos denominada mini-exón o "*spliced leader*" (SL) RNA en el extremo 5' de todos los mRNA (De Lange et al., 1983). Existen unas 200 copias del gen del *SL RNA* en el genoma, que

se transcriben de forma monocistrónica (Kooter and Borst, 1984; Kooter et al., 1984). El SL RNA aporta a todos los mRNAs la estructura cap (Perry et al., 1987) que los protege de la degradación (Figura 2.7). La poliadenilación ocurre de manera dependiente del trans-splicing del gen inmediatamente posterior (LeBowitz et al., 1993; Matthews et al., 1994).

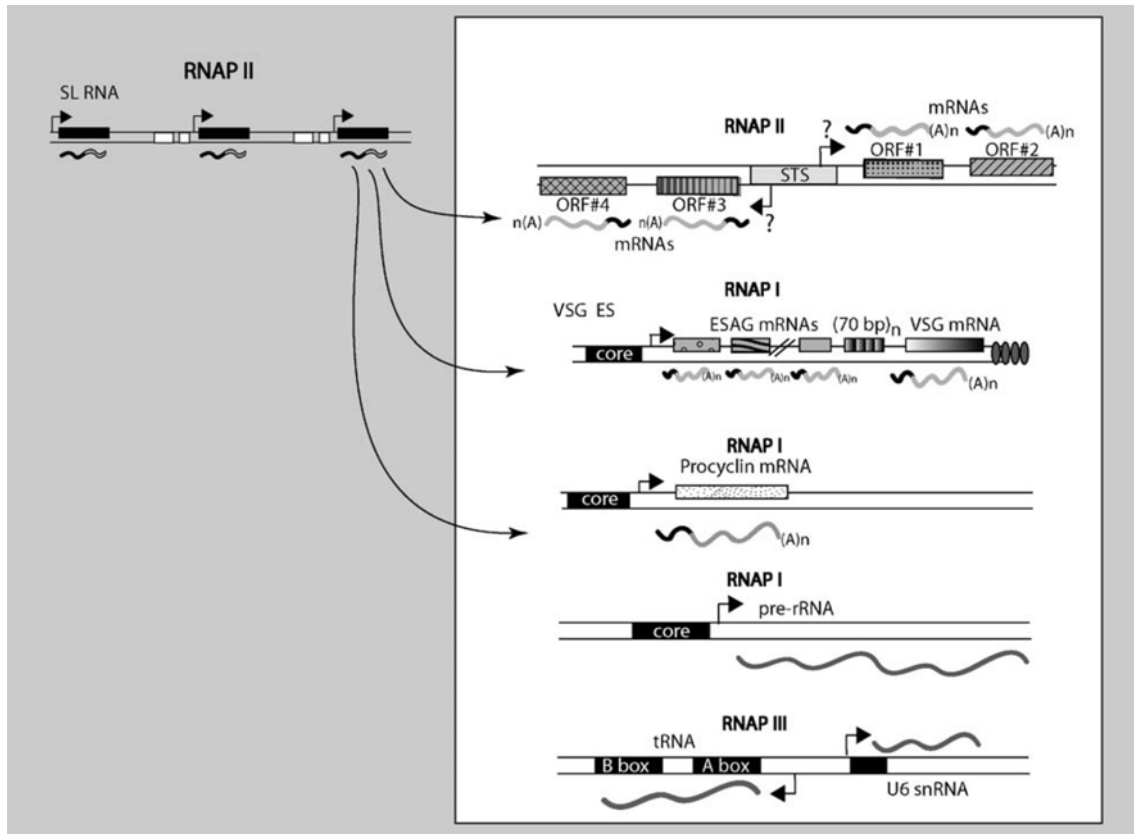


Figura 2.7 Esquema de la transcripción en *T. brucei* (Palenchar and Bellofatto, 2006).

2.3.2 Regulación transcripcional y promotores

La importancia del inicio de la transcripción para la regulación de la expresión génica en otros organismos, ha llevado a una búsqueda intensa de promotores de las tres RNA polimerasas en tripanosomátidos.

Inicialmente se postulaba que la regulación del inicio de la transcripción por la RNAPII era prácticamente nula en tripanosomátidos (Clayton, 2002), debido a la dificultad en identificar regiones promotoras y factores de transcripción homólogos a los descritos en eucariotas superiores. Análisis *in silico* en las bases de datos de los

genomas de estos parásitos identificaban sólo algunas proteínas involucradas en la regulación de la expresión génica, sin embargo estudios funcionales han revelado que los tripanosomátidos poseen más factores de transcripción de los que originalmente se estimaban (Martinez-Calvillo et al., 2010).

Como se comentaba anteriormente (Apartado 2.3.1.), la mayoría de genes en *T. brucei* se transcriben de forma policistrónica. Dentro de cada unidad de transcripción policistrónica (PTU, *polycistronic transcription unit*), los genes son transcritos desde la misma hebra, pero la transcripción de dos PTUs puede ser divergente o convergente. Las regiones que separan las PTUs son conocidas como regiones de cambio de hebra (SSR, *strand switch regions*) (Siegel et al., 2009). Estudios realizados en *Leishmania* demuestran que la transcripción mediada por la RNAPII se inicia entre dos PTUs divergentes y termina en un SSR entre dos policistrones convergentes (Martinez-Calvillo et al., 2003), sugiriendo que las regiones SSR divergentes son posibles sitios de iniciación de la transcripción, sin embargo las secuencias precisas que indican la iniciación y terminación de la transcripción son todavía desconocidas (Martinez-Calvillo et al., 2010), debido a que estas regiones no presentan una similitud de secuencia ni contienen elementos típicos de eucariotas como las cajas TATA.

Actualmente no se han podido identificar promotores RNAPII de genes que codifiquen proteínas en tripanosomátidos. El único promotor RNAPII caracterizado hasta el momento en *T. brucei*, es el del gen *SL RNA* (Das et al., 2005; Gilinger and Bellofatto, 2001; Gunzl et al., 1997; Schimanski et al., 2005), dicho promotor carece de la caja TATA, sin embargo, se han identificado varias proteínas ortólogas a factores de transcripción que interaccionan específicamente con este promotor y que son esenciales para su transcripción (Schimanski et al., 2006; Schimanski et al., 2005).

Algunos estudios sugieren que la transcripción mediada por RNAPII puede ser iniciada desde un sitio aparentemente sin promotor y proponen que una estructura abierta de la cromatina es suficiente para la iniciación de la transcripción (McAndrew et al., 1998).

T. brucei presenta las cuatro histonas canónicas: H2A, H2B, H3 y H4, y cuatro variantes de histonas: H2AZ, H2BV, H3V y H4V, estudios de inmunoprecipitación de la cromatina y secuenciación (ChIP-seq) han explorado su distribución global en el genoma, revelando que las histonas H4K10ac, H2AZ, H2BV y el factor BDF3 están enriquecidos en probables sitios de iniciación de la transcripción (SSR divergentes)

mientras que las variantes H3V y H4V están enriquecidas en probables sitios de terminación de la transcripción (SSR convergentes) (Siegel et al., 2009).

Un estudio en el cual se evaluó la actividad transcripcional de un SSR de tripanosoma en células de mamífero, sugiere que los promotores en *T. brucei* pueden ser similares a los de otros eucariotas, a pesar de no haber sido identificados aún mediante búsqueda bioinformática (Bayele, 2009).

En conjunto los resultados conducen a la idea de que en tripanosomátidos los mecanismos de iniciación de la transcripción mediada por RNAPII pueden ser divergentes a los encontrados en eucariotas superiores.

En el caso de la RNAPIII, se han encontrado promotores de estructura similar a la de otros eucariotas, con elementos reguladores adyacentes (Nakaar et al., 1994; Nakaar et al., 1997). Los promotores de los tRNA contienen dos cajas (A y B) intragénicas que actúan en *cis* y por lo tanto recuerdan a las de otros eucariotas. Una parte de los promotores de tRNAs tienen una función secundaria: sus cajas A y B sirven como elementos reguladores de los promotores de los genes *U3*, *U6* y *7SL* localizados aguas arriba y en la orientación opuesta (Palenchar and Bellofatto, 2006). El promotor del gen *5S rRNA* contiene las cajas A y C junto con otros elementos intermediarios, característicos de este tipo de promotores en eucariotas, pero que en tripanosomátidos no han sido funcionalmente caracterizados (Hernandez-Rivas et al., 1992).

Las secuencias de los promotores de la RNAPI en *T. brucei*, también han sido caracterizadas, revisado en (Palenchar and Bellofatto, 2006). El promotor del rDNA consta de dos elementos centrados (dominios I y II) y un elemento distante (dominio III), que se asemejan a los promotores RNAPI típicos de eucariotas (Janz and Clayton, 1994). El promotor de la *prociclina* es muy parecido a los promotores del rDNA y está formado por tres elementos reguladores. En contraste, el promotor del *VSG-ES* requiere una secuencia dinucleotídica CA en el inicio de la secuencia codificante (CA comprende las posiciones -1/+1), además de otras dos secuencias reguladoras en las posiciones -60 y -36 (Janz et al., 1994). Las diferencias observadas en las secuencias de los distintos promotores RNAPI sugieren que el reclutamiento del complejo, se lleva a cabo mediante un conjunto de factores de transcripción diferentes.

En los últimos años se ha intentado caracterizar los complejos RNAPI y los factores de transcripción responsables de la actividad en los distintos promotores (Gunzl et al., 2003; Nguyen et al., 2007; Nguyen et al., 2006; Walgraffe et al., 2005). Sin embargo, aunque se han realizado avances considerables en la caracterización bioquímica del

complejo de transcripción RNAPI, hasta el momento no se han encontrado factores específicos para la transcripción de genes codificantes ni para la regulación transcripcional durante los diferentes estadios del ciclo de vida, a la cual están sujetos los genes *VSG* y la *prociclina*.

2.3.3 Regulación de la expresión monoalélica de la *VSG*

Durante mucho tiempo, los únicos genes de *T. brucei* de los que se ha conocido regulación a nivel de la transcripción son los que codifican para las proteínas de superficie *VSG* y *prociclina*, aunque recientemente se ha visto que también existe regulación de la transcripción del gen *SL* (Lustig et al., 2007).

La regulación de la transcripción de los genes *VSG* es compleja, ya que no sólo está reprimida en la forma procíclica, sino que en la fase sanguínea también están reprimidos todos los promotores de los sitios de expresión excepto uno, en un fenómeno conocido como exclusión monoalélica (Kooter and Borst, 1984).

La exclusión monoalélica que garantiza la expresión de un solo gen perteneciente a una gran familia de genes con alta homología, es un fenómeno poco entendido que se presenta en diferentes organismos. Un ejemplo es la regulación de los receptores olfativos donde sólo uno de más de 1500 receptores es activado de manera exclusiva en cada neurona olfativa (Lomvardas et al., 2006; Serizawa et al., 2004). De forma similar en el parásito *Plasmodium falciparum* causante de la malaria, sólo uno de ~50 genes *VAR* es activado de forma monoalélica (Scherf, 2006; Voss et al., 2006). En *T. brucei* sólo uno de los más de 1000 genes *VSG* es expresado en la forma infectiva del parásito, el gen *VSG* activo es transcrito desde uno de los ~20 sitios de expresión (ES), pero la forma en que la expresión monoalélica es controlada y cómo los demás *VSG*-ES son silenciados es desconocida.

Aunque se desconoce cuál es el mecanismo de represión de los *VSG*-ES en procíclicos, se ha sugerido que es distinto del que mantiene reprimidos en sanguíneos a todos los *VSG*-ESs menos uno (Navarro et al., 1999). En la forma procíclica, parece que hay especificidad de secuencia a nivel de promotor, ya que un promotor ribosomal insertado en un *VSG*-ES es de-reprimido mientras que un promotor de un *VSG*-ES permanece reprimido (Horn and Cross, 1997). Sin embargo, la mayor actividad del promotor ribosomal en la forma procíclica, complica la interpretación de los resultados.

Se ha estudiado la posibilidad de que secuencias cercanas al promotor, previamente definido como una secuencia de ~70 pb (Vanhamme et al., 1995), tengan un papel en la regulación monoalélica. Sin embargo, en estudios de delección, se cubrió un intervalo de unas 1000 pb corriente arriba y abajo sin encontrar posibles secuencias reguladoras (Navarro and Cross, 1998). Tampoco se han observado reordenamientos de DNA asociados con el cambio en el estado transcripcional (Navarro and Cross, 1996).

Los promotores de los VSG-ESs presentan una alta homología y no se detectan diferencias de secuencia entre promotores activos e inactivos (Gottesdiener et al., 1991). Se ha encontrado una modificación de la timina, conocida como base J, que se encuentra principalmente en los promotores inactivos. Sin embargo, parece que esta base puede ser importante para el mantenimiento del estado inactivo, pero no hay evidencias experimentales de que intervenga en la inactivación (Cross et al., 2002; DiPaolo et al., 2005).

Actualmente los mecanismos que aseguran la expresión monoalélica de la VSG permanecen sin dilucidar, sin embargo varios modelos han sido propuestos. Los más importantes se basan en: compartimentación nuclear, silenciamiento telomérico y regulación a nivel de la elongación-maduración del RNA, revisado en (Navarro et al., 2007; Pays et al., 2004). Numerosos estudios recientes, sugieren que tanto la estructura de la cromatina como la regulación epigenética juegan también un papel importante, revisado en (Figueiredo et al., 2009). Los modelos propuestos no son mutuamente excluyentes, probablemente el mecanismo de expresión monoalélica involucre diferentes niveles de regulación epigenética.

2.3.3.1 Compartimentación nuclear

Uno de los modelos actuales está basado en la compartimentación nuclear. La transcripción de los genes *prociclina* y el rDNA ocurre en el nucleolo, principal compartimento nuclear que alberga la RNAPI en células eucariotas, y lugar de biogénesis de los ribosomas, sin embargo, la transcripción del VSG-ES activo se lleva a cabo en un cuerpo extranucleolar que también contiene RNAPI, denominado ESB (*Expression Site Body*) (Landeira and Navarro, 2007; Navarro and Gull, 2001). Este cuerpo extranucleolar se asocia de manera exclusiva al VSG-ES activo, mientras que un VSG-ES parcialmente activo se localiza en la periferia del nucleolo de forma similar

que los promotores del rDNA y la *prociclina* (Navarro et al., 2007) (Figura 2.8), sugiriendo que el reclutamiento del sitio de expresión activo al ESB es crucial para la expresión monoalélica.

Es importante resaltar que el estado transcripcional adquirido mediante el mecanismo de exclusión alélica debe ser heredable, ya que además de expresar un solo VSG-ES en un momento dado, debe mantener dicha selección durante sucesivas generaciones. Recientemente se ha demostrado que el locus del VSG-ES activo presenta un retraso en la separación de las cromátidas hermanas y permanece asociado al único ESB durante la mitosis. Este retraso en la separación de las cromátidas es dependiente del Complejo Cohesina, ya que la depleción de cualquiera de las subunidades del complejo causa una separación prematura de las cromátidas y asociado a esto un aumento de la frecuencia de cambio de la expresión de la VSG activa a otra previamente inactiva (Landeira et al., 2009).

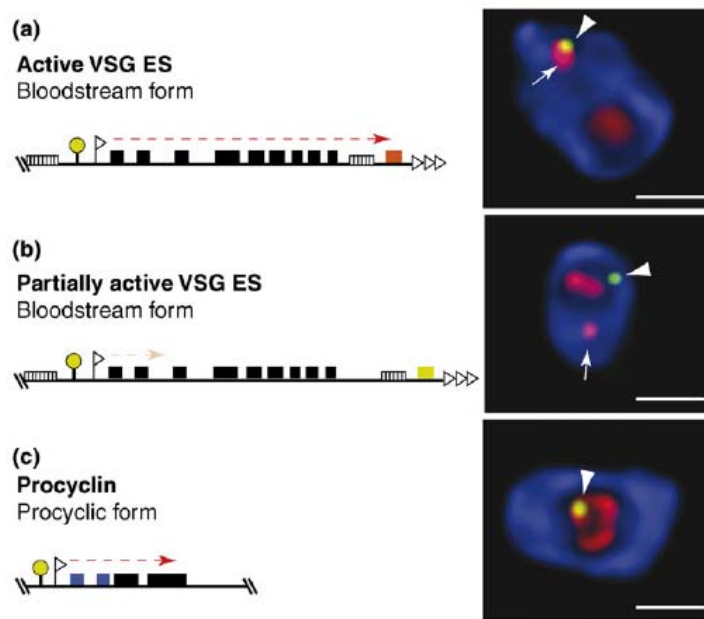


Figura 2.8 Compartimentación nuclear de la RNAPI en *T. brucei* y localización de los loci transcritos por la RNAPI: el VSG-ES activo (a), un VSG-ES parcialmente activo (b) y la *prociclina* (c), marcados con la GFP-LacI (Navarro & Gull, 2001). Inmunofluorescencia usando anticuerpos anti-RNAPI (rojo) y anti-GFP (verde), el núcleo se ve teñido con Dapi (azul) y el nucleolo es el área con menos tinción donde se localiza la RNAPI. La posición en el núcleo del locus marcado con el GFP-LacI esta indicado con una punta de flecha. El ESB (indicado con una flecha) se observa como compartimento extranucleolar de RNAPI en las imágenes a y b, (Navarro et al., 2007).

2.3.3.2 Silenciamiento telomérico.

Se ha propuesto que la estructura del telómero pueda tener un papel importante en la regulación de la expresión de la *VSG*, dado que esta es expresada exclusivamente desde loci subteloméricos (De Lange and Borst, 1982; Horn and Cross, 1995). En levaduras la estructura heterocromatizada del telómero permite la represión de la transcripción de genes teloméricos, en un fenómeno conocido como efecto de la posición del telómero (TPE, *Telomere position effect*) (Gottschling et al., 1990) mediado por proteínas de la familia SIR (*Silencing Information Factors*) (Taddei et al., 2004). Sin embargo, se ha descrito que la depleción parcial o deleción de genes homólogos involucrados en TPE de levaduras (*TbSIR2rp1*, *TbTRF*, *TbKU*) no afecta la variación antigénica en *T. brucei* (Conway et al., 2002). Recientemente, se ha observado que la proteína de unión RAP1, la cual es un componente importante del complejo telomérico, en *T. brucei* afecta el silenciamiento de los *VSG*-ES. La depleción de TbRAP1 causa la pérdida de la represión en los telómeros que contienen *VSG*-ESs y conlleva a la formación de más de un ESB (Yang et al., 2009). Aunque la derepresión no es específica, sugiere que la estructura de la cromatina en el telómero es un componente importante en el mantenimiento de un único ESB.

2.3.3.3 Regulación de la elongación- maduración del RNA.

Se postula que la mayor diferencia entre el *VSG*-ES activo y los inactivos sea la capacidad del primero en reclutar factores de elongación/procesamiento típicos de la RNAPII a un sitio transcrito por la RNAPI, y que posiblemente dichos factores que no son requeridos para la transcripción del rDNA, pudieran residir en el ESB para asegurar una transcripción eficiente del *VSG*-ES activo (Daniels et al., 2010; Pays et al., 2004), imitando a las factorías transcripcionales encontradas en los núcleos de mamíferos.

Experimentos mediante RT-qPCR señalan que algunos promotores inactivos permanecen moderadamente activos pero la transcripción de estos es rápidamente abortada y nunca llega hasta el gen *VSG*, sugiriendo la existencia de un control de la transcripción a nivel de elongación (Vanhamme et al., 2000). Esto puede explicarse debido a una posición nuclear diferencial de los *VSG*-ESs dependiendo de su grado de

activación, los VSG-ES inactivos se encuentran aleatoriamente localizados en el núcleo (Perez-Morga et al., 2001), mientras que un VSG-ES parcialmente activo se localiza en la periferia del nucleolo donde es accesible a la maquinaria RNAPI, pero no a los factores de elongación y procesamiento que permiten llevar a cabo la transcripción completa del VSG activo en el ESB (Navarro et al., 2007). De cualquier forma, teniendo en cuenta el bajo nivel de transcripción de estos promotores inactivos (~10%) y el número de promotores VSG-ES en el genoma (~20), la transcripción de los VSG-ES inactivos que se ha descrito no parece muy significativa.

2.3.3.4 Estructura de la cromatina y regulación epigenética

La función y estructura de la cromatina en *T. brucei*, se empiezan a desvelar en trabajos recientes. Las histonas son extremadamente divergentes de las eucariotas, sin embargo, se han identificado modificaciones post-transcripcionales como la metilación y la acetilación, (Janzen et al., 2006; Mandava et al., 2007) que junto con el hallazgo de enzimas remodeladoras de la cromatina están empezando a revelar funciones comunes y nuevas de la cromatina en estos parásitos, revisado en (Rudenko, 2010). Recientemente se ha demostrado que la modificación de histonas e incorporación de variantes de histonas tienen un papel evolutivamente conservado en el control de la transcripción en todo el linaje eucariota, incluyendo tripanosomas (Siegel et al., 2009).

Inicialmente no se habían detectado cambios a nivel de la estructura de la cromatina que aparentemente pudieran tener un papel importante en la regulación de los VSG-ES en la forma sanguínea. Sin embargo, recientemente utilizando la técnica del CHIP, se ha descrito que el VSG-ES activo presenta menos nucleosomas en comparación con los inactivos, al igual que la regiones transcritas del rDNA están también deplecionadas de nucleosomas, en contraste con el espaciador ribosomal y las repeticiones del DNA no transcritas, que presentan una alta densidad de histona H3, usada en estos estudios como marcador de nucleosomas (Figueiredo and Cross, 2010; Stanne and Rudenko, 2010).

Las modificaciones post-transcripcionales de las histonas son importantes en la regulación de la estructura de la cromatina y la expresión génica, en este aspecto se ha encontrado que la delección de la enzima histona metiltransferasa DOT1 (*disruptor of telomeric silencing*), encargada de trimetilar la histona H3 en *T. brucei*, causa un aumento de 10 veces en los transcritos de varias VSGs inactivas, sin embargo, sólo una VSG es

transcrita a un nivel normal (Figueiredo et al., 2008), sugiriendo que hay otros factores involucrados en asegurar la expresión de un única VSG. Además, *T. brucei* presenta 3 acetiltransferasas (HAT1-3) (Siegel et al., 2008), la depleción de HAT1 causa la derepresión de un gen reportero telomérico, pero no afecta la transcripción de los promotores de los VSG-ES (Kawahara et al., 2008).

La metilación del DNA es uno de los marcadores epigenéticos mejor caracterizados, se presenta en eucariotas superiores, bacteria y arquea, pero está ausente en algunos organismos como *S. cerevisiae* y *C. elegans*, por muchos años se creyó que la metilación tampoco se daba en *T. brucei*, aunque había sido descrita en *T. cruzi* (Rojas and Galanti, 1990). Sin embargo, el descubrimiento del gen putativo de una DNA metiltransferasa y posteriormente la identificación de la 5-metilcitocina en el DNA nuclear de *T. brucei* (Militello et al., 2008), han confirmado que la metilación del DNA también se presenta en estos parásitos, aunque su función en la regulación de la expresión génica en tripanosomas todavía no esta clara.

Recientemente otras proteínas involucradas en regulación epigenética han sido identificadas y relacionadas con el control de la expresión monoalélica en *T. brucei*. Dentro de estas, un homólogo del factor ISWI, miembro de la superfamilia proteínas remodeladoras de la cromatina SNF2, cuya depleción causa un incremento en la transcripción de los promotores VSG-ES inactivos, aunque sin aumentar la transcripción de las VSGs inactivas teloméricas, ya que la transcripción de los promotores de-reprimidos no parece extenderse más allá de la región próxima al promotor ni mucho menos hasta el gen VSG telomérico (Hughes et al., 2007). Así mismo, el complejo remodelador de la cromatina FACT (*facilitates chromatin transcription*) también se ha visto implicado en el mantenimiento del silenciamiento de los promotores VSG-ES inactivos, la subunidad del complejo TbSpt16 se encontró enriquecida en la región promotora de los VSG-ES inactivos pero no en promotor activo, en la forma sanguínea de *T. brucei* (Denninger et al., 2010).

En conjunto los resultados de los últimos años sugieren que las modificaciones en la cromatina son un componente importante en el silenciamiento de los VSG-ES inactivos y que probablemente existen en otros factores epigenéticos responsables de activar la transcripción completa de un único VSG-ES. Sin embargo, todavía hace falta identificar cuales factores están involucrados en marcar el VSG-ES activo como parte del mecanismo de exclusión monoalélica.

2.4 Regulación de la expresión génica mediada por SUMO

La SUMOilación es una modificación post-traducciona de proteínas que ha despertado gran interés durante la última década y consiste en la unión covalente de un péptido similar a la ubiquitina llamado SUMO (*small ubiquitin-related modifier*), a determinadas proteínas para modular su función. La SUMOilación se ha visto involucrada en diversos procesos celulares en eucariotas superiores desde su descubrimiento hace 12 años, el primer gen SUMO identificado fue el *SMT3* en *S. cerevisiae*, donde el péptido *SMT3* se encontró unido a la proteína activadora *RanGAP1* modificando su localización celular (Mahajan et al., 1997; Matunis et al., 1996). A partir de entonces, se ha descrito su papel en importantes procesos celulares como: regulación transcripcional, respuesta al daño del DNA, control epigenético, transporte núcleo-citoplasma, localización y estabilidad de proteínas, respuesta a estrés y progresión del ciclo celular.

A nivel molecular, la SUMOilación altera la superficie de la proteína afectando su interacción con otras macromoléculas, de esta forma la modificación puede interferir o promover interacciones proteína-proteína, de diferentes formas; enmascarando sitios de unión, adicionando otros que estén presentes en SUMO o promoviendo cambios conformacionales que revelen nuevas superficies de la proteína diana, revisado en (Geiss-Friedlander and Melchior, 2007), de esta forma la modificación postraducciona por SUMO puede regular la actividad de una proteína de diversas formas.

2.4.1. La familia SUMO

SUMO es una proteína de ~12KDa, cuya estructura tridimensional es similar a la ubiquitina, pero comparte únicamente el 20% de identidad a nivel de secuencia de aminoácidos. La mayoría de eucariotas tienen sólo un gen *SUMO* como: levaduras, *C. elegans* y *D. melanogaster*, llamado comúnmente *SMT3*, mientras que las plantas y los vertebrados presentan varios genes *SUMO* (Novatchkova et al., 2004; Wang et al., 2008). En humanos se han descrito 4 genes *SUMO* con diferentes funciones y localización, llamados *SUMO 1-4* (Owerbach et al., 2005; Zhang et al., 2008)

Todas las proteínas SUMO en eucariotas son traducidas como precursores inmaduros que deben ser procesados por proteasas específicas, para generar la forma

madura que presenta un motivo C-terminal (glicina-glicina), el cual es necesario para su conjugación a otras proteínas (Figura 2.9).

Generalmente sólo una pequeña fracción de una determinada proteína se encuentra SUMOilada. Esta modificación es revertida por la acción de enzimas cistein proteasas encargadas de la desumoilación. En levaduras estas enzimas son llamadas Ulp1 y Ulp2 (Upl, *Ubiquitin-like protein-specific proteases*) (Li and Hochstrasser, 2000) y en humanos existen seis homólogos conocidos como SENPs (*Sentrin-Specific Proteases*) (Gong and Yeh, 2006). Además de su actividad desumoilasa estas enzimas son las encargadas de la maduración del precursor de SUMO mediante su actividad hidrolasa C-terminal (Figura 2.9).

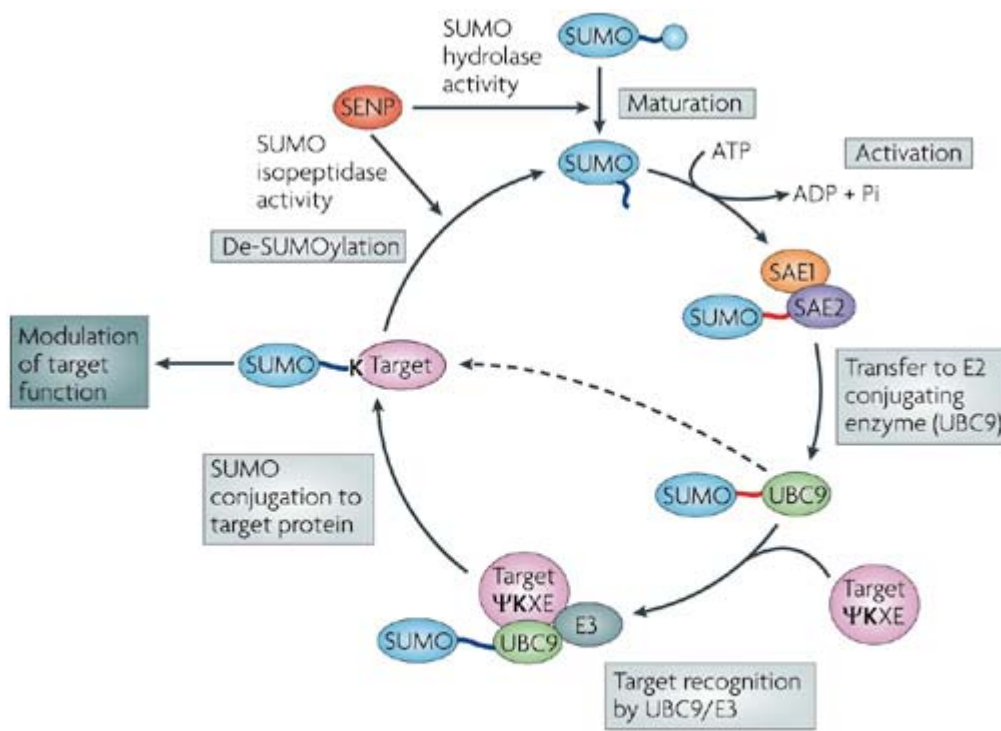
En *T. brucei* se ha identificado sólo un gen ortólogo de SUMO (Liao et al., 2010), que es esencial para la progresión del ciclo celular y la viabilidad en la forma procíclica y también en la forma sanguínea (Obado et al., 2011). Recientemente, en *T. cruzi* se realizó el primer análisis proteómico a gran escala de los posibles sustratos de SUMO en tripanosomas, donde se identificaron 236 proteínas involucradas en diversos procesos biológicos (Bayona et al., 2011). Estos datos sugieren que la SUMOilación es un proceso esencial en tripanosomas al igual que lo es para la mayoría de organismos eucariotas, pero el mecanismo de conjugación de SUMO, los posibles sustratos y los procesos en los cuales está involucrado, no han sido investigados en *T. brucei*.

2.4.2. Mecanismo enzimático de la SUMOilación

La SUMOilación como la Ubiquitinación requiere de una cascada enzimática que involucra tres pasos. Primero, la proteína SUMO madura es activada en el extremo C-terminal por la enzima de activación E1, constituida por el heterodímero AOS1-UBA2 en levaduras (Johnson et al., 1997). En este primer paso la enzima E1 usa ATP para formar un enlace SUMO-adenilato entre el residuo carboxilo-terminal de SUMO (glicina) y un residuo interno (cisteína) de la subunidad UBA2 de la enzima. Segundo, la proteína SUMO activada es transferida a la enzima de conjugación E2, llamada UBC9, formando un enlace tioéster entre un residuo cisteína de UBC9 y el grupo carboxilo C-terminal de SUMO (Johnson et al., 1997; Saitoh et al., 1998). Finalmente el grupo SUMO es transferido al sustrato desde UBC9, formando un enlace isopeptídico entre el residuo glicina C-terminal de SUMO y el grupo amino de una lisina del

sustrato. Este último paso está generalmente mediado por enzimas SUMO E3 ligasas, las cuales determinan la especificidad del sustrato y catalizan la transferencia de SUMO desde la enzima de conjugación, Ubc9 (Johnson and Gupta, 2001; Takahashi et al., 2001a; Tozluoglu et al., 2010) (Figura 2.9).

La transferencia de SUMO desde la enzima de conjugación E2 al sustrato, puede ser SUMO E3 ligasa independiente, pero la reacción se da con muy baja eficiencia, por lo que frecuentemente se requiere de enzimas E3 ligasas. (Johnson and Gupta, 2001; Takahashi et al., 2001a; Tozluoglu et al., 2010).



Nature Reviews | Neuroscience

Figura 2.9. Cascada enzimática de la SUMOilación (Martin *et al.*, 2007)

Para la ligación de SUMO a los sustratos es necesario la presencia de una secuencia consenso. La mayoría de las proteínas modificadas por SUMO contienen el residuo aceptor lisina dentro de un motivo $\Psi KX(D/E)$, donde Ψ es un aminoácido hidrofóbico grande, K es la lisina modificada por SUMO, X es un aminoácido cualquiera y D/E puede ser cualquiera de los dos aminoácidos (ácido glutámico o

ácido aspártico) (Sampson et al., 2001). El reconocimiento de la secuencia consenso sólo es posible si ésta se encuentra en un bucle o en una región sin estructura (Ulrich, 2009), ya que la enzima de conjugación E2, no reconoce los sitios consenso si están en estructuras de hélice estables.

En tripanosomátidos, como se comentaba anteriormente (Apartado 2.4.1), el mecanismo de conjugación de SUMO, la especificidad y las enzimas involucradas en la cascada de SUMOilación, no han sido investigadas. Recientemente, en el genoma de *T. cruzi* mediante búsquedas *in silico*, se han identificado ortólogos potenciales de todos los componentes de la cascada de SUMOilación, incluyendo 4 posibles SUMO E3 ligasas tipo SP-RING (Bayona et al., 2011). Sin embargo, ninguna de las enzimas ha sido caracterizada a nivel molecular.

2.4.3. SUMO E3 Ligasas

Actualmente han sido identificadas 3 familias de proteínas como enzimas SUMO E3 ligasas. El grupo principal está caracterizado por la presencia de un motivo conservado SP-RING, esencial para su función; este motivo hace referencia a una estructura parecida a un anillo, similar al encontrado en las enzimas E3 ligasas de ubiquitina y se cree que funciona de manera análoga. Estas SUMO ligasas pueden unir SUMO a los sustratos reclutando el complejo E2-SUMO para facilitar su conjugación.

Dentro del grupo SP-RING se encuentra la familia PIAS, llamada así por su miembro fundador PIAS3 (*Protein inhibitor of activated STAT*), represor de la actividad del factor de transcripción STAT3 (Chung et al., 1997). En *S. cerevisiae* se han descrito dos miembros de PIAS (Siz1 y Siz2) (Johnson and Gupta, 2001; Takahashi et al., 2001b) y en mamíferos cinco (PIAS1-3 y las variantes PIASX-alfa, PIASX-beta y PIAS-gamma) (Kahyo et al., 2001; Nakagawa and Yokosawa, 2002; Nishida and Yasuda, 2002; Sachdev et al., 2001; Schmidt and Muller, 2002). Otros miembros de este grupo de SUMO ligasas son, la proteína MMS21 (también conocida como NSE2), la cual forma parte de un complejo nuclear octamérico junto con Smc5/6, que se ha visto involucrado en reparación del DNA y organización cromosómica en *S. cerevisiae* (Zhao and Blobel, 2005) y la proteína de levaduras ZIP3, específica de meiosis, que forma parte del complejo de iniciación de la sinapsis (Cheng et al., 2006).

El segundo grupo de SUMO E3 ligasas, esta representado por el factor de importación nuclear RanBP2, encontrado únicamente en vertebrados donde regula el transporte núcleo-citoplasma a través del poro nuclear (Kirsh et al., 2002; Pichler and Melchior, 2002). A diferencia de las SP-RING E3 ligasas, RanBP2 no tiene equivalente conocido en la cascada de ubiquitinación, a pesar de esto también se ha demostrado que RanBP2 interactúa con SUMO y parece acelerar la transferencia de SUMO posicionando el enlace tioester UBC9-SUMO hacia el residuo aceptor de lisina (Pichler et al., 2004).

El tercer grupo, fue descubierto con la proteína humana Pc2 (*polycomb protein Pc2*), la cual forma parte de los complejos multiméricos (*PcG bodies*) que están involucrados en silenciamiento de genes (Kagey et al., 2003). La familia de proteínas PcG fue descrita originalmente en *Drosophila melanogaster*, donde se describió que mantiene la represión de varios genes de forma estable y heredable (Schwartz et al., 2006).

Las SUMO ligasas pueden catalizar la transferencia de SUMO a los sustratos a través de diferentes mecanismos, revisado en (Gareau and Lima, 2010):

1. Reclutando el complejo E2-SUMO a través del dominio SP-RING y un dominio SP-CTD (*Siz/PIAS-carboxy-terminal domain*), presentes solo en las E3 ligasas Siz/PIAS, y posicionándolos en una orientación óptima para favorecer la descarga de SUMO. En este caso la enzima E3 no necesita interactuar directamente con el sustrato (Tozluoglu et al., 2010).

2. Reclutando directamente el sustrato y el complejo E2-SUMO para facilitar la conjugación. En este caso la especificidad es dada por la interacción E3 ligasa-sustrato. Las proteínas de la familia Siz/PIAS contienen también un dominio PINIT que en algunos casos ha demostrado ser importante para interactuar con el sustrato (Yunus and Lima, 2009). Este mecanismo parece ser importante para dirigir la conjugación a residuos de lisina que no están dentro de un motivo consenso.

3. Coordinando el enlace tioester E2-SUMO en una conformación óptima para facilitar su conjugación, sin hacer contacto directo con el sustrato y de forma no-covalente a través de un motivo SIM/SBM (*SUMO interacting/binding motif*), como es el caso de la RanBP2.

Los SIMs se caracterizan por una secuencia corta de aminoácidos hidrofóbicos rodeados por residuos ácidos, estos median las interacciones no covalentes entre SUMO y las proteínas que los contienen. Los SIMs se han encontrado en un amplio rango de proteínas, incluyendo sustratos de SUMO y enzimas de la cascada de

SUMOilación, incluyendo la enzima E1 y varias SUMO E3 ligasas (Gareau and Lima, 2010). Los sustratos modificados con SUMO pueden su vez contactar con otras proteínas que se unen a SUMO por medio de los motivos SIM (Kerscher, 2007).

2.4.4. SUMOilación y regulación de la transcripción

El grupo más común de sustratos modificados por SUMO son los factores de transcripción, cuya actividad transcripcional puede ser alterada positiva o negativamente como consecuencia de la SUMOilación, revisado en (Lyst and Stancheva, 2007).

La SUMOilación ha sido asociada generalmente con la represión de la transcripción; se han descrito corepresores transcripcionales como los complejos de histona deacetilasa (HDACS) que se asocian preferentemente con formas SUMOiladas de algunos factores de transcripción (Garcia-Dominguez and Reyes, 2009). En *S. cerevisiae* las 4 histonas principales son SUMOiladas y están involucradas en represión de la transcripción (Nathan et al., 2006). Entre otros ejemplos, la histona humana H4 también es SUMOilada y se asocia con una regulación negativa de la transcripción (Shiio and Eisenman, 2003).

Sin embargo, la SUMOilación de factores de transcripción también se ha relacionado con un aumento de la actividad transcripcional. La modificación con SUMO de los factores de transcripción de choque térmico (HSF1 y HSF2) tiene un efecto positivo y al parecer la mutación del residuo de lisina de HSF1 involucrado en la modificación reduce su actividad transcripcional (Goodson et al., 2001). Asimismo, se ha descrito que la conjugación de p53 con SUMO, estimulada por exposición a rayos UV, activa su actividad transcripcional (Gostissa et al., 1999).

Las proteínas PIAS que actúan como SUMO E3 ligasas, fueron descritas inicialmente como reguladores negativos de la transcripción, sin embargo, ahora se conoce también su función como coactivadores (Schmidt and Muller, 2003); por ejemplo, se ha descrito que PIAS1 interactúa con la proteína nuclear FLASH y aumenta la coactivación del factor de transcripción c-Myb (Alm-Kristiansen et al., 2011). Uno de los mecanismos mediante el cual operan consiste en la relocalización de reguladores transcripcionales a diferentes compartimentos subnucleares como las “manchas nucleares” (*nuclear speckles*) (Alm-Kristiansen et al., 2011) y los cuerpos nucleares PML

(promyelocytic leukemia nuclear bodies) (Heun, 2007). La proteína supresora de tumores PML fue uno de los primeros sustratos de SUMO identificados. La SUMOilación de PML es esencial para el ensamblaje de los cuerpos nucleares PML, también conocidos como dominios oncogénicos PML, ya que actúa promoviendo su interacción con otras proteínas (Heun, 2007). También se ha descrito que la SUMO ligasa PIAS1 relocaliza el factor de transcripción Msx1 hacia la periferia nuclear, facilitando su unión a determinados promotores para reprimir su transcripción (Lee et al., 2006; Sharrocks, 2006).

Cabe mencionar que en algunos casos, se ha descrito que la actividad de PIAS como modulador transcripcional puede ocurrir de forma independiente de su actividad E3 ligasa. El factor de transcripción FLI1 (*Friend leukemia integration-1*) es relocalizado a cuerpos nucleares por PIASx-alfa, donde su actividad transcripcional es reprimida mediante SUMOilación, sin embargo, su relocalización es independiente del dominio SUMO ligasa y parece ser dependiente otro dominio presente en PIAS (Sharrocks, 2006; van den Akker et al., 2005). Otro ejemplo es el factor de transcripción Elk1 donde PIASx promueve su actividad transcripcional facilitando su derepresión, en este caso la actividad E3 ligasa de PIASx no es aparentemente necesaria. La propiedad coactivadora de PIASx reside en su dominio SIM y requiere que Elk1 este SUMOilado (Yang and Sharrocks, 2005).

Un estudio reciente en levaduras utilizando la técnica de ChIP, encontró proteínas SUMOiladas asociadas a la cromatina de genes expresados constitutivamente y no en los genes reprimidos (Rosonina et al., 2010). Sin embargo, en genes que se expresan de forma inducible, las proteínas SUMOiladas se detectaron únicamente mientras estaban activados. Según el modelo que proponen los autores, la sumoilación en estos casos permite regular los niveles de transcripción y facilitar su silenciamiento cuando la señal de activación desaparece (Rosonina et al., 2010).

Además de los factores de transcripción, estudios de proteómica a gran escala han identificado otros componentes de la maquinaria de transcripción como sustratos de SUMO en levaduras, mamíferos y plantas (Makhnevych et al., 2009; Miller et al., 2010; Rosas-Acosta et al., 2005; Wohlschlegel et al., 2004) (Tabla 2.3). Estos incluyen subunidades de los factores generales de transcripción (GTFs), mediadores y subunidades de las RNAPs, como por ejemplo, la SUMOilación de la subunidad RPB1 en respuesta al daño por UV (Chen et al., 2009). También se encuentran factores de remodelación la cromatina como subunidades del complejo SWI/SNF, la DNA

Introducción

topoisomerasa II (Bachant et al., 2002), histonas y subunidades del complejo nuclear cohesina o proteínas asociadas como el factor PDS5, regulador de complejo cohesina (Stead et al., 2003).

Protein complex	Sumoylated components
RNA polymerase I core	Rpa12p, Rpa135p, Rpa190p ^d , Rpa34p, Rpa43p, Rpa49p ^e , Rpc40p, Rpo26p
RNA polymerase II core	Rpb2p, Rpb4p, Rpo21p ^e , Rpo26p
RNA polymerase III core	Ret1p, Rpc37p, Rpc40p, Rpc53p, Rpc82p, Rpo26p
Ino80p chromatin remodeling complex	Ino80p, Rvb1p, Rvb2p, Arp4p, Ies1p, Ies4p, Taf14p, Nhp10p
Swr1p chromatin remodeling complex	Swr1p, Vps71p, Vps72p, Swc1p, Arp4p, Act1p ^e , Rvb1p, Rvb2p, God1p, Aor1p ^d
RSC chromatin remodeling complex	Sth1p, Rsc1p, Rsc2p, Rsc4p, Rsc6p, Rsc8p, Rsc58p
SNF/SWI chromatin remodeling complex	Arp7p, Arp9p, Snf12p, Snf2p, Snf5p, Swi3p, Taf14p
SAGA complex	Ada2p, Gcn5p, Ngg1p, Sgf73p, Spt7p, Spt8p
Leo1/elongation complex	Ctr9p, Leo1p, Rtf1p, Paf1p ^e
COMPASS	Set1p, Sdc1p
Telomere silencing complex	Sir2p ^d , Sir3p, Sir4p, Rap1p
Histones	Hta1p, Hta2p, Htb1p, Htb2p, Hhf1p, Hhf2p
Gcr1p/Gcr2p transcriptional activator	Gcr1p, Gcr2p, Rap1p
Nuclear cohesin complex	Smc1p, Mcd1p
Septins	Cdc3p, Cdc11p, Shs1p
RENT complex	Cdc14p, Net1p, Sir2p ^d
Arp2/3 complex	Arc35p, Arc40p
Proteasome core complex	Pre2p, Pre10p, Pre7p ^d , Pre6p ^d , Rpn8p ^d , Pup1p ^d

Tabla 2.3. Proteínas SUMOiladas identificadas por espectrometría de masas en un estudio global en *S. cerevisiae* (Wohlschlegel et al., 2004).

Estos estudios resultan muy interesantes dado que varios de estos factores se han asociado a la regulación de la expresión génica en *T. brucei* y más específicamente a la regulación de la expresión monoalélica de la *VSG*, como se ha comentado anteriormente (Apartados 2.3.2 y 2.3.4). Por lo tanto la SUMOilación de alguna o varias de estas proteínas podría desempeñar un papel importante en la regulación de la transcripción en *T. brucei*.

Objetivos

3. Objetivos

El objetivo general propuesto al inicio de esta tesis fue analizar la función que desempeña la subunidad TbRPB7 y posibles factores asociados, en la regulación transcripcional de la *VSG* en *Trypanosoma brucei*.

Objetivos concretos:

1. Demostrar la función directa de la TbRPB7 en la transcripción mediada por la RNA polimerasa I en *T. brucei*, poniendo a punto los ensayos de transcripción *in vitro* y transcripción *in vivo* (*Run-on*) en líneas deplecionadas para la TbRPB7.
2. Establecer el método de inmunoprecipitación de cromatina (ChIP) y analizar la distribución de las RNA polimerasas I, II y la subunidad TbRPB7 en la cromatina a lo largo de diferentes unidades de transcripción.
3. Identificar posibles proteínas o factores asociados a la TbRPB7 que estén involucrados en la transcripción y la expresión de la *VSG*.
4. Caracterizar funcionalmente al menos una de las proteínas asociadas a la TbRPB7, en particular la TbSIZ1 que contiene un dominio conservado SP-RING de SUMO E3 ligasa
5. Determinar la localización subnuclear de la enzima SUMO E3 ligasa y las proteínas SUMOiladas, respecto a la RNAPI y el *locus VSG* activo.
6. Analizar la posición de proteínas SUMOiladas asociadas a la cromatina de diferentes unidades transcripcionales mediante ChIP y en particular en los sitios de expresión de la *VSG* teloméricos.

Resultados

4. Anexo resultados

4.1. Anexo resultados 1

La subunidad RPB7 de la RNAPII es necesaria para transcripción mediada por la RNAPI en *Trypanosoma brucei*.

Embo reports, 10: 252-257. 2009

En el parásito protozoo *Trypanosoma brucei*, los genes que codifican para las dos glicoproteínas principales de superficie; VSG y prociclina, son transcritos por la RNAPI en lugar de la RNAPII, la polimerasa normalmente encargada de la síntesis de mRNA en eucariotas superiores. Esta característica inusual puede estar acompañada del reclutamiento de subunidades específicas o cofactores que le confieren a la RNAPI la capacidad de transcribir RNAs que codifican para proteínas. En este estudio encontramos que la transcripción mediada por la RNAPI requiere de la TbRPB7, una subunidad disociable del complejo RNAPII. TbRPB7 interactúa con TbRPA1 y TbRPB6z, dos subunidades específicas de la RNAPI. Utilizando ensayos de transcripción *in vivo* (*Run-on*) detectamos que la transcripción mediada por la RNAPI se afecta cuando TbRPB7 disminuye por RNA de interferencia. Por otro lado, en ensayos de transcripción *in vitro* la adición de proteína TbRPB7 incrementa la transcripción del promotor de la VSG. Estos resultados son un ejemplo singular de una quimera funcional de RNA polimerasa, en la cual el núcleo catalítico del complejo de la RNAPI recluta una subunidad o cofactor específico de la RNAPII.

RNA pol II subunit RPB7 is required for RNA pol I-mediated transcription in *Trypanosoma brucei*

Xenia Peñate*, Diana López-Farfán*, David Landeira, Amy Wentland, Isabel Vidal & Miguel Navarro⁺

Instituto de Parasitología y Biomedicina 'López-Neyra', Consejo Superior de Investigaciones Científicas, CSIC (Spanish National Research Council), Granada, Spain

In the protozoan parasite *Trypanosoma brucei*, the two main surface glycoprotein genes are transcribed by RNA polymerase I (pol I) instead of RNA pol II, the polymerase committed to the production of mRNA in eukaryotes. This unusual feature might be accomplished by the recruitment of specific subunits or cofactors that allow pol I to transcribe protein-coding RNAs. Here, we report that transcription mediated by pol I requires TbRPB7, a dissociable subunit of the pol II complex. TbRPB7 was found to interact with two pol I-specific subunits, TbrPA1 and TbrPB6z. Pol I-specific transcription was affected on depletion of TbRPB7 in run-on assays, whereas recombinant TbRPB7 increased transcription driven by a pol I promoter. These results represent a unique example of a functional RNA polymerase chimaera consisting of a core pol I complex that recruits a specific pol II subunit.

Keywords: antigenic variation; VSG; transcription; RNA polymerase I; RPB7

EMBO reports advance online publication 23 January 2009; doi:10.1038/embor.2008.244

INTRODUCTION

Trypanosoma brucei, located in a distal position in the eukaryotic cell lineage, is the aetiological agent of African trypanosomiasis. Changes in the type of variant surface glycoprotein (VSG) on the surface of the parasite allow it to elude the host's immune antibody response and ensure a persistent infection (Borst & Ulbert, 2001; Pays, 2005). In the procyclic or insect mid-gut stage of the parasite, the procyclin family of glycoproteins covers the surface. Transcription of *VSG* and *procyclin* by RNA polymerase I (pol I) is an exceptional feature among eukaryotes, as pol I does not normally transcribe protein-coding genes. For other genes, the transcriptional apparatus of *T. brucei* includes the three characteristic eukaryotic RNA polymerases.

The evolutionary specialization of the eukaryotic RNA polymerases results in a complex situation whereby subunits are either shared between polymerases or are specific for each of the three classes (I, II and III). There are various RNA polymerase subunits that are conserved in function but encoded by three genes, an example being the largest subunit: RPA1 (I), RPB1 (II) and RPC1 (III). Other subunits are shared by the three polymerases such as RPB5, RPB6, RPB8, RPB10 and RPB12. However, in *T. brucei*, three of the shared subunits, RPB5, RPB6 and RPB10, have other isoforms, known as TbrPB5z, TbrPB6z and TbrPB10z, which are included in the RNA pol I complex (Walgraffe *et al*, 2005; Nguyen *et al*, 2006), whereas TbrPB5, TbrPB6 and TbrPB10 are used in the pol II complex (Das *et al*, 2006; Devaux *et al*, 2006). Other specific subunits for each type of polymerase are related in sequence and/or function with an archaeal ancestor; for example, the RNA polymerase subunit E (RpoE) subunit family, which in eukaryotes includes RPA43 (I), RPB7 (II) and RPC25 (III). In trypanosomes, the lack of an orthologue of RPA43/RPA14 in the genome, together with the absence of a charged amino terminus in the variant TbrPB6z, suggested that the incorporation of TbrPB6z into the pol I complex impedes the recruitment of RPB4/RPB7 counterparts (Devaux *et al*, 2007). A new parasite-specific pol I subunit called TbrPA31 was recently described, but no sequence or structural similarity with RPA43 was detected (Nguyen *et al*, 2007). Thus, the main question is whether the RNA pol I complex recruits any additional subunits related to archaeal RpoE/RpoF family members. Our results indicate that TbRPB7, a subunit present exclusively in the RNA pol II complex of all eukaryotes, is also associated with RNA pol I in *T. brucei* and in this manner might contribute to a multifunctional polymerase that is able to transcribe not only ribosomal DNA (rDNA) but also messenger RNA (mRNA).

RESULTS AND DISCUSSION

Development of a dual-reporter cell line

Most of the RNA pol I complexes in a trypanosome cell are dedicated to the transcription of rRNA in the nucleolus, whereas a smaller proportion is involved in the transcription of *VSG* and *procyclin* mRNA. Thus, the functional analysis of candidate subunits needs to be evaluated on the basis of their specific

Instituto de Parasitología y Biomedicina 'López-Neyra', Consejo Superior de Investigaciones Científicas, CSIC (Spanish National Research Council), Avda. del Conocimiento s/n, 18100 Granada, Spain

*These authors contributed equally to this work

⁺Corresponding author. Tel: +34 958 181651; Fax: +34 958 181633;

E-mail: miguel.navarro@ipb.csic.es

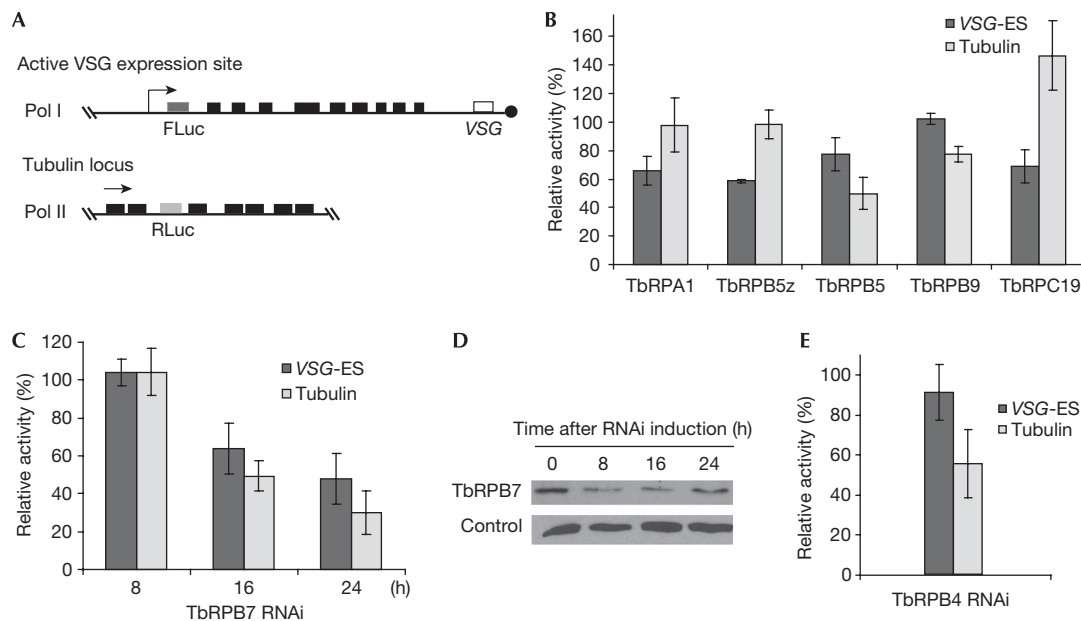


Fig 1 | *In vivo* analysis of RNA pol I and pol II transcription in a dual-reporter cell line (SALR). (A) Schematic outline of the genomic positioning of the reporter cassettes. The upper portion represents the active VSG (variant surface glycoprotein) locus, known as VSG-ES. Black boxes indicate associated genes polycistronically transcribed with the VSG (open box); the telomere is represented by a circle. The reporter gene FLuc (firefly luciferase) is 400 bp downstream from the active VSG-ES promoter (arrow) and the RLuc gene (*Renilla* luciferase) was inserted within the cluster of α - β tubulin repeats. (B) Effect of TbRPA1 (8 h), TbRPB5z (18 h), TbRPB5 (16 h), TbRPB9 and TbRPC19 (24 h) depletion on the reporter activities. Relative reporter activities are represented as a percentage of the non-induced controls; mean and standard deviation (error bars) of three independent experiments are shown. (C) Effect of TbRPB7 depletion on VSG-ES pol I- and pol II-mediated transcription. Reporter activities during a time course of RNAi induction. FLuc (VSG-ES promoter transcription) and RLuc (*tubulin* read-through) reporter activities are presented as percent activity relative to the uninduced culture. Mean and standard deviation of three independent experiments are shown. (D) Kinetics of TbRPB7 protein depletion at several time points after induction, analysed using anti-TbRPB7 antibody. As a loading control, we used an anti-TbFKBP12 antibody. (E) Effect on the activities of FLuc and RLuc reporters after 18 h of depletion of TbRPB4, as represented in (C). ES, expression site; pol, polymerase; RNAi, RNA interference; Tb, *Trypanosoma brucei*.

effects on VSG expression site (ES) promoter activity *in vivo*. Initially, we decided to test the function of the various RNA polymerase subunits by evaluating their function in a cell line containing a firefly luciferase (FLuc) reporter gene inserted downstream from the active VSG-ES promoter. To monitor the transcription of pol II simultaneously, a *Renilla* luciferase (RLuc) reporter gene was inserted within the tubulin chromosomal locus (Fig 1A). In this cell line, we were able to obtain reporter measurements of both pol I- and pol II-mediated transcription on depletion by inducible RNA interference (RNAi; Wang *et al*, 2000) of a candidate gene using a dual-reporter assay (Promega, Madison, WI, USA). All measurements of reporter activities were obtained when no significant reduction in cell growth was detected. To validate this cell line, we first carried out a tetracycline-inducible depletion of the largest subunit of pol I. Activity of FLuc on TbRPA1 RNAi (8 h) was effectively reduced, whereas pol II-driven RLuc did not change significantly (Fig 1B). Analysis of TbRPA1 protein levels using TbRPA1 antibodies showed a clear depletion (supplementary Fig S1 online).

Functional analysis of polymerase subunits

Next, we analysed the requirements for the transcription of VSG-ES by specific pol I subunits that, although present in the complex,

might not necessarily be involved in VSG-ES transcription. Recent data show that TbRPB5z is required for the transcription of rRNA, but no information on a direct function in VSG-ES transcription was addressed (Devaux *et al*, 2007). Fig 1B shows that pol I-driven FLuc activity decreased on RNAi depletion of TbRPB5z, indicating that TbRPB5z is indeed involved in the transcription of VSG-ES. Conversely, depletion of TbRPB5 resulted in a 50% reduction of pol II-mediated RLuc reporter activity, whereas the activity of FLuc was altered only slightly. To assess the efficiency of our depletion experiments, we simultaneously analysed parasite growth and mRNA levels (supplementary Fig S2A and S2B online).

Rpb9 is a non-essential subunit of the yeast pol II that regulates transcription elongation and has been shown to be essential in *T. brucei* (Devaux *et al* 2006). Reporter activity on depletion of TbRPB9 at 24 h showed that RLuc activity at the *tubulin* locus decreased, in contrast to FLuc activity at the VSG-ES locus (Fig 1B). Another pol I subunit that Günzl's group has co-purified in a complex together with TbRPA1 is TbRPC19 (Nguyen *et al*, 2006). In yeast, Rpc19 is essential for the transcription of pol I and pol III. We measured reporter activities 24 h after TbRPC19 RNAi and observed a decrease in FLuc reporter activity, confirming its requirement for the transcription of VSG-ES (Fig 1B). These results

show the utility of this dual-reporter cell line to assess the functions of essential polymerase subunits *in vivo*.

Transcription of VSG-ES involves TbRPB7

Previous studies in *T. brucei* were unable to co-purify the pol I-specific subunits RPA43 and RPA14, counterparts of Rpb4/Rpb7 in the pol II complex (Walgraffe et al, 2005; Nguyen et al, 2006). Furthermore, in the *T. brucei* genome database, we failed to identify an orthologue of RPA43, whereas TbRPB7 and TbRPC25, counterpart subunits of pol II and pol III, were clearly identified through homology searches. Thus, we hypothesized that the trypanosome pol I complex might use subunits from the canonical mRNA production machinery during the transcription of VSG. As expected, pol II-driven RLuc reporter activity was lower on TbRPB7 depletion (16 h). Surprisingly, we also detected a reduction in the VSG promoter-driven FLuc reporter activity in a time course TbRPB7 depletion experiment (Fig 1C), when no significant reduction in cell growth was detected in three independent clones (supplementary Fig S2 online). We also developed an anti-TbRPB7 antiserum (supplementary Fig S3 online) and conducted a Western analysis on RNAi, which confirmed the reduction in TbRPB7 protein levels (Fig 1D).

Rpb7 in yeast forms a heterodimer with Rpb4 and adopts a similar structure to the archaeal RpoE/RpoF counterpart when binding to the 10-subunit core pol II complex (Bushnell & Kornberg, 2003; Armache et al, 2005). On the basis of this observation, we decided to investigate a possible function of TbRPB4 in the transcription of VSG. Several independent TbRPB4-RNAi clones showed no significant effect on the transcriptional reporter activity of VSG, although they did show a reduction of pol II-driven RLuc reporter activity in the *tubulin* locus (Fig 1E). Thus, we found that the transcription of VSG in *T. brucei* seems to be TbRPB4 independent. It has been shown that yeast Rpb7 can interact with pol II in the absence of Rpb4 (Sheffer et al, 1999); thus, Rpb7 alone is sufficient to carry out transcription under non-stress conditions (Choder, 2004).

RNA pol I transcription in trypanosomes requires TbRPB7

To investigate whether TbRPB7 is involved directly in the transcription of pol I, we performed a series of run-on experiments in permeabilized bloodstream-form trypanosomes after the depletion of TbRPB7 in a Tet-inducible manner. Nascent RNA labelled with α^{32} UTP was isolated 24 h after the induction of TbRPB7 depletion and hybridized to Southern-blotted DNA fragments from the 18S rRNA, VSG, *tubulin* and transfer RNA (tRNA) genes (Fig 2). Quantification of the hybridization signal from pol I-mediated transcription of VSG mRNA showed a significant decrease on TbRPB7 knockdown, with a concurrent reduction of 18S rRNA levels. Nascent *tubulin* mRNA showed a similar reduction, consistent with the role of RPB7 in pol II transcription in eukaryotes. As a control, the transcription of tRNA by pol III was not significantly affected. Taken together, these data indicate that TbRPB7 is involved not only in pol II transcription as in other eukaryotes, but is also required for the transcription of pol I in *T. brucei*. These results raise questions about whether TbRPB4 is required for RNA pol I transcription. To investigate this question, we carried out run-on experiments on TbRPB4 depletion. Fig 2 shows that transcriptional activities from the VSG and ribosomal promoters were not affected on TbRPB4 depletion,

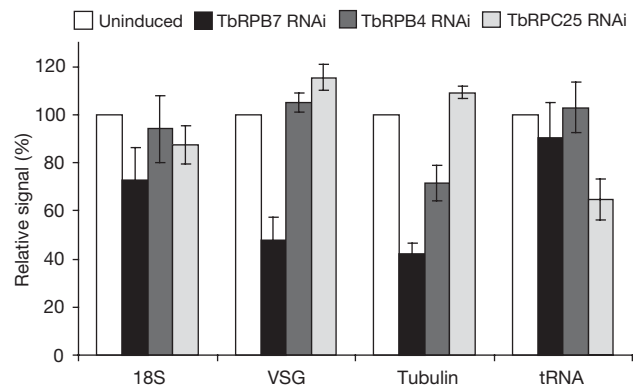


Fig 2 | Run-on analysis of nascent RNAs in bloodstream-form trypanosomes. After induction of TbRPB7 (24 h), TbRPB4 (16 h) or TbRPC25 (24 h) depletion, saponin-permeabilized cells were incubated in the presence of [α - P^{32}]UTP for 15 min at 35 °C. Total RNA was extracted and hybridized with Southern blots of DNA fragments from the indicated genes. Hybridization was quantified and is represented on the histogram as a percentage signal obtained from non-induced cells. Mean and standard error of three independent experiments are shown. RNAi, RNA interference; Tb, *Trypanosoma brucei*; tRNA, transfer RNA; VSG, variant surface glycoprotein.

whereas pol II transcription of *tubulin* decreased. By contrast, depletion of TbRPC25, the counterpart subunit of TbRPB7 in pol III, showed a 40% reduction of tRNA transcription without a decrease in the transcription of VSG or *tubulin*, showing that TbRPC25 functions exclusively in the transcription of pol III (Fig 2). We simultaneously analysed TbRPB4 and TbRPC25 mRNA levels to confirm depletion (supplementary Fig S2B online). These data suggest that depletion of either a pol II or a pol III subunit does not necessarily affect the transcriptional activity of VSG-ES at early depletion times.

The RNA pol I complex recruits TbRPB7

Functional reporter assays, together with nascent RNA labelling experiments on TbRPB7 depletion, suggest that TbRPB7 is involved in pol I-driven transcription. However, previous attempts have failed to detect TbRPB7 in partially purified pol I complexes analysed using proteomics approaches (Walgraffe et al, 2005; Nguyen et al, 2006, 2007). In yeast, recruitment of Rpb7 to the pol II complex occurs in a dissociable manner in just 20% of complexes (Sheffer et al, 1999). The X-ray structure of a 12-subunit complex from *Saccharomyces cerevisiae*, including a Rpb4–Rbp7 heterodimer not present in previous pol II structures, has been described (Armache et al, 2003; Bushnell & Kornberg, 2003). These structural data have shown a direct interaction of Rpb6 with Rpb1 and Rpb7 in the pol II complex. Thus, we decided to investigate whether TbRPB7 interacts with TbRPB6z, a trypanosome variant of TbRPB6 present in pol I but not in pol II complexes (Nguyen et al, 2006). We expressed TbRPB6z fused to the tandem affinity purification (TAP) epitope (TAP-TbRPB6z) in a procyclic cell line, where the transcription of pol I of the surface protein procyclin also occurs. After purification of the complex containing TAP-TbRPB6z, proteins were eluted by cleavage with

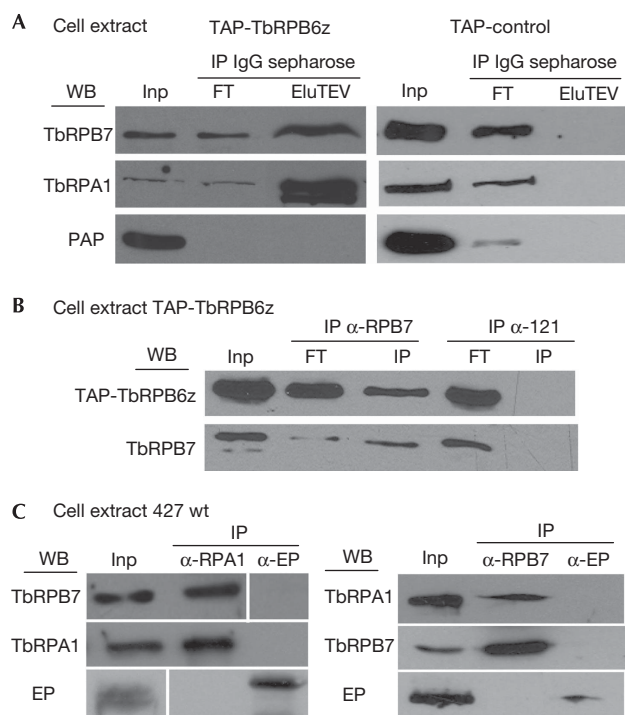


Fig 3 | Co-immunoprecipitation of TbRPB7 and RNA pol I subunits. (A) Extracts from procyclic cell lines expressing either TAP-TbRPB6z or TAP-control were precipitated with IgG sepharose, eluted with TEV protease (EluTEV) and analysed by Western blots (WB) with the indicated antibodies. PAP antibody (peroxidase anti-peroxidase) was used to detect protein A of TAP-TbRPB6z or the TAP-control. (B) Co-IP of TbRPB7 with TAP-TbRPB6z. Extracts from the procyclic cell line expressing TAP-TbRPB6z were incubated with protein G sepharose previously bound to anti-TbRPB7 antiserum (α -RPB7) or anti-VSG121 (α -121) as an unrelated control. Samples were analysed by Western blot with the indicated antibodies. PAP antibody was used to detect protein A of TAP-TbRPB6z. (C) Interaction between endogenous TbRPB7 and TbRPA1 subunits. Extracts from wild-type procyclic trypanosomes were incubated with protein G sepharose previously bound to anti-TbRPA1 (α -RPA1), anti-TbRPB7 antiserum (α -RPB7) or anti-EP as a control. The samples were eluted in SDS loading buffer and analysed by Western blots with the indicated antibodies. Loading information of (A, B) is available in the supplementary information online. For comparison in (C): IP α -RPA1, WB RPB7 input 1%, IP 85%; WB RPA1: input 1%, IP 5%. WB EP input 1%, IP 10%, was loaded, in IP α -RPB7: input 5%, IP 100%. EP, EP procyclin (procyclin protein rich in Glu-Pro repeats); FT, flow-throw; Inp, input; IP, immunoprecipitate; TAP, tandem affinity purification; Tb, *Trypanosoma brucei*; TEV, tobacco etch virus protease.

tobacco etch virus (TEV) protease and analysed by Western blot, which revealed that TAP-TbRPB6z efficiently co-immunoprecipitates with both TbRPB7 and TbRPA1 (Fig 3A). As a negative control, an extract expressing only the TAP tag did not co-immunoprecipitate with either of the two pol I subunits. This result was confirmed by reciprocal co-immunoprecipitation experiments using anti-TbRPB7 antiserum (Fig 3B). To confirm this interaction

with pol I in bloodstream-form trypanosomes, we expressed TbRPB7-TAP (supplementary Fig S3 online) and were able to coimmunoprecipitate TbRPA1 (supplementary Fig S4A online). Conversely, co-immunoprecipitation experiments using antibodies against TbRPA1 showed that TbRPB7 is associated with the pol I complex (supplementary Fig S4B online). Furthermore, we investigated this interaction with endogenous subunits, avoiding any possibility of nonspecific interactions by the over-expression of the tagged proteins. Co-immunoprecipitation experiments using wild-type trypanosome extracts with TbRPA1 antibodies detected co-precipitated TbRPB7 by Western blot analysis using anti-TbRPB7 antiserum (Fig 3C). These data indicate that TbRPB7 associates with the pol I complex defined by the core subunits TbRPA1 and TbRPB6z. Given the overall structural conservation between the three eukaryotic RNA polymerases (Cramer *et al*, 2008), it is tempting to speculate that TbRPB7, TbRPB6z and TbRPA1 in the trypanosome pol I complex might be interacting in a similar manner to Rpb7, Rpb6 and Rpb1 in the yeast pol II complex (Armache *et al*, 2003).

TbRPB7 associates with the pol I complex in the nucleus

To investigate further whether TbRPB7 and the pol I complex interact in the trypanosome nucleus, we carried out double immunofluorescence experiments by three-dimensional microscopy using affinity-purified anti-TbRPA1 and anti-TbRPB7 antisera. TbRPA1 antibodies recognized the pol I complex located in the nucleolus and in the extra-nucleolar expression-site body associated with VSG expression (Fig 4A; Navarro & Gull, 2001). TbRPB7 partly colocalized to the extra-nucleolar expression-site body (Fig 4). Furthermore, TbRPB7 localized to the nucleoplasm (presumably with pol II); however, it was also found to colocalize partly with TbRPA1 in the nucleolar periphery (Fig 4B). Similarly, Br-UTP-labelled nascent RNA resistant to α -amanitin was restricted to TbRPA1 protein located at the nucleolar periphery (supplementary Fig S5 online), where ribosomal promoter sequences are also located (Landeira & Navarro, 2007). This nucleolar periphery localization of TbRPA1, TbRPB7 and nascent RNA suggests that the dissociable TbRPB7 subunit is recruited into the active pol I but not the remaining inactive pol I complex, defined by the lack of Br-UTP labelling. This situation is similar to that observed in yeast where Rpb7 is recruited to a small fraction of pol II complexes only on the initiation of transcription (Sheffer *et al*, 1999 reviewed in Choder, 2004).

TbRPB7 promotes the transcription of RNA pol I *in vitro*

Next, we wanted to address whether purified TbRPB7 was able to enhance the activity of a VSG-ES promoter by *in vitro* transcription using cytoplasmic protein extracts that contain low amounts of TbRPB7 (data not show). To measure the transcription efficiencies, we used an *in vitro* assay that uses a 377 bp G-less cassette template driven by the VSG-ES promoter (see Methods; Fig 5A). Transcription from the VSG-ES promoter was not very efficient; however, the addition of exogenous recombinant TbRPB7 to the reaction increased the amount of G-less transcripts threefold in proportion to the amount of cell extract used (Fig 5B). As a control, we carried out transcription using the same template but without the promoter, showing that transcription was promoter dependent. In addition, pol I *in vitro* transcription was abolished when

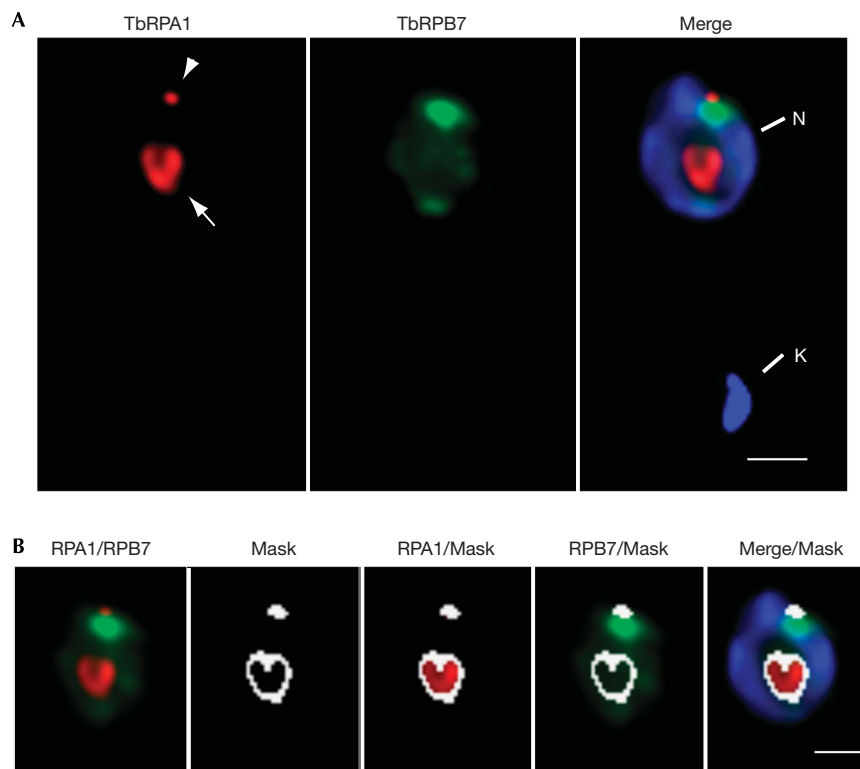


Fig 4 | TbRPB7 nuclear localization by three-dimensional microscopy. Analysis of bloodstream-form trypanosomes was carried out with double indirect immunofluorescence and three-dimensional deconvolution microscopy. Rabbit anti-TbRPA1 and mouse anti-TbRPB7 antisera were used. Nuclear (N) and mitochondrial DNA (kinetoplast, K) were stained with DAPI (blue). (A) Anti-TbRPA1 shows the pol I-containing nucleolus (arrow) and the expression site body (arrowhead). Anti-TbRPB7 shows a nucleoplasmic distribution; maximum intensity projections of three-dimensional stacks are shown. (B) Colocalization analysis of three-dimensional deconvolved data sets. A colocalization mask (white) was calculated for each non-equalized 8-byte slice, and merged with both TbRPA1 (red) and TbRPB7 (green) labels. The slice animation of a three-channel three-dimensional (Z step) data set through the nucleus can be found as supplementary Video online. Scale bars, 1 μm . DAPI, 4,6-diamidino-2-phenylindole; pol, polymerase; Tb, *Trypanosoma brucei*.

the extracts were TbRPA1-depleted. VSG-ES promoter activity was also affected by incubating the reactions with any of our anti-TbRPB7 antisera, but not with unrelated antisera, suggesting that TbRPB7 is essential for VSG-ES promoter-dependent transcription of pol I (Fig 5C).

RPB7, a conserved subunit of RNA pol II, is the functional counterpart of the RPA43 in pol I (Peyroche *et al*, 2002), with a structure similar to that of archaeal RpoE (Siaut *et al*, 2003). However, our results represent the first eukaryotic example in which a pol I complex recruits the pol II-specific subunit, RPB7. Previous studies have suggested that RPB7 recruits processing factors and localizes in the exit path for nascent RNA in the pol II complex (Mitsuzawa *et al*, 2003; Ujvari & Luse, 2006). Thus, it is tempting to speculate that the recruitment of TbRPB7 to the trypanosome RNA pol I complex underlies the unusual ability of this polymerase to transcribe protein-coding genes.

METHODS

Cell lines. Details regarding the *T. brucei* cell lines, transfection, plasmids and RNAi experiments can be found in the supplementary information online.

Run-on experiments. Transcription in saponin-permeabilized bloodstream parasites was performed with [α - ^{32}P]UTP for 15 min at 35 $^{\circ}\text{C}$, as described in the supplementary information online.

Co-immunoprecipitation and immunofluorescence. Generation of anti-TbRPB7 mice antisera is detailed in the supplementary information online. Protein extracts were prepared from TbRPB7-TAP, TAP-TbRPB6z or TAP-expressing cells, and co-immunoprecipitation was performed with anti-TbRPA1, anti-TbRPB7 or IgG sepharose, and developed with the appropriate antibodies as detailed in the supplementary information online. Suspension immunofluorescence and deconvolution of multichannel three-dimensional data sets were carried out as described by Landeira & Navarro (2007); for details see the supplementary information online.

In vitro transcription assays. Cell extract preparation and transcription reactions were performed following the protocols of Günzl lab (Laufer *et al*, 1999). Reactions with pVSG-Gless, which contains the VSG-ES promoter region (from -729 to +145 bp) and a Gless cassette (377 bp) at 1.962 kb, were incubated at 28 $^{\circ}\text{C}$ for 1 h and then digested with RNase T1, as described in the supplementary information online.

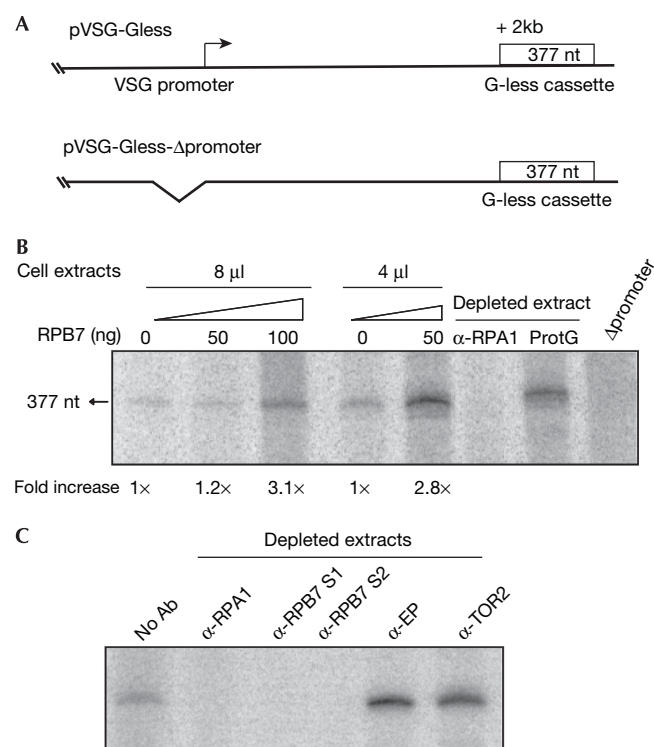


Fig 5 | TbRPB7 increases VSG-ES promoter transcription. (A) Schematic representation of DNA templates; pVSG-Gless containing the VSG121 promoter region and a Gless cassette (377 bp) inserted approximately 2 kb downstream (top), or a pVSG-Gless- Δ promoter, the same construct without the core promoter (bottom). (B) TbRPB7 enhances *in vitro* transcription in a dose-dependent manner. Transcription reactions were performed with 4–8 μ l of concentrated cell extract and 200 ng of DNA template. Increasing amounts of TbRPB7 recombinant protein were added as indicated. Depletion of extracts with anti-TbRPA1 antiserum (α -TbRPA1) completely abolishes transcription, contrary to mock depletion performed with protein G (Prot G). As a negative control, pVSG-Gless without promoter (Δ promoter) yielded no detectable transcription. Fold increase of transcription was calculated as the ratio of transcript in the presence of recombinant TbRPB7 to the transcript in the absence of the protein. (C) Antibody-depleted extracts using anti-TbRPA1 or anti-TbRPB7 antisera S1 or S2 abolished *in vitro* transcription, whereas anti-EP or anti-TOR2 antisera controls did not. Ab, antibody; EP, EP procyclin (procyclin protein rich in Glu-Pro repeats); ES, expression site; Tb, *Trypanosoma brucei*; TOR2, target of rapamycin 2; VSG, variant surface glycoprotein.

Supplementary information is available at *EMBO reports* online (<http://www.emboreports.org>)

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank D. Van Tyne for a critical reading of this paper and A. Barquilla for sharing unpublished tagging vectors. We thank C. Suñe for the G-less cassette and A. Estévez for TAP constructs (IPBLN-CSIC). We are grateful to A. Günzl (University of Connecticut) for help with the transcription assays. M.N. is a Howard Hughes Medical Institute (HHMI) International Research Scholar. This study was financed by HHMI-55005525, and Ministerio de Investigación y Ciencia grants SAF2006-01763 and SAF2005-00657.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare that they have no conflict of interest.

REFERENCES

- Armache KJ, Kettenberger H, Cramer P (2003) Architecture of initiation-competent 12-subunit RNA polymerase II. *Proc Natl Acad Sci USA* **100**: 6964–6968
- Armache KJ, Mitterweber S, Meinhardt A, Cramer P (2005) Structures of complete RNA polymerase II and its subcomplex, Rpb4/7. *J Biol Chem* **280**: 7131–7134
- Borst P, Ulbert S (2001) Control of VSG gene expression sites. *Mol Biochem Parasitol* **114**: 17–27
- Bushnell DA, Kornberg RD (2003) Complete, 12-subunit RNA polymerase II at 4.1-Å resolution: implications for the initiation of transcription. *Proc Natl Acad Sci USA* **100**: 6969–6973
- Choder M (2004) Rpb4 and Rpb7: subunits of RNA polymerase II and beyond. *Trends Biochem Sci* **29**: 674–681
- Cramer P et al (2008) Structure of eukaryotic RNA polymerases. *Annu Rev Biophys* **37**: 337–352
- Das A, Li H, Liu T, Bellofatto V (2006) Biochemical characterization of *Trypanosoma brucei* RNA polymerase II. *Mol Biochem Parasitol* **150**: 201–210
- Devaux S, Lecordier L, Uzureau P, Walgraffe D, Dierick JF, Poelvoorde P, Pays E, Vanhamme L (2006) Characterization of RNA polymerase II subunits of *Trypanosoma brucei*. *Mol Biochem Parasitol* **148**: 60–68
- Devaux S, Kelly S, Lecordier L, Wickstead B, Perez-Morga D, Pays E, Vanhamme L, Gull K (2007) Diversification of function by different isoforms of conventionally shared RNA polymerase subunits. *Mol Biol Cell* **18**: 1293–1301
- Landeira D, Navarro M (2007) Nuclear repositioning of the VSG promoter during developmental silencing in *Trypanosoma brucei*. *J Cell Biol* **176**: 133–139
- Lauffer G, Schaaf G, Bollgong S, Gunzl A (1999) *In vitro* analysis of α -amanitin-resistant transcription from the rRNA, procyclic acidic repetitive protein, and variant surface glycoprotein gene promoters in *Trypanosoma brucei*. *Mol Cell Biol* **19**: 5466–5473
- Mitsuzawa H, Kanda E, Ishihama A (2003) Rpb7 subunit of RNA polymerase II interacts with an RNA-binding protein involved in processing of transcripts. *Nucleic Acids Res* **31**: 4696–4701
- Navarro M, Gull K (2001) A pol I transcriptional body associated with VSG mono-allelic expression in *Trypanosoma brucei*. *Nature* **414**: 759–763
- Nguyen TN, Schimanski B, Zahn A, Klumpp B, Gunzl A (2006) Purification of an eight subunit RNA polymerase I complex in *Trypanosoma brucei*. *Mol Biochem Parasitol* **149**: 27–37
- Nguyen TN, Schimanski B, Gunzl A (2007) Active RNA polymerase I of *Trypanosoma brucei* harbors a novel subunit essential for transcription. *Mol Cell Biol* **27**: 6254–6263
- Pays E (2005) Regulation of antigen gene expression in *Trypanosoma brucei*. *Trends Parasitol* **21**: 517–520
- Peyroche G, Levillain E, Siaut M, Callebaut I, Schultz P, Sentenac A, Riva M, Carles C (2002) The A14–A43 heterodimer subunit in yeast RNA pol I and their relationship to Rpb4–Rpb7 pol II subunits. *Proc Natl Acad Sci USA* **99**: 14670–14675
- Sheffer A, Varon M, Choder M (1999) Rpb7 can interact with RNA polymerase II and support transcription during some stresses independently of Rpb4. *Mol Cell Biol* **19**: 2672–2680
- Siaut M, Zarus C, Levivier E, Ferri ML, Court M, Werner M, Callebaut I, Thuriaux P, Sentenac A, Conesa C (2003) An Rpb4/Rpb7-like complex in yeast RNA polymerase III contains the orthologue of mammalian CGRP-RCP. *Mol Cell Biol* **23**: 195–205
- Ujvari A, Luse DS (2006) RNA emerging from the active site of RNA polymerase II interacts with the Rpb7 subunit. *Nat Struct Mol Biol* **13**: 49–54
- Walgraffe D, Devaux S, Lecordier L, Dierick JF, Dieu M, Van den Abbeele J, Pays E, Vanhamme L (2005) Characterization of subunits of the RNA polymerase I complex in *Trypanosoma brucei*. *Mol Biochem Parasitol* **139**: 249–260
- Wang Z, Morris JC, Drew ME, Englund PT (2000) Interference of *Trypanosoma brucei* gene expression by RNA interference using an integratable vector with opposing T7 promoters. *J Biol Chem* **275**: 40174–40179

Supplemental Information

RNA polymerase II subunit RPB7 is required for RNA polymerase I mediated transcription in *Trypanosoma brucei*

Xenia Peñate, Diana López-Farfán, David Landeira, Amy Wentland, Isabel Vidal and Miguel Navarro

Instituto de Parasitología y Biomedicina "López-Neyra"
Consejo Superior de Investigaciones Científicas
(Spanish National Research Council)
Avda. del Conocimiento s/n
18100 GRANADA
SPAIN

RESULTS

TbRPB7 is associated with the RNA pol I complex in the bloodstream form.

The functional *in vivo* transcriptional depletion assays suggest that TbRPB7 is involved in transcriptional regulation of the VSG promoter. To investigate these results further we performed a series of co-immunoprecipitation (co-IP) experiments to characterize a possible interaction of TbRPB7 with the RNA pol I core complex in bloodstream-form trypanosomes. We tagged the TbRPB7 gene with a TAP epitope at the carboxyl terminus, and expressed it in a Tet-inducible manner. Then, by using IgG Sepharose to pull down the TbRPB7-TAP, we efficiently co-IP the largest subunit of pol I using affinity-purified antibodies against TbRPA1 (Fig. S4A). Conversely, co-IP experiments utilizing antibodies against TbRPA1 (Navarro and Gull, 2001) demonstrated that TbRPB7 is associated with the pol I complex (Fig. S4B). In addition, we tagged TbRPB7 with two copies of Myc (a different, smaller epitope), at the carboxyl terminus and performed co-IP experiments using anti-Myc and anti-TbRPA1 antibodies, with similar results (data not shown). TbRPB7-Myc was more efficiently coprecipitated with TbRPA1 upon the use of bifunctional crosslinkers, such as DSP (data not shown). Furthermore, TbRBP7-TAP purification of interacting proteins allowed us to identify most of the pol II subunits, and an additional 24 coincident peptide-masses were detected for TbRPA1 by PMF (data not shown, Xenia Peñate PhD Thesis, 2007. Universidad de Granada, Spain).

SUPPLEMENTAL MATERIAL

Cell lines. *Trypanosoma brucei* bloodstream (strain Lister 427, antigenic type MiTat 1.2, clone 221a) and 427 procyclic form, DNA transfections, and selection procedures were described previously (Wirtz et al, 1999). Procyclic stage cells of the culture-adapted *T. brucei brucei* 427 were grown at 28 °C in SDM79 supplemented with 10% (v/v) fetal calf serum. Bloodstream-form trypanosomes of stock 427 clone 221a were cultured in HMI-9.

Plasmid constructions.

Establishment of the dual-reporter cell line, called SALR, comprised two rounds of transfection in the 'single-marker' cell line (Wirtz et al., 1999): first, a *FLuc*-containing plasmid (pMig104) designed to integrate 405 bp downstream of the active ES promoter, and then pMig113 (*RLuc*-containing plasmid), designed to integrate in the *tubulin* locus. pMig104 is a pMig20 derivative, control construct in (Navarro & Cross, 1998), in which the integration sequence was replaced by a RT-PCR amplified fragment corresponding to the sequence downstream of the 221 active ES promoter (primers 5p and RT from (Rudenko et al, 1994)). pMig113 is a pHD309 (Wirtz et al, 1994) derivative with the *Renilla-Luciferase* reporter gene (Invitrogen) cloned in using HindIII-BamHI. *Luciferase* and *Renilla* reporter genes (in pMig104 and pMig113 respectively) are flanked by the same 3' UTR (Navarro & Cross, 1998).

pTAP1 is a pHD924 (Estevez et al., 2001)-pHD678 (Biebinger et al., 1997) derivative lacking the T7 promoter and the *VSG* promoter directing selectable marker (*hyg*) transcription. pRPB7-TAP is a pTAP1 derivative with the *TbRPB7* ORF, cloned using HindIII-HpaI. pTAP1c is the control construct, obtained by HindIII-HpaI restriction cleavage of pTAP1, klenow filled and re-ligated. The ORF of *TbRPB6z* (Tb11.03.0935) was amplified by PCR from *T. brucei* genomic DNA, and cloned into pGEM-T. It was then digested with FseI-BglII and subcloned into pTAP1N, which contains a TAP-tag coding sequence behind the EP promoter. This vector was linearized with NotI and transfected by electroporation into the procyclic cell line 1313-514 strain 427 (Alibu et al, 2005).

RNA Interference (RNAi).

The plasmid p2T7-Blasticidin (Wang et al, 2000), which allows stable Tet-inducible expression of dsRNA of a gene, was used for RNAi experiments. PCR fragments of the RNA polymerase subunits were amplified, digested with HindIII-BamHI, and ligated into the vector (oligonucleotides for PCR are listed in Supplemental Table 1). The p2T7-TbRPA1; p2T7-TbRPB5z; p2T7-TbRPB5; p2T7-TbRPC19; p2T7-TbRPB4; p2T7-TbRPB7; p2T7-TbRPB9; p2T7-TbRPC25, vectors were linearized and stably transfected into the dual-reporter cell line (SALR) described above.

For analysis of RNAi effect on growth, un-induced and induced (1µg/ml doxycycline) cultures were first followed for up to 3-4 days (Figure S2). Only clones that showed an impact in the cell growth after induction of the RNAi, suggesting an appropriate depletion of each essential RNA polymerase subunit, were used for reporter assays. However, the measures of reporter activities of each clone were carried out at earlier times, when no significant growth defects were observed (Fig. S2A). FLuc and RLuc were assayed with Dual-Luciferase

Reporter System (Promega) according to manufacturer's instructions using a Berthold FB12 luminometer.

Northern blot.

mRNA level before and 24 h after induction of RNAi was monitored by Northern blot, total RNA was extracted by TRIzol reagent (Invitrogen) and analyzed by standard methods, 15 μ g of RNA were electrophoresed on formaldehyde-1.5% agarose gels and then transferred to a nylon membranes (Amersham). [α - 32 P] - dCTP-labeled probes were made by random priming of the same fragments cloned in p2T7-Blasticidin vector.

Generation of anti-TbRPB7 antibody.

The full-length ORF of *TbRPB7* was amplified by PCR, and cloned in-frame with an N-terminal His tail. The recombinant protein was expressed in *E. coli* BL21 and affinity-purified using a Ni $^{2+}$ resin, according to manufacturer's instructions (GE Healthcare). Two BALB/c mice were immunized with the purified protein and the antisera were tested by western blotting. The antibody used in immunofluorescence assays was previously affinity-purified by absorption to nitrocellulose loaded with recombinant HisRPB7.

Run-on using Permeabilized Cells.

Cultures of bloodstream form cell lines SALR-RPB7C, SALR-RPB4, and SALR-RPC25 were grown to a cell density of 8×10^5 cells ml $^{-1}$. After doxycyclin induction of RPB7 RNAi (24h), RPC25 RNAi (24h), and RPB4 RNAi (16h), cells were collected by centrifugation at room temperature and washed in buffer C (50mM Hepes pH 7.9, 100mM KCl, 4mM MgCl $_2$, 5mM DTT, 10 μ g/ml leupeptin, 1mM PMSF, 0.5mM Glucose). Cells were resuspended in buffer C at a density of 2×10^8 cells ml $^{-1}$, and permeabilized for 5 min with 50 μ g/ml of saponin (Calbiochem). The labeling reaction was carried out for 15 min at 35°C by addition of a rNTP mixture (3mM ATP, 1.5mM CTP, 1.5mM GTP, 40 units RNasin, 7.5mM Hepes pH 7.4, 100 μ Ci [α - 32 P]-UTP (3000 μ Ci/mmol) (Amersham)). The reaction was stopped by adding 1 ml of TRIzol reagent (Invitrogen), and the labeled RNA was isolated according to manufacturer's instructions. Labeled RNA to be used as a probe was resuspended in 50% formamide and used directly for hybridization.

DNA Southern-blots for run-on experiments were produced by alkali-crosslinking of 2.5 μ g PCR fragments (aprox. 300bp, see Supplemental Table 2 for primer sequences) onto Nylon membranes by Southern-blotting following manufacture instructions (Amersham). Membranes were pre-hybridized for 2h at 42°C with hybridization buffer (5x SSC, 5x Denhardt's, 1% SDS, 50% formamide, 100 μ g/ml salmon sperm DNA). The same amount ($\geq 10^7$ dpm) of radio-labeled RNA probes, isolated from induced and un-induced cultures, were added to hybridization buffer and incubated for 48h at 42°C in two replica DNA-containing membranes. Membranes were washed twice for 20 min at 42°C in 1x SSC, 0.1% SDS, and twice for 15 min at 60°C in 0.2x SSC, 0.1% SDS and exposed. The signal was detected after 2-3 days exposure with a PhosphorImager (Storm scanner 820), and quantified using the ImageQuant 5.2 software (Amersham).

Co-immunoprecipitation of TbRPB6z, TbRPB7 and TbRPA1.

Nuclear cell extracts from procyclic TAP-TbRPB6z or TAP control were prepared from 5×10^{10} parasites, following the Günzl Lab Protocol (Laufer et al, 1999), with

some modifications. The nuclei pellet was resuspended in 1.5 vol. of transcription buffer (150 mM sucrose, 20 mM L-glutamic acid, 100 mM potassium chloride, 20 mM HEPES-KOH pH 7.7, 3 mM MgCl₂, 0.5mM DTT, 10 µg/ml leupeptin, 10 µg/ml aprotinin), treated with 1µg/ml of DNase and RNase, and extracted again following the same protocol. For TAP-TbRPB6z immunoprecipitation, 200µl IgG Sepharose (Amersham) were equilibrated in transcription buffer (TX buffer) and incubated with 7.5 ml of extract for 2h at 4°C. The beads were washed with TX buffer, then equilibrated in Tobacco Etch Virus (TEV) protease buffer (150mM KCl, 20mM Tris HCl pH 8.0, 3mM MgCl₂, 0.5 mM EDTA, 0.5mM DTT) and incubated overnight at 4°C with 300 units of AcTEV protease (Invitrogen). The eluate with the tagged proteins was collected and concentrated using a Centricon (Millipore). In the reciprocal experiment, anti-TbRPB7 or anti-VSG 121 (as a control) polyclonal antibodies were bounded to 30 µl of protein G Sepharose beads for 1h at 4°C. Subsequently, antibody-bound beads were incubated for 2h at 4°C with 700 µl of nuclear cell extract, previously pre-cleared with 4B Sepharose in TX buffer with 1mg/ml BSA for 30 min at 4°C. After washing, bounded proteins were released into Laemmli buffer by boiling at 95°C. Samples were analyzed by Western blot using anti-TbRPB7 (1:1000), anti-TbRPA1 (1:400) or PAP (peroxidase-Anti-Peroxidase, Sigma) antibody used to identify the proteins with TAP tag. Loading information: Figure 3A. Input 0.1%, FT 0.1%, Elu TEV 50% was loaded. Figure 3B. For comparison in WB RPB7, Input 1.4%, FT 1.4%, IP 3.5% was loaded and WB PAP (TAP TbRPB6z): input 0.4%, FT 0.4%, IP 1.6%.

Co-immunoprecipitation of endogenous TbRPB7 and TbRPA1.

Nuclear cell extract from wild type 427 procyclic parasites was prepared exactly as before. Antibodies anti-TbRPA1, anti-TbRPB7 antiserum, or anti-EP as a control, were bounded to 20 µl of protein G-Sepharose beads for 1h at 4°C. Then, antibody-beads complexes were incubated for 2h at 4°C with 900 µl (for IP α-RPA1) or 200 µl (for IP α-RPB7) of nuclear cell extract, previously pre-cleared with protein G Sepharose for 30 min at 4°C. After washing steps, bounded proteins were eluted into Laemmli buffer by boiling at 95°C. Samples were analyzed by SDS-PAGE and western blot, using anti-TbRPB7, anti-TbRPA1 or anti-EP.

Co-immunoprecipitation of TbRPA1 and TbRPB7.

For co-immunoprecipitation using bloodstream form extracts, 7x10⁹ cells expressing TbRPB7-TAP were prepared according to (Dignam et al, 1983) with some modifications. Cells were washed with TDB and frozen at -80 °C. Pellets were resuspended in buffer A and broken in a 10-ml Dounce for 10 min. Subsequently the homogenate was spun at 16,000 g for 10 min at 4°C, and buffer B was added. The supernatant was stored at -80 °C until use. Immunoprecipitation analysis from TbRPB7TAP and TAP were carried out thawing the extract and adding 0.05 % Tween 20. They were rotated for 4h at 4 °C with affinity-purified polyclonal anti-TbRPA1 (Navarro & Gull, 2001), anti-CSM (Cytosolic Marker, kindly provided by A. Estevez, IPBLN-CSIC) or IgG Sepharose (Amersham). Protein G-Sepharose (Sigma), equilibrated in IP buffer (10mM HEPES, 150 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 20% glycerol, pH 7.9), was added to the samples with antibodies, and rotation continued for one hour. Finally, after five washes with the IP buffer, beads were eluted with Laemmly buffer. The co-IP material and aliquots from the input were separated by SDS-PAGE and western blotting with the appropriate antibodies (see Figure S4). Peroxidase-conjugated goat anti-rabbit

IgG (Dako) was used as the secondary antibody, and the membranes were developed with LumiLigh Western Blotting Substrate (Roche).

Immunofluorescence.

Suspension immunofluorescence and deconvolution of multichannel 3D data sets were carried out as described previously (Landeira & Navarro, 2007). As primary antibodies, rabbit polyclonal affinity-purified anti-TbRPA1 (1:600) (Navarro & Gull, 2001) and mouse polyclonal affinity-purified anti-TbRPB7 (1:20) were diluted in 1% blocking reagent (Roche). Alexa Fluor 488 or 594 conjugated goat species-specific antibodies (Molecular Probes) were used as secondary antibodies. Cells were DAPI (4',6'-diamidino-2-phenylindole)-stained and mounted on slides.

Co-localization analysis was performed with non-equalized deconvolved 8-bit images using Image J (v. 1.37) software (Rasband, W., NIH, USA), colocalization plug-in adjusted to a 50 pixel intensity value threshold and a 50% intensity ratio. Pseudo-coloring and maximum intensity projections were performed using Image J (v. 1.37) software. 20 representative cells were analyzed by 3D deconvolution microscopy. Nascent RNA labeling with BrUTP in permeabilized procyclic form (Figure S5) was essentially done as described for bloodstream (Navarro & Gull, 2001). Single slice deconvolution shown in Figure S5 was performed using Huygens software with 0.3 μm as Z sample size.

In vitro Transcription.

Cell extract preparation from procyclic *T. brucei* parasites and *in vitro* transcription reactions were carried out following the Günzl Lab Protocols (Laufer et al, 1999). As a DNA template used in the reactions we used the plasmid pVSG-Gless, generated by inserting a BamHI/XbaI 1.8 kb fragment containing the 377 bp G-less cassette from HIVdGless plasmid (Sune et al, 2000) into a plasmid described in Navarro *et al* 1998 as deletion 6, this contains the VSG121 promoter region (from -729 to +145pb) (Fig. 5A). pVSG-Gless- Δ promoter was generated by pVSG-Gless digestion with PmlI/EcoRV and re-ligated to remove 256 bp of the promoter region. These templates synthesize transcripts of 377 bp lacking of guanosine residues resistant to digestion with RNase T1. The G-less cassette is located 1978 bp downstream of the VSG promoter and allow us to measure the number of transcripts beyond 2 kb (see Figure 5A).

The transcription reactions were performed in a 40 μl mix containing 4-8 μl of concentrated cell extract (40mg/ml of protein), 20 mM potassium L-glutamate, 20 mM KCl, 3 mM, MgCl₂, 20 mM HEPES-KOH pH 7.7, 0.5 mM of A/C/GTP, 5 μM UTP, 0.25 $\mu\text{Ci}/\mu\text{l}$ [α -³²P]-UTP (3000 $\mu\text{Ci}/\text{mmol}$), 0.15 U/ μl RNAsin, 20 mM creatine phosphate, 0.48 mg/ml of creatine kinase, 2.5% polyethylene glycol, 0.2 mM EDTA, 0.5 mM EGTA, 4 mM DTT, 10 mg/ml leupeptin, 10 mg/ml aprotinin, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ α -amanitin, and 200 ng of DNA template. In some reactions, 50-100 ng of TbRPB7 recombinant protein was added to the transcription reactions. Purification of TbRPB7 recombinant protein has been described previously (see generation of TbRPB7 antibody). The biologically active protein was obtained from the soluble fraction of *E. coli* extracts. The reactions were incubated 28°C for 1 h and then digested with 1000 U of RNase T1 (Ambion) for 6 min at 37°C.

The transcription products were isolated with TRIzol reagent according to manufacturer's instructions (Invitrogen). RNA pellets were resuspended in loading buffer and resolved by electrophoresis on 6% polyacrylamide-40% urea gels that were dried and exposed. The radioactivity signal was quantified as in run-on

assays and the fold increase of transcription was calculated as the ratio of signal in presence of recombinant TbRPB7 to the one in absence of recombinant protein. As a control, antibody-depleted extracts were used in transcription reactions. For each assay 8µl of cell extract was pre-incubated with 1µg of anti-TbRPA1, anti-TbRPB7, anti-EP, or anti-TOR2 antibodies for 30 min on ice. For anti-TbRPA1 depletion the extract was then incubated 15 min with 8 µl of protein G-sepharose beads, equilibrated in the transcription buffer. *In vitro* transcription assays were repeated at least 3 times.

Supplemental Table 1

Gene	Oligonucleotide	Sequence
TbRPA1	RNAiRPA1-U RNAiRPA1-L	CGGATCCTCACTGAGCGCCGTTCCACGC AGTGGAGCAAGCTTGGTGAAG
TbRPB5z	RNAiRPB5z-U RNAiRPB5z-L	GAAGCTTGCTGAGCATGGATTCCGTCAAAGTTTC CCAGATCTGTAAACAATAACATGTCGATACATTTTC
TbRPB5	RNAiRPB5-U RNAiRPB5-L	GGAAGCTTATGAGCAGTGAAAGCTACGCC CCGGATCCGTTAACCCTACCTGTCTGGTACGTAAC
TbRPC19	RNAiRPC19-U RNAiRPC19-L	GGATCCGCTTTCATCCTCCACCAAGA AAGCTTTTCGACGGCATACTCACTTG
TbRPB4	RNAiRPB4-U RNAiRPB4-L	GCGAAGCTTGGATCCATGAGTAGTGAGAGATATGTG CGCAAGCTTGTAACTAAAGAGTCGAGCATTTCTAA
TbRPB7	RNAiRPB7-U RNAiRPB7-L	CGGTGGATCCATGTTCTACAAAATGAAATTGG CCGGAAGCTTCTACAGTGGTCCTAAATAATTC
TbRPB9	RNAiRPB9-U RNAiRPB9-L	CCCGGATCCATGGAGTCCACTTTGACGC GGGG AAGCTT TTAATTGTCTTGATGGTCGCTG
TbRPC25	RNAiRPC25-U RNAiRPC25-L	CCCGGATCCATGAGCCTTTCCACAGTTAC GGGAAGCTTAATAACGCGATCCACACG

Supplemental Table 2

Gene	Oligonucleotide	Sequence
18S	18SU 18SL	GACGTAATCTGCCGCCAAAAT AACGCCATGGCAGTCCAGTAC
VSG	VSG221U VSG221L	AGCTAGACGACCAACCGAAGG CGCTGGTGCCGCTCTCCTTTG
Tubulin	TUBU TUBL	AGGCAACGGGAGGTCTGCTATG GGGATGGGATGATGGAGAAAG
tRNA	tRNAU tRNAL	ATGGATATGGCTTTGGACTTC TCTACGCGGATGTTTTATGAA

References

- Alibu VP, Richter C, Voncken F, Marti G, Shahi S, Renggli CK, Seebeck T, Brun R, Clayton C (2005) The role of *Trypanosoma brucei* MRPA in melarsoprol susceptibility. *Mol Biochem Parasitol*
- Biebinger, S., Wirtz, L.E., Lorenz, P. and Clayton, C. (1997) Vectors for inducible expression of toxic gene products in bloodstream and procyclic *Trypanosoma brucei*. *Mol Biochem Parasitol*, **85**, 99-112.
- Dignam JD, Lebovitz RM, Roeder RG (1983) Accurate transcription initiation by RNA polymerase II in a soluble extract from isolated mammalian nuclei. *Nucleic Acids Res* **11**: 1475-1489

- Estevez, A.M., Kempf, T. and Clayton, C. (2001) The exosome of *Trypanosoma brucei*. *Embo J*, **20**, 3831-3839.
- Landeira D, Navarro M (2007) Nuclear repositioning of the VSG promoter during developmental silencing in *Trypanosoma brucei*. *J Cell Biol* **176**: 133-139
- Laufer G, Schaaf G, Bollgonn S, Gunzl A (1999) In vitro analysis of alpha-amanitin-resistant transcription from the rRNA, procyclic acidic repetitive protein, and variant surface glycoprotein gene promoters in *Trypanosoma brucei*. *Mol Cell Biol* **19**: 5466-5473
- Navarro M, Cross GA (1998) In situ analysis of a variant surface glycoprotein expression-site promoter region in *Trypanosoma brucei*. *Mol Biochem Parasitol* **94**: 53-66
- Navarro M, Gull K (2001) A pol I transcriptional body associated with VSG mono-allelic expression in *Trypanosoma brucei*. *Nature* **414**: 759-763
- Rudenko G, Blundell PA, Taylor MC, Kieft R, Borst P (1994) VSG gene expression site control in insect form *Trypanosoma brucei*. *Embo J* **13**: 5470-5482
- Sune C, Goldstrohm AC, Peng J, Price DH, Garcia-Blanco MA (2000) An in vitro transcription system that recapitulates equine infectious anemia virus tat-mediated inhibition of human immunodeficiency virus type 1 Tat activity demonstrates a role for positive transcription elongation factor b and associated proteins in the mechanism of Tat activation. *Virology* **274**: 356-366
- Wang Z, Morris JC, Drew ME, Englund PT (2000) Interference of *Trypanosoma brucei* gene expression by RNA Interference using an integratable vector with opposing T7 promoters. *J Biol Chem*: M008405200
- Wirtz E, Hartmann C, Clayton C (1994) Gene expression mediated by bacteriophage T3 and T7 RNA polymerases in transgenic trypanosomes. *Nucleic Acids Res* **22**: 3887-3894
- Wirtz E, Leal S, Ochatt C, Cross GAM (1999) A tightly regulated inducible expression system for conditional gene knock-outs and dominant-negative genetics in *Trypanosoma brucei*. *Molecular and Biochemical Parasitology* **99**: 89-101

Supplemental Video.

TbRPB7 co-localizes with TbRPA1 in the nucleolar periphery and with the extra-nucleolar ESB. Slice animation of a three-channel 3D (0.1 μm Z step) deconvolved data set through the whole fixed nucleus volume is shown. Three-channel fluorescence imaging using anti-TbRPA1 antibody (red), anti-TbRPB7 antibody (green) and DAPI staining (blue) was performed. Co-localization pixels (see SI Methods) between anti-TbRPA1 and anti-TbRPB7 signals are shown in white. A co-localization mask (white) was calculated for each non-equalized 8 byte slice and merged with both TbRPA1 (red) and TbRPB7 (green) labels and DAPI staining (blue). TbRPB7 was found to partially co-localize with TbRPA1 in the nucleolar periphery, an area containing transcriptionally active pol I (see Figure S5) and with the extra-nucleolar ESB, which is associated with the active VSG-ES promoter and with pol I transcription (Navarro and Gull, 2001). Scale bar, 1 μm .

Supplementary Figures

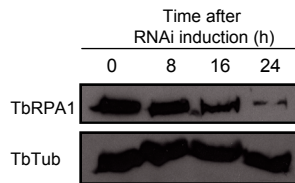


Figure S1. Kinetics of TbRPA1 depletion upon RNAi. Cell extracts, isolated at several time points after induction, were analyzed by western blotting using the polyclonal antibody anti-TbRPA1. The same membrane was then developed with anti-Tubulin as a loading control.

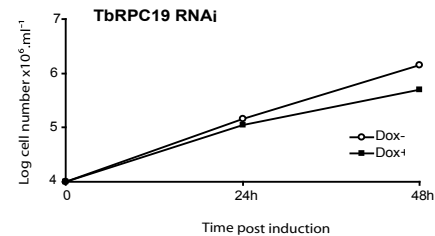
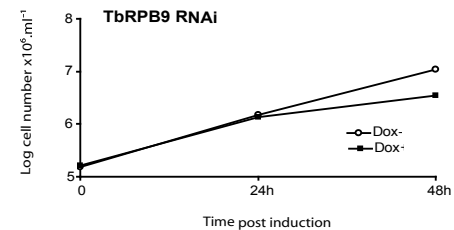
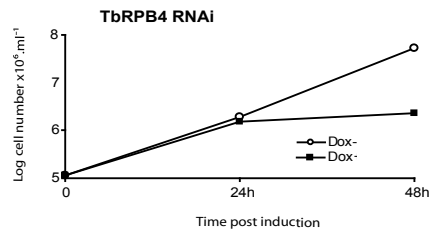
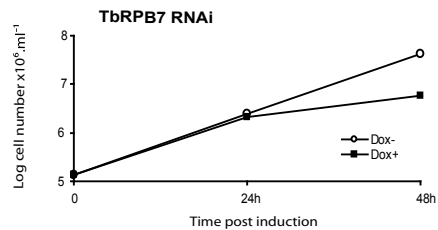
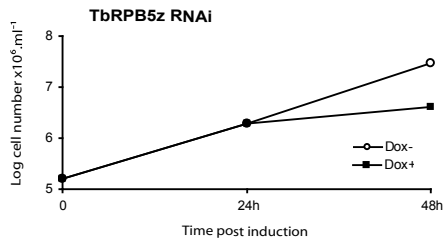
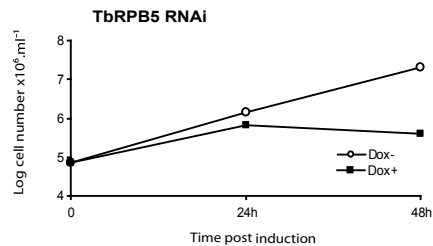
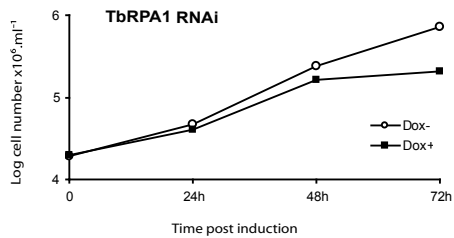


Figure S2A. Growth curves of the RNAi effect of polymerase subunits in the absence (open circles) or presence (solid squares) of $1\mu\text{g/ml}$ Doxycycline (for the induction of dsRNA expression). The number of cells in each culture was measured at different time points after induction.

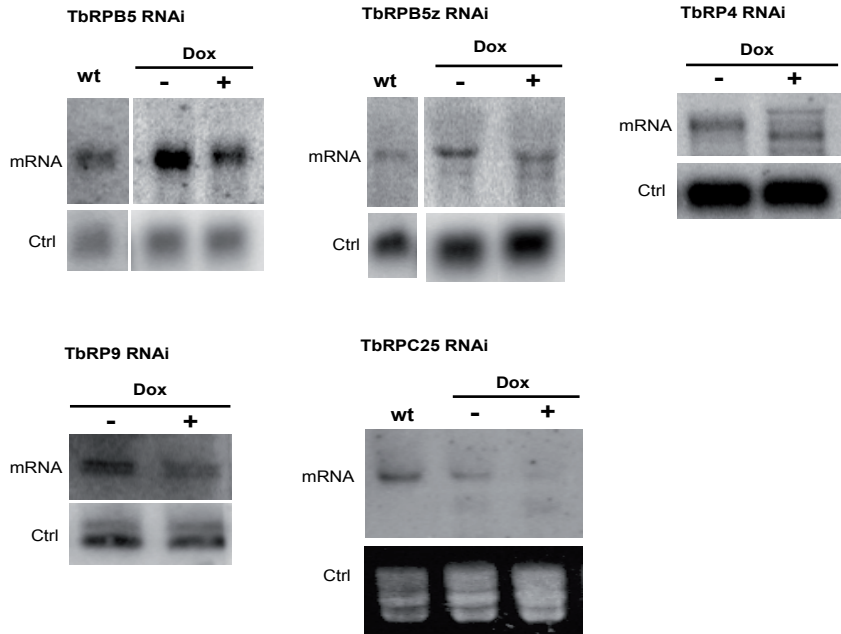


Figure S2B. Northern blot analysis of mRNA level before (-) and 24 h (+) after doxycyclin induction of each RNAi, wild type (wt). As a control, tRNA was detected on the same blot, or the Ethidium bromide staining of rRNA was included.

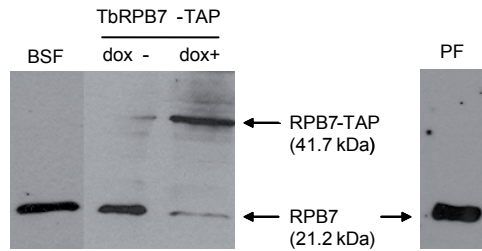
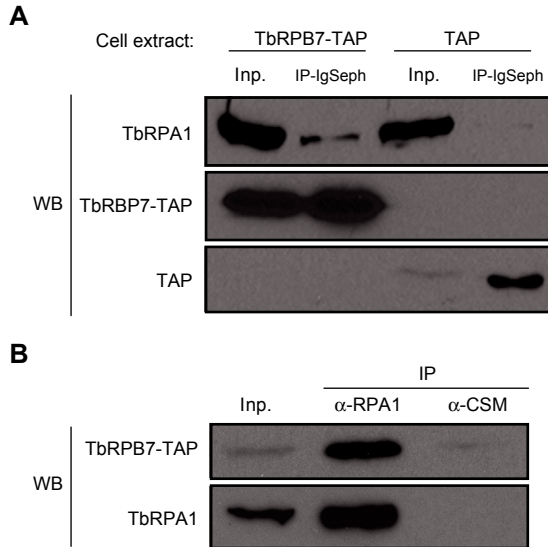


Figure S3. Anti-TbRPB7 antiserum western blot analysis. Total protein extracts of wild type blood-stream trypanosomes (BSF), a cell line expressing TbRPB7-TAP upon doxycyclin induction and procyclic forms (PF).



Supplementary Figure 4

Figure S4. Co-immunoprecipitation of TbRPB7 and TbRPA1 in bloodstream forms. (A) Extracts from cell lines expressing either TbRPB7-TAP or TAP as control were immunoprecipitated with IgG Sepharose. The proteins eluted with Laemmly buffer were analyzed by western blotting with the indicated antibodies. (B) Extracts from TbRPB7-TAP cell line were incubated with anti-TbRPA1 antiserum or anti-CSM as an unrelated control at similar concentration, protein G Sepharose was then added and the samples were analyzed by western blot with the indicated antibodies. PAP (peroxidase-Anti-Peroxidase, Sigma) antibody was used to identify TbRPB7-TAP and the TAP tag.

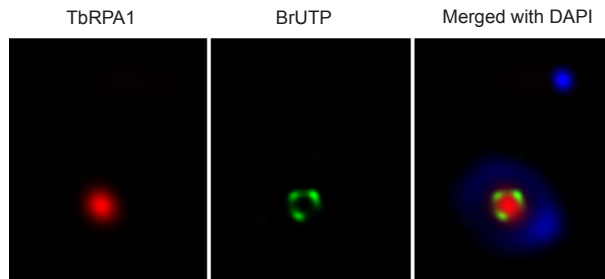


Figure S5. BrUTP labeling of nascent RNA in permeabilized procyclic form nuclei. Double IF using anti-pol I antiserum (red) and a monoclonal antibody against BrdUTP (green), together with DNA staining using DAPI (blue), in methanol fixed cells. BrUTP-labeled nascent RNA was synthesized in the presence of α -amanitin ($100 \mu\text{g/ml}$). Pol I-mediated transcription is confined to several peri-nucleolar foci (green), indicating that pol I transcription occurs largely along the periphery of the nucleolus. Single deconvolved slices are shown. Scale bar, $1 \mu\text{m}$.

4.2. Anexo resultados 2

Mapeo de la distribución en la cromatina de las RNA polimerasas I, II y la subunidad RPB7 en *Trypanosoma brucei*

La transcripción de los genes que codifican para proteínas en eucariotas se realiza por la RNA polimerasa II (RNAPII). Sin embargo, en *Trypanosoma brucei* los genes que codifican para las proteínas de superficie, VSG y prociclina, características de las formas sanguínea y procíclica del parásito, son transcritos por la RNA polimerasa I (RNAPI), en lugar de la RNAPII. El gen *VSG* se encuentra en una posición telomérica, localizado al final de una unidad policistronica larga conocida como sitio de expresión del gen *VSG* (*VSG-ES*). En la forma sanguínea únicamente un *VSG-ES* de entre unos 20 sitios de expresión diferentes es transcrito en un momento dado. Nosotros hemos descrito previamente que la transcripción mediada por la RNAPI en tripanosomas involucra la *TbRPB7*, una subunidad disociable del complejo RNAPII. En este trabajo investigamos los perfiles de ocupación de la *TbRPB7* y una subunidad central de la RNAPI, la *TbRPA1*, a lo largo del *VSG-ES* mediante inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP) seguida de PCR cuantitativa (qPCR). El análisis de ChIP muestra que *TbRPB7* se asocia *in vivo* con el *VSG-ES* activo durante todas las etapas de la transcripción, de manera similar que lo hace la *TbRPA1*. Asimismo, hemos analizado la ocupación de la *TbRPB7* y la subunidad mayor del núcleo central de la RNAPII, la *TbRPB1*, a lo largo de la unidad transcripcional que contiene único promotor de la RNAPII caracterizado hasta el momento, el “*splice leader*” (*SL RNA*) y otros *loci* transcritos por la RNAPII. Interesantemente, *TbRPB7* y *TbRPB1* se encontraron altamente enriquecidos en el *SL RNA*, mientras que los demás *loci* mostraron un enriquecimiento moderado o bajo para las dos subunidades. Los análisis mediante ChIP muestran que la ocupación de *TbRPB7* en el *VSG-ES* activo es similar a la que se encuentra una región codificante de copia única transcrita por la RNAPII y en regiones de iniciación de la transcripción de la RNAPII conocidas como *strand-switch-region* (SSR). Estos resultados sugieren que la *TbRPB7* se une a la cromatina del *VSG-ES* activo.

Genomic mapping of *Trypanosoma brucei* RNA polymerases I, II and RPB7 subunit.

Instituto de Parasitología y Biomedicina "López-Neyra"
Consejo Superior de Investigaciones Científicas
(Spanish National Research Council)
Avda. del Conocimiento s/n
18100 GRANADA
SPAIN

ABSTRACT

Transcription of protein-coding genes in eukaryotes is mediated by the RNA polymerase II (RNAPII), however in *Trypanosoma brucei* the two main surface protein genes characteristic of the bloodstream and insect stages, *VSG* and *procyclin*, are transcribed by RNA polymerase I (RNAPI), instead of RNAPII. The *VSG* gene is located in a telomeric position, at the end of a long polycistronic transcription unit, known as *VSG* expression site (*VSG-ES*). In the bloodstream form only one *VSG-ES* out of 20 different ES loci is transcribed at any given time. We previously reported that transcription mediated by RNAPI in trypanosomes requires TbRPB7, a dissociable subunit of the RNAPII complex. Thus, we investigate the occupancy profiles for TbRPB7 and a core RNAPI subunit, TbRPA1, along the *VSG-ES* by chromatin immunoprecipitation (ChIP) followed by quantitative PCR (qPCR). ChIP analysis showed that TbRPB7 associates *in vivo* with the active *VSG-ES*, during all transcription stages, similar to TbRPA1. In addition, we have analyzed the occupancy for TbRPB7 and, TbRPB1, a core RNAPII subunit, in the well-characterized RNAPII promoter, the *splice leader (SL RNA)* and others RNAPII-transcribed *loci*. Interestingly, TbRPB7 and TbRPB1 were found highly enriched at the *SL RNA* gene, while others RNAPII-transcribed *loci* showed moderate or low enrichment for both subunits. ChIP analysis detected similar occupancy of TbRPB7 in the active *VSG-ES* than at several RNAPII-transcribed regions, except for the *SL* locus, suggesting TbRPB7 is associated with the active *VSG-ES* chromatin.

INTRODUCTION

African trypanosomes diverged from the domain Eukarya very early in the evolution; several aspects of their genome organization, transcription mechanisms and gene expression regulation are atypical compared with the majority of eukaryotic organisms. The genome organization found in the megabase-size chromosomes (Berriman et al., 2005), reveals that most of their protein coding genes are transcribed from long polycistronic transcription units, where the genes are organized without any apparent relationship. Long polycistronic pre-mRNAs are synthesized by RNA polymerase II (RNAPII) and processed by *trans*-splicing and polyadenylation (LeBowitz et al., 1993; Matthews et al., 1994). The *trans*-splicing consists in the addition of 39 nucleotide sequence named *splice leader* (SL) at the 5' end of all mRNA molecules (De Lange et al., 1983). The *SL RNA* is also transcribed by the RNAPII and provide to all mRNAs the cap structure (Perry et al., 1987). In trypanosomes, transcription and *trans*-splicing are independent processes in contrast with other eukaryotes where these processes are coupled. In African trypanosomes, the RNAPII is able to transcribe the protein coding genes *VSG* and *procyclin* in addition to the rRNA genes (Gunzl et al., 2003; Navarro and Gull, 2001; Rudenko et al., 1989), thus *SL trans*-splicing at the 5' of mRNAs could facilitate this exceptional feature.

In contrast to other eukaryotes, the largest subunit of RNAPII in trypanosomes lacks the typical heptapeptide repeats in the carboxy-terminal domain (CTD). Despite the absence of this domain, *T. brucei* RNAPII is phosphorylated when isolated from elongating complexes (Chapman and Agabian, 1994).

Most studied genes transcribed by RNAPII in trypanosomes, are regulated *post*-transcriptionally by sequences found in the 3'UTR regulating the RNA stability (Clayton, 2002). During long time it has been proposed that these organisms do not use transcription initiation as mechanisms of gene expression regulation due to the difficulty to identify promoter regions and transcription factors (Clayton, 2002). However recent studies have demonstrated that these parasites own more transcription factors than initially estimated (Martinez-Calvillo et al., 2010). Thus far, the only protein coding genes which are known to be regulated at transcriptional level are the *VSG* and *procyclin*.

Studies in *Leishmania major* suggest that the regions between polycistronic transcription units, known as strand switch regions (SRRs) could be possible sites of RNAPII transcription initiation or termination (Martinez-Calvillo et al., 2003); however

the specific regulatory sequences present at these regions are still unknown. In *T. brucei*, the histones H4K10ac, H2AZ, H2BV and the factor BDF3, have been found enriched at divergent SSRs while the histone variants H3V y H4V are found in convergent SSRs (Siegel et al., 2009), presumably marking initiation and termination sites of polycistronic transcription units.

In trypanosomes the *SL* promoter is the only well characterized RNAPII promoter (Gunzl et al., 1997). Furthermore, in a different way from the polycistronic transcription units, it has been identified transcription factors which recognize promoter and termination sequences on the *SL RNA* transcription unit (Das and Bellofatto, 2003; Das et al., 2005; Ruan et al., 2004; Schimanski et al., 2005).

The RNAPI promoters in *T. brucei* are the best characterised, reviewed in (Janz and Clayton, 1994). The ribosomal DNA (rDNA) promoter has two essential elements (domains I and II) and one distant (domain III), resembling a typical RNAPI eukaryotic promoter. The *procyclin* promoter is similar to that of the rDNA with three regulatory elements; in contrast, the *VSG* promoter requires a CA at the transcription start, and two other short sequences at -60 and -36 (Vanhamme et al., 1995). Low sequence conservation among the three RNAPI promoters and different regulation, suggest they could recruit RNAPI using different set of factors.

The *VSG* gene is transcribed from a long polycistronic transcription unit (~60kb), known as *VSG* expression site (*VSG-ES*). In the bloodstream form only one *VSG-ES* out of 20 different ES loci is transcribed at any given time, resulting in the expression of a single *VSG* type in the surface of the parasite. Recently, we have described that TbRPB7, a dissociable subunit of the RNAPII complex, is required for RNAPI transcription in trypanosomes (Penate et al., 2009). To investigate the RNAPI and TbRPB7 occupancy profile along the active *VSG-ES* we carried out chromatin immunoprecipitation (ChIP). Additionally, we also analysed the occupancy of TbRPB7 and RNAPII (TbRPB1) at the *SL RNA* transcription unit and other polycistronically transcribed genes to compare the association of TbRPB7 at the different transcription units.

RESULTS AND DISCUSSION

The occupancy profiles for TbRPB7 and the largest RNAPI subunit, TbRPA1, were investigated by chromatin immunoprecipitation (ChIP) using affinity-purified antibodies anti-TbRPB7 (Penate et al., 2009) and anti-TbRPA1 (Navarro and Gull, 2001). Telomeric *VSG* expression sites (*VSG-ES*) sequences in *T. brucei* are highly conserved, particularly at the promoter region. Thus we used a cell line containing

resistance genes 1.1 Kb downstream of both, the actively transcribed VSG221-ES promoter and an inactive VSG-ES promoter (Figure 1A). By using the marker genes as unique sequences, we overcome the high similarity among VSG-ES sequences, a major problem in analyzing VSG-ESs chromatin.

ChIP analysis shows that TbRPA1 immunoprecipitates 35-fold more efficiently with the sequences downstream of active VSG-ES promoter (Neomycin marker) compared with the inactive VSG-ES promoter (Hygromycin marker) (Figure 1B). Similarly, the actively transcribed telomeric VSG221 immunoprecipitates 10-fold more efficiently than other telomeric VSGs (VSG121, VSGJS1) using anti-TbRPA1 antibodies (Figure 1B). Therefore RNAPI is much more efficiently recruited at the active than at an inactive VSG-ES, contrary to previously described models suggesting inactive VSG promoters are transcriptionally active and regulation is at elongation level (Vanhamme et al., 2000).

The low percentage of TbRPA1 detected at the VSG-ES promoter region compared with a single copy gene (Neomycin) inserted downstream, is due to the multi-copy nature and high sequence homology of the VSG-ES promoters. The qPCR primers in this region detect most if not all the promoters but only one is transcribed, while the primers for the transcribed single copy gene are specific for the active VSG-ES (Figure 1A).

TbRPB7 ChIP analysis revealed a similar occupancy pattern to TbRPA1 within the active VSG-ES (Figure 1B). Importantly, ChIP data showed TbRPB7 occupancy along all the active VSG-ES, including the VSG-ES promoter, internal ES regions (*pseVSG*) and the telomeric VSG221 (Figure 1B). However at the inactive VSG-ES promoter and inactive VSGs as VSG121 and VSGJS1, immunoprecipitation values were similar to the RNAPIII-transcribed 5S, used as a negative control (Figure 1B). TbRPB7 was detected at the RNAPI transcribed 18S rRNA, and at the RNAPII transcribed gene *myosin* at similar level than single marker Neomycin and VSG221 in the active VSG-ES. TbRPB7 immunoprecipitation values in all these loci were low but significantly higher than in RNAPIII locus as negative control.

TbRPB7 and TbRPA1 were detected along the active VSG-ES chromatin with similar occupancy patterns. Therefore, TbRPB7 seems to associate with RNAPI at initiation, elongation and termination of transcription. However, it is important to note that TbRPB7 presents low immunoprecipitation values, similar to those observed in RNAPII genes, such as *myosin* (Figure 1B). Recent localization data of RPB7 and RNAPII core subunits (RPB3 and RPB11) in yeast and humans (Cojocar et al., 2008; Jasiak et al., 2008) showed that RPB7 remains associated with the elongation complexes and is required not only for initiation. RPB7 is underrepresented with

respect to RNAPII, and the effect is more pronounced in some genes (Jasiak et al., 2008). In addition, the occupancy of RBP7/RPB11 in transcription initiation sites is higher than in downstream transcriptional regions (Cojocarú et al., 2008).

Next, we developed an affinity purified antiserum against N-terminal region of TbRPB1, the largest subunit of the RNAPII complex, which recognizes the phosphorylated and non phosphorylated protein in western blot analysis (Figure 2A). Immunofluorescence analysis localized the RNAPII core complex in numerous foci in the nucleus of *T. brucei* in contrast with the more precisely distribution of RNAPII complexes and TbRPB7 (Figure 2B).

Most importantly, this antibody against TbRPB1 allowed us to investigate occupancy of TbRPB7 and TbRPB1 in loci transcribed by RNAPII using ChIP analysis. ChIP experiments were performed using a cell line containing the *Luciferase* reporter gene inserted 405 bp downstream of the active *VSG-ES* promoter and, as a control for RNAPII transcription, the *Renilla-luciferase* reporter gene inserted within the tubulin locus (Penate et al., 2009). Interestingly, TbRPB7 and TbRPB1 occupancy were much greater in promoter and coding region of the highly transcribed *SL RNA* gene in comparison with other coding regions transcribed by RNAPII (Figure 3). TbRPB7 occupancy at the *SL* loci displayed similar pattern to that of TbRPB1. In *T. brucei*, every mRNA is capped with a short 39mer sequence known as splice leader (SL), thus the transcription of this multi-copy gene is expected to be very high. These results agree with studies in yeast and human cells, which show that RNAPII displays higher levels of binding to genes with high transcriptional activity, while genes with low transcriptional activity present poor enrichment of RNAPII (Verma-Gaur et al., 2008). Moreover it has been observed that RPB4 and RPB7 occupancy, similarly to RNAPII core occupancy, varies with the gene length (Cojocarú et al., 2008; Verma-Gaur et al., 2008).

However, the low occupancy of TbRPB1 and TbRPB7 found the *tubulin* genes was unexpected as these genes encode the predominant components of microtubules cytoskeleton and therefore are highly transcribed (Scott et al., 1997). In contrast, the occupancy at the single copy *Renilla-luciferase* reporter gene, inserted within the *tubulin* locus, was also low but 3-fold more than in the *tubulin* gene. The very low percentage of immunoprecipitation detected at the *tubulin* gene compared with the single copy gene *Renilla-luciferase* inserted in the *tubulin* array, could be due to the lack of transcription of the entire multi-copy *tubulin* array. Similar of what occurs at the *VSG-ES* conserved regions, the multicopy nature of the *tubulin* gene array, may account for these low ChIP values obtained after normalization. In addition, it is also

possible that at this long 40 Kb polycistronic transcription unit of *tubulin* (Imboden et al., 1987), the RNAPII and TbRPB7 occupancy decrease towards the end.

Unfortunately, in trypanosomes the *SL RNA* promoter is the only well-characterized RNAPII promoter (Gunzl et al., 1997). The coding region of this gene is short (135 nt) and exist ~200 *SL RNA* transcription units which are organized in an array of monocistronic tandem 1.4-Kb repeats (Liang et al., 2003). Due probably to the vast requirement of the 39nt *SL RNA* to be add to each mRNA, we cannot compare the occupancy observed in the *SL* RNAPII transcription unit with the occupancy found in the *VSG-ES* transcription unit.

We next evaluated the occupancy of TbRPB7 and TbRPB1 at a divergent strand-switch-region (SSR); these regions are presumably sites of RNAPII initiation because they are enriched in modified histones and histone variants (Siegel et al., 2009). The occupancy of TbRPB1 and TbRPB7 found in this region was 20-22 folds lower than in the *SL RNA* gene, but about 2-4 folds higher than in a single copy coding gene *myosin* (Figure 4). Most importantly, a similar level of TbRPB7 was found at the SSR and the *Luciferase* gene downstream of the active *VSG-ES* (Figure 4). Therefore, the TbRPB7 occupancy observed in the active *VSG-ES* coding regions are low, but similar of that found in a RNAPII-transcribed gene such as *myosin* and the SSR as a putative RNAPII promoter region.

In summary our results show that most RNAPII complexes, including TbRPB7, are recruited to the highly transcribed *SL RNA* genes. This result suggests that TbRPB7 interacts with RNAPII to a different extent than with RNAPII, but even so, TbRPB7 is detected in the *VSG-ES* similarly than in other RNAPII loci, suggesting TbRPB7 have an important function for the active RNAPII in long transcription units, like the telomeric *VSG-ES*.

Future studies on RNAPII, RNAPII and TbRPB7 global distribution over the genome by ChIP-sequencing (ChIP-seq) are under way in our lab in order to obtain a whole-genome view of the association of TbRPB7 with the two polymerase complexes.

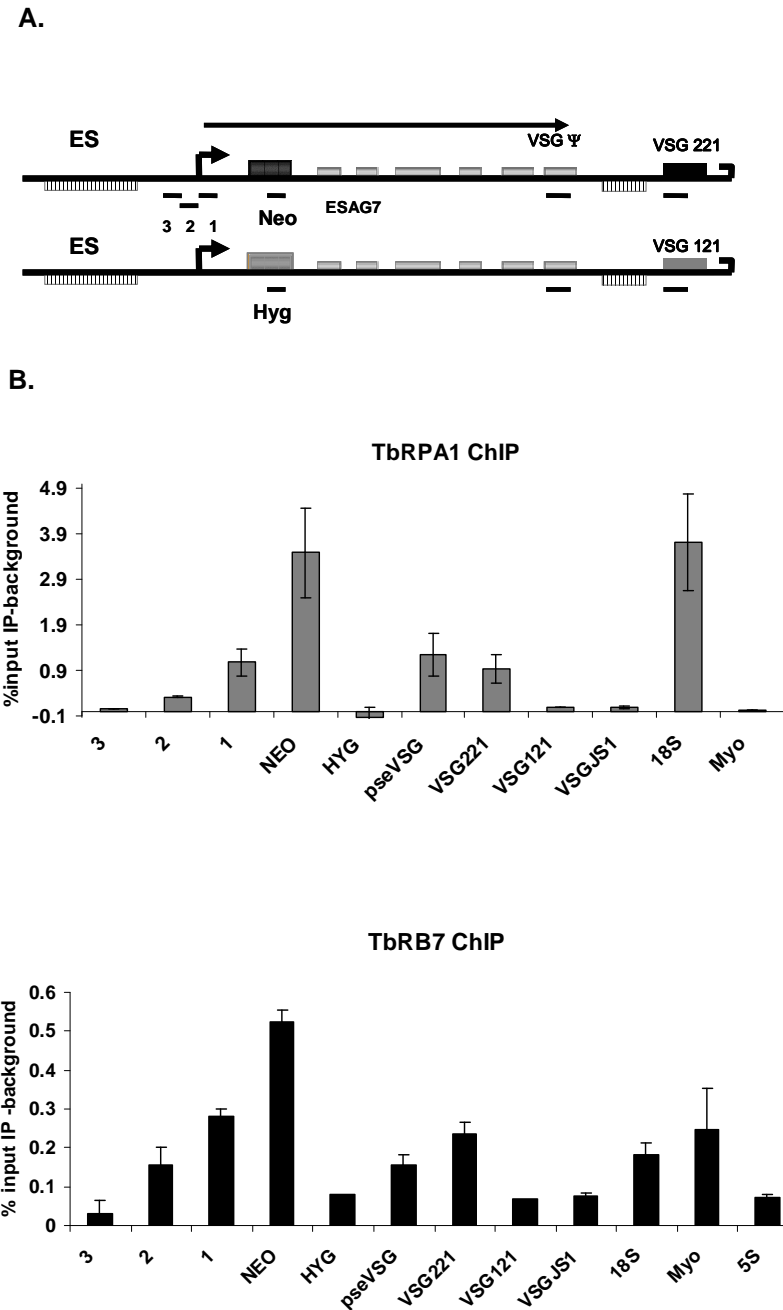


Figure 1. TbRPB7 associates with the active VSG-ES chromatin. (A) Schematic of the *T. brucei* 427 Pnbh cell line with a Neomycin (Neo) marker 1 Kb downstream of the active VSG221-ES promoter and a Hygromycin (Hyg) marker 1 Kb downstream of an inactive VSG-ES. Amplified fragments by qPCR using ChIPed DNA as a template are indicated and primers are listed in the Supplemental Table 1. Primers 1-3 mapping the region upstream of the promoter are common to all ESs, however, primers at the pseudo gene VSG (VSG Ψ) and the VSG are specific of the active VSG221-ES. **(B)** ChIP-qPCR analysis of TbRPB7 and TbRPA1 occupancy at the indicated positions in (A), VSGJS1 is an untagged silent VSG. As controls we used: a RNAPII transcribed gene 18S, a RNA PII gene myosin (Myo), and a RNAPIII gene 5S. The values were normalized as a percentage of input IP after background subtraction of the mock ChIP. The results show the mean of three experiments, including at least two independent ChIP assays.

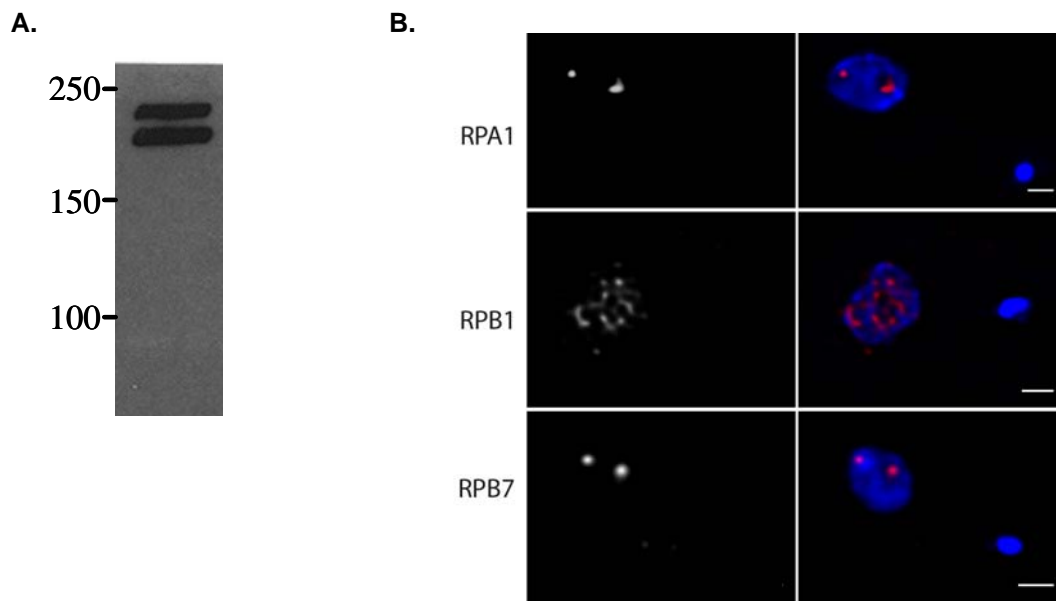


Figure 2. Nuclear localization of TbRPA1, TbRPB1 and TbRPB7 (A) Western blot analysis of total protein extracts with anti-Tb RPB1 shows two bands that probably correspond to unphosphorylated and phosphorylated states of TbRPB1. Affinity-purified antibody developed against TbRPB1 N-terminal domain was used for this analysis. **(B)** Distribution of RNAPI, RNAPII and the dissociable subunit TbRPB7 in the nucleus of bloodstream forms. Immunofluorescence was performed using affinity purified anti-RPA1 (Navarro and Cross, 2001) and anti-RPB1 antibodies and anti-RPB7 antiserum (Peñate et al., 2009). DAPI staining and merge figures are also shown. Scale bars, 1 μ m.

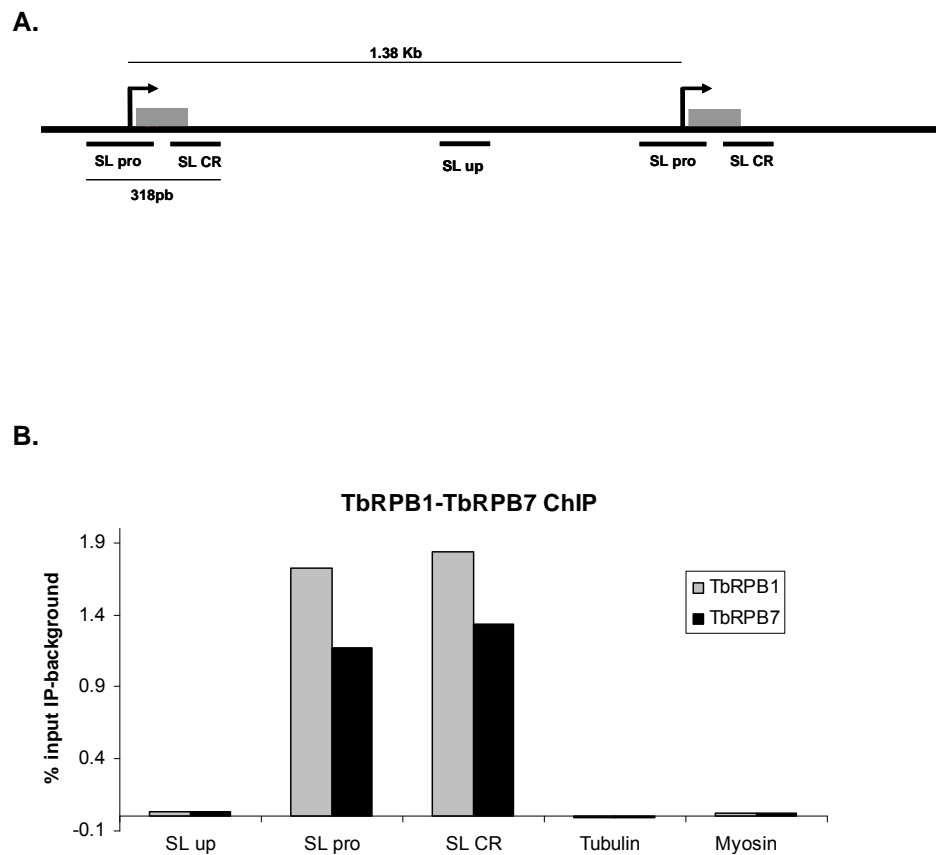


Figure 3. Chromatin mapping of TbRPB1 and TbRPB7 at the *Splice lider* locus (A) Schematic of *SL RNA* locus mapping. *SL* promoters in tandem 1.4 Kb array are indicated with arrows. qPCR amplified fragments are indicated by backlines underline and primers are listed in the Supplemental Table 1. *SL up*: upstream promoter region, *SL pro*: promoter region (nt -56 to +82), *SL CR*: coding region. **(B)** TbRPB1 and TbRPB7 occupancy at the *SL* locus and other RNAPII transcribed genes were analysed by ChIP followed by qPCR. Distinction between different steps of transcription (initiation, elongation, termination) is imposed by the resolution of the ChIP which depends on the size of the sonicated fragments (Cojocaru et al., 2008) (approx. 300pb in our case), thus we can not differentiate *SL* promoter and *SL* coding region since it is below our resolution limit. The values were normalized as a percentage of input IP after background subtraction of the mock ChIP.

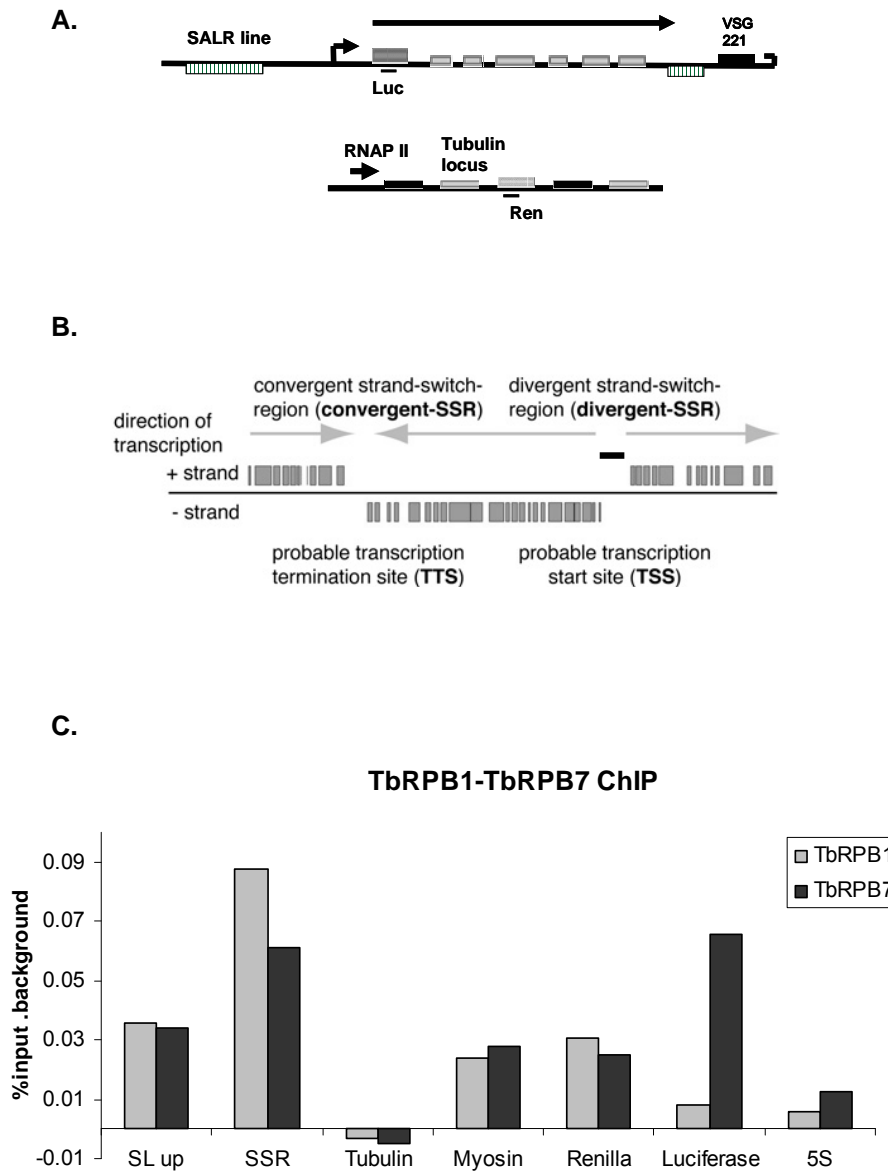


Figure 4. Occupancy of TbRPB1 and TbRPB7 at a divergent-SSR and other RNAPII transcribed regions (A) Schema of tagged cell line SALR used in ChIP experiments containing a *Luciferase* reporter gene (*Luc*) inserted 405bp downstream of the active *VSG221*-ES promoter. *Renilla*-luciferase reporter gene (*Ren*) was inserted in the *tubulin* locus, as RNAPII control. Amplified fragments by qPCR are indicated. (B) Schematic of polycistronic transcription units showing a divergent and convergent strand switch regions (SSRs), from Siegel et al., 2009. Primers were designed over a divergent SSR enriched for histones randomly selected from the kinetoplastid genomes resource (TritrypDB), Amplified fragment by qPCR is indicated by backline underline. (C) TbRPB1 and TbRPB7 occupancy were determined by ChIP at the SSR (probable transcription initiation site) and other RNAPII (*tubulin*, *myosin* and *Renilla*) and RNAPI (*Luciferase*) transcribed loci. An RNAPIII transcribed gene *5S* is shown as negative control. The values were normalized as percentage of input IP after background subtraction of the mock ChIP.

Gene or Region	Primer name	Sequence
1	ESMP1_U ESMP1_L	GGTGTGGCGGACGTCTCGAAC CCTCTAAAATACGCTCAGCCCGTCC
2	ESMP2_U ESMP2_L	ATGAAGGTCTTGCCTGTCT CGCCACACCTTGAGTCTGATATCC
3	ESMP3_U ESMP3_L	TGTTGTTGCAGTATGTTTTCTTC AGACAGCGCAAGACCTTCAT
VSG221	VSG221_U VSG221_L	AGCTAGACGACCAACCGAAGG CGCTGGTGCCGCTCTCCTTTG
VSG pseudogene	221pseudo_U 221pseudo_L	CAAGCATTACCAGAGAAGT CGTCATTGAGTTTCCTTATT
VSG121	VSG121_U VSG121short_L	CCTGACATCGGACGGTAAC TGGTCGATTTGCCTTCCTT
VSGJS1	VSGJS1_U VSGJS1_L	TTCTGCTTCTTTGCCCTTGT AAAATGAAGCGGAAATGGTG
18S gene	18S_U 18S_L	GACGTAATCTGCCGCAAAAT AACGCCATGGCAGTCCAGTAC
Luciferase	Luc_U Luc_L	GTGTTGGGCGGTTATTTAT CATCGACTGAAATCCCTGGT
Renilla	Ren_U Ren_L	GATAACTGGTCCGAGTGGT ACCAGATTTGCCTGATTTGC
Neomycin	Neo_U Neo short_L	ATCAGGATGATCTGGACGAA TACCGTAAAGCACGAGGAAG
Hygromycin	Hyg_U Hyg_L	TGAAAAAGCCTGAACTCACC CTGAATTCCCAATGTCAAG
SL promoter	SL_U SL_L	CCGACACGTTTCTGGCAGCAG TGCGTGTGTTGGCCAGCTGCTAC
SL coding region	SL CR_U SL CR_L	TCGGATGACCTCCACTCTTT TGAGTGTGTGAGTGTGTGTG
SL upstream -613 to -500	SL-upst_U SL-upst_L	ATCACCCGCCGCTAATAAAC AATGGCGGCTAATAACATGAA
SSR	Henrich_U Henrich_L	ATCGCCATCAACTGAAGAG GGTGCAGCGTTCTGTTTGTGTA
Myosin B	MyoB_U MyoB_L	CTGCAGAACAAGCACGGCATT ACGCTCAACAGTGGCAGTGAA
Tubulina	Tub_U Tub_L	AGGCAACGGGAGGTCGCTATG GGGATGGGATGATGGAGAAAG
5S gene	5Snew_U 5Snew_L	GACCATACTGGCCGAATG TACAACACCCCGGTTCC

Supplemental Table 1: Primers used in ChIP-qPCR analysis

MATERIALS AND METHODS

Trypanosomes and cell lines

T. brucei bloodstream-form cells (strain Lister 427, antigenic type MiTat 1.2, clone 221a) were cultured at 37°C in HMI-9 medium. DNA transfections, and selection procedures were described previously (Wirtz et al., 1999).

The Pnbh cell line was constructed in the bloodstream strain Lister 427. First, the *neomycin* cassette was inserted 1.15 Kb downstream of the active expression site *VSG221* by homologous recombination targeting the promoter sequences derived from *SpeI-BamHI* restriction sites, described previously (Navarro and Cross, 1998). Second, the hygromycin cassette was inserted in the in the same way but this time was integrated in the inactive *VSG121* expression site.

Establishment of the dual-reporter cell line, called SALR, in the 'single-marker' cell line (Wirtz et al., 1999) have been described previously (Penate et al., 2009).

Chromatin Immunoprecipitation (ChIP)

Bloodstream cultures were cross-linked by addition of 37% formaldehyde stock solution (to 1% final concentration) and incubated at 37° for 15 min under gentle mixing. Cross-linking was stopped with 2.5M glycine-20mM Tris (not pH-ed) (to 125 mM final concentration), gentle mixed and incubated 5 min more. Cells were collected by centrifugation at 3500 rpm for 20 min at 4°C into 50 ml Falcon conical tubes, washed in 50 ml cold PBS and centrifuged again (same conditions). Pellet was resuspended in 10 ml of PBS with protease inhibitor cocktail (Roche Molecular biochemical), centrifuged at 4000 rpm for 15 min, at 4°C and stored at -80°C. Pellet was thawed on ice and cells were resuspended in 1ml of lysis buffer per 10⁸ cells (1% SDS; 10mM EDTA pH 8.0; 50 mM TrisHCl pH 8.0; 1mM PMSF; 1mM DTT and protease inhibitor cocktail) and incubated on ice 10 min. Cells were sonicated in a VibraCell sonicator to shear the chromatin to an average length of 400pb (9 cycles of 30 sec on/30 sec off) and centrifuged at 13000 rpm for 5 min at 4°C, the supernatant containing sheared chromatin was removed and frozen at -80C. Chromatin was thawed on ice, diluted 1:5 in ChIP dilution buffer (0.01%SDS; 1.1% Triton X-100; 1.2 mM EDTA, 16.7 mM TrisHCl pH 8.0; 150 mM NaCl; 1mM PMSF; 1mM DTT and protease inhibitor cocktail) and pre-cleared with Sepharose™ 4B beads (Sigma-Aldrich) (blocked previously in TE buffer with 0.2 mg/ml salmon sperm DNA and 1 mg/ml BSA) for 1hr at 4°C. For immunoprecipitations 2.5ml of pre-cleared chromatin (5 x 10⁷ cells per IP) was incubated overnight at 4°C with 5-10µg of each antibody (antibodies used in ChIP

Anexo 4.2

experiments are listed in supplementary table 3). Next, 40ul of 50% slurry of protein G Sepharose™ fast flow beads (Sigma-Aldrich) (blocked previously in TE buffer with 0.2 mg/ml salmon sperm DNA and 1 mg/ml BSA) was added and incubated for 1hr at 4°C; immune complexes were collected by centrifugation at 1000g for 2 min. Immunoprecipitates were washed for 5 min with 1 ml of each one the following buffers: low salt wash buffer (0.1%SDS; 1% Triton X-100; 2 mM EDTA pH 8.0; 20 mM TrisHCl pH 8.0; 150 mM NaCl with protease inhibitor cocktail), high salt wash buffer (0.1%SDS; 1% Triton X-100; 2 mM EDTA pH 8.0; 20 mM TrisHCl pH 8.0; 500 mM NaCl), LiCl wash buffer (0.25 M LiCl; 1% NP-40; 1% Na-Deoxycholate; 1 mM EDTA pH 8.0; 10 mM TrisHCl pH 8.0), and twice with TE wash buffer (10 mM TrisHCl pH 8.0; 1 mM EDTA pH 8.0). The complexes were eluted from the beads with 500 µl of elution buffer (1%SDS, 0.1M NaHCO₃) by incubation for 30min at room temperature with rocking, and then the supernatant was transferred to a fresh tube. Crosslinks were reversed by adding 20 µl 5M NaCl (200mM final concentration) and incubating samples at 65°C overnight. RNase A (10 mg/ml) was added to a final concentration of 100 µg/ml and incubated for 1hr at 37°C. Then 10 µl of 0.5 M EDTA (10mM final concentration), 20 µl of 1M Tris-HCl, pH 6.5 (40mM final concentration) and 8 µl of 20 mg/ml Proteinase K (200 µg/ml final concentration) were added to the eluates and incubated for 2 hr at 55°C. Samples were extracted with phenol:chloroform and ethanol precipitated. Pellets were resuspended in 50 µl of H₂O and assayed by quantitative PCR (qPCR). To compare the amount of DNA immunoprecipitated to the total input DNA, 10% of the pre-cleared chromatin was saved as input and was processed with the eluted immunoprecipitates beginning at the crosslink reversal step. Extracted DNA of each sample input was included in the qPCR analysis.

Quantitative PCR (qPCR) was performed using the SYBR green supermix for iQ (Quanta Biosciences) in a CFX96™ cyclor (BioRad), qPCR mixtures contained 2µl of a 1:5 dilution of the immunoprecipitated or a 1:50, 1:100, 1:200 dilution of the input sample and 500nM of each primer in a total volume of 10µl. All qPCR reactions were performed in duplicate and each product was verified by melting curve analysis. The PCR primers used to analyze target fragments were designed by using the Primer3 software and are listed in supplementary table 2. Standard curves for each primer pair were generated with serial dilutions of input DNA to determine PCR efficiency. Immunoprecipitation values were normalized to the amount of input chromatin; using the standard curve equation we obtained the relative amount of each specific DNA fragment in the immunoprecipitate and the relative amount of that fragment in the input DNA, then we calculate the percentage of input immunoprecipitated, the background obtained in non-specific ChIP was subtracted. Finally, fold over negative control

regions values were calculated. All ChIP experiments were performed at least four times.

3D Immunofluorescence

Suspension immunofluorescence and deconvolution of multichannel 3D data was carried out as described by (Landeira and Navarro, 2007). Briefly, 1×10^7 parasites were concentrated by centrifugation and fixed with 4% paraformaldehyde for 2.5 hours at 4 °C. Cells were permeabilized with 2% NP40 (Nonidet® P40 Substitute) for 1 hour at room temperature and blocked 30 minutes at room temperature with blocking solution (100 mM maleic acid, 150 mM NaCl, 0.5% blocking reagent –w/v; Roche-) . Parasites were incubated with primary antibodies: rabbit anti-TbRPB1 affinity purified (1:2000), rabbit anti-TbRPA1 affinity-purified (1:600), mouse anti-TbRPB7 affinity purified polyclonal (1:20), for 1 hour at room temperature, washed with blocking solution and incubated with goat anti-rabbit secondary antibodies (Alexa Fluor® 488 or 594-conjugated antibodies –Invitrogen-) for 1 hour at room temperature. After a wash with PBS 0.1% Tween® 20, 1 µg/ml 4'6'-diamidino-2-phenylindole (DAPI) were added. Stacks (0.1-µm z step) acquisition was performed with a microscope system (Cell R IX81; Olympus), 100× objective, NA 1.40, illumination system (MT20; Olympus), and camera (Orca CCD; Hamamatsu). Deconvolution of 3D images was performed using Huygens Essential software (version 2.9; Scientific Volume Imaging) using an experimentally calculated point-spread function with 0.2-µm TetraSpeck microspheres (Invitrogen). All images displayed in the figures are maximum intensity projections from digitally deconvolved multichannel 3D image datasets. Pseudocoloring and maximum intensity projections were performed using ImageJ software (version 1.44p; National Institutes of Health).

Generation of antibodies against TbRPB1

The N-terminal domain of TbRPB1 was amplified from genomic DNA using oligonucleotides Rpb1Up (5'CCCGGATCCCCGATGGAGTTGCAGAAGGTGAAT) and Rpb1Low (5'GGGG AAGCTTCTTAGTCAAGTACCTGTCTGCACCTTA). The PCR product (656 bp) was inserted into pGEMT vector (Promega) and then into pET28a vector (Novagen) using BamHI and HindIII sites (underlined in oligonucleotides). The resulting plasmid was transferred to *Escherichia coli* KRX cells (Promega) and recombinant protein was obtained after 3 hours of induction at 37 °C with 1 mM isopropylthio-β-D-galactoside (IPTG) and 0.1% rhamnose. Bacteria were resuspended in lysis buffer (0.5M NaCl, 20 mM Na₂HPO₄, 1mM DTT, 1mM EGTA, 1mM PMSF, 100 µg/ml lysozyme, 20 mM imidazole and 8M urea) and lysed by Frech press device. After

centrifugation, supernatant was applied to a Poly-Prep[®] chromatography column (Bio-Rad) containing NI Sepharose Fast Flow[™] 6 (GE Healthcare) equilibrated with 10 volumes of same buffer. Supernatant and sepharose beads were incubated 1 hour at room temperature in gently rotation and then passed through the column until drain, washed with 30 volumes of lysis buffer and eluted with same buffer containing increasing concentration of imidazole (50, 100, 250 and 500 mM). Purified RPB1 fragment was dialyzed in PBS (pH 7.4). For antibodies obtaining, 500 µg of recombinant fragment were mixed with adjuvant and subcutaneously inoculated four times into rabbits with three weeks intervals between doses. Ten days after last inoculation blood was collected. The serum, separated by centrifugation, containing polyclonal antibodies against TbRPB1 was affinity purified with the recombinant protein immobilized with AminoLink[®] Immobilization Kit (Thermo Scientific) following manufacturer's instructions. For affinity purification, 20 ml of filtered serum was used, adding 1X protease inhibitor cocktail (Roche) and 5 mM EDTA. Affinity column was equilibrated with PBS-Tween[®] 20 0.1%, allowing it to drain. Resin was incubated with serum for 1 hour at room temperature (2 ml resin with 20 ml serum) and then put back into the column and let to drain. Affinity column was washed with 90 ml of PBS-Tween[®] 20 0.1% and 40 ml of PBS. Antibodies were eluted with 0.1M glycine pH 2.5 and immediately neutralized with Trizma[®]-base (Sigma-Aldrich) 1M and pH adjusted to 7.5. Antibodies were dialyzed again in PBS and concentrated to 1 mg/ml using Amicon[®] Ultra-15 centrifugal filter devices (Millipore) following manufacture's instructions.

REFERENCES

Berriman, M., Ghedin, E., Hertz-Fowler, C., Blandin, G., Renauld, H., Bartholomeu, D.C., Lennard, N.J., Caler, E., Hamlin, N.E., Haas, B., Bohme, U., Hannick, L., Aslett, M.A., Shallom, J., Marcello, L., Hou, L., Wickstead, B., Alsmark, U.C., Arrowsmith, C., Atkin, R.J., Barron, A.J., Bringaud, F., Brooks, K., Carrington, M., Cherevach, I., Chillingworth, T.J., Churcher, C., Clark, L.N., Corton, C.H., Cronin, A., Davies, R.M., Doggett, J., Djikeng, A., Feldblyum, T., Field, M.C., Fraser, A., Goodhead, I., Hance, Z., Harper, D., Harris, B.R., Hauser, H., Hostetler, J., Ivens, A., Jagels, K., Johnson, D., Johnson, J., Jones, K., Kerhornou, A.X., Koo, H., Larke, N., Landfear, S., Larkin, C., Leech, V., Line, A., Lord, A., Macleod, A., Mooney, P.J., Moule, S., Martin, D.M., Morgan, G.W., Mungall, K., Norbertczak, H., Ormond, D., Pai, G., Peacock, C.S., Peterson, J., Quail, M.A., Rabbinowitsch, E., Rajandream, M.A., Reitter, C., Salzberg, S.L., Sanders, M., Schobel, S., Sharp, S., Simmonds, M., Simpson, A.J., Tallon, L., Turner, C.M., Tait, A., Tivey, A.R., Van Aken, S., Walker, D., Wanless, D., Wang, S., White, B., White, O., Whitehead, S., Woodward, J., Wortman, J., Adams, M.D., Embley, T.M., Gull, K., Ullu, E., Barry, J.D., Fairlamb, A.H., Opperdoes, F., Barrell, B.G., Donelson, J.E., Hall, N., Fraser, C.M., Melville, S.E. and El-Sayed, N.M. (2005) The genome of the African trypanosome *Trypanosoma brucei*. *Science*, **309**, 416-422.

- Clayton, C.E. (2002) Life without transcriptional control? From fly to man and back again. *Embo J*, **21**, 1881-1888.
- Cojocar, M., Jeronimo, C., Forget, D., Bouchard, A., Bergeron, D., Cote, P., Poirier, G.G., Greenblatt, J. and Coulombe, B. (2008) Genomic location of the human RNA polymerase II general machinery: evidence for a role of TFIIF and Rpb7 at both early and late stages of transcription. *Biochem J*, **409**, 139-147.
- Chapman, A.B. and Agabian, N. (1994) Trypanosoma brucei RNA polymerase II is phosphorylated in the absence of carboxyl-terminal domain heptapeptide repeats. *J Biol Chem*, **269**, 4754-4760.
- Das, A. and Bellofatto, V. (2003) RNA polymerase II-dependent transcription in trypanosomes is associated with a SNAP complex-like transcription factor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100**, 80-85.
- Das, A., Zhang, Q., Palenchar, J.B., Chatterjee, B., Cross, G.A. and Bellofatto, V. (2005) Trypanosomal TBP functions with the multisubunit transcription factor tSNAP to direct spliced-leader RNA gene expression. *Mol Cell Biol*, **25**, 7314-7322.
- De Lange, T., Liu, A.Y., Van der Ploeg, L.H., Borst, P., Tromp, M.C. and Van Boom, J.H. (1983) Tandem repetition of the 5' mini-exon of variant surface glycoprotein genes: a multiple promoter for VSG gene transcription? *Cell*, **34**, 891-900.
- Gunzl, A., Bruderer, T., Laufer, G., Schimanski, B., Tu, L.C., Chung, H.M., Lee, P.T. and Lee, M.G. (2003) RNA polymerase I transcribes procyclin genes and variant surface glycoprotein gene expression sites in Trypanosoma brucei. *Eukaryot Cell*, **2**, 542-551.
- Gunzl, A., Ullu, E., Dorner, M., Fragoso, S.P., Hoffmann, K.F., Milner, J.D., Morita, Y., Nguu, E.K., Vanacova, S., Wunsch, S., Dare, A.O., Kwon, H. and Tschudi, C. (1997) Transcription of the Trypanosoma brucei spliced leader RNA gene is dependent only on the presence of upstream regulatory elements. *Mol Biochem Parasitol*, **85**, 67-76.
- Janz, L. and Clayton, C. (1994) The PARP and rRNA promoters of Trypanosoma brucei are composed of dissimilar sequence elements that are functionally interchangeable. *Mol Cell Biol*, **14**, 5804-5811.
- Jasiak, A.J., Hartmann, H., Karakasili, E., Kalocsay, M., Flatley, A., Kremmer, E., Strasser, K., Martin, D.E., Soding, J. and Cramer, P. (2008) Genome-associated RNA polymerase II includes the dissociable Rpb4/7 subcomplex. *J Biol Chem*, **283**, 26423-26427.
- LeBowitz, J.H., Smith, H.Q., Rusche, L. and Beverley, S.M. (1993) Coupling of poly(A) site selection and trans-splicing in Leishmania. *Genes Dev*, **7**, 996-1007.
- Liang, X.H., Haritan, A., Uliel, S. and Michaeli, S. (2003) trans and cis splicing in trypanosomatids: mechanism, factors, and regulation. *Eukaryot Cell*, **2**, 830-840.
- Martinez-Calvillo, S., Vizuet-de-Rueda, J.C., Florencio-Martinez, L.E., Manning-Cela, R.G. and Figueroa-Angulo, E.E. (2010) Gene expression in trypanosomatid parasites. *J Biomed Biotechnol*, **2010**, 525241.
- Martinez-Calvillo, S., Yan, S., Nguyen, D., Fox, M., Stuart, K. and Myler, P.J. (2003) Transcription of Leishmania major Friedlin chromosome 1 initiates in both directions within a single region. *Mol Cell*, **11**, 1291-1299.
- Matthews, K.R., Tschudi, C. and Ullu, E. (1994) A common pyrimidine-rich motif governs trans-splicing and polyadenylation of tubulin polycistronic pre-mRNA in trypanosomes. *Genes Dev*, **8**, 491-501.
- Navarro, M. and Gull, K. (2001) A pol I transcriptional body associated with VSG mono-allelic expression in Trypanosoma brucei. *Nature*, **414**, 759-763.
- Penate, X., Lopez-Farfan, D., Landeira, D., Wentland, A., Vidal, I. and Navarro, M. (2009) RNA pol II subunit RPB7 is required for RNA pol I-mediated transcription in Trypanosoma brucei. *EMBO Rep*, **10**, 252-257.

Anexo 4.2

- Perry, K.L., Watkins, K.P. and Agabian, N. (1987) Trypanosome mRNAs have unusual "cap 4" structures acquired by addition of a spliced leader. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **84**, 8190-8194.
- Ruan, J.P., Arhin, G.K., Ullu, E. and Tschudi, C. (2004) Functional characterization of a *Trypanosoma brucei* TATA-binding protein-related factor points to a universal regulator of transcription in trypanosomes. *Mol Cell Biol*, **24**, 9610-9618.
- Rudenko, G., Bishop, D., Gottesdiener, K. and Van der Ploeg, L.H. (1989) Alpha-amanitin resistant transcription of protein coding genes in insect and bloodstream form *Trypanosoma brucei*. *Embo J*, **8**, 4259-4263.
- Schimanski, B., Nguyen, T.N. and Gunzl, A. (2005) Characterization of a multisubunit transcription factor complex essential for spliced-leader RNA gene transcription in *Trypanosoma brucei*. *Mol Cell Biol*, **25**, 7303-7313.
- Siegel, T.N., Hekstra, D.R., Kemp, L.E., Figueiredo, L.M., Lowell, J.E., Fenyo, D., Wang, X., Dewell, S. and Cross, G.A. (2009) Four histone variants mark the boundaries of polycistronic transcription units in *Trypanosoma brucei*. *Genes Dev*, **23**, 1063-1076.
- Vanhamme, L., Pays, A., Tebabi, P., Alexandre, S. and Pays, E. (1995) Specific binding of proteins to the noncoding strand of a crucial element of the variant surface glycoprotein, procyclin, and ribosomal promoters of *trypanosoma brucei*. *Mol Cell Biol*, **15**, 5598-5606.
- Vanhamme, L., Poelvoorde, P., Pays, A., Tebabi, P., Van Xong, H. and Pays, E. (2000) Differential RNA elongation controls the variant surface glycoprotein gene expression sites of *Trypanosoma brucei*. *Mol Microbiol*, **36**, 328-340.
- Verma-Gaur, J., Rao, S.N., Taya, T. and Sadhale, P. (2008) Genomewide recruitment analysis of Rpb4, a subunit of polymerase II in *Saccharomyces cerevisiae*, reveals its involvement in transcription elongation. *Eukaryot Cell*, **7**, 1009-1018.

4.3. Anexo resultados 3

SUMOilación de proteínas asociadas a la cromatina del sitio de expresión de la VSG por TbSIZ1 en *Trypanosoma brucei*.

En el hospedador mamífero los tripanosomas sanguíneos escapan de la respuesta inmunitaria cambiando periódicamente su principal antígeno de superficie, la glicoproteína variable de superficie (VSG). El gen *VSG* se transcribe por la RNAPI en lugar de la RNAPII. En un estudio anterior publicamos que la transcripción mediada por la RNAPI en tripanosomas requiere de la TbRPB7, una subunidad disociable específica del complejo RNAPII (Penate et al., 2009). Para investigar el papel que desempeña TbRPB7 en la transcripción de la RNAPI, se realizó un ensayo de doble híbrido en levadura (Y2H) usando TbRPB7 como cebo. Esta aproximación detectó varias proteínas que potencialmente interactúan con TbRPB7, incluyendo una proteína con un dominio conservado (MIZ/SP-RING) característico de las SUMO E3 ligasas, llamada TbSIZ1 en este trabajo. La depleción de TbSIZ1 reduce la señal nuclear de proteínas SUMOiladas detectadas por inmunofluorescencia (IF). Análisis por IF de doble marcaje sugiere que las proteínas SUMOiladas están enriquecidas en un área nuclear que colocaliza parcialmente con la posición del *locus* del sitio de expresión de la *VSG* (*VSG-ES*) activo. A continuación, determinamos la ocupación de proteínas SUMOiladas en el *VSG-ES* mediante inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP) usando un anticuerpo frente a SUMO. Se detectaron proteínas SUMOiladas asociadas a la cromatina a lo largo de toda la unidad transcripcional del gen *VSG* activo pero no en los *VSG-ES*s inactivos, ni en otros *loci* transcritos por la RNAPI como el gen *18S* del DNA ribosomal (rDNA), lo que sugiere que la SUMOilación de la cromatina es una característica específica del *VSG-ES* activo. La depleción de TbSIZ1 redujo la ocupación de proteínas SUMOiladas detectadas a lo largo del *VSG-ES* activo. Asimismo, la ocupación de la RNAPI y su actividad transcripcional también disminuyeron. Estos resultados sugieren que en *T. brucei* la SUMOilación de cromatina está involucrada en la regulación del sitio de expresión de la *VSG*, y que la TbSIZ es necesaria para la actividad transcripcional de la RNAPI.

SUMOylation of Chromatin-Associated Proteins at the VSG Expression Site by TbSIZ1 in *Trypanosoma brucei*

Instituto de Parasitología y Biomedicina "López-Neyra"
Consejo Superior de Investigaciones Científicas
(Spanish National Research Council)
Avda. del Conocimiento s/n
18100 GRANADA
SPAIN

ABSTRACT.

In the mammalian host, bloodstream trypanosomes elude the immune response by periodically changing their main surface antigen, the Variant Surface Glycoprotein (VSG). The VSG gene is transcribed by RNA polymerase I (RNAPI) instead of RNAPII. We previously reported that transcription mediated by RNAPI in trypanosomes requires TbRPB7, a dissociable subunit of the RNAPI I complex. To investigate the role of TbRPB7 in RNAPI transcription, a two-hybrid screen using TbRPB7 as bait was performed. This approach detected several putative interacting proteins, including a protein with a conserved SUMO E3 ligase domain (MIZ/SP-RING), named TbSIZ1. Depletion of TbSIZ1 reduced the nuclear signal of SUMO-conjugated proteins analyzed by immunofluorescence (IF) using an anti-SUMO antibody. Double IF analysis suggested that SUMOylated proteins associated with the active VSG-ES chromatin in the nucleus. Next, we determined the occupancy of SUMOylated proteins within VSG-ES chromatin by chromatin immunoprecipitation (ChIP) using an anti-SUMO antibody. SUMOylated proteins were detected along the active VSG transcription unit but not in silent VSG-ESs. SUMOylation of chromatin-associated proteins upstream of active VSG-ES promoter was highly enriched in contrast to control loci as the ribosomal DNA, suggesting this is a distinct feature of the active VSG-ES. Depletion of TbSIZ1 reduced the level of SUMOylation detected in the chromatin-associated proteins at the active VSG-ES. Furthermore, RNAPI occupancy and transcriptional activity were decreased, suggesting that SUMOylation is involved in the positive regulation of RNAPI transcription.

INTRODUCTION

Trypanosoma brucei presents a sophisticated mechanism of antigenic variation of the Variant Surface Glycoprotein (VSG) that allows eluding the host immune antibody response, ensuring a persistent infection (Donelson, 2003; McCulloch, 2004; Pays et al., 2004). Antigenic variation is achieved by mutually exclusive expression of only one out of approximately 1000 VSG genes and pseudogenes (Berriman et al., 2005). The expressed VSG gene is located at the end of a telomeric Expression Site (ES) locus. There are about 15 different VSG expression sites (VSG-ESs) which share highly homologous sequences at the promoter region. The mechanisms that ensure monoallelic expression remain unknown.

In this parasite, the two main surface protein genes characteristic of the bloodstream and insect stages, VSG and *procyclin*, are transcribed by RNA polymerase I (RNAPI) (Kooter and Borst, 1984; Palenchar and Bellofatto, 2006). We described that TbRBP7, a dissociable subunit of the RNAPII complex, is also required for RNAPI complex to transcribe ribosomal DNA (rDNA) and VSG genes (Pena et al., 2009). Previous studies in yeast and human cells have demonstrated that RPB7 interacts with RNA processing factors (Mitsuzawa et al., 2003), and several transcriptional factors (Petermann et al., 1998; Shen et al., 1999; Zhou and Lee, 2001). Thus, we hypothesized that the interaction of TbRBP7 with the trypanosome RNAPI complex may facilitate the recruitment of factors to the VSG-ES promoter to participate in the complex regulation of the monoallelic expression. Thus, we searched for TbRBP7-interacting proteins, using a yeast two-hybrid (Y2H) screening, and identified several proteins, including a protein with a conserved SUMO E3 ligase domain (MIZ/SP-RING).

SUMO (Small ubiquitin-like modifier) is a reversible post-transcriptional protein modification involved in many processes of higher eukaryotes since was discovered 12 years ago. The first SUMO gene was identified in *S. cerevisiae* (*SMT3*); the peptide was found covalently attached to the Ran GTPase-activating protein, modifying the localization of this protein in the cell (Mahajan et al., 1997; Matunis et al., 1996).

SUMO proteins are ~10KDa and their 3D structure is similar to ubiquitin, but they share only 20% sequence identity. Invertebrates such as yeast, *T. brucei*, *C. elegans*, and *D. melanogaster* contain a single SUMO gene, whereas plants and vertebrates have several SUMO genes (Novatchkova et al., 2004; Wang et al., 2008; Liao et al., 2010). In humans there are four SUMO genes with different functions and localizations (Owerbach et al., 2005; Zhang et al., 2008).

SUMOylation, like ubiquitylation, involves a pathway that requires three enzymatic steps. First, the SUMO protein is activated at its C terminus by the E1 activating

Anexo 4.3

enzyme, the heterodimer AOS1-UBA2 in yeast (Johnson et al., 1997). The activated SUMO is then transferred to the E2 conjugating enzyme UBC9, forming a thioester bond between Cys residue of UBC9 and the C-terminal of SUMO (Johnson and Blobel, 1997; Saitoh et al., 1998). Finally, SUMO is transferred to the substrate forming an isopeptide bond. This last step is mediated by SUMO E3 ligases, which are determinants of the substrate specificity and catalyse the transfer of SUMO from UBC9 (Johnson and Gupta, 2001; Takahashi et al., 2001a; Takahashi et al., 2001b; Tozluoglu et al., 2010). Bioinformatic analysis in trypanosomatids has confirmed the existence of all essential genes of the SUMO conjugation/deconjugation pathway (Bayona et al., 2011).

Three protein families have been identified to date as SUMO E3 ligases: the main group is characterized by a conserved SP-RING motif, which is essential for their function; they can bind their targets directly or non-covalently via SUMO interacting motifs (SIMs). This group includes the PIAS family, named based on the founding member, PIAS3 (Protein inhibitor of activated STAT), which is a repressor of the activity of the STAT3 transcription factor (Chung et al., 1997). Three PIAS members have been found in budding yeast: Siz1, Siz2 and Mms21 (Johnson and Gupta, 2001; Takahashi et al., 2001a; Zhao and Blobel, 2005) and five in mammals (PIAS1-3 and the two splice variants) (Kahyo et al., 2001; Nakagawa and Yokosawa, 2002; Nishida and Yasuda, 2002; Sachdev et al., 2001; Schmidt and Muller, 2002).

The second type of SUMO E3 ligases is represented by the nuclear import factor RanBP2, which mediates nucleo-cytoplasmic transport (Kirsh et al., 2002). The third group was discovered with the polycomb protein Pc2, which forms multimeric complexes (PcG bodies) that are involved in gene silencing (Kagey et al., 2003).

In most of cases SUMO ligation involves the recognition of the consensus sequence Ψ Kx(D/E) in the target protein, where Ψ is an hydrophobic amino acid, K is the acceptor lysine residue, x is any amino acid and D/E is an acidic residue (Sampson et al., 2001).

In *T. brucei* only a SUMO orthologue was recently identified (Liao et al. 2010) In this study, knockdown of TbSUMO in procyclic forms showed that the SUMO system is essential for cell cycle progression in the parasite. Studies in bloodstream forms also have showed TbSUMO is essential for cell viability (Obado et al. 2010). Recently, the first proteomic analysis of SUMO substrates in *Trypanosoma cruzi* was reported, whereby 236 proteins involved in several cellular processes were identified, including a metacaspase validated as SUMO substrate (Bayona et al., 2011). These data suggest that SUMOylation is a conserved process in trypanosomatids, as in most organisms,

however, the enzymes, the substrates and the cellular functions where it is involved are mostly unknown in this protozoan parasite.

SUMO modification regulates protein activity in diverse ways. The most common group of SUMO substrates are transcription factors, whose transcriptional activity can be modulated positively or negatively as a result of SUMOylation (Lyst and Stancheva, 2007). SUMO can modulate the ability of proteins to interact with their partners, alter their patterns of sub-cellular localization and control their stability. It is obvious that SUMO influences many different biological processes however recent data suggest that it is especially important in the regulation of transcription.

SUMOylation has been generally associated with transcriptional repression (Garcia-Dominguez and Reyes, 2009; Nathan et al., 2006; Shio and Eisenman, 2003); however, in some cases the SUMOylation of transcription factors is related to increased or activated transcription. SUMO modification of the heat shock transcription factors (HSF1 and HSF2) shows a positive effect and the mutation of the acceptor lysine residue reduced its transcriptional activity (Goodson et al., 2001). In another study the SUMO conjugation of p53 upon UV exposition activated its transcriptional activity (Gostissa et al., 1999). Recently it was reported in yeast that SUMOylated proteins are present at all constitutively transcribed genes and during activation of inducible genes, but not at repressed genes (Rosonina et al 2010).

PIAS proteins, which play a role as E3 ligases, were initially described as negative regulators of transcription, however, emerging evidence implicate PIAS as co-activators (Alm-Kristiansen et al., 2011; Schmidt and Muller, 2003). One of their mechanisms consists in re-localization of transcriptional regulators to different subnuclear compartments (Lee et al., 2006; Sharrocks, 2006).

In this work, we determined the occupancy of SUMOylated proteins within RNAI-transcribed chromatin. SUMOylation of chromatin-associated proteins upstream of active VSG-ES promoter is highly enriched in a TbSIZ1 depending manner. SUMOylated chromatin seems to be unique feature of the active VSG-ES since was detected along the active VSG-ES transcription unit but not in silent VSG-ESs, nor in rDNA, suggesting SUMOylation is involved in the regulation of the VSG-ES transcription.

RESULTS

Identification of a SUMO E3 ligase as TbRPB7- interacting protein by Y2H.

We hypothesized that TbRPB7 may function in RNAPII transcription by recruiting an essential factor to the VSG-ES chromatin, thus we searched for TbRPB7-interacting proteins using yeast two-hybrid (Y2H) screening (Hybrigenics). This approach detected several putative interacting proteins (Supp. Table 1); among them we identified a hypothetical protein with a conserved domain (MIZ/SP-RING) characteristic of SUMO E3 ligases (Melchior et al., 2003), we named TbSIZ1. Two independent clones were identified containing fragments not overlapping with the SP-RING domain of TbSIZ1.

Sequence alignment of SP-RING domains of previously characterized SUMO E3 ligases, including yeast SIZ1, SIZ2 and mammalian PIAS, with TbSIZ1 revealed a significant conservation (Figure 1). While, the SUMOylation pathway presents a single E2 conjugating enzyme, usually more than one SUMO E3 ligase is involved in the transfer of SUMO to different targets (Girdwood et al., 2004). In the *T. brucei* genome, we have identified at least 4 potential SUMO ligases containing a conserved SP-RING domain (Supp. Figure 1).

The TbSIZ1 ORF codifies a protein of 661 amino acids with a predicted size of 72KDa. We analyzed the expression of this protein in bloodstream form (BF) and procyclic form (PF) trypomastotes by western blot analysis using a monoclonal anti-TbSIZ1 antibody that we developed against a recombinant fragment including the amino-terminal of TbSIZ1 (see Materials). Western blot analysis showed that TbSIZ1 is developmentally regulated, displaying higher expression in the infective bloodstream form (Figure 2A). In spite of we were unable to confirm TbRPB7 and TbSIZ1 interaction by co-IP experiments, we decided to investigate the role of TbSIZ1 and the SUMOylation of chromatin in RNAPII transcription and VSG-ES regulation.

TbSIZ1 and SUMO-conjugated proteins are associated in the nucleus with the active VSG-ES.

To carry out this analysis we used an antibody raised against *T. cruzi* SUMO (Bayona et al., 2011; Obado et al., 2011). *T. cruzi* and *T. brucei* SUMO proteins are highly conserved (74% sequence identity, 84% similarity) (Supp. Figure 2). Western blot analysis of *T. brucei* whole-cell extracts detected multiple SUMO conjugated proteins, including some of proteins showing differential expression pattern between BF and PF life cycle stages of the parasite (Figure 2B).

We next analyzed the localization of SUMOylated proteins and TbSIZ1 in trypanosome cells by immunofluorescence (Figure 2C). SUMO modified proteins localized mainly in the nucleus, excluding the nucleolus, in a punctuated pattern with one or two more intense foci. In other eukaryotes, SUMO ligases localized in the nucleus (Alm-Kristiansen et al., 2011 ; Xhemalce et al., 2004), similar to TbSIZ1 in trypanosome nuclei (Fig 2C).

We performed indirect 3D-immunofluorescence (3D-IF) analysis utilizing BF cell lines containing a chromosome GFP-Lac tag, inserted in either the active VSG-ES or the rDNA locus, previously described (Landeira and Navarro, 2007). Double 3D-IF analysis using anti-SUMO and anti-GFP antibodies showed an intense area in the nucleus where SUMOylated proteins were associated with the GFP-tagged active VSG-ES throughout the cell cycle (62.5-90.5% of colocalization SUMO/active VSG-ES) (Figure 3A). Nuclear localization of TbSIZ1, however, showed an association with the active VSG-ES mainly in G1 cells (Figure 3B). Conversely, nuclear position analysis of the rDNA locus showed a lack of significant colocalization with either SUMOylated proteins or SUMO ligase TbSIZ1. (Figure 3C). To investigate a possible association between RNAPI and SUMOylated proteins in the nucleus, 3D-IF analysis was performed in a cell line expressing a GFP-tagged TbRPB5z, a subunit specific of RNAPI in trypanosomes. As observed with the active VSG-ES, the RNAPI-containing extranucleolar body ESB, colocalized with an intense focus in the nucleus containing SUMOylated proteins (Figure 3D).

SUMOylation of chromatin-associated proteins is a distinct feature of the active VSG-ES

Nuclear localization analysis suggested that TbSIZ1 and SUMOylated proteins associate with the active VSG-ES chromatin in the bloodstream form (Figure 3). Thus, we decided to determine the occupancy of chromatin-associated SUMOylated proteins at the VSG-ES by chromatin immunoprecipitation (ChIP) and quantitative PCR (qPCR) using the anti-SUMO antibody.

To overcome the problem of highly homologous sequences among different VSG-ESs, ChIP experiments were performed using cell lines containing the *Luciferase* reporter gene inserted 405 bp downstream of the promoter, in a active (SALR) or inactive (SILR) transcriptional state (Penate et al., 2009 and Materials). In addition, as a control the *Renilla*-luciferase reporter gene is inserted within the tubulin locus in both cell lines (Figure 4A). We first analyzed these cell lines by ChIP using anti-TbRPA1 (largest subunit of RNAPI) confirming that the active VSG-ES is highly enriched of the polymerase in the active transcriptional state in contrast to the inactive VSG-ES

Anexo 4.3

sequences (Figure 4B). TbRPA1 ChIP values at unique sequences as *Luciferase gene*, the pseudo-VSG and the telomeric VSG221 showed that the active VSG-ES chromatin is occupied by the RNAPI, although a negative gradient towards the telomere was detected. Next we addressed the degree of SUMOylated proteins associated to the VSG-ES chromatin. Surprisingly, we detected SUMOylated proteins enriched at the entire active VSG-ES transcription unit, from the promoter to the telomeric VSG gene (Figure 4C). SUMOylated proteins were immunoprecipitated 4.4-fold more efficiently at the active VSG-ES promoter than at the inactive ($p < 0.05$). Similarly, the active VSG221 was significantly immunoprecipitated while other telomeric VSGs as VO2, or VSGs with basic copies as VSG121 and JS1, were below background level (Figure 4C). Importantly, significant SUMOylation levels were not detected at other RNAPI-transcribed loci (rDNA or *procyclin*), nor at other RNAPII or RNAPIII loci analyzed as well.

RNAPI promoters in eukaryotes have DNA regulator sequences in the proximity of the core promoter, which play important roles in their activity (Dammann et al., 1995). We investigated the presence of SUMOylated proteins in the chromatin upstream of the VSG-ES promoters by mapping the region with several primers designed over VSG221-ES sequences (Figure 5A). ChIP-qPCR analysis revealed a dramatic enrichment of SUMOylated proteins upstream of the promoter region, which was notably higher in the fragments 6 and 5, close to the 50pb repeats and moderate in the other fragments (4-1). As a negative control we compared with fragment 9 upstream of the 50pb repeat, which showed no enrichment (Figure 5B). While the sequences just upstream of the VSG-ES promoter are known to be highly conserved among all the VSG-ESs, we noticed that the amount of input amplified by qPCR from each fragment was different. Thus, we carried out relative quantification of the upstream sequences using genomic DNA as a standard. Relative quantification revealed different copy numbers of each PCR fragment analyzed. The PCR of fragment 6 only amplified an additional ES promoter beside the active VSG221-ES, while fragments 4, 3 and 1 were highly conserved in most VSG-ESs (Figure 5C). To validate this quantification method we also performed quantification of other genes known to be single copy genes as myosin and VSG genes. In the case of VSG genes, it is well known that some telomeric VSG genes have also basic copies in the genome (for instance VSG121 and VSGJS1), while others as VSGVO2 are telomeric single copy (Figure 5C).

Therefore, the ChIP values upstream of the promoter using anti-SUMO antibodies are in fact underestimated, except for the low-copy fragments 6 and 5. These results suggest that the chromatin upstream of the active VSG-ES promoter is highly enriched for SUMOylated proteins. To confirm this hypothesis we cloned and sequenced PCR

fragments 4, 5 and 6 from ChIPed and genomic DNA as control. Sequences obtained from genomic DNA yield 3-4 different sequences, while the anti-SUMO ChIPed fragments were high homologues to the VSG221-ES (Supp. Table 3). Similar analysis was performed with fragments 1 and 2; the chromatogram of sequences from ChIPed and genomic DNA shows a unique sequence from the ChIPed DNA contrary to several sequences with overlapping peaks in the genomic DNA (data not shown).

The multicopy nature of the VSG-ES promoter sequences would also explain the low values obtained when analysing RNAPII occupancy (Figure 5B). The VSG-ES transcription start site and promoter are included in the fragment 1, however, the TbRPA1 ChIP values are low due to the data are normalized by the number of copies, while only one promoter is transcribed as shown by the ChIP values of the unique sequences (*Luciferase*) inserted downstream (Figure 4).

TbSIZ1 is required for the SUMOylation of chromatin-associated proteins detected in the active VSG-ES.

SUMO ligases are important for the efficient transfer of SUMO group from the conjugating enzyme E2 to specific target proteins (Tozluoglu et al., 2010). To characterize the function of TbSIZ1 we generated a cell line to perform inducible RNA interference (RNAi). Western blot analysis confirmed the depletion in the level of protein (Figure 6A) while did not significantly affect cell growth or cell cycle progression (Figures 6 B,C). However, TbSIZ1 RNAi reduced 50% of the nuclear signal of SUMOylated proteins, without significant reduction in the overall SUMOylation pattern observed by western blot analysis (Figure 6D).

To investigate the function of TbSIZ1 on VSG-ES SUMOylation *in vivo*, we performed anti-SUMO ChIP experiments upon TbSIZ1 depletion. Reduced levels of SUMO were detected at all positions upstream and downstream of the VSG-ES promoter, compared with the original cell line. (Figure 7A). This data suggest that the SUMO E3 ligase TbSIZ1 is responsible of the chromatin SUMOylation detected in the active VSG-ES.

Next, we investigate whether the SUMOylation of chromatin by TbSIZ1 takes place *in situ* at the active VSG-ES promoter. To do so, we performed ChIP analysis using anti-TbSIZ1 antibodies, however, no significant levels of TbSIZ1 were detected in any loci studied. It is possible that pre-SUMOylated proteins are assembled at the VSG promoter, or that TbSIZ1 associates transiently to catalyze the transfer of the SUMO group and thus, TbSIZ1 is not detected. However we cannot exclude the possibility that the antibodies are not suitable for ChIP experiments and the SUMO E3 ligase TbSIZ1 is present, but it has not been detected.

RNAPI occupancy and transcription of the active VSG-ES are reduced upon TbSIZ1 depletion.

The detection of SUMOylated proteins associated specifically to the active VSG-ES chromatin, contrary to silenced VSG promoters, suggests a positive role in VSG transcription driven by RNAPI. Thus, we analyzed the effect of reduced SUMOylation upon TbSIZ1 RNAi on RNAPI occupancy. We detected lower levels of RNAPI recruited to the active VSG-ES (Figure 7B). However, we also detected a significant reduction of RNAPI in the 18S rDNA gene (Figure 7B).

To determine whether reduced levels of RNAPI affect the transcription level we performed RT-qPCR analysis in cells upon TbSIZ1 depletion. We detected reduced level of the *Luciferase* reporter gene and VSG221 mRNA, without significant effect in RNAPII-transcribed *Renilla*-luciferase reporter gene or myosin expression (Figure 7C). Likewise, RNAPI transcription of the 18S rDNA was also compromised, in spite of the lack of chromatin SUMOylation in this locus, suggesting that TbSIZ1 dependent SUMOylation is important for RNAPI activity.

The function of TbSIZ1 on RNAPI occupancy and transcription of the active VSG-ES prompted us to investigate a possible effect in antigenic switching. However, the active VSG-ES switching-off and the silent VSGs switching-on frequency do not appear to increase upon TbSIZ RNAi (data not shown).

These results suggest that SUMOylation of chromatin-associated proteins at the VSG-ES is dependent of TbSIZ1. In addition, TbSIZ1 is required for full activity of the RNAPI at both the rDNA and VSG-ES *loci*. However, the detection of SUMOylated chromatin exclusively at the VSG-ES suggests SUMOylation is important for efficient recruitment of VSG-ES specific transcription factors.

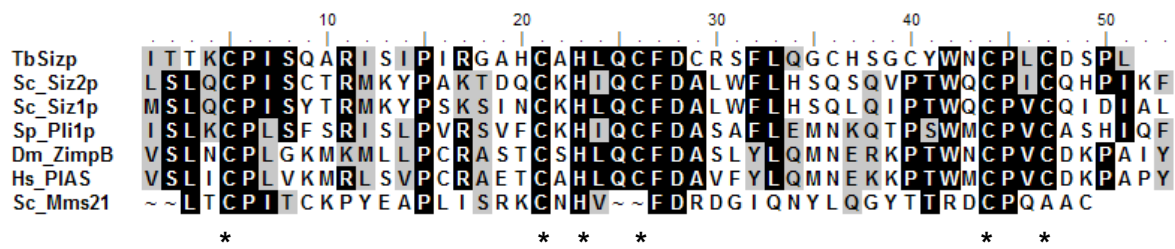


Figure 1. TbSIZ1 contains a conserved SP-RING domain of SUMO E3 ligases. Sequence alignment of SP-RING domains of *T. brucei* SIZ1 and *S. pombe* Plip1, *S. cerevisiae* Siz1, Siz2, *D. melanogaster* Zimp-B, *Homo sapiens* hPIAS, *S. cerevisiae* Mms21. (Accession numbers Tb09.211.2400, CAA 22599.1, NP_014799, NP_010697, AAD29288, Q8N2W9, AAA20471.1 respectively). Identical residues shaded in black and similar residues in grey. Asterisks indicate the positions of the residues forming the C2HC3 conserved SP-RING domain. Alignments were performed with BioEdit Sequence Alignment Editor and ClustalW.

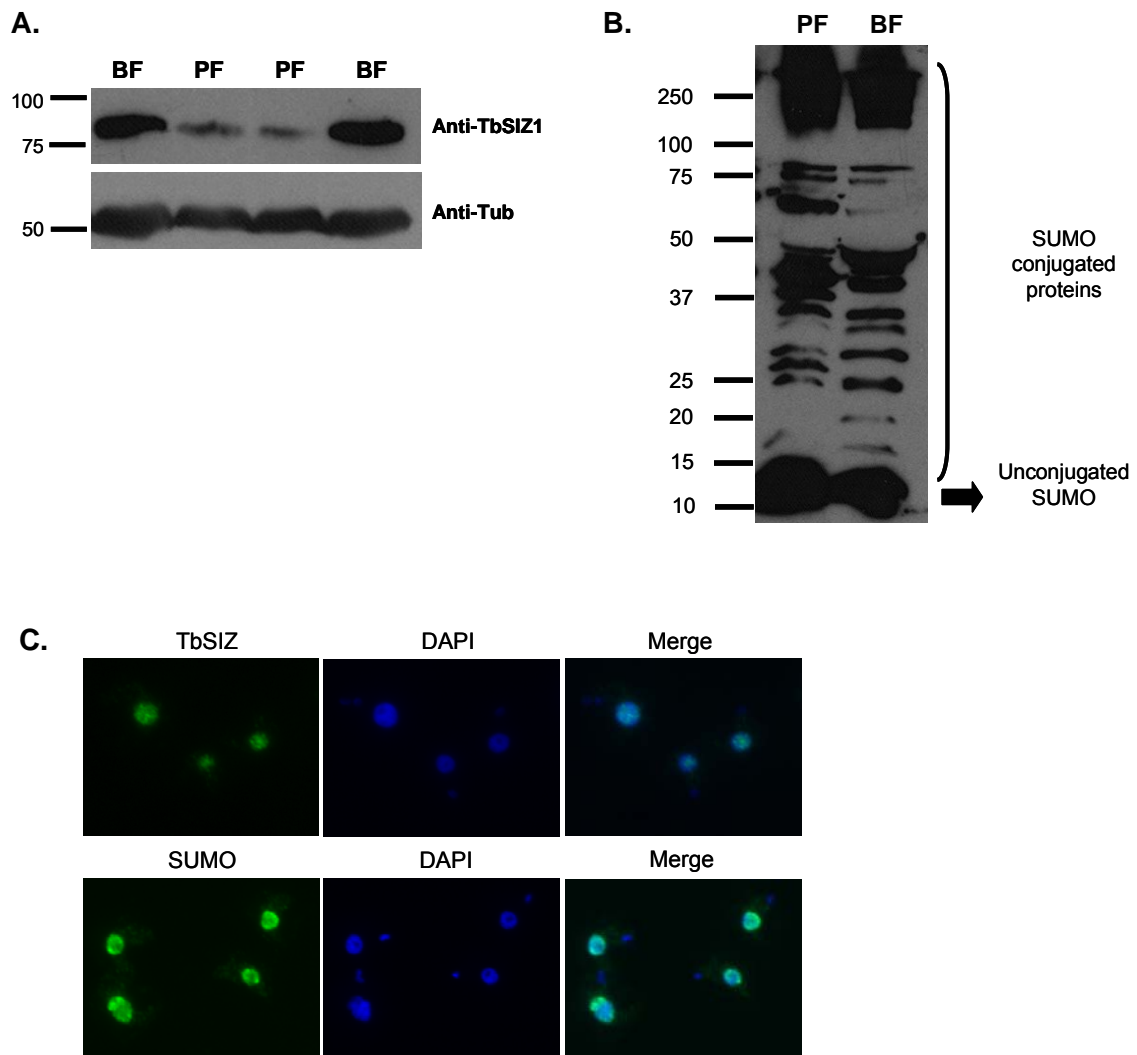


Figure 2. (A) TbSIZ1 is differentially expressed in two developmental stages of *T. brucei*; bloodstream form (BF) and procyclic form (PF). Western blot analysis with a monoclonal antibody generated against TbSIZ1. Anti-tubulin was used as loading control (Anti-Tub). **(B) Differential expression pattern of SUMOylated proteins in two forms of *T. brucei*.** Western blot analysis of SUMOylated proteins using a rabbit anti-SUMO polyclonal antibody. Whole cell extracts (1.5×10^7 parasites) of procyclic (PF) and bloodstream (BF) forms. **(C) The SUMO ligase TbSIZ1 and SUMO conjugated proteins are localized in the nucleus.** Immunofluorescence carried out with the antibodies described above. Upper panel: TbSIZ1 is localized in the nucleus and diffusely distributed (green). Lower panel: SUMOylated proteins are detected mainly in the nucleus but not in the nucleolus and form some more intense foci (green). DNA in the nucleus and the kinetoplast was stained with DAPI (blue), the nucleolus lacks of DAPI staining. Merged images are visualized in last panels.

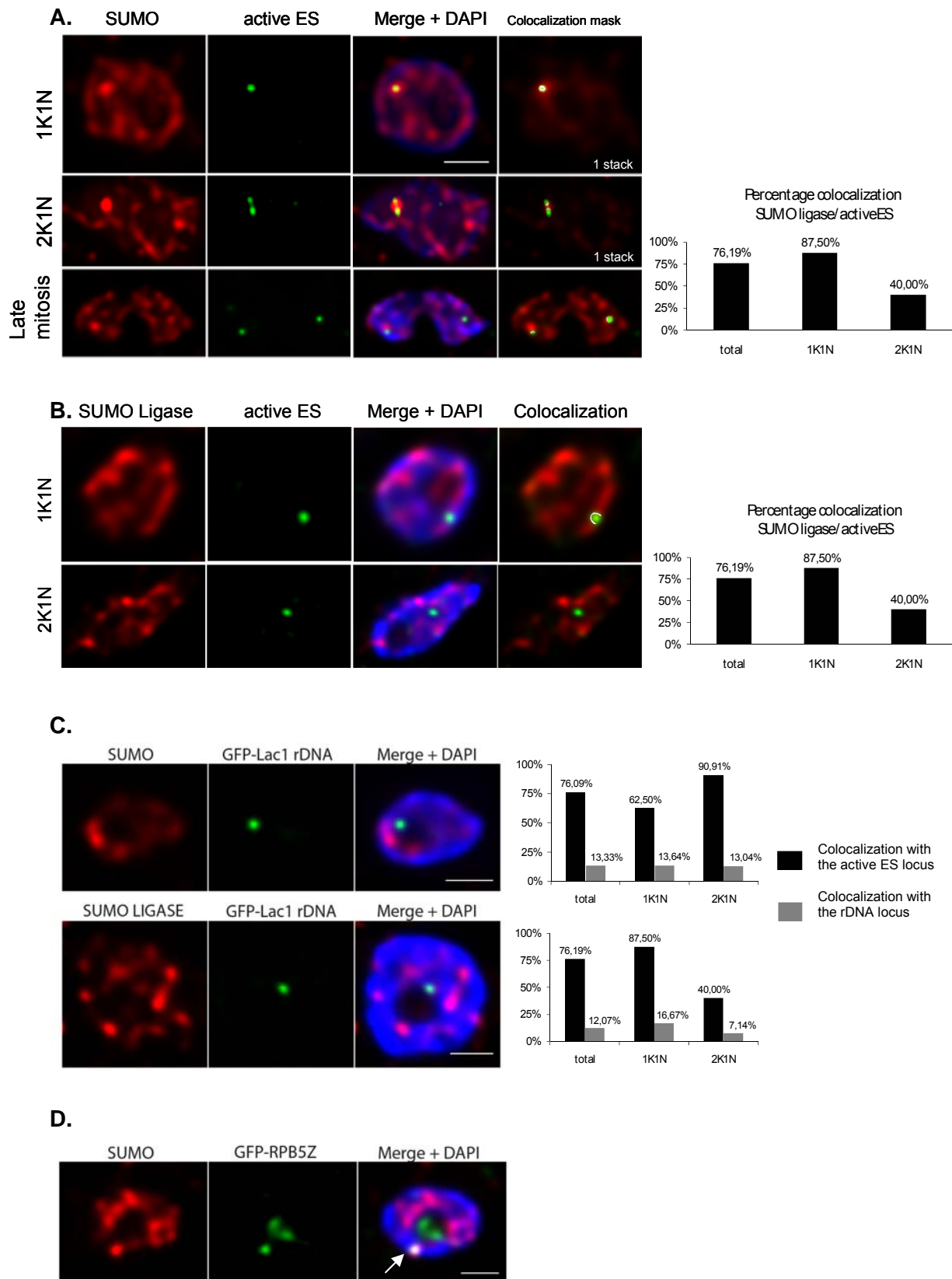


Figure 3. (A) SUMOylated proteins focus associates with active VSG expression site (active ES) during the cell cycle. Double indirect 3D-immunofluorescence (3D-IF) was performed in a cell line where the active ES was GFP-Lac1 tagged, as described by Navarro and Gull, 2001. SUMO was detected with anti-SUMO polyclonal antibody (red), the active ES GFP-Lac1

tagged with an anti-GFP monoclonal antibody (green) and DNA with DAPI staining (blue). Maximum intensity projections of deconvolved slices containing the GFP dot signal are shown. A colocalization mask (white) was calculated for each non-equalized 8-byte slice and merged with both anti-GFP (green) and anti-SUMO (red) labelling, with a ratio setting value of 80%. Maximum intensity projections of one two-channel 3D representative stack are shown. The histogram shows the percentages of colocalization of the main SUMO focus with the active ES dot, calculated from the 3D/colocalization mask analysis of 46 cells. **(B) SUMO ligase TbSIZ1 partially colocalizes with the active ES mainly in G1 cells.** The SUMO ligase was detected with anti-TbSIZ1 monoclonal antibody (red) and the active ES GFP-tagged with an anti-GFP monoclonal antibody (green). The histogram shows the percentages of colocalization of SUMO ligase signal with the active ES dot in 21 cells. **(C) SUMOylated proteins and SUMO ligase TbSIZ1 do not colocalize significantly with rDNA locus (RNAPI).** As control, 3D-IF was also performed in a cell line where the rDNA locus was GFP-tagged. After colocalization analysis of 45 and 58 cells, neither SUMO nor SUMO ligase, respectively, were found to be associated with the rDNA GFP-tagged. Data quantification is shown in the histograms. **(D) SUMO focus colocalizes with RNAPI in the VSG Expression Site Body (ESB).** A cell line that expresses the RNAPI-specific subunit, RPB5z tagged with the GFP (green) was analysed by double IF with anti-SUMO antibody (red). As found with the active ES, the ESB colocalizes with the more intense SUMO focus in the cell. Scale bar, 1 μ m. N: nucleus, K: kinetoplast. Cell cycle phases G1 (1K1N), G2 (2K1N).

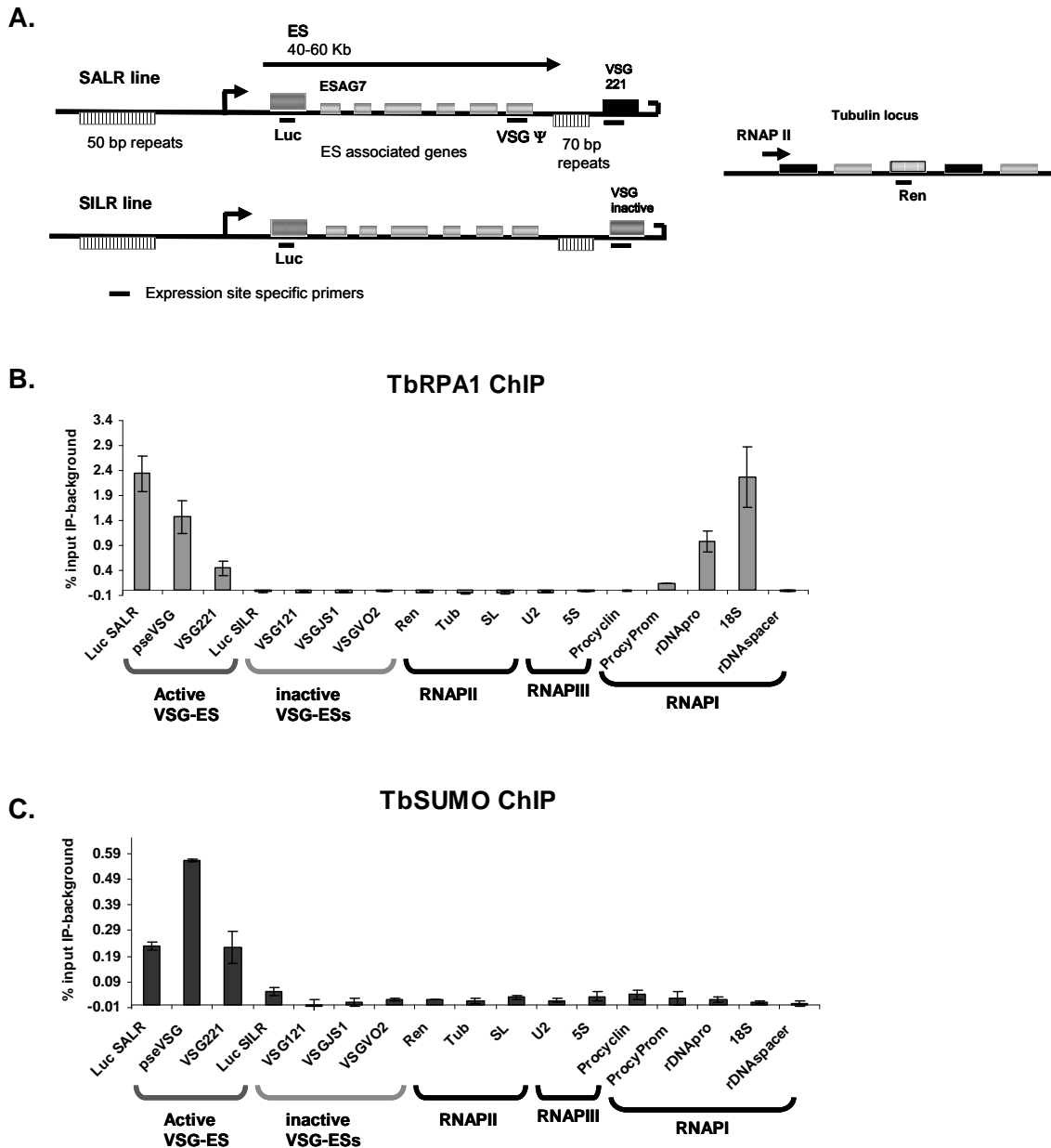


Figure 4. SUMOylation of chromatin-associated proteins occurs in the active VSG-ES. (A) Schema of tagged cell lines used in ChIP experiments. SALR line: *Luciferase* reporter gene (Luc) inserted downstream of the active VSG221-ES promoter and SILR: *Luciferase* reporter gene inserted downstream of an inactive VSG-ES. *Renilla*-luciferase reporter gene (Ren) was inserted in the *tubulin* locus in both cell lines, as RNAPII control. Amplified fragments by qPCR using ChIPed DNA as template are indicated (primers are listed in the supplemental table 2). **(B)** ChIP of TbrPA1 shows the occupancy of RNAPI in this cell lines. Positive control 18S rDNA gene and negative controls RNAPII and RNAPIII transcribed genes. **(C)** ChIP of SUMOylated proteins using anti-SUMO antibody shows a significant enrichment at the active promoter (Luc SALR) and active VSG221. SUMO levels between active (Luc SALR) and inactive state (Luc SILR) are significantly different ($p < 0.05$). SUMOylation was not significant at any other loci analysed. Data are represented as percentage of input IP after background subtraction (unspecific antiserum ChIP). The results show the average from four independent experiments with standard error (SE).

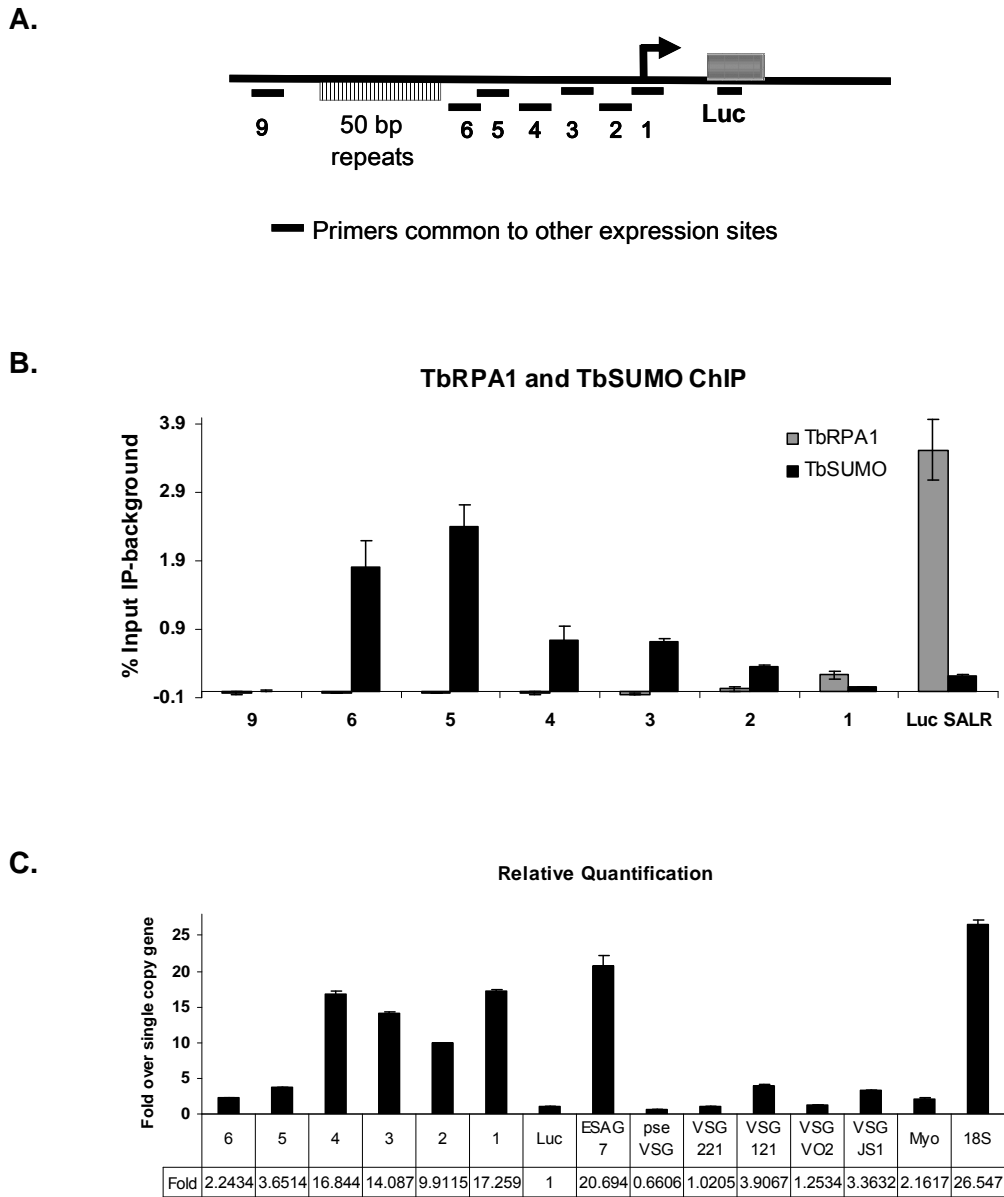


Figure 5. Chromatin upstream of active VSG-ES promoter is highly enriched for SUMOylated proteins. (A) Schema of expression site promoter mapping indicating fragments amplified by qPCR (primers are listed in the Supplemental Table 2). (B) Analysis by ChIP of sequences upstream of the VSG-ES promoter using anti-TbRPA1 and anti-TbSUMO antibodies. Fragments 5 and 6 are highly enriched for SUMOylated proteins while the fragments 4, 3 and 2 show moderate enrichment. TbRPA1 binds at the promoter close to +1. Data are represented as percentage of input IP after background subtraction (unspecific antiserum ChIP). The results show the average from four independent experiments with standard error (SE). (C) Relative quantification of sequences upstream of the VSG-ES promoter by qPCR using genomic DNA as templated revealed different copy number of each PCR fragment analyzed. As controls, we also performed quantification of VSG genes and other control genes. Data are represented as fold increase over the single copy gene *Luciferase*.

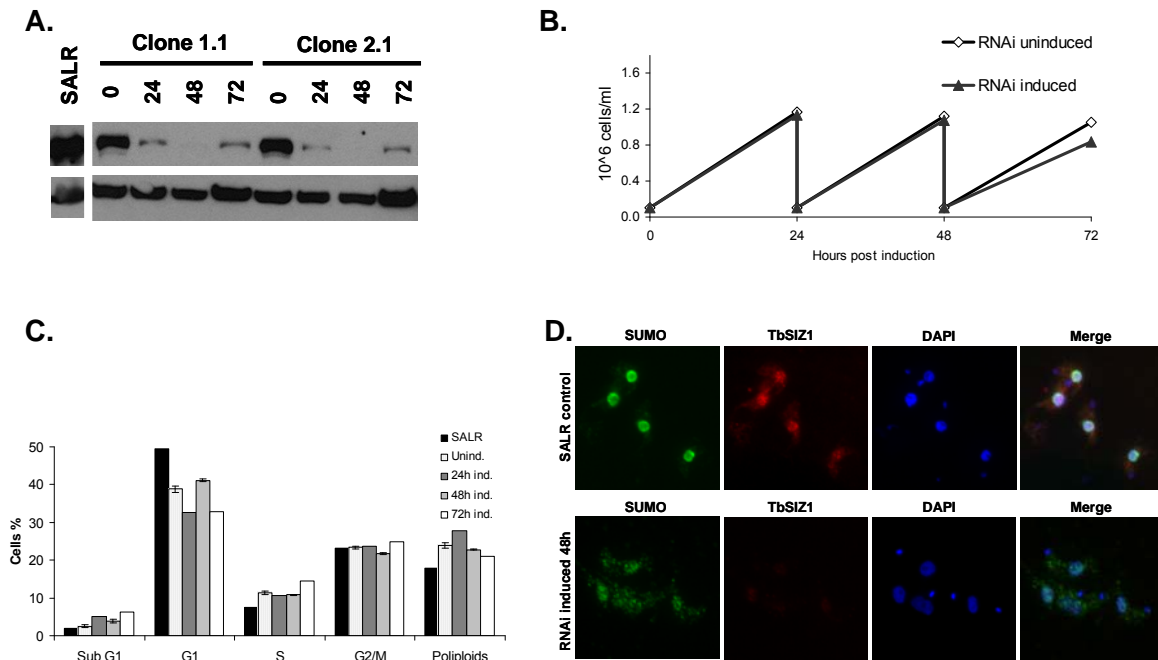


Figure 6. Functional analysis of TbSIZ1 knockdown. (A) Depletion of TbSIZ1 protein upon RNAi at several time points (0, 24, 48 and 72 hours after induction) analyzed by Western blotting. Cell extracts were isolated from two TbSIZ1 RNAi clones in the cell line SALR, Western blotting using mouse anti-TbSIZ1 antiserum and anti-tubulin as loading control. SALR is the parental line, as control. **(B)** Growth curves show mild effect of TbSIZ1 RNAi in cell growth. **(C)** Cell cycle analysis by flow cytometry after different induction times of TbSIZ1 knockdown. Data from two independent clones were tabulated in the graphic. **(D) Depletion of TbSIZ1 reduces the nuclear signal of SUMO-conjugated proteins by IF.** TbSIZ1 RNAi induced cells and control cultures were fixed with paraformaldehyde and double immunofluorescence was performed with anti-SUMO antibody (green) and anti-TbSIZ1 monoclonal antibody (red), DAPI staining (blue). Merged images are visualized in last panels.

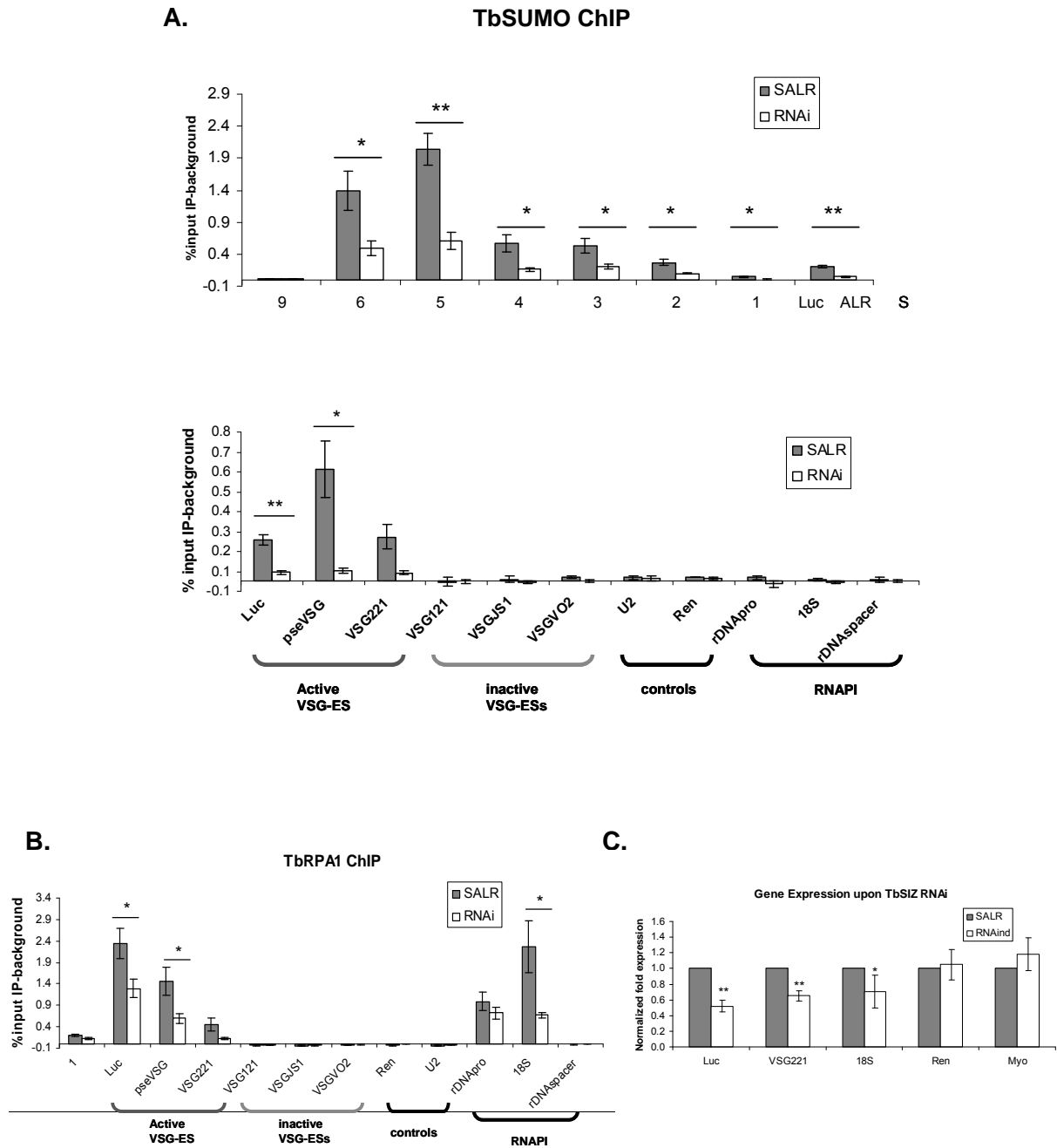


Figure 7. (A) Reduced VSG-ES chromatin SUMOylation upon TbSIZ1 depletion. SUMO ChIP analysis in TbSIZ1 RNAi induced cells (RNAi ind) and control cell line (SALR) show SUMO occupancy is significantly reduced along all active VSG-ES, from the upstream promoter sequences (upper graphic) to the active VSG221 gene (lower graphic). **(B) Reduced RNAPI occupancy upon TbSIZ1 depletion.** Occupancy of RNAPI was determined by TbRPA1 ChIP, statistical analysis shows a significant difference of TbRPA1 levels between the control and RNAi induced cells at the VSG-ES and the rDNA. Data from two RNAi induced clones are represented as percentage of input IP after background subtraction (unspecific antiserum ChIP). The results show the average from at least three independent TbSIZ1 depletion experiments analyzed by ChIP with standard error (SE). **(C) Quantitative RT-PCR analysis shows reduced expression of Luciferase and VSG221 mRNA without significant effect in RNAPII transcribed genes Renilla (control marker) or myosin.** The transcription level of the 18S RNA is also reduced. Results from two independent clones. Data are normalized with U2 mRNA, transcribed by RNAPIII. Statistical analysis Student's t-test * $p < 0.05$, ** < 0.01 .


```

      10      20      30      40      50      60      70
Tb sumo  -DEPTHNSNNGGEP-SNNGGEGAEGTCKEETALVAVKVVNADGAEMFFRIKSR TALKKLI DTYCKKGGISR
Tc sumo  ME.NHA.DS.----N...EA.EKPAV.S.P.SI.....K.CG.Q...F.A.....

      80      90      100     110
Tb sumo  NSVRFLFDGTPIDETKTPPEELGMEDDDVIDAMVEQTGGCLWCMA
Tc sumo  S.....S...S...Q.....NTF----

```

Supplemental Figure 2: Amino acid sequence alignment of *T. brucei* SUMO (TbSUMO) and *T. cruzi* SUMO (TcSUMO). *T. cruzi* and *T. brucei* SUMO proteins are well conserved (74% sequence identity, 84% similarity). Alignments were performed with BioEdit Sequence Alignment Editor and ClustalW. Identical residues shaded in black and represented with a dot.

Gene number	Protein name	Interaction Score
Tb09.211.2400	Predicted zinc finger protein (TbSIZ1)	High confidence
Tb11.01.0910	DNA topoisomerase III protein, putative	Good confidence
Tb11.01.7630	Hypotetical protein, conserved (TbNup109)	High confidence
Tb927.6.2690	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase, putative	Very High confidence
Tb927.10.4930	PP2C-2 Protein phosphatase 2C-like, putative	Moderate confidence

Supplemental Table 1: TbRPB7 putative interacting proteins with higher score of confidence obtained in Y2H screening and selected for the preliminary screening.

Gene or Region	Primer name	Sequence
1	ESMP1_U ESMP1_L	GGTGTGGCGGACGTCTCGAAC CCTCTAAAATACGCTCAGCCCCTCC
2	ESMP2_U ESMP2_L	ATGAAGGTCTTGCGCTGTCT CGCCACACCTTGAGTCTGATATCC
3	ESMP3_U ESMP3_L	TGTTGTTGCAGTATGTTTTCTTC AGACAGCGCAAGACCTTCAT
4	ESMP4_U ESMP4_L	CGGAGAATATTTTCGGATGC AATCGTTACGGCCAAATTCA
5	ESMP5int_U ESMP5_L	TGTTGTGCTTTCTAACACTTCCTT ATTCTCCCCACAGAAAAGA
6	ESMP5_U ESMP5int_L	TTTGTGTTGTTTCATGTTTTGTG AAGGAAGTGTAGAAAGCACAACA
9	ESMP9_U ESMP9_L	TGTTGTCAGTTATGGAGCAG CCAACCCTCAAGCAGGATAA
VSG221	VSG221_U VSG221_L	AGCTAGACGACCAACCGAAGG CGCTGGTGCCGCTCTCCTTTG
VSG pseudogene	221pseudo_U 221pseudo_L	CAAGCATTACCAGAGAAGT CGTCATTCAGTTTCCTTATT
VSG121	VSG121_U VSG121short_L	CCTGACATCGGACGGTAAC TGGTCGATTTTGCCCTTCCTT
VSGJS1	VSGJS1_U VSGJS1_L	TTCTGCTTCTTTGCCCTTGT AAAATGAAGCGGAAATGGTG
VSGVO2	VSGVO2 short_U VSGVO1_L	ACAGAATCGGCCACAGAAAAG CATTTCGCGTTGTCTTGTA
18S gene	18S_U 18S_L	GACGTAATCTGCCGCCAAAAT AACGCCATGGCAGTCCAGTAC
18S promoter	rDNAProm_U rDNAPro_L	GTCAATACAACACACAATAGG CTTAAGTGGGAAAGTGCATA
rDNA spacer	rDNAspacer_U rDNAspacer_L	ATTTTCTCTACCCCTCTCTT ATCATCGTATCATTTTCATC
Procyclin	EP3-2U EP3-2L	ATGGCACCTCGTTCCCTTTA AGAATGCGGCAACGAGACCAA
Procyclin promoter	ProcyProm_U ProcyProm_L	AGTTTAAGATGTTCTCGTGAT CTTTTTGGTGAATTGAAGTC
Luciferase	Luc_U Luc_L	GTGTTGGGCGGTTATTTAT CATCGACTGAAATCCCTGGT
Renilla	Ren_U Ren_L	GATAACTGGTCCGAGTGGT ACCAGATTTGCCTGATTTGC
SL promoter	SL_U SL_L	CCGACACGTTTCTGGCAGCAG TGCGTGTGTTGGCCAGCTGCTAC
Myosin B	MyoB_U MyoB_L	CTGCAGAAACAAGCACGGCATT ACGCTCAACAGTGGCAGTGAA
Tubulina	Tub_U Tub_L	AGGCAACGGGAGGTGCGTATG GGGATGGGATGATGGAGAAAAG
U2 gene	U2_U U2_L	CTGCGTGATCTTTTGTTCCT CGACTGCGTTTTCGTATTTT
5S gene	5Snew_U 5Snew_L	GACCATACTGGCCGAATG TACAACACCCCGGGTTCC

Supplemental Table 2: Primers used in ChIP- qPCR analysis and qRT-PCR

PCR fragment	Sequences from Genomic DNA	Sequences from ChIPed DNA
5-6	<i>VSG221-ES</i> (2) <i>Other VSG-ESs</i> (3)	<i>VSG221-ES</i> (3) <i>VSG221-ES +1 nt changed</i> (1) <i>VSG221-ES +2 nt changed</i> (1)
4	<i>VSG221-ES</i> (0) <i>Other VSG-ESs</i> (3)	<i>VSG221-ES</i> (3)

Supplemental Table 3. Sequence analysis of PCR fragments 5, 6 and 4 from genomic and ChIPed DNA. PCR fragments amplifying the regions 5-6 and 4 from genomic and ChIPed DNA were cloned in pGEMT. Five clones were sequenced for the region 5-6 and three for the region 4, of each template. In the table we show the sequences obtained from genomic and ChIPed DNA, in parenthesis is annotated the number of sequences found. For the fragment 5-6, in the genomic DNA we found four different sequences including 2 clones of *VSG221-ES* while in the ChIPed DNA three clones are identical to *VSG221-ES* and two show 1 or 2 nucleotide changes. For the fragment 4, in the genomic DNA all sequences were different and no one identical to *VSG221-ES* while in the ChIPed DNA all sequences belong to the *VSG221-ES*. The fragment 5-6 was amplified using the primer 6 upper and 5 lower.

DISCUSSION

Screening by yeast two hybrid (Y2H) identified a SUMO E3 ligase TbSIZ1 as a protein that potentially interacts with TbRPB7. We have attempted to verify the interaction between TbRPB7 and TbSIZ1 by co-IP in nuclear and cytoplasmic cell extracts, using antibodies generated against TbSIZ1 and TbRPB7 endogenous proteins. Unfortunately, TbRPB7 did not co-purify with TbSIZ1 under the experimental conditions tested. Y2H is a sensitive technique and low affinity interactions may be more difficult to determine using co-IP. This method is recommended for stable and strong protein interactions because the complexes do not disassemble over time. Transient interactions that control the majority of the cellular processes require a set of conditions to promote and maintain the interactions. In this case, the interaction between TbSIZ1 and TbRPB7 detected by Y2H seems to be weak or transient as part of an enzymatic cascade. Although we have not been able to confirm the interaction by co-IP, we decided to investigate the predicted role of TbSIZ1 in the *T. brucei* SUMOylation pathway and to characterise a putative function in transcriptional regulation.

TbSIZ1 is the first SUMO E3 ligase identified in *T. brucei* and contains a conserved SP-RING domain essential for the E3 ligase activity described previously in other eukaryotes (Melchior et al., 2003). A SUMO orthologue has recently been identified in *T. brucei* (Liao et al. 2010). This study showed that the SUMOylation is essential in trypanosomatids, as in other eukaryotes. SUMO RNAi phenotype in *T. brucei* displays severe defects in cell cycle progression and morphology (Liao et al., 2010 ; Obado et al., 2011). In contrast, we observed that TbSIZ1 depletion does not significantly affect cell growth nor cell cycle progression (Figure 6). This is similar to other SUMO ligases, such as *S. pombe* Pli1 and *S. cerevisiae* Siz1 and Siz2, for which deletion does not affect cell growth (Johnson, 2004; Xhemalce et al., 2004). However, TbSIZ1 RNAi reduces the nuclear signal of SUMOylated proteins by ~50% without a significant effect on the overall SUMOylation pattern detected in Western blot analysis (Figure 6D). These results suggest that the effect of SUMO E3 ligase depletion, rather than affecting general SUMOylation, is more specific, similar to the role previously described for this type of enzyme. Moreover, additional E3 ligases might be important for other processes where SUMO is involved, such as cell growth control. We found at least four more potential SUMO E3 ligases with conserved SP-RING domains in the *T. brucei* genome (Supp. Figure 1)

We have found by ChIP analysis that SUMOylation of chromatin associated proteins is a specific feature of the active VSG-ES, stretching from ~1Kb upstream in the

promoter region to the telomeric VSG (Figures 4 and 5). Furthermore, immunofluorescence analysis of the nuclear position of SUMOylated proteins suggests a highly enriched area that associate with active VSG-ES and the extranucleolar RNAPI in the expression site body (ESB) (Figure 3).

SUMOylation is in general associated with repression of transcription (Garcia-Dominguez and Reyes, 2009; Nathan et al., 2006; Shio and Eisenman, 2003), however in several cases it has been found to function as a transcriptional activator, particularly to modify gene-specific transcription factors or co-regulators (Alm-Kristiansen et al., ; Lyst and Stancheva, 2007; Sharrocks, 2006). In the case of the VSG monoallelic expression, this mechanism might work as an epigenetic mark to warrant the transcription of only one VSG-ES. SUMOylated proteins are not detected in the inactive VSG promoters or silent telomeric VSGs, indicating that SUMO function in VSG transcription is related to activation and not repression.

SUMOylated chromatin was detected at the VSG-ES transcribed by RNAPI, however, the 18S rDNA chromatin is highly enriched with TbRPA1, while lack of SUMOylation. This suggests that the association of SUMO-conjugated proteins to the chromatin is a distinct feature for VSG transcription regulation. TbRPA1 has been described to be SUMOylated in large scale proteomics analyses (Miller et al., 2010 ; Wohlschlegel et al., 2004), however the SUMO enrichment detected 1 Kb upstream of the VSG-ES promoter does not correspond with the TbRPA1 pattern, because the polymerase is not detected upstream of the promoter region. Thus, SUMOylated proteins detected upstream of the VSG-ES promoter are most likely chromatin associated transcription factors or structural components of the chromatin. However, we can not rule out that the SUMOylation detected downstream of the promoter is in part due to SUMOylation of the RNAPI complex.

In this work we show that TbSIZ1 functions as a SUMO E3 ligase *in vivo*. This protein has demonstrated to function in the SUMOylation of chromatin-associated proteins detected at the active VSG-ES. Depletion of TbSIZ1 causes reduction in SUMOylation of the active VSG-ES with a concomitant reduction in RNAPI occupancy and transcriptional activity. This finding is similar to observations in yeast, where in actively transcribed genes SUMOylation of proteins is dependent on the E2 conjugation enzyme Ubc9. Lowering of SUMO levels at constitutive genes upon Ubc9 depletion results in reduced RNAPII levels, however in this case the mRNA levels of the genes were not significantly affected (Rosonina et al.,2010).

We have also observed a reduction in the RNAPI occupancy and transcription at the 18S rDNA gene upon TbSIZ1 depletion, in spite of the fact that we did not detect significant SUMOylation at the chromatin of this locus. This data suggest the presence

of an additional factor, SUMOylated by TbSIZ1 that is required for RNAPII transcription. However, that putative factor is either not associated to chromatin or is bound in a region of the rDNA that we have not analyzed. In sum, this data suggest that TbSIZ1 is required not only for the SUMOylation of chromatin detected in the VSG-ES, but also for the activity or stability of the RNAPII complex.

TbSIZ1 was not detected in SUMOylated regions by ChIP, but its depletion reduced SUMO. It is possible that the SUMO ligase is not present because the factors are SUMOylated prior to being assembled onto the chromatin, in which case SUMO conjugation would not take place *in situ*. In yeast the conjugating enzyme Ubc9 is detected by ChIP only in the promoters of inducible genes, despite the fact that SUMOylation is found in both types of promoters (Rosonina et al., 2010). Also, it is possible that a small amount of TbSIZ1 associates to catalyze the transfer of SUMO and that the interaction is transient and therefore not detected. However we can exclude the possibility that the antibodies are not suitable for ChIP and the SUMO ligase is bound but not detected.

Other SUMO SP-RING-type E3 ligases, such as the PIAS proteins, are known as inhibitors of the transcription factor STAT (Chung et al., 1997). However, recently it has been demonstrated that they can function as enhancers of c-Myb activity in active nuclear RNAPII foci (Alm-Kristiansen et al., 2011). It seems that the function of the PIAS proteins is either activating or repressive, depending upon the context. Another SUMO E3 ligase, Pli1p, presents a role in protecting heterochromatic repeated sequences (i.e. centromeres and telomeres) from illegitimate recombination and is involved in telomere silencing (Xhemalce et al., 2004).

The finding that SUMOylation function in VSG transcription regulation in *T. brucei* opens several questions, such as, what are the SUMO targets and how SUMO modulates their activity. TbSIZ1 could be part of a multi-protein nuclear complex, similar to the SUMO E3 ligase Mms21, which forms a complex with Smc5/6 (involved in DNA repair), where Smc5 is also its target (Zhao and Blobel, 2005). It has been reported that the SUMOylation of Pds5 (a protein involved in sister-chromatid cohesion maintenance) promotes dissolution of cohesion (Stead et al., 2003). These reports and proteomics screens (Wohlschlegel et al., 2004), suggest that components of the cohesin complex might be a possible target of SUMOylation involved in VSG transcription. In *T. brucei*, cohesin complex is involved in the regulation of VSG-ES transcriptional switching (Landeira et al., 2009).

Topoisomerases I and II are also targets of SUMO in yeast and humans. SUMOylated topoisomerases are properly localized, participating in sister-chromatid dissociation and DNA repair (Azuma et al., 2005; Mao et al., 2000). In *T. brucei* there

are three topoisomerase IIIs (Scocca and Shapiro, 2008); TOPO3 β has been involved in the control of VSG switching by removing undesirable recombination intermediates (Kim and Cross., 2010).

Histone SUMOylation is associated with transcriptional repression in *S. cerevisiae*, where all four core histones are SUMOylated (Nathan et al., 2006). Histones SUMOylation upstream of the VSG-ES promoter could be another possible target in *T. brucei*, however in this case chromatin SUMOylation is associated with the active transcriptional state.

Our results suggest that SUMOylation of one or more proteins is required for efficient recruitment of either the RNAPII machinery or specific transcription factors to the VSG-ES promoter. The identification of the ESB as a single nuclear RNAPII-containing body, associated with the active VSG-ES promoter, suggested a model whereby ESB-dependent VSG-ES recruitment leads to the activation of a single ES (Navarro & Gull, 2001). SUMO modification has been involved in the re-localization of transcriptional regulators to different sub-nuclear compartments (Heun, 2007). Thus, TbSIZ1 could be playing a similar role by SUMOylating factors to be located at, or to stabilise, the nuclear ESB.

That far, we have only detected SUMO in the active VSG-ES chromatin, but Western blot analysis and immunofluorescence reveal the existence of many SUMOylated proteins in *T. brucei* nucleus, as in other organisms. Therefore, many of these proteins are probably not associated with chromatin but involved in other processes that control gene expression or genome stability. However, it is important to note that we analyzed just a few loci, representing a very small percentage of the genome. We are currently performing CHIP sequencing (CHIPseq) to obtain the global occupancy of SUMOylated chromatin associated proteins in the genome of *T. brucei*.

These results suggest a model whereby the interaction of TbRPB7 with TbSIZ1 may contribute to the SUMOylation of proteins required for the efficient recruitment of specific factors to active RNAPII promoters. RPB7 has characteristics of a regulatory subunit in RNAPII transcription, thus the presence of SUMOylated factors may influence promoter selectivity. It has been reported that human RPB7 (HsRPB7) enhances the transcription of the vascular endothelial growth factor (VEGF) and regulates its expression (Na et al., 2003) in a RNAPII independent manner. Therefore it is possible that *T. brucei* RPB7 functions in engaging specific transcription factors to recruit the RNAPII core complex to the promoter independently of the whole complex.

Future work in the search for the substrates of TbSUMO, TbSIZ1 and other enzymes involved in the SUMO pathway will be required to uncover the molecular mechanism underlying SUMO modification of the active VSG-ES chromatin in *T. brucei*.

MATERIALS AND METHODS

Trypanosomes and cell lines

T. brucei bloodstream-form cells (strain Lister 427, antigenic type MiTat 1.2, clone 221a) were cultured at 37°C in HMI-9 medium. Procyclic-form cells 427, were grown at 28 °C in SDM79 supplemented with 10% (v/v) fetal calf serum. DNA transfections, and selection procedures were described previously (Wirtz et al., 1999).

Establishment of the dual-reporter cell line, called SALR, in the 'single-marker' cell line (Wirtz et al., 1999) have been described previously (Penate et al., 2009). The generation of the SILR cell line was similar that the SALR cell line, but the Firefly Luciferase (*Fluc*) containing plasmid pMig104 (Navarro and Cross, 1998), was integrated 405pb downstream of an inactive ES promoter.

The two GFP-tagged locus cell lines (for the active *VSG221* ES and rDNA) used in this study have been previously described (Navarro and Gull, 2001; Landeira and Navarro, 2007). The cell line expressing the YFP-TbRPB5z has been described in (Landeira et al, 2009)

RNAi experiments

For RNAi experiments, the single marker cell line was used (Wirtz et al., 1994). *TbSIZ1* RNAi construct was made using the vector p2T7Bla to allow tetracycline-inducible expression of dsRNA from a T7 promoter in bloodstream form cell lines SALR and SILR. A fragment corresponding to 642 nucleotides of the *TbSIZ1* open reading frame (Tb09.211.2400) was amplified by PCR with oligonucleotides (5'CCCGGATCCATGGTGATCCGACCTGCAA3') and (5'GGGGAAGCTTGCCGGCTCATTGTGCTTAAGCGGTGT 3'), and cloned into the *Bam*HI and *Hind*III sites of p2T7Bla. RNAi stable cell lines were diluted daily so that the density of the cultures was maintained between 1x10⁵ and 1x10⁶ in medium with selection drugs. dsRNA synthesis was induced by the addition of 1mg ml⁻¹ of the tetracycline analogue doxycycline (Sigma) in every dilution step.

Yeast two-hybrid screening

Bait cloning and yeast two-hybrid screening were performed by Hybrigenics Services SAS, France (<http://hybrigenics.com/services>). The coding sequence of TbRPB7 was cloned into a plasmid pB27 as a N-terminal fusion to LexA (N-Lex-TbRPB7). The construct was used as bait to screen and a cDNA library of *T. brucei*. 66 clones were processed and 85.1 millions of interactions were analyzed. The prey fragments of the

Anexo 4.3

positive clones were amplified by PCR and sequenced at their 5' and 3' junctions. The resulting sequences were used to identify the interacting proteins in the GenBank database (NCBI). A confidence score PBS (Predicted biological score) was attributed to each interaction.

In silico analysis

BLAST searches were performed against *T. brucei* 927 genome database (<http://www.genedb.org>) using the SP-RING of SUMO E3 ligases from *S. cerevisiae* and human as queries. Protein sequence alignments were performed with BioEdit Sequence Alignment Editor and ClustalW, occasionally refined manually.

Chromatin Immunoprecipitation (ChIP)

Bloodstream cultures were cross-linked by addition of 37% formaldehyde stock solution (to 1% final concentration) and incubated at 37° for 15 min under gentle mixing. Cross-linking was stopped with 2.5M glycine-20mM Tris (not pH-ed) (to 125 mM final concentration), gently mixed and incubated 5 min more. Cells were collected by centrifugation at 3500 rpm for 20 min at 4°C into 50 ml Falcon conical tubes, washed in 50 ml cold PBS and centrifuged again (same conditions). Pellet was resuspended in 10 ml of PBS with protease inhibitor cocktail (Roche Molecular biochemical), centrifuged at 4000 rpm for 15 min, at 4°C and stored at -80°C. Pellet was thawed on ice and cells were resuspended in 1ml of lysis buffer (1% SDS; 10mM EDTA pH 8.0; 50 mM TrisHCl pH 8.0; 1mM PMSF; 1mM DTT and protease inhibitor cocktail) per 10⁸ cells and incubated on ice 10 min. Cells were sonicated in a VibraCell sonicator to shear the chromatin to an average length of 400pb (9 cycles of 30 sec on/30 sec off) and centrifuged at 13000 rpm for 5 min at 4°C, the supernatant containing sheared chromatin was removed and frozen at -80C. Chromatin was thawed on ice, diluted 1:5 in ChIP dilution buffer (0.01%SDS; 1.1% Triton X-100; 1.2 mM EDTA, 16.7 mM TrisHCl pH 8.0; 150 mM NaCl; 1mM PMSF; 1mM DTT and protease inhibitor cocktail) and pre-cleared with Sepharose™ 4B beads (Sigma-Aldrich) (blocked previously in TE buffer with 0.2 mg/ml salmon sperm DNA and 1 mg/ml BSA) for 1hr at 4°C. For immunoprecipitations 2.5ml of pre-cleared chromatin (5 x 10⁷ cells per IP) was incubated overnight at 4°C with 5-10µg of each antibody (antibodies used in ChIP experiments are listed in supplementary table 3). Next, 40ul of 50% slurry of protein G Sepharose™ fast flow beads (Sigma-Aldrich) (blocked previously in TE buffer with 0.2 mg/ml salmon sperm DNA and 1 mg/ml BSA) was added and incubated for 1hr at 4°C; immune complexes were collected by centrifugation at 1000g for 2 min. Immunoprecipitates were washed for 5 min with 1 ml of each one the following buffers:

low salt wash buffer (0.1%SDS; 1% Triton X-100; 2 mM EDTA pH 8.0; 20 mM TrisHCl pH 8.0; 150 mM NaCl with protease inhibitor cocktail), high salt wash buffer (0.1%SDS; 1% Triton X-100; 2 mM EDTA pH 8.0; 20 mM TrisHCl pH 8.0; 500 mM NaCl), LiCl wash buffer (0.25 M LiCl; 1% NP-40; 1% Na-Deoxycholate; 1 mM EDTA pH 8.0; 10 mM TrisHCl pH 8.0), and twice with TE wash buffer (10 mM TrisHCl pH 8.0; 1 mM EDTA pH 8.0). The complexes were eluted from the beads with 500 μ l of elution buffer (1%SDS, 0.1M NaHCO₃) by incubation for 30min at room temperature with rocking, and then the supernatant was transferred to a fresh tube. Crosslinks were reversed by adding 20 μ l 5M NaCl (200mM final concentration) and incubating samples at 65°C overnight. RNase A (10 mg/ml) was added to a final concentration of 100 μ g/ml and incubated for 1hr at 37°C. Then 10 μ l of 0.5 M EDTA (10mM final concentration), 20 μ l of 1M Tris-HCl, pH 6.5 (40mM final concentration) and 8 μ l of 20 mg/ml Proteinase K (200 μ g/ml final concentration) were added to the eluates and incubated for 2 hr at 55°C. Samples were extracted with phenol:chloroform and ethanol precipitated. Pellets were resuspended in 50 μ l of H₂O and assayed by quantitative PCR (qPCR). To compare the amount of DNA immunoprecipitated to the total input DNA, 10% of the pre-cleared chromatin was saved as input and was processed with the eluted immunoprecipitates beginning at the crosslink reversal step. Extracted DNA of each sample input was included in the qPCR analysis.

Quantitative PCR (qPCR) was performed using the SYBR green supermix for iQ (Quanta Biosciences) in a CFX96TM cycler (BioRad), qPCR mixtures contained 2 μ l of a 1:5 dilution of the immunoprecipitated or a 1:50, 1:100, 1:200 dilution of the input sample and 500nM of each primer in a total volume of 10 μ l. All qPCR reactions were performed in duplicate and each product was verified by melting curve analysis. The PCR primers used to analyze target fragments were designed by using the Primer3 software and are listed in supplementary table 2. Standard curves for each primer pair were generated with serial dilutions of input DNA to determine PCR efficiency. Immunoprecipitation values were normalized to the amount of input chromatin; using the standard curve equation we obtained the relative amount of each specific DNA fragment in the immunoprecipitate and the relative amount of that fragment in the input DNA, then we calculate the percentage of input immunoprecipitated. Finally the background values obtained in ChIP with non-specific antibodies were subtracted from the values obtained with the specific antibodies. All ChIP experiments were performed at least four times and statistical analysis (Student's t-test) was applied to compare data sets.

Anexo 4.3

Relative quantification by qPCR

Relative quantification of PCR fragments amplified in ChIP-qPCR assays was performed by qPCR as was described before but the template this time was genomic DNA and the quantification was performed using the $\Delta\Delta$ CT method and a single copy gene as the reference sample (*Luciferase*).

2D Immunofluorescence

2D IF fixation was used to determine the localization of SUMOylated proteins and TbSIZ1 and to analyze the reduction of SUMO conjugated proteins in the nucleus upon TbSIZ1 knockdown. Parasites from 48h RNAi induced cultures and control cells, were collected by centrifugation and spotted in 10 wells slides. Next were fixed with 4% paraformaldehyde for 20 minutes, then permeabilized with 1% NP40 for 20 minutes followed by incubation in 0.5% blocking reagent (Roche) for 20 minutes. Rabbit anti-SUMO polyclonal and anti-TbSIZ1 antibodies were diluted in 0.5% blocking reagent (Roche) and were used as a primary antibody. Goat anti-rabbit Alexa Fluor 488 or 594 conjugate antibodies were used as a secondary antibody. ProLong Gold anti-fade with DAPI (4',6'-diamidino-2-phenylindole) reagent (Invitrogen) was used as a mounting solution. Cells were visualized in a Zeiss fluorescence microscope. Reduction signal scoring was done by direct optical observation of 200 cells from 2 independent clones and the control cell line SALR.

3D Immunofluorescence

Deconvolution 3D microscopy analysis was performed as previously described (Landeira et al., 2007). Briefly, cells were fixed for 2.5 h on ice with 4% PFA and permeabilized with 1% NP-40 for 1 hr at room temperature. IF was performed in 0.5% blocking reagent (Roche) in PBS (Sigma-Aldrich) using rabbit anti-SUMO polyclonal (1:800), mouse anti-TbSIZ1 monoclonal (1:10), rabbit anti-TbRPA1 affinity-purified polyclonal (1:600), rabbit anti-GFP polyclonal (1:5000; Invitrogen) and mouse anti-GFP monoclonal (1:600; Invitrogen), as primary antibodies. Alexa Fluor goat 488 and Alexa Fluor goat 594-conjugated antibodies (Invitrogen) were used as secondary antibodies (Invitrogen). Cells were DAPI stained. Stacks (0.1- μ m z step) acquisition was performed with a microscope system (Cell R IX81; Olympus), 100x objective, NA 1.40, illumination system (MT20; Olympus), and camera (Orca CCD; Hamamatsu). Deconvolution of 3D images was performed using Huygens Essential software (version 2.9; Scientific Volume Imaging) using an experimentally calculated point-spread function with 0.2- μ m TetraSpeck microspheres (Invitrogen). Colocalization analysis, pseudocoloring and maximum intensity projections were performed using ImageJ

version 1.43 software (National Institutes of Health). For the colocalization mask, two points were considered as colocalized if the ratio of the intensity is strictly higher than the ratio setting value set up at 80% in all the analyses. Colocalization percentage Scoring was done by direct optical observation and questionable cells were analyzed by 2D or 3D digital imaging.

Generation of antibodies against TbSIZ1

N-terminal fragment of TbSIZ1 was amplified from genomic DNA using oligonucleotides TbSIZ1Up (5'CCCGGATCCATGGTGATCCGACCTGCAA3') and TbSIZtoHis Low (5'GGGGAAGCTTCTTATCATTGTGCTTAAGCGGTGT3'). The PCR product was inserted into pGEMT vector (Promega) and then into pET28a vector (Novagen) using *Bam*HI and *Hind*III sites. The resulting plasmid was transferred to *Escherichia coli* KRX cells (Promega). The recombinant protein was obtained after 3 hours of induction at 37 °C with 1 mM isopropylthio-β-D-galactoside (IPTG) and 0.1% rhamnose. Bacteria were resuspended in lysis buffer (0.5M NaCl, 20 mM Na₂HPO₄, 1mM DTT, 1mM EGTA, 1mM PMSF, 100 µg/ml lysozyme, 20 mM imidazole, 1% tween[®]20) and lysed by Frech press device. After centrifugation, supernatant was applied to a Poly-Prep[®] chromatography column (Bio-Rad) containing NI Sepharose Fast Flow[™] 6 (GE Healthcare). Supernatant and sepharose beads were incubated 1 hour at room temperature in gently rotation and then passed through the column until drain, washed with 30 volumes of lysis buffer and eluted with same buffer containing increasing concentration of imidazole (50, 100, 250 and 500 mM). Purified protein was dialyzed in PBS (pH 7.4).

Mouse anti-TbSIZ1 monoclonal and polyclonal antibodies were produced by injecting the recombinant protein into a BALB-C mouse following standard immunization protocols. Monoclonal antibodies were obtained by standard monoclonal selection procedures.

RT-qPCR analysis

Total RNA samples were obtained from 50 ml cultures; RNA was extracted using the High Pure RNA isolation Kit (Roche) following manufacturers instructions. RNA quality was verified by gel analysis and nanodrop quantification. cDNA was synthesized from 2µg of RNA with the SuperScript[®] III Reverse Transcriptase (Invitrogene) and random primers (Invitrogene), following manufacturers instructions. RNA sample not treated with reverse transcriptase was used as a RT- control. Quantitative PCR was performed using the SYBR green supermix for iQ (Quanta Biosciences) in a CFX96[™] cyclor (BioRad), qPCR mixtures contained 1µl of cDNA for single copy genes or a 1:100

Anexo 4.3

dilution of cDNA for multicopy genes and 500nM of each primer in a total volume of 10 μ l. All qPCR reactions were performed in duplicate and each product was verified by melting curve analysis. The PCR primers used were designed by using the Primer3 software and are listed in supplementary table 2. Standard curves for each primer pair were generated with serial dilutions of cDNA to determine PCR efficiency. The relative levels of gene expression between a given sample and the reference sample (SALR cell line) were calculated using the $\Delta\Delta$ CT method with the Bio-Rad CFX Manager software. The U2 single copy gene was used as endogenous control to normalize RNA starting quantity. cDNA from 4 independent clones was analysed and statistical analysis (Student's t-test) was performed.

FACS analysis

For cell cycle analysis, samples (1.5×10^7 cells) were collected, centrifuged (1400xg at 4°C for 10min), washed in 5ml PBS1X and centrifuged again (same conditions). Pellets were resuspended in 70% ethanol-30% PBS1X solution and incubated 1hr to overnight at -20°C. After incubation the cells were centrifuged (2000rpm at 4°C for 10min), and washed in 5ml PBS1X and resuspended in 500 μ l PBS1X. Propidium iodide (PI) and RNase were added to 40 μ /ml and 10 μ /ml final concentration, respectively, and incubated 30min at room temperature. Samples were stored at 4°C before FACS analysis. DNA content of 30,000 cells per sample was analysed with a FACScan flow cytometer using the Cellquest software (BD Biosciences). Gating was determined with control cells and the same values were used for all treated cells. Percentage of cells in each phase of the cell cycle was determined according to described procedures (Ormerod MG, 1996).

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Vanina E Alvarez and Juan J. Cazzulo, IIB-INTECH, Buenos Aires, Argentina for kindly providing the anti-SUMO antibody. We thank to D. Van Tyne for a critical reading of this paper. This work was funded by HHMI-55005525. M. N. is a Howard Hughes Medical Institute International Research Scholar.

REFERENCES

- Alm-Kristiansen, A.H., Lorenzo, P.I., Molvaersmyr, A.K., Matre, V., Ledsaak, M., Saether, T. and Gabrielsen, O.S. PIAS1 interacts with FLASH and enhances its co-activation of c-Myb. *Mol Cancer*, **10**, 21.
- Azuma, Y., Arnaoutov, A., Anan, T. and Dasso, M. (2005) PIASy mediates SUMO-2 conjugation of Topoisomerase-II on mitotic chromosomes. *Embo J*, **24**, 2172-2182.
- Berriman, M., Ghedin, E., Hertz-Fowler, C., Blandin, G., Renauld, H., Bartholomeu, D.C., Lennard, N.J., Caler, E., Hamlin, N.E., Haas, B., Bohme, U., Hannick, L., Aslett, M.A., Shallom, J., Marcello, L., Hou, L., Wickstead, B., Alsmark, U.C., Arrowsmith, C., Atkin, R.J., Barron, A.J., Bringaud, F., Brooks, K., Carrington, M., Cherevach, I., Chillingworth, T.J., Churcher, C., Clark, L.N., Corton, C.H., Cronin, A., Davies, R.M., Doggett, J., Djikeng, A., Feldblyum, T., Field, M.C., Fraser, A., Goodhead, I., Hance, Z., Harper, D., Harris, B.R., Hauser, H., Hostetter, J., Ivens, A., Jagels, K., Johnson, D., Johnson, J., Jones, K., Kerhornou, A.X., Koo, H., Larke, N., Landfear, S., Larkin, C., Leech, V., Line, A., Lord, A., Macleod, A., Mooney, P.J., Moule, S., Martin, D.M., Morgan, G.W., Mungall, K., Norbertczak, H., Ormond, D., Pai, G., Peacock, C.S., Peterson, J., Quail, M.A., Rabbinowitsch, E., Rajandream, M.A., Reitter, C., Salzberg, S.L., Sanders, M., Schobel, S., Sharp, S., Simmonds, M., Simpson, A.J., Tallon, L., Turner, C.M., Tait, A., Tivey, A.R., Van Aken, S., Walker, D., Wanless, D., Wang, S., White, B., White, O., Whitehead, S., Woodward, J., Wortman, J., Adams, M.D., Embley, T.M., Gull, K., Ullu, E., Barry, J.D., Fairlamb, A.H., Opperdoes, F., Barrell, B.G., Donelson, J.E., Hall, N., Fraser, C.M., Melville, S.E. and El-Sayed, N.M. (2005) The genome of the African trypanosome *Trypanosoma brucei*. *Science*, **309**, 416-422.
- Cojocaru, M., Jeronimo, C., Forget, D., Bouchard, A., Bergeron, D., Cote, P., Poirier, G.G., Greenblatt, J. and Coulombe, B. (2008) Genomic location of the human RNA polymerase II general machinery: evidence for a role of TFIIF and Rpb7 at both early and late stages of transcription. *Biochem J*, **409**, 139-147.
- Chen, X., Ding, B., LeJeune, D., Ruggiero, C. and Li, S. (2009) Rpb1 sumoylation in response to UV radiation or transcriptional impairment in yeast. *PLoS One*, **4**, e5267.
- Chung, C.D., Liao, J., Liu, B., Rao, X., Jay, P., Berta, P. and Shuai, K. (1997) Specific inhibition of Stat3 signal transduction by PIAS3. *Science*, **278**, 1803-1805.
- Dammann, R., Lucchini, R., Koller, T. and Sogo, J.M. (1995) Transcription in the yeast rRNA gene locus: distribution of the active gene copies and chromatin structure of their flanking regulatory sequences. *Mol Cell Biol*, **15**, 5294-5303.
- Donelson, J.E. (2003) Antigenic variation and the African trypanosome genome. *Acta Trop*, **85**, 391-404.
- Garcia-Dominguez, M. and Reyes, J.C. (2009) SUMO association with repressor complexes, emerging routes for transcriptional control. *Biochim Biophys Acta*, **1789**, 451-459.
- Girdwood, D.W., Tatham, M.H. and Hay, R.T. (2004) SUMO and transcriptional regulation. *Semin Cell Dev Biol*, **15**, 201-210.
- Goodson, M.L., Hong, Y., Rogers, R., Matunis, M.J., Park-Sarge, O.K. and Sarge, K.D. (2001) Sumo-1 modification regulates the DNA binding activity of heat shock transcription factor 2, a promyelocytic leukemia nuclear body associated transcription factor. *J Biol Chem*, **276**, 18513-18518.
- Gostissa, M., Hengstermann, A., Fogal, V., Sandy, P., Schwarz, S.E., Scheffner, M. and Del Sal, G. (1999) Activation of p53 by conjugation to the ubiquitin-like protein SUMO-1. *Embo J*, **18**, 6462-6471.
- Gunzl, A., Ullu, E., Dorner, M., Fragoso, S.P., Hoffmann, K.F., Milner, J.D., Morita, Y., Nguu, E.K., Vanacova, S., Wunsch, S., Dare, A.O., Kwon, H. and Tschudi, C.

- (1997) Transcription of the *Trypanosoma brucei* spliced leader RNA gene is dependent only on the presence of upstream regulatory elements. *Mol Biochem Parasitol*, **85**, 67-76.
- Heun, P. (2007) SUMO organization of the nucleus. *Curr Opin Cell Biol*, **19**, 350-355.
- Jasiak, A.J., Hartmann, H., Karakasili, E., Kalocsay, M., Flatley, A., Kremmer, E., Strasser, K., Martin, D.E., Soding, J. and Cramer, P. (2008) Genome-associated RNA polymerase II includes the dissociable Rpb4/7 subcomplex. *J Biol Chem*, **283**, 26423-26427.
- Johnson, E.S. (2004) Protein modification by SUMO. *Annu Rev Biochem*, **73**, 355-382.
- Johnson, E.S. and Blobel, G. (1997) Ubc9p is the conjugating enzyme for the ubiquitin-like protein Smt3p. *J Biol Chem*, **272**, 26799-26802.
- Johnson, E.S. and Gupta, A.A. (2001) An E3-like factor that promotes SUMO conjugation to the yeast septins. *Cell*, **106**, 735-744.
- Johnson, E.S., Schwienhorst, I., Dohmen, R.J. and Blobel, G. (1997) The ubiquitin-like protein Smt3p is activated for conjugation to other proteins by an Aos1p/Uba2p heterodimer. *Embo J*, **16**, 5509-5519.
- Kagey, M.H., Melhuish, T.A. and Wotton, D. (2003) The polycomb protein Pc2 is a SUMO E3. *Cell*, **113**, 127-137.
- Kahyo, T., Nishida, T. and Yasuda, H. (2001) Involvement of PIAS1 in the sumoylation of tumor suppressor p53. *Mol Cell*, **8**, 713-718.
- Kim, H.S. and Cross, G.A. TOPO3alpha influences antigenic variation by monitoring expression-site-associated VSG switching in *Trypanosoma brucei*. *PLoS Pathog*, **6**, e1000992.
- Kirsh, O., Seeler, J.S., Pichler, A., Gast, A., Muller, S., Miska, E., Mathieu, M., Harel-Bellan, A., Kouzarides, T., Melchior, F. and Dejean, A. (2002) The SUMO E3 ligase RanBP2 promotes modification of the HDAC4 deacetylase. *Embo J*, **21**, 2682-2691.
- Kooter, J.M. and Borst, P. (1984) Alpha-amanitin-insensitive transcription of variant surface glycoprotein genes provides further evidence for discontinuous transcription in trypanosomes. *Nucleic Acids Res*, **12**, 9457-9472.
- Landeira, D., Bart, J.M., Van Tyne, D. and Navarro, M. (2009) Cohesin regulates VSG monoallelic expression in trypanosomes. *J Cell Biol*, **186**, 243-254.
- Landeira, D. and Navarro, M. (2007) Nuclear repositioning of the VSG promoter during developmental silencing in *Trypanosoma brucei*. *J Cell Biol*, **176**, 133-139.
- Lee, M.H., Lee, S.W., Lee, E.J., Choi, S.J., Chung, S.S., Lee, J.I., Cho, J.M., Seol, J.H., Baek, S.H., Kim, K.I., Chiba, T., Tanaka, K., Bang, O.S. and Chung, C.H. (2006) SUMO-specific protease SUSP4 positively regulates p53 by promoting Mdm2 self-ubiquitination. *Nat Cell Biol*, **8**, 1424-1431.
- Liang, X.H., Haritan, A., Uliel, S. and Michaeli, S. (2003) trans and cis splicing in trypanosomatids: mechanism, factors, and regulation. *Eukaryot Cell*, **2**, 830-840.
- Liao, S., Wang, T., Fan, K. and Tu, X. The small ubiquitin-like modifier (SUMO) is essential in cell cycle regulation in *Trypanosoma brucei*. *Exp Cell Res*, **316**, 704-715.
- Lyst, M.J. and Stancheva, I. (2007) A role for SUMO modification in transcriptional repression and activation. *Biochem Soc Trans*, **35**, 1389-1392.
- Mahajan, R., Delphin, C., Guan, T., Gerace, L. and Melchior, F. (1997) A small ubiquitin-related polypeptide involved in targeting RanGAP1 to nuclear pore complex protein RanBP2. *Cell*, **88**, 97-107.
- Mao, Y., Sun, M., Desai, S.D. and Liu, L.F. (2000) SUMO-1 conjugation to topoisomerase I: A possible repair response to topoisomerase-mediated DNA damage. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 4046-4051.
- Matunis, M.J., Coutavas, E. and Blobel, G. (1996) A novel ubiquitin-like modification modulates the partitioning of the Ran-GTPase-activating protein RanGAP1 between the cytosol and the nuclear pore complex. *J Cell Biol*, **135**, 1457-1470.

- McCulloch, R. (2004) Antigenic variation in African trypanosomes: monitoring progress. *Trends Parasitol*, **20**, 117-121.
- Melchior, F., Schergaut, M. and Pichler, A. (2003) SUMO: ligases, isopeptidases and nuclear pores. *Trends Biochem Sci*, **28**, 612-618.
- Miller, M.J., Barrett-Wilt, G.A., Hua, Z. and Vierstra, R.D. Proteomic analyses identify a diverse array of nuclear processes affected by small ubiquitin-like modifier conjugation in Arabidopsis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **107**, 16512-16517.
- Mitsuzawa, H., Kanda, E. and Ishihama, A. (2003) Rpb7 subunit of RNA polymerase II interacts with an RNA-binding protein involved in processing of transcripts. *Nucleic Acids Res*, **31**, 4696-4701.
- Na, X., Duan, H.O., Messing, E.M., Schoen, S.R., Ryan, C.K., di Sant'Agnese, P.A., Golemis, E.A. and Wu, G. (2003) Identification of the RNA polymerase II subunit hsRPB7 as a novel target of the von Hippel-Lindau protein. *Embo J*, **22**, 4249-4259.
- Nakagawa, K. and Yokosawa, H. (2002) PIAS3 induces SUMO-1 modification and transcriptional repression of IRF-1. *FEBS Lett*, **530**, 204-208.
- Nathan, D., Ingvarsdottir, K., Sterner, D.E., Bylebyl, G.R., Dokmanovic, M., Dorsey, J.A., Whelan, K.A., Krsmanovic, M., Lane, W.S., Meluh, P.B., Johnson, E.S. and Berger, S.L. (2006) Histone sumoylation is a negative regulator in *Saccharomyces cerevisiae* and shows dynamic interplay with positive-acting histone modifications. *Genes Dev*, **20**, 966-976.
- Nishida, T. and Yasuda, H. (2002) PIAS1 and PIASxalpha function as SUMO-E3 ligases toward androgen receptor and repress androgen receptor-dependent transcription. *J Biol Chem*, **277**, 41311-41317.
- Novatchkova, M., Budhiraja, R., Coupland, G., Eisenhaber, F. and Bachmair, A. (2004) SUMO conjugation in plants. *Planta*, **220**, 1-8.
- Obado, S.O., Bot, C., Echeverry, M.C., Bayona, J.C., Alvarez, V.E., Taylor, M.C. and Kelly, J.M. Centromere-associated topoisomerase activity in bloodstream form *Trypanosoma brucei*. *Nucleic Acids Res*, **39**, 1023-1033.
- Owerbach, D., McKay, E.M., Yeh, E.T., Gabbay, K.H. and Bohren, K.M. (2005) A proline-90 residue unique to SUMO-4 prevents maturation and sumoylation. *Biochem Biophys Res Commun*, **337**, 517-520.
- Palenchar, J.B. and Bellofatto, V. (2006) Gene transcription in trypanosomes. *Mol Biochem Parasitol*, **146**, 135-141.
- Pays, E., Vanhamme, L. and Perez-Morga, D. (2004) Antigenic variation in *Trypanosoma brucei*: facts, challenges and mysteries. *Curr Opin Microbiol*, **7**, 369-374.
- Penate, X., Lopez-Farfan, D., Landeira, D., Wentland, A., Vidal, I. and Navarro, M. (2009) RNA pol II subunit RPB7 is required for RNA pol I-mediated transcription in *Trypanosoma brucei*. *EMBO Rep*, **10**, 252-257.
- Petermann, R., Mossier, B.M., Aryee, D.N., Khazak, V., Golemis, E.A. and Kovar, H. (1998) Oncogenic EWS-Fli1 interacts with hsRPB7, a subunit of human RNA polymerase II. *Oncogene*, **17**, 603-610.
- Rosonina, E., Duncan, S.M. and Manley, J.L. SUMO functions in constitutive transcription and during activation of inducible genes in yeast. *Genes Dev*, **24**, 1242-1252.
- Sachdev, S., Bruhn, L., Sieber, H., Pichler, A., Melchior, F. and Grosschedl, R. (2001) PIASy, a nuclear matrix-associated SUMO E3 ligase, represses LEF1 activity by sequestration into nuclear bodies. *Genes Dev*, **15**, 3088-3103.
- Saitoh, H., Sparrow, D.B., Shiomi, T., Pu, R.T., Nishimoto, T., Mohun, T.J. and Dasso, M. (1998) Ubc9p and the conjugation of SUMO-1 to RanGAP1 and RanBP2. *Curr Biol*, **8**, 121-124.
- Sampson, D.A., Wang, M. and Matunis, M.J. (2001) The small ubiquitin-like modifier-1 (SUMO-1) consensus sequence mediates Ubc9 binding and is essential for SUMO-1 modification. *J Biol Chem*, **276**, 21664-21669.

- Scocca, J.R. and Shapiro, T.A. (2008) A mitochondrial topoisomerase IA essential for late theta structure resolution in African trypanosomes. *Mol Microbiol*, **67**, 820-829.
- Schmidt, D. and Muller, S. (2002) Members of the PIAS family act as SUMO ligases for c-Jun and p53 and repress p53 activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**, 2872-2877.
- Schmidt, D. and Muller, S. (2003) PIAS/SUMO: new partners in transcriptional regulation. *Cell Mol Life Sci*, **60**, 2561-2574.
- Sharrocks, A.D. (2006) PIAS proteins and transcriptional regulation--more than just SUMO E3 ligases? *Genes Dev*, **20**, 754-758.
- Shen, X.Q., Bubulya, A., Zhou, X.F., Khazak, V., Golemis, E.A. and Shemshedini, L. (1999) Ligand-free RAR can interact with the RNA polymerase II subunit hsRPB7 and repress transcription. *Endocrine*, **10**, 281-289.
- Shiio, Y. and Eisenman, R.N. (2003) Histone sumoylation is associated with transcriptional repression. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100**, 13225-13230.
- Siegel, T.N., Hekstra, D.R., Kemp, L.E., Figueiredo, L.M., Lowell, J.E., Fenyo, D., Wang, X., Dewell, S. and Cross, G.A. (2009) Four histone variants mark the boundaries of polycistronic transcription units in *Trypanosoma brucei*. *Genes Dev*, **23**, 1063-1076.
- Stead, K., Aguilar, C., Hartman, T., Drexel, M., Meluh, P. and Guacci, V. (2003) Pds5p regulates the maintenance of sister chromatid cohesion and is sumoylated to promote the dissolution of cohesion. *J Cell Biol*, **163**, 729-741.
- Takahashi, Y., Kahyo, T., Toh, E.A., Yasuda, H. and Kikuchi, Y. (2001a) Yeast Ull1/Siz1 is a novel SUMO1/Smt3 ligase for septin components and functions as an adaptor between conjugating enzyme and substrates. *J Biol Chem*, **276**, 48973-48977.
- Takahashi, Y., Toh-e, A. and Kikuchi, Y. (2001b) A novel factor required for the SUMO1/Smt3 conjugation of yeast septins. *Gene*, **275**, 223-231.
- Tozluoglu, M., Karaca, E., Nussinov, R. and Haliloglu, T. A mechanistic view of the role of E3 in sumoylation. *PLoS Comput Biol*, **6**.
- Verma-Gaur, J., Rao, S.N., Taya, T. and Sadhale, P. (2008) Genomewide recruitment analysis of Rpb4, a subunit of polymerase II in *Saccharomyces cerevisiae*, reveals its involvement in transcription elongation. *Eukaryot Cell*, **7**, 1009-1018.
- Wang, Y., Ladunga, I., Miller, A.R., Horken, K.M., Plucinak, T., Weeks, D.P. and Bailey, C.P. (2008) The small ubiquitin-like modifier (SUMO) and SUMO-conjugating system of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Genetics*, **179**, 177-192.
- Wohlschlegel, J.A., Johnson, E.S., Reed, S.I. and Yates, J.R., 3rd. (2004) Global analysis of protein sumoylation in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*, **279**, 45662-45668.
- Xhemalce, B., Seeler, J.S., Thon, G., Dejean, A. and Arcangioli, B. (2004) Role of the fission yeast SUMO E3 ligase Pli1p in centromere and telomere maintenance. *Embo J*, **23**, 3844-3853.
- Zhang, X.D., Goeres, J., Zhang, H., Yen, T.J., Porter, A.C. and Matunis, M.J. (2008) SUMO-2/3 modification and binding regulate the association of CENP-E with kinetochores and progression through mitosis. *Mol Cell*, **29**, 729-741.
- Zhao, J. (2007) Sumoylation regulates diverse biological processes. *Cell Mol Life Sci*, **64**, 3017-3033.
- Zhao, X. and Blobel, G. (2005) A SUMO ligase is part of a nuclear multiprotein complex that affects DNA repair and chromosomal organization. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **102**, 4777-4782.
- Zhou, H. and Lee, K.A. (2001) An hsRPB4/7-dependent yeast assay for trans-activation by the EWS oncogene. *Oncogene*, **20**, 1519-1524.

Discusión

5. Discusión

En *Trypanosoma brucei*, la transcripción de los genes que codifican las proteínas de superficie VSG y prociclina, es llevada a cabo por la RNA polimerasa I (RNAPI) en lugar de la RNAPII, lo cual constituye una función inusual para esta polimerasa que normalmente se encarga sólo de transcribir el RNA ribosomal (rRNA) de la célula eucariota. Esta no parece ser una característica común en la familia Trypanosomatidae, ya que sólo ocurre en *T. brucei* y otras especies de tripanosomas africanos. En *T. cruzi* y *Leishmania* no han sido identificados genes codificantes transcritos por la RNAPI, sin embargo, algunos estudios sugieren que la RNAPI de estos organismos es competente para transcribir genes codificantes como resultado de la duplicación de estos en un locus de rDNA (Lodes et al., 1995) o mediante manipulación genética (Boucher et al., 2002; Misslitz et al., 2000; Yan et al., 2001). Esta función es posible gracias al *trans-splicing* de los mRNA, una propiedad de todos los tripanosomátidos que consiste en la adición de una secuencia de 39 nucleótidos denominada mini-exón o *splice leader* (SL) en la región 5' del transcrito primario.

En otros eucariotas la transcripción del mRNA puede llevarse a cabo únicamente mediante la RNAPII, debido en parte, a que dicha transcripción está acoplada al 5' *capping* del RNA el cual es importante para el transporte del RNA al citoplasma, su estabilidad y traducción. El SL aporta a todos los mRNAs la estructura *cap* que los protege de la degradación, independientemente de la polimerasa que los transcriba. Sin embargo, es probable que además existan factores de transcripción específicos de esta RNAPI, que cooperen en la capacidad de transcribir RNAs codificantes, así como también en la regulación necesaria para el control de la expresión monoalélica de la VSG y en la regulación de la expresión diferencial de las glicoproteínas de superficie durante las diferentes fases del ciclo de vida.

Como se ha comentado en la introducción (apartado 2.2), en *T. brucei* se han encontrado homólogos para 10 de las 14 subunidades que componen la RNAPI de levaduras (Nguyen et al., 2006; Walgraffe et al., 2005), las subunidades específicas RPA34 y RPA49 no han sido identificadas, así como tampoco las subunidades RPA14 y RPA43, homólogas estructurales y funcionales del heterodímero RPB4/RPB7 en la RNAPII.

En un estudio previo realizado en nuestro laboratorio utilizando una línea celular doble reportera, se evaluó funcionalmente el efecto de la depleción de distintas subunidades de las polimerasas sobre la transcripción del promotor del VSG-ES. Mientras que la depleción de varias subunidades de la RNAPII mediante interferencia del RNA (RNAi), no afectó a la transcripción de la RNAPI, el RNAi de la TbRPB7, una subunidad específica de RNAPII, afectó la actividad del promotor del VSG-ES y la de los genes ribosomales, mediada por la RNAPI (Anexo 4.1. Figura 1). Este hallazgo sumado al hecho de que las subunidades RPA14 y RPA43, no se detectan en el genoma de *T. brucei* ni en purificaciones del complejo RNAPI (Nguyen et al., 2006; Walgraffe et al., 2005), mientras que TbRPB7 y TbRPC25, subunidades homólogas en los complejos RNAPII y RNAPIII respectivamente, han sido claramente identificadas, sugerían la posibilidad de que TbRPB7 estuviera sustituyendo a la subunidad RPA43 en el complejo RNAPI de *T. brucei*.

En eucariotas RPB7 se ha descrito como una subunidad disociable del complejo RNAPII que forma un heterodímero con la subunidad RPB4, el cual es reclutado a los complejos de transcripción durante iniciación y elongación (Choder, 2004; Kornberg, 2007). En un estudio anterior se evaluó si la transcripción de RNAPI en *T. brucei* involucraba también a la subunidad TbRPB4, pero la depleción de esta subunidad no mostró ningún efecto en la actividad de un reportero insertado corriente abajo del promotor del VSG-ES, mientras que si lo tuvo sobre la transcripción mediada por la RNAPII (Penate, 2007). En levaduras se ha descrito que RPB7 puede interactuar con el complejo RNAPII en ausencia de RPB4 (Sheffer et al., 1999) y que RPB7 por si sola es suficiente para llevar a cabo la transcripción bajo condiciones normales de crecimiento (Choder, 2004), por lo tanto, es posible que TbRPB7 actúe de forma independiente de RPB4 en el complejo RNAPI.

RPB7 es una subunidad evolutivamente muy conservada en eucariotas, con estructura similar a la subunidad RpoE de Archaea (Meka et al., 2005; Siaut et al., 2003). Estos resultados representan el primer ejemplo en el cual un complejo RNAPI interactúa con una subunidad específica del complejo RNAPII. Como comentamos en la introducción (apartado 2.2.2), estudios en levaduras y humanos han demostrado que RPB7 recluta factores de procesamiento de RNA (Mitsuzawa et al., 2003), factores de transcripción (Na et al., 2003; Petermann et al., 1998; Shen et al., 1999) y se localiza en la vía de salida del RNA naciente en el complejo RNAPII (Ujvari and Luse, 2006), lo cual facilita su interacción con estos factores. Es posible entonces que el reclutamiento de

TbRPB7 al complejo RNAPI, contribuya a la inusual habilidad de esta polimerasa para transcribir genes codificantes de proteínas en *T. brucei*.

En esta tesis se lleva a cabo un análisis funcional del papel de la subunidad TbRPB7 en la transcripción mediada por la RNAPI en *T. brucei*.

5.1 La transcripción de la RNAPI requiere la subunidad TbRPB7

Para investigar si el efecto de la depleción TbRPB7 observado en el ensayo de la línea doble reportera era debido a una reducción de la transcripción y no a un efecto secundario postranscripcional, llevamos a cabo experimentos de transcripción *in vivo* (*Run-on*) en tripanosomas sanguíneos permeabilizados, donde el mRNA naciente es marcado radiactivamente.

Los ensayos de *Run-on* indican que la depleción de TbRPB7 afecta no sólo la transcripción de la RNAPII, como en otros eucariotas, si no también la transcripción mediada por la RNAPI. Como consecuencia de la depleción de TbRPB7, la señal del mRNA naciente del gen *VSG* y del gen *18S* rDNA (RNAPI) se reducen significativamente, de forma similar que el mRNA de la tubulina (RNAPII), mientras que la transcripción del tRNA (RNAPIII) no se ve afectada. Como control, la depleción de otras subunidades de la RNAPII (TbRPB4) o RNAPIII (TbRPC25) no altera el nivel de transcripción de la *VSG* mientras que sí reduce significativamente la transcripción de la tubulina o el tRNA, respectivamente, corroborando los resultados observados en el ensayo con los genes reporteros y demostrando que TbRPC25, homólogo de la subunidad TbRPB7 funciona exclusivamente en la transcripción de la RNAPIII (Anexo 4.1. Figura 2).

Estos resultados sugieren que el efecto de la depleción de TbRPB7 sobre los genes transcritos por la RNAPI es específico, mientras que la depleción de una subunidad de la RNAPII o RNAPIII no necesariamente afecta la actividad transcripcional de la RNAPI.

5.2 TbRPB7 promueve la transcripción de la RNAPI *in vitro*

Expresamos la proteína TbRPB7 fusionada a una cola de histidina en *E. coli*, para purificarla y analizar su capacidad de promover la actividad del promotor *VSG-ES* en un sistema de transcripción *in vitro* usando extractos celulares de tripanosomas

procíclicos. Como molde utilizamos un plásmido con el promotor del VSG-ES dirigiendo la transcripción de un casete de 377 pb, carente del nucleósido guanósina en su secuencia (*G-less cassette*), situado 2 Kb aguas abajo del promotor. De esta manera, este sistema permite medir la eficiencia de transcripción y elongación *in vitro* (Montanuy et al., 2008).

La adición de proteína TbRPB7 recombinante, incrementa hasta 3 veces la transcripción del fragmento "*G-less*", demostrando que TbRPB7 potencia la transcripción de la RNAPI y es importante para una elongación eficiente (Anexo 4.1. Figura 5). Las RNA polimerasas inician la transcripción inespecíficamente en roturas de DNA desnudo de cadena sencilla, sin embargo, en nuestro sistema de transcripción *in vitro*, el molde es DNA de doble cadena y comprobamos que la transcripción es dependiente del promotor ya que cuando utilizamos este plásmido desprovisto del promotor, no se detectó transcripción alguna.

La transcripción observada es específica de la RNAPI ya que se ve abolida cuando los extractos son inmunodeplecionados de la subunidad mayor, TbRPA1. El mismo efecto se observa cuando inmunodeplecionamos la TbRPB7 endógena presente en los extractos, pero no cuando se usa un antisuero no específico. Estos resultados sugieren que TbRPB7 es esencial para la transcripción y elongación dependiente del promotor del VSG-ES, mediada por RNAPI.

5.3 El complejo RNAPI interactúa con TbRPB7

El efecto en la actividad de genes reporteros junto con los experimentos de transcripción *in vivo* e *in vitro*, apoyan la hipótesis de que TbRPB7 está involucrada en la transcripción mediada por la RNAPI. Sin embargo, en otros estudios no se ha detectado TbRPB7 en complejos RNAPI parcialmente purificados (Nguyen et al., 2007; Nguyen et al., 2006; Walgraffe et al., 2005).

En levaduras, la interacción de RPB7 con el complejo RNAPII es dissociable y el heterodímero RPB4/RPB7 se encuentra casi siempre en cantidades subestequiométricas, dependiendo de las condiciones de crecimiento, de manera que durante la fase exponencial RPB7 se encuentra sólo en el 20% de los complejos RNAPII transcripcionalmente activos (Choder and Young, 1993; Sheffer et al., 1999). Por esta razón en las primeras estructuras cristalinas de la enzima RNAPII de *S. cerevisiae*, usando células en fase exponencial, el heterodímero RPB4/RPB7 no estaba presente

(Cramer et al., 2001). La estructura cristalina completa de la enzima, incluyendo el heterodímero, fue obtenida posteriormente por dos grupos: en uno de ellos usaron células en fase estacionaria donde el heterodímero se encuentra asociado estequiométricamente a los complejos RNAPII (Bushnell and Kornberg, 2003) y en el otro, la estrategia usada fue la purificación del núcleo del complejo al cual adicionaron 5 veces un exceso de heterodímero purificado, para reconstruir la estructura de 12 subunidades (Armache et al., 2003).

Es posible que la interacción de TbRPB7 con el complejo RNAPI sea también subestequiométrica dificultando su copurificación en cantidades suficientes para ser detectada mediante técnicas proteómicas. En las primeras purificaciones del complejo RNAPI de *T. brucei*, la subunidad TbRPB6z, específica de tripanosomas, tampoco estaba presente (Walgraffe et al., 2005). Posteriormente, con un método más eficiente y unas condiciones menos astringentes, se detectó a TbRPB6z junto con otras nuevas subunidades; sin embargo, el complejo purificado es inactivo (Nguyen et al., 2006), sugiriendo que proteínas adicionales, importantes para la actividad transcripcional, son perdidas durante la purificación (Nguyen et al., 2007).

Los datos cristalográficos muestran una interacción directa de RPB7 con las subunidades RPB6 y RPB1 en el complejo RNAPII (Armache et al., 2003; Bushnell and Kornberg, 2003). Mediante ensayos de coimmunoprecipitación (coIP) encontramos que TbRPB7 interactúa con la variante TbRPB6z, fusionada al epítipo TAP (TAP-TbRPB6Z), en los complejos RNAPI. Para descartar posibles interacciones no específicas debidas a la sobreexpresión de proteínas etiquetadas, comprobamos que esta interacción es detectada también entre proteínas endógenas. TbRPB7 coimmunoprecipita con TbRPA1 usando un antisuero policlonal generado contra TbRPB7 (desarrollado en esta tesis), y viceversa usando un anticuerpo policlonal purificado por afinidad contra TbRPA1 (Anexo 4.1. Figura 3). Estos resultados indican que TbRPB7 interactúa con los complejos RNAPI, sin embargo, esta interacción parece inestable ya que el porcentaje detectado con estas condiciones de coIP fue relativamente bajo.

Asimismo, los análisis mediante inmunofluorescencia en tripanosomas sanguíneos, sugieren que TbRPB7 colocaliza parcialmente con TbRPA1 en la periferia del nucleolo donde se encuentran los promotores ribosomales (Landeira and Navarro, 2007) y con el cuerpo nuclear ESB (*Expression Site Body*), que contiene RNAPI fuera del nucleolo, donde se transcribe el VSG-ES activo (Navarro and Gull, 2001), (Anexo 4.1. Figura 4).

Experimentos de marcaje de RNA nascente indican que aunque se detecta RNAPI en todo el nucleolo, los complejos transcripcionalmente activos se localizan solo hacia la periferia nuclear (Navarro et al., 2007). Estos resultados sugieren nuevamente que TbRPB7 se asocia solo a una pequeña parte de los complejos RNAPI activos en el núcleo de la célula, de manera similar a la que sólo se encuentra en los complejos RNAPII transcripcionalmente activos (Choder, 2004; Kornberg, 2007).

5.4 Distribución de TbRPB7 en la cromatina de unidades de transcripción RNAPI y RNAPII

En el anexo 4.2, describimos mediante análisis de inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP), que una fracción de TbRPB7 se localiza en la cromatina del *locus* del VSG-ES activo, de forma similar a la subunidad mayor del complejo RNAPI, TbRPA1, apoyando los resultados descritos en el anexo 4.1 (Penate et al., 2009).

TbRPB7 y TbRPA1 son detectados con un patrón de ocupación similar a lo largo de todo el sitio de expresión del gen VSG activo, mientras que no se detectan significativamente en los VSG-ES inactivos (Anexo 4.2. figura 1). Por lo tanto, TbRPB7 parece estar presente junto con la RNAPI en iniciación, elongación y terminación de la transcripción. En el VSG-ES, TbRPB7 presenta valores de inmunoprecipitación similares a los observados en genes de copia única transcritos por la RNAPII, como la *miosina* (Anexo 4.2. Figura 1). Estudios recientes de distribución genómica de RPB7 y subunidades centrales de la RNAPII (RPB3 y RPB11) en levaduras y células humanas, demuestran que RPB7 se mantiene asociada a los complejos de elongación y es necesaria no sólo para la iniciación de la transcripción, si no también para estabilizar la polimerasa durante la elongación y bajo condiciones de estrés (Cojocarú et al., 2008; Jasiak et al., 2008; Jensen et al., 1998). Además, se ha observado que RPB7 se asocia con menor eficiencia en comparación con subunidades del núcleo de la RNAPII y que este efecto es más pronunciado en algunos genes (Jasiak et al., 2008). Los resultados de Cojocarú et al., muestran además que la ocupación de RPB7 y RPB11 en los sitios de iniciación de la transcripción es mayor que en las regiones aguas abajo del promotor. En nuestro caso, la ocupación en la región del promotor del VSG-ES que se transcribe activamente, está subestimada debido a que los oligos para el qPCR no distinguen entre los promotores de los sitios de expresión inactivos y el activo, ya que son altamente conservados. Sin embargo, la ocupación en el gen de copia única (*Neomicina*)

insertado 1.15 Kb aguas abajo del promotor, que permite medir específicamente las proteínas presentes en el sitio activo, presenta mayor densidad de TbRPA1 y TbRPB7 que en la región del telómero donde se encuentra el gen *VSG* activo a unas 40-60 Kb del promotor.

En cuanto a la localización en la cromatina de TbRPB7 con los complejos RNAPII, que hemos evaluado mediante ChIP-qPCR en algunos *loci* control, encontramos que la ocupación de TbRPB7 y TbRPB1 (la subunidad mayor del complejo RNAPII), es mucho mayor en el promotor y la región codificante del gen *SL RNA*, que en cualquier otra región codificante transcrita por la RNAPII (Anexo 4.2. Figura 3). Resultados similares han sido observados en *T. cruzi*. Mediante análisis de inmunofluorescencia detectan que la RNAPII se concentra en las repeticiones de genes *SL RNA* en el núcleo y que al parecer su distribución es dependiente del estado transcripcional de la célula (Dossin Fde and Schenkman, 2005). Estos resultados concuerdan con estudios en levaduras donde reportan que una alta densidad de RNAPII se une a genes con alta actividad transcripcional mientras que genes con baja actividad transcripcional presentan poco enriquecimiento de RNAPII (Verma-Gaur et al., 2008). De manera que gran parte de la transcripción se encuentra concentrada en pocos genes; el 25% de la transcripción total es debida al 5% de los genes con las tasas más altas de transcripción (Pelechano et al., 2010). Sin embargo, no esperábamos encontrar tan baja densidad de TbRPB1 y TbRPB7 en genes como la *tubulina*, que son transcritos activamente, como componente básico del corsé de microtúbulos (Scott et al., 1997), aunque en *T. cruzi*, las regiones con mayor señal de RNAPII tampoco colocan con los *cluster* de genes α - β *tubulina* (Dossin Fde and Schenkman, 2005). Se ha reportado que la ocupación de RPB7/RPB4 así como la de subunidades núcleo de la RNAPII, varía de acuerdo la longitud del gen, siendo más alta en regiones cercanas al sitio de iniciación de la transcripción (Cojocarú et al., 2008; Verma-Gaur et al., 2008). Sin embargo, otros estudios en levaduras han encontrado que la distribución intragénica de la RNAPII activa parece ser una característica intrínseca de cada unidad de transcripción (Rodríguez-Gil et al., 2010), por lo tanto es posible que en unidades de transcripción policistrónica largas como en la que se encuentran los *clusters* de α - β *tubulina* (Imboden et al., 1987), la densidad de RNAPII y TbRPB7 disminuya a lo largo de la unidad transcripcional.

Desafortunadamente, en tripanosomas el único promotor RNAPII que ha sido ampliamente caracterizado es el del gen *SL RNA* (Gunzl et al., 1997) cuya actividad transcripcional esta por encima del comportamiento general. Como se ha comentado

en la introducción, este gen se transcribe de forma monocistrónica, su región codificante es corta y existen ~200 copias organizadas en repeticiones en tándem, que presentan una altísima tasa de transcripción debido a que se requieren grandes cantidades de SL RNA para el procesamiento de todos los mRNA de la célula, mediante el mecanismo *trans-splicing* (Liang et al., 2003; Perry et al., 1987). No existen promotores RNAPII descritos para las unidades de transcripción policistrónica y tampoco se conoce su actividad transcripcional, por lo tanto, no podemos evaluar la ocupación de TbRPB1 y TbRPB7 en otras unidades transcripcionales RNAPII, diferentes a la del gen *SL RNA*, así como tampoco podemos comparar la ocupación de TbRPB7 encontrada en la unidad de transcripción del *VSG-ES* con la del *SL RNA*, ya que aunque que las dos se transcriben a una tasa alta, existe sólo una copia activa del gen *VSG*.

Además, a pesar de que la transcripción del gen *SL RNA* ha sido atribuida a la misma RNAPII que transcribe las unidades policistrónicas, existen diferencias en cuanto a mecanismo de transcripción involucrado en cada caso. Como se comentaba en la introducción (apartado 2.2.3), para el *SL RNA* se han encontrado factores de transcripción específicos que reconocen secuencias en el promotor para la iniciación, y para la terminación de la transcripción (Das and Bellofatto, 2003; Das et al., 2005; Gruszynski et al., 2006; Palenchar et al., 2006; Ruan et al., 2004; Schimanski et al., 2006; Schimanski et al., 2005), que posiblemente aumentan la capacidad de reclutar RNAPII hacia estos genes, mientras que no se han identificado aun factores de transcripción involucrados en la transcripción de las unidades policistrónicas transcritas por la misma RNAPII.

Las regiones que separan dos unidades de transcripción policistrónica son conocidas como regiones de cambio de hebra (SSR; *strand switch regions*), como se describió en la introducción (apartado 2.3.2). Se ha propuesto que las SSR divergentes podrían ser posibles sitios de iniciación de la transcripción mediada por la RNAP II (Martinez-Calvillo et al., 2003; Siegel et al., 2009). La ocupación de TbRPB1/TbRPB7 que encontramos en una SSR divergente fue aproximadamente 20 veces menor que la encontrada en el gen *SL RNA*, pero 2-4 veces mayor que la detectada en regiones codificantes de transcripción policistrónica como el gen de la *miosina* (Anexo 4.2. Figura 4). Estos resultados concuerdan con lo comentado anteriormente, probablemente en regiones cercanas a los sitios de iniciación de la transcripción, la densidad de RNAPII es más alta y disminuye a lo largo de la unidad transcripcional hasta niveles casi

indetectables como en el caso de la *tubulina*. Sin embargo haría falta evaluar otras SSR y realizar un mapeo de las regiones cercanas a estas, para llegar a una conclusión al respecto. Por otro lado, la ocupación de TbRPB7 en la SSR fue similar a la encontrada en el gen Luciferasa insertado 405pb aguas abajo del promotor VSG-ES activo (Anexo 4.2. Figura 4). Por lo tanto, la ocupación de TbRPB7 encontrada en el VSG-ES activo es similar a la detectada en genes transcritos por la RNAPII como la miosina y una región putativa de iniciación de transcripción policistrónica (SSR).

Actualmente estamos realizando análisis de ChIP y secuenciación masiva (ChIP-*Sequencing*) para obtener una visión global de la distribución genómica de los complejos RNAPI, RNAPII y TbRPB7, con el objetivo de profundizar en el conocimiento de los mecanismos de transcripción en *T. brucei* y la asociación de esta subunidad con los complejos RNAPI y RNAPII.

En resumen, los resultados obtenidos en esta parte de la tesis, muestran que la mayoría de complejos RNAPII, incluyendo la TbRPB7, son reclutados a los genes *SL RNA* altamente transcritos. Por lo tanto, es posible que TbRPB7 interactúe en menor proporción o de manera diferente, con los complejos RNAPI que con los complejos RNAPII, siendo más estable la interacción con el complejo RNAPII. A pesar de esta diferencia TbRPB7 parece conservar una función importante en la estabilidad de la RNAPI activa durante la elongación de unidades largas de transcripción, como el VSG-ES.

Muy recientemente un grupo ha reportado que según sus ensayos, la RNAPI de *T. brucei* funciona independientemente de TbRPB7 (Park et al., 2011), en contraste con nuestros resultados (Penate et al., 2009). Varias diferencias entre los experimentos realizados pueden explicar las discrepancias en los resultados.

Los experimentos de coIP presentados por Park et al., son realizados con las proteínas etiquetadas: PTP-TbRPB6z y TbRPB7-HA, lo cual como ha sido descrito, puede impedir estéricamente las interacciones (Jung et al., 2008). Ellos reportan que mientras el 25% de TbRPB7 interactúa con TbRPB1, un 1% interactúa con TbRPA1, por lo cual concluyen que esa interacción no es significativa, basándose en la suposición de que TbRPB7 debería interactuar de manera similar con los dos complejos. Sin embargo, como ya lo hemos comentado, nosotros detectamos que TbRPB7 interactúa en mayor proporción o con mayor afinidad, con los complejos RNAPII que con los complejos RNAPI. Esto puede ser debido a que como se ha descrito antes, la interacción con RNAPI es independiente de TbRPB4 o alguna subunidad homóloga de esta, a

diferencia de los complejos RNAPII donde TbRPB4 está presente estabilizando la interacción con RPB7 (Sheffer et al., 1999). Por lo tanto, no resulta sorprendente que la interacción de TbRPB7 con la RNAPI pueda ser incluso más lábil que la reportada con los complejos RNAPII.

En levaduras se ha demostrado que la delección de RPB4 reduce la cantidad de RPB7 unida a los complejos RNAPII a niveles indetectables por coIP, pero suficientes para mantener el complejo activo. RPB7 sólo es detectable en estos complejos cuando es sobreexpresada, y aún así se encuentra en menor cantidad que cuando está presente RPB4 (Sheffer et al., 1999). Con lo cual una interacción de baja afinidad con RNAPI en ausencia de RPB4 es de esperarse.

Park et al., realizan experimentos de CHIP con las subunidades TbRPB7, TbRPB6z y TbRPB9 etiquetadas con un epítipo PTP, a diferencia de nuestros análisis que han sido realizados utilizando anticuerpos hacia las subunidades endógenas; TbRPB7, TbRPA1 y TbRPB1, evitando posibles artefactos ocasionados por las etiquetas. Como comentamos anteriormente, los VSG-ES teloméricos son altamente conservados, por lo cual utilizamos líneas celulares transgénicas con marcadores insertados debajo de los promotores para diferenciar la ocupación de proteínas del VSG-ES activo. Por el contrario, Park et al., analizan regiones muy conservadas del promotor VSG-ES, con lo cual el bajo enriquecimiento que obtienen no es específico del VSG-ES activo ya que los oligos amplifican también los otros ~19 promotores inactivos, lo cual resulta en un valor subestimado. Además, ellos comparan el enriquecimiento de la TbRPB7 obtenido en el promotor *SL RNA* con en el promotor VSG-ES, lo cual como discutíamos anteriormente no es una comparación equitativa, debido a las características inusuales de la transcripción del gen *SL RNA*.

Otra discordancia encontrada con Park et al., es requerimiento de TbRPB7 en la transcripción mediada por RNAPI. Nuestros resultados obtenidos utilizando experimentos *in vivo*, como las medidas de actividades reporteras y ensayos de transcripción *in vitro* e *in vivo* con sus respectivos controles, apoyan nuestra hipótesis y descartan que se trate de una consecuencia indirecta de la depleción de TbRPB7. Sus conclusiones se basan en resultados obtenidos con un método de transcripción *in vitro* y *primer-extension* usando extractos de proteínas. Con este ensayo, Park et al., reportan que la depleción de TbRPB7-PTP interfiere con la transcripción del promotor RNAPII pero no con la del promotor RNAPI. Además de que la depleción de RPB7-PTP no es completa y que la cantidad remanente puede ser suficiente para mantener la

transcripción de los promotores RNAPI, se ha descrito que el requerimiento de RPB4/RPB7 para la transcripción *in vitro* dependiente de promotor, puede ser suplantado por un activador transcripcional como GAL4 adicionado a la reacción (Edwards et al., 1991), por lo tanto puede haber un factor de transcripción putativo en los extractos que esté supliendo parcialmente la carencia de TbRPB7 en los complejos RNAPI.

Por último Park et al., muestran una inmunofluorescencia en células procíclicas donde no se encuentra el cuerpo nuclear ESB y señalan que TbRPB7-PTP no colocaliza con el nucleolo usando un marcador nucleolar (NOP10), que no está involucrado en transcripción. Nuestros estudios demuestran que TbRPB7 se localiza en la periferia nucleolar donde se encuentran los complejos RNAPI transcripcionalmente activos (Navarro et al., 2007), y además colocaliza parcialmente con el ESB.

En resumen los datos sugieren que TbRPB7 no es una subunidad núcleo de la RNAPI en tripanosomas, si no que funciona como una subunidad disociable o como un cofactor en la transcripción del VSG-ES. Es importante resaltar que aunque se ha descrito que la RPB7 en levaduras y humanos puede también desempeñar diferentes papeles independientemente del complejo RNAPII (Na et al., 2003; Selitrennik et al., 2006), nuestros resultados en su conjunto sugieren que el papel de RPB7 en la transcripción de la RNAPI en *T. brucei*, es a nivel de transcripción. Sin embargo, será necesario nuevas aproximaciones y experimentos para investigar las diversas funciones que pueda desempeñar RPB7 en la transcripción tan particular de *T. brucei*.

5.5 Posible interacción de TbRPB7 con una SUMO E3 ligasa.

Con el objetivo de investigar la función de TbRPB7 en la transcripción mediada por la RNAPI y en la búsqueda de posibles interacciones con proteínas involucradas en la regulación de la transcripción, se realizó un ensayo de doble híbrido en levadura (Y2H) usando como cebo la proteína TbRPB7.

Mediante este ensayo se identificaron varias proteínas que podrían interactuar con la TbRPB7 (Anexo 4.3. Tabla S1). Entre estas, una proteína resultó ser muy interesante dado que en un *screening* preliminar su depleción afectaba la actividad del promotor del VSG-ES. Análisis bioinformático de los dominios funcionales que presentaba su secuencia nos permitió identificarla como una SUMO E3 ligasa, la cual hemos denominado TbSIZ1 en esta tesis. Aunque se ha descrito la presencia del grupo

SUMO en *T. brucei* (Liao et al., 2010), TbSIZ1 es la primera SUMO E3 ligasa identificada en *T. brucei*, que potencialmente interactúa con TbRPB7. TbSIZ1 presenta un dominio conservado tipo SP-RING, que está presente en otras SUMO E3 ligasas de eucariotas superiores y que es esencial para la actividad SUMO ligasa *in vivo* (Melchior et al., 2003).

Desafortunadamente, la interacción entre TbRPB7 y TbSIZ1 sugerida por los resultados del doble híbrido, no ha sido posible confirmarla utilizando el método de coIP de las proteínas endógenas. Para llevar a cabo los experimentos de coIP se generaron anticuerpos policlonales y monoclonales frente a TbSIZ1, además del antisuero frente a TbRPB7 obtenido anteriormente (Anexo 4.1). Estos ensayos no permitieron detectar TbRPB7 asociada a TbSIZ1 utilizando varias condiciones experimentales de coIP y diferentes extractos celulares. La técnica del Y2H es muy sensible y permite detectar todo tipo de interacciones de alta, mediana y baja afinidad, pero tiene una alta probabilidad de falsos positivos por lo cual es necesario confirmar las interacciones por técnicas de mayor confiabilidad. Sin embargo, las interacciones de baja afinidad pueden ser difíciles de detectar mediante coIP, este método es más recomendable para interacciones fuertes y estables porque los complejos no se desensamblan fácilmente, mientras que las interacciones transitorias, que controlan la mayoría de procesos celulares, requieren de condiciones específicas para promover y mantener la interacción. En nuestro caso la interacción de TbRPB7 y TbSIZ1 podría ser débil o transitoria como parte de una cascada enzimática.

Actualmente seguimos intentando validar esta interacción, buscando condiciones que puedan estabilizarla y facilitar su detección. A pesar de que no pudimos confirmar la interacción por coIP, decidimos investigar el posible papel de TbSIZ1 en la cascada enzimática de SUMOilación en *T. brucei* y su posible función en la regulación de la expresión de la VSG. Los estudios funcionales que se describen a continuación parecen apoyar la hipótesis de que la interacción entre TbRPB7 y TbSIZ1 ocurre *in vivo*.

En *T. brucei* se ha descrito recientemente la existencia de un gen ortólogo de SUMO (Liao et al., 2010), ese estudio demostró que la SUMOilación es esencial en tripanosomas como en la mayoría de organismos. Sin embargo, tanto los procesos celulares en los cuales está involucrada, como los posibles sustratos y el mecanismo de conjugación de SUMO, son en su mayoría desconocidos. Un estudio muy reciente en *T. cruzi* presenta el primer análisis proteómico a gran escala de los posibles sustratos de SUMO en tripanosomas, en el cual identifican 236 proteínas con diversas funciones

biológicas, de las cuales validan una metacaspasa como primer sustrato de SUMOilación identificado en *T. cruzi* (Bayona et al., 2011).

La depleción de SUMO mediante RNAi en formas procíclicas y sanguíneas de *T. brucei*, ocasiona severos defectos en la progresión de ciclo de celular y la morfología (Liao et al., 2010; Obado et al., 2011). En contraste, la depleción de TbSIZ1, no afecta significativamente el crecimiento ni la progresión del ciclo celular (Anexo 4.3. Figura 6) como ha sido descrito en otras SUMO ligasas como Pli1 de *S. pombe* y Siz1, Siz2 de *S. cerevisiae*, cuya deleción no es letal y tampoco causa defectos en el crecimiento (Johnson, 2004; Xhemalce et al., 2004). No obstante, el RNAi de TbSIZ1 causa hasta un 50% de reducción en la señal nuclear de proteínas SUMOiladas (Anexo 4.3. Figura 6D), sin afectar significativamente el patrón general de SUMOilación detectado por análisis de *Western blot*. Estos resultados sugieren que el efecto de la depleción de la SUMO E3 ligasa, no es sobre la SUMOilación general como el RNAi de SUMO, si no que por el contrario es más específico, de acuerdo con la función descrita para este tipo de enzimas (Johnson and Gupta, 2001; Takahashi et al., 2001a; Takahashi et al., 2001b). En la cascada enzimática de la SUMOilación existe sólo una enzima E2 de conjugación, pero en general hay más de una SUMO E3 ligasa involucrada en la transferencia de SUMO a diferentes sustratos (Girdwood et al., 2004). Por lo tanto, es posible que en *T. brucei* existan otras SUMO E3 ligasas encargadas de catalizar la transferencia del grupo SUMO en otros procesos celulares, lo que explicaría que no detectemos una reducción significativa en el patrón de SUMOilación analizado por *Western blot*. Nuestros análisis bioinformáticos han permitido identificar cuatro proteínas hipotéticas en el genoma de *T. brucei* que presentan el dominio SP-RING conservado y por lo tanto pueden ser potenciales SUMO E3 ligasas de este tipo (Anexo 4.3. Figura S1).

5.6 SUMOilación de proteínas asociadas a la cromatina del VSG-ES activo

Uno de los resultados más interesantes, descrito por primera vez en esta tesis, es la determinación de la presencia de proteínas SUMOiladas asociadas específicamente a la cromatina del sitio de expresión activo de la *VSG*, detectado mediante ensayos de ChIP-qPCR e inmunofluorescencia, utilizando un anticuerpo frente al grupo SUMO. Se han detectado proteínas SUMOiladas asociadas a cromatina a lo largo de toda la unidad transcripcional activa, desde ~1Kb aguas arriba del promotor hasta el gen *VSG* telomérico, con una mayor densidad concentrada en la zona aguas arriba del promotor

(Anexo 4.3. Figuras 4 y 5). Es importante resaltar que no se detectan niveles significativos de SUMOilación en la cromatina de otros genes transcritos por la RNAPI (*prociclina* y *18S rDNA*) ni en otros *loci* transcritos por la RNAPII y RNAPIII, que han sido analizados. Análisis de localización nuclear muestran que una alta densidad de proteínas SUMOiladas se concentran en el VSG-ES activo (Anexo 4.3. Figura 3). Aunque se detecta una señal de proteínas SUMOiladas difusamente distribuida en el nucleoplasma, también se observa un área con mayor concentración de proteínas SUMOiladas que colocaliza parcialmente con la RNAPI activa en el cuerpo nuclear ESB, al que se asocia el VSG-ES activo para ser transcrito (Landeira and Navarro, 2007; Navarro and Gull, 2001).

Como se comentó en la introducción (apartado 2.2.4), la regulación de la transcripción parece ser el proceso más comúnmente asociado con la SUMOilación en eucariotas. Los tres grupos principales de sustratos modificados con SUMO en la célula son: factores de transcripción, proteínas involucradas en la organización nuclear y biogénesis, y proteínas implicadas en el metabolismo del DNA (Wohlschlegel et al., 2004). La SUMOilación ha sido mayormente asociada con represión de la transcripción (García-Domínguez and Reyes, 2009; Nathan et al., 2006; Shiio and Eisenman, 2003), sin embargo, en un número creciente de trabajos se ha descrito su función como activador de la transcripción, modulando de forma positiva la actividad de factores de transcripción específicos y coreguladores (Alm-Kristiansen et al., 2011; Guo and Sharrocks, 2009; Lyst and Stancheva, 2007; Martin et al., 2009; Sharrocks, 2006). El mecanismo molecular que regula la expresión monoalélica de la VSG debe asegurar la transcripción de sólo un VSG-ES mientras los demás promotores inactivos se mantienen silenciados. Sin embargo, no se detectan proteínas SUMOiladas en los promotores de los VSG-ES inactivos ni en los genes VSG teloméricos inactivos, lo cual sugiere que el papel de SUMO en la transcripción de la VSG es activador y no represor. Resultados similares han sido reportados en levaduras, donde SUMO se encuentra asociado con genes transcritos constitutivamente y en promotores de genes inducibles cuando son activados, pero no se detecta en genes reprimidos y ni en promotores no inducidos (Rosonina et al., 2010). En humanos se ha descrito que en respuesta al choque térmico PIAS, SUMO y Ubc9 son reclutados al promotor del gen HSP70.1 para la SUMOilación de PARP-1 (Martin et al., 2009).

De entre los *loci* transcritos por la RNAPI en tripanosomas, únicamente se han detectado proteínas SUMOiladas en la cromatina del VSG-ES. El *locus* de la *prociclina*

que también se transcribe por la RNAPI carece de proteínas SUMOiladas, sin embargo, en la forma sanguínea estos genes no se transcriben. Por el contrario, aunque el *locus* del rDNA está altamente enriquecido de TbrPA1, su cromatina no presenta niveles significativos de SUMO en ninguna de las tres regiones analizadas por ChIP, que incluyen el promotor, el gen *18S* y el espaciador ribosomal (Anexo 4.3. Figura 4). Estos resultados sugieren que la asociación de proteínas SUMOiladas a la cromatina es específica para la transcripción de la *VSG* y no esta involucrada en la transcripción mediada por la RNAPI en general. La región más enriquecida de proteínas SUMOiladas se localiza aguas arriba del promotor del *VSG-ES*, donde no se detectan niveles significativos de TbrPA1, lo que sugiere que la SUMOilación de la RNAPI no es la responsable de la señal de SUMO en esta región. No obstante, RPA1 ha sido descrita como sustrato de SUMOilación en análisis de proteómica a gran escala en plantas y levaduras (Miller et al., 2010; Wohlschlegel et al., 2004), sin embargo, se desconoce bajo qué condiciones ocurra esta modificación. En levaduras la RPB1 es SUMOilada en respuesta al daño por UV y está involucrada en la reparación del DNA (Chen et al., 2009). De cualquier forma, las proteínas SUMOiladas detectadas ~1 Kb aguas arriba del promotor de la *VSG* no concuerdan con la localización de TbrPA1, ya que la polimerasa no se encuentra unida en esta región. Por lo tanto, las proteínas SUMOiladas detectadas aguas arriba del promotor probablemente son diferentes a la RNAPI, sin embargo, aguas abajo del promotor no podemos descartar que TbrPA1 pueda ser una de las proteínas SUMOiladas.

5.7 Papel de TbSIZ1 en la SUMOilación del *VSG-ES* activo

En el anexo 4.3 presentamos evidencias que sugieren que TbSIZ1 funciona como una SUMO E3 ligasa *in vivo* y es responsable, al menos en parte, de la SUMOilación detectada en *VSG-ES* activo. La depleción de esta proteína causa reducción en la SUMOilación de la cromatina detectada a lo largo de todo *VSG-ES*, lo cual coincide con una disminución en el nivel de RNAPI reclutada, que a su vez resulta en una reducción de la transcripción de la *VSG* activa (Anexo 4.3. Figura 7).

Estos resultados sugieren que una SUMOilación eficiente es necesaria para mantener altos los niveles de transcripción de la *VSG*, y muestran que la función de SUMO en este caso es en la activación y no en la represión de la transcripción. Resultados similares han sido observados en levaduras, donde la SUMOilación de

proteínas en genes activamente transcritos es dependiente de la enzima E2 de conjugación, Ubc9. La disminución de los niveles de SUMO en los genes constitutivos como consecuencia de la inactivación de Ubc9, causa una reducción en los niveles de RNAPII, pero en este caso los niveles de mRNA no son significativamente afectados. Sin embargo, la reducción de la SUMOilación en los promotores inducibles tiene un efecto contrario, resultando en un aumento de la transcripción. En ese caso la carencia de SUMO afecta la capacidad de la célula de reprimir la transcripción de los genes inducidos cuando la señal de activación desaparece. Por lo tanto, en los promotores inducibles el papel de SUMO parece ser el de regular los niveles de transcripción de estos genes mediante un mecanismo que funciona a modo de interruptor (Rosonina et al., 2010).

En el futuro planeamos investigar si en *T. brucei*, existen promotores inducibles que puedan ser SUMOilados cuando son activados. Sin embargo, el único ejemplo conocido de promotores inducibles son los que se regulan durante el desarrollo del parásito. En el caso del promotor de la *prociclina* que no se encuentra SUMOilado en la forma sanguínea, quizás en la forma procíclica del parásito donde se transcribe activamente, éste sea SUMOilado mientras que el promotor de la *VSG* pierda la SUMOilación. Ensayos preliminares de ChIP utilizando cromatina aislada de la forma procíclica, no han proporcionado resultados concluyentes, y será necesario poner a punto la técnica en esta forma del desarrollo del parásito. En células humanas se ha descrito que la modificación con SUMO tiene un papel regulador positivo de la ciclina D1, lo cual constituye una forma de regulación de la entrada al ciclo celular y la senescencia (Wang et al., 2011). Las diferencias en el patrón general de proteínas SUMOiladas encontradas entre forma sanguínea y la forma procíclica (Anexo 4.3. Figura 2A), nos permite especular en la posibilidad de que la modificación de sustratos sea diferente en cada fase del desarrollo.

Es importante mencionar que cuando se depleciona TbSIZ también detectamos una reducción en la ocupación de la RNAPI y el nivel de transcripción del DNA ribosomal (Anexo 4.3. Figura 7), a pesar de que no se detecta SUMOilación significativa en la cromatina de este locus (Anexo 4.3. Figura 4). Este resultado podría explicarse por la presencia de un factor adicional, SUMOilado por TbSIZ que sea requerido para la transcripción de la RNAPI, sin embargo, dicho factor podría no estar asociado directamente a la cromatina y por lo tanto no se detecta por ChIP. También es posible que exista SUMOilación en la cromatina del rDNA en una región no se haya analizado

todavía, en ese caso la SUMOilación de este locus no seguiría el mismo patrón que la del VSG-ES, ya que en el VSG-ES se detectan proteínas SUMOiladas a lo largo de toda la unidad transcripcional, mientras que en el locus rDNA se han analizado 3 regiones (promotor, gen *18S* y espaciador) y ninguna presenta SUMOilación significativa de la cromatina. En resumen este dato sugiere que TbSIZ podría ser importante no solo para la SUMOilación de proteínas asociadas a la cromatina detectadas en el VSG-ES, si no también para la actividad o estabilidad del complejo RNAPI.

La SUMO ligasa TbSIZ1 no se detecta por ChIP en las regiones donde se encuentran proteínas SUMOiladas asociadas, pero su depleción causa una reducción en los niveles de SUMO de dichas regiones. Es posible que la SUMO ligasa no esté presente en estas regiones porque las proteínas son SUMOiladas antes de ser ensambladas a la cromatina, en ese caso la transferencia de SUMO no tendría lugar *in situ*, si no que por el contrario las proteínas ya modificadas serían reclutadas al promotor activo. En el caso de la enzima Ubc9 de levaduras, ésta es detectada por ChIP solamente en los promotores de los genes inducibles cuando están activos, mientras que en los genes expresados constitutivamente no se detecta, a pesar de que los dos tipos de promotores se encuentran proteínas SUMOiladas (Rosonina et al., 2010). Otra posibilidad es que se requiera poca cantidad de TbSIZ1 para catalizar la transferencia de SUMO *in situ* y que la interacción sea transitoria por lo tanto no se detecta en una localización específica. No obstante, no podemos excluir la posibilidad de que los anticuerpos obtenidos no sean apropiados para la técnica del ChIP y que la SUMO ligasa esté presente pero no sea detectada.

Como se mencionaba en la introducción, las SUMO E3 ligasas determinan la especificidad del sustrato y catalizan la transferencia del grupo SUMO, por lo tanto están directamente relacionadas con la regulación de la SUMOilación. Las proteínas PIAS en humanos que funcionan como SUMO E3 ligasas tipo SP-RING, fueron descritas en un principio como inhibidores del factor de transcripción STAT (Chung et al., 1997), sin embargo, recientemente se ha demostrado su función como potenciadores de la actividad del factor de transcripción c-Myb en focos nucleares con RNAPII activa (Alm-Kristiansen et al., 2011). Por lo tanto, la función de las proteínas PIAS puede ser activadora o represora dependiendo del contexto de las proteínas modificadas. Además, se ha reportado que su función puede ser modulada por otras modificaciones postraduccionales como la fosforilación y la metilación (Zhao, 2007). Por otro lado, la SUMO E3 ligasa de levaduras, Pli1p ha mostrado tener un papel en la

regulación de la recombinación ilegítima en secuencias repetidas de heterocromatina presentes en los centrómeros y los telómeros, así como también está involucrada en el silenciamiento telomérico (Xhemalce et al., 2004).

El hallazgo de que la SUMOilación tiene un papel positivo en la regulación de la transcripción de la *VSG* y que una SUMO E3 ligasa tipo SP-RING parece estar involucrada en esta regulación, genera muchas preguntas, como por ejemplo: cuáles son las posibles proteínas diana que son modificadas y la forma en que SUMO modula su actividad en *T. brucei*.

TbSIZ1 podría ser parte de un complejo multiproteico, como la SUMO E3 ligasa Mms21, que forma un complejo con las proteínas de mantenimiento estructural de la cromatina Smc5/6, siendo Smc5 a la vez su sustrato. Este complejo se ha relacionado con la reparación del DNA y la organización de la cromatina (Zhao and Blobel, 2005). Otras proteínas involucradas en la organización de la cromatina también se han encontrado modificadas con SUMO. Por ejemplo, la SUMOilación de Pds5, implicada en el mantenimiento de la cohesión de las cromátidas hermanas, promueve la disolución de la cohesión (Stead et al., 2003). En *T. cruzi* la subunidad del complejo cohesina SMC3, es uno de los posibles sustratos de SUMOilación encontrados en el análisis proteómico a gran escala (Bayona et al., 2011). En *T. brucei* se ha descrito el retraso de la separación de las cromátidas hermanas del *VSG*-ES activo, con respecto a otros *loci* control, y que la depleción del complejo cohesina provoca un incremento en la frecuencia de cambio antigénico de la *VSG* (Landeira et al., 2009). Estos resultados, junto con datos de análisis a gran escala de proteínas SUMOiladas (Wohlschlegel et al., 2004), sugieren que las proteínas que organizan dominios transcripcionales de la cromatina podrían ser posibles candidatos de SUMOilación involucrados en la transcripción de la *VSG*.

Las topoisomerasas I y II también han sido encontradas modificadas por SUMO en levaduras y humanos; cuando son modificadas se localizan apropiadamente y participan en la disociación de las cromátidas hermanas y la reparación del DNA (Azuma et al., 2005; Mao et al., 2000). En *T. brucei* existen tres topoisomerasas tipo I (ScoCCA and Shapiro, 2008); la TOPO3 β ha sido relacionada con en el control del cambio de la *VSG*, eliminando intermediarios de recombinación indeseables (Kim and Cross, 2010). Curiosamente la TOPO3 α , cuya función no se ha descrito, es otra de las proteínas identificadas en el Y2H de TbRPB7 junto con la SUMO E3 ligasa, lo cual sugiere que también podría ser un sustrato de SUMOilación.

La SUMOilación de histonas se ha detectado en promotores inactivos, por lo cual está normalmente asociada con represión de la transcripción; en *S. cerevisiae* las cuatro histonas principales son SUMOiladas (Nathan et al., 2006). Las histonas podrían ser otros posibles sustratos en *T. brucei*, pero en este caso la SUMOilación tendría un papel positivo en la regulación, lo cual no se ha descrito anteriormente. Recientemente se ha reportado que el VSG-ES activo está deplecionado de histonas (Figueiredo and Cross, 2010; Stanne and Rudenko, 2010). Sin embargo, estos trabajos se ha realizado utilizando anticuerpos frente a las histonas nativas, por lo que si estuvieran modificadas por SUMO podrían no ser detectadas.

Como se ha comentado en la introducción (apartado 2.4.4.), una de las consecuencias de la modificación con SUMO consiste en la relocalización de reguladores transcripcionales a diferentes compartimentos subnucleares (Heun, 2007), de hecho varias proteínas nucleares son dependientes de SUMOilación para su adecuada localización (Pichler and Melchior, 2002). Estos trabajos descritos previamente junto con nuestros resultados, sugieren la hipótesis de que TbSIZ1 podría tener una función similar mediando la SUMOilación de factores para reclutarlos en el ESB donde se lleva a cabo la transcripción del VSG-ES.

Mediante ChIP confirmamos que TbrPA1 no es reclutada simultáneamente en todos los promotores de los VSG-ES, al contrario de como ha sido sugerido en otros trabajos (Vanhamme et al., 2000). Nuestros resultados indican que hay 50 veces más TbrPA1 en el promotor VSG activo que en los inactivos. La SUMOilación de la cromatina podría ser uno de los mecanismos mediante el cual se regula el reclutamiento de TbrPA1 a un único promotor.

En conjunto, los resultados sugieren que la SUMOilación de una o más proteínas, podría ser necesaria para el ensamblaje y organización de la maquinaria de transcripción; factores de transcripción u otras proteínas como factores de remodelación de la cromatina, implicados en la transcripción de un único VSG-ES. Una hipótesis probable sería que la SUMOilación esté mediando la localización de los factores ensamblados en el ESB siguiendo el modelo de las factorías transcripcionales, pero el mecanismo molecular que subyace en la activación y las proteínas involucradas es aún desconocido.

La transcripción de la VSG y el mantenimiento de la expresión monoalélica parecen ser controlados a múltiples niveles. Recientemente, varias proteínas han sido involucradas en el silenciamiento de las VSGs inactivas, como por ejemplo la proteína

telomérica RAPI1, la histona metiltransferasa DOT1, el factor ISWI y el complejo remodelador de la cromatina FACT (Denninger et al., 2010; Figueiredo et al., 2008; Hughes et al., 2007; Yang et al., 2009). La depleción de la mayoría de estas proteínas causa la pérdida de silenciamiento de los promotores VSG inactivos, pero la transcripción de éstos no es productiva ya que no se refleja en un incremento en los niveles de mRNA de las VSG inactivas, la transcripción de dichos promotores sólo se extiende unas kilobases, sin alcanzar la VSG telomérica. Por lo tanto, deben existir otros factores que controlen la elongación y la transcripción productiva de la VSG activa.

La unidad de transcripción del VSG-ES es mucho más larga que una unidad de transcripción de rDNA y además su transcripción debería estar acoplada a la maquinaria de procesamiento del pre-mRNA, por lo que es posible que la transcripción de la VSG involucre factores de elongación y procesamiento de RNA distintos a los del rDNA y que alguno de estos factores esté SUMOilado.

Sólo hemos detectado proteínas SUMOiladas en la cromatina del VSG-ES, pero en los análisis por *Western blot* e inmunofluorescencia es obvio que existen gran cantidad de proteínas SUMOiladas en *T. brucei*, como en otros organismos (Bayona et al., 2011). Sin embargo, muchas de esas proteínas puede que estén involucradas en otros procesos biológicos y no estén directamente asociadas a la cromatina. También es importante tener en cuenta que en este estudio sólo se han analizado algunos *loci*, lo que representa apenas un pequeño porcentaje del genoma. Actualmente, estamos realizando análisis de ChIP y secuenciación masiva (ChIP-*sequencing*) para obtener la ocupación global de proteínas SUMOiladas en el genoma de *T. brucei*.

En cuanto a la interacción de TbRPB7 con TbSIZ1, es necesario realizar más experimentos para validar y caracterizar esta interacción. La función biológica, el momento y lugar donde ocurre son todavía desconocidos. Sabemos que las dos proteínas están implicadas en la regulación de la transcripción de la VSG activa ya que la depleción de ambas tiene un efecto similar, sin embargo, ninguna de las dos proteínas parece estar asociada a la región de cromatina con mayor densidad de proteínas SUMOiladas aguas arriba de promotor. Como discutimos anteriormente, puede que las proteínas reclutadas a la cromatina sean previamente SUMOiladas en otro lugar, por otro lado TbRPB7 es detectada aguas abajo del promotor donde podría contribuir al reclutamiento de TbSIZ para SUMOilar factores necesarios para la elongación eficiente del VSG-ES activo.

TbRPB7 no se ha reportado como sustrato de SUMOilación en otros organismos y nosotros tampoco la hemos detectado SUMOilada en ensayos de inmunoprecipitación (datos no mostrados). Además, el dominio mínimo de interacción de TbSIZ1 obtenido con los dos clones del Y2H no se solapa con el dominio SP-RING, por lo tanto es poco probable que la interacción sea de esta naturaleza. Una posible hipótesis es que TbRPB7 y TbSIZ1 formen parte de un complejo multiproteico como la SUMO E3 ligasa Mms21 (Zhao and Blobel, 2005). Actualmente estamos generando líneas celulares que expresen una versión de TbSIZ1 fusionada al TAP (*tandem affinity purification*) (Puig et al., 2001) para la purificación del posible complejo proteico, de esta manera podremos también identificar posibles sustratos y otras enzimas de la cascada de SUMOilación, como la E2 de conjugación, que se ha encontrado asociada a la E3 ligasa en otros estudios (Martin et al., 2009).

Teniendo en cuenta que la subunidad TbRPB7 tiene una función reguladora en la transcripción de RNAPII, la presencia de factores SUMOilados podría influenciar también la elección del promotor. Mediante ensayos de Y2H se ha encontrado que en humanos RPB7 (hsRPB7) interactúa con dos factores de transcripción: la proteína oncogénica híbrida Ews-Fli1 y el receptor del ácido retinoico, modulando su actividad transcripcional (Petermann et al., 1998; Shen et al., 1999). También se ha reportado (hsRPB7) aumenta la transcripción del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), y su función es regulada mediante su unión al complejo de ubiquitinación VHL, independientemente de la RNAPII (Na et al., 2003). Es posible que en *T. brucei*, TbRPB7 funcione de forma independiente reclutando factores de transcripción específicos para la entrada del complejo RNAPI en el promotor del VSG-ES, pero serán necesarios más experimentos para validar esta hipótesis.

El papel de la SUMOilación en la regulación de la transcripción parece ser un proceso evolutivamente conservado en eucariotas. En levaduras, ha demostrado estar involucrado en activación de la transcripción (Rosonina et al., 2010), mientras que en eucariotas superiores SUMO parece tener un papel también en la represión de la transcripción (Onishi et al., 2009). La búsqueda de sustratos de TbSUMO y el estudio de las enzimas involucradas en la cascada de SUMOilación serán necesarios para desvelar el mecanismo detallado mediante el cual SUMO está regulado la transcripción en *T. brucei*, además de contribuir al conocimiento de cómo este proceso ha evolucionado en el linaje eucariota.

Conclusiones

6. Conclusiones

1. En *Trypanosoma brucei*, la depleción de la subunidad de la RNAPII, TbRPB7, afecta la transcripción mediada por la RNAPI *in vivo*. En ensayos de transcripción *in vitro*, la adición de TbRPB7 recombinante y su inmunodepleción incrementa o disminuye respectivamente, la actividad del promotor *VSG*.
2. TbRPB7 interactúa con las subunidades TbRPA1 y TbRPB6z específicas del complejo RNAPI, aunque en menor proporción o de forma diferente, con los complejos RNAPI que con los complejos RNAPII.
3. TbRPB7 y TbRPA1 muestran un perfil de ocupación similar en análisis de inmunoprecipitación de cromatina (ChIP) a lo largo del sitio de expresión *VSG* activo, sin embargo, no se detecten significativamente en los sitios de expresión inactivos.
4. Entre las proteínas identificadas por doble híbrido (Hybrigenics) utilizando TbRPB7 como cebo, se seleccionó para su caracterización funcional a una SUMO E3 ligasa del tipo SIZ/PIAS-RING (TbSIZ1) que se expresa mayoritariamente en la forma sanguínea del parásito.
5. La depleción de la SUMO E3 ligasa, TbSIZ1, reduce parcialmente la localización nuclear de proteínas SUMOiladas.
6. Las proteínas SUMOiladas están distribuidas en el núcleo, aunque se distingue un foco con mayor intensidad que colocaliza parcialmente con el locus *VSG-ES* activo y con el cuerpo nuclear ESB.
7. La SUMOilación de la cromatina parece ser característica del sitio de expresión activo de la *VSG*, ya que no ha sido detectada en otros *loci* analizados. El patrón de SUMOilación se extiende desde la región más enriquecida, localizada ~1Kb aguas arriba del promotor, hasta la *VSG* telomérica. Por el contrario, no se detecta SUMOilación en promotores o *VSGs* inactivos, lo que sugiere una función positiva en la regulación de la transcripción de la *VSG*.
8. La SUMO E3 ligasa, TbSIZ1, es necesaria para la eficiente SUMOilación detectada en la cromatina del sitio de expresión activo de la *VSG*, ya que la depleción de TbSIZ1 reduce la ocupación de proteínas SUMOiladas asociadas a la cromatina.

9. La depleción de TbSIZ1, causa una reducción en la ocupación de la RNAPI en la cromatina y su nivel de transcripción disminuye, tanto en el sitio de expresión activo de la *VSG* como en el gen ribosomal *18S*, lo que sugiere un papel regulador de TbSIZ en la transcripción de la RNAPI.
10. En conjunto estos resultados sugieren que la SUMOilación de la cromatina en el sitio de expresión activo de la *VSG* es un factor importante para la regulación de la expresión de la *VSG*.

Anexo otras publicaciones



Contents lists available at ScienceDirect

Molecular & Biochemical Parasitology



Letter to the Editors

Role of RPB7 in RNA pol I transcription in *Trypanosoma brucei*

In eukaryotes, RPB7 has been described as a dissociable subunit of the RNA polymerase II complex, usually referred to as a polymerase co-factor, which together with RPB4 forms a heterodimer recruited to RNA pol II complexes only at initiation/elongation [1,2]. Ample evidence indicates that this dissociable RPB7 subunit is not a part of the stably assembled polymerase core complex [3–5], and thus not a regular (bona fide) subunit [1,2]. We previously described the unexpected requirement of RPB7 for RNA pol I transcription in *Trypanosoma brucei* [6], and whilst some results presented by Park et al. in this issue of MBP are not incompatible with ours, their interpretation is different. We discuss below some of these discrepancies to clarify several issues relevant for the field.

We previously described a low-affinity interaction of RPB7 with RPA1 [6]. Park et al. indicate that whilst 25% of RPB7 interact with RPB1, only 1% of RPB7 interacts with RPA1. They conclude that the latter interaction is not significant, based on the assumption that RPB7 interacts in a similar manner with either RNA pol I or RNA pol II. However, this is not the case, as the interaction of RPB7 with RNA pol I (but not with RNA pol II) is RPB4-independent [6]. In eukaryotes, RPB4 forms a heterodimer with RPB7 which stabilizes the interaction with the RNA pol II core complex [1]. In yeast, deletion of RPB4 reduces the amount of RPB7 bound to RNA pol II to non-detectable levels by co-IP, and RPB7 can only be detected in the complex upon overexpression [7]. Thus, a low affinity interaction of RPB7 with RNA pol I in the absence of RPB4 is not unexpected. Interpretation of the biochemical experiments presented by Park et al. is further complicated by the lack of some complex subunits such as RPB12 and RPB10 in the case of RNA pol II, and the use of epitope-tagged subunits rather than endogenous proteins which may lead to steric problems.

Park et al. suggest that RPB7 does not colocalize with the nucleolus. However, they used procyclic cells which lack extra-nucleolar RNA pol I transcription, and NOP10 as a nucleolar marker (a protein not involved in transcription), and did not perform 3D microscopic analysis. Our data indicate that whilst RPB7 is not localized to the nucleolar centre, it co-localizes with RPA1 at the nucleolar periphery, where the rDNA promoters are located [8]. *In situ* labeling of nascent RNA further indicates that active RNA pol I localizes to the nucleolar periphery, with no nascent RNA at the nucleolar centre [6,9]. The co-localization of RPB7 and RPA1 at the transcriptionally active nucleolar periphery suggests that RPB7 only associates with active RNA pol I complexes. This also means that only a small fraction of the RNA pol I complex contains RPB7, as previously described for yeast and human RNA pol II [1,2]. In mammals, only a fraction of RNA pol I complexes is known to be transcriptionally active and

mammalian RNA pol II complex detection by IF in the nucleus does not always provide a marker for transcriptional activity [10–13]. Thus, it is clear that labeling of total core subunits of either RNA pol I or pol II complexes is to a great extent highlighting mostly inactive enzymes.

One of the major discrepancies is related to the requirement of RPB7 for RNA pol I in vitro transcription. Park et al. suggest that our effects may be an indirect consequence of RPB7 depletion. However, we performed a large series of control experiments to exclude such possibility. For example, run-on assays indicate that depletion of either RNA pol II or pol III subunits did not alter VSG transcription whilst significantly reducing the transcription of *tubulin* or tRNA, respectively (Fig. 2 in [6]). In addition, several distinct RNA pol II subunits were depleted, and again whilst pol II transcription was clearly downregulated, no effect was detected on reporter activities of the RNA pol I-driven VSG promoter [6]. We believe that these results rule out the possibility that depletion of RNA pol II or pol III could affect to pol I transcription at this time of RNAi induction. In our opinion, our in vivo approach using endogenous RNA pol I complex and chromatin as template is more sensitive and relevant as compared to in vitro assays using protein extracts and naked DNA as employed by Park et al. However, we also performed a series of in vitro assays to show that the VSG promoter transcriptional activity is increased upon adding recombinant RPB7 to a cytoplasmic extract, further highlighting the fact that RPB7 is present in limiting amounts. In contrast, Park et al. suggest that RPB7-PTP depletion interferes with pol II but not pol I in vitro transcriptional activity. Apart from the possibility that some endogenous RPB7 is present in their extracts, for which they do not provide any controls, their reduction in RPB7-PTP levels is not complete, such that the remaining levels may be responsible for the observed transcription. In addition, it has been previously shown that RPB4/RPB7 is not required for in vitro transcription as long as an activator such as GAL4 is present in the reaction [14], and such scenario could further account for the discrepant results presented by Park et al.

They further employ chromatin IP experiments to suggest that RPB7 is not enriched at the VSG promoter as compared to the SL region. However, their analysis is problematic because they do not normalize their IP with respect to input, and further biased because of the multicopy nature of the VSG promoter where only one is transcriptionally active, whilst all multicopy SL loci are highly transcribed. We have recently carried out chromatin IP experiments using antibodies against endogenous RPB7, RPB1 and RPA1, and chromatin obtained from VSG expression site tagged with marker genes. Together with proper normalization techniques and comparison with a single copy gene transcribed by pol II yields results entirely consistent with our previous observations [6] (manuscript in preparation, Lopez-Farfan et al. KMCB meeting 2011).

In sum, various data point to the possibility that RPB7 is not a core subunit of RNA pol I, but rather a dissociable subunit which functions in trypanosome VSG transcription in vivo. Clearly

DOIs of original articles: [10.1016/j.molbiopara.2011.07.006](https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2011.07.006), [10.1016/j.molbiopara.2011.06.008](https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2011.06.008)

0166-6851/\$ – see front matter © 2011 Elsevier B.V. All rights reserved.
doi:[10.1016/j.molbiopara.2011.07.005](https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2011.07.005)

Please cite this article in press as: Navarro M, et al. Role of RPB7 in RNA pol I transcription in *Trypanosoma brucei*. Mol Biochem Parasitol (2011), doi:[10.1016/j.molbiopara.2011.07.005](https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2011.07.005)

further experiments will be required to dissect the precise role of this subunit, as even in yeast, where the RNA polymerase complexes are best studied, RPB4/RPB7 function has not yet been fully established [1]. The function of RPB7 as a transcriptional co-factor in VSG transcription raises a number of interesting questions which we will address in future work.

References

- [1] Choder M. Rpb4 and Rpb7: subunits of RNA polymerase II and beyond. *Trends Biochem Sci* 2004;29(12):674–81.
- [2] Kornberg RD. The molecular basis of eukaryotic transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007;104(32):12955–61.
- [3] Armache KJ, Kettenberger H, Cramer P. Architecture of initiation-competent 12-subunit RNA polymerase II. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100(12):6964–8.
- [4] Armache KJ, Mitterweger S, Meinhart A, Cramer P. Structures of complete RNA polymerase II and its subcomplex: Rpb4/7. *J Biol Chem* 2005;280(8):7131–4.
- [5] Cramer P, Armache KJ, Baumli S, et al. Structure of eukaryotic RNA polymerases. *Annu Rev Biophys* 2008;37:337–52.
- [6] Peñate X, Lopez-Farfán D, Landeira D, Wentland A, Vidal I, Navarro M. RNA pol II subunit RPB7 is required for RNA pol I-mediated transcription in *Trypanosoma brucei*. *EMBO Rep* 2009;10(3):252–7.
- [7] Sheffer A, Varon M, Choder M. Rpb7 can interact with RNA polymerase II and support transcription during some stresses independently of Rpb4. *Mol Cell Biol* 1999;19(4):2672–80.
- [8] Landeira D, Navarro M. Nuclear repositioning of the VSG promoter during developmental silencing in *Trypanosoma brucei*. *J Cell Biol* 2007;176(2):133–9.
- [9] Navarro M, Penate X, Landeira D. Nuclear architecture underlying gene expression in *Trypanosoma brucei*. *Trends Microbiol* 2007;15(6):263–70.
- [10] Raska I, Shaw PJ, Cmarko D. Structure and function of the nucleolus in the spotlight. *Curr Opin Cell Biol* 2006.
- [11] Kimura M, Ishihama A. Involvement of multiple subunit-subunit contacts in the assembly of RNA polymerase II. *Nucleic Acids Res* 2000;28(4):952–9.
- [12] Jackson DA, Iborra FJ, Manders EM, Cook PR. Numbers and organization of RNA polymerases: nascent transcripts, and transcription units in HeLa nuclei. *Mol Biol Cell* 1998;9(6):1523–36.
- [13] Xie SQ, Martin S, Guillot PV, Bentley DL, Pombo A. Splicing speckles are not reservoirs of RNA polymerase II: but contain an inactive form, phosphorylated on serine2 residues of the C-terminal domain. *Mol Biol Cell* 2006;17(4):1723–33.
- [14] Edwards AM, Kane CM, Young RA, Kronberg RD. Two dissociable subunits of yeast RNA polymerase II stimulate the initiation of transcription at a promoter in vitro. *J Biol Chem* 1991;266(1):71–5.

Miguel Navarro*

Xenia Peñate

David Landeira

Diana López-Farfán

Instituto de Parasitología y Biomedicina López-Neyra,

Spanish National Research Council (CSIC), Avda. del

Conocimiento s/n, 18100 Granada, Spain

*Corresponding author. Tel.: +34 958181651;

fax: +34 958181633.

E-mail address: miguel.navarro@ipb.csic.es

(M. Navarro)

11 July 2011

Available online xxx

Bibliografia

8. Bibliografía

- Aitchison, N., Talbot, S., Shapiro, J., Hughes, K., Adkin, C., Butt, T., Sheader, K. and Rudenko, G. (2005) VSG switching in *Trypanosoma brucei*: antigenic variation analysed using RNAi in the absence of immune selection. *Mol Microbiol*, **57**, 1608-1622.
- Alm-Kristiansen, A.H., Lorenzo, P.I., Molvaersmyr, A.K., Matre, V., Ledsaak, M., Saether, T. and Gabrielsen, O.S. (2011) PIAS1 interacts with FLASH and enhances its co-activation of c-Myb. *Mol Cancer*, **10**, 21.
- Armache, K.J., Kettenberger, H. and Cramer, P. (2003) Architecture of initiation-competent 12-subunit RNA polymerase II. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100**, 6964-6968.
- Armache, K.J., Mitterweiger, S., Meinhart, A. and Cramer, P. (2005) Structures of complete RNA polymerase II and its subcomplex, Rpb4/7. *J Biol Chem*, **280**, 7131-7134.
- Azuma, Y., Arnaoutov, A., Anan, T. and Dasso, M. (2005) PIASy mediates SUMO-2 conjugation of Topoisomerase-II on mitotic chromosomes. *Embo J*, **24**, 2172-2182.
- Bachant, J., Alcasabas, A., Blat, Y., Kleckner, N. and Elledge, S.J. (2002) The SUMO-1 isopeptidase Smt4 is linked to centromeric cohesion through SUMO-1 modification of DNA topoisomerase II. *Mol Cell*, **9**, 1169-1182.
- Bayele, H.K. (2009) *Trypanosoma brucei*: a putative RNA polymerase II promoter. *Exp Parasitol*, **123**, 313-318.
- Bayona, J.C., Nakayasu, E.S., Laverriere, M., Aguilar, C., Sobreira, T.J., Choi, H., Nesvizhskii, A.I., Almeida, I.C., Cazzulo, J.J. and Alvarez, V.E. (2011) SUMOylation pathway in *Trypanosoma cruzi*: Functional characterization and proteomic analysis of target proteins. *Mol Cell Proteomics*.
- Berriman, M., Ghedin, E., Hertz-Fowler, C., Blandin, G., Renauld, H., Bartholomeu, D.C., Lennard, N.J., Caler, E., Hamlin, N.E., Haas, B., Bohme, U., Hannick, L., Aslett, M.A., Shallom, J., Marcello, L., Hou, L., Wickstead, B., Alsmark, U.C., Arrowsmith, C., Atkin, R.J., Barron, A.J., Bringaud, F., Brooks, K., Carrington, M., Cherevach, I., Chillingworth, T.J., Churcher, C., Clark, L.N., Corton, C.H., Cronin, A., Davies, R.M., Doggett, J., Djikeng, A., Feldblyum, T., Field, M.C., Fraser, A., Goodhead, I., Hance, Z., Harper, D., Harris, B.R., Hauser, H., Hostetler, J., Ivens, A., Jagels, K., Johnson, D., Johnson, J., Jones, K., Kerhornou, A.X., Koo, H., Larke, N., Landfear, S., Larkin, C., Leech, V., Line, A., Lord, A., Macleod, A., Mooney, P.J., Moule, S., Martin, D.M., Morgan, G.W., Mungall, K., Norbertczak, H., Ormond, D., Pai, G., Peacock, C.S., Peterson, J., Quail, M.A., Rabbinowitsch, E., Rajandream, M.A., Reitter, C., Salzberg, S.L., Sanders, M., Schobel, S., Sharp, S., Simmonds, M., Simpson, A.J., Tallon, L., Turner, C.M., Tait, A., Tivey, A.R., Van Aken, S., Walker, D., Wanless, D., Wang, S., White, B., White, O., Whitehead, S., Woodward, J., Wortman, J., Adams, M.D., Embley, T.M., Gull, K., Ullu, E., Barry, J.D., Fairlamb, A.H., Opperdoes, F., Barrell, B.G., Donelson, J.E., Hall, N., Fraser, C.M., Melville, S.E. and El-Sayed, N.M. (2005) The genome of the African trypanosome *Trypanosoma brucei*. *Science*, **309**, 416-422.
- Bischler, N., Brino, L., Carles, C., Riva, M., Tschochner, H., Mallouh, V. and Schultz, P. (2002) Localization of the yeast RNA polymerase I-specific subunits. *Embo J*, **21**, 4136-4144.
- Bonen, L. (1993) Trans-splicing of pre-mRNA in plants, animals, and protists. *Faseb J*, **7**, 40-46.
- Borst, P. (2002) Antigenic variation and allelic exclusion. *Cell*, **109**, 5-8.
- Boucher, N., McNicoll, F., Dumas, C. and Papadopoulou, B. (2002) RNA polymerase I-mediated transcription of a reporter gene integrated into different loci of *Leishmania*. *Mol Biochem Parasitol*, **119**, 153-158.

- Brandenburg, J., Schimanski, B., Nogoceke, E., Nguyen, T.N., Padovan, J.C., Chait, B.T., Cross, G.A. and Gunzl, A. (2007) Multifunctional class I transcription in *Trypanosoma brucei* depends on a novel protein complex. *Embo J*, **26**, 4856-4866.
- Bushnell, D.A. and Kornberg, R.D. (2003) Complete, 12-subunit RNA polymerase II at 4.1-A resolution: implications for the initiation of transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100**, 6969-6973.
- Clayton, C.E. (2002) Life without transcriptional control? From fly to man and back again. *Embo J*, **21**, 1881-1888.
- Cojocaru, M., Jeronimo, C., Forget, D., Bouchard, A., Bergeron, D., Cote, P., Poirier, G.G., Greenblatt, J. and Coulombe, B. (2008) Genomic location of the human RNA polymerase II general machinery: evidence for a role of TFIIF and Rpb7 at both early and late stages of transcription. *Biochem J*, **409**, 139-147.
- Colasante, C., Robles, A., Li, C.H., Schwede, A., Benz, C., Voncken, F., Guilbride, D.L. and Clayton, C. (2007) Regulated expression of glycosomal phosphoglycerate kinase in *Trypanosoma brucei*. *Mol Biochem Parasitol*, **151**, 193-204.
- Conway, C., McCulloch, R., Ginger, M.L., Robinson, N.P., Browitt, A. and Barry, J.D. (2002) Ku is important for telomere maintenance, but not for differential expression of telomeric VSG genes, in African trypanosomes. *J Biol Chem*, **277**, 21269-21277.
- Cramer, P. (2004a) RNA polymerase II structure: from core to functional complexes. *Curr Opin Genet Dev*, **14**, 218-226.
- Cramer, P. (2004b) Structure and function of RNA polymerase II. *Adv Protein Chem*, **67**, 1-42.
- Cramer, P., Bushnell, D.A., Fu, J., Gnatt, A.L., Maier-Davis, B., Thompson, N.E., Burgess, R.R., Edwards, A.M., David, P.R. and Kornberg, R.D. (2000) Architecture of RNA polymerase II and implications for the transcription mechanism. *Science*, **288**, 640-649.
- Cramer, P., Bushnell, D.A. and Kornberg, R.D. (2001) Structural basis of transcription: RNA polymerase II at 2.8 angstrom resolution. *Science*, **292**, 1863-1876.
- Cross, M., Kieft, R., Sabatini, R., Dirks-Mulder, A., Chaves, I. and Borst, P. (2002) J-binding protein increases the level and retention of the unusual base J in trypanosome DNA. *Mol Microbiol*, **46**, 37-47.
- Cross, M., Taylor, M.C. and Borst, P. (1998) Frequent loss of the active site during variant surface glycoprotein expression site switching in vitro in *Trypanosoma brucei*. *Mol Cell Biol*, **18**, 198-205.
- Chen, X., Ding, B., LeJeune, D., Ruggiero, C. and Li, S. (2009) Rpb1 sumoylation in response to UV radiation or transcriptional impairment in yeast. *PLoS One*, **4**, e5267.
- Cheng, C.H., Lo, Y.H., Liang, S.S., Ti, S.C., Lin, F.M., Yeh, C.H., Huang, H.Y. and Wang, T.F. (2006) SUMO modifications control assembly of synaptonemal complex and polycomplex in meiosis of *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Dev*, **20**, 2067-2081.
- Choder, M. (2004) Rpb4 and Rpb7: subunits of RNA polymerase II and beyond. *Trends Biochem Sci*, **29**, 674-681.
- Choder, M. and Young, R.A. (1993) A portion of RNA polymerase II molecules has a component essential for stress responses and stress survival. *Mol Cell Biol*, **13**, 6984-6991.
- Chung, C.D., Liao, J., Liu, B., Rao, X., Jay, P., Berta, P. and Shuai, K. (1997) Specific inhibition of Stat3 signal transduction by PIAS3. *Science*, **278**, 1803-1805.
- Daniels, J.P., Gull, K. and Wickstead, B. (2010) Cell biology of the trypanosome genome. *Microbiol Mol Biol Rev*, **74**, 552-569.
- Das, A. and Bellofatto, V. (2003) RNA polymerase II-dependent transcription in trypanosomes is associated with a SNAP complex-like transcription factor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100**, 80-85.
- Das, A., Li, H., Liu, T. and Bellofatto, V. (2006) Biochemical characterization of *Trypanosoma brucei* RNA polymerase II. *Mol Biochem Parasitol*, **150**, 201-210.
- Das, A., Zhang, Q., Palenchar, J.B., Chatterjee, B., Cross, G.A. and Bellofatto, V. (2005) Trypanosomal TBP functions with the multisubunit transcription factor tSNAP to direct spliced-leader RNA gene expression. *Mol Cell Biol*, **25**, 7314-7322.

- De Lange, T. and Borst, P. (1982) Genomic environment of the expression-linked extra copies of genes for surface antigens of *Trypanosoma brucei* resembles the end of a chromosome. *Nature*, **299**, 451-453.
- De Lange, T., Liu, A.Y., Van der Ploeg, L.H., Borst, P., Tromp, M.C. and Van Boom, J.H. (1983) Tandem repetition of the 5' mini-exon of variant surface glycoprotein genes: a multiple promoter for VSG gene transcription? *Cell*, **34**, 891-900.
- Denninger, V., Fullbrook, A., Bessat, M., Ersfeld, K. and Rudenko, G. (2010) The FACT subunit TbSpt16 is involved in cell cycle specific control of VSG expression sites in *Trypanosoma brucei*. *Mol Microbiol*, **78**, 459-474.
- Devaux, S., Kelly, S., Lecordier, L., Wickstead, B., Perez-Morga, D., Pays, E., Vanhamme, L. and Gull, K. (2007) Diversification of function by different isoforms of conventionally shared RNA polymerase subunits. *Mol Biol Cell*, **18**, 1293-1301.
- Devaux, S., Lecordier, L., Uzureau, P., Walgraffe, D., Dierick, J.F., Poelvoorde, P., Pays, E. and Vanhamme, L. (2006) Characterization of RNA polymerase II subunits of *Trypanosoma brucei*. *Mol Biochem Parasitol*, **148**, 60-68.
- DiPaolo, C., Kieft, R., Cross, M. and Sabatini, R. (2005) Regulation of trypanosome DNA glycosylation by a SWI2/SNF2-like protein. *Mol Cell*, **17**, 441-451.
- Donelson, J.E. (2003) Antigenic variation and the African trypanosome genome. *Acta Trop*, **85**, 391-404.
- Dossin Fde, M. and Schenkman, S. (2005) Actively transcribing RNA polymerase II concentrates on spliced leader genes in the nucleus of *Trypanosoma cruzi*. *Eukaryot Cell*, **4**, 960-970.
- Edwards, A.M., Kane, C.M., Young, R.A. and Kornberg, R.D. (1991) Two dissociable subunits of yeast RNA polymerase II stimulate the initiation of transcription at a promoter in vitro. *J Biol Chem*, **266**, 71-75.
- El-Sayed, N.M., Hegde, P., Quackenbush, J., Melville, S.E. and Donelson, J.E. (2000) The African trypanosome genome. *Int J Parasitol*, **30**, 329-345.
- El-Sayed, N.M., Myler, P.J., Blandin, G., Berriman, M., Crabtree, J., Aggarwal, G., Caler, E., Renauld, H., Worthey, E.A., Hertz-Fowler, C., Ghedin, E., Peacock, C., Bartholomeu, D.C., Haas, B.J., Tran, A.N., Wortman, J.R., Alsmark, U.C., Angiuoli, S., Anupama, A., Badger, J., Bringaud, F., Cadag, E., Carlton, J.M., Cerqueira, G.C., Creasy, T., Delcher, A.L., Djikeng, A., Embley, T.M., Hauser, C., Ivens, A.C., Kummerfeld, S.K., Pereira-Leal, J.B., Nilsson, D., Peterson, J., Salzberg, S.L., Shallom, J., Silva, J.C., Sundaram, J., Westenberger, S., White, O., Melville, S.E., Donelson, J.E., Andersson, B., Stuart, K.D. and Hall, N. (2005) Comparative genomics of trypanosomatid parasitic protozoa. *Science*, **309**, 404-409.
- Farago, M., Nahari, T., Hammel, C., Cole, C.N. and Choder, M. (2003) Rpb4p, a subunit of RNA polymerase II, mediates mRNA export during stress. *Mol Biol Cell*, **14**, 2744-2755.
- Figueiredo, L.M. and Cross, G.A. (2010) Nucleosomes are depleted at the VSG expression site transcribed by RNA polymerase I in African trypanosomes. *Eukaryot Cell*, **9**, 148-154.
- Figueiredo, L.M., Cross, G.A. and Janzen, C.J. (2009) Epigenetic regulation in African trypanosomes: a new kid on the block. *Nat Rev Microbiol*, **7**, 504-513.
- Figueiredo, L.M., Janzen, C.J. and Cross, G.A. (2008) A histone methyltransferase modulates antigenic variation in African trypanosomes. *PLoS Biol*, **6**, e161.
- Garcia-Dominguez, M. and Reyes, J.C. (2009) SUMO association with repressor complexes, emerging routes for transcriptional control. *Biochim Biophys Acta*, **1789**, 451-459.
- Gareau, J.R. and Lima, C.D. (2010) The SUMO pathway: emerging mechanisms that shape specificity, conjugation and recognition. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **11**, 861-871.
- Geiss-Friedlander, R. and Melchior, F. (2007) Concepts in sumoylation: a decade on. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **8**, 947-956.
- Gilinger, G. and Bellofatto, V. (2001) Trypanosome spliced leader RNA genes contain the first identified RNA polymerase II gene promoter in these organisms. *Nucleic Acids Res*, **29**, 1556-1564.

- Girdwood, D.W., Tatham, M.H. and Hay, R.T. (2004) SUMO and transcriptional regulation. *Semin Cell Dev Biol*, **15**, 201-210.
- Gong, L. and Yeh, E.T. (2006) Characterization of a family of nucleolar SUMO-specific proteases with preference for SUMO-2 or SUMO-3. *J Biol Chem*, **281**, 15869-15877.
- Goodson, M.L., Hong, Y., Rogers, R., Matunis, M.J., Park-Sarge, O.K. and Sarge, K.D. (2001) Sumo-1 modification regulates the DNA binding activity of heat shock transcription factor 2, a promyelocytic leukemia nuclear body associated transcription factor. *J Biol Chem*, **276**, 18513-18518.
- Gostissa, M., Hengstermann, A., Fogal, V., Sandy, P., Schwarz, S.E., Scheffner, M. and Del Sal, G. (1999) Activation of p53 by conjugation to the ubiquitin-like protein SUMO-1. *Embo J*, **18**, 6462-6471.
- Gottesdiener, K., Chung, H.M., Brown, S.D., Lee, M.G. and Van der Ploeg, L.H. (1991) Characterization of VSG gene expression site promoters and promoter-associated DNA rearrangement events. *Mol Cell Biol*, **11**, 2467-2480.
- Gottschling, D.E., Aparicio, O.M., Billington, B.L. and Zakian, V.A. (1990) Position effect at *S. cerevisiae* telomeres: reversible repression of Pol II transcription. *Cell*, **63**, 751-762.
- Gruszynski, A.E., van Deursen, F.J., Albareda, M.C., Best, A., Chaudhary, K., Cliffe, L.J., del Rio, L., Dunn, J.D., Ellis, L., Evans, K.J., Figueiredo, J.M., Malmquist, N.A., Omosun, Y., Palenchar, J.B., Prickett, S., Punkosdy, G.A., van Dooren, G., Wang, Q., Menon, A.K., Matthews, K.R. and Bangs, J.D. (2006) Regulation of surface coat exchange by differentiating African trypanosomes. *Mol Biochem Parasitol*, **147**, 211-223.
- Gunzl, A., Bruderer, T., Laufer, G., Schimanski, B., Tu, L.C., Chung, H.M., Lee, P.T. and Lee, M.G. (2003) RNA polymerase I transcribes procyclin genes and variant surface glycoprotein gene expression sites in *Trypanosoma brucei*. *Eukaryot Cell*, **2**, 542-551.
- Gunzl, A., Tschudi, C., Nakaar, V. and Ullu, E. (1995) Accurate transcription of the *Trypanosoma brucei* U2 small nuclear RNA gene in a homologous extract. *J Biol Chem*, **270**, 17287-17291.
- Gunzl, A., Ullu, E., Dorner, M., Fragoso, S.P., Hoffmann, K.F., Milner, J.D., Morita, Y., Nguu, E.K., Vanacova, S., Wunsch, S., Dare, A.O., Kwon, H. and Tschudi, C. (1997) Transcription of the *Trypanosoma brucei* spliced leader RNA gene is dependent only on the presence of upstream regulatory elements. *Mol Biochem Parasitol*, **85**, 67-76.
- Guo, B. and Sharrocks, A.D. (2009) Extracellular signal-regulated kinase mitogen-activated protein kinase signaling initiates a dynamic interplay between sumoylation and ubiquitination to regulate the activity of the transcriptional activator PEA3. *Mol Cell Biol*, **29**, 3204-3218.
- Hernandez-Rivas, R., Martinez-Calvillo, S., Romero, M. and Hernandez, R. (1992) *Trypanosoma cruzi* 5S rRNA genes: molecular cloning, structure and chromosomal organization. *FEMS Microbiol Lett*, **71**, 63-67.
- Heun, P. (2007) SUMO organization of the nucleus. *Curr Opin Cell Biol*, **19**, 350-355.
- Horiuchi, T. and Aigaki, T. (2006) Alternative trans-splicing: a novel mode of pre-mRNA processing. *Biol Cell*, **98**, 135-140.
- Horn, D. and Cross, G.A. (1995) A developmentally regulated position effect at a telomeric locus in *Trypanosoma brucei*. *Cell*, **83**, 555-561.
- Horn, D. and Cross, G.A. (1997) Position-dependent and promoter-specific regulation of gene expression in *Trypanosoma brucei*. *Embo J*, **16**, 7422-7431.
- Hughes, K., Wand, M., Foulston, L., Young, R., Harley, K., Terry, S., Ersfeld, K. and Rudenko, G. (2007) A novel ISWI is involved in VSG expression site downregulation in African trypanosomes. *Embo J*, **26**, 2400-2410.
- Imboden, M.A., Laird, P.W., Affolter, M. and Seebeck, T. (1987) Transcription of the intergenic regions of the tubulin gene cluster of *Trypanosoma brucei*: evidence for a polycistronic transcription unit in a eukaryote. *Nucleic Acids Res*, **15**, 7357-7368.
- Ivens, A.C., Peacock, C.S., Worthey, E.A., Murphy, L., Aggarwal, G., Berriman, M., Sisk, E., Rajandream, M.A., Adlem, E., Aert, R., Anupama, A., Apostolou, Z., Attipoe, P., Bason, N., Bauser, C., Beck, A., Beverley, S.M., Bianchetti, G., Borzym, K., Bothe, G., Bruschi, C.V., Collins, M., Cadag, E., Ciarloni, L., Clayton, C., Coulson, R.M.,

- Cronin, A., Cruz, A.K., Davies, R.M., De Gaudenzi, J., Dobson, D.E., Duesterhoeft, A., Fazelina, G., Fosker, N., Frasch, A.C., Fraser, A., Fuchs, M., Gabel, C., Goble, A., Goffeau, A., Harris, D., Hertz-Fowler, C., Hilbert, H., Horn, D., Huang, Y., Klages, S., Knights, A., Kube, M., Larke, N., Litvin, L., Lord, A., Louie, T., Marra, M., Masuy, D., Matthews, K., Michaeli, S., Mottram, J.C., Muller-Auer, S., Munden, H., Nelson, S., Norbertczak, H., Oliver, K., O'Neil, S., Pentony, M., Pohl, T.M., Price, C., Purnelle, B., Quail, M.A., Rabbinowitsch, E., Reinhardt, R., Rieger, M., Rinta, J., Robben, J., Robertson, L., Ruiz, J.C., Rutter, S., Saunders, D., Schafer, M., Schein, J., Schwartz, D.C., Seeger, K., Seyler, A., Sharp, S., Shin, H., Sivam, D., Squares, R., Squares, S., Tosato, V., Vogt, C., Volckaert, G., Wambutt, R., Warren, T., Wedler, H., Woodward, J., Zhou, S., Zimmermann, W., Smith, D.F., Blackwell, J.M., Stuart, K.D., Barrell, B. and Myler, P.J. (2005) The genome of the kinetoplastid parasite, *Leishmania major*. *Science*, **309**, 436-442.
- Janz, L. and Clayton, C. (1994) The PARP and rRNA promoters of *Trypanosoma brucei* are composed of dissimilar sequence elements that are functionally interchangeable. *Mol Cell Biol*, **14**, 5804-5811.
- Janz, L., Hug, M. and Clayton, C. (1994) Factors that bind to RNA polymerase I promoter sequences of *Trypanosoma brucei*. *Mol Biochem Parasitol*, **65**, 99-108.
- Janzen, C.J., Hake, S.B., Lowell, J.E. and Cross, G.A. (2006) Selective di- or trimethylation of histone H3 lysine 76 by two DOT1 homologs is important for cell cycle regulation in *Trypanosoma brucei*. *Mol Cell*, **23**, 497-507.
- Jasiak, A.J., Hartmann, H., Karakasili, E., Kalocsay, M., Flatley, A., Kremmer, E., Strasser, K., Martin, D.E., Soding, J. and Cramer, P. (2008) Genome-associated RNA polymerase II includes the dissociable Rpb4/7 subcomplex. *J Biol Chem*, **283**, 26423-26427.
- Jensen, G.J., Meredith, G., Bushnell, D.A. and Kornberg, R.D. (1998) Structure of wild-type yeast RNA polymerase II and location of Rpb4 and Rpb7. *Embo J*, **17**, 2353-2358.
- Johnson, E.S. (2004) Protein modification by SUMO. *Annu Rev Biochem*, **73**, 355-382.
- Johnson, E.S. and Gupta, A.A. (2001) An E3-like factor that promotes SUMO conjugation to the yeast septins. *Cell*, **106**, 735-744.
- Johnson, E.S., Schwienhorst, I., Dohmen, R.J. and Blobel, G. (1997) The ubiquitin-like protein Smt3p is activated for conjugation to other proteins by an Aos1p/Uba2p heterodimer. *Embo J*, **16**, 5509-5519.
- Jung, J., Ahn, Y.J. and Kang, L.W. (2008) A novel approach to investigating protein/protein interactions and their functions by TAP-tagged yeast strains and its application to examine yeast transcription machinery. *J Microbiol Biotechnol*, **18**, 631-638.
- Kagey, M.H., Melhuish, T.A. and Wotton, D. (2003) The polycomb protein Pc2 is a SUMO E3. *Cell*, **113**, 127-137.
- Kahyo, T., Nishida, T. and Yasuda, H. (2001) Involvement of PIAS1 in the sumoylation of tumor suppressor p53. *Mol Cell*, **8**, 713-718.
- Kawahara, T., Siegel, T.N., Ingram, A.K., Alsford, S., Cross, G.A. and Horn, D. (2008) Two essential MYST-family proteins display distinct roles in histone H4K10 acetylation and telomeric silencing in trypanosomes. *Mol Microbiol*, **69**, 1054-1068.
- Kelly, S., Wickstead, B. and Gull, K. (2005) An in silico analysis of trypanosomatid RNA polymerases: insights into their unusual transcription. *Biochem Soc Trans*, **33**, 1435-1437.
- Kerscher, O. (2007) SUMO junction-what's your function? New insights through SUMO-interacting motifs. *EMBO Rep*, **8**, 550-555.
- Kettenberger, H., Armache, K.J. and Cramer, P. (2004) Complete RNA polymerase II elongation complex structure and its interactions with NTP and TFIIS. *Mol Cell*, **16**, 955-965.
- Kim, H.S. and Cross, G.A. (2010) TOPO3alpha influences antigenic variation by monitoring expression-site-associated VSG switching in *Trypanosoma brucei*. *PLoS Pathog*, **6**, e1000992.

- Kirsh, O., Seeler, J.S., Pichler, A., Gast, A., Muller, S., Miska, E., Mathieu, M., Harel-Bellan, A., Kouzarides, T., Melchior, F. and Dejean, A. (2002) The SUMO E3 ligase RanBP2 promotes modification of the HDAC4 deacetylase. *Embo J*, **21**, 2682-2691.
- Klinger, C., Huet, J., Song, D., Petersen, G., Riva, M., Bautz, E.K., Sentenac, A., Oudet, P. and Schultz, P. (1996) Localization of yeast RNA polymerase I core subunits by immunoelectron microscopy. *Embo J*, **15**, 4643-4653.
- Kooter, J.M. and Borst, P. (1984) Alpha-amanitin-insensitive transcription of variant surface glycoprotein genes provides further evidence for discontinuous transcription in trypanosomes. *Nucleic Acids Res*, **12**, 9457-9472.
- Kooter, J.M., De Lange, T. and Borst, P. (1984) Discontinuous synthesis of mRNA in trypanosomes. *Embo J*, **3**, 2387-2392.
- Kooter, J.M., Winter, A.J., de Oliveira, C., Wagter, R. and Borst, P. (1988) Boundaries of telomere conversion in *Trypanosoma brucei*. *Gene*, **69**, 1-11.
- Kornberg, R.D. (2007) The molecular basis of eucaryotic transcription. *Cell Death Differ*, **14**, 1989-1997.
- Landeira, D., Bart, J.M., Van Tyne, D. and Navarro, M. (2009) Cohesin regulates VSG monoallelic expression in trypanosomes. *J Cell Biol*, **186**, 243-254.
- Landeira, D. and Navarro, M. (2007) Nuclear repositioning of the VSG promoter during developmental silencing in *Trypanosoma brucei*. *J Cell Biol*, **176**, 133-139.
- Langer, D., Hain, J., Thuriaux, P. and Zillig, W. (1995) Transcription in archaea: similarity to that in eucarya. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **92**, 5768-5772.
- LeBowitz, J.H., Smith, H.Q., Rusche, L. and Beverley, S.M. (1993) Coupling of poly(A) site selection and trans-splicing in *Leishmania*. *Genes Dev*, **7**, 996-1007.
- Lecordier, L., Devaux, S., Uzureau, P., Dierick, J.F., Walgraffe, D., Poelvoorde, P., Pays, E. and Vanhamme, L. (2007) Characterization of a TFIIF homologue from *Trypanosoma brucei*. *Mol Microbiol*, **64**, 1164-1181.
- Lee, H., Quinn, J.C., Prasanth, K.V., Swiss, V.A., Economides, K.D., Camacho, M.M., Spector, D.L. and Abate-Shen, C. (2006) PIAS1 confers DNA-binding specificity on the Msx1 homeoprotein. *Genes Dev*, **20**, 784-794.
- Lee, J.H., Jung, H.S. and Gunzl, A. (2009) Transcriptionally active TFIIF of the early-diverged eukaryote *Trypanosoma brucei* harbors two novel core subunits but not a cyclin-activating kinase complex. *Nucleic Acids Res*, **37**, 3811-3820.
- Lee, J.H., Nguyen, T.N., Schimanski, B. and Gunzl, A. (2007) Spliced leader RNA gene transcription in *Trypanosoma brucei* requires transcription factor TFIIF. *Eukaryot Cell*, **6**, 641-649.
- Lee, T.I. and Young, R.A. (2000) Transcription of eukaryotic protein-coding genes. *Annu Rev Genet*, **34**, 77-137.
- Li, S.J. and Hochstrasser, M. (2000) The yeast ULP2 (SMT4) gene encodes a novel protease specific for the ubiquitin-like Smt3 protein. *Mol Cell Biol*, **20**, 2367-2377.
- Liang, X.H., Haritan, A., Uliel, S. and Michaeli, S. (2003) trans and cis splicing in trypanosomatids: mechanism, factors, and regulation. *Eukaryot Cell*, **2**, 830-840.
- Liao, S., Wang, T., Fan, K. and Tu, X. (2010) The small ubiquitin-like modifier (SUMO) is essential in cell cycle regulation in *Trypanosoma brucei*. *Exp Cell Res*, **316**, 704-715.
- Lodes, M.J., Merlin, G., deVos, T., Ghosh, A., Madhubala, R., Myler, P.J. and Stuart, K. (1995) Increased expression of LD1 genes transcribed by RNA polymerase I in *Leishmania donovani* as a result of duplication into the rRNA gene locus. *Mol Cell Biol*, **15**, 6845-6853.
- Lomvardas, S., Barnea, G., Pisapia, D.J., Mendelsohn, M., Kirkland, J. and Axel, R. (2006) Interchromosomal interactions and olfactory receptor choice. *Cell*, **126**, 403-413.
- Lotan, R., Bar-On, V.G., Harel-Sharvit, L., Duek, L., Melamed, D. and Choder, M. (2005) The RNA polymerase II subunit Rpb4p mediates decay of a specific class of mRNAs. *Genes Dev*, **19**, 3004-3016.
- Lotan, R., Goler-Baron, V., Duek, L., Haimovich, G. and Choder, M. (2007) The Rpb7p subunit of yeast RNA polymerase II plays roles in the two major cytoplasmic mRNA decay mechanisms. *J Cell Biol*, **178**, 1133-1143.

- Lustig, Y., Sheiner, L., Vagima, Y., Goldshmidt, H., Das, A., Bellofatto, V. and Michaeli, S. (2007) Spliced-leader RNA silencing: a novel stress-induced mechanism in *Trypanosoma brucei*. *EMBO Rep*, **8**, 408-413.
- Lyst, M.J. and Stancheva, I. (2007) A role for SUMO modification in transcriptional repression and activation. *Biochem Soc Trans*, **35**, 1389-1392.
- Mahajan, R., Delphin, C., Guan, T., Gerace, L. and Melchior, F. (1997) A small ubiquitin-related polypeptide involved in targeting RanGAP1 to nuclear pore complex protein RanBP2. *Cell*, **88**, 97-107.
- Makhnevych, T., Sydorsky, Y., Xin, X., Srikumar, T., Vizeacoumar, F.J., Jeram, S.M., Li, Z., Bahr, S., Andrews, B.J., Boone, C. and Raught, B. (2009) Global map of SUMO function revealed by protein-protein interaction and genetic networks. *Mol Cell*, **33**, 124-135.
- Mandava, V., Fernandez, J.P., Deng, H., Janzen, C.J., Hake, S.B. and Cross, G.A. (2007) Histone modifications in *Trypanosoma brucei*. *Mol Biochem Parasitol*, **156**, 41-50.
- Mao, Y., Sun, M., Desai, S.D. and Liu, L.F. (2000) SUMO-1 conjugation to topoisomerase I: A possible repair response to topoisomerase-mediated DNA damage. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 4046-4051.
- Martin, N., Schwamborn, K., Schreiber, V., Werner, A., Guillier, C., Zhang, X.D., Bischof, O., Seeler, J.S. and Dejean, A. (2009) PARP-1 transcriptional activity is regulated by sumoylation upon heat shock. *Embo J*, **28**, 3534-3548.
- Martinez-Calvillo, S., Vizuet-de-Rueda, J.C., Florencio-Martinez, L.E., Manning-Cela, R.G. and Figueroa-Angulo, E.E. (2010) Gene expression in trypanosomatid parasites. *J Biomed Biotechnol*, **2010**, 525241.
- Martinez-Calvillo, S., Yan, S., Nguyen, D., Fox, M., Stuart, K. and Myler, P.J. (2003) Transcription of *Leishmania major* Friedlin chromosome 1 initiates in both directions within a single region. *Mol Cell*, **11**, 1291-1299.
- Matthews, K.R. (2005) The developmental cell biology of *Trypanosoma brucei*. *J Cell Sci*, **118**, 283-290.
- Matthews, K.R., Tschudi, C. and Ullu, E. (1994) A common pyrimidine-rich motif governs trans-splicing and polyadenylation of tubulin polycistronic pre-mRNA in trypanosomes. *Genes Dev*, **8**, 491-501.
- Matunis, M.J., Coutavas, E. and Blobel, G. (1996) A novel ubiquitin-like modification modulates the partitioning of the Ran-GTPase-activating protein RanGAP1 between the cytosol and the nuclear pore complex. *J Cell Biol*, **135**, 1457-1470.
- McAndrew, M., Graham, S., Hartmann, C. and Clayton, C. (1998) Testing promoter activity in the trypanosome genome: isolation of a metacyclic-type VSG promoter, and unexpected insights into RNA polymerase II transcription. *Exp Parasitol*, **90**, 65-76.
- McCulloch, R. and Barry, J.D. (1999) A role for RAD51 and homologous recombination in *Trypanosoma brucei* antigenic variation. *Genes Dev*, **13**, 2875-2888.
- McKune, K., Richards, K.L., Edwards, A.M., Young, R.A. and Woychik, N.A. (1993) RPB7, one of two dissociable subunits of yeast RNA polymerase II, is essential for cell viability. *Yeast*, **9**, 295-299.
- Meka, H., Werner, F., Cordell, S.C., Onesti, S. and Brick, P. (2005) Crystal structure and RNA binding of the Rpb4/Rpb7 subunits of human RNA polymerase II. *Nucleic Acids Res*, **33**, 6435-6444.
- Melchior, F., Schergaut, M. and Pichler, A. (2003) SUMO: ligases, isopeptidases and nuclear pores. *Trends Biochem Sci*, **28**, 612-618.
- Militello, K.T., Wang, P., Jayakar, S.K., Pietrasik, R.L., Dupont, C.D., Dodd, K., King, A.M. and Valenti, P.R. (2008) African trypanosomes contain 5-methylcytosine in nuclear DNA. *Eukaryot Cell*, **7**, 2012-2016.
- Miller, M.J., Barrett-Wilt, G.A., Hua, Z. and Vierstra, R.D. (2010) Proteomic analyses identify a diverse array of nuclear processes affected by small ubiquitin-like modifier conjugation in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **107**, 16512-16517.

- Misslitz, A., Mottram, J.C., Overath, P. and Aebischer, T. (2000) Targeted integration into a rRNA locus results in uniform and high level expression of transgenes in *Leishmania* amastigotes. *Mol Biochem Parasitol*, **107**, 251-261.
- Mitsuzawa, H., Kanda, E. and Ishihama, A. (2003) Rpb7 subunit of RNA polymerase II interacts with an RNA-binding protein involved in processing of transcripts. *Nucleic Acids Res*, **31**, 4696-4701.
- Montanuy, I., Torremocha, R., Hernandez-Munain, C. and Sune, C. (2008) Promoter influences transcription elongation: TATA-box element mediates the assembly of processive transcription complexes responsive to cyclin-dependent kinase 9. *J Biol Chem*, **283**, 7368-7378.
- Na, X., Duan, H.O., Messing, E.M., Schoen, S.R., Ryan, C.K., di Sant'Agnesse, P.A., Golemis, E.A. and Wu, G. (2003) Identification of the RNA polymerase II subunit hsrPB7 as a novel target of the von Hippel-Lindau protein. *Embo J*, **22**, 4249-4259.
- Nakaar, V., Dare, A.O., Hong, D., Ullu, E. and Tschudi, C. (1994) Upstream tRNA genes are essential for expression of small nuclear and cytoplasmic RNA genes in trypanosomes. *Mol Cell Biol*, **14**, 6736-6742.
- Nakaar, V., Gunzl, A., Ullu, E. and Tschudi, C. (1997) Structure of the *Trypanosoma brucei* U6 snRNA gene promoter. *Mol Biochem Parasitol*, **88**, 13-23.
- Nakagawa, K. and Yokosawa, H. (2002) PIAS3 induces SUMO-1 modification and transcriptional repression of IRF-1. *FEBS Lett*, **530**, 204-208.
- Nathan, D., Ingvarsdottir, K., Sterner, D.E., Bylebyl, G.R., Dokmanovic, M., Dorsey, J.A., Whelan, K.A., Krsmanovic, M., Lane, W.S., Meluh, P.B., Johnson, E.S. and Berger, S.L. (2006) Histone sumoylation is a negative regulator in *Saccharomyces cerevisiae* and shows dynamic interplay with positive-acting histone modifications. *Genes Dev*, **20**, 966-976.
- Navarro, M. and Cross, G.A. (1996) DNA rearrangements associated with multiple consecutive directed antigenic switches in *Trypanosoma brucei*. *Mol Cell Biol*, **16**, 3615-3625.
- Navarro, M. and Cross, G.A. (1998) In situ analysis of a variant surface glycoprotein expression-site promoter region in *Trypanosoma brucei*. *Mol Biochem Parasitol*, **94**, 53-66.
- Navarro, M., Cross, G.A. and Wirtz, E. (1999) *Trypanosoma brucei* variant surface glycoprotein regulation involves coupled activation/inactivation and chromatin remodeling of expression sites. *Embo J*, **18**, 2265-2272.
- Navarro, M. and Gull, K. (2001) A pol I transcriptional body associated with VSG mono-allelic expression in *Trypanosoma brucei*. *Nature*, **414**, 759-763.
- Navarro, M., Penate, X. and Landeira, D. (2007) Nuclear architecture underlying gene expression in *Trypanosoma brucei*. *Trends Microbiol*, **15**, 263-270.
- Nguyen, T.N., Schimanski, B. and Gunzl, A. (2007) Active RNA polymerase I of *Trypanosoma brucei* harbors a novel subunit essential for transcription. *Mol Cell Biol*, **27**, 6254-6263.
- Nguyen, T.N., Schimanski, B., Zahn, A., Klumpp, B. and Gunzl, A. (2006) Purification of an eight subunit RNA polymerase I complex in *Trypanosoma brucei*. *Mol Biochem Parasitol*, **149**, 27-37.
- Nishida, T. and Yasuda, H. (2002) PIAS1 and PIASxalpha function as SUMO-E3 ligases toward androgen receptor and repress androgen receptor-dependent transcription. *J Biol Chem*, **277**, 41311-41317.
- Nishikura, K. (2006) Editor meets silencer: crosstalk between RNA editing and RNA interference. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **7**, 919-931.
- Novatchkova, M., Budhiraja, R., Coupland, G., Eisenhaber, F. and Bachmair, A. (2004) SUMO conjugation in plants. *Planta*, **220**, 1-8.
- Obado, S.O., Bot, C., Echeverry, M.C., Bayona, J.C., Alvarez, V.E., Taylor, M.C. and Kelly, J.M. (2011) Centromere-associated topoisomerase activity in bloodstream form *Trypanosoma brucei*. *Nucleic Acids Res*, **39**, 1023-1033.
- Onishi, A., Peng, G.H., Hsu, C., Alexis, U., Chen, S. and Blackshaw, S. (2009) Pias3-dependent SUMOylation directs rod photoreceptor development. *Neuron*, **61**, 234-246.

- Orlicky, S.M., Tran, P.T., Sayre, M.H. and Edwards, A.M. (2001) Dissociable Rpb4-Rpb7 subassembly of rna polymerase II binds to single-strand nucleic acid and mediates a post-recruitment step in transcription initiation. *J Biol Chem*, **276**, 10097-10102.
- Overath, P. and Engstler, M. (2004) Endocytosis, membrane recycling and sorting of GPI-anchored proteins: *Trypanosoma brucei* as a model system. *Mol Microbiol*, **53**, 735-744.
- Owerbach, D., McKay, E.M., Yeh, E.T., Gabbay, K.H. and Bohren, K.M. (2005) A proline-90 residue unique to SUMO-4 prevents maturation and sumoylation. *Biochem Biophys Res Commun*, **337**, 517-520.
- Palenchar, J.B. and Bellofatto, V. (2006) Gene transcription in trypanosomes. *Mol Biochem Parasitol*, **146**, 135-141.
- Palenchar, J.B., Liu, W., Palenchar, P.M. and Bellofatto, V. (2006) A divergent transcription factor TFIIB in trypanosomes is required for RNA polymerase II-dependent spliced leader RNA transcription and cell viability. *Eukaryot Cell*, **5**, 293-300.
- Park, S.H., Nguyen, T.N., Kirkham, J.K., Lee, J.H. and Gunzl, A. (2011) Transcription by the multifunctional RNA polymerase I in *Trypanosoma brucei* functions independently of RPB7. *Mol Biochem Parasitol*.
- Paule, M.R. and White, R.J. (2000) Survey and summary: transcription by RNA polymerases I and III. *Nucleic Acids Res*, **28**, 1283-1298.
- Pays, E. (2006) The variant surface glycoprotein as a tool for adaptation in African trypanosomes. *Microbes Infect*, **8**, 930-937.
- Pays, E. and Nolan, D.P. (1998) Expression and function of surface proteins in *Trypanosoma brucei*. *Mol Biochem Parasitol*, **91**, 3-36.
- Pays, E., Vanhamme, L. and Perez-Morga, D. (2004) Antigenic variation in *Trypanosoma brucei*: facts, challenges and mysteries. *Curr Opin Microbiol*, **7**, 369-374.
- Pelechano, V., Chavez, S. and Perez-Ortin, J.E. (2010) A complete set of nascent transcription rates for yeast genes. *PLoS One*, **5**, e15442.
- Penate, X. (2007) Análisis funcional de la RNA polimerasa I de *Trypanosoma brucei*. *Instituto de parasitología y biomedicina López-Neyra*. Universidad de Granada, Granada, Vol. Tesis doctoral.
- Penate, X., Lopez-Farfan, D., Landeira, D., Wentland, A., Vidal, I. and Navarro, M. (2009) RNA pol II subunit RPB7 is required for RNA pol I-mediated transcription in *Trypanosoma brucei*. *EMBO Rep*, **10**, 252-257.
- Perez-Morga, D., Amiguet-Vercher, A., Vermijlen, D. and Pays, E. (2001) Organization of telomeres during the cell and life cycles of *Trypanosoma brucei*. *J Eukaryot Microbiol*, **48**, 221-226.
- Perry, K.L., Watkins, K.P. and Agabian, N. (1987) Trypanosome mRNAs have unusual "cap 4" structures acquired by addition of a spliced leader. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **84**, 8190-8194.
- Petermann, R., Mossier, B.M., Aryee, D.N., Khazak, V., Golemis, E.A. and Kovar, H. (1998) Oncogenic EWS-Fli1 interacts with hSRPB7, a subunit of human RNA polymerase II. *Oncogene*, **17**, 603-610.
- Peyroche, G., Milkereit, P., Bischler, N., Tschochner, H., Schultz, P., Sentenac, A., Carles, C. and Riva, M. (2000) The recruitment of RNA polymerase I on rDNA is mediated by the interaction of the A43 subunit with Rrn3. *Embo J*, **19**, 5473-5482.
- Pichler, A., Knipscheer, P., Saitoh, H., Sixma, T.K. and Melchior, F. (2004) The RanBP2 SUMO E3 ligase is neither HECT- nor RING-type. *Nat Struct Mol Biol*, **11**, 984-991.
- Pichler, A. and Melchior, F. (2002) Ubiquitin-related modifier SUMO1 and nucleocytoplasmic transport. *Traffic*, **3**, 381-387.
- Proshkina, G.M., Shematorova, E.K., Proshkin, S.A., Zaros, C., Thuriaux, P. and Shpakovski, G.V. (2006) Ancient origin, functional conservation and fast evolution of DNA-dependent RNA polymerase III. *Nucleic Acids Res*, **34**, 3615-3624.
- Puig, O., Caspary, F., Rigaut, G., Rutz, B., Bouveret, E., Bragado-Nilsson, E., Wilm, M. and Seraphin, B. (2001) The tandem affinity purification (TAP) method: a general procedure of protein complex purification. *Methods*, **24**, 218-229.

- Robinson, N.P., Burman, N., Melville, S.E. and Barry, J.D. (1999) Predominance of duplicative VSG gene conversion in antigenic variation in African trypanosomes. *Mol Cell Biol*, **19**, 5839-5846.
- Rodriguez-Gil, A., Garcia-Martinez, J., Pelechano, V., Munoz-Centeno Mde, L., Geli, V., Perez-Ortin, J.E. and Chavez, S. (2010) The distribution of active RNA polymerase II along the transcribed region is gene-specific and controlled by elongation factors. *Nucleic Acids Res*, **38**, 4651-4664.
- Rojas, M.V. and Galanti, N. (1990) DNA methylation in *Trypanosoma cruzi*. *FEBS Lett*, **263**, 113-116.
- Rosas-Acosta, G., Russell, W.K., Deyrieux, A., Russell, D.H. and Wilson, V.G. (2005) A universal strategy for proteomic studies of SUMO and other ubiquitin-like modifiers. *Mol Cell Proteomics*, **4**, 56-72.
- Rosonina, E., Duncan, S.M. and Manley, J.L. (2010) SUMO functions in constitutive transcription and during activation of inducible genes in yeast. *Genes Dev*, **24**, 1242-1252.
- Ross, R. and Thomson, D. (1910) A Case of Sleeping Sickness showing Regular Periodical Increase of the Parasites Disclosed. *Br Med J*, **1**, 1544-1545.
- Ruan, J.P., Arhin, G.K., Ullu, E. and Tschudi, C. (2004) Functional characterization of a *Trypanosoma brucei* TATA-binding protein-related factor points to a universal regulator of transcription in trypanosomes. *Mol Cell Biol*, **24**, 9610-9618.
- Rudenko, G. (2010) Epigenetics and transcriptional control in African trypanosomes. *Essays Biochem*, **48**, 201-219.
- Rudenko, G., Bishop, D., Gottesdiener, K. and Van der Ploeg, L.H. (1989) Alpha-amanitin resistant transcription of protein coding genes in insect and bloodstream form *Trypanosoma brucei*. *Embo J*, **8**, 4259-4263.
- Runner, V.M., Podolny, V. and Buratowski, S. (2008) The Rpb4 subunit of RNA polymerase II contributes to cotranscriptional recruitment of 3' processing factors. *Mol Cell Biol*, **28**, 1883-1891.
- Sachdev, S., Bruhn, L., Sieber, H., Pichler, A., Melchior, F. and Grosschedl, R. (2001) PIASy, a nuclear matrix-associated SUMO E3 ligase, represses LEF1 activity by sequestration into nuclear bodies. *Genes Dev*, **15**, 3088-3103.
- Saitoh, H., Sparrow, D.B., Shiomi, T., Pu, R.T., Nishimoto, T., Mohun, T.J. and Dasso, M. (1998) Ubc9p and the conjugation of SUMO-1 to RanGAP1 and RanBP2. *Curr Biol*, **8**, 121-124.
- Sampath, V. and Sadhale, P. (2005) Rpb4 and Rpb7: a sub-complex integral to multi-subunit RNA polymerases performs a multitude of functions. *IUBMB Life*, **57**, 93-102.
- Sampson, D.A., Wang, M. and Matunis, M.J. (2001) The small ubiquitin-like modifier-1 (SUMO-1) consensus sequence mediates Ubc9 binding and is essential for SUMO-1 modification. *J Biol Chem*, **276**, 21664-21669.
- Sareen, A., Choudhry, P., Mehta, S. and Sharma, N. (2005) Mapping the interaction site of Rpb4 and Rpb7 subunits of RNA polymerase II in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem Biophys Res Commun*, **332**, 763-770.
- Scocca, J.R. and Shapiro, T.A. (2008) A mitochondrial topoisomerase IA essential for late theta structure resolution in African trypanosomes. *Mol Microbiol*, **67**, 820-829.
- Scott, V., Sherwin, T. and Gull, K. (1997) gamma-tubulin in trypanosomes: molecular characterisation and localisation to multiple and diverse microtubule organising centres. *J Cell Sci*, **110** (Pt 2), 157-168.
- Scherf, A. (2006) A greedy promoter controls malarial variations. *Cell*, **124**, 251-253.
- Schimanski, B., Brandenburg, J., Nguyen, T.N., Caimano, M.J. and Gunzl, A. (2006) A TFIIB-like protein is indispensable for spliced leader RNA gene transcription in *Trypanosoma brucei*. *Nucleic Acids Res*, **34**, 1676-1684.
- Schimanski, B., Nguyen, T.N. and Gunzl, A. (2005) Characterization of a multisubunit transcription factor complex essential for spliced-leader RNA gene transcription in *Trypanosoma brucei*. *Mol Cell Biol*, **25**, 7303-7313.

- Schmidt, D. and Muller, S. (2002) Members of the PIAS family act as SUMO ligases for c-Jun and p53 and repress p53 activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**, 2872-2877.
- Schmidt, D. and Muller, S. (2003) PIAS/SUMO: new partners in transcriptional regulation. *Cell Mol Life Sci*, **60**, 2561-2574.
- Schwartz, Y.B., Kahn, T.G., Nix, D.A., Li, X.Y., Bourgon, R., Biggin, M. and Pirrotta, V. (2006) Genome-wide analysis of Polycomb targets in *Drosophila melanogaster*. *Nat Genet*, **38**, 700-705.
- Selitrennik, M., Duek, L., Lotan, R. and Choder, M. (2006) Nucleocytoplasmic shuttling of the Rpb4p and Rpb7p subunits of *Saccharomyces cerevisiae* RNA polymerase II by two pathways. *Eukaryot Cell*, **5**, 2092-2103.
- Serizawa, S., Miyamichi, K. and Sakano, H. (2004) One neuron-one receptor rule in the mouse olfactory system. *Trends Genet*, **20**, 648-653.
- Sharrocks, A.D. (2006) PIAS proteins and transcriptional regulation--more than just SUMO E3 ligases? *Genes Dev*, **20**, 754-758.
- Sheffer, A., Varon, M. and Choder, M. (1999) Rpb7 can interact with RNA polymerase II and support transcription during some stresses independently of Rpb4. *Mol Cell Biol*, **19**, 2672-2680.
- Shen, X.Q., Bubulya, A., Zhou, X.F., Khazak, V., Golemis, E.A. and Shemshedini, L. (1999) Ligand-free RAR can interact with the RNA polymerase II subunit hsRPB7 and repress transcription. *Endocrine*, **10**, 281-289.
- Shiio, Y. and Eisenman, R.N. (2003) Histone sumoylation is associated with transcriptional repression. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100**, 13225-13230.
- Siaut, M., Zaros, C., Levivier, E., Ferri, M.L., Court, M., Werner, M., Callebaut, I., Thuriaux, P., Sentenac, A. and Conesa, C. (2003) An Rpb4/Rpb7-like complex in yeast RNA polymerase III contains the orthologue of mammalian CGRP-RCP. *Mol Cell Biol*, **23**, 195-205.
- Siegel, T.N., Hekstra, D.R., Kemp, L.E., Figueiredo, L.M., Lowell, J.E., Fenyo, D., Wang, X., Dewell, S. and Cross, G.A. (2009) Four histone variants mark the boundaries of polycistronic transcription units in *Trypanosoma brucei*. *Genes Dev*, **23**, 1063-1076.
- Siegel, T.N., Kawahara, T., Degrasse, J.A., Janzen, C.J., Horn, D. and Cross, G.A. (2008) Acetylation of histone H4K4 is cell cycle regulated and mediated by HAT3 in *Trypanosoma brucei*. *Mol Microbiol*, **67**, 762-771.
- Simarro, P.P., Diarra, A., Ruiz Postigo, J.A., Franco, J.R. and Jannin, J.G. (2011) The human African trypanosomiasis control and surveillance programme of the World Health Organization 2000-2009: the way forward. *PLoS Negl Trop Dis*, **5**, e1007.
- Stanne, T.M. and Rudenko, G. (2010) Active VSG expression sites in *Trypanosoma brucei* are depleted of nucleosomes. *Eukaryot Cell*, **9**, 136-147.
- Stead, K., Aguilar, C., Hartman, T., Drexel, M., Meluh, P. and Guacci, V. (2003) Pds5p regulates the maintenance of sister chromatid cohesion and is sumoylated to promote the dissolution of cohesion. *J Cell Biol*, **163**, 729-741.
- Stich, A., Barrett, M.P. and Krishna, S. (2003) Waking up to sleeping sickness. *Trends Parasitol*, **19**, 195-197.
- Stuart, K.D., Schnauffer, A., Ernst, N.L. and Panigrahi, A.K. (2005) Complex management: RNA editing in trypanosomes. *Trends Biochem Sci*, **30**, 97-105.
- Taddei, A., Hediger, F., Neumann, F.R., Bauer, C. and Gasser, S.M. (2004) Separation of silencing from perinuclear anchoring functions in yeast Ku80, Sir4 and Esc1 proteins. *Embo J*, **23**, 1301-1312.
- Takahashi, Y., Kahyo, T., Toh, E.A., Yasuda, H. and Kikuchi, Y. (2001a) Yeast Ull1/Siz1 is a novel SUMO1/Smt3 ligase for septin components and functions as an adaptor between conjugating enzyme and substrates. *J Biol Chem*, **276**, 48973-48977.
- Takahashi, Y., Toh-e, A. and Kikuchi, Y. (2001b) A novel factor required for the SUMO1/Smt3 conjugation of yeast septins. *Gene*, **275**, 223-231.
- Tan, Q., Prysak, M.H. and Woychik, N.A. (2003) Loss of the Rpb4/Rpb7 subcomplex in a mutant form of the Rpb6 subunit shared by RNA polymerases I, II, and III. *Mol Cell Biol*, **23**, 3329-3338.

- Taylor, J.E. and Rudenko, G. (2006) Switching trypanosome coats: what's in the wardrobe? *Trends Genet*, **22**, 614-620.
- Tozluoglu, M., Karaca, E., Nussinov, R. and Haliloglu, T. (2010) A mechanistic view of the role of E3 in sumoylation. *PLoS Comput Biol*, **6**.
- Ujvari, A. and Luse, D.S. (2006) RNA emerging from the active site of RNA polymerase II interacts with the Rpb7 subunit. *Nat Struct Mol Biol*, **13**, 49-54.
- Ulrich, H.D. (2009) The SUMO system: an overview. *Methods Mol Biol*, **497**, 3-16.
- van den Akker, E., Ano, S., Shih, H.M., Wang, L.C., Pironin, M., Palvimo, J.J., Kotaja, N., Kirsh, O., Dejean, A. and Ghysdael, J. (2005) FLI-1 functionally interacts with PIAS α , a member of the PIAS E3 SUMO ligase family. *J Biol Chem*, **280**, 38035-38046.
- Van der Ploeg, L.H., Valerio, D., De Lange, T., Bernards, A., Borst, P. and Grosveld, F.G. (1982) An analysis of cosmid clones of nuclear DNA from *Trypanosoma brucei* shows that the genes for variant surface glycoproteins are clustered in the genome. *Nucleic Acids Res*, **10**, 5905-5923.
- Vanhamme, L., Pays, A., Tebabi, P., Alexandre, S. and Pays, E. (1995) Specific binding of proteins to the noncoding strand of a crucial element of the variant surface glycoprotein, procyclin, and ribosomal promoters of *trypanosoma brucei*. *Mol Cell Biol*, **15**, 5598-5606.
- Vanhamme, L., Poelvoorde, P., Pays, A., Tebabi, P., Van Xong, H. and Pays, E. (2000) Differential RNA elongation controls the variant surface glycoprotein gene expression sites of *Trypanosoma brucei*. *Mol Microbiol*, **36**, 328-340.
- Verma-Gaur, J., Rao, S.N., Taya, T. and Sadhale, P. (2008) Genomewide recruitment analysis of Rpb4, a subunit of polymerase II in *Saccharomyces cerevisiae*, reveals its involvement in transcription elongation. *Eukaryot Cell*, **7**, 1009-1018.
- Vethantham, V., Rao, N. and Manley, J.L. (2007) Sumoylation modulates the assembly and activity of the pre-mRNA 3' processing complex. *Mol Cell Biol*, **27**, 8848-8858.
- Voss, T.S., Healer, J., Marty, A.J., Duffy, M.F., Thompson, J.K., Beeson, J.G., Reeder, J.C., Crabb, B.S. and Cowman, A.F. (2006) A var gene promoter controls allelic exclusion of virulence genes in *Plasmodium falciparum* malaria. *Nature*, **439**, 1004-1008.
- Walgraffe, D., Devaux, S., Lecordier, L., Dierick, J.F., Dieu, M., Van den Abbeele, J., Pays, E. and Vanhamme, L. (2005) Characterization of subunits of the RNA polymerase I complex in *Trypanosoma brucei*. *Mol Biochem Parasitol*, **139**, 249-260.
- Wang, X.D., Lapi, E., Sullivan, A., Ratnayaka, I., Goldin, R., Hay, R. and Lu, X. (2011) SUMO-modified nuclear cyclin D1 bypasses Ras-induced senescence. *Cell Death Differ*, **18**, 304-314.
- Wang, Y., Ladunga, I., Miller, A.R., Horken, K.M., Plucinak, T., Weeks, D.P. and Bailey, C.P. (2008) The small ubiquitin-like modifier (SUMO) and SUMO-conjugating system of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Genetics*, **179**, 177-192.
- Wells, J.M., Prospero, T.D., Jenni, L. and Le Page, R.W. (1987) DNA contents and molecular karyotypes of hybrid *Trypanosoma brucei*. *Mol Biochem Parasitol*, **24**, 103-116.
- Werner, F. and Weinzierl, R.O. (2002) A recombinant RNA polymerase II-like enzyme capable of promoter-specific transcription. *Mol Cell*, **10**, 635-646.
- WHO. (1998) Control and surveillance of African trypanosomiasis. Report of a WHO Expert Committee. *World Health Organ Tech Rep Ser*, **881**, I-VI, 1-114.
- Wickstead, B., Ersfeld, K. and Gull, K. (2004) The small chromosomes of *Trypanosoma brucei* involved in antigenic variation are constructed around repetitive palindromes. *Genome Res*, **14**, 1014-1024.
- Wohlschlegel, J.A., Johnson, E.S., Reed, S.I. and Yates, J.R., 3rd. (2004) Global analysis of protein sumoylation in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*, **279**, 45662-45668.
- Woychik, N.A. and Young, R.A. (1989) RNA polymerase II subunit RPB4 is essential for high- and low-temperature yeast cell growth. *Mol Cell Biol*, **9**, 2854-2859.
- Xhemalce, B., Seeler, J.S., Thon, G., Dejean, A. and Arcangioli, B. (2004) Role of the fission yeast SUMO E3 ligase Pli1p in centromere and telomere maintenance. *Embo J*, **23**, 3844-3853.

- Yan, S., Myler, P.J. and Stuart, K. (2001) Tetracycline regulated gene expression in *Leishmania donovani*. *Mol Biochem Parasitol*, **112**, 61-69.
- Yang, S.H. and Sharrocks, A.D. (2005) PIASx acts as an Elk-1 coactivator by facilitating derepression. *Embo J*, **24**, 2161-2171.
- Yang, X., Figueiredo, L.M., Espinal, A., Okubo, E. and Li, B. (2009) RAP1 is essential for silencing telomeric variant surface glycoprotein genes in *Trypanosoma brucei*. *Cell*, **137**, 99-109.
- Young, R.A. (1991) RNA polymerase II. *Annu Rev Biochem*, **60**, 689-715.
- Yunus, A.A. and Lima, C.D. (2009) Structure of the Siz/PIAS SUMO E3 ligase Siz1 and determinants required for SUMO modification of PCNA. *Mol Cell*, **35**, 669-682.
- Zaros, C., Briand, J.F., Boulard, Y., Labarre-Mariotte, S., Garcia-Lopez, M.C., Thuriaux, P. and Navarro, F. (2007) Functional organization of the Rpb5 subunit shared by the three yeast RNA polymerases. *Nucleic Acids Res*, **35**, 634-647.
- Zhang, X.D., Goeres, J., Zhang, H., Yen, T.J., Porter, A.C. and Matunis, M.J. (2008) SUMO-2/3 modification and binding regulate the association of CENP-E with kinetochores and progression through mitosis. *Mol Cell*, **29**, 729-741.
- Zhao, J. (2007) Sumoylation regulates diverse biological processes. *Cell Mol Life Sci*, **64**, 3017-3033.
- Zhao, X. and Blobel, G. (2005) A SUMO ligase is part of a nuclear multiprotein complex that affects DNA repair and chromosomal organization. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **102**, 4777-4782.
- Zhou, H. and Lee, K.A. (2001) An hsRPB4/7-dependent yeast assay for trans-activation by the EWS oncogene. *Oncogene*, **20**, 1519-1524.

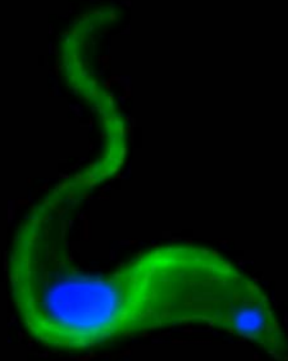


Universidad de Granada



ipbln

Instituto de Parasitología y Biomedicina
"López-Neyra" CSIC



Análisis de la función de la RPB7, la SUMO E3 ligasa SIZ1 y la SUMOilación de la cromatina en la regulación del sitio de expresión de la VSG en *Trypanosoma brucei*.