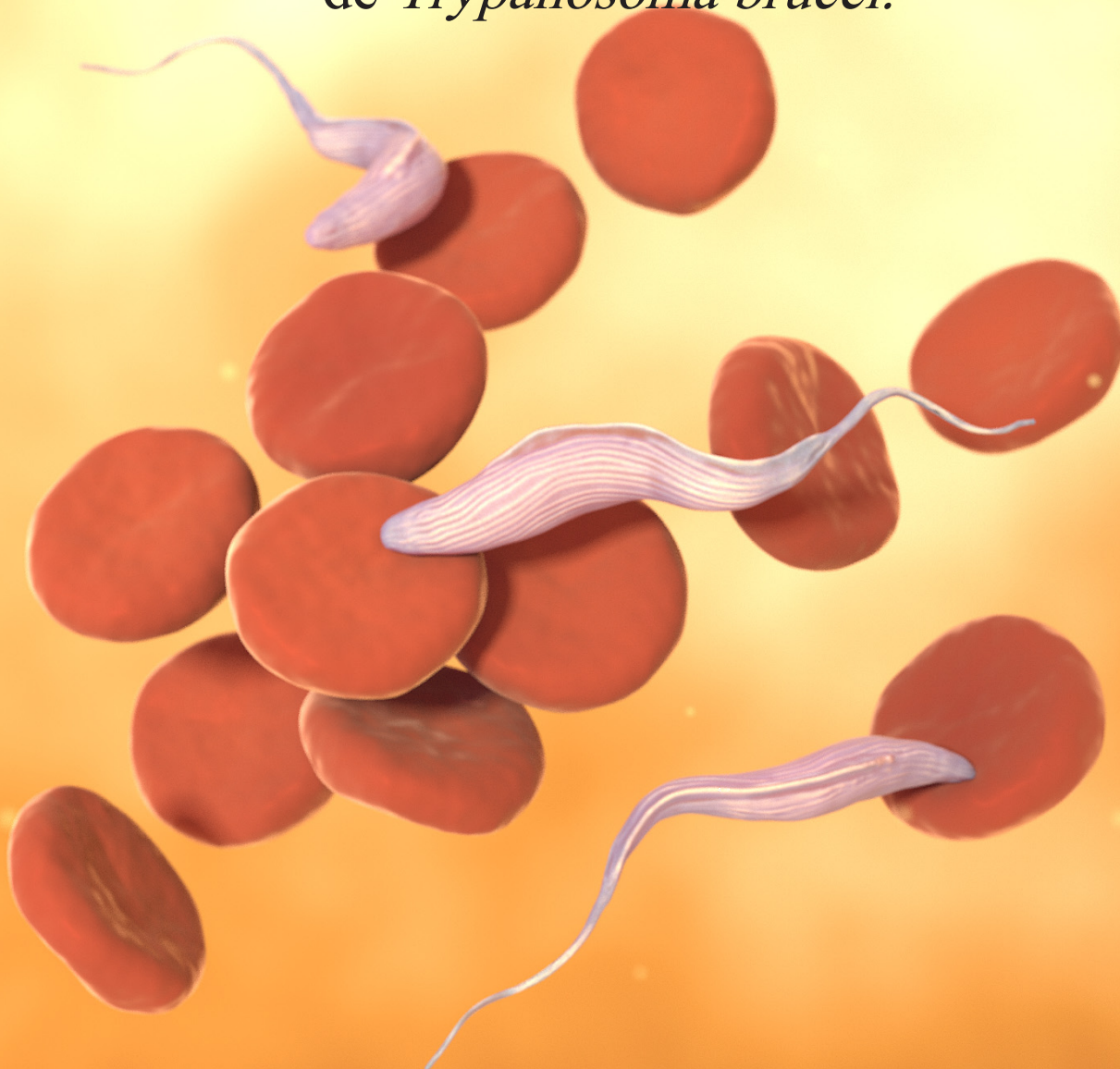


Instituto de Parasitología y Biomedicina
"López-Neyra"
CSIC

Caracterización funcional de las proteínas de
unión a ARN RBP33 y DRBD3 como
reguladoras de la expresión génica
de *Trypanosoma brucei*.



Sandra M. Fernández Moya
Tesis Doctoral
2013

Cubierta anterior y posterior: Tripanosomas en sangre
Autor: Pedro Pablo Fernández Moya (Madrid, Diciembre 2012)



ugr | Universidad
de Granada

ipbln



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

Caracterización funcional de las proteínas de unión a ARN RBP33 y DRBD3 como reguladoras de la expresión génica de *Trypanosoma brucei*.

TESIS DOCTORAL

SANDRA MARÍA FERNÁNDEZ MOYA
Granada, 2013

Editor: Editorial de la Universidad de Granada
Autor: Sandra María Fernández Moya
D.L.: GR 1885-2013
ISBN: 978-84-9028-609-8

**Caracterización funcional de las proteínas de
unión a ARN RBP33 y DRBD3 como
reguladoras de la expresión génica de
Trypanosoma brucei.**

Memoria presentada por la licenciada en Biología,
Sandra María Fernández Moya,
para optar al Título de Doctor.



Fdo.: Sandra M. Fernández Moya

Vº Bº del Director



Fdo.: Antonio M. Estévez García

Investigador Científico Titular
del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC)

Universidad de Granada
Febrero 2013

La Doctoranda D. Sandra María Fernández Moya y el Director de la tesis Dr. Antonio M. Estévez, garantizamos, al firmar esta tesis doctoral, que el trabajo ha sido realizado por el doctorando bajo la dirección del director de la tesis y hasta donde nuestro conocimiento alcanza, en la realización del trabajo, se han respetado los derechos de otros autores a ser citados, cuando se han utilizado sus resultados o publicaciones.

Granada, 14 Febrero de 2013

Director de la Tesis



Fdo.: Antonio M. Estévez García

Doctoranda



Fdo.: Sandra M. Fernández Moya

Esta tesis ha sido realizada en el Instituto de Parasitología y Biomedicina “López.Neyra” bajo la dirección del Doctor Antonio Manuel Estévez García, Investigador Científico Titular del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC).

Granada, Febrero 2013



Antonio M. Estévez García

El que no posee el don de maravillarse ni de entusiasmarse más
le valdría estar muerto, porque sus ojos están cerrados.

Albert Einstein

En el fondo, los científicos somos gente con suerte: podemos
jugar a lo que queramos durante toda la vida.

Lee Smolin

Agradecimientos

Quiero empezar agradeciendo esta tesis a Antonio Estévez, quien hace cinco años puso toda su confianza en mí y me permitió trabajar a su lado, aprendiendo cómo hacer buena ciencia pero también cómo ser un buen científico, un buen compañero y una mejor persona. Realmente has sido mi inspiración y mi guía y nada de esto hubiese sido posible sin tu apoyo, tu cuidado, tus enseñanzas y tu paciencia. Soy consciente de que he tenido la mayor suerte del mundo al tenerte como mi director de tesis y todo lo que sé ahora lo he aprendido de ti. Mil gracias de todo corazón.

A mi familia, en especial a mis padres, que me han apoyado a lo largo del tortuoso camino del predoctoral, sin los que no me hubiese podido ni plantear dedicarme a lo que más me gusta. Por darme esos empujoncitos cuando más flaqueaba mi ánimo y por estar orgullosos siempre de mí. Gracias por todo lo que me habéis dado, y espero poder llegar a devolvéroslo algún día con creces.

A Jesús, mi compañero, mi amigo, mi pareja, en fin, aquel que ha sentido esta tesis más que nadie, soportando mis malos humores y mis malas caras. Pero sobre todo porque es la persona que ha puesto toda su fe en mí, porque cree ciegamente en mí, y ha puesto su futuro y su vida en mis manos. Jamás podré devolverte todo lo que me has dado durante esta tesis y lo único que deseo es que el futuro que viene sea más brillante que el pasado que dejamos atrás. ¡Te quiero mucho!

A mis compañeros del 101, que más que compañeros son ya amigos, de los buenos, de los mejores. A Teresa por su calidez y su sonrisa, por enseñarme lo que es aprovechar el tiempo. ¡Te admiro muchísimo!. A Angélica, por todo, por ser como eres, por ser tú, porque simplemente eres la tía más increíble que he llegado a conocer. A Sonia, mi Sonia, a quien le debo todavía el libro de aprender a decir que no, con la que es imposible no reírse cada cinco minutos y cuyas historias son lo mejor que nunca he escuchado; pero sobre todo porque siempre has estado cuando te he necesitado y no puedo creerme que haya alguien tan generoso como tu en este mundo. A JuanDi, que aunque poquito tiempo, disfruté mucho contigo. A Miguel, por sus películas y sus charlas canal explora-like.

A los chicos del 102; a Diana, por sus consejos; a Isa por su ayuda siempre que se la he pedido, porque tienes un corazón de oro; a Jean-Mathieu por todo un poco, pero sobre todo porque aun recuerdo esas tardes de viernes cuando tienes ganas de irte y un café en buena compañía hace que te olvides de todo. Y a Antonio Barquilla, que aunque ya no forme parte del laboratorio, para mí siempre estabas en la puerta de al lado, y esas visitas al 101 hacían que el laboratorio no estuviese tan vacío (al menos al principio), por ser un gran amigo y un gran científico (con dotes de enseñanza). Gracias.

A la gente del 103/4, porque me acoplé a vuestros cafés, a vuestras charlas y a vuestro día a día y me abristeis los brazos de par en par: a Guio por su dulzura, a Víctor por las charlas en el laboratorio de cultivos, hace mucho que no me río de aquella manera; a Carlos por su ayuda y sobre todo por su ayuda en los premios, jamás pensé encontrarme un ayudante que al final me hiciera el favor de presentar los premios, ¡eres genial! Y por el apoyo a la hora de salir de cervecillas. A Cristina Bosch, a Aurora, a Miguel Angel por enseñarme a que hacer ciencia no significa dejarlo todo por medio y que el respeto a los compañeros es lo mas importante en esta profesión, y por ser

una persona tan cercana, la mayoría de los doctores maduros ni llegan a mirar a los recién llegados predoctorales; y a Cristina, en quien he descubierto un alma sincera y lleno de dulzura que espero no perder aunque nuestros caminos se separen.

A Elena, que como he dicho de Antonio, he descubierto en vosotros dos amigos increíbles, dos personas llenas de fuerza y de vida que siempre llevaré conmigo.

A Kiko, la personalidad del López, por su forma de ser, porque está siempre que hace falta una mano amiga, porque nunca te negará nada si está dentro de sus posibilidades, porque me ayudaste un montón de veces, por los consejos, las charlas en los momentos de bajón, las salidas, ese traslado del maravilloso colchón heredado en tu minicar... Muchísimas gracias por todo!

A Virginia, porque apareciste delante de mí sin darme cuenta y al final he descubierto una persona llena de detalles y de sueños con la que comparto muchísimas cosas. Gracias por estar siempre conmigo!

A Noemí, Marta y Bea, por los buenos tiempos.

A Esther Zumaquero, por tu forma de ser, eres una persona fuerte, independiente y llena de maravillas. Espero no perderte nunca.

A Patricia, por ayudarme tantísimo, sobre todo en los últimos momentos de la tesis. Por las barbacoas, por los cafés, por las salidas, por las charlas, por... un poco por todo y porque pensar en la vida del López y no acordarme de ti es imposible.

A Sara, por la ilusión. Y por la dulzura, y la suerte de haberte conocido. ¡Queda pendiente seguir conociéndonos!

Y al resto de mis compañeros del López, que seguramente me olvidaré de alguno, perdonadme: a Talia, por lo que está por venir; A Paco, por los buenos ratos; a Ezequiel, por mostrarme el otro lado, siempre te recordaré por Avatar; A Luis, por los momentos, las cervezas, los cafés, y los ratos en el comedor; y a Jose Manuel, por su sinceridad y su buen hacer; a David, a Sebastian, a las niñas de Jordi, y al resto del López con los que alguna vez compartimos una comida, una cerveza, un momento. Sois vosotros los que habéis convertido estos cinco años en algo para recordar.

Y no puedo olvidarme de la gente de los servicios: A Alfonso, por su saber hacer, su saber estar y su forma de ser. A Vivi, por toda la ayuda prestada en el laboratorio de radiactividad. A Antonio Lario por su rapidez en el MaldíTOF; y a los de informática que siempre han ayudado cuando el portátil me aseguraba que estaba en las últimas. Después de cinco años avisando, todavía resiste. A los de los medios de cultivo, porque sin ellos la rapidez sería imposible. Y a secretaria, porque con ellos el papeleo parece menos engorroso. A Mari Carmen la bibliotecaria, que aunque ya no esté, la echaré de menos por su buen hacer.

A mis amigos de toda la vida, Dolores, Camino, Miguel, MariaJosé, Luis, David, Penny y la pequeña Julia. Por estar conmigo siempre.

A mi gente de Málaga, Ana, Carmen, Irene, Jose y Patricia. Vosotros llegasteis a ver lo que estaba por ser. Y aun así habeis seguido siendo mis amigos!

A todos, mil gracias.

*A mis padres
y mis hermanos*

A Jesús

Índice

I.	RESUMEN	29
II.	INTRODUCCIÓN	33
II.1	<i>Trypanosoma brucei</i>	35
2.1.1	Morfología, filogenia y patogenia	35
2.1.2	Ciclo de vida	36
2.2	Características biológicas poco comunes	38
2.2.1	Variación antigénica	38
2.2.2	Edición de RNA	39
2.2.3	Organización génica en los cromosomas	40
2.2.4	RNApolimerasas.....	40
2.3	Regulación de la expresión génica	42
2.3.1	Transcripción en tripanosomas	42
2.3.2	Maduración del mRNA y transporte en tripanosomas.....	43
2.3.3	Degradación y traducción del mRNA en tripanosomas	44
2.3.4	Localización del mRNA	48
2.3.5	Regulación Post-traducciona l	51
2.3.6	Proteínas de unión a RNA (RBPs)	52
2.3.6.1.	Proteínas con dominios de dedos de zinc tipo CCCH	52
2.3.6.2.	Proteínas de unión a RNA con dominios PUF	54
2.3.6.3.	Proteínas de unión a RNA con motivos de reconocimiento de RNA (RRM)	55
2.3.7	La teoría del Operón de RNA post-transcripcional	58
2.3.8	<i>TbDRBD3</i> y <i>TbRBP33</i>	58
III.	MATERIALES Y MÉTODOS	61
3.1.	Materiales	63
3.1.1	Líneas celulares de <i>Trypanosoma brucei</i>	63
3.1.2	Anticuerpos	63
3.1.3	Oligos	63
3.1.4	Plásmidos	66
3.1.5	Tampones y medios usados con más frecuencia	67
3.1.6.	Antibióticos	68
3.2.	Métodos	68
3.2.1	<i>Trypanosoma brucei</i>	68
3.2.1.1	Cultivo de sanguíneos	68

3.2.1.2	Cultivo de procíclicos	68
3.2.1.3	Transfección estable de tripanosomas	68
3.2.1.3.1	Tripanosomas sanguíneos	68
3.2.1.3.2	Tripanosomas procíclicos	69
3.2.1.4	Congelación y descongelación de células de <i>T. brucei</i>	69
3.2.1.5	Inmunofluorescencia.	69
3.2.1.6	RNA de interferencia	69
3.2.2	Ácidos nucleicos	70
3.2.2.1.	Trypanosoma brucei y <i>E. coli</i>	70
3.2.2.1.1	Aislamiento de DNA genómico de <i>T. brucei</i>	70
3.2.2.1.2	Preparación de células <i>E. coli</i> electrocompetentes	70
3.2.2.1.3	Transformación de <i>E. coli</i> con plásmidos de DNA	70
3.2.2.1.4	Aislamiento de DNA plasmídico de <i>E. coli</i>	70
3.2.2.2	Protocolos de clonaje estándar	70
3.2.2.2.1.	Protocolos de clonaje	70
3.2.2.2.2.	Amplificación de DNA (PCR)	70
3.2.2.2.3.	Precipitación de DNA	70
3.2.2.2.4.	Extracción de RNA de cultivos de <i>T. brucei</i>	71
3.2.2.2.5.	Análisis de RNA por northern blot	71
3.2.2.2.6.	Análisis de RNA con microarrays	72
3.2.2.2.7.	Marcaje de RNA en 3' con [³² P]Cp	72
3.2.2.2.8.	Secuenciación masiva de RNA	72
3.2.3	Proteínas	73
3.2.3.1.	Producción de Anticuerpos	73
3.2.3.2.	Preparación de lisados de proteínas de <i>T. brucei</i>	73
3.2.3.3.	Inmunoblot	73
3.2.3.4.	Inmunoprecipitación de complejos mRNA-proteínas (CLIP)	74
3.2.3.5.	RT-PCR cuantitativa	74
3.2.3.6.	Purificación por afinidad en tándem (TAP)	75
3.2.3.7.	Tinción de geles con Sypro Ruby	75
3.2.3.8.	Análisis de proteínas por huella peptídica	76
3.2.3.9.	Desfosforilación de proteínas y visualización con Mn ₂₊ -Phostag	76
3.2.3.10.	Análisis de polisomas	76
3.2.3.11.	Actividad luciferasa	76
IV.	OBJETIVOS	77
V.	RESULTADOS	81
	Objetivo 1: Dinámica de los complejos RNP de DRBD3 en respuesta a estrés en <i>Trypanosoma brucei</i>	
	5.1.1. El estrés inducido por arsenito y falta de nutrientes provoca la relocalización	

de DRBD3	81
5.1.2. DRBD3 se asocia con otras proteínas para formar un complejo multiproteico	81
5.1.3. El estrés afecta a la composición de los complejos de proteínas de DRBD3	
5.1.4. DRBD3 permanece unida a los mensajeros que regula en condiciones de estrés	88
 Objetivo 2: Caracterización de la proteína RBP33	
5.2.1 Caracterización Molecular de la proteína de <i>Trypanosoma brucei</i> RBP33 ..	91
5.2.2 El silenciamiento de la proteína RBP33 conduce a la muerte celular del parásito.	93
5.2.3 RBP33 es una proteína de unión a RNA.	93
 Objetivo 3: Proteómica de RBP33	
5.3.1 La proteína RBP33 se encuentra fosforilada <i>in vivo</i>	96
5.3.2 Generación de líneas celulares que expresan TAP-RBP33	97
5.3.3 Identificación de proteínas asociadas a RBP33	100
5.3.4 La metilación de RBP33 no tiene ningún efecto significativo sobre la función de la proteína	102
 Objetivo 4: Ribonómica de RBP33.	
5.4.1 Análisis mediante microarrays de los RNAs expresados diferencialmente al silenciar RBP33	104
5.4.2 Inmunoprecipitación y secuenciación masiva (RNA-Seq) de los RNAs unidos a la proteína RBP33	104
5.4.2.1 Obtención de las muestras	106
5.4.2.2 Preparación de la librería de cDNAs y secuenciación	106
5.4.2.3 Análisis de los resultados.	106
5.4.3 Distribución de las secuencias obtenidas por RNA-Seq	110
5.4.4 Mapeo de la distribución en el genoma de las secuencias obtenidas por RNA-Seq	112
5.4.5 Agrupación funcional de los transcritos que codifican proteínas conocidas ..	112
5.4.6 Efecto del silenciamiento de la proteína RBP33 sobre un reportero LUC con distintas UTRs	118
5.4.7. Comprobación mediante qRT-PCR de los resultados obtenidos por RNA-Seq	121
5.4.8 Efecto del silenciamiento de la proteína RBP33 en transcritos de función desconocida	121
5.4.9 Unión de la proteína RBP33 a transcritos derivados de regiones convergentes del genoma de <i>T. brucei</i>	125

VI.	DISCUSIÓN	127
VII.	CONCLUSIONES	147
VIII.	ANEXO	151
IX.	BIBLIOGRAFÍA	175

Índice de Figuras y Tablas

Figura II.1.	Clasificación de los países con Tripanosomiasis Humana Africana endémica según los casos registrados en 2009	36
Figura II.2.	Diagrama representando el ciclo de vida de <i>Trypanosoma brucei</i> en la mosca tse-tse y en humanos.	37
Figura II.3.	Representación simplificada de una célula de <i>Trypanosoma brucei</i> con una lista de las características únicas del metabolismo del RNA en tripanosomátidos.	39
Figura II.4.	Transcripción génica y procesamiento del pre-mRNA en tripanosomátidos	41
Figura II.5.	Destino de los mRNA en tripanosomas	45
Figura II.6.	Estructura de las proteínas de <i>T. brucei</i> con dominios RRM	56
Figura II.7.	Identificación de las proteínas que se unen a la región 3' UTR de PGK-B	59
Figura V.1.	Efecto del estrés por arsenito y por falta de nutrientes en la localización de DRBD3	
Figura V.2.	Identificación de las proteínas asociadas a DRBD3 por purificación por afinidad en tándem (TAP)	86
Figura V.3.	DRBD3 no se asocia a polisomas	88
Figura V.4.	El estrés por arsenito o por falta de nutrientes afecta a la composición del complejo de DRBD3	89
Figura V.5.	Los transcritos asociados a DRBD3 continúan unidos a la proteína en condiciones de estrés	90
Figura V.6.	Alineamiento de las secuencias de RBP33 de los tripanosomátidos <i>Trypanosoma brucei</i> (Tb927.8.990), <i>Leishmania major</i> (LmjF.07.0802) y <i>Trypanosoma cruzi</i> (Tc00.1047053508569.90/TcCLB.508.569.90)	91
Figura V.7.	Expresión de <i>TbRBP33</i> en tripanosomas sanguíneos y procíclicos	92
Figura V.8.	Expresión y localización de RBP33 en la célula	93
Figura V.9.	Silenciamiento de la expresión de RBP33 mediante RNAi.	94
Figura V.10.	RBP33 es una proteína de unión a RNA.	95
Figura V.11.	Fosforilación de la proteína RBP33	97
Figura V.12.		98
Figura V.13.	Expresión en tripanosomas de la versión de la proteína <i>TbRBP33</i> con la secuencia de purificación por afinidad TAP en la región N-terminal de la proteína	99
Figura V.14.	Identificación de las proteínas asociadas a RBP33 por purificación en tandem por afinidad (TAP, tandem affinity purification)	101

Figura V.15. Metilación de RBP33	103
Figura V.16. Esquema de la obtención de los RNAs unidos a la proteína RBP33	107
Figura V.17. Esquema de la obtención de muestras para secuenciación masiva	108
Figura V.18. Esquema del análisis de los datos obtenidos por RNA-Seq	109
Figura V.19. Distribución de los RNAs identificados con un cambio en la expresión (Fold change) mayor que 4 en el análisis de los resultados de la secuenciación masiva	110
Figura V.20. Visualización de la distribución en el genoma de las lecturas obtenidas por RNA-Seq	113
Figura V.21. Análisis de la distribución de los términos GO de los RNAs identificados con función conocida	118
Figura V.22. El silenciamiento de la proteína RBP33 no tiene un efecto significativo en la degradación ni en la traducción de genes reporteros.	119
Figura V.23. Comprobación de los datos RNASeq mediante RT-PCR cuantitativa (qRT-PCR)	
Figura V.24. Efecto del silenciamiento de RBP33 en la expresión de RNAs específicos	122
Figura V.25. Northern blot de cada una de las regiones indicadas en la figura V.24	124
Figura V.26 RBP33 une transcritos derivados de regiones de cambio de hebra convergentes..	125
Figura VI.1 Esquema de la posible localización y función de las proteínas RBP33 y DRBD3 en T. brucei	145
Figura VIII.1. Plásmidos de DRBD3	153
Figura VIII.2. DHH1, PABP1 y PABP2 no translocan al núcleo tras el tratamiento con arsenito.	
Figura VIII.3. Purificación por afinidad en tándem (TAP) de PABP2, DRBD3, el ribosoma y RRP44	157
Tabla II.1. Elementos identificados en cis y factores en trans que regulan la expresión génica específica de estadio en tripanosomátidos	49
Tabla II.2. Proteínas reguladoras de unión a RNA en tripanosomátidos	53
Tabla V.1. Proteínas asociadas a DRBD3	87
Tabla V.2 RNAs que muestran expresión diferencial tras silenciar la expresión de RBP33 mediante RNAi	105
Tabla V.3 Genes identificados con transcritos asociados a RBP33 que tienen una alta probabilidad de codificar proteínas funcionales y que codifican proteínas validadas experimentalmente	111
Tabla VI.1 Comparación regiones convergentes identificadas por (Wen et al, 2011) como fuente de siRNAs en tripanosomas con los datos obtenidos en RNA-Seq	143
Tabla VIII.1. Resultado del análisis de la secuenciación masiva	159
Tabla VIII.2. Tabla de categorías GO	163

Abreviaturas

ACT	Actina
ARE	Elemento rico en adenosinas y uridinas; del inglés <i>AU- Rich Element</i>
cDNA	DNA complementario; del inglés <i>Complementary DNA</i>
DNA	Ácido desoxirribonucleico; del inglés <i>DesoxirriboNucleic Acid</i>
dsRNA	RNA de doble hebra; del inglés <i>double-strand RNA</i>
GPI	Glicosilinositol fosfato; del inglés <i>GlycosilPhosphate Inositol</i>
HAT	Tripanosomiasis Africana humana; del inglés <i>Human African Trypanosomiasis</i>
IP	InmunoPrecipitación
kDa	Kilodalton
mRNA	RNA mensajero; del inglés <i>messenger RNA</i>
miRNA	Micro RNA
NLS	Señal de localización nuclear; del inglés <i>Nuclear Localisation Signal</i>
NMD	<i>Nonsense Mediated Decay</i>
PABP	Proteína de unión a poli (A); del inglés <i>Poly(A) Binding Protein</i>
PAP	Poli(A) polimerasa
pb	Pares de bases
PBS	Tampón salino fosfatado; del inglés, <i>Phosphate-Buffered Saline</i>
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa; del inglés <i>Polymerase Chain Reaction</i>
PTC	Codón de parada prematuro; del inglés <i>Premature Termination Codon</i>
PTU	Unidad de transcripción policistrónica; del inglés <i>Polycistronic Transcription Unit</i>
RBP	Proteína de unión a RNA; del inglés <i>RNA Binding Protein</i>
RNA	Ácido ribonucleico; del inglés <i>RiboNucleic Acid</i>
RNAi	Interferencia de RNA; del inglés <i>RNA interference</i>
RNA-Seq	Secuenciación masiva de RNA
RNP	Ribonucleoproteína
RRM	Motivo de reconocimiento de RNA; del inglés <i>RNA Recognition Motif</i>
RT-PCR	Reverso transcripción y PCR; del inglés, <i>ReverseTranscription PCR</i>
SDS-PAGE	Electroforesis desnaturalizante en gel de poliacrilamida
SIDA	Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida
siRNA	RNA pequeño interferente; del inglés <i>small interferent RNA</i>
snRNA	RNA pequeño nuclear; del inglés <i>small nuclear RNA</i>
snoRNA	RNA pequeño nucleolar; del inglés <i>small nucleolar RNA</i>
SSR	Región de cambio de hebra; del inglés <i>Switch Strand Region</i>
TAP	Purificación por afinidad en tándem; del inglés <i>Tandem Affinity Purification</i>
tRNA	RNA transferente; del inglés <i>transferent RNA</i>
URE	Elemento rico en uridinas; del inglés <i>U-Rich Element</i>
UPF-1	<i>up-frameshift 1</i>

UTR	Región no codificante; del inglés <i>UnsTranslated Region</i>
U.V.	Luz Ultravioleta
VSG	Glicoproteína de superficie variable; del inglés <i>Variant surface glycoprotein</i>
FTZC	Componente de la zona de transición del flagelo; del inglés <i>Flagellum Transition Component Zone</i>

Resumen

Resumen

La regulación post-transcripcional tiene una importancia excepcional en los tripanosomátidos. Muchos de estos organismos causan enfermedades graves en el hombre. Parasitan cíclicamente hospedadores invertebrados y mamíferos y tienen que adaptarse, por tanto, a condiciones muy distintas según se hallen en uno u otro hospedador. El inicio de la transcripción no parece estar regulada en los tripanosomátidos, sino que más bien dependen de fenómenos post-transcripcionales como el procesamiento, recambio, traducción y localización de los RNAs mensajeros (mRNAs) para modelar su proteoma a lo largo del ciclo de vida.

Recientemente se ha puesto de manifiesto el enorme potencial de las proteínas de unión a RNA (RBPs) como reguladores post-transcripcionales. Estas proteínas están presentes en todos los organismos, y a menudo sobrepasan en número a los reguladores transcripcionales clásicos. Las RBPs se suelen encontrar asociadas a subconjuntos de mRNAs que codifican proteínas que están relacionadas funcionalmente (operones de RNA), y por tanto son capaces de regular a la vez muchos mRNAs de forma coordinada

En esta tesis hemos llevado a cabo la caracterización de dos RBPs de *Trypanosoma brucei*, DRBD3 y RBP33.

La proteína *TbDRBD3* es una de las pocas proteínas de unión a RNA caracterizadas en *T. brucei*. Esta proteína es esencial en tripanosomas sanguíneos y procíclicos y se asocia a un conjunto de mRNAs, estabilizándolos (Estevez, 2008; Stern et al, 2009). En esta tesis se ha llevado a cabo el análisis del comportamiento de la proteína DRBD3 bajo diferentes condiciones de estrés. DRBD3 forma parte de un complejo multiproteico que sufre cambios en la localización celular y en la composición del complejo dependiendo del tipo de estrés. DRBD3 se localiza en el citoplasma de las células en condiciones normales pero al aplicar estrés oxidativo por arsenito de sodio, la proteína se transloca al núcleo. Por otra parte, bajo condiciones de estrés nutricional, la proteína se acumula en gránulos de estrés, alterando además la composición del complejo proteico pero manteniendo los mRNAs específicos a los que se une. Estos resultados sugieren que la proteína DRBD3 transporta mRNAs regulados en la célula en forma de complejos ribonucleoproteicos que se remodelan en respuesta a cambios ambientales.

La proteína *TbRBP33* se localiza principalmente en el núcleo de tripanosomas sanguíneos y procíclicos y es esencial para la supervivencia del parásito en ambas formas de vida. RBP33 se modifica post-traduccionalmente por metilación y fosforilación, aunque las implicaciones funcionales de estas modificaciones todavía no se conocen. RBP33 se asocia a un conjunto de proteínas de las que se han identificado UPF-1 (*up-frameshift 1*) y la proteína de unión a poli(A) 2 (*poly(A) binding protein 2, PABP2*). El estudio del transcriptoma de *T. brucei* en ausencia de la proteína dio lugar a la identificación de transcritos sobreexpresados derivados de genes que codifican proteínas *hipotéticas* localizados en regiones de cambio de hebra (SSRs), además de un conjunto de transcritos que codifican las llamadas proteínas RHS. El análisis por microarrays y por secuenciación masiva de los mensajeros asociados a la proteína nos ha permitido identificar un conjunto de transcritos compuesto por mRNAs que codifican proteínas de membrana y transcritos derivados de regiones que deberían estar silenciadas (SSR convergentes, regiones de cambios de polimerasa, extremo de los cromosomas, etc.).

Nuestros resultados indican que RBP33 puede tener un papel en la regulación del procesamiento de estos RNAs o en la elongación de la transcripción de la RNA polimerasa II.

Introducción

2.1. *Trypanosoma brucei*

2.1.1. Morfología, filogenia y patogenicidad

Los tripanosomas son parásitos eucariotas que pertenecen al género *Trypanosoma*, dentro del orden *Kinetoplastida*. Estos protozoos unicelulares tienen alrededor de 20 µm de largo y 1-3 µm de ancho y se mueven constantemente con la ayuda de un flagelo unido al cuerpo celular. El nombre del orden se lo da el kinetoplasto, el genoma mitocondrial del parásito, que está localizado en la región posterior de la célula, cerca del cuerpo basal, una estructura formada por microtúbulos localizada en la base del flagelo (Fenn & Matthews, 2007). Dos subespecies de *Trypanosoma brucei* (*T. brucei*) son las responsables de la tripanosomiasis humana africana (*Human African Trypanosomiasis, HAT*), también conocida como la Enfermedad del sueño: *T.b. gambiense*, que causa una forma crónica de la enfermedad en las regiones del oeste y del centro de África y *T.b. rhodesiense*, que es responsable de la forma más aguda de la enfermedad, concentrada en el este y en el sur de África (Figura II.1).

La enfermedad del sueño afecta alrededor de 36 países en el África sub-sahariana, donde su vector, la mosca tse-tse *Glossina spp.*, tiene su hábitat. En los últimos 30 años, la falta de medidas de control y tratamientos llevó al incremento de la presencia de estos parásitos en las regiones afectadas, superando en zonas de Angola, Congo o el sur de Sudán, al número de fallecidos por SIDA (http://www.who.int/trypanosomiasis_african). Entre 1997 y 2006, los infectados con *T.b. gambiense* descendieron un 69%. En el caso de *T.b. rhodesiense*, que no supone más que el 4% del total de afectados en 2006, no se ha visto ningún descenso respecto a etapas anteriores. En 2009, el número de nuevos casos descendió por primera vez en 50 años por

debajo de 10.000 afectados y se estima que el número actual de casos es de 30.000 (Figura II.1, (Simarro et al, 2011). Sin embargo, debido al cambio climático, es posible que pueda verse alterado el ciclo de vida de *Glossina* o su distribución geográfica, aumentando el rango de dispersión de la enfermedad en humanos, lo que ha llevado actualmente a considerar a la HAT como una de las 12 enfermedades infecciosas humanas que pueden verse agravadas con el calentamiento global (Moore et al, 2012). Otra subespecie de *T. brucei*, *T.b. brucei*, causa una enfermedad similar llamada Nagana en animales domésticos y salvajes, impidiendo que las regiones afectadas por la enfermedad, con una gran pobreza ya de por sí, puedan tener un adecuado desarrollo ganadero.

La enfermedad del sueño consta de dos etapas: la primera etapa o etapa temprana, también conocida como fase hemolinfática, se define por la presencia de tripanosomas únicamente en sangre y en linfa (Matthews, 2005). Los síntomas descritos son fiebre, inflamación de los ganglios linfáticos, dolores musculares, pérdida de peso, debilidad, dolores de cabeza e irritabilidad. La segunda etapa o etapa tardía de la enfermedad, conocida también como fase neurológica, se caracteriza por la presencia de los parásitos en el líquido cerebroespinal: los tripanosomas han logrado cruzar la barrera hematoencefálica e invadir el Sistema Nervioso Central. En esta etapa se dan cambios en el comportamiento, confusión, mala coordinación, alteración de los ciclos del sueño y coma (Brun et al, 2010). Sin tratamiento, la infección por *T.b. gambiense* se caracteriza por una progresión lenta, de alrededor de 3 años, hasta la muerte de la persona infectada, mientras que en el caso de *T.b. rhodesiense*, la muerte llega en semanas o como mucho, meses.

Los animales domésticos y salvajes

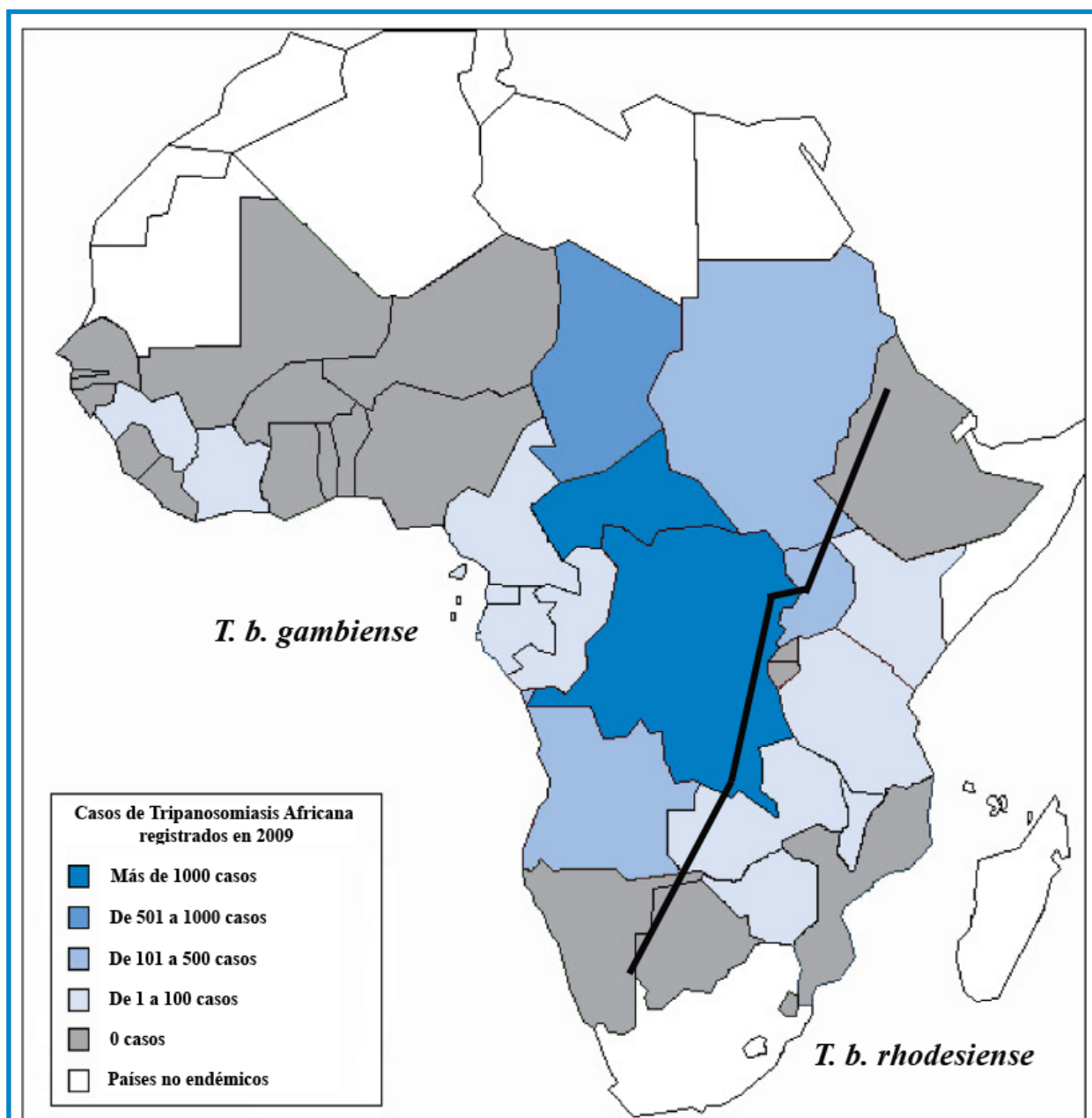


Figura II.1. Clasificación de los países con Tripanosomiasis Humana Africana endémica según los casos registrados en 2009.

La línea negra indica la separación geográfica de ambas especies en el continente africano. (Imagen tomada y modificada de (Simarro et al, 2011))

también pueden infectarse con *T.b. rhodesiense* y *T.b. gambiense*; sin embargo, no desarrollan la enfermedad, siendo una reserva animal desde la que las moscas tse-tsé pueden adquirir de nuevo la infección (Njiokou et al, 2006).

2.1.2. Ciclo de vida

Durante su ciclo de vida, los tripanosomas alternan entre un insecto vector y un hospedador mamífero. Debido a la enorme

diferencia entre ambos hospedadores, los tripanosomas sufren importantes cambios morfológicos y metabólicos que permiten al parásito adaptarse rápidamente a nuevos entornos tan diferentes como son la sangre de un hospedador mamífero y el tracto digestivo de una mosca tse-tsé. Además, son capaces de alternar entre formas proliferativas y no proliferativas dentro de un mismo hospedador (Figura II.2).

La forma metacíclica no proliferativa se transfiere por una picadura, desde las glándulas salivares de la mosca a la sangre del mamífero, donde se transforma en una forma proliferativa denominada forma sanguínea *slender* (esbelta). Estas células expresan una capa protectora compuesta de glicoproteínas de superficie variables (VSGs) ancladas por glicosilinositol fosfato (GPI), que les permite evadir la respuesta inmune a través de la llamada variación antigénica (McCulloch et al, 2004). El kinetoplasto está localizado en la región posterior de la célula y la actividad mitocondrial está prácticamente reprimida. Por ello, utilizan exclusivamente la abundante glucosa presente en la sangre del hospedador mamífero para obtener energía mediante la glicolisis, que tiene lugar en un orgánulo celular denominado glicosoma. A medida que se incrementa el número de parásitos en

sangre, va ocurriendo una diferenciación a una forma no proliferativa más gruesa y con un flagelo más corto, denominada forma *stumpy* (rechoncha). La acumulación de células no proliferativas limita el crecimiento del número de parásitos, alargando la vida del hospedador (y por tanto, la probabilidad de transmisión de la enfermedad). Los tripanosomas sanguíneos *stumpy* están metabólicamente preadaptados a la fuente de energía que encontrarán en la mosca tse-tse, alargando su mitocondria y expresando enzimas del ciclo de los ácidos cítricos y de la cadena respiratoria que están ausentes en los tripanosomas sanguíneos *slender* (Priest & Hajduk, 1994). Además, poseen la capacidad de diferenciarse rápidamente a tripanosomas procíclicos proliferativos en el tracto digestivo de la mosca, algo esencial para una transmisión efectiva y el establecimiento eficaz de la infección en el vector (Vickerman, 1985). Los

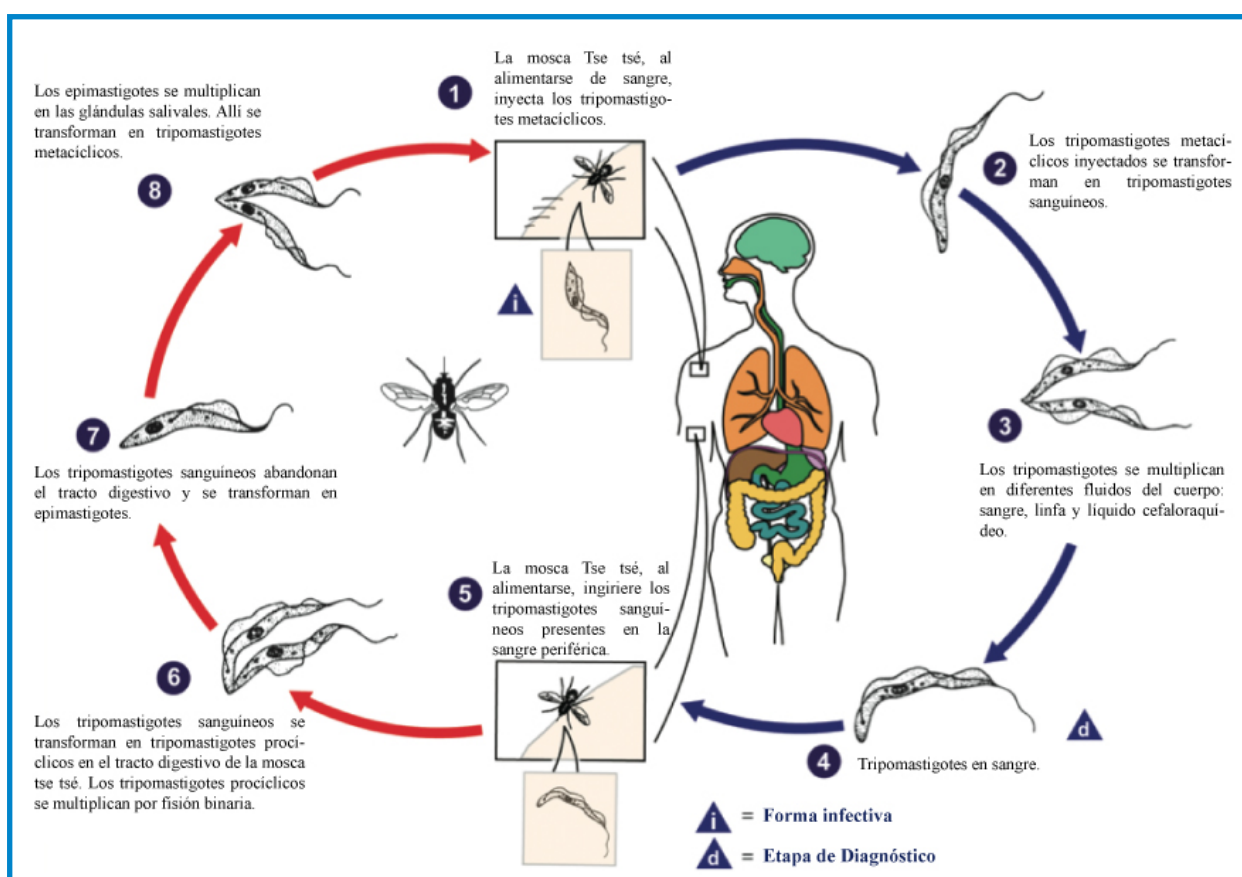


Figura II.2. Diagrama representando el ciclo de vida de *Trypanosoma brucei* en la mosca tse-tse y en humanos.

Imagen tomada de Alexander J. da Silva and Melanie Moser, Librería de Imágenes del Centro de Salud Pública para el Control de Enfermedades.

tripanosomas procíclicos (tripomastigotes) expresan una capa de proteínas de superficie diferente a los tripanosomas sanguíneos, reemplazando las VSGs por prociclinas EP y GPEET, ancladas también por GPIs (Roditi & Liniger, 2002). El kinetoplasto se desplaza desde la región terminal de la célula hacia una región a medio camino entre la anterior y el núcleo (Matthews, 2005). La prolina pasa a ser la principal fuente de energía. La mitocondria se alarga (Priest & Hajduk, 1994) y se expresan enzimas del ciclo de los ácidos tricarbónicos y

de la cadena de transporte de electrones (Flynn & Bowman, 1973). Tras establecerse en el tracto digestivo, los tripanosomas detienen su división y migran a las glándulas salivares de la mosca, donde como formas epimastigotes, se anclan a las paredes de la glándula gracias al flagelo y vuelven a proliferar. Posteriormente, algunas se diferencian a formas metacíclicas no-proliferativas libres en el lumen, con una readquirida capa de VSGs como preparación a su transmisión a un nuevo hospedador mamífero.

2.2. Características biológicas poco comunes

Los tripanosomas no son sólo importantes desde el punto de vista médico y veterinario. Debido a que divergieron de manera temprana en el linaje eucariota (Stevens & Gibson, 1999), estos parásitos exhiben fenómenos biológicos aparentemente únicos (Figura II.3). Muchos de estos procesos fueron descritos por vez primera en tripanosomas, sirviendo como modelos para estudiar eucariotas más complejos: la edición de RNA (Etheridge et al, 2008), la variación antigénica (Borst et al, 1993), la estructura, biosíntesis y función de los anclajes de membrana GPI (Vickerman, 1969), (Ferguson, 1999)) o el *trans-splicing* (Benz et al, 2005) entre otros.

2.2.1. Variación antigénica

T. brucei es un parásito extracelular, que se encuentra expuesto a la respuesta inmune del hospedador. Sin embargo, sobrevive en la sangre y en los líquidos tisulares de los mamíferos mediante la llamada variación antigénica (Vickerman & Luckins, 1969), un mecanismo que poseen estos parásitos para evadir al sistema inmune gracias a un cambio frecuente de proteínas de la superficie celular (revisado en (Vanhamme & Pays, 1995); (Cross

et al, 1998b)). Cada célula está completamente cubierta por una capa de glicoproteínas de superficie variables, las VSGs, que los protegen de los factores líticos del plasma humano. Cuando la infección ocurre en la sangre, las VSGs son reconocidas por el sistema inmune del hospedador, que comienza a producir anticuerpos IgM e IgG, capaces de neutralizar a los tripanosomas a los que reconocen, disminuyendo así el grado de parasitemia. Sin embargo, algunos tripanosomas sanguíneos han cambiado previamente las glicoproteínas de la superficie por una versión con una región antigénica diferente que no son reconocidas por los anticuerpos circulantes, por lo que sobreviven y pueden seguir proliferando hasta que se desarrollen nuevos anticuerpos frente a ellos (Pays & Nolan, 1998). El continuo juego entre la reacción del sistema inmune del hospedador y la variación antigénica del parásito sirve al tripanosoma para controlar su propio crecimiento, exhibiendo y después cambiando sus antígenos de superficie. El beneficio de esta estrategia lleva a una infección persistente debido a la presencia de un número constante y tolerable de parásitos en sangre, en lugar de la muerte del hospedador por un crecimiento descontrolado de la población parasitaria (Pays & Nolan, 1998).

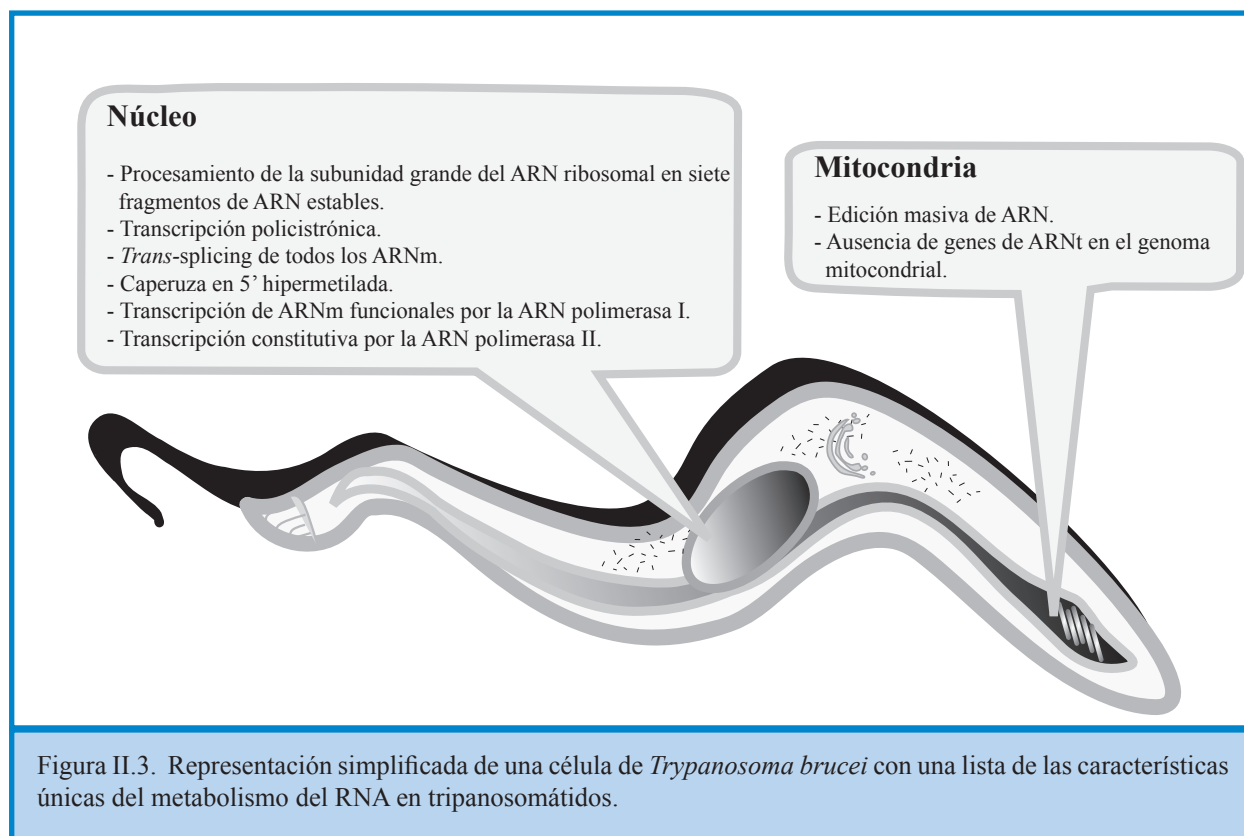
Se pueden identificar alrededor de 1000 genes y pseudogenes de VSGs en el genoma de tripanosomas, en regiones próximas a los telómeros y en cromosomas de pequeño tamaño denominados mini cromosomas ((Vanhamme & Pays, 1995); (Barry, 1997)), pero sólo una glicoproteína se expresa en un determinado momento. El cambio ocurre o bien por un cambio del gen de la VSG de uno de los 20 sitios de expresión conocidos (por recombinación del ADN) o por el silenciamiento del sitio de expresión activo y la activación de otro sitio de expresión diferente en otro cromosoma (lo que se llama activación *in situ* ((Borst et al, 1993), (Cross et al, 1998a)). El fenómeno de variación antigénica hace muy difícil desarrollar una vacuna contra la enfermedad.

2.2.2. Edición de RNA

La mayoría de los pre-mRNA mitocondriales (12 de los 18 que codifican proteínas mitocondriales (Ferguson, 1999)) sufren importantes reacciones de edición para poder reconstituir un marco abierto de lectura.

El proceso de edición del RNA consiste en la inserción o delección post-transcripcional de residuos de uridinas en sitios específicos de los mRNA (Etheridge et al, 2008), creando codones de traducción para metionina, corrigiendo cambios en los marcos de lectura e incluso creando marcos abiertos de lectura completos (Feagin & Stuart, 1988). Estas reacciones de edición pueden llegar a ser tan numerosas como ocurre en el caso del transcrito que codifica la subunidad 7 de la NADH deshidrogenasa mitocondrial, en el que el pre-mRNA de 783 nucleótidos se edita insertando 551 residuos de uridina y eliminando otras 88 uridinas de 391 sitios diferentes (Stuart, 1998).

El genoma de la mitocondria o kinetoplasto está compuesto por numerosas copias de DNA circular, que codifican las proteínas involucradas en la cadena respiratoria y en la fosforilación oxidativa y rRNAs (los maxicírculos, con alrededor de 50 copias en la mitocondria y aproximadamente 25 kb) y los RNA guía cortos (los minicírculos, con unas 10.000 copias y aproximadamente 1 kb) que son esenciales para la edición de



los transcritos defectuosos derivados de los maxicírculos ya que contienen la secuencia informativa que necesita la maquinaria de edición para la inserción de uridinas en los sitios precisos (Blum et al, 1990). El estudio de la función de estos minicírculos reveló por primera vez el fenómeno de la edición de RNA en eucariotas (referencias en (Koslowsky et al, 1990)).

El modelo de edición propuesto en tripanosomas implica la unión del gRNA justo en 3' del sitio de edición. El complejo de edición actúa sobre la base a corregir, primero cortándola para, a continuación, añadir los residuos de uridina al extremo 3' terminal del sitio de corte en 5', todo mediante una uridil transferasa terminal (TUTasa). Los residuos de uridinas se aparean con los nucleótidos guías del gRNA y extienden el dúplex. Una exonucleasa 3'-5' eliminará posteriormente las uridinas que no correspondan a la secuencia guía y una RNA ligasa une el fragmento modificado al resto de la secuencia (revisado en (Estevez & Simpson, 1999)).

2.2.3. Organización génica en los cromosomas

El genoma nuclear de los tripanosomas está compuesto por 11 cromosomas diploides megabásicos recientemente secuenciados (Berriman et al, 2005) y alrededor de un centenar de minicromosomas (que sirven de almacén a multitud de genes de VSGs flanqueados por secuencias repetidas de 177 pares de bases). La organización genética de los tripanosomas es aparentemente única en eucariotas: los genes se organizan en largas unidades policistrónicas de hasta 100 marcos abiertos de lectura. Las unidades transcripcionales adyacentes pueden ser convergentes o divergentes, y están separadas por regiones llamadas regiones de cambio de hebra (*Strand Switch Regions*, SSR) (Figura II.4, (Berriman et al, 2005)). El procesamiento de los policistrones requiere dos pasos acoplados: *trans-splicing* de un exón llamado *spliced leader* (SL) en el

extremo 5' de cada cistrón y poliadenilación en el extremo 3' del gen anterior ((Benz et al, 2005), (Matthews et al, 1994)). Como consecuencia, todos los RNA mensajeros de los tripanosomas comienzan por los mismos 39 nucleótidos que corresponden a los del exón SL. Además, la unión del exón SL añade una caperuza en el extremo 5' del mensajero (Perry et al, 1987) que los protege de la degradación. Esta caperuza, también conocida como *cap4*, está hipermetilada y es la caperuza conocida más modificada de todos los eucariotas. Se ha comprobado que esta estructura es importante en traducción y en el *trans-splicing* (Zamudio et al, 2009). Varios análisis han revelado que la acción del *trans-splicing* determina el sitio de poliadenilación del gen situado en 5' de la región de corte, sugiriendo que ambas reacciones están funcionalmente acopladas ((Benz et al, 2005; Matthews et al, 1994)).

2.2.4. RNA polimerasas

En la mayoría de los eucariotas, la RNA polimerasa I es la responsable de transcribir los RNA ribosomales, la RNA polimerasa II transcribe RNA mensajeros y pequeños RNAs no codificantes y la RNA polimerasa III se hace cargo de los RNA transferentes (tRNA), U RNAs y otros RNAs pequeños no codificantes. Los tripanosomas son también poco convencionales en este aspecto; además de transcribir rRNAs, la RNA polimerasa I transcribe los genes que codifican para las proteínas de superficie mayoritarias: las VSGs en las formas sanguíneas y las prociclinas en las formas procíclicas ((Gunzl et al, 2003), (Kooter & Borst, 1984), (Rudenko et al, 1989); (Gunzl et al, 2003); (Clayton et al, 1990)). En otros eucariotas, la producción de mRNAs funcionales derivados de la RNA polimerasa I resultó ineficiente (Grummt & Skinner, 1985). Esta habilidad única de utilizar una RNA polimerasa I se debe probablemente al *trans-splicing*, donde se añade post-transcripcionalmente a los pre-mRNA una caperuza en el extremo 5' habilitando todos los tipos de transcritos para la traducción y, por lo tanto al contrario de lo que

ocurre en los demás eucariotas, presentando un aparente desacoplamiento entre la transcripción y la adición de la caperuza al transcrito. De hecho, en tripanosomas se pueden transcribir mRNAs traducibles usando cepas que expresan polimerasas de bacteriófagos tipo T3 y T7 (Wirtz et al, 1994). Hay dos propiedades importantes que explican el uso de esta RNA polimerasa I en el caso de la transcripción de las proteínas de superficie: una, que en tripanosomas la RNA polimerasa I es regulable, ya que se han identificado promotores específicos en los genes de las VSGs y las prociclinas ((Clayton

et al, 1990), (Gottesdiener et al, 1991), (Janz & Clayton, 1994), (Zomerdijk et al, 1990)), algo que puede ser importante para la variación antigénica. Y dos, que la eficiencia de la transcripción de la RNA polimerasa I es 10 veces mayor que la de la RNA polimerasa II (Biebinger et al, 1996), una propiedad fundamental para producir a partir de un sólo gen activo la cantidad suficiente de moléculas de mRNA de VSGs para dar lugar al 10% del total de mensajeros en los tripanosomas sanguíneos (Clayton, 2002).

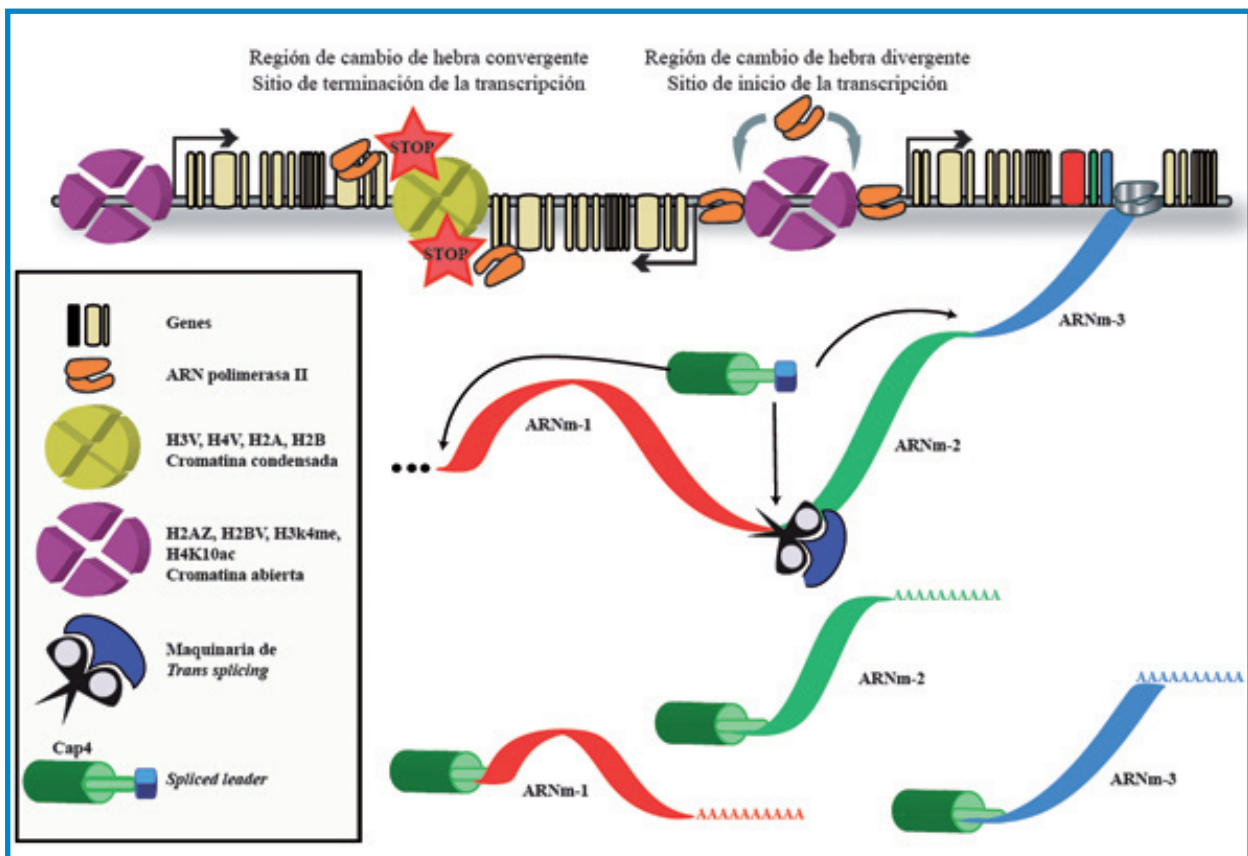


Figura II.4. Transcripción génica y procesamiento del pre-mRNA en tripanosómidos.

El cromosoma se representa con tres unidades transcripcionales policistrónicas (PTU) separadas por regiones de cambio de hebra (SSR). La transcripción se inicia en las SSRs entre dos PTUs divergentes y termina en las SSRs entre dos PTUs convergentes. Las variantes de histonas de las SSRs convergentes son diferentes de las que están asociadas a las SSR divergentes. Los pre-mRNA policistrónicos se procesan a mRNA maduros e individuales por la acción de dos reacciones acopladas: el *trans-splicing* de un exón con caperuza llamado *spliced-leader* (SL) en el extremo 5' de la secuencia y la poliadenilación en el extremo 3'.

2.3. Regulación de la expresión génica

Como se mencionó antes, los tripanosomátidos alternan entre dos tipos de hospedadores muy distintos, con diferente composición, temperatura, nutrientes y defensas. Esto requiere una adaptación rápida y eficaz, que viene dada por una precisa regulación de la expresión génica.

2.3.1. Transcripción en tripanosomas

A diferencia de los operones bacterianos que contienen genes regulados de un mismo proceso biológico, las unidades transcripcionales policistrónicas en tripanosomátidos contienen genes sin relación funcional aparente (Imagen II.4, (Berriman et al, 2005)). Además, los transcritos derivados de una misma unidad transcripcional policistrónica pueden mostrar diferentes patrones de expresión a pesar de que todos están codificados en el mismo policistrón. En los eucariotas, gran parte de la regulación de la expresión génica se lleva a cabo a nivel transcripcional. Así, los promotores y los factores de transcripción indican los genes que tienen que ser transcritos por la RNA polimerasa II en cada condición en particular. En tripanosomas encontramos algo muy diferente: debido al mecanismo inusual de producción de mRNA maduros, el inicio de la transcripción parece ser poco importante para la regulación de la expresión génica. De hecho, la transcripción por la RNA polimerasa II parece ser constitutiva (Martinez-Calvillo et al, 2003). Además, se han identificado muy pocas regiones reguladoras, y sólo han conseguido caracterizarse el promotor del *SL* ((Gilinger & Bellofatto, 2001), (Das et al, 2005), (Schimanski et al, 2005)), de los genes ribosomales, las prociclinas (Clayton et al, 1990; Janz & Clayton, 1994) y las VSGs

((Gottesdiener et al, 1991), (Zomerdijk et al, 1990)). Tampoco se han conseguido caracterizar factores de transcripción. De hecho, los análisis bioinformáticos realizados hasta la fecha han podido identificar escasos homólogos de factores de transcripción eucariotas típicos ((Ivens et al, 2005), (Iyer et al, 2008)).

Ensayos *run-on* de transcripción en *Leishmania* han mostrado que la transcripción por la RNA polimerasa II se inicia en las SSR divergentes y finaliza en las SSR convergentes, en regiones con tRNAs transcritos por la RNA polimerasa III o en regiones de RNA transcritos por la RNA polimerasa I ((Martinez-Calvillo et al, 2003), (Martinez-Calvillo et al, 2004)). También se ha descrito que existen diferentes variantes de histonas en las SSR divergentes y convergentes ((Mandava et al, 2007), (Siegel et al, 2009), (Respuela et al, 2008), (Thomas et al, 2009)). La histona modificada H4K10ac, junto con las variantes de histonas H2AZ, H2BV y el factor BDF3 se encuentran preferentemente en las SSR divergentes, coincidiendo con los sitios de inicio de la transcripción por la RNA polimerasa II, mientras que las histonas H2A, H2B, H3V y H4V marcan los lugares del fin de la transcripción en regiones convergentes o coincidiendo con regiones de transcripción por la RNA polimerasa I y III ((Mandava et al, 2007), (Wright et al, 2010)). Los límites de las unidades transcripcionales están, entonces, marcados por las distintas conformaciones de la cromatina, y la transcripción por la RNA polimerasa II parece estar regulada únicamente por modificaciones en las histonas en lugar de por factores de transcripción (Talbert & Henikoff, 2009).

Recientemente, una nueva capa de regulación se ha añadido al mapa general de regulación de la expresión génica en *T. brucei*. (Kelly et al, 2012) describen que los genes que codifican los mRNAs que son diferencialmente

regulados durante la respuesta a choque térmico en tripanosomas están selectivamente posicionados en las unidades de transcripción policistrónicas. Así, los genes cuya expresión disminuye tras el choque térmico, están localizados cerca de los sitios de inicio de la transcripción por la RNA polimerasa II, mientras que los genes cuya expresión aumenta en estas condiciones se encuentran distantes a los sitios de inicio de la transcripción. Además, han comprobado que este tipo de posición selectiva de grupos de genes no se limita a la respuesta al choque térmico sino que es un fenómeno general de la organización génica de *T. brucei*. También se describe que la abundancia de ciertos mensajeros en diferentes fases del ciclo de división celular está relacionada con la distancia del gen correspondiente al sitio de inicio de la transcripción. Todo esto determina que la posición espacial contribuye significativamente a la expresión temporal de los genes, siendo la primera evidencia de una organización funcional del genoma de *T. brucei* ((Kelly et al, 2012)).

Aún con este nuevo punto de regulación, la transcripción policistrónica por la RNA polimerasa II de cientos de genes que se regulan diferencialmente en respuesta a multitud de factores externos y la falta de promotores en estos genes señala que el mayor peso de la regulación génica en tripanosomátidos se da post-transcripcionalmente, durante el procesamiento, exportación, degradación, traducción y localización de los mRNAs (Clayton, 2002).

2.3.2. Maduración del mRNA y transporte en tripanosomas

Para generar mRNA maduros, los transcritos de RNA policistrónicos primarios pasan por reacciones de *trans-splicing* y poliadenilación. Como antes se indicó, el *trans-splicing* tiene al menos dos funciones: separa mRNA individuales de transcritos primarios policistrónicos y añade una secuencia de RNA de 39 nt (*SL*) que lleva una caperuza

que permite a los RNAs ser traducidos y los protege de la degradación. El sitio aceptor del *splicing* es un dinucleótido AG que se encuentra en 3' de una región polipirimidínica ((Liang et al, 2003), (Benz et al, 2005)). Los sitios de poliadenilación del gen anterior están localizados entre 100 y 300 nucleótidos 5' de la señal de *trans-splicing* ((Benz et al, 2005)) y la poliadenilación es dependiente del *splicing* del gen siguiente ((Benz et al, 2005; Hug et al, 1994; Matthews & Gull, 1994), (Vassella et al, 1994)). Estudios sobre el gen de la tubulina han demostrado que si se bloquea el *trans-splicing*, la poliadenilación no ocurre (Hug et al, 1994). De hecho, parece ser que la región polipirimidínica juega un papel muy importante en el acoplamiento de estos dos procesos, ya que la mutación de esta región conduce a la elección de un sitio de poliadenilación aberrante (Ullu et al, 1993). El *cis-splicing* en tripanosomas es algo poco común y sólo ocurre en dos genes: en los genes de la poli(A) polimerasa (PAP) (Mair et al, 2000) y en el gen de una RNA helicasa (*Tb927.8.1510*) (Ivens et al, 2005). La reciente caracterización del transcriptoma de *T. brucei* por secuenciación masiva de RNA indica que no existen más intrones en genes que codifican proteínas (Shaked et al, 2010).

Hay muy pocos ejemplos de genes regulados por procesamiento del pre-mRNA y todavía no está claro si el *splicing* está regulado en el desarrollo. Un estudio reciente en *T. cruzi* describió un posible mecanismo de regulación de la expresión génica por el cual durante el procesamiento del corte de los policistrones, algunas señales de las regiones intergénicas parecen ocultarse, generando largos transcritos estables con una caperuza en 5' o RNA mensajeros con largas regiones no codificantes en 3'. Se ha llegado a pensar que estos transcritos intermediarios pueden ser almacenados hasta ser procesados a transcritos maduros cuando la célula lo requiera (Jager et al, 2007). También se ha observado que el estrés por cambios de pH en *T. brucei* lleva a la acumulación en los ribosomas de una de las proteínas implicadas en la transcripción del precursor del RNA *SL*. Como consecuencia, el procesamiento de mRNA total se detiene, con

lo que se ha propuesto como un componente principal de la respuesta a estrés en tripanosomas (Lustig et al, 2007). Por otra parte, el estudio del transcriptoma de *T. brucei* a una resolución de un nucleótido (Kolev et al, 2010) confirmó, por un lado, los sitios putativos de inicio de la transcripción por la RNA polimerasa II marcados de forma específica por histonas modificadas ((Siegel et al, 2009), (Wright et al, 2010)) y por otro, reveló que los mRNA muestran una inusual heterogeneidad en los lugares de *trans-splicing* y poliadenilación. De hecho, la mayoría de los genes producen diferentes transcritos derivados de dicha heterogeneidad, lo que lleva a la existencia de una gran variedad de mRNAs con diferentes secuencias reguladoras que se expondrían en las regiones 3' y 5' no codificantes influenciando, finalmente, en la estabilidad y/o traducción del RNA mensajero. La posibilidad de la regulación del sitio de procesamiento del pre-mRNA supondría un punto adicional de control para compensar la falta de regulación a nivel de la transcripción, aunque queda por descubrir si es el *splicing* alternativo o la poliadenilación los que forman parte del proceso regulado.

Aun así, un posible punto de control a este nivel no es suficiente para dirigir la regulación de la expresión génica al nivel global necesario para remodelar el transcriptoma completamente durante los procesos de diferenciación (Archer et al, 2008).

El transporte de mRNA del núcleo al citosol en kinetoplastidos no se conoce todavía, y no se sabe si puede ser comparable al que se da en levaduras (Hieronymus & Silver, 2003). Únicamente se ha identificado en el genoma de *T. brucei*, un ortólogo de un factor de exportación nuclear (Mex67) de levaduras. Recientes evidencias en *Leishmania* y en *T. cruzi* indican que algunas proteínas con dominios de unión a RNA, se unen al mRNA en el núcleo justo antes de exportarse ((Cassola & Frasch, 2009), (da Costa Lima et al, 2010)) determinando, previamente a su salida al citosol, el destino de los mRNA (Cassola et al, 2010).

2.3.3. Degradación y traducción del mRNA en tripanosomas

La degradación de los RNA mensajeros en eucariotas es un punto crítico en el control de la expresión génica. El nivel de un determinado mRNA presente en un momento concreto no depende únicamente de la velocidad de la transcripción del mRNA, sino también de la eficiencia de la degradación del mismo en ese momento (Keene, 2010). En tripanosomas, la concentración de mRNA está determinada por la eficiencia en el *splicing* y por la degradación del mRNA, y los niveles de proteínas están influenciados por los ratios de traducción y la estabilidad de las proteínas (Haile et al, 2003).

Por regla general, los mRNA están protegidos de la degradación por la interacción de la proteína de unión a la cola poli(A) PABP (*poly(A) binding protein*) con la cola poli(A) en el extremo 3' y por el complejo de unión a la caperuza en el extremo 5' (Caponigro & Parker, 1995). En levaduras y células de mamíferos, el primer paso para la degradación de los mRNA es, normalmente, el acortamiento de la cola poli(A) por la exonucleasa PRNA (*poly(A) ribonuclease*), el complejo ribonucleasa específico de PAB (Pan2/3) o por un complejo de múltiples subunidades Ccr4/Caf1/Not1 (Clayton & Shapira, 2007). Las proteínas que constituyen el complejo ribonucleoproteico (RNP) son las que determinan qué desadenilasa funcionará (Keene, 2010). Una vez que la cola poli(A) ha llegado a cierto límite de acortamiento, la proteína PABP se separa, la interacción con el extremo 5' se interrumpe y los extremos del RNA quedan libres para la digestión. A continuación, los mRNA pueden ser degradados en la dirección de 3' a 5' por exonucleasas Rrp44 asociadas al exosoma, un complejo multiproteico con diversas funciones en la degradación de los RNA mensajeros (Buttner et al, 2006); o bien, la caperuza se hidroliza por un complejo Dcp1, Dcp2 y una helicasa Dhh1 y entonces se produce una degradación en dirección de 5' a 3' por la exonucleasa Xrn1 (Keene, 2010). Para algunos

mensajeros, la degradación se inicia con un corte endonucleolítico seguido por la degradación en

dirección 5' por el exosoma o en dirección 3' por XRN1 (Figura II.5).

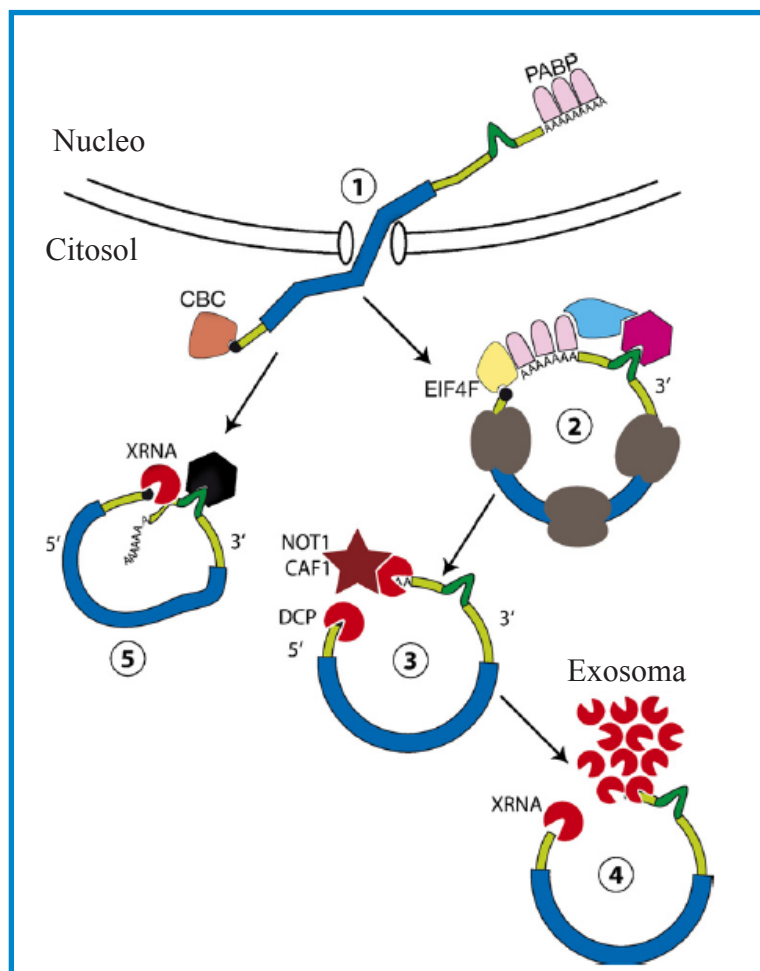


Figura II.5. Destino de los mRNA en tripanosomas.

Se representa el marco abierto de lectura en azul y la 5' y 3' UTR en verde; la caperuza se muestra como una esfera negra. 1) Salida del RNA del núcleo con el complejo nuclear de unión a la caperuza (CBC) y la proteína de unión a poli(A) (PABP) en el extremo 3' y el complejo nuclear de unión a la caperuza en el extremo 5'. 2) Tras la primera ronda de traducción, el factor eIF4E se une a la caperuza. La unión de eIF4G posterior forma el complejo de unión a la caperuza eIF4F, que interacciona con PABP. La traducción continúa; el RNA se estabiliza y la traducción se favorece por proteínas de unión adicionales (en rosa y en azul turquesa). 3) En determinadas circunstancias, el RNA se desadenila por el complejo CAF1/NOT, y posteriormente se pierde la caperuza por las proteínas DCPs. 4) En este paso el RNA puede ser degradado por el exosoma y por XRN1. 5) Alternativamente, el RNA puede sufrir el ataque de enzimas desadenilantes y por XRN1. Este proceso está dirigido por secuencias en la región 3' UTR (horquilla verde oscuro) a las que se unen proteínas específicas (hexágono negro) que ayudan al reclutamiento de la maquinaria de degradación. Imagen tomada de (Clayton & Shapira, 2007)

En tripanosomas, se han identificado los homólogos de la mayoría de las enzimas involucradas en la degradación del mRNA:

A) Existen tres posibles homólogos de PRNA (Utter et al, 2011), PAN2, PAN3 y algunos componentes del complejo NOT. La actividad desadenilasa ha sido demostrada en

extractos de tripanosomas (Milone et al, 2002) y ocurre durante la degradación del RNA in vivo ((Haile et al, 2003), (Li et al, 2006)) pero las proteínas involucradas no han sido todavía identificadas, aunque sí se ha demostrado que PRNA-1 es una desadenilasa activa que afecta a la producción de proteínas específicas de estadio (Utter et al, 2011). Los complejos

PAN2/3 y CAF1/NOT son necesarios para el crecimiento normal de los tripanosomas y el complejo CAF1/NOT, que carece de la proteína Ccr4 fundamental en levaduras, es el principal encargado de la desadenilación de los mRNA de los parásitos (Schwede et al, 2008).

B) El exosoma de los tripanosomas, aunque algo más pequeño, tiene una composición y arquitectura similar a los de levadura y células de mamíferos (Estevez et al, 2003). En eucariotas superiores y en tripanosomas, el exosoma no solo juega un papel en la degradación del RNA sino que también está involucrado en el procesamiento del RNA ribosomal 5.8S. Además, en eucariotas superiores el exosoma se encarga de la degradación rápida de los mRNAs que contienen elementos AREs en las regiones no codificantes (Chen et al, 2001) por lo que existe la posibilidad de que tenga la misma función en tripanosomas (Haile et al, 2003). En levaduras, el exosoma está presente tanto en el citosol como en el núcleo. El complejo citoplasmático tiene al menos diez componentes, Rrp4p, Rrp40p-Rrp46p, Csl4p y Mtr3p, mientras que el complejo nuclear tienen una subunidad adicional Rrp6p, relacionada con la RNasa D bacteriana. En tripanosomas, el exosoma está compuesto por al menos 11 subunidades: 6 RNAsas similares a PH: *TbRRP41A*, *TbRRP41B*, *TbRRP45*, *TbEAP1*, *TbEAP2* y *TbEAP4* así como *TbRRP6* y *TbEAP3* parecen tener papeles diferentes en la estabilidad del exosoma en *T. brucei* (Estevez et al, 2003) Además, RRP6 está localizada en el citosol (Estevez et al, 2001). En tripanosomas, todos los componentes homólogos del exosoma con la excepción del homólogo de Csl4p, son esenciales y presentan defectos en el procesamiento del rRNA 5,8S (Estevez et al, 2001).

C) En levaduras, dos exonucleasas 5'-3' están implicadas en el procesamiento en 5' de los RNA: Xrn1/Sep1/Kem1 y Xrn2/Rat1. Ambas proteínas tienen dominios exonucleasas homólogos en la región N-terminal pero diferentes localizaciones: Xrn1p se localiza el 90% en el citoplasma mientras que Rat1p/Xrn2p se localiza en el núcleo (Johnson, 1997). Los tripanosomas tienen cuatro posibles

exoribonucleasas de 5'-3', parecidas a Xrn1: XRNA, XRNB, XRNC y XRND. XRND está activa en el núcleo. XRNB y XRNC son exclusivamente citoplasmáticas. Su ausencia no parece afectar al crecimiento celular o a la degradación (Li et al, 2006). XRNA es el homólogo más cercano a Xrn1 de levaduras y se encuentra tanto en el núcleo como en el citoplasma. La inhibición de XRNA parece no afectar a la degradación de mensajeros constitutivos como el de actina pero retrasa la degradación de mensajeros con elementos desestabilizantes UREs. Así, sólo ha sido demostrado que XRNA que juega un papel en la degradación de mRNA (Li et al, 2006)

Todos estos resultados sugieren que los tripanosomas tienen al menos dos rutas diferentes de degradación de los mRNA, la ruta constitutiva y la ruta regulada. La ruta constitutiva depende de la desadenilación de los transcritos y opera a una cinética lenta durante la degradación de los mRNA. Es la ruta utilizada para degradar mRNAs que no muestran una regulación durante el desarrollo (*ACT*) y mensajeros muy estables como *PGKC* (Figura II.5). De hecho, la delección de XRNA (Li et al, 2006) o del exosoma (Haile et al, 2003) no tiene efecto alguno sobre los mensajeros que son degradados por esta ruta. Sin embargo, es posible que otro paso, por ejemplo, la desadenilación por CAF1, tenga más control sobre esta ruta de degradación (Schwede et al, 2008). La ruta regulada es rápida, dependiente de XRNA (Li et al, 2006) y parece ser independiente de la desadenilación. Esta ruta es probablemente muy importante para aquellos mRNAs muy inestables cuya concentración depende del momento del ciclo en el que se encuentre el parásito y, como en las células de mamíferos, está claramente afectado por la eliminación del exosoma o de la 5' exonucleasa XRNA (Haile & Papadopoulos, 2007).

En *Leishmania*, la degradación de algunos mensajeros es bifásica, siendo en promastigotes independientes de la desadenilación, al contrario que en

amastigotes donde se desadenilan antes de ser degradados (Haile et al, 2008). Además, los retrotransposones SIDER2 en las regiones 3' no codificantes promueven la desestabilización de mensajeros con cortas vidas medias (Bringaud et al, 2007). La degradación se inicia con un corte endonucleolítico en la segunda de las dos regiones conservadas de 79 nucleótidos de SIDER2 antes de que se produzca la desadenilación (Muller et al, 2010b). Esto descubre un nuevo mecanismo de degradación del mRNA en estos parásitos que tiene como objetivo RNAs con vidas medias cortas que comparten un retrotransposon conservado en su región 3' no codificante (Muller et al, 2010b).

En eucariotas superiores, los transcritos recién sintetizados que contienen mutaciones que generan codones de terminación prematuros (PTC) se degradan por NMD (*Nonsense mediated decay*) ((Chang et al, 2007), (Maquat, 2005)). NMD ocurre en el citoplasma y requiere de la traducción para reconocer los PTCs. La helicasa dependiente de ATP, Upf1, es esencial para la degradación por NMD (Delhi et al, 2011). NMD puede activarse por una longitud anormal de la región 3' no codificante, o por secuencias específicas en dicha región o alrededor del codón de terminación. En tripanosomas existen homólogos de las proteínas Upf1 y Upf2. La delección de ambas proteínas en tripanosomas sanguíneos no produce ningún efecto ni en el fenotipo de los parásitos ni en su crecimiento pero en tripanosomas procíclicos, el silenciamiento de UPF1 afecta al crecimiento. Por otra parte, la introducción de PTCs o la reducción del marco abierto de lectura en un mensajero marcado, reduce su abundancia, aunque no indica la actividad directa de UPF1 en ello (Delhi et al, 2011). Además, la degradación del mRNA marcado se incrementa también con la distancia desde el codón de terminación hasta la cola poli(A) (Delhi et al, 2011). En levaduras y células de mamífero, la presencia de la PABP tras un PTC inhibe la degradación por NMD. Es posible que PABP sea el antagonista del NMD al acortar la cola poli(A). En tripanosomas, la sobreexpresión de PABP1 incrementa los niveles de los mRNA al estabilizarlos (Delhi et al, 2011). Todos estos datos apoyarían

la existencia de una ruta NMD clásica en tripanosomas. Sin embargo, la existencia de transcritos con regiones 3' no codificantes con tamaños mayores de 1 kb no es algo poco común en tripanosomas. La dependencia de la regulación de la expresión génica al nivel post-transcripcional ha llevado a la evolución de largas regiones 3' no codificantes donde coexisten múltiples elementos reguladores que son reconocidos por diversas proteínas de unión a RNA reguladoras. Por lo tanto, la cuestión queda pendiente de resolver.

La degradación de un determinado mRNA depende de elementos *cis* identificados en las regiones no codificantes (UTRs) tanto en el extremo 3' como en el 5' (Clayton, 2002), que funcionan como sitios de unión para componentes de la maquinaria de degradación o para proteínas involucradas en modular la estabilidad de los transcritos ((Milone et al, 2002), (Hendriks et al, 2001), Tabla II.1). Uno de los elementos mejor caracterizados en eucariotas que regula la estabilidad de los mRNAs es el elemento rico en adenosinas y uridinas (ARE) identificado en las regiones 3' no codificantes de transcritos de corta vida media ((Shaw & Kamen, 1986), (Caput et al, 1986)). Elementos similares a los AREs existen en tripanosomas: los elementos ricos en uridinas (UREs) se han identificado en algunos transcritos regulados durante el desarrollo en *T. brucei* que son estables en la forma procíclica pero inestables en la forma sanguínea (Clayton & Shapira, 2007). Por ejemplo, se ha identificado en los mRNA de las prociclinas *EP* una región de 26 nucleótidos rica en uridinas que genera inestabilidad de estos mensajeros en las formas sanguíneas del parásito y reprimen su traducción. Dentro de la misma región un lazo de 16 nucleótidos aumenta la traducción de los mensajeros en tripanosomas procíclicos ((Hehl et al, 1994), (Furger et al, 1997)). Otros elementos han sido identificados en *Leishmania major*, concretamente un elemento de 450 nt localizado en la región 3' no codificante de alrededor de 85 mRNA (Boucher et al, 2002) o las secuencias derivadas de retrotransposones SIDER1 y SIDER2, anteriormente descritas

((Muller et al, 2010a), Tabla II.1). En *T. cruzi*, se ha identificado recientemente un elemento de 43 nt, también en la región 3' no codificante de más de 900 mRNA de importantes familias génicas (MASP, mucinas, proteasas de superficie GP63 y proteínas quinasas) así como genes independientes de bajo número de copia, todos ellos RNAs detectados principalmente en las formas amastigotes intracelulares (Li et al, 2012).

La intensiva búsqueda de factores que se unan a estos elementos en *cis*, ha tenido poco éxito hasta el momento, y sólo unas pocas proteínas de unión a RNA han sido verificadas en laboratorio ((D'Orso et al, 2003), (Estevez, 2008), (De Gaudenzi et al, 2005), (Luu et al, 2006), (Ivens et al, 2005), (D'Orso & Frasch, 2001a), (D'Orso & Frasch, 2001b)) y se describirán con detalle en la sección 2.3.6.

Los micro RNA (miRNA) son RNAs pequeños no codificantes que en eucariotas regulan la expresión al nivel de estabilidad y traducción del mRNA. La proteína Argonauta (AGO) juega un papel fundamental en la síntesis de estos miRNAs en eucariotas pero su presencia en tripanosomas no ha sido demostrada todavía. Sin embargo, se ha identificado una proteína citosólica homóloga a la proteína Argonauta, AGO1. Esta proteína es esencial para que se lleve a cabo el silenciamiento en tripanosomas (Janzen et al, 2006) aunque la ausencia de AGO no tiene ningún efecto en el ciclo vital (Shi et al, 2004) y el único fenotipo que genera esta deficiencia es el incremento de transcritos derivados de retrotransposones (Janzen et al, 2006). Todo ello indica que los miRNA, de existir, no juegan un papel fundamental en la regulación de la expresión de la mayoría de los genes en tripanosomátidos.

Muy poco se sabe de los mecanismos de traducción en estos parásitos aunque la maquinaria de traducción parece estar conservada en tripanosomas (Clayton & Shapira, 2007). En eucariotas, la síntesis de

proteínas se inicia con la unión de un complejo llamado eIF4F a la estructura de la caperuza de los mRNA. Sin embargo, la presencia de la caperuza hipermetilada en el 5' de todos los mRNA en tripanosomátidos parece añadir más complejidad al proceso a nivel del inicio de la traducción y puede incluso llegar a ser un mecanismo totalmente diferente. Además, los factores de transcripción identificados en tripanosomas, eIF4E y eIF4G, tienen adaptaciones moleculares que les permiten interactuar con la estructura *cap 4* ((Craig et al, 1998), (Yoffe et al, 2009), (Dhalia et al, 2005)). La metilación en el *cap 4* y la secuencia *SL* parecen ser esenciales en la traducción y en la viabilidad celular (Zamudio et al, 2009). En eucariotas, las interacciones entre eIF4F y las proteínas de unión a la cola poli(A) unidas a la cola poli(A) provocan la circularización del RNA, acercando las regiones 3' y 5' no codificantes entre sí (Preiss & Hentze, 1999). Estas regiones contienen elementos que pueden interactuar con proteínas represoras y evitar la circularización del mRNA durante el inicio de la traducción (Richter & Sonenberg, 2005), aunque este proceso no ha sido identificado todavía en tripanosomátidos. Sin embargo, la mayoría de los estudios de la traducción en *Leishmania* y tripanosomas indicaron que la regulación de la traducción depende de las regiones 3' no codificantes de los mRNA. Las regiones 5' no codificantes no tienen función si no es en sinergia con las regiones 3' no codificantes ((Clayton & Shapira, 2007), (Smith et al, 2009)).

2.3.4. Localización del mRNA

En mamíferos y en levaduras, la traducción de los mRNAs se lleva a cabo en los polisomas, distribuidos por todo el citosol. Los mRNAs que no van a ser traducidos o que están destinados a degradarse, se localizan en un compartimento del citosol, en microdominios llamados cuerpos de procesamiento o cuerpos P y en gránulos de estrés (SGs, *Stress Granules*) (Parker & Sheth, 2007). Los cuerpos P parecen estar involucrados en la degradación del mRNA,

Tabla II.1: Elementos identificados en *cis* y factores en *trans* que regulan la expresión génica específica de estadio en tripanosomátidos (Haile & Papadopoulos, 2007).

Elementos en la 3' UTR	mRNA		Proteínas reguladoras en <i>trans</i>	regulación del mRNA	Ref.
UREs					
Elemento rico en uridinas (26 mer)(a)	prociclina EP1 (b)	<i>T. brucei</i>	ND	Inestabilidad, traducción	(Hotz et al, 1997)
Rico en uridina (similar al 26 mer de EP1)	fosfoglicerato quinasa PGKB (b)	<i>T. brucei</i>	ND	Inestabilidad	(Quijada et al, 2002)
Rico en uridina (similar al 26 mer de EP1)	piruvato fosfato diquinasa (b)	<i>T. brucei</i>	ND		(Quijada et al, 2002)
Rico en uridina 26 mer	subunidades de la citocromo oxidasa	<i>T. brucei</i>	ND	Inestabilidad, traducción	(Mayho et al, 2006)
Elemento rico en AU	Mucina pequeña SMUG	<i>T. cruzi</i>	TcUBP-1, TcUBP-2	Inestabilidad, traducción	(Di Noia et al, 2000)
Elemento rico en uridinas	Amastina c	<i>Leishmania</i>	ND	Inestabilidad	(Haile et al, 2008)
SIDERS					
SIDER2 (d, e)	Proteína hipotética	<i>Leishmania</i>	ND	Inestabilidad, estabilizado por pur y cicloheximina	(Bringaud et al, 2007)
SIDER2 (d, e)	Aminometiltransferasa	<i>Leishmania</i>	ND	Inestabilidad, estabilizado por pur y cicloheximina	(McNicoll et al, 2005),(Boucher et al, 2002)
SIDER1 (450 nt)(f)	Amastina	<i>Leishmania</i>	ND	Traducción, inducido por estrés por calor	(Hehl et al, 1994)
Elementos en <i>cis</i> individuales					
16 mer <i>stem loop</i>	prociclina EP1	<i>T. brucei</i>	ND	Traducción	(Engstler & Boshart, 2004)
124 nt (elemento de respuesta a choque por frío)	prociclina EP1	<i>T. brucei</i>	ND	Estabilidad, traducción	(McNicoll et al, 2005)
300 nt	Amastina	<i>Leishmania</i>	32 kDa?	Traducción	(Colasante et al, 2007)
418 nt (más de 2 elementos)	PGKC glicosomal	<i>T. brucei</i>	ND	Inestabilidad, posibilidad de traducción	(Coughlin et al, 2000)
200 nt	Amastina	<i>Leishmania</i>	30 y 36 kDa	Estabilidad	(Mishra et al, 2003)
10 nt	PFR2C	<i>Leishmania</i>	ND	Inestabilidad	(Zilka et al, 2001)
270 nt	HSP83	<i>Leishmania</i>	ND	Traducción, inducido por choque térmico	(McNicoll et al, 2005)
117 nt	HSP70	<i>Leishmania</i>	ND	Estabilidad, inducido por choque térmico	(Quijada et al, 2000)
202 nt	proteasa de superficie GP63 (MSLP)	<i>Leishmania</i>	ND	Estabilidad, inducido por cicloheximina	(McNicoll et al, 2005)

(a) Presente en un gran grupo de transcritos enriquecidos en tripanosomas procíclicos que tienen que ser analizados en detalle.

(b) Estabilizado al expresarse la proteína de unión a RNA humana HuR y tras la delección del exosoma.

(c) El gen del que deriva pertenece a una familia multigénica, pero aquí amastina se refiere al mismo mRNA individual en

toda la tabla

(d) Distribuido por todo el genoma, predominantemente se encuentra en las regiones 3' no codificantes de los mRNA de *Leishmania*

(e) En este contexto, SIDER2 promueve la desestabilización del mRNA en ambas formas de vida del parásito

(f) El elemento conservado en la 3' UTR de 450 nt previamente caracterizado pertenece a la subfamilia SIDER1 de retrotransposones.

y contienen enzimas de la ruta de degradación 5'-3', tales como la exoribonucleasa Xrn1 (Bashkirov et al, 1997), el complejo Dcp1/2 y otras proteínas relacionadas con la ruta de degradación de los mRNA excepto aquellos relacionados con el exosoma (Ingelfinger et al, 2002; Parker & Sheth, 2007); los SGs sólo aparecen bajo condiciones de estrés como pueden ser cambios en la temperatura del medio o falta de nutrientes y su presencia está relacionada con el silenciamiento de la traducción. En estos gránulos se han encontrado algunos factores del inicio de la traducción, la proteína de unión a poli(A) PABP1 y proteínas de la subunidad pequeña ribosomal ((Kedersha et al, 2002), (Kimball et al, 2003)). Los estudios sobre la fisiología de estos gránulos de estrés indica que sirven como lugar de distribución, desde el cual se decide si reiniciar la traducción, almacenar los mRNAs o degradarlos (Anderson & Kedersha, 2006) aunque su función todavía es un punto por resolver ((Anderson & Kedersha, 2009), (Balagopal & Parker, 2009)). Los mRNA pueden intercambiarse entre estas dos estructuras (Parker & Sheth, 2007) y los polisomas, de forma que están dinámicamente relacionados. De hecho, la adición de cicloheximina, una droga que inhibe la elongación de la traducción, “congelando” los polisomas, provoca la disociación de los cuerpos P y los SGs (Fernandez-Moya & Estevez, 2010). En tripanosomas también encontramos estructuras similares a la de los cuerpos P y los SGs. La presencia de los cuerpos P es constitutiva en tripanosomas, y están formados por XRNA, un homólogo de Xrn1 ((Holetz et al, 2007), (Kramer et al, 2008)), represores de la traducción como la RNA helicasa DHH1 y SCD6 y algunas proteínas de unión a RNA ((Brenchley et al, 2007; Estevez, 2008). Por otra parte, el choque térmico en tripanosomas es un inductor potencial de SGs (Kramer et al,

2008). Estos gránulos no colocalizan con los cuerpos P y contienen proteínas de unión a poli(A) y factores del inicio de la traducción. Es posible que estos gránulos estén relacionados con la disminución global de mRNA que se observa en las células tras el choque térmico. Además, la respuesta al choque térmico en tripanosomas induce la formación de un nuevo tipo de gránulo compuesto por XRNA, pero no por DHH1 o SCD6 y que está situado en el extremo posterior de la célula ((Kramer et al, 2008), (Brenchley et al, 2007)). La función de estos gránulos no se conoce pero es posible que representen algún tipo de reserva de XRNA, retirando parte de la enzima del citoplasma o de los cuerpos P como estrategia de inhibición por secuestro (Raineri et al, 2004). Además, el estrés provocado por falta de nutrientes induce la formación de grandes gránulos citoplasmáticos llamados gránulos de mRNA, que comparten componentes con los cuerpos P y con los SGs (Cassola et al, 2007). Estos gránulos pueden estar relacionados con el almacenamiento de mRNA cuando en el ambiente no hay nutrientes disponibles y desaparecen al cesar el estrés, de forma que los mRNA almacenados vuelven a estar disponibles para su traducción (Cassola, 2011). Como se ha explicado en apartados anteriores, la maduración de todos los mRNA en tripanosomas involucra la unión por *trans-splicing* del exón *SL* en el extremo 5' del transcrito. La inhibición del *trans-splicing* provoca la acumulación de mRNA parcialmente procesados, con caperuza y cola poli A, pero con varios marcos de lectura y con uno o varios intrones, que se acumulan en gránulos en la periferia del núcleo (Kramer et al, 2012). Estos gránulos, llamados NPGs (*Nuclear Periphery Granules*), contienen todas las proteínas identificadas en los cuerpos P en tripanosomas, además de la proteína de unión a poli(A) 2 (PABP2) y el homólogo en

tripanosomas de la RNA helicasa Vasa (Hay et al, 1988). Los NPGs difieren de los cuerpos P debido a que dependen de la transcripción, concretamente de los mRNA que se han sintetizado de forma incompleta durante ésta (si se inhibe la transcripción, se disgregan), no contienen la proteína principal de los cuerpos P, SCD6 y la cicloheximina no les afecta. Esto, junto con la presencia de Vasa, sugiere un cierto parecido a los gránulos que se forman en la región perinuclear de las células germinales de metazoos, de los que se sugiere que pueden estar actuando como compartimentos en el control de la calidad de los mRNA (Sheth et al, 2010). Así, aunque la función de los NPGs no se conoce todavía, la hipótesis que se baraja señala a la posibilidad de que se trate de un compartimento que no sólo controla la calidad de los mRNA recién sintetizados sino que marca el destino de los mismos: traducción, almacenamiento o degradación

La existencia de estos gránulos en tripanosomas ayuda a la compartimentalización de los mRNA jugando un papel fundamental en la regulación de la expresión génica, sobre todo en momentos de estrés. Durante el ciclo de vida, al alternar entre hospedadores, los tripanosomas van a sufrir cambios de temperatura de hasta 10 °C, van a encontrarse en ambientes con escasez de nutrientes o con diferentes tipos de nutrientes, o como ocurre en *Leishmania*, se van a enfrentar a medios muy ácidos y oxidativos. Todas estas condiciones suponen el desensamblaje de los polisomas en otras células eucariotas, incluyendo los tripanosomas ((Bregues & Parker, 2007), (Liu et al, 2005)). La presencia de estos gránulos, puede suponer una rápida y efectiva vía para distribuir los mRNA liberados de los polisomas y decidir su destino mientras las condiciones ambientales mejoren o hasta que se alcance la siguiente fase del ciclo de vida.

2.3.5. Regulación Post-traducciona

Muy poco se conoce sobre la regulación a nivel post-traducciona en estos parásitos. Sin embargo, en otros eucariotas,

las modificaciones post-traduccionales juegan un papel muy importante en la regulación de la expresión génica, sobre todo a nivel de la transcripción. En eucariotas, la expresión génica puede verse alterada en respuesta a una señal externa, todo llevado a cabo por cascadas de proteínas quinasas/fosfatasa que terminan en la modificación post-traducciona de factores de transcripción nucleares o citoplasmáticos (Bhattacharyya et al, 2006). Se han identificado en los genomas de los tripanosomátidos un gran número de genes que codifican posibles quinasas y fosfatasa esenciales para la proliferación, resistencia a estrés y control del ciclo celular. ((Parsons et al, 2005), (Brenchley et al, 2007)). Por ejemplo, se ha identificado recientemente una proteína tirosina-fosfatasa, *TbPTP1*, involucrada en la diferenciación del parásito (Szoor et al, 2006). La delección de la proteína *TbPTP1* da lugar a la diferenciación espontánea de los tripanosomas sanguíneos a tripanosomas procíclicos. La actividad de esta proteína está regulada por cambios de pH y del estado de oxidación del medio. Esto sugiere que la fosforilación es uno de los puntos importantes para la supervivencia del parásito durante el paso del medio sanguíneo del mamífero al tracto digestivo de la mosca. En eucariotas, la proteína TOR (*Target of rapamycin*) es una treonín/serín quinasa que controla el crecimiento celular en respuesta a nutrientes presentes en el medio, a las condiciones energéticas y a los factores de crecimiento. TOR actúa a través de dos complejos multiproteicos diferentes: TORC1, que controla aspectos temporales del crecimiento celular y TORC2, que controla aspectos espaciales del crecimiento celular (Loewith et al, 2002). En tripanosomas, el control del crecimiento celular recae en los ortólogos de TOR, *TbTOR1* y *TbTOR2*, así como en los ortólogos de las proteínas que forman los complejos, KOG1/raptor y AVO3/rictor (Barquilla et al, 2008). *TbTOR1*, localizada en el núcleo, controla el crecimiento celular regulando el ciclo celular y la proliferación, regulando la síntesis de proteínas, el tamaño celular, la progresión del ciclo celular y la localización de la RNA polimerasa I en el nucléolo, a través de su unión a *TbTORC1*, cuyas funciones básicas

están conservadas en *T. brucei*. *TbTOR2*, localizada en el citosol, asociada a orgánulos citoplasmáticos como la mitocondria y, en menor medida, el retículo endoplasmático. Esta proteína parece actuar mediante la señalización realizada por *TbTORC2* en la polarización de la actina hacia la ruta de endocitosis, jugando un papel fundamental en la endocitosis y en la citocinesis. Además, la inhibición de *TbTOR1* y *TbRaptor*, que conduce a una reducción de la señalización por *TbTORC1* confiere una resistencia y supervivencia parcial ante situaciones de estrés, esencial para superar condiciones poco favorables de forma temporal hasta adaptarse a ellas (Barquilla & Navarro, 2009).

Sin embargo, debido a que la mayoría de la regulación de la transcripción génica se realiza a un nivel post-transcripcional, es posible que los factores finales de las cascadas de señalización no sean factores de transcripción sino proteínas de unión a RNA involucradas en regular el desarrollo a este nivel (Fernandez-Moya & Estevez, 2010).

2.3.6. Proteínas de unión a RNA (RBPs)

Como se ha indicado anteriormente, la regulación de la expresión génica en tripanosomátidos depende, en gran parte, de un conjunto de elementos en *cis* en las regiones no codificantes de los RNA mensajeros y un grupo de factores que actúan en *trans* que interactúan con estos elementos determinando la vida media del transcrito, su localización y su traducción.

Pocos son los factores en *trans* descritos en tripanosomas, algunos detectados únicamente basándose en similitud de secuencias o en la presencia de dominios de unión a RNA (Tabla II.2). Basándose en los tipos de dominios estructurales que se unen al RNA podemos encontrar las proteínas con dominios de dedos de zinc tipo CCCH, proteínas PUF, proteínas con el motivo rico en argininas y glicinas (RGG) (Miller & Read, 2003) y proteínas con motivos de

reconocimiento de RNA (RRM) (Raineri et al, 2004). Otras proteínas que dependen de diferentes dominios para unirse a RNA, tales como las que poseen el dominio homólogo K (KH) o el dominio de choque frío (CSD) no han sido caracterizadas por el momento (Kramer & Carrington, 2011).

2.3.6.1. Proteínas con dominios de dedos de zinc tipo CCCH

Las proteínas de dedo de zinc tipo CCCH (ZC3H) en eucariotas están definidas por el motivo de dedo de zinc C-X₄₋₁₅-C-X₄₋₆-C-X₃-H (Wang et al, 2008) que se une casi exclusivamente a RNAs de cadena simple. ZC3Hs son proteínas poco frecuentes en los eucariotas inferiores y en mamíferos pero se han descrito en una amplia variedad de organismos, desde levaduras hasta humanos (Wang et al, 2008). En los estudios realizados sobre estas proteínas, se ha descrito que las ZC3H alteran la abundancia de determinados mRNA desestabilizándolos (Carballo et al, 1998). La familia mejor conocida de estas proteínas, TIS-11, se une a regiones ricas en adenosinas y uridinas localizadas en las regiones 3' no codificantes de los transcritos que regulan y producen la desadenilación y en la mayoría de los casos, la degradación del mRNA. En los genomas de *T. brucei*, *T. cruzi* y *Leishmania* se han identificado genes que codifican 38, 51 y 54 proteínas CCCH, respectivamente (Kramer et al, 2010). Sólo dos familias han sido experimentalmente caracterizadas: las proteínas pequeñas ZFP (*Zinc Finger Protein*) y las proteínas de unión a secuencias del ciclo (CSBP) (Figura 7).

En *T. brucei*, hay tres proteínas *TbZFP* con un único dominio CCCH: *TbZFP1*, *TbZFP2* y *TbZFP3* implicadas en el control de los cambios de la expresión génica que acompañan a la diferenciación de los tripanosomas cuando cambian del medio sanguíneo del mamífero al tracto digestivo de la mosca tse-tsé ((Hendriks et al, 2001), (Paterou et al, 2006), (Hendriks & Matthews, 2005)). Pero no sólo afectan a la diferenciación: *TbZFP3* aparece asociada

Tabla II.2: Proteínas reguladoras de unión a RNA en tripanosomátidos (Haile & Papadopoulou, 2007)

Factores en trans		mRNAs que unen			Ref.
mRNA específicos	Grupos de mRNA	Elementos en <i>cis</i> (no necesariamente suficientes)	Efecto de los factores en <i>trans</i> en los mRNA que unen		
<i>Tc</i> UBP1	Mucina pequeña <i>SMUG</i>		Elemento rico en AU	Si	(D'Orso & Frasch, 2001b)
<i>Tc</i> UBP1		glicoproteínas, metabolismo	stem loop	N.D.	Si (Noe et al, 2008)
<i>Tb</i> UBP2	Proteína F-box (<i>CFB1</i>)		3'-no codificante	Estabilización del mRNA	Si (Hartmann et al, 2007)
<i>Tb</i> UBP1/2	Familia de proteínas transmembrana		3'-no codificante	Estabilización y	No (Hartmann & Clayton, 2008)
<i>Tc</i> RBP3		proteínas ribosomales	stem loop	N.D.	Si (Noe et al, 2008)
<i>Tb</i> RBP3	ZFP1; ZC3H11, <i>CFB1</i> <i>Tb</i> 927.4.1000 and <i>Tb</i> 927.8.7820			Sin efectos significativos observados	Si (Wurst et al, 2009)
<i>Tb</i> DRBD3		Regulado durante el desarrollo / transmembrana	Elementos ricos en uridinas	Estabilización del mRNA	Si (Estevez, 2008)
<i>Tb</i> DRBD3 =PTB1		mRNA con zonas ricas en C en 5'UTR	N.D.	Estabilización del mRNA, <i>trans-splicing</i>	Si (Stern et al, 2009)
<i>Tb</i> DRBD4 =PTB2		mRNA con zonas ricas en C en 5'UTR	N.D.	Estabilización del mRNA, <i>trans-splicing</i>	No (Stern et al, 2009)
<i>Tb</i> ZFP3	<i>EPI</i>		loop II and loop III de la 3'-no codificante	Incremento de la traducción	Si (Paterou et al, 2006)
<i>Tb</i> ZFP3	<i>GPEET</i>		N.D.	Reducción de la traducción	Si (Paterou et al, 2006)
<i>Tc</i> PUF6		Regulado durante el desarrollo	N.D.		Si (Dallagiovanna et al, 2008)
<i>Tb</i> PUF9	LIGKA, PNT1, PNT2=CPC2	Posible función en el ciclo celular	N.D.	Estabilización del mRNA	Si (Archer et al, 2009)

- (a) Presente en un gran grupo de transcritos enriquecidos en tripanosomas procíclicos que tienen que ser analizados en detalle.
- (b) Estabilizado al expresarse la proteína de unión a RNA humana HuR y tras la delección del exosoma.
- (c) El gen del que deriva pertenece a una familia multigénica, pero aquí *amastina* se refiere al mismo mRNA individual en toda la tabla
- (d) Distribuido por todo el genoma, predominantemente se encuentra en las regiones 3' no codificantes de los mRNA de *Leishmania*
- (e) En este contexto, *SIDER2* promueve la desestabilización del mRNA en ambas formas de vida del parásito
- (f) El elemento conservado en la 3' UTR de 450 nt previamente caracterizado pertenece a la subfamilia *SIDER1* de retrotransposones.

a polisomas en tripanosomas procíclicos pero no en tripanosomas sanguíneos ((Hendriks, Robinson et al. 2001), (Paterou et al, 2006)) con lo que puede estar funcionando como regulador de la traducción.

Las proteínas de unión a secuencias cíclicas, CSBP, fueron identificadas en *Chritidia fasciculata* (CSBPA y CSBPB(Mahmood et al, 2001) (Mittra & Ray, 2004)) y en *Leishmania donovani* (LdCSBP). Estas proteínas se unen a secuencias de 8 nucleótidos (C/A) AUAGAA(G/A) encontradas tanto en las regiones 3' como en las regiones 5'UTRs de los mRNAs cuyos niveles fluctúan según el estado del ciclo de vida del parásito; sin embargo, CSBPA y CSBPB no parecen ser necesarios para la regulación de estos niveles con el ciclo y sus funciones no se conocen todavía (Mittra & Ray, 2004).

Recientemente se han identificado otras dos proteínas con dominios CCCH: *TbZC3H20*, enriquecida en los tripanosomas procíclicos, es necesaria para el normal crecimiento de éstos. Esta proteína estabiliza dos transcritos regulados durante el desarrollo, la proteína transportadora mitocondrial MCP12 y una *trans*-sialidasa (TS-like E), convirtiéndola en la primera proteína de la familia de proteínas ZC3H que controla la expresión génica modulando la abundancia (estabilidad) de los mRNA en tripanosomas (Ling et al, 2011). *TbZC3H18* es una proteína con dos dominios de dedos de zinc CCCH que está conservada entre los kinetoplastos. Su delección en tripanosomas sanguíneos retrasa la diferenciación a tripanosomas procíclicos, por lo que es posible que juegue un papel en la adaptación de los tripanosomas al entorno de la mosca tse-tsé (Benz et al, 2011).

2.3.6.2. Proteínas de unión a RNA con dominios PUF

Las proteínas con dominios Puf regulan la expresión de los mRNAs uniéndose a secuencias específicas situadas en las 3' UTRs y reclutando proteínas que conducen a los mensajeros a la degradación o a la represión traduccional (revisado en (Wharton

& Aggarwal, 2006)). Los transcritos regulados por una misma proteína Puf están por lo general, relacionados funcionalmente. Por ejemplo, en levaduras, Puf1 y Puf2 son proteínas que unen mRNAs que codifican proteínas asociadas a membrana (Gerber et al, 2004). En tripanosomas, se han encontrado al menos 10 proteínas Puf que han sido agrupadas en función de la capacidad de unión a un elemento Puf conservado identificado previamente en la región 3' no codificante del mensajero *Hunchback* de *Drosophila melanogaster* (Caro et al, 2006). El estudio de la antigenicidad de las proteínas PUF en *Leishmania infantum* confirmó la presencia de estas 10 proteínas en estos organismos, con la excepción de PUF9, de la que se identificaron dos isoformas *LiPUF9a* y *LiPUF9b* (Folgueira et al, 2010).

Actualmente, sólo tres proteínas se han estudiado al detalle: *TbPUF1/TcPUF6*, *TbPUF9* y *TbPUF7*.

TbPUF1 es una proteína que no parece tener efecto en *T. brucei* pero en *T. cruzi* la sobreexpresión del ortólogo *TcPUF6* afecta al transcriptoma: la expresión de 232 genes aumenta más de tres veces y disminuye más de tres veces en 37 genes ((Dallagiovanna et al, 2008; Luu et al, 2006), (Dallagiovanna et al, 2008)). Se han identificado ocho mensajeros que coprecipitan con la proteína fusionada con TAP *TbPUF6*, que disminuyen cuando se sobreexpresa la proteína, indicando que PUF6 desestabiliza los mensajeros que une (Dallagiovanna et al, 2008). Se han identificado cuatro mensajeros que precipitan con *TbPUF9*-TAP, de los cuales tres muestran diferentes concentraciones durante el ciclo de vida, presentando su máxima concentración en la fase S. Experimentos de sobreexpresión y eliminación de PUF9 muestran que esta proteína podría estar estabilizando los transcritos específicamente en la fase S del ciclo (Archer et al, 2009). El silenciamiento por ribointerferencia de la proteína *TbPUF7* localizada en el nucleolo, reduce el crecimiento celular e inhibe el procesamiento del RNA pre-ribosomal (Droll et al, 2010).

2.3.6.3. Proteínas de unión a RNA con motivos de reconocimiento de RNA (RRM)

El motivo de reconocimiento de RNA (RRM) es el dominio de unión a RNA más abundante en eucariotas (Lorkovic & Barta, 2002). Consiste en aproximadamente 90 aminoácidos incluyendo el octapéptido tipo RNP1 (K/R)G(F/Y)(G/A)FVX(F/Y). Las habilidades de unión de los dominios RRM son muy diversos; estos motivos pueden unir entre dos y ocho nucleótidos de un RNA de cadena simple con afinidades y especificidades muy diferentes pero también otras proteínas con otros dominios RRM (Kielkopf et al, 2004). Las proteínas con estos motivos pueden estar involucradas en la biogénesis de los rRNAs, en el *splicing* de mRNAs, en la unión de la caperuza a los mRNAs, en la exportación de los RNAs del núcleo al citosol, en el procesamiento de los tRNAs o en la traducción y el transporte de mRNAs en el citoplasma. Además, numerosas proteínas con dominios RRM juegan papeles fundamentales en la regulación de la degradación de mRNA (D'Orso & Frasch, 2001a; De Gaudenzi et al, 2005). Los kinetoplastidos tienen 75 proteínas con dominios RRM (Figura II.6, De Gaudenzi, Frasch et al. 2005). Sólo unas pocas (entre 13 y 21) tienen ortólogos reconocibles en otros eucariotas, incluyendo las proteínas de unión a poli(A), el factor de inicio de traducción EIF3B y el factor de *splicing* U2AF35. Cinco de estas proteínas, todas únicas en kinetoplastidos, han sido experimentalmente caracterizadas y todas parecen tener un papel en la regulación de la estabilidad del mRNA: 3 proteínas con un sólo dominio RRM (UBP1, UB2, y RBP3), una con dos dominios RRM en la secuencia (DRBD3/PTB1) y una con cuatro dominios RRM (DRBD4/PTB2).

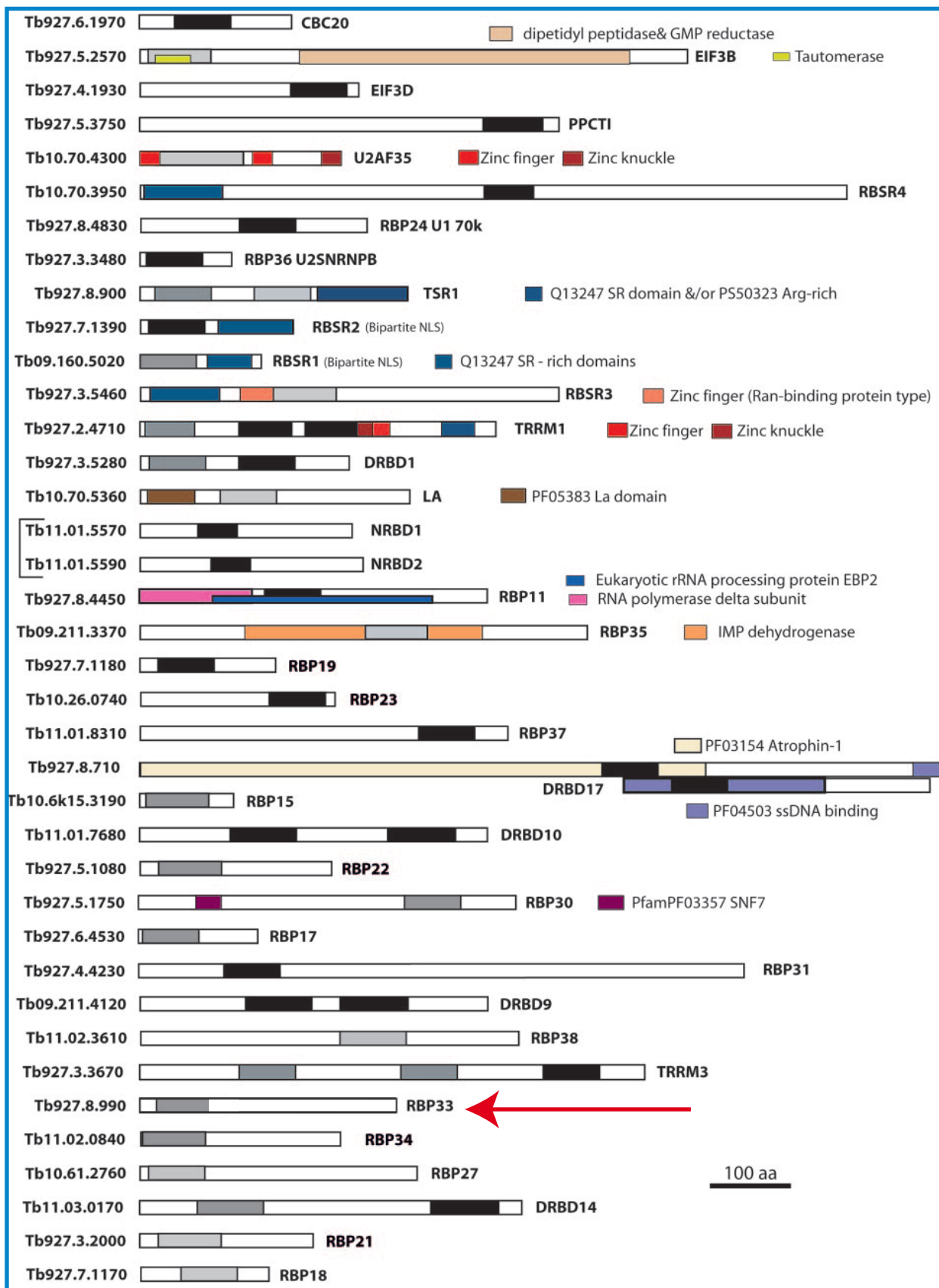
La primera proteína con un dominio RRM identificada en kinetoplastidos fue *TcUBP1*, involucrada en la regulación del mensajero *SMUG* durante el ciclo de vida de

T. cruzi (Di Noia et al, 2000). *TcUBP1* se une a la secuencia ARE localizada en la región 3' UTR de los transcritos (D'Orso & Frasch, 2002). La sobreexpresión de *TcUBP1* provoca la disminución de la concentración del mRNA que une *in vivo*, sugiriendo que actúa como un factor desestabilizante (D'Orso & Frasch, 2001b). *TcUBP* interacciona directamente con otra proteína con dominio RRM, *TcUBP2* y con la proteína de unión a poli(A) PABP1 (D'Orso & Frasch, 2002) formando un complejo ribonucleoproteico. La unión a PABP1 evita la dimerización de *TcUBP1* y se especula con que esto podría disminuir la afinidad de la PABP1 por la cola poli(A), aumentando el grado de degradación de los mRNAs (D'Orso & Frasch, 2002). Además del mensajero *SMUG*, otros 39 mensajeros se han descrito por coimmunoprecipitación (Noe et al, 2008). Tanto *UBP1* como *UBP2* se localizan en el citoplasma pero también en los gránulos de estrés en condiciones de ayuno y en el núcleo con estrés oxidativo provocado por arsenito; para llegar al núcleo se ha comprobado experimentalmente que el transporte depende del dominio RRM y de la unión a RNA (Cassola et al, 2007; Cassola & Frasch, 2009). Experimentos parecidos se han llevado a cabo con los ortólogos de *T. brucei*. La sobreexpresión o la delección por RNAi de *TbUBP1* o *TbUBP2* es letal y tiene efectos en los niveles de un grupo de mRNA, incluyendo mRNA de la familia de las proteínas con Caja-F (Hartmann et al, 2007). Estas proteínas son componente del complejo ubiquitín-ligasa SCF E3, relacionado con el control del ciclo celular.

En el caso de la proteína RBP3, es capaz de unirse a un grupo diferente de mRNAs, que principalmente codifican proteínas ribosomales; sólo se han encontrado unos pocos transcritos comunes con *TcUBP1* (Noe et al, 2008). Cinco mRNA coimmunoprecipitan con la proteína: 2 proteínas con dominios CCCH (ZPF1, ZC3H11), una proteína con Caja-F llamada CFB1 y dos proteínas de función desconocida (Wurst et al, 2009).



Figura II.6. Estructura de las proteínas de *T. brucei* con dominios RRM.



A la derecha se indica el número del identificador del gen y a la izquierda el nombre de las proteínas que codifican. Los dominios tienen diferentes colores basándose en la homología al dominio de unión a RNA estándar: los dominios más parecidos se indican en negro; los menos, en gris. Las proteínas codificadas por genes adyacentes se indican con corchetes a la izquierda del identificador (tomado de (De Gaudenzi et al, 2005)).

2.3.7 La teoría de los Operones de RNA post-transcripcionales

Como hasta ahora hemos visto, las proteínas de unión a RNA se asocian a conjuntos de RNAs que codifican proteínas relacionadas funcionalmente. Esta aparente coordinación establece las bases de la hipótesis de la existencia de operones de RNA post-transcripcionales (PTROs), según la cual, los factores que actúan en *trans* regulan de forma combinatoria múltiples mRNAs a lo largo de una ruta coordinada de procesamiento de RNA, permitiendo a las células responder con inusual agilidad a los cambios del medio (Keene & Tenenbaum, 2002).

El ejemplo mejor definido de un operón de RNA post-transcripcional fue descrito por Gerber *et al.* Estos autores examinaron cinco miembros de la familia Pumilio (PUF: Puf1-Puf5) en *S. cerevisiae* y encontraron que cada una de ellas une una subpoblación diferente de mRNAs que codifican proteínas con funciones relacionadas (Gerber *et al.*, 2004). Puf3 se asocia a un conjunto de 154 mRNAs que casi exclusivamente codifican proteínas mitocondriales, muchas de las cuales están involucradas en la biosíntesis de proteínas; Puf1p y Puf2p interactúan con mRNAs que codifican proteínas asociadas a la membrana; Puf4p se une a mRNAs que codifican factores nucleolares de procesamiento ribosomal; y Puf5p se asocia a mRNAs que codifican modificadores de la cromatina. Estos resultados demostraron el principio de que los mRNAs que codifican los componentes de los orgánulos y las estructuras macromoleculares están organizados, y potencialmente regulados en el espacio y en el tiempo, por RBPs específicos de secuencia.

Numerosos factores apuntan al hecho de que los PTROs existen en tripanosomas: los mRNAs asociados a una misma RBP codifican para proteínas relacionadas funcionalmente. Por ejemplo, TcUBP1, descrito anteriormente, se asocia a mRNAs que codifican proteínas

metabólicas (Noe *et al.*, 2008), *TbPUF9* que se une a transcritos que son regulados durante el ciclo celular o *TbDRBD3* que se une a un conjunto de mRNAs que codifican proteínas de membrana (Estevez, 2008); existen grupos de mRNAs que se regulan con el desarrollo que contienen elementos reguladores comunes en sus 3' UTRs. Por ejemplo, dos secuencias derivadas de retrotransposones extintos presentes en grandes familias de mRNAs en *Leishmania*, *LmSIDER1* y 2, confieren control traduccional dependiendo de estado del ciclo de vida o desestabilidad independientemente del momento del ciclo, respectivamente (Bringaud *et al.*, 2007); durante la diferenciación de tripanosomas sanguíneos a procíclicos en *T. brucei*, se identificaron un grupo de mRNAs que codifican complejos específicos o que pertenecen a la misma ruta con patrones de regulación similares (Kramer, 2012).

2.3.8 *TbDRBD3* y *TbRBP33*

En la región 3' UTR del mensajero de la fosfoglicerato quinasa B (PGK-B) se identificó un elemento rico en uridinas (URE) parecido a los elementos AREs de mamíferos que determina la estabilidad del transcrito durante el desarrollo en tripanosomas (Quijada *et al.*, 2002). Este URE desestabiliza al mensajero de PGK-B en los tripanosomas sanguíneos y se utilizó para la identificación de factores que actuaran en *trans* uniéndose a este elemento. Cuatro proteínas se identificaron como proteínas que se unían a dicho elemento (Estevez, 2008) (Figura II.7): DRBD3, RBP33, *Tb927.6.4440* y UBP2, ya caracterizada (Hartmann *et al.*, 2007).

Tb927.6.4440, conocida como RBP42, es una proteína de unión a RNA recientemente caracterizada (Das *et al.*, 2012). Esta proteína, posee dos dominios proteicos conocidos, uno en la región N-terminal con cierta homología al dominio proteico NTF2, normalmente relacionado con las interacciones proteína-proteína y otro en la región C-terminal, con homología al dominio de unión a RNA, RRM.

RBP42 es un homólogo distante de la proteína G3BP, una proteína de unión a RNA conocida por integrar las señales extracelulares con las respuestas metabólicas intracelulares (Parker et al, 1996). RBP42 es citoplasmática, asociada a los polisomas a través de las interacciones con el RNA mensajero. También es esencial para la supervivencia de los tripanosomas procíclicos (Das et al, 2012) y sanguíneos (Alsford et al, 2011). RBP42 se une a un conjunto de mensajeros que codifican enzimas relacionadas con el metabolismo celular. Además, la traducción disminuye en ausencia de esta proteína. Por ello, los autores lanzan la hipótesis de que RBP42 pueda estar involucrada en la regulación de la respuesta celular a los tipos de nutrientes

disponibles en el medio en los diferentes momentos del ciclo del parásito, mediante la unión a los mRNAs que codifican las enzimas metabólicas involucradas. Por otra parte, debido a los efectos que provoca su ausencia en la traducción, puede tratarse también de un regulador de la traducción, promoviendo la traducción de determinados mRNA específicos ayudando a reclutar los factores de iniciación o de elongación en los polisomas para facilitar la producción proteica.

DRBD3 es una proteína con dos dominios RRM en su secuencia y una región en el extremo carboxilo rica en prolinas y glutaminas que ha sido caracterizada en nuestro

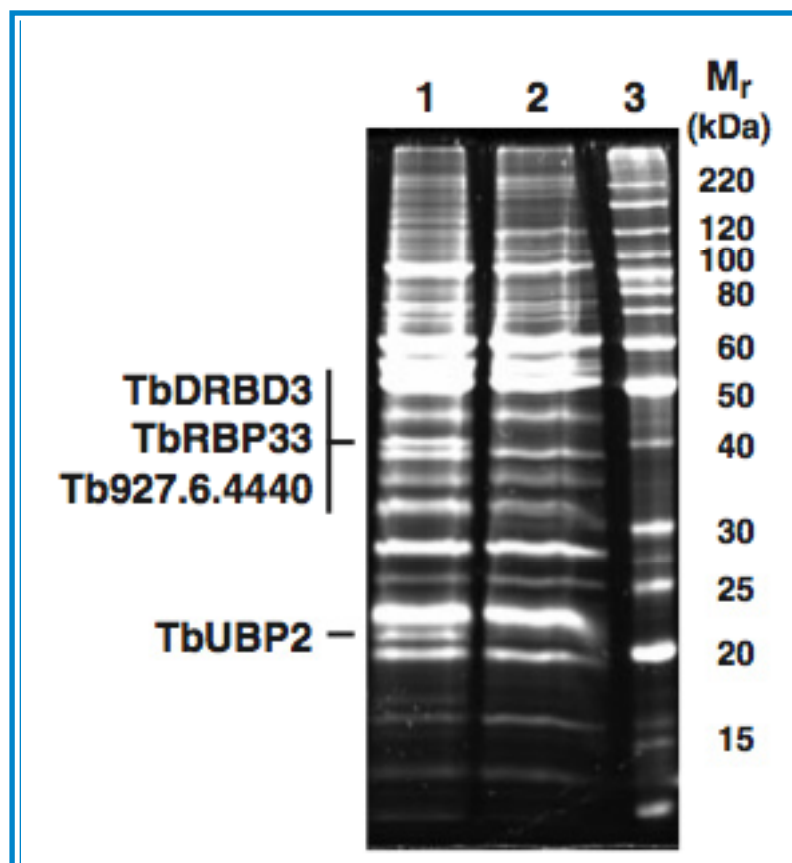


Figura II.7. **Identificación de las proteínas que se unen a la región 3' UTR de PGK-B.**

Los extractos citosólicos de tripanosomas procíclicos se utilizaron de muestra inicial en una columna de cromatografía de estreptavidina-agarosa con la 3' UTR de PGK-B (línea 1) o con una versión sin la secuencia reguladora URE (línea 2). El eluido de cada columna se cargó en un gel desnaturizante SDS-PAGE y se tiñó posteriormente con Sypro Ruby. Las proteínas que aparecen únicamente en el eluido de la cromatografía con la 3' UTR intacta se extrajeron del gel y se identificaron por espectrometría de masas. De la banda de aproximadamente 40 kDa se identificaron tres proteínas de pesos moleculares parecidos. Imagen tomada de (Estevez, 2008)

laboratorio (Estevez, 2008). Se trata de una proteína esencial que no se regula durante el desarrollo y que se localiza en el citoplasma y en el núcleo. El estudio del transcriptoma en tripanosomas en los que se silenció la proteína por RNAi determinó que la ausencia de DRBD3 produce la disminución de 2 a 5 veces de la concentración de un conjunto de 21 mensajeros que están enriquecidos en proteínas transmembranales reguladas durante el desarrollo y relacionadas con la transducción de la señal y el transporte. Entre ellos, transportadores de aminoácidos (AATP11), proteínas de superficie BARP (Urwyler et al, 2007), transialidasas *TbTS*, (Engstler et al,

1993) receptores de la adenilato ciclasa, o transportadores de pteridinas, indicando una función para esta proteína como estabilizadora de este conjunto de mensajeros. En otro trabajo se demostró que DRBD3 (renombrada PTB1 en el artículo) es esencial para el *trans-splicing* de una serie de transcritos derivados de genes que contienen regiones polipirimidinas ricas en citosinas, una función similar a la desarrollada por las proteínas de unión a regiones polipirimidínicas (PTB) en humanos (Stern et al, 2009).

La caracterización de la proteína de unión a RNA **RBP33** se describe en esta Tesis Doctoral.

Materiales y Métodos

3.1. Materiales

3.1.1 Líneas celulares de *Trypanosoma brucei*

Todas las líneas celulares utilizadas en esta tesis son las líneas parentales indicadas en el recuadro o han sido derivadas de las mismas.

En este último caso, se indica primero la línea parental seguida de un número correspondiente al plásmido transfectado.

427	Procíclicos y sanguíneos	Cross and Manning, 1973
449	Procíclicos	Biebinger,S et al. 1997
S16	Sanguíneos	Wirtz et al., 1999

3.1.2 Anticuerpos

Anticuerpos Primarios				
Nombre	Organismo	Origen	Western	IF
anti-RBP33	Conejo	Este laboratorio	1:10.000	1:500
anti-CSM	Conejo	Guerra-Giráldez, C., Quijada, L., & Clayton, C. E. JCS, (2002)	1: 5.000	
Anti-DRBD3	Conejo	Este laboratorio	1:10.000	1:500
anti-proteína A	Conejo	Sigma		1: 40.000
Anticuerpo monoclonal BB2	Ratón	Bastin, 1996	1:1000	
Anticuerpos Secundarios				
Anti-IgG de conejo- HRP	Cabra	Promega	1:2.500	
anti-IgG de conejo Alexa Fluór 488	Cabra	Molecular probes		1: 500

3.1.3 Oligonucleótidos

Nombre	Secuencia	Gen	Uso
AE35	GAGGGGCCCTAGTTCTAGAGCGGCCATC	Stuffer	pGR70/255
AE36	GGTGGTTAACGGCTGGTCCTGCAC	Stuffer	
AE59	GAAAGCTTGATATCCCGACTACCGAAAAC	TEV-CBP	pGR55
AE60	GACTCGAGAAGTGCCCCGGAGGATGAG	TEV-CBP	
AE61	GAAAGCTTATGAACAAATTCAACAAAGAA	N-TAP	pGR149
AE62	AACAAGTGCCCCGGAGGATGAGATTTTC	N-TAP	
AE76	GTAAAGCTTACTCCACTGCTGTGTAATGC	DRBD3	qRT-PCR/sonda
AE78	GCTGGTGTCTATGTTCAATACCCAATACG	DRBD3	qRT-PCR/sonda

AE79	GCAGAAGCATATGAGCACGGGTGATCCAA	RBP33	pGR55
AE80	TTGAAGCTTTGAATTGTGACGCATCACG	RBP33	
AE82	CTTCTGACTCTGTCTGTCCTAACATTTGC	RBP33	pGR149
AE93	GTGGATCCAAGCTTTACGACCGCCACGTG	RBP33	pGR70
AE94	AACGGGCCCGGTTGTGGTAACGGTGGAGG	RBP33	
AE115	GATAAGCTTATGAGCACGGGTGATCC	RBP33	pGR149
AE116	TGAATTGTGACGCATCACGG	RBP33	
AE126	GCTGAAGTGCAGGAGAGCGGTAG	Tb927.10.9080 (PT-X)	qRT-PCR/sonda
AE168	GCTGCAGCATGCCTAAACTCAGC	Tb927.9.7470 (NT10)	qRT-PCR
AE184	CAAACAGCCCTTATTCAACACCTCACG	Tb927.4.4730(AATP11)	qRT-PCR
AE186	GTTTTGCTCGCAACAACCTTCTACG	Tb927.10.9080 (PT-X)	qRT-PCR/sonda
AE215	GCAGCTCAGTGTCTCTATAAATCAATGC	Tb927.4.4730(AATP11)	qRT-PCR
AE222	GTTTTACCGGTGCTGTGCGTTTCCTCACG	5' utr RBP33	pGR149
AE223	GGGCCTCTTCTGCGTCTTCTGGCTAC	5' utr RBP33	
AE224	ACGGATCCATGAGCACGGGTGATCCAACCTG	RBP33	pGR149/269
AE269	GGACAAACTGCCACAAACTACAAGGGATG	Zona RHS 7 (Tb927.7.1930)	Sonda
AE270	GGTATTGATGGGGAGTGCCAGTACC	Zona RHS 7 (Tb927.7.1930)	Sonda
AE340	CCTGCTGAACCAAAGCGGGAGACAGG	Tb927.10.5720 (Xa)	Sonda
AE341	GGATGGGAGGAAAAGCTTGCTGGATGG	Tb927.10.5720 (Xa)	Sonda
AE344	GGTGTCTGTTAGAGGATGGTTACCCTACG	Tb927.7.1930	Sonda
AE345	CGACATTTGAAGCACAAGCTGTGTAGAGG	Tb927.7.1930	Sonda
AE380	GGACTTCTCCAGTTGTGCGCAGGAGG	Tb927.10.4680 (NUDIX)	qRT-PCR
AE381	GCAATCGCCGGACTGCAACCCAGG	Tb927.10.4680 (NUDIX)	qRT-PCR
AE390	CGACGTCAATGAGCGTACGGACGATGG	Tb927.10.4720	qRT-PCR
AE391	GCTTCAAGTACTCCAATGTGCGCAAAGC	Tb927.10.4720	qRT-PCR
AE400	GCACCTGTCCCACGAGAATCTGCAGG	Tb927.10.8590 (FTZC)	qRT-PCR
AE401	GCACAGAAACTCTCGGAGGTGGCACG	Tb927.10.8590 (FTZC)	qRT-PCR
AE406	CCTGTTGTTTGAGTGGGATCCTTAACC	Tb927.10.12170 (RAB-like)	qRT-PCR
AE407	CCACATATTGAAGAGCCTTTGGTCGTCG	Tb927.10.12170 (RAB-like)	qRT-PCR
AE454	CGTGGCAGGTCTTCCCGACG	LUC	qRT-PCR/sonda
AE455	GGTAAGACCTTTCGGTACTTCGTCC	LUC	qRT-PCR/sonda
AE456	CCT TCG CGT TAA CGA CTG ATA TGC C	5' utr PT-X	pGR212
AE457	CGA AAA GCT TGG TTC ACT CTC TTC	5' utr PT-X	
AE460	AGCCGGAGCGCATTGCTCTG	7SL	qRT-PCR/sonda
AE461	CAACACCGACACGCAACC	7SL	qRT-PCR/sonda

AE486	GATAAGCTTTGGCATCGGAGGCAGCGTTA	Tb927.9.4080	pGR225
AE487	CCTAAGATGAGTCGAAATCAGGTAC	Tb927.9.4080	
AE488	GATAAGCTTTGAACCAGAAGCGATGCGAAG	Tb927.6.740	pGR226
AE489	GTCACCACTAATGACAACGATATCG	Tb927.6.740	
AE594	AAGAAGCTTTGCCTGCTCCGGCGATCGG	HSP70 (Tb927.7.710)	pGR231/275
AE595	GTTCTGCACCAACTGTTGCACG	HSP70 (Tb927.7.710)	
AE618	ACTAGTAGCGTACTCCCCTAACTCTATTTCTC	3' utr PT-X	pGR237
AE630	GAGCGGTAGTGGATCCTATCATTAGGGCGCAGC	3' utr PT-X	pGR237
AE631	CCTCCAAGTGTACTCCCCTAACTCTATTTCTC	3' utr PT-X	
AE640	CCTACCTGAGCGACTTGGAAAGG	ACT	qRT-PCR
AE641	GCATTTGCTGTGTACGATGCTGG	ACT	qRT-PCR
AE647	GAGAGCATGTTAACTCAGTCGAGG	Tb927.9.7470 (NT10)	qRT-PCR
AE650	GCTCGCTTTCTGATTCATCTTCTGTT TCTTCGAAAACTCCTC	TAP-RBP33 R130K	pGR269
AE651	GGTGTTAGGATCCTTAGGTTGACTTCC	TAP-RBP33 R130K	
AE655	GTGGATCCAAGCTTCGAAGGAAGTGAGGACGC	5' utr RBP33	pGR255
AE656	AACGGGCCCTCACTAGCGATCCGTTCCG	5' utr RBP33	
AE659	GGTGAGGGTAACGAACGCAACC	NTF2	pGR264
AE660	CAGGATCCGGGATAGAACCGTGCCACC	NTF2	
AE661	GGAGCTTGTGCGCGTGAGC	RBP24 (U170K)	pGR265
AE662	AGGGATCCCGTAATACTCATGATATCATC	RBP24 (U170K)	
AE674	CTGGTACCAGGTTCGAGGTGCAATCC	P0	pGR268
AE675	GAGGATCCGAAGAGAGCACCCATGCCAAAG	P0	
AE676	CGTACGAGGGTCATTCGAAAACTC	TAP-RBP33 R130K	pGR269
AE678	GTAGTGAGGTCGCGTAATTAATGC	5' de Tb927.10.5720 (Xb)	Sonda
AE679	CCTGTCTCCCCTTTGGTTCAGCAGG	5' de Tb927.10.5720 (Xb)	Sonda
AE680	GCAAGGGCTTTGTGAAGTTGACC	upstream Tb927.9.4900	Sonda
AE681	CCCAACTACAGAACAGTACCTGC	upstream Tb927.9.4900	Sonda
AE682	GGTAATTCCATCTCCGAAACTTCG	Tb927.5.4000-4010	Sonda
AE683	GGTTGCTGATAATGGAGGGAATGG	Tb927.5.4000-4010	Sonda
AE691	GCTTTGAAGCTTGTCGAGGTCC	locus ISG65	qRT-PCR
AE692	GGTTACGCTCTGGGAAAAGACC	locus ISG65	qRT-PCR

3.1.4 Plásmidos

Plásmido	Proteína	Tag	Fusion	Plásmido parental	Selección
pGR12	-	TAP	-	pHD1360 (c)	HYG
pGR149	RBP33	TAP	N	pHD1360 (c)	HYG
pGR269	RBP33-R130K	TAP	N	pGR149 (esta tesis)	HYG
pGR139	DRBD3	TAP	N	pHD1360 (c)	HYG
p3216	DRBD3	eYFP	C	p2710 (Clontech)	NEO
p3378 (a)	SCD6	mCherry	C	p2705 (b)	BLA
p2706 (b)	PABP1	PTP	C	p2706 (b)	NEO
p3074	PABP1	4xTy	C	p2706 (b)	NEO
p3747	PABP2	PTP	C	p2706 (b)	NEO
p3358	PABP2	4xTy	C	p2706 (b)	NEO
pGR266	PABP2	TAP	C	p3747 (esta tesis)	NEO
p3763	L18	TAP	N	p2676 (b)	PUR
pGR268	P0	PTP	C	p2706 (b)	NEO
pGR225	Tb927.9.4080	TAP	N	p2676 (b)	PUR
pGR226	Tb927.6.740	TAP	N	p2676 (b)	PUR
pGR264	NTF2	PTP	C	p2706 (b)	NEO
pGR265	RBP24 (U170K)	PTP	C	p2706 (b)	NEO
pGR231	HSP70 (Tb927.7.710)	4xTy	N	p2676 (b)	PUR
pGR275	HSP70 (Tb927.7.710)	TAP	N	pGR231 (esta tesis)	PUR
pHD1360	RRP44	TAP	C	pHD918 (d)	HYG
Plásmido	Proteína	Función	Plásmido parental	Selección	
pGR55	RBP33	Generación Ab	pET24a (g) + TEV-CBP	KAN	
pGR53	DRBD3	Generación Ab	pET24a (g) + TEV-CBP	KAN	
pGR70	RBP33	RNAi	pGR19 (e)	HYG	
pGR255	RBP33	RNAi	pGR19 (Esta tesis)	HYG	
pGR108	LUC	LUC	pHD1437(f)	NEO	
pGR212	5' utr PTX	LUC	pGR108 (esta tesis)	NEO	
pGR237	3'utr PTX	LUC	pGR108 (esta tesis)	NEO	

a es (Kramer et al, 2008)

b es (Oberholzer et al, 2006)

c es (Hausler & Clayton, 1996)

d es (Estevez et al, 2001)

e es (Clayton et al, 2005)

f es (Colasante et al, 2007)

g es de Novagen

3.1.5 Tampones y medios usados con más frecuencia

Todos los medios se prepararon con agua Milli-Q.

Agar LB	1% triptona, 0,5% Levadura, 1%NaCl y 1,5% agar
Citomix	2 mM EGTA, 120 mM KCl, 0.15 mM CaCl ₂ .2H ₂ O, 10 mM fosfato potásico, pH 7.6, 25 mM Hepes, 5 mM MgCl ₂ .6H ₂ O, 0.5% glucosa, 100 µg/ml BSA y 1 mM hipoxantina
Denhardt's 50 x	1% de BSA, polivinilpirrolidona y Ficoll
HMI-9	IMDM (sigma) 1,77% (p/v), NaHCO ₃ 36mM, hipoxantina 1mM, timidina 161mM, cisteína 1,5mM, batocuproina 78mM, piruvato sódico 1mM, b-mercaptoetanol 2µM. Ajustar el pH a 7,5, filtrar y añadir 10% BSF.
IPP- 150	Tris-HCl, pH 7.4, 10 mM; NaCl 150 mM; Igepal 0,1%.
ZPFM	132 mM NaCl, 8 mM KCl, 8 mM Na ₂ HPO ₄ , 1.5 mM KH ₂ PO ₄ , 0.5 mM MgAc ₂ , 0.09 mM CaAc ₂ , pH 7.
Laemmli 5X	0,625 M Tris-HCl, pH 6.8, 10% (p/v) SDS, 40% (p/v) glicerol, 7.5% (v/v) β-mercaptoetanol, 1.5% azul de bromofenol
MOPS 10X	0,2 M de MOPS, 80 mM de NaAc, 10 mM de EDTA pH 7.0 (NaOH). Guardar en oscuridad a 4°C.
PBS	10 mM Na ₂ HPO ₄ y 1,8 mM de KH ₂ PO ₄ (pH 7,4); 140 mM NaCl; 2,7 mM KCl
PBST	PBS + 0,1% Tween 20
vPBS	Conocido como el PBS modificado de Voorheis: PBS con sacarosa 46 mM y glucosa 10 mM. Filtrar y conservar a 4°C.
SDM-79	MEM (GIBCO) 0,7% (p/v); medio 199 (GIBCO) 0,2% (p/v), aminoácidos esenciales MEM 50X (Sigma) 0,8% (p/v), aminoácidos no esenciales MEM 100X (Sigma) 0,6% (p/v), glucosa 5,6 mM, HEPES 30mM, MOPS 24 mM, NaHCO ₃ 24mM, piruvato sódico 1mM, D-L-alanina 2,24mM, L-arginina 574 µM, L-glutamina 2mM, D-L-metionina 469 µM, L-fenilalanina 484 µM, L-prolina 5,2mM, D-L-serina 571 µM, taurina 1,28mM, D-L-treonina 2,94mM, tirosina 552 µM, guanosina 35 µM, ácido fólico 9 µM, D(+) glucosamina 232 µM, ácido p-aminobenzoico 14,6 µM, biotina 800nM. Filtrar y añadir BSF al 10% y hemina 11,5 µM.
SOB	2% (p/v) bacto-triptona, 0.5% (p/v) extracto de levadura, 0.05% NaCl, 2.5 mM KCl, 10 mM MgCl ₂ , pH 7.0
SSC	3 M de NaCl, 0.3 M de citrato de sodio, pH 7 (NaOH)
Tampón de electroforesis SDS-PAGE	0,25 M Tris, 1,92 M glicina, 1% SDS.
Tampón de transferencia	25 mM Tris base, 186 mM glicina, 20% (v/v) metanol
Tampón de carga Northern blot	1X MOPS, 50% de formamida y 6.5% de formaldehído. Puede añadirse EtBr a una concentración final de 10 µg/ml.
Tampón de lisis	20 mM Tris, pH 8, 20 mM NaCl, 20 mM EDTA, 1 % SDS
Tampón de ligasa de RNA	500 mM Hepes o Tris, pH 7.5, 200 mM MgCl ₂ , 70 mM DTT, 2 mM ATP
TCA + DOC	disolver 40 mg of deoxicolato, Na sal en 10 ml de 100% TCA.

3.1.6 Antibióticos

	STOCK	Sanguíneos	Procíclicos	<i>E. coli</i>
Higromicina	50mg/mL	5 µg/ml	50 µg/ml	
Fleomicina	2,5 mg/mL		0,5 µg/ml	
Kanamicina	25 mg/mL			25 µg/ml
Blasticidina	10 mg/mL	5 µg/ml	10 µg/ml	
Ampicilina	100 mg/mL			10 µg/ml
Geneticina (G418)	2,5 mg/mL	2,5 µg/ml		
Tetraciclina	1 mg/mL	1µg/ml	1 µg/ml	
Puromicina	1 mg/mL	1µg/ml	1 µg/ml	

3.2. Métodos

3.2.1 *Trypanosoma brucei*

Hay dos formas del ciclo de vida de *Trypanosoma brucei* que pueden ser cultivadas *in vitro*.

3.2.1.1 Cultivo de sanguíneos

La forma sanguínea de *T. brucei* se cultivó en medio HMI-9 suplementado al 10% con suero fetal bovino inactivado previamente, en un incubador humificado, a 37°C y 5% CO₂. La densidad celular se midió regularmente con cámara de Neubauer y los cultivos se mantuvieron con diluciones periódicas cada dos días o cuando la densidad celular estuviese a punto de alcanzar los dos millones de parásitos por mililitro.

3.2.1.2 Cultivo de procíclicos

La forma procíclica de *T. brucei* se cultivó en medio SDM-79 suplementado con 10% de suero fetal bovino inactivado previamente y 1,5mL hemina (2,5mg/mL). Las condiciones del incubador son: 28 °C de temperatura y concentraciones normales de oxígeno. Los cultivos se mantuvieron con

diluciones periódicas cada dos días.

3.2.1.3 Transfección estable de tripanosomas

3.2.1.3.1. Tripanosomas sanguíneos

Los tripanosomas sanguíneos se recogieron a una densidad entre $1-2 \times 10^6$ a $1.000 \times g$, durante 10 minutos y a temperatura ambiente, se lavaron con citomix a 37 °C y se resuspendieron en el mismo tampón a una densidad de $1 \times 10^7/400 \mu l$. Para cada transfección se utilizaron 400 µl de la suspensión celular y se transfirieron a una cubeta estéril junto con 10 µg de DNA plasmídico linearizado (1µg/µl). La electroporación se llevó a cabo en un electroporador BTX a 1,6kV y 24Ω (2,5kV/resistencia). Tras la electroporación, las células se transfirieron inmediatamente a 12 mL de HMI-9 que se repartieron en una placa de 24 pocillos y se mantuvieron a 37°C 12 a 24 h sin selección. Tras esto, aplicamos el mismo volumen a cada pocillo (0,5mL) de HMI-9 con el marcador de selección en la concentración apropiada. Los transfectantes son visibles a

partir del día 5-7.

3.2.1.3.2. *Trypanosomas* procíclicos

Los *trypanosomas* procíclicos se recogieron a una densidad entre $4-8 \times 10^6$ a $1.000g$ durante 10 minutos y a $4^\circ C$, se lavaron con ZPFM a $4^\circ C$ y se resuspendieron en el mismo tampón a una densidad de $1-3 \times 10^7/400 \mu l$. Para cada transfección se utilizaron $500 \mu l$ de la suspensión celular y se transfirieron a una cubeta estéril junto con $5-10 \mu g$ de DNA plasmídico linearizado ($1\mu g/\mu l$). La electroporación se llevó a cabo en un electroporador BTX a $1,6kV$ y 24Ω ($2,5kV/resistencia$). Tras la electroporación, las células se transfirieron inmediatamente a $8 mL$ de SDM-79 que se repartieron en ocho pocillos de dos placas de 24 pocillos para hacer diluciones seriadas y se mantuvieron a $28^\circ C$ $12-24 h$ sin selección. Tras esto, añadimos $0,5 mL$ de SDM-79 condicionado con la concentración adecuada del marcador de selección en los pocillos vacíos y las diluciones se hicieron partiendo del volumen inicial y diluyendo en los pocillos nuevos a razón 1:1. Los primeros transfectantes aparecen a los 10 días.

Para preparar medio condicionado, se centrifuga un cultivo que se encuentre en la fase log tardía ($7-9 \times 10^6/ml$) y se toma el sobrenadante sin apurar demasiado para evitar que el pellet vuelva a resuspendirse. Se puede esterilizar con un filtro, pero si se va a utilizar en breve, únicamente es necesario guardarlo a $4^\circ C$.

3.2.1.4. Congelación y descongelación de células de *T. brucei*

Para congelar, las células se recogieron en fase exponencial de crecimiento mediante centrifugación ($1.000g$, durante 10 minutos y a $4^\circ C$). Las células se resuspendieron en medio de cultivo con 10% (v/v) de glicerol en criotubos. Las células se congelaron lentamente hasta los $-80^\circ C$. Para conservarlas por largos periodos los viales se transfirieron a nitrógeno líquido. Para descongelarlas, las células se diluyeron

rápidaente en medio atemperado ($37^\circ C$ para sanguíneos y $28^\circ C$ para procíclicos).

3.2.1.5. Inmunofluorescencia

Para la localización de las proteínas *TbRBP33* y *TbDRBD3* y sus derivados, se recogieron los parásitos ($1.000g$, $10 min$, $4^\circ C$) y se lavaron 1 vez con vPBS. Las células se fijaron con 4% (p/v) de paraformaldehído en PBS durante $20 min$ a temperatura ambiente en el volumen requerido en cada caso: $2 millones/cámara$ para procíclicos y $10 millones/cámara$ para sanguíneos. Las células se adhirieron en un portaobjetos pre-tratado con poli-L-lisina $0,1 mg/mL$ durante $10 min$ y secado durante $1h$ a $60^\circ C$. Las células ya adheridas se lavaron brevemente con PBS y se permeabilizaron con $0,2\%$ (p/v) de Tritón X-100 en PBS durante $20 min$. Se lavan las células de nuevo con PBS y se bloquean utilizando 20% (v/v) de suero fetal bovino (FBS) en PBS durante $30 min$. Después de lavar, las células se incubaron $1 h$ con el anticuerpo primario purificado diluido en el tampón de bloqueo (20% FBS-PBS). Se hacen tres lavados con PBST y uno con tampón de bloqueo antes de incubar $1 h$ con el anticuerpo secundario diluido en el tampón de bloqueo. Tras tres lavados, se lava brevemente con metanol y se dejan secar las muestras. Se añade una gota de medio de montaje con DAPI Vectashield (Vector) y se cubren con un cubreobjetos. Las muestras se observaron en un microscopio Zeiss con el objetivo de inmersión $100X$.

3.2.1.6. Ribointerferencia

Los cultivos transfectados con los plásmidos de RNAi, se seleccionaron con los marcadores de resistencia adecuados y los clones resistentes se congelaron en fase de crecimiento exponencial. El resto del cultivo se dividió en 2 y uno de los inóculos se indujo con $1 \mu g/ml$ de tetraciclina. Se comparó el crecimiento tras $48 horas$ y se seleccionaron los clones en los que el crecimiento del cultivo inducido se diferenciaba con el no inducido en más de un 50% . **3.2.2.1. *Trypanosoma brucei* y *E. coli***

3.2.2 Ácidos nucleicos

3.2.2.1. *Trypanosoma brucei* y *E. coli*

3.2.2.1.1 Aislamiento de DNA genómico de *T. brucei*

Centrifugamos de $2,5 \times 10^7$ a 1×10^8 células y se lavan y se resuspenden en 300 μ l de PBS en un eppendorf. Añadimos 2 μ l de 10mg/mL de RNasa A y 300 μ l de tampón de lisis 2 x. Mezclamos e incubamos 30-60 min a 37°C. Tras esto, enfriamos los tubos 10 min a temperatura ambiente y añadimos 133 μ l de 7.5 M de NaAc. Mezclamos y centrifugamos 20 min a 16.000g. Transferimos el sobrenadante a un nuevo tubo y precipitamos el DNA añadiendo 1 volumen de isopropanol. Centrifugamos de nuevo 5 min, eliminamos el sobrenadante, lavamos dos veces con 70% de etanol y dejamos secar al aire. Resuspendimos en 50 μ l de agua Milli-Q toda la noche a 4 °C.

3.2.2.1.2. Preparación de células *E. coli* competentes

Para el clonaje de todos los plásmidos se utilizó la cepa de *E. coli* DH5 α . Las células se prepararon para transformar siguiendo el protocolo descrito por (Inoue et al, 1990).

3.2.2.1.3 Transformación de *E. coli* con plásmidos de DNA

Para la transformación de *E. coli* se atemperaron las células en hielo. A continuación, se le añadió 5 μ l de mezcla de ligación, se incubaron las células en hielo durante 30 min y se llevó a cabo la transformación por choque térmico. Para ello, los tubos que contenían las células se pusieron durante 30 segundos en un baño de agua a 42°C y se devolvieron al hielo durante 2 min. Se transfirieron las células a un tubo Falcon de 15 mL con 0,9 mL de SOB a temperatura ambiente y se incubaron durante 1 h a 37 °C en agitación. Tras este tiempo, se plaquearon 50 ml de células en placas de agar LB

con los antibióticos apropiados (normalmente, ampicilina a una concentración de 100 μ g/mL) y se incubaron durante la noche a 37°C.

3.2.2.1.4 Aislamiento de DNA plasmídico de *E. coli*

Para aislar concentraciones de 100-500 μ g de DNA plasmídico de *E. coli* se utilizó el kit de purificación de plásmidos de Macherey-Nagel (Alemania) tal y como se describe en las instrucciones aportadas por los fabricantes.

3.2.2.2. Protocolos de clonaje estándar

3.2.2.2.1. Protocolos de clonaje

Los protocolos de corte de DNA con enzimas de restricción, ligación de fragmentos de DNA y desfosforilación de DNA con fosfatasa alcalina, usados en esta tesis se encuentran detallados en (Sambrook et al, 1989) o como se describe por los fabricantes de las enzimas utilizadas.

3.2.2.2.2. Amplificación de DNA (PCR)

El DNA se amplificó por la reacción en cadena de la polimerasa con las polimerasas *Pfu*, *Pwo* o *Taq* como describen los fabricantes de las enzimas. La selección de la polimerasa dependió del uso del DNA (longitud del producto de PCR, eficiencia, precisión, etc.). Los oligos se diseñaron utilizando los programas Gene Construction Kit 2 y OligoCalc para calcular las propiedades de los oligos. Los productos de las PCRs se purificaron con el kit de purificación de PCRs (Macherey-Nagel, Alemania)

3.2.2.2.3. Precipitación de DNA

Para precipitar DNA, añadimos 0,1 volumen de 3M acetato de sodio (pH 7.0) y 1 volumen de isopropanol o dos volúmenes de etanol. Centrifugamos a 13.000 rpm durante 30

min a 4°C. El pellet de DNA se lavó con 70% etanol, se dejó secar al aire y se resuspendió en agua Milli-Q. Para concentraciones muy pequeñas de DNA, se añaden 20 µg de glucógeno junto con el NaAc y el isopropanol o etanol.

3.2.2.2.4. Extracción de RNA de cultivos de *T. brucei*

Para los experimentos de northern blot, se recogieron las células en crecimiento exponencial (1.500g, 10 min, temperatura ambiente). Cada pellet de 5×10^7 a 10^8 células se resuspendió en 1 mL de Trizol peqGold TriFast (peqLab Biotechnologie, Alemania) a temperatura ambiente y se agitó bien con el vórtex. La muestra puede congelarse a -20 °C hasta su uso. Añadimos 200 µl de cloroformo y agitamos de nuevo con el vórtex durante 30 segundos. Centrifugamos 3 min a 16.000g. Recogemos 500-600 µl de la fase acuosa superior y precipitamos el RNA añadiendo 1 volumen de isopropanol. Incubamos durante 30 min en hielo. Centrifugamos 30 min a 16.000g, 4°C. Retiramos el sobrenadante y lavamos el pellet con 70% de etanol. Dejamos secar al aire antes de resuspender en agua Milli-Q a razón de 1 µl/ 10^6 células. Las muestras se almacenaron a -80 °C.

Para qRT-PCR, tras dejar secar el pellet se resuspende en 85 µl de agua Milli-Q y añadimos 10 µL de 10x tampón de DNAsa I y 5 µL RQ DNAsa 1U/ µL. Incubamos la mezcla durante 30 min a 37°C. Tras esto, fenolizamos añadiendo 1 volumen de una solución 1:1 de fenol ácido: cloroformo, y agitamos durante 30 segundos con el vórtex. Centrifugamos durante 3 min a 16.000g, retiramos la fase acuosa superior y añadimos 1/10 de volumen de 3 M de NaAc y 2,5 volúmenes de etanol (-20°C) y 20 µg de glucógeno. Incubamos a -20°C durante 30 min, centrifugamos 30 min a 16.000g, 4°C, eliminamos el sobrenadante, lavamos con etanol y dejamos secar al aire. Resuspendemos en 20 µl de agua Milli-Q

3.2.2.2.5. Análisis de RNA por northern blot

Las muestras con 10-25 µg de RNA total se incubaron con 15-20 µl de tampón de carga a 37°C durante 5-10 min. Se agitaron con el vórtex hasta disolver bien y se incubaron 10 min a 65 °C. Tras este tiempo, se enfriaron rápidamente en hielo, se centrifugaron brevemente y se cargaron en un gel de agarosa al 1%, 6,5% de formaldehído y MOPS. Como marcador de tamaños de RNA se utilizaron 5 µg de marcador Invitrogen 0,24-9,4 kb RNA. El gel corrió en MOPS 1X a 90V durante 3-4 horas. Las muestras se transfirieron por capilaridad del gel a una membrana de nylon con 10X SSC durante una noche. Tras marcar las posiciones de los pocillos en la membrana, separamos el gel y fijamos los RNAs a la membrana con luz U.V. 1200 mJ/cm². Lavamos la membrana 5 min con 5X SSC y la secamos al aire.

Los filtros se prehibridaron en 6xSSC, 1%SDS, 5xDenhardt, 100 µg/ml de DNA de esperma de arenque durante al menos 2 h a 42°C. Se hibridaron durante toda la noche a 42 °C en la misma solución sin Denhardt pero con 50 % de formamida y la sonda desnaturalizada. Posteriormente, se lavaron en 10 X SSC, 1% SDS durante 30 min a temperatura ambiente, un segundo lavado en 1 x SSC, 0.5% SDS precalentado, durante 45 min a 42 °C y un último lavado en 0.1xSSC, 0.2%SDS precalentado, 30 min a 42°C.

Las sondas para la hibridación fueron obtenidas por PCR sobre DNA genómico de *T. brucei*; 9µL DNA de productos de las PCRs, de 200 nucleótidos aproximadamente, se marcaron con 4 µL de α -³²P[dCTP] por *random priming*, usando el kit *Prime-it* de Stratagene. A continuación, se purificaron eliminando el exceso de radiactividad por centrifugación mediante filtración por gel en columnas de Sephadex (GE Healthcare). Posteriormente, se midieron las dpm totales y añadimos 10⁶ dpm/10 mL en el tampón de hibridación. Las sondas se almacenaron a -20°C y se utilizaron

de nuevo tras hervirlas 5 min y enfriarlas 2 min en hielo.

Para utilizar de nuevo las membranas, se lavaron con 1 L de 0,1X SSC y 0,5% SDS llevados a ebullición. La membrana se puso en una cubeta con un poco de este tampón a temperatura ambiente y en el momento de hervor, se añadió con cuidado de no dar directamente en la membrana y se incubó durante 30 min a temperatura ambiente.

3.2.2.2.6. Análisis de RNA con microarrays

Para los microarrays, se crecieron los cultivos durante 48 horas en presencia de tetraciclina para inducir el silenciamiento, y se extrajo el RNA total de las células sin inducir e inducidas como se ha indicado en 3.2.2.2.5. 15 µg de RNA se retrotranscribieron en presencia de 100 ng de oligo-d(T), 0,25 mM dATP, 0,25 mM dTTP, 0,25 mM dGTP, 0,05 mM dCTP, 0,05 mM Cy3- o 0,05 mM Cy5-dCTP (GE HealthCare), 50 mM Tris-HCl, pH 8,3, 75 mM KCl, 3mM MgCl₂, 5 mM DTT, 40 U de RNAsa OUT (Invitrogen) y 400 U de reverso transcriptasa Superscript III (Invitrogen). Las reacciones se incubaron durante 3 horas a 50°C, se pararon calentando hasta 70°C durante 15 min y se trataron con 5 U de RNAsa H durante 20 min a 37 °C. El cDNA se purificó utilizando el kit MinElute Reaction CleanUp Kit (Qiagen), se precipitaron con etanol y se resuspendieron en el tampón de hibridación. Los portas de microarrays genómicos de *T. brucei* se prehibridaron en 5X SSC, 0,1% SDS y 1% BSA durante 45-60 min a 42 °C. Se lavaron 3 veces en agua durante 10 segundos y se hundieron dos segundos totalmente en isopropanol. Se secaron centrifugándolos en falcon de 50 mL durante 10 min a 200g.

Los cDNAs se disolvieron en 10 µl de agua y se añadieron a 60 µl de tampón de hibridación: 6x SSC, 1% SDS, 50% formamida, 0,6 mg/ml DNA de espermatozoos de arenque. La solución se mezcló bien, se hirvió durante 5 min y se enfrió en hielo durante 2 min. Tras centrifugarlo brevemente, se añadió a los

portas de los microarrays y se incubó a 37°C durante 20 horas. Todos los lavados se hicieron a temperatura ambiente y con agitación suave. Se lavaron los portas durante 10 min en 2X SSC, 0,5% SDS, luego en 0.2xSSC, 0.5% SDS y finalmente 10 segundos en 0.1xSSC. Secar de nuevo.

Se analizaron 4 hibridaciones (3 réplicas biológicas con un cambio de marcaje en una de ellas). Los portas se escanearon utilizando un escáner de arrays Axo GenePix scanner (Axon Instruments, Sunnyvale, CA, USA). Las imágenes obtenidas se convirtieron al formato TIGR usando Express Converter con las opciones *fitted intensitas* y *Background Sustraction*. Tras esto, se analizaron utilizando los programas de TIGR MIDAS, con la opción *stringent filter* en ambos canales. Se Normalizaron los datos utilizando algoritmo total, lowess y SD con Cy5 como referencia, aplicando la corrección de réplicas *interslide* y finalmente realizó un *cross-filter cutoff* de 0,6. Los datos normalizados se analizaron con el programa MeV utilizando el algoritmo SAM (*Significance Analysis of Microarrays*) con las opciones por defecto. Sólo los clones con un $p < 0.05$ y un fold de cambio de expresión de 1.5 veces fueron seleccionados:

3.2.2.2.7. Marcaje de RNA en 3' con [³²P]Cp

Para marcar los RNAs en 3' con [³²P]Cp mezclamos en tampón de ligasa de RNA, 50 µCi de [³²P]Cp (10 µCi/µl), 2 µg de RNA, 5 U de RNAsa OUT (Invitrogen), 4 µL de DMSO y completamos hasta 19 µL con agua. Añadimos finalmente 12U de T4 RNA ligasa (Promega, 12.3 U/µl). Incubamos la reacción a 27 °C durante 4h o a 4°C durante toda la noche. Los productos marcados se purificaron con geles al 6% de Urea-PAGE.

3.2.2.2.8. Secuenciación masiva de RNA

Para la secuenciación masiva, se utilizaron como control RNAs purificados según se ha descrito en 3.2.2.2.5. Las muestras

de mRNAs asociados a RBP33 se extrajeron como se indica en el protocolo 3.2.3.4. Entre 100 y 200 ng de RNAs se utilizaron para la secuenciación y se prepararon con el kit de preparación de muestras para la secuenciación de mRNA (Illumina) según indicaban los fabricantes.

Las muestras se secuenciaron en una plataforma de Illumina en el Instituto Sanger en Hinxton, Reino Unido y las lecturas obtenidas de 36 nt se procesaron por calidades utilizando el programa FASTX-toolkit (http://hannonlab.cshl.edu/fastx_toolkit/). Tras esto, se mapearon las secuencias sobre el genoma de *T. brucei*

(V4; http://www.sanger.ac.uk/Projects/T_brucei) utilizando Bowtie (Langmead et al, 2009). Utilizando HTSeq, un programa parte de Phyton (<http://www-huber.embl.de/users/anders/HTSeq/doc/overview.html>), las lecturas se contaron en sus localizaciones génicas y utilizando edgeR, un paquete del software Bioconductor (Fred Hutchinson Cancer Research Center, USA), comparamos los datos obtenidos del transcriptoma completo de procíclicos con nuestras muestras de inmunoprecipitaciones de los complejos RBP33-mRNA, según indicaban los protocolos de los diseñadores del programa.

3.2.3 Proteínas

3.2.3.1. Producción de Anticuerpos

Se utilizó un fragmento del marco abierto de lectura (ORF) de *TbDRBD3* que corresponde a los primeros 83 aminoácidos, o un fragmento de *TbRBP33* que corresponde a los 160 aminoácidos finales para clonarlos en el plásmido pHD1306, expresarlo como fusiones His₆-GST, purificarlos utilizando resinas de afinidad a glutatión y níquel e intercambiar el tampón por PBS. Las inmunizaciones en conejo se llevaron a cabo según indica el protocolo estándar (23). Los anticuerpos policlonales se purificaron por afinidad utilizando las versiones de las proteínas completas asociadas a AffiGel-10 (Bio-Rad) y en tampón 50 mM Hepes, pH 7.5. Tras eluir en 2.5 ml y añadir el mismo volumen de glicerol se conservaron en alícuotas a -20°C. Para expresar las proteínas completas de *TbDRBD3* y *TbRBP33* en *Escherichia coli* para la purificación de los anticuerpos, se clonaron las ORFs en pGR36 (generando pGR53 y pGR55, respectivamente). Las bacterias se crecieron a temperatura ambiente hasta una densidad OD₆₀₀ de 0,2, se indujeron añadiendo 1mM de isopropil-β-D-tiogalactopiranosido (IPTG, Applied Biosystems-Ambion) y se incubaron a la misma temperatura hasta que alcanzaron una OD₆₀₀ de

1,5. Las proteínas recombinantes se purificaron utilizando resinas de afinidad a calmodulina (Stratagene, La Jolla, CA, USA) y de afinidad a níquel (GE Healthcare, Barcelona, España), siguiendo las instrucciones de los fabricantes.

3.2.3.2. Preparación de lisados de proteínas de *T. brucei*

Para la obtención de extractos solubles de tripanosomas procíclicos y sanguíneos, las células se recogieron a una densidad de 5-8 x 10⁶/ml los procíclicos y 0,5 a 1 x 10⁶/ml los sanguíneos, se lavaron con PBS y se resuspendieron en el mismo tampón. Se añadió un volumen de tampón de carga Laemmli 5x y se hirvió durante 10 minutos. Las muestras se enfriaron a temperatura ambiente y se cargaron en un gel de poliacrilamida, a una concentración de 10⁶ parásitos/ pocillo. Como marcador de tamaños se utilizó BenchmarkTM (Invitrogen).

3.2.3.3. Inmunoblot

Las muestras se cargaron en geles de electroforesis de 0,75 mm de grosor al 10% SDS-PAGE (Sambrook & Russell) y se separaron por tamaños en un sistema de electroforesis Mini-

Protean (Bio-Rad) a 200V durante 50 minutos. Las muestras se transfirieron desde el gel a una membrana de nitrocelulosa (Millipore) mediante un sistema de transferencia de inmersión (Mini-Protean, Bio-Rad) en frío, a 100V (unos 200mA), durante 45 minutos. El gel se sumergió unos segundos en tampón de transferencia. La membrana se bloqueó durante 30 min con PBS-Tween 20 0,05% y 5% de leche (p/v, Sveltesse). Se incubó 1h 30 min en las diluciones correspondientes de los anticuerpos primarios diluidos en PBST-leche. Tras 3 lavados de 10 min con PBST 0,05 %, incubamos 1 h con el anticuerpo secundario diluido en PBST-leche. De nuevo realizamos los 3 lavados de 10 minutos con PBST antes de revelar con agentes de inmunodetección de quimioluminiscencia (GE Healthcare) según las instrucciones del fabricante.

3.2.3.4. Inmunoprecipitación de complejos mRNA-proteínas.

Con este protocolo se purificaron las muestras de RNA que se utilizarían en RNA-Seq y en las RT-PCR cuantitativas. Antes de recoger los cultivos, se tomaron 50µL de bolitas magnéticas (protein G- Dynabeads) por muestra (hay dos muestras por cultivo, IgG y AntiRBP33). Se añadieron 450 µL de IPP-150 (en tubos RNAsa-free) y los anticuerpos correspondientes (la relación calculada de RBP33 respecto a IgG es 1/10, con lo que se añadieron 5 µL de IgG de conejo y 50 µL de antiRBP33). Se incubaron las bolitas durante 30 minutos a temperatura ambiente para que se conjugasen con los anticuerpos.

Durante este tiempo, se recogieron 5×10^7 células de procíclicos en fase exponencial mediante centrifugación (1500 g, 10 min, 4°C) y se lavaron con 10 ml de SDM-79 sin suero. Se resuspendieron en 0,2 mL de vPBS y se pasaron a un pocillo de una placa multipocillo de 6 (BD Falcon™). Los tripanosomas se irradiaron con 400 mJ/cm² de luz U.V. Tras esto, se pasaron a un tubo Falcon de 15 mL y se volvieron a centrifugar en las mismas condiciones que antes.

El pellet de tripanosomas se resuspendió

en 2 ml de 10 mM Tris-HCl, pH 7.4, 2 mM DTT, 100U/ml RNAsin (Promega) (en el momento justo de usarlo), 0.2% Igepal, 2mM inhibidores de RNAsas (VPCs, vanadilos 200mM stock (Sigma-Aldrich)) y un cóctel de inhibidores de proteasas libres de EDTA (Roche Diagnostics). Las células se rompieron pasando 2 veces la mezcla por una aguja de 27G. Del total, se tomaron 50 µL como INPUT, y se conservaron añadiendo 1 mL de trizol y congelando a -20°C. El resto del lisado se centrifugó de nuevo y se tomó el sobrenadante resultante, al que se añadió NaCl hasta 0,15M. Antes de añadir el extracto, se lavaron las bolitas 2 veces con 500 µL de IPP-150. EL extracto se dividió en dos partes iguales. A una parte se le añadieron las bolitas con anti-TbRBP33 purificado y a la otra parte las bolitas con IgG de conejo. Se incubaron las muestras 3 horas a 4°C, en rotación. Tras la incubación, separamos los complejos de proteínas-RNA mensajeros unidos a los anticuerpos con bolitas magnéticas utilizando una gradilla imantada. En esta base, se lavaron las muestras 4 veces con 500 µl de IPP-150. Los RNA mensajeros se eluyeron con 100 µM Tris-HCl, pH8, 100 mM NaCl, 0,5 % SDS, 1 mM EDTA y 100 µg de Proteinasa K, e incubando a 50°C en un termomixer con agitación 800 rpm durante 30min. Se eliminaron las proteínas purificando con fenol: cloroformo 1:1 y precipitando con EtOH y glucógeno durante 30 min a -20°C. Se centrifugaron las muestras durante 30 min a 4°C y 20.000 rpm. Los pellets se lavaron con Etanol al 70%. Se resuspendieron de nuevo en 85 µL de agua y se añadieron 10 µL de tampón de DNasa I y 5 µL de RQ DNasa (Promega). Se incubaron las muestras a 37°C durante 30 min y volvieron a purificarse los RNA fenolizando y precipitando, esta vez con 1/10 del volumen de 3M NaAc y 2,5 veces del volumen de EtOH. Tras incubar las muestras a -20°C durante 30 min, se centrifugan de nuevo y se lavan con etanol 70% como paso final.

3.2.3.5. RT-PCR cuantitativa

300 ng de RNA se convirtieron en cDNA utilizando *random hexamers* (Invitrogen) y

la Maxima reverse transcriptasa (Fermentas), según las indicaciones de los fabricantes. Las RT-PCR cuantitativas se llevaron a cabo utilizando SYBR Green de Fermentas en un termociclador BioRad CFX96 con las condiciones siguientes:

95 °C, 10 min; 40 x [95°C, 15s; 55°C, 30s].

Para confirmar la especificidad, se controlaron las T_m (*melting temperature*) y las amplificaciones se visualizaron en un gel de agarosa y por secuenciación de DNA. Además, se incluyeron controles en los que no se había añadido la reverse transcriptasa para eliminar la posibilidad de contaminaciones con DNA genómico. El enriquecimiento de los transcritos específicos se calculó tras compararse con inmunoprecipitaciones control llevadas a cabo con suero de conejo normal y normalizando los niveles respecto al RNA de la actina en los datos de RBP33 y del 7SL en las muestras de DRBD3. Los experimentos se llevaron a cabo al menos cuatro veces

3.2.3.6. Purificación por afinidad en tándem (TAP)

Se recogieron $1-2 \times 10^{10}$ células en fase logarítmica de crecimiento, se lavaron con SDM-79 sin suero y se congelaron hasta su uso. Los extractos de proteínas se obtuvieron resuspendiendo el pellet celular en 1 ml de tampón de lisis por cada 10^9 células (10 mM Tris-HCl, pH 7,6, 2mM DTT, 0,1% (p/v) Igepal CA-630, coctel completo de inhibidores de proteasas sin EDTA (Roche)) y pasando la suspensión por una aguja de jeringa 27G, tres veces, en hielo. Los lisados se centrifugaron a 16.000g durante 10 min a 4°C. Se añadió NaCl a una concentración final de 150 mM. El procedimiento de la purificación por TAP se llevó a cabo como se describe en Puig et al 2001, con excepciones: la digestión con TEV se llevó a cabo durante toda la noche a 4°C y la unión a la resina de calmodulina se llevó a cabo durante 4 horas a 4°C. Los complejos de proteínas se eluyeron en 1 mL de Tris-HCl,

pH 7,4, 150 mM CaCl₂, 20 mM EGTA, se precipitaron durante 30 min en hielo con 20% de ácido tricloroacético (TCA) y 0,08% de desoxicolato de sodio en tubos siliconizados, se lavaron con 100% acetona, se secaron al aire, se cargaron en un gel SDS-PAGE al 10% y se tiñeron con Sypro Ruby como se indica en 3.2.3.7.

Para las muestras que se trataron con RNAsa, la mitad del lisado se incubó con 50 µg de RNAsa A y 1.000 U de RNAsa T1 durante 30 min en hielo antes de la centrifugación. Para confirmar que la digestión se llevó a cabo correctamente, se extrajo RNA del eluido de TEV, se retrotranscribió a cDNA tras haberlo tratado previamente con DNAsa con 0,5 µg de *random hexamers* (Invitrogen) y la reverse transcriptasa Máxima (Fermentas) y se amplificaron con cebadores específicos los transcritos que codifican AATP11 (*Tb927.4.4730*), el transportador de pteridinas del cromosoma X PT-X (*Tb927.10.9080*) y el transportador de nucleobases *TbNT10* (*Tb927.9.7470*) como se describe en Estévez 2008.

Para confirmar la asociación de las proteínas identificadas en las purificaciones TAP de DRBD3, se llevaron a cabo purificaciones a pequeña escala con 3×10^9 células expresando las proteínas identificadas fusionadas a PTP o TAP. En este caso, los eluidos de TEV se precipitaron con TCA como se ha descrito antes, se cargaron en un gel SDS-PAGE al 10%, se transfirieron a membranas de nitrocelulosa y se analizaron en busca de la señal de DRBD3 utilizando anticuerpos policlonales anti-DRBD3 (Estevez, 2008).

3.2.3.7. Tinción de geles con Sypro Ruby

Para teñir los geles con Sypro Ruby (LONZA, Rockland, USA), se añadió directamente la solución y se dejó durante toda la noche tiñendo. El exceso de tinción se eliminó lavando 3 veces con una mezcla de 10% metanol y 7% ácido acético.

3.2.3.8. Análisis de proteínas por huella peptídica

Las bandas seleccionadas se cortaron y se enviaron al Servicio de Proteómica del Instituto de Parasitología y Biomedicina López-Neyra para su identificación por MALDI-TOF. El análisis se realizó en el espectrómetro de masas Voyager DE-PRO (Applied Biosystem). La herramienta MASCOT (http://www.matrixscience.com/search_form_select.htm, Matrix Science) se usó para buscar proteínas con masas de péptidos coincidentes con las masas de las muestras. La base de datos usada contiene la base de datos específica de *T. brucei* cedida por el Dr. Michael Ferguson (Universidad de Dundee, Reino Unido). Una proteína se consideró positiva cuando el índice MASCOTT fue mayor que 50 ($p < 0,05$).

3.2.3.9. Desfosforilación de proteínas y visualización con Mn²⁺-Phostag

Partimos de dos pellets de 1×10^8 células de sanguíneos y dos de procíclicos de la cepa 427, lavados en sus correspondientes medios sin suero. Se rompen en 1 mL de 10 mM Tris-HCl pH 7.4, 0,1% Igepal y una pastilla de inhibidores de proteasas (Roche) mediante aguja 27G. A uno de los pellets se añade el buffer suplementado con inhibidores de fosfatasas: 10 mM NaF y 1 mM ortovanadato. Se centrifugan a 16.000g durante 10 minutos, se toman los sobrenadantes y no se suplementan con sal. Del lisado sin inhibidores de fosfatasas se toman 70 μ L, se añaden 8 μ L de 10x CIAP buffer y 2 μ L de CIAP de Roche (1U/ μ L) y se deja incubando a temperatura ambiente durante media hora. Tras esto, añadir 20 μ L de 5xLaemmli y hervir 5 minutos. Del lisado tratado con inhibidores de fosfatasas, se toman 70 μ L, se añaden 8 μ L de CIAP y 2 μ L de buffer de lisis, se mantiene en hielo hasta que se cumpla la media hora y se tratan con Laemmli de la misma manera.

A los geles de poliacrilamida SDS-PAGE se le añade al gel separador, 25 mM de Phos-tag™ Acrilamida (Wako Chemicals,

USA) y el mismo volumen de una solución 10 mM de $MnCl_2$ antes de añadir el persulfato y el temed.

3.2.3.10. Análisis de polisomas

La asociación de DRBD3 a los polisomas se llevó a cabo en gradientes de sacarosa 10%-50% como se describe en (Kramer et al, 2008).

3.2.3.11. Actividad luciferasa

Para los ensayos de luciferasa se prepararon previamente en tubos adaptados al luminómetro con 100 μ L de reactivo de ensayo de luciferasa (Promega) en cada tubo. Programamos el luminómetro para realizar la medida con un retraso de 2 segundos y durante 10 segundos para medir la actividad de la luciferasa. Recogemos 10^7 células, lavamos con PBS y se resuspenden en 100 μ L de tampón de lisis de la luciferasa (100 mM fosfato potásico pH 7.8, 2 mM DTT, 0.1% TritonX-100, 10% glicerol). Incubamos 10 min en hielo y centrifugamos a 16.000g durante 10 min a 4°C. Recogemos el sobrenadante y utilizamos 20 μ L para los ensayos de luciferasa y el resto para medir la concentración de proteínas con Bradford.

Objetivos

Objetivos

1. **Dinámica de los complejos RNP de *TbDRBD3* en respuesta a estrés en *Trypanosoma brucei***
 - Aislamiento y caracterización de complejos multiproteicos.
 - Efecto del estrés oxidativo y nutricional en la composición de los complejos de DRBD3.
2. **Caracterización funcional in vivo de la proteína de unión a RNA *TbRBP33***
 - Expresión de la proteína en tripanosomas sanguíneos y procíclicos.
 - Estudios de ribointerferencia (RNAi) y de localización subcelular.
 - Análisis de la unión de RBP33 a RNAs.
3. **Proteómica de *TbRBP33***
 - Estudio de modificaciones post-traduccionales de la proteína.
 - Aislamiento y caracterización de complejos multiproteicos.
4. **Ribonómica de *TbRBP33***
 - Análisis de la expresión diferencial del transcriptoma de tripanosomas procíclicos en ausencia y presencia de la proteína RBP33.
 - Identificación y caracterización del conjunto de mRNAs a los que se une RBP33 mediante secuenciación masiva de RNA.
 - Análisis del efecto de la ribointerferencia de RBP33 sobre mRNAs específicos asociados a la proteína.

Resultados



OBJETIVO 1: Dinámica de los complejos RNP de DRBD3 en respuesta a estrés en *Trypanosoma brucei*

5.1.1. El estrés inducido por arsenito y falta de nutrientes provoca la relocalización de DRBD3

Como describimos en la introducción, habíamos demostrado en nuestro laboratorio que la localización de DRBD3 es principalmente citoplasmática (Estevez, 2008). Sin embargo, DRBD3 no se distribuye de manera homogénea en el citoplasma y se acumula en la región perinuclear (Figura VI, A).

Expresamos la versión de la proteína DRBD3 con la secuencia TAP desde el locus endógeno utilizando una línea celular con el segundo alelo reemplazado por un marcador de resistencia (Figura VIII 1,A). Las células TAP-DRBD3/- alargaron su tiempo de generación en un 20% con respecto a los tripanosomas silvestres (*wt*) y mostraron la misma localización de DRBD3 (Figura VI, B). A continuación analizamos si la distribución de DRBD3 se alteraba por estrés oxidativo o nutricional. Como puede verse en la figura V.IC, DRBD3 se transloca al núcleo cuando los parásitos se incuban en presencia de arsenito de sodio. Este efecto es reversible, ya que las células permanecen vivas y DRBD3 vuelve al citoplasma cuando retiramos el arsenito del medio de cultivo. La mayoría pero no todo DRBD3 se detectó en el núcleo tras 3 horas de incubación con 50 μ M de arsenito. Mayores tiempos de incubación provocaban la aparición de células redondeadas pero no aumentaba la concentración de DRBD3 en el núcleo (Figura VIII.2). La relocalización de DRBD3 no fue debida únicamente a un mecanismo general de

transporte de RBPs al núcleo en condiciones de estrés oxidativo ya que ni las proteínas PABP1/PABP2 ni la RNA helicasa DHH1 se acumulaba en el núcleo tras cuatro horas de exposición con arsenito (Figura VIII.2)

Por otra parte, el estrés provocado por falta de nutrientes conduce a la acumulación de DRBD3 en gránulos citosólicos (Figura V.1, D). Además, tras la incubación de los tripanosomas en PBS durante 3 horas, las células permanecen viables y DRBD3 se localiza en regiones concretas que colocalizan con el marcador de gránulos de estrés SCD6 (Kramer et al, 2008). Estos resultados indican que la localización de DRBD3 en la célula puede regularse en respuesta a diferentes estímulos medioambientales.

5.1.2. DRBD3 se asocia con otras proteínas para formar un complejo multiproteico

Para determinar si existen proteínas asociadas a DRBD3 dentro de la célula, se utilizó el método TAP de purificación por afinidad en tándem junto con espectrometría de masas. TAP es un método que consiste en añadir un doble epítipo a una proteína y purificar las proteínas que se unen a ésta mediante dos cromatografías de afinidad consecutivas (Puig et al, 2001). Para ello se construyó el vector pGR139 (Ver M & M; Figura VIII.1,A) que expresa la proteína DRBD3 fusionada a la secuencia TAP (la secuencia TAP está formada por proteína A, una región de corte por proteasa TEV y un dominio de unión a calmodulina). Encontramos que DRBD3 se asocia a las proteínas de unión a poli(A) PABP1 y PABP2,

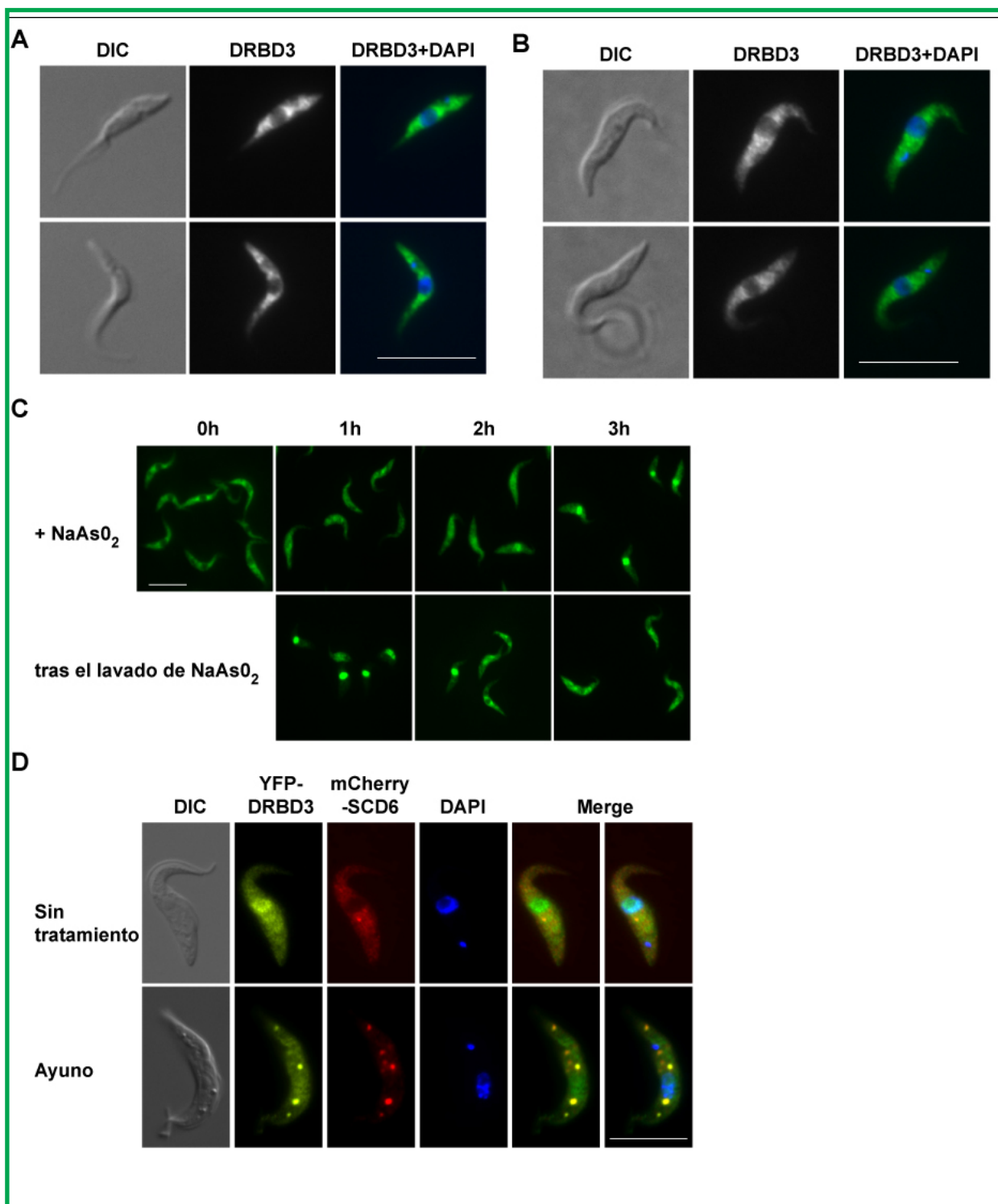


Figura V.1. Efecto del estrés por arsenito y por falta de nutrientes en la localización de DRBD3.

En los análisis de inmunofluorescencia se utilizó antisuero anti-DRBD3 en las células wt (**A**) o anti-proteína A en los tripanosomas que expresan TAP-DRBD3 (**B**). (**C**) El arsenito conduce a la acumulación de DRBD3 en el núcleo. Las células se incubaron hasta 3 horas en medio SDM-79 suplementado con 50 μ M de arsenito de sodio. Se tomaron alícuotas cada hora y se trataron para su análisis por inmunofluorescencia con anti-DRBD3. Posteriormente, los parásitos se lavaron con SDM-79 y volvieron a incubarse durante otras 3 horas. (**D**) DRBD3 se localiza en los gránulos de estrés en los tripanosomas incubados en medio sin nutrientes. Las células que co-expresaban YFP-DRBD3 y mCherry-SCD6 se lavaron dos veces en PBS y se incubaron en el mismo tampón durante 3 horas. Las barras indican 10 μ m.

a una RNA helicasa putativa (*Tb927.6.740*), a una proteína con dominio de dedo de zinc (*Tb927.9.4080*), a dos proteínas pequeñas nucleares U1 (U1-70K y U1C), a un factor de transporte nuclear putativo (*Tb927.10.2240*) y al menos a 20 proteínas ribosomales tanto de la subunidad mayor como de la subunidad menor (Figura V.2 y Tabla V.1).

Las proteínas PABP1 y 2 migran conjuntamente en una única banda con una movilidad de 65 kDa. Se detecta siempre un segundo poli péptido a aproximadamente 52 kDa que probablemente se genera por proteólisis (Figura V.2, A). Se interrumpió la unión a ambas PABPs cuando se incubó el extracto de proteínas con RNAsa A y RNAsa T1 antes del TAP (Figura V.2, A), indicando que la interacción de DRBD3 con PABP1 y PABP2 es dependiente de RNA.

Para confirmar la asociación de DRBD3 con algunas de las proteínas identificadas, generamos líneas celulares que expresaban estas proteínas fusionadas a TAP o PTP (Schimanski et al, 2005). PTP se trata de una secuencia similar a TAP en la que la región CBP ha sido sustituida por proteína C que se une con mucha afinidad al anticuerpo monoclonal HPC4 y se eluye al igual que CBP, con quelantes de cationes divalentes. Este cambio elimina problemas de ineficiencia que se han ido presentando en la cromatografía por afinidad a calmodulina. Se analizó la presencia de DRBD3 por inmunoblot tras la primera cromatografía de afinidad a IgG y el corte con TEV. Como control negativo se utilizó una línea celular que expresaba una versión con TAP de la exonucleasa RRP44 (Estevez et al, 2001). Pudimos confirmar las interacciones con PABP1, PABP2 y la RNA helicasa *Tb927.6.740*, con la proteína con dominio de dedo de zinc *Tb927.9.4080* y el U1A snRNP U1-70K (Figura V.2, C). La interacción de ambas PABPs se perdió tras el tratamiento con las RNAsas, tal y como se esperaba, mientras que la asociación con el resto de las proteínas del complejo resultó resistente a RNAsas (Figura V.2, D). La presencia de proteínas ribosomales en las

fracciones purificadas del TAP sugiere una asociación con los ribosomas. Sin embargo, no hemos sido capaces de detectar DRBD3 en ribosomas purificados con TAP o en polisomas (Figura V.2, C y Figura V.3)

5.1.3 El estrés afecta a la composición de los complejos de proteínas de DRBD3

Visto que el estrés afecta a la localización de DRBD3, quisimos determinar si la interacción de la proteína con las proteínas identificadas estaba también influenciada por cambios nutricionales u oxidativos. Los niveles de proteína DRBD3 se mantuvieron constantes cuando tratamos los tripanosomas con arsenito o cuando cambiamos el medio por PBS (Figura V.4). Tras el tratamiento con arsenito, PABP1 y PABP2 permanecieron asociados a DRBD3 al mismo nivel que en las células control. Sin embargo, la concentración del resto de proteínas que copurificaban con DRBD3 se vio reducida (Figura V.4, A). Para confirmar estas observaciones, los tripanosomas que expresaban TAP-DRBD3 se modificaron para expresar las versiones fusionadas a la secuencia Ty de PABP1 y PABP2 desde sus *loci* endógenos, y el anticuerpo monoclonal BB2, que reconoce específicamente al epítipo Ty (Bastin et al, 1996) se utilizó para visualizar estas proteínas por inmunoblot. Como podemos ver en la Figura V.4C, la cantidad de PABP1 y PABP2 asociada a DRBD3 es similar en presencia o ausencia de arsenito. Por el contrario, en el estrés inducido por falta de nutrientes, la cantidad de PABP2 (pero no la de PABP1) que copurificaba con DRBD3 se redujo, y la cantidad de HSP70 (*Tb927.7.710*) que copurificaba se incrementó (Figura V.4, B). Este efecto se observó en varias purificaciones independientes y se confirmó utilizando las versiones fusionadas a Ty- de ambas PABPs y de HSP70 (Figura V.4, D). Los cambios observados en la cantidad de PABP2 y HSP70 asociados a DRBD3 no se debieron a las variaciones de los niveles totales de estas proteínas, ya que sus concentraciones

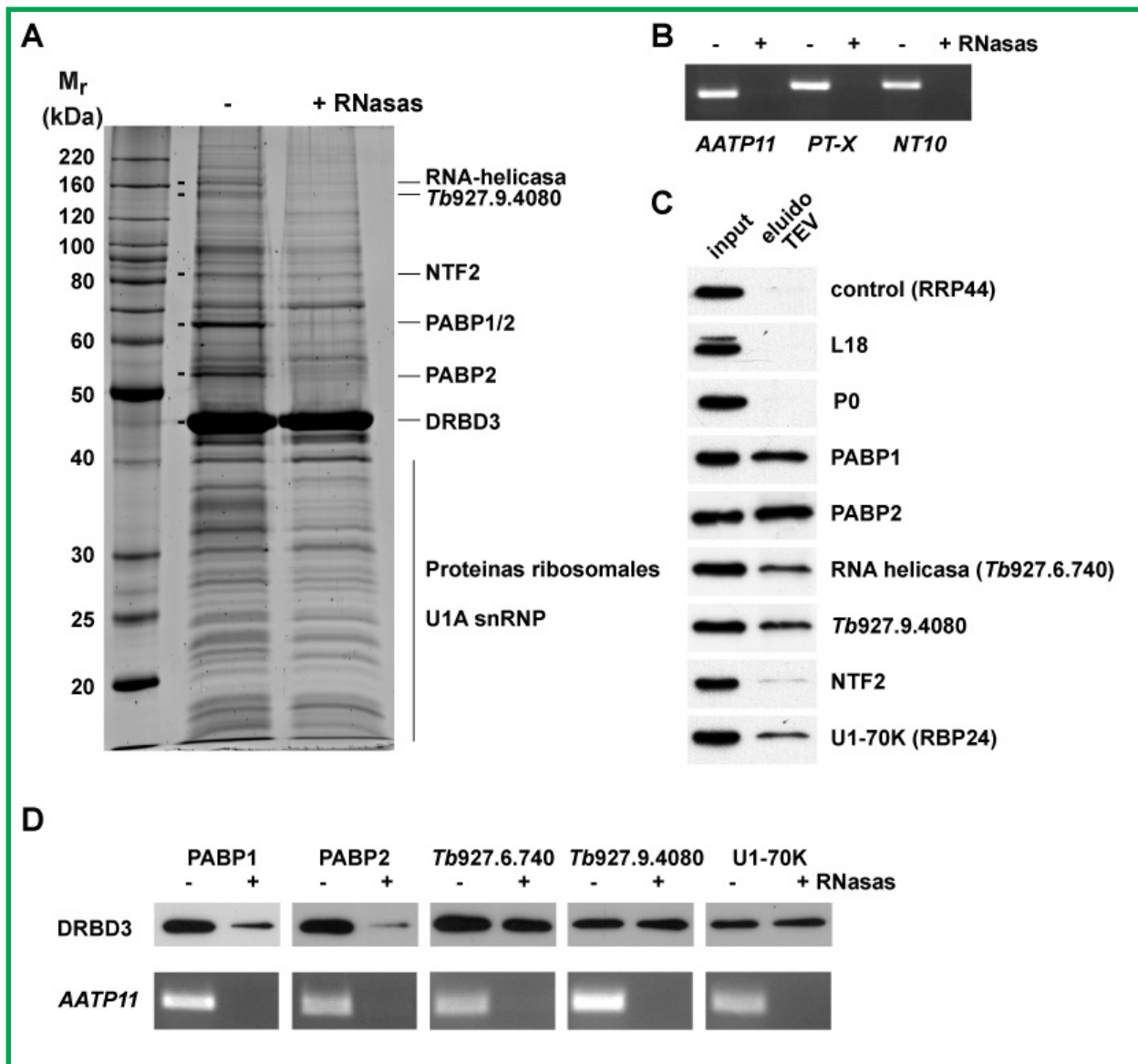


Figura V.2. Identificación de las proteínas asociadas a DRBD3 por purificación por afinidad en tándem (TAP)

(A) Se obtuvieron extractos de proteínas de células que expresaban TAP-DRBD3 desde el locus endógeno. Dividimos el lisado en dos partes iguales, y tratamos una de ellas con RNAsa A y T1. Ambas fracciones fueron procesadas en paralelo en el TAP como se describe en M y M. (B) La eficacia del tratamiento con RNAsas se comprobó por RT-PCR del material purificado tras la incubación con la proteasa TEV, utilizando oligonucleótidos específicos para los transcritos que se unen a DRBD3 según se ha publicado en (Estevez, 2008). (C) Las interacciones entre proteínas se confirmaron al generar líneas que expresaban versiones con secuencias TAP o PTP fusionadas a algunas de las proteínas identificadas. Los ribosomas fueron purificados utilizando las proteínas ribosomales L18 o P0 como cebos. (D) Para comprobar si las interacciones entre proteínas eran dependientes de RNA, los lisados de las células que expresaban las proteínas con las versiones fusionadas a TAP o PTP se trataron con RNAsas A y T1 como se ha indicado anteriormente. Se comprobó la presencia de DRBD3 en los eluidos de TEV como en (C), y la eficacia del tratamiento de las RNAsas se comprobó por RT-PCR utilizando oligonucleótidos específicos para el transcrito AATP11 que une específicamente DRBD3, como se ha explicado en (B).

Tabla V.1. Proteínas asociadas a DRBD3

Systematic name	Description of gene product	kDa	Score
Tb927.10.1510	NOT1	259,1	74
Tb927.9.4080	Protein with Zn finger domain	142,1	146
Tb927.6.740	RNA helicase	139,1	150
Tb927.6.3750	HSP70	71,5	108
Tb927.10.2240	Protein with NTF2 domain	66,4	76
Tb927.9.9290	PABP1	63,0	99
Tb927.9.10770	PABP2	62,1	107
Tb927.4.1790	Ribosomal protein L3	54,4	58
Tb927.1.2340	Alpha-tubulin	49,8	91
Tb927.1.2330	Beta-tubulin	49,7	88
Tb927.10.2100	TEF1	49,1	50
Tb927.3.5050	Ribosomal protein L4	41,9	61
Tb927.9.8740	DRBD3	37,0	129
Tb927.11.2060	Ribosomal protein P0	34,6	54
Tb927.8.4830	RBP24 U170K	31,7	95
Tb927.8.1330	Ribosomal protein L7a	30,9	66
Tb927.11.3590	Ribosomal protein S4	30,6	131
Tb927.9.6070	Ribosomal protein S3	30,4	36
Tb927.10.3940	Ribosomal protein S3a	29,4	105
Tb927.5.1110	Ribosomal protein L2	28,3	88
Tb927.7.1730	Ribosomal protein L7	27,7	118
Tb927.11.10790	Ribosomal protein SA	27,6	71
Tb927.3.3320	Ribosomal protein L13	25,4	55
Tb927.9.8420	Ribosomal protein L10	24,7	84
Tb927.7.5180	Ribosomal protein L23a	24,7	66
Tb927.10.13500	Ribosomal protein L10a	24,6	37
Tb927.9.3990	Ribosomal protein S7	23,8	45
Tb927.10.12330	ZC3H34	22,4	57
Tb927.9.7590	Ribosomal protein L11	22,4	59
Tb927.8.1110	Ribosomal protein S9	22,1	36
Tb927.10.2120	U1A small nuclear ribonucleoprotein	21,8	55
Tb927.6.720	Ribosomal protein L14	21,4	35
Tb927.10.560	Ribosomal protein S11	20,1	44
Tb927.10.5370	Ribosomal protein S10	19,3	20
Tb927.4.1860	Ribosomal protein S19	18,8	60

permanecieron similares antes y después del tratamiento (input). Para asegurarnos de estos resultados, utilizamos líneas celulares que expresaban las versiones de PABP1, PABP2 y HSP70 fusionadas a TAP o PTP, y se analizó la cantidad de DRBD3 unida a estas proteínas en condiciones de estrés nutricional. Como se

esperaba, la cantidad de DRBD3 que copurificó con PABP2 se vio reducida en los tripanosomas en condiciones de falta de nutrientes, mientras que la cantidad de DRBD3 asociada a HSP70 se incrementó (Figura V.4, E). Aunque SCD6 colocalizó con DRBD3 en los gránulos de estrés (Figura V.1), no pudimos detectarla en la

purificación por TAP.

5.1.4 DRBD3 permanece unida a los mensajeros que regula en condiciones de estrés

Como hemos visto anteriormente, el

estrés regula tanto la localización como las proteínas asociadas a DRBD3. Debido a que DRBD3 une un conjunto específico de mRNAs y los estabiliza (Estevez, 2008; Stern et al, 2009), analizamos si DRBD3 permanece unido a estos mRNAs en condiciones de estrés. Se midieron los niveles de tres de los mRNAs que se asocian a DRBD3 tras la inmunoprecipitación

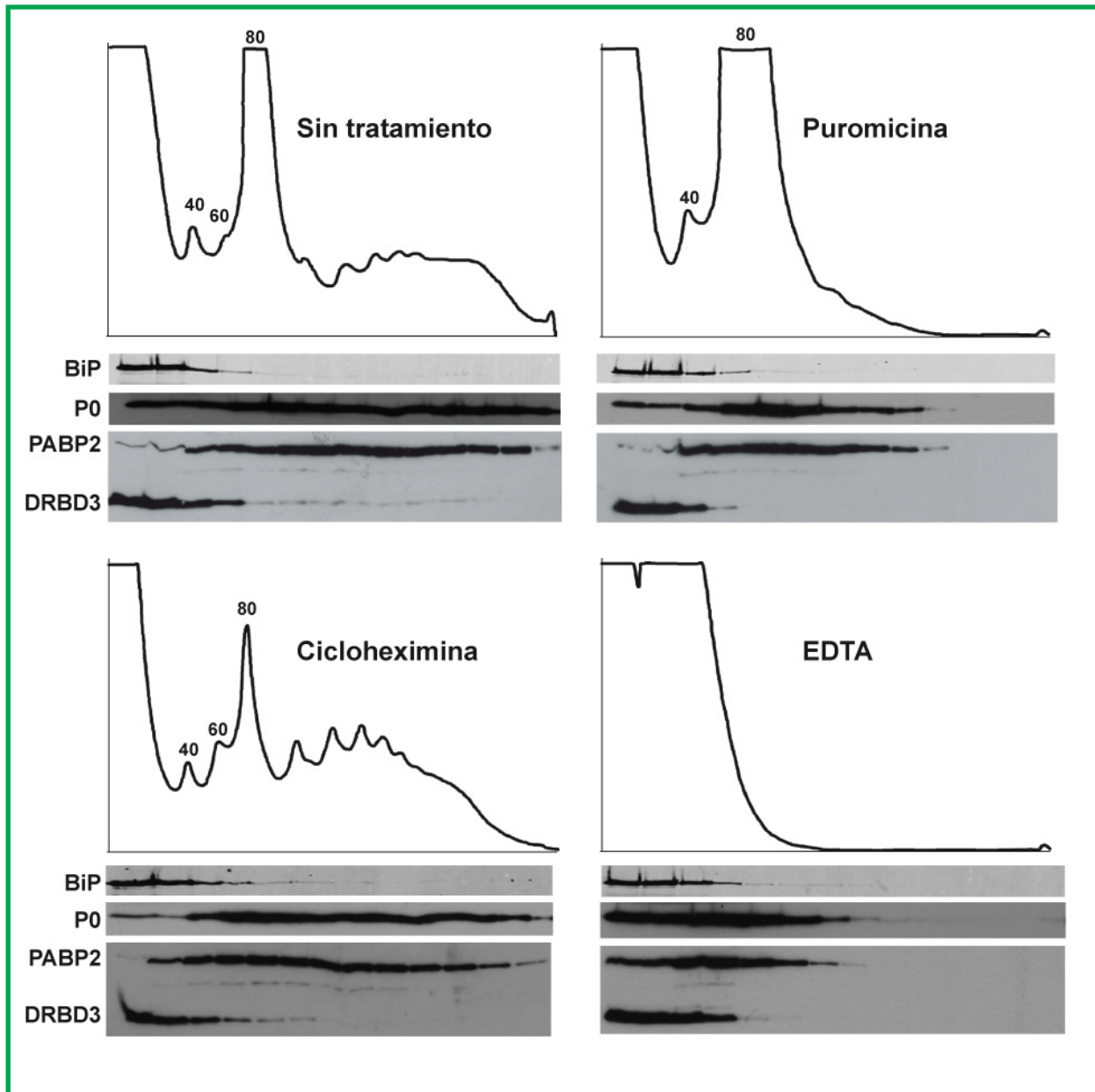


Figura V.3. DRBD3 no se asocia a polisomas

Se utilizaron lisados de tripanosomas para su análisis por separación por gradiente de sacarosa en ausencia o en presencia de inhibidores de la traducción. Se midió la absorbancia a 254 nm durante el fraccionamiento. Las fracciones se analizaron por inmunoblot utilizando anti-DRBD3. La distribución de DRBD3 en el gradiente se comparó con la distribución de proteínas conocidas asociadas a polisomas (proteínas ribosomales P0 y PABP2) y proteínas no asociadas a polisomas (BiP).

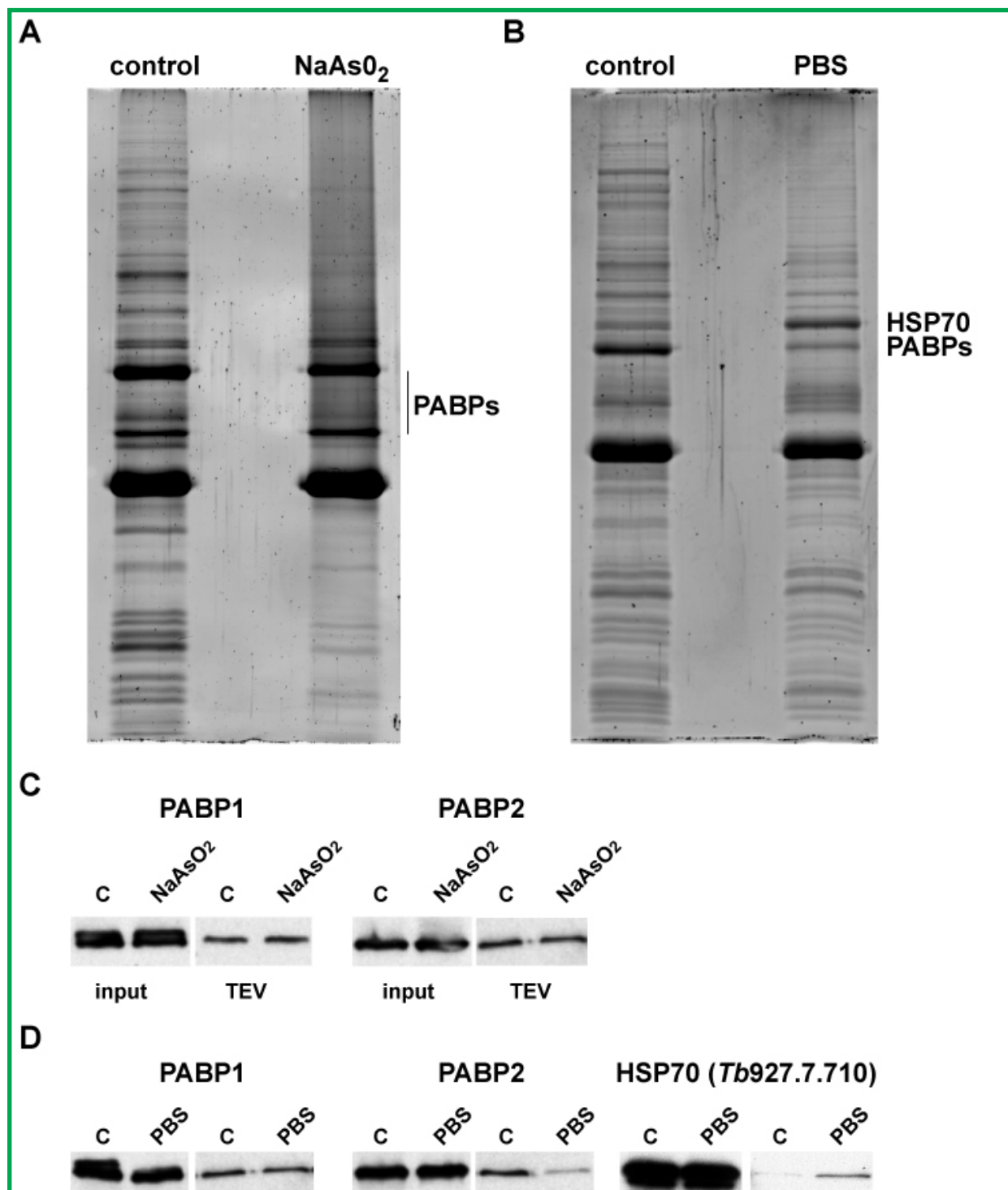


Figura V.4. El estrés por arsenito o por falta de nutrientes afecta a la composición del complejo de DRBD3. El complejo de proteínas asociadas a DRBD3 se purificó mediante TAP de células tratadas durante 3 horas con 50 μ M de arsenito de sodio (A) o de células incubadas durante 3 horas en medio sin nutrientes (B) y se compararon con las purificaciones TAP llevadas a cabo con cantidades equivalentes de lisados de tripanosomas crecidos en condiciones normales (Control). (C) Se generaron líneas celulares que expresaban TAP-DRBD3 y las versiones fusionadas a 4xTy de PABP1 o PABP2. Se analizó la presencia de las PABPs por inmunoblot en los lisados con y sin arsenito tras la cromatografía con IgG y el corte con TEV. (D) Se analizó de la misma manera que en (C) la asociación de Ty-PABP1, Ty-PABP2 y Ty-HSP70 con DRBD3 en condiciones de ayuno. (E) Se generaron líneas celulares que expresaban las versiones fusionadas a TAP o PTP de PABP1, PABP2 y HSP70. Se analizó la cantidad de DRBD3 que copurificaba con estas proteínas en condiciones de ayuno tras el corte con TEV, utilizando antisuero anti-DRBD3.

de los complejos mRNA-proteína de DRBD3 y RT-PCR cuantitativa. Como puede verse en la Figura V.5, los mRNAs que codifican AATP11 (transportador de aminoácidos 11), PT-X (transportador de pteridinas del cromosoma X) o NT10 (transportador de nucleobases 10) permanecieron unidos a DRBD3 en condiciones de estrés nutricional o tras el

tratamiento con arsenito. Los niveles totales de *AATP11* y *PT-X*, como pudimos ver con un análisis de northern blot, disminuyeron $1,7\pm 0,2$ veces y $2,3\pm 0,4$ veces, respectivamente, tras la incubación con arsenito durante 3 horas ($n=3$) pero permanecieron sin cambios ($1,2\pm 0,1$ y $1,1\pm 0,1$ veces) en condiciones de estrés nutricional (Figura V.5, B).

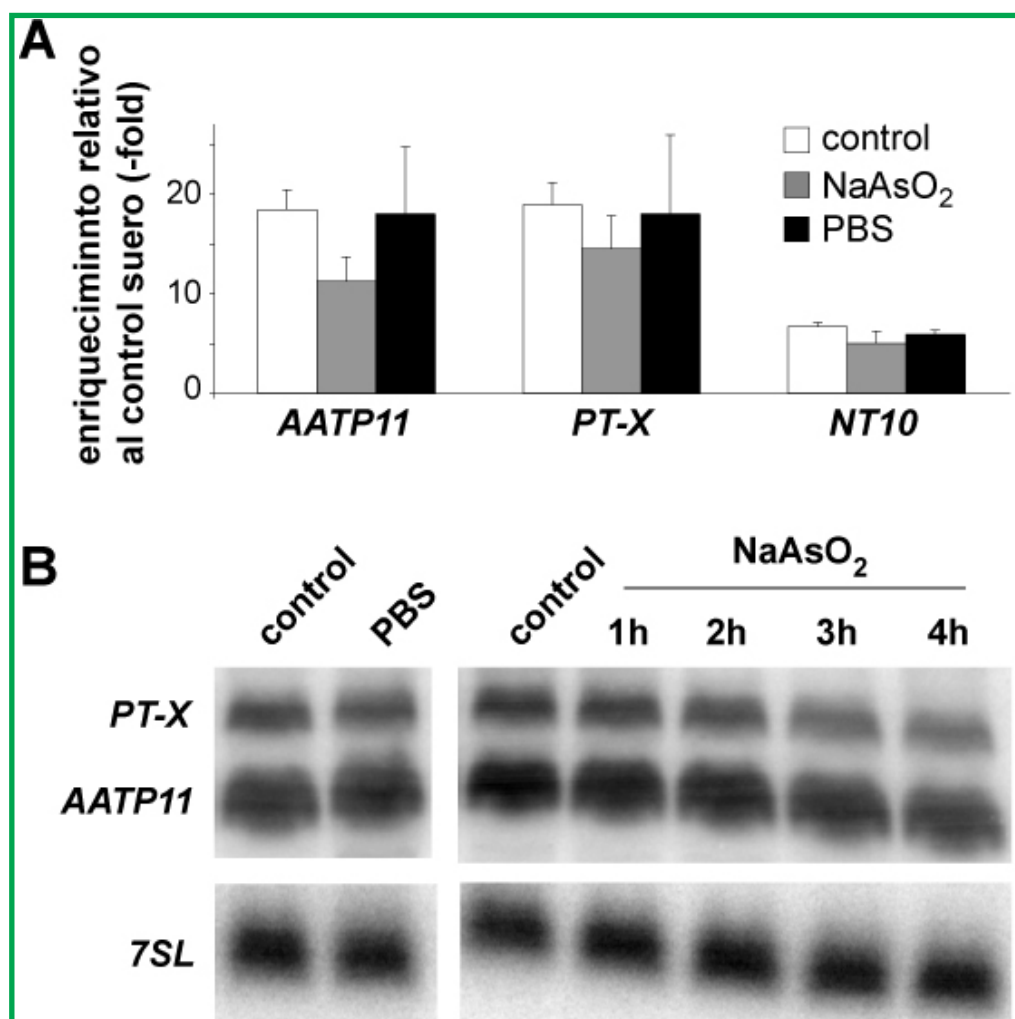


Figura V.5. Los transcritos asociados a DRBD3 continúan unidos a la proteína en condiciones de estrés.

(A) Se analizó la asociación de los mRNAs regulados por DRBD3 por RT-PCR cuantitativa tras la inmunoprecipitación de los complejos ribonucleoproteicos con DRBD3 utilizando antisuero anti-DRBD3 en cultivos crecidos en condiciones normales (control) o en condiciones de estrés. El enriquecimiento de los transcritos específicos se calculó tras compararse con inmunoprecipitaciones control llevadas a cabo con suero de conejo normal y normalizando los niveles respecto al RNA del *7SL*. Los experimentos se llevaron a cabo al menos cuatro veces. (B) Los niveles totales de *AATP11* y *PT-X* en las células control y en las células estresadas se visualizaron por northern blot, utilizando sondas radioactivas específicas (Estevez, 2008). Las muestras de RNA se obtuvieron de las células tras 3 horas incubadas en PBS o tras 1-4 horas en presencia de 50 μ M de arsenito de sodio.

OBJETIVO 2: Caracterización de la proteína RBP33

5.2.1 Caracterización molecular de la proteína de *Trypanosoma brucei* RBP33

RBP33 es una proteína de 318 aminoácidos con un tamaño teórico de 34 kDa según los resultados obtenidos *in silico* con el programa

Compute pI/Mw tool de Expasy (http://web.expasy.org/compute_pi/). En la secuencia se observan dos regiones muy parecidas a dominios proteicos conocidos. Los 70 aminoácidos de la región N-terminal muestran similitud con el dominio de unión a RNA RRM (dominio PROSITE PS50102) (Figura V.1, cuadro rosa).



Figura V.6. Alineamiento de las secuencias de RBP33 de los tripanosomátidos *Trypanosoma brucei* (Tb927.8.990), *Leishmania major* (LmjF.07.0802) y *Trypanosoma cruzi* (Tc00.1047053508569.90/TcCLB.508.569.90).

El alineamiento se realizó con el programa ClustalW (<http://www.genome.jp/tools/clustalw>). Se identificaron varios dominios funcionales utilizando el software SCANPROSITE de EXPASY (<http://prosite.expasy.org>): en

rosa, se indica el dominio de unión a RNA, RRM (*RNA Recognition motif*); en azul, se indica la secuencia de localización nuclear NLS (*Nuclear Localization Signal*); en verde, se indican las regiones más conservadas de la mitad carboxilo. La línea roja indica la parte de la secuencia de la proteína que se utilizó para desarrollar anticuerpos policlonales frente a RBP33 recombinante.

El dominio RRM es uno de los dominios de unión a RNA más comunes encontrados en las proteínas de unión a RNA eucariotas. A continuación se ha identificado una posible señal de localización nuclear NLS (Figura V.6, cuadro azul). Tras realizar una búsqueda por similitud de secuencias utilizando el buscador BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>), se concluyó que la mitad carboxilo de la proteína no tiene parecido con ninguna secuencia proteica conocida que no sea de tripanosomátidos. En esta parte de la secuencia se observan varias regiones conservadas entre las distintas especies (Figura V.6, cuadros verdes) donde se observa la presencia de tres

cisteínas que están demasiado separadas para formar un dedo de zinc clásico. Estos datos indican que RBP33 se trata de una proteína única en tripanosomátidos.

Se desarrollaron anticuerpos policlonales de conejo frente a la región C-terminal de la proteína RBP33, concretamente tomando la región comprendida entre los aminoácidos 105 y 318 (Figura V.6, línea roja) para evitar una reacción cruzada con otras proteínas que posean el dominio RRM. Para ello, se expresó y se purificó la parte C-terminal de RBP33 fusionada a GST en *E. coli* (ver Materiales y Métodos).

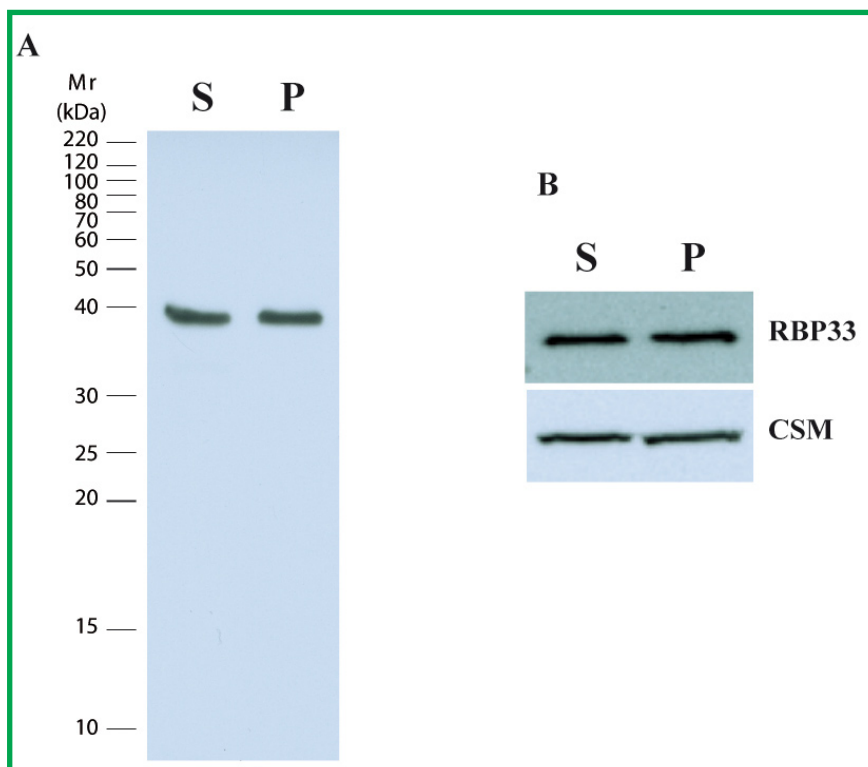


Figura V.7. Expresión de *TbRBP33* en tripanosomas sanguíneos y procíclicos.

(A) Inmunoblot con los anticuerpos policlonales desarrollados frente a la región C-terminal de *TbRBP33*. En cada pocillo se utilizó el lisado de 10^6 tripanosomas procíclicos (P) y sanguíneos (S). La proteína migra en geles desnaturizantes cerca del marcador de 40 kDa. (B) RBP33 se expresa por igual en tripanosomas procíclicos y sanguíneos. Como control se utilizaron anticuerpos frente a la proteína citosólica *TbCSM* (Guerra-Giraldez et al, 2002).

El antisuero reconoce una única banda de aproximadamente 40 kDa en extractos celulares de tripanosomas procíclicos y sanguíneos (Figura V.7, A). Los niveles endógenos de la proteína son similares en ambas formas de vida (Figura V.7, B).

Para conocer la distribución celular

de RBP33 se utilizó el antisuero policlonal purificado por afinidad según se indica en M y M. La microscopía de inmunofluorescencia de parásitos procíclicos y sanguíneos fijados indica que la proteína RBP33 se localiza predominantemente en el núcleo, colocalizando con la señal DAPI nuclear (Figura V.8).

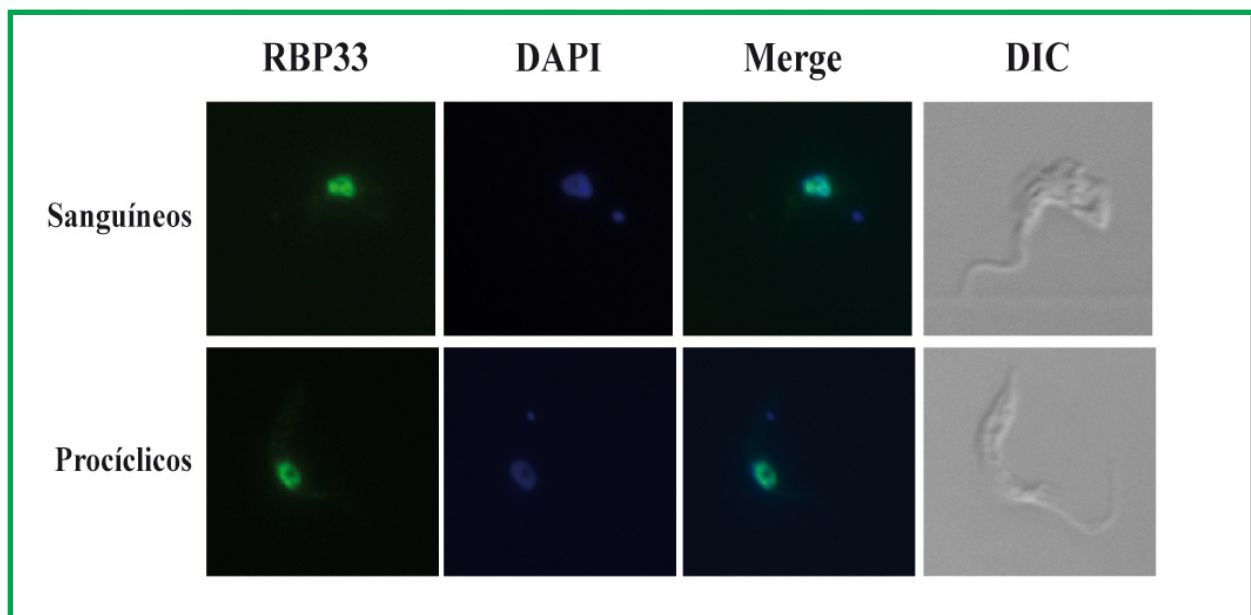


Figura V.8. Expresión y localización de RBP33 en la célula

Detección por inmunofluorescencia de la proteína RBP33 de tripanosomas sanguíneos y procíclicos. Se utilizaron anticuerpos policlonales específicos desarrollados frente a la parte C-terminal de la proteína, purificados posteriormente por afinidad. Se utilizó un anticuerpo conjugado con el fluoróforo Alexa488 como secundario. El marcaje de los núcleos se realizó con la tinción DAPI, incluida en la solución de montaje.

5.2.2 El silenciamiento de la proteína RBP33 conduce a la muerte celular del parásito.

La expresión de la proteína RBP33 se silenció *in vivo* en tripanosomas procíclicos y sanguíneos produciendo de manera inducible RNA de doble cadena correspondiente a la mitad carboxilo terminal de la proteína. Tras 48 horas de la inducción con tetraciclina, se observó una reducción acusada en los niveles del mRNA de RBP33 (Figura V.9, A). El análisis por inmunoblot demostró que los niveles de la proteína disminuyen hasta hacerse prácticamente indetectables en ambas formas de vida (Figura V.9, B). La señal de inmunofluorescencia de la proteína RBP33

también descendió hasta niveles basales (Figura V.9, C). La ausencia de la proteína RBP33 inhibe el crecimiento tanto de tripanosomas sanguíneos como de tripanosomas procíclicos (Figura V.9, D). Como puede verse en los gráficos, las líneas de RNAi exhiben un crecimiento lento y tras dos días de inducción del silenciamiento, los parásitos dejan de crecer y mueren. Estos resultados indican que RBP33 es una proteína esencial para la supervivencia de *T. brucei* sanguíneos y procíclicos.

5.2.3 RBP33 es una proteína de unión a RNA

Las proteínas con dominios RRM están involucradas en un gran número de procesos a través de la interacción específica con el RNA

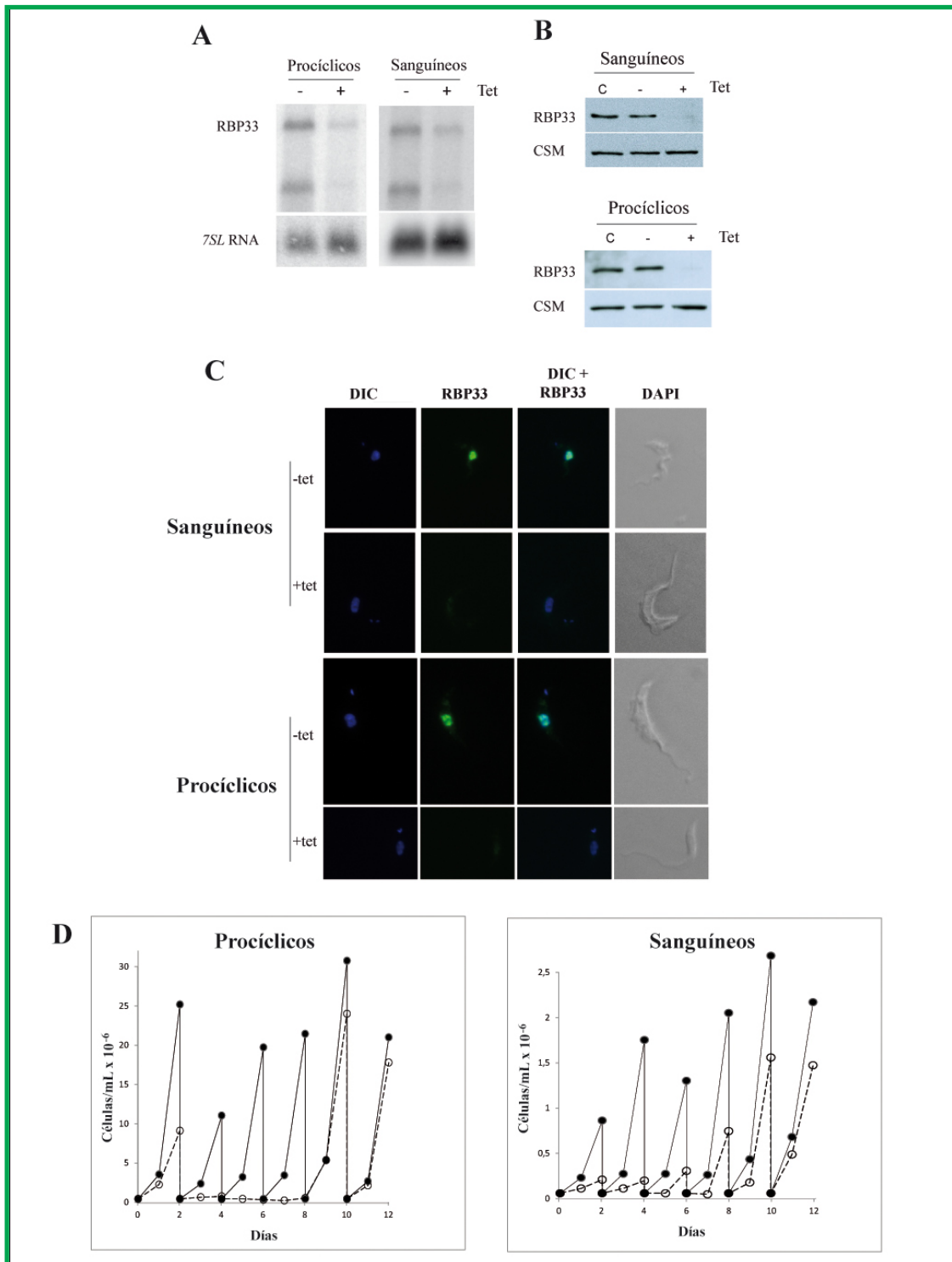


Figura V.9: Silenciamiento de la expresión de RBP33 mediante RNAi.

Los niveles del mRNA (A) y proteína (B) RBP33 se analizaron en tripanosomas sanguíneos y procíclicos transfectados con el plásmido pGR70, que expresa RNA de doble cadena dirigido a silenciar la expresión de RBP33 de manera inducible al añadir tetraciclina en el medio de cultivo a una concentración de 1 mg/mL. El Northern blot se realizó con muestras de RNA total obtenidas de tripanosomas cultivados en presencia (+) o ausencia (-) de tetraciclina. Se utilizaron 15 µg de RNA por pocillo y la membrana se hibridó con una sonda dirigida a los primeros 310 nucleótidos de la secuencia de RBP33. Se usó el RNA 7SL como control de carga. Para el inmunoblot se usaron 1 millón de células por pocillo. RBP33 se detectó mediante anticuerpos específicos. La proteína CSM se usó como control de carga. (C) Detección por inmunofluorescencia de la proteína RBP33 en cultivos en presencia (+) o ausencia (-) de tetraciclina tras 48 horas de incubación. (D) Curvas de crecimiento

de los cultivos de tripanosomas sanguíneos y procíclicos. Con una línea continua y un círculo negro se indican los cultivos crecidos en ausencia de tetraciclina; Con una línea discontinua y un círculo blanco se indican los cultivos con 1mg/mL de tetraciclina para inducir el silenciamiento. Los cultivos de tripanosomas sanguíneos se iniciaron con 5×10^4 células/mL mientras que los cultivos procíclicos se iniciaron con 5×10^5 células/mL, y se fueron diluyendo a estos mismos niveles cada dos días.

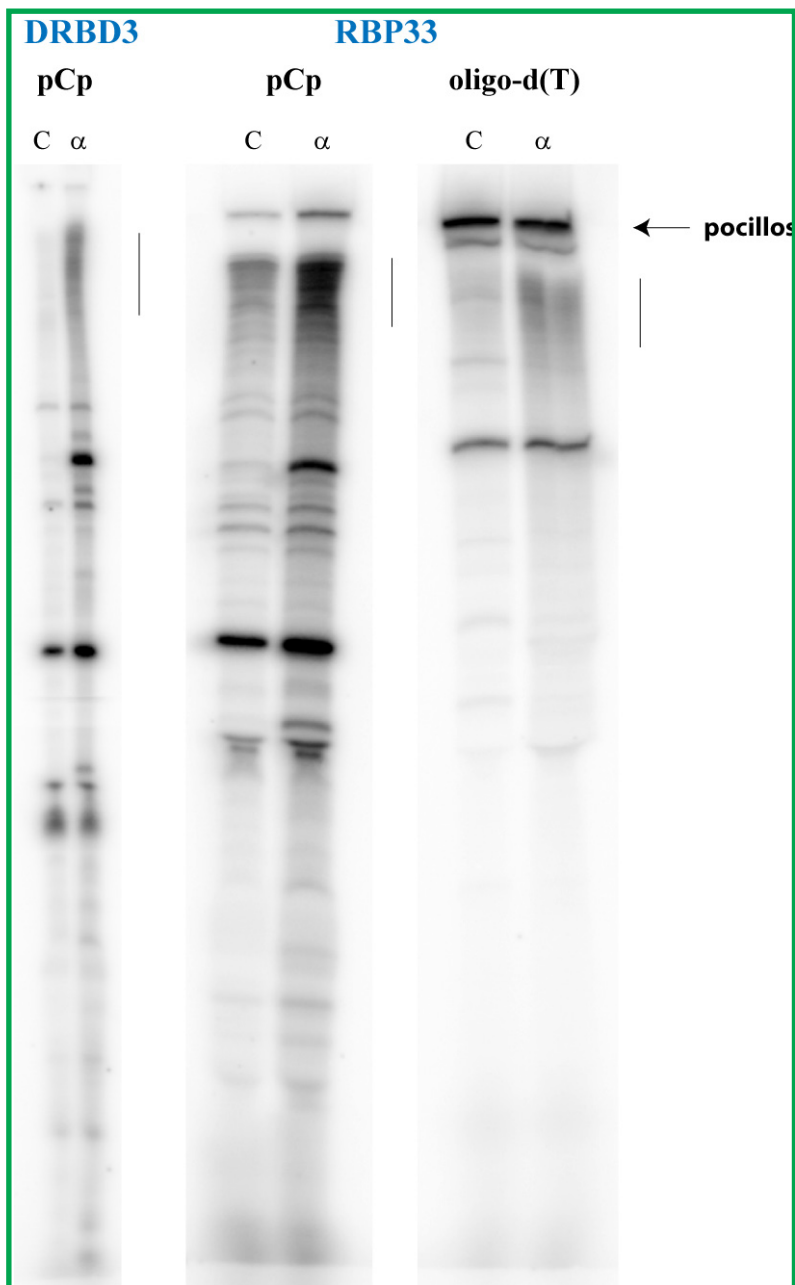


Figura V.10: **RBP33 es una proteína de unión a RNA**

La detección de los posibles RNAs asociados a RBP33 se llevó a cabo mediante inmunoprecipitación con anticuerpos específicos (α) y se comparó con una inmunoprecipitación control realizada con IgGs de conejo (C). Se incluyó la inmunoprecipitación de la proteína de unión a RNA DRBD3 como control positivo. Los RNAs inmunoprecipitados se marcaron con pCp en el extremo 3' (carriles pCp) o se retrotranscribieron con oligo-d(T) en presencia de dCTP marcado radiactivamente. Posteriormente, se resolvieron en geles PAGE-Urea al 6% y se detectaron mediante phosphorimager. La flecha indica la posición de los pocillos. La línea lateral señala la región en la que se esperan que migren los mRNA.

(De Gaudenzi et al, 2005), pero un conjunto de RRM's pueden además interaccionar con otras proteínas (Kielkopf et al, 2004). Para determinar si RBP33 es realmente una proteína de unión a RNA llevamos a cabo la irradiación con U.V. de los tripanosomas *in vivo*, con lo que las proteínas de unión a RNA se unirán de forma covalente a los transcritos que tengan adheridos. Posteriormente los extractos proteicos se dividen en dos partes iguales: una parte se utiliza para llevar a cabo la inmunoprecipitación (IP) con anticuerpos anti-RBP33 de la proteína RBP33 unida a sus mRNAs específicos (Figura V.16) y la otra parte como control negativo de la inmunoprecipitación utilizando IgGs de conejo. Posteriormente, las proteínas se degradan con proteinasa K. El eluido final contiene aquellos RNAs que se unen de forma específica a RBP33. Utilizamos la inmunoprecipitación paralela de DRBD3 como control positivo, ya que sabíamos por estudios previos en nuestro laboratorio que DRBD3 se une a un conjunto específico de RNAs (Estevez, 2008).

Para visualizar los sustratos de RBP33 y DRBD3, por una parte se marcaron los RNAs

en 3' con pCp (que marca todos los RNAs de la muestra (Figura V.10, carril pCp) y por otra parte, los RNAs de una segunda réplica de la inmunoprecipitación con anti-RBP33 y su correspondiente control se retrotranscribió con oligo-d(T) (que se une a los mRNAs) en presencia de dCTP marcado radiactivamente (Figura V.10, columna oligo-d(T)). Las muestras se cargaron en un gel de poliacrilamida desnaturante al 6% y se detectaron mediante *phosphorimager*. Los resultados obtenidos indican un enriquecimiento específico de transcritos en las muestras de las IP de RBP33 y DRBD3 respecto a las muestras control con IgG de conejo. De entre los transcritos coimmunoprecipitados con RBP33, se observan algunos RNAs concretos con diferentes tamaños pero principalmente el enriquecimiento es mayor en la región de los mRNAs. De hecho, en los pocillos señalados "oligo-d(T)" esta diferencia se ve incrementada respecto a las muestras control. Estos datos nos sugieren que la proteína RBP33 se asocia a un conjunto específico de transcritos, principalmente poliadenilados.

OBJETIVO 3: Proteómica de RBP33

5.3.1 La proteína RBP33 se encuentra fosforilada *in vivo*

La observación detallada de la secuencia de la proteína RBP33 revela la existencia de numerosos residuos de serinas, treoninas y tirosinas que pueden ser fosforilados por las quinasas en la señalización celular en organismos eucariotas. Para comprobar si la proteína RBP33 sufre este tipo de modificación post-traducciona, en primer lugar se realizó un análisis *in silico* para predecir los posibles sitios de fosforilación en la secuencia. Para ello, se calcularon las probabilidades de fosforilación de todos los residuos serina, treonina y tirosina con el programa web de predicción NetPhos (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos>). De todos

los residuos posibles, 18 serinas, 2 treoninas y 4 tirosinas obtuvieron un valor de probabilidad de fosforilación por encima de 0,5 y por tanto, esto indica que son residuos que pueden estar siendo fosforilados en la proteína (Figura V.11, A). Para confirmar la fosforilación de la proteína RBP33, se llevó a cabo el estudio de la alteración de la movilidad electroforética de la misma en geles de acrilamida con Mn²⁺-Phostag. Phos-tagTM es una molécula que se une de forma específica a iones fosforilados, de forma que en geles desnaturantes SDS-PAGE se une a los grupos fosfato de las proteínas fosforiladas reduciendo su velocidad de migración en el gel y permitiendo su separación de las proteínas no fosforiladas (Kinoshita et al, 2006). Se tomaron extractos celulares de tripanosomas sanguíneos y procíclicos y se separaron en dos muestras,

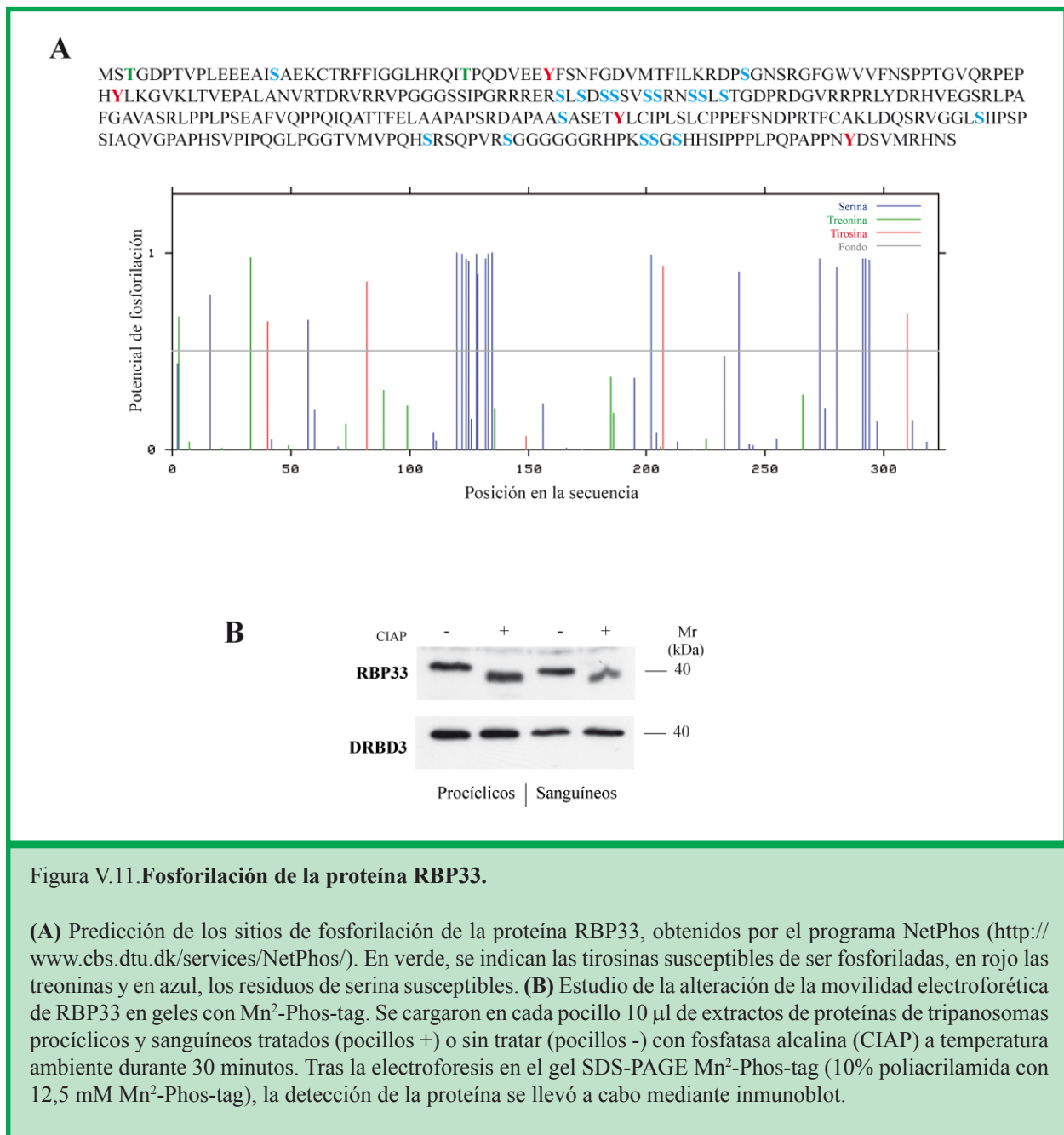


Figura V.11. Fosforilación de la proteína RBP33.

(A) Predicción de los sitios de fosforilación de la proteína RBP33, obtenidos por el programa NetPhos (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/>). En verde, se indican las tirosinas susceptibles de ser fosforiladas, en rojo las treoninas y en azul, los residuos de serina susceptibles. (B) Estudio de la alteración de la movilidad electroforética de RBP33 en gels con Mn²-Phos-tag. Se cargaron en cada pocillo 10 µl de extractos de proteínas de tripanosomas procíclicos y sanguíneos tratados (pocillos +) o sin tratar (pocillos -) con fosfatasa alcalina (CIAP) a temperatura ambiente durante 30 minutos. Tras la electroforesis en el gel SDS-PAGE Mn²-Phos-tag (10% poliacrilamida con 12,5 mM Mn²-Phos-tag), la detección de la proteína se llevó a cabo mediante inmunoblot.

una tratada con inhibidores de fosfatasas, para evitar que durante el periodo de manipulación las proteínas fueran desfosforiladas por proteínas fosfatasas del extracto, y otra con fosfatasa alcalina (CIAP). Se utilizó como control la proteína DRBD3, que no se fosforila. Como puede verse en la figura V.11B, la proteína RBP33 sufre un retraso en el gel de acrilamida-Phos-tagTM respecto a las muestras tratadas con CIAP, tanto en tripanosomas sanguíneos como en tripanosomas procíclicos; sin embargo, no hay alteración de la movilidad en el caso de la proteína DRBD3, que no sufre este tipo de

modificación posttraduccional. Estos resultados indican que la proteína RBP33 se encuentra fosforilada en ambas formas de vida.

5.3.2 Generación de líneas celulares que expresan TAP-RBP33

Para determinar si existen proteínas asociadas a RBP33 dentro de la célula, se utilizó el método TAP. Para ello se construyó el vector pGR149 (Ver M & M; Figura V.12,A) que expresa la proteína RBP33 fusionada a la

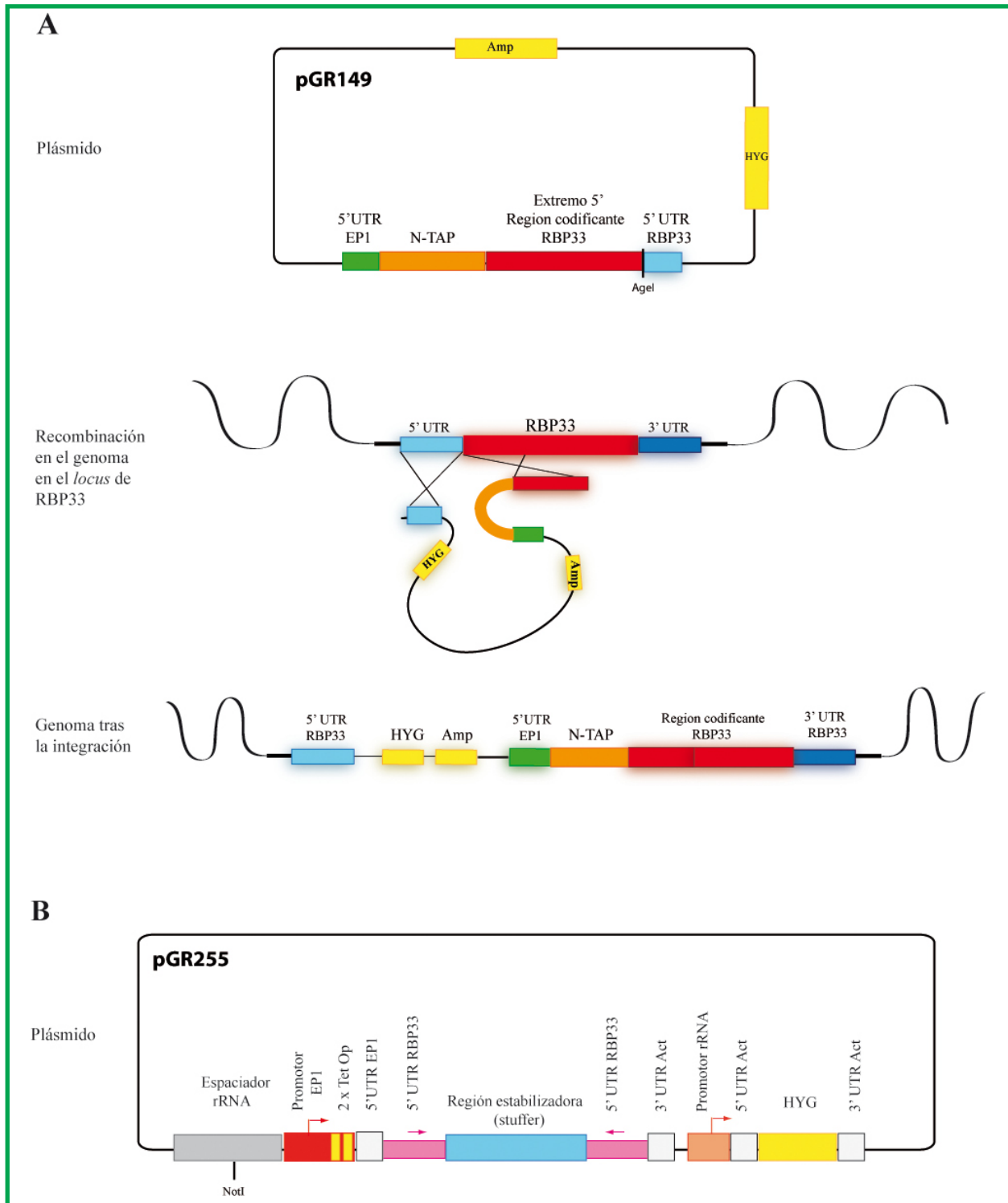


Figura V.12.

(A) Diagrama del plásmido de integración pGR149 utilizado para expresar desde el *locus* endógeno la proteína RBP33 fusionada a la secuencia TAP en el extremo N-terminal. El plásmido se integra entre la 5' UTR de RBP33 y el principio de la secuencia codificante del mismo gen. UTR: regiones no codificantes; Amp: resistencia a ampicilina; Hyg: resistencia a higromicina. (B) Diagrama del plásmido pGR255 derivado de pGR19 (Clayton et al., 2005), utilizado para inducir el silenciamiento de la proteína RBP33. Tet Op: Operador de tetraciclina; EP1: proclina EP1; Act: actina.

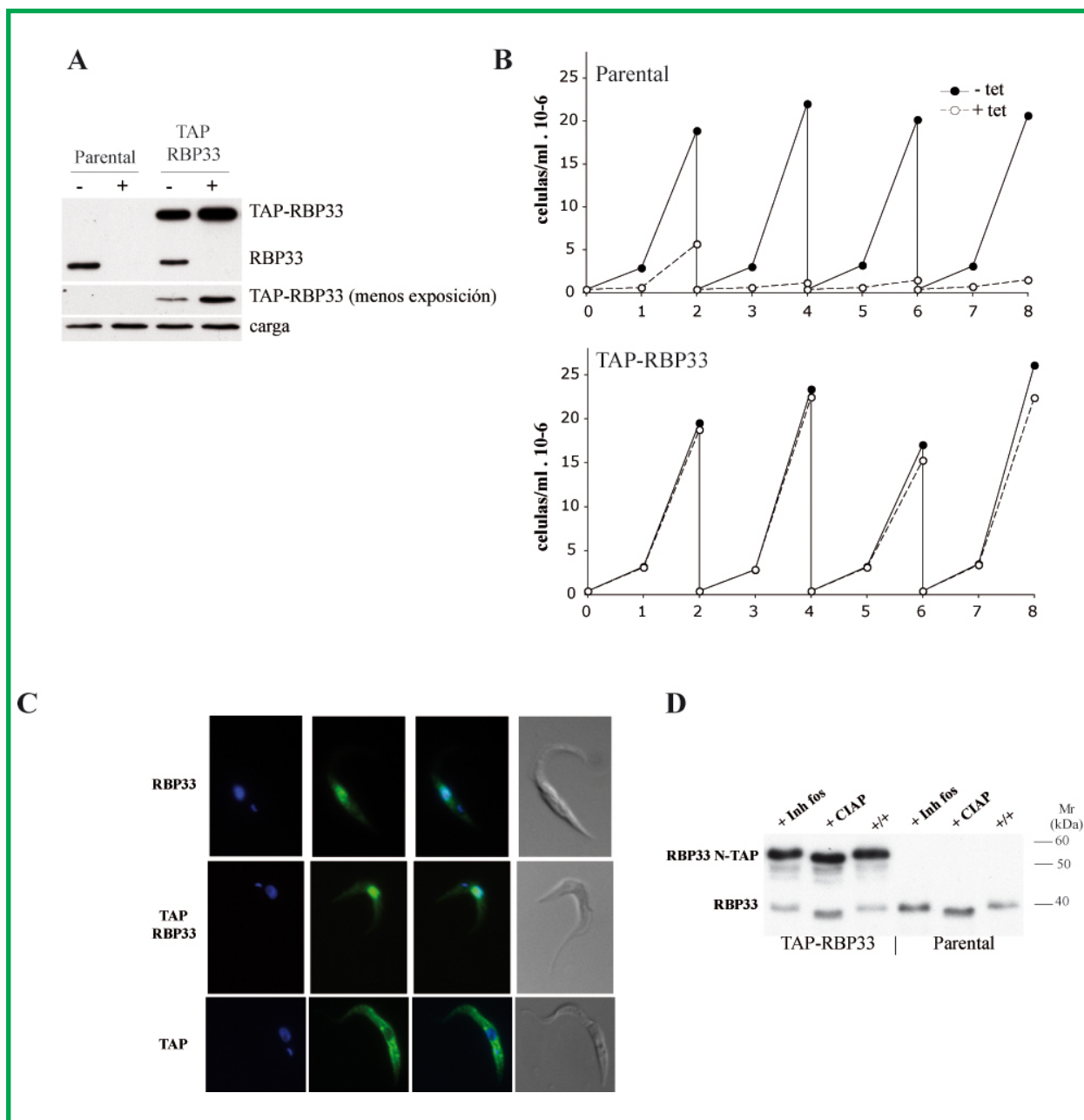


Figura 13. Expresión en tripanosomas de la versión de la proteína TbRBP33 con la secuencia de purificación por afinidad TAP en la región N-terminal de la proteína.

(A) Inmunoblot de la línea celular parental y de la línea celular que expresa la proteína recombinante TAP-RBP33. (+) indica el silenciamiento de la proteína endógena en ambas líneas tras 48 horas de incubación en presencia de 1mg/mL de tetraciclina. (B) Curvas de crecimiento de ambas líneas en presencia (+) o ausencia (-) de tetraciclina. La presencia de la proteína recombinante es suficiente para el adecuado crecimiento de los cultivos aún en ausencia de la proteína nativa. (C) Inmunofluorescencias que muestran la localización celular de la proteína endógena RBP33, del péptido TAP, o de la proteína recombinante TAP-RBP33. (D) Estudio de la alteración de la movilidad electroforética de la proteína recombinante RBP33-NTAP expresada en tripanosomas procíclicos (TAP-RBP33) respecto a la proteína RBP33 endógena (Parental), en geles desnaturizantes con Mn^{2+} -Phos-tag. Las muestras se incubaron a temperatura ambiente durante 30 minutos en presencia de fosfatasa alcalina (+ CIAP), inhibidores de fosfatasa (+ Inh fos) o con ambos (+/+).

secuencia para integrarse por recombinación homóloga en el *locus* del gen que codifica la proteína RBP33. De esta manera, se obtuvo una línea de tripanosomas procíclicos seleccionada por resistencia a higromicina. Para confirmar que la proteína TAP-RBP33 es funcional, se construyó el vector pGR255 para realizar ribointerferencia del mensajero de la proteína RBP33 endógena sin afectar a la expresión de la proteína fusionada a TAP. Para ello el *dsRNA* que se expresa desde pGR255 se dirige hacia la región 5' UTR del gen RBP33 endógeno (Figura V.12, B), que no está presente en la versión fusionada a la secuencia TAP.

Utilizando los anticuerpos frente a la proteína RBP33, se comprobó por inmunoblot que la proteína TAP-RBP33 integrada en el *locus* endógeno se expresa correctamente en los cultivos (Figura V.13, A). Los niveles de la proteína endógena se reducen hasta desaparecer tras inducir el silenciamiento con tetraciclina, mientras que los niveles de la proteína TAP-RBP33 aumentan ligeramente, como puede verse en el inmunoblot de menor exposición. Por otra parte, la expresión de la proteína TAP-RBP33 es suficiente para asegurar la supervivencia del cultivo en el que se ha inducido el silenciamiento de la proteína endógena RBP33 mientras que en el cultivo parental, el silenciamiento de la proteína endógena RBP33 conduce a la muerte celular tras 48 horas de inducción con tetraciclina (Figura V.13, B). Por inmunofluorescencia se llevó a cabo la detección de la proteína TAP-RBP33 en el parásito (Figura V.13, C). La proteína fusionada tiene la localización nuclear esperada, al igual que ocurre con la proteína RBP33 endógena y difiriendo de la localización del epítipo TAP expresado por sí solo, que es citosólico. Por otra parte, comprobamos si TAP-RBP33 sufre las mismas modificaciones post-traduccionales que la proteína RBP33 endógena. Pudimos ver que la proteína TAP-RBP33, al igual que RBP33, se desfosforila por la acción de la fosfatasa alcalina y su movilidad no es afectada al añadir inhibidores de fosfatasas (Figura V.13, D).

Con esto aseguramos que la proteína fusionada TAP-RBP33 parecía actuar de igual manera que la proteína RBP33 endógena y que, por lo tanto, los complejos proteicos a purificar deben reflejar los complejos que se dan con la proteína RBP33 endógena *in vivo*.

5.3.3. Identificación de proteínas asociadas a RBP33

Para la purificación TAP se utilizaron sobrenadantes derivados de extractos centrifugados a 16.000G de células que expresaban TAP-RBP33 y TAP-DRBD3 desde el *locus* endógeno. TAP-DRBD3 se utilizó como control positivo de la purificación, ya que sabemos que forma un complejo *in vivo* (Fernandez-Moya et al, 2012). Los extractos proteicos se pasaron a través de una primera columna de purificación con resina de IgG que une la proteína A de la secuencia TAP (Figura V.8, A). Tras un lavado en el que eliminamos las proteínas no unidas a la resina, eluimos las proteínas unidas utilizando proteasa TEV que corta la secuencia TEV. El eluido se cromatografió en una columna con resina de calmodulina, que se une al péptido de unión a calmodulina (CBP) presente en el TAP. Tras eliminar la fracción que no se une a la columna mediante un lavado exhaustivo, se eluye con EGTA que quela el calcio de la solución y hace que la región CBP pierda afinidad por la calmodulina. Se comprobó el proceso de purificación mediante un inmunoblot (Figura V.14, A) cargando cada uno de los pasos de la purificación para hacer un seguimiento de la proteína fusionada TAP-RBP33. Como podemos ver en la figura, la proteína TAP-RBP33 se conserva desde el extracto total hasta su elución por EGTA. El eluido final de la purificación se resolvió en un gel de poliacrilamida desnaturalizante y éste se tiñó con Sypro Ruby que marca a las proteínas (figura V.14, B). Las bandas visibles en el gel se cortaron y se enviaron al servicio de proteómica del Instituto de Parasitología y Biomedicina López-Neyra para su identificación mediante huella peptídica (MALDI-TOF). Los datos obtenidos de los péptidos digeridos durante el

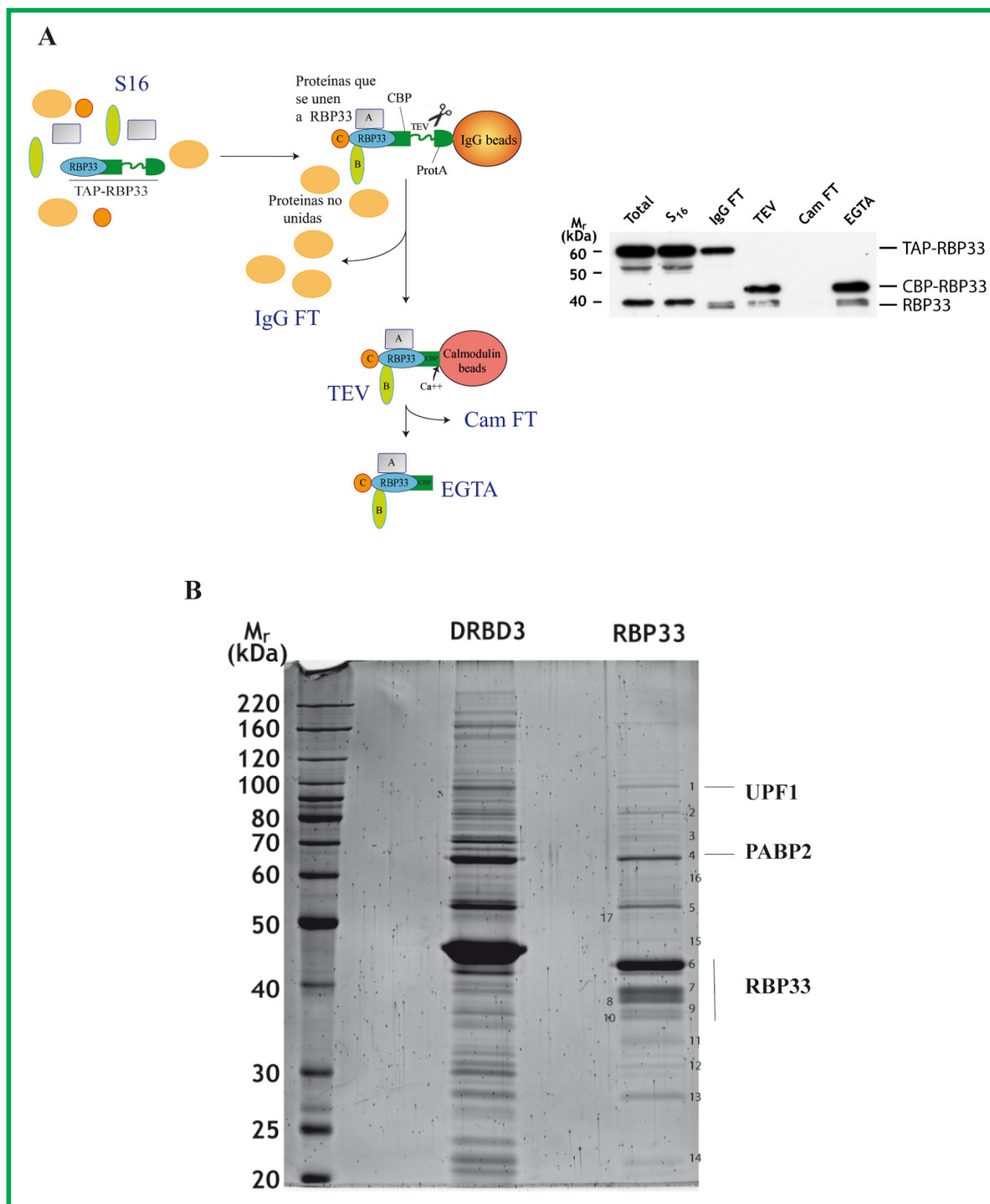


Figura V.14. Identificación de las proteínas asociadas a RBP33 por purificación en tandem por afinidad (TAP, *tandem affinity purification*)

(A) Seguimiento mediante western blot de la proteína RBP33 durante la purificación de las proteínas asociadas a TAP-RBP33 (Esquema modificado de *Nature Review*, 2003). La proteína TAP-RBP33 se une a la columna de resina de IgG a través del dominio proteína A (prot A) del TAP. Los complejos multiproteicos así inmovilizados, son liberados mediante la acción de la proteasa TEV que corta la secuencia TEV localizada entre el dominio proteína A y el dominio de unión a calmodulina (*Calmodulin Binding Protein*, CBP). El eluido se pasa posteriormente por una columna de resina de calmodulina que une el dominio CBP de la proteína con el TAP. El complejo se eluye finalmente utilizando EGTA. (B) Los extractos de proteínas se obtuvieron de células que expresaban la proteína recombinante TAP-RBP33 o TAP-DRBD3 desde el *locus* endógeno. Las bandas no coincidentes con el control DRBD3-TAP se extrajeron del gel para su identificación por MS-MS. A la derecha, se indican las bandas que han sido identificadas.

análisis se compararon con las digestiones *in silico* de secuencias depositadas en una base de datos específica de *T. brucei* cedida por el Dr. Michael Ferguson (Universidad de Dundee, Reino Unido). Una proteína se consideró positiva cuando el índice MASCOTT (http://www.matrixscience.com/search_form_select.html) fue mayor que 50 ($p < 0,05$).

La mayoría de las bandas no pudieron identificarse. De las bandas seleccionadas, se identificó UPF1 (banda 1), una proteína involucrada en la ruta de degradación de transcritos con codones de parada prematuros (*Nonsense-mediated decay*, NMD) en eucariotas pero cuya función en tripanosomas no está definida todavía (Delhi et al, 2011); también hay interacción de RBP33 con la proteína de unión a la cola poli(A) PABP2, que se identificó en dos bandas muy separadas la una de la otra (bandas 4 y 5), algo que también ocurre en la purificación con DRBD3. Además, RBP33 también se une a sí misma como hemos podido comprobar en la purificación TAP (bandas 6-10) y en el inmunoblot de la misma (Figura V.14,A), donde podemos ver en el lavado IgG FT que la banda de la proteína RBP33 endógena disminuye, pudiendo indicar que ha quedado unida a TAP-RBP33 en la columna, y también que se mantiene durante la purificación hasta el eluido EGTA. Por otra parte, puede verse la desfosforilación que le ocurre a la proteína RBP33 y TAP-RBP33 durante la purificación, observándose la aparición de una banda doble.

Estos resultados indican que RBP33 se une a las proteínas UPF1, PABP2 y consigo misma dentro de la célula.

5.3.4 La proteína RBP33 se encuentra metilada *in vivo*

El análisis aún no publicado de las proteínas metiladas en las formas procíclicas de *T. brucei* realizado en el laboratorio de la Dr. Laurie K. Read de la Universidad de Búfalo (Nueva York, EE.UU.) reveló que la proteína

RBP33 se metila en uno de los residuos arginina de su secuencia (Figura V.15, A, cuadro). La metilación de argininas generalmente altera la función proteica influenciando las interacciones proteína-proteína, proteína-ácido nucleico y/o el tráfico de la proteína en las células. Para estudiar la importancia de esta metilación en la función de la proteína RBP33, se generó una proteína mutada TAP-RBP33 sustituyendo la arginina metilada por una lisina (TAP-RBP33 R130K) y se integró de forma estable en el *locus* endógeno de RBP33 de una línea de ribointerferencia de tripanosomas procíclicos con el plásmido pGR255 (Figura V.15, B). Comparamos la expresión de la proteína RBP33 en tres líneas celulares: la parental RNAi, la línea RNAi TAP-RBP33 silvestre (wt) y la nueva línea RNAi TAP-RBP33 R130K (Figura V.15, B). Se confirmó el silenciamiento de la proteína RBP33 endógena al inducir el RNAi con tetraciclina en las tres líneas celulares, conservándose la expresión de la proteína fusionada a la secuencia TAP en las líneas TAP-RBP33. Los resultados indican que TAP-RBP33 R130K se expresa de igual manera que la proteína TAP-RBP33. Por otra parte, este cambio tampoco tuvo un efecto significativo en el crecimiento del cultivo, ralentizándolo ligeramente respecto al cultivo TAP-RBP33 wt. De hecho, la expresión TAP-RBP33 R130K evita la muerte celular cuando se ha inducido el silenciamiento de la proteína endógena, al igual que ocurría con TAP-RBP33 wt. En conclusión, la metilación de dicho residuo arginina no parece tener un efecto significativo en la función esencial de la proteína RBP33, al menos en las condiciones de cultivo ensayadas.

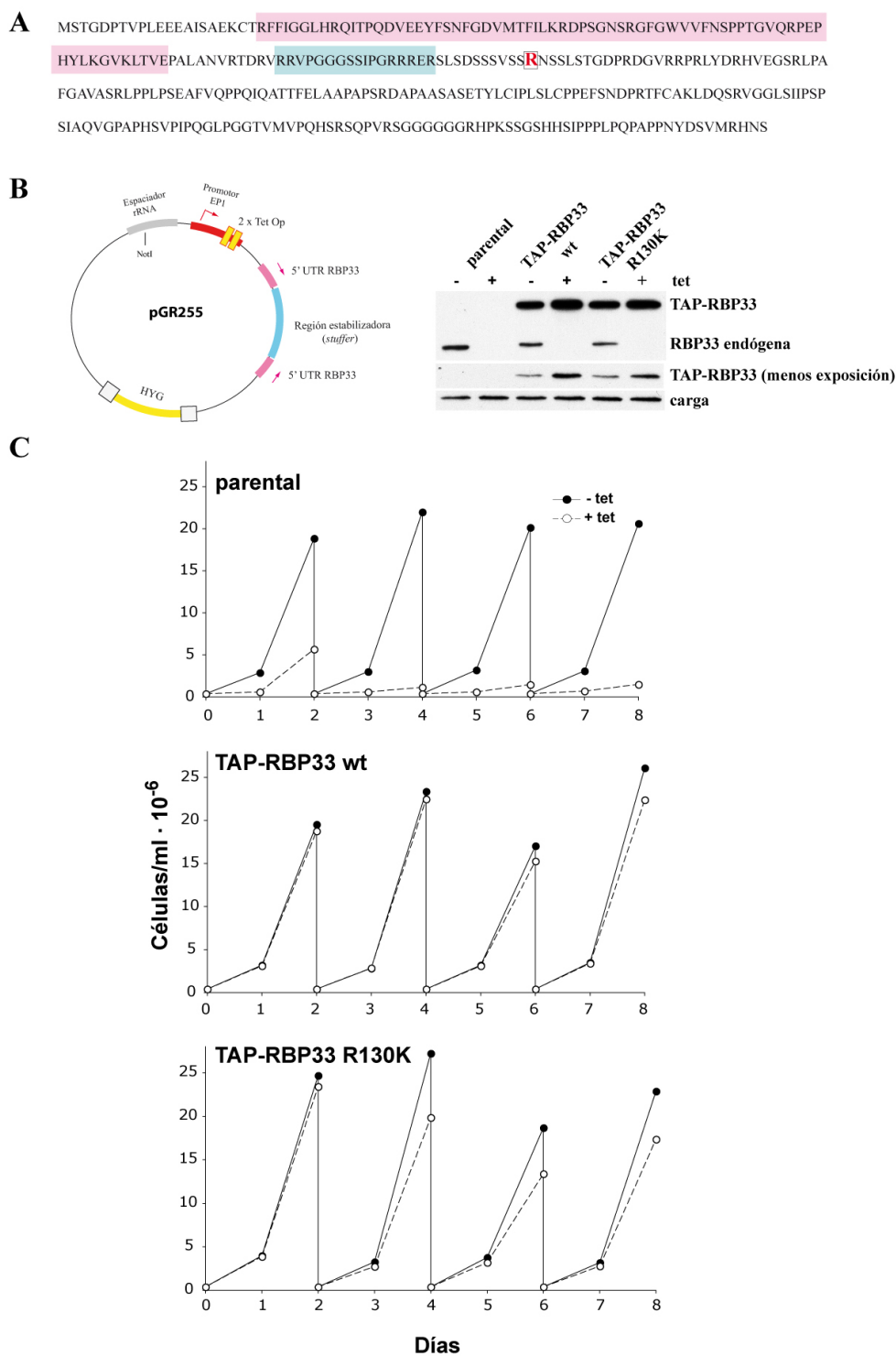


Figura V.15. Metilación de RBP33.

(A) Secuencia de la proteína RBP33. En rojo se indica el residuo de arginina di-metilado. En rosa se indica el dominio funcional RRM y en azul se indica la señal de localización nuclear. (B) Western de 3 líneas RNAi utilizando la secuencia 5' no codificante de RBP33 (plásmido pGR255) como secuencia para el silenciamiento de la proteína endógena y no de la proteína recombinante TAP-RBP33 que tiene una 5' no codificante distinta. pGR255 se transfectó a la línea parental (449), a una línea que expresa TAP-RBP33 o a otra que expresa TAP-RBP33 con la mutación R130K en el residuo de metilación. (C) Curvas de crecimiento de las tres líneas anteriores, llevadas a cabo durante 8 días en ausencia (-) o en presencia (+) de tetraciclina.

OBJETIVO 4: Ribonómica de RBP33

5.4.1 Análisis mediante microarrays de los RNAs expresados diferencialmente al silenciar RBP33

Las proteínas de unión a RNA regulan la función del conjunto de mRNAs que unen. Para analizar la población de RNAs susceptible de regulación por la proteína RBP33, se comparó el transcriptoma de tripanosomas procíclicos en los que se silenció por RNAi la proteína RBP33 con el de células no inducidas utilizando la hibridación de microarrays genómicos. Se utilizaron microarrays cedidos por el Instituto Craig Venter (Rockville, MD, EE.UU) con aproximadamente 8.600 muestras independientes repartidas por duplicado en cada array. Las muestras de RNA se aislaron de células recogidas tras 48 horas de inducción del silenciamiento de RNA con tetraciclina y posteriormente se transcribieron en reverso a cDNA en presencia de nucleótidos fluorescentes. Los resultados obtenidos tras el análisis de tres réplicas independientes muestran que la ausencia de RBP33 da lugar a un aumento en los niveles de un conjunto específico de RNAs, de los que se seleccionaron aquellos que mostraban un cambio en los niveles de expresión entre muestras de al menos dos veces (Tabla V.2). De los RNAs seleccionados, la gran mayoría están anotados como proteínas de función desconocida (*hypothetical protein*), proteínas hipotéticas conservadas (*hypothetical protein conserved*) o proteínas poco probables (*hypothetical protein unlikely*). Sólo unos pocos codificaban proteínas de función conocida, correspondiendo casi por completo a proteínas RHS (*Retrotransposon Hot Spot Protein*), proteínas cuyos genes se localizan en sitios genómicos con alta probabilidad de ataque por parte de retrotransposones. Realizando una búsqueda de la localización en el genoma de cada uno de los genes que codifican estos transcritos encontramos que la gran mayoría

se encuentran próximos a o en regiones de cambio de hebra (SSR), o en los extremos de los cromosomas (Tabla V.2, columna localización). El resto de los transcritos de la célula no mostraron diferencias de expresión. Los resultados obtenidos en el análisis con microarrays nos indicaban que RBP33 podría estar implicada en la regulación de la expresión de sitios y regiones cromosómicas que están normalmente silenciadas en tripanosomas procíclicos.

5.4.2 Inmunoprecipitación y secuenciación masiva (RNA-Seq) de los RNAs unidos a la proteína

Los datos obtenidos de los microarrays nos indican los transcritos cuya abundancia se ve alterada por la ausencia de la proteína RBP33, pero estos datos no indican si dichos cambios se deben a un efecto directo de RBP33 sobre sus transcritos diana. Para obtener más información acerca de la función de la proteína RBP33 en tripanosomas y para conocer los mRNAs que están relacionados con RBP33 de forma directa, llevamos a cabo la purificación de los transcritos asociados a RBP33 utilizando el método anteriormente descrito en 5.2.4, seguido de la secuenciación masiva de los RNAs obtenidos tras la inmunoprecipitación.

La secuenciación masiva tiene bastantes ventajas sobre los microarrays: detecta los niveles de transcritos secuenciándolos, con lo que no está sujeta a niveles de señales subjetivos; además, no tiene límite para la cuantificación de las muestras como ocurre con los arrays, sino que depende del número de secuencias obtenidas. Por otra parte, los microarrays carecen de la sensibilidad de detección de aquellos genes que se expresan a niveles o muy bajos o muy altos, evitando con la secuenciación masiva la pérdida de información en el análisis.

Identificador del gen	Ratio (log2)	Producto: Gene DB	Localización
Tb927.1.70	2,4	Retrotransposon hot spot protein 4 (RHS4), putative	Principio del cromosoma
Tb927.10.5720	2,1	Hypothetical protein	SSR convergente
Tb927.5.3990	2,0	Variant surface glycoprotein (VSG, atypical), putative	SSR convergente
Tb927.4.280	1,9	Retrotransposon hot spot protein 3 (RHS3), putative	Dentro de una unidad transcripcional
Tb927.9.8940	1,8	Hypothetical protein, unlikely	Dentro de una unidad transcripcional
Tb927.1.80	1,8	Hypothetical protein, unlikely	Principio del cromosoma
Tb927.9.9900	1,8	Hypothetical protein, unlikely	Dentro de una unidad transcripcional
Tb927.2.1210	1,8	Retrotransposon hot spot protein 4 (RHS4), putative	SSR divergente
Tb927.7.2000	1,7	Retrotransposon hot spot protein 7 (RHS7), putative	Dentro de una unidad transcripcional
Tb927.4.5090	1,7	Hypothetical Protein	Dentro de una unidad transcripcional
Tb927.11.1500	1,7	Hypothetical protein y leucine-rich repeat protein (LRRP), putative	SSR convergente
Tb927.11.17830	1,7	Hypothetical protein, conserved	Dentro de una unidad transcripcional
Tb927.9.4870	1,7	Hypothetical protein, unlikely	Dentro de una unidad transcripcional
Tb927.5.170	1,7	Hypothetical protein, conserved	Principio del cromosoma
Tb927.2.510	1,7	Retrotransposon hot spot protein 4 (RHS4), putative	SSR divergente
Tb927.9.9910	1,6	Hypothetical protein, unlikely	Dentro de una unidad transcripcional
Tb927.9.13160	1,6	Hypothetical Protein	SSR convergente
Tb927.11.11060	1,7	Hypothetical Protein	Dentro de una unidad transcripcional
Tb927.3.5740	1,6	Hypothetical Protein	SSR convergente
Tb927.3.5740	1,6	Hypothetical Protein	SSR convergente
Tb927.1.5140	1,6	Hypothetical protein, unlikely	SSR convergente
Tb927.4.150	1,5	Hypothetical Protein	Principio del cromosoma
Tb927.6.160	1,5	Retrotransposon hot spot protein 1 (RHS1), putative	SSR convergente
Tb927.2.160	1,5	Hypothetical protein, conserved	Principio del cromosoma
Tb927.11.9410	1,5	Hypothetical Protein	SSR convergente
Tb927.1.290	1,5	Leucine-rich repeat protein (LRRP), putative	SSR convergente
Tb927.4.140	1,5	Hypothetical Protein	Principio del cromosoma
Tb927.7.1980	1,5	Retrotransposon hot spot protein 7 (RHS7), putative	SSR convergente
Tb927.6.110	1,5	Hypothetical Protein	Principio del cromosoma
Tb927.11.8840	1,5	Hypothetical Protein	Dentro de una unidad transcripcional
Tb927.9.1260	1,4	Hypothetical protein, unlikely	SSR convergente
Tb927.2.450	1,4	Retrotransposon hot spot protein 4 (RHS4), putative (3B10 180)	Dentro de una unidad transcripcional
Tb927.1.280	1,4	Hypothetical protein, conserved	SSR convergente
Tb927.9.16760	1,4	Hypothetical protein, unlikely	SSR convergente
Tb927.7.2030	1,4	Retrotransposon hot spot protein 7 (RHS7), putative	Dentro de una unidad transcripcional
Tb927.9.14650	1,4	SLACS retrotransposable element (part), putative	SSR divergente
Tb927.9.16030	1,4	Hypothetical protein, unlikely	SSR divergente
Tb927.6.120	1,4	Hypothetical Protein	Principio del cromosoma
Tb927.9.760	1,4	Hypothetical Protein	Final del cromosoma
Tb927.2.1180	1,4	Retrotransposon hot spot protein 3 (RHS3), putative	SSR divergente
Tb927.10.7920	1,3	Hypothetical protein, conserved	Dentro de una unidad transcripcional
Tb927.2.680	1,3	Hypothetical Protein	SSR divergente
Tb927.5.4000	1,3	Hypothetical Protein	SSR convergente
Tb927.9.16070	1,3	Hypothetical Protein	SSR divergente
Tb927.1.380	1,3	Hypothetical protein, conserved	SSR divergente
Tb927.2.690	1,3	Leucine-rich repeat protein (LRRP), putative	SSR divergente
Tb927.8.5920	1,3	Hypothetical Protein	Dentro de una unidad transcripcional
Tb927.10.1010	1,3	Hypothetical Protein	SSR convergente
Tb927.9.14550	1,3	Leucine-rich repeat protein (LRRP), putative	SSR divergente
Tb927.9.6980	1,2	Hypothetical protein, unlikely	Dentro de una unidad transcripcional

Tabla V.2. RNAs que muestran expresión diferencial tras silenciar la expresión de RBP33 mediante RNAi.

Se obtuvo RNA total de dos cultivos de tripanosomas procíclicos crecidos durante 48 horas, uno en ausencia de tetraciclina y otro con 1 mg/mL de tetraciclina en el medio para inducir el silenciamiento de la proteína RBP33. Los RNAs de cada muestra se retrotranscribieron a cDNA, utilizando citosinas marcadas con diferentes fluorocromos. Posteriormente, se tomaron concentraciones iguales de cada muestra, se mezclaron y se utilizaron para hibridar microarrays. En la tabla se muestra el listado de los RNA en los que se ha encontrado un cambio significativo de la expresión génica ($p < 0,01$) tras el silenciamiento de la proteína. El identificador hace referencia al nombre del gen según la anotación en la base de datos GeneDB de *T.brucei* (<http://www.genedb.org/Homepage/Tbruceibrucei927>); Ratio (log2) indica el grado de cambio en la expresión del gen en escala logarítmica obtenido en el análisis de los microarrays (el valor 1 representaría que no hay cambio; valores superiores a 1 indican sobreexpresión del gen); la columna de Producto: GeneDB se refiere al tipo de proteína final a la que da lugar cada gen según la base de datos del GeneDB; Localización describe la región del cromosoma en la que se encuentra cada gen y puntualiza si el gen se encuentra en una región de cambio de hebras (*strand switch region*, *SSR*) convergente o divergente, dentro de una unidad transcripcional, al principio o al final de los cromosomas. Se ha utilizado el código de color de la base de datos GeneDB de *T.brucei*: en azul se indican los RNA ribosomales, tRNAs y snoRNAs; en rosa, proteínas hipotéticas poco probables; en verde, proteínas hipotéticas; en marrón claro, las proteínas hipotéticas conservadas en distintos tripanosomátidos; en amarillo, las proteínas con funciones deducidas por homología de secuencia; y en rojo las proteínas caracterizadas experimentalmente.

5.4.2.1 Obtención de las muestras

Tras irradiar con luz U.V. los cultivos de tripanosomas procíclicos, parte del extracto total se utilizó para la purificación del conjunto total de los RNAs que se expresan en la célula para utilizarse como control en la comparación posterior con los RNAs coimmunoprecipitados con RBP33 (Figura V.16). Los RNAs de ambas muestras se enriquecieron utilizando bolitas magnéticas unidas a oligo-d(T) y con los eluidos se generaron las genotecas de cDNA para llevarlas posteriormente a su identificación por secuenciación masiva.

5.4.2.2 Preparación de la librería de cDNAs y secuenciación

Para realizar la secuenciación masiva de las muestras, éstas deben pasar por un proceso previo antes de entrar en el secuenciador (Figura V.17). Tras el enriquecimiento de las muestras en mRNAs, los transcritos se fragmentaron y se retrotranscribieron a cDNA. Tras reparar los extremos que habían quedado libres, se realizó la adición de una base de adenina en el extremo 3' de los cDNA para prepararlos para la ligación de secuencias adaptadoras con una base de timidina en su extremo 3'. La ligación de los adaptadores a los extremos de

los fragmentos de cDNA permite la posterior hibridación de las secuencias complementarias a estos adaptadores que se encuentran fijadas en el portaobjetos en el que se realiza la secuenciación. Los productos de la reacción de ligación se purificaron en un gel de agarosa y se seleccionó la banda de aproximadamente 200 pb. Tras este paso, se generó una librería de cDNA amplificando las muestras por PCR, utilizando dos oligonucleótidos diseñados específicamente para unirse a los extremos finales de los adaptadores. Las muestras fueron enviadas al Instituto Sanger en Hinxton, Reino Unido, donde se secuenciaron utilizando la tecnología Illumina.

5.4.2.3 Análisis de los resultados

La tecnología Illumina convierte el conjunto de las imágenes tomadas en cada paso de la secuenciación en un archivo que contiene millones de lecturas de 36 pb cada una (Figura V.18). Se realizó un filtrado por calidades de las lecturas, generando un nuevo archivo Fastq que se utilizó para alinear las secuencias restantes con el genoma de *T. brucei* versión 4 (http://www.sanger.ac.uk/Projects/T_brucei) utilizando el programa Bowtie. Se obtuvo el número de lecturas mapeadas en cada gen

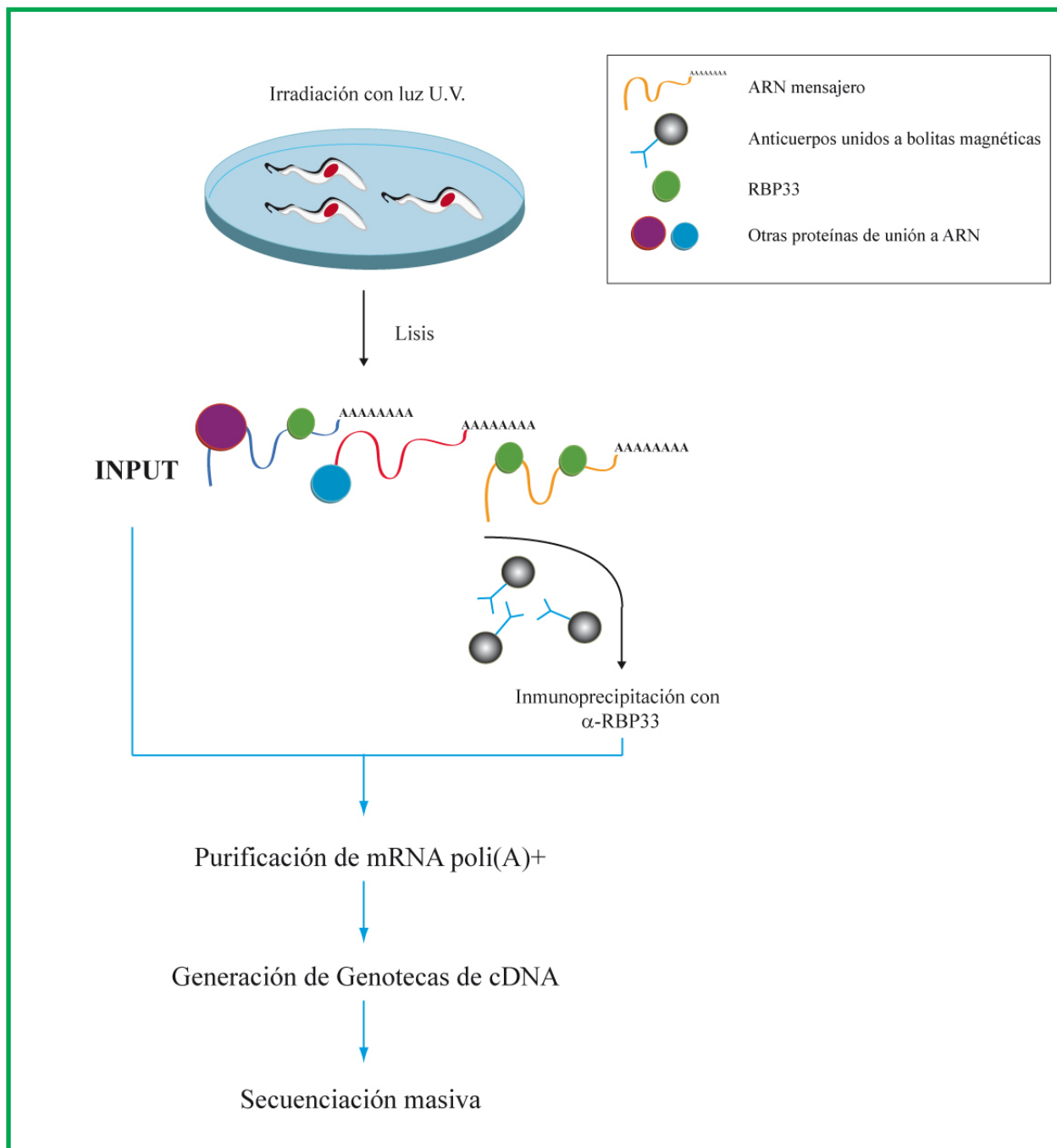


Figura V.16. Esquema de la obtención de los RNAs unidos a la proteína RBP33.

Los tripanosomas vivos se irradian con luz ultravioleta, que forma enlaces covalentes RNA-proteína. Las células se lisan y los complejos específicos RNA-proteína se inmunoprecipitan utilizando anticuerpos dirigidos contra RBP33. Paralelamente, se realiza una extracción de RNA celular total. Del RNA obtenido por ambas rutas se realiza la extracción de mRNA poli(A)+ utilizando oligo-d(T) unido a bolitas magnéticas y, posteriormente, se retrotranscribe a cDNA que se analiza por secuenciación masiva o por PCR a tiempo real para determinar qué RNAs estaban unidos por la proteína de interés.

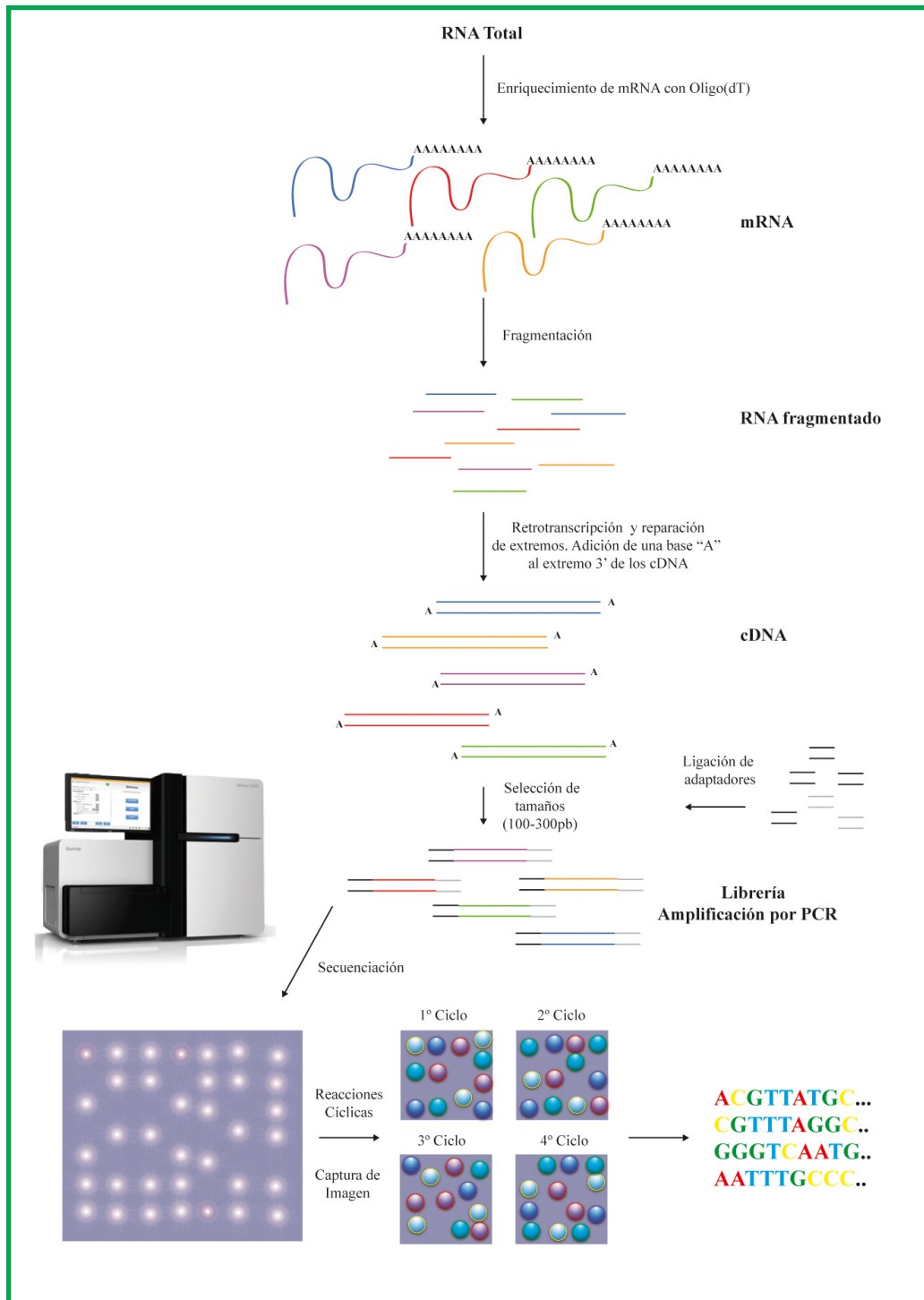


Figura V.17. Esquema de la obtención de muestras para secuenciación masiva.

Para un típico experimento de RNA-Seq, se extrae RNA total de las células y se purifican los RNA mensajeros mediante bolitas magnéticas unidas a oligo-d(T). Tras eluir de las bolitas magnéticas, el RNA se fragmenta con cationes divalentes a 80°C. Posteriormente, se reversotranscribe a cDNA. Tras reparar los extremos libres, se añade una base de adenina en la zona 3' de cada cDNA y se ligan a los extremos de las moléculas de cDNA dos adaptadores diferentes. Posteriormente, la muestra se separa por tamaños en un gel de agarosa y se selecciona la región de 200 pb, aproximadamente. Una vez purificado el DNA del gel, se enriquece la muestra por amplificación por PCR (15 ciclos). Previamente a la secuenciación, la muestra se adhiere a un portaobjetos preparado, donde se llevará a cabo el proceso de secuenciación. En cada ciclo de PCR, se toman imágenes de las señales emitidas al incorporarse los nuevos nucleótidos, y con estas imágenes, se obtiene la secuencia completa de cada molécula.

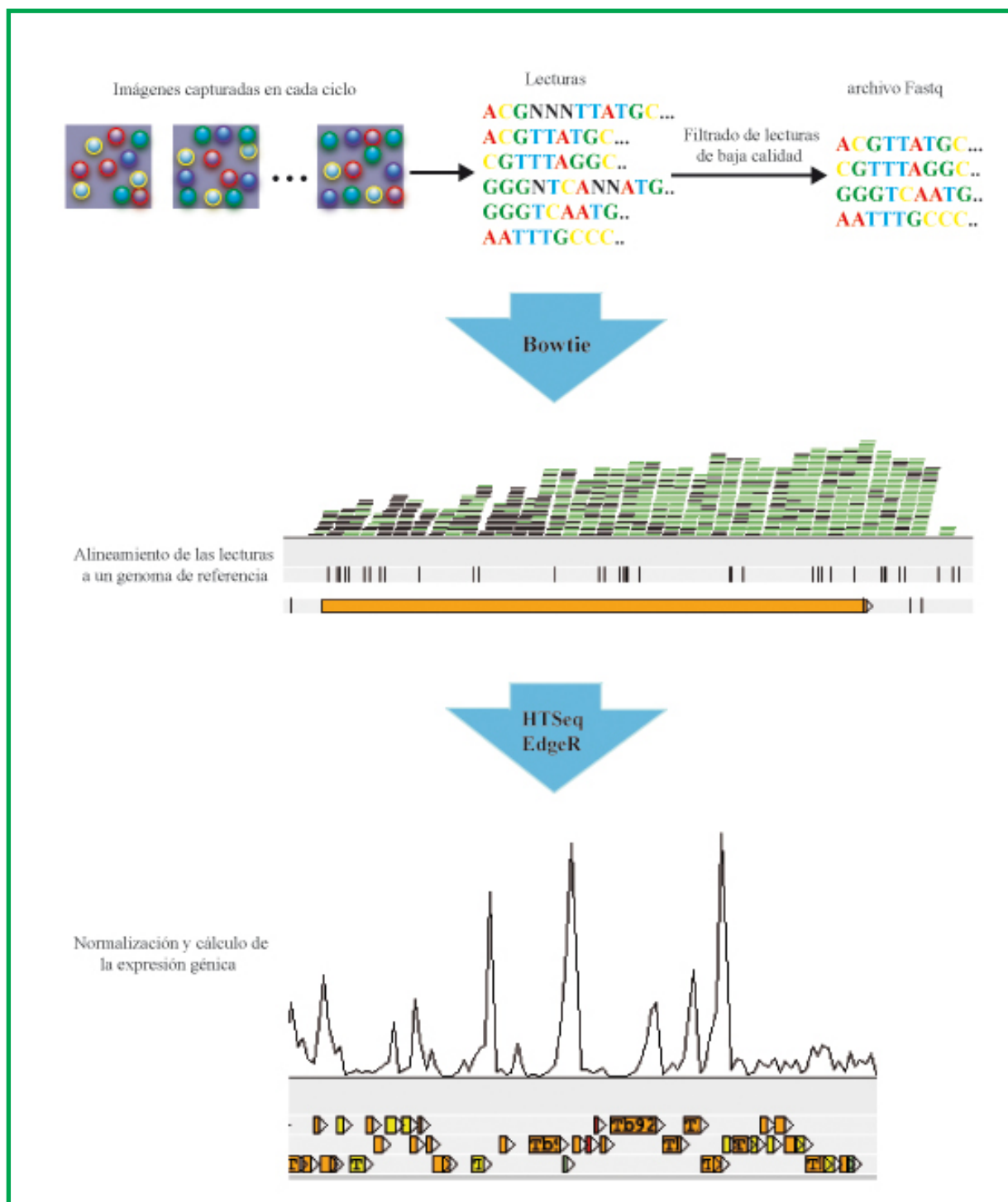


Figura V.18. Esquema del análisis de los datos obtenidos por RNA-Seq.

La captura de imágenes y la secuenciación está llevada a cabo por un programa específico desarrollado por Illumina. Las imágenes se convierten en secuencias cortas acompañadas por un valor que hace referencia a la calidad de la lectura. Antes de trabajar con las secuencias, se realiza un filtrado por calidades, eliminando aquellas que no lleguen a un valor mínimo establecido. Esto se lleva a cabo con el programa fastx-toolkit, generando un archivo fastq. Existen diferentes programas públicos que permiten alinear las secuencias a un genoma de referencia (Bowtie (Langmead et al, 2009)). Los resultados obtenidos tras el alineamiento se normalizan y se analizan con diferentes programas estadísticos (En nuestro caso utilizamos EdgeR (Robinson et al, 2010)) para obtener el resultado final de transcritos nuevos, de diferencias entre transcritos o bien de transcriptomas completos.

con el programa HTSeq y el resultado final se utilizó para el análisis estadístico para determinar las secuencias que se expresaban de forma diferencial.

5.4.3 Distribución de las secuencias obtenidas por RNA-Seq

Al comparar la muestra control con los RNAs inmunoprecipitados con la proteína RBP33, se extrajeron un conjunto de RNAs enriquecidos de forma significativa respecto al control. Se descartaron aquellos transcritos cuyo logaritmo del cambio en la expresión era menor de 4 (logFC). Esto quiere decir que cuando el valor del logFC es, por ejemplo 2, el valor absoluto del cambio es 4 veces el nivel de expresión de la muestra de RBP33 respecto al control (si \log_2 de FC=2, entonces FC=4). Los

resultados obtenidos se agruparon en diferentes conjuntos según el código de color utilizado en la base de datos de GeneDB (Tabla VIII.1). Analizando la distribución de los RNAs identificados se observó que una gran parte de ellos, el 53% concretamente, pertenecen al conjunto de RNAs que codifican secuencias que por su estructura han sido identificadas *in silico* como posibles proteínas, pero que por su pequeño tamaño (Figura V.19, porción rosa) o porque no se parecen a ninguna otra proteína de tripanosomas ni de otros organismos, ni existe evidencia experimental de que se expresen *in vivo* (Figura V.19, porción verde) no puede asegurarse que codifiquen finalmente proteínas y por ello, se nombran como hipotéticas. El 16% de los RNAs identificados se agrupan en RNAs transcritos normalmente por la RNA polimerasa III, la mayoría tRNAs y snoRNAs

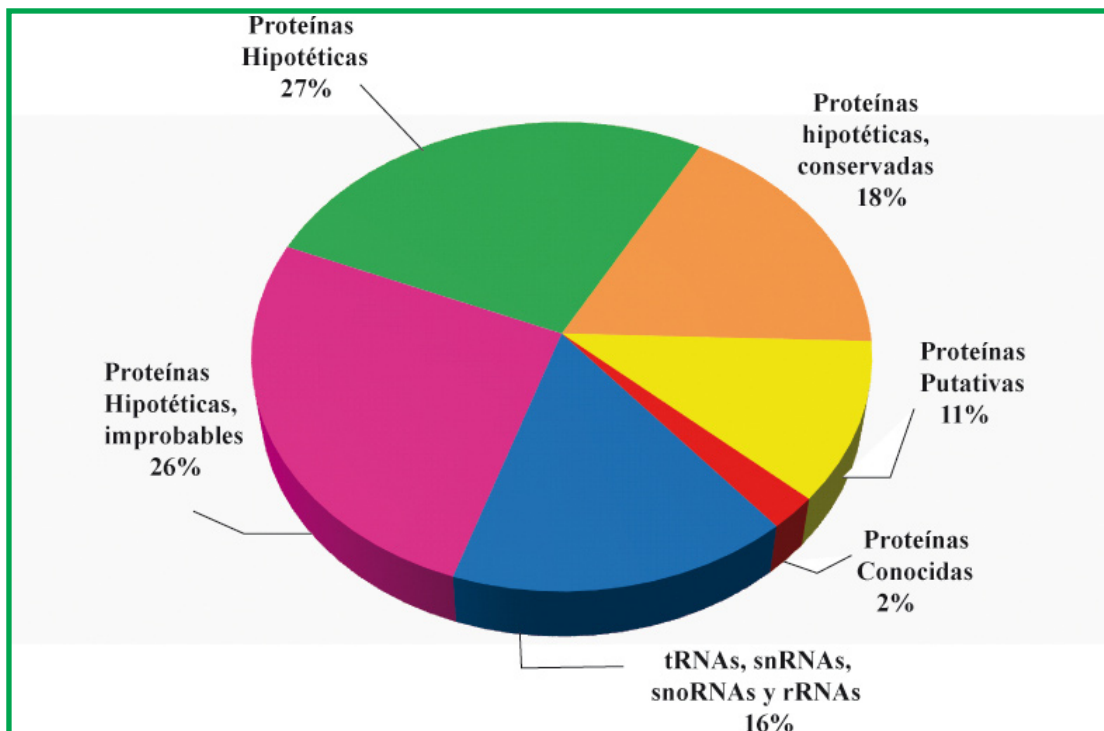


Figura V.19. Distribución de los RNAs identificados con un cambio en la expresión (Fold change) mayor que 4 en el análisis de los resultados de la secuenciación masiva.

De los 178 RNAs, un 53 % de ellos se trata de RNAs que codifican proteínas que por su pequeño tamaño, o porque no hay evidencias de su expresión *in vivo* ni parecido a ninguna otra proteína existente, reciben el nombre de proteínas hipotéticas. El 18% de los RNAs identificados pertenecen a genes todavía sin identificar, pero que por homología con otros organismos, o por características de la secuencia, parecen dar lugar a proteínas de función desconocida pero conservada, recibiendo el nombre de proteínas hipotéticas conservadas. Un 16 % de RNAs se agrupan en RNAs transcritos normalmente por la RNA polimerasa III: RNA transferentes, RNA ribosomales y RNA pequeños. El resto (proteínas putativas y conocidas) se trata de proteínas ya identificadas, bien por homología o bien a través de la experimentación.

ID	Producto	logFC	Localización
Tb927.10.11860	Proteína hipotética, conservada; proteína rica en prolina	5,74	Dentro de una unidad transcripcional
Tb927.10.15070	Proteína hipotética, conservada	5,29	Dentro de una unidad transcripcional
Tb927.10.4720	Proteína hipotética, conservada	5,14	Dentro de una unidad transcripcional
Tb927.11.8070	Proteína hipotética, conservada	5,08	Dentro de una unidad transcripcional
Tb927.6.380	Proteína hipotética, conservada	5,04	Dentro de una unidad transcripcional
Tb927.4.2660	Proteína hipotética, conservada	5,03	Dentro de una unidad transcripcional
Tb927.6.370	Proteína hipotética, conservada	5,02	Dentro de una unidad transcripcional
Tb927.7.4050	Proteína hipotética, conservada	4,92	Dentro de una unidad transcripcional
Tb927.1.4440	Proteína hipotética, conservada	4,88	Dentro de una unidad transcripcional
Tb927.5.4130	Proteína hipotética, conservada	4,79	Dentro de una unidad transcripcional
Tb927.6.4050	Proteína de la familia de las proteínas con dedos de zinc, putativa	4,68	Dentro de una unidad transcripcional
Tb927.11.6240	Proteína hipotética, conservada	4,66	Dentro de una unidad transcripcional
Tb927.5.1290	Proteína hipotética, conservada	4,62	Dentro de una unidad transcripcional
Tb927.7.4580	Proteína hipotética, conservada	4,61	Dentro de una unidad transcripcional
Tb927.1.4570	Proteína hipotética, conservada	4,42	Dentro de una unidad transcripcional
Tb927.8.5480	Proteína hipotética, conservada	4,42	Dentro de una unidad transcripcional
Tb927.7.5390	Proteína hipotética, conservada	4,41	Dentro de una unidad transcripcional
Tb927.10.15730	Proteína hipotética, conservada	4,36	Dentro de una unidad transcripcional
Tb927.9.8030	Proteína hipotética, conservada	4,35	Dentro de una unidad transcripcional
Tb927.1.4590	Proteína hipotética, conservada	4,25	Dentro de una unidad transcripcional
Tb927.5.1840	Proteína hipotética, conservada	4,24	SSR convergente
Tb927.11.10290	Proteína hipotética, conservada	4,24	Dentro de una unidad transcripcional
Tb927.1.4620	Proteína hipotética, conservada	4,24	Dentro de una unidad transcripcional
Tb927.10.12080	Proteína hipotética, conservada	4,19	Dentro de una unidad transcripcional
Tb927.10.9310	Proteína hipotética, conservada	4,18	Dentro de una unidad transcripcional
Tb927.8.2840	Proteína hipotética, conservada	4,16	SSR convergente
Tb927.7.3130	Proteína hipotética, conservada	4,13	Dentro de una unidad transcripcional
Tb927.11.5790	Proteína hipotética, conservada	4,13	Dentro de una unidad transcripcional
Tb927.1.4550	Proteína hipotética, conservada	4,12	Dentro de una unidad transcripcional
Tb927.6.5200	Proteína hipotética, conservada	4,11	SSR convergente
Tb927.9.6270	Proteína hipotética, conservada	4,11	Dentro de una unidad transcripcional
Tb927.11.5130	Proteína hipotética, conservada	4,08	Dentro de una unidad transcripcional
Tb927.5.130	Proteína relacionada con glicoproteínas de superficie variable, putativa	29,16	SSR divergente
Tb927.6.5240	Glicoproteína de superficie variable (VSG) atípica, putativa	28,87	SSR convergente
Tb927.7.6540	Glicoproteína de superficie variable (VSG) atípica, putativa	7,00	SSR convergente
Tb927.8.130	Glicoproteína de superficie variable (VSG) atípica, putativa	6,11	Al principio del cromosoma
Tb927.9.17850	Glicoproteína de superficie variable (VSG) atípica, putativa (3815.230)	5,85	Al final del cromosoma
Tb927.10.9620	NADH-sulfina reductasa c	5,67	Dentro de una unidad transcripcional
Tb927.5.4950	Glicoproteína de superficie variable (VSG) atípica, putativa	5,66	Dentro de una unidad transcripcional
Tb927.10.9080	Transportador de pteridinas, putativo	5,36	Dentro de una unidad transcripcional
Tb927.8.7740	Transportador de aminoácidos, putativo	4,91	Dentro de una unidad transcripcional
Tb927.4.4730	Transportador de aminoácidos, putativo (AATP11)	4,78	Dentro de una unidad transcripcional
Tb927.11.20190	Glicoproteína de superficie variable (VSG) atípica, putativa	4,73	Dentro de una unidad transcripcional
Tb927.10.12170	Proteína de interacción con RAB, putativa	4,55	Dentro de una unidad transcripcional
Tb927.1.2820	Transportador de pteridinas, putativo	4,54	Dentro de una unidad transcripcional
Tb927.1.2880	Transportador de pteridinas, putativo	4,54	Dentro de una unidad transcripcional
Tb927.1.2830	Transportador de pteridinas, putativo	4,53	Dentro de una unidad transcripcional
Tb927.7.5960	Proteína asociada con la diferenciación 4, putativa	4,34	Dentro de una unidad transcripcional
Tb927.1.3130	Proteína quinasa, putativa	4,17	Dentro de una unidad transcripcional
Tb927.7.5980	Proteína asociada con la diferenciación 6, putativa	4,14	Dentro de una unidad transcripcional
Tb927.4.3930	Transportador de aminoácidos, putativo	4,10	Dentro de una unidad transcripcional
Tb927.11.1480	Receptor tipo adenilato ciclasa GRESAG-4, putativo	4,02	SSR convergente
Tb927.10.8590	Componente de la zona de transición del flagelo (FTZC)	4,90	Dentro de una unidad transcripcional
Tb927.6.3480	Proteína de dedos de zinc (ZFP1)	4,60	Dentro de una unidad transcripcional
Tb927.8.6840	Proteína de reparación de errores (MLH1)	4,25	Dentro de una unidad transcripcional
Tb927.10.4680	NUTX hidrolasa, conservada; proteína de la familia MutN/NUX	4,03	Dentro de una unidad transcripcional

Tabla V.3: Genes identificados con transcritos asociados a RBP33 que tienen una alta probabilidad de codificar proteínas funcionales y que codifican proteínas validadas experimentalmente.

Del análisis de la secuenciación masiva se tomaron aquellos transcritos que codifican posibles proteínas funcionales (en marrón y amarillo) proteínas que ya han sido validadas experimentalmente (en rojo) y que se unen a RBP33 de manera significativa ($p < 0,01$) respecto al control con un valor de FC mayor de cuatro. ID: Identificador del gen según la anotación en la base de datos GeneDB de *T.brucei* (<http://www.genedb.org/Homepage/Tbruceibrucei927>); la columna de Producto se refiere al tipo de proteína final a la que da lugar cada gen; la columna logFC indica el valor de la diferencia con el control (veces); Localización describe la región del cromosoma en la que se encuentra cada gen puntualizando si el gen se encuentra en una región de cambio de hebras (SSR) divergente o convergente, dentro de una unidad transcripcional o al principio y final del cromosoma. El código de color utilizado se describe en el pie de la Tabla V.2.

del cromosoma 10 (Figura V.19, porción azul). El resto de los RNAs identificados codifican proteínas conservadas en tripanosomas (Figura V.19, porción naranja; Tabla V.3), cuya función se deduce por homología de los dominios conservados que presentan con las proteínas de otros organismos (Figura V.19, porción amarilla; Tabla V.3) y proteínas de función conocida y/o validada experimentalmente en la literatura (Figura V.19, porción roja; Tabla V.3).

5.4.4 Mapeo de la distribución en el genoma de las secuencias obtenidas por RNA-Seq

Tras analizar los datos, las lecturas se importaron al programa Artemis (<http://www.sanger.ac.uk/resources/software/artemis/>), una herramienta de visualización y anotación de secuencias y datos obtenidos de la secuenciación masiva. De esta manera se pueden visualizar las posiciones de cada una de las lecturas obtenidas y obtener una visión global de los datos. Con este software, hicimos un seguimiento general de los resultados obtenidos tras el análisis (Tabla V.3). Lo primero que observamos fue que aunque muchas lecturas caen en regiones codificantes, la mayoría de ellas se alinean con genes que codifican proteínas hipotéticas (código de color: verde, morado) y que se localizan en regiones de cambios de hebra convergentes (Figura V.20, A) o divergentes (Figura V. 20, B), en regiones en los extremos de los cromosomas (Figura V. 20, C) y en regiones de cambio de polimerasas (Figura V. 20, D). Otra parte de las lecturas se han observado dentro de unidades transcripcionales mapeadas a genes que se localizan en la hebra contraria al del sentido de la unidad transcripcional, o cerca de grandes regiones vacías (Figura V. 20, D). Por otra parte, visualizamos parte de los genes obtenidos que codifican proteínas conocidas. En éstos, el enriquecimiento observado en la inmunoprecipitación con la proteína RBP33 es muy evidente en el caso del gen *FTZC* (*flagellum transition component zone*)(ver tabla V.3; Figura V. 20, E) que codifica una proteína

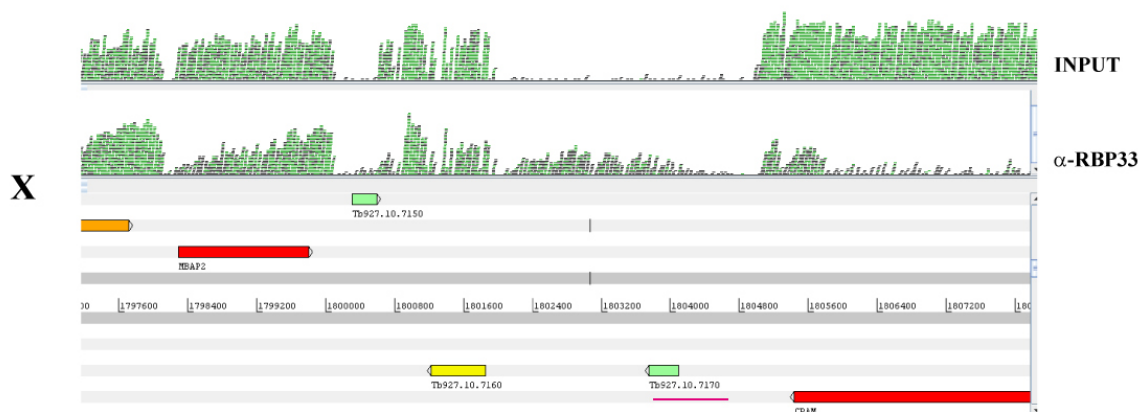
localizada en la región más próxima a la base del flagelo; y de *PT-X* (*pteridin transporter X*), que codifica un transportados de pteridinas; en otros genes, el enriquecimiento es algo menos contundente (Figura V. 20, E) e incluso pudimos observar que la proteína RBP33 también tiene afinidad por su propio mRNA.

5.4.5 Agrupación funcional de los transcritos que codifican proteínas conocidas.

Para organizar los datos obtenidos por RNA-Seq en conjuntos que agrupasen los genes identificados en el contexto de función molecular y componente celular, se llevó a cabo un análisis GO (*Gene Ontology*) con el programa *online* GStat (<http://gostat.wehi.edu.au/>). Debido a que la mayoría de los genes identificados (Tabla VIII.1) son desconocidos y están anotados como hipotéticos y conservados en el genoma de *T. brucei*, sólo 21 pudieron ser analizados finalmente (Tabla V.3, en amarillo y rojo). Las categorías GO que se vieron enriquecidas con un $p < 0,001$ (Figura V.21, Tabla VIII.2) incluyen algunas categorías generales como por ejemplo “parte de la membrana” ($1,5 \times 10^{-7}$) o “actividad transportadora” (5×10^{-5}). La distribución de los datos en categorías más específicas disminuye la significancia en el caso de la función molecular, donde la categoría “actividad transportadora transmembrana de aminos” tiene un valor de 10×10^{-4} ; sin embargo, en el caso de los grupos de componentes celulares, encontramos categorías que mantienen su grado de significancia e incluso lo aumentan, como ocurre con “integrado en membrana” (5×10^{-8}). Resumiendo, RBP33 une un conjunto de transcritos que codifican proteínas de membrana relacionadas con el transporte.

A. SSR convergente

Proteína hipotética Tb927.10.7170



Proteínas hipotéticas Tb927.7.6010 y Tb927.7.6030

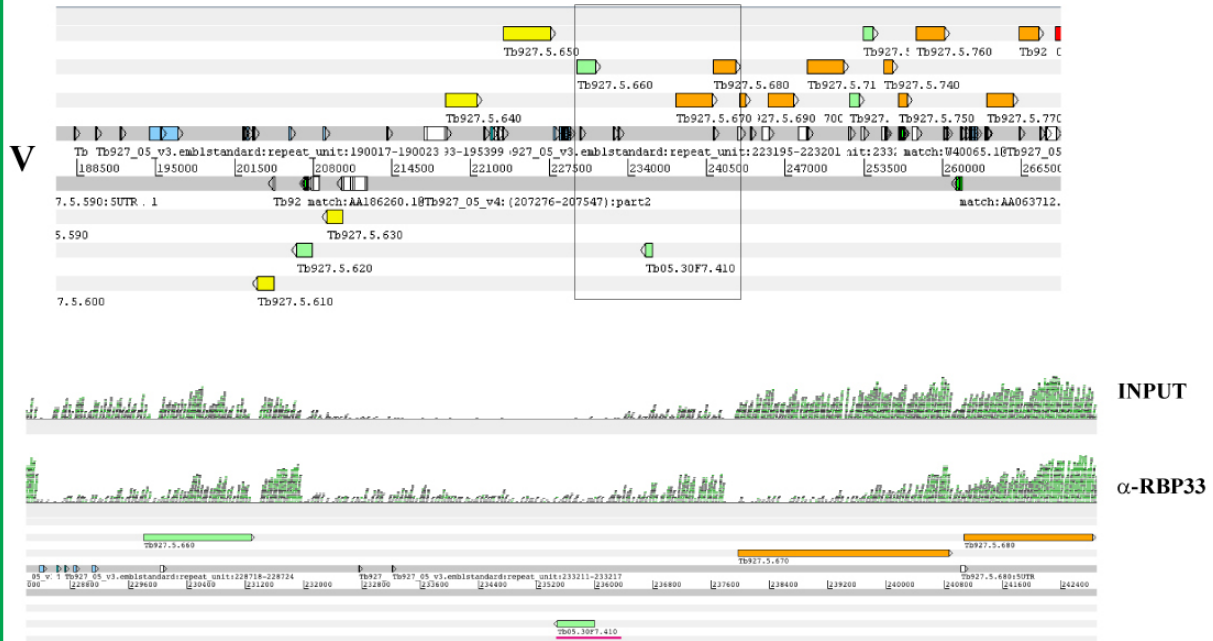


tRNA Ácido glutámico (Tb927.5.2765)



B. En regiones divergentes

Proteína hipotética Tb05.30F7.410



C. Al final del cromosoma

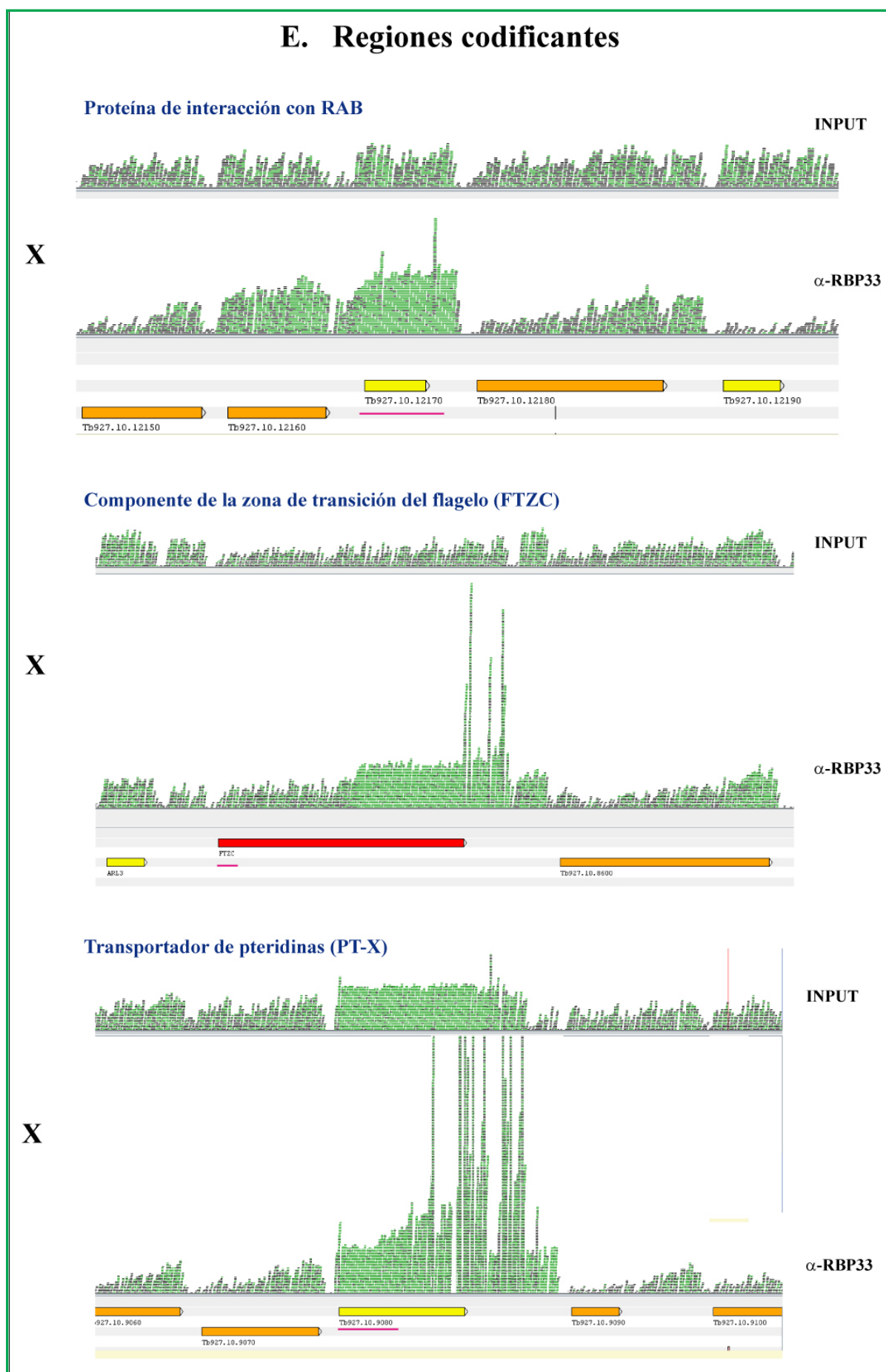
Proteínas hipotéticas Tb927.7.7550 y Tb927.7.7560



D. Dentro de una unidad transcripcional



E. Regiones codificantes



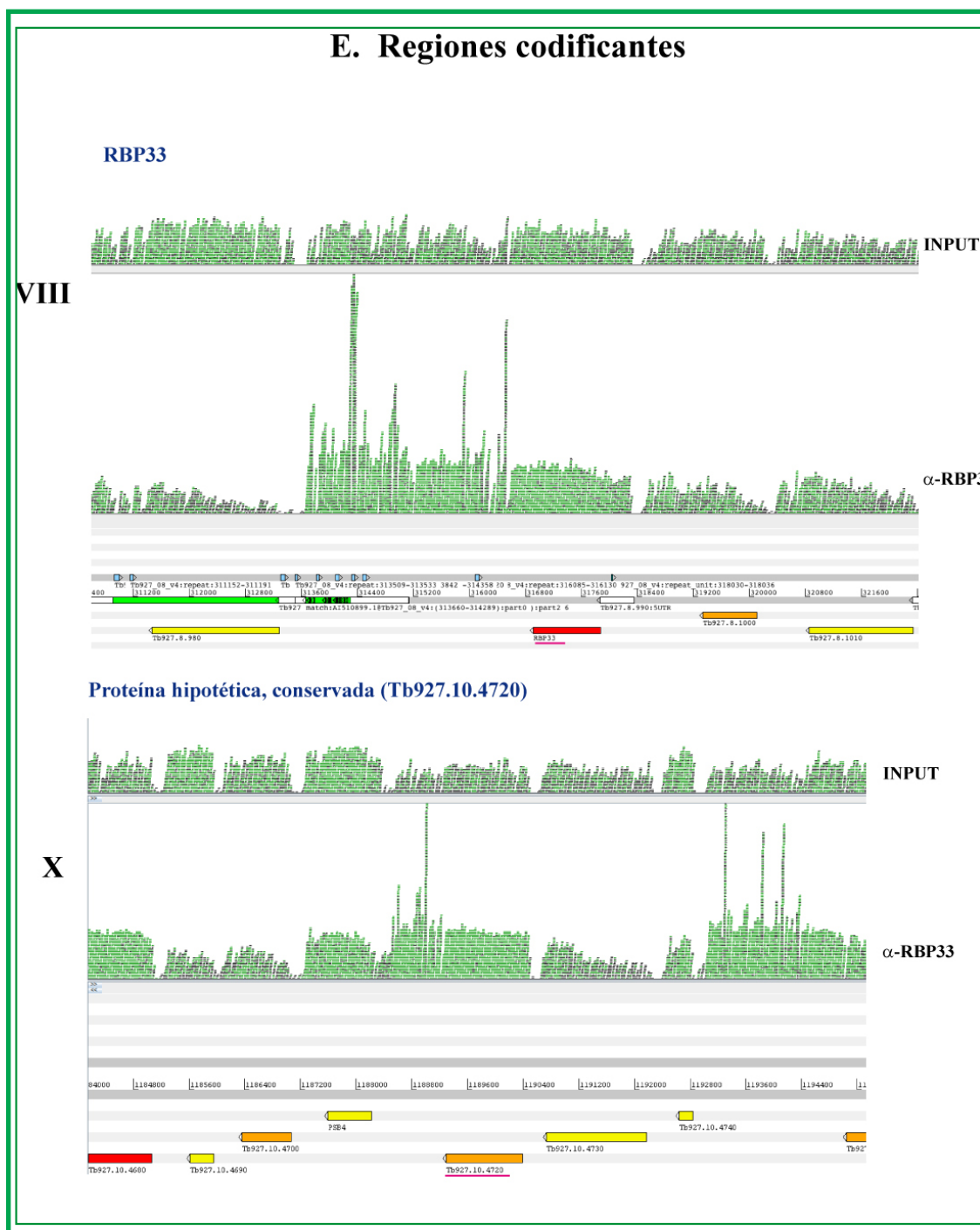


Figura V.20. Visualización de la distribución en el genoma de las lecturas obtenidas por RNA-Seq.

Ejemplos de las regiones del genoma en el que se observa una expresión diferencial según los resultados obtenidos tras el análisis de los datos de RNA-Seq. Con una línea violeta se indica el gen que codifica los transcritos enriquecidos en la muestra de la inmunoprecipitación con RBP33. Las lecturas alineadas se presentan en color verde, comparando el control IgG (INPUT) con las de RBP33 (α -RBP33). **A)** Regiones convergentes de los cromosomas X, VII y V. **B)** Región divergente del cromosoma V. **C)** Región del final del cromosoma VII. **D)** Regiones dentro de unidades transcripcionales de los cromosomas I y X. **E)** Regiones codificantes de los cromosomas X y VIII.

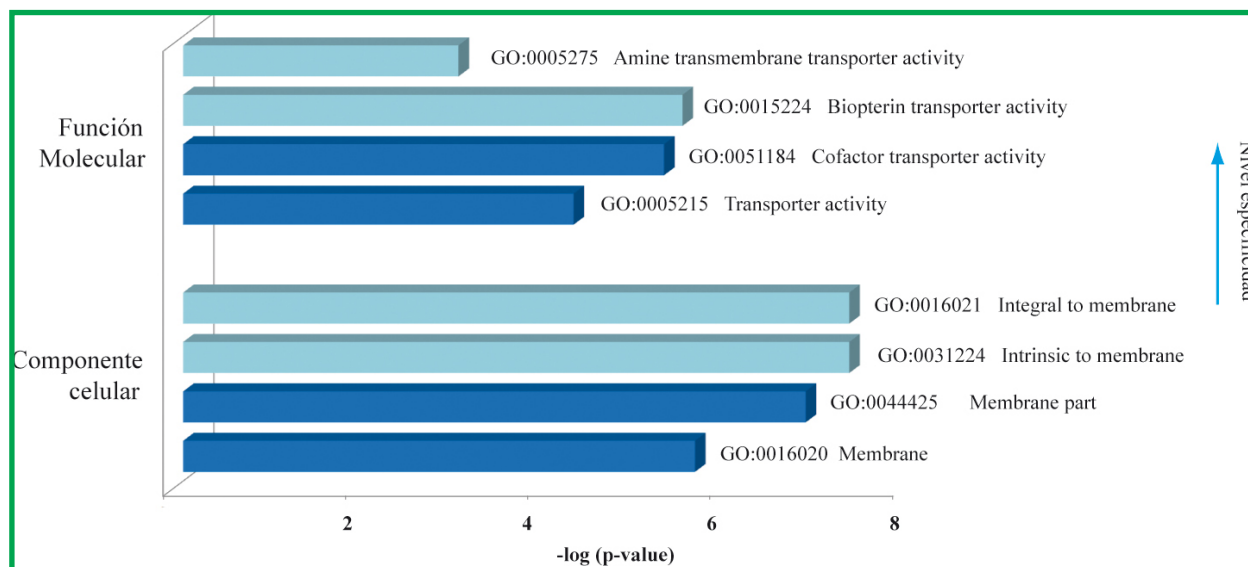


Figura V.21. Análisis de la distribución de los términos GO de los RNAs identificados con función conocida, obtenidos mediante el programa GOToolbox (<http://genome.crg.es/GOToolBox/>) y analizados según Read L. et al. Todas las asociaciones significativas de los términos GO ($p < 0,001$) se muestran en el gráfico. Los términos GO que describen categorías específicas se indican con las barras de color azul celeste; los términos GO que describen categorías generales se indican en color azul oscuro. Los niveles de concreción de los grupos GO aumentan en la dirección de la flecha. Los datos se agruparon en tres categorías indicadas en el eje Y.

5.4.6 Efecto del silenciamiento de la proteína RBP33 sobre un reportero LUC con distintas UTRs.

Anteriormente, en nuestro laboratorio se había llevado a cabo la caracterización de un conjunto de mensajeros estabilizados por la unión a DRBD3 y que codifican proteínas de membrana. El análisis por GO de los transcritos conocidos identificados por RNA-Seq nos ha identificado un pequeño grupo de transcritos que codifican proteínas de membrana asociados a RBP33. De entre estos transcritos, los que codifican los transportadores de pteridinas (entre ellos el transportador de pteridinas PT-X) y el transportador de aminoácidos AATP11, son comunes entre las dos proteínas de unión a RNA.

En los mensajeros, los elementos reguladores que establecen si se degradan o si se traducen suelen estar localizados en las regiones no codificantes de los transcritos. Para determinar el efecto de la proteína RBP33 sobre los transcritos que une, llevamos a cabo el seguimiento de la señal de los mensajeros de

FTZC, PT-X y de un mensajero que codifica la proteína luciferasa, con las UTRs del mensajero de PT-X. Para esto, la 3' UTR de PT-X sustituyó a la 3' UTR de actina (ACT) de la luciferasa y en otra construcción, la 5' UTR sustituyó a la 5' UTR del gen *EPI* (Figura V.22, A). Las construcciones se integraron de forma estable en una línea de RNA interferente de RBP33 (plásmido pGR70). En el caso de los mensajeros de *FTZC* y *PT-X*, no se observa un cambio significativo de la señal del mensajero al silenciar la proteína RBP33. Esto era de esperar, pues en los microarrays no se observaron diferencias de expresión de estos transcritos entre las muestras. De la misma manera, no se observaron cambios significativos en la expresión del mensajero luciferasa al sustituir la 5' UTR de *EPI* por la correspondiente de *PT-X*. Se observa un ligero aumento de la señal del mensajero de luciferasa en la línea con la 3' UTR de *PT-X*, probablemente debido a un aumento de la estabilidad del mensajero, determinada por posibles elementos reguladores en la secuencia, pero dicha diferencia no se ve alterada al silenciar la expresión de la proteína RBP33 (Figura V.22, B). Estos datos

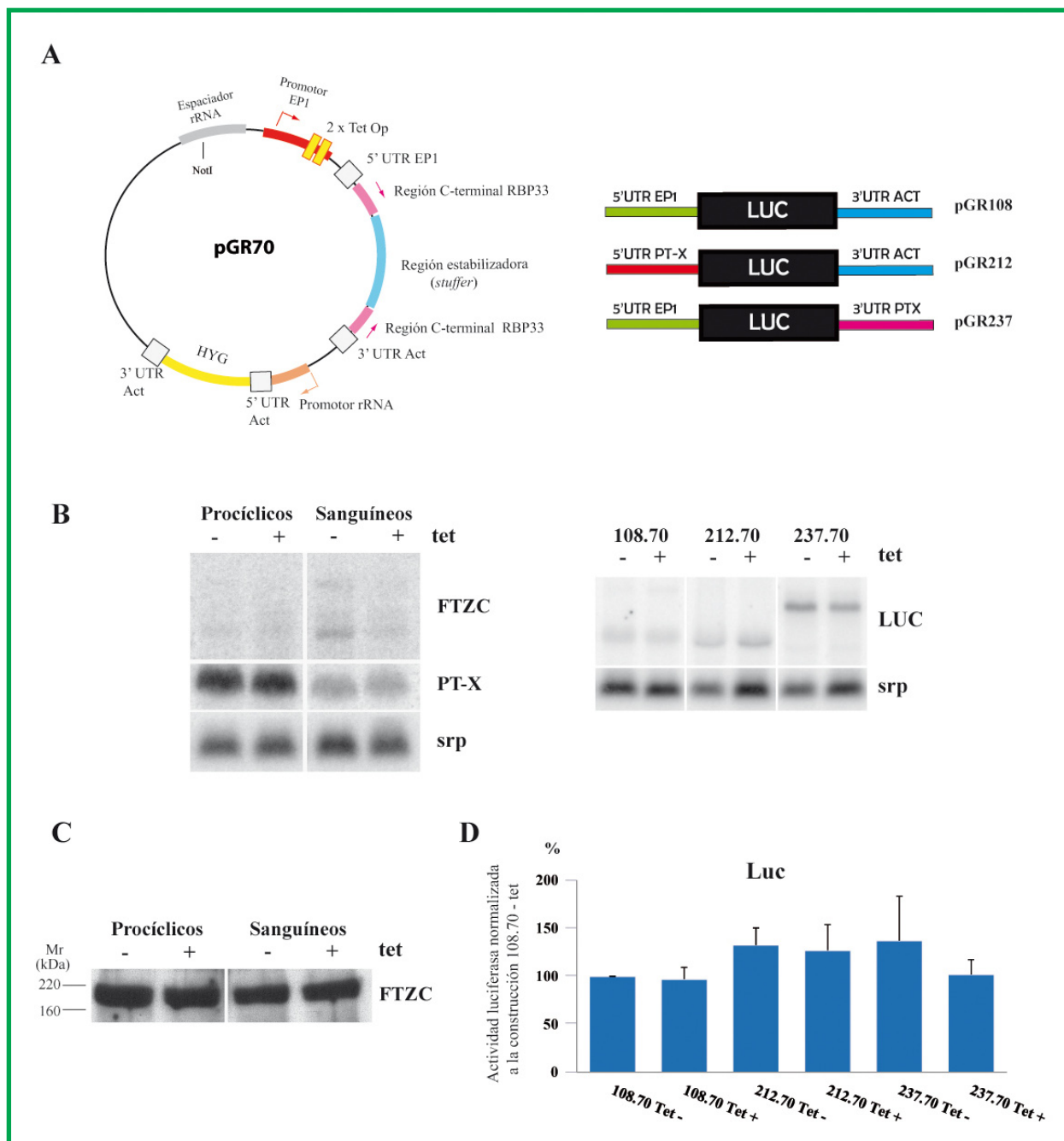


Figura V.22. El silenciamiento de la proteína RBP33 no tiene un efecto significativo en la degradación ni en la traducción de genes reporteros.

Los vectores de expresión con el gen de la luciferasa (LUC) fusionado a regiones no codificantes de diferentes genes se integraron de forma estable en una línea de tripanosomas procíclicos transfectada con el plásmido pGR70 que genera RNA interferente de RBP33 de manera inducible por tetraciclina. **(A)** Esquema del plásmido pGR70 y construcciones para la generación de las tres líneas celulares utilizadas en el ensayo luciferasa. pGR212 y pGR237 son plásmidos derivados de pGR108 Estevez (2008) con las regiones 5' y 3' no codificantes del gen PT-X (Tb927.10.9080), respectivamente. **(B)** Los niveles de los mensajeros de FTZC, PT-X y luciferasa se analizaron por northern blot en los cultivos RNAi sin (-) o con (+) tetraciclina, utilizando en cada caso una sonda complementaria a la región codificante de su correspondiente mensajero. Se utilizó SRP como control de carga para la normalización. **(C)** Inmunoblot de la expresión de la proteína FTZC en cultivos de tripanosomas procíclicos y sanguíneos en los que se ha inducido (+) el silenciamiento de la proteína RBP33. El anticuerpo anti-FTZC fue cedido por el Dr. Frédéric Bringaud (Bringaud et al, 2000). **(D)** La actividad de la luciferasa se analizó enzimáticamente y se normalizó basándose en los valores del cultivo 108.70 sin inducir (108.70 -tet).

indican que RBP33 no parece tener un papel en la degradación o en la estabilidad de los mensajeros que une.

Quisimos comprobar si, a pesar de que RBP33 es una proteína nuclear, el silenciamiento de la misma puede estar afectando a la traducción a proteína de los mensajeros que une. El Dr. Frédérick Bringaud, de la Universidad Víctor Segalen de Burdeos, Francia, nos cedió anticuerpos que reconocían la proteína FTZC. Sin embargo, no observamos cambios en la expresión de la proteína al silenciar RBP33 en

tripanosomas sanguíneos y procíclicos (Figura V.22, C). Analizamos la señal luciferasa de los cultivos RNAi anteriormente descritos para ver si había efecto en la traducción del mensajero de la luciferasa al sustituir las 5' y 3' UTRs por las de *PT-X*. Observamos un aumento de la señal al sustituir ambas 3' y 5' UTRs del control por las de *PT-X*. Pero al igual que ocurría con FTZC, no se observan cambios significativos de la cantidad de proteína luciferasa al deplecionar RBP33 (Figura V.22, D).

Por lo tanto, la actividad de RBP33 no

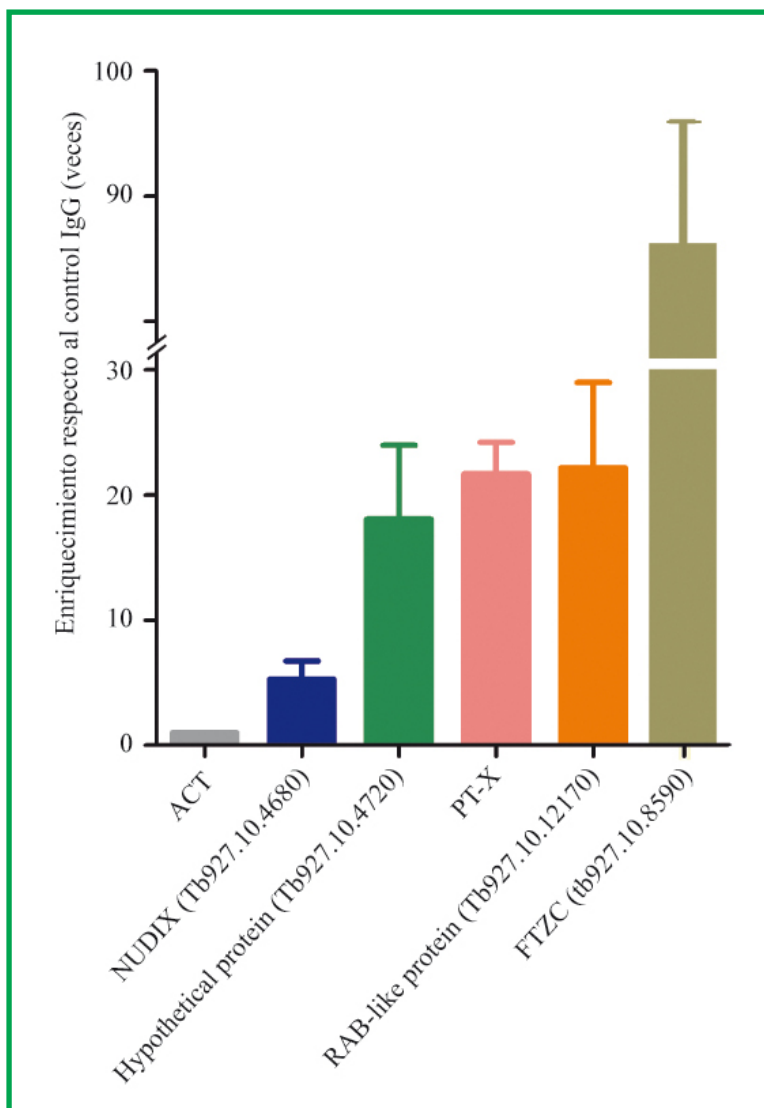


Figura V.23. Comprobación de los datos RNaseq mediante RT-PCR cuantitativa (qRT-PCR).

Tras irradiar con luz ultravioleta un cultivo de tripanosomas procíclicos, el extracto soluble se dividió en dos. Una mitad se incubó con anticuerpos anti-RBP33, la otra con IgG de conejo. Los RNAs obtenidos se cuantificaron mediante qRT-PCR. En la gráfica, se muestra el enriquecimiento respecto al control IgG de algunos RNAs que codifican proteínas conservadas. Se utilizó Actina (ACT) como normalizador.

parece tener relación ni con la degradación de los mensajeros ni con la traducción de los transcritos a proteínas.

5.4.7. Comprobación mediante qRT-PCR de los resultados obtenidos por RNA-Seq.

El hecho de que RBP33 no parecía estar afectando a los niveles de mensajeros ni de proteínas de los transcritos específicos analizados, nos llevó a cuestionarnos si la proteína estaba uniéndose de forma específica a los mensajeros identificados por RNA-Seq. Para comprobar que los datos de secuenciación reflejan lo que está ocurriendo en los tripanosomas, se validaron un grupo de transcritos mediante PCR cuantitativa (qRT-PCR), entre los que elegimos *PT-X* y *FTZC* para confirmar la unión de RBP33 a estos mensajeros. Las muestras se obtuvieron mediante el método de inmunoprecipitación de la proteína RBP33 descrito en la Figura 16. Tomamos como control de las PCRs el mensajero de la actina (*ACT*) puesto que en los resultados de la secuenciación no reflejaba expresión diferencial respecto al control INPUT.

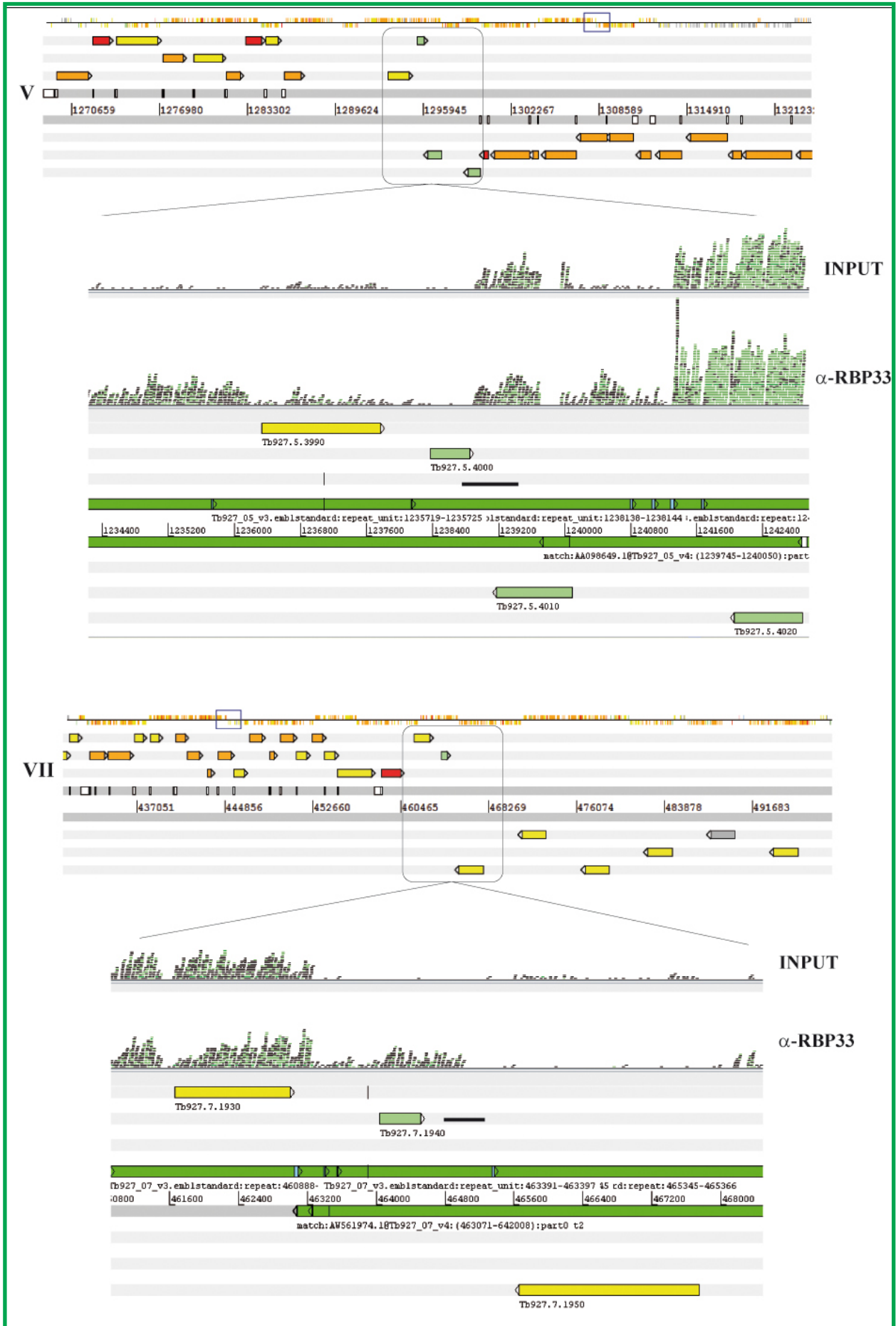
Observamos en la Figura V.23 el enriquecimiento de más de 20 veces en la mayoría de los transcritos utilizados unidos por la proteína RBP33 respecto al control de la inmunoprecipitación con IgG. El caso más llamativo es el del transcrito de *FTZC*, con un enriquecimiento de aproximadamente 90 veces respecto al control.

Con estos datos confirmamos que RBP33 se une a los mensajeros identificados por el análisis de RNA-Seq y que los resultados obtenidos en degradación y traducción reflejan que la función de RBP33 puede estar relacionada con la regulación de los transcritos que une cuando éstos se encuentran todavía localizados en el núcleo. Por tanto, RBP33 puede estar implicada en la transcripción, procesamiento o exportación de estos mRNAs,

pero aún no tenemos evidencia experimental que nos permita saberlo.

5.4.8 Efecto del silenciamiento de la proteína RBP33 en transcritos de función desconocida.

Hasta ahora habíamos centrado nuestra atención en aquellos transcritos identificados con función conocida, a la espera de obtener resultados que diesen un poco de luz a la posible función de la proteína RBP33 en *T. brucei*. Sin embargo, la gran mayoría de los transcritos identificados codifican proteínas que muy posiblemente no son funcionales y que se sitúan en regiones del cromosoma próximas a regiones convergentes, divergentes, regiones de cambio de polimerasa o situados en las hebras contrarias a la dirección de la transcripción. Para analizar el efecto del silenciamiento de RBP33 sobre estos transcritos de función desconocida, diseñamos un conjunto de sondas que hibridaban con transcritos codificados por genes situados en regiones convergentes (Figura V.24, línea negra en cromosomas V, VII y X) y entre dos unidades transcripcionales dentro de la misma hebra (figura V.24, cromosoma IX). Además, para eliminar la posibilidad de que el incremento de la señal en los northern blot fuera debido a un efecto inespecífico de muerte celular observado tras la inducción del silenciamiento del RNAi en los tripanosomas procíclicos, incluimos una muestra de los RNAs extraídos de un cultivo de RNAi de la proteína DRBD3, que como ya indicamos en la introducción, es también esencial en tripanosomas. Como puede verse en la Figura V.25, se observa un incremento en los niveles de los transcritos cuando se induce el silenciamiento de la proteína RBP33 tanto en los cultivos de los tripanosomas procíclicos como en sanguíneos. La diferencia entre las muestras de los cultivos sin inducir con los cultivos de RNAi inducidos es, en algunas ocasiones, moderado como puede observarse en la muestra del cromosoma IX y en el cromosoma V y es mucho más evidente en el caso de los cromosomas VII o X. Además, también se observa la aparición de varias bandas



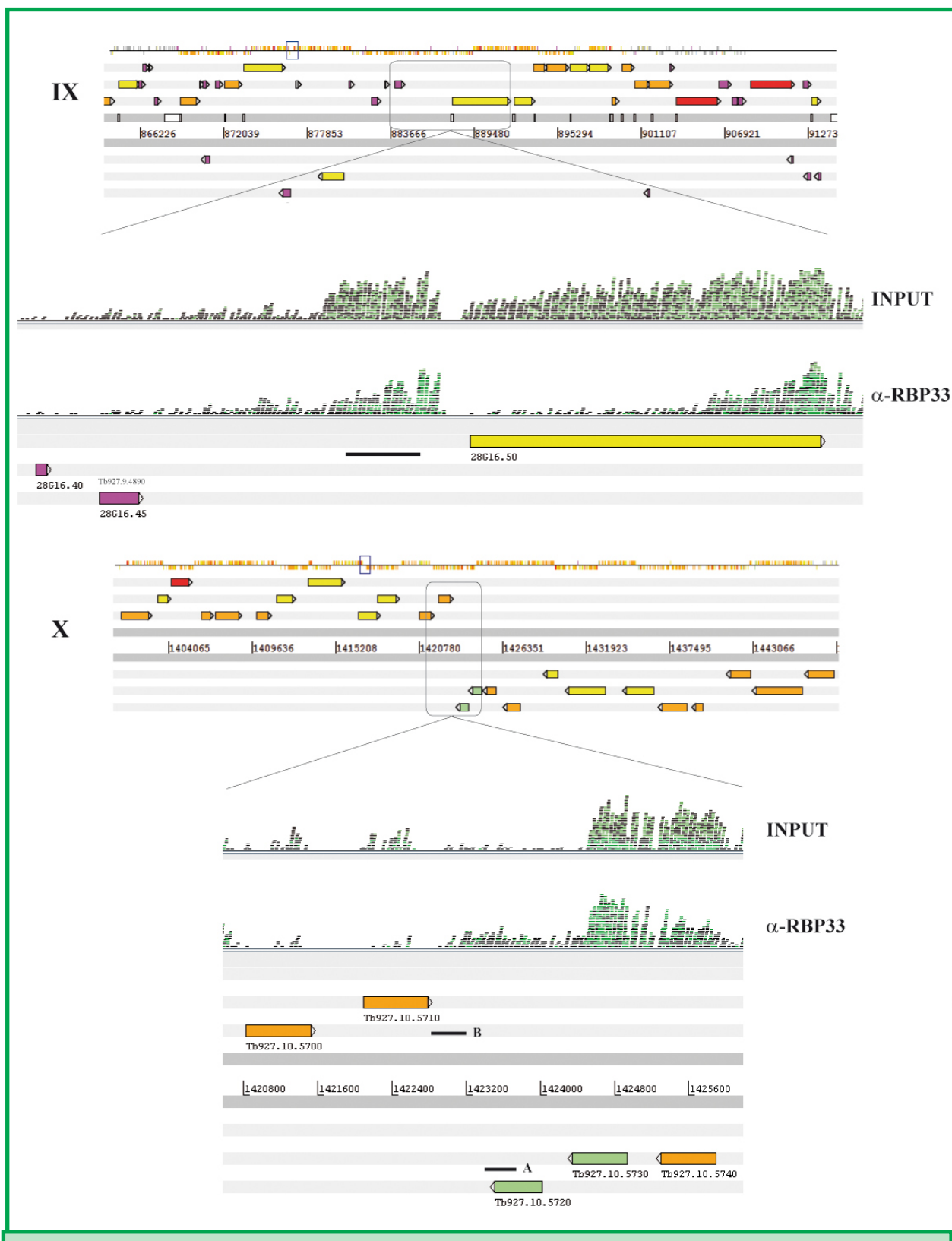


Figura V.24. Efecto del silenciamiento de RBP33 en la expresión de RNAs específicos.

Para validar los resultados obtenidos de las hibridaciones en microarrays, se analizó mediante northern blot la expresión de genes situados en regiones de cambio de dirección de la unidad de transcripción (cromosomas V, VII y X) o en regiones dentro de una unidad transcripcional (cromosoma IX). La línea negra indica la región del cromosoma que se utilizó como sonda en cada una de las hibridaciones. En detalle sobre los genes, se muestra la

visualización de las regiones utilizadas tras analizar los resultados de la secuenciación masiva. a-RBP33 indica el enriquecimiento de secuencias de RNA obtenido por inmunoprecipitación de los complejos RBP33-RNA. Input indica la expresión génica a nivel de transcriptoma obtenida por purificación del RNA total de tripanosomas procíclicos en condiciones de crecimiento normal.

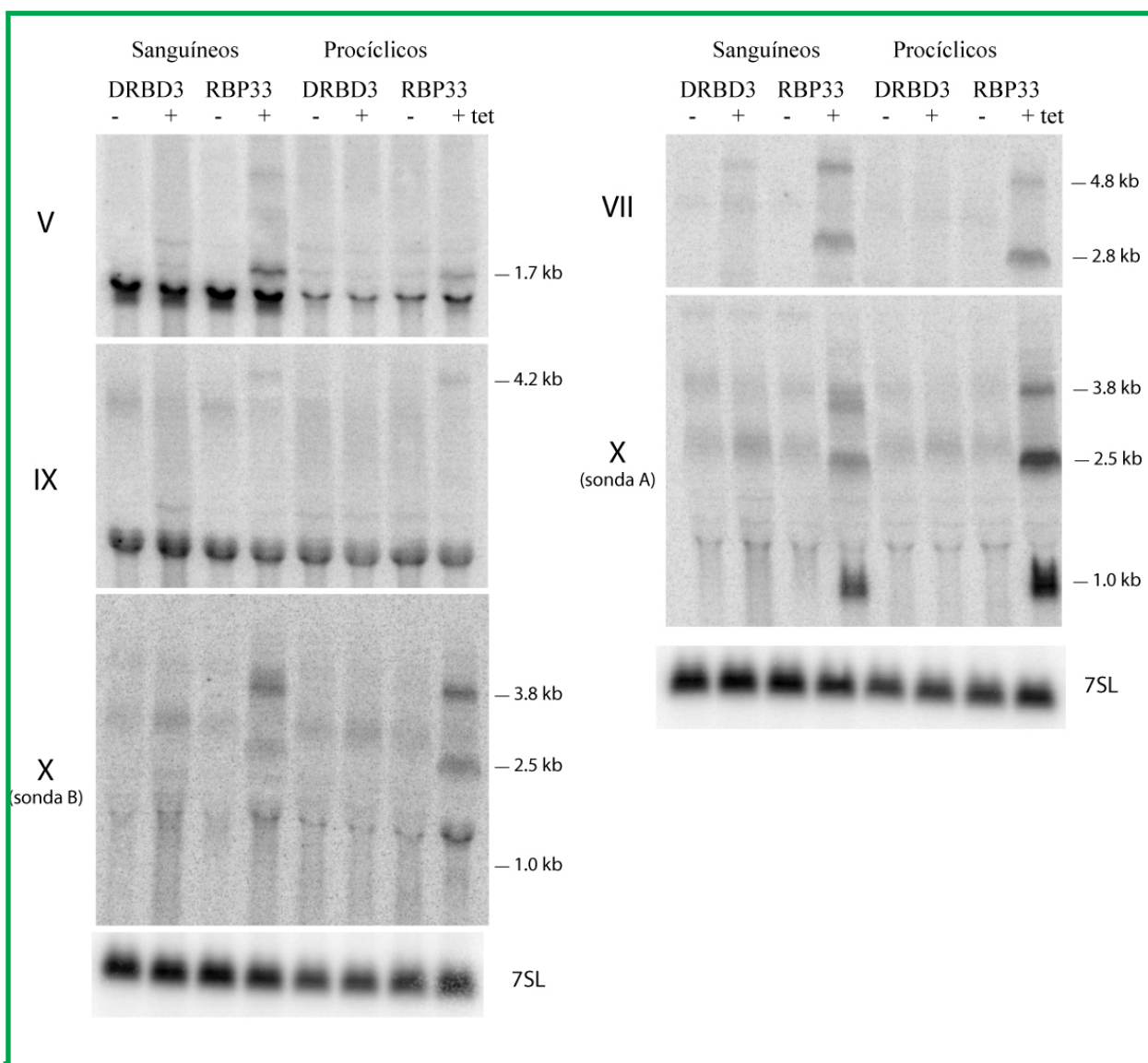


Figura V.25. Northern blot de cada una de las regiones indicadas en la figura 10.

Se utilizó como control una línea celular que silencia la proteína de unión a RNA DRBD3, para descartar la posibilidad de que los resultados se debiesen a alteraciones generales en la expresión génica debidas a muerte celular. Se cargaron en cada pocillo 15 µg de RNA total extraído de cultivos de tripanosomas sanguíneos y tripanosomas procíclicos crecidos durante 48 horas en presencia (+) o en ausencia (-) de tetraciclina para inducir el silenciamiento de la proteína RBP33. Se utilizó la sonda del RNA 7SL como control de carga.

de diferentes tamaños tras el silenciamiento de la proteína RBP33, como ocurre en el caso del cromosoma IX con la banda de 4,2 kb o en el cromosoma X, que identifica hasta 3 bandas diferentes con la sonda A, correspondiendo probablemente la banda de menor tamaño al transcrito del gen *Tb927.10.5720*. Como control de carga usamos la sonda del RNA del *7SL*. Estos resultados nos indican que el silenciamiento de la proteína RBP33 conduce a un aumento específico de transcritos derivados de regiones muy concretas del genoma que además, parecen estar silenciadas.

5.4.9 Unión de la proteína RBP33 a transcritos derivados de regiones convergentes del genoma de *T. brucei*.

Los resultados obtenidos nos indican la asociación de la proteína RBP33 con transcritos derivados de regiones concretas del genoma de *T. brucei*. Las regiones de cambio de hebra convergentes son especialmente interesantes

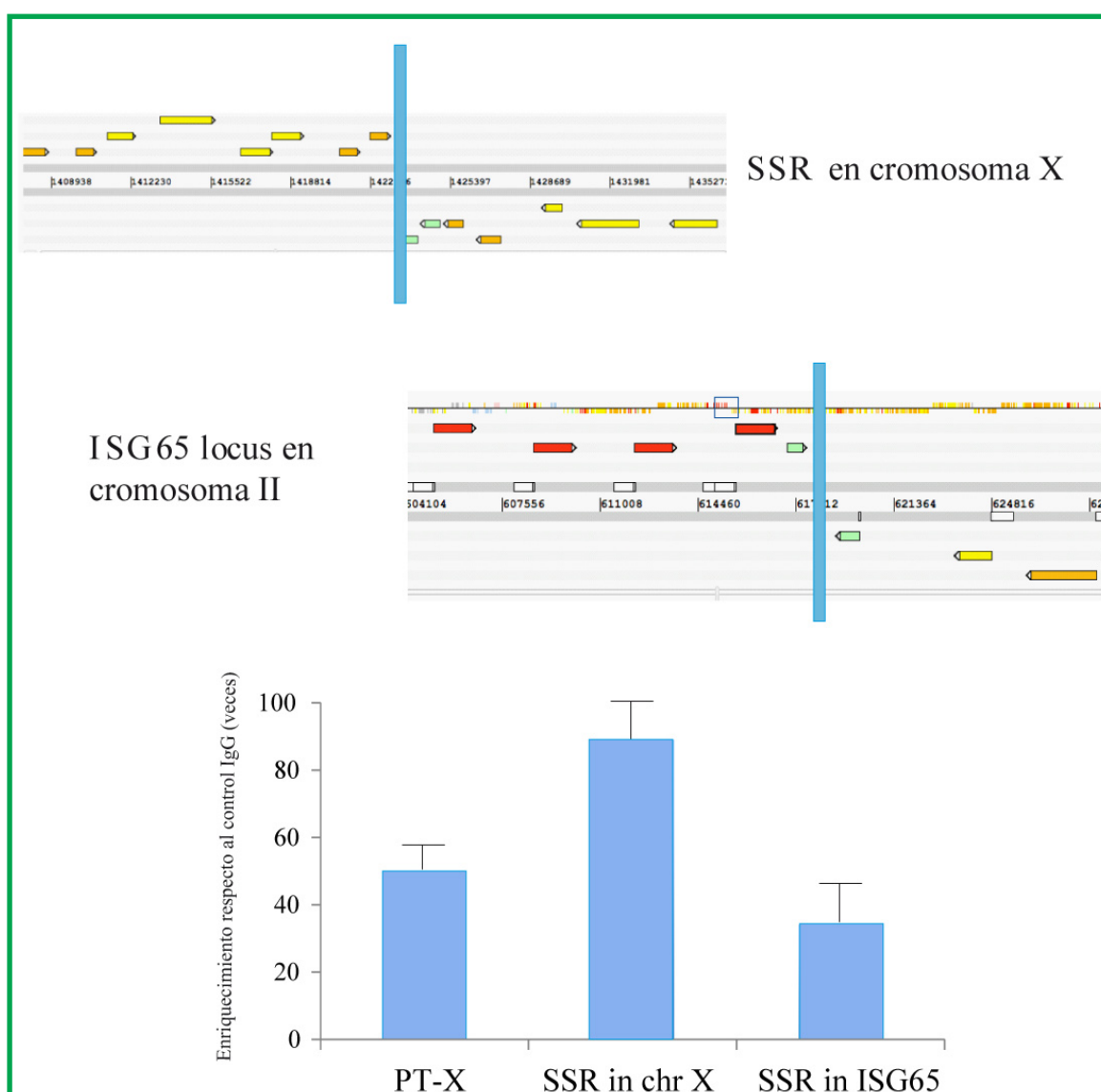


Figura 26. RBP33 une transcritos derivados de regiones de cambio de hebra convergentes.

Se utilizaron las mismas muestras de RNA obtenidas en el experimento de la Figura 17. Se cuantificaron mediante qRT-PCR los RNAs de las regiones convergentes del cromosoma X y II (barras verticales azules) respecto al control IgG. Utilizamos PT-X como control positivo de las reacciones de PCR. En la gráfica, observamos el enriquecimiento respecto al control IgG de ambas regiones seleccionadas.

debido a que son regiones de terminación de la transcripción por la RNA polimerasa II y poseen una conformación de la cromatina diferente del resto del genoma. Para ver si RBP33 se unía a transcritos derivados específicamente de este tipo de regiones, realizamos la cuantificación por qRT-PCR de los RNAs derivados de dos

regiones convergentes (Figura V.26). Como control positivo utilizamos el mRNA de *PT-X*, del que ya confirmamos su unión a RBP33 en la Figura V.23. Los resultados nos indicaron que en ambos casos, se producía un claro enriquecimiento respecto al control.

Discusión

Los tripanosomátidos son un conjunto de protozoos parásitos responsables de un grupo importante de enfermedades en humanos y animales domésticos. *Trypanosoma brucei* es el responsable de la tripanosomiasis humana africana (HAT), también conocida como la Enfermedad del sueño que sin tratamiento médico es mortal. Esta enfermedad afecta alrededor de 36 países africanos y hasta el momento el desarrollo de vacunas efectivas contra estos parásitos se ha visto impedido por la variación antigénica de las proteínas de superficie del parásito. Los tripanosomas no son sólo importantes desde el punto de vista médico y veterinario. Debido a que divergieron de manera temprana en el linaje eucariota (Baldauf, 2003), estos parásitos son unos de los organismos más ancestrales en la evolución eucariota, utilizándose como modelo para el estudio de características generales de la biología de los eucariotas.

Trypanosoma brucei tiene un ciclo de vida complejo que alterna entre un insecto vector y hospedadores mamíferos (Introducción. Figura II.2) lo que significa que está expuesto a grandes diferencias según el hospedador que parasita: cambios drásticos en el pH, en el tipo de nutrientes disponibles, la temperatura, la osmolaridad, las defensas del hospedador y el oxígeno del medio. Para adaptarse a estos cambios, el parásito tiene que regular su expresión génica de manera rápida y coordinada para adaptar su metabolismo energético, cambiar las proteínas de superficie o afrontar las defensas del hospedador entre otros. Sin embargo, la organización génica de los cromosomas supone un verdadero desafío para entender cómo se regula la expresión de genes en estos parásitos. El genoma de *T. brucei* está compuesto por 11 cromosomas mega-básicos con agrupaciones de pre-rRNAs, tRNAs, RNAs pequeños nucleolares (snoRNAs), RNAs pequeños nucleares (snRNAs), el RNA del spliced leader (SL) y los genes que codifican RNAs mensajeros (Berriman *et al*, 2005). Todas estas secuencias se agrupan en unidades transcripcionales policistrónicas (PTUs) en las

que pueden llegar a co-transcribirse hasta cien genes por la RNA polimerasa II desde sitios de inicio de la transcripción definidos por variantes de histonas específicas. La transcripción por la RNA polimerasa II comienza en los sitios de cambio de hebra (SSR) entre dos PTUs divergentes y termina en los sitios de SSR donde dos PTUs convergen (Siegel *et al*, 2009). Por otra parte, los genes que pertenecen a la misma unidad transcripcional, con escasas excepciones, no codifican proteínas relacionadas funcionalmente y además, pueden mostrar una gran diferencia en los niveles de sus mRNAs, pudiendo variar incluso durante el ciclo de vida del parásito. Estas observaciones, junto con el hecho de que el genoma de *T. brucei* parece estar transcrito de forma casi constitutiva (Siegel *et al*, 2009) y de la ausencia aparente de factores de transcripción, indica que la regulación de la expresión génica ocurre casi exclusivamente por mecanismos post-transcripcionales.

Debido a que el inicio de la transcripción no se regula de manera selectiva, se ha propuesto que proteínas de unión a RNA actúan como “factores de post-transcripción” al final de cascadas de señalización, uniendo los cambios ambientales a la abundancia de mRNA y proteínas (Fernandez-Moya & Estevez, 2010; Kramer, 2012). En la introducción hemos descrito algunas de las proteínas involucradas en la regulación de la expresión génica a nivel de *splicing*, transporte, estabilidad, localización, degradación y traducción de los RNAs mensajeros (Introducción. Tabla II.2). Por otra parte, la regulación de la expresión génica en tripanosomas puede ser vista como un proceso dinámico mediado por los llamados operones de RNA post-transcripcionales (PTROs) (Keene & Tenenbaum, 2002). Como ya hemos descrito en la introducción, los PTROs representan unidades modulares de RBPs que coordinan múltiples mRNAs que codifican proteínas relacionadas funcionalmente o proteínas que forman parte de rutas o procesos regulados durante el desarrollo y que actúan a todos los niveles, desde la síntesis del mRNA naciente hasta su traducción o degradación, creando una red tan compleja que es capaz de responder

de forma contundente y efectiva a cualquier cambio del medio en ausencia de regulación transcripcional.

Este trabajo de tesis se ha centrado en el estudio de dos proteínas de unión a RNA con dominios tipo RRM, *TbRBP33* y *TbDRBD3*, caracterizándolas bioquímica y molecularmente para llegar a conocer su papel en la regulación de la expresión génica de *Trypanosoma brucei*.

1. Alteración de los complejos mRNA-proteínas de DRBD3 en respuesta a estrés.

Como ya dijimos al principio, los tripanosomas sufren importantes cambios morfológicos y bioquímicos para poder adaptarse a las diferentes condiciones ambientales que van encontrando en los nichos de los hospedadores mamíferos y en los insectos vectores. Hasta el 30% del transcriptoma se remodela durante la diferenciación de tripanosomas sanguíneos de mamíferos a las formas procíclicas en insectos (Jensen et al, 2009; Kabani et al, 2009; Queiroz et al, 2009; Siegel et al, 2011). Como hemos dicho antes, debido a que el inicio de la transcripción no se regula de manera selectiva, se ha propuesto que las RBPs son las proteínas que actúan como “factores de post-transcripción” regulando estos cambios durante la vida del parásito, sirviendo de enlaces entre los cambios externos ambientales y los cambios del transcriptoma (Fernandez-Moya & Estevez, 2010; Kramer, 2012).

Sin embargo, todavía no se conocen los mecanismos por los que las RBPs traducen la información externa en cambios de los niveles de mRNA y proteínas. DRBD3 es una de las pocas proteínas caracterizadas en estos parásitos. Se une a un conjunto de mensajeros específicos y favorece su estabilización (Estevez, 2008; Stern et al, 2009). Hemos visto que DRBD3, en condiciones de cultivo normales, reside principalmente en el citoplasma. Sin embargo, bajo condiciones de estrés provocadas por arsenito, DRBD3 se concentra en el núcleo.

Un comportamiento parecido ha sido descrito para las RBPs UBP1 y UBP2 en *T. cruzi* (Cassola & Frasch, 2009). Este efecto parece ser específico de un conjunto de RBPs, debido a que otras RBPs no se translocan al núcleo en circunstancias similares en *T. cruzi* (Cassola & Frasch, 2009) y como hemos visto que ocurre con PABP1/2 y DHH1 (Figura VIII.2). El comportamiento de DRBD3 se adapta a la función de una proteína que viaja y transporta mRNAs específicos del núcleo al citosol. De hecho, una parte de la proteína se detecta también en el núcleo de células no estresadas (Figura V.1 y (Estevez, 2008)). En otro estudio sobre DRBD3, en el que se la llamó PTB1, se pudo observar una localización principalmente nuclear en condiciones estándar de crecimiento (Stern et al, 2009). Como se ha podido observar en otras RBPs en *T. cruzi* (Cassola et al, 2007), las condiciones de falta de nutrientes conduce a la acumulación de DRBD3 en gránulos de estrés (SG), como puede verse por la colocalización con el marcador de SG SCD6. En eucariotas, se cree que los SGs acumulan mRNAs traducibles en condiciones de estrés para protegerlos de la degradación hasta que las condiciones ambientales mejoran (Buchan & Parker, 2009). Este parece ser también el caso de tripanosomas, debido a que los niveles de los mRNAs regulados por DRBD3 no se alteran en condiciones de falta de nutrientes y permanecen unidos al complejo.

No se conoce demasiado la manera en la que las RBPs interactúan con otras proteínas para llevar a cabo su función en tripanosomas. Llevamos a cabo la purificación por afinidad en tándem (TAP) para investigar cómo afecta el estrés a la composición de los complejos ribonucleoproteicos de DRBD3. Encontramos que DRBD3 está asociada a determinadas proteínas en condiciones normales, formando un complejo estable. Las proteínas más abundantes del complejo son las proteínas de unión a poli(A) PABP1 y PABP2, y hasta 20 proteínas ribosomales. Comprobamos que la asociación con las PABPs era dependiente de RNA, y pudimos confirmarlo por detección de DRBD3 utilizando PABP1 y PABP2 fusionadas a TAP como cebo. Las consecuencias

funcionales de esta asociación son desconocidas por el momento, pero debido a que DRBD3 es una proteína estabilizadora, y las PABPs protegen a los mRNAs de la degradación por desadenilasas, es posible que DRBD3 fortalezca la interacción de las PABPs con los mRNAs, como se ha propuesto de otras RBPs en células de mamíferos (Garneau et al, 2007). DRBD3 es la proteína más abundante en los eluidos. Esto puede deberse a varias razones: a que no todas las moléculas de DRBD3 están asociadas a otras proteínas, a que pueden existir múltiples complejos y a que los complejos se disocian total o parcialmente durante la purificación. Debido a que el proceso de purificación por TAP lleva horas, lo más probable es que esté ocurriendo esto último. Esto significa que el material purificado contiene una mezcla de diferentes complejos, quizás representando la heterogeneidad en la célula pero también representando una mezcla de complejos que se han disociado parcial o totalmente durante la purificación.

La presencia de proteínas ribosomales en el material purificado por TAP sugiere que DRBD3 está asociada a ribosomas. Sin embargo, no pudo ser detectada ni en fracciones de polisomas ni en los ribosomas purificados por TAP. Las proteínas ribosomales son contaminantes muy frecuentes en numerosas purificaciones y se han identificado en muchos experimentos de inmunoprecipitación, aunque nunca tan abundantes ni tan numerosas (revisado en (Ouna et al, 2012)). Pensamos que la asociación a proteínas ribosomales, sin embargo, es específica. Primero, porque llevamos a cabo la purificación por TAP de las proteínas PABP2, RRP44 y de la secuencia TAP sola y se compararon sus patrones con la purificación de DRBD3 y los ribosomas y no se observaron contaminaciones aparentes de proteínas ribosomales en ninguna de las purificaciones de PABP2, RRP44 y TAP (ver Anexo, Figura VIII.3, B); y segundo porque el patrón de proteínas ribosomales observado es prácticamente idéntico en distintas purificaciones independientes (Figura VIII.3, B). La presencia de proteínas ribosomales en el TAP-DRBD3 puede explicarse si DRBD3 no

está físicamente asociado con los ribosomas, sino en la proximidad, por ejemplo en el retículo endoplasmático rugoso, formando estructuras citoplasmáticas que permanezcan agregadas durante el proceso de purificación. Esto coincide con el hecho de que no se purificaron proteínas ribosomales con DRBD3 tras el tratamiento con arsenito, cuando DRBD3 se encontraba principalmente localizada en el núcleo.

Bajo condiciones de estrés, encontramos que los mRNAs que une DRBD3 permanecen adheridos a la proteína. Los niveles totales de los transcritos AATP11 y PT-X disminuyen unas 2 veces tras el tratamiento con arsenito. Debido a que DRBD3 estabiliza los transcritos que une, estos resultados sugieren que no todas las moléculas de AATP11 y PT-X están unidas a DRBD3 en la célula y que el conjunto de transcritos que permanecen asociados a DRBD3 están más protegidos de la degradación en condiciones de presencia de arsenito. De hecho, se sabe que la mayoría de los mRNAs se asocian a múltiples RBPs en otros eucariotas (Keene, 2010). Además, en esta tesis hemos podido ver que RBP33, otra proteína de unión a RNA, también se asocia a PT-X en tripanosomas.

DRBD3 se disocia de muchas proteínas al inducir el estrés con arsenito, quedando asociadas únicamente las PABPs. Esto parece contradictorio, debido a que DRBD3 se transloca al núcleo pero no así las PABPs. Sin embargo, una cantidad significativa de DRBD3 permanece en el citoplasma en estas condiciones, donde puede asociarse a las PABPs. Las condiciones de falta de nutrientes, por otra parte, favorece la disociación de PABP2 pero no de PABP1, y la unión de la chaperona HSP70. Todos estos cambios indican que los complejos de DRBD3 se remodelan en respuesta a estímulos medioambientales. Los factores de *splicing* U1-70K y U1C, también copurifican con DRBD3. Se ha visto que la ausencia de DRBD3 provoca defectos en el *splicing* de los mRNAs que une (Stern et al, 2009), lo que con nuestros resultados, sugiere que DRBD3 se une a transcritos que se localizan en el núcleo, los transporta hasta el citoplasma y regula su destino a través de la asociación

con varias proteínas involucradas en el *splicing* y degradación del RNA.

2. Caracterización de 75RBP33.

RBP33 es una proteína que pertenece al grupo de proteínas con dominios RRM, uno de los dominios de unión a RNA mejor conservado en eucariotas (De Gaudenzi et al, 2005). También se ha identificado una posible señal de localización nuclear en la región adyacente al dominio RRM. La mitad carboxilo de la secuencia no tiene parecido con ninguna otra secuencia fuera de los tripanosomátidos, con lo que no disponemos de más información *a priori* que su posible capacidad para unir RNA. (Resultados. Figura V.6). Dentro de esta región carboxilo, se observaron varias cisteínas conservadas entre los tripanosomátidos pero situadas en zonas demasiado alejadas para llegar a conformar un dedo de zinc canónico. Por otra parte, como la región C-terminal de la proteína RBP33 es única en tripanosomátidos, se utilizó para la generación de anticuerpos policlonales, con los que pudimos identificar una banda de unos 40 kDa correspondiente a la proteína, mostrando la misma concentración de RBP33 en tripanosomas sanguíneos y procíclicos (Resultados. Figura V.7).

La compartimentalización subcelular es un fenómeno esencial en eucariotas ya que posibilita la ordenación y regulación de proteínas involucradas en una ruta bioquímica o en una ruta de señalización específica. Cada proteína necesita de un contexto espacial bioquímico determinado para llevar a cabo su función. RBP33 contiene en su secuencia una posible señal de localización nuclear *NLS* que marcaría a la proteína para su transporte desde el citoplasma hasta el núcleo. Mediante inmunofluorescencia indirecta pudimos observar que la proteína RBP33 se encontraba localizada principalmente en el núcleo, tanto en tripanosomas sanguíneos como procíclicos (Resultados. Figura V.8). Esto nos indica que la función de la proteína puede tener que ver

con el metabolismo del RNA en el núcleo: transcripción, procesamiento o transporte.

La ribointerferencia (RNAi) es un mecanismo de silenciamiento génico descubierto en *Caenorhabditis elegans* (Fire et al, 1998) como respuesta a la presencia de RNA de doble cadena (*dsRNA*). El fenómeno ha tenido un profundo impacto en el descubrimiento de nuevos aspectos de la biología eucariota y ha facilitado enormemente el análisis de la función génica, especialmente en organismos que no pueden ser estudiados por aproximaciones genéticas clásicas (por ejemplo, organismos en los que no estaba disponible su genoma). La introducción de *dsRNA* en una célula inicia una compleja cascada de eventos que terminan en la degradación del mRNA complementario a la secuencia del *dsRNA*. La molécula de *dsRNA* es identificada por la ribonucleasa *Dicer* (Hutvagner & Zamore, 2002), que corta el *dsRNA* en pequeños RNAs interferentes (*siRNAs*) de 20-25 nucleótidos. Los *siRNAs* entran en el complejo de silenciamiento inducido por RNA (RISC) que localiza el mRNA complementario y la actividad nucleasa de RISC lo degrada.

T. brucei fue el primer parásito protozoo en el que se demostró que la ribointerferencia era funcional (Ngo et al, 1998) al introducir una secuencia larga *dsRNA* homóloga al mensajero de la α -tubulina. Esto provocó la reducción de los niveles del mensajero y la consecuente inhibición de la síntesis de la correspondiente proteína. Actualmente es una herramienta ampliamente empleada en *T. brucei* para obtener una reducción dirigida y regulada en los niveles de expresión de una proteína (Ngo et al, 1998).

En el presente trabajo, utilizamos líneas celulares que expresan el represor TET mientras que los vectores utilizados para inducir el silenciamiento presentan en su secuencia promotores de la RNA polimerasa I inducibles por tetraciclina (Shi et al, 2000). Para ello, en el vector se clonan dos copias opuestas de la secuencia del mRNA de la proteína a silenciar

separadas por una región estabilizadora llamada *stuffer* y todo esto se integra de forma estable en las zonas silenciadas que se encuentran entre las unidades transcripcionales de DNAs ribosómicos.

La expresión del *dsRNA* sólo se consigue tras la adición de tetraciclina al medio de cultivo. Tras 48 horas de inducción con tetraciclina, los niveles de los mensajeros de RBP33 disminuyeron aproximadamente a la mitad (Resultados. Figura V.9A) mientras que los niveles de la proteína se redujeron hasta casi desaparecer (Resultados. Figura V.9B). El mismo resultado obtuvimos en las inmunofluorescencias de los cultivos inducidos, en los que la señal de RBP33 disminuyó hasta niveles basales (Resultados. Figura V.9C). La inducción del silenciamiento de la proteína RBP33 provocó un dramático efecto sobre el crecimiento de los cultivos de tripanosomas sanguíneos y procíclicos. A partir de las 48 horas de inducción, el crecimiento de los parásitos se ve afectado drásticamente, dejando de crecer y muriendo finalmente (Resultados. Figura V.9D). Esto indica que la función de la proteína RBP33 en tripanosomas sanguíneos y procíclicos es esencial. El hecho de que con el tiempo la población se recupere (al sexto y al octavo día en los cultivos de tripanosomas sanguíneos y procíclicos, respectivamente) se ha observado previamente en otros experimentos de RNAi en *T. brucei* en los que el silenciamiento de proteínas esenciales puede llevar en ocasiones a la selección de una población de células que escape a la muerte celular provocada por los *dsRNAs* específicos. Una posible explicación de estos resultados es la pérdida de la ribointerferencia por recombinación del marcador de selección en otra región del genoma. También puede estar ocurriendo la selección de células llamadas RNAi negativas que no son capaces de responder al *dsRNA* (Ullu et al, 2004).

Las proteínas con dominios RRM suelen estar involucradas en un gran número de procesos a través de la interacción específica

con el RNA. Sin embargo, recientemente los dominios RRM han centrado la atención de los científicos debido a su papel en el transporte de proteínas al núcleo y en las interacciones proteína-proteína (Cassola et al, 2010); (Kielkopf et al, 2004). Para comprobar si RBP33 es capaz de unir RNAs, se llevó a cabo la inmunoprecipitación de la proteína y el marcaje de la población de RNAs que pudiera haberse coimmunoprecipitado con RBP33 (método RIP, *RNA-immunoprecipitation*). Se utilizó como control la proteína DRBD3, que se une a un conjunto específico de mRNAs que codifican proteínas de membrana y enzimas del metabolismo intermediario (Estevez, 2008). Los resultados de los RNAs coimmunoprecipitados con RBP33 y DRBD3 y marcados con pCp muestran que al igual que DRBD3, RBP33 es una proteína con capacidad de unión a un conjunto de RNAs específicos (Resultados. Figura V.10; pCp). De hecho, es posible que ambas tengan afinidad por determinados RNAs concretos ya que se pueden observar varias bandas comunes en los geles de ambas inmunoprecipitaciones. Esto no es de extrañar: ambas proteínas fueron purificadas por afinidad al elemento URE de la 3' UTR del mensajero de PGK-B (Estevez, 2008) y es posible que sean capaces de unirse a los mismos elementos reguladores de determinados RNAs. Por otra parte, como la molécula de pCp se une en el extremo 3'OH de todas las moléculas de RNA de la muestra, para visualizar específicamente los mRNAs que une RBP33 utilizamos un marcaje mediante la retrotranscripción de los RNAs purificados utilizando oligo-d(T) como cebador que se unirá a la cola poli(A) de los mRNAs y dCTP como nucleótido marcado. De esta manera pudimos confirmar que parte de los RNAs que coimmunoprecipitan con RBP33 parecen ser RNAs mensajeros (Resultados. Figura V.10; oligo d(T)).

3. Identificación de proteínas asociadas a *TbRBP33*

La forma en la que las proteínas de unión a RNA interaccionan con otras proteínas para ejercer su acción es algo que todavía se

conoce muy poco en tripanosomas. Utilizamos el método de purificación en tándem (TAP) para determinar si RBP33 se une a otras proteínas en la célula. El método TAP tiene dos grandes ventajas sobre otros métodos convencionales. Primero, es extremadamente eficiente, proporcionando complejos con un alto grado de pureza para ser identificados por espectrometría de masas (MS). Segundo, todos los pasos de la purificación pueden llevarse a cabo en condiciones no desnaturalizantes que permiten mantener la funcionalidad al complejo proteico purificado. En tripanosomas, TAP se ha aplicado con éxito en la identificación de las proteínas que forman el exosoma (Estevez et al, 2001) y en la identificación de la maquinaria para la edición mediante inserción/delección de uridinas de los pre-mRNAs de la mitocondria (Panigrahi et al, 2003). Sin embargo, la presencia de la secuencia TAP en la proteína puede afectar a la función de la proteína o a los niveles de expresión de la misma. Para descartar estas posibilidades al expresar RBP33 con la secuencia TAP en la región N-terminal de la proteína, se integró de forma estable el plásmido de expresión de TAP-RBP33 en el *locus* del gen que codifica la proteína RBP33 en una línea de tripanosomas procíclicos parental y en una línea de ribointerferencia de la proteína endógena RBP33 (Resultados. Figura V.12,B). Mediante inmunoblot pudimos comprobar que la proteína TAP-RBP33 se expresaba adecuadamente en los cultivos, mientras que los niveles de la proteína endógena se reducen a la mitad, efecto de la integración de la secuencia de la proteína TAP-RBP33 en uno de los alelos del gen de RBP33. La inducción con tetraciclina del silenciamiento de la proteína endógena condujo hasta la desaparición de su señal en el inmunoblot mientras que los niveles de la proteína TAP-RBP33 incluso aumentaron (Resultados. Figura V.13,A) indicando la necesidad de mantener unos niveles de proteína específicos en las células ya sea mediante el aumento de la traducción de la secuencia presente o mediante la disminución de la degradación de la proteína. Por otra parte, la presencia de la secuencia TAP no impide que la proteína se localice en el núcleo tal y como

lo hace la proteína endógena, difiriendo de la localización del epítipo TAP que expresado por sí solo permanece en el citosol (Resultados. Figura V.13,C). Por último y más importante, TAP-RBP33 demostró ser funcional al recuperar la viabilidad de los cultivos en los que el silenciamiento de la proteína endógena conduce a la muerte celular tras 48 horas de inducción con tetraciclina (Resultados. Figura V.13,B).

La proteína TAP-DRBD3 se utilizó como control positivo de la purificación, ya que hemos comprobado que se asocia a multitud de proteínas *in vivo* (Fernandez-Moya et al, 2012).

Los resultados indican que RBP33 parece estar asociada a las proteínas UPF1 (*up-frameshift 1*) y PABP2 (*poly(A) binding protein 2*), además de a sí misma como pudimos observar en la purificación TAP pero también en el inmunoblot del seguimiento de la purificación, donde aparece la proteína endógena en todos los pasos de la purificación hasta el eluido con EGTA (Resultados. Figura 13,A).

La proteína UPF-1 es una RNA helicasa conservada en todos los eucariotas, necesaria para la degradación de mRNAs con codones de parada prematuros mediante el proceso llamado NMD (*nonsense mediated decay*). Los codones de terminación prematuros (PTCs, *premature stop codons*) pueden darse por un cambio en el marco de lectura al transcribir el mRNA, por mutaciones puntuales o como consecuencia de defectos en el *splicing* (Maquat, 2005). UPF1 se localiza en el citoplasma y, mediante mecanismos que implican que el mRNA con el PTC se esté traduciendo, estimula la rápida destrucción del mismo (Singh et al, 2007). En *T. brucei* se ha identificado el homólogo de la proteína Upf1, *TbUPF1*, que interacciona con *TbUPF2* y, de una manera dependiente de RNA, con la proteína de unión a poli(A) PABP1. Estudios con la proteína *TbUPF1* indican que la ausencia de la proteína no tiene efectos sobre el crecimiento de *T. brucei* ni sobre los niveles de los mRNA totales (Delhi et al, 2011). Todo esto, junto con el hecho de que el gen de UPF1

está muy conservado en los kinetoplastos, indica que *TbUPF1* debe tener alguna función específica en estos parásitos pero no está clara la existencia de un mecanismo clásico de NMD y su posible implicación en él (Delhi et al, 2011).

Recientes estudios abren nuevas alternativas a la posible función de *TbUPF1* en tripanosomas, al descubrir en células humanas, nuevas funciones de la proteína Upf1 posiblemente no relacionadas con NMD y que son llevadas a cabo en el núcleo (Azzalin & Lingner, 2006) han observado una implicación directa de Upf1 con la replicación del DNA; la ausencia de Upf1 provoca la parada del crecimiento en la fase S temprana, impidiéndose la progresión y la terminación de la replicación del DNA y observándose además una posible interacción con la subunidad δ de la DNA polimerasa. Chawla *et al.* (Chawla et al, 2011) indican que Upf1 y otros factores que participan en NMD, se unen al telómero en células humanas, evitando el daño telomérico. Por otra parte, estudios bioinformáticos han detectado posibles interacciones con numerosas proteínas del núcleo, indicando que la función de Upf1 no se centra únicamente en la replicación del DNA sino también en el procesamiento del RNA naciente y en la terminación de la transcripción por la RNA polimerasa (Varsally & Brogna, 2012). De hecho, los resultados obtenidos de RNA-Seq y de los microarrays sugieren que la proteína RBP33 pueda estar implicada en la regulación de la elongación, quizás a través de la interacción con la proteína *TbUPF1*.

La proteína de unión a poli(A) (PABP) también es una proteína muy conservada en eucariotas que se une a la cola poli(A) y actúa en la regulación de la eficiencia de traducción y en la estabilidad del mRNA. Para ello, PABP (también conocida como PABPC) se une a extremos del mRNA a través de las interacciones con la cola poli(A) y con el complejo de unión a la caperuza a través de la proteína de inicio de la traducción eIF4G (Le et al, 1997). La formación de este círculo cerrado favorece el inicio de la traducción de los transcritos y su estabilidad y puede suponer

un punto de control de la estabilidad de los mRNAs antes de su traducción. A través de la interacción adicional con el factor de liberación de la traducción eRF3, PABP podría estar acoplado a la terminación de la traducción y el reciclaje de los ribosomas con la degradación de los mRNAs (Hosoda et al, 2003). Además, PABP participa en la biogénesis, degradación y procesamiento del mRNA (Hosoda et al, 2006). Por otra parte, la disociación de PABP de la cola poli(A) permitiría la desadenilación, primer paso para la ruta principal de la degradación de los mRNAs. Por último, esta proteína parece estar involucrada en el transporte de los mRNAs al citoplasma (Brune et al, 2005).

Los homólogos de PABP han sido descritos en tripanosomátidos. El primero en identificarse fue PABP1, en *T. cruzi*, que está codificado por dos genes repetidos y situados en tándem y se expresa de manera constitutiva (Batista et al, 1994). El ortólogo de *T. brucei* *TbPABP1* también ha sido caracterizado y conserva una similitud del 86% con la proteína de *T. cruzi* (Hotchkiss et al, 1999). PABP1 de *Leishmania major* (*LmPABP1*) está codificada por un gen de copia única que se expresa de forma constitutiva durante el ciclo de vida de *Leishmania* y únicamente conserva un 35% de similitud con los homólogos de *Trypanosoma*. Aparte, junto con *LmPABP1*, se han identificado otros dos homólogos de PABP: *LmPABP2* y *LmPABP3*. De los tres, únicamente las dos primeras proteínas están conservadas con el resto de los tripanosomátidos (da Costa Lima et al, 2010). En *T. brucei* el silenciamiento de las proteínas *TbPABP1* y *TbPABP2* condujo a resultados similares: reducción del crecimiento entre las primeras 24 y 48 horas tras la inducción con tetraciclina y la muerte celular en pocos días, aunque esta última consecuencia fue más rápida en el caso del silenciamiento de *TbPABP2* que de *TbPABP1* (da Costa Lima et al, 2010). En *Leishmania*, la inhibición de la transcripción con actinomicina D, condujo a un cambio en la distribución de *LmPABP2* y -3 hacia el núcleo, pero no en el caso de *LmPABP1* (da Costa Lima et al, 2010)) En *Chritidia fasciculata*, el ortólogo de PABP2 forma parte de un complejo que reconoce elementos en las regiones no

codificantes de un conjunto de mRNAs que se acumulan de forma periódica durante el ciclo celular (Mitra & Ray, 2004). Todos estos datos indican que las proteínas PABP1 y PABP2 en tripanosomátidos se unen a diferentes moléculas y llevan a cabo funciones distintas y esenciales para la supervivencia celular, siendo PABP1 la proteína que esté realizando las funciones ya definidas para PABP en traducción en otros eucariotas mientras que es posible que PABP2 actúe como un acompañante de diferentes proteínas de unión a RNA involucradas en el control post-transcripcional de la expresión de mRNAs específicos. Otros papeles que puede estar desarrollando PABP2 en tripanosomas pueden ser asociado al procesamiento y exportación del mRNA, considerando que tras inhibir la transcripción, *LmPABP2* y *LmPABP3* en *Leishmania* se relocalizaron en el núcleo. Además, en *T. brucei*, PABP2 se asocia al complejo U1 snRNP, necesario para el *cis splicing* del intrón que se encuentra en el mensajero de la poli(A) polimerasa (Palfi et al, 2002). Recientes estudios han identificado PABP2 como una de las proteínas presentes en los gránulos perinucleares (NPG), en los que se localizan transcritos parcialmente procesados, con caperuza y cola poli(A) pero que contienen dos o más marcos de lectura en tándem. Estos gránulos se forman al inhibir el *trans-splicing* en tripanosomas y son muy similares a los cuerpos P (Cassola et al, 2007), ya que contienen todas las proteínas identificadas en éstos. Sin embargo, se diferencian de los cuerpos P en que su formación es dependiente de una transcripción activa. Estos datos involucran a la proteína PABP2 en la salida de transcritos al citoplasma o en el control de calidad de los nuevos transcritos antes de su liberación por completo al citoplasma (Kramer et al, 2012). De hecho, estudios recientes han determinado que en condiciones de inhibición de la maduración de los mRNAs con sinefungina, una parte de la proteína *TbPABP2* se localiza en el núcleo; si además, se combina la inhibición del *trans-splicing* con la inhibición de la exportación del mRNA inducido por choque térmico, esto da lugar a una gran acumulación de *TbPABP2* en el núcleo (Kramer et al, 2013), indicando que

es posible que componentes de los NPGs se originen primero en el núcleo, donde PABP2 se une a los mRNAs durante su maduración y sea exportado junto con éstos, determinando su destino.

En resumen, es posible que algunas de las interacciones que estamos observando en la purificación con el TAP sean dependientes de RNA; esto explicaría la purificación de UPF1 como una interacción indirecta a través de la interacción dependiente de RNA con PABP2. Sin embargo, este tipo de interacción solo ha sido descrita con PABP1 (Delhi et al, 2011). Por otra parte, otra de las posibles funciones de PABP2 en el núcleo se ha descrito como acompañante de proteínas de unión a RNA en la identificación de mRNAs específicos en el núcleo, con lo que la interacción con RBP33 podría estar encaminada a tal fin. Sin embargo, únicamente con los datos de la purificación es imposible llegar a determinar la posible función de la proteína RBP33 en *T. brucei*. La purificación TAP de los recíprocos de PABP2 y UPF1 pueden confirmar la unión con RBP33 y posteriores experimentos de purificación en presencia de RNAsas descartarían las dudas acerca del tipo de interacciones de UPF1 con RBP33.

4. Modificaciones post-traduccionales de la proteína *TbRBP33*

En tripanosomas, las proteínas de unión a RNA están involucradas en la coordinación de la mayoría de los procesos que controlan la regulación génica a nivel post-transcripcional. En las células de mamíferos, existen numerosos ejemplos que demuestran una conexión entre la regulación de la traducción y degradación de los mRNAs y la señalización extracelular, llevada a cabo a través de cascadas de fosforilación y/u otras modificaciones post-traduccionales. Esto apunta a que la actividad de las proteínas de unión a RNA en tripanosomas podría alterarse de diferente manera según el tipo de modificaciones post-traduccionales a las que se vean sometidas en respuesta a cambios del medio extracelular.

La fosforilación de proteínas es una modificación post-traducciona reversible que supone un mecanismo clave para el control de la función de las proteínas a través de su activación/desactivación o del cambio en su localización subcelular. La fosforilación de las proteínas regula numerosos procesos celulares, incluyendo las rutas metabólicas, la transcripción génica, el transporte de membrana y la división celular. La fosforilación se da predominantemente en los residuos de serina, treonina y tirosina. El análisis *in silico* de la secuencia de la proteína RBP33 con el programa NetPhos mostró la existencia de numerosos residuos que podían ser fosforilados *in vivo* (Resultados. Figura 11,A). El uso de geles desnaturalizantes SDS-PAGE con Mn²⁺-Phostag marcó la proteína RBP33 fosforilada, reduciendo su velocidad de migración en el gel respecto a la proteína desfosforilada por la fosfatasa alcalina (CIAP). Pudimos observar que tanto en tripanosomas sanguíneos como en tripanosomas procíclicos, la proteína RBP33 se encontraba fosforilada *in vivo*. DRBD3, por otra parte, no sufrió cambios en la movilidad de su proteína tras el tratamiento del extracto proteico con CIAP, indicando que la proteína no se encuentra fosforilada en ninguna de estas dos formas de vida.

La fosforilación provoca diversos cambios en las proteínas de unión a RNA. Por ejemplo, la proteína de unión a RNA KSRP se une a diferentes grupos de mRNAs favoreciendo su degradación en el citosol. La fosforilación de KSRP en la región C-terminal por la MAP quinasa p38, altera la conformación de la proteína, convirtiéndola en una proteína incapaz de unirse a sus mRNAs. Además, KSRP puede ser fosforilada en la región N-terminal por la AKT quinasa, que conduce al secuestro de la proteína en el núcleo y en la estabilización de un conjunto de mRNAs específico (Diaz-Moreno et al, 2009).

En levaduras y en humanos, la metilación post-traducciona de los residuos de arginina en las proteínas afecta multitud de procesos, incluyendo la transcripción, el procesamiento

del RNA, la replicación y reparación del DNA y la transducción de señales. La metilación de las argininas altera las funciones de las proteínas influenciando las interacciones proteína-proteína, proteína-ácidos nucleicos y el tráfico de las proteínas en la célula. La unión del grupo metilo a la arginina, mantiene la carga de la arginina pero altera la forma de la cadena lateral, incrementando la hidrofobicidad y eliminando un grupo donante de hidrógeno. Debido a esto es muy común que las proteínas metiladas en las argininas alteren su habilidad de unirse a otras proteínas o a otros ácidos nucleicos (Fisk & Read, 2011).

El análisis aún no publicado de las proteínas metiladas en tripanosomátidos realizado en el laboratorio de la Dr. Laurie K. Read de la Universidad de Búfalo (Nueva York, EE.UU.) y al que hemos tenido acceso nos indicó la existencia de un residuo de arginina metilado en la proteína RBP33. Para estudiar los efectos de la metilación en RBP33, sustituimos la arginina por un residuo de lisina (R130K) en la secuencia de la proteína TAP-RBP33 y la expresamos en la línea de interferencia que utilizamos con el TAP-RBP33 wt. Ni la expresión, ni la localización celular de la proteína ni el crecimiento de los cultivos se vio alterado significativamente al introducir la mutación en el residuo de arginina metilado, respecto al cultivo TAP-RBP33 wt.

Las modificaciones post-traduccionales alteran la función de las proteínas en respuesta a cambios externos. RBP33 se expresa a la misma concentración tanto en tripanosomas sanguíneos como en tripanosomas procíclicos. Cabe la posibilidad de que la fosforilación/desfosforilación de RBP33 altere la actividad, localización o la afinidad de la proteína por el grupo de RNAs que une. Debido a que la proteína se encuentra fosforilada en ambas formas de vida, es posible que la modificación se lleve a cabo durante la diferenciación de sanguíneos a procíclicos o viceversa. Recientemente se ha demostrado que la acción de *Tb*PPT1, una proteína tirosina fosfatasa es la principal responsable del inicio de la diferenciación a procíclicos, indicando la gran

importancia que este tipo de modificación post-traducciona l tiene en tripanosomas (Szoor et al, 2006). Por otra parte, los resultados en los cultivos RNAi de la proteína RBP33 endógena que expresan TAP-RBP33 con el residuo de arginina mutado a lisina (R103K), indican que, al menos en el caso de la metilación en tripanosomas procíclicos, no tiene efecto alguno sobre la localización de la proteína o sobre la función esencial de la misma, ya que TAP-RBP33 R103K es capaz de mantener la supervivencia de los parásitos en ausencia de la proteína RBP33 endógena. De nuevo, quedaría por ver qué efecto tiene la metilación de RBP33 en tripanosomas sanguíneos y durante la diferenciación, o en distintas condiciones de estrés (oxidativo, ayuno, etc.). Futuros experimentos mutando los residuos que pueden estar siendo fosforilados (aquellos con un valor de probabilidad de fosforilación por encima de 0,5 según el programa NetPhos) en la proteína RBP33 podrían resultar relevantes para un conocimiento más detallado de su acción en tripanosomas.

Estos resultados demuestran que RBP33 es la primera proteína de unión a RNA identificada en tripanosomátidos en la que se han visto diferentes tipos de modificaciones post-traduccionales cuya función en la actividad, localización o unión a RNAs queda por determinar.

5. Identificación de los RNAs asociados a TbRBP33

El transcriptoma, el conjunto completo de los transcritos expresados en una célula en un determinado momento, representa la unión clave entre la información codificada en el DNA y el fenotipo. Los microarrays de expresión génica se han utilizado en multitud de tipos celulares para determinar los cambios de la expresión génica en diferentes condiciones y entre especies.

Para analizar la población de RNAs susceptible de regulación por la proteína RBP33, se comparó el transcriptoma de un cultivo RNAi de RBP33 de tripanosomas procíclicos con un cultivo sin

inducir. Tras aislar las muestras de RNA, se transcribieron en reverso a cDNA en presencia de nucleótidos fluorescentes. Debido a que los transcritos se marcan con estos nucleótidos, la intensidad de la señal puede utilizarse como medida de la expresión génica.

Los resultados indican que la ausencia de RBP33 da lugar a un aumento en los niveles de un conjunto de RNAs, la gran mayoría anotados como proteínas de función desconocida (*hypothetical protein*), proteína hipotéticas conservadas (*hypothetical protein conserved*) o proteínas poco probables (*hypothetical protein unlikely*). Sólo unos pocos codificaban proteínas de función conocida, correspondiendo casi por completo a proteínas RHS (*Retrotransposon Hot Spot Protein*), proteínas cuyos genes se localizan en las regiones repetitivas subteloméricas de los cromosomas así como en el centro de unidades transcripcionales y son genes con alta probabilidad de ataque por parte de retrotransposones (Grynberg et al, 2012). La gran mayoría de los genes que codifican los transcritos identificados se encuentran próximos a o en regiones de cambio de hebra (SSR), y en los extremos de los cromosomas. Ninguno de estos datos nos dio una idea de la posible función de RBP33.

El análisis del transcriptoma basado en el tradicional microarray tiene numerosas desventajas, incluyendo la dificultad de obtención de microarrays de alta calidad en organismos nuevos o poco estudiados como ocurre con los tripanosomátidos, y la falta de precisión necesaria para la identificación del 5' sitio aceptor de splicing (SAS) y del sitio de poliadenilación (PAS) en 3' en estos organismos, además de limitaciones como es el número de genes por microarrays, la identificación de señales diferenciales en transcritos poco expresados o el ruido de fondo. El análisis por secuenciación masiva tiene muchas más ventajas: el RNA-Seq no está limitado a la detección de transcritos que correspondan con secuencias génicas ya conocidas, puede ser utilizado para el estudio de todo el genoma y de los niveles de RNA del transcriptoma y puede marcar de forma precisa las regiones del

3' PAS y del 5' SAS, tiene un ruido de fondo muy bajo y una capacidad de análisis que está limitado únicamente por la profundidad de la secuenciación (Wang et al, 2009).

Los datos obtenidos con los microarrays nos llevaron a decantarnos por la secuenciación masiva para la identificación de los mRNAs que se unen específicamente a RBP33. Tras la purificación de los RNAs asociados a RBP33 mediante el método RIP (ver M & M) y la purificación de los RNAs totales obtenidos de células del mismo cultivo, las muestras fueron procesadas según el protocolo aportado por el kit de secuenciación masiva de Illumina y enviadas a secuenciar al Instituto Sanger en Hinxton, Reino Unido. La normalización y el análisis estadístico de la expresión diferencial de los datos obtenidos en la secuenciación, generó una lista de RNAs enriquecidos de forma significativa respecto al control. El 53% de los RNAs identificados pertenecen a un conjunto de secuencias que codifican proteínas que por su estructura han sido identificadas *in silico* como posibles proteínas pero que por su tamaño o por la ausencia de homólogos, se consideran hipotéticas. Un 16% de los RNAs identificados pertenecen a RNAs transcritos normalmente por la RNA polimerasa III y el resto de RNAs codifican proteínas conservadas y/o conocidas. Una observación más detallada de los datos obtenidos por secuenciación masiva nos reveló que la mayor parte de las secuencias obtenidas en los arrays se correspondían con los RNAs identificados por RNA-Seq (Tabla VIII.1). Sin embargo, en el caso de los transcritos de las RHS, no vimos una relación directa de éstos con la proteína RBP33 que pudiese explicar el enriquecimiento observado en los resultados de los microarrays. La distribución de las secuencias obtenidas por RNA-Seq en el genoma de *T. brucei* nos permitió analizar los resultados con un poco más de perspectiva: la mayor parte de las lecturas que alinean con genes hipotéticos (código de color: verde, morado) se localizan en SSR convergentes, y en menor medida en SSR divergentes y en los extremos del cromosoma. De las lecturas que se alinean en regiones del genoma dentro de unidades de transcripción policistrónicas, una

parte coincide con genes que se transcriben en la dirección opuesta a la de la dirección de la unidad de transcripción o en regiones adyacentes a grandes espacios vacíos dentro de los cromosomas, y en zonas que separan segmentos transcritos por diferentes RNA-polimerasas y el resto son lecturas que pertenecen a genes que codifican proteínas conocidas. De entre estas, se observan casos excepcionales de enriquecimiento en la muestra de la IP con anti-RBP33: las regiones correspondientes a los genes de FTZC (*flagellum transition component zone*; Tb927.10.8590), PT-X (*pteridin transporter from chromosome X*; Tb927.10.9080) y el gen que codifica la propia proteína RBP33 (Tb927.8.990) son zonas que muestran la unión específica de la proteína RBP33 a los transcritos derivados de esos genes. Del análisis GO del conjunto de los transcritos identificados que codifican proteínas conocidas y/o validadas experimentalmente, destacó un enriquecimiento claro en proteínas de membrana y actividades transportadoras de cofactores. Además, algunos de los transcritos identificados que codifican proteínas de membrana involucradas en el transporte de pteridinas y aminoácidos, se encuentran asociados tanto a RBP33 como a la proteína DRBD3 (AATP11 (*amino acid transporter protein 11*) y PT-X, entre otros).

En nuestro laboratorio se identificaron mediante microarray y northern blot el conjunto de mensajeros que se asocia a DRBD3 y que codifican proteínas de membrana y enzimas del metabolismo intermediario de tripanosomas (Estevez, 2008). Los resultados obtenidos del análisis del mensajero de la luciferasa con las 3' UTRs de alguno de los transcritos identificados, junto con otros experimentos de vidas medias nos indicaron que la proteína DRBD3 se une a los mensajeros y los protege de la degradación. Al igual que DRBD3, RBP33 une transcritos que codifican proteínas de membrana relacionadas con el transporte de diversos metabolitos. Como ya dijimos anteriormente, DRBD3 y RBP33 fueron purificadas ambas por unión a una misma secuencia URE de PGK-B (Estevez, 2008) y debido a esto es posible que parte del motivo de reconocimiento de RNA

de ambas proteínas sea similar, asociando a un conjunto de mensajeros de membrana comunes. Sin embargo, los datos iniciales de los arrays indican que la ausencia de RBP33 provoca un enriquecimiento general de un conjunto de transcritos, apuntando a una posible función favoreciendo la degradación o la transcripción de determinados RNAs mientras que DRBD3 ejerce la función opuesta estabilizando los transcritos que une.

5. Análisis de la acción de TbRBP33 sobre transcritos que codifican proteínas conocidas

Las secuencias de regulación localizadas en las regiones no codificantes de los mRNAs juegan un papel fundamental en el control tanto de la estabilidad de los transcritos como en la eficiencia de su traducción. Para comprobar si el silenciamiento de la proteína tenía algún efecto sobre la expresión de los mensajeros que une, generamos varias construcciones sustituyendo la 5' y la 3' UTR de la luciferasa por la correspondiente del mensajero de PT-X. Las construcciones se integraron de forma estable en una línea RNAi de RBP33 de tripanosomas procíclicos. El análisis por northern blot de los RNAs de las muestras indica que en ausencia de RBP33 se incrementa casi imperceptiblemente la concentración del mensajero de PTX. La sustitución de la 5' UTR del transcrito de la luciferasa por la del mensajero de PTX no generó ninguna variación en los niveles luciferasa tanto en condiciones normales como al inducir el silenciamiento de RBP33. Sin embargo, al sustituir la 3' UTR del mRNA de la luciferasa por la de PTX, los niveles de los transcritos de la luciferasa aumentaron, aunque la inducción del silenciamiento de RBP33 no afectó apenas a estos niveles respecto a los del cultivo sin inducir (Resultados. Figura V.22,B). De hecho, estos resultados concuerdan con los resultados obtenidos en los microarrays: de haberse dado un enriquecimiento significativo de los transcritos de PT-X en ausencia de la proteína RBP33, se habría identificado el mensajero previamente a los análisis realizados

con RNA-Seq.

Por otra parte, analizamos la señal de los transcritos de la proteína FTZC. FTZC se trata de una proteína localizada en la región más próxima al axonema, en la zona de transición cuyo silenciamiento no produce ningún tipo de fenotipo letal ni cambios en la morfología o en el crecimiento de los cultivos (Bringaud et al, 2000). Al igual que con el mensajero de PTX, la inducción del silenciamiento de la proteína RBP33 no afectó a los niveles del transcrito de FTZC.

Todos estos datos apuntan a que RBP33 no tiene implicación en la regulación de la estabilidad del conjunto de transcritos que une.

A pesar de su localización nuclear, quisimos comprobar si la proteína RBP33 tiene algún papel en la traducción de los mRNAs a proteína. Utilizamos los cultivos anteriores con las construcciones de luciferasa y llevamos a cabo la cuantificación de la señal de la proteína como reflejo de lo que podría estar ocurriendo con el mensajero de PTX. Sin embargo, el silenciamiento de la proteína RBP33 no condujo a cambios significativos de la señal de la proteína luciferasa en estos cultivos. Por otra parte, el Dr. Frédéric Bringaud nos cedió anticuerpos anti-FTZC con los que pudimos comprobar que no existe ningún efecto del silenciamiento de RBP33 sobre la expresión de la proteína FTZC tanto en tripanosomas sanguíneos como en procíclicos.

Resumiendo, la actividad de RBP33 no parece tener relación ni con la degradación y estabilidad de los RNAs ni con la traducción del mensajero a proteínas.

Esto nos condujo a preguntarnos si los resultados obtenidos en el RNA-Seq derivan de la interacción específica con la proteína RBP33 como se supone, ya que en principio la presencia o ausencia de la proteína no produce ningún cambio en los dos transcritos seleccionados de la tabla de resultados de RNA-Seq. Para comprobar que los datos de secuenciación están reflejando lo que está ocurriendo en los tripanosomas, se validaron un grupo de transcritos mediante PCR cuantitativa (*qRT-PCR*). Tomamos como control de las PCRs el

mensajero de la actina (ACT) puesto que en los resultados de la secuenciación no reflejaba expresión diferencial respecto al control INPUT. Entre los transcritos seleccionados utilizamos PT-X y FTZC, para observar que se da la unión de RBP33 a estos transcritos.

El enriquecimiento de más de 20 veces en la mayoría de los transcritos utilizados unidos por la proteína RBP33 respecto al control de la inmunoprecipitación con IgG nos confirmó la validez de los datos obtenidos por microarrays. Además tanto los transcritos de PTX como los de FTZC mostraron un enriquecimiento importante siendo el caso más llamativo el del transcrito de *FTZC*, con un enriquecimiento de aproximadamente 90 veces respecto al control.

5. Análisis de la acción de TbRBP33 sobre transcritos que codifican productos no identificados.

Del total de secuencias identificadas en el análisis del RNA-Seq, un 53% se corresponden con genes que codifican las llamadas proteínas hipotéticas, secuencias que por su estructura han sido marcadas como posibles proteínas pero que por su tamaño o por la falta de homólogos en otros organismos, no pueden ser consideradas como tal con total seguridad. De hecho, muchas de ellas (53%) se considera que no es probable que codifiquen proteínas (marcadas como *hypothetical protein*, *unlikely*). En los ejemplos de los alineamientos de las lecturas con el genoma de *T. brucei* se hace evidente que gran parte de estas proteínas hipotéticas se localizan en regiones de cambio de hebra convergentes y, en menor medida, en regiones de cambio de hebra divergentes, dentro de unidades transcripcionales pero en la dirección contraria a la transcripción y en los extremos de los cromosomas y en regiones de cambio de polimerasas.

Para estudiar el efecto del silenciamiento de la proteína RBP33 sobre la expresión de estos transcritos, diseñamos un conjunto de sondas que hibridasen en varias regiones convergentes de los cromosomas V, VII y X

y dentro de una unidad transcripcional en el cromosoma IX. En los northern, la ausencia de la proteína en los cultivos con tetraciclina conduce a un incremento en los niveles de todos los transcritos ensayados, tanto en tripanosomas sanguíneos y procíclicos. Además, se observa la aparición de diferentes bandas tras el silenciamiento de la proteína RBP33, como ocurre en el caso del cromosoma IX, en el que aparece una única banda de 4,9 kb o en el cromosoma X, que el uso de dos sondas diferentes nos ha permitido diferenciar dos y tres bandas, correspondiendo probablemente la banda de menor tamaño al transcrito del gen *Tb927.10.5720*. Estos resultados observados indican que RBP33 está realizando una acción específica sobre transcritos derivados de regiones muy concretas del genoma. La ausencia de las mismas bandas en las muestras de tripanosomas sanguíneos y procíclicos en los que se llevó a cabo el silenciamiento de la proteína DRBD3 demuestran que estas respuestas no son debidas a la muerte celular ya que, al igual que RBP33, DRBD3 es una proteína esencial en ambas formas de vida.

Los datos obtenidos sobre el cromosoma X indicaban además algo importante: en ausencia de la proteína RBP33 se genera un transcrito que corresponde a la región convergente, desde el último gen de la unidad transcripcional a la que pertenece el gen *Tb927.10.5720* hasta la región al final de la unidad transcripcional contraria. De la misma manera, la aparición de múltiples bandas en el resto de los transcritos observados apunta a una posible implicación de la proteína RBP33 en el procesamiento del pre-mRNA policistrónico o en el control de la elongación de la RNA polimerasa II, principalmente en regiones que deben ser silenciadas como son las SSR.

Para comprobar este punto, llevamos a cabo nuevas RT-PCRs cuantitativas sobre los RNAs obtenidos por IP con anti-RBP33. En este caso, utilizamos PT-X como control positivo de las amplificaciones y escogimos dos regiones convergentes: *Tb927.10.5720* en el cromosoma X, cuyos transcritos ya hemos observado por northern blot, y *Tb927.2.3320* que corresponde a una región convergente del cromosoma 2 que

no habíamos observado en nuestros análisis. Observamos un enriquecimiento de las muestras respecto al control, indicando un alto grado de afinidad de RBP33 por los transcritos derivados de diversas regiones convergentes.

Como ya indicamos en la introducción, la transcripción por la RNA polimerasa es constitutiva y se inicia en las regiones donde la cromatina es menos compacta, definida por la presencia de las variantes de histonas H2AZ y H2BV, principalmente en las regiones SSR divergentes, pero también a continuación de regiones de genes de tRNAs, transcritos por la RNA polimerasa III. Por otro lado, la terminación de la transcripción coincide en las regiones donde se encuentran las variantes de histonas H3V y H4V, localizadas en regiones convergentes (Siegel et al, 2009). El estudio de los niveles de transcritos de la hebra contraria a la hebra específica de la RNA polimerasa II muestra que aunque existe expresión en esta hebra, es 10 veces menor que en la específica. Si, en las regiones convergentes donde la RNA polimerasa termina la transcripción, ésta no se detuviese, se generarían secuencias antisentido complementarias a los genes situados en la hebra contraria a la transcripción, generando multitud de *dsRNAs* que podrían estar alterando toda la expresión génica de la célula a través del silenciamiento por RNA. Sin embargo, los datos obtenidos en los microarrays no apuntan a una desregularización generalizada del transcriptoma, sino a algo mucho más específico.

Recientes estudios en esta línea de trabajo indican que los siRNAs en tripanosomas, los RNAs pequeños interferentes que se producen tras el corte con la endonucleasa *Dicer*, derivan de siete orígenes diferentes: principalmente, de retrotransposones como *ingi* y *SLACS* (Djikeng et al, 2001), y de repeticiones invertidas distribuidas en el genoma, y en menor medida de fragmentos derivados de tRNAs y snoRNAs, de pseudogenes, de secuencias derivadas de los rRNAs y de un conjunto de regiones de cambio de hebra convergentes (Wen et al, 2011). Comparando las regiones convergentes identificadas como fuentes de

siRNAs en tripanosomas, encontramos que el 64% coinciden con regiones en las que se han identificado transcritos asociados a RBP33 en SSR convergentes, algunas de ellas abarcando incluso más de uno de estos transcritos (Tabla VI.1).

En *T. brucei*, el silenciamiento es un mecanismo constitutivo de defensa del genoma para silenciar los transcritos de los retrotransposones *Ingi* y *SLACS* (Djikeng et al, 2001). Los retrotransposones *Ingi* son la familia de retrotransposones más abundante en *T. brucei*, comparables con los elementos SINE y LINE en humanos. Un elemento *Ingi* intacto está formado por dos mitades del elemento RIME en sus extremidades y contiene un marco abierto de lectura en la región central. Los elementos RIME pueden encontrarse en el genoma como retrotransposones independientes (Hasan et al, 1984; Kimmelet al, 1987). Mientras las proteínas derivadas de los elementos *ingi* poseen cuatro dominios (endonucleasa, unión a DNA, reverso transcriptasa y RNAsa), los elementos RIME no parecen codificar ninguna proteína y dependen de *ingi* para su transposición (Berriman et al, 2005). La eliminación de *TbAGO1* conduce a un incremento de la abundancia de los transcritos derivados de los retrotransposones RIME (*Ribosomal Interspersed Mobile Element*) además de la sobreexpresión de transcritos derivados de una familia de proteínas llamada RHS (*Retrotransposon Hot Spot*) (Durand-Dubief et al, 2007). En los microarrays analizados, la ausencia de la proteína RBP33 conducía al incremento de transcritos de diferentes RHS e incluso de un elemento SLAC que posteriormente en los datos de RNA-Seq aparecían como transcritos que no se unían de manera directa a RBP33. Por otra parte, recientemente se han identificado siRNAs derivados de *dsRNAs* originados por la unión de transcritos de pseudogenes de las RHS que actúan directamente sobre los transcritos derivados de la misma familia (Wen et al, 2011). Las RHS son una gran familia de genes que codifican proteínas principalmente nucleares de función desconocida y multitud de pseudogenes no codificantes (Bringaud et al, 2002). Al menos se han descrito seis familias

Tabla VI.1 Comparación regiones convergentes identificadas por (Wen et al, 2011) como fuente de siRNAs en tripanosomas con los datos obtenidos en RNA-Seq

Regiones convergentes	Región	RNA-Seq
<i>Tb927_01_v4_CTU1</i>	636000-642000	<i>Tb927.1.2780, Tb927.1.2820</i>
<i>Tb927_01_v4_CTU2</i>	721000-736000	<i>Tb927.1.3330/3340/3350/3370</i>
<i>Tb927_02_v4_CTU3</i>	615500-623000	-
<i>Tb927_02_v4_CTU4</i>	958000-967300	<i>Tb927.2.5410</i>
<i>Tb927_03_v4_CTU5</i>	380900-390600	-
<i>Tb927_03_v4_CTU6</i>	626600-634300	<i>Tb927.3.2480</i>
<i>Tb927_03_v4_CTU7</i>	1120900-1132400	-
<i>Tb927_04_v4_CTU8</i>	843800-848300	<i>Tb927.4.3193</i>
<i>Tb927_04_v4_CTU9</i>	978400-981200	<i>Tb927.4.3750</i>
<i>Tb927_05_v4_CTU11</i>	123700-131000	-
<i>Tb927_05_v4_CTU12</i>	443500-450200	-
<i>Tb927_05_v4_CTU13</i>	630600-639800	<i>Tb927.5.1840</i>
<i>Tb927_05_v4_CTU14</i>	870000-878800	-
<i>Tb927_05_v4_CTU15</i>	960700-969700	-
<i>Tb927_05_v4_CTU16</i>	1237600-1244800	-
<i>Tb927_05_v4_CTU17</i>	1377100-1385900	-
<i>Tb927_06_v4_CTU18</i>	88300-97500	-
<i>Tb927_06_v4_CTU19</i>	115000-122000	<i>Tb927.6.240, Tb927.10.250</i>
<i>Tb927_06_v4_CTU20</i>	171400-175100	<i>Tb927.6.370, Tb927.10.380</i>
<i>Tb927_06_v4_CTU21</i>	232200-240800	<i>Tb927.6.550</i>
<i>Tb927_06_v4_CTU22</i>	337500-346800	<i>Tb927.6.810</i>
<i>Tb927_07_v4_CTU23</i>	53000-62000	<i>Tb927.290</i>
<i>Tb927_07_v4_CTU24</i>	460000-470000	<i>Tb927.7.1940</i>
<i>Tb927_07_v4_CTU25</i>	833400-838900	<i>Tb927.7.3240</i>
<i>Tb927_07_v4_CTU26</i>	1616700-1627500	<i>Tb927.7.6000, Tb927.10.6030</i>
<i>Tb927_08_v4_CTU27</i>	552100-562000	<i>Tb927.8.1670</i>
<i>Tb927_08_v4_CTU28</i>	853600-860700	<i>Tb927.8.2850, Tb927.10.2851</i>
<i>Tb927_08_v4_CTU30</i>	1581000-1593000	<i>Tb927.8.5340/5345/5350/5360</i>
<i>Tb927_08_v4_CTU31</i>	1895800-1900500	<i>Tb927.8.6560</i>
<i>Tb927_08_v4_CTU32</i>	2090400-2097100	-
<i>Tb927_09_v4_CTU33</i>	1126000-1136000	<i>Tb927.9.6830, Tb927.9.6960</i>
<i>Tb927_09_v4_CTU34</i>	2029800-2035800	<i>Tb927.12810</i>
<i>Tb927_10_v5_CTU35</i>	270700-281300	<i>Tb927.10.1010, Tb927.10.1020</i>
<i>Tb927_10_v5_CTU36</i>	610000-625000	<i>Tb927.10.2420</i>
<i>Tb927_10_v5_CTU37</i>	933900-947100	-
<i>Tb927_10_v5_CTU38</i>	1123000-1138000	<i>Tb927.10.4350</i>
<i>Tb927_10_v5_CTU39</i>	1418000-1429000	<i>Tb927.10.5720</i>
<i>Tb927_10_v5_CTU40</i>	1793000-1807000	<i>Tb927.10.7150, Tb927.10.7170</i>
<i>Tb927_10_v5_CTU41</i>	2504000-2518000	<i>Tb927.10.10190, Tb927.10.10200</i>
<i>Tb927_10_v5_CTU42</i>	2977900-2992300	<i>Tb927.10.12280</i>
<i>Tb927_10_v5_CTU43</i>	3163700-3186300	<i>Tb927.10.13050/13060/13080</i>
<i>Tb927_11_01_v4_CTU44</i>	447000-456000	<i>Tb927.11.1480</i>

<i>Tb927_11_01_v4_CTU45</i>	1180000-1186000	
<i>Tb927_11_01_v4_CTU46</i>	1654000-1666000	
<i>Tb927_11_01_v4_CTU47</i>	2082000-2092000	
<i>Tb927_11_01_v4_CTU48</i>	2515000-2525000	
<i>Tb927_11_01_v4_CTU49</i>	3332000-3345000	<i>Tb927.11.12450, Tb927.10.12470</i>
<i>Tb927_11_01_v4_CTU50</i>	3823000-3832000	<i>Tb927.11.14370, Tb927.10.1439</i>

de genes *RHS*, con variabilidad dentro de cada grupo y numerosas quimeras (Berriman et al, 2005; Bringaud et al, 2002). Estos genes se encuentran agrupados en regiones subteloméricas, que son de gran importancia para los procesos de variación antigénica en tripanosomas (Pays, 2005). Se han identificado también numerosos pseudogenes *RHS* en los que se observa la inserción de retroelementos en su secuencia codificante. Esta inserción suele darse en un sitio altamente específico de la secuencia codificante de los *RHS* y normalmente en fase permitiendo la traducción del transcrito a una proteína híbrida (Bringaud, Biteau et al. 2002). Sin embargo también se ha detectado la presencia de cambios del marco abierto de lectura o codones de parada en la secuencia de los retrotransposones, indicando que las proteínas podrían estar incompletas y no ser funcionales.

Existe la posibilidad de que RBP33 esté involucrada en la producción de siRNAs a través de la regulación del procesamiento de los pre-mRNAs de los que derivan, especialmente aquellos originados de secuencias en las SSR convergentes. De esta manera, la ausencia de la proteína provoca la imposibilidad de la liberación de siRNAs específicos lo que llevaría al aumento de los retrotransposones y de los transcritos de los genes *RHS*, tal y como se ha visto en las células deficientes de *TbAGO1* (Durand-Dubief et al, 2007), y como hemos podido observar en los análisis de microarrays que ocurre al silenciar la proteína RBP33. Algunos de los transcritos identificados asociados a la proteína RBP33 son snoRNAs que pertenecen en su mayoría al cromosoma X. Los snoRNAs son RNAs que funcionan como complejos ribonucleoproteicos para

guiar la modificación enzimática de RNAs específicos en sitios determinados por interacciones antisentido RNA:RNA (Matera et al, 2007). Sin embargo, recientes estudios indican una posible relación entre las rutas de silenciamiento de RNA y los snoRNAs (Hock et al, 2007) además de la posible función de RNAs pequeños derivados de snoRNAs, que tendrían una función en el procesamiento del pre-mRNA y en el control de la expresión génica (revisado en (Falaleeva & Stamm, 2013)). Todo ello indica que la posible unión de RBP33 a estos snoRNAs tenga que ver con el reconocimiento de regiones específicas de procesamiento de los pre-mRNAs.

Por otra parte, RBP33 se une a un conjunto de proteínas codificantes de membrana, relacionadas con el transporte de aminoácidos y pteridinas. Como hemos visto anteriormente, PT-X, uno de estos transportadores, no se ve alterado en ausencia de RBP33. Esto podría explicarse por dos razones: si RBP33 está implicado en procesamiento del pre-mRNA de estos transcritos, la ausencia de los mismos provoca su acumulación como pre-mRNAs no procesados en el núcleo. Esto podría explicar el ligero aumento de la señal del transcrito observado en los northern. También podría estar implicada en el transporte de los mRNAs maduros hasta el citoplasma.

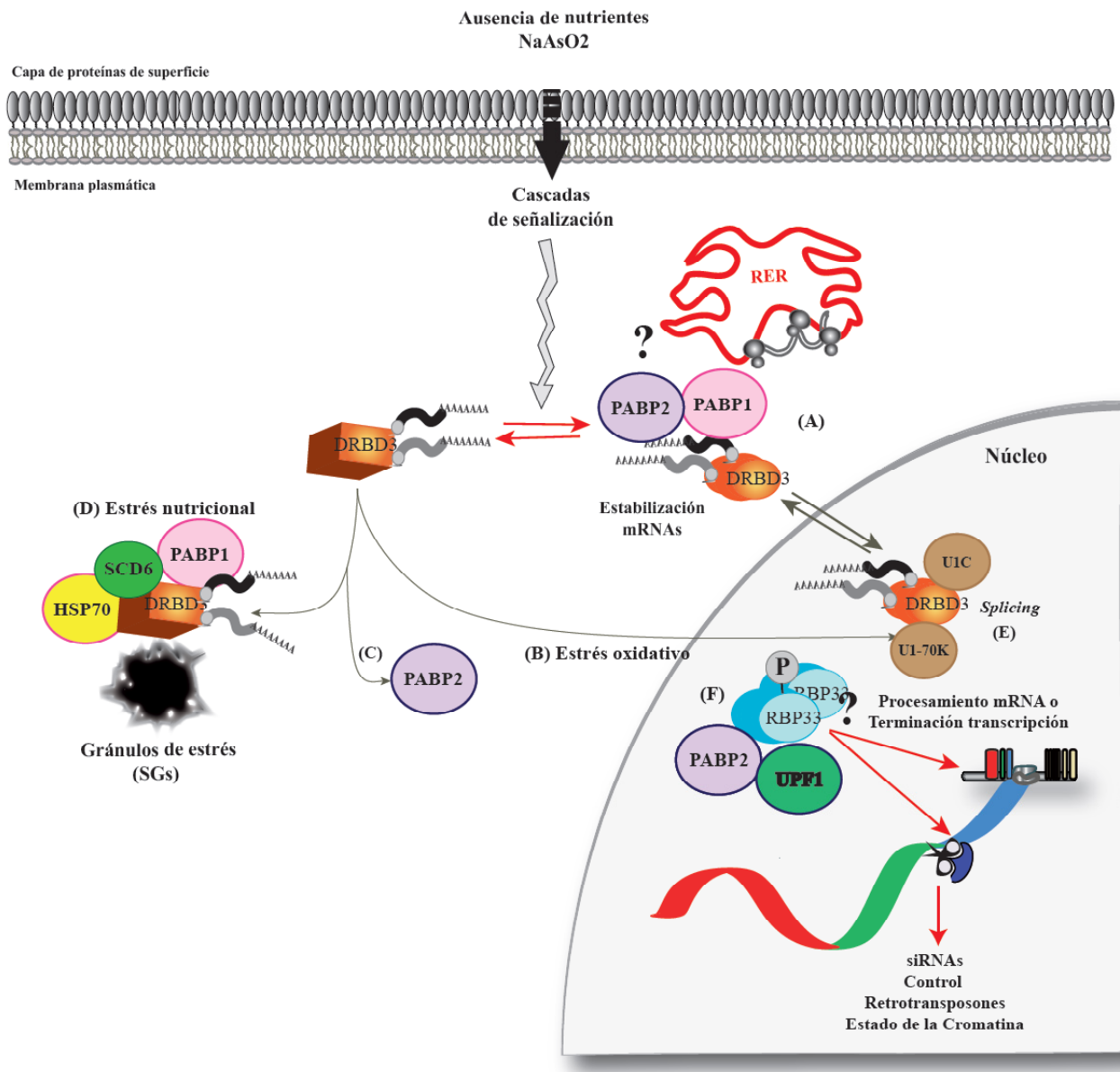
Además, el posible papel de la proteína RBP33 en la terminación de la transcripción por la RNA polimerasa tampoco puede ser descartado. El hecho de que RBP33 se una a transcritos derivados de regiones SSR podría estar favoreciendo la asociación de variantes de histonas en estas regiones así como la separación de la RNA polimerasa impidiendo su avance.

La proteína RBP33 tiene un papel esencial en la regulación de la abundancia de transcritos que derivan de regiones SSR convergentes, además de que puede estar involucrada en la producción de siRNAs para el control de la expresión de los retrotransposones en tripanosomas. Esto puede deberse bien a que RBP33 está implicada en la degradación de estos transcritos, que deben mantenerse a niveles muy bajos en condiciones normales; al procesamiento de los transcritos derivados de estas regiones, acelerando la producción

de siRNAs que deben estar disponibles para ejercer su función de control de los elementos móviles; o bien a la regulación de la elongación de la transcripción por la RNA polimerasa II.

Los datos presentados en esta tesis indican que las proteínas de unión a RNA DRBD3 y RBP33 tienen un papel fundamental en la regulación de la expresión génica a nivel post-transcripcional. La figura VI.1 muestra, a modo de resumen, un esquema de la posible localización y función de las proteínas RBP33 y DRBD3 en *T. brucei*.

Figura VI.1 Esquema



DRBD3, en condiciones de cultivo normales, reside principalmente en el citoplasma. El estrés oxidativo provocado por arsenito conduce a la translocación de la proteína DRBD3 al núcleo (B), aunque parte de ella queda en el citosol asociada a las PABPs; por otra parte, el estrés inducido por falta de nutrientes favorece la disociación de PABP2 (C), pero no de PABP1 y conduce a la localización de la proteína en los gránulos de estrés donde se une a la chaperona HSP70 (D). En el núcleo, DRBD3 se une a transcritos específicos y los transporta al citoplasma donde regula su destino a través de la asociación directa o indirecta con proteínas involucradas en el *splicing* (U1-70K y U1C (E)) con PABPs y proteínas ribosomales (A).

RBP33 se localiza principalmente en el núcleo (F). Los resultados obtenidos indican que RBP33 parece estar asociada a las proteínas UPF1 (*up-frameshift 1*) y PABP2 (*poly(A) binding protein 2*), además de a sí misma. De esta manera es posible que RBP33 afecte a la elongación de la transcripción en regiones específicas a través de la interacción con UPF-1 o en el procesamiento de los pre-mRNAs a través de la interacción con PABP-2 (G).

Conclusiones

Conclusiones

- DRBD3 forma un complejo con numerosas proteínas, incluidas las proteínas de unión a poli(A), PABP1 y PABP2, una RNA-helicasa, una proteína de dedo de Zn y proteínas ribosomales.
- La composición del complejo de proteínas de DRBD3 varía al someter a las células a diferentes condiciones de estrés. En condiciones de estrés oxidativo inducido por arsenito, DRBD3 se transloca al núcleo, perdiéndose la interacción de la proteína con la mayoría de las proteínas identificadas excepto con las PABPs. En condiciones de estrés nutricional, la proteína se acumula en gránulos citosólicos en los que permanece unida a PABP1 y se une a la chaperona HSP70. El conjunto de transcritos que se unen a DRBD3 permanecen inalterables durante ambas condiciones de estrés. Estas observaciones indican que DRBD3 forma parte de complejos ribonucleoproteicos muy dinámicos que se remodelan en respuesta a estímulos medioambientales.
- La proteína *TbRBP33* es una proteína con un dominio de unión a RNA tipo RRM cuya mitad carboxilo no tiene parecido con ninguna proteína fuera del conjunto de los kinetoplastos. Se encuentra localizada principalmente en el núcleo y el silenciamiento por RNAi conduce a la muerte celular tanto en tripanosomas sanguíneos como en tripanosomas procíclicos.
- La proteína RBP33 es una proteína de unión a RNA que se asocia a un conjunto específico de transcritos, una parte de los cuales se encuentran poliadenilados.
- RBP33 se encuentra fosforilada en tripanosomas sanguíneos y procíclicos. Las implicaciones funcionales de esta modificación son desconocidas por el momento.
- RBP33 se metila en uno de los residuos arginina de su secuencia. La sustitución del residuo de arginina por lisina no parece tener un efecto significativo en la función esencial de la proteína RBP33, al menos en las condiciones de cultivo ensayadas.
- La fusión de la secuencia TAP en la región N-terminal de la proteína RBP33 no alteró la función de la proteína en tripanosomas. Los resultados de las purificaciones indican que RBP33 está asociada a las proteínas UPF-1 (*up-frameshift 1*) y PABP-2 (*poly(A) binding protein 2*), además de a sí misma.
- RBP33 se asocia a un conjunto de RNAs que provienen principalmente de zonas silenciadas del genoma, y también a transcritos que codifican proteínas de membrana relacionadas con el transporte de diversos metabolitos. El silenciamiento de RBP33 conduce a un enriquecimiento de RNAs derivados de regiones de cambio de hebra, de cambio de polimerasa o de regiones específicas dentro de unidades transcripcionales de la RNA polimerasa II. Por tanto, RBP33 parece estar regulando la expresión de zonas muy concretas del genoma que deben estar silenciadas.
- Nuestros datos indican que RBP33 parece estar implicada en el procesamiento y degradación de transcritos que deben ser silenciados o en la regulación de la elongación de la transcripción en zonas silenciadas del genoma.

Anexo

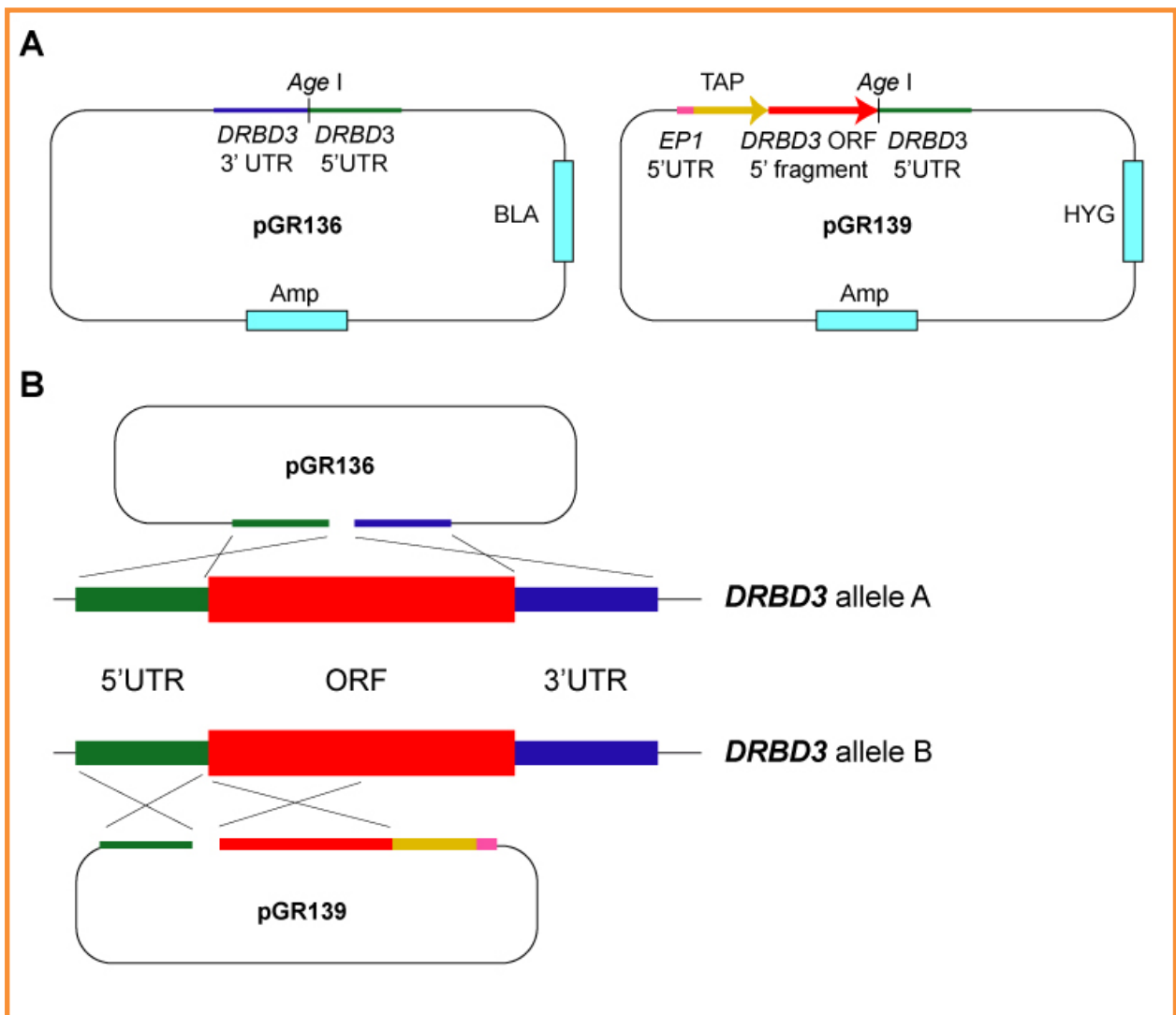


Figura VIII.1. Plásmidos de *DRBD3*

Construcción (A) y estrategia (B) para generar una línea celular expresando TAP-*DRBD3* del locus endógeno

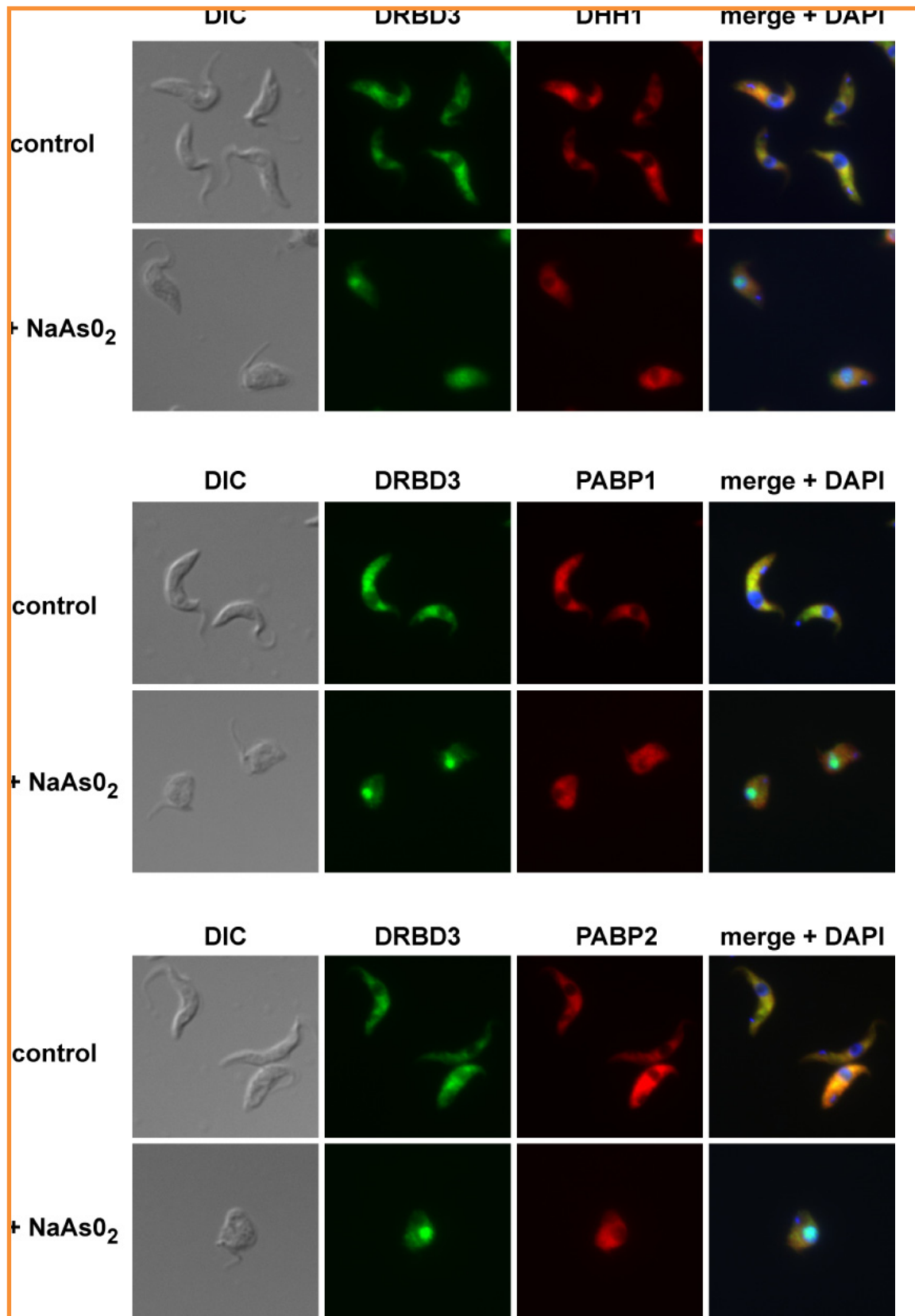


Figura VIII.2. **DHH1, PABP1 y PABP2 no translocan al núcleo tras el tratamiento con arsenito.**

Las células que expresan las versiones de estas proteínas fusionadas a 4xTy se incubaron con 50 μM de arsenito de sodio durante 4 horas y se procesaron para su análisis por inmunofluorescencia utilizando los anticuerpos policlonales anti-DRBD3 y los anticuerpos monoclonales BB2. La unión de los anticuerpos se detectó utilizando anticuerpos anticonejo Alexa Fluor 488 y IgGs anti-ratón Alexa fluor 594.

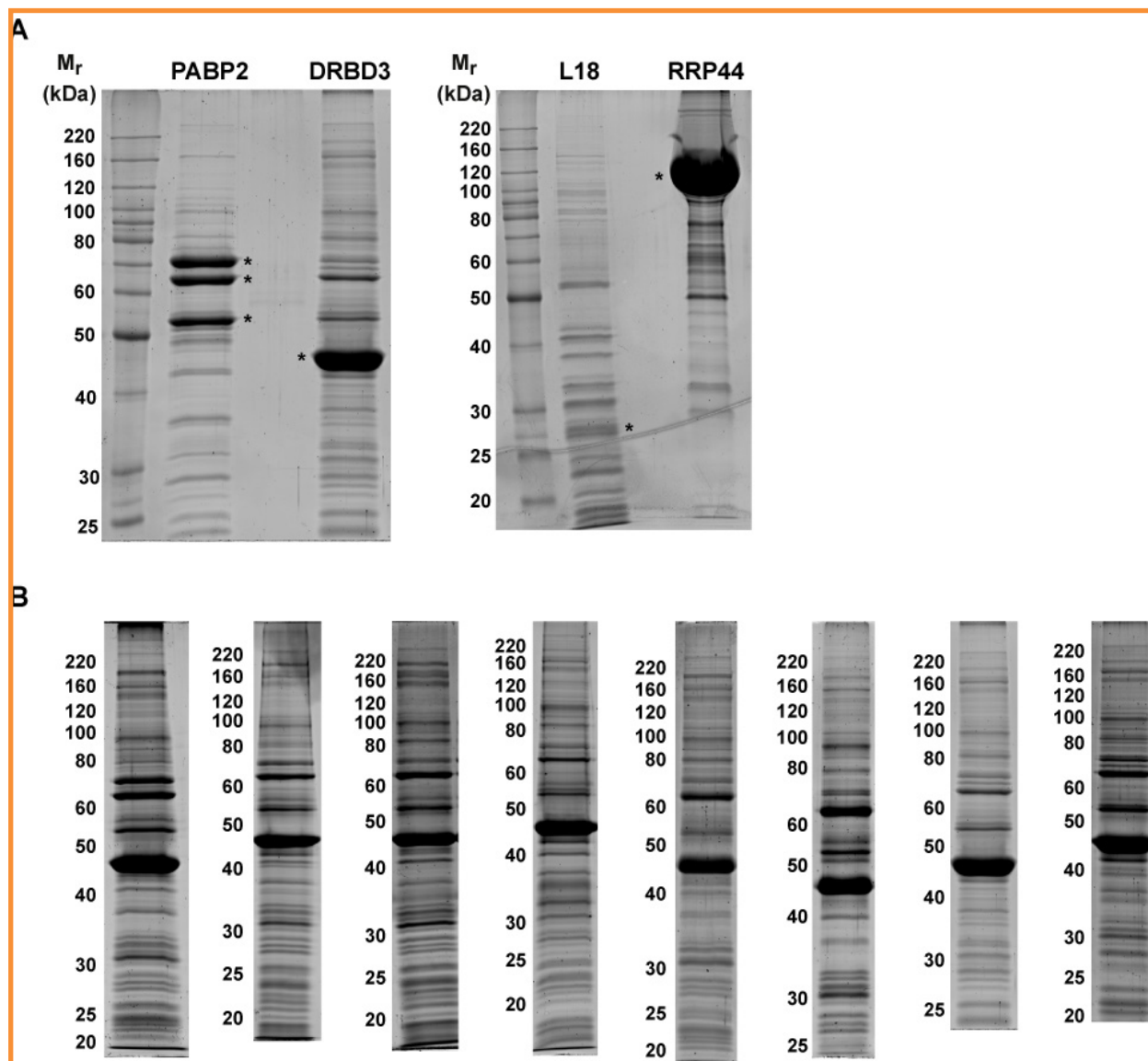


Figura VIII.3. Purificación por afinidad en tándem (TAP) de PABP2, DRBD3, el ribosoma y RRP44.

(A) La contaminación de proteínas ribosomales en las purificaciones TAP de PABP2 y RRP44 se confirmaron por espectrometría de masas de todas las bandas visualizadas en la tinción Sypro. Las purificaciones TAP de DRBD3 y del ribosoma (utilizando la proteína ribosomal L18 como cebo) se incluyen para su comparación. Ninguna de las bandas analizadas en las purificaciones de PABP2 y RRP44 correspondía a proteínas ribosomales. Los asteriscos indican las proteínas utilizadas como cebo en cada caso. La banda de 70 kDa en la purificación de PABP2 corresponde a PABP2 fusionada al péptido de unión a calmodulina de la secuencia TAP; la banda de 65 kDa es la proteína PABP2 endógena, y la banda de 55 kDa representa probablemente a un producto de degradación de PABP2. LA presencia de las moléculas de PABP2 fusionadas a TAP y de PABP2 endógena en los complejos purificados indica una asociación de PABP2 con otras moléculas de PABP2. (B) La asociación de las proteínas ribosomales a DRBD3 se observó en ocho purificaciones TAP independientes.

ID	Producto	logFC	Localización en cromosoma
Tb10_tRNA_Ag_2tRNA	ARNt Arginina	30,14	Dentro de una unidad transcripcional
Tb927.11.tRNA_Phe_2	ARNt Fenilalanina	28,82	Dentro de una unidad transcripcional
Tb927.5.2765	ARNt Ácido glutámico	28,47	SSR convergente
Tb927.11.tRNA_Phe_1	ARNt Fenilalanina	28,38	Dentro de una unidad transcripcional
Tb927.4.3298	ARNt Valina	5,93	Dentro de una unidad transcripcional
Tb10_tRNA_Pro_1tRNA	ARNt Prolina	5,36	Dentro de una unidad transcripcional
Tb927_10_v4snoRNA.0024snoRNA	CDsnoRNA	5,30	Dentro de una unidad transcripcional
Tb927.8.2663	ARNt Asparagina	5,01	Dentro de una unidad transcripcional
Tb927.8.2851	ARNt Isoleucina	4,92	SSR convergente
Tb927_10_v4snoRNA.0037snoRNA	H/ACA-like snoRNA	4,81	Dentro de una unidad transcripcional
Tb927_10_v4snoRNA.0038snoRNA	H/ACA-like snoRNA	4,60	Dentro de una unidad transcripcional
Tb927_10_v4snoRNA.0051snoRNA	H/ACA-like snoRNA	4,55	Dentro de una unidad transcripcional
Tb927_10_v4snoRNA.0064snoRNA	CDsnoRNA	4,45	Dentro de una unidad transcripcional
Tb927_10_v4snoRNA.0065snoRNA	CDsnoRNA	4,44	Dentro de una unidad transcripcional
Tb927_10_v4snoRNA.0039snoRNA	H/ACA-like snoRNA	4,40	Dentro de una unidad transcripcional
Tb927_10_v4snoRNA.0022snoRNA	CDsnoRNA	4,38	Dentro de una unidad transcripcional
Tb927_10_v4snoRNA.0023snoRNA	CDsnoRNA	4,32	Dentro de una unidad transcripcional
Tb927_10_v4snoRNA.0080snoRNA	H/ACA-like snoRNA	4,31	Dentro de una unidad transcripcional
Tb927_10_v4snoRNA.0078snoRNA	H/ACA-like snoRNA	4,31	Dentro de una unidad transcripcional
Tb927_10_v4snoRNA.0067snoRNA	CDsnoRNA	4,25	Dentro de una unidad transcripcional
Tb927_10_v4snoRNA.0025snoRNA	CDsnoRNA	4,25	Dentro de una unidad transcripcional
Tb927_10_v4snoRNA.0063snoRNA	CDsnoRNA	4,24	Dentro de una unidad transcripcional
Tb927_10_v4snoRNA.0002snoRNA	H/ACA-like snoRNA	4,22	Dentro de una unidad transcripcional
Tb927_10_v4snoRNA.0069	CDsnoRNA	4,10	Dentro de una unidad transcripcional
Tb927.4.4663	tRNA Selenocysteine	4,10	Dentro de una unidad transcripcional
Tb927_10_v4snoRNA.0004snoRNA	H/ACA-like snoRNA	4,09	Dentro de una unidad transcripcional
Tb927_10_v4snoRNA.0079snoRNA	H/ACA-like snoRNA	4,06	Dentro de una unidad transcripcional
Tb927_10_v4snoRNA.0066snoRNA	CDsnoRNA	4,02	Dentro de una unidad transcripcional
Tb927_10_v4snoRNA.0050snoRNA	H/ACA-like snoRNA	4,00	Dentro de una unidad transcripcional
Tb927.9.9900	Proteína hipotética, improbable	31,11	Dentro de una unidad transcripcional
Tb927.9.9930	Proteína hipotética, improbable	29,91	Dentro de una unidad transcripcional
Tb927.9.9920	Proteína hipotética, improbable	29,42	Dentro de una unidad transcripcional
Tb927.1.3700	Proteína hipotética, improbable	28,54	Dentro de una unidad transcripcional
Tb927.10.12039	Proteína hipotética, improbable	7,81	Dentro de una unidad transcripcional
Tb927.9.9910	Proteína hipotética, improbable	7,71	Dentro de una unidad transcripcional
Tb927.9.6990	Proteína hipotética, improbable	6,32	Dentro de una unidad transcripcional
Tb927.9.8940	Proteína hipotética, improbable	6,21	Dentro de una unidad transcripcional
Tb927.9.2680	Proteína hipotética, improbable (3C4-42)	6,13	SSR divergente
Tb927.9.13170	Proteína hipotética, improbable	5,91	SSR convergente
Tb927.9.13410	Proteína hipotética, improbable	5,55	Dentro de una unidad transcripcional
Tb927.9.11730	Proteína hipotética, improbable	5,36	Dentro de una unidad transcripcional
Tb927.1.3480	Proteína hipotética, improbable	5,34	SSR divergente
Tb927.1.3140	Proteína hipotética, improbable	5,14	Dentro de una unidad transcripcional
Tb927.9.13180	Proteína hipotética, improbable	5,11	SSR convergente
Tb927.1.3240	Proteína hipotética, improbable	5,02	Dentro de una unidad transcripcional
Tb927.9.11880	Proteína hipotética, improbable	5,01	En SSR divergente
Tb927.1.3330	Proteína hipotética, improbable	5,01	SSR convergente
Tb927.1.3500	Proteína hipotética, improbable	5,01	SSR divergente
Tb927.9.13190	Proteína hipotética, improbable	4,90	SSR convergente
Tb927.10.15630	Proteína hipotética, improbable	4,90	Dentro de una unidad transcripcional
Tb927.1.4010	Proteína hipotética, improbable	4,86	Dentro de una unidad transcripcional
Tb927.9.9890	Proteína hipotética, improbable	4,85	Dentro de una unidad transcripcional
Tb927.9.3730	Proteína hipotética, improbable (1112-40)	4,84	Dentro de una unidad transcripcional
Tb927.1.4290	Proteína hipotética, improbable	4,82	Dentro de una unidad transcripcional
Tb927.9.2040	Proteína hipotética, improbable	4,81	Dentro de una unidad transcripcional
Tb927.9.4490	Proteína hipotética, improbable (1112-43)	4,81	Dentro de una unidad transcripcional
Tb927.1.800	Proteína hipotética, improbable	4,80	Dentro de una unidad transcripcional
Tb927.9.1970	Proteína hipotética, improbable	4,73	SSR divergente
Tb927.1.4460	Proteína hipotética, improbable	4,64	Dentro de una unidad transcripcional
Tb927.9.6980	Proteína hipotética, improbable	4,63	Dentro de una unidad transcripcional
Tb927.1.4640	Proteína hipotética, improbable	4,61	Dentro de una unidad transcripcional
Tb927.9.2690	Proteína hipotética, improbable	4,59	Dentro de una unidad transcripcional
Tb927.1.3340	Proteína hipotética, improbable	4,54	SSR convergente
Tb927.9.4010	Proteína hipotética, improbable (1112-165)	4,37	Dentro de una unidad transcripcional
Tb927.9.3940	Proteína hipotética, improbable (1112-130)	4,36	Dentro de una unidad transcripcional
Tb927.9.5660	Proteína hipotética, improbable (28316-375)	4,34	Dentro de una unidad transcripcional
Tb927.9.2500	Proteína hipotética, improbable	4,26	Dentro de una unidad transcripcional
Tb927.9.15940	Proteína hipotética, improbable	4,26	SSR divergente
Tb927.9.8010	Proteína hipotética, improbable	4,24	Dentro de una unidad transcripcional

Tb927.1.3936	Proteína hipotética, improbable	4,18	Dentro de una unidad transcripcional
Tb927.9.2480	Proteína hipotética, improbable	4,16	Dentro de una unidad transcripcional
Tb927.1.2720	Proteína hipotética, improbable	4,15	Dentro de una unidad transcripcional
Tb927.10.7260	Proteína hipotética, improbable	4,02	Dentro de una unidad transcripcional
Tb927.1.3920	Proteína hipotética, improbable	4,01	Dentro de una unidad transcripcional
Tb927.11.9030	Proteína hipotética, improbable	4,01	SSR convergente
Tb927.10.3050	Proteína hipotética	9,14	Dentro de una unidad transcripcional
Tb927.10.9010	Proteína hipotética	8,47	SSR convergente
Tb927.7.1940	Proteína hipotética	7,57	SSR convergente
Tb927.11.8840	Proteína hipotética	7,30	Dentro de una unidad transcripcional
Tb927.11.16180	Proteína hipotética	7,03	Dentro de una unidad transcripcional
Tb927.10.9630	Proteína hipotética	6,53	Dentro de una unidad transcripcional
Tb927.4.5090	Proteína hipotética	6,53	Dentro de una unidad transcripcional
Tb927.10.12750	Proteína hipotética	6,14	Dentro de una unidad transcripcional
Tb927.4.4780	Proteína hipotética	6,08	Dentro de una unidad transcripcional
Tb927.7.3480	Proteína hipotética	5,85	Dentro de una unidad transcripcional
Tb927.11.8340	Proteína hipotética	5,55	Dentro de una unidad transcripcional
Tb927.8.3050	Proteína hipotética	5,53	Dentro de una unidad transcripcional
Tb927.2.1290	Proteína hipotética (25824-45)	5,49	Al principio del cromosoma
Tb927.8.5340	Proteína hipotética	5,48	SSR convergente
Tb927.10.12570	Proteína hipotética	5,45	Dentro de una unidad transcripcional
Tb927.11.11060	Proteína hipotética	5,44	Dentro de una unidad transcripcional
Tb927.10.13060	Proteína hipotética	5,41	Dentro de una unidad transcripcional
Tb927.6.810	Proteína hipotética	5,41	SSR convergente
Tb927.8.5920	Proteína hipotética	5,34	Dentro de una unidad transcripcional
Tb927.7.6010	Proteína hipotética	5,20	SSR convergente
Tb927.10.4350	Proteína hipotética	5,19	SSR convergente
Tb927.1.2200	Proteína hipotética; de la familia de las proteínas con dedos de zinc (ZC3H4)	5,14	Dentro de una unidad transcripcional
Tb927.10.12070	Proteína hipotética	5,01	Dentro de una unidad transcripcional
Tb927.10.11460	Proteína hipotética	4,92	Dentro de una unidad transcripcional
Tb927.7.6030	Proteína hipotética	4,91	SSR convergente
Tb05_3097.410	Proteína hipotética	4,91	SSR divergente
Tb927.11.11400	Proteína hipotética	4,88	Dentro de una unidad transcripcional
Tb927.11.2450	Proteína hipotética	4,85	SSR convergente
Tb927.8.9050	Proteína hipotética	4,77	Dentro de una unidad transcripcional
Tb927.10.15060	Proteína hipotética	4,75	Dentro de una unidad transcripcional
Tb927.4.140	Proteína hipotética	4,68	Dentro de una unidad transcripcional
Tb927.6.550	Proteína hipotética	4,67	SSR convergente
Tb927.10.15030	Proteína hipotética	4,65	Dentro de una unidad transcripcional
Tb927.6.100	Proteína hipotética	4,64	Al principio del cromosoma
Tb927.10.12580	Proteína hipotética	4,57	Dentro de una unidad transcripcional
Tb927.7.7560	Proteína hipotética	4,56	Al final del cromosoma
Tb927.10.5100	Proteína hipotética	4,55	Dentro de una unidad transcripcional
Tb927.11.13160	Proteína hipotética	4,54	Dentro de una unidad transcripcional
Tb04_3812.100	Proteína hipotética	4,53	Dentro de una unidad transcripcional
Tb927.7.6710	Proteína hipotética	4,48	Dentro de una unidad transcripcional
Tb927.10.14060	Proteína hipotética	4,44	Dentro de una unidad transcripcional
Tb927.9.19950	Proteína hipotética	4,41	SSR divergente
Tb927.10.7660	Proteína hipotética	4,40	Dentro de una unidad transcripcional
Tb927.10.1020	Proteína hipotética	4,22	SSR convergente
Tb927.10.12560	Proteína hipotética	4,16	Dentro de una unidad transcripcional
Tb927.10.7170	Proteína hipotética	4,13	SSR convergente
Tb927.11.7810	Proteína hipotética	4,11	Dentro de una unidad transcripcional
Tb927.10.11860	Proteína hipotética, conservada, proteína rica en prolinas	5,74	Dentro de una unidad transcripcional
Tb927.10.15070	Proteína hipotética, conservada	5,29	Dentro de una unidad transcripcional
Tb927.10.4720	Proteína hipotética, conservada	5,14	Dentro de una unidad transcripcional
Tb927.11.8970	Proteína hipotética, conservada	5,08	Dentro de una unidad transcripcional
Tb927.6.380	Proteína hipotética, conservada	5,04	Dentro de una unidad transcripcional
Tb927.4.2660	Proteína hipotética, conservada	5,03	Dentro de una unidad transcripcional
Tb927.6.370	Proteína hipotética, conservada	5,02	Dentro de una unidad transcripcional
Tb927.7.4050	Proteína hipotética, conservada	4,92	Dentro de una unidad transcripcional
Tb927.1.4440	Proteína hipotética, conservada	4,88	Dentro de una unidad transcripcional
Tb927.5.4130	Proteína hipotética, conservada	4,79	Dentro de una unidad transcripcional
Tb927.6.4050	Miembro de la familia de proteínas con dedos de zinc, putativa	4,68	Dentro de una unidad transcripcional
Tb927.11.6240	Proteína hipotética, conservada	4,66	Dentro de una unidad transcripcional
Tb927.5.1290	Proteína hipotética, conservada	4,62	Dentro de una unidad transcripcional
Tb927.7.4580	Proteína hipotética, conservada	4,61	Dentro de una unidad transcripcional
Tb927.1.4570	Proteína hipotética, conservada	4,42	Dentro de una unidad transcripcional
Tb927.8.5480	Proteína hipotética, conservada	4,42	Dentro de una unidad transcripcional
Tb927.7.5390	Proteína hipotética, conservada	4,41	Dentro de una unidad transcripcional

Tb927.10.15730	Proteína hipotética, conservada	4,36	Dentro de una unidad transcripcional
Tb927.9.8030	Proteína hipotética, conservada	4,35	Dentro de una unidad transcripcional
Tb927.1.4590	Proteína hipotética, conservada	4,25	Dentro de una unidad transcripcional
Tb927.5.1840	Proteína hipotética, conservada	4,24	SSR convergente
Tb927.11.10290	Proteína hipotética, conservada	4,24	Dentro de una unidad transcripcional
Tb927.1.4620	Proteína hipotética, conservada	4,24	Dentro de una unidad transcripcional
Tb927.10.12080	Proteína hipotética, conservada	4,19	Dentro de una unidad transcripcional
Tb927.10.9310	Proteína hipotética, conservada	4,18	Dentro de una unidad transcripcional
Tb927.8.2840	Proteína hipotética, conservada	4,16	SSR convergente
Tb927.7.3130	Proteína hipotética, conservada	4,13	Dentro de una unidad transcripcional
Tb927.11.5790	Proteína hipotética, conservada	4,13	Dentro de una unidad transcripcional
Tb927.1.4550	Proteína hipotética, conservada	4,12	Dentro de una unidad transcripcional
Tb927.6.5200	Proteína hipotética, conservada	4,11	SSR convergente
Tb927.9.6270	Proteína hipotética, conservada	4,11	Dentro de una unidad transcripcional
Tb927.11.5130	Proteína hipotética, conservada	4,08	Dentro de una unidad transcripcional
Tb927.5.130	Proteína relacionada con glicoproteínas de superficie variable, putativa	29,16	SSR divergente
Tb927.6.5240	Glicoproteína de superficie variable (VSG) atípica, putativa	28,87	SSR convergente
Tb927.7.6540	Glicoproteína de superficie variable (VSG) atípica, putativa	7,00	SSR convergente
Tb927.8.130	Glicoproteína de superficie variable (VSG) atípica, putativa	6,11	Al principio del cromosoma
Tb927.9.17850	Glicoproteína de superficie variable (VSG) atípica, putativa (3H15.230)	5,85	Al final del cromosoma
Tb927.10.9620	NADH-ubiquinona oxidoreductasa c	5,67	Dentro de una unidad transcripcional
Tb927.5.4950	Glicoproteína de superficie variable (VSG) atípica, putativa	5,66	Dentro de una unidad transcripcional
Tb927.10.9080	Transportador de pteridinas, putativo	5,36	Dentro de una unidad transcripcional
Tb927.8.7740	Transportador de aminoácidos, putativo	4,91	Dentro de una unidad transcripcional
Tb927.4.4730	Transportador de aminoácidos, putativo (AATP11)	4,78	Dentro de una unidad transcripcional
Tb927.11.20190	Glicoproteína de superficie variable (VSG) atípica, putativa	4,73	Dentro de una unidad transcripcional
Tb927.10.12170	Proteína de interacción con RAB, putativa	4,55	Dentro de una unidad transcripcional
Tb927.1.2820	Transportador de pteridinas, putativo	4,54	Dentro de una unidad transcripcional
Tb927.1.2880	Transportador de pteridinas, putativo	4,54	Dentro de una unidad transcripcional
Tb927.1.2850	Transportador de pteridinas, putativo	4,53	Dentro de una unidad transcripcional
Tb927.7.5960	Proteína asociada con la diferenciación 4, putativa	4,34	Dentro de una unidad transcripcional
Tb927.1.3130	Proteína quinasa, putativa	4,17	Dentro de una unidad transcripcional
Tb927.7.5980	Proteína asociada con la diferenciación 6, putativa	4,14	Dentro de una unidad transcripcional
Tb927.4.3930	Transportador de aminoácidos, putativo	4,10	Dentro de una unidad transcripcional
Tb927.11.1480	Receptor tipo adenilato ciclasa GRESAG4, putativo	4,02	SSR convergente
Tb927.10.8590	Componente de la zona de transición del flagelo (FTZC)	4,90	Dentro de una unidad transcripcional
Tb927.6.3490	Proteína de dedos de zinc (ZFP1)	4,60	Dentro de una unidad transcripcional
Tb927.8.6840	Proteína de reparación de errores MLH1 (MLH1)	4,25	Dentro de una unidad transcripcional
Tb927.10.4680	NUDIX hidrolasa, conservada, proteína de la familia MutT/NUDIX	4,03	Dentro de una unidad transcripcional

Tabla VIII.1: Resultado del análisis de la secuenciación masiva

De la tabla de resultados obtenidos se han seleccionado aquellos que se han visto enriquecidos más de cuatro veces de manera significativa ($p < 0,01$) en la muestra de la inmunoprecipitación con los anticuerpos frente a RBP33 respecto al conjunto del RNA total presente en las células de tripanosomas procíclicos en condiciones de crecimiento normales. ID: Identificador del gen según la anotación en la base de datos GeneDB de *T.brucei* (<http://www.genedb.org/Homepage/Tbruceibrucei927>); la columna de Producto se refiere al tipo de proteína final a la que da lugar cada gen; la columna logFC indica el valor de la diferencia con el control (veces); Localización describe la región del cromosoma en la que se encuentra cada gen y puntualiza si el gen se encuentra en una región de cambio de hebras (SSR) divergente o convergente, dentro de una unidad transcripcional o al principio y final del cromosoma. El código de color utilizado se describe en el pie de la Tabla V.1.

Grupo	Clase	Término GO	P-value	Ids	Nº Ref	Nº Muestra
Componente celular	4,3	membrane GO:0016020	2,45E-006	Tb927.8.130.Tb927.7.6540.Tb1.14.0015.Tb11.01.20	450	13
				60.Tb927.4.3930.Tb927.8.7740.Tb927.6.370.Tb11.27.0001.Tb09.244.0250.Tb927.6.380.Tb927.6.5240.Tb927.5.4950.AATP11		
	5,4,3	membrane part GO:0044425	1,51E-007	Tb927.8.130.Tb927.7.6540.Tb1.14.0015.Tb11.01.20	450	13
				60.Tb927.4.3930.Tb927.8.7740.Tb927.6.370.Tb11.27.0001.Tb09.244.0250.Tb927.6.380.Tb927.6.5240.Tb927.5.4950.AATP11		
	6,5,4	intrinsic to membrane GO:0031224	5,00E-008	Tb927.8.130.Tb927.7.6540.Tb1.14.0015.Tb11.01.20	450	13
60.Tb927.4.3930.Tb927.8.7740.Tb927.6.370.Tb11.27.0001.Tb09.244.0250.Tb927.6.380.Tb927.6.5240.Tb927.5.4950.AATP11						
7,6,5	integral to membrane GO:0016021	5,00E-008	Tb927.8.130.Tb927.7.6540.Tb1.14.0015.Tb11.01.20	450	13	
Función Molecular	2	transporter activity GO:0005215	5,27E-005	Tb927.4.3930.Tb927.8.7740.Tb927.1.2880.Tb927.1.2820.Tb927.1.2850.AATP11	157	6
				Tb927.1.2880.Tb927.1.2820.Tb927.1.2850		
	3	cofactor transporter activity GO:0051184	5,37E-006	Tb927.1.2880.Tb927.1.2820.Tb927.1.2850	8	3
				Tb927.1.2880.Tb927.1.2820.Tb927.1.2850		
	4	biopterin transporter activity GO:0015224	3,37E-006	Tb927.1.2880.Tb927.1.2820.Tb927.1.2850	7	3
Tb927.4.3930.Tb927.8.7740.AATP11						
5	amine transmembrane transporter activity GO:0005275	9,62E-004	Tb927.4.3930.Tb927.8.7740.AATP11	42	3	

Tabla VIII.2. Tabla de categorías GO.

De los 56 genes utilizados, la herramienta web GoToolbox (<http://genome.crg.es/GoToolBox/>) devolvió las categorías referidas a 21 de ellos. Los términos GO se agrupan en clases cada vez más específicas (números más altos). A cada resultado se le otorgó un valor p-value de acuerdo al número de genes de la muestra en cada categoría (Nº muestra) respecto al conjunto de referencia, en este caso el genoma de *T. brucei* (Nº Ref).

Alterations in DRBD3 Ribonucleoprotein Complexes in Response to Stress in *Trypanosoma brucei*

Sandra M. Fernández-Moya¹, Angélica García-Pérez¹, Susanne Kramer^{2†}, Mark Carrington², Antonio M. Estévez^{1*}

1 Instituto de Parasitología y Biomedicina "López-Neyra", IPBLN-CSIC, Armilla, Granada, Spain, **2** Department of Biochemistry, University of Cambridge, Cambridge, United Kingdom

Abstract

Regulation of RNA polymerase II transcription initiation is apparently absent in trypanosomes. Instead, these eukaryotes control gene expression mainly at the post-transcriptional level. Regulation is exerted through the action of numerous RNA-binding proteins that modulate mRNA processing, turnover, translation and localization. In this work we show that the RNA-binding protein DRBD3 resides in the cytoplasm, but localizes to the nucleus upon oxidative challenge and to stress granules under starvation conditions. DRBD3 associates with other proteins to form a complex, the composition of which is altered by cellular stress. Interestingly, target mRNAs remain bound to DRBD3 under stress conditions. Our results suggest that DRBD3 transports regulated mRNAs within the cell in the form of ribonucleoprotein complexes that are remodeled in response to environmental cues.

Citation: Fernández-Moya SM, García-Pérez A, Kramer S, Carrington M, Estévez AM (2012) Alterations in DRBD3 Ribonucleoprotein Complexes in Response to Stress in *Trypanosoma brucei*. PLoS ONE 7(11): e48870. doi:10.1371/journal.pone.0048870

Editor: Ziyin Li, University of Texas-Houston Medical School, United States of America

Received: May 8, 2012; **Accepted:** October 1, 2012; **Published:** November 8, 2012

Copyright: © 2012 Fernández-Moya et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: AME and MC were jointly funded by the Royal Society Joint Project grant, grant number 2008/R2; AME was funded by Spanish Plan Nacional, grant number BFU 2009-07510; MC was funded by The Wellcome Trust, grant number 085956/Z/08/Z. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: aesteve@pb.csic.es

† Current address: Theodor-Boveri-Institut für Biowissenschaften, Julius-Maximilians Universität, Würzburg, Germany

Introduction

Kinetoplastids, such as *Trypanosoma brucei*, *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania* sp., are protozoa representing one of the deepest branches in the eukaryotic lineage [1]. Many of them are parasites, and have a significant impact on human health [2]. They exhibit many biological processes that are divergent from crown group eukaryotes, especially in gene expression [3]. Remarkably, genes are constitutively transcribed from long polycistronic units [4], and individual mRNAs are generated by coupled *trans*-splicing and polyadenylation reactions [5]. RNA polymerase II transcription initiation seems to be controlled by histone marks rather than by regulatory transcription factors [6]. Consequently, kinetoplastid gene expression is regulated primarily at the post-transcriptional level [3,7,8]. Trypanosomes and Leishmanias alternate between insect and mammalian hosts during their life cycles. Despite the absence of transcriptional control, they have to remodel gene expression to adapt to the drastic changes in pH, temperature, osmolarity, defences, nutrients and oxygen availability present within one or other host, or to different compartments within the same host [9,10]. This is thought to be achieved through the concerted action of RNA-binding proteins (RBPs) that regulate mRNA maturation, translation, localization and degradation in response to environmental cues [3,7,11]. Although there are large numbers of predicted RBPs encoded in the genomes of kinetoplastids, only few have been functionally characterized [11], and virtually nothing is known about how RBPs are able to modulate the

abundance of mRNAs and proteins. As reported in other eukaryotes [12], changes in the subcellular localization of several RBPs have been observed when trypanosomes are challenged *in vitro* to different stresses, such as heat shock, oxidative stress or starvation. *T. cruzi* uridine binding protein 1 (UBP1) is a destabilizing factor that binds to a specific group of mRNAs, and is found in a ribonucleoprotein complex associated with another RBP, UBP2 [13,14]. Both UBPs shuttle from the cytoplasm to the nucleus when the oxidative stress pathway is activated by sodium arsenite [15]. SR62, an RBP of the SR-related protein family, and the polypyrimidine tract binding protein PTB2, relocalize from nuclear speckles to the nucleolus upon heat shock in *T. cruzi* [16]. On the other hand, heat shock and starvation promote the accumulation of UBPs, UBP2, the poly(A)-binding proteins PABP1 and PABP2, the RNA-helicase DHH1, the translational repressor SCD6 and several other RBPs in cytoplasmic granules in *T. cruzi* and *T. brucei* [17,18]. Importantly, UBPs were also observed in cytoplasmic granules of trypanosomes isolated from the insect vector where nutrients may well be limiting [18]. However, we still have a very limited knowledge of how RBPs interact with target mRNAs and with other protein partners in response to environmental cues. The RNA-binding protein DRBD3 is one of the few characterized RBPs in trypanosomes. This essential protein associates to a specific subset of mRNAs, promoting their stabilization in *T. brucei* [19,20]. In this work we have analyzed the behavior of DRBD3 under different stress conditions. We show that DRBD3 is part of a multiprotein

complex that undergoes changes in both the subcellular localization and composition upon arsenite or starvation-induced stresses.

Results

Arsenite and Starvation Stresses Cause Relocalization of DRBD3

We have previously shown that DRBD3 localization is mainly cytoplasmic using a specific antiserum in immunofluorescence analysis [19]. However, DRBD3 is not homogeneously distributed in the cytoplasm and accumulates in the perinuclear region (Figure 1A). We expressed a TAP tagged version of DRBD3 from the endogenous locus using a cell line, TAP-DRBD3^{-/-}, with the second allele replaced with an antibiotic resistance marker (Figure S1). TAP-DRBD3^{-/-} cells exhibited a generation time prolonged by about 20% with respect to wild-type trypanosomes, and showed an identical DRBD3 localization pattern (Figure 1B). We next analyzed whether DRBD3 distribution was altered by oxidative or nutritional stresses. As shown in Figure 1C, DRBD3 translocated to the nucleus when parasites were incubated in the presence of sodium arsenite. This phenomenon was reversible, since cells remained viable and DRBD3 returned to the cytoplasm when arsenite was removed from the culture medium. Most, but not all DRBD3 protein was detected in the nucleus after a 3 hours treatment with 50 μ M arsenite. Longer incubation times caused the appearance of rounded cells and did not increase the nuclear accumulation of DRBD3 (Figure S2). DRBD3 relocalization was not simply due to a general shuttling of cellular RNA-binding proteins to the nucleus upon oxidative stress, since neither poly-A binding proteins PABP1/PABP2 nor the RNA helicase DHH1 accumulated in the nucleus even after 4 hours exposure to arsenite (Figure S2).

Nutritional stress, on the other hand, induced the accumulation of DRBD3 in cytosolic granules (Fig. 1D). Thus, upon incubation of trypanosomes in phosphate-buffered saline for 3 hours, cells remained viable and DRBD3 concentrated in discrete foci that colocalized with the stress granules marker SCD6 [17,18]. These results indicate that DRBD3 localization within the cell can be modulated in response to different environmental stimuli.

DRBD3 Associates with other Proteins to Form a Multiprotein Complex

We used the tandem-affinity purification (TAP) method [21] coupled to mass spectrometry to analyze whether DRBD3 binds to other proteins in the cell. DRBD3 was found in a complex that included poly(A)-binding proteins PABP1 and PABP2, a putative RNA-helicase Tb927.6.740, a protein with a Zn finger domain (Tb927.9.4080), two U1 small nuclear proteins (U1-70K and U1C), a putative nuclear transport factor (Tb927.10.2240) and at least 20 ribosomal proteins from both large and small subunits (Figure 2A and Table 1).

PABP1 and PABP2 comigrated in a single band with a mobility of 65 kDa. We always detected a second PABP2 polypeptide of ~52 kDa that probably arises after proteolysis (Figure 2A, see also Figure S3B). Binding to both PABPs was disrupted when the protein extract was incubated with RNase A and RNase T1 prior to TAP (Figure 2A), indicating that the interaction of DRBD3 with PABP1 and PABP2 is RNA-dependent. To confirm the association of DRBD3 with some of the identified protein partners, we generated cell lines that expressed candidate proteins fused to the TAP- or the PTP [22] tags. The presence of bound DRBD3 was tested by western

assays after IgG-sepharose chromatography and TEV protease cleavage. A cell line expressing a TAP-tagged version of the exonuclease RRP44 [23] was used as a negative control. We confirmed the interactions with PABP1, PABP2, the RNA helicase Tb927.6.740, the Zn finger domain protein Tb927.9.4080 and the U1A snRNP U1-70K (Figure 2C). Interaction with both PABPs was lost after treatment with RNases, as expected, whereas the association to other proteins in the complex was found to be RNase-resistant (Figure 2D). The presence of many ribosomal proteins in the TAP purified fractions suggested association to ribosomes. However, we were unable to detect DRBD3 in either TAP-purified ribosomes or in polysomes (Figure 2C and Figure 3).

The Composition of DRBD3 Protein Complexes is Affected by Stress

Since cellular stress influences DRBD3 localization, we sought to determine whether the interaction of DRBD3 with its protein partners was also affected by starvation and oxidative challenges. DRBD3 protein levels remained constant when trypanosomes were treated with sodium arsenite or starved in phosphate-buffered saline (Figure 4, and data not shown). Upon arsenite treatment, PABP1 and PABP2 remained associated with DRBD3 to approximately the same degree as in control cells. The amount of most of the other co-purifying proteins was reduced (Figure 4A). To confirm these observations, trypanosomes expressing TAP-DRBD3 were modified to express Ty-epitope tagged versions of PABP1 and PABP2 from their endogenous loci, and the monoclonal antibody BB2 [24] was used to visualize these proteins by western blot analysis. As shown in Figure 4C, the amount of PABP1 and PABP2 associated with DRBD3 was similar in the presence or absence of arsenite. In contrast, on starvation stress the amount of PABP2, but not PABP1, that co-purified with DRBD3 was reduced, and the amount of one HSP70 (Tb927.7.710) that co-purified was increased (Figure 4B). This phenomenon was observed in several independent purifications, and was confirmed using Ty-tagged versions of both PABPs and HSP70 as indicated above (Figure 4D). The observed changes in the amount of PABP2 and HSP70 associated with DRBD3 were not due to variations in the total levels of these proteins, since they were similar before and after treatment (input). To further confirm these results, we used cell lines expressing TAP- or PTP-tagged versions of PABP1, PABP2 or HSP70, and analyzed the amount of DRBD3 bound to these proteins upon nutritional stress. As expected, the amount of DRBD3 that co-purified with PABP2 was reduced in starved trypanosomes, whereas the amount of DRBD3 associated with HSP70 was increased (Figure 4E). Although SCD6 colocalized with DRBD3 in stress granules (Figure 1), we could not detect it in the TAP purified material (data not shown).

DRBD3 Remains Bound to Target mRNAs in Stress Conditions

As shown above, stress modulated both the localization of and the proteins associated with DRBD3. Since DRBD3 binds to a specific subset of mRNAs promoting their stabilization [19,20], we next analyzed if DRBD3 remains associated with its target mRNAs upon stress. The levels of three DRBD3-bound mRNAs were measured after immunoprecipitation of DRBD3 ribonucleoprotein particles followed by quantitative RT-PCR. As shown in Figure 5A, mRNAs encoding AATP11 (amino acid transporter 11), PT-X (pteridine transporter on chromosome X)

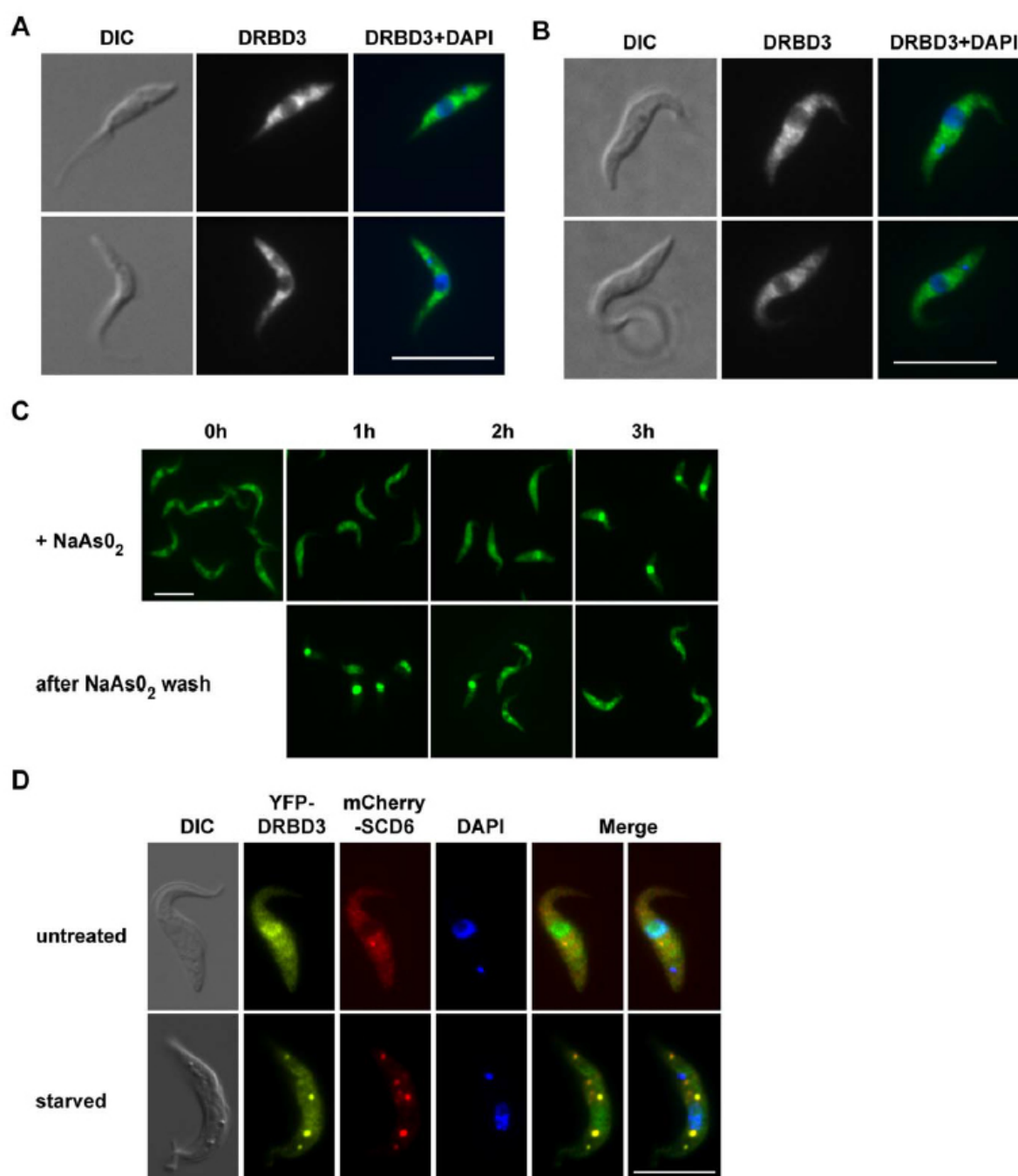


Figure 1. Effect of arsenite- and starvation-induced stress on DRBD3 localization. Immunofluorescence analyses were performed with anti-DRBD3 antiserum in wild-type cells (A) or with anti-protein A in trypanosomes expressing DRBD3 fused to the TAP tag (B). (C) Arsenite promotes the accumulation of DRBD3 in the nucleus. Cells were incubated in SDM-79 medium supplemented with 50 μ M sodium arsenite for up to 3 hours. Aliquots were taken every hour and treated for immunofluorescence assays using anti-DRBD3 antiserum. Parasites were then washed in SDM-79 and incubated for 3 additional hours. (D) DRBD3 localizes to stress granules in starved trypanosomes. Cells co-expressing YFP-DRBD3 and mCherry-SCD6 were washed twice in phosphate-buffered saline and incubated in the same buffer for three hours. Bars, 10 μ m. doi:10.1371/journal.pone.0048870.g001

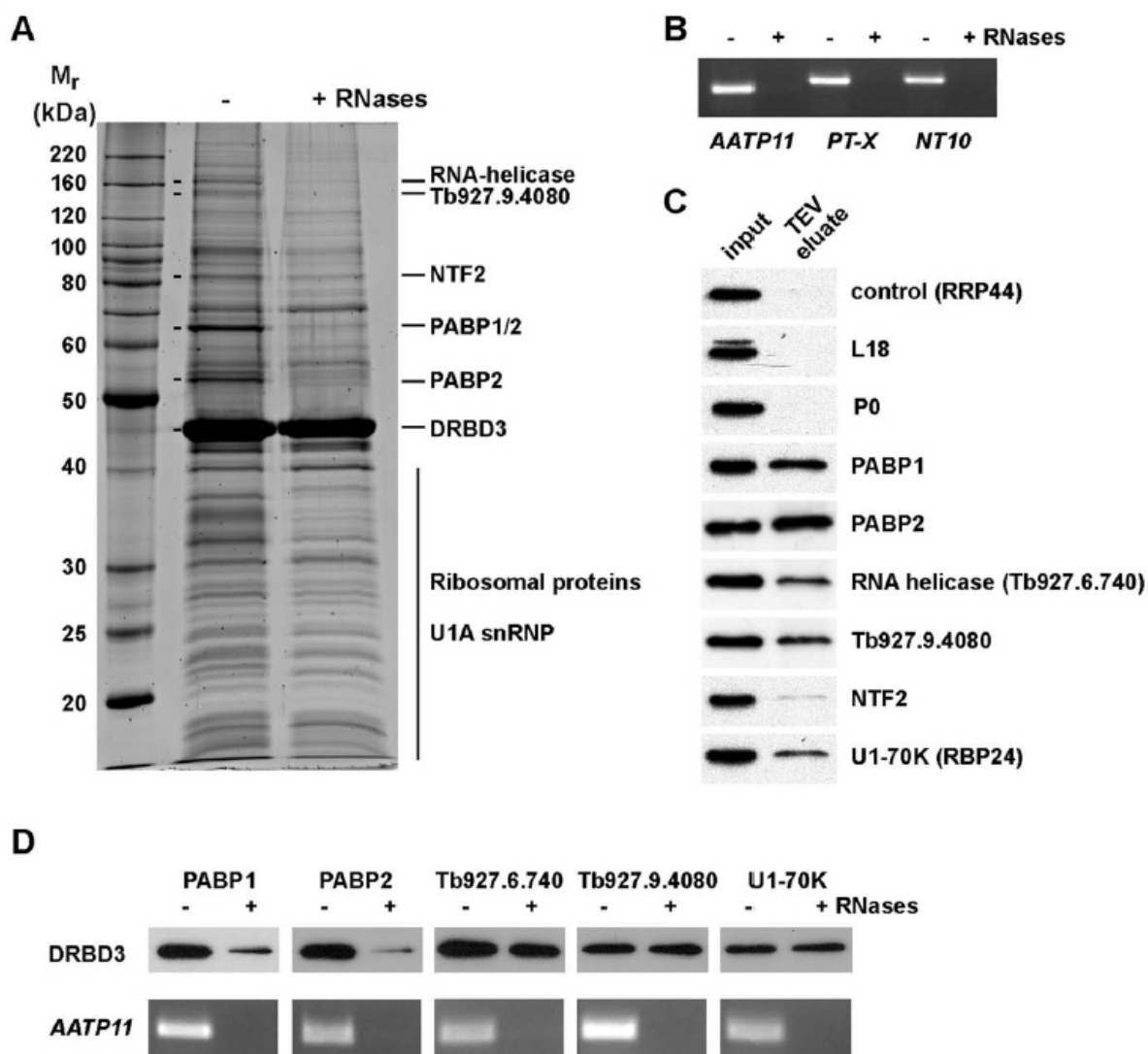


Figure 2. Identification of DRBD3-associated proteins by tandem-affinity purification (TAP). (A) Protein extracts were obtained from cells expressing a TAP-DRBD3 fusion from the endogenous locus. The lysate was split into two halves, and RNases A and T1 were added to one. Both fractions were processed in parallel for TAP as described in Materials and Methods. (B) The efficiency of the RNases treatment was assessed by RT-PCR of the purified material after TEV protease incubation using oligonucleotides specific for transcripts known to be bound to DRBD3. (C) Protein interactions were confirmed by generating cell lines expressing TAP- or PTP-tagged versions of some of the identified protein partners. The presence of DRBD3 was assayed in the purified material by western blot analysis after IgG chromatography and TEV protease incubation. Ribosomes were pulled down using either L18 or P0 ribosomal proteins as baits. (D) To assess whether the observed protein interactions were RNA-dependent, lysates obtained from cell lines expressing TAP- or PTP-tagged versions of the indicated proteins were treated with RNases A and T1 as indicated above. The presence of DRBD3 was assayed in the TEV eluates as in panel C, and the efficiency of the RNases treatment was evaluated by RT-PCR using oligonucleotides specific for the DRBD3-bound transcript *AATP11* as above. doi:10.1371/journal.pone.0048870.g002

or NT10 (nucleobase transporter 10) remained bound to DRBD3 after starvation or arsenite treatment. Total cellular levels of *AATP11* and *PT-X*, as measured by Northern blot analysis, decreased 1.7±0.2-fold and 2.3±0.4-fold, respectively, upon incubation with arsenite for 3 hours (n=3) but remained unchanged (1.2±0.1 and 1.1±0.1-fold, n=3) in starvation conditions (Figure 5B).

Discussion

Trypanosomes undergo profound morphological and biochemical changes to adapt to the different environmental conditions in the various niches they occupy in mammalian and insect hosts. Up to 30% of the transcriptome is remodeled during differentiation from mammalian bloodstream trypanosomes to procyclic insect forms [25,26,27,28]. Since transcription initiation is not selectively regulated, it has been proposed that RNA-binding proteins (RBPs)

Table 1. Proteins associated with DRBD3.

Systematic name	Description of gene product	kDa	Score
Tb927.10.1510	NOT1	259.1	74
Tb927.9.4080	Protein with Zn finger domain	142.1	146
Tb927.6.740	RNA helicase	139.1	150
Tb927.6.3750	HSP70	71.5	108
Tb927.10.2240	Protein with NTF2 domain	66.4	76
Tb927.9.9290	PABP1	63.0	99
Tb927.9.10770	PABP2	62.1	107
Tb927.4.1790	Ribosomal protein L3	54.4	58
Tb927.1.2340	Alpha-tubulin	49.8	91
Tb927.1.2330	Beta-tubulin	49.7	88
Tb927.10.2100	TEF1	49.1	50
Tb927.3.5050	Ribosomal protein L4	41.9	61
Tb927.9.8740	DRBD3	37.0	129
Tb927.11.2060	Ribosomal protein P0	34.6	54
Tb927.8.4830	RBP24 U170K	31.7	95
Tb927.8.1330	Ribosomal protein L7a	30.9	66
Tb927.11.3590	Ribosomal protein S4	30.6	131
Tb927.9.6070	Ribosomal protein S3	30.4	36
Tb927.10.3940	Ribosomal protein S3a	29.4	105
Tb927.5.1110	Ribosomal protein L2	28.3	88
Tb927.7.1730	Ribosomal protein L7	27.7	118
Tb927.11.10790	Ribosomal protein S4	27.6	71
Tb927.3.3320	Ribosomal protein L13	25.4	55
Tb927.9.8420	Ribosomal protein L10	24.7	84
Tb927.7.5180	Ribosomal protein L23a	24.7	66
Tb927.10.13500	Ribosomal protein L10a	24.6	37
Tb927.9.3990	Ribosomal protein S7	23.8	45
Tb927.10.12330	ZC3H34	22.4	57
Tb927.9.7590	Ribosomal protein L11	22.4	59
Tb927.8.1110	Ribosomal protein S9	22.1	36
Tb927.10.2120	U1A small nuclear ribonucleoprotein	21.8	55
Tb927.6.720	Ribosomal protein L14	21.4	35
Tb927.10.560	Ribosomal protein S11	20.1	44
Tb927.10.5370	Ribosomal protein S10	19.3	20
Tb927.4.1860	Ribosomal protein S19	18.8	60

Proteins co-purifying with TAP-DRBD3 were excised from SDS-PAGE gels, subjected to MALDI-TOF analysis and identified using MASCOT software. Proteins indicated in boldface were detected at least in two independent purifications. MASCOT probability based Mowse scores are reported. Scores >51 are statistically significant ($p < 0.05$).
doi:10.1371/journal.pone.0048870.t001

act as 'post-transcription factors' that are at the end of signaling cascades linking environmental cues to mRNA and protein abundance [3,7]. Indeed, several reports have highlighted the importance of signaling pathways in regulating differentiation and proliferation in trypanosomes [29]. However, it is still unknown how RBPs transduce environmental information into mRNA and protein abundance. DRBD3 is one of the few characterized RBPs in these parasites. It binds to a subset of mRNAs and promotes their stabilization [19,20]. In this report we investigated whether DRBD3 ribonucleoprotein complexes respond to changes in the

environment. In normal culture conditions, DRBD3 resides mainly in the cytoplasm. Upon arsenite-induced stress, however, DRBD3 concentrates in the nucleus. A similar behavior has been described for the RBPs UBP1 and UBP2 in *T. cruzi* [15]. This phenomenon seems to be specific to a subset of RBPs, as other RBPs do not translocate to the nucleus under the same conditions (Figure S2 and [15]). The behavior of DRBD3 is consistent with a function as a shuttle protein that transports target mRNAs from the nucleus to the cytosol. In fact, a fraction of DRBD3 is also detected in the nucleus of unstressed cells (Figure 1 and [19]). In another study, DRBD3 (named PTB1 in that report) showed a prominent nuclear localization under standard growth conditions [20]. As observed for several other RBPs in *T. cruzi* [18], starvation induces the accumulation of DRBD3 in stress granules (SGs), as judged by co-localization with the SG marker SCD6. In eukaryotes, SGs are thought to accumulate translationally-stalled mRNAs which are protected from degradation until environmental conditions improve [12]. This seems to be also the case in trypanosomes, since total levels of DRBD3-regulated mRNAs are unaltered upon starvation stress and remain bound to the complex.

How RBPs interact to other proteins to carry out their tasks is poorly understood in trypanosomes. Tandem-affinity purification (TAP) was performed to investigate how stress influences the protein composition of DRBD3 ribonucleoprotein complexes. DRBD3 was found to associate with several other proteins in unstressed cells forming a stable complex. The more abundant proteins in the complex are poly(A)-binding proteins PABP1/PABP2 and up to 20 different ribosomal proteins. Association with PABPs was found to be RNA-dependent, and was confirmed by detection of DRBD3 when TAP was performed using each PABP as bait. The functional consequences of this association are not known at present but, since DRBD3 is a stabilizing protein and PABPs protect mRNAs from degradation by deadenylases, it is possible that DRBD3 strengthens PABPs interaction with the mRNAs, as has been proposed for other RBPs in mammalian cells [30]. DRBD3 is the most abundant protein in the eluates. There are two possible explanations for this: there could be multiple complexes and/or the complexes partially or fully dissociate during the purification. Since the TAP purification procedure takes hours, the latter is likely to occur whether or not there are multiple complexes. This means that the purified material contains a mixture of different complexes, perhaps representing heterogeneity in the cell but also representing a mixture of complexes that have partially or fully dissociated during purification.

The presence of ribosomal proteins in the TAP-purified material suggests association to ribosomes. However, DRBD3 could not be detected in either polysomal fractions or TAP-purified ribosomes. Ribosomal proteins are typical contaminants present in many biochemical purifications, and indeed they have been detected in several pull-down experiments in *T. brucei*, albeit not in such abundance and number (reviewed in [31]). In addition, we performed TAP of the RBPs PABP2 and RRP44 and compared their patterns with those obtained with DRBD3 and ribosomes. As shown in Figure S3A, we did not observe any apparent contamination of ribosomal proteins in either PABP2 or RRP44 purifications. TAP carried out with a cell line expressing only the TAP tag did not yield any ribosomal protein either (data not shown). Moreover, a very similar pattern of ribosomal proteins associated with DRBD3 was consistently observed in up to eight independent TAP purifications (Figure S3B). The presence of ribosomal proteins in the purified TAP-DRBD3 could be explained if DRBD3 is not physically interacting with ribosomes, but located in close proximity to them, for example near the rough

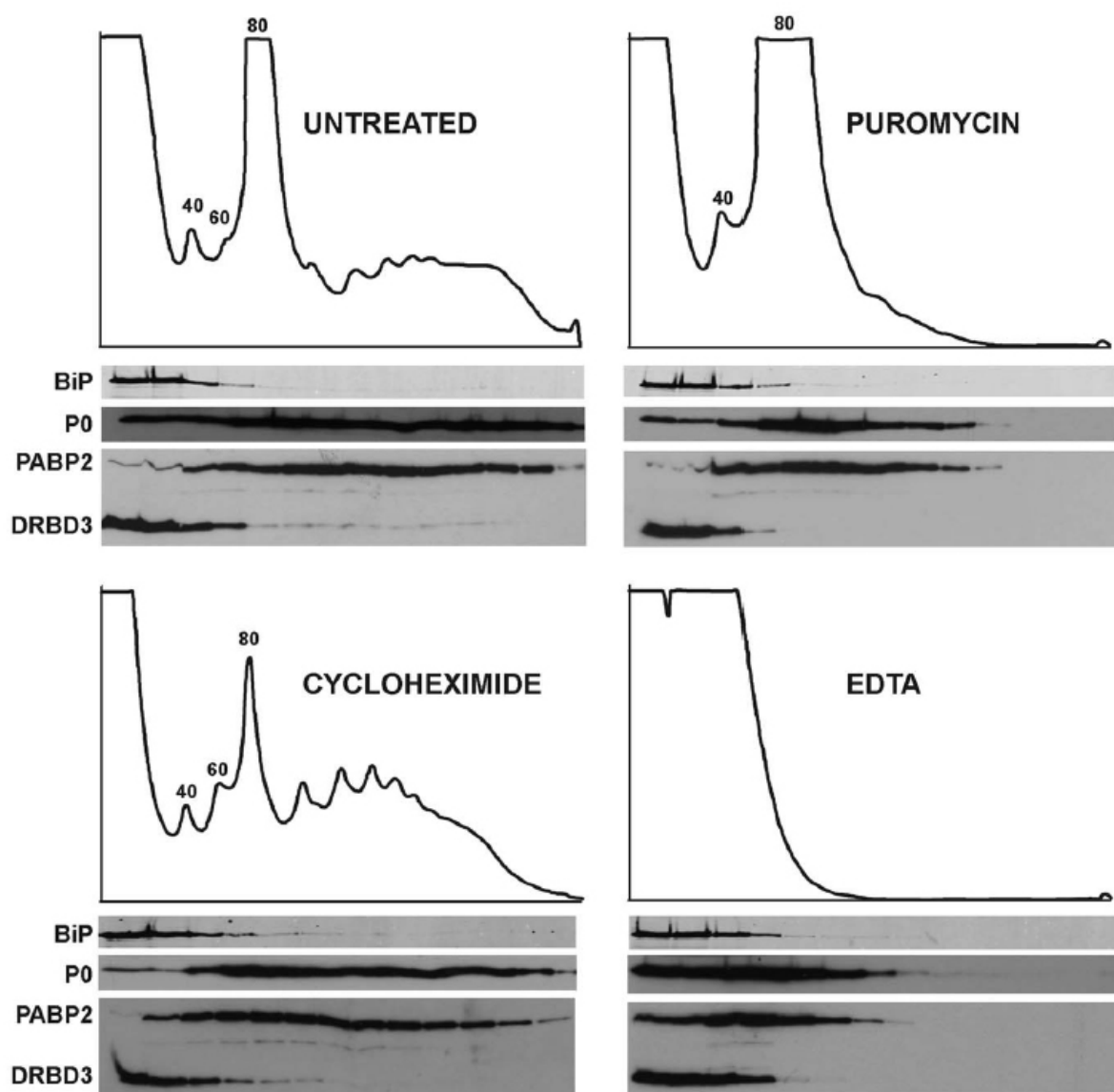


Figure 3. DRBD3 does not associate with polysomes. Trypanosome lysates were subjected to sucrose gradient separation in the absence or presence of translational inhibitors. Absorption at 254 nm was recorded during fractionation. Fractions were analyzed by western blot using an anti-DRBD3 antiserum. The distribution of DRBD3 along the gradients was compared to those of proteins known to be polysome-associated (ribosomal protein P0 and PABP2) or not bound to polysomes (BiP). doi:10.1371/journal.pone.0048870.g003

endoplasmic reticulum, forming cytoplasmic substructures that remain aggregated during the purification process. This is supported by the fact that no ribosomal proteins copurified with DRBD3 upon arsenite treatment, when most DRBD3 is located in the nucleus.

Under stress conditions, we found that target mRNAs remain bound to DRBD3. Total levels of two target transcripts, *AATP11* and *PT-X*, are decreased about 2-fold upon arsenite treatment. Since DRBD3 stabilizes target transcripts [19], these results suggest that not all *AATP11* and *PT-X* molecules are bound to DRBD3 in the cell, and that the pool associated with DRBD3 is

more protected from degradation in arsenite conditions. Indeed, it is known that most mRNAs associate to multiple RNA-binding proteins in other eukaryotes ([32] and references therein). Moreover, we have found that *PT-X* also binds to a different RNA-binding protein in trypanosomes (data not shown).

DRBD3 is dissociated from most proteins upon arsenite-induced stress, PABPs being the only proteins detected in the complex. This is in apparent contradiction to localization data since DRBD3, but not PABPs, translocated to the nucleus after arsenite treatment. However, a significant amount of DRBD3 remained in the cytoplasm in these conditions, where it could be

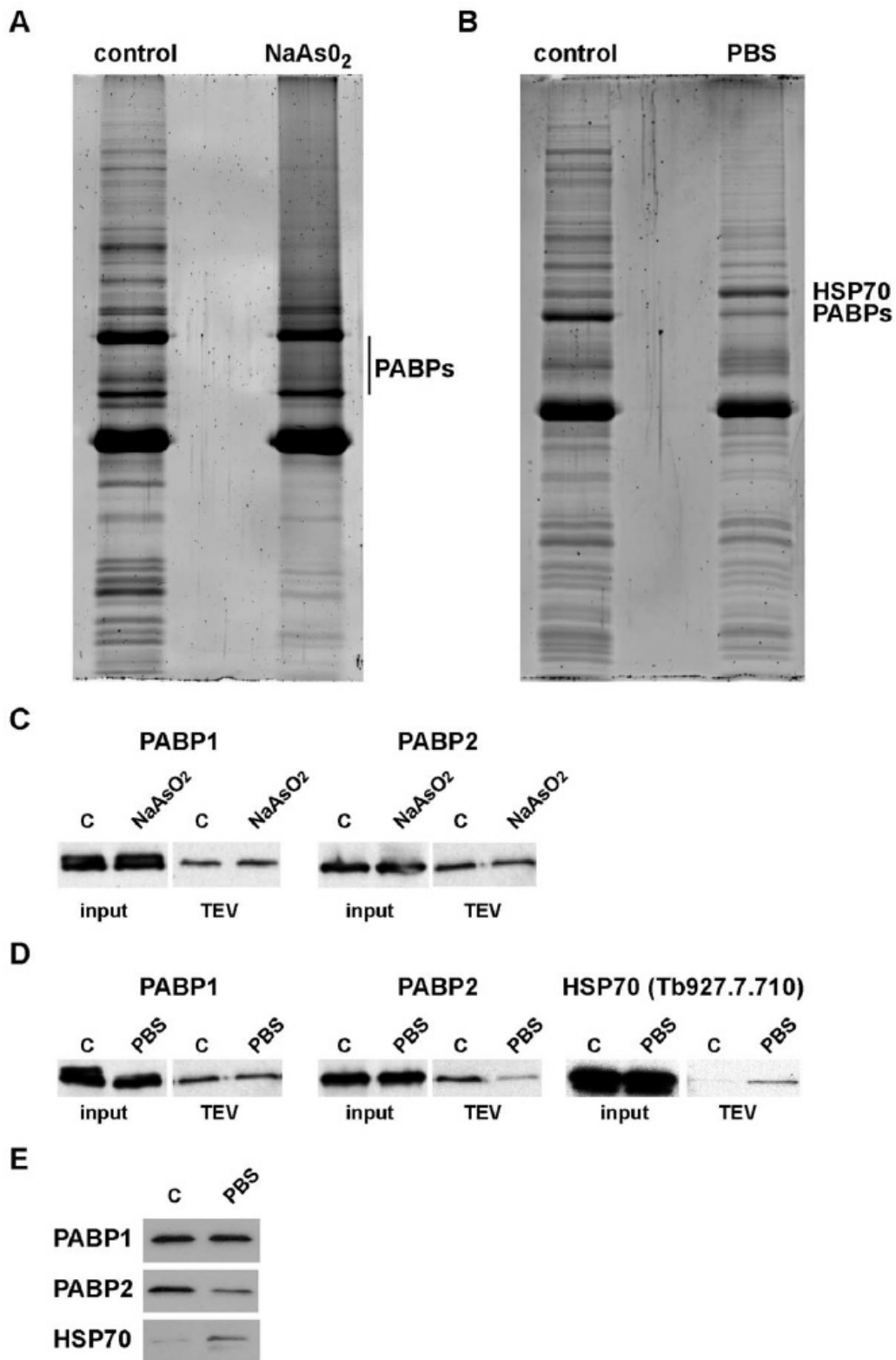


Figure 4. Arsenite- and starvation-induced stress affects DRBD3 complex composition. DRBD3 protein complexes were TAP-purified from cells incubated with 50 μM sodium arsenite for 3 h (A) or starved in PBS for 3 h (B), and compared to TAPs carried out with lysates obtained from equivalent amounts of normally grown trypanosomes (control). (C) Cell lines were generated that expressed both TAP-DRBD3 and 4xTy-tagged versions of PABP1 or PABP2. The presence of PABPs was assayed in the presence or absence of arsenite by western blot after IgG chromatography and TEV cleavage. (D) Association of Ty-PABP1, Ty-PABP2 and Ty-HSP70 with DRBD3 in starvation conditions was also analyzed as in panel C. (E) We also generated cell lines expressing TAP- or PTP-tagged versions of PABP1, PABP2 and HSP70. The amount of DRBD3 that copurified with these proteins in starvation conditions was analyzed after IgG chromatography and TEV cleavage using a DRBD3 antiserum. doi:10.1371/journal.pone.0048870.g004

associated with PABPs. Starvation, on the other hand, promotes the dissociation of PABP2, but not PABP1, and the binding of a HSP70 chaperone. All these changes indicate that DRBD3 complexes are remodeled in response to environmental stimuli. Interestingly, two splicing factors, U1-70K and U1C, copurify with DRBD3. Since depletion of DRBD3 causes splicing defects in target mRNAs [20], our results suggest that DRBD3 binds to target transcripts already in the nucleus, transports them to the cytoplasm and regulates their fate through the association to various proteins involved in RNA splicing and turnover.

Materials and Methods

Trypanosome Culture

Trypanosoma brucei Lister 427 procyclic cells were grown at 27°C in SDM-79 medium [33] containing 10% fetal bovine serum. Sodium arsenite was used at a final concentration of 50 μM . For starvation experiments, cells were collected from logarithmic cultures, washed twice in phosphate-buffered saline (PBS),

resuspended in the original volume of PBS and incubated at 27°C for 3 h with gentle shaking. Transgenic trypanosomes were obtained following standard procedures [34].

Immunofluorescence Assays

Immunolocalization studies were carried out as previously described [17,19], using polyclonal anti-*Tb*DRBD3 [19], anti-protein A (Sigma) or BB2 monoclonal antibodies [24].

Expression of TAP-, PTP-, eYFP-, mChFP- and Ty-fusion Proteins

Details of constructs for the expression of tagged proteins are provided in Figure S1, and are based in vectors described in [35]. Tagged proteins were expressed from their endogenous loci except for RRP44-TAP, which was inducibly expressed from a ribosomal DNA spacer using 1 $\mu\text{g/ml}$ tetracycline for 48 hours.

Tandem Affinity Purification (TAP)

Cells ($1-2 \times 10^{10}$) were harvested in log phase, washed in serum-free SDM-79 medium and frozen at -80°C until use. Protein extracts were obtained by resuspending the cell pellet in 1 ml of lysis buffer per 10^9 cells [10 mM Tris-HCl, pH 7.6, 2 mM DTT, 0.1% (w/v) Igepal CA-630, Complete protease inhibitor cocktail without EDTA (Roche)] and passing the suspension through a 27-gauge syringe thrice on ice. Lysates were centrifuged at $16,000 \times g$ for 10 min at 4°C. NaCl was added to the supernatant at a final concentration of 150 mM. TAP procedure was performed as described in [21], except that TEV digestion was carried out overnight at 4°C, and binding to calmodulin beads was allowed to proceed for 4 hours at 4°C. Protein complexes were eluted in 1 ml of 10 mM Tris-HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl, 20 mM EGTA, precipitated for 30 min on ice with 20% trichloroacetic acid and 0.08% sodium deoxycholate in siliconized tubes, washed with 100% acetone, air-dried, loaded in 10% PAGE-SDS gels and stained with Sypro Ruby. Protein bands were excised, subjected to MALDI-TOF analysis and identified using MASCOT software (<http://www.matrixscience.com>).

For RNases treatment, half of the lysate was incubated with 50 μg of RNase A and 1,000 units of RNase T1 for 30 min on ice before centrifugation. To confirm proper digestion, RNA was extracted from TEV eluate aliquots. cDNA was obtained from 1 μg of DNase-treated RNA using 0.5 μg of random hexamers (Invitrogen) and Maxima reverse transcriptase (Fermentas), and PCR-amplified using specific primers pairs for the mRNAs encoding the amino acid transporter AATP11 (Tb927.4.4730), the pteridine transporter on chromosome 10, PT-X (Tb927.10.9080), and the nucleobase transporter *Tb*NT10 (Tb927.9.7470), as described [19].

To confirm the association of DRBD3 with different protein partners, small-scale purifications were carried out from 3×10^9 cells expressing candidate proteins fused to PTP or TAP tags. In this case, TEV eluates were precipitated with trichloroacetic acid as above, loaded in 10% SDS-PAGE gels, transferred to nitrocellulose membranes and assayed for the presence of DRBD3 using anti-DRBD3 antiserum [19].

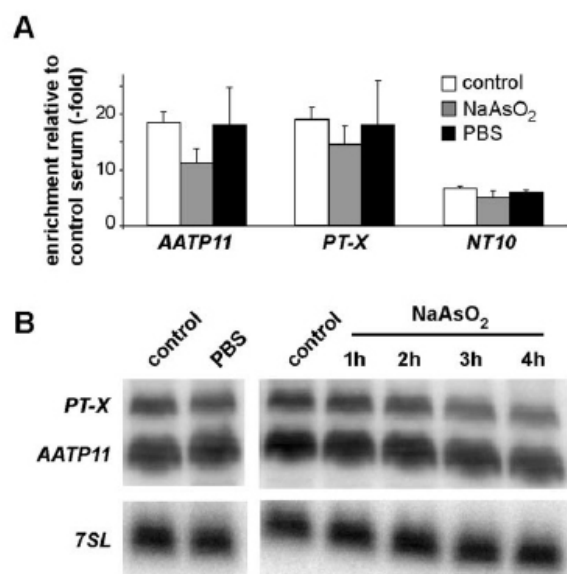


Figure 5. DRBD3-associated transcripts remain bound in stress conditions. (A) Association of DRBD3-regulated mRNAs was assayed by quantitative RT-PCR after immunoprecipitation of DRBD3 ribonucleoprotein complexes using anti-DRBD3 antiserum from normally grown (control) or stressed trypanosomes. Fold-enrichment of target transcripts was calculated after comparing to mock immunoprecipitations carried out using normal rabbit serum and normalizing to the 7SL RNA. Experiments were done at least four times. (B) Total levels of AATP11 and PT-X in control or stressed cells were visualized by Northern blot analysis using specific radioactive probes [19]. RNA samples were extracted from cells starved during 3 hours in PBS or incubated in the presence of 50 μM sodium arsenite for 1–4 hours. doi:10.1371/journal.pone.0048870.g005

Polysome Analysis

The association of DRBD3 with polysomes was tested using 10%–50% sucrose gradients as previously described [17]. Both puromycin and cycloheximide were used at 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$. EDTA was used at 50 mM.

mRNA Analysis

The association of mRNAs with DRBD3 under different conditions was assayed by immunoprecipitation of DRBD3 ribonucleoprotein complexes followed by quantitative RT-PCR. Cell lysates were obtained from 1×10^9 cells as above. Vanadyl ribonucleoside complexes (Sigma) and RiboLock (Fermentas) were included in the lysis buffer at a concentration of 2 mM and 50 U/ml, respectively. One half of the lysate was incubated with DRBD3 antiserum bound to protein-G Dynabeads, and the other half was incubated with normal rabbit serum (Sigma) as a control. Beads were washed four times in 10 mM Tris-HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl, 0.1% (w/v) Igepal CA-630 and incubated for 30 min at 50°C with 100 μg of proteinase K in 10 mM Tris-HCl, pH 8, 100 mM NaCl, 0.5% SDS and 1 mM EDTA. RNA was extracted with phenol:chloroform and treated with RQ1 DNase I (Promega). 300 ng of RNA were converted to cDNA using random hexamers as above. Quantitative RT-PCR reactions were performed using Fermentas SYBR Green master mix in a BioRad CFX96 thermal cycler with the following cycling conditions: 95°C, 10 min; $40 \times [95^\circ\text{C}, 15 \text{ s}; 55^\circ\text{C}, 30 \text{ s}]$. To confirm specificity, amplification was followed by melting temperature analysis, agarose gel electrophoresis and DNA sequencing. In addition, minus reverse transcriptase controls were included to rule out contamination of genomic DNA. Data were normalized relative to amplification of the signal recognition particle 7SL RNA. The following primers were used:

AATP11: AE184 (CAAACAGCCCTTATTCAACACCT-CACG), AE215 (GCAGCTCAGTGTCTCTATAAAT-CAATGC); *PT-X*: AE126 (GCTGAAGTGCAGGAGAGCGG-TAG), AE186 (GTTTGTGCTGCAACAACCTCTACG); *TbNT10*: AE647 (GAGAGCATGTTAACTCAGTCGAGG), AE648 (GCTGCAGCATGCCTAACTCAGC); *7SL*: AE460 (AGCCGGAGCGCATTGCTCTG), AE461 (CAACACCGA-CAGCAACC).

Supporting Information

Figure S1 Plasmids used in this work. Constructs (A) and strategy (B) used to generate a cell line expressing TAP-DRBD3 from the endogenous locus. (C) Assessment of DRBD3 expression in wild-type, DRBD3/– and TAP-DRBD3/– cell lines. One DRBD3 allele was replaced by a blasticidin resistance marker using plasmid pGR139. The resulting cell line, DRBD3/–, expressed a reduced amount of endogenous DRBD3. DRBD3/– cells were transfected with plasmid pGR136 to generate TAP-DRBD3/– trypanosomes that no longer produced endogenous DRBD3 and

expressed a TAP-tagged version of DRBD3 instead. Incubation of protein extracts from TAP-DRBD3/– cells with TEV protease caused cleavage of the IgG domains from the TAP sequence and the appearance of a protein corresponding to DRBD3 fused to the calmodulin-binding peptide (CBP) of the TAP tag, as expected. The cytosolic marker CSM was used as a loading control. (D) List of plasmids used for the expression of tagged proteins. All constructs target the endogenous loci, except for pHD1360, which is inserted into the rDNA spacer locus. p3378 was described in [17]; pHD360 in [36]; pHD918 in [23]; all other parental plasmids were described in [35].

(TIIF)

Figure S2 DHH1, PABP1 and PABP2 do not translocate to the nucleus upon arsenite treatment. Cells expressing 4xTy-tagged versions of these proteins were incubated with 50 μM sodium arsenite for 4 hours and processed for immunofluorescence analysis using both anti-DRBD3 antiserum and BB2 monoclonal antibodies. Bound antibodies were detected using Alexa Fluor 488 goat anti-rabbit and Alexa fluor 594 goat anti-mouse IgGs. The results obtained after 3 hours exposure to arsenite were undistinguishable from those shown here (data not shown).

(TIIF)

Figure S3 Tandem-affinity purification (TAP) of PABP2, DRBD3, the ribosome and RRP44. (A) Contamination of ribosomal proteins in TAP-purified PABP2 or RRP44 was assessed by mass spectrometry of all the bands visualized by Sypro staining. TAP of DRBD3 and the ribosome (using the ribosomal protein L18 as bait) are included for comparison. None of the bands analyzed in PABP2 and RRP44 purifications corresponded to any ribosomal protein. Asterisks indicate the protein used as bait in each case. The ~ 70 kDa band in the PABP2 purification corresponds to PABP2 fused to the calmodulin-binding peptide of the TAP tag; the ~ 65 kDa band is endogenous PABP2, and the ~ 55 kDa probably represents a PABP2 degradation product. The presence of both tagged and endogenous PABP2 molecules in the purified complex indicates self-association of PABP2 within the cell. (B) Association of DRBD3 to ribosomal proteins was consistently observed in eight independent TAP purifications.

(TIIF)

Acknowledgments

We thank Christine Clayton for providing pHD constructs, Steve Reed for P0 antiserum, James D. Bang for BiP antiserum and Osvaldo de Melo Neto for PABP2 antiserum.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: AME MC. Performed the experiments: SMFM AGP SK AME. Analyzed the data: SMFM AGP SK MC AME. Wrote the paper: AME.

References

- Fernandes AP, Nelson K, Beverley SM (1993) Evolution of nuclear ribosomal RNAs in kinetoplastid protozoa: Perspectives on age and origins of parasitism. *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 11608–11612.
- Stuart K, Brun R, Croft S, Fairlamb A, Gurtler RE, et al. (2008) Kinetoplastids: related protozoan pathogens, different diseases. *J Clin Invest* 118: 1301–1310.
- Fernandez-Moya SM, Estevez AM (2010) Posttranscriptional control and the role of RNA-binding proteins in gene regulation in trypanosomatid protozoan parasites. *Wiley Interdiscip Rev RNA* 1: 34–46.
- Martinez-Calvillo S, Yan S, Nguyen D, Fox M, Stuart K, et al. (2003) Transcription of *Leishmania major* Friedlin chromosome 1 initiates in both directions within a single region. *Mol Cell* 11: 1291–1299.
- Liang XH, Haritan A, Ulid S, Michaeli S (2003) *bas* and *civ* splicing in trypanosomatids: mechanism, factors, and regulation. *Eukaryot Cell* 2: 830–840.
- Siegel TN, Hekstra DR, Kemp LE, Figueiredo LM, Lowell JE, et al. (2009) Four histone variants mark the boundaries of polycistronic transcription units in *Trypanosoma brucei*. *Genes Dev* 23: 1063–1076.
- Kramer S (2012) Developmental regulation of gene expression in the absence of transcriptional control: The case of kinetoplastids. *Mol Biochem Parasitol* 181: 61–72.
- Haile S, Papadopoulou B (2007) Developmental regulation of gene expression in trypanosomatid parasitic protozoa. *Curr Opin Microbiol* 10: 569–577.

9. Sharma R, Gluzen E, Peacock L, Gibson W, Gull K, et al. (2009) The heart of darkness: growth and form of *Trypanosoma brucei* in the tsetse fly. *Trends Parasitol* 25: 517–524.
10. Matthews KR (2005) The developmental cell biology of *Trypanosoma brucei*. *J Cell Sci* 118: 283–290.
11. Kramer S, Carrington M (2011) *Trans*-acting proteins regulating mRNA maturation, stability and translation in trypanosomatids. *Trends Parasitol* 27: 23–30.
12. Buchan JR, Parker R (2009) Eukaryotic stress granules: the ins and outs of translation. *Mol Cell* 36: 932–941.
13. D'Orso I, Frasch AC (2002) *Ta*UBP-1, a mRNA destabilizing factor from trypanosomes, homodimerizes and interacts with a novel ARE- and poly(A)-binding proteins forming a ribonucleoprotein complex. *J Biol Chem* 277: 50520–50528.
14. Noe G, De Gaudenzi JG, Frasch AC (2008) Functionally related transcripts have common RNA motifs for specific RNA-binding proteins in trypanosomes. *BMC Mol Biol* 9: 107.
15. Cassola A, Frasch AC (2009) An RNA recognition motif mediates the nucleocytoplasmic transport of a trypanosome RNA-binding protein. *J Biol Chem* 284: 35015–35028.
16. Nazer E, Verdun RE, Sanchez DO (2011) Nucleolar localization of RNA binding proteins induced by actinomycin D and heat shock in *Trypanosoma cruzi*. *PLoS One* 6: e19920.
17. Kramer S, Queiroz R, Ellis L, Webb H, Hoheisel J, et al. (2008) Heat shock causes a decrease in polysomes and appearance of stress granules in trypanosomes independently of eIF2 α phosphorylation at a position equivalent to serine 51. *J Cell Sci* 121: 3002–3014.
18. Cassola A, De Gaudenzi JG, Frasch AC (2007) Recruitment of mRNAs to cytoplasmic ribonucleoprotein granules in trypanosomes. *Mol Microbiol* 65: 655–670.
19. Estevez AM (2008) The RNA-binding protein *Tb*DRBD3 regulates the stability of a specific subset of mRNAs in trypanosomes. *Nucleic Acids Res* 36: 4573–4586.
20. Stern MZ, Gupta SK, Salmon-Divon M, Haham T, Barda O, et al. (2009) Multiple roles for polypyrimidine tract binding (PTB) proteins in trypanosome RNA metabolism. *RNA* 15: 648–665.
21. Puig O, Caspary F, Rigaut G, Rutz B, Bouveret E, et al. (2001) The tandem affinity purification (TAP) method: a general procedure of protein complex purification. *Methods* 24: 218–229.
22. Schimanski B, Nguyen TN, Gunzl A (2005) Highly efficient tandem affinity purification of trypanosome protein complexes based on a novel epitope combination. *Eukaryot Cell* 4: 1942–1950.
23. Estevez AM, Kempf T, Clayton C (2001) The exosome of *Trypanosoma brucei*. *EMBO J* 20: 3831–3839.
24. Bastin P, Bagherzadeh Z, Matthews KR, Gull K (1996) A novel epitope tag system to study protein targeting and organelle biogenesis in *Trypanosoma brucei*. *Mol Biochem Parasitol* 77: 235–239.
25. Kabani S, Fenn K, Ross A, Ivens A, Smith TK, et al. (2009) Genome-wide expression profiling of in vivo-derived bloodstream parasite stages and dynamic analysis of mRNA alterations during synchronous differentiation in *Trypanosoma brucei*. *BMC Genomics* 10: 427.
26. Jensen BC, Sivam D, Kifer CT, Myler PJ, Parsons M (2009) Widespread variation in transcript abundance within and across developmental stages of *Trypanosoma brucei*. *BMC Genomics* 10: 482.
27. Queiroz R, Benz C, Fellenberg K, Hoheisel JD, Clayton C (2009) Transcriptome analysis of differentiating trypanosomes reveals the existence of multiple post-transcriptional regulons. *BMC Genomics* 10: 495.
28. Siegel TN, Gunasekera K, Cross GA, Ochsenreiter T (2011) Gene expression in *Trypanosoma brucei*: lessons from high-throughput RNA sequencing. *Trends Parasitol* 27: 434–441.
29. Fenn K, Matthews KR (2007) The cell biology of *Trypanosoma brucei* differentiation. *Curr Opin Microbiol* 10: 539–546.
30. Garneau NL, Wilusz J, Wilusz CJ (2007) The highways and byways of mRNA decay. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8: 113–126.
31. Ouna BA, Stewart M, Helbig C, Clayton C (2012) The *Trypanosoma brucei* CCCH zinc finger proteins ZC3H12 and ZC3H13. *Mol Biochem Parasitol* 183: 184–188.
32. Keene JD (2010) The global dynamics of RNA stability orchestrates responses to cellular activation. *BMC Biol* 8: 95.
33. Brun R, Schönenberger M (1979) Cultivation and *in vitro* cloning of procyclic culture forms of *Trypanosoma brucei* in a semi-defined medium. 36: 289–292.
34. Clayton C, Estevez AM, Hartmann C, Albu VP, Field MC, et al. (2005) Down-regulating gene expression by RNA interference in *Trypanosoma brucei*. *Methods Mol Biol* 309: 39–60.
35. Kelly S, Reed J, Kramer S, Ellis L, Webb H, et al. (2007) Functional genomics in *Trypanosoma brucei*: a collection of vectors for the expression of tagged proteins from endogenous and ectopic gene loci. *Mol Biochem Parasitol* 154: 103–109.
36. 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*. *Mol Biochem Parasitol* 99: 89–102.

Bibliografía

- Alsford, S., D. J. Turner, et al. (2011). "High-throughput phenotyping using parallel sequencing of RNA interference targets in the African trypanosome." Genome Res **21**(6): 915-924.
- Anderson, P. and N. Kedersha (2006). "RNA granules." J Cell Biol **172**(6): 803-808.
- Anderson, P. and N. Kedersha (2009). "RNA granules: post-transcriptional and epigenetic modulators of gene expression." Nat Rev Mol Cell Biol **10**(6): 430-436.
- Archer, S., R. Queiroz, et al. (2008). "Trypanosomes as a model to investigate mRNA decay pathways." Methods Enzymol **448**: 359-377.
- Archer, S. K., V. D. Luu, et al. (2009). "Trypanosoma brucei PUF9 regulates mRNAs for proteins involved in replicative processes over the cell cycle." PLoS Pathog **5**(8): e1000565.
- Azzalin, C. M. and J. Lingner (2006). "The human RNA surveillance factor UPF1 is required for S phase progression and genome stability." Curr Biol **16**(4): 433-439.
- Balagopal, V. and R. Parker (2009). "Polysomes, P bodies and stress granules: states and fates of eukaryotic mRNAs." Curr Opin Cell Biol **21**(3): 403-408.
- Baldauf, S. L. (2003). "The deep roots of eukaryotes." Science **300**(5626): 1703-1706.
- Barquilla, A., J. L. Crespo, et al. (2008). "Rapamycin inhibits trypanosome cell growth by preventing TOR complex 2 formation." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(38): 14579-14584.
- Barquilla, A. and M. Navarro (2009). "Trypanosome TOR complex 2 functions in cytokinesis." Cell Cycle **8**(5): 697-699.
- Barry, J. D. (1997). "The relative significance of mechanisms of antigenic variation in African trypanosomes." Parasitol Today **13**(6): 212-218.
- Bashkirov, V. I., H. Scherthan, et al. (1997). "A mouse cytoplasmic exoribonuclease (mXRN1p) with preference for G4 tetraplex substrates." J Cell Biol **136**(4): 761-773.
- Bastin, P., Z. Bagherzadeh, et al. (1996). "A novel epitope tag system to study protein targeting and organelle biogenesis in Trypanosoma brucei." Mol Biochem Parasitol **77**(2): 235-239.
- Batista, J. A., S. M. Teixeira, et al. (1994). "Characterization of a Trypanosoma cruzi poly(A)-binding protein and its genes." Mol Biochem Parasitol **67**(2): 301-312.
- Benz, C., J. Mulindwa, et al. (2011). "The Trypanosoma brucei zinc finger protein ZC3H18 is involved in differentiation." Mol Biochem Parasitol **177**(2): 148-151.
- Benz, C., D. Nilsson, et al. (2005). "Messenger RNA processing sites in Trypanosoma brucei." Mol Biochem Parasitol **143**(2): 125-134.
- Berriman, M., E. Ghedin, et al. (2005). "The genome of the African trypanosome Trypanosoma brucei." Science **309**(5733): 416-422.
- Bhattacharyya, S. N., R. Habermacher, et al. (2006). "Relief of microRNA-mediated translational repression in human cells subjected to stress." Cell **125**(6): 1111-1124.
- Biebinger, S., S. Rettenmaier, et al. (1996). "The PARP promoter of Trypanosoma brucei is developmentally regulated in a chromosomal context." Nucleic Acids Res **24**(7): 1202-1211.
- Blum, B., N. Bakalara, et al. (1990). "A model for RNA editing in kinetoplastid mitochondria: "guide" RNA molecules transcribed from maxicircle DNA provide the edited information." Cell **60**(2): 189-198.
- Borst, P., J. H. Gommers-Ampt, et al. (1993). "Control of antigenic variation in African trypanosomes." Cold Spring Harb Symp Quant Biol **58**: 105-114.
- Boucher, N., Y. Wu, et al. (2002). "A common mechanism of stage-regulated gene expression in Leishmania mediated by a conserved 3'-untranslated region

- element.” *J Biol Chem* **277**(22): 19511-19520.
- Brenchley, R., H. Tariq, et al. (2007). “The TriTryp phosphatome: analysis of the protein phosphatase catalytic domains.” *BMC Genomics* **8**: 434.
- Bregues, M. and R. Parker (2007). “Accumulation of polyadenylated mRNA, Pab1p, eIF4E, and eIF4G with P-bodies in *Saccharomyces cerevisiae*.” *Mol Biol Cell* **18**(7): 2592-2602.
- Bringaud, F., N. Biteau, et al. (2002). “A new, expressed multigene family containing a hot spot for insertion of retroelements is associated with polymorphic subtelomeric regions of *Trypanosoma brucei*.” *Eukaryot Cell* **1**(1): 137-151.
- Bringaud, F., M. Muller, et al. (2007). “Members of a large retroposon family are determinants of post-transcriptional gene expression in *Leishmania*.” *PLoS Pathog* **3**(9): 1291-1307.
- Bringaud, F., D. R. Robinson, et al. (2000). “Characterization and disruption of a new *Trypanosoma brucei* repetitive flagellum protein, using double-stranded RNA inhibition.” *Mol Biochem Parasitol* **111**(2): 283-297.
- Brun, R., J. Blum, et al. (2010). “Human African trypanosomiasis.” *Lancet* **375**(9709): 148-159.
- Brune, C., S. E. Munchel, et al. (2005). “Yeast poly(A)-binding protein Pab1 shuttles between the nucleus and the cytoplasm and functions in mRNA export.” *RNA* **11**(4): 517-531.
- Buchan, J. R. and R. Parker (2009). “Eukaryotic stress granules: the ins and outs of translation.” *Mol Cell* **36**(6): 932-941.
- Buttner, K., K. Wenig, et al. (2006). “The exosome: a macromolecular cage for controlled RNA degradation.” *Mol Microbiol* **61**(6): 1372-1379.
- Caponigro, G. and R. Parker (1995). “Multiple functions for the poly(A)-binding protein in mRNA decapping and deadenylation in yeast.” *Genes Dev* **9**(19): 2421-2432.
- Caput, D., B. Beutler, et al. (1986). “Identification of a common nucleotide sequence in the 3'-untranslated region of mRNA molecules specifying inflammatory mediators.” *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**(6): 1670-1674.
- Carballo, E., W. S. Lai, et al. (1998). “Feedback inhibition of macrophage tumor necrosis factor- α production by tristetraprolin.” *Science* **281**(5379): 1001-1005.
- Caro, F., N. Bercovich, et al. (2006). “*Trypanosoma cruzi*: analysis of the complete PUF RNA-binding protein family.” *Exp Parasitol* **113**(2): 112-124.
- Cassola, A. (2011). “RNA Granules Living a Post-transcriptional Life: the Trypanosomes' Case.” *Curr Chem Biol* **5**(2): 108-117.
- Cassola, A., J. G. De Gaudenzi, et al. (2007). “Recruitment of mRNAs to cytoplasmic ribonucleoprotein granules in trypanosomes.” *Mol Microbiol* **65**(3): 655-670.
- Cassola, A. and A. C. Frasch (2009). “An RNA recognition motif mediates the nucleocytoplasmic transport of a trypanosome RNA-binding protein.” *J Biol Chem* **284**(50): 35015-35028.
- Cassola, A., G. Noe, et al. (2010). “RNA recognition motifs involved in nuclear import of RNA-binding proteins.” *RNA Biol* **7**(3): 339-344.
- Clayton, C. and M. Shapira (2007). “Post-transcriptional regulation of gene expression in trypanosomes and leishmanias.” *Mol Biochem Parasitol* **156**(2): 93-101.
- Clayton, C. E. (2002). “Life without transcriptional control? From fly to man and back again.” *EMBO J* **21**(8): 1881-1888.
- Clayton, C. E., A. M. Estevez, et al. (2005). “Down-regulating gene expression by RNA interference in *Trypanosoma brucei*.” *Methods Mol Biol* **309**: 39-60.
- Clayton, C. E., J. P. Fueri, et al. (1990). “Transcription of the procyclic acidic repetitive protein genes of *Trypanosoma*

- brucei." *Mol Cell Biol* **10**(6): 3036-3047.
- Colasante, C., A. Robles, et al. (2007). "Regulated expression of glycosomal phosphoglycerate kinase in *Trypanosoma brucei*." *Mol Biochem Parasitol* **151**(2): 193-204.
- Coughlin, B. C., S. M. Teixeira, et al. (2000). "Amastin mRNA abundance in *Trypanosoma cruzi* is controlled by a 3'-untranslated region position-dependent cis-element and an untranslated region-binding protein." *J Biol Chem* **275**(16): 12051-12060.
- Craig, A. W., A. Haghghat, et al. (1998). "Interaction of polyadenylate-binding protein with the eIF4G homologue PAIP enhances translation." *Nature* **392**(6675): 520-523.
- Cross, G. A., L. E. Wirtz, et al. (1998). "Regulation of vsg expression site transcription and switching in *Trypanosoma brucei*." *Mol Biochem Parasitol* **91**(1): 77-91.
- Cross, M., M. C. Taylor, et al. (1998). "Frequent loss of the active site during variant surface glycoprotein expression site switching in vitro in *Trypanosoma brucei*." *Mol Cell Biol* **18**(1): 198-205.
- Chang, Y. F., J. S. Imam, et al. (2007). "The nonsense-mediated decay RNA surveillance pathway." *Annu Rev Biochem* **76**: 51-74.
- Chawla, R., S. Redon, et al. (2011). "Human UPF1 interacts with TPP1 and telomerase and sustains telomere leading-strand replication." *EMBO J* **30**(19): 4047-4058.
- Chen, C. Y., R. Gherzi, et al. (2001). "AU binding proteins recruit the exosome to degrade ARE-containing mRNAs." *Cell* **107**(4): 451-464.
- D'Orso, I., J. G. De Gaudenzi, et al. (2003). "RNA-binding proteins and mRNA turnover in trypanosomes." *Trends Parasitol* **19**(4): 151-155.
- D'Orso, I. and A. C. Frasch (2001). "Functionally different AU- and G-rich cis-elements confer developmentally regulated mRNA stability in *Trypanosoma cruzi* by interaction with specific RNA-binding proteins." *J Biol Chem* **276**(19): 15783-15793.
- D'Orso, I. and A. C. Frasch (2001). "TcUBP-1, a developmentally regulated U-rich RNA-binding protein involved in selective mRNA destabilization in trypanosomes." *J Biol Chem* **276**(37): 34801-34809.
- D'Orso, I. and A. C. Frasch (2002). "TcUBP-1, an mRNA destabilizing factor from trypanosomes, homodimerizes and interacts with novel AU-rich element- and Poly(A)-binding proteins forming a ribonucleoprotein complex." *J Biol Chem* **277**(52): 50520-50528.
- da Costa Lima, T. D., D. M. Moura, et al. (2010). "Functional characterization of three leishmania poly(a) binding protein homologues with distinct binding properties to RNA and protein partners." *Eukaryot Cell* **9**(10): 1484-1494.
- Dallagiovanna, B., A. Correa, et al. (2008). "Functional genomic characterization of mRNAs associated with TcPUF6, a pumilio-like protein from *Trypanosoma cruzi*." *J Biol Chem* **283**(13): 8266-8273.
- Das, A., R. Morales, et al. (2012). "The essential polysome-associated RNA-binding protein RBP42 targets mRNAs involved in *Trypanosoma brucei* energy metabolism." *RNA* **18**(11): 1968-1983.
- Das, A., Q. Zhang, et al. (2005). "Trypanosomal TBP functions with the multisubunit transcription factor tSNAP to direct spliced-leader RNA gene expression." *Mol Cell Biol* **25**(16): 7314-7322.
- De Gaudenzi, J., A. C. Frasch, et al. (2005). "RNA-binding domain proteins in Kinetoplastids: a comparative analysis." *Eukaryot Cell* **4**(12): 2106-2114.
- Delhi, P., R. Queiroz, et al. (2011). "Is there a classical nonsense-mediated decay pathway in trypanosomes?" *PLoS One* **6**(9): e25112.
- Dhalia, R., C. R. Reis, et al. (2005). "Translation

- initiation in *Leishmania major*: characterisation of multiple eIF4F subunit homologues." Mol Biochem Parasitol **140**(1): 23-41.
- Di Noia, J. M., I. D'Orso, et al. (2000). "AU-rich elements in the 3'-untranslated region of a new mucin-type gene family of *Trypanosoma cruzi* confers mRNA instability and modulates translation efficiency." J Biol Chem **275**(14): 10218-10227.
- Diaz-Moreno, I., D. Hollingworth, et al. (2009). "Phosphorylation-mediated unfolding of a KH domain regulates KSRP localization via 14-3-3 binding." Nat Struct Mol Biol **16**(3): 238-246.
- Djikeng, A., H. Shi, et al. (2001). "RNA interference in *Trypanosoma brucei*: cloning of small interfering RNAs provides evidence for retroposon-derived 24-26-nucleotide RNAs." RNA **7**(11): 1522-1530.
- Droll, D., S. Archer, et al. (2010). "The trypanosome Pumilio-domain protein PUF7 associates with a nuclear cyclophilin and is involved in ribosomal RNA maturation." FEBS Lett **584**(6): 1156-1162.
- Durand-Dubief, M., S. Absalon, et al. (2007). "The Argonaute protein TbAGO1 contributes to large and mini-chromosome segregation and is required for control of RIME retroposons and RHS pseudogene-associated transcripts." Mol Biochem Parasitol **156**(2): 144-153.
- Engstler, M. and M. Boshart (2004). "Cold shock and regulation of surface protein trafficking convey sensitization to inducers of stage differentiation in *Trypanosoma brucei*." Genes Dev **18**(22): 2798-2811.
- Engstler, M., G. Reuter, et al. (1993). "The developmentally regulated trans-sialidase from *Trypanosoma brucei* sialylates the procyclic acidic repetitive protein." Mol Biochem Parasitol **61**(1): 1-13.
- Estevez, A. M. (2008). "The RNA-binding protein TbDRBD3 regulates the stability of a specific subset of mRNAs in trypanosomes." Nucleic Acids Res **36**(14): 4573-4586.
- Estevez, A. M., T. Kempf, et al. (2001). "The exosome of *Trypanosoma brucei*." EMBO J **20**(14): 3831-3839.
- Estevez, A. M., B. Lehner, et al. (2003). "The roles of intersubunit interactions in exosome stability." J Biol Chem **278**(37): 34943-34951.
- Estevez, A. M. and L. Simpson (1999). "Uridine insertion/deletion RNA editing in trypanosome mitochondria--a review." Gene **240**(2): 247-260.
- Etheridge, R. D., I. Aphasizheva, et al. (2008). "3' adenylation determines mRNA abundance and monitors completion of RNA editing in *T. brucei* mitochondria." EMBO J **27**(11): 1596-1608.
- Falaleeva, M. and S. Stamm (2013). "Processing of snoRNAs as a new source of regulatory non-coding RNAs: snoRNA fragments form a new class of functional RNAs." Bioessays **35**(1): 46-54.
- Feagin, J. E. and K. Stuart (1988). "Developmental aspects of uridine addition within mitochondrial transcripts of *Trypanosoma brucei*." Mol Cell Biol **8**(3): 1259-1265.
- Fenn, K. and K. R. Matthews (2007). "The cell biology of *Trypanosoma brucei* differentiation." Curr Opin Microbiol **10**(6): 539-546.
- Ferguson, M. A. (1999). "The structure, biosynthesis and functions of glycosylphosphatidylinositol anchors, and the contributions of trypanosome research." J Cell Sci **112** (Pt 17): 2799-2809.
- Fernandez-Moya, S. M. and A. M. Estevez (2010). "Posttranscriptional control and the role of RNA-binding proteins in gene regulation in trypanosomatid protozoan parasites." Wiley Interdiscip Rev RNA **1**(1): 34-46.
- Fernandez-Moya, S. M., A. Garcia-Perez, et al. (2012). "Alterations in DRBD3

- ribonucleoprotein complexes in response to stress in *Trypanosoma brucei*." PLoS One **7**(11): e48870.
- Fire, A., S. Xu, et al. (1998). "Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*." Nature **391**(6669): 806-811.
- Fisk, J. C. and L. K. Read (2011). "Protein arginine methylation in parasitic protozoa." Eukaryot Cell **10**(8): 1013-1022.
- Flynn, I. W. and I. B. Bowman (1973). "The metabolism of carbohydrate by pleomorphic African trypanosomes." Comp Biochem Physiol B **45**(1): 25-42.
- Folgueira, C., M. Martinez-Bonet, et al. (2010). "The *Leishmania infantum* PUF proteins are targets of the humoral response during visceral leishmaniasis." BMC Res Notes **3**: 13.
- Furger, A., N. Schurch, et al. (1997). "Elements in the 3' untranslated region of procyclin mRNA regulate expression in insect forms of *Trypanosoma brucei* by modulating RNA stability and translation." Mol Cell Biol **17**(8): 4372-4380.
- Garneau, N. L., J. Wilusz, et al. (2007). "The highways and byways of mRNA decay." Nat Rev Mol Cell Biol **8**(2): 113-126.
- Gerber, A. P., D. Herschlag, et al. (2004). "Extensive association of functionally and cytologically related mRNAs with Puf family RNA-binding proteins in yeast." PLoS Biol **2**(3): E79.
- Gilinger, G. and V. Bellofatto (2001). "Trypanosome spliced leader RNA genes contain the first identified RNA polymerase II gene promoter in these organisms." Nucleic Acids Res **29**(7): 1556-1564.
- Gottesdiener, K., H. M. Chung, et al. (1991). "Characterization of VSG gene expression site promoters and promoter-associated DNA rearrangement events." Mol Cell Biol **11**(5): 2467-2480.
- Grummt, I. and J. A. Skinner (1985). "Efficient transcription of a protein-coding gene from the RNA polymerase I promoter in transfected cells." Proc Natl Acad Sci U S A **82**(3): 722-726.
- Grynberg, P., D. G. Passos-Silva, et al. (2012). "Trypanosoma cruzi gene expression in response to gamma radiation." PLoS One **7**(1): e29596.
- Guerra-Giraldez, C., L. Quijada, et al. (2002). "Compartmentation of enzymes in a microbody, the glycosome, is essential in *Trypanosoma brucei*." J Cell Sci **115**(Pt 13): 2651-2658.
- Gunzl, A., T. Bruderer, et al. (2003). "RNA polymerase I transcribes procyclin genes and variant surface glycoprotein gene expression sites in *Trypanosoma brucei*." Eukaryot Cell **2**(3): 542-551.
- Haile, S., A. Dupe, et al. (2008). "Deadenylation-independent stage-specific mRNA degradation in *Leishmania*." Nucleic Acids Res **36**(5): 1634-1644.
- Haile, S., A. M. Estevez, et al. (2003). "A role for the exosome in the in vivo degradation of unstable mRNAs." RNA **9**(12): 1491-1501.
- Haile, S. and B. Papadopoulou (2007). "Developmental regulation of gene expression in trypanosomatid parasitic protozoa." Curr Opin Microbiol **10**(6): 569-577.
- Hartmann, C., C. Benz, et al. (2007). "Small trypanosome RNA-binding proteins TbUBP1 and TbUBP2 influence expression of F-box protein mRNAs in bloodstream trypanosomes." Eukaryot Cell **6**(11): 1964-1978.
- Hartmann, C. and C. Clayton (2008). "Regulation of a transmembrane protein gene family by the small RNA-binding proteins TbUBP1 and TbUBP2." Mol Biochem Parasitol **157**(1): 112-115.
- Hasan, G., M. J. Turner, et al. (1984). "Complete nucleotide sequence of an unusual mobile element from *trypanosoma brucei*." Cell **37**(1): 333-341.
- Hausler, T. and C. Clayton (1996). "Post-transcriptional control of hsp70 mRNA in *Trypanosoma brucei*." Mol Biochem Parasitol **76**(1-2): 57-71.

- Hay, B., L. Y. Jan, et al. (1988). "A protein component of *Drosophila* polar granules is encoded by *vasa* and has extensive sequence similarity to ATP-dependent helicases." Cell **55**(4): 577-587.
- Hehl, A., E. Vassella, et al. (1994). "A conserved stem-loop structure in the 3' untranslated region of procyclin mRNAs regulates expression in *Trypanosoma brucei*." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(1): 370-374.
- Hendriks, E. F. and K. R. Matthews (2005). "Disruption of the developmental programme of *Trypanosoma brucei* by genetic ablation of TbZFP1, a differentiation-enriched CCCH protein." Mol Microbiol **57**(3): 706-716.
- Hendriks, E. F., D. R. Robinson, et al. (2001). "A novel CCCH protein which modulates differentiation of *Trypanosoma brucei* to its procyclic form." EMBO J **20**(23): 6700-6711.
- Hieronymus, H. and P. A. Silver (2003). "Genome-wide analysis of RNA-protein interactions illustrates specificity of the mRNA export machinery." Nat Genet **33**(2): 155-161.
- Hock, J., L. Weinmann, et al. (2007). "Proteomic and functional analysis of Argonaute-containing mRNA-protein complexes in human cells." EMBO Rep **8**(11): 1052-1060.
- Holetz, F. B., A. Correa, et al. (2007). "Evidence of P-body-like structures in *Trypanosoma cruzi*." Biochem Biophys Res Commun **356**(4): 1062-1067.
- Hosoda, N., T. Kobayashi, et al. (2003). "Translation termination factor eRF3 mediates mRNA decay through the regulation of deadenylation." J Biol Chem **278**(40): 38287-38291.
- Hosoda, N., F. Lejeune, et al. (2006). "Evidence that poly(A) binding protein C1 binds nuclear pre-mRNA poly(A) tails." Mol Cell Biol **26**(8): 3085-3097.
- Hotchkiss, T. L., G. E. Nerantzakis, et al. (1999). "*Trypanosoma brucei* poly(A) binding protein I cDNA cloning, expression, and binding to 5 untranslated region sequence elements." Mol Biochem Parasitol **98**(1): 117-129.
- Hotz, H. R., C. Hartmann, et al. (1997). "Mechanisms of developmental regulation in *Trypanosoma brucei*: a polypyrimidine tract in the 3'-untranslated region of a surface protein mRNA affects RNA abundance and translation." Nucleic Acids Res **25**(15): 3017-3026.
- Hug, M., H. R. Hotz, et al. (1994). "Hierarchies of RNA-processing signals in a trypanosome surface antigen mRNA precursor." Mol Cell Biol **14**(11): 7428-7435.
- Hutvagner, G. and P. D. Zamore (2002). "RNAi: nature abhors a double-strand." Curr Opin Genet Dev **12**(2): 225-232.
- Ingelfinger, D., D. J. Arndt-Jovin, et al. (2002). "The human LSM1-7 proteins colocalize with the mRNA-degrading enzymes Dcp1/2 and Xrn1 in distinct cytoplasmic foci." RNA **8**(12): 1489-1501.
- Inoue, H., H. Nojima, et al. (1990). "High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids." Gene **96**(1): 23-28.
- Ivens, A. C., C. S. Peacock, et al. (2005). "The genome of the kinetoplastid parasite, *Leishmania major*." Science **309**(5733): 436-442.
- Iyer, L. M., V. Anantharaman, et al. (2008). "Comparative genomics of transcription factors and chromatin proteins in parasitic protists and other eukaryotes." Int J Parasitol **38**(1): 1-31.
- Jager, A. V., J. G. De Gaudenzi, et al. (2007). "mRNA maturation by two-step trans-splicing/polyadenylation processing in trypanosomes." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(7): 2035-2042.
- Janz, L. and C. Clayton (1994). "The PARP and rRNA promoters of *Trypanosoma brucei* are composed of dissimilar sequence elements that are functionally interchangeable." Mol Cell Biol **14**(9): 5804-5811.

- Janzen, C. J., F. van Deursen, et al. (2006). "Expression site silencing and life-cycle progression appear normal in Argonaute1-deficient *Trypanosoma brucei*." Mol Biochem Parasitol **149**(1): 102-107.
- Jensen, B. C., D. Sivam, et al. (2009). "Widespread variation in transcript abundance within and across developmental stages of *Trypanosoma brucei*." BMC Genomics **10**: 482.
- Johnson, A. W. (1997). "Rat1p and Xrn1p are functionally interchangeable exoribonucleases that are restricted to and required in the nucleus and cytoplasm, respectively." Mol Cell Biol **17**(10): 6122-6130.
- Kabani, S., K. Fenn, et al. (2009). "Genome-wide expression profiling of in vivo-derived bloodstream parasite stages and dynamic analysis of mRNA alterations during synchronous differentiation in *Trypanosoma brucei*." BMC Genomics **10**: 427.
- Kedersha, N., S. Chen, et al. (2002). "Evidence that ternary complex (eIF2-GTP-tRNA(i)(Met))-deficient preinitiation complexes are core constituents of mammalian stress granules." Mol Biol Cell **13**(1): 195-210.
- Keene, J. D. (2010). "The global dynamics of RNA stability orchestrates responses to cellular activation." BMC Biol **8**: 95.
- Keene, J. D. and S. A. Tenenbaum (2002). "Eukaryotic mRNPs may represent posttranscriptional operons." Mol Cell **9**(6): 1161-1167.
- Kelly, S., S. Kramer, et al. (2012). "Genome organization is a major component of gene expression control in response to stress and during the cell division cycle in trypanosomes." Open Biol **2**(4): 120033.
- Kielkopf, C. L., S. Lucke, et al. (2004). "U2AF homology motifs: protein recognition in the RRM world." Genes Dev **18**(13): 1513-1526.
- Kimball, S. R., R. L. Horetsky, et al. (2003). "Mammalian stress granules represent sites of accumulation of stalled translation initiation complexes." Am J Physiol Cell Physiol **284**(2): C273-284.
- Kimmel, B. E., O. K. ole-MoiYoi, et al. (1987). "Ingi, a 5.2-kb dispersed sequence element from *Trypanosoma brucei* that carries half of a smaller mobile element at either end and has homology with mammalian LINEs." Mol Cell Biol **7**(4): 1465-1475.
- Kinoshita, E., E. Kinoshita-Kikuta, et al. (2006). "Phosphate-binding tag, a new tool to visualize phosphorylated proteins." Mol Cell Proteomics **5**(4): 749-757.
- Kolev, N. G., J. B. Franklin, et al. (2010). "The transcriptome of the human pathogen *Trypanosoma brucei* at single-nucleotide resolution." PLoS Pathog **6**(9): e1001090.
- Kooter, J. M. and P. Borst (1984). "Alpha-amanitin-insensitive transcription of variant surface glycoprotein genes provides further evidence for discontinuous transcription in trypanosomes." Nucleic Acids Res **12**(24): 9457-9472.
- Koslowsky, D. J., G. J. Bhat, et al. (1990). "The MURF3 gene of *T. brucei* contains multiple domains of extensive editing and is homologous to a subunit of NADH dehydrogenase." Cell **62**(5): 901-911.
- Kramer, S. (2012). "Developmental regulation of gene expression in the absence of transcriptional control: the case of kinetoplastids." Mol Biochem Parasitol **181**(2): 61-72.
- Kramer, S., B. Bannerman-Chukualim, et al. (2013). "Differential Localization of the Two *T. brucei* Poly(A) Binding Proteins to the Nucleus and RNP Granules Suggests Binding to Distinct mRNA Pools." PLoS One **8**(1): e54004.
- Kramer, S. and M. Carrington (2011). "Trans-acting proteins regulating mRNA maturation, stability and translation in trypanosomatids." Trends Parasitol **27**(1): 23-30.

- Kramer, S., N. C. Kimblin, et al. (2010). "Genome-wide in silico screen for CCCH-type zinc finger proteins of *Trypanosoma brucei*, *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania major*." BMC Genomics **11**: 283.
- Kramer, S., A. Marnef, et al. (2012). "Inhibition of mRNA maturation in trypanosomes causes the formation of novel foci at the nuclear periphery containing cytoplasmic regulators of mRNA fate." J Cell Sci **125**(Pt 12): 2896-2909.
- Kramer, S., R. Queiroz, et al. (2008). "Heat shock causes a decrease in polysomes and the appearance of stress granules in trypanosomes independently of eIF2(alpha) phosphorylation at Thr169." J Cell Sci **121**(Pt 18): 3002-3014.
- Langmead, B., C. Trapnell, et al. (2009). "Ultrafast and memory-efficient alignment of short DNA sequences to the human genome." Genome Biol **10**(3): R25.
- Le, H., R. L. Tanguay, et al. (1997). "Translation initiation factors eIF-iso4G and eIF-4B interact with the poly(A)-binding protein and increase its RNA binding activity." J Biol Chem **272**(26): 16247-16255.
- Li, C. H., H. Irmer, et al. (2006). "Roles of a *Trypanosoma brucei* 5'->3' exoribonuclease homolog in mRNA degradation." RNA **12**(12): 2171-2186.
- Li, Z. H., J. G. De Gaudenzi, et al. (2012). "A 43-nucleotide U-rich element in 3'-untranslated region of large number of *Trypanosoma cruzi* transcripts is important for mRNA abundance in intracellular amastigotes." J Biol Chem **287**(23): 19058-19069.
- Liang, X. H., A. Haritan, et al. (2003). "trans and cis splicing in trypanosomatids: mechanism, factors, and regulation." Eukaryot Cell **2**(5): 830-840.
- Ling, A. S., J. R. Trotter, et al. (2011). "A zinc finger protein, TbZC3H20, stabilizes two developmentally regulated mRNAs in trypanosomes." J Biol Chem **286**(23): 20152-20162.
- Liu, J., F. V. Rivas, et al. (2005). "A role for the P-body component GW182 in microRNA function." Nat Cell Biol **7**(12): 1261-1266.
- Loewith, R., E. Jacinto, et al. (2002). "Two TOR complexes, only one of which is rapamycin sensitive, have distinct roles in cell growth control." Mol Cell **10**(3): 457-468.
- Lorkovic, Z. J. and A. Barta (2002). "Genome analysis: RNA recognition motif (RRM) and K homology (KH) domain RNA-binding proteins from the flowering plant *Arabidopsis thaliana*." Nucleic Acids Res **30**(3): 623-635.
- Lustig, Y., L. Sheiner, et al. (2007). "Spliced-leader RNA silencing: a novel stress-induced mechanism in *Trypanosoma brucei*." EMBO Rep **8**(4): 408-413.
- Luu, V. D., S. Brems, et al. (2006). "Functional analysis of *Trypanosoma brucei* PUF1." Mol Biochem Parasitol **150**(2): 340-349.
- Mahmood, R., B. Mittra, et al. (2001). "Characterization of the *Crithidia fasciculata* mRNA cycling sequence binding proteins." Mol Cell Biol **21**(14): 4453-4459.
- Mair, G., H. Shi, et al. (2000). "A new twist in trypanosome RNA metabolism: cis-splicing of pre-mRNA." RNA **6**(2): 163-169.
- Mandava, V., J. P. Fernandez, et al. (2007). "Histone modifications in *Trypanosoma brucei*." Mol Biochem Parasitol **156**(1): 41-50.
- Maquat, L. E. (2005). "Nonsense-mediated mRNA decay in mammals." J Cell Sci **118**(Pt 9): 1773-1776.
- Martinez-Calvillo, S., D. Nguyen, et al. (2004). "Transcription initiation and termination on *Leishmania major* chromosome 3." Eukaryot Cell **3**(2): 506-517.
- Martinez-Calvillo, S., S. Yan, et al. (2003). "Transcription of *Leishmania major* Friedlin chromosome 1 initiates in both directions within a single region." Mol Cell **11**(5): 1291-1299.

- Matera, A. G., R. M. Terns, et al. (2007). "Non-coding RNAs: lessons from the small nuclear and small nucleolar RNAs." Nat Rev Mol Cell Biol **8**(3): 209-220.
- Matthews, K. R. (2005). "The developmental cell biology of *Trypanosoma brucei*." J Cell Sci **118**(Pt 2): 283-290.
- Matthews, K. R. and K. Gull (1994). "Evidence for an interplay between cell cycle progression and the initiation of differentiation between life cycle forms of African trypanosomes." J Cell Biol **125**(5): 1147-1156.
- Matthews, K. R., C. Tschudi, et al. (1994). "A common pyrimidine-rich motif governs trans-splicing and polyadenylation of tubulin polycistronic pre-mRNA in trypanosomes." Genes Dev **8**(4): 491-501.
- Mayho, M., K. Fenn, et al. (2006). "Post-transcriptional control of nuclear-encoded cytochrome oxidase subunits in *Trypanosoma brucei*: evidence for genome-wide conservation of life-cycle stage-specific regulatory elements." Nucleic Acids Res **34**(18): 5312-5324.
- McCulloch, R., E. Vassella, et al. (2004). "Transformation of monomorphic and pleomorphic *Trypanosoma brucei*." Methods Mol Biol **262**: 53-86.
- McNicoll, F., M. Muller, et al. (2005). "Distinct 3'-untranslated region elements regulate stage-specific mRNA accumulation and translation in *Leishmania*." J Biol Chem **280**(42): 35238-35246.
- Milone, J., J. Wilusz, et al. (2002). "Identification of mRNA decapping activities and an ARE-regulated 3' to 5' exonuclease activity in trypanosome extracts." Nucleic Acids Res **30**(18): 4040-4050.
- Miller, M. M. and L. K. Read (2003). "*Trypanosoma brucei*: functions of RBP16 cold shock and RGG domains in macromolecular interactions." Exp Parasitol **105**(2): 140-148.
- Mishra, K. K., T. R. Holzer, et al. (2003). "A negative regulatory element controls mRNA abundance of the *Leishmania mexicana* Paraflagellar rod gene PFR2." Eukaryot Cell **2**(5): 1009-1017.
- Mittra, B. and D. S. Ray (2004). "Presence of a poly(A) binding protein and two proteins with cell cycle-dependent phosphorylation in *Crithidia fasciculata* mRNA cycling sequence binding protein II." Eukaryot Cell **3**(5): 1185-1197.
- Moore, S., S. Shrestha, et al. (2012). "Predicting the effect of climate change on African trypanosomiasis: integrating epidemiology with parasite and vector biology." J R Soc Interface **9**(70): 817-830.
- Muller, M., P. K. Padmanabhan, et al. (2010). "Selective inactivation of SIDER2 retroposon-mediated mRNA decay contributes to stage- and species-specific gene expression in *Leishmania*." Mol Microbiol **77**(2): 471-491.
- Muller, M., P. K. Padmanabhan, et al. (2010). "Rapid decay of unstable *Leishmania* mRNAs bearing a conserved retroposon signature 3'-UTR motif is initiated by a site-specific endonucleolytic cleavage without prior deadenylation." Nucleic Acids Res **38**(17): 5867-5883.
- Murray, A., C. Fu, et al. (2007). "Regions in the 3' untranslated region confer stage-specific expression to the *Leishmania mexicana* a600-4 gene." Mol Biochem Parasitol **153**(2): 125-132.
- Ngo, H., C. Tschudi, et al. (1998). "Double-stranded RNA induces mRNA degradation in *Trypanosoma brucei*." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(25): 14687-14692.
- Njiokou, F., C. Laveissiere, et al. (2006). "Wild fauna as a probable animal reservoir for *Trypanosoma brucei* gambiense in Cameroon." Infect Genet Evol **6**(2): 147-153.
- Noe, G., J. G. De Gaudenzi, et al. (2008). "Functionally related transcripts have common RNA motifs for specific RNA-binding proteins in trypanosomes." BMC Mol Biol **9**: 107.
- Oberholzer, M., S. Morand, et al. (2006). "A vector series for rapid PCR-

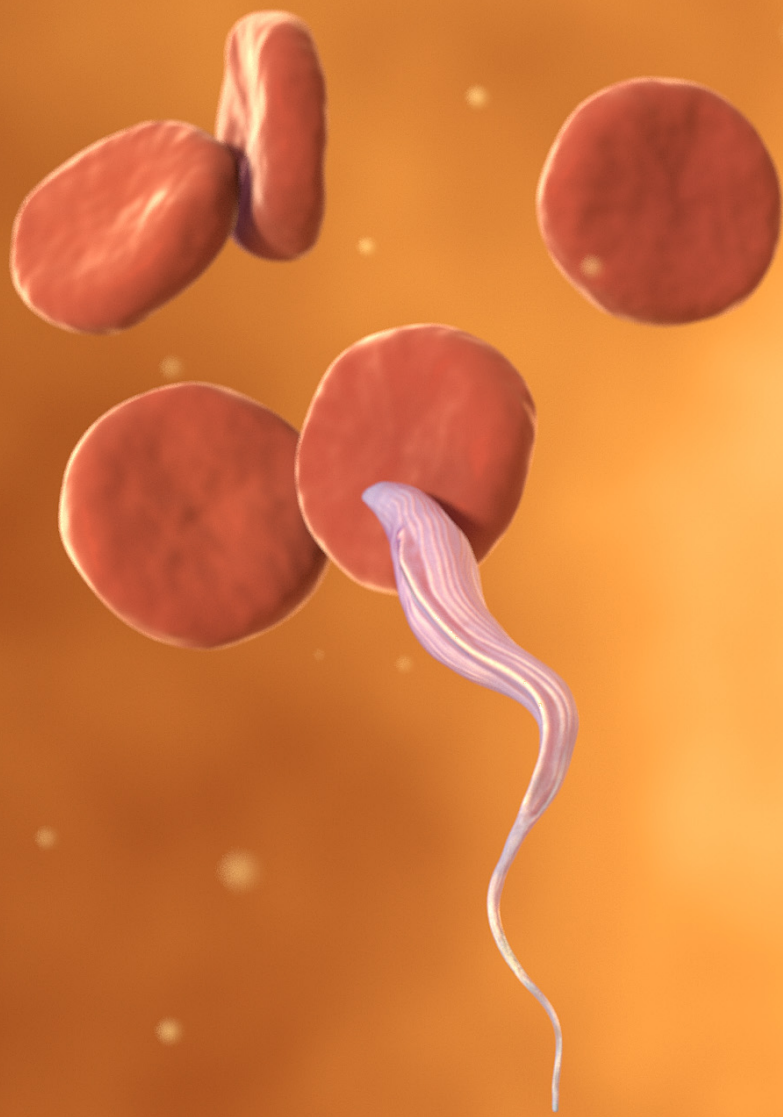
- mediated C-terminal in situ tagging of *Trypanosoma brucei* genes.” Mol Biochem Parasitol **145**(1): 117-120.
- Ouna, B. A., M. Stewart, et al. (2012). “The *Trypanosoma brucei* CCCH zinc finger proteins ZC3H12 and ZC3H13.” Mol Biochem Parasitol **183**(2): 184-188.
- Palfi, Z., W. S. Lane, et al. (2002). “Biochemical and functional characterization of the cis-spliceosomal U1 small nuclear RNP from *Trypanosoma brucei*.” Mol Biochem Parasitol **121**(2): 233-243.
- Panigrahi, A. K., A. Schnauffer, et al. (2003). “Identification of novel components of *Trypanosoma brucei* editosomes.” RNA **9**(4): 484-492.
- Parker, F., F. Maurier, et al. (1996). “A Ras-GTPase-activating protein SH3-domain-binding protein.” Mol Cell Biol **16**(6): 2561-2569.
- Parker, R. and U. Sheth (2007). “P bodies and the control of mRNA translation and degradation.” Mol Cell **25**(5): 635-646.
- Parsons, M., E. A. Worthey, et al. (2005). “Comparative analysis of the kinomes of three pathogenic trypanosomatids: *Leishmania major*, *Trypanosoma brucei* and *Trypanosoma cruzi*.” BMC Genomics **6**: 127.
- Paterou, A., P. Walrad, et al. (2006). “Identification and stage-specific association with the translational apparatus of TbZFP3, a CCCH protein that promotes trypanosome life-cycle development.” J Biol Chem **281**(51): 39002-39013.
- Pays, E. (2005). “Regulation of antigen gene expression in *Trypanosoma brucei*.” Trends Parasitol **21**(11): 517-520.
- Pays, E. and D. P. Nolan (1998). “Expression and function of surface proteins in *Trypanosoma brucei*.” Mol Biochem Parasitol **91**(1): 3-36.
- Perry, K. L., K. P. Watkins, et al. (1987). “*Trypanosome* mRNAs have unusual “cap 4” structures acquired by addition of a spliced leader.” Proc Natl Acad Sci U S A **84**(23): 8190-8194.
- Preiss, T. and M. W. Hentze (1999). “From factors to mechanisms: translation and translational control in eukaryotes.” Curr Opin Genet Dev **9**(5): 515-521.
- Priest, J. W. and S. L. Hajduk (1994). “Developmental regulation of mitochondrial biogenesis in *Trypanosoma brucei*.” J Bioenerg Biomembr **26**(2): 179-191.
- Puig, O., F. Caspary, et al. (2001). “The tandem affinity purification (TAP) method: a general procedure of protein complex purification.” Methods **24**(3): 218-229.
- Queiroz, R., C. Benz, et al. (2009). “Transcriptome analysis of differentiating trypanosomes reveals the existence of multiple post-transcriptional regulons.” BMC Genomics **10**: 495.
- Quijada, L., C. Guerra-Giraldez, et al. (2002). “Expression of the human RNA-binding protein HuR in *Trypanosoma brucei* increases the abundance of mRNAs containing AU-rich regulatory elements.” Nucleic Acids Res **30**(20): 4414-4424.
- Quijada, L., M. Soto, et al. (2000). “Identification of a putative regulatory element in the 3'-untranslated region that controls expression of HSP70 in *Leishmania infantum*.” Mol Biochem Parasitol **110**(1): 79-91.
- Raineri, I., D. Wegmueller, et al. (2004). “Roles of AUF1 isoforms, HuR and BRF1 in ARE-dependent mRNA turnover studied by RNA interference.” Nucleic Acids Res **32**(4): 1279-1288.
- Respuela, P., M. Ferella, et al. (2008). “Histone acetylation and methylation at sites initiating divergent polycistronic transcription in *Trypanosoma cruzi*.” J Biol Chem **283**(23): 15884-15892.
- Richter, J. D. and N. Sonenberg (2005). “Regulation of cap-dependent translation by eIF4E inhibitory proteins.” Nature **433**(7025): 477-480.
- Robinson, M. D., D. J. McCarthy, et al. (2010). “edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data.” Bioinformatics

- 26(1): 139-140.
- Roditi, I. and M. Liniger (2002). "Dressed for success: the surface coats of insect-borne protozoan parasites." Trends Microbiol **10**(3): 128-134.
- Rudenko, G., D. Bishop, et al. (1989). "Alpha-amanitin resistant transcription of protein coding genes in insect and bloodstream form *Trypanosoma brucei*." EMBO J **8**(13): 4259-4263.
- Sambrook, J., E. F. Fritsch, et al. (1989). Molecular cloning : a laboratory manual. Cold Spring Harbor, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Schimanski, B., T. N. Nguyen, et al. (2005). "Characterization of a multisubunit transcription factor complex essential for spliced-leader RNA gene transcription in *Trypanosoma brucei*." Mol Cell Biol **25**(16): 7303-7313.
- Schimanski, B., T. N. Nguyen, et al. (2005). "Highly efficient tandem affinity purification of trypanosome protein complexes based on a novel epitope combination." Eukaryot Cell **4**(11): 1942-1950.
- Schwede, A., L. Ellis, et al. (2008). "A role for Caf1 in mRNA deadenylation and decay in trypanosomes and human cells." Nucleic Acids Res **36**(10): 3374-3388.
- Shaked, H., C. Wachtel, et al. (2010). "Establishment of an in vitro trans-splicing system in *Trypanosoma brucei* that requires endogenous spliced leader RNA." Nucleic Acids Res **38**(10): e114.
- Shaw, G. and R. Kamen (1986). "A conserved AU sequence from the 3' untranslated region of GM-CSF mRNA mediates selective mRNA degradation." Cell **46**(5): 659-667.
- Sheth, U., J. Pitt, et al. (2010). "Perinuclear P granules are the principal sites of mRNA export in adult *C. elegans* germ cells." Development **137**(8): 1305-1314.
- Shi, H., A. Djikeng, et al. (2000). "Genetic interference in *Trypanosoma brucei* by heritable and inducible double-stranded RNA." RNA **6**(7): 1069-1076.
- Shi, H., A. Djikeng, et al. (2004). "Argonaute protein in the early divergent eukaryote *Trypanosoma brucei*: control of small interfering RNA accumulation and retroposon transcript abundance." Mol Cell Biol **24**(1): 420-427.
- Siegel, T. N., K. Gunasekera, et al. (2011). "Gene expression in *Trypanosoma brucei*: lessons from high-throughput RNA sequencing." Trends Parasitol **27**(10): 434-441.
- Siegel, T. N., D. R. Hekstra, et al. (2009). "Four histone variants mark the boundaries of polycistronic transcription units in *Trypanosoma brucei*." Genes Dev **23**(9): 1063-1076.
- Simarro, P. P., A. Diarra, et al. (2011). "The human African trypanosomiasis control and surveillance programme of the World Health Organization 2000-2009: the way forward." PLoS Negl Trop Dis **5**(2): e1007.
- Singh, G., S. Jakob, et al. (2007). "Communication with the exon-junction complex and activation of nonsense-mediated decay by human Upf proteins occur in the cytoplasm." Mol Cell **27**(5): 780-792.
- Smith, T. K., N. Vasileva, et al. (2009). "Blocking variant surface glycoprotein synthesis in *Trypanosoma brucei* triggers a general arrest in translation initiation." PLoS One **4**(10): e7532.
- Stern, M. Z., S. K. Gupta, et al. (2009). "Multiple roles for polypyrimidine tract binding (PTB) proteins in trypanosome RNA metabolism." RNA **15**(4): 648-665.
- Stevens, J. R. and W. C. Gibson (1999). "The evolution of pathogenic trypanosomes." Cad Saude Publica **15**(4): 673-684.
- Stuart, K. (1998). "RNA editing: trypanosomes rewrite the genetic code." Verh K Acad Geneesk Belg **60**(1): 63-74.
- Szoor, B., J. Wilson, et al. (2006). "Protein tyrosine phosphatase TbPTP1: A molecular switch controlling life cycle differentiation in trypanosomes." J Cell Biol **175**(2): 293-303.

- Talbert, P. B. and S. Henikoff (2009). "Chromatin-based transcriptional punctuation." *Genes Dev* **23**(9): 1037-1041.
- Thomas, S., A. Green, et al. (2009). "Histone acetylation marks origins of polycistronic transcription in *Leishmania major*." *BMC Genomics* **10**: 152.
- Ullu, E., K. R. Matthews, et al. (1993). "Temporal order of RNA-processing reactions in trypanosomes: rapid trans splicing precedes polyadenylation of newly synthesized tubulin transcripts." *Mol Cell Biol* **13**(1): 720-725.
- Ullu, E., C. Tschudi, et al. (2004). "RNA interference in protozoan parasites." *Cell Microbiol* **6**(6): 509-519.
- Urwyler, S., E. Studer, et al. (2007). "A family of stage-specific alanine-rich proteins on the surface of epimastigote forms of *Trypanosoma brucei*." *Mol Microbiol* **63**(1): 218-228.
- Utter, C. J., S. A. Garcia, et al. (2011). "PolyA-specific ribonuclease (PARN-1) function in stage-specific mRNA turnover in *Trypanosoma brucei*." *Eukaryot Cell* **10**(9): 1230-1240.
- Vanhamme, L. and E. Pays (1995). "Control of gene expression in trypanosomes." *Microbiol Rev* **59**(2): 223-240.
- Varsally, W. and S. Brogna (2012). "UPF1 involvement in nuclear functions." *Biochem Soc Trans* **40**(4): 778-783.
- Vassella, E., R. Braun, et al. (1994). "Control of polyadenylation and alternative splicing of transcripts from adjacent genes in a procyclin expression site: a dual role for polypyrimidine tracts in trypanosomes?" *Nucleic Acids Res* **22**(8): 1359-1364.
- Vickerman, K. (1969). "On the surface coat and flagellar adhesion in trypanosomes." *J Cell Sci* **5**(1): 163-193.
- Vickerman, K. (1985). "Developmental cycles and biology of pathogenic trypanosomes." *Br Med Bull* **41**(2): 105-114.
- Vickerman, K. and A. G. Luckins (1969). "Localization of variable antigens in the surface coat of *Trypanosoma brucei* using ferritin conjugated antibody." *Nature* **224**(5224): 1125-1126.
- Wang, D., Y. Guo, et al. (2008). "Genome-wide analysis of CCCH zinc finger family in *Arabidopsis* and rice." *BMC Genomics* **9**: 44.
- Wang, Z., M. Gerstein, et al. (2009). "RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics." *Nat Rev Genet* **10**(1): 57-63.
- Wen, Y. Z., L. L. Zheng, et al. (2011). "Pseudogene-derived small interference RNAs regulate gene expression in African *Trypanosoma brucei*." *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**(20): 8345-8350.
- Wharton, R. P. and A. K. Aggarwal (2006). "mRNA regulation by Puf domain proteins." *Sci STKE* **2006**(354): pe37.
- Wirtz, E., C. Hartmann, et al. (1994). "Gene expression mediated by bacteriophage T3 and T7 RNA polymerases in transgenic trypanosomes." *Nucleic Acids Res* **22**(19): 3887-3894.
- Wright, J. R., T. N. Siegel, et al. (2010). "Histone H3 trimethylated at lysine 4 is enriched at probable transcription start sites in *Trypanosoma brucei*." *Mol Biochem Parasitol* **172**(2): 141-144.
- Wurst, M., A. Robles, et al. (2009). "An RNAi screen of the RRM-domain proteins of *Trypanosoma brucei*." *Mol Biochem Parasitol* **163**(1): 61-65.
- Yoffe, Y., M. Leger, et al. (2009). "Evolutionary changes in the *Leishmania* eIF4F complex involve variations in the eIF4E-eIF4G interactions." *Nucleic Acids Res* **37**(10): 3243-3253.
- Zamudio, J. R., B. Mitra, et al. (2009). "Hypermethylated cap 4 maximizes *Trypanosoma brucei* translation." *Mol Microbiol* **72**(5): 1100-1110.
- Zilka, A., S. Garlapati, et al. (2001). "Developmental regulation of heat shock protein 83 in *Leishmania*. 3' processing and mRNA stability control transcript abundance, and translation id directed by a determinant in the 3'-untranslated region." *J Biol Chem*

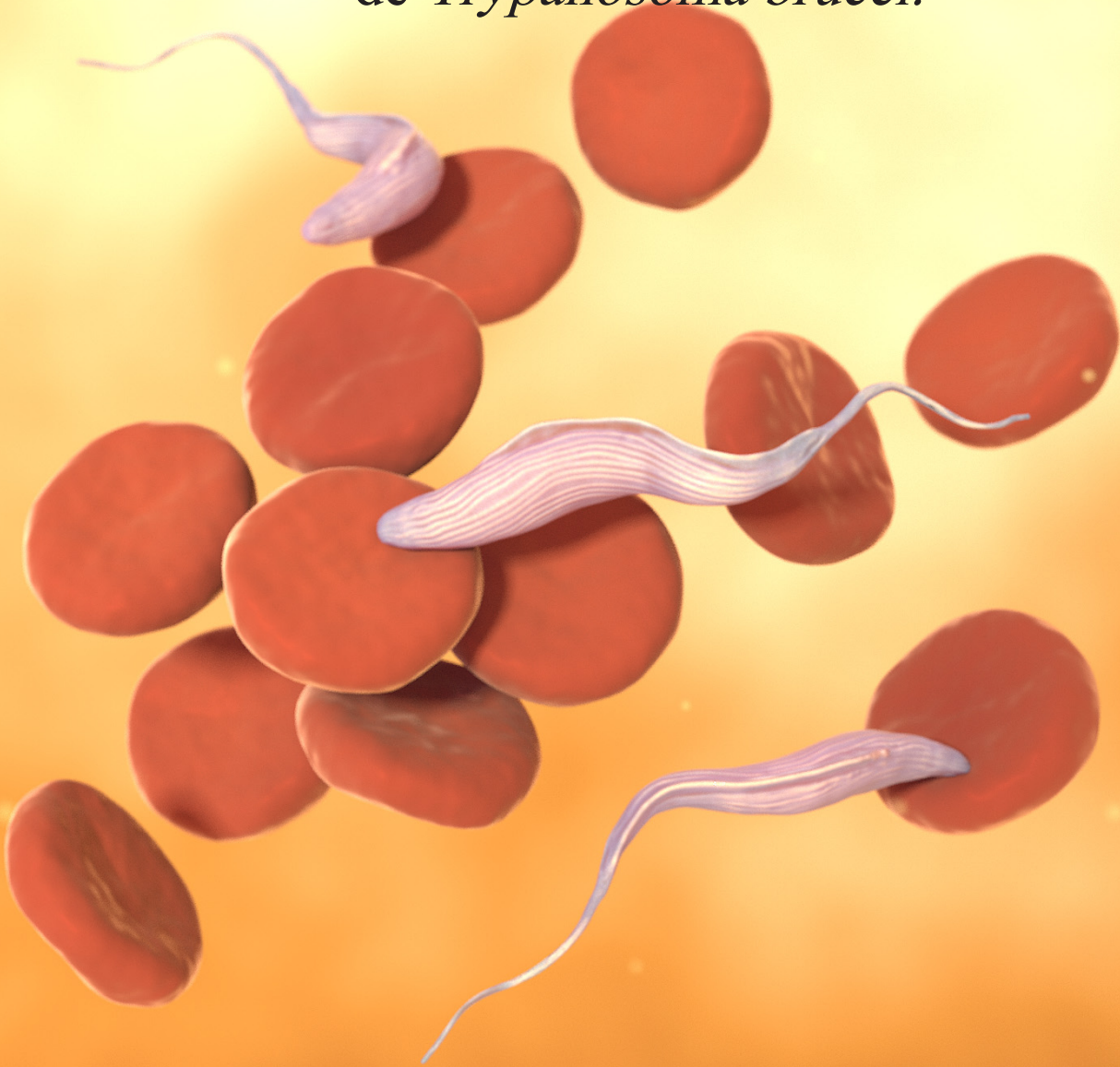
276(51): 47922-47929.

Zomerdijk, J. C., M. Ouellette, et al. (1990).
“The promoter for a variant surface
glycoprotein gene expression site in
Trypanosoma brucei.” EMBO J **9**(9):
2791-2801.





Caracterización funcional de las proteínas de
unión a ARN RBP33 y DRBD3 como
reguladoras de la expresión génica
de *Trypanosoma brucei*.



Sandra M. Fernández Moya
Tesis Doctoral
2013