

UACM

Universidad Autónoma
de la Ciudad de México

Nada humano me es ajeno

Universidad Autónoma de la Ciudad de México

Posgrado en Ciencias Genómicas

“Caracterización de la interacción de TveIF-5A en el extremo 3' UTR del RNAm del gen *tvcp39* mediado por poliaminas en *Trichomonas vaginalis*”.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

DOCTORA EN CIENCIAS GENÓMICAS

P R E S E N T A

M. en C. BERTHA ISABEL CARVAJAL GAMEZ

DIRECTORA DE TESIS

DRA. MARÍA ELIZBETH ÁLVAREZ SÁNCHEZ

MÉXICO, D.F

SISTEMA BIBLIOTECARIO DE INFORMACIÓN Y DOCUMENTACIÓN



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE LA CIUDAD DE MÉXICO COORDINACIÓN ACADÉMICA

RESTRICCIONES DE USO PARA LAS TESIS DIGITALES

DERECHOS RESERVADOS[©]

La presente obra y cada uno de sus elementos está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor; por la Ley de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México, así como lo dispuesto por el Estatuto General Orgánico de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México; del mismo modo por lo establecido en el Acuerdo por el cual se aprueba la Norma mediante la que se Modifican, Adicionan y Derogan Diversas Disposiciones del Estatuto Orgánico de la Universidad de la Ciudad de México, aprobado por el Consejo de Gobierno el 29 de enero de 2002, con el objeto de definir las atribuciones de las diferentes unidades que forman la estructura de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México como organismo público autónomo y lo establecido en el Reglamento de Titulación de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México.

Por lo que el uso de su contenido, así como cada una de las partes que lo integran y que están bajo la tutela de la Ley Federal de Derecho de Autor, obliga a quien haga uso de la presente obra a considerar que solo lo realizará si es para fines educativos, académicos, de investigación o informativos y se compromete a citar esta fuente, así como a su autor ó autores. Por lo tanto, queda prohibida su reproducción total o parcial y cualquier uso diferente a los ya mencionados, los cuales serán reclamados por el titular de los derechos y sancionados conforme a la legislación aplicable.

UACM3 TDV221

DIRECTOR

Dra. María Elizabeth Álvarez Sánchez
Profesora-Investigadora
Posgrado en Ciencias Genómicas
Universidad Autónoma de la Ciudad de México

ASESORES

Dra. Rossana Arroyo Verástegui
Investigador Titular
Departamento de Infectómica y Patogénesis Molecular
Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN

Dr. Máximo B. Martínez Benítez
Instituto de Ciencia y Tecnología del Distrito Federal y CDE-DF

Dra. Minerva Camacho Nuez
Profesora-Investigadora
Posgrado en Ciencias Genómicas
Universidad Autónoma de la Ciudad de México

Dr. Mario César López Camarillo
Profesor-Investigador
Posgrado en Ciencias Genómicas
Universidad Autónoma de la Ciudad de México

El presente proyecto de investigación fue realizado en el laboratorio 1 del Posgrado en Ciencias Genómicas de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México, bajo la dirección de la Dra. María Elizabeth Álvarez Sánchez y bajo la asesoría de la Dra. Rossana Arroyo Verástegui, Dra. Minerva Camacho Nuez, Dr. Mario César López Camarillo y Dr. Máximo Berto Martínez Benítez. Agradezco a mi lectora de tesis la Dra. Rosalia Lira Carmona, así como al Dr. Jaime Ortega López, al Dr. Guillermo Mendoza y al Dr. Luis Briebe. El proyecto fue financiado con fondos del Posgrado en Ciencias Genómicas de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México y del CONACYT con número de proyecto 83808. La estudiante agradece el apoyo de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México, Posgrado en Ciencias Genómicas y al ICyTDF como becaria.

AGRADECIMIENTOS.

Gracias, por todo el apoyo, confianza, paciencia, dedicación, tiempo, amistad. Por compartir conmigo su sabiduría. Durante este tiempo que hemos estado juntas he aprendido mucho, cosas que jamás creí conocer y vivir. Gracias por ser un ejemplo para mí.

Gracias, Dra. Rossana, por todo el apoyo, las enseñanzas y confianza que me ha brindado. Mil Gracias.

A la Dra. Minerva, por su enseñanza, su paciencia, su tiempo.

Gracias Max por tu paciencia, tu amistad, tu apoyo, tu enseñanza, por tu tiempo.

A César por las sugerencias y observaciones al proyecto. Gracias por tu apoyo.

Gracias a la Dra. Rosalía Lira por su enseñanza, confianza y tiempo.

Al Dr. Jaime Ortega por las facilidades brindadas para realizar el presente proyecto y sus extraordinarios consejos.

Dr. Guillermo Mendoza, gracias por su tiempo, consejos sobre la metodología y por sus esplendidos resultados en espectrometría de masas.

Gracias a todos los profesores del Posgrado en Ciencias Genómicas.

Gracias a todos mis compañeros del Posgrado en Ciencias Genómicas por su amistad.

A Solange (qpd) por ayudarme con las imágenes y tus consejos sobre diseño.

Gracias a Eduardo Carrillo, por esas sesiones en el confocal fueron realmente enriquecedoras.

Gracias Brenda por todo el apoyo en el labo.

Gracias Mavil, por tu apoyo y amistad.

Gracias Lulú, Caty y Vivi, mil gracias por toda su ayuda.

A mis amigas:

Laura, gracias por tu amistad durante estos años, en verdad es un placer tener una amiga como tú.

Itzelita, gracias por tu amistad y apoyo incondicional, gracias por enseñarme muchas cosas. Mil gracias.

Enrique Becerril, amigo es un honor para mí el que me brindes tu amistad, gracias por todo tu apoyo y por estar siempre ahí.

Almita, gracias por tu amistad y todo el apoyo que me has brindado.

Are, muchas gracias por tu amistad y el apoyo incondicional.

Jorge Payan, gracias por tu apoyo.

Itzel López, gracias por tu amistad y apoyo.

A todos mis amigos (Jose Luis, Miguel Angel, Miguel Fonseca, Elba, Carlos, Yak, Helios).

Gracias mamá porque sin tu apoyo no habría podido realizar este logro tan importante en mi vida que es también tuyo, gracias por los sacrificios y tu amor. Gracias por todo el amor que día a día me das y aunque no te lo digo seguido te amo.

Gracias amor por enseñarme tantas cosas, por enseñarme a reír y amar. Gracias por apoyarme en todo momento, por tu tiempo y tu amor. Te amo.

A la luz de mi alma, mi hijita esto está dedicado a ti, ya que tu fuiste la inspiración y la lucha de cada día, gracias por motivarme tanto sin tú saberlo, te adoro. Perdón por no estar siempre, pero sabes que te adoro incondicionalmente.

Gracias a Blanquilli, mi hermanita. Por tu apoyo y consejos, gracias por ser mi amiga.

Gracias a mi papa y abuelito, en donde quiera que estén, muchas gracias por todo (q.p.d).

Gracias DIOS por haberme permitido vivir esto y gracias por nunca haberme soltado de tu mano.

ÍNDICE GENERAL

LISTA DE ABREVIATURAS

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABLAS

RESUMEN

I. INTRODUCCIÓN

1. ANTECEDENTES GENERALES

1.1	Tricomonosis	1
1.2	Epidemiología	3
1.3	<i>Trichomonas vaginalis</i>	4
1.4	Ciclo de vida de <i>Trichomonas vaginalis</i>	7
1.5	Genoma de <i>Trichomonas vaginalis</i>	9
1.6	Requerimientos nutricionales de <i>T. vaginalis</i>	12
1.7	Patogenicidad	14
1.8	Citoadherencia	15
1.9	Citotoxicidad	16
1.10	La relevancia del hierro (Fe^{2+}) en los organismos	18
1.11	Mecanismos de regulación mediado por Fe^{2+} en <i>T. vaginalis</i>	19
1.12	Generalidades de poliaminas	21
1.13	Metabolismo de las poliaminas en eucariontes	24
1.14	Ruta de retroconversión de las poliaminas	25
1.15	Catabolismo de poliaminas	26
1.16	Interacción de las poliaminas con DNA y RNA	27
1.17	Regulación transcripcional y post transcripcional mediado por	

poliaminas	28
1.18 <i>T. vaginalis</i> y las poliaminas	31
1.19 Mecanismos de regulación mediados por poliaminas	30
2. II. ESTADO DEL ARTE	
2.1 Generalidades de eIF-5A	31
2.1.1 Deoxihipusina sintasa	36
2.1.2 Deoxihipusina hidroxilasa	37
2.2 <i>Trichomonas vaginalis</i> y las poliaminas	38
2.3 eIF-5A de <i>Trichomonas vaginalis</i>	40
2.4 Transcripción	40
2.5 Traducción	41
2.6 Modificaciones post-traduccionales	44
III. JUSTIFICACIÓN	45
IV. HIPÓTESIS	45
V. OBJETIVOS	
1. OBJETIVO GENERAL	45
2. OBJETIVOS PARTICULARES	45
VI. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	46
VII. MATERIALES Y MÉTODOS	
5.1 Análisis <i>in silico</i> de las secuencias tipo ERE en genes de <i>T. vaginalis</i>	47
5.2 Extracción del DNA genómico de <i>T. vaginalis</i>	48

5.28. Inmunolocalización de la proteína TvCP39	73
5.29. Obtención de extractos citoplasmáticos	74
5.30. Fraccionamiento nuclear y citoplasmático	75
VIII. RESULTADOS	76
IX. DISCUSIÓN	140
X. CONCLUSIÓN	152
XI. PERSPECTIVAS	152
XII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	153
XIII. APÉNDICE	170

LISTA DE ABREVIATURAS

➤ BSA	Albúmina de suero bovino
➤ C1	Control 1
➤ C2	Control 2
➤ cbp	Cuanto baste para
➤ cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementario
➤ <i>cox-2</i>	gen <i>ciclooxigenasa-2</i>
➤ CPs	Cisteín proteinasas
➤ DAB	1, 4-Diamino-2-butanona dihidroclorido
➤ DEPC	Dietilpirocarbonato
➤ DFMO	Difluorometil ornitina
➤ DMSO	Dimetil sulfóxido
➤ DNA	Ácido desoxirribonucleico
➤ DNAg	DNA genómico
➤ dNTPs	Deoxinucléotido tri-fosfatados
➤ DTT	Ditiotreitol
➤ EDTA	Ácido etilén diaiminotetra-acético
➤ ERE	Elemento de respuesta a eIF-5A
➤ ere	Elementos de respuesta a estrógenos
➤ g	Gramos
➤ GST	Glutación S-transferasa
➤ GTP	Guanosin trifosfato
➤ HCl	Ácido clorhídrico
➤ hr	Horas
➤ HRP	Enzima peroxidasa de rábano
➤ Inr	Elemento regulador de transcripción
➤ IPTG	Isopropil-β-D-tiogalactopiranosido
➤ IRE	Elemento de respuesta a hierro
➤ kDa	Kilodaltones
➤ LB	Medio Luria-Broth (levadura -maltosa)
➤ LPG	Lipofosfoglicanos
➤ MAPK	Proteína cinasa activadora de mitógenos
➤ Mb	Mega bases
➤ Met	Metionina
➤ Mg ²⁺	Magnesio
➤ min	Minutos
➤ ml	Mililitros
➤ mM	Milimoles
➤ ng	Nanogramos
➤ nm	Nanómetros
➤ O.N.	Toda la noche
➤ ODC	Ornitina descarboxilasa
➤ OMS	Organización Mundial de la Salud

➤ PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida
➤ PAO	Poliamina oxidasa
➤ pb	Pares de bases
➤ PBS	Fosfato amortiguador salino
➤ PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
➤ PFOR	Piruvato ferredoxina oxidoreductasa
➤ pH	Potencia de hidrógeno
➤ Pmol	Picomoles
➤ PSA	Persulfato de amonio
	retrotranscriptasa
➤ RNA	Ácido ribonucleico
➤ RNAi	Ácido ribonucleico interferente
➤ RNAm	Ácido ribonucleico mensajero
➤ RNAr	Ácido ribonucleico ribosomal
➤ RNAt	Ácido ribonucleico de transferencia
➤ rpm	revoluciones por minuto
➤ RT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
➤ s	Segundos
➤ SAM	S-adenosilmetionina descarboxilasa
➤ SAMDC	Descarboxilasa de S- adenosilmetionina
➤ SC	Suero de caballo
➤ SDS	Dodecil sulfato de sodio
➤ T.A	Temperatura ambiente
➤ T.A.	Temperatura ambiente
➤ TAE	Amortiguador Tris-Acetato-EDTA
➤ TCA	Ácido tricloro acético
➤ TEMED	N, N, N', N'', tetrametilen-diamina
➤ TYM	Medio de cultivo tripticasa-extracto de
➤ UTR	Región no traducida
➤ V	Volts
➤ VECs	Células del Epitelio Vaginal
➤ WB	Western blot
➤ µg	Microgramos
➤ µl	Microlitros
➤ µm	Micrómetros

LISTA DE FIGURAS

- FIG. 1 Microscopía de barrido de *T. vaginalis*
- FIG. 2 Ciclo de vida de *T. vaginalis*
- FIG. 3 Mecanismo de regulación por Fe²⁺
- FIG. 4 Función de eIF-5A en el gen *cox 2*
- FIG. 5 Estructura de un RNAm de *T. vaginalis*
- FIG. 6. Expresión del gen *tvcp39* en presencia y ausencia de poliaminas
- FIG. 7. Efecto de la presencia y ausencia de poliaminas en la cantidad de TvCP39.
- FIG. 8. Efecto de la Actinomicina D en la estabilidad de *tvcp39* y *tveif-5a* en presencia y ausencia de poliaminas.
- FIG. 9. Efecto de la cicloheximida en la inhibición de la traducción de TveIF-5A en presencia y ausencia de poliaminas.
- FIG. 10. Análisis del 3'UTR de *tvcp39* de *T. vaginalis*.
- FIG. 11. Inducción de TveIF-5A madura en el sistema eucariote
- FIG. 12. Purificación de TveIF-5A precursora y madura.
- FIG. 13. Efecto de la ausencia de poliaminas en la proteína TveIF-5A.
- FIG. 14. Inmunodetección de las diferentes modificaciones post-traduccionales de TveIF-5A.
- FIG. 15. Análisis fluorimétrico de TveIF-5A precursora y madura
- FIG. 16. Inmunodetección de la hipusinación de TveIF-5A precursora *in vitro*.
- FIG. 17. Separación de las formas de TveIF-5A por cromatografía de intercambio iónico en una columna MonoS.
- FIG. 18. Ensayo de movilidad electroforética del ERE *cox-2* e *IRE-Fer*.
- FIG. 19. Ensayo de movilidad electroforética del ERE-like de *tvcp39*.
- FIG. 20. Ensayo de súper retardo del ERE-like de *tvcp39* y TveIF-5A.
- FIG. 21. Ensayo de movilidad electroforética del ERE-like de *tvcp39* con extractos citoplásmicos de *T. vaginalis* crecidas en presencia y ausencia de poliaminas.
- FIG. 22. Ensayo de North Western blot de extractos de proteínas totales de *T. vaginalis* crecidas en presencia y ausencia de poliaminas utilizando como sonda el ERE-like de *tvcp39* biotinilado.

LISTA DE TABLAS

- Tabla 1. Genoma de *T. vaginalis*
- Tabla 2. Genes regulados a nivel transcripcional y post-transcripcional por poliaminas.
- Tabla 3. Proteínas involucradas en el metabolismo, catabolismo y retroconversión de poliaminas.
- Tabla 4. Hipusinación en diferentes organismos
- Tabla 5. LC-ESI-MS/MS de las isoformas de TveIF-5A
- Tabla 6. Secuencia y estructura de los 3'UTR utilizados para la transcripción *in vitro*.

RESUMEN.

Trichomonas vaginalis es el agente causal de la tricomonosis, una de las principales características de esta infección es la presencia de flujo con mal olor ocasionado por la alta concentración de poliaminas. Las poliaminas son pequeños cationes indispensables para la virulencia y patogénesis de este parásito. Reportes previos, mostraron la regulación positiva de las poliaminas sobre el transcrito y la proteína de TvCP65. Otra proteasa que participa en la citotoxicidad y podría estar siendo regulada por las poliaminas es la TvCP39. El posible mecanismo a través del cual las poliaminas podrían estar participando en la estabilidad de los RNAm es mediante una proteína dependiente de poliaminas llamada eIF-5A, la cual requiere de una modificación post-traducciona llamada hipusinación para convertir a eIF-5A precursora a su forma madura. Recientemente, se ha sugerido que eIF-5A madura es capaz de unirse al RNAm específicamente a la secuencia denominada elemento de respuesta a eIF-5A (ERE) localizada en el 3'UTR del RNAm. En este trabajo nosotros caracterizamos la interacción de TveIF-5A activa con el 3'UTR de *tvcp39* involucrada en la citotoxicidad del parásito, la cual fue utilizada como modelo de estudio. Ensayos de RT-PCR y qRT-PCR en parásitos tratados con el inhibidor de la biosíntesis de putrescina 1,4-diamino-2-butanonea (DAB), mostraron una disminución de ~ 80 y ~90 %, en los niveles de transcrito de *tvcp39* y *tveif-5a* y en el tiempo de vida media de ~45 min y ~2.5 h, respectivamente. Así como en la cantidad de TvCP39 y TveIF-5A analizado por Western blot e inmunofluorecencia. Ensayos de localización y fraccionamiento núcleo-citoplasma, sugiere una relocalización de TvCP39 en presencia de poliaminas. Por otra parte, la inhibición de la traducción con cicloheximida, mostró una disminución en la cantidad de TveIF-5A precursora y madura ~4 h y en los niveles del transcrito de *tveif-5a* ~2h, en parásitos tratados con DAB. Este efecto fue restaurado únicamente con putrescina exógena. Por otra parte, el análisis del 3'UTR de *tvcp39* y *tveif-5a*, mostró una estructura tipo ERE, lo que sugiere un posible mecanismo de regulación post-transcripcional. Los ensayos de interacción de TveIF-5A madura recombinante, obtenida mediante la clonación y expresión en un sistema de *Sacharomyces cerevisiae*, con el ERE-like de *tvcp39* sugieren que esta proteína es

capaz de unirse a la estructura tallo-burbuja de *tvcp39* y *cox-2*. Por otra parte, mediante ensayos de Western blot y espectrometría de masas, determinamos tres posibles modificaciones post-traduccionales en TveIF-5A: O-glicosilación, fosforilaciones en serina y tirosina e hipusinación, lo que sugiere un papel importante en la actividad de esta proteína. Estos datos sugieren que la putrescina es necesaria para la estabilidad del RNAm de *tvcp39* y *tveif-5a*, así como para la cantidad de TvCP39, maduración y función de TveIF-5A.

I. INTRODUCCION.

1. Antecedentes generales

1.1 Tricomonosis

La tricomonosis es una infección de transmisión sexual ocasionada por el parásito *Trichomonas vaginalis* que infecta el tracto genitourinario (Alderete y col., 1984). Esta infección puede presentarse de forma asintomática, aguda o crónica. Los signos y síntomas de la tricomonosis en la forma aguda son: vulvitis difusa con leucorrea copiosa que se caracterizan por ser descargas abundantes de color verde-amarillentas con olor fétido, además de presentar prurito en la vulva. Un signo clínico específico para esta infección es el cérvix de fresa o denominado científicamente como *Colpitis macularis*, observado solo en el 2% de las pacientes (Spiegel y col., 1990; Lehker y Alderete., 2000). Otros signos y síntomas pueden incluir disuria y dolor abdominal en cavidad baja. Algunas veces esta patología puede ser asintomática, motivo por el cual no es diagnosticada. En el caso de la tricomonosis crónica, los signos y síntomas que predominan son prurito y la dispareunia, mientras que la secreción puede ser escasa.

Los factores que influyen en la respuesta inflamatoria y la severidad de los síntomas, no han sido bien entendidos pero se han asociado con los niveles

hormonales, la coexistencia con la flora vaginal, la cepa y la relativa concentración de los organismos presentes en la vagina (Spiegel y col., 1990).

La prevalencia de la tricomonosis en el hombre ha sido menos caracterizada. Generalmente, los pacientes masculinos son asintomáticos; a pesar de que es una infección autolimitada, se puede presentar en ocasiones como una uretritis no gonocócica y no clamidial (Swygard y col., 2004; Alderete y col., 2000). Los reportes de prevalencia relacionados con infecciones uretrales con tricomonosis han variado dependiendo de la población y las técnicas usadas para diagnóstico. Reportes previos han mostrado que altas concentraciones de Zn^{2+} en secreciones prostáticas de humano actúan como tricomonocidas (Krieger y Rein., 1982). Recientemente, se reportó el efecto del Zn^{2+} en *T. vaginalis*. En este estudio se demostró que utilizando una concentración de 1.6 mM de Zn^{2+} disminuye la citotoxicidad del parásito hacia las células DU-145 comparado con el control. Adicionalmente, la expresión del RNAm de *tvcp65* así como la cantidad de la proteína TvCP65 disminuyó en presencia de 1.6 mM de Zn^{2+} . De manera interesante la morfología del parásito no presentó la transformación a su forma ameboides, sin embargo, este parásito mostró proyecciones flagelares hacia las células DU-145 y con otros parásitos. El análisis proteómico mostró 37 proteínas que se expresan diferencialmente en presencia de 1.6 mM de Zn^{2+} comparado con el control (Vázquez-Carrillo y col., 2011).

Esta infección ocasiona consecuencias adversas en la salud de la mujer y del hombre como son: infertilidad (El-Shazly y col., 2001), enfermedad inflamatoria pélvica crónica (Moodley y col., 2002), neonatos prematuros y de bajo peso al nacer ocasionado por la ruptura de las membranas amnióticas (Cotch y col., 1997).

Recientemente, se reportó un neonato con tricomonosis en vías respiratorias altas, debido a la transmisión vertical del tracto urogenital de la madre al momento de la salida del neonato por el canal vaginal (Carter y col., 2008). Adicionalmente, se ha asociado como un factor de riesgo que incrementa la transmisión del virus de la inmunodeficiencia adquirida (VIH), debido a que *T. vaginalis* desarrolla un proceso inflamatorio seguido de la degradación de la matriz extracelular de las células del epitelio vaginal (VECs) lo cual provoca que células de la lamina basal queden expuestas. Este estrato epidérmico es rico en células CD⁴⁺ las cuales son el blanco del VIH (Van Der Pol y col., 2008). También se ha asociado como factor para el desarrollo de cáncer cervical debido al proceso inflamatorio crónico que se desarrolla durante la tricomonosis, así como de la destrucción de las VECs lo cual permite el establecimiento y replicación del virus del papiloma humano (VPH) (Viikki y col., 2000).

El hombre puede presentar uretritis, prostatitis, epididimitis, eyaculación precoz, nicturia y cáncer de próstata (Krieger y col., 1993). En este último se ha propuesto que *T. vaginalis* induce y regula la expresión de proteínas pro inflamatorias, las cuales ocasionan daño en el epitelial prostático, provocando la generación de nuevas células epiteliales. Sin embargo, si se pierde la homeostasis celular comienza una hiperproliferación descontrolada (Sutcliffe y col., 2006).

1.2. Epidemiología.

La tricomonosis es la infección de transmisión sexual (ITS) más común considerada como un marcador de conducta sexual de alto riesgo, en la mayoría de los

casos está asociada a otras infecciones como la gonorrea y vaginitis bacteriana (Zhang y col., 1996; Swygard y col., 2004). La prevalencia varía entre las poblaciones estudiadas en un rango de 5-97 % en mujeres y 0-3 % en hombres (www.who.int/es/), también varía dependiendo de la población y las técnicas usadas para el diagnóstico (Sistema Único de Información para la Vigilancia Epidemiológica SSA, 2006). La Organización Mundial de la Salud (OMS) reporta una incidencia de tricomonosis de más de 250 millones de casos al año (reporte de la OMS año 2010). En México se estima que la tricomonosis ocupa el primer lugar en cuanto a ITS. En el 2010 se reportaron 116, 622 casos y en el segundo semestre del 2011 se han reportado 68, 278 casos de tricomonosis en toda la República Mexicana (Sistema Único de Información para la Vigilancia Epidemiológica SSA., 2010). Los estados más afectados en la República Mexicana son: Chiapas, Estado de México, Guanajuato, Oaxaca, Puebla, Distrito Federal y Veracruz (Sistema Único de Información para la Vigilancia Epidemiológica SSA., 2010).

1.3 *Trichomonas vaginalis*

T. vaginalis es un parásito protozoario y su clasificación taxonómica está basada en el árbol filogenético y en la evolución de eucariontes superiores y protozoarios:

- Supergrupo:** Excavata (Wegener Parfrey y col., 2006)
Grupo: Parabasalia (Wegener Parfrey y col., 2006)
Orden: Trichomonadida (Kirby., 1947; Honigberg., 1974)

Familia: Trichomonadidae (Wenyon., 1926)
Género: *Trichomonas*
Especie: *Trichomonas vaginalis* (Donne., 1836)

Este parásito mide 10 a 20 μm de largo, 7 μm de ancho y 20 μm de diámetro, se divide por fisión binaria longitudinal. Tiene cuatro flagelos anteriores y uno adosado a la membrana ondulante. *T. vaginalis* se caracteriza por tener un núcleo prominente con estructura rígida, típicamente alargado, mide de 4 a 5 μm se encuentra limitado por una envoltura nuclear con poros típicos y contiene gránulos dispersos de cromatina. Se localiza en la porción anterior y ventral izquierda de la expansión capitular del axostilo. En el interior del núcleo la cromatina forma cúmulos granulares relativamente pequeños (Paces y col., 1992). El nucleólo, es pequeño, rodeado de un área libre de cromatina (Honingberg y King., 1964), contiene 6 cromosomas con un tamaño de 160 Mb (Carlton y col., 2007).

Este parásito posee un citoesqueleto especializado que consta de: la costa, constituida por proteínas contráctiles, es una estructura fibrilar estriada localizada en el citoplasma adyacente a la membrana ondulante y conectada al cuerpo basal del flagelo recurrente y es la encargada de proporcionar el soporte mecánico a la membrana ondulante, esta estructura distingue a la familia *Trichomonadidae* de otras familias clasificadas en el mismo orden. El axostilo recorre el cuerpo del parásito desde la parte anterior y termina en la posterior del mismo en forma de espícula (Fig. 1).

T. vaginalis carece de mitocondrias pero contiene un organelo denominado hidrogenosoma para llevar a cabo el metabolismo de carbohidratos en donde el

hidrógeno es el aceptor de electrones en la producción de energía (ATP). El hidrogenosoma se diferencia de las mitocondrias en la pérdida del citocromo c, de las enzimas involucradas en la cadena respiratoria y el DNA mitocondrial (Honigberg y King., 1964; Nielsen y Nielsen., 1975; Schmidt y Roberts., 1998).

T. vaginalis presenta dos morfologías, la forma ameboide que se ha encontrado en biopsias de pacientes con tricomonosis y en parásitos al contacto con VECs, y la forma ovoide que se ha encontrado en el flujo uretral y vaginal, orina y en semen de pacientes infectados con este parásito (Lehker y col., 1991; Arroyo y col., 1993; Moreno-Brito y col., 2003).

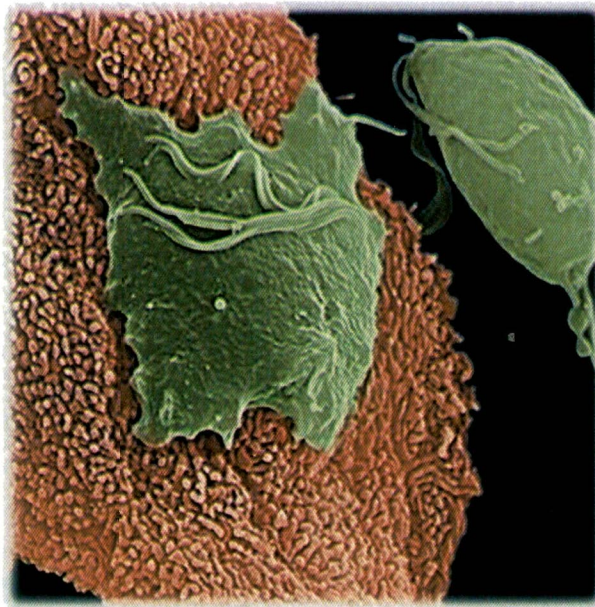


Figura 1. Microscopia de barrido de *Trichomonas vaginalis*, mostrando la forma ameboide (adherida a una célula del epitelio vaginal) y la forma ovoide (Tomado de: Pereira-Neves and Marlene Benchimol, Santa Ursula University, Rio de Janeiro, Brazil).

1.4 Ciclo de vida de *Trichomonas vaginalis*

El ciclo de vida de este parásito es muy simple comparado con el de otros parásitos patógenos, no tiene huéspedes intermedios ni vectores y solo se presenta en forma de trofozoíto uninucleado. La transmisión es de persona a persona mediante el contacto sexual con personas infectadas (Fig. 2). Los parásitos se adhieren a las mucosas de la vagina y del cérvix donde permanecen a pesar de las condiciones adversas como son: el pH, temperatura, cambios hormonales, descamación de las VECs, escasez de nutrientes, presencia de anticuerpos anti-tricomonas, de lactobacilos o de otras bacterias, así como del flujo menstrual, entre otras condiciones (Schwebke y col., 2004; Arroyo y col., 2000). *T. vaginalis* se multiplica por fisión binaria que empieza con la división nuclear, para finalmente generar dos células hijas. Este parásito se divide seis veces cada 24 h *in vitro* (Gómez-Conde y col., 2000; Lehker y col., 1991).

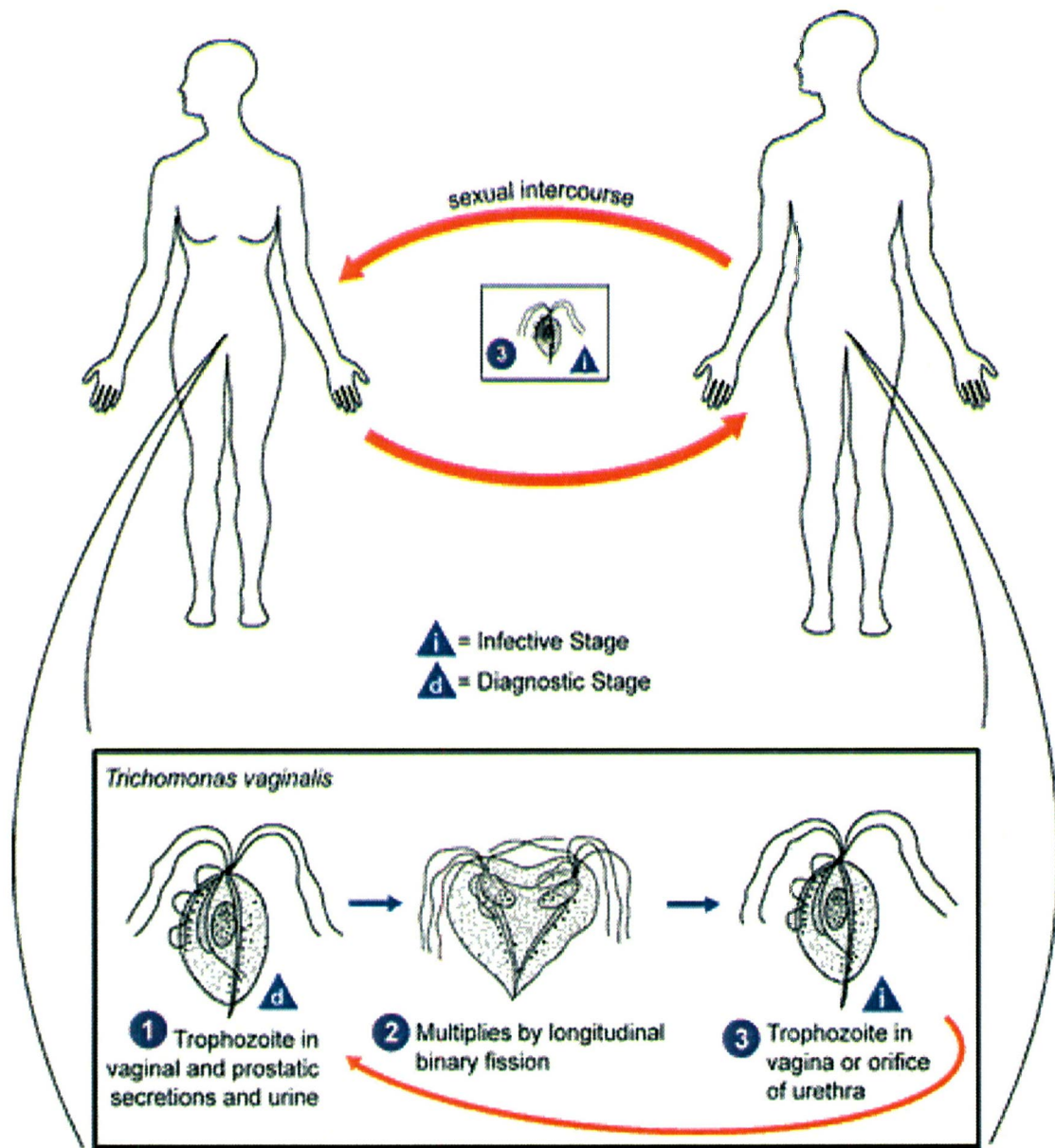


Figura 2. Ciclo de vida de *Trichomonas vaginalis*. I) estado infectivo; d) estado de diagnóstico. 1. Trofozoíto en secreciones vaginales, prostáticas y orina; 2. División por fisión binaria; 3. Trofozoíto en vagina y orificio uretral. (Tomado de: la base de datos Introduction "The *Trichomonas vaginalis* Genome Database" www.tigr.or/tdb/e2k1/tvg/intro.shtml).

1.5 Genoma de *Trichomonas vaginalis*

T. vaginalis ha sido descrito como un parásito diploide con seis cromosomas (Dermota., 1997; Yuh y col., 1997; Sutcliffe y col., 2006) que contiene un genoma de 160 Mb con 60,000 genes que codifican para proteínas (Tabla 1). Este parásito presenta ~65 genes que contienen intrones, además de contener genes que codifican para proteínas que son capaces de realizar el procesamiento de corte y empalme denominado "splicing", encontrando motivos conservados los cuales son esenciales para proteínas "spliceosomales", como es la proteína PRP8, la cual provee evidencias directas de este procesamiento (Pestota y col., 2001; Vanacova y col., 2005; Carlton y col., 2007). El genoma de este parásito presenta genes que codifican para RNA de transferencia (RNAt) de los 20 aminoácidos y 250 genes codificantes para RNA ribosomales (RNAr). En el 75 % de los genes de este parásito se localiza un elemento promotor "Inr" en el extremo 5' de la región no traducida (UTR). Estos elementos son indispensables para que se lleve a cabo la expresión de los genes. Los Inr son secuencias homólogas a la caja TATA en eucariontes (Liston y col., 1998; Vanacova y col., 2005). Sin embargo, se han encontrado sitios de inicio de la transcripción que no tienen homología con el Inr en *T. vaginalis*, como es el caso del promotor del gen *hsp10* (Liston y col., 1998). Recientemente se reportó una secuencia TATA en el gen del RNAr 5S (Torres-Machorro y col., 2009).

De manera interesante *T. vaginalis* contiene genes "Dicer", "argonautas" y "DEAD-DEAH-box", así como genes para helicasas, sugiriendo la existencia de una vía

para la formación de RNA interferentes (RNAi), sin embargo hasta el momento no se encuentra algún reporte donde se emplee este tipo de RNAs (Carlton y col., 2007).

El gran tamaño del genoma de *T. vaginalis* es debido al alto contenido de elementos repetidos (65%) y han sido clasificadas como: 1) repetidos tipo virus: similaridad con virus o bacteriófagos; 2) transposones: similaridad a perfiles de transposones o integrasas; 3) retrotransposones: secuencias con similaridad a transcriptasa reversa o perfiles retrotransposones; 4) repetidos no clasificados: secuencias que no presentan similaridad a proteínas conocidas como son los mavericks. En total estos elementos repetidos conforman las 59 familias de elementos altamente repetidos. Estas familias están en cientos de copias localizadas en contiguos pequeños dentro del genoma de *T. vaginalis*. Cada familia de repetidos es extraordinariamente homogénea con un promedio de polimorfismo de ~2.5% (Carlton y col., 2007).

La expansión de familias de genes de *T. vaginalis* indica una adaptación a diferentes microambientes, explicando porque este parásito es capaz de adaptarse rápidamente al microambiente cambiante de su hospedero en cuanto a: pH, temperatura, Fe^{2+} , Zn^{2+} y poliaminas (Carlton y col., 2007).

Una de las familias más importantes descritas es la implicada en la maquinaria de tráfico membranal, la cual es esencial para la secreción de proteínas patógenas, endocitosis y fagocitosis de bacterias y células del hospedero. *T. vaginalis* contiene genes involucrados en la respuesta al daño al DNA y su reparación, reestructuración de la cromatina y meiosis, los cuales son indispensables para la viabilidad de este parásito. Adicionalmente, se ha descrito la familia de genes que codifican para proteína-cinasas,

lo cual sugiere la presencia de mecanismos para la trasducción de señales. Un ejemplo es la proteína-cinasa maduradora de mitógenos (MAPK). También, se identificaron genes que codifican para proteínas involucradas en el cambio morfológico (ovoide-ameboide) como la actina y la tubulina (Carlton y col., 2007).

En relación a la patogénesis de *T. vaginalis*, se localizaron genes que codifican enzimas para la síntesis de lipofosfoglicanos (LPG); de particular interés es un gen encargado de la síntesis de ramnosa, un azúcar inusual ausente en las células del hospedero. Otros genes identificados son los involucrados en la biosíntesis del ácido siálico (azúcar de superficie de *T. vaginalis*). Además, se identificaron 800 proteínas que representan moléculas de superficie involucradas en citoadherencia y citotoxicidad. Algunas de las cuales ya han sido reportadas y descritas como son cinco adhesinas (AP65, AP51, AP33, AP23 y AP120) (Lehker y col., 1991; Alderete y col., 2000; García y col., 2003; Moreno-Brito y col., 2005) y diferentes cisteína proteinasas como la CP de 30 kDa, CP de 62 kDa, CP de 39 kDa y la CP de 65 kDa (Mendoza-López y col., 2000; Hernandez y col., 2004; Álvarez- Sánchez y col., 2000; Hernández-Gutiérrez y col., 2004). Por otra parte se localizaron 152 casos de posible transferencia lateral de genes procariontes-eucariontes, los cuales corresponden a genes que codifican enzimas metabólicas involucradas en las vías de la síntesis de carbohidratos o aminoácidos (Carlton y col., 2007).

Tabla 1. Características del genoma de *T. vaginalis*.

Tamaño del ensamblaje en (pb)	176,441,227
Contenido de G + C (%)	32.7
Genes que codifican para proteínas	59,681
Genes con intrones	65
Densidad de genes	2956
Genes para tRNA	479

(Carlton y col., 2007)

1.6 Requerimientos nutricionales de *T. vaginalis*.

T. vaginalis carece de la vía biosintética *de novo* de nucleótidos como guanina, timidina, citocina, uracilo y/o uridina las cuales entran al parásito por difusión pasiva y que son necesarios para su sobrevivencia (Linstead., 1981; Heyworth y col., 1982; 1984), por lo que adquiere estos nutrientes del núcleo de las VECs las cuales son una fuente rica en nucleótidos (González-Lázaro y col., 2005).

T. vaginalis es incapaz de sintetizar espermina por lo que obtiene esta molécula del hospedero mediante un sistema antiporte acoplado a la secreción de dos moléculas de putrescina por cada molécula de espermina (Schuber., 1989). Este parásito requiere de carbohidratos, siendo la maltosa la fuente principal para su crecimiento; aunque también utiliza glucosa, galactosa, glucógeno o almidón (Mack y Müller., 1980). Los

aminoácidos también son indispensables para la sobrevivencia del parásito en especial arginina, treonina y leucina que en ocasiones son utilizados por el parásito para la generación de energía (Yoon y col., 1991). Además se reporta la presencia de genes requeridos para la síntesis de prolina, arginina, cisteína y para el metabolismo de treonina, así como genes que codifican enzimas involucradas en el metabolismo de metionina (Carlton y col., 2007).

T. vaginalis requiere principalmente de colesterol, fosfatidiletanolamina, fosfatidilcolina y esfingomiélinas por carecer de estas vías metabólicas y de muchas enzimas que intervienen en la biosíntesis de fosfolípidos, por ello los obtiene de forma exógena y su captación la realiza por medio de receptores para lipoproteínas (Heyworth y col., 1982; 1984; Beach y col., 1990; 1991). En el genoma de este parásito se identificaron genes que codifican para enzimas de la síntesis de lipofosfoglicanos (LPG) (Carlton y col., 2007), así como genes que codifican para superóxido dismutasas, tioredoxinas, peroxiredoxinas y ruberitinas. También, se encontraron familias de enzimas transportadoras de azúcares y aminoácidos, así como muchos miembros de familias cotransportadoras de cloro (Carlton y col., 2007).

Este parásito es capaz de incorporar y endocitar al VIH dentro de vesículas para posteriormente degradarlas dentro de vacuolas citoplasmáticas (Rendón-Maldonado y col., 2003). *T. vaginalis* al fagocitar los eritrocitos adquiere lípidos y Fe^{2+} . Para la captura de Fe^{2+} este parásito posee moléculas receptoras y transportadoras de Fe^{2+} como las glicoproteínas capaces de unir a eritrocitos para la adquisición de Fe^{2+} . Además, *T. vaginalis* está recubierta de fibronectina, la cual es una proteína de unión que se encuentra regulada por las concentraciones de Fe^{2+} , por lo que se ha propuesto

sea una molécula indispensable para la adquisición de nutrientes y la adhesión hacia la célula blanco (Lehker y col., 1990; Crouch y col., 2001; Alderete y col., 2002), la lactoferrina es una molécula transportadora de Fe^{2+} capaz de unirse a receptores de membrana en *T. vaginalis*, esta molécula remueve el Fe^{2+} de la superficie del parásito y posteriormente es internalizada (Peterson y Alderete., 1984). Adicionalmente, *T. vaginalis* fagocita virus, bacterias, levaduras, eritrocitos, fragmentos celulares para la adquisición de una gran cantidad de nutrientes (Arroyo y col., 2000; Costmagna y col., 2001; Pereira-Neves y Benchimol., 2007).

1.7 Patogenicidad

Al contacto del parásito con las VECs, participan diferentes señales transmembranales las cuales conducen al cambio morfológico de ovoide a ameboide con la formación de filipodios y pseudopodios (Arroyo y col., 1993). Luego se incrementa la citoadherencia del parásito a las VECs (Lehker y col., 1991; Alderete y col., 2000; García y col., 2003; Moreno-Brito y col., 2005). Posteriormente, se da la señal de quimiotaxis para el reclutamiento de los parásitos hacia el sitio inicial de contacto y el intercambio de material genético (Arroyo y col., 1993). Después se lleva a cabo la citotoxicidad del parásito hacia las VECs (Alvarez-Sánchez y col., 2000; Hernández-Gutierrez y col., 2003).

1.8 Citoadherencia.

La citoadherencia del parásito a las VECs comienza cuando *T. vaginalis* está en contacto con las VECs, lo cual desencadena una serie de señalizaciones que incluye adherencia específica a las VECs por las que tiene una alta especificidad (Lehker y col., 1991; Arroyo y col., 1993). Hasta ahora se han descrito cinco adhesinas estas se han nombrado según su peso molecular: 65 kDa (AP65), 51 kDa (AP51), 33 kDa (AP33), 23 kDa (AP23) y 120 kDa (AP120). Cada una de estas adhesinas actúan sobre receptores específicos, los cuales aun no han sido bien caracterizados. Mediante ensayos de inmunofluorescencia indirecta se conoce que se encuentran localizadas en la membrana del parásito y que son indispensables para la unión célula-célula (Lehker y col., 1991; Alderete y col., 2000; García y col., 2003; Moreno-Brito y col., 2005).

La citoadherencia le permite al parásito cambiar su morfología de ovoide a ameboide mediante uniones denominadas interdigitaciones entre la membrana plasmática del parásito formando proyecciones en la superficie de las VECs (Rasmussen y col., 1986; Arroyo y col., 1993; Höningber y col., 1993). Adicionalmente, estas proteínas le permiten adaptarse a medios ambientes adversos como es el ciclo menstrual, en bajas concentraciones de Fe^{2+} se tiene menor síntesis de adhesinas, por lo que el parásito es menos adhesivo y migra a sitios ricos de este catión, mientras que en altas concentraciones de Fe^{2+} el parásito se vuelve más adhesivo (Lehker y col., 1991). Las adhesinas interactúan con las células del hospedero vía ligando-receptor, de esta manera se sabe que existe una relación entre la expresión de superficie de las adhesinas y los niveles de citoadherencia (Alderete y Garza., 1988; Arroyo y col., 1992).

Además de la participación de las adhesinas se han descrito dos cisteína proteinasa que participan en citoadherencia. A continuación se mencionará brevemente la participación de la CP de 30 kDa (CP 30) involucrada en adhesión, es capaz de unirse a células del hospedero, se encuentra en la superficie del parásito participando en citoadherencia, su localización en citoplasma sugiere la fase de crecimiento del parásito, la fase celular del parásito, regulación medioambiental y el tipo de aislado, esta proteínasa actúa en un rango de pH de 5.5 a 7.0, estos rangos de pH han sido detectados en la vagina de pacientes con tricomonosis. CP30 es capaz de degradar diferentes proteínas como son: hemoglobina, fibronectina y colágeno IV (Mendoza-López y col., 2000).

1.9 Citotoxicidad.

T. vaginalis posee una gran cantidad de proteinasas ~446 del tipo metalopeptidasas, cistein proteinasa, serin proteinasa y aspartil proteinasa. La síntesis y la actividad de las proteinasas de *T. vaginalis* pueden ser controladas por factores ambientales tales como: Fe^{2+} , pH, la capacidad de óxido-reducción y la relativa sensibilidad de su actividad a inhibidores como: N- α -p-tosil-L-lisina cloro-métil-cetona (TLCK), leupeptina, agentes quelantes como el EDTA y EGTA (Coombs y North., 1983; Alderete y Garza., 1985; Bosner y col., 1999).

Las cisteín proteinasas (CPs) son endopeptidasas que se caracterizan por contener una cisteína en su sitio activo. Mediante 2D se ha evidenciado en *T. vaginalis* la presencia de 23 diferentes CPs, algunas de las cuales están involucradas en

diferentes propiedades de virulencia de este parásito como: citotoxicidad, adhesión, hemólisis y evasión de la respuesta inmune (Neale y Alderete., 1990; Provenzano y Alderete., 1995; Álvarez-Sánchez y col., 2000; Mendoza-López y col., 2000; Hernández-Gutiérrez y col., 2003).

En la citotoxicidad participan dos cisteína proteinasa, la CP de 65 kDa (CP65) participa en la citotoxicidad hacia células HeLa (Álvarez-Sánchez y col., 2000), se encuentra localizada en la superficie del parásito y en el citoplasma. Esta proteinasa es capaz de degradar componentes de la matriz extracelular como son: colágeno IV y fibronectina. Anticuerpos específicos contra esta proteinasa se han detectado en pacientes con tricomonosis lo cual indica que es altamente inmunogénica. Mediante ensayos de citotoxicidad se demostró que CP65 es capaz de unirse a la superficie de las células HeLa y participar en el proceso de daño celular. Actúa en un amplio rango de pH, de 4.5 a 7.0, siendo el pH de 5.5 óptimo para su actividad, esta proteinasa es termoestable (Álvarez-Sánchez y col., 2000). Altas concentraciones de Fe^{2+} *in vitro* (Álvarez-Sánchez y col., 2007) y bajas concentraciones de poliaminas reducen su actividad proteolítica, el transcrito, la localización de CP65 y los niveles de citotoxicidad (Álvarez- Sánchez y col., 2008).

La CP de 39 kDa (CP39), se ha encontrado en secreciones vaginales de pacientes infectadas con tricomonosis, y es una molécula involucrada en la citotoxicidad a VECs y a células HeLa. Dicha proteinasa es capaz de degradar diversos sustratos como colágeno I, III, IV y V, fibronectina, hemoglobina humana e inmunoglobulinas A y G. Esta proteinasa actúa en un amplio rango de pH, de 3.6 a 9.0 con un pH óptimo de

7.0. Mediante ensayos de inmunofluorescencia indirecta se le ha detectado en la superficie del parásito y en citoplasma (Hernández-Gutiérrez y col., 2004). Recientemente se reportó la presencia de anticuerpos anti-TvCp39 en pacientes con tricomonosis, lo cual sugiere que esta proteinasa es altamente inmunogénica (Ramón-Luing y col., 2011).

1.10 La relevancia del hierro (Fe^{2+}) en los organismos

El hierro es un catión esencial para todos los organismos debido a que forma parte de algunas proteínas como catalasas, peroxidasas y oxidasas, además de participar en procesos metabólicos implicados en su crecimiento como la respiración y en la síntesis de DNA.

Este catión participa en la síntesis de pirimidinas y aminoácidos en el ciclo de los ácidos tricarboxílicos y en la cadena de transporte de electrones (Ratledge y Dover., 2000). El Fe^{2+} no se encuentra de forma libre, ya que al reaccionar con el peróxido de hidrógeno promueve la generación de especies reactivas de oxígeno que pueden dañar el DNA, las membranas lipídicas y las proteínas (Zheng y col., 1999). La mayor parte del Fe^{2+} es captado por proteínas como la transferrina y ferritina las cuales permiten mantener una homeostasis celular (Baker y col., 2003).

1.11 Mecanismos de regulación medido por Fe^{2+} en *T. vaginalis*

T. vaginalis posee un alto requerimiento de Fe^{2+} , por lo que las concentraciones de este catión son esenciales para su metabolismo, sobrevivencia y patogénesis. Este parásito presenta diferentes mecanismos para adquirir el Fe^{2+} de su hospedero, específicamente de los eritrocitos y de las VECs.

La patogénesis de *T. vaginalis* es modulado por el Fe^{2+} , por ejemplo, la adherencia del parásito a las VECs y células HeLa se incrementa en altas concentraciones de Fe^{2+} debido a un aumento de la síntesis de las cinco adhesinas (AP23, AP33, AP51, AP65 y AP120) (Alderete y col., 1995; Arroyo y col., 1992; García y col., 2003; Lehker y col., 1991; Moreno-Brito y col., 2005).

El mecanismo transcripcional descrito para *ap65* que codifica para la AP65, una de las adhesinas más abundantes, es a través de la presencia de una secuencia conservada en la posición -90 (**AGATAACGA**) que funciona como un promotor de respuesta a Fe^{2+} , esta regulación es mediada por factores de transcripción del tipo MYC (Fig. 3A). Sin embargo, esta secuencia no ha sido encontrada en los genes que codifican para las otras adhesinas o para otros genes regulados positivamente por Fe^{2+} (Tsai y col., 2002). Por lo que se ha sugerido que exista también un mecanismo de regulación post-transcripcional por Fe^{2+} . El cual se basa en las interacciones RNA-proteína. Estas proteínas regulatorias de Fe^{2+} (IRPs) con elementos de respuesta a Fe^{2+} (IREs) localizados en las regiones no traducidas de algunos RNAm (Hentze y Kühn., 1996). En la proteinasa TvCP4 se ha propuesto un mecanismo de regulación por Fe^{2+} tipo IRE/IRP localizado en la región 5' UTR del RNAm de *tvcp4*, que forma una

estructura tallo-burbuja, similar al encontrado en el IRE-ferritina en humano con una secuencia consenso **CUUCAAGAGACANC** (Solano-González y col., 2009) (Fig. 3B). Tambien, se han reportado secuencias tipo IRE atípicas con un motivo UUG en el 5' UTR del RNAm de *tvcp12*, otra CP que es regulada negativamente por Fe^{2+} (Fig. 3C) (León-Sicairos y col., 2004; León-Sicairos y col., 2011, en preparación).

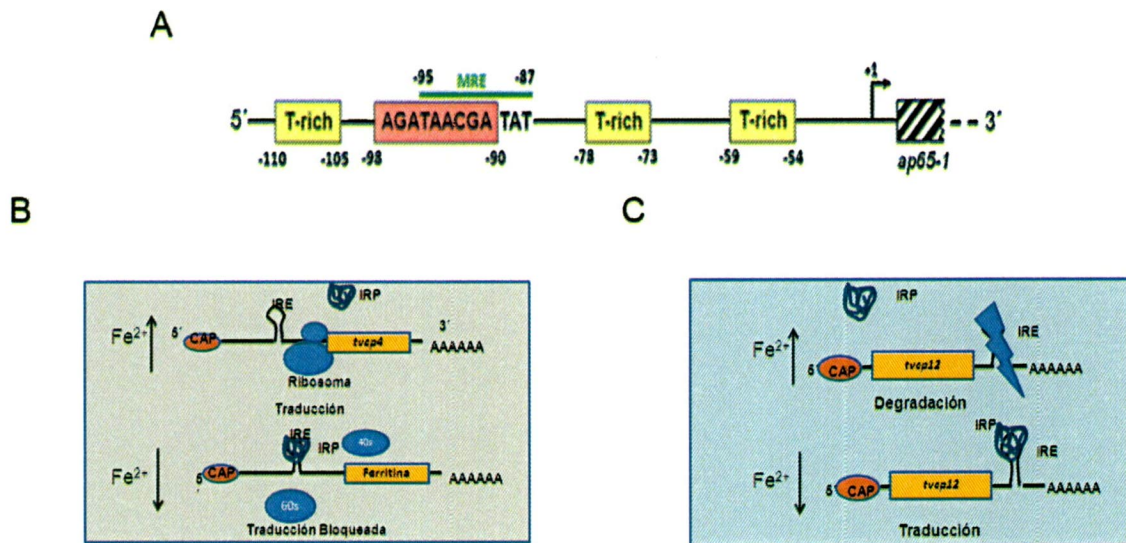


Figura 3. Mecanismos de regulación por Fe^{2+} en *T. vaginalis*. A) Regulación transcripcional del gen *ap65* por Fe^{2+} , en el cuadro rosa se muestra la secuencia del núcleo del promotor de respuesta a Fe^{2+} donde se une el factor de transcripción c-Myb, en los recuadros amarillos se muestran las regiones ricas en timidina (T). B) Mecanismo de regulación post-transcripcional del gen *tvcp4* en altas y bajas concentraciones de Fe^{2+} . C) Mecanismo de regulación post-transcripcional del gen *tvcp12* en altas y bajas concentraciones de Fe^{2+} .

1.12. Generalidades de Poliaminas.

Las poliaminas putrescina, espermidina y espermina son aminas alifáticas imprescindibles para la vida en todos los eucariontes. Las poliaminas se caracterizan por ser moléculas sencillas de un tamaño similar a los aminoácidos y que se encuentran presente en concentraciones importantes (en el rango 0.1- 2.29 mM), regulando múltiples procesos vitales para el mantenimiento y el crecimiento celular como: apoptosis, división, diferenciación y crecimiento celular. Las poliaminas se unen a los ácidos nucleicos por medio de interacciones electrostáticas para influir en la transcripción y la traducción (Tabor y col., 1985; Pegg y col., 1988; Schuber y col., 1989). A pH fisiológico, las poliaminas poseen cargas positivas, a mayor número de grupos amino la carga neta de la molécula será mayor. Por otro lado las cadenas carbonadas de estas moléculas permiten que también se establezcan interacciones hidrofóbicas, así como que exista cierta flexibilidad conformacional, que en conjunto permitan a putrescina, espermidina y espermina establecer interacciones más fuertes y específicas con diversas biomoléculas como DNA, RNA y ciertas proteínas cargadas negativamente (Marton y Pegg., 1995; Thomas y Thomas., 2001). Mediante estas interacciones, las poliaminas ejercen muchas de sus funciones, por ejemplo, la actividad de muchas proteínas, como USF, TFE3, Ig/EBP, YY1, etc (Chen y col., 2007; Patel y Wang., 1997; Rao y col., 2000; Wang, 2005; 2007) o la expresión de determinados genes como. *c-myc*, *c-jun*, E-caderina, y receptor toll-like 2 (TLR2) (Patel y Wang., 1997; Childs y col., 2003; Wang., 2007) (Tabla 2).

Tabla 2. Genes regulados a nivel transcripcional y post-transcripcional por las poliaminas.

Transcripcional	Post-transcripcional
<p><i>Fosfolipasa C-gamma 1</i></p> <p><i>p21</i></p> <p><i>c-jun</i></p> <p><i>c-fos</i></p> <p><i>Receptor de estrógenos (ere)</i></p>	<p><i>c-myc</i></p> <p><i>aft-2 (HUR)</i></p> <p><i>cox-2 (eIF-5A)</i></p>

La concentración de poliaminas y la proporción entre ellas (putrescina, espermidina y espermina) determinará de que forma regulan cada proceso en el que están implicadas. En este sentido, se conocen más de 20 proteínas distintas que en su conjunto determinan los niveles de poliaminas mediante la regulación de su síntesis, degradación, interconversión y procesos de transporte (Tabla 3) (Marton y Pegg., 1995).

El sistema de regulación de los niveles de poliaminas es uno de los más complejos en células eucariotas, presentando mecanismos específicos. Su complejidad y el control riguroso de su concentración sugiere la relevancia de estas moléculas a nivel celular.

Tabla 3. Proteínas involucradas en el metabolismo, catabolismo y retroconversión de poliaminas.

Arginasa
ornitina descarboxilasa (ODC)
espermidina sintasa (SpdST)
espermina sintasa (SpnST)
S-adenosilmetionina descarboxilasa (SAMDC)
metionina adenosil transferasa (MAT)
S-adenosilmetionina (SAM)
espermidina N1-acetiltransferasa (SSAT)
S-adenosilmetionina descarboxilasa (SAMDC)
poliamino oxidasa (PAO)
espermina oxidasa (SMO)
espermina N1-acetiltransferasa (SSAT)
diamino oxidasa (DAO)
N8-acetiltransferasa desacetilasa
N8-acetilespermidina desacetilasa
arginina descarboxilasa (ADC),
Agmatinasa

1.13 Metabolismo de las poliaminas en eucariontes.

El metabolismo de las poliaminas se regula de acuerdo al balance entre los procesos de síntesis, degradación, interconversión y transporte. Este balance está determinado por los niveles intracelulares de poliaminas (Tabor y Tabor., 2010). La ruta biosintética de las poliaminas en la mayoría de los eucariontes es a través de la síntesis “*de novo*” y comienza por los aminoácidos L-arginina y L-metionina por una serie de seis reacciones enzimáticas interdependientes (Wallace y col., 2003). La ruta de biosíntesis se inicia con la transformación de L-arginina en L-ornitina y urea, catalizada por la enzima arginasa (Jenkinson y col., 1996). A continuación, L-ornitina sufre una descarboxilación mediada por ornitina descarboxilasa (ODC) transformándose en putrescina. La formación de putrescina la cual dona los grupos aminopropil por la acción de la enzima S-adenosil metionina descarboxilasa (dcSAM) la cual es formada a partir de S-adenosil metionina (SAMDC) para la producción de espermidina vía espermidina sintasa y espermina con una segunda reacción del aminopropiltransferasa por la espermina sintasa (Wallace y col., 2003).

A su vez, la S-adenosilmetionina (SAM) es formada a partir de L-metionina y ATP por medio de la metionina adenosil transferasa (MAT) (Wallace y col., 2003). Una ruta alterna para la síntesis de espermina y espermidina es mediante la condensación de un aminopropilo con un grupo amino de la putrescina, catalizado por la espermidina sintasa (SpdST), produciéndose espermidina. Después la espermina sintasa (SpmST) cataliza la condensación de un segundo aminopropilo, específicamente con el grupo

amino del otro extremo de la molécula, produciendo la espermina (Wallace y col., 2003).

La generación de cadaverina (una poliamina minoritaria) es a partir de L-arginina mediante las enzimas arginina descarboxilasa y agmatinasa. Sin embargo, la síntesis de cadaverina en mamíferos parece estar también catalizada por la ODC, aunque en este caso la ODC descarboxila a L-lisina y no a L-ornitina (Wallace y col., 2003).

Las enzimas ODC y SAMDC son esenciales para que se lleve a cabo la biosíntesis de poliaminas, debido a que estas se encuentran altamente reguladas. Mediante estudios en ratones knock-out de ODC y SAMDC se pudo demostrar la importancia de estas enzimas en la sobrevivencia de los ratones. La ausencia de estas enzimas resultó en la muerte de los ratones en fases tempranas del desarrollo embrionario (Pendeville y col., 2001; Nishimura y col., 2002), lo que indica que son enzimas esenciales para la vida. Por otra parte, ratones transgénicos que carecen de la enzima SpdST (incapaces de sintetizar espermina) son viables, lo que sugiere que la espermina no es una poliamina esencial para la supervivencia en mamíferos (Seiler., 2004), además de sugerir vías alternas para la síntesis de espermina.

1.14 Ruta de retroconversión de las poliaminas.

Existe una ruta inversa que transforma las diferentes poliaminas en sus precursores inmediatos. En primer lugar las poliaminas mayores, espermina o espermidina son acetiladas, mediante la espermidina/espermina N1-acetiltransferasa (SSAT), esta enzima acetila un grupo amino primario de la espermidina o espermina a partir de

acetilCoA, dando lugar a la formación de N1-acetil espermidina o N1- acetilespermina, respectivamente (Casero y Pegg., 1993). Una vez acetiladas, las poliaminas pueden ser convertidas en su precursor inmediato, mediante la acción de poliamino oxidasa (PAO) la cual es una flavoproteína de localización peroxisomal. Esta enzima cataliza la escisión de la poliamina acetilada por el grupo amino secundario dando lugar a la poliamina menor y liberando peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y 3-acetamidopropanal (Holttä., 1977; Bolkenius y Seiler., 1981). La ruta de retroconversión contribuye al mantenimiento de los niveles adecuados de cada una de las poliaminas. Por otro lado, la producción de H_2O_2 se ha relacionado con la capacidad de las poliaminas de inducir apoptosis en determinadas condiciones (Parchment., 1993).

1.15 Catabolismo de poliaminas.

En eucariontes se conocen una serie de enzimas que participan en el catabolismo de poliaminas. Una de estas enzimas es la diamino oxidasa (DAO), también conocida como histaminasa. DAO es una cupro-oxidasa que tiene como principales sustratos a putrescina e histamina, aunque también cataliza la desaminación oxidativa de otras aminas primarias, liberando H_2O_2 y los correspondientes aminoaldehídos (Seiler y col., 1983). Otras enzimas implicadas en el catabolismo de poliaminas son las amino oxidasas séricas, y transferasas como la espermidina N8-acetiltransferasa y la N8-acetilespermidina desacetilasa (Seiler., 2004) que han sido implicadas en procesos tales como la movilización de depósitos de espermidina del

núcleo (Seiler, 1987), la inhibición de la apoptosis (Berry, 1999) o la acetilación de histonas (Desiderio y col., 1992).

1.16 Interacción de las poliaminas con el DNA y el RNA

Las interacciones de las poliaminas con el DNA son independientes de la secuencia del DNA, ya que las cargas positivas de los grupos amino de las poliaminas interaccionan con las cargas negativas de los grupos fosfatos presentes en las cadenas polinucleotídicas. De acuerdo a reportes previos se ha descrito que las poliaminas pueden acoplarse en el surco menor de la doble hélice del DNA (Feuerstein y col., 1990; Feuerstein y col., 1991; Tippin y Sundaralingam., 1997; Deng y col., 2000), incrementando la temperatura de fusión del DNA (Thomas y Bloomfield., 1984), por lo que pueden tener una importante función de estabilizar el DNA. Por otro lado, también se ha descrito que las poliaminas pueden interaccionar con el surco mayor del DNA e inducir curvaturas que podrían regular la transcripción de los genes (Feuerstein y col., 1986; Feuerstein y col., 1989; Rouzina y Bloomfield., 1998; Childs y col., 2003). También se ha demostrado que las poliaminas pueden condensar moléculas de DNA de alto peso molecular (Arscott y col., 1990), inducir cambios conformacionales que determinan transiciones entre las formas DNA-B y DNA-Z (Hasan y col., 1995), estabilizar triple cadena de DNA (DNA triplex) (Hampel y col., 1991) o formas alteradas del DNA duplex como apareamientos incorrectos (Hou y col., 2001). Las poliaminas participan en la estabilización de los nucleosomas y de niveles estructurales superiores de la cromatina (Morgan y col., 1987; Matthews., 1993). Estas interacciones con el DNA

pueden modificar su compactación y por tanto la accesibilidad de las múltiples proteínas necesarias para la replicación y transcripción. Además, su acción sobre diferentes proteínas o enzimas que participan en dichos procesos de replicación, transcripción o remodelado de la cromatina, puede contribuir a su regulación. Por otra parte, la variación de la concentración de poliaminas es capaz de modificar la afinidad de varios factores de transcripción por su sitio de unión al DNA (Thomas y Thomas., 1993; Panagiotidis y col., 1995; Desiderio y col., 1999).

1.17. Regulación transcripcional y post-transcripcional mediado por poliaminas

Estudios previos han demostrado que las poliaminas son necesarias para la expresión del gen *c-myc*, sobre su transcripción, en presencia del inhibidor de la ODC el 2-difluorometil ornitina (DFMO), disminuye la expresión de este gen en un 90%, por lo que se ha propuesto que la presencia de las poliaminas durante el inicio de la transcripción y durante la elongación del RNAm del gen *c-myc* es necesaria (Celano y col., 1989). Por otra parte, la proteína p21Cip1 se ha caracterizado por ser una CDK, actuando por asociación a las ciclinas y también como un factor de transcripción, necesaria para el control del ciclo celular. El gen *p21cip1* se encuentra regulado por poliaminas a través de la expresión del gen *c-myc*. En bajas concentraciones de poliaminas la expresión del gen *c-myc* disminuye y la expresión del gen *p21cip1* aumenta (Liu y col., 2006). Una gran cantidad de estudios ha indicado que las poliaminas son requeridas en la proliferación celular en mamíferos, la ausencia de

poliaminas conduce a una inhibición específica de la ruta biosintética de estos cationes, resultando en el arresto del crecimiento celular (Tabor y Tabor., 1991).

Adicionalmente, el gen *fosfolipasa C-gamma 1* necesita de poliaminas para su expresión, la proteína fosfolipasa C-gamma 1 (PLC)- γ 1 cataliza la formación de inositol-trifosfato el cual es un regulador de las concentraciones de Ca^{2+} al igual que las poliaminas. Mediante el uso del inhibidor DFMO, se demostró que la expresión de (*plc*)- γ 1 disminuyó debido a la disminución del Ca^{2+} y de las poliaminas (Rao y col., 2007). Mediante ensayos de RT-PCR y qRT-PCR se determinó que los niveles de expresión de *c-myc* y *c-jun* aumentan en presencia de poliaminas debido a que estos cationes se encuentran estimulando la síntesis de RNAm (Chen y col., 2007; Patel y Wang., 1997). Estudios previos mostraron que las poliaminas influyen en el rápido crecimiento de tumores mamarios. A este respecto, se ha sugerido que existe una interacción entre las poliaminas y los estrógenos, principalmente el estradiol, demostrando que la espermina facilita la unión de los estrógenos al receptor de estrógenos (ER), mediante la unión a secuencias conocidas como elementos de respuesta a estrógenos (ERE). Estos resultados han sugerido un posible mecanismo de alteración mediado por poliaminas en la interacción de ER con las secuencias consenso ERE (Huang y col., 2006).

La ausencia de poliaminas regula la estabilidad del RNAm del *factor de transcripción 2 (aft-2)*, mediante la unión de la proteína HuR al extremo 3'UTR de *aft-2*. En ausencia de poliaminas, mediante el inhibidor DFMO, se incrementaron los niveles de RNAm de *aft-2* y de su proteína. De manera interesante, la cantidad de HuR en citoplasma aumentó, sin embargo, cuando se realizó un silenciamiento del gen *hur* los niveles del RNAm de *aft-2* disminuyeron drásticamente (Xiao y col., 2007).

Existe una regulación mediada por poliaminas en el gen de la *ciclooxigenasa-2* (*cox-2*) involucrado en cáncer de colon de humano, este gen contiene una secuencia consenso llamada elemento de respuesta a eIF-5A (EREs) localizada en el extremo 3'UTR del RNAm. La proteína eIF-5A al unirse al ERE es capaz de estabilizar la estructura del RNAm aumentando la expresión de este gen (Figura 4) (Taylor y col., 2002).

1.18 Mecanismos de regulación mediados por eIF-5A

El mecanismo molecular involucrado en la regulación a través de las poliaminas en el crecimiento celular en mamíferos, así como para la regulación post-transcripcional no se conoce con precisión, se ha reportado que la ausencia de espermidina afecta la traducción y transcripción celular resultando en la inhibición del crecimiento celular y secundariamente provoca la falta de la formación de la hipusina e inducción de citostasis (Jarvinen y col., 2005).

Como anteriormente se mencionó, las poliaminas son capaces de interactuar con los diversos tipos de RNA, muchos estudios han mostrado que la mayor parte de la poliaminas presentes en la célula se encuentran unidas a RNA (Igarashi y Kashigawi., 2000). Existen diversos trabajos que describen las interacciones de estas moléculas con RNAm, RNAr y RNAt (Quigley y col., 1978; Igarashi and Kashigawi., 2000; 2006), modulando su plegamiento o estabilidad.

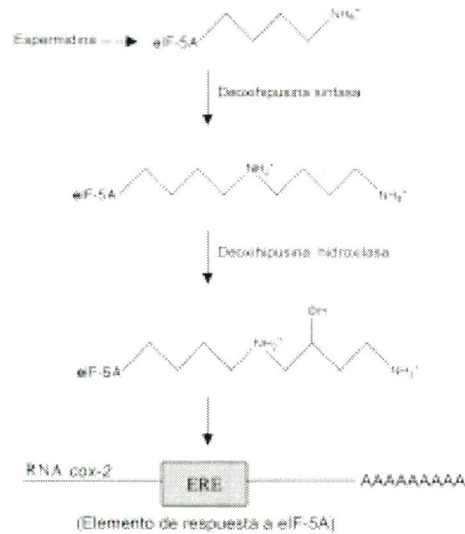


Figura 4. eIF-5A hipusinado es capaz de unirse a las secuencias EREs en el extremo 3'UTR de los RNAm del gen *cox2* (Taylor y col., 2002).

2. eIF-5A

2.1 Generalidades de eIF-5A

Uno de los mecanismos moleculares caracterizados de las poliaminas es la modificación post-traducciona de un residuo de lisina, denominada hipusinación en eIF-5A. Esta proteína es la única conocida en eucariotas que contiene el aminoácido hipusina, residuo que se forma mediante una modificación post-traducciona de una lisina. En ello interviene una enzima específica denominada deoxihipusina sintasa (DHS), que cataliza la adición de un carbono 4-aminobutil de la espermidina a un residuo de lisina específico (Park y col., 1981). Este mecanismo de hipusinación de eIF-5A es esencial para la viabilidad celular (Schnier y col., 1991) y supone otro mecanismo

por el cual las poliaminas son capaces de regular la síntesis proteica (Childs y col., 2003).

eIF-5A es una proteína multifuncional de 140 aminoácidos conservada a través de los eucariontes desde arqueobacterias hasta mamíferos pero no en eubacterias (Kemper y col., 1976; Park y col., 2006). eIF-5A se conoce como un factor dependiente de las poliaminas que se caracteriza por tener 11 aminoácidos conservados, rodeando el residuo de lisina en la posición 50, estos aminoácidos son Ser-Thr-Ser-Lys-Thr-Gly-**Lys***-His-Gly-His-Ala-Lys, en otras proteínas estos aminoácidos no están presentes, sugiriendo un origen temprano en la evolución de los eucariontes (Kemper y col., 1976; Park y col., 2006; Zaneli., 2005).

eIF-5A presenta dos dominios, el N-terminal caracterizado por tener una gran concentración de cargas positivas y estar situado en una región expuesta en donde se encuentra el residuo de lisina expuesto. Este dominio es capaz de unirse a diversos RNAm y a la enzima deoxihipusina sintasa (DHS). El dominio C-terminal es ácido y se caracteriza por contener una alfa hélice que le permite unirse al DNA y a las proteínas. Esta estructura es conservada en diferentes organismos, esto ha sido obtenido mediante predicción de estructuras en 3D y estructuras cristalizadas como en: *Leishmania*, *Methanococcus* y humano, en donde se muestra una alta homología (Park y col., 1991).

eIF-5A sufre otras modificaciones post-traduccionales, la primera se lleva a cabo en el N-terminal en el residuo de serina (Kang y col., 1993; Klier y col., 1993), este residuo se fosforila, mutaciones realizadas en el codón que codifica para este residuo indicó que la desfosforilación es suficiente para que la proteína eIF-5A presente

actividad y permita el crecimiento de la levadura, por lo que sugiere que la fosforilación no es esencial para la función de esta proteína (Chen y Liu., 1997). La segunda modificación que se ha propuesto es la glicosilación; sin embargo, no se han obtenido evidencias bioquímicas que respalden esta modificación (Wolff y col., 2007). Por último, la modificación post-traducional de hipusinación en un residuo específico de lisina es esencial para la función de esta proteína. En *S. cerevisiae*, el bloqueo de la hipusinación mediante mutación en el codón que codifica la lisina 50, resulta en células no viables (Shnier y col., 1991; Sasaki y col., 1996; Park y col., 1998).

Se conoce que eIF-5A es la única proteína conocida capaz de hipusinarse, el aminoácido llamado hipusina ([N^ε-(4-amino-2-hidroxibutil) lisina]), fue llamado así basado en su estructura, que consiste de hidroxiputrescina y lisina (Kemper y col., 1976; Park y col., 2006). La modificación post-traduccional de hipusinación es un factor determinante en la actividad de eIF-5A y consta de dos reacciones enzimáticas: la primera se lleva a cabo por medio de la enzima deoxihipusina sintasa (DHS) y la segunda por medio de la enzima deoxihipusina hidroxilasa (DOHH) (Schiner y col., 1991).

La proteína eIF-5A fue aislada inicialmente de una fracción ribosomal de reticulocitos de conejo y se ha demostrado que esta proteína hipusinada produce un estímulo para la síntesis de metionil-puromicina, indicando un papel en la formación del primer esqueleto peptídico, por lo que se ha considerado como un factor de inicio de la traducción (Kemper y col., 1976). Sin embargo, la ausencia de esta proteína en

levaduras solo ocasiona una reducción del 30% en la tasa de síntesis proteica (Kang y Hershey., 1994). Este resultado ha dado pauta a involucrar a eIF-5A en otras funciones. Reportes anteriores sugieren que esta proteína está involucrada en la traducción de ciertos RNAm con papeles importantes en la progresión del ciclo celular (G1/S). La expresión de eIF-5A se ha correlacionado con la proliferación celular al observarse un aumento de la cantidad de esta proteína cuando es arrestada la fase G1 en levaduras (Kang y Hershey., 1994).

Experimentos de localización de la proteína eIF-5A han sugerido que este factor está presente en el núcleo y en el citoplasma y se ha propuesto que entra al núcleo mediante difusión pasiva (Jao y Chen., 2002). Sin embargo, no en todos los organismos la proteína eIF-5A está en el núcleo. En ovocitos de *Xenopus* se ha localizado únicamente en citoplasma (Shi., 1996).

En levaduras, eIF-5A podría estar involucrada en la exportación de una subpoblación de RNAm específicos de núcleo a citoplasma, relacionados con la transición del ciclo celular G1/S. Estos datos sugieren que eIF-5A puede estar participando en el procesamiento post-transcripcional de RNAm's específicos. Estos transcritos podrían estar codificando para factores que son requeridos en la viabilidad celular y en la proliferación. Lo que se apoya aun más por el descubrimiento que eIF-5A actúa como un cofactor del VIH-1, actuando como un transportador de núcleo a citoplasma del RNAm del gen *rev* del VIH formando un complejo con la proteína REV. La actividad de esta proteína es esencial para la replicación del VIH (Ruhl y col., 1993; Bevec y col., 1996; Bevec y Hauber., 1997; Liu y col., 1997; Hofmann y col., 2001). Estudios en *S. cerevisiae* han sugerido que eIF-5A tiene un papel mayoritario como un factor de

elongación en la traducción más que un factor de iniciación de la misma y como un transportador de moléculas (Chan y col., 2001; Schatz y col., 1998; Kemper y col., 1976).

eIF-5A se encuentra presente en *S. cerevisiae*, este microorganismo contiene dos genes *eIF-5A* (*TIF51A* y *TIF51B*) los cuales codifican dos isoformas de la proteína eIF-5A con un 90% de identidad y su transcripción es diferencial en respuesta a la presencia de oxígeno. Sin embargo, el remplazo del gen *TIF51A* por el *TIF51B* mantiene la misma función, sugiriendo un papel similar entre ambas proteínas (Schwelberger y col., 1993). En humano se han reportado dos genes *eIF-5A* (*EIF-5A1* y *EIF-5A2*) que codifican hasta cinco isoformas de la proteína eIF-5A con un 93% de identidad; además, se han encontrado cinco pseudogenes (Steinkasserer y col., 1995; Jenkins y col., 2001; Clement y col., 2003).

En parásitos, el gen *eIF-5A* se ha identificado mediante análisis bioinformáticos como en *Toxoplasma gondii* (Kissinger y col., 2000), *Leishmania major* (Krummel-Smith y col., 2003) y en *Plasmodium falciparum*. En estos parásitos existe una sola isoforma de eIF-5A altamente conservada con respecto a las proteínas eIF-5A previamente reportadas en otros organismos. En *P. falciparum* se ha propuesto a la proteína eIF-5A como posible blanco farmacéutico contra el parásito causante de la malaria (Kaiser y col., 2003).

2.1.1 Deoxihipusina sintasa

DHS es una enzima tetramérica compuesta de cuatro subunidades idénticas de ~ 40 kDa. La estructura cristalizada del complejo NAD de la enzima DHS en humano, comprobó la interacción de la enzima con el NAD⁺ (Liao y col., 1998). Mediante ensayos de mutagénesis dirigida se determinó el residuo del sitio activo que participa en la unión de la espermidina y la identificación de residuos críticos para la unión de NAD⁺ (Joe y col., 1997; Lee y col., 2001). La sustitución de un residuo de alanina inhibe la unión de la espermidina a DHS madura y se ha visto que estos residuos son altamente conservados en todas las especies (Lee y col., 2001). No todos los organismos presentan a DHS pero en algunas bacterias que no poseen a la enzima, presentan a la proteína EF-P homóloga de eIF-5A.

Mediante estudios filogenéticos se ha sugerido que ciertas especies de bacterias pudieron transferir horizontalmente el gen *dhs* a ciertas arqueas y no requieren la modificación de eIF-5A por DHS. Estudios previos han sugerido que eIF-5A y las dos enzimas participantes en la modificación post-traducciona (hipusinación) fueron adquiridas de manera co-evolutiva. Por otra parte en estudios realizados con la enzima DHS al usar el inhibidor AXD455 (Semapimod) de manera dosis dependiente, DHS pierde su capacidad de hipusinar a eIF-5A (Sommer y col., 2004).

La enzima DHS se caracterizó en *Nicotiana plumbaginifolia* (Tobacco) mediante ensayos de actividad enzimática para llevar a cabo la modificación post-traducciona de eIF-5A. En estos ensayos de actividad enzimática, DHS transfiere un carbono aminobutil de la espermidina al residuo específico de lisina de la proteína eIF-5A

precursora. Esta reacción es dependiente de NAD1 para dar paso a la siguiente enzima DOOH, la cual hidroxila el carbono aminobutil para dar paso a la formación de la hipusina, convirtiendo a eIF5A precursora en su forma madura. Esta es la modificación post-traduccionales más específica que se conoce (Park y col., 2006).

2.1.3 Deoxihipusina hidroxilasa

La segunda enzima implicada en modificar a eIF-5A es la enzima deoxihipusina hidroxilasa (DOHH). El gen *dohh* fue clonado a partir de la identificación del gen *dohh* en humano. A la DOHH también se le llama factor 3 de elongación y forma parte de la subunidad de la proteína fosfatasa 2A, DOHH comúnmente está presente en interacciones proteína-proteína (Andrade y col., 2001) y ha estado involucrada en el transporte núcleo-citoplasma, transporte vacuolar y organización de la regulación del citoesqueleto. DOHH es conservada en un 47% de identidad entre *S. cerevisiae* y la de humano, se ha encontrado un solo gen *dohh* en muchos eucariontes. La DOHH recombinante de humano se caracterizó como una metaloenzima dependiente de Fe (II) con ocho repetidos HEAT con unión a Fe²⁺; es una enzima super helicoidal con ocho repetidos en tándem. Esta metaloenzima es capaz de unir dos átomos de Fe²⁺ coordinadamente en los motivos His-Glu por monómero (Park y col., 2006). Estudios recientes han mostrado que DOHH solo es indispensable para la hipusinación en eucariontes superiores pero no para levadura, arqueas y eubacterias (Tabla 4) (Park y col., 2010).

Tabla 4. Hipusinación en diferentes organismos

	Eubacterias	Arqueas	Levadura	Eucariontes superiores
eIF-5A homólogo	X	X	X	X
DHS homólogo	X	X	X	X
DOHH Homólogo			X (No indispensable)	X

La alta conservación de secuencias de eIF-5A, DHS y DOOH en eucariontes puede estar dictada por el requerimiento estructural de eIF-5A para su interacción con moléculas efectoras celulares y con la interacción enzimática (Andrade y col., 2001).

2.2. *T. vaginalis* y las poliaminas.

T. vaginalis al carecer de la vía *de novo* necesita obtener a la espermidina de las VECs y eritrocitos (Heyworth y col., 1982; 1984), esta poliamina forma parte de la ruta

biosintética de las poliaminas (Yarlett y col., 2000). La biosíntesis de las poliaminas en este parásito comienza con la síntesis de la ornitina por la vía de la arginina hidrolasa que conduce a la producción de ATP vía carbamato cinasa. La putrescina es sintetizada por la enzima ODC, esta poliamina se encuentra presente en gran cantidad en las secreciones de pacientes con tricomonosis (3.5 mM). En personas sanas, la cantidad de putrescina y otras diaminas en secreciones vaginalis no son detectables, sugiriendo que el parásito produce putrescina durante la infección (Yarlett y col., 2000). En *T. vaginalis* la inhibición de la ODC con el inhibidor reversible 1-4-diamino-2 butanona (DAB), inhibe la vía biosintética de las poliaminas (Garcia y col., 2005). Esta inhibición tiene un efecto sobre las adhesinas en el contacto dependiente de estas proteínas con las VECs, resultando en la disminución de la adhesión en presencia de poliaminas sin disminuir la cantidad de las adhesinas (Garcia y col., 2005).

Las poliaminas también regulan positivamente la actividad proteolítica de la CP65 y CP39, así como la expresión del transcrito de *tvcp65*, la localización de CP65 también se ve disminuida. Esta inhibición es restaurada mediante la adición de putrescina exógena, indicando que la síntesis de putrescina es importante para la expresión y actividad de la CP65 (Álvarez-Sánchez y col., 2008). Estos resultados sugieren que *tvcp65* y *tvcp39* involucradas en la citotoxicidad de este parásito podría estar regulada a través de un mecanismo mediado por poliaminas (Álvarez-Sánchez y col., 2008). Recientes estudios han evidenciado que un mecanismo similar al reportado para *cox-2* podría estar presente en el RNAm de *tvcp39* y *tvcp65*.

2.3 eIF-5A de *Trichomonas vaginalis*

T. vaginalis tiene dos genes *tveif-5a* denominados *tveif-5a1* y *tveif-5a2* con un marco de lectura abierto de 504 pb. Estos genes codifican para una proteína precursora de 19 kDa. Ambos genes se expresan de manera constitutiva y son regulados positivamente por las poliaminas. Mediante ensayos de Western blot con anticuerpos anti-péptido (anti-TveIF-5A) se inmunodetectaron dos proteínas de 19 y 20 kDa con un pI de 5.2 y 5.5, respectivamente, en extractos proteicos de *T. vaginalis*. La estructura terciaria teórica de TveIF-5A muestra la secuencia conservada expuesta, donde se encuentra la lisina 58 para que se lleve a cabo la modificación post-traducciona de hipusinación y la posible interacción con las secuencias EREs en el 3'UTR. La localización de TveIF-5A en *T. vaginalis* es en el citoplasma (Carvajal-Gamez y col., 2010).

2.4 Transcripción.

Es conocido que la transcripción en eucariontes se lleva a cabo por tres distintas polimerasas dependientes de DNA. La RNA polimerasa I responsable de la transcripción de los RNAr, la RNA polimerasa II que transcribe genes que codifican proteínas y la RNA polimerasa III que transcribe los RNAt y genes de pequeños RNAr como el 5S (Liston y Johnson., 1998; Torres y col., 2006). Las polimerasas se distinguen por su sensibilidad a alfa-amanitina (toxina fúngica), mediante la cual se ha podido sugerir que *T. vaginalis* contiene una RNA polimerasa II inusual, la cual se ha identificado por ser resistente a alfa-amanitina en un 50%, sugiriendo que solo esta es

responsable de la transcripción en este parásito (Quon y col., 1996; Liston y Johnson, 1998). Recientemente se ha descrito la presencia del RNAr 5S en *T. vaginalis*, el cual es transcrito por la RNA polimerasa II en el parásito. Su papel en el parásito no ha sido bien esclarecido, sin embargo, se cree que pueda estar actuando en la fidelidad de la traducción (Torres y col., 2006). De manera interesante recientemente se reportó la secuencia consenso TATA en el RNAr 5S (Torres-Machorro y col., 2009).

Los RNAm de *T. vaginalis* contienen “cap” lo cual refuerza la idea de la existencia de la polimerasa II. Esta polimerasa requiere que los RNAm tengan “cap” en el extremo 5' para iniciar la transcripción (Arroyo., 2000).

2.4 Traducción.

El mecanismo de traducción es universal, ya que los RNAs ribosomales son altamente conservados en estructuras primarias y secundarias en todos los organismos. La única excepción aparece en los factores iniciales de la traducción, algunos son funcionalmente similares en todos los organismos. En eucariontes el complejo de iniciación involucra un gran número de factores proteicos, muchos de ellos tienen múltiples subunidades (Pestova y col., 2001).

La traducción de los RNAm a proteínas comienza después del ensamble del RNAt iniciador (Met- tRNA), RNAm y la subunidad 40S separada del 60S. El Met-tRNA se coloca en el sitio P del ribosoma en el codón de inicio. Este proceso conduce a la formación del ribosoma 80S, evento que consiste de varias etapas las cuales son:

1) Selección del MetRNA iniciador de un “pool” de tRNAs de elongación por el factor de iniciación eIF2. Este factor juega un papel central en el inicio de la transcripción asociándose al Met-tRNA para formar el complejo eIF2yGTP y Met-tRNAi como un complejo tRNAr a la subunidad 40S. Inmediatamente, eIF-3 actúa como un factor anti-asociación de la subunidad y promueve la selección del Met-tRNA iniciador. Para formar el complejo de pre-iniciación 43S con el RNAm, el cual ocurre instantáneamente, el factor eIF4 escanea el RNAm para encontrar el codón de inicio, por un mecanismo que involucra el reconocimiento del “cap” sobre el mRNA por eIF4E. En el siguiente paso, eIF5 promueve la hidrólisis de GTP para el complejo de preiniciación, además de estabilizar al Met tRNA y participar en la formación del esqueleto peptídico, pero no en su elongación.

El movimiento del RNAm limita el complejo ribosomal a la región 5' no traducida del sitio inicial de la traducción para formar el complejo de iniciación 48S en donde son apareadas las bases codón-anticodón del tRNA (Pestova y col., 2001).

En *T. vaginalis* la traducción de los RNAm puede estar regulado mediante elementos de respuesta a Fe^{2+} (IREs), su estructura de tallo y burbuja sugieren que actúen como un mecanismo regulador post-transcripcional, como ocurre en el gen de la *ferritina*, actuando como reclutadores de la maquinaria traduccional (Fig. 5) (Tsai y col., 2002; Solano-González y col., 2007). La regulación por Fe^{2+} en *T. vaginalis* ha sido bien estudiada y esta regulación es muy parecida a la de mamíferos, la cual ocurre mediante la regulación al nivel post-transcripcional a través de la unión de proteínas de respuesta a Fe^{2+} (IRP) a una estructura tallo-burbuja localizadas en las regiones no traducidas de los RNAm. En *T. vaginalis* se caracterizó la estructura tallo-burbuja en el extremo

5'UTR del RNAm *tvcp4*, regulado positivamente por Fe^{2+} . El transcrito del gen *tvcp12* también es regulado negativamente al nivel post-transcripcional por Fe^{2+} mediante una estructura tallo-burbuja localizada en el 3'UTR (Solano-González y col., 2007; León Sicarios y col., 2004; Tesis de Doctorado, 2007). Recientemente, se reportó la presencia de estructuras tallo-burbuja atípicas, sugiriendo que se deben a formas ancestrales surgidas de bacterias, capaces de participar en la regulación por Fe^{2+} (Torres-Romero y Arroyo, 2009).

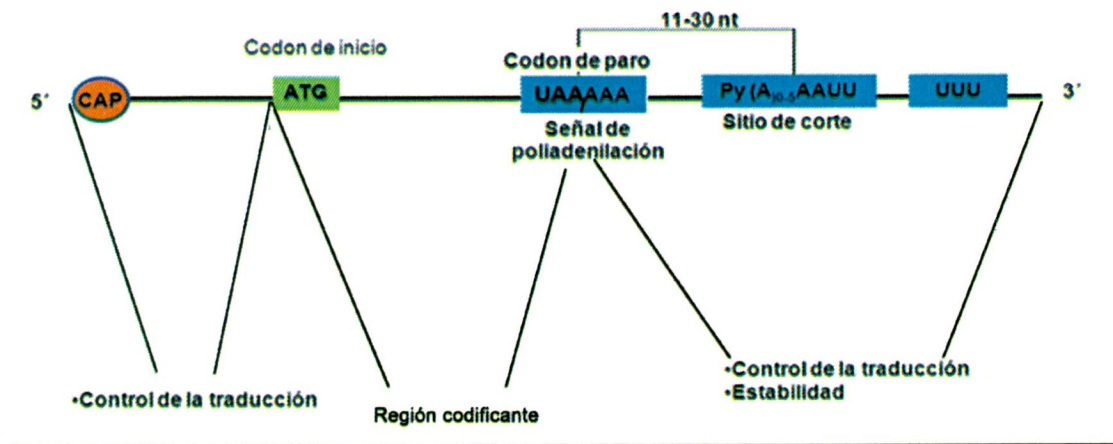


Figura 5. Estructura de un RNAm de *T. vaginalis*. En el círculo naranja se muestra el cap del RNAm. En el recuadro verde se muestra el sitio de inicio de la traducción. Los recuadros azules muestran las secuencias reguladoras del RNAm localizado en el 3'UTR.

2.5 Modificaciones post-traduccionales.

Todas las proteínas hidrogenosomales son codificados por preproteínas con una secuencia líder de 5 a 15 aminoácidos, ausentes en las proteínas maduras. Adicionalmente se ha propuesto que esta secuencia se utilice para la translocación de las proteínas del citoplasma a los hidrogenosomas, posiblemente ayudados por las proteínas de choque térmico HSP10, HSP60 y HSP70, responsables del plegamiento correcto de las proteínas localizadas en los hidrogenosomas (Lahti y col., 1992).

Las principales modificaciones post-traduccionales en *T. vaginalis* son:

- 1) acetilación
- 2) glutaminación
- 3) glicosilación
- 4) fosforilación

Estas modificaciones son llevadas a cabo después del ensamblaje de las estructuras proteicas en *T. vaginalis* (Arroyo., 2000).

III. Justificación

Las poliaminas regulan propiedades de virulencia en *T. vaginalis* como la adhesión y la citotoxicidad. La ausencia de poliaminas influye sobre la actividad proteolítica, expresión proteica y transcrito de CP65. eIF5A al ser un factor dependiente de poliaminas, es capaz de unirse a las secuencias EREs en el 3' de los RNAm, lo que sugiere un mecanismo de regulación post-transcripcional mediado por poliaminas.

IV. Hipótesis

La proteína TvEIF-5A madura es capaz de unirse al 3'UTR del RNAm del gen *tvcp39* y regular su expresión dependiente de poliaminas.

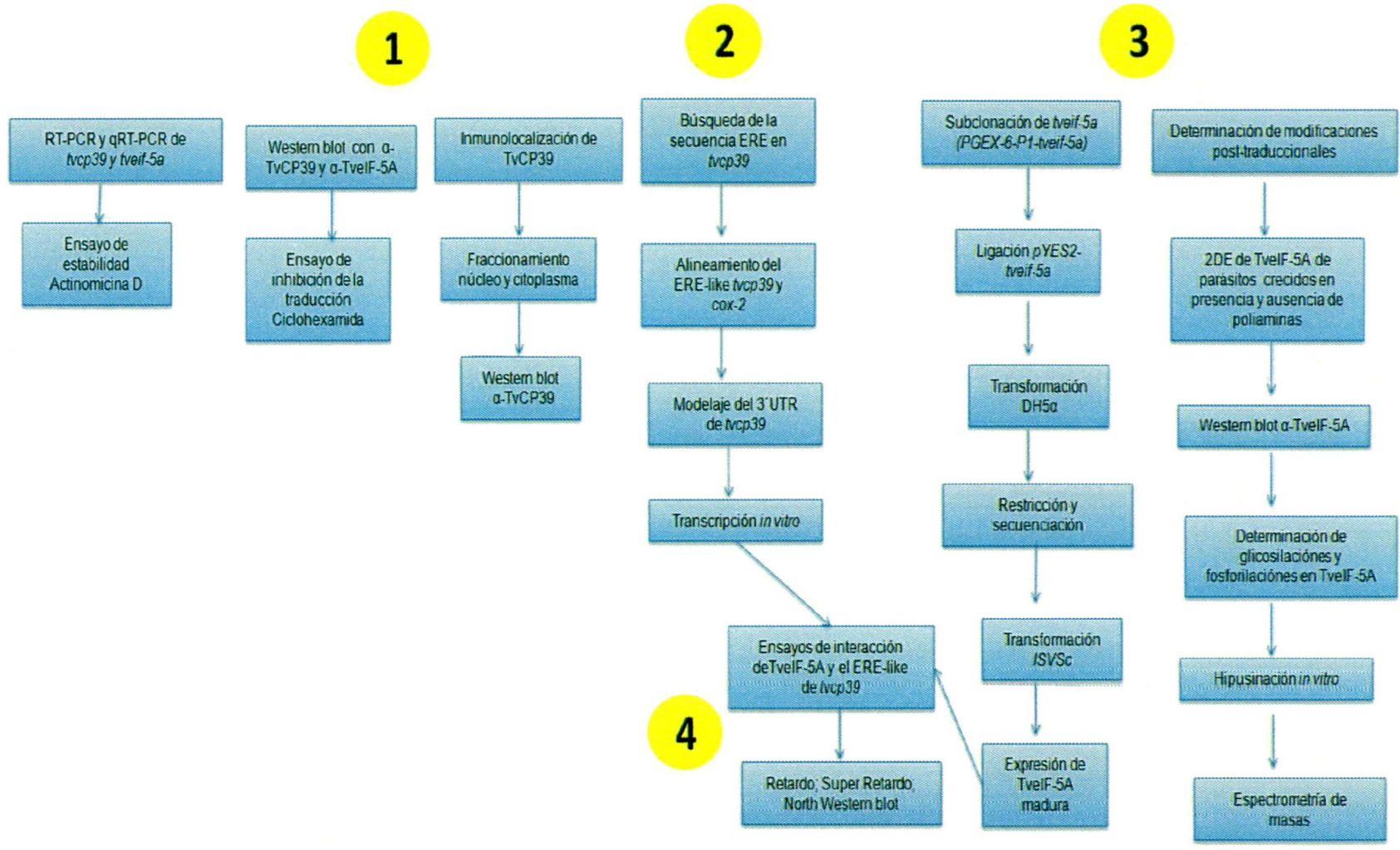
V. Objetivos

Objetivo general

Determinar la interacción de la proteína TveIF-5A con la secuencia ERE situada en el extremo 3'UTR del RNAm del gen *tvcp39*.

Objetivos particulares

1. Determinar la estabilidad del RNAm de *tvcp39* y *tveif-5a* en presencia y ausencia de poliaminas.
2. Identificar a las posibles secuencias EREs del RNAm de *tvcp39* de *T. vaginalis*.
3. Obtener a la proteína TveIF-5A madura de *T. vaginalis* y analizar las posibles modificaciones post-traduccionales en las diferentes condiciones de poliaminas.
4. Determinar la unión de TveIF-5A a las secuencias EREs en el extremo 3'UTR del RNAm de *tvcp39*.



VI. Estrategia experimental.

VII. Metodología.

5.1 Análisis *in silico* de las secuencias tipo ERE like en genes de *T. vaginalis*

Para analizar los RNAm de genes de *T. vaginalis* que pudieran presentar la secuencia consenso ERE se realizó una búsqueda dentro del genoma de *T. vaginalis* en la base de datos trichDB (<http://trichdb.org/trichdb/>). Los ETS obtenidos se analizaron en el extremo 3'UTR para localizar la secuencia AAAUGU o UAACCA, los cuales se encuentran río arriba del sitio de corte y poliadenilación previamente descrito (Espinosa y col., 2002). Posteriormente, se realizó un alineamiento múltiple tomando 10 pb río arriba y 10 pb río abajo del codón de término de la traducción usando el programa Clustal W.

También se caracterizó la estructura tipo ERE en el 3'UTR del RNAm del gen *tvcp39*, previamente clonado y secuenciado (Ramon-Luing y col., 2011).

Posteriormente, cada una de las secuencias se analizaron con el programa "RNA fold" para analizar la estructura tallo-burbuja y determinar el valor de ΔG , ambos parámetros se han reportado como una de las características de elementos regulatorios.

Como control para corroborar la formación de la estructura secundaria de estos RNAm, se usaron diferentes tamaños de estas secuencias, para analizar la estructura tallo-burbuja (100 pb, 50 pb, 25 pb, 15 pb y 10 pb). De estas secuencias se diseñaron sondas complementarias del extremo 3'UTR del gen *cox2*, *tvcp39*, *D-loop* e *IRE-FER*

reportados con un tamaño 26 pb (Parker y col., 2002), usando la secuencia del promotor T7 del fago lamda para la transcripción *in vitro*.

5.2. Extracción del DNA genómico de *T. vaginalis*.

Parásitos del aislado CNCD 147 de *T. vaginalis* se cultivaron en medio TYM (triptona- extracto de levadura-maltosa) con 10% de suero de caballo (SC) inactivado por calor (30 min a 56 °C) por 24 h a 37 °C para obtener parásitos en fase logarítmica de crecimiento con un inóculo de 2×10^6 , en botellas de cultivo de 25 cm² con 30 ml de TYM-SC. Para cultivos masivos se inocularon 8×10^6 o 35×10^6 tricomonas en botellas de cultivos de 75 cm² conteniendo 100 ml de TYM-SC, considerando que su duplicación es cada 6 horas se colocó el inóculo inicial.

Para la extracción de DNAg se lavaron los parásitos 3 veces con PBS pH 7, centrifugando por 5 min a 1800 rpm. Los parásitos se contaron en una cámara de Neubauer para obtener la cantidad de 20×10^6 parásitos. Para la extracción de DNA se utilizó el Kit WIZARD GENOMIC (Quiagen):

A 20×10^6 parásitos se les adicionó 600 µl de solución de lisis y se resuspendieron, después, se adicionó 3 µl de solución RNAsa, se mezcló por inversión 5 veces y se incubó la mezcla 30 min a 37 °C. Transcurrido el tiempo se dejó enfriar 5 min a T.A y después de este tiempo se adicionó 200 µl de solución de precipitación de proteínas, se vortexeó 20 s e inmediatamente se colocaron las muestras en hielo por 5 min, después se centrifugaron 4 min a 14,000 rpm, el sobrenadante que contenía el DNA se removió a un tubo de 1.5 ml estéril y limpio, posteriormente se agregó

isopropanol a T.A y se invirtió el tubo hasta ver las hebras de DNA. Posteriormente, el DNA se centrifugó 5 min a 14,000 rpm, se decantó y agregó etanol al 70%, se invirtió por gravedad para lavar el DNA y centrifugó 1 min a T. A a 14,000 rpm. El etanol se aspiró con una pipeta pasteur estéril y se dejó secar por 15 min. Luego se adicionó 100 μ l de solución rehidratante (agua libre de nucleasas) y se incubó 1 h a 65 °C. La integridad del DNA se corroboró mediante una electroforesis en gel de agarosa al 0.8%, teñido con bromuro de etidio.

5.3. Extracción y purificación de RNA total.

A 20×10^6 parásitos se les adicionó 1 ml de trizol, los tubos se mezclaron por inversión y se incubaron 10 min a T.A y 30 min a 4°C. Posteriormente, se adicionó 200 μ l de cloroformo, se mezcló por 15 s a T.A y se centrifugó 15 min a 4°C a 10,000 rpm. La fase acuosa se recuperó y se adicionó 0.5 ml de isopropanol por cada 1 ml de trizol, se mezcló e incubó 15 min a T.A y se centrifugó 15 min a 4°C a 10,000 rpm. Posteriormente, se descartó el sobrenadante y las pastillas se lavaron 2 veces con etanol al 75% en agua DEPC, se centrifugó por 5 min a 4 °C a 10,000 rpm y se dejaron secar a T.A. Al final, la pastilla se resuspendió en 20 μ l de agua DEPC. La cuantificación se realizó por espectrofotometría a 260/280 nm y la calidad del RNA total se verificó mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1 % teñido con bromuro de etidio.

5.4. Síntesis de cDNA.

El RNA total de parásitos crecidos en presencia o ausencia de DAB se resuspendió en un volumen de 20 µl de H₂O-DEPC estéril y se cuantificó por espectrofotometría 260/280 nm. A partir de 1 µg de RNA total se sintetizó cDNA, para ello se adicionó 1 µl de oligo dT y agua DEPC cbp 12 µl, se incubó 15 min a 70 °C. Después, se colocó en hielo 5 min y se adicionó 4 µl de amortiguador 5 ×, 2 µl de dNTPs y 2 µl de DTT, se incubó 2 min a 42 °C. Posteriormente, se colocó rápidamente en hielo y se adicionó la retrotranscriptasa reversa (Superscrip II Invitrogen), se incubó 50 min a 42 °C, pasado el tiempo se inactivó la enzima retrotranscriptasa reversa 10 min a 70 °C. Los cDNAs se cuantificaron por espectrofotometría a 260-280 nm y se tomó 1µg de cDNA de cada condición con el cual se amplificó un fragmento específico de *tvcp39* usando los iniciadores específicos sentido 5'ACAGGCAACATGTTTACAGGCGAAGAG 3' y antisentido 5'CTTTTATATAGTTTATTTGTCTGTTGGGATGCA 3' de cuya amplificación se obtuvo un producto de 219 pb (Ramon-Luing y col., 2011). Como control de carga se usó el gen *β-tubulina*, utilizando los siguientes iniciadores: BTUB9 (5'-CATTGATAACGAAGCTCCTTTACGAT-3') y BTUB2 (5'-GCATGTTGTGCCGGACATAACCAT-3') (León-Sicairos y col., 2004).

Programa para obtener el amplicón de *tvcp39*

94 °C 2 min 1 ciclo
94 °C 1 min }
55 °C 1 min } 25 ciclos
72 °C 30 seg }
72 °C 7 min 1 ciclo

Programa para obtener el amplicón de β - *tubulina*

94 °C 2 min 1 ciclo
94 °C 1 min }
48 °C 1 min } 25 ciclos
72 °C 30 seg }
72 °C 7 min 1 ciclo

5.5. Clonación en PCR 2.1 TOPO Cloning (Invitrogen).

Para la clonación en el vector PCR 2.1 TOPO Cloning (Invitrogen), se tomaron 4 μ l de la reacción de PCR, 1 μ l del vector, 0.5 μ l de H₂O, 1 μ l de sales (que contiene Mg²⁺) contenidas en el kit del vector y la mezcla se incubó por 5 min a T.A. Posteriormente, se transformaron células DH5 α (*E. coli* TOP 10) con 4 μ l de la mezcla de ligación, se incubó 30 min en hielo. Posteriormente, se les dio un choque térmico (30 s a 42°C),

inmediatamente se pasaron en hielo, después se agregaron 250 µl de medio SOC y se incubaron en agitación 1 h a 37 °C a 200 rpm. Enseguida 100 µl de células transformadas se plaqueó en cajas con medio LB + ampicilina (100 mg a ml), se incubaron 18 h a 37°C. Como control se realizó la transformación sin el producto de PCR.

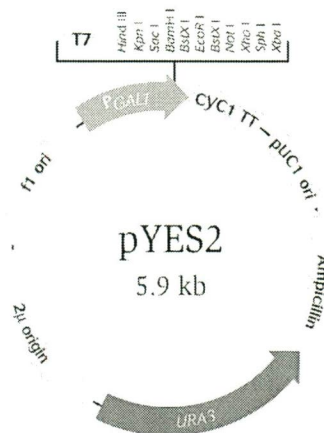
5.6. Análisis *in silico*.

Para analizar si TvelF-5A sufre la modificación post-traducciona de hipusinación se realizó una búsqueda *in silico* de los genes que codifican para las enzimas participantes en esta modificación.

Mediante el uso de herramientas bioinformáticas, se realizó una búsqueda del gen *dohh* y *dhs* en diferentes organismos, usando la base de datos Genebank (<http://www.ncbi.gov>), con las secuencias obtenidas de nucleótidos se realizó la conversión a aminoácidos y se realizó un BLAST con parámetros estándar y secuencias no redundantes, para la obtención de proteínas de un amplio grupo de organismos como parásitos, levaduras, hongos, mamíferos y plantas. Para definir dominios conservados en la enzima DHS de los diversos organismos analizados, se realizó un alineamiento múltiple con el programa CLUSTALW (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2>) y la edición con el programa Boxshade (<http://www.ch.embnet.org/software/>). La secuencia consenso se utilizó como sonda, para hacer la búsqueda de las enzimas DOHH y DHS en la base de datos TrichoDB, mediante un BLAST.

5.7. Clonación en *pYES2*.

Para obtener a la proteína TveIF-5A madura se realizó la subclonación del gen *tveif-5a* en el vector de expresión en levadura *pYES2*, el cual utiliza el promotor GAL1. El plásmido se digirió con las enzimas *Bam*HI y *Xho*I, para su linearización. Para evitar la religación del plásmido se adicionaron 0.5 μ l de fosfatasa alcalina (PSA New England-BioLabs) y se incubó 30 min a 37°C, la reacción se corrió en un gel de agarosa al 1% con TAE 1x a 70 V; la banda se purificó siguiendo el protocolo del kit QIAEXII.



Mapa del plásmido *pYES2* con un tamaño de 5.9 kb, indicando el sitio de corte y el promotor GAL1.

5.8. Purificación de productos en gel QIAEXII (QIAGEN).

El plásmido *pYES2* linearizado con las enzimas *BamHI* y *XhoI* se analizó en un gel de agarosa al 1% con TAE 1x a 70 V; la banda del plásmido linearizado se cortó del gel y se purificó siguiendo el protocolo del kit QIAEXII.

Para purificar los productos obtenidos en un gel de agarosa se cortó la banda deseada y se pesó un tubo Eppendorf estéril y nuevo, se adicionó el amortiguador QXI en proporción al peso de la banda cortada (por ejemplo, 1200 μ L son utilizados para 0.090 g). Posteriormente, se adicionó 10 μ l de la resina y se incubó la mezcla 10 min a 55 °C, la mezcla se vortexeó cada 5 min hasta que la agarosa se disolvió. Ya disuelta la agarosa, la mezcla, se vortexeó vigorosamente y se centrifugó 1 min a 13,000 rpm, el sobrenadante se decantó y se adicionó 500 μ l del amortiguador de lavado (QXI) para lavar la pastilla. Posteriormente, la pastilla se resuspendió y centrifugó 1 min a 13000 rpm. El sobrenadante se decantó y se adicionó 500 μ L del amortiguador de lavado PE (adicionado con etanol), la pastilla se resuspendió y se centrifugó 1 min a 13,000 rpm, el sobrenadante se decantó y la pastilla se dejó secar al aire libre, después se resuspendió en 20 μ l de agua inyectable y se incubó 5 min a 60 °C. Este paso se repitió 3 veces.

5.9. Reacción de ligación.

Para la reacción de ligación se utilizó una relación 1:10 (plásmido-inserto) con la enzima T4 ligasa, amortiguador de la T4 ligasa y agua estéril; el control de la reacción

de ligación se realizó con DNA plasmídico, T4 ligasa, amortiguador de la T4 ligasa y agua estéril para el control 1; para el control 2, se adicionó a la reacción DNA plasmídico, amortiguador de la T4 ligasa y agua. Las reacciones se incubaron O.N a 16 °C. Al día siguiente se realizó la transformación del plásmido en células DH5α *E. coli* con un shock térmico de 42 °C por 90s las células se recuperaron a 37 °C en medio Luria Broth.

5.10. Miniprep por lisis alcalina.

Para obtener el DNA plasmídico se cultivaron las clonas candidatas en 5 ml de medio LB-ampicilina, posteriormente se incubó 37 °C a 200 rpm a O.N. Brevemente, la extracción del DNA plasmídico del cultivo de bacterias (miniprep):

Primero, se realizó el empastillado de las células por centrifugación 2 min a 15,000 rpm, posteriormente, se decantó el sobrenadante y la pastilla se resuspendió en 100 µl de la solución I fría, se agitó hasta resuspender la pastilla. Enseguida, se agregó 200 µl de la solución II recién preparada y se mezcló suavemente por inversión, después se agregó 150 µl de solución III fría, se invirtió y se incubó en hielo durante 5 min, pasado el tiempo se centrifugó 5 min a 4°C a 15,000 rpm. El sobrenadante se transfirió a un tubo limpio y se agregó un volumen 1:1 de fenol: cloroformo, se agitó y centrifugó como el paso anterior. La fracción soluble se transfirió a un tubo limpio, y se agregaron 2 volúmenes de etanol al 100% a 4°C, se precipitó por 2 h a 20 °C, se centrifugó 20 min a 4 °C a 15,000 rpm. La pastilla obtenida se lavó 3 veces con etanol al 70% a 4°C, se secó a T.A y se resuspendió en 50 µl de agua inyectable, se verificó en

un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio. Posteriormente, el DNA plasmídico se digirió con las enzimas *BamHI* y *XhoI* para la liberación del inserto, se utilizó 1 unidad de enzima por cada 1 µg de DNA plasmídico. El DNA plasmídico que contenía el inserto se secuenció utilizando 400 ng.

5.11. Cultivo de *Sacharomyces cerevisiae*

Las células de levadura se crecieron bajo condiciones aeróbicas en 100 ml de medio YPD (1.0% de extracto de levadura, 2.0% de polipeptona, 2.0 % de glucosa, pH 5.3) en un frasco de 500 ml (Sakaguchi) a 30 °C en agitación a 140 rpm. Para determinar la fase logarítmica se midió la densidad óptica a 610 nm, a las 4 y 8 h de incubación.

5.12. Competentes de *Sacharomyces cerevisiae*

El cultivo de *S. cerevisiae* en fase logarítmica, se centrifugó 5 min a 1000 g, se decantó el sobrenadante y a la pastilla se le adicionó amortiguador TE hasta resuspender la pastilla; posteriormente, se contaron las levaduras para tener 2×10^8 por ml. En 0.5 ml de la suspensión celular se adicionó un volumen igual de amortiguador TE en una solución de iones metálicos 0.2 M y se incubó 30°C a 140 rpm de agitación. Aproximadamente, 0.1 ml del cultivo se colocó en un tubo Eppendorff de 1.5 ml y se adicionó 670 µg de DNA plasmídico previamente ligado con el gen *tveif-5a*,

se incubó 30 min a 30°C, un volumen igual de polietilén glicol al 70% (PEG)-4000 estéril se adicionó al cultivo mezclando por vortex y se incubó 30°C a 1 h. Posteriormente, el tubo Eppendorff se sumergió en un baño a 42°C a 5 min e inmediatamente se enfrió a T.A. Aproximadamente 0.1 ml de la suspensión celular se sembró en agar que contiene 0.7% de nitrógeno base para levadura, 2.0% de glucosa, 50 µg de amino ácidos por ml, 40 g de sulfato de adenina por ml. Las cajas se incubaron a 30 °C de 2 a 4 días, las colonias crecidas se contaron.

5.13. Inducción de la proteína recombinante

Una sola colonia de las células INVSC1 conteniendo la construcción *pYES2-tveif5a* se inoculó en 15 ml de medio YPD O.N a 33°C a 200 rpm. Al día siguiente se determinó la densidad óptica y se centrifugó el cultivo 5 min a 4 °C a 1500 g, el sobrenadante se desechó y la pastilla se resuspendió en 2 ml de medio YPD. Posteriormente, se inoculó en 50 ml de medio YPD e incubó 4 h a 30 °C adicionando 1 M de galactosa al medio, se tomaron muestras a las 0, 2 y 4 h. Posteriormente, se centrifugó el cultivo 5 min a 1500 g y se analizó el sobrenadante y la pastilla en geles SDS-PAGE. Por otra parte, para realizar el lisado celular se adicionó 500 µl de amortiguador de lisis y se centrifugó 5 min a 4°C a 1500 g. El sobrenadante se removió y se adicionó amortiguador de carga 2×, por otra parte a la pastilla se le adicionó amortiguador de carga 1× y se analizaron en geles SDS-PAGE al 13%.

5.14. Western blot de la proteína recombinante

La proteína recombinante se corrió en un gel SDS-PAGE al 13%, un gel idéntico se transfirió a una membrana de nitrocelulosa utilizando amortiguador de transferencia (Tris-base 25 mM, glicina 40 mM, SDS 0.05 %, metanol 20 %). La transferencia se realizó a 100 V a 1 h. La membrana de nitrocelulosa se tiñó con rojo de Ponceaou para verificar la transferencia. Posteriormente, la membrana se lavó 3 veces con PBS pH 7.0 y se bloqueó con PBS-Tween 0.1% con leche al 5 % a O.N a 4°C, al día siguiente se incubó con el anticuerpo anti-péptido (anti-TveIF-5A) usando una dilución 1:60 000 en agitación constante 4°C a O.N. Al día siguiente la membrana se lavó 5 veces por 10 min con PBS pH 7.0-Tween 20 al 0.1%. Posteriormente, se incubó con el segundo anticuerpo anti-ratón conjugado a peroxidasa de rabano picante (HRP) utilizando una dilución 1:3000 por 1 h. Finalmente, se realizaron 10 lavados por 10 min con PBS pH 7.0-Tween 20 al 0.1%, y se reveló por quimioluminiscencia utilizando placas autoradiograficas (KODAK).

5.15. Transcripción *in vitro*

Las secuencias del 3'UTR de *tvcp39*, *cox-2*, *D-loop* y el 5'UTR del *IRE-fer* se usaron como molde para realizar la amplificación por PCR y el amplicón se usó para llevar a cabo la transcripción *in vitro*.

Antes de comenzar el experimento se descongeló en hielo los nucleótidos: ATP, CTP, GTP, UTP (sin marca), UTP (biotinilado), Amortiguador 10× (MEGAscript Kit Ambion) y los productos de PCR de *tvcp39*, *cox-2*, *D-loop*, *IRE-FER* (DNA).

Para la transcripción se preparó la mezcla en el siguiente orden: Amortiguador 10x 2 µl, ATP 2 µl, GTP 2 µl, CTP 2 µl, UTP (sin marca) 1.5 µl, UTP (biotinilado) 0.5 µl, DNA (producto de PCR) 8 µl, Enzima T7 Mix 2 µl. La mezcla preparada se incubó a 37 °C durante 4 h. Posteriormente, se adicionó a cada mezcla 1 µl de DNasa y se incubó a 37 °C durante 20 min. Terminado el tiempo de incubación se precipitó el RNA con:

15 µl de acetato de sodio

115 µl de H₂O del kit Ambion

300 µl de etanol grado biología molecular

La precipitación se mezcló por inversión leve y se dejó precipitar ON a -70 °C. Al día siguiente la cámara de electroforesis se trató con benzal, con el fin de evitar la degradación del RNA y se preparó un gel de agarosa al 3 % con TBE 1× y H₂O DEPC y como amortiguador de corrida se usó TBE 0.5× H₂O DEPC. Las muestras se colocaron en hielo hasta su descongelación, se centrifugaron 20 min a 4 °C a 13,000 rpm, el sobrenadante se decantó y las pastillas del RNA se secaron a T.A. Cada muestra de RNA se resuspendió en 20 µl de H₂O libre de RNAsas. Las muestras se desnaturalizaron (RNA de hebra simple) a 65 °C x 15 min (hotplate) y se dejó enfriar a temperatura ambiente (T.A) por 10 min, pasado el tiempo las muestras se colocaron a -20°C (Calla-Choque, 2011, tesis de Doctorado; Torres-Romero y col., 2011, en revisión).

5.16. Ensayo de Retardo

Para determinar si la proteína TveIF-5A de *T. vaginalis* es capaz de unirse al extremo 3'UTR del RNAm de *tvcp39* se realizaron ensayos de movilidad electroforética (EMSA).

Antes de comenzar el experimento se descongelaron los siguientes reactivos: RNA *tvcp39*, *cox2*, *D-loop*, *IRE-FER*, amortiguador de unión BB5×, tRNA (5 mg/ml), DEPC, heparina (0.02 g/400 µl), H₂O inyectable, amortiguador de muestra para EMSA (Kit Ambion), extractos citoplasmáticos de *T. vaginalis* y HeLa, TveIF-5A recombinante madura, TveIF-5A recombinante precursora.

La concentración de proteínas fue considerada como 13.8 µg/µl para TveIF-5A recombinante madura y 50.2 µg/µl para TveIF-5A recombinante precursora.

Las mezclas se incubaron 10 min a T.A, pasado el tiempo de incubación se adicionaron las sondas según correspondió el caso en una concentración de ~300 ng y cada mezcla se incubó durante 25 min a 4 °C. Transcurrido el tiempo de incubación se adicionó 1.3 µl de heparina (100 mg/ml) a cada muestra y se incubaron por 10 min a T.A, enseguida, se adicionó 2 µl de amortiguador de muestra EMSA (“amortiguador de carga” del kit Ambion) a cada tubo. Las muestras fueron analizadas en geles de agarosa al 1.25 %. La electroforesis se realizó en una cámara vertical, previamente tratada con benzal, a 100 V durante 1:30 h en amortiguador TBE 0.5× pH 7.5. Terminada la electroforesis el gel fue puesto en un recipiente cubierto con aluminio e incubado con una solución de Syber green (1: 10 000) O.N. a 4°C sin agitación. Al día siguiente los geles se visualizaron en el fotodocumentador con el software QuantityOne

(Biorad) usando luz UV (Torres-Romero, 2011, tesis de Doctorado; Calla-Choque, 2011, tesis de Doctorado; Torres-Romero y col., 2011, en revisión).

5.17 Ensayos de Retardo con extractos citoplasmáticos.

La reacción se llevó a cabo en un volumen total de 20 μ l en el amortiguador de unión en presencia de 10 μ g de proteínas totales, como control la TveIF-5Ar en condiciones nativas, posteriormente se adicionó la sonda biotinilada del ERE, se incubó por 15 min a 4°C. Como control se usó la proteína recombinante TveIF-5Ap y se realizaron competencias inespecíficas usando una sonda biotinilada no relacionada. Los complejos RNA-proteína se corrieron en geles de agarosa al 3% con TBS 1 \times para DNA. El gel se tiñó con Syber Green usando una dilución 1:15 000, ON a 4°C sin agitación, al día siguiente se visualizó en el fotodocumentador (Torres-Romero., 2011, tesis de Doctorado; Calla-Choque., 2011, tesis de Doctorado; Torres-Romero y col., 2011, en revisión).

5.18 Super retardo

La proteína recombinante TveIF-5A se incubó 5 min a 4 °C en amortiguador de interacción 1 \times (HEPES 125 mM pH 7.6, CH₃COOK 750 mM, MgCl₂ 7.5 mM, glicerol al 5%) en presencia de 40 U de inhibidor de RNAsas (Promega). Luego, la proteína interaccionó con el RNAm conteniendo las estructuras EREs de *cox-2* o *tvcp39*; 30 min

a 4°C por separado. Posteriormente, la mezcla se analizó en un gel de agarosa al 1.3% durante 1 h 30 min a 100 volts. Para corroborar la unión de la proteína TveIF-5A a las secuencias EREs, se utilizó el anticuerpo α -TveIF-5Ar, se adicionó a la mezcla, 1 μ g de α -TveIF-5Ar y se incubó por 25 min a T.A, posteriormente se corrieron en geles de agarosa al 1.3%. El gel se tiñó con Syber Green usando una dilución 1:15 000, ON a 4°C sin agitación, al día siguiente se visualizó en el fotodocumentador (Calla-Choque., 2011, tesis de Doctorado; Torres-Romero y col., 2011, en revisión).

5.19 Ensayo de North Western blot

Membranas de nitrocelulosa con extracto total de proteínas de *T. vaginalis* crecidas en presencia y ausencia de poliaminas corridas en 2 D, se lavaron con el amortiguador BB (Hepes 10 mM pH 7.6, MgCl₂ 3 mM, KCl 40 mM, DTT 1 mM, NP-40 al 0.2%, PMSF 1 mM, disuelto en etanol grado reactivo, con 20 μ g/ml de tRNA por 1 h a 30°C. Posteriormente, a las membranas se les adicionó la sonda biotinilada del ERE *tvcp39* usando ~2 μ g. Después, se lavaron las membranas 3 veces con el amortiguador BB por 10 min a T.A, terminado los lavados se continuó lavando con el amortiguador B (Tris-HCl 10 mM pH 7.5, NaCl 50 mM) 3 veces por 7 min a T.A. Posteriormente, la membrana se bloqueó con amortiguador STMT (NaCl 1M, Tris-HCl 0.1M pH 7.5, MgCl₂ 2mM, Tritón X-100 0.05%) junto con albúmina de suero bovino (BSA) al 3%, 30 min a 37°C, después se adicionó la estreptavidina-HRP (μ g/ μ l) en una dilución 1: 15 000 y se incubó durante 1 h a T.A. en agitación suave, terminada la incubación las membranas

se lavaron 3 veces con el amortiguador STMT a 7 min a T.A, posteriormente se reveló por quimioluminiscencia usando el reactivo ECL (Calla-Choque, 2011, tesis de Doctorado; Torres-Romero y col., 2011, en revisión).

5.20 Ensayo de estabilidad del RNAm

Tricomonas cultivadas en presencia y ausencia de DAB se les trató con actinomicina D como un inhibidor de la transcripción, posteriormente se realizó la extracción del RNA total a diferentes tiempos 0, 1, 2, 4, 6, 8, 12 y 24 h. La expresión de los genes *tvcp39*, *tveif-5a* y β -*tubulina* se midió por RT-PCR, la intensidad de las bandas en geles teñidos con bromuro de etidio se cuantificó mediante un análisis densitométrico usando el software Gel Doc XR PC (BioRad). Los pixeles del transcrito de β -*tubulina* de las tricomonas cultivada con y sin el inhibidor DAB (t_0) en presencia de actinomicina se tomaron como el 100% en cada condición. Los niveles de RNAm se normalizaron con respecto a la cantidad de β -*tubulina* en cada condición. Experimentalmente la vida media del RNAm de *tvcp39* y *tveif-5a* (tiempo en el cual el 50% de las moléculas de RNAm permanecen intactas) se determinó considerando las cantidades del RNAm de *tvcp39* y *tveif-5a* a diferentes tiempos sobre una escala semilogarítmica. La vida media teóricamente de los RNAm de *tvcp39* y *tveif-5a* se obtuvo usando la ecuación de decaimiento $t_{1/2} = \ln 2/k$, donde k corresponde a la constante de decaimiento (López-Camarillo y col., 2003; Leon-Sicairos 2007, Tesis de Doctorado; Leon-Sicairos y col., 2011, en revisión).

5.21 Electroforesis en doble dimensión (2D)

Para hidratar las tiras IPG se utilizaron 180×10^6 parásitos y se lavaron 3 veces con PBS pH 7.0, posteriormente los parásitos se lisaron con 200 μ l de amortiguador de hidratación (CHAPS al 4% w/v de 0.02 g, Urea 7 M pesar 0.21 g, DTT-35 μ l de la solución stock 1M) y se adicionó 3 μ l de anfolinas. Los lisados se incubaron a T.A durante 5 min y se centrifugaron a 5 min a 4°C a 13000 rpm, se tomó una alícuota de 125 μ l del lisado para hidratar las tiras IPG de 4-7. Posteriormente, se realizó la hidratación pasiva por 16 h sin mover la placa. Al día siguiente se realizó el isoelectroenfoque utilizando el siguiente programa:

Paso 1:	Paso2	Paso 3
250v [lineal]	4000v [lineal]	4000v [Rápido]
HRS:MIN	HRS:MIN	VHORS
ENTER TIME: 00:40	ENTER TIME 03:00	ENTER TIME: 10,000.

Una vez terminado el isoelectroenfoque se equilibraron las tiras IPG con 5 ml del amortiguador de equilibrio que contenía 15 mg/ml de DTT por 15 min y para el segundo lavado se tomaron 5 ml del amortiguador de equilibrio y se le adicionó 37.5 mg/ml de yodoacetamida (IAA) por 15 min. Una vez rehidratada la tira de IPG se corrió la segunda dimensión en un gel SDS-PAGE al 15%, el cual se corrió a 100 V a 1 h 30 min, posteriormente el gel se tiñó con plata y un gel duplicado corrido bajo las mismas condiciones se transfirió a una membrana de nitrocelulosa.

5.22 Western blot en diferentes condiciones de poliaminas.

Parásitos (20×10^6) cultivados en presencia y ausencia de poliaminas se centrifugaron a 1800 rpm a 5 min a 4 °C, la pastilla se lavó 5 veces con PBS pH 7.0 y se adicionó 900 μ l de PBS pH 7.0 y 100 μ l de ácido tricloroacético al 100% (TCA) y se dejaron O.N. a 4°C. Al día siguiente las pastillas se lavaron con PBS pH 7.0, 5 veces centrifugando 4 °C a 1800 rpm en cada lavado. En el último lavado se descartó el sobrenadante y se limpiaron las paredes de los tubos con un algodón sin tocar las pastillas, las pastillas se resuspendieron en 400 μ l de amortiguador de carga 1 \times y se hirvieron por 3 min. Las muestras se corrieron en dos geles de poliacrilamida al 13% a 100 V a 1 h a T.A, transcurrido este tiempo uno de los geles se tiñó con azul de Coomasie brillante, los geles duplicados se transfirieron a membranas de nitrocelulosa para realizar ensayos de Western blot. Las membranas se tiñeron con rojo de Ponceau para verificar la transferencia de las proteínas, se lavaron con PBS pH 7.0 y se bloquearon con PBS-Tween 20 al 0.1% con leche al 5 % a 4 °C a O.N. Al día siguiente las membranas se lavaron con PBS pH 7.0-Tween 20 al 0.1% y se incubaron con el anticuerpo α -péptido (TvelF-5A) en una dilución 1:16 000, en agitación O.N. a 4 °C. Al día siguiente las membranas se lavaron 5 veces por 10 min con PBS pH 7.0-Tween 20 al 0.1% y se incubaron con el segundo anticuerpo cabra anti-ratón conjugado a HRP en una dilución 1:3000 y se incubaron 1 h en agitación, pasado el tiempo se realizaron 10 lavados por 10 min con PBS pH 7.0-Tween 20 al 0.1% y se reveló por quimioluminiscencia utilizando el kit ECL (Amersham Bioscience). Como control de carga se usó el

anticuerpo α -tubulina en una dilución 1: 100, ambos anticuerpos se incubaron al mismo tiempo.

5.23. Cromatografía de afinidad a GST

La pastilla de bacterias obtenida de la inducción con IPTG 1 mM, se resuspendió en amortiguador de unión a GST (5 ml/ μ g) y se adicionó lisozima (100 μ g/ml) 30 min a 37 °C a 200 rpm. Posteriormente, se sonicó la muestra utilizando las siguientes condiciones:

- 2 min
- 20 s on / 20s off
- 70 % de amplitud

La muestra se centrifugó a 15 min a 4°C a 13 000 rpm, el sobrenadante se filtró usando una membrana de 0.22 μ m. El sobrenadante se inyectó en el cromatógrafo utilizando los siguientes parámetros:

- Válvula A amortiguador de unión
- Válvula B amortiguador de elución
- Flujo isocrático A: 3 ml (500 μ l / min)
- Gradiente amortiguador A 100% - 0%
- Gradiente amortiguador B 0% - 100%
- Flujo isocrático B: 3 ml (500 μ l / min)

Previamente la columna pre-empacada (GE Healthcare) se equilibró con agua desgasificada utilizando un flujo de 500 μ l / min. Posteriormente, la columna se equilibrio

con el amortiguador de unión con un flujo de 500 μl / min. La muestra se paso por la columna con un flujo de 100 μl / min. Posteriormente, se pasaron 3 volúmenes del amortiguador de unión con un flujo de 500 μl / min y la proteína TveIF-5A recombinante se eluyó con el amortiguador de elución que contiene glutatión reducido utilizando un flujo de 100 μl / min.

5.24. Cromatografía de intercambio iónico

La muestra del lisado celular de la clona de *S. cerevisiae* se centrifugó 15 min a 4°C a 13 000 rpm, el sobrenadante se filtró usando una membrana de 0.22 μm y se inyectó en el cromatógrafo utilizando los siguientes parámetros:

- Válvula A amortiguador de unión
- Válvula B amortiguador de elución
- Flujo isocrático A: 3 ml (500 μl / min)
- Gradiente amortiguador A 100% - 0%
- Gradiente amortiguador B 0% - 100%
- Flujo isocrático B: 3 ml (500 μl / min)

Previamente, la columna pre-empacada (Bio-Rad) se equilibró con agua desgasificada utilizando un flujo de 500 μl / min. Posteriormente la columna se equilibró con el amortiguador de unión con un flujo de 500 μl / min. La muestra se paso por la columna con un flujo de 100 μl / min. Posteriormente se pasaron 3 volúmenes del

amortiguador de unión con un flujo de 500 μl / min y la proteína TveIF-5A se eluyó con el amortiguador de elución utilizando un flujo de 100 μl / min.

5.25. qPCR cuantitativo por Tiempo Real

Para la realización de PCR cuantitativo por tiempo real, se analizó la intensidad de las bandas de los productos de RT-PCR por densitometría del gen control *β -tubulina*, *tveif-5a* y *tvcp39* utilizando el programa Quantity One (Bio Rad), con los datos obtenidos se obtuvo el número de copias / μl , con este se realizaron diluciones de 1×10^{10} hasta 1×10^2 para la curva estándar. Posteriormente, se cargó 1 μl de cada una de las diluciones por triplicado así como 1 μl del cDNA también por triplicado y se analizó por el Software Detection Sequences (versión 1.3) (Applied Biosystem).

Para el control de *β -tubulina* se realizó la siguiente reacción:

12.5 μl de SYBER green (Invitrogen)

1 μL de oligonucleótido BTUB 9

1 μl de oligonucleótido BTUB2

9.5 μl de agua DEPC

El programa de ciclaje que se siguió fue:

90°C	15 min] 25 ciclos	1 ciclo
95°C	30 s		
48°C	30 s		
72°C	30 s		

Para realizar PCR tiempo real del gen *tveif-5a* se utilizaron los siguientes iniciadores: sentido 5' TTTGTTGACCGTTCCGATTATG 3' tm 58 y antisentido 5' TTGCCCTCTGGTGGGAAGATC 3' tm 59

Para el gen *tveif-5a* se utilizó la siguiente reacción:

12.5 µl de SYBER green (Invitrogen)

1 µl de oligonucleótido TRSeIF-5A

1 µl de oligonucleótido TRASeIF-5A

9.5 µl de agua DEPC

Programa de ciclaje que se siguió fue:

90°C	15 min	1 ciclo
95°C	30 s] 25 ciclos
58°C	30 s	
72°C	30 s	

Para realizar PCR tiempo real del gen *tvcp39* se diseñaron los iniciadores, utilizando el programa Sequence Detection Software (version 1.3) (Applied Biosystem), los cuales se muestran a continuación:

Sentido

5' TTTGTTGACCGTTCCGATTATG 3'

Antisentido

5' TTGCCCTCTGGTGGGAAGATC 3'

90°C	15 min] 40 ciclos	1 ciclo
95°C	30 s		
58°C	30 s		
72°C	30 s		

El análisis de los datos se realizó en el programa Prisma por el método de Bonferroni y se graficaron los resultados usando el programa Sigmaplot. Los valores obtenidos del gen *tveif-5a* y *tvcp39* se normalizaron con los valores del gen de β -*tubulina*.

5.26 Ensayo de estabilidad del TveIF-5A con cicloheximida

Tricomonas cultivadas en presencia y ausencia de DAB se les trató con cicloheximida como un inhibidor de la traducción. Posteriormente se realizó la precipitación de proteínas totales por TCA y la extracción del RNA total a diferentes tiempos 0, 1, 2, 4, 6, 8, 12 y 24 h. Los extractos de proteínas totales de los parásitos crecidos en presencia y ausencia de poliaminas tratados con cicloheximida se analizaron en geles SDS-PAGE al 15%, los geles duplicados se transfirieron a membranas de nitrocelulosa y se trataron como se describió previamente. Las membranas se incubaron con el anticuerpo α -péptido (TveIF-5A) en una dilución 1:16 000, en agitación O.N. a 4 °C se lavaron y se incubaron con el segundo anticuerpo cabra anti-ratón conjugado a HRP en una dilución 1:3000 por 1 h en agitación, pasado el tiempo se realizaron 10 lavados por 10 min con PBS pH 7.0-Tween 20 al 0.1% y se

reveló por quimioluminiscencia utilizando el kit ECL (Amersham Bioscience). Como control de carga se usó el anticuerpo α -tubulina en una dilución 1: 100, ambos anticuerpos se incubaron al mismo tiempo.

La expresión de los genes *tveif-5a* y *β -tubulina* se midió por RT-PCR, la intensidad de las bandas en geles teñidos con bromuro de etidio se cuantificó mediante un análisis densitométrico usando el software Gel Doc XR PC (BioRad). Los pixeles del transcrito de *β -tubulina* de las tricomonas cultivada con y sin el inhibidor DAB en presencia de cicloheximida se tomaron como el 100% en cada condición. Los niveles de RNAm se normalizaron con respecto a la cantidad de *β -tubulina* en cada condición. Para confirmar los cambios en los niveles de expresión se realizó qRT-PCR utilizando los iniciadores para *tveif-5a*: sentido 5' TTTGTTGACCGTTCCGATTATG 3' y antisentido 5' TTGCCCTCTGGTGGGAAGATC 3' y como control de carga los de *α -tubulina* BTUB2 y BTUB9.

5.27. Identificación de las diferentes modificaciones post-traduccionales de TveIF-5A

Para analizar las posibles modificaciones post-traduccionales en TveIF-5A, primero se realizó un análisis *in silico* de posibles fosforilaciones y glicosilaciones. Para ello, usamos el programa YinOYang 1.2 Prediction Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/YinOYang/>) para determinar O- β -GlcNAc, usando el máximo score. Por otra parte, para determinar posibles fosforilaciones usamos el

programa NetPhos 2.0 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/>) con el máximo score para predecir fosforilaciones en serina, treonina y tirosina.

Para confirmar la presencia de estas posibles modificaciones post-traduccionales se realizaron ensayos de western blot en 2D de extractos de proteínas totales utilizando anticuerpos anti-fosfoserina, anti-fosfotreonina y anti-fosfotirosina en una dilución 1:500 (Zymed Laboratories, South San Francisco, CA), las cuales se incubaron a 4°C a O. N. en agitación suave. Al día siguiente, las membranas se lavaron 5 veces por 10 min con PBS pH 7.0-Tween 20 al 0.1% y posteriormente se incubaron con el segundo anticuerpo cabra anti-ratón conjugado a HRP en una dilución 1:3000 y se incubaron por 1 h en agitación, pasado el tiempo, se realizaron 10 lavados por 10 min con PBS pH 7.0-Tween 20 al 0.1%. El revelado se realizó por quimioluminiscencia utilizando el kit ECL (Amersham Bioscience).

Para determinar N y/o O-glicosilaciones se utilizaron lectinas las cuales tienen afinidad a carbohidratos específicos. Las membranas de nitrocelulosa se incubaron con lectinas biotiniladas *Sambucus nigra* aglutinina (SNA) y *Maackia amurensis* aglutinina (MAA) para detectar O-glicosilaciones y *Canavalia ensiformis* lectina (Con A) para detectar N-glicosilaciones a una dilución de 1:100 (Zymed Laboratories, South San Francisco, CA). Las membranas se incubaron a 4°C a O.N. Al día siguiente las membranas se lavaron 5 veces por 10 min con PBS pH 7.0-Tween 20 al 0.1% y posteriormente se incubaron con estreptavidina conjugada a HRP en una dilución 1: 15 000 durante 1h a T.A en agitación, después se realizaron 10 lavados por 10 min con PBS pH 7.0-Tween 20 al 0.1% y se reveló por quimioluminiscencia.

5.28. Inmunolocalización de la proteína TvCP39

T. vaginalis cultivadas en presencia y ausencia de poliaminas sobre laminillas, se fijaron con paraformaldehído 4% 1 h a 37 °C.

Para permeabilizar los parásitos, las laminillas se lavaron 3 veces con PBS pH 7.0, para eliminar el RNA se utilizó una solución de HCl 1M, se hidrató con PBS pH 7.0 por 10 min, se neutralizó con NH₄Cl 50 mM en PBS pH 7.0 por 10 min y se hicieron 2 lavados con PBS pH 7.0 por 10 min, se colocaron las laminillas en HCl 1M a 2 h a T.A. Pasado el tiempo se lavaron con PBS pH 7.0 por 5 min y se bloquearon las laminillas con glicina 50 mM en PBS pH 7.0 a 4°C y después se bloqueo con suero fetal bovino al 1% a T.A, después se bloqueo nuevamente con glicina 50 mM en PBS pH 7.0 por 1 h a T.A, transcurrido el tiempo se bloquearon con suero fetal bovino al 1% y se permeabilizó con Tritón X 100 al 0.2% por 10 min, pasado el tiempo de incubación se bloquearon las laminillas tres veces con suero fetal bovino al 1% en PBS pH 7.0 a 4°C, y posteriormente se bloqueó con suero fetal bovino al 0.2%, se lavaron tres veces con PBS pH 7.0 y se colocó el primer anticuerpo α -TvCP39 (Ramón-Luing y col., 2011) utilizando una dilución 1:20 incubando O.N a 4 °C. Al día siguiente se lavó con PBS pH 7.0-BSA 1% por 3 veces, se adicionó el anticuerpo secundario α -conejo en una dilución 1:100 por 1 h a 4 °C, se lavó con PBS pH 7.0-BSA 1% por 3 veces, la contra-tinción se realizó con yoduro de propidio por 10 segundos, transcurrido el tiempo se lavó la laminilla sumergiéndola con cuidado en agua destilada, posteriormente se colocaron 5 μ l de la resina Vectashield-DAPI en el porta objetos y se montó la laminilla sellando las orillas con barniz transparente, por último las laminillas fueron guardadas a 4°C

protegiéndolas de la luz. Para parásitos no permeabilizados, se realizó el tratamiento anterior sin la permeabilización con Triton x 100.

5.29. Obtención de extractos citoplasmáticos

Tricomonas (600×10^6) o células HeLa (4 cajas de 75 mm^2 confluentes) o se centrifugaron a 1800 rpm por 5 min a 4°C . Las pastillas se lavaron con PBS pH 7, y se resuspendieron en 1 ml del amortiguador y se aforaron en 30 ml, después se centrifugaron en cada lavado a 1800 rpm por 5 min a 4°C . Luego de los lavados, las tricomonas se resuspendieron en 30 ml de PBS a 4°C y se contabilizó el número de parásitos en la cámara de Neubauer, mientras que los tubos se centrifugaron a 1800 rpm por 5 min a 4°C (mientras se realizaban los conteos) y se descartaron los sobrenadantes. El tubo se mantuvo boca abajo para tratar de eliminar el PBS restante. Por cada 50×10^6 parásitos se agregó: 1.6 mM de leupeptin, 7.5 mM de TLCK y amortiguador BB. A cada pastilla se le agregó 50 mg/ml de leupeptin, TLCK y amortiguador BB, se homogenizó y se pasó a un triturador o "Down" a 4°C y se dieron 10 golpes por 20 s, después se incubaron por 10 min en hielo. Cada volumen de resuspensión se almacena en tubos Eppendorf de 1.5 ml (Torres-Romero y col., 2011, en revisión; obtenido de Calla-Choque., 2011, tesis de Doctorado. Con modificaciones).

5.30. Fraccionamiento nuclear y citoplasmático

Parásitos (100×10^6) crecidos en presencia y ausencia de poliaminas, se centrifugaron a 1800 rpm por 5 min a 4°C, el sobrenadante se descartó y la pastilla se lavó con PBS pH 7.0 por 3 veces. La pastilla se resuspendió en 4 volúmenes de amortiguador A (10 mM Hepes, pH 7.9, 1.5 mM MgCl₂, 10 mM KCl, 0.5 mM ditioneitol, 0.5 mM DMSO) y se incubó 20 min a 4°C. Los parásitos se centrifugaron a 9000 rpm, el sobrenadante se decantó y se adicionó 5 volúmenes de amortiguador A suplementado con una mezcla de inhibidores de proteinasas (5 mg/ml de Leupeptin, E-64 y TLCK). La mezcla se transfirió a un triturador y se dieron 25 golpes en hielo. La mezcla se centrifugó a 9000 rpm por 5 min a 4°C. La pastilla se resuspendió en el amortiguador C (20 mM Hepes, pH 7.9, 0.42 M NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 0.5 mM ditioneitol, 5 mg/ml de Leupeptin, E-64 y TLCK) y se incubó 40 min a 4°C. La mezcla se centrifugó a 14000 rpm 20 min a 4°C (Gomez y col., 1998).

VIII. Resultados

Primero, se determinó el efecto de las poliaminas en la expresión del RNAm de *tvcp39*, debido a que *tvcp39* se utilizó para demostrar la participación de TveIF-5A en la estabilidad de los RNAm, primero analizamos la regulación de la expresión del gen *tvcp39* mediada por las poliaminas. Para ello, se realizó un ensayo de RT-PCR de *tvcp39* en parásitos cultivados en ausencia y presencia de poliaminas usando el inhibidor reversible DAB. El análisis del amplicón de *tvcp39* por RT-PCR mostró que su expresión disminuyó en presencia de DAB comparado con la expresión en presencia de poliaminas. Mientras que los parásitos tratados con DAB y transferidos a un medio con putrescina exógena recuperaron la expresión de *tvcp39* respecto a la condición normal; a diferencia de los parásitos crecidos en presencia de DAB y transferidos a un medio normal que no recuperaron su expresión (Fig.6A). Como control de carga para este ensayo se usó el gen de β -*tubulina* el cual es constitutivo, por lo que no se tuvieron cambios en la expresión. Posteriormente, se analizó la expresión del RNAm de *tvcp39* cuantitativamente mediante RT-PCR en Tiempo Real, la expresión del transcrito de *tvcp39* en la condición normal se tomó como un 100% de expresión. Los parásitos en presencia de DAB presentaron una disminución de la expresión de *tvcp39* del 80% comparado con la condición normal. Los parásitos crecidos en presencia de DAB y transferidos a un medio con putrescina exógena recuperaron la expresión hasta en un 50 % más con respecto a la condición con DAB. Por el contrario, en presencia del inhibidor y transferidos al medio normal no recuperaron la expresión de transcrito del gen *tvcp39* (Fig. 6B).

Para analizar la regulación de TvCP39 por las poliaminas, se realizó la extracción de proteínas totales de los parásitos crecidos en presencia y ausencia de poliaminas. Las proteínas totales se analizaron en geles SDS-PAGE al 13%, uno se tiñó con azul de Coomassie brillante y el gel duplicado se transfirió a una membrana de nitrocelulosa para inmunodetectar a las proteínas TvCP39 (39 kDa) y α -Tubulina (55 kDa) como control de carga, en la misma membrana. El resultado mostró que la cantidad de TvCP39 de 39 kDa disminuyó en los parásitos tratados con DAB (Fig.7A, carril 2), comparadas con los parásitos crecidos en un medio normal (Fig.7A, carril 1). De manera interesante, la adición de putrescina exógena recuperó parcialmente la cantidad de TvCP39 (Fig. 7A, carril 3), comparada con los parásitos tratados con DAB. Los parásitos crecidos en DAB y transferidos a un medio normal, no mostraron cambios en la cantidad de TvCP39 con respecto a la condición con DAB (Fig. 7A carril 4).

Para confirmar la disminución de la cantidad de TvCP39, se realizó la inmunolocalización de TvCP39 con el anticuerpo anti-TvCP39, mediante inmunofluorescencia indirecta usando parásitos permeabilizados (P) y no permeabilizados (NP). La inmunolocalización de TvCP39 en parásitos crecidos en medio normal permeabilizados mostró que TvCP39 se encuentra en citoplasma (Fig. 7B, paneles a-d), mientras que en los parásitos no permeabilizados muestra localización de superficie (Fig. 7B, paneles e-h), mientras que en los parásitos permeabilizados (P) y no permeabilizados (NP) tratados con DAB (Fig. 7B, paneles i-o) disminuyó de manera considerable la cantidad de TvCP39. En los parásitos tratados con DAB y transferidos a un medio con putrescina exógena se recuperó parcialmente la cantidad de TvCP39, en citoplasma (P) y en la superficie del parásito (NP) (Fig. 7B,

paneles p-x). Como control negativo del experimento se usó el suero preinmune (Fig. 7B, paneles y, β).

Para sugerir la localización nuclear de TvCP39 en presencia de poliaminas se realizó un fraccionamiento nuclear y citoplasmático. Los extractos proteicos de cada fracción se analizaron en geles SDS-PAGE al 13%, un gel se tiñó con azul de Coomasie brillante y el gel duplicado se transfirió a una membrana de nitrocelulosa para inmunodetectar a las proteínas TvCP39 (39 kDa), TveIF-5A (20 kDa). Como control citoplasmico y nuclear se usaron a la núcleoporina (53 kDa) y PCNA (28 kDa) (anticuerpo del Dr. Brieba), respectivamente. Los resultados mostraron que TvCP39 se localiza en el núcleo en presencia de poliaminas, comparado con el fraccionamiento proteico de parásitos crecidos en medio normal usado como control (Fig. 7C). Los controles usados en el experimento mostraron que no hubo contaminación entre ambas fracciones (núcleo-citoplasma).

Figura 6. Expresión del gen *tvcp39* en presencia y ausencia de poliaminas. Panel A y B. RT-PCR semicuantitativo y qRT-PCR con RNA total de parásitos crecidos en: línea 1; medio normal (control positivo) (N); línea 2, tratados con DAB (D); línea 3, tratados con DAB y transferidos a putrescina (D-P); línea 4, tratados con DAB y transferidos a medio normal (control) (D-N); línea 5, crecidos en medio normal y transferidos a putrescina (N-P). C. RT negativo (-) de cada una de las condiciones en presencia y ausencia de poliaminas.

BIBLIOTECA UACM

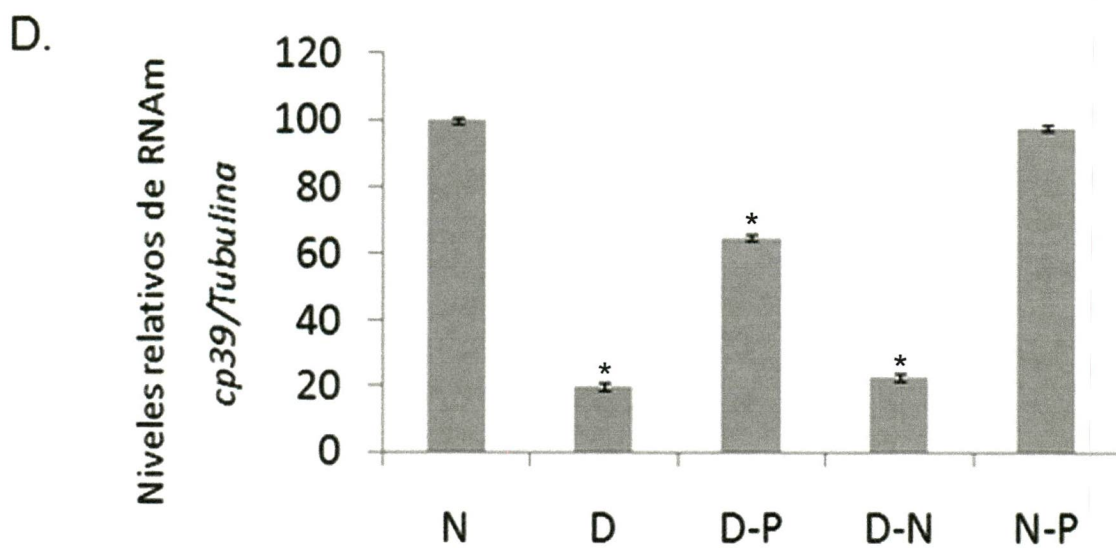
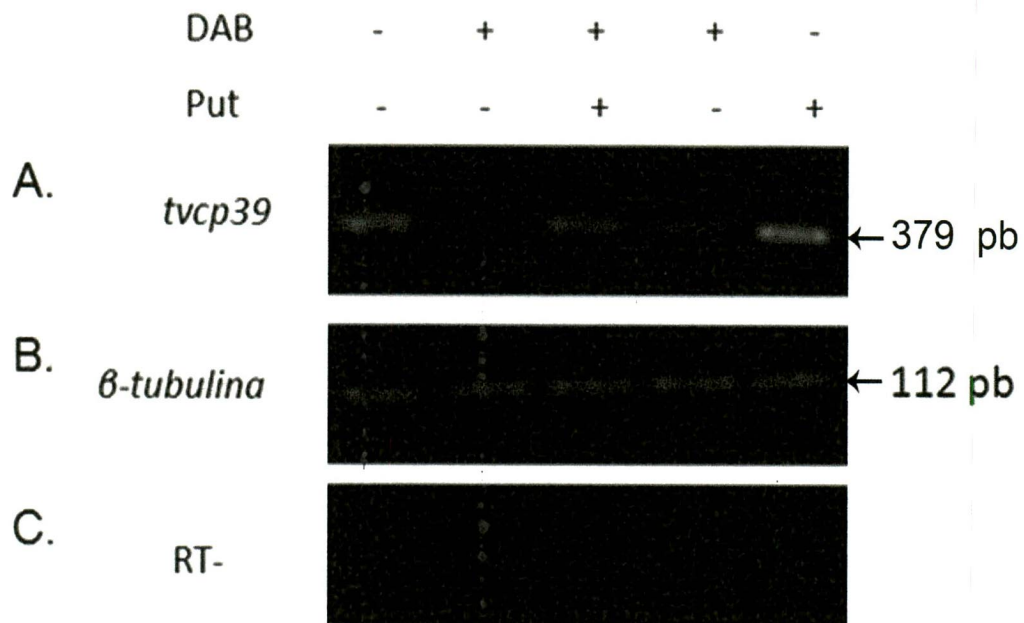
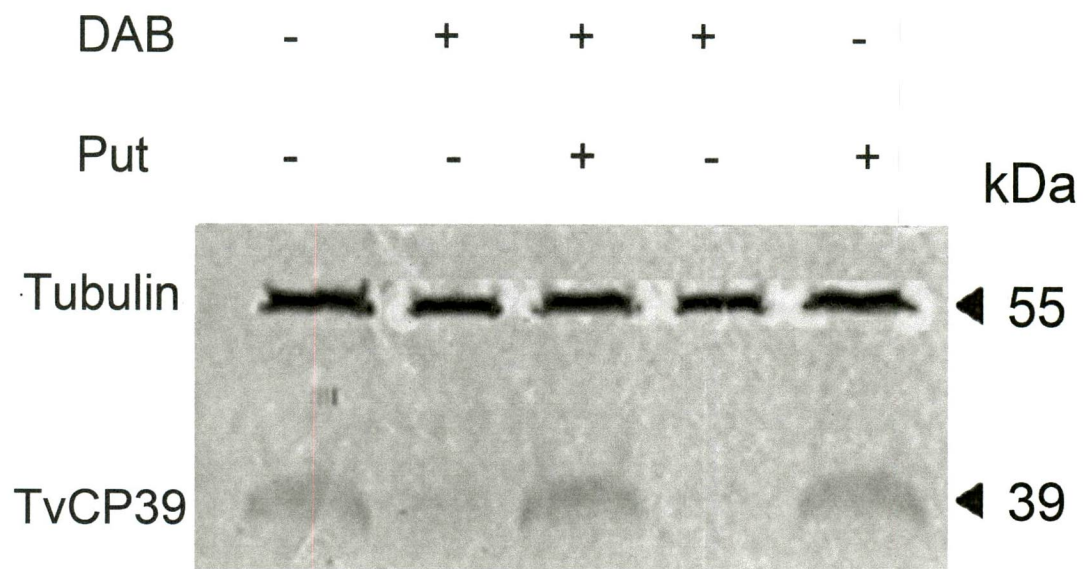


Fig. 7. Efecto de la presencia y ausencia de poliaminas en TvCP39. Panel A. Inmunodetección de TvCP39 de 39 kDa en extractos de proteínas totales de los parásitos crecidos en diferentes condiciones de poliaminas. Líneas: 1; medio normal (control positivo) (N); 2, tratados con DAB (D); 3, tratados con DAB y transferidos a putrescina (D-P); 4, tratados con DAB y transferidos a medio normal (control) (D-N); 5, crecidos en medio normal y transferidos a putrescina (N-P). Control de carga α -tubulina, indicado con la flecha en 55 kDa. Panel B. Inmunolocalización de TvCP39 de *T. vaginalis* crecidas en ausencia y presencia de poliaminas, con el anticuerpo α -TvCP39 (Ramón-Luig y col., 2011). Microscopia confocal 60x con parásitos permeabilizados (P) y no permeabilizados (NP). Panel 1, FITC; Panel 2, DAPI; Panel 3, Sobreposición FITC-DAPI. Panel 4. Microscopia de Nomasky. Paneles: parásitos P (a-d) y NP (e-h) crecidos en medio normal; parásitos P (i-l) y NP (m-o), tratados con DAB; parásitos P (p-s) y NP (t-x), tratados con DAB y transferidos a putrescina exógena; parásitos P (y- β), control negativo. Panel C. Fraccionamiento nuclear (n) y citoplasmático (c) de parásitos crecidos en medio con DAB y transferidos a putrescina exógena (D-P) y en medio normal (control). Carriles: 1-4, Inmunodetección de TvCP39 de 39 kDa en fracción nuclear y citoplasmática., 5-8, Inmunodetección de Tvelf-5A de 20 kDa en fracción nuclear y citoplasmática. Usado como control citoplasmático. 9-12, Inmunodetección de núcleoporina y PCNA de 53 y 28 kDa, respectivamente, en fracción nuclear y citoplasmática. Usado como control nuclear.

A.



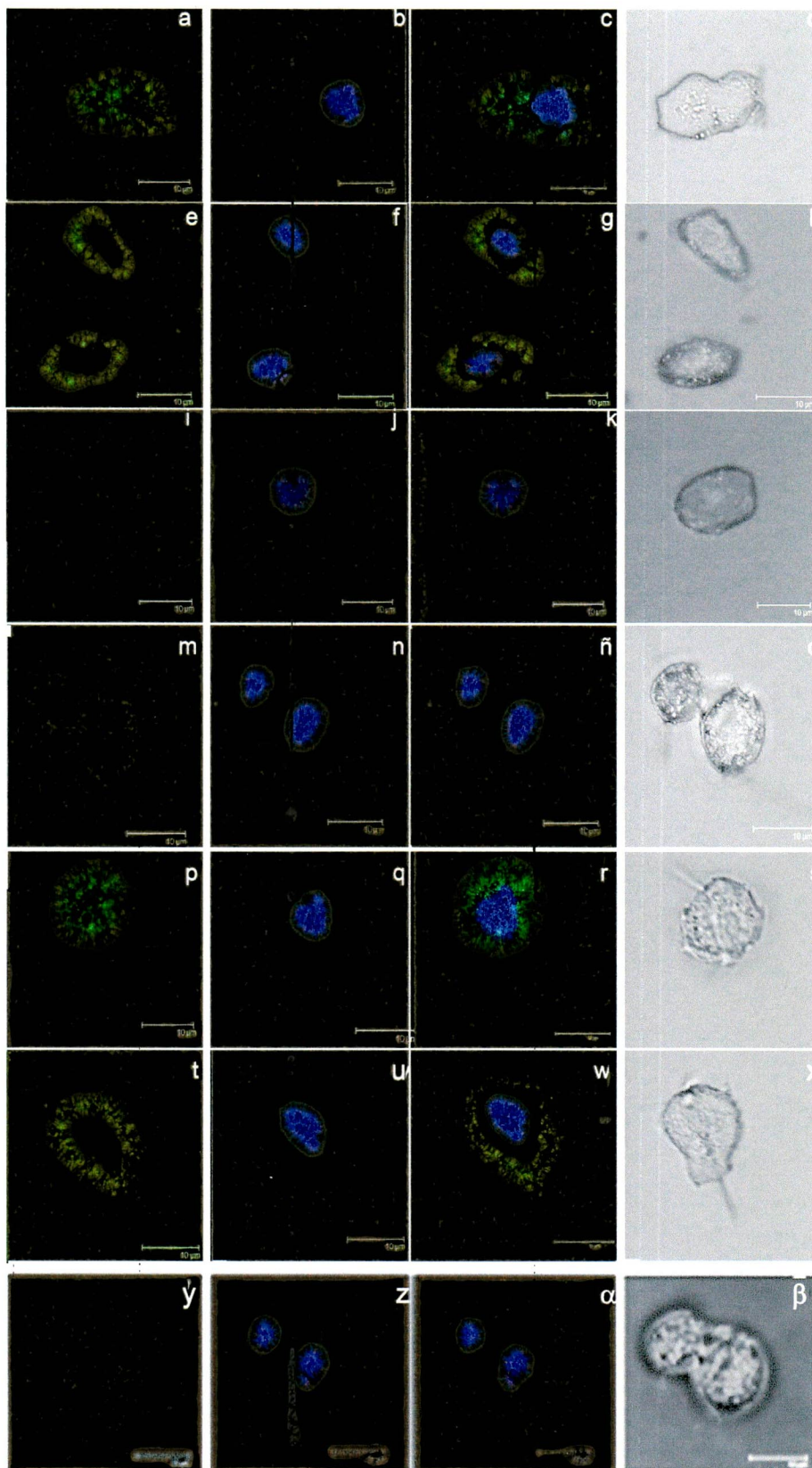
B.

1

2

3

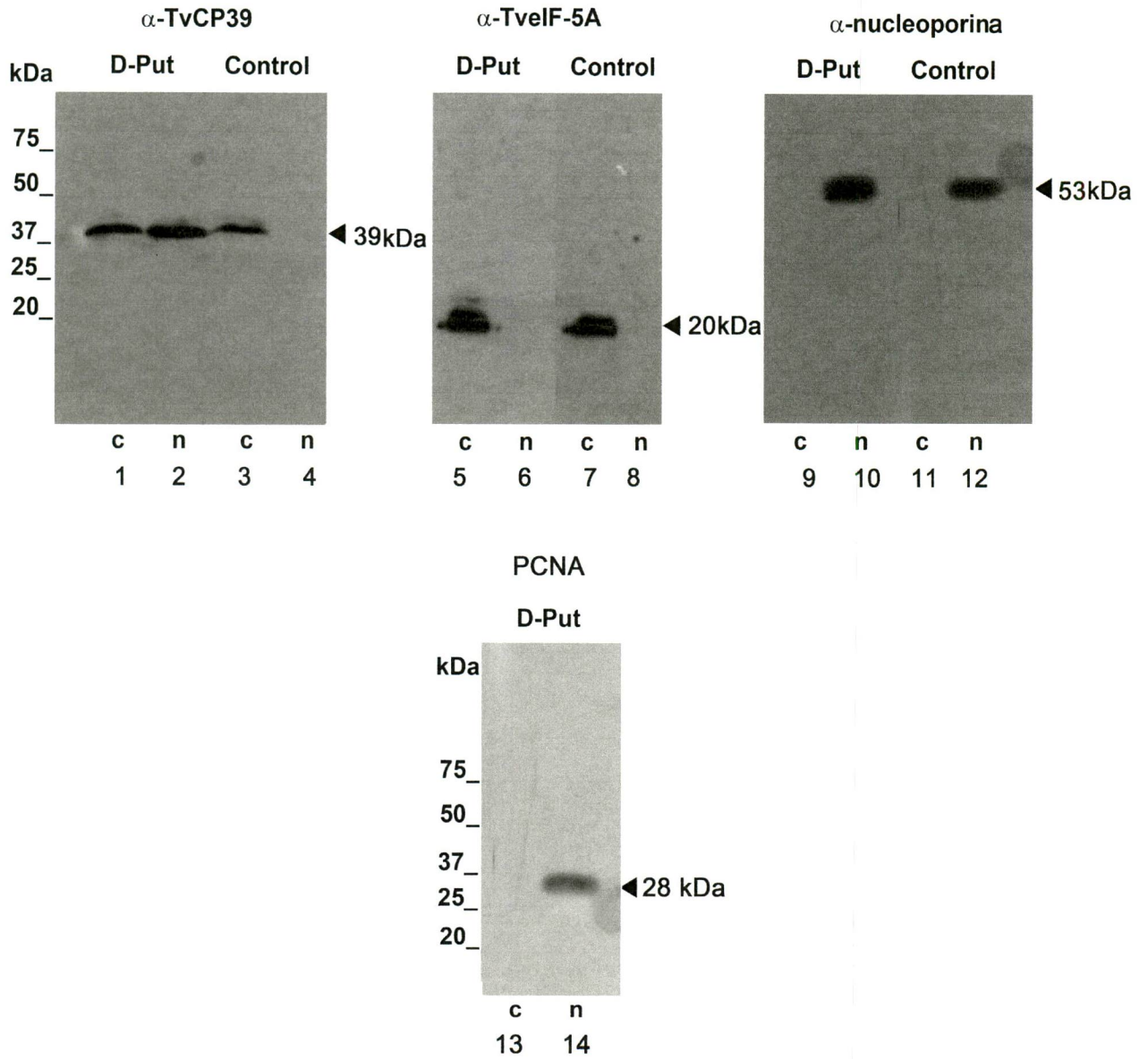
4



α -TVCP39

SP1

C.



Después, se analizó la estabilidad del transcrito de *tvcp39* y *tveif-5a* con el propósito de determinar el tiempo de vida media de ambos transcritos. Para ello se realizó un ensayo de estabilidad con parásitos cultivados en ausencia y presencia de poliaminas usando Actinomicina D como un inhibidor de la transcripción. Los parásitos se tomaron a diferentes tiempos (0, 1, 3, 6, 8, 12 y 24 h), posteriormente se extrajo el RNA total y se realizó la síntesis de cDNA para hacer la RT-PCR usando oligonucleótidos específicos para *tvcp39* y *tveif-5a*. El tamaño de los amplicones obtenidos fue de 238 pb para *tvcp39* y 504 pb para *tveif-5a*; como control de carga se utilizó el gen de β -tubulina (β -*tub*) con un tamaño de amplicón de 112 pb. La viabilidad de los parásitos fue del 98-99% en todas las condiciones analizadas. La estabilidad del transcrito de *tvcp39* y *tveif-5a* en el cultivo normal disminuyó a los ~180 min en *tvcp39* y ~360 min en *tveif-5a* después de añadir actinomicina D (Fig. 8, línea Normal). En contraste, la estabilidad de los transcritos de *tvcp39* y *tveif-5a* de los parásitos tratados con DAB, disminuyó a los ~60 min después del tratamiento de los parásitos con actinomicina D (Fig. 8, línea DAB). La estabilidad del transcrito de *tvcp39* y *tveif-5a* se recuperó al adicionar putrescina exógena al medio de cultivo, ~360 min en *tvcp39* y a los ~180 min en *tveif-5a* (Fig. 8, líneas DAB-Put). Posteriormente se realizó el análisis densitométrico de cada amplicón con el fin de graficar el tiempo de vida media de ambos transcritos (Fig. 8, paneles E y F). Las gráficas muestran la disminución de la vida media del RNAm de *tvcp39* y *tveif-5a* en los parásitos crecidos en presencia de DAB (Fig. 8, paneles E y F -■-), comparado con la vida media del RNAm de *tvcp39* y *tveif-5a* de los parásitos crecidos en medio normal (Fig. 8, paneles E y F -●-). El tiempo de vida media de los transcritos de *tvcp39* y *tveif-5a* se recuperaron con el tratamiento

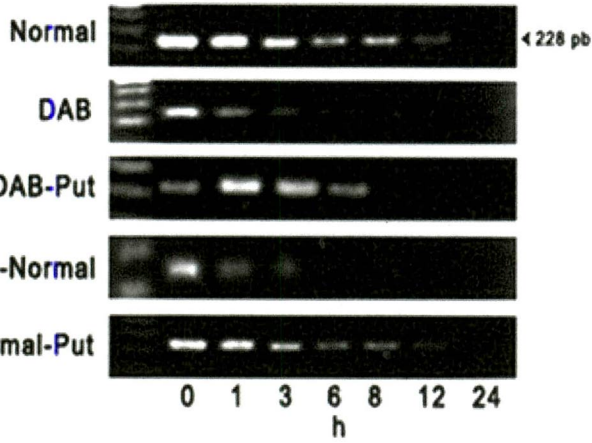
de putrescina exógena, comparado con la vida media de los parásitos tratados con DAB (Fig. 8, paneles E y F -♦-). Los valores de *tvcp39* y *tveif-5a* se normalizaron con los valores del gen constitutivo *β-tubulina* usado como control interno (Fig. 3, panel B). Los resultados sugieren que la vida media de los RNAm de *tvcp39* y *tveif-5a* son regulados por las poliaminas.

Por otra parte, el análisis del extremo 3'UTR del RNAm de *tveif-5a* mostró la presencia de una estructura tipo ERE, sugiriendo una probable autoregulación (Fig. 8, panel G). Esto no es de sorprender ya que existen moléculas que se autoregulan debido a la importancia que tienen a nivel celular como es el caso del aminoacil t-RNA que participa en el control de la expresión de genes a nivel post-transcripcional (Butler y col., 1986).

Fig. 8. Efecto de la Actinomicina D en la estabilidad de *tvcp39* y *tveif-5a* en presencia y ausencia de poliaminas. El tiempo de vida media del RNAm de *tvcp39* y *tveif-5a* se analizó usando actinomicina D mediante RT-PCR semicuantitativo, obteniendo un amplicón de 238 pb para *tvcp39* y 504 pb para *tveif-5a*. Paneles A y B. RT-PCR semicuantitativo del RNAm de *tvcp39* y *tveif-5a* de parásitos crecidos en presencia y ausencia de poliaminas y tratados con actinomicina D, monitoreados a diferentes tiempos (0, 1, 2, 3, 6, 8, 12 y 24 h): Producto de PCR separados en un gel de agarosa al 1.5 % y teñidos con bromuro de etidio. Panel: N, tricomonas crecidas en medio normal; D, tricomonas tratadas con DAB; D-P, tricomonas tratadas con DAB y transferidas a putrescina; D-N, tricomonas tratadas con DAB y transferidas a medio normal; N-P, tricomonas crecidas en medio normal y transferidas a putrescina. El control de carga fue β -tubulina (*β -tub*). Panel E y F. Tiempo de vida media de *tvcp39* y *tveif-5a*, correspondientemente, tricomonas crecidas en: medio normal (--♦--), tratadas con DAB (-■-); tratadas con DAB y transferidas a putrescina (-●-); tratadas con DAB y transferidas a medio normal (-▲-); medio normal y transferidas a putrescina (-■-). Panel G. Estructura tallo-burbuja del ERE de *tveif-5a* con un ΔG -12.01.

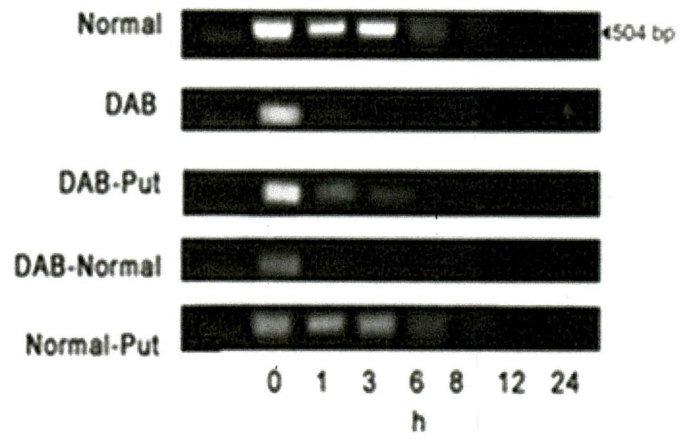
A

tvcp39



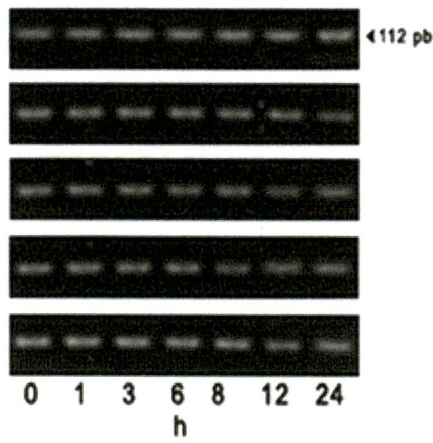
B

tveif-5a



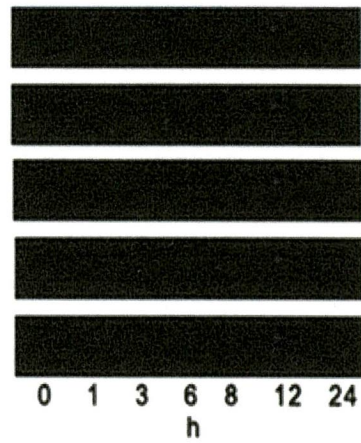
C

β -*tub*

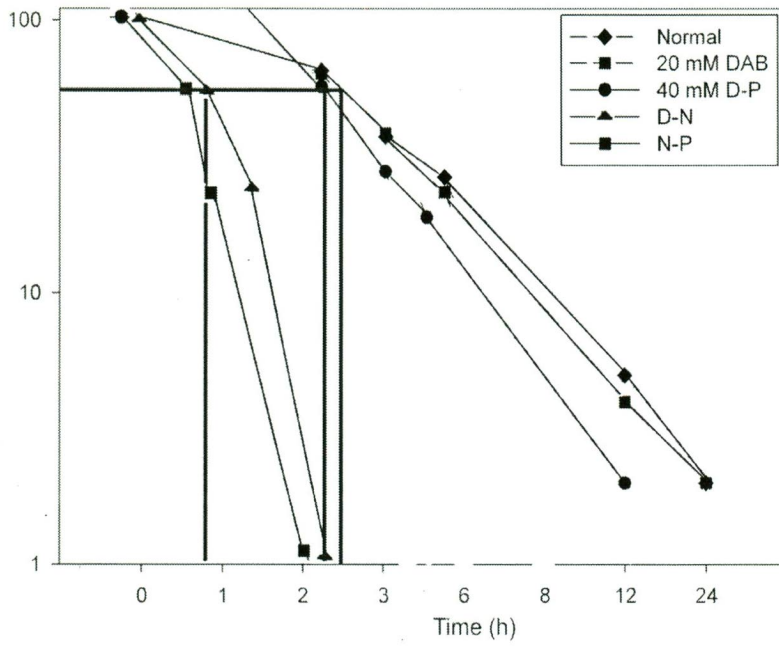


D

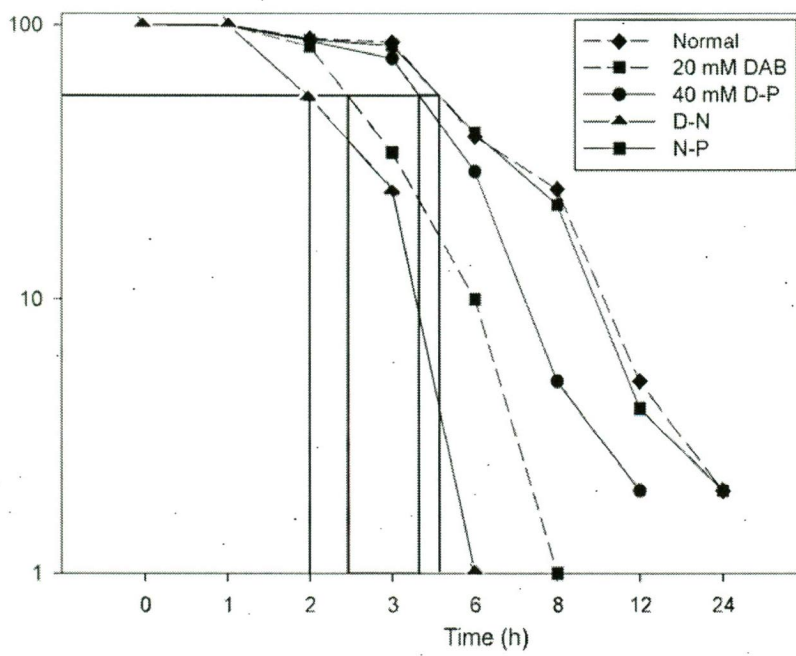
RT-



E.



F.



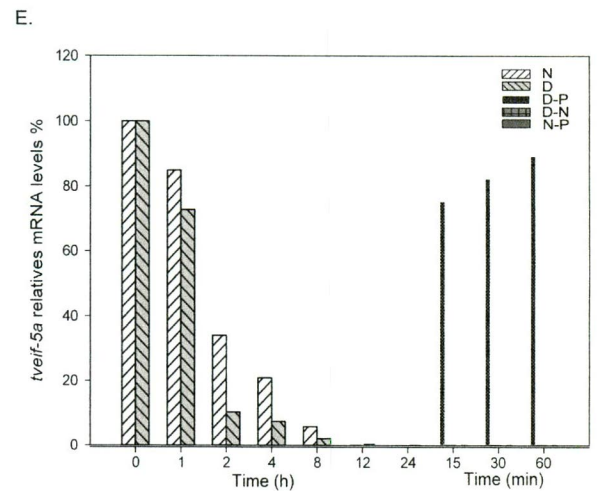
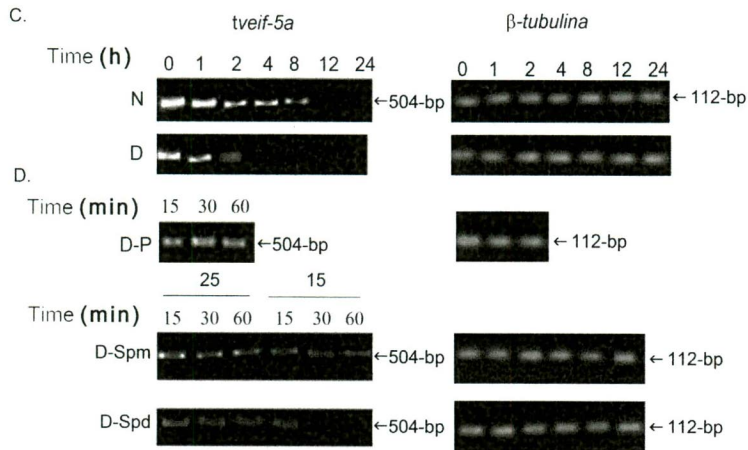
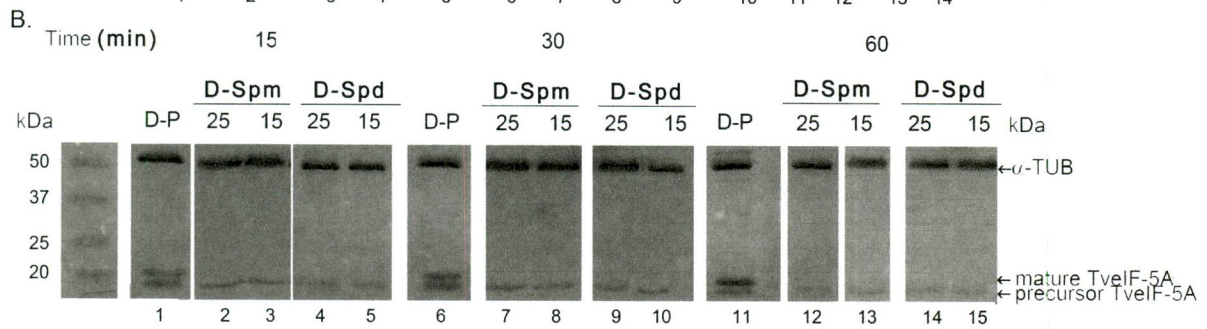
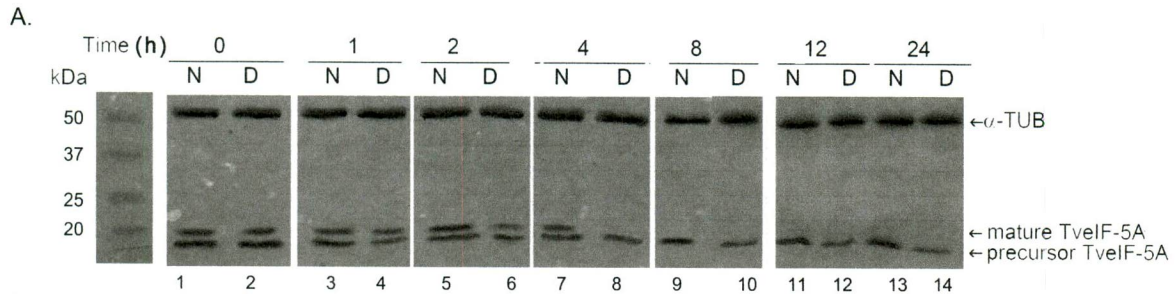
G
A
C A C
U A
G G
A A A U A G A

tveif-5a

Para conocer el efecto de la inhibición de la traducción con cicloheximida de TveIF-5A (precursora y madura) en parásitos crecidos en presencia y ausencia de poliaminas, se realizaron ensayos de Western blot utilizando los extractos de proteínas totales recolectados a diferentes tiempos (0, 1, 2, 4, 6, 8, 12, 24), después del tratamiento con cicloheximida, utilizando el anticuerpo α -TveIF-5A y α -Tubulina (Fig. 9) como control de carga. El resultado mostró que la cantidad de TveIF-5A madura y precursora en parásitos crecidos en medio normal y tratados con cicloheximida, es similar hasta las 4 h de monitoreo (Fig. 9A, líneas 1, 3, 5, 7), sin embargo, a partir de las 8 h la cantidad de TveIF-5A madura disminuyó gradualmente (Fig. 9A, líneas 4, 9, 11, 13). En contraste, la cantidad de TveIF-5A madura disminuyó a las 4 h en los parásitos tratados con DAB y cicloheximida (Fig. 9A, líneas 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14). De manera interesante la cantidad de TveIF-5A madura aumentó en los parásitos tratados con DAB y transferidos a un medio con putrescina exógena, en los 15, 30 y 60 min de tratamiento (Fig. 9B, líneas 1, 6, 11). Posteriormente, se realizó la extracción del RNA total de los parásitos crecidos en presencia y ausencia de poliaminas y tratados con cicloheximida a diferentes tiempos (0, 1, 2, 4, 6, 8, 12, 24) (Fig. 9A), con la finalidad de determinar los cambios en los niveles de expresión del transcrito de *tveif-5a*, mediante ensayos de RT-PCR y qRT-PCR. Los resultados mostraron que los niveles de *tveif-5a* en los parásitos crecidos en medio normal, disminuyó a partir de las 8 h de tratamiento con cicloheximida. De manera interesante los niveles de *tveif-5a* en los parásitos crecidos en medio con DAB disminuyeron a partir de las 2 h de tratamiento con cicloheximida y este efecto pudo ser revertido

al transferir a los parásitos a un medio con putrescina exógena a partir de los 15 min de monitoreo. Cabe mencionar que aquellos parásitos crecidos en presencia de DAB y transferidos a los diferentes cultivos adicionados con 25, 15 μ M de espermina y espermidina no mostraron recuperación en los niveles de expresión de *tveif-5a*. Para analizar la expresión de *tveif-5a* cuantitativamente se realizó un ensayo de qRT-PCR, en esta cuantificación se tomó el tiempo cero como el 100%. La condición normal mostró una disminución de ~ 50% a las 8 h. Por el contrario, los parásitos crecidos en presencia de DAB tuvieron una disminución de ~60% a partir de las 2 h, la transferencia de los parásitos crecidos en DAB a un medio con putrescina exógena recuperaron la expresión en un 80 % más con respecto a la condición con DAB. Los valores del gen *tveif-5a* se normalizaron con los valores del gen constitutivo *β -tubulina* usado como control interno.

Fig. 9. Efecto de la Cicloheximida en la inhibición de la traducción TveIF-5A en presencia y ausencia de poliaminas. El tiempo de vida media del TveIF-5A se analizó usando el anticuerpo anti-TveIF-5A. Los parásitos se monitorearon a diferentes tiempos (0, 1, 2, 4, 8, 12 y 24 h). Panel A. Líneas: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13; parásitos crecidos en medio normal. Panel A. Líneas: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14; parásitos tratados con DAB. Panel B. Líneas: 1, 6, 11; parásitos tratados con DAB y transferidos a un medio con putrescina exógena. Panel B. Líneas: 2, 3, 7, 8, 12, 13, parásitos tratados con DAB y transferidos a medios con 25 o 15 μ M de espermina (Spm). Panel B. Líneas 4, 5, 9, 10, 14, 15, parásitos tratados con DAB y transferidos a medios con 25 o 15 μ M de espermidina (Spd). Panel C. Análisis por RT-PCR del RNAm de *tveif-5a* de parásitos tratados con cicloheximida a diferentes tiempos. La flecha indica el amplicón de 504 pb correspondiente a *tveif-5a*. Línea N, tricomonas crecidas en medio normal; D, tricomonas tratadas con DAB; D-P, tricomonas tratadas con DAB y transferidas a putrescina; D-Spm, tricomonas tratadas con DAB y transferidas a 25 o 15 μ M de espermina; D-Spd, tricomonas tratadas con DAB y transferidas a 25 o 15 μ M de espermidina. Panel E. qRT-PCR del RNAm de *tveif-5a* de parásitos crecidos en presencia y ausencia de poliaminas y cicloheximida. N) tricomonas crecidas en medio normal. D) Parásitos tratados con DAB. D-P) Parásitos tratados con DAB y transferidos a putrescina. D-N) Parásitos tratados con DAB transferidos a medio normal. N-P) Parásitos crecidos en medio normal y transferidos a putrescine. En ambos experimentos los datos se normalizaron contra los valores obtenidos con el gen control usando *β -tubulina*.



El segundo objetivo fue analizar el 3'UTR de *tvcp39* y determinar las posibles secuencias ERE-like en *T. vaginalis*. El análisis de la clona RACE 3'UTR *tvcp39* (Ramon-Luing y col., 2011) mostró un ERE-like con la secuencia AAATTTCCAA la cual fue analizada en el programa "RNA fold" mostrando una estructura tallo-burbuja con un ΔG de -12.01. Este resultado nos sugiere que *T. vaginalis* contiene una secuencia ERE-like atípica, que podría estar participando en la regulación al nivel post-transcripcional de *tvcp39*. Al comparar esta secuencia con la reportada en el gen *cox 2* (AAATGTCCCA) encontramos dos cambios, sin embargo en trabajos anteriores (Parker y col., 2002), se ha descrito que esta secuencia puede variar hasta en tres bases. Esta misma secuencia fue localizada en otros genes dentro del genoma de *T. vaginalis*. Con las secuencias analizadas se realizó un alineamiento múltiple de estas secuencias EREs tomando como sonda la secuencia reportada en el gen *cox2*, la posible secuencia ERE en *T. vaginalis* es AAT/(g)G/(t)G/(t)CCAA (Fig. 10A, B, C). También se realizó el análisis de las estructuras secundarias usando el programa "RNA fold", en donde se analizaron diferentes tamaños de secuencia: 100 pb, 50 pb, 25 pb y 10 pb, esto fue realizado como control para comprobar que la estructura tallo-burbuja se conserva (Fig. 10B). Encontramos que para el extremo 3'UTR del gen *tvcp39* forma estructura de tallo y burbuja en todos los tamaños analizados.

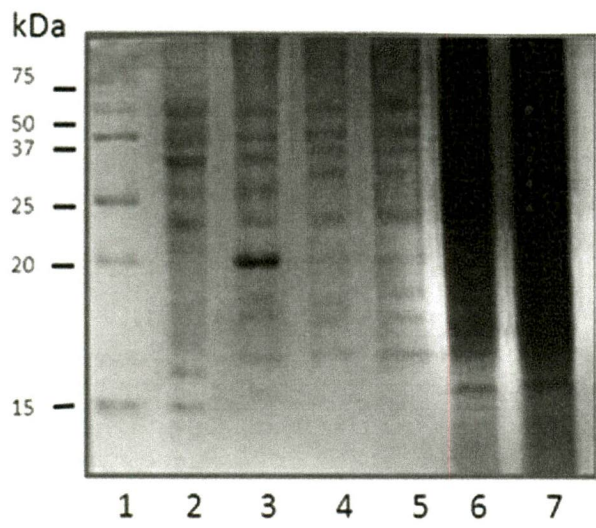
Fig. 10. Análisis del 3'UTR del RNAm de *tvcp39* de *T. vaginalis*. A. Secuencia del 3'UTR de *tvcp39*. En el recuadro se muestra el codón de paro de la traducción del RNAm de *tvcp39*. La línea negra muestra la secuencia ERE-like de *tvcp39*. B. Modelaje del 3'UTR de *tvcp39* con el programa "RNAfold". C. Estructura tallo-burbuja de la secuencia ERE-like de *tvcp39*. D. Secuencias EREs reportadas en la literatura.

Para obtener a TveIF-5A madura, se realizó la subclonación del gen *tveif-5a* de *T. vaginalis* en un sistema eucarionte (levadura) utilizando el vector de expresión *pYES2*. Las clonas candidatas se analizaron por restricción usando las enzimas *BamHI* y *XhoI*. De este análisis, se obtuvieron dos clonas positivas, las cuales contenían el inserto de 504 pb. Los plásmidos (*pYES2-tveif-5a*) que contenían el inserto se secuenciaron usando iniciadores específicos para el gen *tveif-5a*. La secuencia obtenida correspondió al gen *tveif-5a* previamente clonado en *pGEX6P-1*.

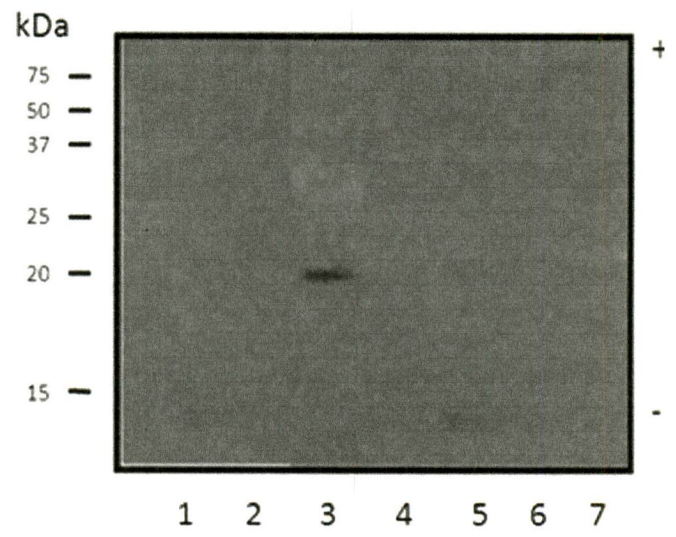
La construcción *pYES2-tveif-5a* se transformó en células de *S. cerevisiae* *ISVSc*, posteriormente se realizó la inducción de la proteína probando diferentes concentraciones de galactosa 0.1, 0.25, 0.5 y 1 M y en diferentes temperaturas 30, 33 y 37 °C, encontrando que la temperatura y concentración óptima de galactosa para la inducción de TveIF-5A madura de 20 kDa son de 0.5 M de galactosa a 33 °C. La inducción se realizó por 6 h (Fig. 11A, carril 3), transcurrido el tiempo de inducción, se lisaron las levaduras. El lisado celular y el sobrenadante del cultivo se analizaron en geles SDS-PAGE al 15%, un gel se tiñó con azul brillante de Coomassie (Fig. 11A). Como parte del control del experimento se realizó la extracción de proteínas de *S. cerevisiae* no transformantes (Fig. 11A, carril 2). Los controles fueron células *ISVSc* transformadas con la construcción *pYES2-tveif-5a* sin inducción y el plásmido *pYES* vacío, inducido con 0.5 mM de galactosa (Fig. 11A, carriles 4 y 5). El gel duplicado se transfirió a una membrana de nitrocelulosa para realizar un Western blot usando anticuerpos anti-péptido TveIF-5A. En el Western blot se observó el reconocimiento de una banda en la región de 20 kDa que corresponde a TveIF-5A madura (Fig. 11B).

Fig. 11. Inducción de TveIF-5A madura en el sistema eucarionte. Panel A. Análisis por electroforesis en SDS-PAGE al 15% de los extractos de *S. cerevisiae*. Carriles: 1) marcadores de peso molecular en kDa, 2) Extracto de *S. cerevisiae* sin transformar, 3) Extracto de *S. cerevisiae*, *pYES2-tveif-5a* con inducción, 4) Extracto de *S. cerevisiae*, *pYES2-tveif-5a* sin inducción, 5) Extracto de *S. cerevisiae*, *pYES2* vacío con inducción (control negativo), 6) Extracto de *S. cerevisiae*, *pYES2-tveif-5a* fracción insoluble inducido, 7) Extracto de *S. cerevisiae*, *pYES2-tveif-5a* fracción insoluble no inducido. Panel B. Western blot de la proteína TveIF-5A recombinante, incubado con el anticuerpo anti péptido TveIF-5A, revelado por quimioluminiscencia.

A

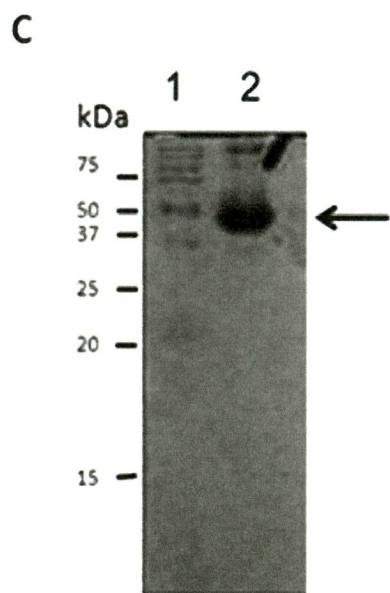
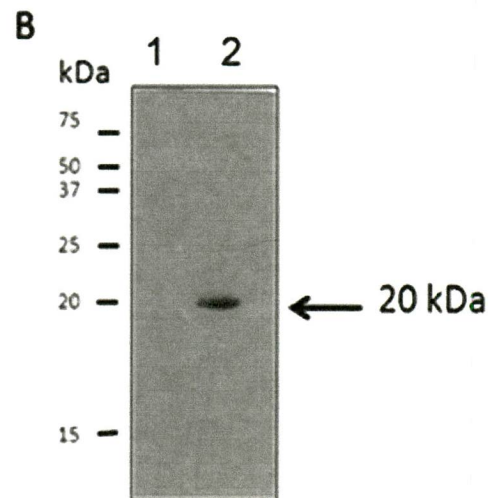
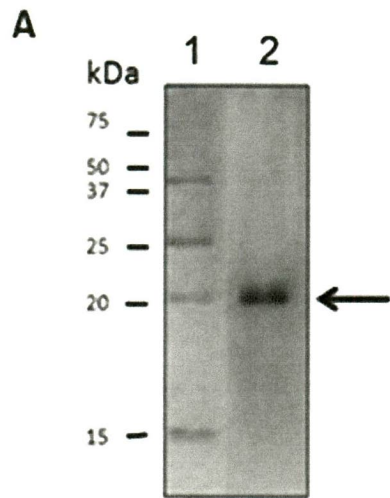


B



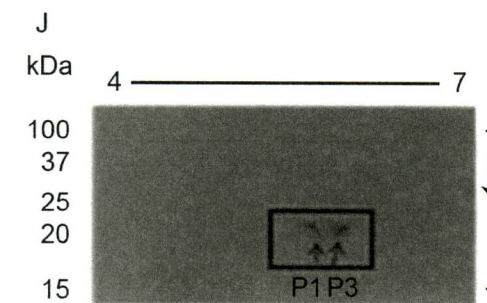
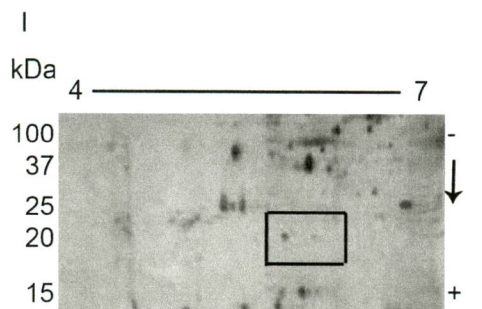
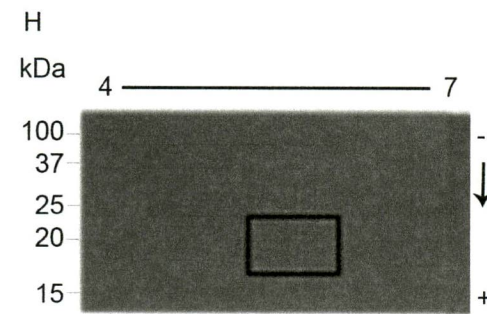
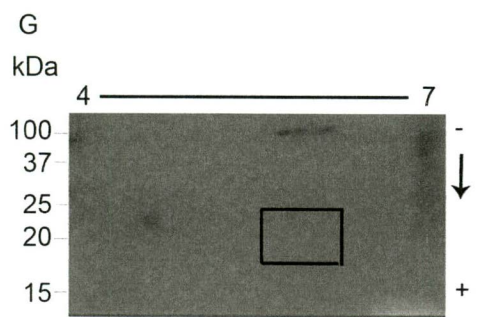
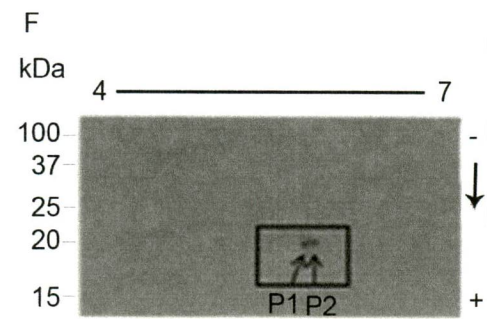
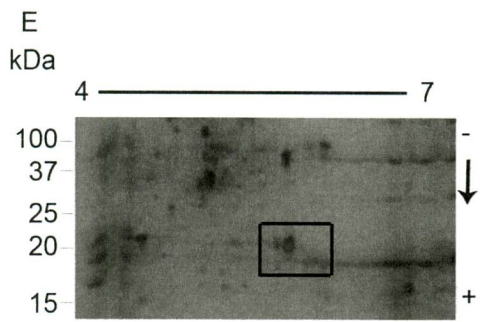
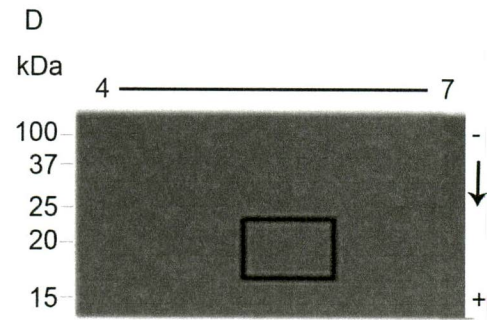
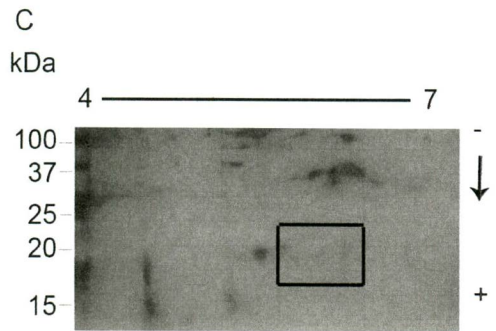
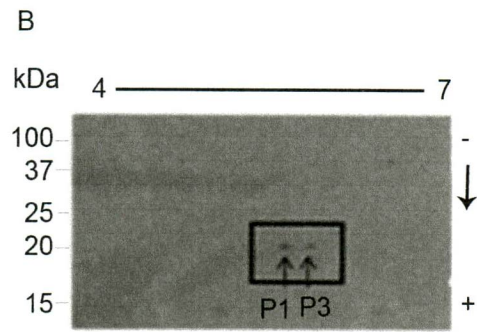
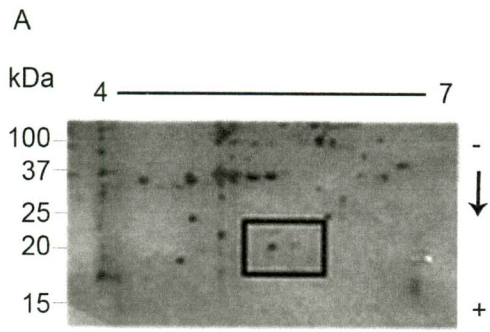
Por otra parte, se realizó la purificación de la proteína TveIF-5A precursora acoplada a glutatión transferasa (GST) y madura por cromatografía de afinidad (FPLC) a GST e intercambio iónico, correspondientemente. La proteína TveIF-5A madura purificada se analizó en un gel SDS-PAGE al 15% teñido con azul brillante de Coomassie (Fig. 12A) y el gel duplicado se transfirió a una membrana de nitrocelulosa para realizar un Western blot usando anticuerpos anti-péptido TveIF-5A, revelado por quimioluminiscencia (Fig. 12B), en donde se inmunodetectó una banda de 20 kDa correspondiente a TveIF-5A madura. También, se realizó la purificación de TveIF-5A precursora acoplada a GST, obtenida previamente de la construcción *pGEX6-P-1-tveif-5a*, la purificación se analizó en un gel SDS-PAGE al 15% teñido con azul brillante de Coomassie (Fig. 12C) y el gel duplicado se transfirió a una membrana de nitrocelulosa para realizar un Western blot usando anticuerpos anti-péptido TveIF-5A revelado por quimioluminiscencia (Fig. 12D), se inmunodetectó a TveIF-5A precursora de un tamaño de 46 kDa. Después, se realizó la cuantificación proteica por el método de Bradford obteniendo una concentración de 481 µg/mL de TveIF-5A precursora y 51.5 µg/mL de TveIF-5A madura.

Fig. 12. Purificación de TveIF-5A precursora y madura. Panel A. Análisis por electroforesis en SDS-PAGE al 15% de TveIF-5A madura. Carriles: 1) marcadores de peso molecular en kDa, 2) TveIF-5A madura pura de 20 kDa indicado por la flecha. Panel B. Inmunodetección de TveIF-5A madura pura, con el anticuerpo anti-péptido TveIF-5A. Panel C. Análisis por electroforesis en SDS-PAGE al 15% de la proteína GST-TveIF-5A precursora. Carriles: 1) marcadores de peso molecular, 2) Proteína GST-TveIF-5A pura de 46 kDa indicado por la flecha. Panel D. Western blot de la proteína GST-TveIF-5A precursora, con el anticuerpo anti-péptido TveIF-5A.



La proteína TveIF-5A se analizó en parásitos crecidos en presencia y ausencia de poliaminas, mediante un gel en 2DE, usando extractos de proteínas totales de *T. vaginalis*. Un gel se tiñó con plata y el gel duplicado se transfirió a una membrana de nitrocelulosa para realizar un Western blot usando el anticuerpo anti-péptido TveIF-5A. El resultado mostró la inmunodetección de dos manchas con un peso molecular de 19 kDa y 20 kDa en los extractos de proteínas de parásitos crecidos en medio normal (Fig. 13A y B), confirmando la presencia de dos proteínas TveIF-5A, las cuales sugieren corresponde a la proteína precursora (19 kDa) y a la proteína modificada (20 kDa). En el caso de los extractos de proteínas de parásitos crecidos en medio con DAB no se inmunodetectó ninguna mancha (Fig. 13C y D). En los extractos de proteínas de *T. vaginalis* crecidos en presencia de DAB y transferidos a un medio con putrescina exógena se inmunodetectaron dos manchas de 19 kDa con diferentes pI de 5.2 y 5.3, lo cual podría sugerir la presencia de una forma intermediaria o deoxihipusinada (Fig. 13E y F).

Fig. 13. Efecto de la ausencia de poliaminas en la proteína TveIF-5A. A. y B. Extracto de proteínas totales de *T. vaginalis* en gel SDS-PAGE en 2DE teñido con plata y Western blot, de los parásitos crecidos en medio normal. En el recuadro se muestran las dos manchas inmunodetectadas con el anticuerpo anti-péptido TveIF-5A. C y D. Gel SDS-PAGE teñido con plata y Western blot de los parásitos crecidos en ausencia de poliaminas, en el recuadro se muestra la ausencia de las dos manchas detectadas en el control. E y F. Gel SDS-PAGE teñido con plata y Western blot en membrana de nitrocelulosa de los parásitos crecidos en medio suplementado con DAB y transferido a un medio con putrescina exógena, en el recuadro se muestran las dos manchas inmunodetectadas con el anticuerpo anti péptido TveIF-5A. G y H. Gel SDS-PAGE teñido con plata y Western blot de los extractos de proteínas totales de los parásitos crecidos en presencia de DAB y transferidos a un medio normal, en el recuadro se muestran la ausencia de las manchas. I y J. Gel SDS-PAGE teñido con plata y Western blot del extracto total de proteínas de tricomonas crecidas en medio normal y transferidas a un medio con putrescina exógena, en el recuadro se muestran las dos manchas inmunodetectas.



Con la finalidad de conocer la existencia de posibles modificaciones post-traduccionales que dieran la diferencia en peso molecular y en pI de la proteína TveIF-5A precursora y madura, se realizó un análisis *in silico* para predecir O-glicosilaciones y fosforilaciones. El análisis mostró que TveIF-5A presenta O-glicosilaciones y fosforilaciones en serina y tirosina, para confirmar esto se realizaron geles SDS-PAGE al 15 % en 2DE para obtener el proteoma de *T. vaginalis* (Fig. 14, panel A), y un gel duplicado se transfirió a una membrana de nitrocelulosa para realizar Western blot usando las lectinas MSA (Fig. 14, panel C) y MAA (Fig. 14, panel D), como control del experimento se utilizó el anticuerpo anti-péptido TveIF-5A (Fig. 14, panel B).

Para determinar las fosforilaciones presentes en TveIF-5A se utilizaron anticuerpos anti-fosfoserina (Fig. 14, panel E), anti-fosfotirosina (Fig. 14, panel F) y anti-fosfotreonina y mediante un análisis usando el software PDQuest se empalmaron las manchas detectadas por las lectinas MSA, MAA, ConA, e inmunodetectadas por los anticuerpos anti-fosfoserina, anti-fosfotreonina y anti-fosfotirosina. El resultado mostró que la mancha 2 que correspondió a TveIF-5A madura (Fig. 14, panel B) empalma con la mancha detectadas con las lectinas MSA y MAA (Fig. 14 paneles, C y D). Como control del experimento se rasuraron la glicosilaciones con la enzima PGNasa (Sigma). El análisis para las fosforilaciones mostró que la mancha 2, que correspondió a TveIF-5A madura, empalmó con las manchas inmunodetectadas para fosfoserina y fosfotirosina, no así para anti-fosfotreonina (Fig. 14, paneles B, E y F). Estos resultados demostraron que la proteína TveIF-5A presenta dos modificaciones: la O-glicosilación pero no N-glicosilaciones y fosforilación en serina y tirosina pero no en treonina, que influyen en el cambio de peso molecular y pI entre TveIF-5A precursora y madura.

Para confirmar la identidad de P1, P2 y P3 se realizó un análisis de espectrometría de masas (ESI-QUAD-TOF), Tabla. 5.

Tabla. 5. P1, P2 y P3 identificados por espectrometría de masas (ESI-QUAD-TOF) de extractos de proteínas totales, identificados mediante una búsqueda con el programa MASCOT (National Center for Biotechnology non-redundant database) usando un algoritmo no redundante.

Proteína	Numero de acceso ^a	mancha ^b	MASCO T score ^c	Ion score ^d	Secuencia de péptido ^e
translation initiation factor eIF-5A family protein [Trichomonas vaginalis G3]	gil154418199	P1	412	85 69 31 26 53 82 46 104 103 39 18	K.AGIAGTDLFTGR.R K.GGYVLIIEGR.PCR.V R.EDVDLPPEGNEMR.Q R.EDVDLPPEGNEMR.Q R.EDVDLPPEGNEMR.Q R.RYETHLPTSHEIEVPPFVDR.S R.RYETHLPTSHEIEVPPFVDR.S R.SDYGLINIDDGHTQLLLTDGTLR.E R.SDYGLINIDDGHTQLLLTDGTLR.E R.SDYGLINIDDGHTQLLLTDGTLR.E R.SDYGLINIDDGHTQLLLTDGTLREDVDLPPEGNE MR
translation initiation factor eIF-5A family protein [Trichomonas vaginalis G3]	gil154418199	P2	417	57 82 55 48 55 89 83 143 122	K.KGGYVLIIEGR.P K.AGIAGTDLFTGR.R R.EDVDLPPEGNEMR.Q R.YETHLPTSHEIEVPPFVDR.S R.YETHLPTSHEIEVPPFVDR.S R.RYETHLPTSHEIEVPPFVDR.S R.RYETHLPTSHEIEVPPFVDR.S R.RYETHLPTSHEIEVPPFVDR.S R.SDYGLINIDDGHTQLLLTDGTLR.E R.SDYGLINIDDGHTQLLLTDGTLR.E
translation initiation factor eIF-5A family protein [Trichomonas vaginalis G3]	gil154418199	P3	427	15 85 34 62 41 61 20 84 64 61 61 149 108 65 33 79	K.ATIPVNK.L R.EDVDLPPEGNEMR.Q R.EDVDLPPEGNEMR.Q R.YETHLPTSHEIEVPPFVDR.S R.YETHLPTSHEIEVPPFVDR.S R.RYETHLPTSHEIEVPPFVDR.S R.RYETHLPTSHEIEVPPFVDR.S R.RYETHLPTSHEIEVPPFVDR.S R.RYETHLPTSHEIEVPPFVDR.S R.RYETHLPTSHEIEVPPFVDR.S R.RYETHLPTSHEIEVPPFVDR.S K ₂ SKTGKHGHAKAGIAGTDLFTGR.R + Hypusine (K) R.SDYGLINIDDGHTQLLLTDGTLR.E R.SDYGLINIDDGHTQLLLTDGTLR.E MSSAEEEEVHDLIEIQEVDAGSQEK.A R.SDYGLINIDDGHTQLLLTDGTLREDVDLPPEGNEMR.Q R.SDYGLINIDDGHTQLLLTDGTLREDVDLPPEGNEMR.Q

aNCBI nr database.

b Spot number in agreement with Figs. 1 and 2.

c/d Ion score is $-10 \cdot \log(P)$, where P is the probability that the observed match is a random event. Individual ion scores > 56 indicate identity or extensive

homology (p<0.05). Protein scores are derived from ion scores as a non-probabilistic basis for ranking protein hits.

eM = methionine modified by oxidation; N= deamidated; C = cysteine modified by carbamidomethyl; Hyp=lysine modified by hypusine.

Type of search : MS/MS Ion Search

Error tolerant search: All significant protein hits

Enzyme: Trypsin

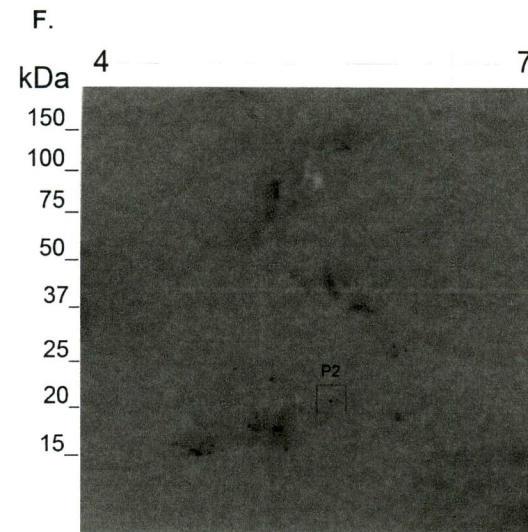
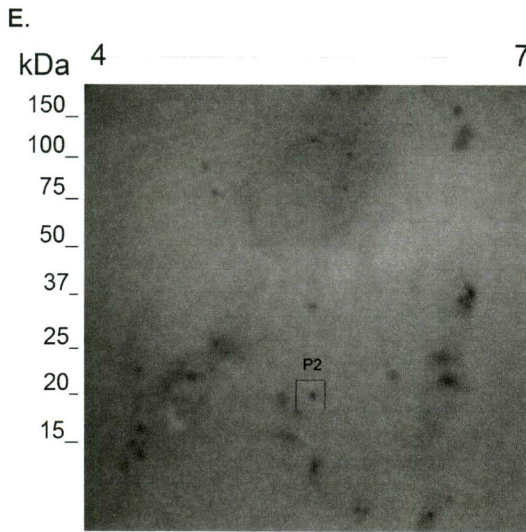
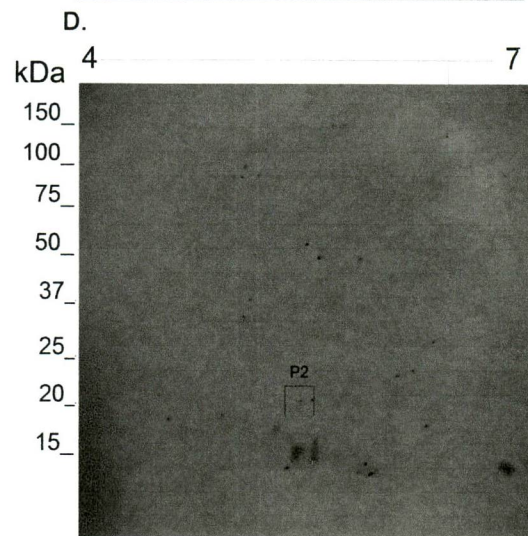
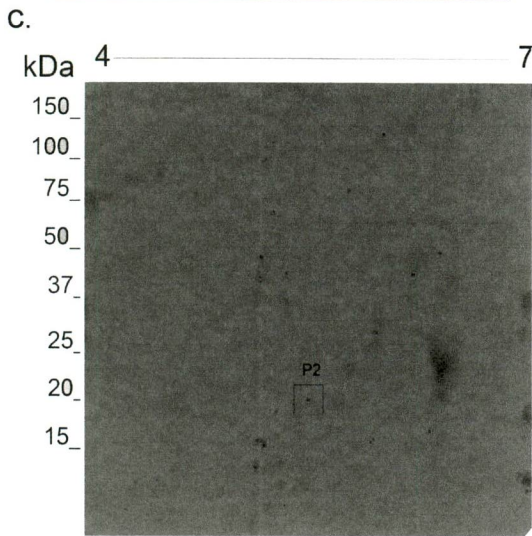
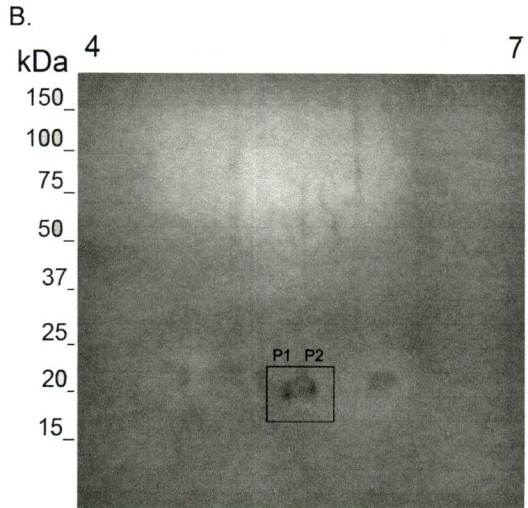
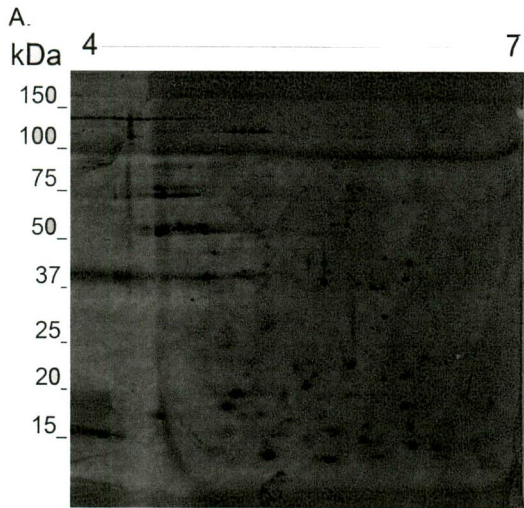
Variable modifications : Oxidation (M); Hypusine (K)

Mass values: Monoisotopic

Protein Mass : Unrestricted; Peptide Mass Tolerance : ± 50 ppm; Fragment Mass Tolerance: ± 0.6 Da; Max Missed Cleavages : ;

Instrument type : ESI-QUAD-TOF; Number of queries : 861

Fig. 14. Inmunodetección de las diferentes modificaciones post-traduccionales de TveIF-5A. Panel A. Extracto de proteínas totales de *T. vaginalis* en un gel SDS-PAGE en 2DE usado tiras con un pI de 4-7 teñido con Sypro rubi, mostrando el proteoma de *T. vaginalis*. Panel B. Western blot del extracto de proteínas totales de parásitos crecidos en medio normal, usado como control, el recuadro muestra las dos manchas inmunodetectadas con el anticuerpo anti péptido TveIF-5A, indicadas por las flechas, el número 1 corresponde a TveIF-5A precursora y el 2 a TveIF-5A madura. Panel C. Western blot usando la lectina MSA, el recuadro muestra la mancha detectada, señalada por la flecha y el número 2. Panel D. Western blot usando la lectina MAA, el recuadro muestra la mancha detectada, señalada por la flecha y el número 2. Panel E. Western blot usando el anticuerpo anti-fosfoserina, el recuadro muestra la mancha inmunodetectada, señalada por la flecha y el número 2. Panel F. Western blot usando el anticuerpo anti-fosfotirosina, el recuadro muestra la mancha inmunodetectada, señalada por la flecha y el número 2.



Para determinar la otra modificación post-traducciona de TveIF-5A madura, previamente reportada en la literatura, como es la hipusinación, se realizó un ensayo enzimático utilizando a TvDHS recombinante (previamente obtenida en el laboratorio), espermidina, NAD^+ , amortiguador (glicina-NaOH) y TveIF-5A precursora. Esta reacción enzimática se analizó en el fluorómetro. Como controles se determinó la emisión fluorimétrica de todos los componentes usados tales como: espermidina, NAD^+ , amortiguador, TvDHS y TveIF-5A precursora. Los valores obtenidos se utilizaron para poder diferenciar la emisión fluorimétrica de cada los sustratos y determinar el valor fluorimétrico de TveIF-5A madura. Los resultados del análisis mostraron una diferencia de emisión fluorescente entre TveIF-5A precursora y TveIF-5A madura, las cuales son visualizadas en los diferentes picos de emisión fluorimétricos (Fig. 15).

Para confirmar que TveIF-5A madura se obtenía por la reacción enzimática, las muestras finales del ensayo enzimático se analizaron en un gel nativo al 12% en 1D, un gel duplicado se transfirió a una membrana de nitrocelulosa para realizar un Western blot con el anticuerpo anti-péptido TveIF-5A, el análisis mostró la inmunodetección de tres bandas entre la región de 46 y 47 kDa, lo cual podría corresponder a TveIF-5A precursora, intermediaria y madura. Para confirmar el cambio en pI de TveIF-5A madura respecto a TveIF-5A precursora, se realizó un gel en 2DE con la muestra de la reacción del ensayo enzimático, anteriormente descrito, un gel se transfirió a una membrana de nitrocelulosa para realizar un Western blot utilizando el anticuerpo anti-péptido TveIF-5A, el resultado obtenido fue la inmunodetección de dos manchas de 46 y 47 kDa con un pI de 5.26 y 5.46

respectivamente, las cuales corresponden a TveIF-5A precursora y TveIF-5A madura (Fig. 16).

Figura 15. Análisis fluorimétrico de TveIF-5A precursora y madura. Gráfica del análisis fluorimétrico de la hipusinación de TveIF-5A precursora *in vitro*. Las flechas indica los picos de lectura en absorbancia de TveIF-5A precursora (azul) y TveIF-5A madura (verde olivo).

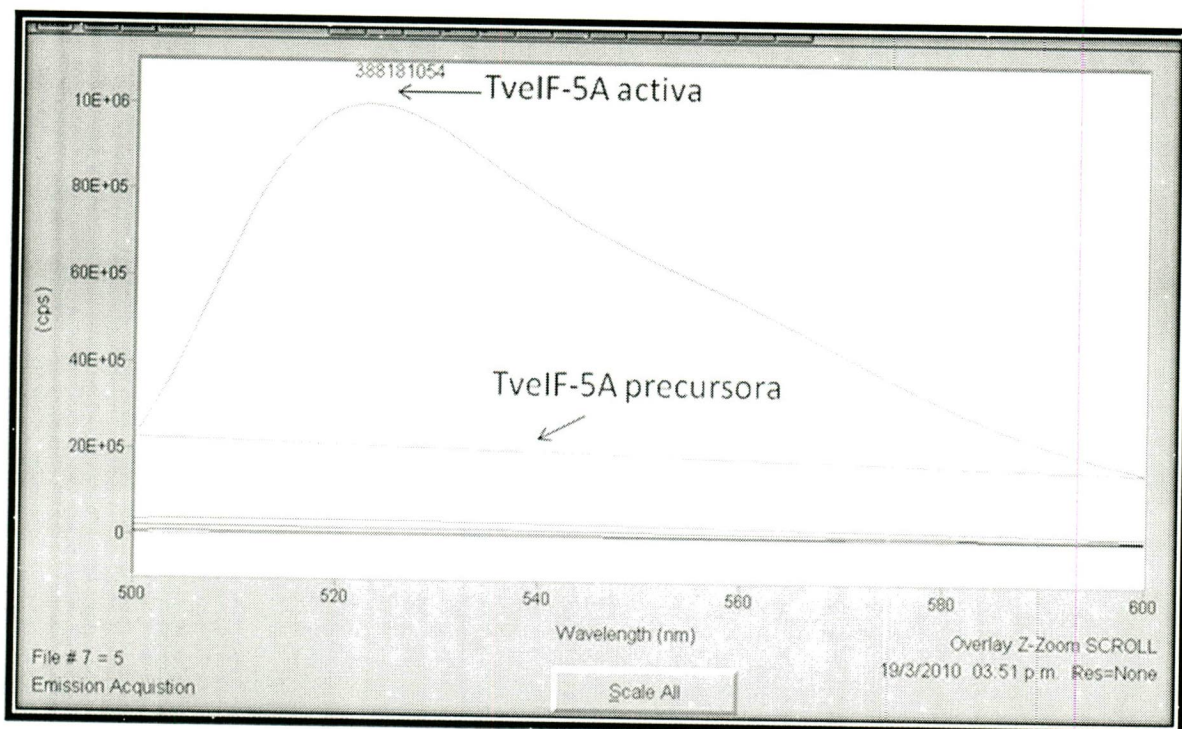
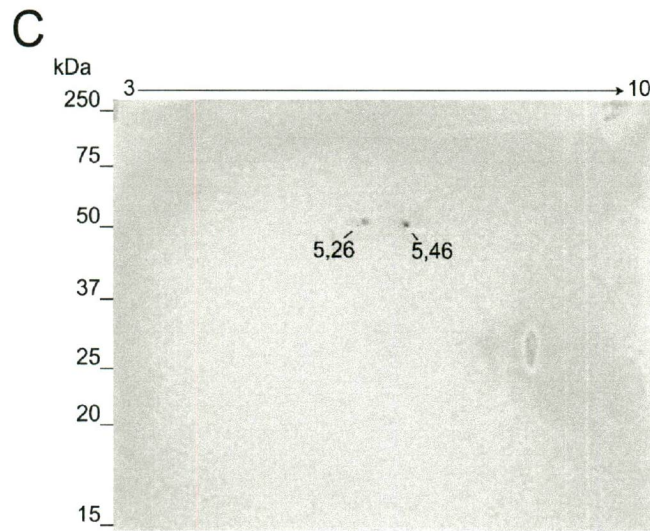
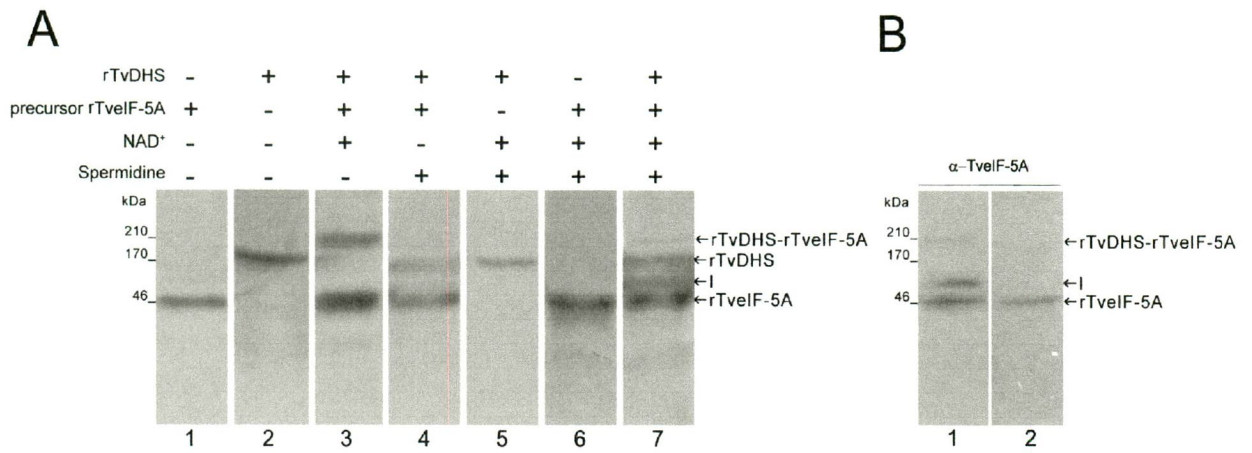


Figura 16. Inmunodetección de la hipusinación de TveIF-5A precursora *in vitro*. A. Gel nativo de la hipusinación *in vitro*. Carriles: 1. TveIF-5A precursora. 2. TvDHS recombinante. 3. Reacción de hipusinación sin espermidina. 4. Reacción de hipusinación sin NAD^{2+} . 5. Reacción de hipusinación sin TveIF-5A precursora. 6. Reacción de hipusinación sin TvDHS. 7. Reacción de hipusinación en donde se muestra a TveIF-5A hipusinada (I). B. Western blot en 1D de la hipusinación *in vitro* de TveIF-5A utilizando anticuerpos anti-péptido TveIF-5A. Carriles: 1. Inmunodetección de TveIF-5A precursora (rTvEIF-5A), hipusinada (I) y el complejo TveIF-5A- TvDHS (rTveIF-5A-rTvDHS). Las flechas indican las tres bandas obtenidas en la hipusinación *in vitro*, en la región de 46 y 47 kDa. 2. Inmunodetección de TvEIF-5A precursora por HPLC. La flecha indica la banda de TveIF-5A de 46 kDa. C. 2DE-Western blot de la hipusinación *in vitro* utilizando anticuerpos anti-péptido TveIF-5A. Las flechas indican las dos manchas inmunodetectadas por los anticuerpos.



Para demostrar la presencia de las tres formas de TveIF-5A (precursora, intermediaria y madura), basándonos en la diferencia de pI encontrado en el análisis en 2D, se realizó una cromatografía de intercambio catiónico, usando las muestras finales del ensayo enzimático. Primero, separamos a TvDHS recombinante mediante una cromatografía de afinidad a níquel aprovechando la etiqueta de histidinas, con la finalidad de evitar que esta proteína interfiera en la separación de las diferentes formas de TveIF-5A. Después, se separó a TveIF-5A precursora de la madura mediante un gradiente de pH con KCl 0.5 M en una columna MonoS, obteniendo dos fracciones que presentaron dos picos de elución, el primer pico (E1) eluyó a una concentración de 0.22 M de KCl con un tiempo de retención de 40 min y el segundo pico eluyó a una concentración de 0.5 M de KCl con un tiempo de retención de 45 min (Fig. 17 A, E1 y E2).

Basándonos en el aspecto teórico de como se lleva a cabo la hipusinación de TveIF-5A, la cual consiste en la incorporación de un grupo 4-aminobutil a un residuo específico de lisina, y que esta incorporación hace imposible que la tripsina pueda cortar este residuo, se realizó un mapeo peptídico con tripsina de cada una de las eluciones obtenidas de la cromatografía de intercambio iónico. Para ello realizamos un análisis *in silico* en el programa "peptidecutter", para predecir los posibles fragmentos peptídicos que se podían obtener y con ello diferenciar entre TveIF-5A precursora y madura. El resultado mostró que E1 generó 8 fragmentos peptídicos y E2 generó 4 fragmentos peptídico, lo cual demuestra que E1 presenta el residuo de lisina que genera una mayor cantidad de

péptidos y E2 al estar hipusinada genera una menor cantidad de péptidos, estos resultados concordaron con el análisis *in silico*.

Los resultados anteriores fueron confirmados mediante isoelectrospray acoplado a Espectrometría de Masas, en donde se obtuvo que E1 corresponde a TveIF-5A precursora, debido a que la tripsina fue capaz de cortar la lisina donde se lleva a cabo la hipusinación y E2 correspondió a TveIF-5A madura (Tabla 6).

Figura 17. Separación de las formas de TveIF-5A por cromatografía de intercambio iónico en una columna MonoS. A. Fraccionamiento de las formas de TveIF-5A, la gráfica muestra los dos picos (E1 y E2) obtenidos mediante el gradiente de KCl. B. Gel SDS-PAGE al 12 % teñido con plata. Carriles: 1. Marcadores de peso molecular en kDa. NP. Fracción de lo que no se pegó a la columna. E1. Primera elución con el gradiente de KCl. E2. Segunda elución obtenida con el gradiente de kCl. La flecha indica la banda de 46 kDa.

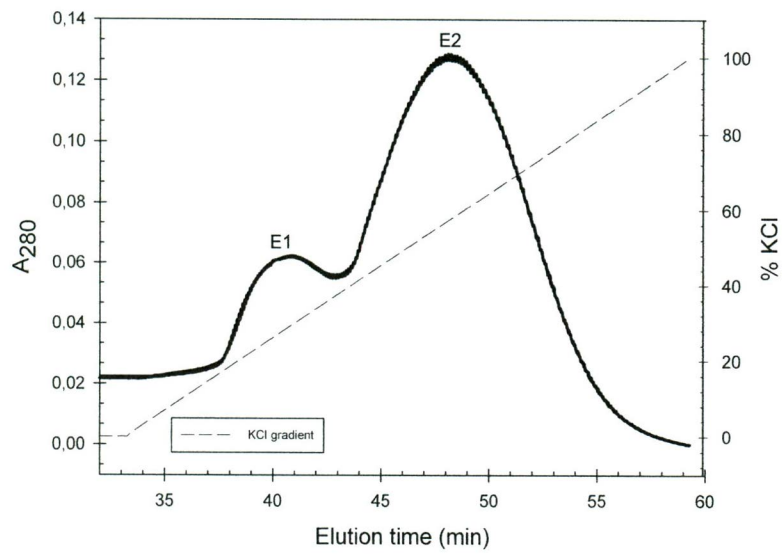
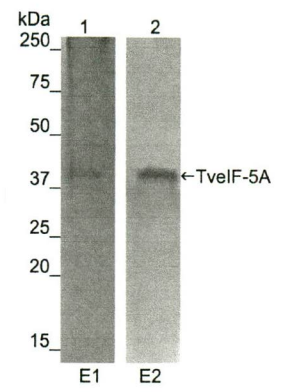
A**B**

Tabla 6. LC-ESI-MS/MS de las isoformas de TveIF-5A.

Elución	Proteína	Mascot score ^a	Ion score ^b	Secuencia de péptido	% cobertura ^c
			58		
			74	K.LVELDAIAYK K.LVELDAIAYK	
			54	K.CNCYLADIADFQK.F + Deamidate	
			85	K.IYADYFGDHKPCR.C	
			57	K.VISTPDAPAAIGPYCQAR.L	
			110	R.TLYTSGIIGNDPHGGPNPETVEGQAELIMK	
E1	TveIF-5A	442	41	K.LVELDAIAYK	30
	Precursor		130	K.CNCYLADIADFQK.F + Deamidated (NQ)	
			71	K.CNCYLADIADFQK.F_K.CNCYLADIADFQK.F	
			80	K.IYADYFGDHKPCR.C	
			96	K.VISTPDAPAAIGPYCQAR.L	
			89	R.TLYTSGIIGNDPHGGPNPETVEGQAELIMK.S +	
			108	Oxidation(M)	
			98		
			36	K.ANQTNELFK.A + Deamidated (NQ)	
E2	TveIF-5A	57	102	K.NLDSDEEEIKPK.K	22
	Mature		21	K.LVDKTNIDK.D	
			35	K.EKIALSVAR.G + Hypusine (K)	

^aIon score is $-10 \cdot \log(P)$, where P is the probability that the observed match is a random event. Individual ion scores > 56 indicate identity or extensive homology ($p < 0.05$). Protein scores are derived from ion scores as a non-probabilistic basis for ranking protein hits.

^c%Coverage indicates the protein sequences or parts of these sequences that were identified by MS/MS.

Type of search: MS/MS ion search

Enzyme: trypsin

Mass values : Monoisotopic

Protein Mass : Unrestricted

Peptide Mass Tolerance: ± 1.2 Da

Fragment Mass Tolerance: ± 0.6 Da

Max Missed Cleavages : 1

El análisis funcional de la interacción de TveIF-5A con el 3'UTR del RNAm de *tvcp39*, se demostró usando a TveIF-5A madura recombinante en un ensayo de movilidad electroforética (EMSA). Primero, se realizó la transcripción *in vitro* de la estructura tallo-burbuja localizada en el 3'UTR del RNAm de *tvcp39*, la cual se sintetizó basándonos en los resultados del análisis *in silico* del 3'UTR de *tvcp39*. Como controles positivos de este experimento se utilizaron: 1) sonda de la estructura tallo-burbuja de un elemento de respuesta al hierro de la ferritina (*IRE-fer*), 2) sonda de la estructura tallo-burbuja de un elemento de respuesta a eIF-5A (*ERE-cox2*), y 3) sonda de un control negativo con la secuencia ERE-like *tvcp39* que no forma una estructura tallo-burbuja (D-loop) (Tabla 7).

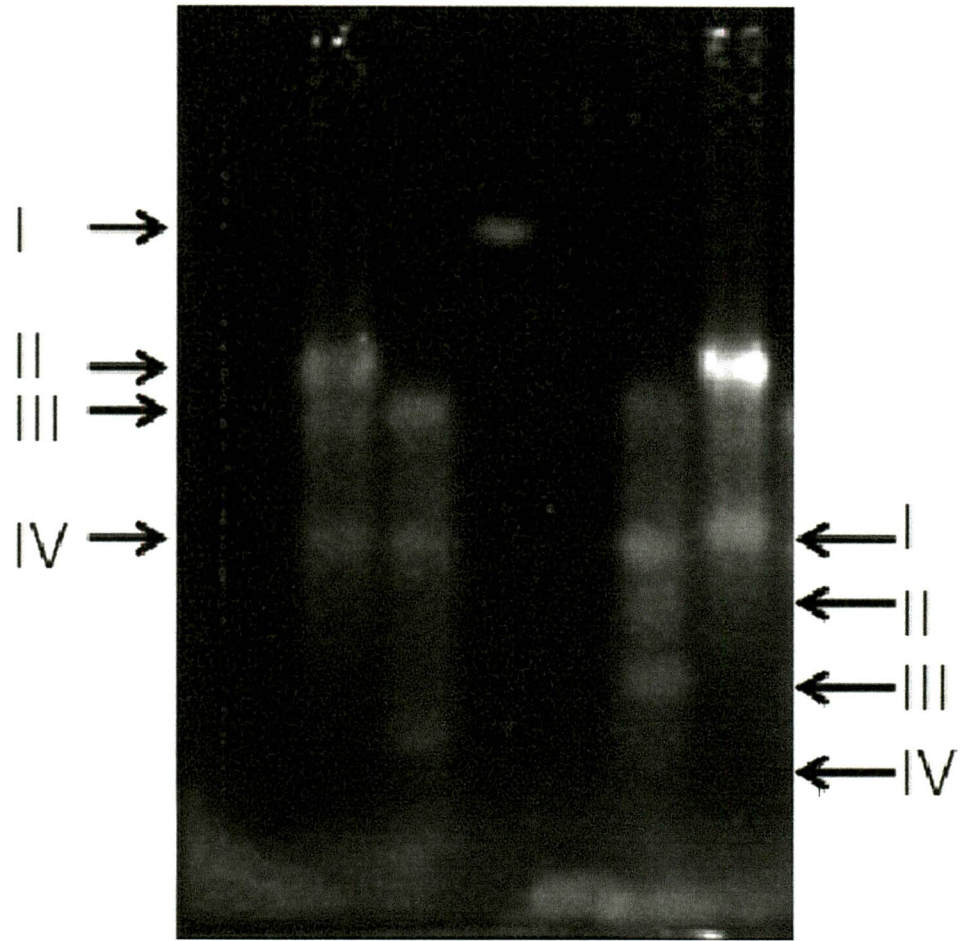
Tabla 7. Secuencia y estructura de los 3'UTR utilizados para la transcripción *in vitro*.

3'UTR	Secuencia	Estructura tallo burbuja
<i>tvcp39</i>	>Race3N-C1-M13F ACTATATAAAAGATTCGGAATTTTAGAATT TCCAATAA	90 pb
<i>cox-2</i>	5'AAATGTCACACAGAATTCTGTGTGACATT TCCCCTATAGTGAGTCGTATTA 3'	95 pb
<i>D-Loop</i>	5'TCGTATGCCGGTTAATGCCTATTATGCTG AGTGATATCCCCAGCATACGGCCAATTACG GA 3'	110 pb
<i>IRE-fer</i>	5'ATTCTGCTTGAACAGTGCTTGGACGGAA TATT 3'	190 pb

Mediante las sondas obtenidas en la transcripción *in vitro*, se obtuvieron las estructuras ERE-like de *tvcp39* y ERE-cox2 de 90 y 95 pb respectivamente, así como la estructura *IRE-fer* y *D-loop* de 110 bp y 95 pb respectivamente.

Primero, se realizó el ensayo de interacción con el control positivo *IRE-fer* usando extractos de proteínas citoplásmicas de *T. vaginalis* y células HeLa por separado, encontrando la formación de cuatro complejos, los cuales habían sido reportados previamente (Solano-González y col., 2007). Posteriormente, se realizó la interacción con el ERE-cox2 y la proteína TveIF-5A precursora, como era de esperarse no se formó ningún complejo, en cambio la interacción del ERE-cox2 con la proteína TveIF-5A madura se formaron complejos, lo que demuestra que TveIF-5A madura es activa (Fig. 18).

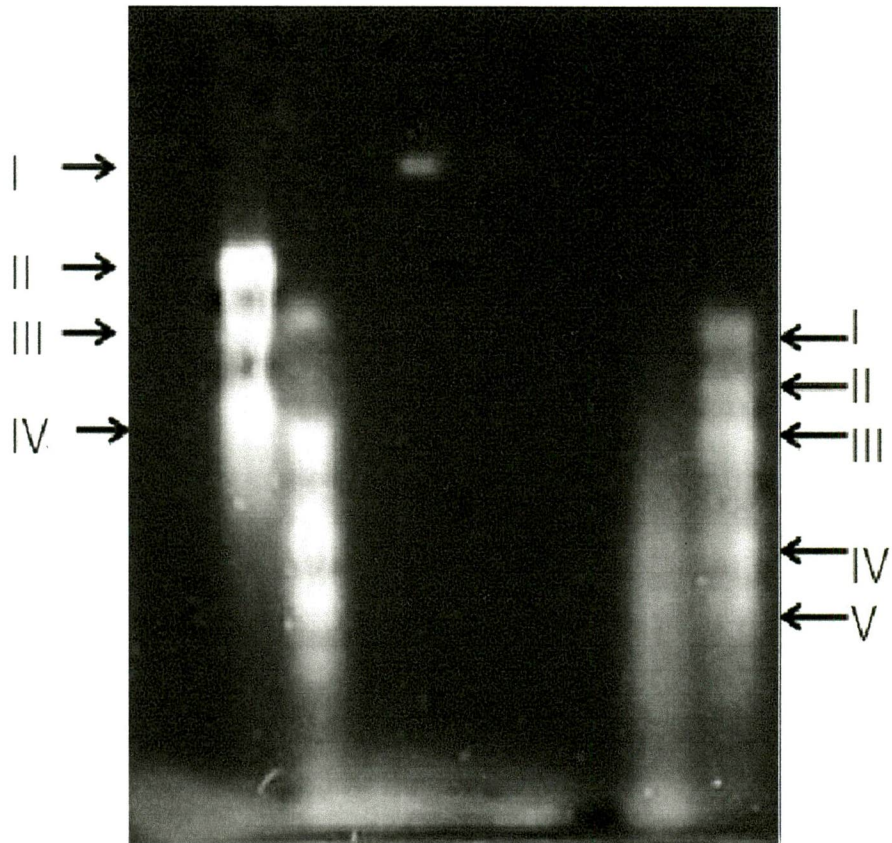
Figura 18. Ensayo de movilidad electroforética del ERE *cox-2* e *IRE-fer*.
EMSA en gel de agarosa al 1.3% teñido con Syber green.



Sonda libre	+	-	-	-	-	-	-
ERE-cox2	+	+	+	+	+	-	-
IRE-fer	-	-	-	-	-	+	+
Extractos citoplasmáticos de <i>T. vaginalis</i>	-	-	+	-	-	+	-
Extractos citoplasmáticos de células HeLa	-	+	-	-	-	-	+
TveIF-5A madura	-	-	-	+	-	-	-
TveIF-5A precursora	-	-	-	-	+	-	-

Con la finalidad de determinar la interacción entre el ERE-like de *tvcp39* y TveIF-5A y proponer que esta proteína participa en la estabilidad del RNAm de *tvcp39*, se realizó un ensayo de interacción usando el ERE-like de *tvcp39* con TveIF-5A precursora y TveIF-5A madura. La interacción del ERE-like de *tvcp39* con la proteína TveIF-5A precursora no mostró la formación de complejos, en cambio, al interaccionar con la proteína madura se formó un complejo, demostrando la interacción específica entre TveIF-5A madura y el ERE de *tvcp39* (Fig. 19). Como control negativo del ensayo de interacción se usó la sonda D-loop el cual no mostró interacción con TveIF-5A. Los resultados obtenidos sugieren que TveIF-5A madura interacciona con la estructura de tallo-burbuja de la secuencia ERE-like de *tvcp39*, por lo que podría participar en la estabilidad de este RNAm.

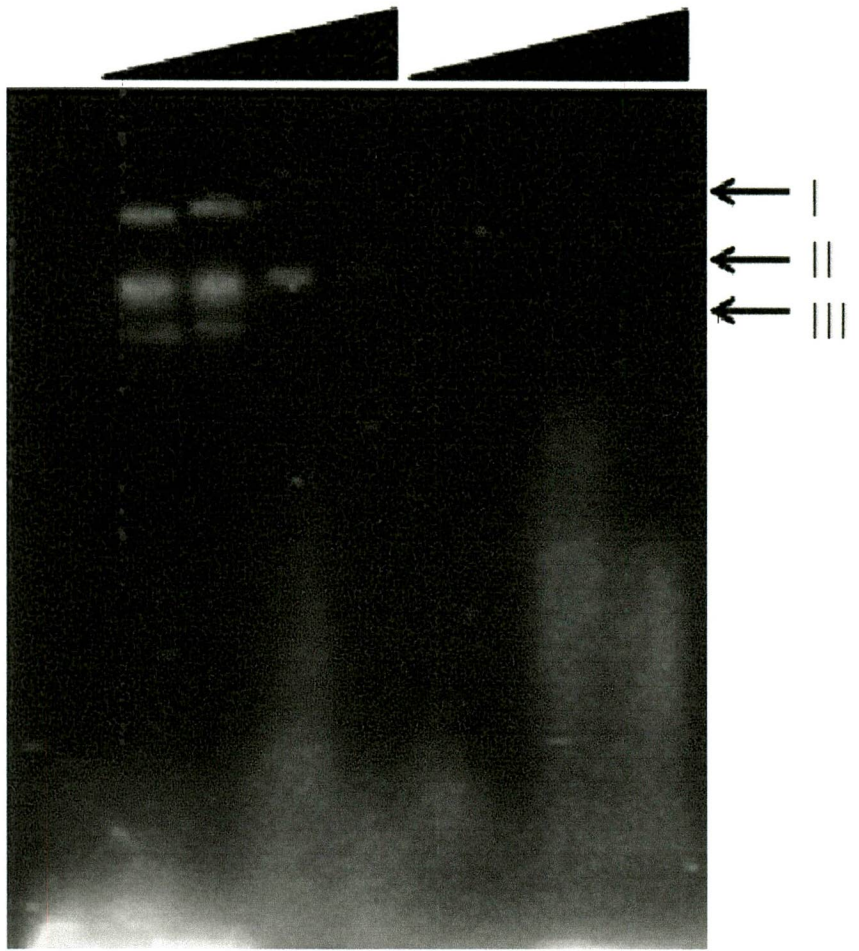
Figura 19. Ensayo de movilidad electroforética del ERE-like de *tvcp39*. EMSA en gel de agarosa teñido con Syber green. Carriles: 1. Sonda libre del ERE-like de *tvcp39*. 2. Extractos citoplasmáticos de células HeLa, incubados con el ERE-like *tvcp39*. 3. Extractos de *T. vaginalis* incubados con el ERE-like de *tvcp39*. 4. ERE-like *tvcp39* incubado con TveIF-5A recombinante precursora. 5. ERE-like *tvcp39* incubado con TveIF-5A recombinante madura. 6. ERE-like *tvcp39* incubado con TveIF-5A recombinante madura y anticuerpos anti-TveIF-5A. 7. ERE-like *tvcp39* incubado con TveIF-5A recombinante precursora y anticuerpos anti-TveIF-5A. 8. ERE-like *tvcp39* incubado con una proteína no relacionada GST. 9. ERE-like *tvcp39* incubado con extractos de *T. vaginalis* y anticuerpos anti TveIF-5A 10. ERE-like *tvcp39* incubado con extractos de *T. vaginalis* y anticuerpos no relacionado anti-Tubulina.



Sonda libre	+	-	-	-	-	-	-	-	-
ERE-like <i>tvcp39</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Extractos citoplásmaticos de <i>T. vaginalis</i>	-	-	+	-	-	-	-	+	+
Extractos citoplásmaticos de células HeLa	-	+	-	-	-	-	-	-	-
TveIF-5A madura	-	-	-	-	+	+	-	-	-
TveIF-5A precursora	-	-	-	+	-	-	+	-	-
Anticuerpo anti-TveIF-5A	-	-	-	-	-	+	+	-	+
Anticuerpo no relacionado anti-tubulina	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Proteína no relacionada GST	-	-	-	-	-	-	-	+	-

Para confirmar la interacción de TveIF-5A madura con el ERE-like de *tvcp39*, se realizaron ensayos de super retardo usando el anticuerpo anti-TveIF-5A recombinante a diferentes concentraciones (1×, 2.5×, 5×, 10× y 100×). Los resultados mostraron que los anticuerpos super retardan el complejo de la interacción ERE-like *tvcp39* y TveIF-5A madura (Fig. 20, carriles 2-5). El análisis mostró que concentraciones mayores del anticuerpo anti-TveIF-5A, disminuye la cantidad del complejo TveIF-5A-ERE-like *tvcp39*, demostrando que la interacción ERE-like *tvcp39* y TveIF-5A madura es específica. Como control del experimento se realizó la interacción ERE-like *tvcp39* y TveIF-5A precursora, usando el anticuerpo anti-TveIF-5A recombinante a diferentes concentraciones (1×, 2.5×, 5×, 10× y 100×), no se observó la formación de ningún complejo (Fig. 20, carriles 6-10).

Figura 20. Ensayo de Super retardo del ERE-like de *tvcp39* y TveIF-5A. Super retardo en gel de agarosa teñido con Syber green. Concentración molar del anticuerpo anti-TveIF-5A; carriles: 2 y 6, anti-TveIF-5A (1×); 3 y 7, anti-TveIF-5A (2.5 ×); 4 y 8, anti-TveIF-5A (5 ×); 5 y 9, anti-TveIF-5A (10×).



Sonda libre	+	-	-	-	-	-	-	-	-
ERE-like <i>tvcp39</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+
TveIF-5A madura	-	+	+	+	+	-	-	-	+
TveIF-5A precursora	-	-	-	-	-	+	+	+	+
Anticuerpo anti-TveIF-5A	-	+	+	+	+	+	+	+	+
Sonda no relacionada tRNA	-	+	+	+	+	+	+	+	+

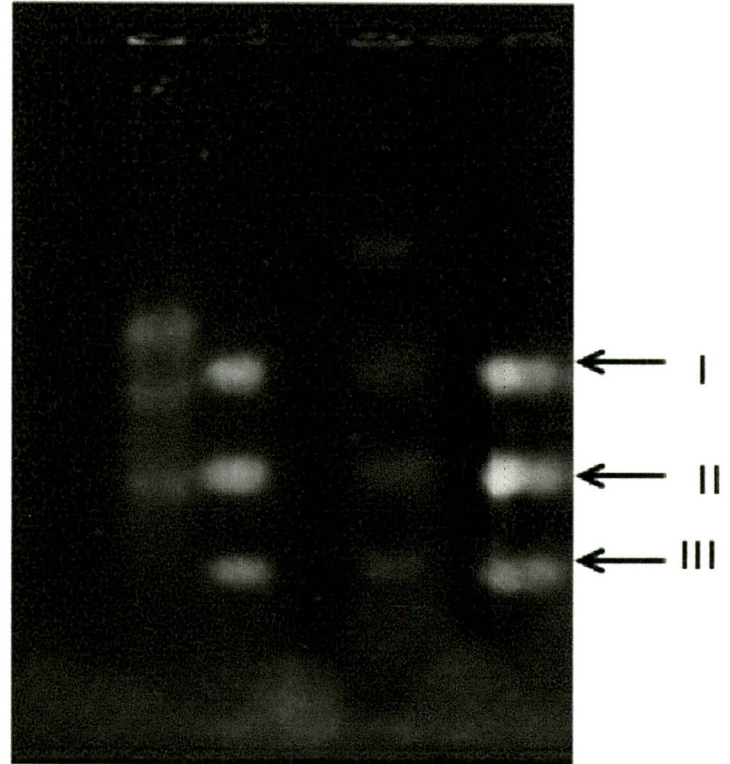
Para demostrar que la interacción TveIF-5A madura con el ERE-like de *tvcp39* es mediado por poliaminas, se realizó un ensayo de interacción usando el ERE-like *tvcp39* y extractos citoplasmáticos de *T. vaginalis* crecidas en presencia y ausencia de poliaminas. El resultado demostró que en los extractos de proteínas totales de parásitos crecidos en presencia de poliaminas se forman tres complejos de diferentes tamaños (Fig. 21, carriles 3, 5, 7), lo que sugiere que existan otras proteínas además de TveIF-5A que interaccionen con el ERE-like de *tvcp39*. De manera interesante los extractos proteicos de tricomonas crecidas e ausencia de poliaminas, no mostró la formación de ningún complejo. Este resultado demuestra que la interacción ERE-like de *tvcp39* y TveIF-5A es mediado por poliaminas (Fig. 21, carriles 4, 6).

Para analizar la posibilidad de la participación de otras proteínas en la interacción del ERE-like *tvcp39*, se realizó un ensayo de North Western en 2DE utilizando extractos citoplasmáticos de *T. vaginalis* crecidos en presencia y ausencia de poliaminas e incubados con la sonda ERE-like *tvcp39*. El resultado demostró que el ERE-like *tvcp39* interaccionó con tres proteínas incluyendo a TveIF-5A madura en presencia de poliaminas. Las proteínas reconocidas por el ERE-like de *tvcp39* tienen un pI teórico de 4.6, 5.1 y 5.7 con un peso molecular de ~18, ~22, ~24 kDa, según el análisis en PDQuest. Como control positivo se utilizó el anticuerpo anti-péptido TveIF-5A y marcadores moleculares en 2DE (Fig. 22).

Los resultados obtenidos hasta ahora nos sugieren que TveIF-5A madura podría estar involucrada en el mecanismo de regulación post-transcripcional de *tvcp39*, adicionalmente, las dos proteínas que interaccionaron con el ERE-like

tvcp39 podrían formar parte del mecanismo post-transcripcional propuesto en este trabajo, por lo cual consideramos importante identificar a estas proteínas.

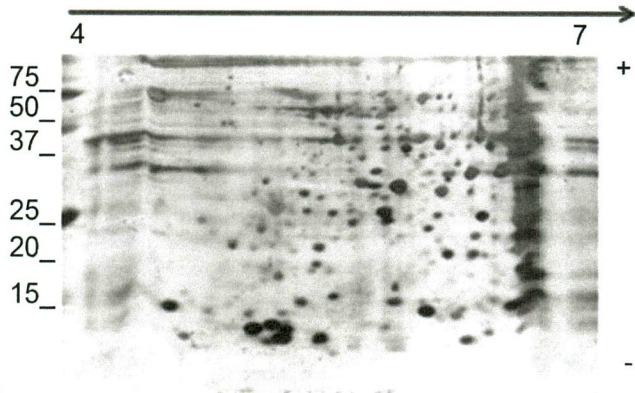
Figura 21. Ensayo de movilidad electroforética del ERE-like de *tvcp39* con extractos citoplasmáticos de *T. vaginalis* crecidas en presencia y ausencia de poliaminas. Ensayo de interacción analizado en un gel de agarosa al 1.3 % teñido con Syber green.



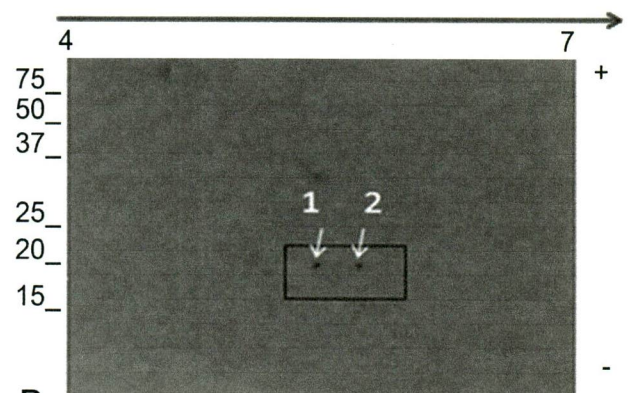
Sonda libre	+	-	-	-	-	-	-
ERE-like <i>tvcp39</i>	-	-	+	+	+	+	+
IRE-fer	+	-	-	-	-	-	-
Extractos citoplasmáticos de <i>T. vaginalis</i> crecidos en:							
Cultivo normal	-	+	+	-	-	-	-
Cultivo con DAB	-	-	-	+	+	+	-
Cultivo con DAB y transferidos a putrescina exógena	-	-	-	-	+	-	-
Cultivo con DAB y transferidos a medio normal	-	-	-	-	-	+	-
Cultivo normal y transferidos a putrescina exógena	-	-	-	-	-	-	+

Fig. 22. Ensayo de North Western de extractos de proteínas totales de *T. vaginalis* crecidas en presencia y ausencia de poliaminas utilizando como sonda el ERE-like de *tvcp39* biotinilado. A. Proteoma de *T. vaginalis*, analizado en geles SDS-PAGE al 15% teñido con plata. B. Western blot del gel duplicado (A), usado como control, en el recuadro se muestran las dos manchas inmunodetectadas con el anticuerpo anti-péptido TveIF-5A. C. North Western blot del gel duplicado (A). D. North Western blot de los parásitos tratados con DAB. E. North Western blot de parásitos tratados con DAB y transferido a putrescina exógena, en el recuadro se muestran las manchas detectadas. F. Western blot del extracto de proteínas totales de parásitos tratados con DAB y transferidos a putrescina exógena, en el recuadro se muestran las manchas inmunodetectadas con el anticuerpo anti-péptido TveIF-5A.

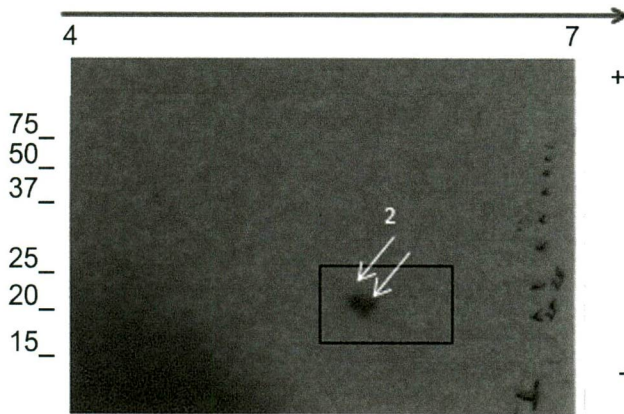
A.



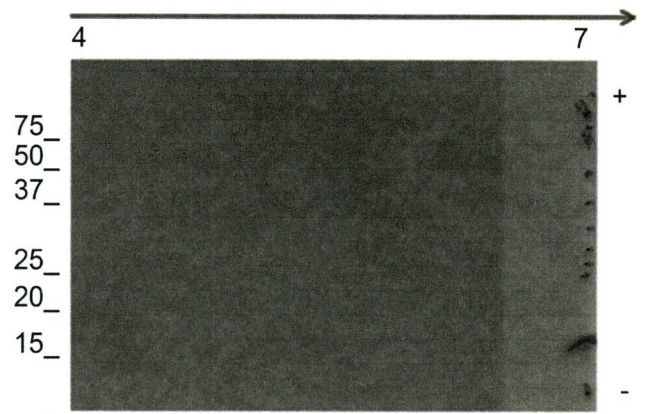
B.



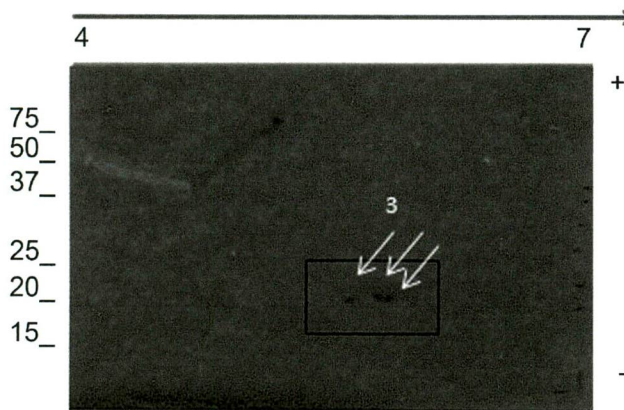
C.



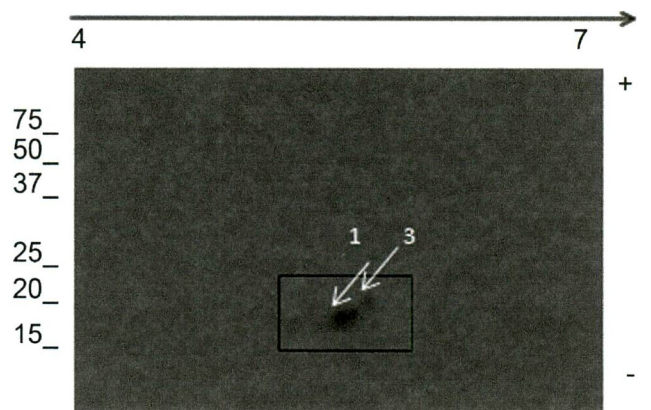
D.



E.



F.



IX. Discusión

En el genoma de *T. vaginalis* se identificaron ~ 800 proteínas que participan en la citoadherencia, citotoxicidad y que se encuentran en la membrana del parásito, algunas de estas moléculas ya están reportadas y descritas como son cinco adhesinas (Lehker y col., 1991; Alderete y col., 2000; García y col., 2003; Moreno-Brito y col., 2005) y diferentes cisteín proteinasas como la CP de 30 kDa, CP de 39 kDa y la CP de 65 kDa (Álvarez-Sánchez y col., 2000; Hernández-Gutierrez y col., 2004; Carlton y col., 2007; Ramón-Luing y col., 2011). En este trabajo de investigación reportamos la regulación positiva mediada por el metabolismo de poliaminas en TvCP39, en los niveles de transcrito de *tvcp39*, actividad proteolítica, cantidad y localización de TvCP39. Estos resultados correlacionaron con los previamente descritos para TvCP65, en donde se muestra que el metabolismo de poliaminas, la cual se encuentra directamente relacionada con la regulación de los niveles de transcrito de *tvcp65*, actividad proteolítica y cantidad de TvCP65 (Alvarez-Sánchez y col., 2008). Estudios previos han mostrado una estrecha relación entre la citotoxicidad de *T. vaginalis* hacia las celuas HeLa y las poliaminas, debido a la alta concentración de putrescina y cadaverina (2.37 mM) presente en el flujo vaginal de mujeres con tricomonosis, comparada con mujeres sanas las cuales presentan concentraciones indetectables de estas poliaminas (Yarlett y col., 2000).

Nuestros resultados de inmunolocalización e inmunodetección de TvCP39 mostraron que esta proteína en presencia de poliaminas se localiza en el

citoplasma (Hérendez-Gutiérrez y col., 2004) y en la región nuclear, esta localización es poco usual para una proteinasa, cabe mencionar que su papel funcional en núcleo es desconocida, reportes recientes de la cistein proteinasa 4 de *Entamoeba histolytica* (EhCP4), la cual juega un papel importante en la disrupción de la barrera epitelial del colon y como un factor de virulencia durante la invasión, menciona que se encuentra localizada en vesículas citoplásmicas, en la región nuclear y en la región periférica del retículo endoplasmico (ER) (He y col., 2010). La localización nuclear de proteinasas también se ha observado en otras proteinasas como la catepsina L y B, la catepsina L participa en el corte proteolítico del N-terminal de la histona 3 (H3) (Duncan y col., 2008). Esta proteinasa originalmente se describió como una proteinasa lisosomal (Barrett y col., 2003), sin embargo, se ha propuesto que en núcleo podría participar en la regulación cromosomal durante el procesamiento proteolítico del factor de transcripción CDP/Cux and H3 (Goulet y col., 2004; Duncan y col., 2008). Serpina A3G (SpiA3G) es una proteinasa que induce la maduración de los macrófagos y se encuentra localizada en el núcleo. Ha sido sugerido que la localización nuclear de estas proteinasas podrían ser debido a que están involucradas en papel importantes como es la regulación del ciclo celular (G1/S), replicación del DNA, ensamble cromosomal, así como a la activación o desactivación de factores de transcripción (Goulet y col., 2004; Duncan y col., 2008). Sin embargo más estudios deben ser realizados para confirmar por inmunofluorecencia esta localización nuclear.

Las poliaminas son cationes que se caracterizan por su capacidad a unirse a macromoléculas (DNA, RNA, proteínas, etc). De esta manera pueden regular

diversas propiedades importantes a nivel celular como son: replicación, transcripción, traducción, modificaciones post-traduccionales, maduración de proteínas, entre muchas otras (Igarashi y Kashiwagi., 2009). La inhibición de la biosíntesis de poliaminas mediante el uso de DAB, resultó en la disminución de la expresión de los transcritos de *tveif-5a* y *tvcp39* así como en la cantidad de TveIF-5A madura, este efecto únicamente fue revertido al utilizar 40 mM de putrescina exógena, esta concentración fue necesaria para revertir el efecto de 20 mM de DAB que disminuye ~90% de los niveles de putrescina intracelular y disminuye el crecimiento del parásito (Reis y col., 1999; García y col., 2005).

Espermina y espermidina en las concentraciones analizadas no mostraron un efecto de recuperación en el crecimiento del parásito. Estos datos sugieren que la putrescina es necesaria para restablecer los niveles de expresión de *tveif-5a* y *tvcp39*, lo cual es consistente con el papel regulatorio de las poliaminas en la expresión de ciertos genes, las poliaminas pueden regular positivamente o negativamente la expresión de genes como: *c-fos*, *c-jun*, *p53*, *p21*, and *c-myc* (Wang y col., 1993; Li y col., 1999; Patel y col., 1997; Liu y col., 2005; Chen y col., 2007). Las poliaminas están implicadas en la regulación de la expresión del receptor *toll-like 2* (TLR2). También se reportó que la inhibición de las poliaminas, disminuye significativamente los niveles del RNAm de *TLR2*, así como la cantidad de la proteína TLR2 en células tratadas con el inhibidor de la biosíntesis de poliaminas DL- α -difluoromethylornithine (DFMO). De manera interesante 40 mM de putrescina exógena restauró la expresión del transcrito de TLR2 y la cantidad de proteína, lo cual demuestra que la putrescina es esencial para la expresión y cantidad de proteína de TLR2. Sin embargo, el mecanismo por el cual ocurre aun

se desconoce (Chen y col., 2007). Por otra parte, la inhibición de la biosíntesis de poliaminas en una línea de carcinoma mamario de ratón (FM3A) disminuye la cantidad de la proteína eIF-5A (Nishimura y col., 2005). Este efecto es similar al observado para *tvcp39* y *tveif-5a* en *T. vaginalis*. Adicionalmente, la inhibición de S-adenosilmetionina decarboxilasa de *Plasmodium falciparum* resulta en la disminución de la parasitemia, posiblemente debido a la disminución en la cantidad de eIF-5A madura (Kaiser y col., 2003; Blavid y col., 2010).

Por otra parte, la estabilidad del RNAm de *tveif-5a* y *tvcp39* disminuyó en presencia de poliaminas y fue restaurada al adicionar putrescina exógena, lo cual demuestra que la estabilidad de estos transcritos es mediado por poliaminas. El mecanismo involucrado en la regulación de genes mediado por poliaminas es desconocido en *T. vaginalis*. Sin embargo, se ha propuesto que el RNAm de *cox-2* es regulado a través de las poliaminas por eIF-5A dependiente de poliaminas mediante la unión al ERE del 3'UTR (Parker y col., 2002). En este estudio caracterizamos el 3'UTR de *tvcp39* el cual presentó una secuencia ERE atípica que forma una estructura tallo-burbuja, la cual presenta dos cambios de nucleótidos con respecto a la secuencia consenso reportada en el 3'UTR de *cox-2* y en trabajos anteriores (Parker y col., 2002; Xu y col., 2000; 2001; Ramón-Luing y col., 2011). Estos resultados concuerdan con reportes previos en donde se sugiere que puede haber cambios en la secuencia ERE hasta en tres nucleótidos (Xu y col., 2004). Mediante ensayo de evolución sistemática de ligandos por enriquecimiento exponencial (SELEX) se ha sugerido la importancia de la secuencia EREs al haber encontrado ~800 RNAm, que presentan dicha secuencia. Ha sido propuesto que estos genes están involucrados en propiedades

importantes a nivel celular (Xu y col., 2004), por lo que a partir de nuestros resultados se puede sugerir que podría existir un mecanismo de regulación post-transcripcional en *tvcp39* y en *tveif-5a* semejante al propuesto para el gen *cox-2*.

Por otra parte, la inhibición de la putrescina usando 20 mM de DAB disminuye la estabilidad del RNAm de *tveif-5a* y reduce la cantidad de TveIF-5A madura, este efecto fue restaurado al adicionar 40 mM de putrescina exógena. eIF-5A es conocida como una proteína dependiente de poliaminas debido a que requiere de espermidina para llevar a cabo su modificación post-traducciona llamada hipusinación (Park y col., 1997) y para regular los niveles de *tveif-5a*. De manera interesante, parásitos tratados con DAB y cicloheximida mostraron una disminución en la cantidad de TveIF-5A madura, lo que sugiere que la putrescina es necesaria para que se lleve a cabo la hipusinación de TveIF-5A.

En *P. falciparum*, la disminución en la concentración de poliaminas disminuyó la cantidad de eIF-5A madura (Blavid y col., 2010), estudios previos en células FM3A con suero fetal bovino y 2 µg/ml de cicloheximida no mostraron cambios en la cantidad de eIF-5A, en contraste, la inhibición de la traducción de TveIF-5A con cicloheximida mostró una disminución en la cantidad de la proteína madura y la forma precursora, la cual permaneció estable hasta las 24 h. Este resultado correlaciona con la alta demanda de poliaminas en la patogénesis de ciertos parásitos (Muller y col., 2008) y debido a esto se ha propuesto que los inhibidores de ODC podrían ser buenos agentes quimioterapéuticos (Igarashi y Kashiwagi., 2000; Casero y col., 2007; Wallace y col., 2004; Blavid y col., 2010; Muller y col., 2008).

En *T. vaginalis* la poliaminas regulan algunas propiedades de virulencia como la citoadherencia. En parásitos crecidos en presencia de DAB la adhesión aumenta 20 veces más con respecto al control (García y col., 2005). De esta manera no es de sorprender que la inhibición del metabolismo de las poliaminas también tenga correlación con otra propiedad de virulencia en *T. vaginalis* como la citotoxicidad a través de TvCP65 y TvCP39 afectando la habilidad de *T. vaginalis* para ocasionar daño a las células HeLa (Alvarez-Sánchez y col., 2008).

Mediante el uso del sistema eucariontes de *S. cerevisiae* se obtuvo la proteína recombinante TveIF-5A madura. Reportes anteriores mostraron la obtención de eIF-5A madura de humano mediante un sistema eucarionte de levadura, esta proteína fue capaz de reconocer la secuencia ERE consenso (AAATGTACAC) (Xu y col., 2001).

Recientemente reportamos la presencia de dos genes *tveif-5a* que codifican para una proteína de 19 kDa. Mediante ensayos de Western blot utilizando anticuerpos anti-péptido TveIF-5A se inmunodetectaron dos proteínas de 19 y 20 kDa, las cuales podrían corresponder a la formas precursora y madura respectivamente (Carvajal-Gamez y col., 2010). eIF-5A sufre una modificación post-traducciona específica llamada hipusinación, la cual le proporciona actividad biológica a la proteína (Park., 1989), esta modificación es irreversible y es llevada a cabo en segundos (Kang y col., 1999). La hipusinación consta de dos pasos enzimáticos, en el primer paso participa la enzima DHS, la cual se expresa en *T. vaginalis* (Park y col., 1989; Quintas-Granados y col., 2011, en revisión) y puede ser responsable de la hipusinación de la proteína precursora TveIF-5A *in vivo*. El segundo paso es llevado a cabo por la enzima DOHH, la cual hidroxila un carbono

del 4-aminobutil de la lisina, sin embargo, este gen está ausente en *T. vaginalis*, lo cual sugiere una bifuncionalidad en DHS de este parásito (Quintas-Granados y col., 2011, en revisión). Este paso enzimático en algunos organismos como en la levadura no es indispensable para la hipusinación., por ejemplo, *S. cerevisiae* mutante del gen *dohh* es viable y tiene una tasa de crecimiento semejante a *S. cerevisiae* silvestre, sugiriendo que DHS es suficiente para llevar a cabo la hipusinación (Thompson y col., 2003; Park y col., 2010). Por otra parte, la inactivación de DOHH es letal para eucariontes multicelulares como *Caenorhabditis elegans* (Bartig y col., 1990) y *Drosophila melanogaster* (Schnier y col., 1991). eIF-5A y DHS son esenciales en arqueas, sugiriendo que el primer paso de la modificación de la lisina a deoxihipusina es esencial (Joe y col., 1995), aunque ciertas arqueas continenen hipusina, y otras contienen unicamente deoxihipusina (Wolff y col., 1997). Aparentemente ciertas cyanobacteria, myxobacteria, *Thermus*, *Chlorobium*, *Rhodopirellula*, *Bdellovibrio*, *Zymomonas*, *Caulobacter* y *Cytophaga* contienen DHS que pudo haber sido adquirida mediante transferencia lateral de arqueas (Weir y col., 2004).

En este trabajo realizamos la hipusinación *in vitro* utilizando a TvDHS y TveIF-5A precursora como sustrato, este resultado sugiere que TvDHS es suficiente para llevar a cabo la hipusinación en *T. vaginalis*. En general, la DHS tiene sitios específicos de unión para sus sustratos, incluyendo el sitio de reconocimiento del residuo de lisina de TveIF-5A precursora (Joe y col., 1994), requiere NAD^+ como cofactor (Wagner y col., 2007; Joe y col., 1995), necesario para la formación del complejo TvDHS-TveIF-5A. Esto sugiere que esta reacción es NAD^+ - dependiente. Estos resultados concuerdan con los reportados en DHS

de *Nicotiana crassa* el cual une sustratos de manera NAD⁺-dependiente (Klier y col., 1995; Lee y col., 1999). En contraste la DHS de humano no requiere de NAD⁺ para la unión con eIF-5A. De manera interesante, aun en ausencia de espermidina, mostró la formación del complejo TvDHS-TveIF-5A, NAD⁺-dependiente, sugiriendo que la interacción es espermidina independiente. Estudios previos han mostrado que el NAD⁺ cataliza el corte de la espermidina en ausencia de eIF-5A precursora (Joe y col., 1995; Wagner y col., 1997), sin embargo, no encontramos cambios en la migración de TvDHS en presencia de espermina y NAD⁺, sugiriendo que TvDHS une NAD⁺ o espermidina independientemente de la unión con TveIF-5A. Por otra parte la reacción completa (TvDHS, TveIF-5A, NAD⁺ y espermidina), mostró una banda con diferente patrón de migración en el gel nativo que sugiere corresponder al producto intermediario mejor conocido como TveIF-5A deoxihipusinado, lo cual ha sido descrito previamente como deoxihipusina [*N*⁶-(4-aminobutil)lisina] (Schnier y col., 1991; Kaiser y col., 1999). Sin embargo, TveIF-5A intermediaria solo se obtuvo en el gel nativo inmediatamente después de dos pasos cromatográficos y esta forma no pudo ser obtenida en el gel de 2DE, probablemente por la rápida transformación a TveIF-5A madura. Este mismo efecto fue observado con la DHS de rata, en donde la forma intermediaria es rápidamente modificada a su forma madura. De manera interesante la forma intermediaria de TveIF-5A fue observada en extractos de proteínas totales crecidos en presencia de DAB 24 h y transferidos a un medio con putrescina exógena, sugiriendo que las poliaminas juegan un papel importante en la modificación post-traducciona l de TveIF-5A, debido a que el pI y peso molecular son diferentes a las proteínas previamente reportadas (Carvajal-Gamez y col.,

2010). Estos datos concuerdan con los reportados en *P. falciparum* (PfeIF-5A) (Foth y col., 2008), *S. cerevisiae* (eIF-5Ab) (Kang y col., 1993), y *D. melanogaster* (eIF5A) (Gordon y col., 1987), en el cual hay dos variantes de eIF-5A, no modificada e hipusinada. Además, en *P. falciparum* se han detectado tres isoformas distintas de eIF-5A observadas en el proteoma de este parásito en fase eritrocítica la cual se caracteriza por ser rica en poliaminas (Foth y col., 2008). Sin embargo a estas tres isoformas no se les identificaron sus modificaciones post-traduccionales.

Los métodos típicos para determinar la deoxihipusinación incluye la determinación de radioactividad de la hipusina posterior a la separación de eIF-5A precursora y madura después de la cromatografía de intercambio iónico, mediante la unión del carbono 4-aminobutil de la espermidina previamente marcada radioactivamente por precipitación con TCA y determinación de radioactividad de eIF-5A mediante SDS-PAGE o por cromatografía líquida (Park., 1989; Kaiser y col., 2011). En este trabajo reportamos un método no radioactivo para determinar el residuo de hipusina por ESI-MS/MS y ESI/QUAD/TOF.

eIF-5A madura es conocida como una proteína multifuncional debido a su múltiples funciones a las que ha sido relacionada (Parker y col., 2002; Sheng y col., 1997; Xu y col., 2001). Esta proteína es capaz de unirse a secuencias específicas denominadas elementos de respuesta a eIF-5A (ERE) localizados en el 3'UTR de los RNAm (Xu y col., 2000; 2001; Parker y col., 2002). Por esta razón no es de sorprender que se observen más de tres complejos en la interacción entre el ERE-like de *tvcp39* y *cox-2* utilizando extractos de *T. vaginalis* y células HeLa respectivamente. Estos resultados apoyan la propuesta de la posible

interacción de TveIF-5A madura con algunos RNAm *in vivo*. De acuerdo a nuestros resultados TveIF-5A hipusinada *in vitro* interacciona con el ERE de *cox-2* y *tvcp39*, indicando que la hipusina se requiere para la interacción secuencia-específica de TveIF-5A madura con la estructura tallo-burbuja del ERE. En contraste eIF-5A precursora no fue capaz de unirse al ERE de *cox-2*, confirmando que la hipusina es esencial para la actividad biológica de esta proteína (Park., 1989). Adicionalmente, la hipusinación *in vitro* causó un corrimiento en el segundo pico de elución observado en el cromatograma, lo cual indica la elución de TveIF-5A madura a un *pI* diferente al de la TveIF-5A precursora. Este efecto particular en el corrimiento en el pico de elución del cromatograma fue reportado para la síntesis de deoxihipusina en eIF-4D de células CHO (Park., 1989). En adición, después de la cromatografía de intercambio iónico, nosotros obtuvimos una menor cantidad de TveIF-5A precursora. El análisis del mapeo peptídico de TveIF-5A precursora y madura concuerdan con reportes previos, que indican que la tripsina es capaz de cortar en el residuo de lisina donde se lleva a cabo la hipusinación en TveIF-5A precursora pero no en TveIF-5A madura debido a la hipusinación (Park y col., 1981).

Actualmente, una de las modificaciones post-traduccionales más específica es la hipusinación en eIF-5A precursora (Yan y col., 1989), la cual ocurre en un residuo específico de lisina, localizada en una región conservada (Park y col., 2010), la cual fue encontrada en TveIF-5A (Carvajal-Gamez y col., 2010), sugiriendo la importancia de esta región para una función celular fundamental y la especificidad de DHS. Ambas proteínas son altamente conservadas sugiriendo un papel fundamental al nivel celular (Park y col., 2001).

Otras modificaciones post-traduccionales también se encontraron en TveIF-5A, las cuales son observadas como cambios en su peso molecular y pl. A este respecto nuestros datos muestran que TveIF-5A madura presenta O-glicosilaciones y fosforilaciones en serina y tirosina. Estos resultados concuerdan con el análisis bioinformático. La fosforilación en serina en TveIF-5A es similar a la reportada para ZmeIF5A de maíz (Lebska y col., 2010) y *S. cerevisiae* (eIF-5Ab) (Kang y col., 1993) este residuo es potencialmente fosforilado por una proteína cinasa (CK2). Interesantemente, mutaciones puntuales en este residuo de serina en ZmeIF5A (Ser2Ala y Ser4Ala) and eIF-5Ab es incapaz de ser fosforilado por CK2 (Lebska y col., 2010). La secuencia del N-terminal de eIF-5A de plantas (*Oriza sativa*, *Arabidopsis thaliana*, maize) contiene una secuencia consenso para CK2 ((S/T) XXZ, S/T es serina o treonina, X - ningún- amino ácido básico, y Z – un amino ácido ácido o fosforilado), sugiriendo que esta enzima puede estar involucrada en la regulación de fosforilación (Lenska y col., 2010). En *T. vaginalis* esta secuencia consenso está presente en el N-terminal (MSSAEEEEV), sugiriendo que TveIF-5A puede ser fosforilada en Ser2, la cual afecta el pl pero no su actividad (Kang y Hershey., 1994; Kang y col., 1993). Por el contrario ninguna evidencia bioquímica sobre la glicosilación en eIF-5A ha sido reportada en otros organismos (Kang y col., 1993; Schnier y col., 1991), esta modificación en TveIF-5A puede ser responsable de las diferencias en peso molecular de TveIF-5A precursora y madura observadas en este estudio. Reportes previos, muestran que la estabilidad de eIF-5A puede ser larga (Nishimura y col., 2005), lo cual podría deberse a la presencia de glicosilaciones. Esta modificación post-traduccional influencia el correcto plegamiento de la proteína y proporciona estabilidad y

resistencia a proteinasas (Gordon y col., 1987). Las características bioquímicas en cuanto a la diferencia de pI de eIF-5A precursora y madura fue vista en extractos proteicos de células de ovario de hámster chino (CHO) en *S. cerevisiae* en presencia de poliaminas (Park., 1989; Schnier y col., 1991). En este estudio, mostramos que la presencia de putrescina cambia el pI de TveIF-5A. Estos datos sugieren que las poliaminas juegan un papel esencial en la modificación post-traducciona de TveF-5A, además de permitir diferenciar por peso molecular y pI las diferentes formas de TveIF-5A; la forma intermediaria contiene un residuo de deoxihipusina en *T. vaginalis*. Sin embargo, la forma intermediaria fue solo detectada en tricomonas crecidas en presencia de DAB y transferidas a un medio adicionado con putrescina exógena. Este resultado puede ser debido a la rápida transferencia del carbon amino butil de la espermidina. Estos resultados son consistentes con reportes en *Plasmodium falciparum* eIF-5A (PfeIF-5A) (Blavid y col., 2010; Foth y col., 2008), *S. cerevisiae* (eIF-5Ab) (Gordon y col., 1987; Kang y Hershey 1994), y *Drosophila melanogaster* (eIF5A) (Gordon y col., 1987), en el cual dos variantes isoeléctricas de eIF-5A precursora y madura. Estos resultados son soportados por la observación de que la hipusinación es irreversible, por este motivo influencia el pI de eIF-5A madura.

En tobacco (NeIF-5A), se reportó un doblete de 18- y 21-kDa en todos los tejidos con intensidad idéntica mediante Western blot en extractos de proteínas totales el cual podría deberse a modificaciones post-traduccionales en eIF-5A, como fosforilaciones, glicosilación e hipusinación (Chamot y Kuhlemeier., 1992). Estas modificaciones post-traduccionales juegan un papel esencial en la regulación de la actividad de eIF-5A durante el ciclo de vida de *Plasmodium*. En

este trabajo se sugiere que los eventos post-traduccionales en TveIF-5A influencia el peso molecular y pl.

X. Conclusion.

La biosíntesis de putrescina es necesaria para la estabilidad y expresión de *tvcp39* y *tveif-5a*, así como de la maduración de TveIF-5A. La presencia del ERE-like en el 3'UTR de *tvcp39* y su interacción con TveIF-5A madura, sugiere la participación de un mecanismo de regulación post-transcripcional mediado por poliaminas.

XI. Perspectivas.

- ❖ Determinar las proteínas que interaccionan con TveIF-5A.
- ❖ Identificar y caracterizar las proteínas que interaccionan con TveIF-5A y el 3'UTR de *tvcp39*.
- ❖ Determinar la función de eIF-5A en *T. vaginalis*.
- ❖ Determinar genes regulados por poliaminas que contengan una secuencia ERE.

XII. Referencias Bibliografías

ALDERETE JF Y GARZA GE. 1985. Specific nature of *Trichomonas vaginalis* parasitism of host cell surfaces. Infect. Immun. 50, 701.

ALDERETE JF Y GARZA GE. 1988. Identification and properties of *Trichomonas vaginalis* proteins involved in cytoadherence. Infect Immun. 56, 28.

ALDERETE JF Y PEARLMAN E. 1984. Pathogenic *Trichomonas vaginalis* cytotoxicity to cell culture monolayers. Br J Vener Dis. 60, 99.

ALDERETE JF, BENCHIMOL M, LEHKER MW, CROUCH ML. 2002. The complex fibronectina *Trichomonas vaginalis* interactions and tricomonosis. Parasitol Int. 51, 285.

ALDERETE JF, CROUCH ML AND ARROYO R. 2004. Mecanismos de patogénesis de la tricomonosis: La enfermedad de transmisión sexual no viral número uno causada por *Trichomonas vaginalis*. La frontera: genética molecular de la enfermedad. Capítulo 6. Tomo I. Editado por Luna-Arias J.P Y Orozco-Orozco E. Editorial IPN México. 167.

ALVAREZ-SÁNCHEZ E, CARVAJAL-GAMEZ BI, SOLANO-GÓNZALEZ E, GARCÍA A, ALDERETE J, ARROYO R. 2008. Polyamines Depletion Down-regulated Gene Expression of the *Trichomonas vaginalis* Cytotoxic 65 kDa CP65 Cystein Proteinase. J. Biochem. Cell. 10, 1016.

ALVAREZ-SANCHEZ ME, AVILA-GONZALEZ L, BECERRIL-GARCIA C, FATTELFACENDA LV, ORTEGA-LOPEZ J, ARROYO R. 2000. A novel cysteine

proteinase (CP65) of *Trichomonas vaginalis* involved in cytotoxicity. Microbial Pathogenesis. 28,193.

ÁLVAREZ-SÁNCHEZ ME, SOLANO-GONZÁLEZ E, YAÑEZ-GÓMEZ C, ARROYO R. 2007. Negative iron regulation of the CP65 cysteine proteinase cytotoxicity in *Trichomonas vaginalis*. Microbes Infect. 14, 1597.

ANORLU RI, FAGBENRO-BEYIOKU AF, FAGORALA T. 2001. Prevalence of *Trichomonas vaginalis* in patients with vaginal discharge in Lagos Nigeria. Nigeria Postgrad. Med. J. 8, 183.

ARROYO R Y ALDERETE JF. 1989. *Trichomonas vaginalis* surface proteinase activity is necessary for parasite adherence to epithelial cells. Infect Immun. 57, 2991.

ARROYO R, GONZÁLEZ-ROBLES A, MARTÍNEZ-PALOMO, ALDERETE JF. 1993. Signalling of *Trichomonas vaginalis* for ameboid transformation and adhesion synthesis follows cytoadherence. Mol. Microbiol. 2, 299.

ARROYO R. 2000. Biología molecular de la tricomonosis. Genética y Biomedicina Molecular. Edit. Limusa, Noriega. 19, 287.

ARROYO R, ENGBRING J, ALDERETE JF. 1992. Molecular basis of host epithelial cell recognition by *Trichomonas vaginalis*. Mol. Microbiol. 6, 853.

BEACH DH, HOLZ GJR, SINGH BN, LINDMARK DG. 1990. Fatty acid and sterol metabolism of cultured *Trichomonas vaginalis* and *Tritrichomonas foetus*. Mol Biochem Parasitol. 38, 175.

BEACH DH, HOLZ GG, SINGH BN, AND LINDMARK DG. 1990. Fatty acid and sterol metabolism of cultured *Trichomonas vaginalis* and *Tritrichomonas foetus*. Mol. Biochem. Parasitol. 38, 175.

BEACH DH, HOLZ GGJR, SINGH BN, LINDMARK DG. 1991. Phospholipid metabolism of cultured *Trichomonas vaginalis* and *Tritrichomonas foetus*. Mol Biochem Parasitol. 44, 97.

BLAVID R, KUSCH P, HAUBER J, ESCHWEILER U, RAMADAN S, SPECHT S, DEININGER S, HOERAUF A, KAISER A. 2010. Down-regulation of hypusine biosynthesis in plasmodium by inhibition of S-adenosyl-methionine-decarboxylase. Amino Acid. 38, 461.

BOTTENTUIT LL, BANDEIRA-DE MELO BM, ORTEGA-LÓPEZ J, ARROYO R AND COSTA E SILVA FF. 2000. Strategies by which some Pathogenic Trichomonads integrate Diverse Signals in the Decision-making Process. An. Acad. Bras. Ci. 17, 185.

BOZNER P. 1997. Immunological detection and subcellular localization of Hsp70 and Hsp60 homologs in *Trichomonas vaginalis*. J. Parasitol. 83, 224.

CARLTON JM, HIRT RP, SILVA JC, DELCHER AL, SCHATZ M, ZHAO QI, WORTMAN JR, BIDWELL LS, ALSMARK U. CECILIA M, BESTEIRO SÉBASTIEN, SICHERITZ-PONTEN T, CHRISTOPHE NJ, DACKS JB, FOSTER PG, CEDRIC S, YVES VP, MIRANDA-SAAVEDRA D, BARTON GJ, WESTROP GD, MÜLLER S, DESSI D, FIORI PL, QINGHU R, PAULSEN I, ZHANG H, BASTIDA-CORCUERA FD, SIMOES-BARBOSA A, BROWN MT, HAYES RD, MUKHERJEE M, OKUMURA CY, SCHNEIDER R, SMITH A, VANACOVA S, VILLALVAZO M, HAAS BJ, PERTEA M, FELDBLYUM TV, UTTERBACK TR, SHU CL, OSOEGAWA K, DE JONG PJ, HRDY I, HORVATHOVA L, ZUBACOVA Z, DOLEZAL P, MALIK SB, LOGSDON JR JM, HENZE K, GUPTA A, WANG CC, DUNNE RL, UPCROFT JA UPCROFT P, WHITE O, SALZBERG SL, TANG P,

CHIU C, LEE YS, EMBLEY TM, COOMBS GH, MOTTRAM JC, TACHEZY J, FRASER-LIGGETT CM, JOHNSON PJ. 2007. Draft Genome Sequence of the Sexually Transmitted Pathogen *Trichomonas vaginalis*. *Science*. 315, 207.

CARVAJAL-GAMEZ B, ARROYO R, LIRA R, LÓPEZ-CAMARILLO C, ALVAREZ-SÁNCHEZ ME. 2010. Identification of two novel *Trichomonas vaginalis eif-5a* genes. *Infection, Genetics and Evolution*.10, 284.

CASERO JRRA, MARTON LJ. 2007. Targeting polyamines metabolism and function in cancer and other hyperproliferative diseases. *Nat Rev Drug Discov*.6, 373.

CELANO PS, STEPHEN BB AND CASERO RA. 1989. Polyamines Differentially Modulate the Transcription of Growth associated Genes in Human Colon Carcinoma Cells. *J. Biol. Chem*. 264, 15.

CHAMOT D, KUHLEMEIER C. 1992. Differential expression of genes encoding the hypusine-containing translation initiation factor, eIF-5A, in tobacco. *Nucleic Acids Research*. 20,665.

CHAN KL, GHANDHI NEW D, WONG FS, LAM CMC, AND WONG JTY. 2001. Transcript levels of the eukaryotic translation initiation factor 5A gene peak at early G1 phase of the cell cycle in the Dinoflagellate *Cryptothecodinium cohnii*, *App. Enviro. Microbiol*. 22, 2284.

CHATTOPADHYAY MK, TABOR CW, TABOR H. 2003. Spermidine but not spermine is essential for hypusine biosynthesis and growth in *Saccharomyces cerevisiae*: spermine is converted to spermidine *in vivo* by the FMS1-amine oxidase. *Proc Natl Acad Sci*. 24, 13869.

- CHEN J, RAO JN, ZOU T, LIU L, MARASA BS, XIAO L, ZENG X, TURNER DJ, WANG JY. 2007. Polyamines are required for expression of Toll-like receptor 2 modulating intestinal epithelial barrier integrity. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 293,568.
- COOMBS GH, NORTH YM. 1983. An analysis of the proteinases of *Trichomonas vaginalis* by acrylamide gel electrophoresis. *Parasitol.* 86,16.
- COSTMAGNA SR Y PRADO FM. 2001. On the ultrastructure of *Trichomonas vaginalis*: cytoskeleton, endocytosis and hydrogenosomes. *Parasitol.* 10,108.
- COTCH MF, PASTOREK IJG, NUGENT RP, HILLIER SL, GIBBS RS, MARTIN DH. 1997. *Trichomonas vaginalis* associated with low-birth weight and preterm delivery. The vaginal infections and Prematurity Study Group. *Sex Transm Dis.* 24,353.
- DAILEY DC Y ALDERETE JF. 1991. The Phenotypically Variable Surface Protein of *Trichomonas vaginalis* Has a Single, Tandemly Repeated Immunodominant Epitope. *Infect. And Immun.* 59, 6.
- DIAMOND LS. 1957. The establishment of various Trichomonads of animals and man in axenic cultures. *The Journal of Parasitology.*43,488.
- DYALL SD, YAN W. DELGADILLO-CORREA MG, LUNCEFORD A. LOO J.A, CLARKE CF, JONSON PJ. 2005. Non-mitochondrial complex I proteins in a Hydrogenosomal oxidoreductasa complex. *Nature.* 434, 29.
- ESPINOSA N, HERNÁNDEZ R, LÓPEZ-GRIEGO L, LÓPEZ-VILLASEÑOR I. 2002. Separable putative polyadenylation and cleavage motifs in *Trichomonas vaginalis* mRNAs. *Gene.* 1, 289.

ESTADÍSTICA DE LAS ETS A NIVEL MUNDIAL SEGÚN LA OMS. Se puede encontrar en:

FOTH B, ZHANG N, MOK S, PREISER P, BOZDECH Z. 2008. Quantitative protein expression profiling reveals extensive post-transcriptional regulation and post-translational modifications in schizont-stage malaria parasites. *Genome Biology*.9,R177.

GARCIA AF, BENCHIMOL M, ALDERETE JF. 2005. *Trichomonas vaginalis* polyamine metabolism is linked to host cell adherence and cytotoxicity. *Infect Immun*.73,2602.

GARCÍA AF, CHANG TH, BENCHIMOL M, JICHAEL KD, LEHKER MW AND ALDERETE JF. 2003. Iron and contact with host cells induce expression of adhesins on surface of *Trichomonas vaginalis*. *Mol. Microb.* 47, 5.

GERNER EW, MAMONT PS, BERNHARDT A, SIAT M. 1986. Post-translational modification of the protein-synthesis initiation factor eIF-4D by spermidine in rat hepatoma cells. *Biochem J.* 239,379.

GÓMEZ C, PÉREZ DG, LÓPEZ-BAYGHEN E, OROZCO E. 1998. Transcriptional analysis of the EhPgp1 promoter of *Entamoeba histolytica* multidrug-resistant mutant. *J Biol Chem.* 273,7277.

GOMEZ-CONDE E, MENA-LÓPEZ R, HERNANDEZ-JAUREGUI P, GONZALEZ-CAMACHO M. 2000. *Trichomonas vaginalis*; chromatin and mitotic spindle during mitosis. *Exp. Parasitol.* 96, 130.

GONZÁLEZ-LÁZARO M, GONZÁLEZ-ROBLES A, HERNÁNDEZ-GUTIÉRREZ R, ARROYO R. 2005. HeLa cell nucleus, a source of thymidine for *Trichomonas vaginalis* growing in vitro. *Int J Biochem Cell Biol.* 37,166.

GORDON ED, MORA R, MEREDITH SC, LINDQUIST SL. 1987. Hypusine formation in eukaryotic initiation factor 4D is not reversed when rates or specificity of protein synthesis is altered. *Journal of Biological Chemistry*. 262, 16590.

HAMANA K, MATSUZAKI S. 1992. Polyamines as a chemotaxonomic marker in bacterial systematics. *Crit Rev Microbiol*. 18, 261.

HANAUSKE-ABEL HM, PARK MH, HANAUSKE AR, POPOWICZ AM, LALANDE M, FOLK JE. 1994. Inhibition of the G1-S transition of the cell cycle by inhibitors of deoxyhypusine hydroxylation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*. 1221, 115.

HEATHER WALLACE M, FRASER ALISON V, AND HUGHES ALUN. 2003. A perspective of polyamine metabolism. *J. Biochem*. 376, 114.

HERNANDEZ H, SARRACENT J, SARIEGO I, GARBER G, DELGADO R, LOPEZ O AND SARRACENT J. 2004. Monoclonal antibodies against a 62 kDa proteinase of *Trichomonas vaginalis* decrease parasites cytoadherence to epithelial cells and confer protection to mice. *Parasite Immunol*. 26, 119.

HERNANDEZ-GUTIERREZ R, ORTEGA-LÓPEZ J, ARROYO R. 2003. A 39-kDa cysteine proteinase CP39 from *Trichomonas vaginalis*, which is negatively affected by iron may be involved in trichomonal cytotoxicity. *J Eukaryot. Microbiol*. 50, 696.

HEYWORTH P G, GUTTERIDGE WE, GINGER CD. 1982. Purine metabolism in *Trichomonas vaginalis*. *FEBS Lett*. 141, 106.

HONIGBERG BM, KING VM. 1964. Structure of *Trichomonas vaginalis*. *Donné. J. Parasitol*. 50, 345.

HORNER DS, HIRT RP, KILVINGTON S, LLOYD D, EMBLEY TM. 1996. Molecular data suggest an early acquisition of the mitochondrion endosymbiont. Proc Biol Sci. 263, 1373.

<http://thaisyjosef.com/hombremujer/enfermedadessexuales/enfermedadessexuales.htm>.

<http://www.who.int/es/>

HUANG YI, KEEN JC, PLEDGIE A, MARTON LJ, ZHU T, SUKUMAR S, PARK BH, BLAIR B, BRENNER K, CASERO RA, Y DAVIDSON NE. 2006. Polyamine analogues down-regulate estrogen receptor expression in human breast cancer cells. J. Biol. Chem. 281, 1905.

IGARASHI K, KASHIWAGI K. 2000. Polyamines: mysterious modulators of cellular functions. Biochem Biophys Res Commun. 19, 271.

JAO LI-EN D AND YU-CHEN K. 2002. Subcellular localization of the hypusine-containing eukaryotic initiation factor 5A by Immunofluorescent staining and green fluorescent protein tagging. J. Cell. Biochem. 86, 590.

KAISER A, GOTTWALD A, MAIER W, SEITZ HM. 2003. Targeting enzymes involved in spermidine metabolism of parasitic protozoa-a possible new strategy for antiparasitic treatment. Parasitol Res.91,508.

KANG HA, HERSHEY JW. 1994. Effect of initiation factor eIF-5A depletion on protein synthesis and proliferation of *Saccharomyces cerevisiae*. J Biological Chemistry. 269, 3934.

KANG HA, SCHWELBERGER HG, HERSHEY JW. 1993. Translation initiation factor eIF-5A, the hypusine-containing protein, is phosphorylated on serine in *Saccharomyces cerevisiae*. J Biol Chem. 268,14750.

KAPIGA SH, LYAMUYA EF, LWIHULA GK, HUNTER DJ. 1998. The incidence of HIV infection among women using family planning methods in Dar es Salaam, Tanzania. AIDS.12, 75.

KEMPER WM, BERRY KW, MERRICK WC.1976. Purification and properties of rabbit reticulocyte protein synthesis initiation factors M2Balpha and M2Bbeta. J. Biol. Chem. 251, 5551.

KENNY GE, HOOTON TM, ROBERTS MC, CARTWRIGHT FD, JEANNE H. 1983. Susceptibilities of Genital Mycoplasmas to the Newer Quinolones as Determined by the Agar Dilution Method. Antimicrob Agents Chemother. 33,103.

KRIEGER JN, POISSON MA, REIN MF. 1983. Beta-hemolytic activity of *Trichomonas vaginalis* correlates with virulence. Infect Immun. 41,1291.

KRIEGER JN, REIN MF. 1982. Canine Prostatic Secretions Kill *Trichomonas vaginalis*. Infect. Immun. 7, 81.

KRIEGER JN, REIN MF. 1982. Zinc sensitivity of *Trichomonas vaginalis*: in vitro studies and clinical implications. J Infect Dis. 146, 341.

KUCKNOOR AS, MUNDODI V Y ALDERETE JF. 2005. Adherence to human vaginal epithelial cells signals for increased expression of *Trichomonas vaginalis* genes. Infect. Immun. 64, 6478.

KYRPIDES NC AND WOESE CR. 1998. Evolution universally conserved translation initiation factors. Proc. Natl. Acad. Sci. 95, 224.

LAEMMLI UK. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 227,680.

LAGA M, MANOKA A, KIVUVU M, MALELE B, TULIZA M, NZILA N, GOEMAN J, BEHETSF, BATTER V, ALARY M. 1993. Non-ulcerative sexually transmitted diseases as risk factors for HIV-1 transmission in women: results from a cohort study. *AIDS*. 7, 95.

LAHTI C, D'OLIVEIRA C AND JONSON P. 1992. Beta succinyl- coenzyme A synthetase from *Trichomonas vaginalis* is a soluble hydrogenosomal protein with an amino- terminal sequence that resembles mitochondrial presequences. *J. Bacterial*. 174, 6822.

LEBSKA M, CIESIELSKI A, SZYMONA L, GODECKA L, LEWANDOWSKA-GNATOWSKA E, SZCZEGIELNIAK J. 2010. Phosphorylation of maize eIF5A by CK2: identification of phosphorylated residue and influence on intracellular localization of eIF5A. *Journal of Biological Chemistry*. 285, 6217.

LEE CH Y PARK MH. 2001. Structure function studies of human deoxyhypusine synthase identification of amino acid residues critical for the binding of spermidine and NAD. *Biochem.J*. 355, 841.

LEHKER MW Y ALDERETE JF. 2000. Biology of Tricomonosis. *Curr. Opin Infect Dis*. 13, 37.

LEHKER MW, ARROYO R Y ALDERETE JF. 1991. The regulation by iron of the synthesis of adhesins and cytoadherence levels in the protozoan *Trichomonas vaginalis*. *J. Exp. Med*. 174, 311.

- LEHKER MW, CHANG TH, DAILEY DC AND ALDERETE JE. 1990. Specific erythrocyte binding is an additional nutrient acquisition system for *Trichomonas vaginalis*. J. Exp. Med. 171, 2165.
- LEÓN-SICAIROS CR, LEÓN-FÉLIX J, ARROYO R. 2004. *tvcp12*: a novel *Trichomonas vaginalis* cathepsin L-like cysteine proteinase-encoding gene. Microbiol.150, 1131.
- LI L, LI J, RAO JN, LI M, BASS BL, WANG JY. 1999. Inhibition of polyamine synthesis induces p53 gene expression but not apoptosis. Am J Physiol Cell Physiol. 276, 946.
- LI L, LIU L, RAO JN, ESMAILI A, STRAUCH ED, BASS BL, WANG JY. 2002. JunD stabilization results in inhibition of normal intestinal epithelial cell growth through P21 after polyamine depletion. Gastro. 123, 764.
- LIAO DI, WOLFF EC, PARK MH AND DAVIES DR. 1998. Crystal structure of the NAD complex of human deoxyhypusine synthase an enzyme with a ball and chain mechanism for blocking the active site. Structure 6,23.
- LINSTEAD D Y CRANSHAW MA. 1983. The pathway of arginine catabolism in the parasitic flagellate *Trichomonas vaginalis*. Mol Biochem Parasitol.8, 241.
- LINSTEAD D. 1981. New defined and semi-defined media for cultivation of the flagellate *Trichomonas vaginalis*. Parasitol. 83, 12.
- LISTON DR Y JOHNSON PJ. 1998. Gene Transcription in *Trichomonas vaginalis*. Parasitol. Today. 14, 7.
- LIU L, LI L, RAO JN, ZOU T, ZHANG HM, BONEVA D, BERNARD MS, WANG JY. 2005. Polyamine-modulated expression of *c-myc* plays a critical role in stimulation of normal intestinal epithelial cell proliferation. Am J Physiol Cell Physiol.288, 89.

MENDOZA-LÓPEZ MR, BECERRIL-GARCÍA C, FATTEL-FACENDA LV, AVILA-GONZALEZ L, RUIZ-TACHIQUIN ME, ORTEGA-LÓPEZ J AND ARROYO R. 2000. CP30 a Cistein Proteinase involved in *Trichomonas vaginalis* cytoadherence. Infect. Immuni. 49, 4912.

MOLITOR IM, KNÖBEL S, DANG C, SPEIELMAMNN T, ALLÉRA A, KÖNIG GM. 2004. Translation initiation factor EIF-5A from *Plasmodium falciparum*. Mol. Biochem. Parasitol. 137, 65.

MORENO-BRITO V, YÁÑEZ-GÓMEZ C, MEZA-CERVANTEZ P, AVILA-GONZÁLEZ L, RODRÍGUEZ MA, ORTEGA-LÓPEZ J, GONZÁLEZ-ROBLES A, ARROYO R. 2005. A *Trichomonas vaginalis* 120 kDa protein with identity to hydrogenosome pyruvate:ferredoxin oxidoreductase is a surface adhesin induced by iron. Cell Microbiol. 7, 245.

MÜLLER IB, DAS GUPTA R, LÜERSEN K, WRENGER C, WALTER RD. 2008. Assessing the polyamine metabolism of *Plasmodium falciparum* as chemotherapeutic target. Mol Biochem Parasitol.160,1.

MUNDODI V, KUCKNOO AS Y ALDERETE JF. 2007. Antisense RNA decreases AP33 gene expression and cytoadherence by *T. vaginalis*. BMC Microbiol. 7, 64, 1186.

MUNDODI V, KUCKNOOR AS, CHANG TH, ALDERETE JOHN F. 2006. A novel surface protein of *Trichomonas vaginalis* is regulated independently by low iron and contact with vaginal epithelial cells. BMC Microbiol. 31, 6.

- MUNDODI V, KUCKNOOR AS, KLUMPP DJ, CHANG TH, ALDERETE JF. 2004. Silencing the ap65 gene reduces adherence to vaginal epithelial cells by *Trichomonas vaginalis*. *Mol Microbiol.* 53, 4.
- NEALE KA, ALDERETE JF. 1990. Analysis of the proteinases of representative *Trichomonas vaginalis* isolates. *Infect. Immun.*58, 157.
- NIKOS KC Y WOESE CR. 1998. Evolution Universally conserved translation initiation factors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 22, 228.
- NISHIMURA K, MUROZUMI K, SHIRAHATA A, PARK MH, KASHIWAGI K, IGARASHI K. 2005. Independent roles of eIF5A and polyamines in cell proliferation. *Biochem J.* 385, 779.
- PARK MH, LEE YB, JOE YA. 1997. Hypusine is essential for eukaryotic cell proliferation. *Biol Signal.*6, 115.
- PARK MH. 1989. The essential role of hypusine in eukaryotic translation initiation factor 4D (eIF-4D). Purification of eIF-4D and its precursors and comparison of their activities. *J Biol Chem.* 264,18531.
- PARK MH, LEE YB, JOE YA. 1997. Hypusine is essential for eukaryotic cell proliferation. *Biol. Signals.* 6,115.
- PARK MH. 2006. The Post-Translational Synthesis of a Polyamine-Derived Amino Acid, Hypusine, in the Eukaryotic Translation Initiation Factor 5A (eIF-5A). *J. Biochem.* 139, 161.
- PARK MH. 2006. The post-translational synthesis of a polyamine-derived amino acid, hypusine, in the eukaryotic translation initiation factor 5A (eIF5A). *Journal of Biochemistry.*139,161.

PARKER MT, GERNER EW. 2002. Polyamine-mediated post-transcriptional regulation of cox-2. *Biochimie*.84, 815.

PATEL AR, WANG JY. 1997. Polyamines modulate transcription but not posttranscription of *c-myc* and *c-jun* in IEC-6 cell. *Am J Physiol Cell Physiol*. 273,1020.

PEGG A. 1988. Polyamine Metabolism and Its Importance in Neoplastic Growth and as a Target for Chemotherapy. *Cancer Research* 48, 759.

PESTOVA TV, KOLUPAEVA VG, LOMAKIN IB, PILIPENKO EV, SHATSKY IN, AGOL VI AND HELLEN CUT. 2001. Molecular mechanisms of translation initiation in eukaryotes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 98, 7029.

PETERSON KM Y ALDERTE JF. 1984. Iron uptake and increase intracellular enzyme activity follow host lactoferrina binding by *Trichomonas vaginalis* receptors. *J. Exp. Med*. 160, 398.

PINES J. 1994. Protein kinases and cell cycle control. *Cell Biol*. 5, 399.

PROVENZANO D, ALDERETE JF. 1995. Analysis of human immunoglobulin-degrading cysteine proteinases of *Trichomonas vaginalis*. *Infect Immun*. 63, 3388.

QUON DV, DELGADILLO MG, JOHNSON PJ. 1996. Transcription in the early diverging eukaryote *Trichomonas vaginalis*: an unusual RNA polymerase II and alpha-amanitin-resistant transcription of protein-coding genes. *J. Mol. Evol*. 43, 253.

RASMUSSEN, S.E; NIELSEN, M.H; LIND, I; RHODES, M.J. 1986. Morphological studies of the cytotoxicity of *Trichomonas vaginalis* to normal human vaginal epithelial cells in vitro. *Genitourin. Med*. 62, 240.

REIS IA, MARTINEZ MP, YARLETT N, JOHNSON PJ, SILVA-FILHO FC, VANNIER-SANTOS MA. 1999. Inhibition of polyamine synthesis arrests trichomonad growth and induces destruction of hydrogenosomes. *Antimicrob Agents Chemother.* 43, 1919.

ROSENTHAL B, MAIL Z, CAPLIVSKI D, GHOSH S, DE LA VEGA H, GRAF T AND SAMUELSON J. 1997. Evidence for the Bacterial Origin of Genes Encoding Fermentation Enzymes of the Amitochondriate Protozoan Parasite *Entamoeba histolytica*. *J. Bacteriol.* 179, 3736.

ROSORIOUS O, REICHART B, KRÄTZER F, HEGER P, DABAUVALLE MC, HAUBER J. 1999. Nuclear pore localization and nucleocytoplasmic transport of eIF-5A: evidence for direct interaction with the export receptor CRM1. *J Cell Sci.* 112, 2369.

SANDERSON BE, WHITE E, BALSDON MJ. 1983. Amine content of vaginal fluid from patients with trichomoniasis and gardnerella associated nonspecific vaginitis. *Br J Vener Dis.* 59, 302.

SCHATZ O, OFT M, DASCHER C, SCHEBESTA M, ROSORIOUS O, JAKSCHE H, DOBROVNIK M, BEVEC D, HAUBER J. 1998. Interaction of the HIV-1 rev cofactor eukaryotic initiation factor 5a with ribosomal protein. *Cell Biol.* 95,1607.

SCHMIDT GD, ROBERTS LS. 1989. *Foundations in parasitology*. Fourth Edition. 35, 87.

SCHNIER J, SCHWELBERGER HG, SMIT-MCBRIDE Z, KANG HA, HERSHEY JW. 1991. Translation initiation factor 5A and its hypusine modification are essential for cell viability in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol.* 11, 3105.

SCHNIER J, SCHWELBERGER THG, SMIT-MCBRIDE Z, AH KANG H AND HERSHEY JWB. 1991. Translation initiation factor 5a and its hypusine modification are essential for cell viability in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Mol. Cell. Biol. 31, 3114.

SCHUBER F. 1989. Influence of polyamines on membran function. J.Biochem. 296, 1.

SCHWEBKE JR, BURGESS D. 2004. Trichomoniasis. Clin Microbiol Rev. 17, 794.

SHEVCHENKO A, WILM M, VORM O, MANN M. 1996. Mass spectrometric sequencing of proteins from silver-stained polyacrylamide gels. Analytical Chemistry. 68, 850.

SOLANO-GONZÁLEZ E, BURROLAS-BARRAZA E, LEÓN-SICARIOS C, AVILA-GONZÁLEZ L, GUTIÉRREZ-ESCOLANO L, ORTEGA-LÓPEZ J, ARROYO. 2007. The trichomonad cysteine proteinase TVCP4 transcript contains an iron-responsive element. FEBS Letters. 581, 2919.

SORVILLO F, SMITH L, KERNDT P, ASH L. 2001. *Trichomonas vaginalis*, HIV, and African-Americans. Emerg Infect Dis. 7, 927.

SPIEGEL, C.A. 1990. Microflora associated with *Trichomonas vaginalis* and vaccination against vaginal trichomoniasis. 213-224. In B. M. Honigberg (ed.). Trichomonads parasitic in human. Springer-Verlag, New York, N.Y.

SWYGARD H, SENA A, HOBBS M, AND COHEN M. 2004. Trichomoniasis: clinical manifestations, diagnosis and management. Sex Transm Infect. 80, 915.

TABOR CW AND TABOR H. 1985. Polyamines in Microorganisms. Microbiol. 81, 49.

TABOR CW, TABOR H. 1984. Polyamines. Annu Rev Biochem. 53, 749.

- TADOLINI B. 1988. Polyamine inhibition of lipoperoxidation. The influence of polyamines on iron oxidation in the presence of compounds mimicking phospholipid polar heads. *J. Biochem* 249, 33.
- TAYLOR PM, GERNER EW. 2002. Polyamine-mediated post-transcriptional regulation of cox-2., *Biochem.* 84, 815.
- TORRES-MACHORRO AL, HERNÁNDEZ R, SÁNCHEZ J, LÓPEZ-VILLASEÑOR I. 2006. The 5S ribosomal RNA gene from the early diverging protozoa *Trichomonas vaginalis*. *Mol Biochem Parasitol.* 145, 269.
- TSAI CD, LIU HW AND TAI J. 2002. Characterization of an Iron-responsive promoter in the protozoan pathogen *Trichomonas vaginalis*. *J. Biol. Chem.* 277, 7.
- VAN DER POL B, KWOK C, PIERRE-LOUIS B, RINALDI A, SALATA RA, CHEN PL, VAN DE WIJGERT J, MMIRO F, MUGERWA R, CHIPATO T, MORRISON CS. 2008. *Trichomonas vaginalis* infection and human immunodeficiency virus acquisition in African women. *J Infect Dis.* 15, 197.
- VAÑACOVA S, YAN W, CARLTON JM AND JOHNSON PJ. 2005. Spliceosomal introns in the deep-branching eukaryote *Trichomonas vaginalis*. *PNAS.* 22, 102.
- WALLACE HM, FRACER AV. 2004. Inhibitors of polyamine metabolism: Review article. *Amino Acid.* 26,353.
- WANG JY, MCCORMACK SA, VIAR MJ, WANG HL, TZEN CY, SCOTT RE, JOHNSON LR. 1993. Decreased expression of protooncogenes c-fos, c-myc and c-jun following polyamine depletion in IEC-6 cells. *Am J Physiol Cell Physiol.* 265,G331.

- WOLFF EC, KANG KR, KIM YS, PARK MH. 2007. Posttranslational synthesis of hypusine: evolutionary progression and specificity of the hypusine modification. *Amino Acids*. 33, 341.
- YARLETT N, BACCHI CJ. 1994. Parasite polyamine metabolism: targets for chemotherapy. *Biochem Soc Trans*. 22, 875.
- YARLETT N, MARTINEZ MP, GOLDBERG B, KRAMER DL, PORTER CW. 2000. Dependence of *Trichomonas vaginalis* upon polyamine backconversion. *Microbiology*. 146, 2715.
- YARLETT N, MARTINEZ MP, MOHARRAMI MA, TACHEZY J. 1996. The contribution of the arginine dihydrolase pathway to energy metabolism by *Trichomonas vaginalis*. *Mol Biochem Parasitol*. 78, 117.
- YONG-SEOK K, HYUN-OUK S, IK-HWA C, SOON-JUNG P AND JAE-SOOK R. 2006. Hydrogenosomal activity of *Trichomonas vaginalis* cultivated under different iron conditions. *J. Parasitol*. 44, 373.
- YOON K, RYU J S, MIN D Y. 1991. Cytotoxicity of lymphokine madurated peritoneal macrophages against *Trichomonas vaginalis*. *J Parasitol*. 29, 381.
- ZANELLI CF., VALENTINI SR. 2007. Is There a role for eIF-5A in translation ?., *Amino Acids*. 33, 351.
- ZHANG ZF, GRAHAM S, YU SZ, MARSHALL J, ZIELEZNY M, CHEN XY, SUN M, TANG SL, LIAO CS, XU JL. 1995. *Trichomonas vaginalis* and cervical cancer. A prospective study in China. *Ann. Epidemiol*. 5, 325.
- ZHANG ZF. 1996. Epidemiology of *Trichomonas vaginalis*. A perspective study in China. *Sex. Transm*. 23, 415.

XIII. Apendice.

Gel de Agarosa al 1%

Agarosa (Gibco BRL)	0.20gr
TAE 1x	20ml
Bromuro de Etidio	4 μ l ((0.5 mg/ml)

Amortiguador TAE 50x

Trizma Base (Sigma)	242 gr.
Ácido acético glacial	57.1 ml
EDTA (Sigma)	37.2 gr.

Se afora a 1 litro con H₂O destilada, se ajusta el pH a 8.5.

Extracción de DNA

PBS 1x

NaCl (MERCK)	8g
KCl	8g
Na ₂ HPO ₄	0.65g
KH ₂ PO ₄	0.2g

Se ajusto el pH a 7.0 con NaOH o HCl se afora a 1 litro con agua destilada y se esteriliza por autoclave.

Amortiguador de lisis

SDS (Sigma)	0.2%
NaCl	100 mM
EDTA	10 mM, pH 8.0
Tris-HCl	10 mM, pH 8.0

Etanol al 70%

Para 50ml:

Etanol al 100%	35%
H ₂ O destilada	15%

TDSET

Tris-HCl pH 7.8 1M 1 ml

DOC 10%	2 ml
SDS	0.5 ml
EDTA pH 8.0	2.0 ml
Tritón X-100	1 ml

Se mezclan los componentes en 50 ml y se afora a 100 ml.

EDTA pH 8.0

EDTA	46.525 g
H ₂ O	250 ml

El agua destilada es ajustada a un pH de 8.0, posteriormente se adiciona el EDTA y se vuelve ajustar el pH a 8.0.

PBS – EDTA 0.2%

PBS 1X p 7.0 500 ml

EDTA 1g

Se disuelve el EDTA y se esteriliza por autoclave 121°C/ 20 min

Sacarosa 10% en PBS pH 8.0

Sacarosa 1 g

H₂O DESTILADA 10 ml

Adicionar una punta de micropipeta de 200 µL en la solución de sacarosa.

Extracción de DNA plasmídico

Solución I (Estéril)

Glucosa 50mM

Tris-HCl 25mM, pH 8.0

EDTA 10mM, pH 8.0

Solución II (recién preparada)

NaOH 0.2 M

SDS (Dodecil sulfato de Sodio) 1%

Solución III

Acetato de sodio 5 M	60ml
Ácido acético glacial	11.5 ml
H ₂ O destilada	28.5 ml

Se ajusta el pH 5.2 con ácido acético glacial, se esteriliza por autoclave.

Medio de cultivo

Medio Luria Bertani (LB)

Cloruro de sodio	10g
Tristona	10g
Extracto de Levadura	5g

Se ajusta el pH a 7.0 y se afora con H₂O destilada a 1litro. Por último se esteriliza en autoclave.

Ampicilina (100 µg/ml)

Se filtra por 0.22µm, para esterilizar y se protege de la luz.

Placas de LB-Ampicilina

20 g de LB agar bacteriológico, después de haberlo esterilizado por autoclave y a una temperatura de 45°C se adiciona ampicilina (100 µg/ml) y se transfiere a cajas Petri en esterilidad.

Extracción de RNA total

Etanol al 70%

Etanol absoluto	700 ml
H ₂ O-DEPC	300 ml

Preparación de 1,4-diamino-2-butanona (DAB) 20 mM.

Para preparar 90 ml de medio TYM con DAB 20 mM (Sigma) se requiere 0.35012 g de DAB (PM 175.06 g/mol) disuelto en 2 ml de medio TYM, este stock se filtra por 0.22µm, la solución stock es adicionada a los 90 ml de medio TYM y es guardada a 4°C por 12 h.

Preparación de putrescina 40 mM

Para preparar 54 ml de medio TYM con putrescina 40 Mm (Sigma) se requiere 0.4025 g de putrescina (PM 161.1 g/mol) disuelto en 2.5 ml de medio TYM, la solución stock es filtrada por 0.22 µm y es guardada a 4°C 12 h.

Acrilamida al 30%/bisacrilamida al 0.8%

Acrilamida	29.2 g
Bisacrilamida	0.8 g

Disolver en 40 ml de agua destilada. Una vez disuelto aforar hasta 100 ml.

Filtrar a través de papel filtro "Whatman" No. 1.

Almacenar a 4°C hasta un mes, previamente protegido de la luz.

Tris-HCl/SDS 4x, pH 8.8 (1.5 M Tris-Cl, 0.4% SDS)

Trizma-base (Sigma) 9.08g

SDS (Sigma) 0.2 g

Disolver en 20 ml de agua destilada y ajustar a pH 8.8 con HCl.

Afora a un volumen final de 50 ml con agua destilada. Filtrar la solución almacenar a 4 °C.

Tris-HCl/SDS 4x, pH 6.8 (1.5 M Tris-Cl, 0.4% SDS)

Trizma-base (Sigma) 3.025g

SDS (Sigma) 0.2 g

Disolver en 20 ml de agua destilada y ajustar a pH 8.8 con HCl.

Afora a un volumen final de 50 ml con agua destilada. Filtrar la solución almacenar a 4 °C.

Persulfato de amonio al 10%

10 mg (0.01 g) en un ml de agua destilada.

TEMED (Bio- Rad)

0.01ml (10µl)

SDS-amortiguador 2x

Trizma-base 1.52 g

SDS 2g

Disolver en 50 ml de agua destilada y ajustar el pH a 6.8. Posteriormente
adicionar:

Glicerol 20 ml

Agua destilada (aforar a 100 ml)

Amortiguador de muestra 1x (BM 1x)

SDS amortiguador 2x 500 μ l

β – mercaptoetanol 5% 50 μ l

Azul de bromofenol 50 μ l

(stock 10 mg /ml)

Agua destilada 400 μ l

Amortiguador de muestra 2x (BM 2x)

SDS amortiguador 2x 400 μ l

β – mercaptoetanol 5% 50 μ l

Azul de bromofenol 50 μ l

(stock 10 mg /ml)

Amortiguador de electroforesis 5x (stock)

Glicina (Sigma) 72 g

Trizma-base (Sigma) 15.1g

SDS (Sigma) 5.0 g

Aforar con agua destilada a 1 litro.

Amortiguador de electroforesis 1x

Amortiguador de electroforesis 5x 100 ml

Agua destilada 400 ml

Solución Colorante de proteínas (Azul brillante de Coomassie) 0.05%

Metanol 500 ml

Ácido acético glacial 100 ml

Agua destilada 400 ml

Azul de Coomassie 0.5g

Disolver toda la noche. Filtrar con papel "Whatman" no. 1. Almacenar a T.A.

Solución decolorante de geles de poliacrilamida

Metanol 165 ml

Ácido acético glacial 50 ml

Agua destilada 785 ml

Almacenar a T.A.

Preparación de Gelatina al 9%

0.0324 g en 10 ml de agua destilada incuba a 37°C para solubilizar.

Gel separador

4. 50 ml Poliacrilamida/Bisacrilamida al 30%
3.75 ml 4x Tris-CL/SDS pH 8.8
6.75 ml Gelatina al 9%
0.05 ml Persulfato de amonio al 10%
0.01 ml TEMED

Gel concentrador

0.65 ml Poliacrilamida/Bisacrilamida al 30%
1.25 ml 4X Tris-CL/SDS pH 6.8
3.05 ml Agua
0.025 ml Persulfato de amonio al 10%
0.005 ml TEMED

Amortiguador de maduración de proteinasas pH 4.5 3M

Acetato de sodio	13.61 g
DTT	0.154 g
Ácido acético	20 ml
H ₂ O	980ml

Se disuelve en 500 ml el acetato de sodio, DTT posteriormente se adiciona el ácido acético y se ajusta el pH y se afora a 1 litro.

Tritón X- 100 2.5%

Tritón X-100	25 ml
H ₂ O destilada	cbp 1000 ml

Amortiguador de transferencia

Trizma- base	25mM	3.03 g
Glicina	190mM	14.25 g
Metanol	20%	200 ml

Disolver primero el Trizma y Glicina. Una vez disuelto agregar el metanol y finalmente, se afora a 1 litro con agua destilada. Enfriar a 4°C hasta su uso.

TBS 1X pH 7.0

Trizma – base	20 mM	2.42 g
NaCl	500 Mm	29.22 g

Disolver en 500 ml de agua destilada, ajustar el pH a 7.5 y aforar a 1 litro con agua destilada.

Solución reveladora HRP (por color Bio Rad)

Solución A:

HRP	7.5 mg
Metanol frío	2.5 ml

Solución B:

TBS 1X pH 7.5	12.5 ml
H ₂ O ₂	7.5 ml

Primero se prepara la solución B, se mezcla el TBS 1X con el H₂O₂ y se mezcla, posteriormente se prepara la solución A, se mezcla el reactivo HRP (Bio Rad) en los 2.5 de metanol frío y se adiciona a la solución B.

Paraformaldehído al 4%

Paraformaldehído 4 g en 100 ml de PBS 1X previamente filtrado, se disuelve a 55°C y se adicionan 4 gotas de NaOH hasta disolver totalmente.

PBS 1X

NaCl 8 g

KCl 8 g

Na₂HPO₄ 0.65 g

KH₂PO₄ 0.2 g

Se disuelve en 500 ml de agua destilada y se ajusta el pH a 7.0, posteriormente se afora a 1 litro y se esteriliza por autoclave, y se filtra por membrana de 0.22 µm.

NH₄Cl/PBS 1X pH 7.0 50 Mm

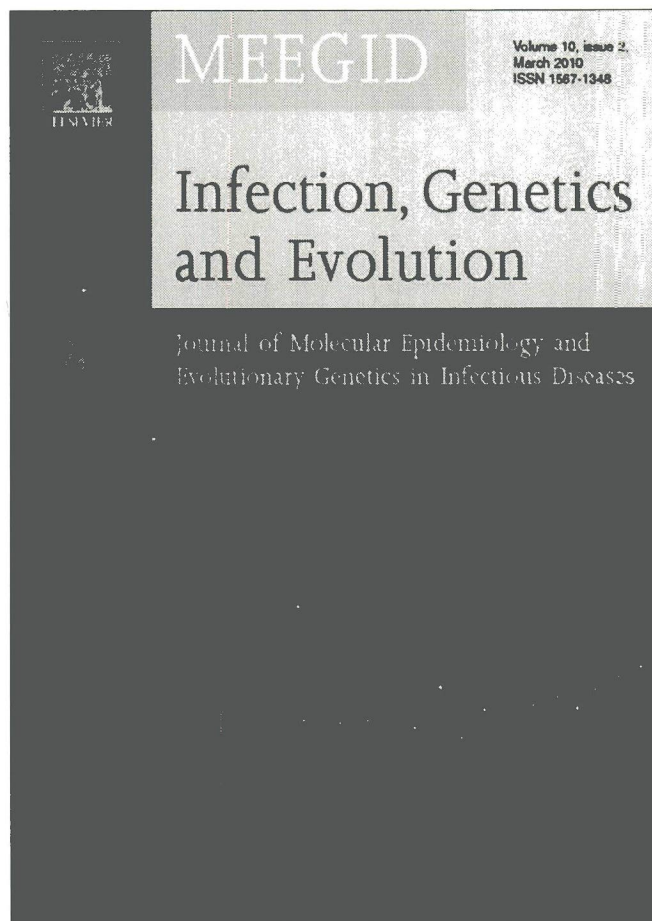
HCl/ PBS 1X pH 7.0 1 M

GLICINA 0.5 M/ PBS 1X pH 7.0

SUERO FETAL BOVINO 1%/ PBS 1X pH 7.0

SUERO FETAL BOVINO 0.2% PBS 1X pH 7.0

Provided for non-commercial research and education use.
Not for reproduction, distribution or commercial use.



This article appeared in a journal published by Elsevier. The attached copy is furnished to the author for internal non-commercial research and education use, including for instruction at the authors institution and sharing with colleagues.

Other uses, including reproduction and distribution, or selling or licensing copies, or posting to personal, institutional or third party websites are prohibited.

In most cases authors are permitted to post their version of the article (e.g. in Word or Tex form) to their personal website or institutional repository. Authors requiring further information regarding Elsevier's archiving and manuscript policies are encouraged to visit:

<http://www.elsevier.com/copyright>



Infection, Genetics and Evolution

journal homepage: www.elsevier.com/locate/meegidIdentification of two novel *Trichomonas vaginalis* eif-5a genesB. Carvajal-Gamez^a, R. Arroyo^b, R. Lira^c, C. López-Camarillo^a, M.E. Alvarez-Sánchez^{a,*}^a Posgrado en Ciencias Genómicas, Universidad Autónoma de la Ciudad de México (UACM). San Lorenzo # 290, Col. Del Valle, CP 03100 Mexico City, Mexico^b Departamento de Infectómica y Patogénesis Molecular, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN (CINVESTAV-IPN). Av IPN 2508, Mexico City, Col. San Pedro Zacatenco CP 07360, Mexico^c Unidad en Enfermedades Infecciosas y Parasitarias, Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS). Av Cuauhtemoc # 330, Mexico City, Col. Doctores CP 06720, Mexico

ARTICLE INFO

Article history:

Received 14 September 2009

Received in revised form 17 December 2009

Accepted 25 December 2009

Available online 7 January 2010

Keywords:

Eukaryotic translation initiation factor 5A (eIF-5A)

Polyamines

Hypusine

Trichomonas vaginalis

ABSTRACT

The eukaryotic translation initiation factor 5A (eIF-5A) is highly conserved and is the only protein that is known to contain the unique and essential amino acid residue hypusine. Synthesis of hypusine is essential for the function of eIF5A in eukaryotic cell proliferation and survival. In this study, we identified two novel eukaryotic translation initiation factor 5A (eIF-5A) genes in *Trichomonas vaginalis*. The *tveif-5a1* and *tveif-5a2* putative genes were localized in different contigs, both containing ORFs encoding proteins of 168 amino acids that share high sequence identity with eIF-5A sequences from other eukaryotic organisms. A phylogenetic tree constructed with TveIF-5A1 and TveIF-5A2 from *T. vaginalis* and 13 other eIF-5A sequences of eukaryotic and archaeobacterial origin revealed that both trichomonal TveIF-5As show the highest degree of similarity to bacteria. Using an anti-TveIF-5A antibody, we detected two protein bands and spots of 19 and 20 kDa with isoelectric points (pI) of 5.2 and 5.5, respectively, by one and two-dimensional Western blot assays. In addition, we used reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) to demonstrate that both of these *tveif-5a* genes are expressed in *T. vaginalis*. Immunofluorescence assays showed that the TveIF-5A protein was dispersed throughout the parasite cytoplasm. In conclusion, *T. vaginalis* has two *eif-5a* genes, and both genes are expressed as highly conserved proteins of 19 kDa, which are localized in the cytoplasm of this parasite.

© 2010 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Trichomonas vaginalis is a protozoan parasite responsible for trichomonosis, one of the most prevalent sexually transmitted diseases worldwide (WHO, 2007). Trichomonosis is independently associated with a variety of adverse health consequences in both women and men, including increased human immunodeficiency virus (HIV) transmission (Guenther et al., 2005), infertility (El-Shazly et al., 2001), cervical cancer (Viikki et al., 2000) and nongonococcal urethritis and chronic prostatitis in men (Soper, 2004). This parasite lacks many of common metabolic pathways. For example, it is unable to synthesize spermine *de novo*, and instead it exchanges two molecules of putrescine for one of the host spermine, which is then back-converted to spermidine (Yarlett et al., 2000).

The spermidine is utilized for the post-translational hypusination of a single cellular protein, the precursor of eukaryotic translation initiation factor 5A (eIF-5A), formerly called eIF-4D. In archaea, this protein is called aIF-5A and bacterial elongation factor P, or EF-P (Park, 2006). Both eIF-5A and EF-P are essential for the

growth and viability of eukaryotic and prokaryotic organisms, respectively. The eukaryotic protein, eIF-5A, has longer N- and C-terminal extensions than EF-P and other aIF-5As (Aoki et al., 1997; Hanawa-Suetsugu et al., 2004; Park, 2006). The eIF-5A protein has a molecular mass of 16.5–18.5 kDa and a slightly acidic pI of 5.1–5.4 (Park, 1989). The spermidine-dependent hypusine modification of eIF-5A is the most specific post-translational modification of this protein currently known. Only the second lysine residue of the eIF-5A peptide chain is specifically modified, and the sequence around the hypusine residue is completely conserved in organisms from archae to eukaryotes (Joe and Park, 1994).

The hypusine modification of eIF-5A is catalyzed in a multi-step reaction. In the first step, precursor eIF-5A is modified by the deoxyhypusine synthase (DHS). The DHS catalyzes the transfer of the 4-amino-butyl moiety of the spermidine to the ε-amino group of the lysine residue, forming a deoxyhypusine residue in the eIF-5A precursor. The addition of this moiety to the Lys group creates a long basic side chain in this loop (Park et al., 2003). In the second step, the hydroxylation of the eIF-5A precursor protein by the deoxyhypusine hydroxylase (DOHH) enzyme forms active hypusinated eIF-5A (Park et al., 2006). The lysine that undergoes the hypusine modification is located at the tip of an exposed loop. The amino acid sequence surrounding this modification site (STSKTGKHHGAK) is very basic and hydrophilic.

* Corresponding author. Tel.: +52 36912000x15306; fax: +52 5575 5805.

E-mail address: elizabethalvarezsanchez@yahoo.com.mx (M.E. Alvarez-Sánchez).

Hypusine modification of eIF-5A via spermidine is essential for cell growth and protein synthesis (Joe and Park, 1994), and its function is related to several biological processes. Initially, eIF-5A was characterized as a translation initiation factor in yeast; however, the overall rate of protein synthesis in *Saccharomyces cerevisiae* is not significantly changed by the complete intracellular depletion of eIF-5A (Kang and Hershey, 1994; Schnier et al., 1991). Recent studies indicate that eIF-5A is not a global initiator of protein translation; it may function as a nucleo-cytoplasmic shuttle protein of a subset of mRNAs related to the G1/S cell cycle transition and be required for cell viability and efficient proliferation (Chan et al., 2002; Schrader et al., 2006), or it may be involved in the degradation pathway of mRNA metabolism (Wagner and Klug, 2007). The eIF-5A protein binds to specific sequences in the mRNA (Xu et al., 2004). Additionally, the subcellular localization of eIF-5A is mainly in the cytoplasm, where eIF-5A is associated with the endoplasmic reticulum; eIF-5A can also be found in the perinuclear region (Shi et al., 1996) as well as in the nucleus (Parreiras-e-Silva et al., 2007; Rosorius et al., 1999).

The research presented here focuses on the identification and expression of eIF-5A in *T. vaginalis*. We demonstrate that *T. vaginalis* contains two *eif-5a*-like genes (*tveif-5a1* and *tveif-5a2*), and both are expressed as highly conserved 19 kDa proteins that are localized in the cytoplasm of trichomonads.

2. Materials and methods

2.1. Parasite culture

The *T. vaginalis* CNCD 147 isolate was used in this study (Alvarez-Sánchez et al., 2000). Trichomonads were cultured in Diamond's trypticase-yeast extract-maltose (TYM) medium (Diamond, 1957) supplemented with 10% heat-inactivated horse serum (JSR, Lenexa, Kans) for 24 h at 37 °C. Organisms in the logarithmic-growth phase were used for all assays.

2.2. Screening of databases and *eif-5a* sequence analysis

Sequences of the *eif-5a* genes from several organisms were obtained from the Genbank database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/>). The search for the *T. vaginalis eif-5a* genes in the *T. vaginalis* genome sequence was performed using the consensus eukaryotic eIF-5A sequence from *Homo sapiens* (Genbank No. NP_001137232.1), *Bombyx mori* (Genbank No. AADK01003814), and *Plasmodium falciparum* (Genbank No. 23496531), as a probe. To deduce the amino acid (aa) sequence of the *T. vaginalis eif-5a* genes, DNA sequence of these genes was translated using the EXPASY translate tool (<http://www.expasy.ch/tools/translate>). These sequences were aligned using the Clustal W program (<http://www.ch.embnet.org/software/ClustalW.html>). The predicted aa sequence of *T. vaginalis eIF-5A* was used to determine the percentage of identity and E-values of related proteins by BLAST (<http://www.expasy.org/tools/blast/>). The alignment with Clustal W used gap penalties of 10 to minimize internal gaps. Structural domains and sequence patterns were predicted by using the ScanProsite (<http://us.expasy.org/tools/scanprosite/>), Motif Scan

(http://myhits.isb-sib.ch/cgi-bin/motif_scan), and Pfam (<http://www.sanger.ac.uk/Software/Pfam/search.shtml>) programs.

2.3. Genome analysis

In order to establish the genomic organization for the putative *tveif-5a* genes, a blast search using the cDNA sequence was carried out against the *T. vaginalis* genome in TIGR. Splice Site Prediction by Neural Network (NNSSP) (<http://restools.sdsc.edu/biotools/biotools16.html>) was used to predict potential splicing sites. Analysis of G/C content and prediction of highly conserved Initiation (Inr) sites were done using the DNasis package (LKB).

2.4. Phylogenetic analysis of *Tveif-5A*

The phylogenetic tree was constructed using the neighbor-joining (NJ) program with JTT distances (Saitou and Nei, 1987) as implemented in the MEGA 4.0 version (Kumar, 1996), using the proteins from *Escherichia coli* and *Marimona* sp. EF-P, as an outgroup, and the ribosomal 18s gene. The robustness of the phylogenetic inferences was tested by bootstrapping, using 1000 replications of the data based on the criteria of 50% majority-rule consensus.

2.5. RNA isolation and RT-PCR assays

Total RNA from 1×10^7 parasites was extracted using the TRIzol[®] reagent (Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, CA) as recommended by the manufacturer. For semiquantitative RT-PCR, total RNA (1 µg) was reverse-transcribed using the Superscript Reverse Transcriptase Kit (Invitrogen) and an oligo (dT₁₈) primer. A fragment of 504-bp corresponding to the *tveif-5a1* complete ORF was amplified by PCR using the sense primer eIF5A1-S (5'-CCGGATCCATGCTTTCAGCTGAAGAAGA-3') and eIF5A1-AS (5'-CCAAGC TTTTAGTTTGTGGACTTCTTGC-3'). The *tveif-5a2* complete ORF was amplified by PCR using the same sense primer eIF5A1-S and the antisense primer eIF5A-As (5'-CCCTCGAGTTAGTTTGTG-GACTTCTTGC-3') (Table 1).

2.6. Cloning and sequencing of full length *tveif-5a1* and *tveif-5a2* cDNAs from *T. vaginalis*

The amplification of both *tveif-5a* genes from cDNA was performed with the sense primer and antisense primer for the *tveif-5a1* and *tveif-5a2* genes (Table 1). The two amplicons were cloned into the TOPO TA vector (Invitrogen). The inserts of the selected clones were sequenced by the dideoxy chain-termination method (Sanger et al., 1977) in an Automatic Sequencer (AB3130 Applied Biosystems). The alignment of two genes *tveif-5a1* (Genbank Acc. No. Bankit 1294185) and *tveif-5a2* (Genbank Acc. No. Bankit GQ489182), was performed with the Clustal W program and edited by the BOXSHADE program.

2.7. Synthetic peptide design and antibody generation

Based on the multiple alignment of both amino acid TveIF-5A sequence among different species, we selected the most divergent

Table 1
Primers used to obtain the *tveif-5a1* and *tveif-5a2* genes.

Gene	Primer sense	Primer antisense	Product bp
<i>tveif-5a1</i>	5'-CCGGATCCATGCTTTCAGCTGAAGAAGA-3' HindIII	5'-CCAAGC TTTTAGTTTGTGGACTTCTTGC-3' BamHI	504
<i>tveif-5a2</i>	5'-CCCTCGAGTTAGTTTGTGGACTTCTTGC-3' XhoI	5'-CCAAGC TTTTAGTTTGTGGACTTCTTGC-3' BamHI	504

region to generate a synthetic peptide of fifteen aa residues coupled to MAP8, which we used for mice immunization to generate a monospecific polyclonal antibody (Francis et al., 1991). Three-dimensional theoretical models of *T. vaginalis* TveIF-5A1 and TveIF-5A2 proteins were generated using a model based on the crystallized tertiary structure of the human EIF5A protein and eIF5A of *Methanococcus jannaschii* (Kim et al., 1998) as templates. Structural manipulations and modeling were carried out by using the PHYRE and PHYMOL programs.

2.8. Western blot assays

Total protein extract was obtained from parasites (2×10^7) by 10% trichloroacetic acid (TCA) precipitation as described (Alvarez-Sánchez et al., 2007). Solubilized proteins were boiled in sample buffer (Laemmli, 1970) before loading the gel (SDS-PAGE in a 15% polyacrylamide gel) with an equivalent of 4×10^5 parasites per row. After electrophoresis, proteins were transferred onto nitrocellulose membranes, blocked with 5% skim milk in PBS-0.1% Tween 20 (PBST) for 18 h at 4 °C, and incubated with the anti-synthetic peptide antibody (anti-TveIF-5A) (at 1:60,000 dilution) for 18 h at 4 °C. Then, membranes were washed five times with PBST, incubated with peroxidase-conjugated secondary antibody (1:3000 dilution) (Amersham) for 2 h at 25 °C, and developed by chemiluminescence system (Sigma). Preimmune normal mouse serum (NMS) was used as a negative control (at a 1:60,000 dilution).

2.9. Indirect immunofluorescence assays

For indirect immunofluorescence assays, parasites were fixed with 4% paraformaldehyde for 1 h at 37 °C, washed with PBS, permeabilized with 1 M HCl for 2 h at room temperature, and blocked with 0.2 M glycine for 1 h at 37 °C and with 0.2% fetal bovine serum for 15 min. Next, trichomonads were incubated with the anti-TveIF-5A antibody or NMS (1:20 dilution) for 18 h at 4 °C and washed with PBS. Then, parasites were incubated with fluorescein isothiocyanate-conjugated anti-mouse immunoglobulins (Jackson ImmunoResearch) (1:90 dilution) for 40 min at room temperature, washed, mounted with Vectashield mounting solution (Vector Lab), and observed by laser confocal microscopy (Leica, DMLS).

2.10. Protein extraction and purification

For protein extraction, parasites 1.8×10^8 were harvested, washed three times with PBS pH 7, and directly lysed with 200 μ l Isoelectric focusing (IEF) buffer (7 M urea, 4% CHAPS, 70 mM DTT and 2% IPG buffer 3–10, trace bromophenol blue; Bio-Rad). The supernatant was centrifuged at $13\,000 \times g$ for 10 min at 4 °C to remove insoluble material. The extracted proteins were used for 2D gel electrophoresis.

2.11. 2D gel electrophoresis

For IEF, aliquots of 120 μ l (1.08×10^8 parasites) were then applied to the IPG strips (7 cm, linear pH 4–7; Bio-Rad) by in-gel rehydration. All IEF took place on a Protean IEF cell (Bio-Rad) with a surface temperature of 15 °C and a maximum current of 50 μ A/strip. Focusing parameters were as follows: passive rehydration for 12 h; step 1—gradient from 1 to 200 V over 35 min; step 2—gradient from 200 to 3322 V over 220 min; step 3—gradient from 3322 to 10,148 V over 270 min. Before running the second dimension, the IPG strips were first reduced (10 mg/ml DTT) and then alkylated (25 mg/ml iodoacetamide) in equilibration buffer (6 M urea, 2% SDS, 300 mM Tris-HCl at pH 8.8, 20% glycerol)

for 15 min at room temperature. Equilibrated IPG strips were transferred to the second dimension gel (15% SDS-polyacrylamide) and sealed with 0.5% (w/v) agarose in equilibration buffer containing a trace of bromophenol blue. Gels were run at 35 mA/gel.

3. Results

3.1. *T. vaginalis* has two *eif-5a* genes

The conserved region of human and *Plasmodium eif-5a* genes was used to search for homologous genes in the *T. vaginalis* genome. Two *eif-5a* hypothetical gene sequences, named *tveif-5a1* and *tveif-5a2*, were identified. Both *tveif-5a* genes have the same size of 504 bp, encoding 168 aa proteins with 98% identity, and with a predicted molecular weight of 19 kDa. The DNAsis analysis showed that both loci had a similar G + C pattern distribution. The G + C content in both ORFs was 49.2%. These ORFs were separated by an A + T rich region containing 20% G + C (data not shown). The locus *tveif-5a1* showed three ORFs in the same strand, which encode a hypothetical protein, an eIF-5A protein (TveIF-5A1), and a protein with a SH3 domain (Fig. 1A). The second locus (*tveif-5a2*) also showed three ORFs in the same strand, and they encode a trichomonad hypothetical protein TLK, eIF-5A protein (TveIF-5A2), and a surface antigen (Fig. 1A).

Analysis of the 5' untranslated region (UTR) of the *tveif-5a1* and *tveif-5a2* genes showed the typical Inr consensus sequence at –21 nt in *tveif-5a1* and at –26 nt in *tveif-5a2*. Analysis of the 3'-UTR region in both genes showed a putative polyadenylation sequence (UAAA), at 29 nt downstream of the TAA stop codon in the *tveif-5a1* gene and at 32 nt downstream of the TAA stop codon in the *tveif-5a2* gene (data not shown). Sequence analysis of the *tveif-5a1* and *tveif-5a2* genes showed 38 differences at the nucleotide level, 36 of which were silent substitutions, and two of which generated changes in the usage of codons (data not shown).

3.2. The TveIF-5A1 and TveIF-5A2 proteins are highly conserved

Multiple alignment of amino acid sequences of eIF-5A demonstrated a high degree of conservation among different species of mammals, plants, protozoa, yeast, and fungi, as well as with the bacterial EF-P protein, especially in the residues surrounding the lysine (Fig. 1B). This region contains a domain of the 12 amino acid residues STSKTGKKGHAK, which undergoes the modification corresponding to the loop region (domain I) and is highly conserved in all analyzed sequences, except in the bacterial protein. Thus, it is reasonable that the conformation adopted by this loop is similar in all these proteins; even though the C-terminal portion is less conserved.

BLAST analysis of the deduced amino acid sequence of TveIF-5A1 and TveIF-5A2 showed that the highest values (7e–92 and 4e–92, respectively), to related eukaryotic eIF-5A proteins. The TveIF-5A1 and TveIF-5A2 protein sequences presented 38–98% identity and 63–99% similarity to *H. sapiens* EIF-5A, *S. cerevisiae* TIF51B, *P. falciparum* eIF-5A, *Entamoeba histolytica* eIF-5A, and *Arabidopsis thaliana* AtEIF5A (Table 2). These results suggest that these eIF-5A proteins may have a common ancestor with similar function. Furthermore, in *T. vaginalis*, the TveIF-5A proteins also have the highly conserved hypusination domain (K-58), suggesting an early evolution for this protein and high conservation in the evolutionary scale.

3.3. Molecular modeling of trichomonad eIF-5A proteins

A 3D protein theoretical model generated for TveIF-5A isoforms 1 and 2 showed a structure that is homologous to the crystal

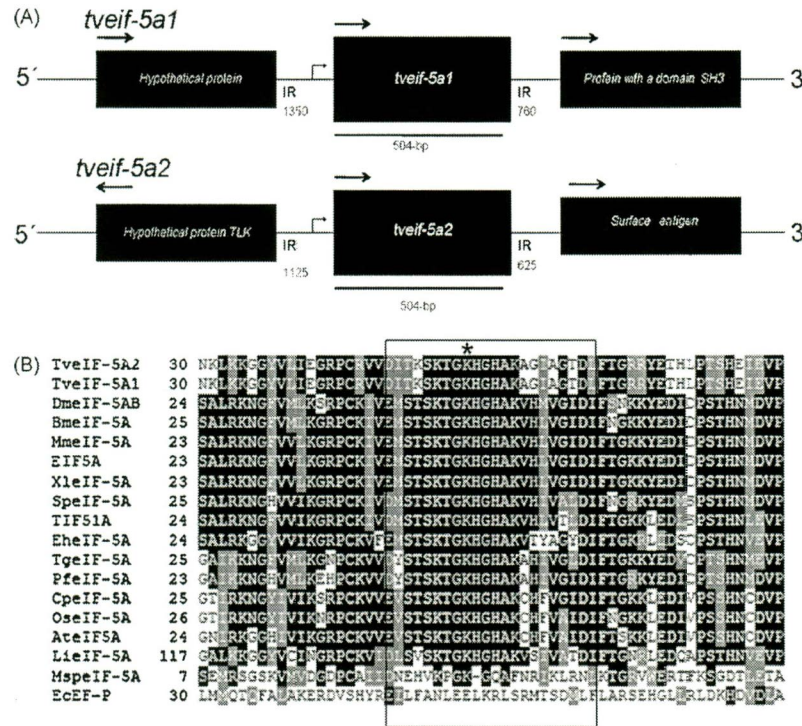


Fig. 1. Multiple alignment of the deduced amino acid sequences of putative *T. vaginalis* TveIF-5A1 and TveIF-5A2 with organisms from three different phyla. (A) Maps of the *tveif-5a* genes. The *tveif-5a1* gene is in the locus TVAG_283020 and the *tveif-5a2* gene is in the locus TVAG_361780 (<http://trichbd.org>). The three ORFs of the two genes are identified by horizontal bars for *tveif-5a1* (ORF1, hypothetical protein; ORF2, eIF-5A1 gene; ORF3, domain SH3 protein), and *tveif-5a2* (ORF1, hypothetical protein TLK; ORF2, *tveif-5a2* gene; ORF3, surface antigen, partial sequence). (B) Sequences from *Trichomonas vaginalis* (TveIF-5A1 and TveIF-5A2), *Saccharomyces cerevisiae* (TIF51A), *Plasmodium falciparum* (PfeIF-5A), *Schizosaccharomyces pombe* (SpeIF-5A), *Mus musculus* (MmeIF-5A), *Homo sapiens* (EIF5A), *Xenopus laevis* (XleIF-5A), *Bombyx mori* (BmeIF-5A), *Toxoplasma gondii* (TgeIF-5A), *Carica papaya* (CpeIF-5A), *Drosophila melanogaster* (DmeIF-5AB), *Oriza sativa* (OseIF-5A), *Arabidopsis thaliana* (AtelF5A), *Leishmania infantum* (LieIF-5A), *Entamoeba histolytica* (EheIF-5A), *Escherichia coli* (EceIF-P), and *Marimona sp.* (MspeIF-5A). Alignments were generated by the CLUSTAL W program and edited by the BOXSHADE program. The black box shows homologous sequences, and the gray box denotes similar sequences. The black square shows the conserved region of 12 aa; the lysine residue that can be hypusinated is marked with a *.

structure of eIF-5A from bacteria (EF-P protein) and the EIF5A human isoforms, with high similarity in the N-terminal domain (Clement et al., 2003). These studies showed that TveIF-5A is composed of two predominantly β -sheet domains. Domain I is composed of six β -strands and domain II is composed of six β -strands and one α -helix. Interestingly, the hypusinated lysine residue is located in a loop turn in the N-terminal domain I of TveIF-5A (data not shown).

3.4. Phylogenetic analysis of TveIF-5A amino acid sequences

Based on the eIF-5A sequences from different organisms, a phylogenetic analysis was performed. The eIF-5A sequences form distinct groups: the archaeal group (I), which branches in two subgroups encompassing yeast and fungi and (II) the group of

eukaryotes and arthropods. The bacterial EF-P protein was included as an outgroup. This phylogenetic tree shows that all eukaryotic groups—yeast, fungi, arthropods, and protozoa—have a common ancestor, although each group underwent a process of speciation and duplication. We found that eIF-5A is highly conserved along to its evolutionary scale among all organisms. TveIF-5A1 and TveIF-5A2 were grouped into the bacterial branch (Fig. 2). To determine the evolutionary origin of the *tveif-5a* genes, we constructed a phylogenetic tree of the 18s gene, which is highly conserved. The 18s of *T. vaginalis* is grouped with the *E. histolytica* parasite, suggesting that *tveif-5a* genes came from a horizontal gene transfer (data not shown).

3.5. Expression of *tveif-5a1* and *tveif-5a2* in *T. vaginalis*

Semi-quantitative RT-PCR was performed with primers designed for each *eif-5a* gene (Fig. 3A, lane 1). Then, the RT-PCR product was digested with Hind III and analyzed by agarose gel electrophoresis. Three digestion fragments were obtained: a 504-bp corresponding to the complete *tveif-5a1* mRNA and two of 413 bp and 91 bp corresponding to the complete *tveif-5a2* mRNA (Fig. 3A, lane 2). The *tveif-5a* gene sequences of multiple clones specific for each gene were compared with the sequences reported in the draft of the *T. vaginalis* genome, *tveif-5a1* and *tveif-5a2* (TVAG_283020, TVAG_361780). These experimental sequences from 18 clones (*tveif-5a1*) and 20 clones (*tveif-5a2*) differed in 38 nucleotides inside the coding region, resulting in 98% identity and the appearance of a new HindIII site in the *tveif-5a2* gene. The alignment of the two genes *tveif-5a1* and *tveif-5a2* is shown in Fig. 3B.

Table 2
Comparison of TveIF-5A with other eukaryotic eIF-5A proteins.

Protein name	Organism	Gene accession number ^a	e-values	S (%)	I (%)
TveIF-5A1	<i>T. vaginalis</i>	TVAG_283020	7e–92	99	98
TveIF-5A2	<i>T. vaginalis</i>	TVAG_361780	4e–92	99	98
EIF5A	<i>H. sapiens</i>	NP_001137232.1	5e–26	63	38
eIF-5A	<i>P. falciparum</i>	XP_001350451.1	3e–25	64	41
TIF51B	<i>S. cerevisiae</i>	AAA35155.1	1e–27	63	38
eIF-5A	<i>E. histolytica</i>	XP_651531.1	4e–25	63	39
AtelF5A	<i>A. thaliana</i>	NP_172848.1	1e–23	63	38

S = similarity, I = identity.

^a GenBank database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez>).

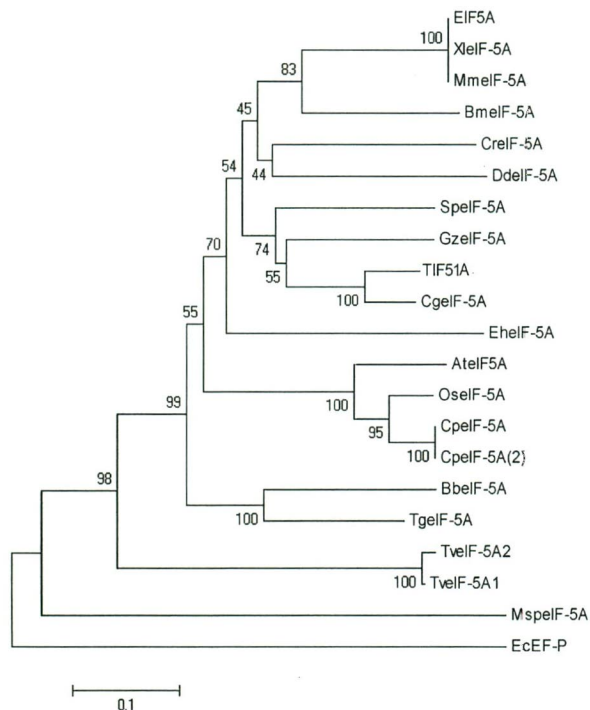


Fig. 2. Phylogenetic analysis of TveIF-5A *T. vaginalis* amino acid sequences. Amino acid sequences of *Trichomonas vaginalis* (TveIF-5A1 and TveIF-5A2), *Saccharomyces cerevisiae* (TIF51A), *Candida glabrata* (CgelF-5A), *Schizosaccharomyces pombe* (SpelF-5A), *Mus musculus* (MmelF-5A), *Homo sapiens* (EIF5A), *Xenopus laevis* (XleIF-5A), *Caenorhabditis elegans* (CreIF-5A), *Babesia bovis* (BbelF-5A), *Bombyx mori* (BmelF-5A), *Toxoplasma gondii* (TgelF-5A), *Carica papaya* (CpelF-5A, CpelF-5A(2)), *Dictiostelium discoideum* (DdelF-5A), *Oryza sativa* (OselF-5A), *Arabidopsis thaliana* (AtelF5A), *Gibberella zeae* (GzelF-5A), *Entamoeba histolytica* (EhelF-5A), *Escherichia coli* (EcEF-P), and *Marimona* sp. (MspelF-5A). The phylogenetic tree was constructed with the MEGA 4.0 program based on a Clustal W alignment, using complete protein sequences, with *E. coli* as an outgroup. Bootstrap values of 1000 replicates, the number represent the bootstrap proportions (%). The scale bar represents 0.01 substitutions per site.

By Western blot assays, the anti-peptide TveIF-5A antibody detected double band of 19 and 20 kDa in parasite extracts, corresponding to the expected size for the TveIF-5A protein of *T. vaginalis* (Fig. 3C, lane 3). In the 2D-WB experiments, the anti-peptide TveIF-5A antibody detected two spots: spot 1 at 19 kDa and a *pI* of 5.2, and spot 2 at 20 kDa and a *pI* of 5.5 (Fig. 3D). The NMS used as a negative control in 1D and 2D-WB gave no reaction (Fig. 3C, lane 2 and data not shown, respectively).

3.6. The TveIF-5A protein is localized in the cytoplasm of *T. vaginalis*

The localization of the TveIF-5A in *T. vaginalis* was analyzed by indirect immunofluorescence assays, using fixed non-permeabilized and permeabilized parasites. Fig. 4 shows that TveIF-5A is localized in the cytoplasm of permeabilized trichomonads (panel F). No fluorescence was seen in non-permeabilized parasites (panel C), or parasites incubated with NMS, used as a negative control (panel A). These data show that TveIF-5A is expressed as a cytoplasmic protein in *T. vaginalis*.

4. Discussion

In this study, we have shown that *T. vaginalis* has two *eif-5a* genes, each with an open reading frame of 504-bp. These genes encode two putative eIF-5A proteins of 168 amino acids that are localized in the trichomonad cytoplasm. Additionally, at least two

different size proteins of 19 and 20 kDa and *pI* 5.2 and 5.5, respectively, have been detected in *T. vaginalis*. Both genes are expressed in *T. vaginalis* in the growth conditions used in this study.

Our data are consistent with the literature. Other organisms have also been shown to have more than one *eif-5a* gene. For example, in *A. thaliana*, there are three isoforms of the AtelF5A protein, each encoded by a separate gene and exhibiting distinct expression profiles (Hopkins et al., 2008). Two *eif-5a* genes have been described in *S. cerevisiae* (TIF51A and TIF51B), which encode 90% identical proteins that are differentially transcribed in response to the presence of oxygen (Dias et al., 2008). In humans, two genes of 84% identity (EIF5A1 and EIF5A2) have been described, and they have been reported to be differentially transcribed among tissues and some tumor cell lines. Many eukaryotes have different isoforms of *eif-5a* genes and nonfunctional pseudogenes (Clement et al., 2003). *Caenorhabditis elegans* has two genes (*iff-1* and *iff-2*) which share 85% identity and are differentially expressed (Hanazawa et al., 2004). Also, the tomato plant has four *eIF-5A* genes and the tetraploid potato has five genes (Wang et al., 2001). Rice (*Oryza sativa*) has two *eIF5A* genes (*OselF5A-1* and *OselF5A-2*). These genes exhibited a similar expression pattern during leaf development and senescence (Chou et al., 2004).

The two *eif-5a* genes in *T. vaginalis* showed 98% identity and high homology to *eIF-5A* from multiple organisms: human, *P. falciparum*, *L. infantum* and others (Molitor et al., 2004; Kaiser et al., 2007).

No introns were found in the *tveif-5a* genes. Analysis of the transcriptional start sites showed the typical short 5'-UTR, including the Inr element previously characterized in this parasite (Liston and Johnson, 1999), and the putative polyadenylation signal (Espinosa et al., 2002) were also found at the 3'-UTR of both genes.

The 3D theoretical model we generated for TveIF-5A is homologous to the model of the human EIF5A isoforms 1 and 2 and the crystal structure of eIF-5A from *Leishmania* (Kissinger et al., 2003). The high β -sheet content and one alpha helix in the N-terminal region are typical of this protein. The TveIF-5A secondary structure is highly conserved. It shows a two-domain protein in which domain I is composed of six β -strands and domain II is composed of five β -strands and one α -helix. This structure is similar to the proposed 3D model for the human EIF5A protein. These data suggest that the eIF-5A protein is highly conserved among eukaryotes. It has been proposed that proteins containing this type of alpha-helix structure are involved in transporting a variety of RNA from the nucleus to the cytoplasm, such as the HIV RNA Rev (Schatz et al., 1998). TveIF-5A has two motifs that are highly conserved with other eukaryotes, like *P. falciparum* (Molitor et al., 2004), *P. vivax* (Kaiser et al., 2007), *Leishmania major* (Cano et al., 2008), and *Toxoplasma gondii* (Cano et al., 2008; Kissinger et al., 2003), while the EF-P of bacterial has three highly conserved motifs. The difference between TveIF-5A and EF-P is the absence of the third domain, the lack of which may be relevant for TveIF-5A and other eIF-5A proteins in mRNA transport and/or binding and stabilization (Park, 2006).

Moreover, the hypusine modification site in *T. vaginalis* is highly conserved and is located at lysine 58. The presence of this amino acid in TveIF-5A suggests that it is conserved in evolution and could be used for basic functions. The exposed hypusine loop in the N-terminal domain I of TveIF-5A may be the critical point of interaction between TveIF-5A and its downstream effectors. In humans, EIF5A may adopt an ordered conformation that might contribute to its functionality during the interaction with other molecules, such as deoxyhypusine synthase or nucleic acids (Lee et al., 1999).

The region near Lys-31 in the eIF-5A homolog of *E. coli* and *Marimona* sp. is modified by an unusual group of 148 ± 1 Da. This

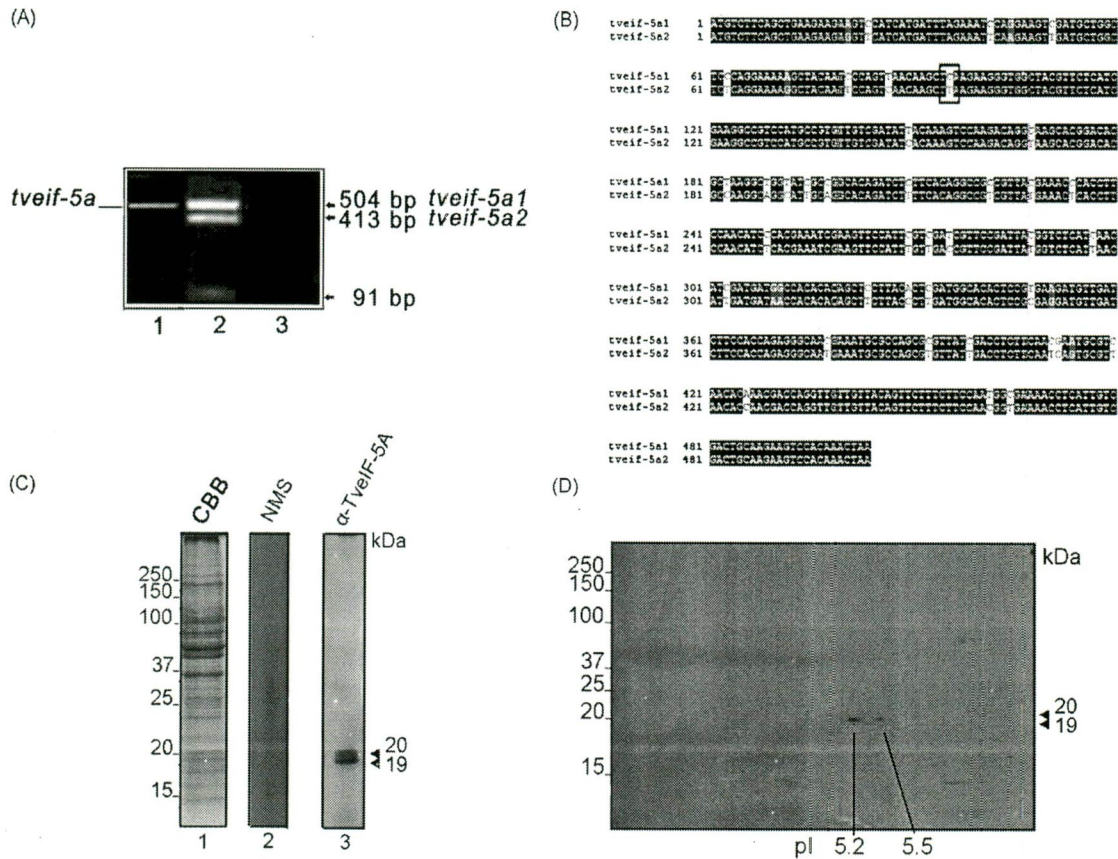


Fig. 3. Expression of *tveif-5a* in *T. vaginalis*. (A) Semi-quantitative RT-PCR analysis to detect the *tveif-5a* transcript using total RNA from *T. vaginalis* parasites separated on 1.5% agarose gel electrophoresis and ethidium bromide staining. Expression of *tveif-5a1* and *tveif-5a2* (lane 1), digestion of the RT-PCR product with the HindIII enzyme (lane 2) and negative control of RT- (lane 3). (B) *tveif-5a1* and *tveif-5a2* nucleotide sequences were aligned by the Clustal W program and edited by the BOXSHADE program. The black box shows the identical sequences, and the white box denotes the different nucleotides between the two sequences. In the square is shown the restriction site of the HindIII enzyme for *tveif-5a2*. (C) Western blot assays with total extract of trichomonads from *T. vaginalis* isolate CNCI 147 separated by SDS-PAGE (lane 1, CBB) and Coomassie brilliant blue-stained or blotted onto nitrocellulose membranes and probed with an anti-Tveif-5A serum (lane 3) prepared against a synthetic peptide of Tveif-5A. Preimmune normal mouse serum (NMS) was used as a negative control (lane 2). Both sera were used at a 1:60,000 dilution. kDa, molecular mass markers in kilodaltons. (D) Total extract of *T. vaginalis*. The gel was obtained after separation of the proteins by 2D (first dimension: IEF with IPG strips with pH range 4–7, second dimension: 15% gel, SDS-PAGE), blotted onto nitrocellulose membranes, and probed with the anti-Tveif-5A serum (1:100 dilution). The arrowheads indicate bands or spots recognized by the antibody of 19 and 20 kDa. Preimmune NMS was used as a negative control (data not shown).

group differs from hypusine but may also be essential for the activity and stability of the native protein. The Lys-31 region has special motif VKPGK that is conserved in the eIF-5A sequences of many different bacteria and *M. jannaschii* (Kim et al., 1998). The presence of this amino acid in TveIF-5A suggests the acquisition or maintenance of a specific biochemical pathway during evolution that is responsible for hypusine formation.

A comparison of eIF-5A sequences from a phylogenetic point of view reveals high conservation of this protein in mammals, yeast, fungi, and some protozoa including *P. falciparum*, and *Leishmania* (Molitor et al., 2004; Kissinger et al., 2003). However, this study further revealed that TveIF5A is more closely grouped with the bacterial eIF-P such as those found in *E. coli* and *Marimonas* sp. This phylogenetic tree suggests that the trichomonad and *eif-5a* gene probably arose from a horizontal transfer from bacteria (Sjölander, 2004).

In our 2D Western blots, we detected two spots in total *T. vaginalis* extracts using the anti-peptide eIF-5A antibody. We interpret these data as follows: spot 1 may represent the precursor eIF-5A protein and spot 2 may correspond to the mature eIF-5A protein after some post-translational modifications, such as hypusination, phosphorylation, and/or glycosylation (Wolff et al., 2007). Hypusination and N-terminal

phosphorylation have been observed for homologs of these proteins (Kang et al., 1993; Kang and Hershey, 1994). In fact, modifications like these might be responsible for the 1 kDa difference between these two proteins.

The anti-peptide antibody used for the 1D and 2D Western blot assays detecting the TveIF-5A protein in *T. vaginalis* was designed using N-terminal region TveIF-5A2, which is identical to that of TveIF-5A1. For this reason, the antibody should not distinguish between the TveIF-5A1 and TveIF-5A2 proteins. Based on the expression of the mRNA transcripts (Fig. 3A), both proteins can be expressed at the same time.

Although others have reported the presence of eIF-5A protein in the nucleus and cytoplasm in different organisms (Shi et al., 1996; Rosorius et al., 1999; Parreiras-e-Silva et al., 2007), in *T. vaginalis* TveIF-5A was localized only in the cytoplasm. No protein was observed in the nucleus, though we do not rule out the possible presence of this protein in the nucleus under different growth conditions. However, it does not possess the putative nuclear localization signals (NLS) identified in the eukaryotic eIF-5A N-terminal sequences (Parreiras-e-Silva et al., 2007), suggesting that the TveIF-5A is located only in the trichomonad cytoplasm.

Based on these results, the characterization of other proteins that interact and modify (especially those that hypusinate) the

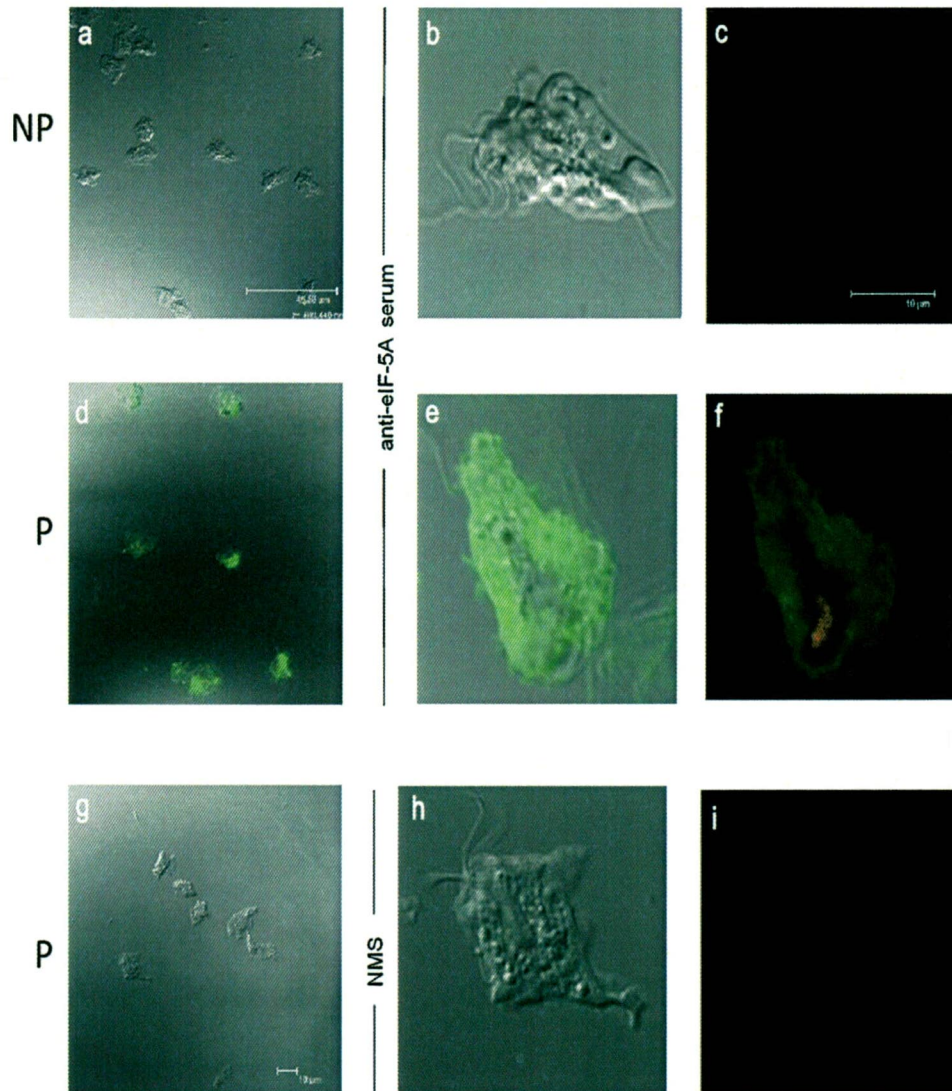


Fig. 4. Expression and localization of TveIF-5A in *T. vaginalis*. Immunofluorescence analysis of fixed, non-permeabilized (a–c) and permeabilized (d–f) parasites incubated with the polyclonal mouse anti-TveIF-5A serum at a 1:20 dilution, followed by a secondary anti-mouse conjugated to fluorescein isothiocyanate (Jackson) antibody at a 1:90 dilution and counterstained with propidium iodide. Indirect immunofluorescence (c, f, i), and the corresponding phase contrast microscopy at 60 \times magnification (a, d, g) and 1.58 zoom (b, e, h). As a negative control, permeabilized parasites were incubated with NMS (g–i) at a 1:20 dilution.

eIF-5A protein, such as DHS or DOHH, as well as the regulatory mechanisms of TveIF-5A hypusination mediated by polyamines would be of great future interest. These experiments might explain the effect of polyamines as another environmental signal for regulation of the cytotoxicity levels of *T. vaginalis* (Alvarez-Sánchez et al., 2008). Studies in this direction are in progress.

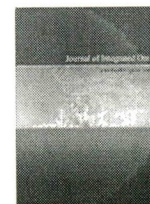
Acknowledgments

This work was supported by grants from CONACyT (060231 and 83808) Mexico (to M.E.A.S.). B.C.G. was supported by a scholarship from CONACyT México and ICyT-DF (PIFUTP08-150). The excellent art work of Sollanch Archer and the technical support of M.Sc. Eduardo Carrillo for his assistance in the Confocal Microscopy Facility at UACM are acknowledged. We also thank Dr. Gabriel López for permission to use the Microscopy Facility at Instituto Nacional de Pediatría (INP); and we acknowledge Brenda Herrera Villalobos of the UACM for her technical assistance.

References

- Alvarez-Sánchez, M.E., Avila-González, L., Becerril-García, C., Fattel-Facenda, L., Ortega-López, J., Arroyo, R., 2000. A novel cysteine proteinase (CP65) of *Trichomonas vaginalis* involved in cytotoxicity. *Microb. Pathog.* 28, 193–202.
- Alvarez-Sánchez, M.E., Solano-González, E., Yañez-Gómez, C., Arroyo, R., 2007. Negative iron regulation of the CP65 cysteine proteinase cytotoxicity in *Trichomonas vaginalis*. *Microb. Infect.* 9, 1597–1605.
- Alvarez-Sánchez, M.E., Carvajal-Gamez, B.I., Solano-González, E., Martínez-Benítez, M., García, A.F., Alderete, J.F., Arroyo, R., 2008. Polyamine depletion down-regulates expression of the *Trichomonas vaginalis* cytotoxic CP65, a 65 kDa cysteine proteinase involved in cellular damage. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* 40, 2442–2451.
- Aoki, H., Dekany, K., Adams, S.L., Ganoza, M.C., 1997. The gene encoding the elongation factor P protein is essential for viability and is required for protein synthesis. *J. Biol. Chem.* 272, 32254–32259.
- Cano, V.S.P., Jeon, G.A., Johansson, H.E., Henderson, C.A., Park, J.H., Valentini, S.R., Hershey, J.W.B., Park, M.H., 2008. Mutational analyses of human eIF5A-1: identification of amino acid residues critical for hypusine modification and eIF5A activity. *FEBS J.* 275, 44–58.
- Chan, K.L., New, D., Ghandhi, S., Wong, F., Lam, C.M.C., Wong, J.T.Y., 2002. Transcript levels of the eukaryotic translation initiation factor 5A gene peak at early G₁ phase of the cell cycle in the Dinoflagellate *Cryptocodinium cohnii*. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 2278–2284.

- Clement, P.M.J., Henderson, C.A., Jenkins, Z.A., Smit-McBride, Z., Wolff, E.C., Hershey, J.W.B., Park, M.H., Johansson, H.E., 2003. Identification and characterization of eukaryotic initiation factor 5A-2. *Eur. J. Biochem.* 270, 4254–4263.
- Chou, W.C., Huang, Y.W., Tsay, W.S., Chinag, Y.T., Huang, D.D., Huang, H.J., 2004. Expression of genes encoding the rice translation initiation factor, eIF5A, is involved in developmental and environmental responses. *Physiol. Plant.* 121, 50–57.
- Diamond, L.S., 1957. The establishment of various Trichomonads of animals and man in axenic cultures. *J. Parasitol.* 43, 488–490.
- Dias, C.A.O., Cano, V.S.P., Rangel, S.M., Apponi, L.H., Frigieri, M.C., Muniz, J.R.C., Garcia, W., Park, M.H., Garratt, R.C., Zanelli, C.F., Valentini, S.R., 2008. Structural modeling and mutational analysis of yeast eukaryotic translation initiation factor 5A reveal new critical residues and reinforce its involvement in protein synthesis. *FEBS J.* 275, 1874–1888.
- El-Shazly, A.M., El-Naggar, H.M., Soliman, M., El-Negeri, M., El-Nemr, H.E., Handousa, A.E., Morsy, T.A., 2001. A study on *Trichomoniasis vaginalis* and female infertility. *J. Egypt. Soc. Parasitol.* 31, 545–553.
- Espinosa, N., Hernández, R., López-Griego, L., López-Villaseñor, I., 2002. Separable putative polyadenylation and cleavage motifs in *Trichomonas vaginalis* mRNAs. *Gene* 289, 81–86.
- Francis, M.J., Hastings, G.Z., Brown, F., McDermed, J., Lu, Y.A., Tam, J.P., 1991. Immunological evaluation of the multiple antigen peptide (MAP) system using the major immunogenic site of foot-and-mouth disease virus. *Immunology* 73, 249–254.
- Guenther, P.C., Secor, W.E., Dezzutti, C.S., 2005. *Trichomonas vaginalis*-induced epithelial monolayer disruption and human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) replication: implications for the sexual transmission of HIV-1. *Infect. Immun.* 73, 4155–4160.
- Hanawa-Suetsugu, K., Sekine, S., Sakai, H., Hori-Takemoto, C., Terada, T., Unzai, S., Tame, J.R.H., Kuramitsu, S., Shirouzu, M., Yokoyama, S., 2004. Crystal structure of elongation factor P from *Thermus thermophilus* HB8. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101, 9595–9600.
- Hanazawa, M., Kawasaki, I., Kunitomo, H., Gengyo-Ando, K., Bennett, K.L., Mitani, S., Iino, Y., 2004. The *Caenorhabditis elegans* eukaryotic initiation factor 5A homologue IFF-1, is required for germ cell proliferation, gametogenesis and localization of the P-granule component PGL-1. *Mech. Dev.* 121, 213–224.
- Hopkins, M.T., Lampi, Y., Wang, T.W., Liu, Z., Thompson, J.E., 2008. Eukaryotic translation initiation factor 5A is involved in pathogen-induced cell death and development of disease symptoms in *Arabidopsis*. *Plant. Physiol.* 148, 479–489.
- Joe, Y.A., Park, M.H., 1994. Structural features of the eIF-5A precursor required for posttranslational synthesis of deoxyhypusine. *J. Biol. Chem.* 269, 25916–25921.
- Kaiser, A., Hammels, I., Gottwald, A., Nassar, M., Zaghoul, M.S., Motaal, B.A., Hauber, J., Hoerauf, A., 2007. Modification of eukaryotic initiation factor 5A from *Plasmodium vivax* by a truncated deoxyhypusine synthase from *Plasmodium falciparum*: an enzyme with dual enzymatic properties. *Bioorg. Med. Chem.* 15, 6200–6207.
- Kang, H.A., Schwelberger, H.G., Hershey, J.W.B., 1993. Translation initiation factor eIF-5A, the hypusine-containing protein, is phosphorylated on serine in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 268, 14750–14756.
- Kang, H.A., Hershey, J.W.B., 1994. Effect of initiation factor eIF-5A depletion on protein synthesis and proliferation of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 269, 3934–3940.
- Kim, K.K., Hung, L.W., Yokota, H., Kim, R., Kim, S.H., 1998. Crystal structure of eukaryotic translation initiation factor 5A from *Methanococcus jannaschii* at 1.8 Å resolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95, 10419–10424.
- Kissinger, J.C., Gajria, B., Li, L., Paulsen, I.T., Roos, D.S., 2003. ToxoDB: accessing the *Toxoplasma gondii* genome. *Nucleic Acid Res.* 31, 234–236.
- Kumar, S., 1996. A stepwise algorithm for finding minimum evolution trees. *Mol. Biol. Evol.* 13, 584–593.
- Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680–685.
- Lee, Y.B., Joe, Y.A., Wolff, E.C., Dimitriadis, E.K., Park, M.H., 1999. Complex formation between deoxyhypusine synthase and its protein substrate, the eukaryotic translation initiation factor 5A (eIF5A) precursor. *Biochem. J.* 340, 273–281.
- Liston, D.R., Johnson, P.J., 1999. Analysis of a ubiquitous promoter element in a primitive eukaryote: early evolution of the initiation element. *Mol. Cell. Biol.* 19, 2380–2388.
- Molitor, I.M., Knöbel, S., Dang, C., Spielmann, T., Alléra, A., König, G.M., 2004. Translation initiation factor eIF-5A from *Plasmodium falciparum*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 137, 65–74.
- Park, J.H., Aravind, L., Wolff, E.C., Kaevel, J., Kim, Y.S., Park, M.H., 2006. Molecular cloning, expression, and structural prediction of deoxyhypusine hydroxylase: a HEAT-repeat-containing metalloenzyme. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103, 51–56.
- Park, J.H., Wolff, E.C., Folk, J.E., Park, M.H., 2003. Reversal of the deoxyhypusine synthesis reaction. Generation of spermidine or homospermidine from deoxyhypusine by deoxyhypusine synthase. *J. Biol. Chem.* 278, 32683–32691.
- Park, M.H., 1989. The essential role of hypusine in eukaryotic translation initiation factor 4D (eIF-4D). Purification of eIF-4D and its precursors and comparison of their activities. *J. Biol. Chem.* 264, 18531–18535.
- Park, M.H., 2006. The post-translational synthesis of a polyamine-derived amino acid, hypusine, in the eukaryotic translation initiation factor 5A (eIF5A). *J. Biochem.* 139, 161–169.
- Parreiras-e-Silva, L.T., Gomes, M.D., Oliveira, E.B., Costa-Neto, C.M., 2007. The N-terminal region of eukaryotic translation initiation factor 5A signals to nuclear localization of the protein. *Biochem. Biophys.* 362, 393–398.
- Rosorius, O., Reichart, B., Krätzer, F., Heger, P., Dabauvalle, M.C., Hauber, J., 1999. Nuclear pore localization and nucleocytoplasmic transport of eIF-5A: evidence for direct interaction with the export receptor CRM1. *J. Cell. Sci.* 112, 2369–2380.
- Saitou, N., Nei, M., 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 4, 406–425.
- Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A.R., 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 74, 5463–5467.
- Schatz, O., Oft, M., Dascher, C., Schebesta, M., Rosorius, O., Jaksche, H., Dobrovnik, M., Bevec, D., Hauber, J., 1998. Interaction of the HIV-1 Rev cofactor eukaryotic initiation factor 5A with ribosomal protein L5. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95, 1607–1612.
- Schnier, J., Schwelberger, H.G., Smit-McBride, Z., Kang, H.A., Hershey, J.W.B., 1991. Translation initiation factor 5A and its hypusine modification are essential for cell viability in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 11, 3105–3114.
- Schrader, R., Young, C., Kozian, D., Hoffmann, R., Lottspeich, F., 2006. Temperature-sensitive eIF5A mutant accumulates transcripts targeted to the nonsense-mediated decay pathway. *J. Biol. Chem.* 281, 35336–35346.
- Shi, X.P., Yin, K.-C., Zimolo, Z.A., Stern, A.M., Waxman, L., 1996. The subcellular distribution of eukaryotic translation initiation factor, eIF-5A, in cultured cells. *Exp. Cell. Res.* 225, 348–356.
- Sjölander, K., 2004. Phylogenomic inference of protein molecular function: advances and challenges. *Bioinformatics* 20, 170–179.
- Soper, D.M.D., 2004. Trichomoniasis: under control or undercontrolled? *Am. J. Obstet. Gynecol.* 190, 281–290.
- Viikki, M., Pukkala, E., Nieminen, P., Hakama, M., 2000. Gynaecological infections as risk determinants of subsequent cervical neoplasia. *Acta Oncol.* 39, 71–75.
- Wagner, S., Klug, G., 2007. An archaeal protein with homology to the eukaryotic translation initiation factor 5A shows ribonucleolytic activity. *J. Biol. Chem.* 282, 13966–13976.
- Wang, T.W., Lu, L., Wang, D., Thompson, J.E., 2001. Isolation and characterization of senescence-induced cDNAs encoding deoxyhypusine synthase and eukaryotic translation initiation factor 5A from tomato. *J. Biol. Chem.* 276, 17541–17549.
- World Health Organization, 2007. Global prevalence and incidence of selected curable sexually transmitted infections. World Health Organization, Geneva Switzerland.
- Wolff, E.C., Kang, K.R., Kim, Y.S., Park, M.H., 2007. Posttranslational synthesis of hypusine: evolutionary progression and specificity of the hypusine modification. *Amino Acids* 33, 341–350.
- Xu, A., Jao, D.L.E., Chen, K.Y., 2004. Identification of mRNA that binds to eukaryotic initiation factor 5A by affinity co-purification and differential display. *Biochem. J.* 384, 585–590.
- Yarlett, N., Martinez, M.P., Goldberg, B., Kramer, D.L., Porter, C.W., 2000. Dependence of *Trichomonas vaginalis* upon polyamine backconversion. *Microbiology* 146, 2715–2722.



ORIGINAL ARTICLE

The effect of Zn²⁺ on prostatic cell cytotoxicity caused by *Trichomonas vaginalis*

Laura Isabel Vazquez-Carrillo¹, Laura Itzel Quintas-Granados¹, Rossana Arroyo², Guillermo Mendoza Hernández³, Arturo González-Robles², Bertha Isabel Carvajal-Gamez¹, M. Elizabeth Álvarez-Sánchez¹

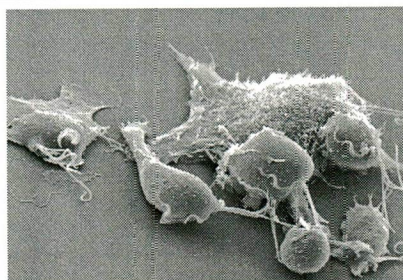
¹Posgrado en Ciencias Genómicas, Universidad Autónoma de la Ciudad de México, plantel del Valle, San Lorenzo #290 Col. Del Valle, CP 03100 México DF, México. Telephone: +52 36912000 x 15306. Fax number: +52 55755805; ²Departamento de Infectómica y Patogénesis Molecular, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional; ³Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F., México.

Received: 1 December 2010 Accepted: 3 February 2011 Available Online: 15 February 2011

ABSTRACT

Our investigation focused on the study of the proteome, morphology, and cytotoxicity of *T. vaginalis* during interactions with prostatic DU-145 cells. The results suggest that approximately 37 different proteins are expressed in the presence of Zn²⁺, which also down-regulates the protein and transcriptional levels of TvCP65. The result is a negative effect on trichomonal cytotoxicity. The differentially expressed proteins were identified by mass spectrometry analysis.

Keywords: *Trichomonas vaginalis*; DU-145 prostatic cells; morphology; Zn²⁺ proteome; cytotoxicity; TvCP65.



1. Introduction

Trichomonas vaginalis is the causative agent of trichomoniasis, a common worldwide infection associated with important public health problems [1] and implicated as a cofactor in the transmission of the human immunodeficiency virus [2]. This infection causes infertility [3], low birth weight infants and preterm delivery [4], and a predisposition to cervical neoplasia [5]. Infections in women cause vaginitis, cervicitis, urethritis, a malodorous seropurulent vaginal discharge and infertility [3, 6]. The cytopathogenicity of *T. vaginalis* begins with cytoadherence to target cells, which is mediated by ligand-receptor type interactions [7-8]. After adherence to vaginal epithelial cells (VECs), *T. vaginalis* suffers a dramatic change from ellipsoid to amoeboid [9]. Five adhesins (AP65, AP51, AP33, AP23, and AP120) [10-12] and two cysteine proteinases (CPs) (TvCP30 and TvCP62) [1, 13-15] participate in trichomonal adherence. Following adherence, a cytotoxic effect on the VECs cells, due to two CPs

(TvCP65, 65 kDa, [16-17] and TvCP39, 39 kDa, [18-19]), is observed before the target cells are phagocytized by the parasite [20]. In addition, other processes are involved in host colonization and target cell damage, such as hemolysis [21], immune evasion [22-23], signal transduction [9], and apoptosis induction [24].

Studies about female trichomoniasis indicate that iron (Fe²⁺), which is a component of the vaginal microenvironment, is also an essential element up-regulating numerous trichomonad genes. The Fe²⁺ concentration in the female microenvironment changes during the menstrual cycle, which modulates the expression of crucial metabolic enzymes and several pathogenic properties, and also leads to the multiplication and cytoadherence of *T. vaginalis* [25]. Not only is adhesin synthesis positively regulated by Fe²⁺ [26], but some proteinases involved in C3b complement component degradation [22] and immune evasion through the regulation of

P270 phosphorylation [27] are also regulated by this cation. Furthermore, Fe^{2+} down-regulates proteinases involved in trichomonal cytotoxicity, TvCP65 and TvCP39, which also participate in the interaction between the parasite and host, e.g., HeLa cells and VECs [1, 18]. In particular, TvCP65 degrades collagen IV and fibronectin in a broad pH range [16]. In contrast, TvCP39 degrades collagens (I, III, IV, and V), fibronectin and hemoglobin, and human IgA and IgG [18]. Interestingly, the proteolytic activities of TvCP39 [19] and TvCP65 [28] are negatively regulated by Fe^{2+} , the transcript and protein expression levels of TvCP65 agree with this decreased proteolytic activity [28].

Although trichomoniasis affects men, most are asymptomatic [29]. However, mild cases of urethritis, chronic prostatitis, and epididymitis have been associated with this infection [30]. *T. vaginalis* has several consequences in men's health, such as reduced sperm cell motility due to cell surface interactions between the parasite and the head or tail of the sperm as well as due to the flagella of parasites [31], which leads to male infertility [32]. During male infections, *T. vaginalis* accesses the microenvironment of the prostate, which is the gland that surrounds the posterior urethra of a man and, along with the seminal vesicles, produces prostatic and seminal fluids. In this environment, Zn^{2+} is an important component of prostatic fluids, is present at high concentration (4.5 to 7 mM), and has been found to be critical in spermatogenesis [33]. Prostatic secretions are primary components of the antimicrobial defenses of the male genitourinary tract [32]. Zn^{2+} , in particular, is principal to prostate defense due to its ability to prevent pathogen establishment in the male reproductive tract [33] and has, indeed, been found to have an antimicrobial spectrum towards bacteria, viruses, chlamydiae, and fungi [34]. This antimicrobial effect also affects *T. vaginalis*, which is sensitive to relatively low concentrations of Zn^{2+} chloride and sulfate, giving a minimal trichomonocidal concentrations (MTC) of 1.6 mM for both [33]. Nevertheless, a Zn^{2+} concentration of about 0.8 mM, obtained in patients with chronic bacterial prostatitis, is not trichomonocidal [35]. In these cases, *T. vaginalis* may persist for longer periods of time in the male genitourinary tract, and possibly progress to the prostate. *T. vaginalis* has been observed to infect the prostatic epithelium, cause chronic prostatitis, and elicit an inflammatory immune response [36]. Thus, *T. vaginalis* has been observed in prostate tissue near inflamed areas and epithelial hyperplasia, which suggests that *T. vaginalis* might be involved in prostate carcinogenesis [37].

Furthermore, Zn^{2+} plays an important role in the metabolism of parasites. It interferes in the function of the hydrogenosome, an organelle involved in the metabolism of pyruvate. The hydrogenosome is the main site of the initial Zn^{2+} effect in the pathogenic protozoan *Tritrichomonas foetus* [38].

The purpose of the present study was to investigate the morphology of *T. vaginalis* and the proteinases involved in its interaction with DU-145 prostatic cells and to examine the Zn^{2+} -dependent changes on the cytotoxicity and protein pro-

file of *T. vaginalis*. The Zn^{2+} effect on the protein and transcript levels of TvCP65 and the identification of differentially expressed proteins were of particular interest.

2. Material and methods

2.1 *T. vaginalis* and cells culture.

Trophozoites of *T. vaginalis* isolate CNCD 147 were asexually cultivated for 24 h in trypticase-yeast extract-maltose (TYM) medium pH 6.2 with 10% heat-inactivated horse serum (Gibco) and supplemented with or without 0.25 mM, 1.0 mM, and 1.6 mM ZnCl_2 (Sigma). Samples were taken at several time points up to 24 h for parasite counting using a Neubauer-counting chamber, and viability was measured by the trypan blue exclusion method [28]. Cytotoxicity assays and proteomic profiles were performed with parasites cultivated under the same conditions.

Immortalized HeLa ATCC cells were grown in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM; Life Technologies) supplemented with 10% horse serum and 10% penicillin-streptomycin (Gibco) at 37 °C in a 5% CO_2 atmosphere for 24 h until confluent cell monolayers were obtained. DU-145 ATCC cells were grown in low glucose DMEM (pH 7.2) supplemented with 10% fetal bovine serum and 10% penicillin-streptomycin (Gibco) at 37 °C in a 5% CO_2 atmosphere for 24 h until confluent cell monolayers were obtained.

2.2 2D gel electrophoresis.

For proteomic maps, we used a previously reported protocol [39] with modifications. *T. vaginalis* (1.2×10^8) grown in the presence or absence of 0.25 mM, 1.0 mM, and 1.6 mM Zn^{2+} were collected by centrifugation at 900 g for 5 min at 4 °C and washed three times with PBS pH 7.0. For the first dimension, parasites were lysed in a final volume of 200 μl rehydration solution (7 M urea, 4% CHAPS, 70 mM DTT, 2% IPG buffer pH 4–7, trace bromophenol blue; Bio-Rad). The supernatant was centrifuged at 13000 g for 10 min at 4 °C to remove insoluble material, and samples of 120 μl (corresponding to 7.2×10^7 parasites) were applied to an IPG strip (7 cm, pH 4–7 linear; Bio-Rad) for passive rehydration for 12 h. All isoelectric focusing took place on a Protean IEF system (Bio-Rad) as follows: step 1—gradient from 1 to 225 V over 35 min; step 2—gradient from 250 to 2479 V over 185 min; step 3—gradient from 2466 to 15,434 V over 210 min. Before the second dimension, proteins were reduced (10 mg/ml DTT) and alkylated (25 mg/ml iodoacetamide) step-wise, 15 min for each step, in equilibration buffer (6 M urea, 2% SDS, 300 mM Tris-Cl pH 8.8, 20% glycerol, and 0.002% bromophenol blue) at room temperature. Equilibrated IPG strips were separated on 12% SDS-PAGE gels (7 cm \times 8 cm \times 1.0 mm) using the MiniProtean II Cell vertical system (Bio-Rad) and standard Tris/glycine/SDS buffer. Gels were run at 35 mA/gel at room temperature until the tracking dye left the gel and stained with Coomassie Brilliant Blue G-250 following procedures described by the manufacturer. Finally, gels were documented using Gel Doc EQ (Bio-Rad). Image analysis was performed using the pDQuest software (Bio-Rad). Three

independent protein preparations, each obtained from an independent parasite culture, were performed for comparisons of 2-DE maps. Differentially expressed proteins were determined by a tridimensional analysis using Melanie 7 Software and identified by tandem mass spectrometry analysis (MS/MS).

2.3 LC-ESI-MS/MS.

The MS/MS analysis of each fraction obtained from the offline separation steps was carried out on a 3200 Q TRAP hybrid tandem mass spectrometer (Applied Biosystems/MDS Sciex, Concord, ON, Canada) equipped with a nanoelectrospray ion source (NanoSpray II). The instrument was coupled online to a nanoAcquity Ultra Performance LC system (Waters Corporations, Milford, MA). Samples were desalted by injection onto a Symmetry C18 UPLC trapping capillary column (180 $\mu\text{m} \times 20$ mm, Waters Corporations) and washed with 0.1% formic acid in 100% MilliQ water at a flow rate of 15 $\mu\text{l}/\text{min}$. After 3 min, the trap column was switched in line with a capillary analytical column. Peptides were separated on an ethylene-bridged hybrid, C18 UPLC column (75 $\mu\text{m} \times 100$ mm, Waters Corporations) using a linear gradient of 2-70% acetonitrile, 0.1% formic acid over a 60 min period at a flow rate of 0.25 $\mu\text{l}/\text{min}$. Spectra were acquired in automated mode using Information Dependent Acquisition (IDA). Precursor ions were selected in Q1 using the enhanced MS mode with a scan range of m/z 400-1500 and 4000 amu/s. Selected ions were subjected to an enhanced resolution scan at a low speed of 250 amu/s over a narrow (30 amu) mass range and, then, to an enhanced product ion scan (MS/MS). Precursor ions were fragmented by collision activated dissociation (CAD) in a Q2 collision cell using rolling collision energy. The generated fragment ions were captured and mass analyzed in a Q3 linear ion trap.

2.4 Database search.

For protein identifications, the molecular mass of each tryptic fragment was used as query at the National Center for Biotechnology nonredundant database using the MASCOT search algorithm (Matrix Science, London, UK, available at <http://www.matrixscience.com>). Monoisotopic mass values, mass tolerance (peptide ± 1.2 Da and fragment ± 0.6 Da), possible methionine residue oxidation, and deamidation and carbamidomethylation at cysteine residues were considered as variable modifications. A maximum of one missed tryptic cleavage per protein was allowed, and no taxonomic restrictions were considered in the database search. For positive identifications, MASCOT individual ion scores >56 indicated identity or extensive homology ($p < 0.05$).

2.5 Cell-binding assay.

The cell-binding assay to detect proteinases with affinity to the host cell surface was performed as previously described [15]. Briefly, a clarified detergent extract from 2×10^7 parasites, which was grown in the presence or absence of 0.25 mM, 1.0 mM, or 1.6 mM Zn^{2+} , was incubated for 18 h at 4 °C with 1×10^6 fixed HeLa or DU-145 cells. Then trichomonad

proteinases bound to the surface of fixed cells were eluted in Laemmli buffer [40] for 20 min at 37 °C. Released proteinases were loaded onto a 10% SDS-PAGE gel copolymerized with 2% gelatin and run at 35 mA/gel. Gels were washed with 10% Triton X-100 for 10 min with gentle agitation. Finally, proteinase activation was performed in 100 mM sodium acetate buffer pH 4.5 with 0.1% β -mercaptoethanol for 18 h at 4 °C, 25 °C, 37 °C, and 43.5 °C. The gels were further stained with Coomassie Brilliant Blue for a visualization in which clear bands against a dark background indicate proteolytic activity. Densitometry analyses of activity bands were performed in triplicate using the software Quantity One ver. 4.6.3 (Bio-Rad).

2.6 Cytotoxicity assay.

The cytotoxicity assay was carried out using confluent HeLa and DU-145 cells monolayers in 48-well microtiter plates with 3.5×10^4 HeLa or 5.5×10^4 DU-145 cells/well, respectively. Briefly, parasites (2.75×10^5) grown with or without 0.25 mM, 1.0 mM, and 1.6 mM Zn^{2+} were resuspended in TYM-DMEM medium without serum, added to confluent cell monolayers of HeLa or DU-145 cells at a ratio of 5:1 (parasites:host cell), and incubated for several time points, up to 24 h, at 37 °C under a 5% CO_2 atmosphere. Monolayer destruction was assessed using a colorimetric method and quantitated spectrophotometrically at 570 nm [14, 16, 28]. Each sample was performed in triplicate, and experiments were performed at least twice with similar results.

2.7 Western blot assay.

Total protein extract from parasites (2×10^7), which were grown in the presence or absence of 1.6 mM Zn^{2+} , were obtained by TCA-precipitation as previously described [16, 28, 41]. Solubilized proteins were resuspended in Laemmli buffer [40], boiled, and loaded onto a 10% polyacrylamide gel with an equivalent of 4×10^5 parasites/lane. Protein extracts were blotted onto nitrocellulose membranes and blocked with 5% skim milk in PBS (pH 7.0) for 18 h at 4 °C. Membranes were incubated for 18 h at 4 °C with anti-TvCP65 primary antibody as reported [16], and an anti- α -tubulin monoclonal antibody (1:1000 dilution, Invitrogen) was used as a loading control. Then the blotted membrane was washed five times with a PBS pH 7.0-0.1% Tween 20 buffer. The primary antibody was detected with a secondary goat anti-mouse-IgG (H+L) horseradish peroxidase conjugate (1:3000 dilution, Invitrogen). The membrane was washed with PBS pH 7.0-0.1% Tween 20 and visualized using an enhanced chemiluminescence ECL Plus Western Blotting Detection System (GE Healthcare) according to the manufacturer's instructions.

2.8 RNA extraction and cDNA synthesis.

A sample containing 2×10^7 parasites grown with or without 0.25 mM, 1.0 mM, and 1.6 mM of Zn^{2+} was collected by centrifugation at 900 g for 5 min at 4 °C (Allegra™ X-22 Centrifuge, Beckman Coulter). The pellet was suspended in 1 ml of TRIzol® reagent (Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad,

CA), and the total RNA was extracted as recommended by the manufacturer. RNA concentration was determined spectrophotometrically using a NanoDrop 2000 (Thermo Scientific). All 260/280 ratios were between 1.8 and 2.1. Finally, 1 µg of total RNA was reverse-transcribed using the Superscript Reverse Transcriptase Kit (Invitrogen) and the oligo-dT (dT₁₈) (10 pmol/µl) primer.

2.9 Analysis of gene expression by semi-quantitative RT-PCR.

PCR was performed in 50 µl reactions containing 50 ng of cDNA, 10 pmol of each primer pair, and 0.25 U of Taq DNA polymerase (Invitrogen). PCR was carried out in a GeneAmp PCR System 9700 thermal cycler (Applied Biosystems). We used the following primer pairs to amplify: 370 bp of the *tvcp65* gene (accession number AY463696), forward: 5'-ACGCGATTACATCTGGAGAACTC-3', and reverse: 5'-ATAAGAGGAGCGTGATGGCACAT-3'; and 112 bp of the β -*tubulin* gene as reported [42]. The amplified products were analyzed on 2% agarose gels and visualized by ethidium bromide staining. Gene expression densitometry analyses were performed using the Quantity One Software (Bio-Rad). Data from densitometry quantification of the housekeeping gene (β -*tubulin*) were used to normalize the results.

2.10 Real-time qRT-PCR analysis of specific *T. vaginalis* *tvcp65* and β -*tubulin* genes.

Quantification of *tvcp65* expression was performed by real-time qRT-PCR. Oligonucleotide primers for real-time qRT-PCR were designed using Primer3 version 3.0 (www.primer3.sourceforge.net) and commercially synthesized (Instituto de Biotecnología, UNAM). To specifically amplify 100 bp of the *tvcp65* gene, the forward: 5'-AATGTTGTTGAAGGCGATGAAA-3', and reverse: 5'-CTACAGCAGCTGGGCCATTT-3' were used, and previously reported primers were used to amplify 112 bp of the β -*tubulin* gene [42]. Each reaction was carried out in a total volume of 25 µl with 1 µl of cDNA (50 ng), 12.5 µl Maxima™ SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (2×) kit (Fermentas), 1 µl of each primer (10 pmol/µl), and 9.5 µl of molecular biology grade water. qRT-PCR was performed using a 7500 Fast Real-Time PCR machine (Applied Biosystems). PCR conditions for *tvcp65* were as follows: 15 min at 95°C followed by up to 40 cycles of 95°C for 30 s, 57°C for 30 s, and 72°C for 30 s, and, finally, 95°C for 15 s, 60°C for 30 s, and 95°C for 15 s. The "housekeeping" β -*tubulin* gene was selected for a reference gene study because it did not vary in the presence of any of the tested Zn²⁺ concentrations. Standardization of *tvcp65* messenger RNA (mRNA) expression was performed by dividing the value of each gene at different Zn²⁺ concentrations by the value of the housekeeping gene found for all samples.

2.11 Indirect immunofluorescence assays.

Parasites were fixed using 4% paraformaldehyde for 1 h at 37°C and washed with PBS pH 7.0. Half of the fixed parasites were permeabilized using 1 M HCl for 2 h at room temperature. Parasites were then blocked with 0.2 M glycine for 1 h at

37°C followed by 0.2% fetal bovine serum for 15 min. Then trichomonads were incubated with polyclonal mouse anti-TvCP65 antibody (1:100 dilution) [16] or preimmune sera (PI) for 18 h at 4°C. Next, parasites were incubated with fluorescein isothiocyanate-conjugated anti-mouse immunoglobulins (1:90 dilution, Jackson ImmunoResearch) for 40 min at room temperature. Finally, Vectashield-DAPI mounting solution (Vector Lab) was added, and laser confocal microscopy was performed (Leica, DMLS).

2.12 Scanning electron microscopy.

Parasites cultivated in TYM media for 24 h at 37°C were incubated for different periods of time with DU-145 cell monolayers. Glutaraldehyde-fixed samples were dehydrated with increasing concentrations of ethanol, critical-point dried using a Samdri 780 apparatus (Tousimis, Rockville Maryland, USA), coated with gold using a JEOL JFC-1100 ion-sputtering device, and examined using a XL-30 ESEM scanning electron microscope (FEI Company, Eindhoven, The Netherlands).

2.13 Statistical analysis.

All data are the means ± standard error of triplicate samples. A statistically significant change between means was determined by ANOVA (*p*) using Sigma Plot 11.0 Software.

3. Results

3.1 Growth kinetics of *T. vaginalis*.

To investigate the effects of Zn²⁺ on *T. vaginalis* development, we first performed growth kinetics in the presence or absence of 0.25 mM, 1.0 mM, and 1.6 mM Zn²⁺ (Fig. 1). After

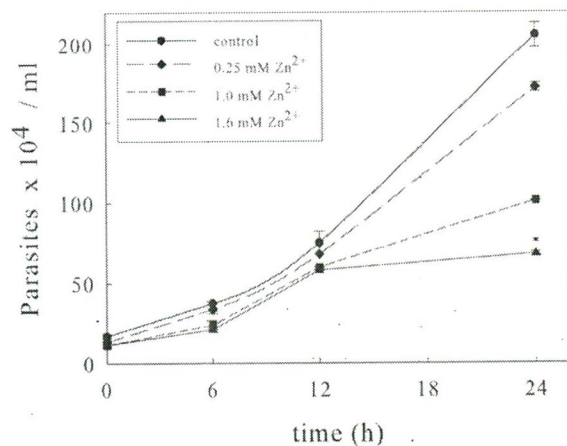


Figure 1. Effect of Zn²⁺ on the growth of *T. vaginalis*. Parasites were counted in a Neubauer-counting chamber at different time points (6, 12, and 24 h) after incubation at 37°C in TYM medium supplemented with (0.25 mM, 1.0 mM, and 1.6 mM) or without Zn²⁺ (control). In addition, parasite viability, as measured by trypan blue exclusion, was about 98% under all conditions. Each point indicates the mean of three experiments, and error bars indicate standard deviation. There were no statistically significant differences for data corresponding to 0.25 mM (*p*=0.970) and 1.0 mM Zn²⁺ (*p*=0.960) compared to the control. In contrast a statistically significant difference was found for 1.6 mM Zn²⁺ data (*p*=0.01) (*) compared to the control.

24 h, the parasites cultivated without Zn^{2+} (control) had four duplications, while the parasites grown with 0.25 mM, 1.0 mM, or 1.6 mM Zn^{2+} had three and a half, three, and one duplication, respectively. Furthermore, viability for all samples was ~98%. Experiments were performed in triplicate with the same results. These findings indicate that Zn^{2+} had no effect on *T. vaginalis* viability, and trichomonad growth was only diminished in 1.6 mM Zn^{2+} .

3.2 *T. vaginalis* Zn^{2+} proteomic map.

Images of three representative 2-DE gels obtained from three independent experiments using parasites grown in the presence and absence of 0.25 mM, 1.0 mM, and 1.6 mM Zn^{2+} were analyzed by pDQuest software (data not shown), and it was found that most of the protein profile changes were obtained with 1.6 mM Zn^{2+} . Therefore, we selected this specific concentration for further analyses. The 2-DE protein spot profiles were highly reproducible in terms of both the total number of protein spots and their relative positions and intensities. Coomassie Brilliant Blue G-250 stained gels showed approximately 150 spots in the presence of 1.6 mM Zn^{2+} (Fig. 2B) compared to 177 spots in its absence (Fig. 2A). Proteins detected in pI 4–7 had molecular masses between 20 and 250 kDa. The gels showed remarkable changes in protein profiles for parasites grown in the presence of Zn^{2+} . Indeed, we found at least 27 proteins that were differentially expressed in the

presence of Zn^{2+} . The major differences in expression protein profiles were obtained from 50 to 100 kDa.

Interestingly, we found some spots over-expressed in the presence of Zn^{2+} (Figs. 2C and 2D, spots 1, 3, 8) that correspond to fimbrin (gi|123493533), adenosylhomocysteinase (gi|123499896), and aminopeptidase P-like metalloproteinase (gi|123445672) (Table 1). Otherwise, the expression levels of several spots were diminished in the presence of Zn^{2+} (Fig. 2C and 2D). Spots 2, 4, 5, 6, and 7 correspond to fimbrin (gi|123397260) (spots 2 and 4, probably due to degradation), two adenosylhomocysteinases (gi|123499896 and gi|123488577), and asparaginyl endopeptidase-like cysteine peptidase (gi|123408789) (Table 1). These findings suggest that Zn^{2+} had both positive and negative effects on the expression levels of ~27 proteins and no effect on 111 proteins. Interestingly, the asparaginyl endopeptidase-like cysteine peptidase (gi|123408789) and the adenosylhomocysteinase (gi|123499896) had already been identified in the active degradome of *T. vaginalis* [39].

3.3 Proteinases involved in the interaction of *T. vaginalis* and prostatic cells.

We performed ligand-protease assays using parasites grown in the presence or absence of 0.25 mM, 1.0 mM, and 1.6 mM Zn^{2+} to detect possible *T. vaginalis* proteinases interactions with DU-145 cells. We observed differences between

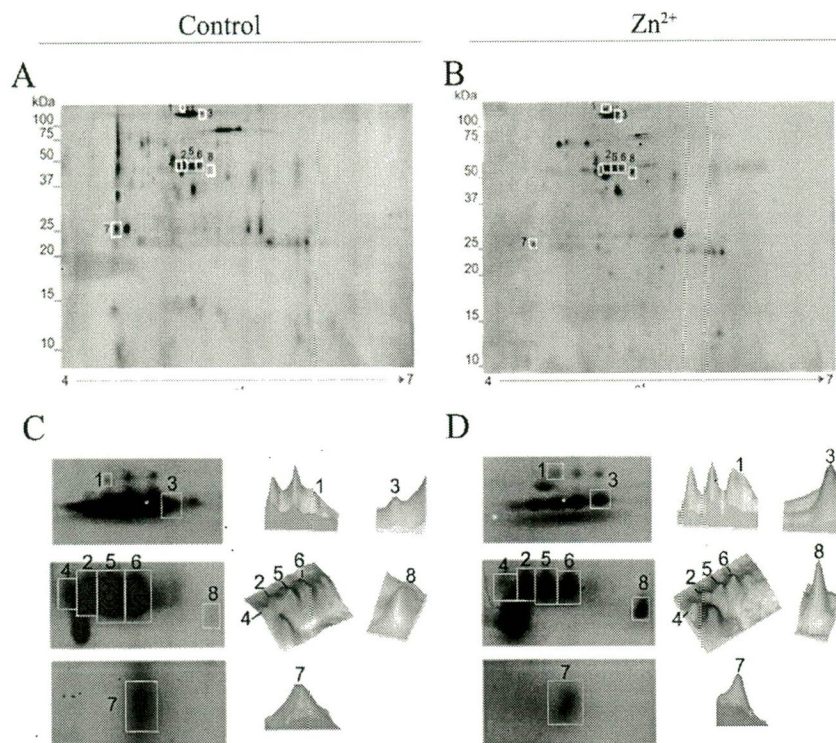


Figure 2. Zn^{2+} proteomic map of *T. vaginalis*. The total proteins of *T. vaginalis* grown in the A) absence or B) presence of 1.6 mM Zn^{2+} were separated in the first dimension by isoelectric focusing over a pH range from 4.0 to 7.0 followed by 12% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis. Protein spots were Coomassie Brilliant Blue G-250 stained. Enlarged images of the gels shown in A or B and three-dimensional analyses of 8 differentially expressed proteins in parasites cultivated in the absence C) or presence D) of Zn^{2+} . The left panel shows a representative image of a Coomassie Brilliant Blue G-250 gel, whereas the right panel shows a landscape representation of spots. Numbers 1, 3, and 8 indicate spots that are over-expressed in the presence of Zn^{2+} , while numbers 2, 4, 5, 6, and 7 indicate spots that are down-regulated in the presence of Zn^{2+} .

the proteinases that interact with DU-145 cells in comparison with those that interact with HeLa cells. [16]. Fig. 3A shows the activities of all proteinases from protein extracts of *T. vaginalis* grown in the absence (Fig. 3A, lane 1) or presence (lane 2) of 1.6 mM Zn²⁺. These extracts interacted with fixed DU-145 cells, and the zymograms show the activities of at least five trichomonad proteinases (TvCP70, TvCP65, TvCP39, TvCP25, and TvCP20) bound to the surfaces of fixed DU-145 cells in the absence (Fig. 3B, lane 1) or presence (lane 2) of 1.6 mM Zn²⁺. Interestingly, the proteolytic activity profile of proteinases that interact with prostatic cells was similar at all temperatures analyzed (data not shown), which suggests that these proteinases may be active up to 43.5 °C. Nevertheless, the best resolution of proteinase activity bands was obtained with activation at 4 °C (Fig. 3B). According to

the densitometry analyses of the TvCP70, TvCP65, TvCP39, TvCP25, and TvCP20 activity bands bound to the DU-145 cells (Fig. 3C), reductions of ~12%, 16%, 13%, 25%, and 11%, respectively, were observed when the parasites were grown in the presence of 1.6 mM Zn²⁺ in comparison to the activity bands of untreated control parasites (taken as 100%). Interestingly, the activities of CPs involved in cytotoxicity (TvCP65 and TvCP39) were reduced in the presence of Zn²⁺, however this reduction was minimal. This result may be related to the reduction in trichomonal cytotoxicity observed in the presence of this cation. We also performed Western blot and indirect immunofluorescence assays and real-time PCR experiments to corroborate if the expression levels of these CPs were affected by Zn²⁺.

Table 1. Zn²⁺ differentially expressed proteins identified by mass spectrometry from clinical isolate *T. vaginalis* CNCD 147 were identified by searching the National Center for Biotechnology non-redundant database using the MASCOT search algorithm.

Protein	Accession number ^a	Spot number ^b	MASCOT score ^c	Ion score ^d	Peptide sequence ^e	% Coverage ^f	Predicted MW Da /pI
Fimbrin	gi 123493533	1	120	49	K.LSPEQILLR.W	5	67,839 /5.17
				32	R.LLKPGETLADLLK.L		
				39	K.TVNLTNHPELFR.L		
Fimbrin	gi 123397260	2	125	41	K.LSPEQILLR.W	7	50,761 /6.43
				43	R.LLKPGETLADLLK.L		
				41	K.TVNLTNHPELFR.L		
Adenosylhomocysteinase	gi 123499896	4	574	37	R.ALTWPDGK.G	30	54,064 /5.61
				37	R.ASDVMIGGK.T		
				58	K.HLDEEVAR.L		
				48	R.HSLIDGINR.A		
				57	K.EMPGLMVLRE		
				22	K.EMPGLMVLRE		
				52	K.SPEGAPFEYR.I		
				49	K.TALVMGYGDVGK.G		
				23	R.IADINLHVLGR.K		
				55	R.IADINLHVLGR.K		
				39	R.LHLGSLDVHLTK.L		
				56	K.LLFPAINVNDVTK.S		
				26	K.GFEFENAGAVDPQK.G		
				25	K.GDNYEYTCVLAVLK.Q		
				43	K.GPQQIVDDGGDATLLIQK.G		
Adenosylhomocysteinase	gi 123499896	4	402	31	K.VYTLPK.H	22	54,064 /5.61
				44	K.HLDEEVAR.L		
				32	K.SPEGAPFEYR.I		
				69	K.TALVMGYGDVGK.G		
				66	R.IADINLHVLGR.K		
				31	R.LHLGSLDVHLTK.L		
				65	K.LLFPAINVNDVTK.S		
				27	K.EGTPEKPAGIPVFAWK.G		
				39	K.GPQQIVDDGGDATLLIQK.G		
				36	R.ALTWPDGK.G		
				53	K.HLDEEVAR.L		
				32	R.HSLIDGINR.A		
				40	K.FDNIYGCR.H		
				60	K.SPEGAPFEYR.I		
				31	K.TALVMGYGDVGK.G		
59	R.IADINLHVLGR.K						
66	R.IADINLHVLGR.K						
24	R.LHLGSLDVHLTK.L						
54	R.LHLGSLDVHLTK.L						
62	K.LLFPAINVNDVTK.S						
28	K.QADYINVPVEGPK.S						
45	K.EGTPEKPAGIPVFAWK.G						
39	K.AIVGNIGHFDNEIDTEGLK.N						
Adenosylhomocysteinase	gi 123499896	5	576	36	R.ALTWPDGK.G	33	54,064 /5.61
				53	K.HLDEEVAR.L		
				32	R.HSLIDGINR.A		
				40	K.FDNIYGCR.H		
				60	K.SPEGAPFEYR.I		
				31	K.TALVMGYGDVGK.G		
				59	R.IADINLHVLGR.K		
				66	R.IADINLHVLGR.K		
				24	R.LHLGSLDVHLTK.L		
				54	R.LHLGSLDVHLTK.L		
				62	K.LLFPAINVNDVTK.S		
				28	K.QADYINVPVEGPK.S		
				45	K.EGTPEKPAGIPVFAWK.G		
				39	K.AIVGNIGHFDNEIDTEGLK.N		

				45	R.VIITEVDPICALQAAMEGYQVR.R		
				35	K.VYTLPK.H		
				26	K.KVYTLPK.H		
				45	R.ASDVMIGGK.T		
				39	R.ALTWPDGK.G		
				43	K.IILDEEVAR.L		
				24	R.HSLIDGINR.A		
				47	K.FDNIYGCR.H		
				30	K.EMPGLMVL.R.E		
				59	K.SPEGAPFEYR.I		
				53	K.TALVMGYGDVVGK.G		54,064
		6	850	69	R.IADINLHVLGR.K	48	/5.61
				35	K.TALVMGYGDVVGK.G		
				34	R.LHLGSLDVHLTK.L		
				73	K.LLFPAINVNDVTK.S		
				22	K.QADYINVPVEGPK.S		
				53	K.GFEFENAGAVPDPQK.G		
				30	K.GETLPEYWENTYR.A		
				32	K.EGTPEKPAVIPVFAWK.G		
				42	K.GPQQIVDDGGDALLIQK.G		
				37	K.AIVGNIGHFDNEIDTEGLK.N		
				67	R.VIITEVDPICALQAAMEGYQVR.R		
				44	K.HLDEEVAR.L		
				37	R.HSLIDGINR.A		
				22	K.EMPGLMVL.R.E		
Adenosylhomocysteine nase	gi 123488577	4	295	34	K.SPAGAPFEYR.I	19	53,873
				60	R.IADINLHVLGR.K		/5.53
				29	R.LHLGSLDVHLTK.L		
				37	K.LLFPAINVNDVTK.S		
				36	R.VIITEVDPICALQAAMEGYQVR.R		
				42	K.VVAGVPK.L		
				57	K.VTATNFYK.V		
Clan CD, family C13, asparaginyl endopeptidase-like cysteine peptidase	gi 123408789	7	198	38	R.SLDIILNVYPGR.A	14	43,916
				36	R.SLDHILNVYPGR.		/5.95
				36	K.QSHVMEYGDTSLK.T		
				28	K.IILMCYDDIVNDAENPFK.G		
				61	K.LADEVGGIR.I		
				38	K.EVTGVDNVK.F		
				37	R.NVYSILLEK.Q		
Clan MG, family M24, aminopeptidase P-like metallopeptidase	gi 123445672	8	222	23	K.TPYEIEQIK.K	13	50,416
				31	K.DVYGALDQIK.M		/5.34
				38	K.AAELTSEAIHVMK.N		
				39	K.AAELTSEAIHVMK.N		

^a NCBI nr database.

^b Spot number in agreement with Figs. 2A and 2B.

^{c,d} Ion score is $-10 \cdot \log(P)$, where P is the probability that the observed match is a random event. Individual ion scores > 56 indicate identity or extensive homology ($p < 0.05$). Protein scores are derived from ion scores as a non-probabilistic basis for ranking protein hits.

^e M = methionine modified by oxidation; N = deamidated; C = cysteine modified by carbamidomethyl.

^f %Coverage indicates the protein sequences or parts of these sequences that were identified by MS/MS.

Type of search:	MS/MS Ion search
Enzyme:	trypsin
Mass values:	Monoisotopic
Protein Mass:	Unrestricted
Peptide Mass Tolerance:	± 1.2 Da
Fragment Mass Tolerance:	± 0.6 Da
Max Missed Cleavages:	1
Instrument type:	ESI-4SECTOR

3.4 *T. vaginalis* interaction with DU-145 prostatic cells.

Using scanning electron microscopy, we evaluated the interaction between *T. vaginalis* and DU-145 prostatic cells at several incubation time points (Fig. 4A). The morphology of the parasites in contact with the DU-145 cell monolayer was similar to that of the parasites in contact with HeLa cells. However, their morphology was different in comparison to

those in contact with VEC cells [43]. We observed rounded parasite morphology but never a complete amoeboid transformation during interactions with DU-145 cells (Fig. 4A). After 5 min of incubation, *T. vaginalis* showed adherence to DU-145 cells (Fig. 4A, b). Parasites displayed an oval form with a rough surface, four anterior flagella, an undulating membrane, and posterior axostyle. At the 15 and

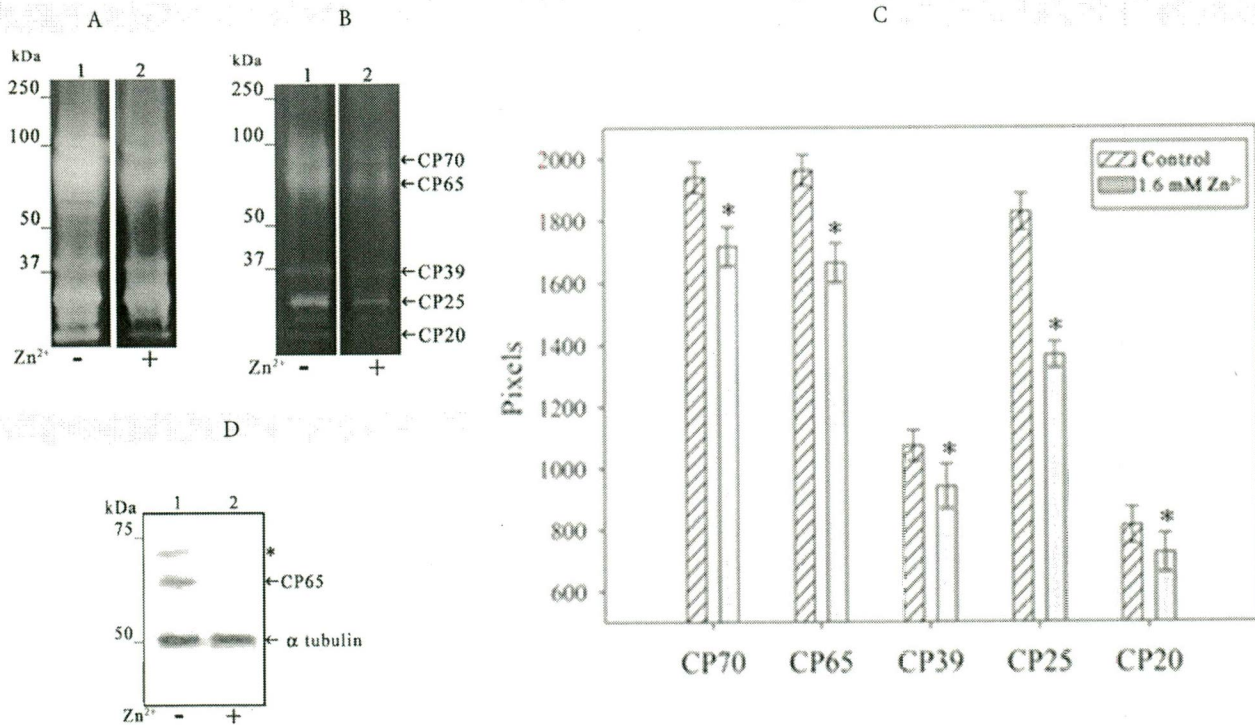


Figure 3. *Proteinases involved in the interaction of T. vaginalis with prostatic cells.* A) Zymograms correspond to trichomonad lysates from parasites cultivated in the absence (lane 1) or presence of 1.6 mM Zn²⁺ (lane 2). B) Lysates from parasites cultivated in the presence or absence of Zn²⁺ were used for ligand-proteinase assays and activated at 4 °C as described in the Materials and Methods section. Proteinase patterns correspond to the trichomonad proteinases with affinity for DU-145 cell surface from parasites cultivated in the absence (lane 1) or presence of 1.6 mM Zn²⁺ (lane 2). Arrows show clear bands of the proteolytic activities of 70, 65, 39, 25 and 20 kDa (TvCP70, TvCP65, TvCP39, TvCP25, and TvCP20), respectively. C) Densitometry analyses of each activity band from three different gels activated at 4 °C. Bars indicate the mean intensity of activity bands, and error bars represent the standard deviations $p=0.01$ (*). D) The Zn²⁺ effect on the amount of TvCP65 and α -tubulin. Total protein extracts from *T. vaginalis* grown in the absence (lane 1) or presence of Zn²⁺ (lane 2) were blotted onto nitrocellulose membranes for a Western blot assay with anti-TvCP65 and anti- α -tubulin (control) antibodies. Arrow indicates the immunodetected protein for each antibody employed. Asterisk indicates a higher sized band also recognized by the anti-TvCP65 antibody that might correspond to immunodetection of the TvCP65 precursor band.

30 min time points, we observed parasites in close proximities to the same target cells (Fig. 4A, c-d), which was probably due to a chemotaxis effect. After 60 min, we further observed empty areas that became progressively larger after 90 min, which corresponded to monolayer disruptions (Fig. 4A, e). After 90 min, we observed *T. vaginalis* pseudopods forming at the contact site (Fig. 4A, f). Interestingly, amoeboid trophozoites were not observed in contact with DU-145, however amoeboid trophozoites have been observed in contact with VECs [43]. In addition, the integrity and appearance of DU-145 prostatic cells without trichomonads did not change (Fig. 4A, a). We then kinetically analyzed the cytotoxicity of *T. vaginalis* towards DU-145 cells at several different time points (Fig. 4B). With scanning electron microscopy, we observed *T. vaginalis* attached to DU-145 cells after 5 min of incubation (Fig. 4B, b). After 15 min, the monolayer of DU-145 cells began to suffer damage, which might have been due to contact-dependent mechanisms (Fig. 4B, c). After 30 and 60 min, we observed irreversible cell damage due to the trichomonads (Fig. 4B, d, e). The no trichomonad control showed no changes in the appearance of

DU-145 cells (Fig. 4B, a).

3.5 Cytotoxicity.

First, we determined the Zn²⁺ effect on trichomonal cytotoxicity towards HeLa or DU-145 cells. After 1 h, the cytotoxicity exhibited by parasites, which were cultivated with 1.6 mM Zn²⁺, towards HeLa cells was 98% of that exhibited by parasites cultivated in absence of Zn²⁺ (Fig. 5A). However, trichomonal cytotoxicity towards DU-145 cells was only 20% of what was seen with HeLa cells, and the presence or absence of Zn²⁺ had no effect (Fig. 5A). These findings suggested that Zn²⁺ had no effect on *T. vaginalis* cytotoxicity towards HeLa cells; however, trichomonal cytotoxicity towards DU-145 cells at this same time point was 80% less in comparison to HeLa cells (Fig. 5A). We then determined the cytotoxicity of *T. vaginalis* towards prostatic DU-145 cells at different time points and found 100% cytotoxicity after 8 h (Fig. 5B), which suggested trichomonal cytotoxicity was different for HeLa compared to DU-145 cells. In addition, we analyzed the effects of 0.25 mM, 1.0 mM, and 1.6 mM Zn²⁺ on the cytotoxicity of DU-145 cells and found that major cytotoxic differences were obtained with 1.6 mM Zn²⁺ (data

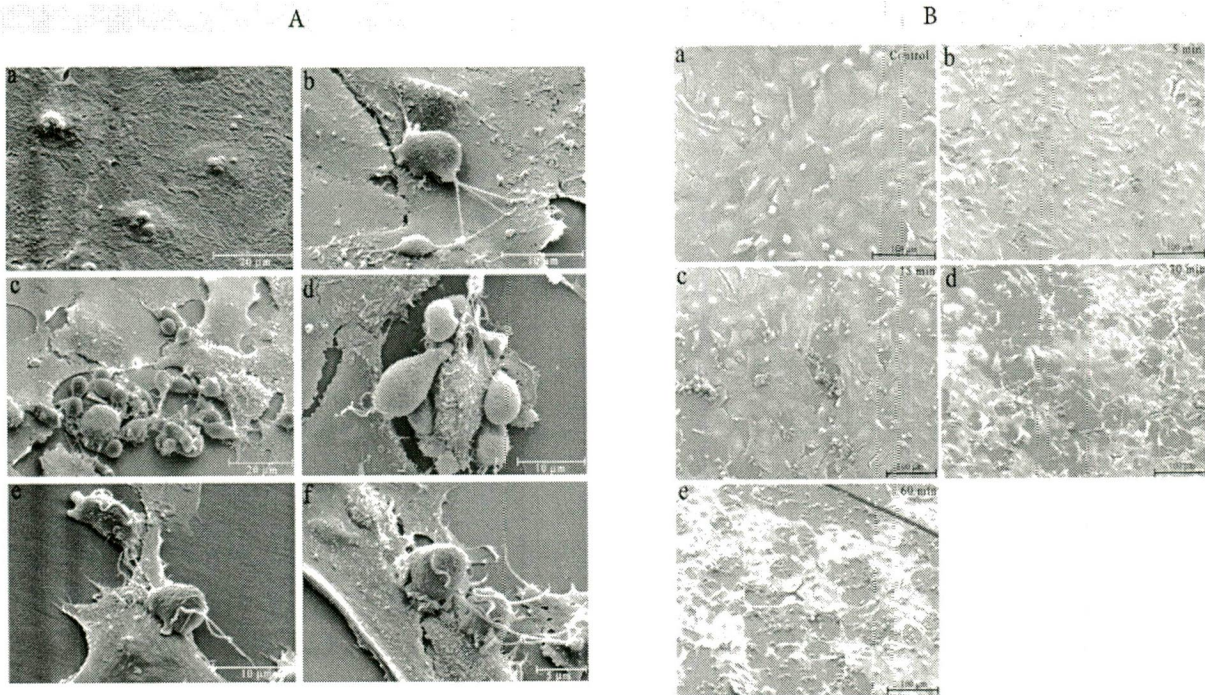


Figure 4. Interaction of *T. vaginalis* trophozoites with DU-145 prostatic cell monolayers. Morphological appearance of *T. vaginalis* in contact with DU-145 prostatic cells at different time points, and kinetic studies of the cytotoxicity of *T. vaginalis* towards DU-145 cells. A) Trophozoites were incubated with DU-145 cells for b) 5 min, c) 15 min, d) 30 min, e) 60 min, and f) 90 min. a) DU-145 prostatic cells before interacting with *T. vaginalis*. The majority of parasites attached to DU-145 cells retain a pear-like shape with four flagella, an undulating membrane, and axostyle. Some showed a few pseudopods (panel d-e). After 5 min of interaction, the lytic activity of the parasites is evident as seen by the disruption of the cell monolayer. B) Kinetics of *T. vaginalis* cytotoxicity towards DU-145 cell monolayers. Parasites were added to confluent DU-145 cell monolayers and observed under low magnification by scanning electron microscopy at different time points. Cells show a similar lytic activity at b) 5 min, c) 15 min, d) 30 min, and e) 60 min, as previously described. a) Control DU-145 cells without parasites.

not shown). The kinetic data show that cytotoxicity was 20% at 1 h for parasites cultivated with or without 1.6 mM of Zn^{2+} (Fig. 5B). After 8 h, the cytotoxicity of parasites cultivated with 1.6 mM of Zn^{2+} was 72% (Fig. 5B), while in the absence of Zn^{2+} the cytotoxicity was 100%. These findings suggested that Zn^{2+} had some negative effect on trichomonal cytotoxicity towards DU-145 cells.

3.6 The effect of Zn^{2+} on the amount of TvCP65.

By Western blot analysis, an anti-TvCP65 antibody [16] immunodetected two bands that correspond to a precursor (Fig. 3D, lane 1 asterisk) and active TvCP65 enzyme (Fig. 3D, lane 1 arrow) in total protein extracts from parasites grown without Zn^{2+} . In contrast, parasites grown in the presence of Zn^{2+} lacked these bands (Fig. 3D, lane 2), while an anti- α -tubulin antibody detected a single band with the same intensity in the absence (Fig. 3D, lane 1) or the presence of Zn^{2+} (lane 2). As expected, the amount of α -tubulin was not changed in the presence of Zn^{2+} , which indicated the Zn^{2+} effect was specific for the TvCP65 protein level. These observations suggest that the amount of TvCP65 was reduced in the presence of Zn^{2+} , which could be related to the reduction in the cytotoxicity level.

To confirm the decrease in TvCP65 protein level in *T. vaginalis*, indirect immunofluorescence assays were

performed using permeabilized and non-permeabilized fixed parasites. Fig. 6 shows a reduction of fluorescence intensity from surface (panels k and l) and cytoplasmic (panels h and i) TvCP65 in Zn^{2+} -treated trichomonads compared to the control trichomonads, which show fluorescence on the surface (panels e and f) and in the cytoplasm (panels b and c). No fluorescence was observed from trichomonads treated identically but incubated with PI serum, a negative control (panels n and o). These data strongly suggested that the presence of Zn^{2+} affects the amount of TvCP65, which resulted in a reduction in the TvCP65 proteolytic activity.

3.7 The effect of Zn^{2+} on tvcp65 mRNA.

We then performed semi-quantitative and quantitative RT-PCR (Fig. 7) using cDNA from parasites grown in the presence or absence of Zn^{2+} to determine the effect of Zn^{2+} on the expression of the TvCP65 transcript. We obtained a 370-bp amplicon using cDNA from parasites grown in the absence (Fig. 7A, lane 1) or presence of 1.6 mM Zn^{2+} (lane 2). Based on densitometry analyses (data not shown), an 80% reduction, compared to the no Zn^{2+} control, was observed for tvcp65 transcript. The 112-bp β -tubulin RT-PCR product was used as an internal control. As expected, the quantity of this transcript was not affected by the Zn^{2+} concentration (Fig. 7B, lanes 1-2). No detectable PCR product from DNaseI-treated

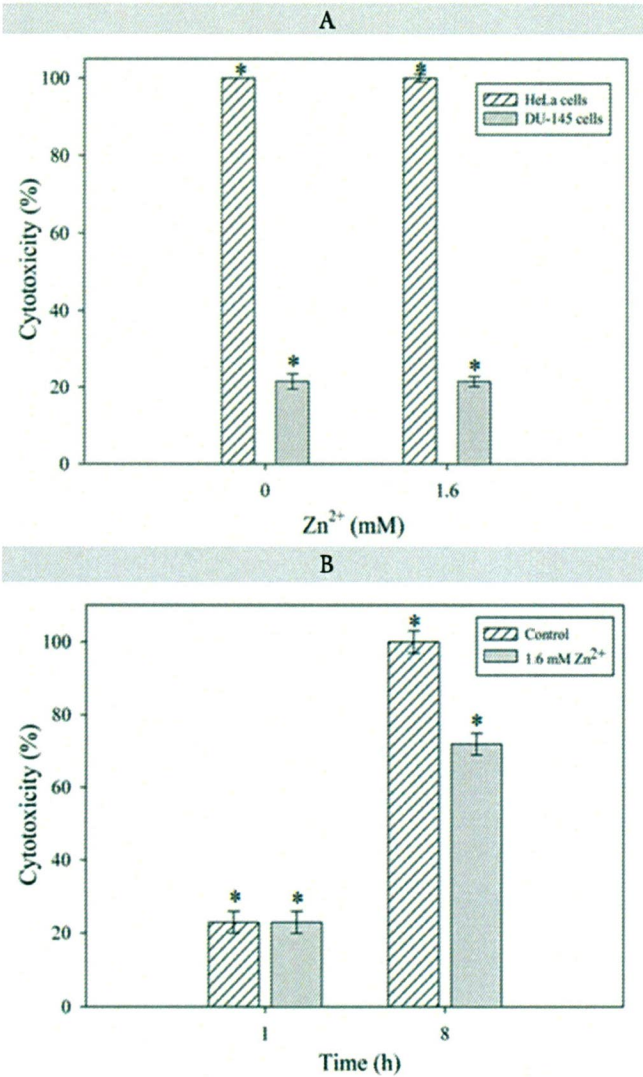


Figure 5. Zn²⁺ effect on *T. vaginalis* cytotoxicity. Kinetic cytotoxicity of parasites cultivated in the presence or absence of 1.6 mM Zn²⁺. A) Cytotoxicity of *T. vaginalis* cultivated in the presence and absence of Zn²⁺ towards HeLa and DU-145 cells after 1 h, $p=0.056$ (*). B) Data from trichomonal cytotoxicity towards DU-145 cells after 8 h without Zn²⁺ were normalized to 100% for comparison. Cytotoxicity of *T. vaginalis* cultivated with 1.6 mM Zn²⁺ was reduced 30%. Bars indicate the percent cytotoxicity of three experiments with triplicate samples, and error bars represent standard deviations, $p=0.050$ (*).

RNA from parasites cultivated in the presence or absence of Zn²⁺ was obtained in the negative controls (RT(-) experiments)(Figs. 7A and 7B, lanes 3-4), which showed that amplicons from *tvcp65* and *β-tubulin* genes corresponded to the quantity of mRNA of each gene. Consistent with these findings, the qRT-PCR results indicated that the *tvcp65* transcript was reduced 80% in the presence of Zn²⁺ (Fig. 7C).

4. Discussion

Zn²⁺ is a catalytic component of over 300 enzymes [44]. This metal is an essential nutrient and plays a crucial role in several biological functions in the male microenvironment. Zn²⁺ is a part of several proteins as both a structural and catalytic component, such as DNA-binding proteins, which

contain Zn²⁺ fingers, and the CCCH-type Zn²⁺ finger protein, which participates in the adenylation and export of metazoan nuclear mRNAs [45]. Moreover, Zn²⁺ has many functions in proteins, which include metalloregulation and Zn²⁺ signaling [46]. Human prostatic fluid from healthy men and men with chronic bacterial prostatitis or trichomoniasis has different Zn²⁺ concentrations [34]. Indeed, Zn²⁺ levels found in the prostate could be important in resolving trichomoniasis in men [29, 34].

Our results with human DU-145 prostatic cells showed morphological and molecular changes of *T. vaginalis* that might contribute to understanding how this parasite causes damage to men. We analyzed different Zn²⁺ concentrations and found that the major differences in cytotoxicity, duplication, and protein profile were obtained at 1.6 mM Zn²⁺, which is the minimum trichomonocidal concentration (MTC) [34] for *T. vaginalis*. In fact, survival of parasites in the presence of Zn²⁺ was proportional to the Zn²⁺ concentration. Nevertheless, parasite viability was not affected by Zn²⁺. As pointed out by Krieger and Rein, normal human prostatic fluid Zn²⁺ concentrations kill *T. vaginalis in vitro* and may limit or solve trichomoniasis in most infected men [34]. Studies indicate that *T. vaginalis* survival in canine

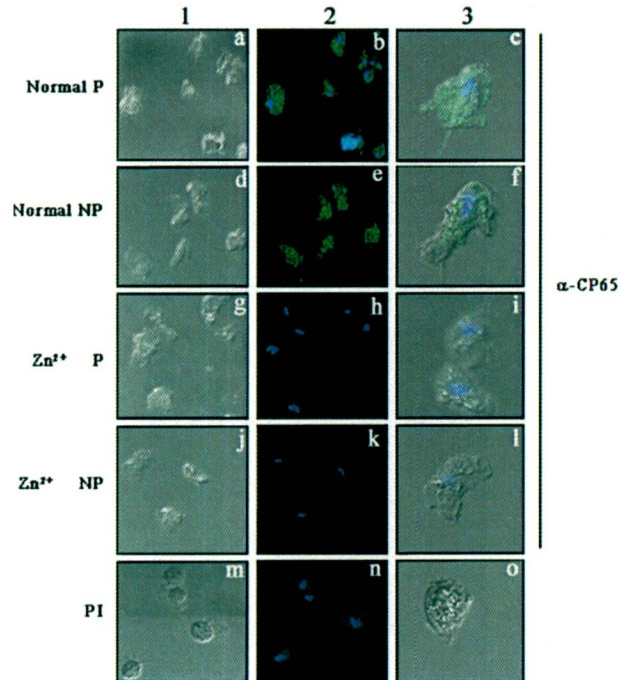
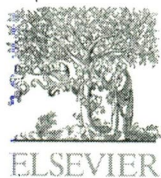
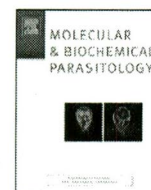


Figure 6. Expression and localization of TvCP65 in the presence of Zn²⁺. Immunofluorescence analyses of fixed, non-permeabilized (NP; d-f, j-l) and permeabilized (P; a-c, g-i) parasites grown in the presence (g-l) or absence (a-f, m-o) of 1.6 mM Zn²⁺, incubated with the anti-TvCP65 antibody (a-l) or preimmune sera (PI; m-o) followed by a secondary anti-mouse conjugated to a fluorescein isothiocyanate (Jackson) antibody (1:90 dilution), and mounted with Vectashield-DAPI. Indirect immunofluorescence (b, e, h, k), and the corresponding phase contrast microscopy at 60× magnification (a, d, g, j) and 1.58 zoom (c, f, i, l). As a negative control, permeabilized parasites were incubated with PI (m-o) at a 1:20 dilution.



Contents lists available at ScienceDirect

Molecular & Biochemical Parasitology



Putrescine is required for the expression of *eif-5a* in *Trichomonas vaginalis*

Bertha Isabel Carvajal-Gamez^a, Rossana Arroyo^b, Minerva Camacho-Nuez^a, Rosalia Lira^c,
Máximo Martínez-Benitez^d, María Elizbeth Alvarez-Sánchez^{a,*}

^a Posgrado en Ciencias Genómicas, Universidad Autónoma de la Ciudad de México (UACM), San Lorenzo # 290, Col. Del Valle, CP 03100, Mexico City, Mexico

^b Departamento de Infectómica y Patogénesis Molecular, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN (CINVESTAV-IPN), Av IPN 2508, Col. San Pedro Zacatenco CP 07360, Mexico City, Mexico

^c Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Infecciosas y Parasitarias, Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS), Av. Cuauhtemoc #330, Col. Doctores CP 06720, Mexico City, Mexico

^d Instituto de Ciencia y Tecnología del Distrito Federal, CDE-DF, San Lorenzo # 290, Col. Del Valle, CP 03100, Mexico City, Mexico

ARTICLE INFO

Article history:

Received 18 December 2010

Received in revised form 4 July 2011

Accepted 9 July 2011

Available online xxx

Keywords:

Trichomonas vaginalis

Eukaryotic translation initiation factor 5A

TveIF-5A

Putrescine

mRNA stability

ABSTRACT

Recently, we found that *Trichomonas vaginalis* contains a eukaryotic translation initiation factor 5A (TveIF-5A) with unknown function in this parasite. eIF-5A is the only cellular protein dependent of polyamines to form a hypusine residue, an unusual basic amino acid that is post-translationally formed by modification of a single specific lysine residue in an eIF-5A precursor protein. The purpose of this study was to determine the effect of a putrescine analogue, 1,4-diamino-2-butanone (DAB), on *tveif-5a* mRNA and TveIF-5A protein expression. TveIF-5A protein expression was reduced by inhibition of putrescine biosynthesis, and *tveif-5a* mRNA levels were reduced ~90%, as shown by western blot and immunofluorescence assays. Cycloheximide treatment reduced the amount of mature TveIF-5A protein at 4 h and decreased the *tveif-5a* transcript level at 2 h, according to western blot, RT-PCR and qRT-PCR analyses. Actinomycin D treatment showed that the *tveif-5a* mRNA had half-life of ~2.5 h in DAB-treated parasites. The half-life of *tveif-5a* mRNA was ~4.5 h under exogenous putrescine conditions. These results suggest that putrescine is required for *tveif-5a* mRNA stability, and it is necessary for the expression, stability and maturation of TveIF-5A protein.

© 2011 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Trichomonas vaginalis is a flagellated protozoan responsible for trichomoniasis. This infection is associated with many serious health complications [1,2] and with increased risk of human immunodeficiency virus infection [3], pelvic inflammatory disease [4], and adverse pregnancy outcomes [5]. *T. vaginalis* relies upon exogenously supplied polyamines to meet its requirements [6]. The parasite produces and excretes large amounts of putrescine via an energy-generating arginine dihydrolase pathway [7,8]. The excreted putrescine is used to drive the uptake of host spermine via a putrescine: spermine antiporter system in a 2:1 molar ratio [6]. Putrescine is synthesized by the trichomonad enzyme ornithine decarboxylase (ODC). Inhibition of ODC results in inhibition of putrescine biosynthesis, making it unavailable to cotransport exogenous spermine into the cell [9]. *T. vaginalis* growth is inhibited by 20 mM 1,4-diamino-2-butanone (DAB); however, the organism maintains motility, and the trichomonads is rescued by adding 40 mM putrescine into the culture medium

[9]. 20 mM DAB approximately reduced 90% amount of intracellular putrescine can prevent cotransport of exogenous spermine [9,10]. The ability of putrescine to reverse the growth-inhibitory effect of DAB is similar to its competition with DAB for transporting spermine into the cell and the resultant restoration of putrescine: spermine antiporters [10,11]. During trichomoniasis infection, the vaginal fluid presents high levels of putrescine (up to 2 mM), while spermine and spermidine are in low concentrations (less than 3.75 μM) [12]. Polyamines (putrescine, spermidine, and spermine) are ubiquitous polycations in prokaryotic and eukaryotic cells, except in Methanobacteria and Halobacteria [13,14]. Polyamines carry a positive charge at physiological pH and can bind to various cellular macromolecules, such as DNA, RNA, phospholipids, chromatin, and proteins, by electrostatic charges, regulating important cellular processes [14–17]. Polyamines regulate the expression of various genes and proteins at the levels of replication, transcription, translation, post-translational modification, protein activation, membrane stability, and ion channeling [15]. In eukaryotic organisms, spermidine has an independent function as the source of the 4-aminobutyl portion of hypusine [N^ε-(4-amino-2-hydroxybutyl)-lysine], an unusual amino acid necessary for the activity of the eukaryotic translation initiation factor (eIF-5A), an essential cellular protein [18].

* Corresponding author. Tel.: +52 5536912000x15306; fax: +52 555575 5805.
E-mail address: elizbethalvarezsanchez@yahoo.com.mx (M.E. Alvarez-Sánchez).

eIF-5A, a polyamine-dependent protein, was first characterized as a translation initiation factor in yeast [19]. However, data suggest that eIF-5A acts as a nucleo-cytoplasmic shuttle protein of a specific subset of mRNAs related to the cell cycle and is involved in cell viability and proliferation [20,21].

T. vaginalis has two *eif-5a*-like genes (*tveif-5a1* and *tveif-5a2*), differentiated by the presence of a *HindIII* restriction site only in the *tveif-5a2* gene; however, both of them encode a highly conserved 19-kDa protein. The N-terminal sequence of the 19-kDa protein has been analyzed to design a specific peptide for antibody production [22]. As expected, the anti-synthetic peptide antibody (anti-TveIF-5A) recognizes either precursor (19-kDa) or mature (20-kDa) TveIF-5A protein. These forms can only be differentiated by molecular weight and isoelectric point. In this study, we demonstrate that putrescine is necessary for *tveif-5a* expression due to changes in *tveif-5a* mRNA stability and TveIF-5A protein maturation.

2. Materials and methods

2.1. Culture and growth of *T. vaginalis*

The *T. vaginalis* isolate CNCD 147 was used in this study [23], and the absence of mycoplasmas and ureaplasmas was assessed by culture. Briefly, *T. vaginalis* 24 h culture was centrifuged, and the supernatant was filtered through a 0.45 μm -pore size filter membrane (MF-Milipore MCE Membrane), and incubated in H-agar by *M. hominis* and U-agar for *U. urealyticum*, as described elsewhere [24]. These results were confirmed by PCR using specific primers for each microorganism as follow. Total DNA was obtained from 2×10^7 parasites using the Wizard Genomic Kit (Qiagen) as recommended by the manufacturer, and subjected to PCR to assess the presence of genus-specific mycoplasma DNA, using the RNAH1 and RNAH2 primers for *M. hominis*, and U5 and U4 primers for *U. urealyticum*. DNA from *M. hominis* and *U. urealyticum* were used as PCR positive controls. Amplification conditions were applied according to the protocols previously described using a commercial kit (Stratagene Mycoplasma PCR Primer Set, Stratagene, La Jolla, CA, USA) [25–27]. Parasites were grown up to two weeks by daily passage in Diamond's trypticase-yeast extract-maltose (TYM) medium [28] supplemented with 10% heat-inactivated horse serum (TYM-serum) for 24 h at 37 °C. Trichomonad growth kinetic experiments were performed with an initial density 1×10^4 parasites and with 20, 10, 5, 1, 0.5, or 0.25 mM DAB (Sigma) added to normal culture media for 24 h at 37 °C [29]. For putrescine metabolism restoration, DAB-treated parasites were harvested after 24 h growth, washed with sterile PBS and transferred to TYM-serum medium supplemented with 40, 20, 10, 5, 1, 0.5, or 0.25 mM putrescine or 50, 25, or 15 μM spermine or spermidine (Sigma). Control trichomonads were grown in normal medium and transferred to medium with 40 mM exogenous putrescine or spermine or spermidine at 50, 25 or 15 μM (Fig. 1C). The amounts of putrescine, spermine, and spermidine added to media were based on previously published reports in *T. vaginalis* [9]. Concentrations of spermine and spermidine greater than 50 and 25 μM , respectively, were toxic to the parasites, and less than 50 and 25 μM did not rescue trichomonal growth. Parasite viability after these treatments was verified by the trypan blue (Sigma) exclusion method. Logarithmic-phase parasites were used for all assays.

2.2. Indirect immunofluorescence assays

For indirect immunofluorescence assays, parasites grown in the absence or presence of 20 mM DAB for 24 h, and DAB-treated parasites were transferred 40 mM exogenous putrescine medium for 30 min at 37 °C, and in TYM medium (as a control), were

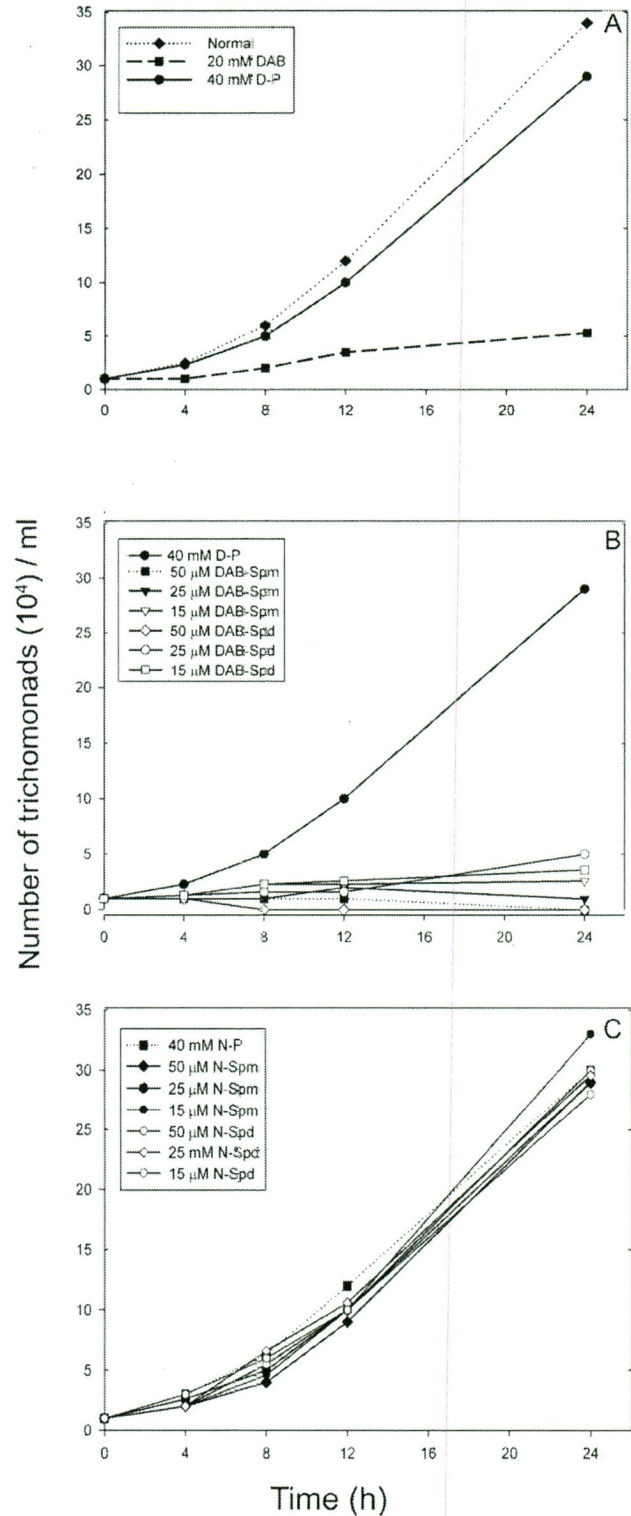


Fig. 1. Growth kinetics of trichomonads grown in the presence and absence of polyamines. (A) *T. vaginalis* isolate CNCD 147 treated with 20 mM DAB (■); treated with 20 mM DAB and transferred to 40 mM exogenous putrescine (●); and under normal growth (♦). (B) DAB-treated trichomonads transferred to 40 mM exogenous putrescine (●) as a control; transferred to different exogenous spermine (spm) concentrations: 50 μM (■), 25 μM (▼), and 15 μM (▽); or transferred to different exogenous spermidine (spd) concentrations: 50 μM (◇), 25 μM (○), and 15 μM (□). (C) The controls were trichomonads grown in normal medium and transferred to medium with 40 mM exogenous putrescine (■) trichomonads grown in normal medium and transferred to medium with spermine concentrations: 50 μM (♦), or 25 μM (●), or 15 μM (●); and trichomonads grown in normal medium and transferred to medium with different exogenous spermidine concentrations: 50 μM (◇), or 25 μM (○), or 15 μM (□).

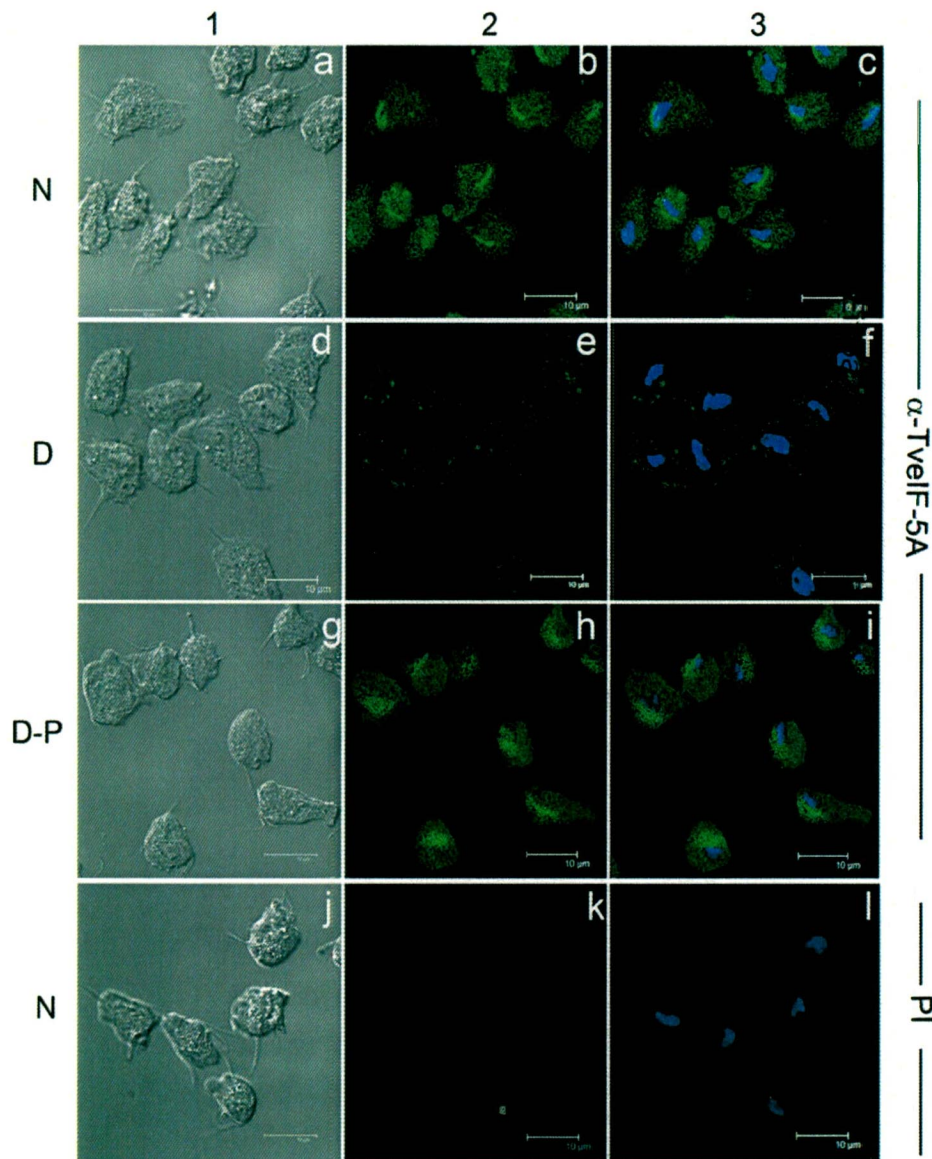


Fig. 2. Immunolocalization of TveIF-5A in trichomonads grown in the presence or absence of putrescine. Column 1: phase contrast microscopy at 63× magnification. Column 2: FITC channel. Column 3: merge of FITC and DAPI channels. Immunofluorescence analysis of trichomonads that were untreated (N) (a–c), DAB-treated (D) (d–f), or DAB-treated and transferred to medium containing 40 mM exogenous putrescine for 30 min (D-P) (g–i). Untreated parasites incubated with preimmune (PI) serum at a 1:5000 dilution were used as a negative control (PI) (j–l). Parasites were fixed, permeabilized, and incubated with the polyclonal mouse anti-TveIF-5A (a–i) or PI (j–l) serum at a 1:5000 dilution followed by anti-mouse IgG conjugated with fluorescein isothiocyanate (Jackson) at a 1:90 dilution (a–l). Photographs were taken under laser confocal microscopy (Leica, DMLS).

fixed, blocked, and permeabilized as previously described [22]. Trichomonads were incubated with the anti-peptide TveIF-5A mouse serum (anti-TveIF-5A) or preimmune (PI) serum as a negative control (both at a 1:5000 dilution) for 12 h at 4 °C [22]. Then parasites were incubated with fluorescein isothiocyanate-conjugated anti-mouse immunoglobulins (Jackson Immuno Research) at a 1:90 dilution for 1 h at room temperature, washed, mounted with Vectashield-DAPI mounting solution as a counterstain and to differentiate nuclei (VectorLab, Burlingame, CA), and observed with a laser confocal microscope (Leica, DMLS).

2.3. Western blot assays

Parasites (2×10^7) were grown in the absence or presence of 20 mM DAB in TYM medium for 24 h, and DAB-treated parasites were transferred to 40 mM exogenous putrescine incubated for 30 min at 37 °C. The control was parasites grown in TYM medium

for 24 h. The parasites were precipitated with 10% trichloroacetic acid (TCA) to obtain total protein extracts [23]. Solubilized proteins were boiled in sample buffer before loading the gel (SDS-PAGE with 15% polyacrylamide) with an equivalent of 4×10^4 parasites per row. After electrophoresis, proteins were transferred onto nitrocellulose membranes, blocked with 5% skim milk in PBS–0.05% Tween 20 (PBS–Tween) for 18 h at 4 °C, incubated with the anti-TveIF-5A antibody (1:60,000 dilution) for 18 h at 4 °C, washed five times with PBS–Tween, incubated with a peroxidase-conjugated secondary antibody (1:3000 dilution) (Bio-Rad) for 2 h at 25 °C, and developed using an enhanced chemiluminescence ECL Plus Western Blotting Detection System (GE Healthcare), according to the manufacturer's instructions. PI serum was used as a negative control (1:60,000 dilutions). As a loading and internal control, an anti- α tubulin monoclonal antibody (α -TUB) was used at a 1:100 dilution (Zymed Laboratories, South San Francisco, CA).

2.4. RNA isolation, semi-quantitative RT-PCR and real-time qRT-PCR analyses

Total RNA from 1×10^7 parasites grown in the presence or absence of 20 mM DAB was extracted using TRIzol[®] (Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, CA) as recommended by the manufacturer. For semi-quantitative RT-PCR, total RNA (1 μ g) was reverse-transcribed using the Superscript II reverse transcriptase kit (Invitrogen) and an oligo (dT¹⁸) primer. Then 1 μ g cDNA from each condition was used to amplify a 504-bp fragment corresponding to the *tveif-5a* complete ORF using the sense primer eIF5A1-S (5'-CCGGATCCATGCTTTCAGCTGAAGAAGA-3') and the antisense primer eIF5A1-AS (5'-CCAAGCTTTTGTGGACTTCTTGC-3') (10 pmol each) [22]. As an internal control, a 112-bp fragment of the *T. vaginalis* β -tubulin (β -*tub*) transcript was amplified using the BTUB9 sense primer (5'-CATTGATAACGAAGCTCCTTTACGAT-3') and the BTUB2 antisense primer (5'-GCATGTTGTGCCGGACATAACCAT-3') [30]. Quantitative RT-PCR was performed using an ABI PRISM 7300 Sequence Detector (Applied Biosystems, Foster City, CA). Briefly, RT-PCR amplification mixtures (25 μ l) contained 1 μ g cDNA from each condition, 10 pmol of each specific primer for *tveif-5a* (sense primer TRStveif-5a 5'-TTTGTGACCGTTCGATTATG-3' and antisense primer TRASTveif-5a 5'-TTGCCCTCTGGTGAAGATC-3') and 2 \times SYBR Green I PCR Master Mix (12.5 μ l) buffer (Applied Biosystems). The cycling conditions comprised 10 min of polymerase activation at 95 °C and 25 cycles at 95 °C for 30 s, 55 °C for 30 s and 72 °C for 30 s.

Each assay (in triplicate) included a standard curve of eight 1/10 serial dilution points of *tveif-5a* or β -*tub* cDNA (1 μ g of each tested cDNA) and a no-template control. All PCR efficiencies were over 95%. The results obtained by the Sequence Detection Software (version 1.3; Applied Biosystems) were exported as tab-delimited text and imported into Microsoft Excel for further analysis. To confirm the amplification specificity, PCR products were subjected to a standard curve analysis. The level of *tveif-5a* mRNA was quantified by qRT-PCR analysis using β -*tub* mRNA as an internal control with the Applied Biosystems analysis software (version 1.3). The β -*tubulin* mRNA levels were used as loading and normalization controls. Expression of β -*tubulin* mRNA is not affected by polyamines [29].

2.5. Transcriptional blockage by actinomycin D

tveif-5a mRNA stability was monitored in DAB-treated and untreated parasites using the transcriptional inhibitor actinomycin D (Sigma). Trichomonads were incubated with 10 μ g/ml actinomycin D in dimethyl sulfoxide [31] at 37 °C. Parasites (2.0×10^7) were taken at different time-points (0, 1, 2, 3, 6, 8, 12, and 24 h). Total RNA from trichomonads was extracted by TRIzol[®], followed by semi-quantitative RT-PCR analysis to detect the presence and stability of *tveif-5a* mRNA [22]. The *tveif-5a* and β -*tub* mRNA levels were analyzed on ethidium bromide-stained agarose gels and quantified by densitometric analysis with Quantity One software (Bio-Rad). The pixels produced by the β -*tub* transcript in trichomonads cultured without treatment (t_0) were defined as 100% for each condition to determine the stability time of *tveif-5a*. The *tveif-5a* mRNA levels were normalized with respect to β -*tub* mRNA. The experimental *tveif-5a* mRNA half-life (the time at which 50% of mRNA molecules remained intact) was determined by the quantity of *tveif-5a* mRNA at different times. The theoretical half-life of *tveif-5a* mRNA was obtained from the logarithmically transformed best-fit line by linear regression analysis using the decay equation $t^{1/2} = \ln 2/K$, where K corresponds to the decay constant, using the Sigmaplot program.

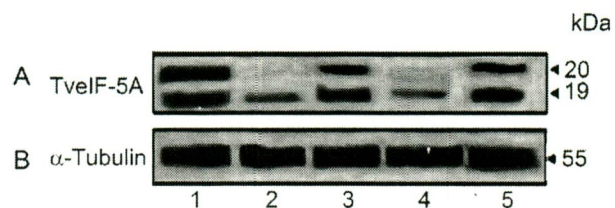


Fig. 3. DAB treatment reduced the amount of the mature TveIF-5A protein. (A) Western blot analysis of TCA-precipitated total trichomonad proteins of the following: lane 1, untreated parasites grown in normal medium (positive control) (N); lane 2, DAB-treated parasites (D); lane 3, DAB-treated trichomonads transferred to medium containing 40 mM exogenous putrescine (D-P); lane 4, DAB-treated trichomonads transferred to normal medium without putrescine (control) (D-N); and lane 5, trichomonads grown in normal medium transferred to medium with 40 mM exogenous putrescine (N-P). All were probed with specific anti-TveIF-5A serum [23] at a 1:60,000 dilution. (B) Control anti- α -tubulin (α -TUB) antibody at a 1:100 dilution used as an internal loading control. Arrowheads show the positions of the precursor (19 kDa) and mature (20 kDa) TveIF-5A and the α -TUB (55 kDa) protein bands.

2.6. Influence of putrescine in the protein synthesis of TveIF-5A and the mRNA level of tveif-5a after inhibition of putrescine biosynthesis with DAB and cycloheximide

Protein synthesis inhibition in trichomonads cultured in normal and DAB-treatment conditions was obtained by adding 10 μ g/ml of cycloheximide (Sigma) into the culture medium at time 0 of growth at 37 °C [31] and monitored at different time-points (0, 1, 2, 4, 8, 12, and 24). Normal and DAB-treated parasites were transferred to putrescine-, spermine-, or spermidine-containing medium and incubated at 37 °C for extra time (15, 30, and 60 min). After that, total protein extract was obtained from 2×10^7 parasites by 10% TCA precipitation as previously described [26]. Solubilized proteins were boiled in sample buffer [32] before loading the gels (SDS-PAGE in a 15% polyacrylamide gel). After SDS-PAGE, gels were transferred onto nitrocellulose membranes, and western blot assays were performed to detect TveIF-5A using the anti-TveIF5A antibody [23]. The anti- β tubulin antibody was used as a loading control. Total RNA was obtained at different time-points (0, 1, 2, 4, 8, 12, and 24 h) from 2×10^7 parasites cultured in normal or DAB medium. DAB-treated parasites were transferred to putrescine-, spermine-, or spermidine-containing medium and incubated at 37 °C for 15, 30, or 60 min. *tveif-5a* mRNA levels were measured by RT-PCR and qRT-PCR. Three independent experiments were performed for each time interval, and each measurement was executed in duplicate.

2.7. Statistical analysis

All data were expressed as the means \pm S.D. from three samples. qRT-PCR experiments were repeated three times. The significance of the difference between means was determined by ANOVA with Prisma Firewall 1.53 software. The level of significance was also determined by the Bonferroni multiple comparisons test.

3. Results

In order to test the presence of intra and extracellular mycoplasmas and ureaplasmas, in the trichomonad isolate used in this study because these organisms strongly influence polyamines metabolism. We analyzed the presence of *M. hominis* and *U. urealyticum* using specific culture method and PCR screening of these organisms. The results indicated that both organisms were absent in the parasite culture supernatants and in association with the trichomonad cells (data not shown).

To establish the effects of DAB treatment on *T. vaginalis*, we analyzed the parasite's growth with different concentrations of DAB (data not shown). Parasites grown in normal culture had four dupli-

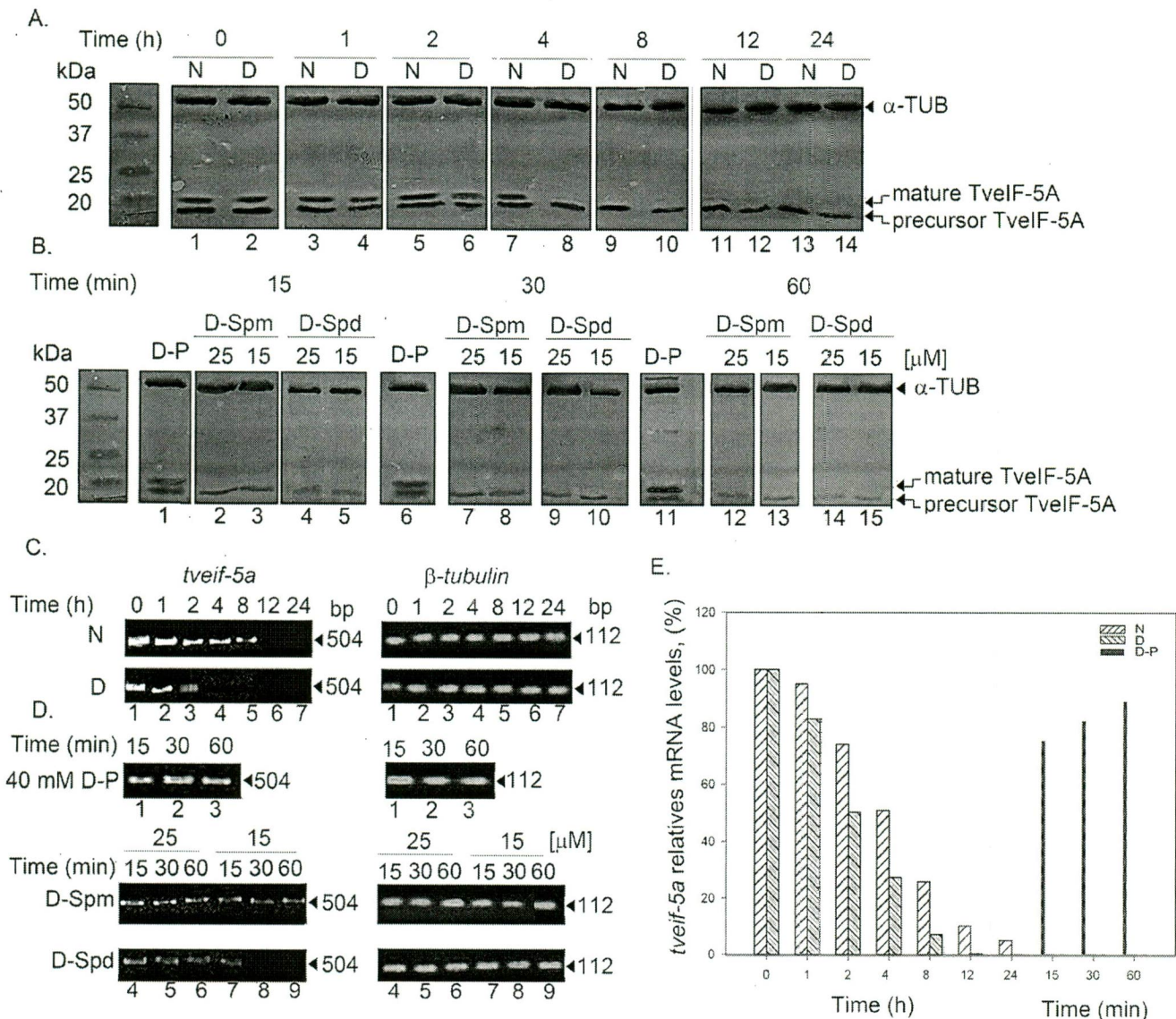


Fig. 4. Effect of inhibition of putrescine biosynthesis on TveIF-5A protein synthesis. (A) Inhibition of protein synthesis in trichomonads grown in the presence (N) or absence of putrescine (D). Trichomonads were treated with 10 μg of cycloheximide and monitored at different times (0, 1, 2, 4, 8, 12, and 24 h). (B) Parasites grown in the absence of putrescine were transferred to 40 mM exogenous putrescine, spermine (15 and 25 μM) or spermidine (15 and 25 μM) at different times (15, 30 and 60 min). TveIF-5A and α-tubulin were detected by western blot using anti-TveIF-5A (dilution 1:60 000) or anti α-tubulin (dilution 1:100) antibody. (C) RT-PCR analysis performed with total RNA from trichomonads treated with 10 μg of cycloheximide and monitored at different times (0, 1, 2, 4, 8, 12, and 24 h). Untreated parasites grown in normal medium (positive control) (N); DAB-treated parasites (D). (D) DAB-treated parasites and transferred to 40 mM exogenous putrescine (D-P), spermine (15 and 25 μM) (Spm) or spermidine (15 and 25 μM) (Spd) at different times (15, 30 and 60 min). (E) qRT-PCR using total RNA from parasites as described in parts C and D to determine the differences in the levels of *tveif-5a* mRNA in trichomonads after cycloheximide treatment and inhibition of putrescine biosynthesis with DAB (bar D) and after adding 40 mM exogenous putrescine to DAB-treated parasites (bar D-P). Untreated parasites were grown in normal medium (positive control) (bar N). The *β-tubulin* gene was selected as a reference, based on its absence of variation in the presence or absence of putrescine, other polyamines, and cycloheximide.

cations; 20 mM DAB-treated parasites had one and a half. After 24 h of growth in DAB, trichomonads could be rescued by addition of 40 mM exogenous putrescine to the culture medium, and they exhibited three duplications (Fig. 1A). However, neither spermine nor spermidine at 50, 25, or 15 μM rescued the growth of *T. vaginalis* (Fig. 1B). For subsequent experiments, 20 mM DAB was chosen because 100% of the organisms retained motility and 98–99% viability, as previously reported [29].

3.1. Inhibition of putrescine biosynthesis reduces the expression of the TveIF-5A protein in *T. vaginalis*

To identify potential changes in the normal subcellular distribution of TveIF-5A by inhibition of putrescine biosynthesis, we

performed indirect immunofluorescence assays. Fig. 2 shows that the TveIF-5A protein was detected in the cytoplasm of permeabilized parasites [panel N (a–c)], as previously reported [22]. The fluorescence intensity in DAB-treated trichomonads was strongly reduced [panel D (d–f)]. A partial recovery of the fluorescence intensity was observed after adding 40 mM exogenous putrescine to DAB-treated parasites [panel D-P (g–i)]; untreated parasites transferred to medium with 40 mM exogenous putrescine showed a similar intensity as normal-medium parasites (data not shown). Thus, the addition of putrescine partially restored fluorescence, but no fluorescence recovery was observed in DAB-treated parasites transferred to normal medium without putrescine (data not shown). Trichomonads incubated with PI serum as a negative control did not show fluorescence [panel PI (j–l)].

3.2. DAB treatment decreases the level of mature TveIF-5A in *T. vaginalis*

Western blot assays were carried out using total protein extracts and anti-TveIF-5A or anti- α tubulin antibody (Fig. 3). Interestingly, DAB-treated parasites did not show any mature TveIF-5A protein (Fig. 3A, lane 2) compared to the control, normal-grown parasites (Fig. 3A, lane 1). The addition of 40 mM exogenous putrescine after 30 min restored the mature TveIF-5A protein (Fig. 3A, lane 3). These results show that the presence of 40 mM exogenous putrescine is necessary for formation of mature TveIF-5A.

3.3. Putrescine is necessary for TveIF-5A maturation

To examine TveIF-5A stability, we analyzed total TveIF-5A protein (precursor and mature) in trichomonads grown in the presence or absence of putrescine and treated with cycloheximide by western blot assay (Fig. 4A and B). In normal culture conditions, TveIF-5A protein (precursor and mature) was present up to 4 h (Fig. 4A, lane 7); after that, only the precursor protein was observed (Fig. 4A, lanes 9, 11, 13). In contrast, in DAB-treated parasites the mature protein was absent at the 4 h time-point, while the precursor protein remained until 24 h after cycloheximide treatment (Fig. 4A, lanes 8, 10, 12, and 14). Parasites grown in DAB medium and transferred to medium containing putrescine at 15, 30, and 60 min showed the precursor and mature TveIF-5A proteins (Fig. 4B, lanes 1, 6 and 11); however, DAB-treated parasites transferred to medium with spermine or spermidine never showed recovery of the mature form (Fig. 4B, lanes 2–5, 7–10, 12–15). The results suggest that putrescine but not spermine or spermidine is necessary for maturation of TveIF-5A after DAB treatment. Then we compared the effects of cycloheximide on *tveif-5a* mRNA in parasites grown in the presence or absence of putrescine using RT-PCR and qRT-PCR. The results show that the *tveif-5a* mRNA level in parasites grown in normal culture medium and treated with cycloheximide progressively diminished from 2 to 8 h after treatment (Fig. 4C, lanes 3–5); in contrast, in DAB-treated parasites treated with cycloheximide, *tveif-5a* mRNA decreased after 2 h (Fig. 4C, lane 3). This effect was reversed in 24 h DAB-treated parasites by the addition of 40 mM exogenous putrescine at 15, 30 and 60 min (Fig. 4D, lanes 2 and 3). Spermine or spermidine did not completely recover the *tveif-5a* mRNA level (Fig. 4D, lanes 4–9). The qRT-PCR analysis showed that inhibition of putrescine biosynthesis decreased the *tveif-5a* mRNA level at 8 h by $\sim 70\%$ ($p < 0.05$) (Fig. 4E, bar D), and the expression of *tveif-5a* mRNA was progressively recovered by $\sim 78, 83$ and 90% by 40 mM exogenous putrescine ($p < 0.05$) at 15, 30 and 60 min, respectively (Fig. 4E, bars D–P).

3.4. Putrescine regulates the expression of the *tveif-5a* genes

The effect of inhibition of putrescine biosynthesis on *tveif-5a* mRNA level was determined by both RT-PCR and qRT-PCR. Inhibition of putrescine biosynthesis decreased the level of *tveif-5a* mRNA recovered after addition of 40 mM exogenous putrescine in a RT-PCR assay (Fig. 5A, lanes 2 and 3) compared with the untreated control parasites (Fig. 5A, lane 1). In DAB-treated parasites transferred to normal medium without putrescine, no recovery of mRNA expression was observed (Fig. 5A, lane 4). To determine whether *tveif-5a* mRNAs from the two coding genes were affected by inhibition of putrescine biosynthesis, the RT-PCR product was digested with *HindIII* and analyzed by agarose gel electrophoresis. Both genes were down-regulated in the inhibition of putrescine biosynthesis condition (data not shown). The qRT-PCR analysis showed that inhibition of putrescine biosynthesis by DAB reduced *tveif-5a* expression by $90 \pm 0.98\%$ ($p < 0.0005$) at the mRNA level (Fig. 5C, bar D). The addition of 40 mM exogenous putrescine increased

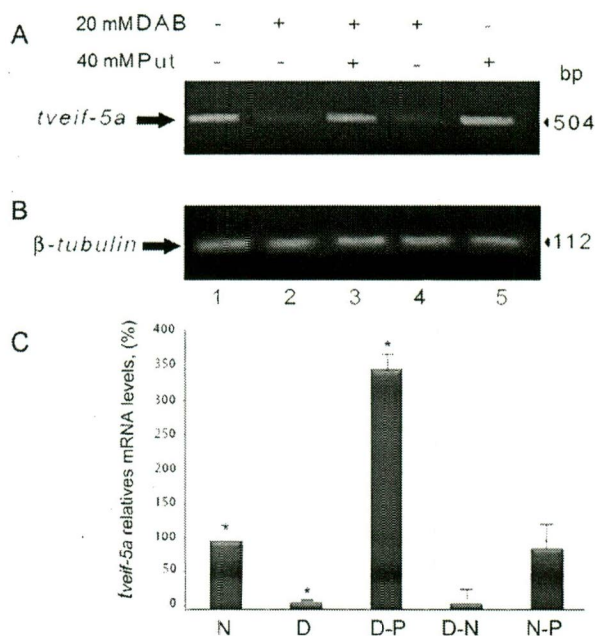


Fig. 5. *tveif-5a* expression after inhibition or restoration of cellular putrescine. (A and B) Semi-quantitative RT-PCR analysis performed with total RNA from lane 1, untreated parasites grown in normal medium (positive control) (N); lane 2, DAB-treated parasites (D); lane 3, DAB-treated trichomonads transferred to medium containing 40 mM exogenous putrescine (D-P); lane 4, DAB-treated trichomonads transferred to normal medium without putrescine (control) (D-N); and lane 5, trichomonads grown in normal medium and transferred to medium with 40 mM exogenous putrescine (N-P). β -Tubulin (β -tub) was used as a quantity control. (C) qRT-PCR to quantify the differences in the levels of *tveif-5a* mRNA in trichomonads after inhibition of putrescine biosynthesis with DAB (bar D) and after adding 40 mM exogenous putrescine to DAB-treated parasites (bar D-P) using total RNA from parasites as described in parts A and B.

tveif-5a mRNA to $\sim 250 \pm 2\%$ ($p < 0.0005$) (Fig. 5C, bar D-P), whereas the control parasites transferred to 40 mM exogenous putrescine showed an expression of *tveif-5a* mRNA of $90 \pm 1\%$ ($p < 0.0005$) (Fig. 5C, bar N-P) of the untreated control (Fig. 5C, bar N). Inhibition of putrescine biosynthesis did not alter the expression of β -tubulin, which was used as a loading control (Fig. 5B). These data show that inhibition of putrescine biosynthesis reduces *tveif-5a* mRNA, which is consistent with the reduction of the TveIF-5A protein (Fig. 3A), suggesting that putrescine is necessary for *tveif-5a* expression.

3.5. Inhibition of putrescine biosynthesis affects *tveif-5a* mRNA stability

To test whether the decrease in *tveif-5a* mRNA level by inhibition of putrescine biosynthesis was influenced by changes in mRNA turnover, the *tveif-5a* mRNA half-life was measured in the presence or absence of putrescine after transcription blockage with actinomycin D. Fig. 6 shows that *tveif-5a* mRNA stability progressively diminished from 3 to 8 h after the transcriptional blockage (Fig. 6A, panel N). The *tveif-5a* mRNA half-life was estimated to be ~ 5 h in parasites grown in normal culture medium (Fig. 6B, normal). The transcript was nearly gone after 3 h in DAB-treated parasites (Fig. 6A, panel D), and the half-life of *tveif-5a* mRNA under DAB treatment was calculated to be ~ 2.5 h (Fig. 6B, 20 mM DAB). The DAB-treated parasites transferred to normal medium were used as a control (Fig. 6A, panel D-N). Interestingly, *tveif-5a* mRNA stability was restored by 40 mM exogenous putrescine, as the *tveif-5a* transcript was detected after actinomycin D blockage (Fig. 6A, panel D-P) and the *tveif-5a* mRNA half-life was to ~ 4.5 h (Fig. 6B, 40 mM D-P). No changes were observed in normal control parasites after

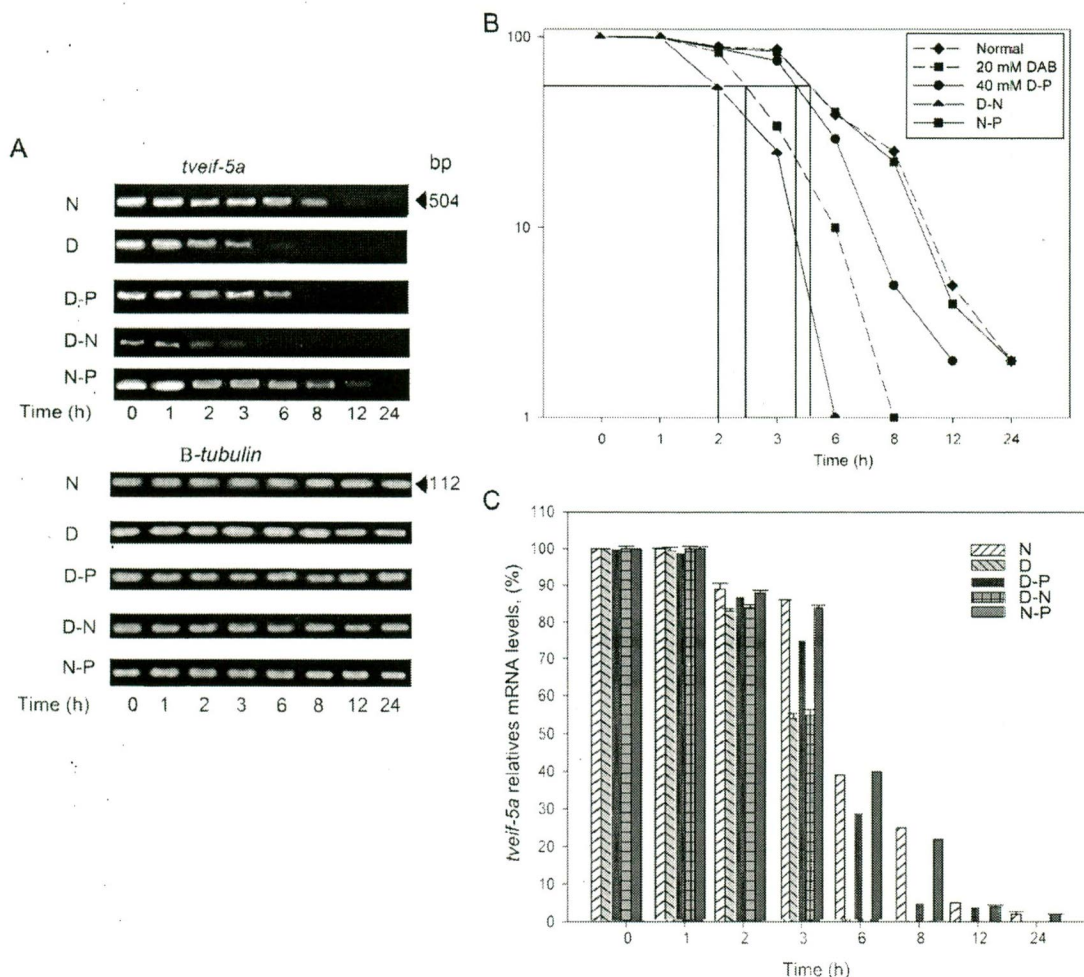


Fig. 6. Effect of inhibition of putrescine biosynthesis on *tveif-5a* mRNA stability. (A) Levels of *tveif-5a* mRNA by semi-quantitative RT-PCR analysis using total RNA from the same parasites grown in the presence or absence of putrescine and treated with actinomycin D and harvested after 0, 1, 2, 3, 6, 8, 12 and 24 h of treatment for analysis. PCR products were separated by 1.5% agarose gel electrophoresis and stained with ethidium bromide. Panel N, trichomonads grown in normal medium under basal conditions; panel D, DAB-treated trichomonads; panel D-P, DAB-treated trichomonads transferred to medium containing exogenous putrescine; panel D-N, DAB-treated trichomonads transferred to normal medium; panel N-P, trichomonads grown in normal medium and transferred to medium with 40 mM exogenous putrescine. The internal control was the 112-bp β -tubulin (β -*tub*) amplicon. (B) The half-life of *tveif-5a*, assessed by transcription blockage using actinomycin D. Trichomonads grown in normal medium (◆). DAB-treated trichomonads (■). DAB-treated trichomonads transferred to medium with 40 mM exogenous putrescine (●). DAB-treated trichomonads transferred to normal medium (▲). Trichomonads grown in normal medium and transferred to medium with 40 mM exogenous putrescine (■). (C) qRT-PCR to quantify the differences in the levels of *tveif-5a* mRNA in actinomycin D-treated trichomonads that were treated with DAB (bar D), parasites treated with DAB and 40 mM exogenous putrescine (bar D-P), trichomonads grown in normal medium under basal conditions (bar N), DAB-treated trichomonads transferred to normal medium without putrescine (control) (bar D-N), and trichomonads grown in normal medium and transferred to medium with 40 mM exogenous putrescine (bar N-P), using total RNA from parasites as described in part A. Total cellular RNA was isolated, and the levels of remaining *tveif-5a* and β -*tub* mRNA were measured by qRT-PCR. Values are the means \pm SE from duplicate samples. * $p < 0.00014$ compared with trichomonads grown in the presence or absence of putrescine.

40 mM exogenous putrescine (Fig. 6A, panel N-P and Fig. 6B N-P). *T. vaginalis* β -*tub* mRNA, used as an internal control, had a half-life longer than 24 h, and its expression was not affected in the different culture conditions tested (Fig. 6A). The no-template control reaction (RT-) was also used as a negative control (data not shown). These results were confirmed by qRT-PCR. This analysis showed that inhibition of putrescine biosynthesis by 20 mM DAB in actinomycin D-treated parasites inhibited *tveif-5a* expression by $\sim 97 \pm 0.88\%$ ($p < 0.05$) at the mRNA level after 6 h (Fig. 6C, bar D). This effect was reversed by 40 mM exogenous putrescine, which increased the expression of *tveif-5a* mRNA to $\sim 80 \pm 0.092\%$ ($p < 0.05$) after 3 h (Fig. 6C, bar D-P). Inhibition of putrescine biosynthesis did not alter the expression of β -*tubulin*, which was used as a loading control. These data show that the amount of *tveif-5a* mRNA is reduced in a time-dependent manner in actinomycin D/DAB-treated trichomonads, suggesting that putrescine could regulate *tveif-5a* expression by modulating the stability of its transcript.

4. Discussion

In this study, we investigated the effect of inhibition of putrescine biosynthesis on the expression of the *tveif-5a* genes, which showed 99% of identity and encoding 168 aa highly conserved protein with 98% identity previously reported by us [22]. We showed that the inhibition of ODC (the enzyme involved in putrescine biosynthesis) by DAB (a competitive inhibitor of ODC) and the inhibition of putrescine biosynthesis, which is then unavailable to cotransport exogenous spermine into the cell, resulted in reductions of *tveif-5a* mRNA stability and the amount of mature TveIF-5A protein. *tveif-5a* mRNA and protein expression were restored to higher than basal levels by 40 mM exogenous putrescine, likely due to the capacity of putrescine to reverse the inhibitory effect of DAB by competing to transport spermine into the cell and the restoring of the putrescine: spermine antiporter. Although the concentration of putrescine (40 mM) used in this study is 20 times more than the concentration found during the tri-

chomoniasis infection, this concentration was necessary to reverse the effects of DAB (20 mM) that decreased the amount of intracellular putrescine by ~90% and arrested parasite growth [9,10]. However, neither spermine nor spermidine at similar concentrations was able to reverse this effect. These findings strongly suggest that putrescine is required for the expression of *tveif-5a* in *T. vaginalis*.

Our data are consistent with the effects of polyamines on the regulation of the expression of several genes. Polyamines can positively or negatively regulate the expression of genes such as *c-fos*, *c-jun*, *p53*, *p21*, and *c-myc* [33–37], whereas polyamine inhibition decreases mRNA levels by repressing gene transcription [37]. Cellular polyamines are also implicated in the regulation of toll-like receptor 2 (TLR2) expressions. In polyamine inhibition, TLR2 mRNA and protein levels significantly decrease in cells treated with the inhibitor of polyamine biosynthesis DL- α -difluoromethylornithine (DFMO). Moreover, 40 mM exogenous putrescine restores TLR2 mRNA and protein levels [38], as occurs with TveIF-5A in *T. vaginalis*. Polyamine inhibition with DMFO in mouse mammary carcinoma FM3A cells decreases the level of eIF-5A protein [39], as occurs with likely due to TveIF-5A in *T. vaginalis*. Additionally, the inhibition of S-adenosylmethionine decarboxylase of *Plasmodium falciparum* results in decreased parasitemia, possibly due to suppression of the mature eIF-5A [40,41].

The mechanism involved in gene regulation by polyamines is still unknown. Polyamine inhibition by DFMO down-regulates *cox-2* mRNA due to destabilization of its 3'-UTR by a mature eIF-5A-mediated post-transcriptional mechanism in a human colon adenocarcinoma cell line [42]. The most important role of polyamines in translation regulation may be due to the fact that the majority of polyamines bind to RNA [39] and that spermidine is required for activation of eIF-5A [42].

Our results show that inhibition of putrescine biosynthesis using 20 mM DAB decreased the stability of the *tveif-5a* mRNA and reduced the amount of the mature TveIF-5A protein, which were restored by the addition of 40 mM exogenous putrescine.

eIF-5A is called a polyamine-dependent protein because polyamines are required for its unique hypusination modification [18,43] and for regulating *tveif-5a* mRNA level. In cycloheximide-treated parasites, 40 mM exogenous putrescine was necessary to establish the antiporter system and obtain the TveIF-5A hypusination. In *P. falciparum*, low levels of polyamines decrease the mature eIF-5A protein [41]. Studies in FM3A cells cultured with fetal bovine serum and treated with 2 μ g/ml cycloheximide did not show changes in the quantity of the eIF-5A protein. In contrast, cycloheximide's inhibition of TveIF-5A protein synthesis showed that the mature and precursor TveIF-5A in trichomonads are present at different times. However, in inhibition of putrescine biosynthesis, mature TveIF-5A decreased and was only restored by 40 mM exogenous putrescine [39].

In protozoan parasites, there is a high demand for polyamines in pathogenesis [44]. Therefore, inhibition of polyamine biosynthesis with inhibitors of ODC has been proposed as a chemotherapeutic target [14,16,17,41,44]. In trichomonads, polyamines regulate some of the molecules involved in *T. vaginalis* pathogenicity. The level of cytoadherence in DAB-treated trichomonads increases up to 20-fold, with no differences in the amount of adhesins between normal and DAB-treated organisms [9]. In contrast, the level of trichomonal cytotoxicity decreased due to reductions in *tvcp65* mRNA and the quantity and proteolytic activity of TvCP65, a cysteine proteinase involved in *T. vaginalis* cytotoxicity [23]. The effect of inhibition of putrescine biosynthesis on TveIF-5A is consistent with that observed for TvCP65 [29]. Thus, our work shows that putrescine regulates *tveif-5a* gene expression and TveIF-5A synthesis, possibly due to an autoregulatory mechanism in which TveIF-5A modulates the stability of its own transcript. However, the reg-

ulatory mechanism implicated is still unknown, and work is in progress to elucidate it.

Acknowledgments

This work was supported by grants from CONACyT (83808) and ICyT-DF (PIFUTP08-150) Mexico (to M.E.A.S.). B.I.C.G. was supported by a scholarship from ICyT-DF Mexico. We are grateful to Dr. Ana Maria Cevallos Gaos for proofreading the manuscript. We appreciate the excellent technical assistance of Laura Isabel Vazquez Carrillo M.Sc. and the technical support of Eduardo Carrillo M.Sc. for his assistance in the Confocal Microscopy Facility at UACM.

References

- [1] Sorvillo F, Smith L, Kerndt P, Ash L. *Trichomonas vaginalis*, HIV, and African-Americans. *Emerg Infect Dis* 2001;7:927–32.
- [2] Kapiga SH, Lyamuya EF, Lwihula GK, Hunter DJ. The incidence of HIV infection among women using family planning methods in Dar es Salaam, Tanzania. *AIDS* 1998;12:75–84.
- [3] Laga M, Manoka A, Kivuvu M, et al. Non-ulcerative sexually transmitted diseases as risk factors for HIV-1 transmission in women: results from a cohort study. *AIDS* 1993;7:95–102.
- [4] Schwebke JR, Burgess D. Trichomoniasis. *Clin Microbiol Rev* 2004;17:794–803.
- [5] Cotch MF, Pastorek IJG, Nugent RP, Hillier SL, Gibbs RS, Martin DH. *Trichomonas vaginalis* associated with low-birth weight and preterm delivery. The vaginal infections and Prematurity Study Group. *Sex Transm Dis* 1997;24:353–60.
- [6] Yarlett N, Bacchi CJ. Parasite polyamine metabolism: targets for chemotherapy. *Biochem Soc Trans* 1994;22:875–9.
- [7] Linstead D, Cranshaw MA. The pathway of arginine catabolism in the parasitic flagellate *Trichomonas vaginalis*. *Mol Biochem Parasitol* 1983;8:241–52.
- [8] Yarlett N, Martinez MP, Moharrami MA, Tachezy J. The contribution of the arginine dihydrolase pathway to energy metabolism by *Trichomonas vaginalis*. *Mol Biochem Parasitol* 1996;78:117–25.
- [9] García AF, Benchimol M, Alderete JF. *Trichomonas vaginalis* polyamines metabolism is linked to host cell adherence and cytotoxicity. *Infect Immun* 2005;73:2602–10.
- [10] Reis IA, Martínez MP, Yarlett N, Johnson PJ, Silva-Filho FC, Vannier-Santos MA. Inhibition of polyamine synthesis arrests trichomonad growth and induces destruction of hydrogenosomes. *Antimicrob Agents Chemother* 1999;43:1919–23.
- [11] Yarlett N, Martínez MP, Goldberg B, Kramer DL, Porter WC. Dependence of *Trichomonas vaginalis* upon polyamine backconversion. *Microbiology* 2000;146:2715–22.
- [12] Sanderson BE, White E, Balsdon MJ. Amine content of vaginal fluid from patients with trichomoniasis and gardnerella associated nonspecific vaginitis. *Br J Vener Dis* 1983;59:302–5.
- [13] Hamana K, Matsuzaki S. Polyamines as a chemotaxonomic marker in bacterial systematics. *Crit Rev Microbiol* 1992;18:261–83.
- [14] Igarashi K, Kashiwagi K. Polyamines: mysterious modulators of cellular functions. *Biochem Biophys Res Commun* 2000;271:559–64.
- [15] Tabor CW, Tabor H. Polyamines. *Annu Rev Biochem* 1984;53:749–90.
- [16] Casero Jr RA, Marton LJ. Targeting polyamines metabolism and function in cancer and other hyperproliferative diseases. *Nat Rev Drug Discov* 2007;6:373–90.
- [17] Wallace HM, Fracer AV. Inhibitors of polyamine metabolism: review article. *Amino Acid* 2004;26:353–65.
- [18] Park MH. The essential role of hypusine in eukaryotic translation initiation factor 4D (eIF-4D). Purification of eIF-4D and its precursors and comparison of their activities. *J Biol Chem* 1989;264:18531–5.
- [19] Kang HA, Hershey JWB. Effect of initiation factor eIF-5A inhibition on protein synthesis and proliferation of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 1994;269:3934–40.
- [20] Chan KL, New D, Ghandhi S, Wong F, Lam CMC, Wong JTY. Transcript levels of the eukaryotic translation initiation factor 5A gene peak at early G1 phase of the cell cycle in the Dinoflagellate *Cryptothecodinium cohnii*. *Appl Environ Microbiol* 2002;68:2278–84.
- [21] Rosorius O, Reichart B, Krätzer F, Heger P, Dabauville MC, Hauber J. Nuclear pore localization and nucleocytoplasmic transport of eIF-5A: evidence for direct interaction with the export receptor CRM1. *J Cell Sci* 1999;112:2369–80.
- [22] Carvajal-Gamez BI, Arroyo R, Lira R, López-Camarillo C, Alvarez-Sánchez ME. Identification of two novel *Trichomonas vaginalis* eif-5a genes. *Infect Genet Evol* 2010;10:284–91.
- [23] Alvarez-Sánchez ME, Ávila-González L, Becerril-García C, Fattel-Facenda L, Ortega-López J, Arroyo R. A novel cysteine proteinase (CP65) of *Trichomonas vaginalis* involved in cytotoxicity. *Microb Pathog* 2000;28:193–202.
- [24] Kenny GE, Hooton TM, Roberts MC, Cartwright FD, Jeanne H. Susceptibilities of genital mycoplasmas to the newer quinolones as determined by the agar dilution method. *Antimicrob Agents Chemother* 1989;33:103–7.

- [25] Blanchard A, Yáñez A, Dybvig K, Watson HL, Griffiths G, Cassell GH. Evaluation of intraspecies genetic variation within the 16S rRNA gene of *Mycoplasma hominis* and detection by polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 1993;31:1358–61.
- [26] Riley DE, Samadpour M, Krieger JN. Detection of variable DNA repeats in diverse eukaryotic microorganisms by a single set of polymerase chain reaction primers. *J Clin Microbiol* 1991;29:2746–51.
- [27] Rappelli P, Carta F, Delogu G, et al. *Mycoplasma hominis* and *Trichomonas vaginalis* symbiosis: multiplicity of infection and transmissibility of *M. hominis* to human cells. *Arch Microbiol* 2001;175:70–4.
- [28] Diamond LS. The establishment of various trichomonads of animals and man in axenic cultures. *J Parasitol* 1957;43:488–90.
- [29] Alvarez-Sánchez ME, Carvajal-Gómez BI, Solano-González E, et al. Polyamine depletion down-regulates expression of the *Trichomonas vaginalis* cytotoxic CP65, a 65 kDa cysteine proteinase involved in cellular damage. *Int J Biochem Cell Biol* 2008;40:2442–51.
- [30] León-Sicairos CR, León-Félix J, Arroyo R. *tvcp12*: a novel *Trichomonas vaginalis* cathepsin L-like cysteine proteinase-encoding gene. *Microbiology* 2004;150:1131–8.
- [31] Lehker MW, Arroyo R, Alderete JF. The regulation by iron of the synthesis of adhesins and cytoadherence levels in the protozoan *Trichomonas vaginalis*. *J Exp Med* 1991;174:311–8.
- [32] Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970;227:680–5.
- [33] Wang JY, McCormack SA, Viar MJ, et al. Decreased expression of protooncogenes *c-fos*, *c-myc* and *c-jun* following polyamine depletion in IEC-6 cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 1993;265:G331–8.
- [34] Li L, Li J, Rao JN, Li M, Bass BL, Wang JY. Inhibition of polyamine synthesis induces p53 gene expression but not apoptosis. *Am J Physiol Cell Physiol* 1999;276:946–54.
- [35] Li L, Liu L, Rao JN, et al. JunD stabilization results in inhibition of normal intestinal epithelial cell growth through P21 after polyamine depletion. *Gastroenterology* 2002;123:764–79.
- [36] Patel AR, Wang JY. Polyamines modulate transcription but not posttranscription of *c-myc* and *c-jun* in IEC-6 cell. *Am J Physiol Cell Physiol* 1997;273:1020–9.
- [37] Liu L, Li L, Rao JN, et al. Polyamine-modulated expression of *c-myc* plays a critical role in stimulation of normal intestinal epithelial cell proliferation. *Am J Physiol Cell Physiol* 2005;288:89–99.
- [38] Chen J, Rao JN, Zou T, et al. Polyamines are required for expression of Toll-like receptor 2 modulating intestinal epithelial barrier integrity. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2007;293:568–76.
- [39] Nishimura K, Murozumi K, Shirahata A, Park MH, Kashiwagi K, Igarashi K. Independent roles of eIF5A and polyamines in cell proliferation. *Biochem J* 2005;385:779–85.
- [40] Kaiser A, Gottwald A, Maier W, Seitz HM. Targeting enzymes involved in spermidine metabolism of parasitic protozoa – a possible new strategy for antiparasitic treatment. *Parasitol Res* 2003;91:508–16.
- [41] Blavid R, Kusch P, Hauber J, et al. Down-regulation of hypusine biosynthesis in plasmodium by inhibition of S-adenosyl-methionine-decarboxylase. *Amino Acid* 2010;38:461–9.
- [42] Parker MT, Gerner EW. Polyamine-mediated post-transcriptional regulation of COX-2. *Biochimie* 2002;84:815–9.
- [43] Park MH, Lee YB, Joe YA. Hypusine is essential for eukaryotic cell proliferation. *Biol Signal* 1997;6:115–23.
- [44] Müller IB, Das Gupta R, Lüersen K, Wrenger C, Walter RD. Assessing the polyamine metabolism of *Plasmodium falciparum* as chemotherapeutic target. *Mol Biochem Parasitol* 2008;160:1–7.

Coordinación de Certificación y Registro

UACM

Universidad Autónoma
de la Ciudad de México

Nada Humano me es ajeno