

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE LA CIUDAD DE MÉXICO

COLEGIO DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA

PROGRAMA DE CIENCIAS GENÓMICAS

**Caracterización de la proteína Tv-PSP1 y  
su posible participación en la  
degradación del RNAm de *tvcp39* en  
*Trichomonas vaginalis***

**TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

**DOCTORA EN CIENCIAS GENÓMICAS**

P R E S E N T A :

M. en C. Alma María de la Luz Villalobos Osnaya

DIRECTOR  
Dra. María Elizabeth Álvarez Sánchez

Ciudad de México, junio, 2019

## SISTEMA BIBLIOTECARIO DE INFORMACIÓN Y DOCUMENTACIÓN



## UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE LA CIUDAD DE MÉXICO COORDINACIÓN ACADÉMICA

### RESTRICCIONES DE USO PARA LAS TESIS DIGITALES

### DERECHOS RESERVADOS<sup>©</sup>

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.

**INTEGRACIÓN DEL JURADO:**

Presidente: Dra. Minerva Camacho Nuez

Secretario: Dra. María Elizbeth Álvarez Sánchez UACM

Vocal: Dra. Rosalia Lira Carmona

Vocal: Dr. César López Camarillo

Plantel de adscripción:

PLANTEL DEL VALLE, UACM.

**DIRECTOR**

---

Dra. María Elizbeth Álvarez Sánchez  
Universidad Autónoma de la Ciudad de México

## AGRADECIMIENTOS

El desarrollo de este trabajo no lo puedo catalogar como algo fácil, pero lo que sí puedo decir es que cada momento lo disfrute, cada investigación proceso o proyecto que se realizaron dentro de ella, mediante estos agradecimientos quiero resaltar la labor de todos aquellos que estuvieron presentes durante toda o la mayor parte de la realización y desarrollo de esta tesis.

Este trabajo fue realizado bajo la tutoría de la Dra. Elizabeth Álvarez Sánchez, a la cual agradezco me permitiera formar parte de su grupo de trabajo, gracias por las enseñanzas y todo el apoyo brindado durante el desarrollo de mi proyecto, fue mi guía en este proceso.

En la realización y ejecución de este proyecto participaron profesores que durante todo el proceso me apoyaron con sus observaciones las cuales fueron aportaciones importantes en el desarrollo de mi tesis, gracias por formar parte Dra. Minerva Camacho Nuez, Dr. Mauricio Castañón, Dr. Cesar López Camarillo, Dra. Martha Yocupicio Monroy, Dra. Elisa Irene Azuara Liceaga, Dra. Claudia Selene Zárate Guerra, Dra. Lilia López Cánovas, Dr. José de Jesús Olivares Trejo, Dra. Mavil López Casamichana.

Gracias a mi universidad UACM, por haberme permitido formarme en ella, gracias a todas las personas que fueron partícipes de este proceso, ya sea de manera directa o indirecta.

El desarrollo de esta tesis fue posible con la colaboración con la Dra. Rossana Arroyo, Dra. Georgina Garza, Dr. César Millán Pacheco, Dr. Arturo González Robles, gracias al apoyo y la confianza que me brindaron para poder llegar a donde estoy.

A la Dra. Rosalía Lira Carmona por sus observaciones realizadas para mejorar, por transmitirme su conocimiento gracias por formar parte de este proyecto.

Gracias por los apoyos económicos recibidos durante todo este proceso, ICyTDF (ICyTDF/SRI/70/2011), COMECyT (14BTD0105) y a la UACM por la beca de obtención de grado (2016-II) y todos aquellos apoyos para poder presentar mi trabajo en diferentes congresos.

A Catalina, Viviana, Lulú y Dana por su inmensa bondad, la ayuda y apoyo que me brindaron fue sumamente importante para lograr esta meta.

Mis compañeros de laboratorio cada uno han aportado grandes cosas, por ayudarme por aprender juntos por que siempre fue divertido trabajar con todos ustedes Laura, Yolanda, Mara, Jonathan, José Luis, Bryan, Víctor, Jorge, David.

A todos aquellos que formaron parte de este proyecto que siempre me apoyaron, gracias por las ganas de transmitirme su conocimiento por motivarme y por estar ahí, gracias Jacqueline, Itzel, Helios, Elba, Miguel Ángel Fonseca, Miguel Ángel Del Moral.

A Rubí y Olga por estar ahí siempre escuchándome, por apoyarme y motivarme en cada momento, gracias por su ayuda y hacer esto un tanto menos complicado.

A los malos Gustavo, Thomas, Andrea por formar parte de este proyecto, por su apoyo, sus porras y regaños siempre es un placer compartir con ustedes.

A Itzel Quintas e Iris Serratos por transmitirme su conocimiento y ayudarme a llegar al punto en el que me encuentro, no fue sencillo el camino gracias por siempre motivarme y ayudarme hasta donde les era posible les agradezco y hago presente mi gran cariño hacia ustedes.

A mi mejor amigo José Ali, la ayuda brindada fue sumamente importante, estuviste a mi lado incluso en los momentos y situaciones tormentosas siempre apoyándome, motivándome hasta donde te era posible o incluso aún más.

Gracias a todas aquellas personas que formaron parte de mi vida durante este proceso y que pude haber omitido, aunque no los haya mencionado sé que tengo buenos recuerdos con cada uno de ustedes y que hicieron cada uno de mis días mejores.

## DEDICATORIA

Durante la realización de mi proyecto, ustedes han sido el principal cimiento de mi desarrollo profesional y deseos de superación, no ha sido sencillo el camino hasta ahora pero gracias por su cariño, apoyo y por creer en mí, este trabajo se los dedico a ustedes que siempre han estado a mi lado a mi madre, abuela, hermanos y sobrinos, esto es posible gracias a ustedes.

A Omar que estuviste presente en la evolución de esta tesis, por toda la ayuda y aporte no solo a mi tesis si no a mi vida, por preocuparte por mí y por qué siempre quisiste lo mejor para mí, sé que aunque ya no estamos juntos fuiste una de las principales personas involucradas en ayudarme a que este proyecto fuera posible.

## Abreviaturas

$\mu$ l	Microlitros
Å	Ángstrom
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
CPs	Cisteína proteinasa
DAB	1,4 Diamino-2-butatona dihidroclorido
DC	Dicroísmo circular
DLS	Dispersión dinámica de luz
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
ERE	Elementos de respuesta a eIF5A
ESTs	Expressed sequence tag
Fd	Ferredoxina
GST	Glutación S-Transferasa
IPP	Interacciones proteína-proteína
IPTG	Isopropil- $\beta$ -D-tiogalactopiranosido
IRE	Elementos de respuesta a Hierro
kDa	Kilodaltones
LB	Medio luria Broth
M	Molar
mg	Miligramos
min	Minutos
mM	Milimoles
nm	Nanómetros
ns	Nanosegundos
OD	Densidad óptica
ODC	Ornitina descarboxilasa
ON	Toda la noche
PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida
pb	Pares de bases

PBS	Amortiguador fosfato salino
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PDB	Protein Data Bank
PFO	Piruvato ferredoxina óxido-reductasa
pH	Potencial de Hidrógeno
PSP	Proteína soluble en ácido perclórico
RMSD	Desviación estándar cuadrática media
rTv-PSP1	Proteína recombinante Tv-PSP1
SDS	Dodecil sulfato de sodio
SSAT	Espermina N <sup>1</sup> acetiltransferasa
TA	Temperatura ambiente
TAE	Amortiguador Tris-Acetato-EDTA
TYM	Medio de cultivo tripticasa-extracto de levadura-maltosa
UTR	Región no traducida
VECs	Células del epitelio vaginal

## Índice

Abreviaturas .....	1
Índice de tablas.....	5
Índice de figuras .....	6
Resumen.....	8
Abstract.....	9
1.1 Tricomoniasis .....	10
1.2 Diagnóstico de la tricomoniasis .....	12
1.3 Tratamiento de la tricomoniasis.....	13
1.4 Epidemiología.....	15
1.5 Parásito <i>T. vaginalis</i> .....	16
1.6 Ciclo de vida de <i>T. vaginalis</i> .....	18
1.7 Genoma de <i>T. vaginalis</i> .....	19
1.8 Propiedades y factores de virulencia.....	20
1.9 Regulación génica .....	23
2. Antecedentes particulares.....	26
2.1 Estructura de las proteínas solubles en ácido perclórico (PSP) .....	26
2.2 Familia YjgF/YER057c/UK114.....	28
4. Objetivo general .....	32
4.1 Objetivos particulares.....	32
5. Estrategia experimental .....	33
6. Materiales y Métodos.....	34
6.1 Análisis <i>in silico</i> de proteínas PSP de <i>T. vaginalis</i> .....	34
6.2 Cultivo de <i>T. vaginalis</i> .....	34
6.3 Extracción de ARN total de <i>T. vaginalis</i> .....	35
6.4 Expresión y purificación de la proteína recombinante Tv-PSP1 (rTv-PSP1).....	35
6.5 Western blot utilizando anticuerpos rTv-PSP1.....	36
6.6 Obtención de la proteína nativa Tv-PSP1.....	37
6.7 Tinción en Plata geles de poliacrilamida.....	37
6.8 Inmunolocalización de Tv-PSP1 en <i>T. vaginalis</i> .....	38
6.9 Cromatografía de exclusión molecular .....	38

6.10	Dispersión de Luz Dinámica.....	39
6.11	Dicroísmo circular.....	40
6.12	Modelaje por homología.....	40
6.13	Dinámica molecular.....	41
6.14	Fluorescencia intrínseca.....	41
6.15	Inmunoprecipitación.....	41
6.16	Espectrometría de masas.....	42
6.17	Ensayo de RNAsa.....	42
6.18	Estudio <i>in silico</i> de acoplamiento de la proteína Tv-PSP1 y la secuencia IRE.....	43
6.19	Cálculos de la energía libre de unión Tv-PSP1-ARN:.....	44
	Cálculos electrostáticos.....	44
	Cálculos no electrostáticos o no polares.....	45
7.	Resultados.....	46
7.1	Caracterización bioquímica de la proteína Tv-PSP1.....	46
7.2	Estabilidad del ARNm de Tv-PSP1 en presencia y ausencia de poliaminas.....	67
7.3	Localización celular de Tv-PSP1.....	69
7.4	Interacción de Tv-PSP1 con otras proteínas de <i>T. vaginalis</i> .....	74
7.5	Participación de Tv-PSP1 en la degradación del ARNm de <i>tvcp39</i> en <i>T. vaginalis</i> .....	79
8.0	Discusión.....	91
9.	Conclusiones.....	100
10.	Perspectivas.....	100
11.	Referencias.....	101
12.	Apéndice.....	113

## Índice de tablas

Tabla 1. Características del Genoma de <i>T. vaginalis</i> .....	20
Tabla 2. Función enzimática de proteínas de adhesión.....	21
Tabla 3. Proteínas involucradas en propiedades de virulencia de <i>T. vaginalis</i> .....	23
Tabla 4. Expresión de moléculas en presencia y ausencia de Fe <sup>2+</sup> .....	24
Tabla 5. Códigos de PDB de proteínas cristalizadas de la familia PSP.....	26
Tabla 6. Análisis <i>in silico</i> de ESTs obtenidos de la base de datos TrichDB.....	49
Tabla 7. Determinación del peso molecular de TvL-PS1.....	55
Tabla 8. Determinación del radio hidrodinámico de TvL-PS1.....	56
Tabla 9. Porcentaje de $\alpha$ -hélices y hojas $\beta$ de la proteína Tv-PSP1.....	58
Tabla 10. Porcentaje de $\alpha$ -hélices y hojas $\beta$ de proteínas cristalizadas de la familia YER057c/YjgF/UK114.....	58
Tabla 11. Posibles aminoácidos que interactúan entre las subunidades de la estructura homotrimérica de Tv-PSP1.....	61
Tabla 12. Proteínas de <i>E. histolytica</i> que interactúan con EhL-PSP y sus homólogos en <i>T. vaginalis</i> que posiblemente interactúan con Tv-PSP1.....	75
Tabla 13. Proteínas predichas que interactúan con la proteína Tv-PSP1 de <i>T. vaginalis</i> utilizando el programa STRING.....	78
Tabla 14. Proteínas identificadas por espectrometría de masas. ....	80
Tabla 15. Amortiguadores candidatos para del ensayo de ribonucleasa.....	79
Tabla 16. Posibles aminoácidos de la proteína Tv-PSP1 en contacto con las estructuras IRE del ARN.....	86
Tabla 17. Energías de unión ( $\Delta G_{calc}$ ) para el sistema Tv-PSP1-ARN, determinado por APBS and VMD.....	90

## Índice de figuras

Figura 1. Tricomoniasis.....	12
Figura 2. Casos por entidad federativa de tricomoniasis.....	16
Figura 3. <i>Trichomonas vaginalis</i> .....	18
Figura 4. Ciclo de vida de <i>T. vaginalis</i> .....	19
Figura 5. Representación gráfica del medio ambiente de <i>T. vaginalis</i> .....	25
Figura 6. Estructura del cristal de la proteína hp14.5 de humano.....	28
Figura 7. Motivo característico de la familia YER057c/YjgF/UK114 en las proteínas PSP de <i>T. vaginalis</i> .....	47
Figura 8. Motivo característico de proteínas de la familia YER057c/YjgF/UK114.....	48
Figura 9. Proteínas solubles en ácido perclórico.....	51
Figura 10. Estructura cuaternaria de la proteína Tv-PSP1.....	53
Figura 11. Cromatograma de elución de la proteína rTv-PSP1.....	55
Figura 12. Dispersión dinámica de luz.....	56
Figura 13. Espectro de Dicroísmo Circular de la proteína rTv-PSP1.....	57
Figura 14. Modelo del monómero de la proteína Tv-PSP1.....	59
Figura 15. Modelo homotrimérico de la proteína Tv-PSP1.....	60
Figura 16. Residuos en contacto entre las subunidades de proteínas PSP.....	62
Figura 17. Estabilidad de la proteína Tv-PSP1 en presencia de Urea.....	63
Figura 18. Dinámica molecular del homotrímero de la proteína Tv-PSP1.....	64
Figura 19. Gráfica de la dinámica molecular de 100 ns de la proteína Tv-PSP1.....	65
Figura 20. Gráfica de la dinámica molecular de 100 ns de la proteína Tv-PSP1 sin la presencia de loops.....	66
Figura 21. Expresión del gen de <i>tv-psp1</i> en presencia y ausencia de putrescina.....	68
Figura 22. Localización en citoplasma de la proteína Tv-PSP1 en <i>T. vaginalis</i> .....	70
Figura 23. Localización en núcleo de la proteína Tv-PSP1 en <i>T. vaginalis</i> .....	71
Figura 24. Localización en hidrogenosomas de la proteína Tv-PSP1 en <i>T. vaginalis</i> .....	72
Figura 25. Localización celular de la proteína Tv-PSP1 en <i>T. vaginalis</i> .....	73
Figura 26. Análisis comparativo de los interactomas predichos de EhL-PSP y Tv-PSP1 utilizando el programa STRING.....	76

Figura 27. Mapa del interactoma de Tv-PSP1 utilizando la base de datos STRING..	77
Figura 28. Estabilidad de la estructura cuaternaria de la proteína Tv-PSP1.....	80
Figura 29. Ensayo de degradación de ARN total.....	81
Figura 30. Estructuras secundarias predichas ERE e IRE de <i>T. vaginalis</i> .....	82
Figura 31. Ensayo de degradación de IRE y ERE de <i>T. vaginalis</i> .....	83
Figura 32. Análisis de la estructura secundaria y cuaternaria de la proteína Tv-PSP1 en presencia de Mg <sup>2+</sup> .....	84
Figura 33. Fluorescencia intrínseca de la proteína Tv-PSP1 y estructuras tallo y burbuja de ARNm de <i>T. vaginalis</i> .....	85
Figura 34. Acoplamiento molecular de Tv-PSP1 y la estructura IRE.....	87
Figura 35. Aminoácidos de TvL-PSP que interaccionan con la secuencia IRE.....	88
Figura 36. Potencial electrostático del homotrímero de Tv-PSP1.....	89

## Resumen

Los miembros de la familia de proteínas YER057c/YJGF, o proteínas solubles en ácido perclórico (PSP), se han descrito en 23 especies, incluidas arqueobacterias, procariontes y eucariontes. Las secuencias entre ellas se encuentran muy conservadas, es por ello que se cree que podrían estar participando en procesos celulares básicos. El objetivo de este trabajo fue la caracterización de una proteína soluble en ácido perclórico (PSP) denominada *Tv-PSP1* de *T. vaginalis*. El análisis de etiquetas de secuencias expresadas (EST) del gen que codifica para la proteína *Tv-PSP1* muestra que se expresa en el parásito en condiciones de cultivo normal. Utilizando anticuerpos policlonales contra la proteína *Tv-PSP1* recombinante (*rTv-PSP1*) en extractos totales de proteínas de *T. vaginalis*, analizados en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE), se reconoció una sola banda con un peso molecular de 13.5 kDa. Cuando estos extractos fueron analizados en condiciones nativas (PAGE sin SDS y 2-mercaptoetanol) se observó una banda de peso molecular alto, que corresponde a la estructura homotrimérica de *Tv-PSP1* con un peso molecular de 40.5 kDa. La estructura secundaria mostró que presenta un 38% de  $\alpha$ -hélice y 14% de láminas  $\beta$ ; esto se determinó mediante dispersión dinámica de luz, cromatografía de exclusión molecular y dicroísmo circular. Ensayos de dinámica molecular durante 100 nanosegundos permitieron determinar que la estructura homotrimérica es estable, utilizando microscopía electrónica de transmisión se localizó a la proteína *Tv-PSP1* en el núcleo, citoplasma e hidrogenosomas de *T. vaginalis*. Para determinar la posible función de la proteína *Tv-PSP1* se realizó un análisis *in silico* en busca del posible interactoma utilizando la base de datos STRING, la cual mostró interacciones con proteínas de unión a ARN. Mediante ensayos de inmunoprecipitación se logró identificar su interacción con una proteína con motivos de unión a ARN. Ensayos de degradación de ARN demostraron que la proteína *Tv-PSP1* es capaz de degradar parcialmente el ARN, lo que sugiere una posible función de ribonucleasa. Esta proteína podría presentar especificidad a nivel de estructura tallo y burbuja, ya que mediante ensayos de EMSA fue capaz de reconocer secuencias de ARN tipo ERE e IRE del 3'UTR de RNAm; esta interacción se analizó con estudios de acoplamiento molecular.

## Abstract.

The members of the YER057c / YJGF family of proteins, or perchloric acid soluble proteins (PSP), have been described in 23 species in archaeobacteria, prokaryotes and eukaryotes, are highly conserved, and can participate in key cellular processes. The goal of this work was the characterization of a perchloric acid soluble protein (PSP) for Tv-PSP1 of *T. vaginalis*. The gene coding for this protein is expressed under normal culture conditions according to expressed sequence tags (ESTs) analysis. Polyclonal antibodies against the recombinant Tv-PSP1 protein (rTv-PSP1) in total proteins from *T. vaginalis* analyzed under denaturing conditions (SDS-PAGE) recognized a single band with a molecular weight of 13.5 kDa. When total proteins were analyzed under native conditions (PAGE without SDS and 2-mercaptoethanol), a high molecular weight band was observed, corresponding to the homotrimeric structure of Tv-PSP1 with a molecular weight of 40.5 kDa. The secondary structure has a composition of 38%  $\alpha$ -helix and 14%  $\beta$  sheets; this was determined by dynamic light scattering, size exclusion chromatography and circular dichroism spectroscopy. Tests of molecular dynamics during 100 nanoseconds determined that the homotrimeric structure is stable, using transmission electron microscopy located in the Tv-PSP1 protein in the nucleus, cytoplasm and hydrogenosomes of *T. vaginalis*. To determine the possible function, an *in silico* analysis was performed in search of the possible interactome of Tv-PSP1 from the STRING database, which is related to the interactions with the RNA binding proteins. Immunoprecipitation assays identify its interaction with a protein with RNA-binding motifs. RNA degradation assays show that the Tv-PSP1 protein is able to partially degrade RNA, which represents a possible function of ribonuclease. This protein might show specificity at the structure and bubble level, given that according to the EMSA assay it was able to recognize sequences of RNA type ERE and IRE of the 3'UTR of mRNA; this interaction was analyzed with molecular docking studies.

## 1.Introducción

### 1.1 Tricomoniasis

La tricomoniasis es una infección que se adquiere por transmisión sexual, afectando tanto a hombres como a mujeres, siendo prevalente en poblaciones sexualmente activas (Swapan and Sanjay 2007). Esta infección es causada por el parásito protozoo *Trichomonas vaginalis*. En mujeres se ha encontrado que infecta la vagina y la uretra, mientras que en hombres afecta uretra, próstata y epidídimo. El periodo de incubación que se ha reportado es de 4 a 28 días (Fig. 1) (Petrin, Delgaty et al. 1998). La tricomoniasis se transmite exclusivamente por coito vaginal, aunque también se ha reportado la trasmisión vertical madre-hijo(a), la cual puede ser transmitida cuando los neonatos pasan por el canal de parto, presentando implicaciones médicas en los recién nacidos como infecciones respiratorias; sin embargo, no es grave y no requiere tratamiento (Temesvári, Kerekes et al. 2002; Carter and Whithaus 2008)

Los factores de riesgo para adquirir a *T. vaginalis* son: múltiples compañeros sexuales, coexistencia con otros agentes infecciosos de enfermedades de transmisión sexual y no usar anticonceptivos de barrera como el condón.

En las mujeres los síntomas se pueden desarrollar a partir de 4 a 30 días después del contagio (Cadena, Miranda et al. 2006). Los factores del huésped como el pH vaginal, los niveles hormonales, la integridad de la flora vaginal normal y la sangre durante el periodo menstrual, parecen desempeñar un papel importante en el desarrollo de los síntomas (Reece and Hobbins 2010). El pH óptimo para *T. vaginalis* se encuentra entre 5.5 y 6, mientras que el pH normal de la vagina es de 3.5-5, por lo tanto, para que se desarrolle la tricomoniasis se debe alcalinizar el pH de la vagina (Baruch, 2014).

En la mujer los síntomas y signos frecuentes son leucorrea, vulvitis y prurito, disuria y dispareunia (Allsworth, et al. 2009). La leucorrea puede ser de carácter purulenta o espumosa, tener color amarillento, verde o gris y olor fétido. El signo característico de la tricomoniasis son lesiones hemorrágicas puntuales, conocidas como “cérvix de fresa” (Petrin, et al. 1998); asimismo, el prurito vulvar, el ardor y la

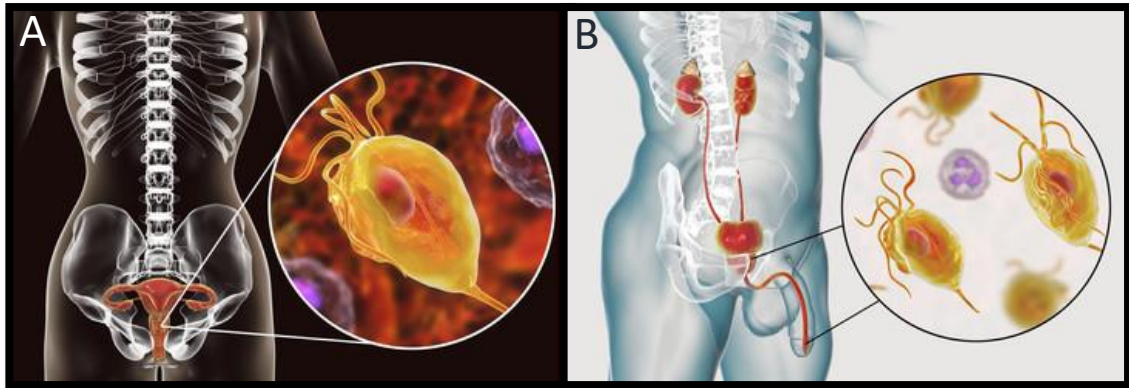
irritación genital dolorosa pueden llegar a provocar intensa dispareunia, mientras que la vulvitis provoca intenso dolor (Apt Baruch 2014).

La tricomoniasis puede presentar consecuencias tales como: vaginitis, cervicitis, uretritis e inflamación pélvica crónica (Hardy, et al.1984), infertilidad (Gimenes, Souza et al. 2014), así como una predisposición al desarrollo de cáncer cervical (Boyle et al. 2003) debido a la capacidad del parásito para inducir la supresión de las células CD4, así como la destrucción del epitelio vaginal, lo cual permite y/o favorece el establecimiento y replicación del virus del papiloma humano y su replicación (Mason and Gwanzura 1990); estos eventos también ponen en riesgo la transmisión y adquisición del VIH, facilitando el acceso del virus de inmunodeficiencia humana e induciendo su replicación a través de las vías de citocinas como TNF- $\alpha$  (Guenthner et al. 2005).

La presencia del parásito en mujeres embarazadas se relaciona con el aumento de la probabilidad de que se presente la ruptura de la membranas amnióticas hasta en un 30%, pudiendo ocasionar partos prematuros (Schwebke and Burgess 2004) y aumentando en un 40% la posibilidad de tener un infante prematuro de bajo peso (Mandell et al. 2006).

En el caso del hombre la sintomatología se encuentra menos caracterizada, ya que alrededor del 60% suelen ser asintomáticos; por lo que se considera que el varón es el portador de *T. vaginalis*. La prevalencia de tricomoniasis masculina varía de acuerdo con la población y el método de diagnóstico utilizado. Si bien esta infección puede eliminarse en un lapso de 2 semanas o autolimitarse (Borchardt et al. 1995), la detección de la infección puede ser más difícil. El parásito al establecerse en el tracto urogenital puede ocasionar inflamación en el meato uretral con prurito, sensación de ardor después de orinar o eyacular y uretritis nongonococal. Si la infección no se cura, puede producir prostatitis o epididimitis, así como predisposición a desarrollar cáncer de próstata (Krieger, et al. 1993; Swygard, et al. 2004; Sutcliffe, et al. 2006), esto debido a que *T. vaginalis* daña las células epiteliales, provocando así la renovación celular, misma que es mediada por factores de crecimiento para regular la inflamación al regular la expresión de genes pro-inflamatorios; si este proceso no se controla, puede llevar a la hiperproliferación de las células prostáticas. *T. vaginalis* también puede regular la expresión de genes anti-apoptóticos y evitar la apoptosis en las

células dañadas; lo anterior podría llevar a lesiones precursoras de cáncer de próstata (Sutcliffe, et al. 2006). Adicionalmente, *T. vaginalis* se ha asociado a la disminución de la movilidad y viabilidad del espermatozoide, provocando problemas de infertilidad (Ochsendorf, 2008).



**Figura 1 Tricomoniasis.** Infección de transmisión sexual causada por el parásito *T. vaginalis*. (istockphoto.com) (A) sistema reproductivo femenino y el parásito *T. vaginalis*. (B) sistema reproductivo masculino y el parásito *T. vaginalis*.

## 1.2 Diagnóstico de la tricomoniasis

La confirmación diagnóstica de la tricomoniasis se realiza mediante técnicas directas e indirectas; la sensibilidad dependerá del número de parásitos y del método de diagnóstico utilizado. El diagnóstico a través del examen de Papanicolaou puede tener hasta un 20% de falsos positivos, debido a que los métodos por tinción pueden confundir a *T. vaginalis* con leucocitos (Perl., 1972). En la secreción vaginal uretral y prostática puede ser identificados de manera rápida los organismos móviles, aun cuando su ejecución es fácil y de bajo costo, es poco sensible y sólo se detecta del 50 a 70% de los casos, debido a que este método de detección depende de la experiencia del microscopista (Heine and McGregor 1993), así como las condiciones de transporte y procesamiento (Draper, et al. 1993, Krieger, et al.1988), por lo tanto un mal manejo de las muestras podría alterar el diagnóstico.

Una técnica mucho más sensible y costosa es el cultivo del parásito, es considerado el estándar de oro, con una sensibilidad del entre el 97 y 98% y una especificidad del 95%; sin embargo, presenta ciertas desventajas, como requerir un

número mínimo de parásitos para poder observar el crecimiento, así como un lapso de incubación de 2 a 7 días (Garber, et al. 1987). Existen dispositivos como el InPouch (Biomed Diagnostic) que facilitan la eficiencia de este método con una mayor sensibilidad (30-80%) en el examen de secreciones vaginales en fresco (Levi, et al. 1997).

Inmunofluorescencia indirecta (IFD), es una técnica útil para casos con baja cantidad de parásitos, puesto que únicamente requiere de 300 parásitos por mililitro para ser detectados y presenta una sensibilidad del 80% (Apt Baruch 2014).

La reacción en cadena de polimerasa (PCR) (Hobbs, et al. 1999) es una reacción específica (100%) y sensible (96%); los genes del parásito que se amplifican con esta técnica son  $\beta$ -*Tubulina*, con un fragmento de 112 pb, y *ap65*, con un producto de 209 pb (Madico, et al. 1998).

AFFIRM™ VPIII es una prueba para la detección de especies como *Candida spp*, *Gardnerella vaginalis* y *T. vaginalis* para pacientes con vaginitis mediante el uso de secuencias complementarias de ADN, las cuales se unen a las secuencias de ácidos nucleicos del organismo causante de la infección; esta unión da como resultado una reacción colorimétrica que permite la identificación de estos patógenos de manera cómoda, rápida, confiable y sencilla, la cual es hasta 30% más sensible que la microscopía y se puede utilizar tanto en un laboratorio clínico como en el consultorio médico (Flores-Paz y col., 2008). Métodos indirectos o serológicos incluyen la prueba de ELISA (Ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas) basada en la búsqueda y detección de anticuerpos tipo IgG, IgM, e IgA, en mujeres infectadas; sin embargo, estas pruebas tienen una sensibilidad baja y una especificidad no subóptima para la detección de una infección activa por *T. vaginalis* (Unemo y col. 2014).

### 1.3 Tratamiento de la tricomoniasis

La tricomoniasis es curable y en la mayoría de los casos es tratada con metronidazol, sin embargo, no siempre se resuelve fácilmente, debido principalmente a la falta de disciplina del paciente o que la pareja no se trate, aunque también se han reportado casos de resistencia al metronidazol. El tratamiento consiste en una sola dosis por vía oral, lográndose la cura mediante este régimen en un 82 a 88% de los

casos, aumentando hasta un 95% cuando también se trata a la pareja; sin embargo, actualmente existe la posibilidad de que se presente resistencia relativa al metronidazol, en cuyo caso lo recomendable es que se trate con una dosis mayor (500mg) dos veces por día durante una semana; si a pesar de ello la infección persiste, se trata con una dosis de 2 g una vez por día durante 3 a 5 días (Reece and Hobbins 2010). Este tratamiento puede presentar algunas reacciones adversas menores, como náuseas, aunque la mayor parte de los pacientes suelen tolerar el tratamiento y la alergia al metronidazol es poco frecuente (Mandell, et al. 2006). Para pacientes que no toleran una dosis tan elevada o no responden al tratamiento, existe la opción de tomar tinidazol con una sola dosis de 2g por vía oral (Reece and Hobbins 2010). Este fármaco posee una mejor eficacia *in vitro*, es mejor tolerado y ha resuelto la mayor parte de los casos resistentes a metronidazol. Desafortunadamente, existen pocas alternativas con beneficio probado para pacientes resistentes al tinidazol y metronidazol, siendo la más conocida el nonoxidol-9.

El Metronidazol es un tricomonocida de acción directa, el proceso de acción del metronidazol implica la reducción del grupo nitro a un intermediario transitorio tóxico, los metabolitos reducidos del metronidazol intervienen en la síntesis de ácidos nucleicos, pudiendo causar la muerte celular del organismo (Dunne, et al. 2003).

La importancia del hidrogenosoma en el modo de acción de los fármacos tricomonocidas viene determinada por el hecho de que no son por sí mismos tóxicos para el parásito, pero son activados por nitrorreducción a derivados tóxicos de vida media corta, los electrones para esta reducción se originan de la oxidación por el piruvato Oxidoreductasa (PFO) y son transferidos vía ferredoxina (Fd) al grupo nitro del fármaco. La resistencia al metronidazol en *T. vaginalis* se ha relacionado con deficiencias en el funcionamiento del hidrogenosoma, principalmente por la ineficiencia de la actividad de enzimas como la PFO (Vázquez, et al. 2001), y una mutación en la región 5'UTR del gen de la enzima Fd.

Las infecciones recurrentes son comunes, entre un 5 y 31% de las posibles causas de estas infecciones repetitivas podrían ser: la reinfección de una pareja sin tratar, la infección de una nueva pareja, o bien, que el tratamiento no haya resultado efectivo.

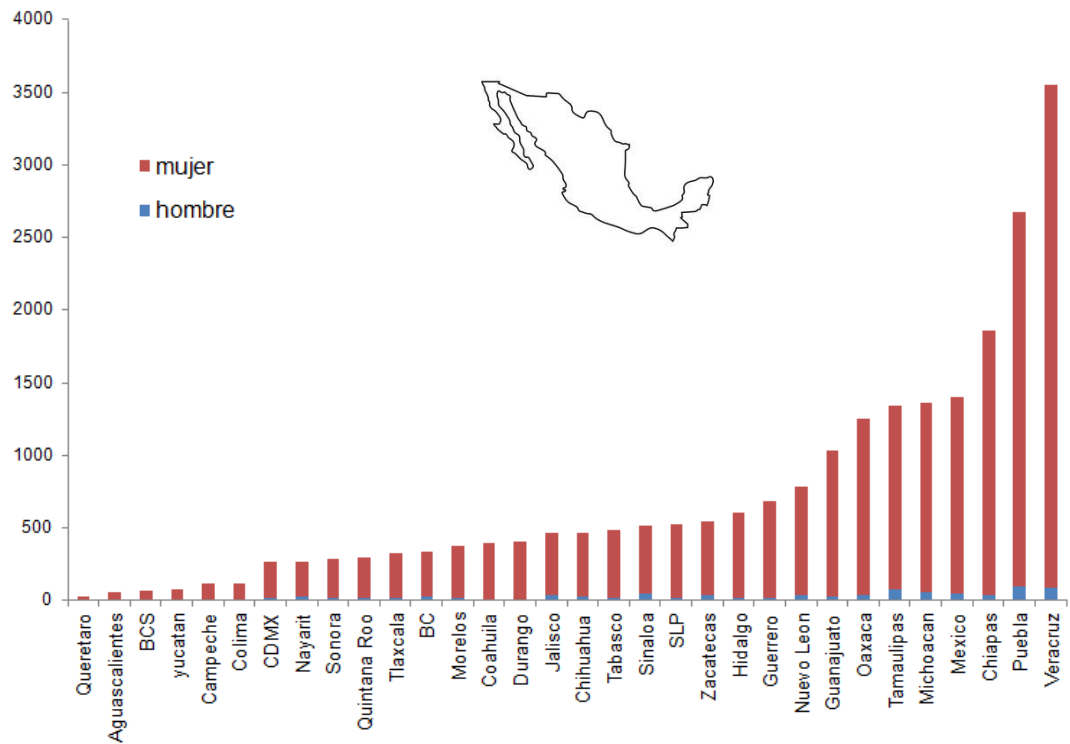
## 1.4 Epidemiología

Cada día más de 1 millón de personas contraen una infección de transmisión sexual (ITS). Se estima que, anualmente, unos 357 millones de personas contraen alguna ITS de los cuales 143 millones son por tricomoniasis, siendo responsable de hasta del 40% de las ITS (WHO, 2019). En México durante el 2018 se reportaron alrededor de 42, 603 casos; 1,754 en hombres y 40,849 en mujeres, y hasta la semana 15 del 2019 se han reportaron 11,480 casos, 479 y 11,001 en hombres y mujeres respectivamente; sin embargo, estos datos bien podrían no corresponder a la realidad, ya que la enfermedad no es de reporte obligatorio y, como se mencionó anteriormente, puede tener muchos hospederos asintomáticos.

De manera general esta infección afecta en mayor número a mujeres; en México este grupo está representando en promedio por el 97% de los casos reportados y el resto (3%) es representado por los hombres. Es importante recordar que este bajo porcentaje se debe a su característica de asintomáticos.

Entre el 13-50% de mujeres que consultan al ginecólogo presentan *T. vaginalis*; en aquellas que son aparentemente sanas, el parásito se observa entre 2 y 25%. La mayor frecuencia la presentan las mujeres sexualmente activas entre los 20-50 años, siendo más prevalente en mujeres con múltiples parejas.

El estado de Veracruz presenta el mayor número de casos reportados en México, seguido de Puebla y Chiapas. Por otro lado, los estados con menor incidencia reportada son Querétaro, Aguascalientes y Baja California Sur, encontrándose la Ciudad de México en el lugar 26 (Fig. 2).



**Figura 2. Casos por entidad federativa de tricomoniasis.** Número de casos de tricomoniasis reportados por entidad durante el 2018 (<https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/425972/sem52.pdf>)

### 1.5 Parásito *T. vaginalis*

*T. vaginalis* ha sido ampliamente estudiado, morfológicamente es alargado y ovoide de 7 a 20 µm, en cultivo axénico, pero cambia a una forma ameboide cuando se encuentra unido a células del epitelio vaginal (Petrin et al. 1998).

El núcleo está localizado en la porción anterior del cuerpo: es grande y ovoide con cromatina uniforme y se encuentra envuelto por una membrana porosa. Presenta una estructura central rígida y delgada denominada axostilo, nace bajo el núcleo y sale por la región posterior, cruzando el cuerpo del parásito terminando en una espícula.

*T. vaginalis* tiene cinco flagelos, de los cuales cuatro se encuentran en la parte posterior del cuerpo y uno de ellos está adosado a la membrana ondulante con un extremo libre. La membrana ondulante se conecta al cuerpo basal del flagelo

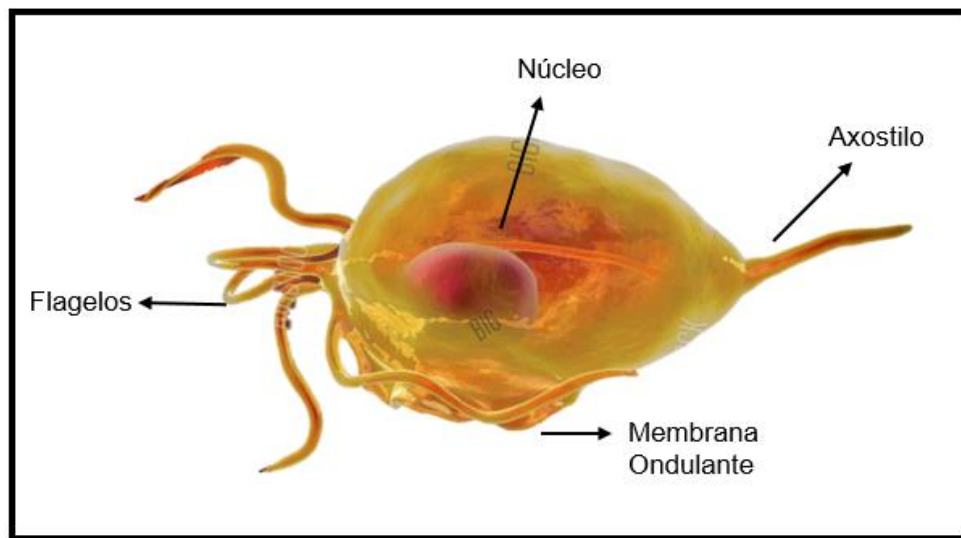
recurrente y es una característica distintiva de la familia *Trichomonadidae*. Los flagelos y la membrana ondulante le dan la característica de movimiento (Fig. 3).

El parásito es capaz de cambiar de morfología, pasando de una célula ovoide a presentar una ameboide, siendo el citoesqueleto parte importante para que se presente este cambio, compuesto de  $\alpha$ -actina,  $\alpha$  y  $\beta$  tubulina, centrina, formina y profilina, implica una remodelación de la actina, la cual está mediada por una proteína de la familia de las fimbrinas, la presencia de la proteína TvFim1, aumenta la velocidad de proliferación en el ensamble de la actina en la conformación flagelada. Esta proteína cambia su localización junto con la actina cuando se presenta el cambio conformacional ameboide (Kusdian, 2013).

En el citoplasma del parásito se encuentra un gran número de vacuolas (incluyendo liposomas), relacionadas con procesos de endocitosis, digestión y transporte, son protozoos microaerófilos, carentes de mitocondrias y peroxisomas. Se alimentan mediante procesos de pinocitosis y fagocitosis, que tienen lugar preferentemente en la región posterior de la célula, formando vacuolas de distintos tamaños.

Los orgánulos implicados en el metabolismo energético son los hidrogenosomas los cuales se encuentran en gran cantidad dentro del parásito, están evolutivamente relacionados con las mitocondrias, tienen una forma esférica o ligeramente alargada, con un tamaño que oscila entre 0,2 a 1  $\mu\text{m}$  de diámetro, aunque en condiciones de estrés como un tratamiento farmacológico, pueden llegar a duplicar su tamaño.

El hidrogenosoma es el responsable de la formación de ATP mediante la oxidación del piruvato y el malato en condiciones anaeróbicas. Los hidratos de carbono son la principal fuente de ATP, comenzando su metabolismo en el citosol, donde se lleva a cabo la glicolisis. Este organelo carece de ácido desoxirribonucleico (DNA), tiene tres gránulos cromáticos y genera ATP a través de la vía enzimática de la PFO.



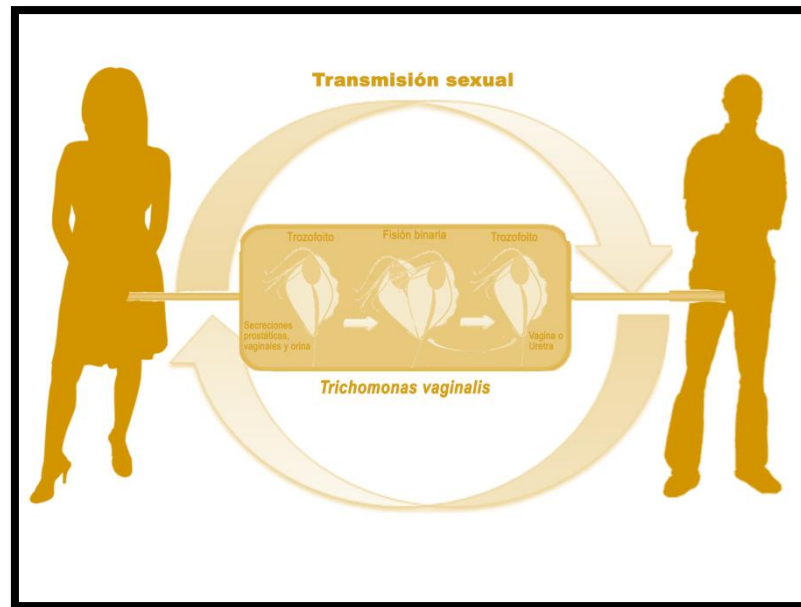
**Figura 3. *Trichomonas vaginalis*.** En la figura se muestran las estructuras presentes en el parásito *T. vaginalis*.

### 1.6 Ciclo de vida de *T. vaginalis*

*T. vaginalis* presenta únicamente una forma denominada trofozoíto, no existe forma de resistencia o quiste, aunque se han descrito formas redondeadas en ambientes desfavorables; estas formas pseudoquisticas se observan como organismos esféricos e inmóviles caracterizados por la internalización de flagelos y membrana ondulante; sin embargo, este estado es reversible en cuanto el parásito vuelve a encontrarse en un medio adecuado (Pereira-Neves, et al., 2003).

No existen formas libres de este microorganismo, no tiene huéspedes intermedios ni vectores, el humano es su único huésped, la transmisión es de persona a persona, y sólo se transmite por contacto sexual. El transporte del parásito ocurre entre las mucosas en el acto sexual, mediante las secreciones involucradas, como el flujo vaginal, el líquido pre-seminal y el semen. En la infección el parásito se establece en el lumen y superficie mucosa de los tractos urogenitales de humano (Fig. 4). Los trofozoítos son muy susceptibles a la desecación, por lo que se mueren al estar fuera del cuerpo humano.

Este parásito tiene una reproducción asexual por división binaria longitudinal, esto significa que duplica todos sus componentes y genera dos células idénticas (Schwebke and Burgess 2004).



**Figura 4. Ciclo de vida de *T. vaginalis*.** El parásito habita en el tracto urogenital femenino, así como en la uretra y próstata masculinas, su transmisión es por contacto sexual. Se replica mediante mecanismos de división binaria.

### 1.7 Genoma de *T. vaginalis*

En el 2007 se reportó la secuencia del genoma de *T. vaginalis* constituido aproximadamente de 160 MB el cual se organiza en seis cromosomas, en comparación con genomas de parásitos como *Entamoeba* (20Mb), *Plasmodium* (25 Mb), y *Toxoplasma* (63 Mb), el genoma de *T. vaginalis* es más grande debido a la gran cantidad de elementos transponibles, los cuales comprenden entre un cuarto a un tercio del genoma total (Conrad et al. 2012), además *T. vaginalis* presenta secuencias repetitivas que abarcan hasta el 65% del genoma.

Así mismo se han determinado ~60,000 genes que codifican para proteínas, así como ARN de transferencia (ARNt) que codifican para los 20 aminoácidos, 60 genes presentan intrones, lo que sugiere que *T. vaginalis* es capaz de realizar “splicing”; además, existen secuencias conservadas en el 5' y 3' de los intrones, mismos que sirven como blanco para el complejo ribonucleoproteico que conforma el “splicesoma” (Tabla 1) (Carlton et al. 2007)

El promotor *Inr* es la secuencia promotora más abundante en la región no traducida (UTR) 5' de ~75% de las secuencias de los genes; cabe resaltar que en *T.*

*vaginalis*, no se ha encontrado una secuencia TATA para el inicio de la transcripción. Se encontró la presencia de genes que codifican para proteínas tipo Dicer y Argonauta, así como 41 genes helicasa transcripcionalmente activos, sugiriendo la posible existencia de la vía de RNA de interferencia (RNAi) (Carlton, Hirt et al. 2007).

La presencia de RNAm con cap implica la existencia de la RNA polimerasa II, al ser esta necesaria en el procesamiento del capping al inicio de la transcripción. La RNA polimerasa II de *T. vaginalis* participa en la transcripción de varios genes en tricomonas (Liston and Johnson 1999). También ha sido descrita la RNA pol III, encargada de transcribir el gen que codifica para el rRNA 5Sr (Torres-Machorro et al. 2006).

El genoma de *T. vaginalis* presenta muchas secuencias repetidas; una posible explicación a este fenómeno es la hipótesis de que el parásito se sometió a un cuello de botella poblacional durante su adaptación al tracto urogenital, lo cual dio como resultado la acumulación, expansión y fijación del gran número de copias repetidas.

Los elementos repetidos constituyen ~39 Mb del genoma clasificados como 1) similar a virus, 2) tipo transposón y 3) retrotransposones y no clasificados; estos últimos presentan en promedio ~2.5% de polimorfismos.

Tabla 1- Características del Genoma de *T. vaginalis*.

<b>CARACTERÍSTICA</b>	<b>DATOS</b>
<i>Tamaño</i>	160Mb
<i>Número de cromosomas</i>	6
<i>Porcentaje de G+C</i>	32.7%
<i>Genes predichos</i>	59,681
<i>Genes/ Genes con intrones</i>	25,949/65
<i>Porcentaje de secuencias repetidas</i>	65%
<i>Genes para tRNA</i>	479

### 1.8 Propiedades y factores de virulencia

*T. vaginalis* se expone a diferentes factores medio ambientales, por lo que modula la expresión de sus genes, incluyendo aquellos que codifican para diferentes factores de virulencia; la expresión de estos es lo que le permite al parásito realizar una colonización exitosa en el hospedero. Los diversos mecanismos incluyen la unión

y degradación de la mucosa y componentes de la matriz extracelular (ECM), la adherencia a las células del epitelio vaginal (VECs), así como la citotoxicidad, fagocitosis.

Uno de los procesos iniciales requeridos para el establecimiento de la infección a través de la interacción parásito-hospedero es la adhesión. El parásito sufre un cambio morfológico rápido a una forma ameboide tras el contacto con las VECs, incrementando el área de adhesión, esta transformación induce la síntesis de diversos factores entre los que destacan proteínas de superficie como glicoconjugados, proteínas de citoesqueleto y adhesinas (AP). Estas AP destacan por la diversidad funcional que presentan, co-localizándose en el hidrogenosoma donde desarrollan diversos papeles enzimáticos o pudiéndose expresar en la superficie del parásito (Tabla 2) participando en el proceso de interacción con el hospedero.

Tabla 2 Función enzimática de proteínas de adhesión.

<b>Proteína</b>	<b>Función enzimática</b>
AP120	Piruvato: ferredoxina oxidoreductas (PFOR)
AP65	Enzima málica
AP51	Subunidad $\beta$ de la Succinil coenzima A sintetasa (SCS)
AP33	Subunidad $\alpha$ de la SCS

En el proceso de adhesión intervienen otras biomoléculas, como lipofosfoglicano (LPG) que participa en la interacción del parásito con las células VECs vía unión de galectina-1, la cual es importante para la adherencia del parásito, citotoxicidad y la transformación de trofozoítos ovoides a ameboides (Hirt, 2011).

Dos cisteín-proteinasas (CPs) están involucradas en la adhesión CP30 (Mendoza-López y col. 2000) y CP62 (Hernandez-Gutierrez, et al. 2004).

Una vez que se da la interacción del parásito con el hospedero se desencadena una serie de eventos que promueven la citólisis de las células blanco mediante mecanismos de citotoxicidad que involucran diversas moléculas como porinas, fosfolipasas y proteínas de superficie.

La fagocitosis es otra propiedad que presenta *T. vaginalis*; este proceso se encuentra estrechamente relacionado con la obtención de nutrientes y con la evasión del sistema inmune. Mediante microscopía electrónica se ha podido confirmar la capacidad de *T. vaginalis* para fagocitar VECs, lactobacilos, leucocitos, eritrocitos y

levaduras. Las células son degradadas en vacuolas fagocíticas gracias a la actividad de fosfatasa activa en las fagolisosomas y el aparato de Golgi (Rendón-Maldonado, et al. 1998).

Este proceso puede producirse mediante dos mecanismos distintos: a través de la generación de pseudópodos que rodean e internalizan a la célula diana o bien mediante procesos de succión causando la elongación de la membrana plasmática de la célula diana y su posterior internalización a través de un canal endocítico estrecho (Rendón-Maldonado, et al. 1998; Pereira-Neves and Benchimol, 2007; Midlej and Benchimol, 2010).

La ingestión de levaduras y bacterias ocasiona un aumento del pH vaginal generando un microambiente favorable para el crecimiento y multiplicación de este parásito y, al mismo tiempo, una disminución de la flora endógena, que actúa como mecanismo de protección de la mujer frente a la colonización de patógenos. Desde un punto de vista evolutivo, la fagocitosis de bacterias de la microbiota podría explicar la adquisición de genes bacterianos a través de una transferencia lateral (Lateral Gene Transfer o LGT). Esto justificaría la presencia de enzimas en este parásito con funciones esenciales en la colonización de la mucosa que presentan origen bacteriano (Hirt, 2013); como la familia de las BspA (Nöel et al., 2010), entre otras.

La evasión del sistema inmune mediante la degradación de inmunoglobulinas (Igs) IgA, IgG e IgM (Provenzano, et al., 1995) también se ve favorecida por la fagocitosis de los leucocitos (Rendon-Maldonado et al., 1998),

La actividad  $\beta$ -hemolítica de *T. vaginalis* está descrita como un proceso de virulencia del parásito (Krieger et al. 1981), los eritrocitos son fuente de ácidos grasos y hierro para el parásito (Petrin et al., 1998), permitiendo la regulación de numerosos genes (Lehker et al. 1991) y factores ligados a la patogenia. En la hemólisis podrían estar involucradas moléculas como CPs, proteínas formadoras de poros y posiblemente un factor hemolítico denominado TvLIP (triacilglicerol lipasa). Asimismo, se han predicho doce proteínas de una familia formadora de poros denominada SAPLIP (saposin-like), se ha identificado la presencia de fosfolipasas A1 y A2 con actividad lítica, que contribuyen al desarrollo del proceso inflamatorio (Lubick and Burgess, 2004) y a la actividad hemolítica (Vargas-Villarreal et al., 2005).

La apoptosis es otro posible mecanismo, mediado por la unión a neutrófilos de humano y VECs a través de un incremento en la actividad de la caspasa-3 (Kang y col., 2006), y CPs de alrededor de 30 kDa CP2, CP3, CP4 y CPT.

Las moléculas que se han descrito que participan en estos mecanismos se muestran en la siguiente tabla:

Tabla 3. Proteínas involucradas en propiedades de virulencia de *T. vaginalis*.

<b>Propiedad</b>	<b>Proteínas involucradas en el mecanismo</b>
<i>Citoadherencia</i>	AP65, AP51, AP33, AP23, AP120, CP30, CP62, TvLPG Tv-GAPDH, Tv-ENO-1
<i>Citotoxicidad</i>	TvCP12, TvCP39, TvCP65, TvMP50,
<i>Hemólisis</i>	TvLIP, SAPLIP (saposin-like)
<i>Apoptosis</i>	CP2, CP3, CP4, CPT
<i>Evasión de la respuesta inmune</i>	CP60, P270, P230

Muchos de estos genes y sus productos proteicos se encuentran regulados por las condiciones medio ambientales a las que se expone el parásito como altas o bajas concentraciones de cationes entre los que se encuentran el hierro, las poliaminas o el zinc, por lo que la regulación génica tiene un papel importante en cada uno de estos procesos.

### 1.9 Regulación génica

La regulación de la expresión de los genes es fundamental en la célula; es el resultado de varios mecanismos complejos iniciados en el núcleo y finalizados en el citoplasma, donde la célula responde a estímulos medio ambientales o propios de su desarrollo. Esta respuesta y la regulación se puede dar en diferentes niveles: durante la transcripción, durante el procesamiento de maduración del ARN mensajero (ARNm) o en el transporte del ARNm del núcleo al citoplasma. Estos mecanismos determinan la localización subcelular, eficiencia de la traducción y degradación del ARNm, lo que se refleja en la vida media de los ARNm, que puede ser desde unos minutos, hasta más de 24hrs (Tourrière et al., 2002). Es importante resaltar que los mecanismos de estabilidad de los ARNm son el punto clave en la expresión de los genes, reflejándose

en la cantidad de proteína que se produce, la mayoría de estos procesos requieren del reconocimiento de secuencias específicas o de estructuras reguladoras en la molécula de ARN (Alberts, 2002).

Se han descrito tres procesos de regulación durante la transcripción del ARNm: la adición de metilguanosa en el extremo 5' (capping), la remoción de los intrones (splicing) y corte/poliadenilación de la región 3' no traducida (3'UTR) (Lopez-Camarillo, et al., 2010) la adición de una cola de poli A. Cada uno de estos procesos se encuentra regulado por proteínas, así como por la presencia de determinadas secuencias en los extremos UTR de los ARNm, la unión de las proteínas involucradas en estos procesos juega un papel fundamental para evitar la degradación o favorecer la estabilidad de los ARNm; dichos procesos ocurrirán dependiendo de las necesidades de la célula para sobrevivir al ambiente en el que se encuentre (Dreyfuss, et al., 2002, Tourrière, et al., 2002).

*T. vaginalis* obtiene diferentes cationes de su hospedero, mismos que juegan un papel importante en la regulación de varios genes en el parásito (Fig. 5). El  $Fe^{2+}$ , regula moléculas que se sobreexpresan en presencia de este catión o genes que se ha reportado se expresan más en ausencia de  $Fe^{2+}$  (Tabla 4), también se ha observado que el parásito es capaz de internalizar los flagelos y el axostilo, desarrollando una morfología de pseudoquiste en ausencia de  $Fe^{2+}$  (de Jesus, et al., 2007).

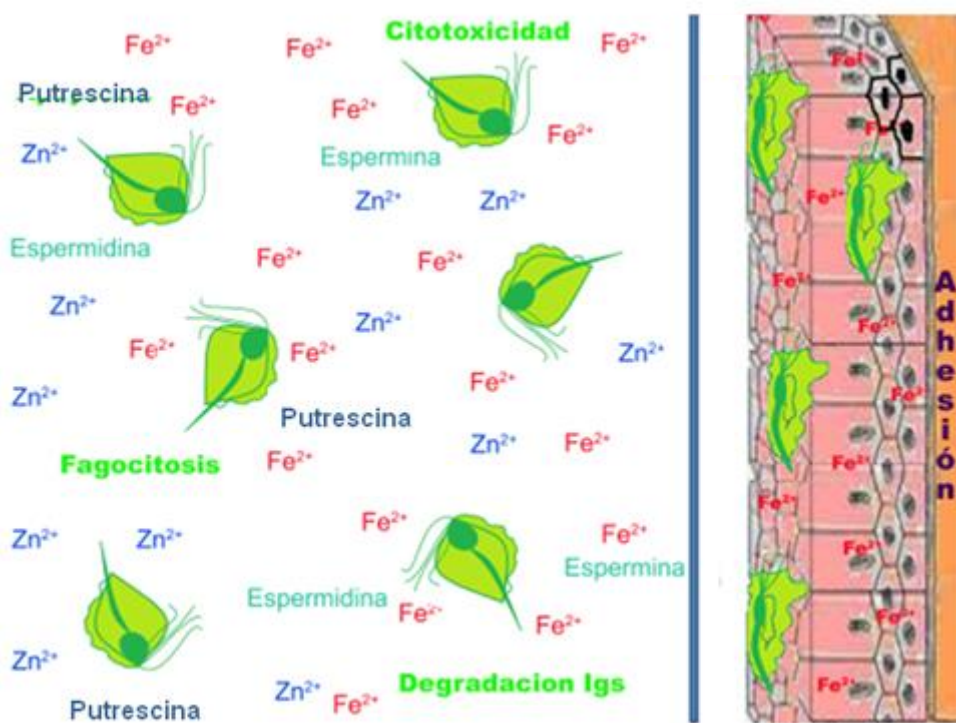
**Tabla 4** Expresión de moléculas en presencia y ausencia de  $Fe^{2+}$ .

<b>Presencia de <math>Fe^{2+}</math></b>	<b>Ausencia de <math>Fe^{2+}</math></b>
<i>AP23, AP33, AP51, AP65 AP120</i> <i>(Alderete, et al. 2004; Moreno-Brito, et al. 2005)</i> <i>TvLEGU1 (Leon-Felix et al. 2004)</i> <i>TvLip (Carvalho et al. 2005),</i> <i>NTPDasa 1, Ecto 5 nucleotidasa</i> <i>(Tasca et al. 2005)</i> <i>TvCP4 (Solano-Gonzalez et al. 2007)</i>	Fibronectina 1 y 2 (Crouch and Alderete 2001) TvCP39 (Hernandez-Gutierrez, et al. 2003) TvCP12 (Leon-Sicairos et al. 2004) TvCP65 (Alvarez-Sanchez et al. 2007).

Un catión que actúa como cofactor de enzimas es el  $Zn^{2+}$ , un organismo eucarionte puede contener hasta un 8.8% proteínas que unen  $Zn^{2+}$  (Andreini et al. 2006; Maret and Li 2009). Durante la interacción de *T. vaginalis* con células prostáticas

DU-145, en presencia de 1.6 mM de  $Zn^{2+}$  o ausencia de éste, cation proteínas como fimbrinas, adenosil-homocisteinasa, cisteín-peptidasa y una metaloproteasa presentan una expresión diferencial (Vazquez-Carrillo, et al., 2011).

Las poliaminas participan en mecanismos de regulación génica, por ejemplo, la proteína TveIF-5A de *T. vaginalis* sufre una modificación postraducciona denominada hipusinación en presencia de estos cationes, generando una proteína madura, la cual puede interaccionar con la estructura tallo y burbuja tipo ERE del 3'UTR del ARNm de la cisteín-proteasa TvCP39, participando en un mecanismo post-traducciona dando estabilidad al ARN mensajero (Carvajal-Gamez, et al., 2016).



**Figura 5. Representación gráfica del medio ambiente de *T. vaginalis*.** La imagen muestra los elementos presentes en el microambiente de la vagina, donde se muestra la presencia de cationes como el  $Zn^{2+}$   $Fe^{2+}$  y poliaminas.

La degradación del ARNm es un proceso importante en la regulación génica, participan proteínas denominadas nucleasas, enzimas que catalizan la degradación de ácidos nucleicos rompiendo los enlaces fosfodiéster, pueden ser específicas para

ADN o ARN; estas enzimas participan en varios procesos fisiológicos en la célula, son expresadas en diferentes tejidos y exhiben especificidades variables contra diferentes sustratos de ADN o ARN, participando en diferentes etapas de procesamiento de estas moléculas.

Aquellas enzimas que se encargan de la hidrólisis del ARN son denominadas ribonucleasas o RNAsas, mismas que presentan diversidad estructural y funcional. Las ribonucleasas están divididas en tres familias, la superfamilia RNAsa A, la familia T1 y la familia T2. Algunos clasifican a las RNAsas de humano como RNAsas secretadas y no secretadas o pancreáticas y no pancreáticas. También pueden dividirse en exonucleasas y endonucleasas, pueden ser muy específicas para secuencias particulares o estructuras. En *T. vaginalis* hasta el momento no se ha descrito de manera estructural o funcional alguna enzima de tipo RNAsa, nosotros previamente identificamos una proteína de la familia de proteínas YER057c/YJGF, cuyo blanco potencial podría ser un ARNm de una proteína que participa en la citotoxicidad del parásito (Villalobos-Osnaya, 2011).

## 2. Antecedentes particulares.

### 2.1 Estructura de las proteínas solubles en ácido perclórico (PSP)

Las miembros de la familia YER057c/YJGF son proteínas solubles en ácido perclórico (PSP) y se encuentran muy conservadas entre sus miembros; muchas de ellas se han cristalizado, y hasta el momento en la base de datos PDB (Protein Data Bank) se han registrado 39 cristales de proteínas pertenecientes a esta familia (Tabla 5).

**Tabla 5.** Códigos de PDB de proteínas cristalizadas de la familia PSP.

<b>Estructura PDB</b>	<b>Organismo</b>
3K0T	<i>Pseudomonas syringae</i>
2B33	<i>Thermotoga marítima</i>
1QD9	<i>Bacillus subtilis</i> YABJ
3IEF	<i>Giardia lamblia</i>

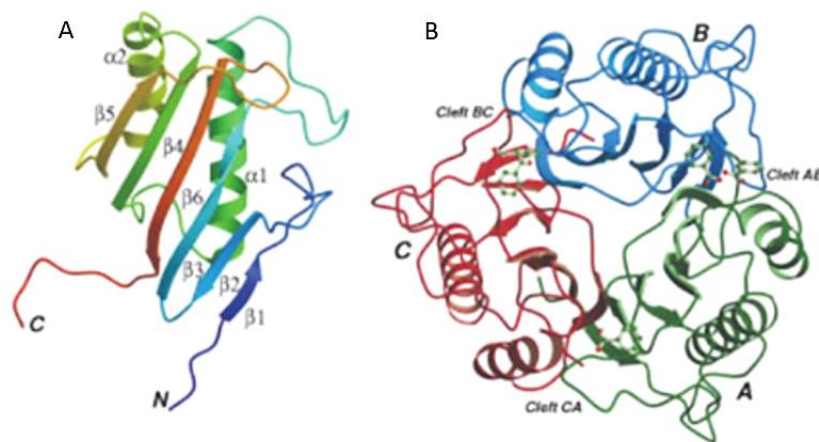
2DYY	<i>Pyrococcus horikoshi</i>
3GTZ	<i>Salmonella typhimurium</i>
2CSL	<i>Thermus thermophilus</i>
2EWC	<i>Streptococcus pyogenes</i>
3D01	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>
1ONI	<i>Homo sapiens</i>
3MIX	<i>Bacillus subtilis</i>
3K12	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
3I7T	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
2IG8	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
3LYB	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
1PF5, 2UYN, 3V4D, 1QU9, 2UYJ, 2UYP	<i>Escherichia coli</i>
1JD1, 3QUW	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
3MQW, 3M1X, 3M4S	<i>Entamoeba histolytica</i>
3KJK	<i>Neisseria meningitidis</i>
1QAH	<i>Rattus norvegicus</i>
3L7Q	<i>Streptococcus mutans</i>
1J7H	<i>Haemophilus influenzae</i>
2CW4	<i>Thermus Thermophilus</i>
1XRG	<i>Clostridium thermocellum</i>
3KJJ	<i>Neisseria meningitidis</i>
2CWJ	<i>Aeropyrum pernix</i>
3LME	<i>Rhodopseudomonas palustris</i>
3VCZ	<i>Vibrio vulnificus</i>
2CVL	<i>Thermus thermophilus</i>
1NQ3	<i>Capra hircus</i>
3R0P	Organismo sin cultivar

La familia YjgF/YER057c/UK114 cuenta con alrededor de 200 miembros, las proteínas de PSP son pequeñas, de aproximadamente 130 aminoácidos (aa). Mediante un alineamiento de 107 secuencias de proteínas tipo PSP se determinó que presentan una identidad >38 % entre ellas, y nueve aminoácidos invariantes P-X<sub>5</sub>-Y-X<sub>13</sub>-G-X<sub>25</sub>-N-X<sub>27</sub>-F-X<sub>3</sub>-N-X<sub>13</sub>-R-X<sub>8</sub>-P-X<sub>5</sub>-E, los cuales se propone podrían estar relacionados con el sitio catalítico (Manjasetty et al. 2004).

Entre las estructuras de los cristales de proteínas se encuentra la proteína Hmf1p de *Saccharomyces cerevisiae*, cuya estructura cuaternaria es un trímero, sus monómeros presentan una estructura tipo  $\alpha/\beta$ , donde cada uno está formado por seis hojas  $\beta$  y dos  $\alpha$ -hélices con un arreglamiento de su estructura secundaria de la siguiente forma: S1-S2-S3-H1-S4-H2-S5-S6 (Deaconescu et al. 2002).

La proteína PSP de humano hp14.5 presenta una estructura homotrimérica, donde cada subunidad consiste en un dominio globular formado por seis hojas  $\beta$  y dos  $\alpha$ -hélices, dispuestas en una orientación casi paralela a las hojas. La disposición de las hojas  $\beta$  es 1-2-3-6-4-5, donde 4 y 5 están en paralelo y las demás antiparalelas (Fig. 6) (Manjasetty et al. 2004).

El cristal de la proteína ST0811 de *Sulfolobus tokodaii* mostró un plegamiento  $\alpha + \beta$ , con un arreglo de  $\beta\beta\beta\alpha\beta\beta$  en un orden semejante al descrito previamente en hp14.5. La estructura trimérica de ST0811 se ha observado en el cristal y en solución, mostrando un radio stock (volumen promedio que ocupa una molécula en la solución) de 27 Å, medida consistente con el máximo de radio stock para una estructura trimérica (28 Å). Asimismo, se observó la estabilidad de esta estructura en la presencia de 5% de ácido perclórico. Se sugirió que la carga positiva que rodea a la proteína en la cavidad que se forma podría atraer al ARN y tener una función de RNAsa, así como se propuso para L-PSP de rata y hp14.5 de humano (Kanouchi et al. 2000, Miyakawa, et al., 2006).



**Figura 6. Estructura del cristal de la proteína hp14.5 de humano.** (A) Se observa la estructura monomérica constituida por seis hojas  $\beta$  y dos  $\alpha$ -hélices (B) Estructura cuaternaria de la proteína constituida por tres subunidades. Tomada de Manjasetty, 2004.

## 2.2 Familia YjgF/YER057c/UK114

Las proteínas PSP, miembros de la familia de proteínas YER057c/YJGF, se han descrito en 23 especies, incluidas arqueobacterias, procariontes y eucariontes,

las secuencias entre ellas se encuentran muy conservadas, es por ello que se cree que podrían estar participando en procesos celulares básicos.

La primera proteína soluble en ácido perclórico que se describió fue en rata; se trata de una proteína de 23 kDa constituida por dos subunidades de 10 kDa y un pI de 4.67. Su secuencia presentó similitudes en la región de 83-90 aa con proteínas de shock térmico de organismos como ratón, humano, mosca de la fruta, levadura, parásitos (Levy-Favatier et al. 1993). Más adelante, otra proteína de 30 kDa constituida por dos subunidades de 14 kDa se aisló de extractos solubles en ácido perclórico; ésta presentó casi toda la secuencia previamente reportada por Levy-Favatier, a excepción de 37 residuos de aminoácidos en el N-terminal y C-terminal. La proteína PSP que se obtuvo de hígado y riñón de ratón se localizó en núcleo y citoplasma en la mayoría de las células de hepatocitos y riñón; además, en este último también se observó en algunas células epiteliales del tubo de la corteza superior renal (Oka et al. 1995).

La primera función que se adjudicó a esta proteína fue la inhibición de la síntesis de proteínas, la cual se observó era dependiente del tiempo, ya que a tiempos prolongados era mayor. Se propuso que esto ocurría mediante un mecanismo de disgregación de los poliribosomas (Oka et al. 1995).

Hasta el momento no se ha podido determinar una función específica de esta familia de proteínas, los reportes donde se ha tratado de determinar la función en diferentes organismos hasta el momento son:

La inhibición del crecimiento del tumor, donde la proteína PSP denominada UK101 está relacionada con la baja proliferación de la capa epitelial y su participación en un mecanismo inmune capaz de actuar en fases tempranas de carcinogénesis (Ghezzi, et al. 1999).

La proteína PSP de rata K-PSP1 está relacionada negativamente con la traducción de proteínas; por lo tanto, la expresión de K-PSP1 es baja cuando la síntesis de proteínas es alta y viceversa. Esta proteína se localizó en el citosol, en aparato de Golgi y en retículo endoplasmático, por lo que podría estar relacionada con el transporte o procesamiento de lípidos (Kanouchi, 2000).

En *S. cerevisiae* se reportaron dos miembros de la familia YER057/YjgF/UK114 o L-PSP, uno de ellos, llamado factor de matriz mitocondrial 1 (Mmf1p o Yil051cp), se

localiza en la mitocondria y presenta una secuencia de señalización mitocondrial en sus primeros 19 aminoácidos; el otro miembro de la familia es Hmf1p (Yer057cp), localizado en la fracción soluble del citoplasma y núcleo. Ambas proteínas presentan un 60% de homología entre ellas y se localizan en diferentes cromosomas (IX y V respectivamente).

La función biológica que se ha descrito para estas proteínas es similar: tanto Hmf1p como Yil051cp influyen en el mantenimiento del DNA mitocondrial y el tiempo de división celular (Oxelmark, et al. 2000). Se propone que YIL05c determina la especificidad de la biosíntesis de isoleucina, probablemente en el paso de transaminación, y es requerido para mantener a la mitocondria en un ambiente deficiente de isoleucina (Kim, et al. 2001).

La proteína UK114 de humano se reportó en retículo endoplásmico (RE) y se especula que la presencia de PSP en este organelo posiblemente podría estar asociado a un estrés de RE, la unión de la proteína PSP al RE se debe a la presencia de una secuencia (RIER) que presenta similitud con la señal de RE (KDEL) y posiblemente esta proteína se asocie con alguna función del RE (Kanouchi, et al. 2005). La expresión de UK114 es tejido-específica de hígado y riñón, su función se ha relacionado en la diferenciación y transformación de carcinoma hepatocelular, actuando como un supresor de tumor o como un biomarcador de los grados de diferenciación del estatus de las muestras de carcinoma hepatocelular (Chong, et al., 2008).

Como se mencionó anteriormente, a nivel de secuencia las proteínas L-PSP presentan una similitud con proteínas de shock térmico, se demostró que la proteína DUK114 de *Drosophila melanogaster* es una potencial chaperona, la cual presentó un efecto comparable con la proteína Hsp90, mediante la protección de factores esenciales en la proliferación celular durante el choque térmico (Farkas, et al. 2004).

EhL-PSP de *E. histolytica* co-localizó con una deadenilasa (EhCAF1) e interaccionó con una proteína del complejo exosomal EhRRP41 (ribonucleasa) en el parásito, sugiriendo que EhL-PSP posiblemente tenga un papel en la degradación del ARNm. EhL-PSP forman parte del complejo exosomal y se encuentran involucrados en la última etapa de la degradación 3'-5' del ARNm. La proteína EhL-PSP se localizó en membrana celular y citoplasma (López- Rosas, et al., 2014).

Otro parásito en el que se han descrito proteínas de tipo PSP es *Leishmania infantum*. Un paso fundamental en la virulencia es la interacción del patógeno con las células del hospedero; en un análisis comparativo entre cepas aisladas de humano (BH46) y perro (BH400) de diferente patogenicidad, identificaron proteínas con diferentes funciones, como chaperonas, proteínas de unión a ADN, proteínas de migración celular y metaloproteasas; estas últimas son relevantes dado que están involucradas en procesos de infección: la metalopeptidasa clan MA interactúa con la endoribonucleasa L-PSP, una clase de proteína que actúa sobre ARNm de cadena sencilla mediante la inhibición de la síntesis de proteínas (Fonseca pires 2014).

Por otra parte, en *Rhodoseudomonas palustris* se reportó una posible endoribonucleasa L-PSP denominada Rhp-PSP. Esta proteína tiene propiedades antivirales contra el virus del mosaico del tabaco (VMT), se propuso que el mecanismo mediante el cual se logró la inhibición de la infección se debe a su capacidad de degradar el ARN (Su, et al. 2015).

En algunos de estos reportes las proteínas PSP interactúan con otras proteínas para poder llevar a cabo su función. Las interacciones entre proteínas juegan un papel fundamental en las diferentes funciones de la célula, por lo que la identificación de la red de las interacciones que se dan entre muchas proteínas de un determinado organismo, la cual se denomina “interactoma”, es esencial para identificar los mecanismos clave dentro de un sistema biológico.

Previamente en *T. vaginalis* se describieron tres marcos de lectura abierto de genes que codifican para proteínas tipo PSP con dominio de endoribonucleasa perteneciente a la familia Yjgf/YER057c, una de ellas se identificó mediante espectrometría de masas la cual se denominó Tv-PSP1.

Esta proteína es regulada de manera negativa por poliaminas, y es soluble en ácido perclórico (PSP), debido a sus características consideramos que es posible que esta proteína participe en algún mecanismo de degradación de RNAm importante en el proceso de citotoxicidad del parásito como *tvcp39*, debido a la presencia de estructuras tallo y burbuja tipo ERE en su extremo 3 UTR, las cuales podrían ser reconocidas por la proteína Tv-PSP1. (Villalobos-Osnaya, 2011).

### 3. Hipótesis.

La proteína Tv-PSP1 reconocerá la estructura ERE del 3'UTR del ARNm del gen *tvcp39* y su interacción degradará el transcrito de este gen de *T. vaginalis*.

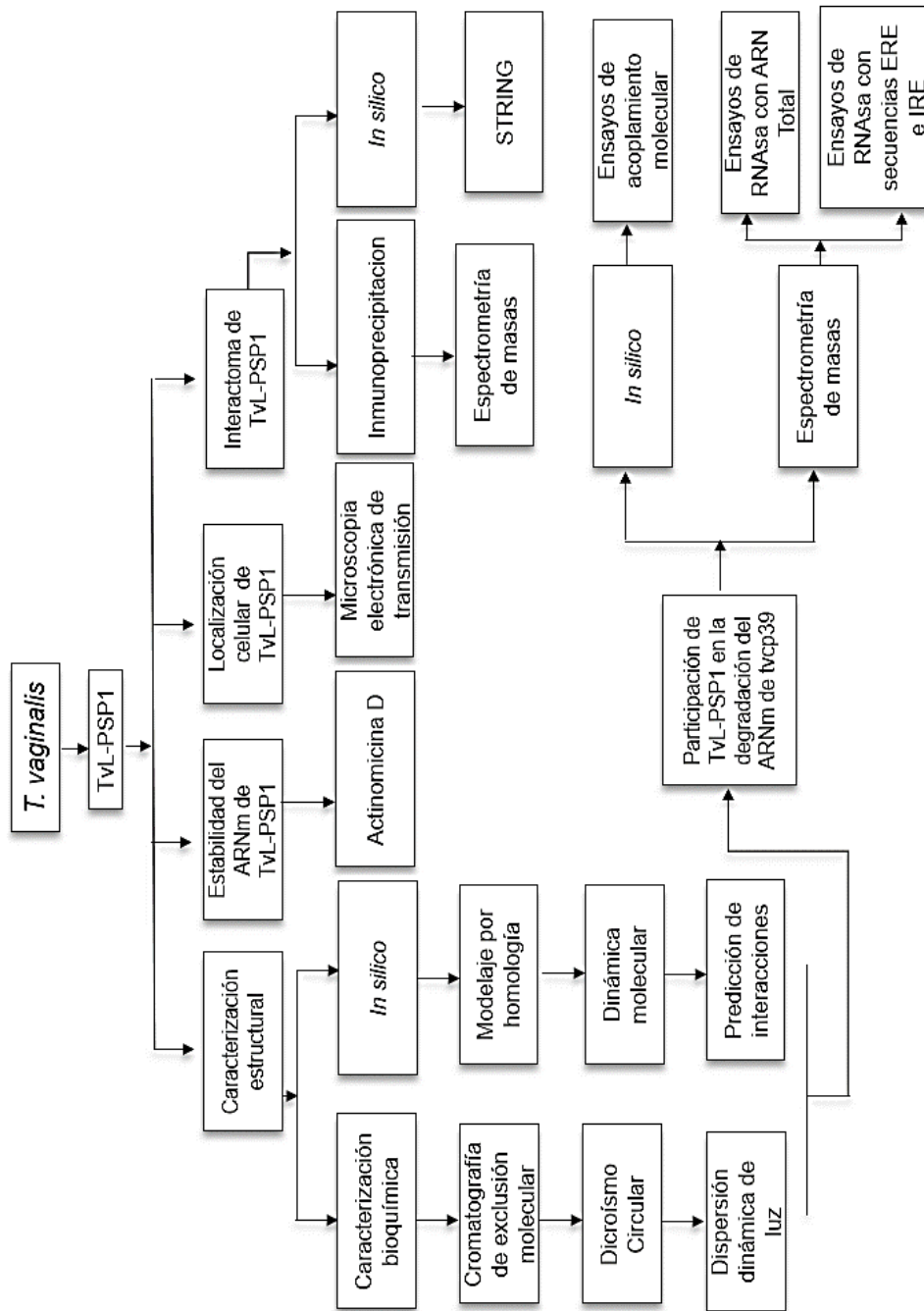
### 4. Objetivo general

Determinar la participación de Tv-PSP1 en la degradación del ARNm del gen *tvcp39*

#### 4.1 Objetivos particulares

1. Caracterizar bioquímicamente a rTv-PSP1.
2. Determinar la estabilidad del ARNm de Tv-PSP1 en presencia y ausencia de poliaminas.
3. Determinar la localización de Tv-PSP1 en *T. vaginalis*.
4. Determinar el interactoma de Tv-PSP1 con otras proteínas que participan en la degradación
5. Determinar la participación de Tv-PSP1 en la degradación del ARNm de *tvcp39* de *T. vaginalis*.

## 5. Estrategia experimental



## 6. Materiales y Métodos.

### 6.1 Análisis *in silico* de proteínas PSP de *T. vaginalis*.

Se realizó una búsqueda de ESTs de los tres marcos de lectura abierto de las proteínas PSP de *T. vaginalis* en la base de datos Trichdb (<http://trichdb.org/trichdb/>). Una búsqueda de secuencias de aminoácidos de miembros de la familia YER057c/YjgF/UK114 permitió determinar la identificación de 9 aminoácidos invariables (P-X5-Y-X13-G-X25-N-X27-F-X3-N-X13-R-X8-P-X5-E) característicos de la familia mediante un alineamiento y determinar cuáles de estos aminoácidos se conservan en las proteínas PSPs de *T. vaginalis*.

Estructuras cristal de proteínas tipo PSPs de la familia YER057c/YjgF/UK114, obtenidas en la base PDB (Protein Data Base) (<https://www.rcsb.org/>) permitieron obtener información de los porcentajes de las estructuras secundarias de cada uno de los miembros de la familia, el organismo al que pertenecen y el tipo de estructura cuaternaria que presentan. Con el programa STRING (<https://string-db.org/>) se realizó una predicción del interactoma de la proteína de Tv-PSP1, la cual se llevó a cabo mediante dos estrategias: 1) Búsqueda de los homólogos de proteínas de *T. vaginalis* en la base de datos de *T. vaginalis* (<http://trichdb.org/trichdb/>) utilizando como base las proteínas que participan en el exosoma de *E. histolytica* reportadas por López-Rosas, 2014. 2) La secuencia de la proteína Tv-PSP1 se ingresó en la base de datos la cual predijo un mapa de interacción mediante evidencias experimental, bases de datos, textos, co-expresión.

### 6.2 Cultivo de *T. vaginalis*

El aislado CNCD147 de *T. vaginalis* fue cultivado en medio triptona, extracto de levadura y maltosa (TYM) pH 6.2 con 10% de suero de caballo (Gibco) previamente inactivado por calor, con pases cada 24h. Para todos los ensayos se utilizaron parásitos en fase logarítmica con dos semanas de pases.

### 6.3 Extracción de ARN total de *T. vaginalis*.

La extracción de ARN se obtuvo mediante el método de TRIzol® (Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, CA, EE. UU.), a partir de  $20 \times 10^6$  parásitos los cuales fueron centrifugados a 624 g /4°C /5 min, se decantó el medio, posteriormente se realizó un lavado con PBS pH 7.0, se agregó 1 ml de TRIzol frío. Se mezcló por inversión y se incubó a temperatura ambiente (TA) durante 10 min, posteriormente se incubó 30 min a 4°C, se agregó 200 µl de cloroformo y se mezcló fuertemente a TA. Se centrifugó a 9184 g /4°C / 15 min recuperando la fase acuosa en un tubo nuevo, al cual se le añadió isopropanol, y se mezcló e incubó a TA. A continuación, se centrifugó a 9184 g / 4°C / 15 min, decantó el sobrenadante y lavó la pastilla dos veces con etanol al 75% con agua DEPC, cada lavado se centrifugó a 9184 g / 4°C / 15 min. Una vez finalizados los lavados, se decantó el sobrenadante y se dejó secar la pastilla a TA y se resuspendió en agua DEPC. La cuantificación se realizó con el equipo Nanodrop por espectrofotometría y se verificó la integridad del ARN en un gel de agarosa al 1% con TBE 1X, teñido con red gel.

### 6.4 Expresión y purificación de la proteína recombinante Tv-PSP1 (rTv-PSP1).

El método reportado por Oka (1995) para la obtención de proteínas tipo PSP se utilizó para inducir la expresión de la proteína recombinante rTv-PSP1, el cual consistió en crecer la clona BL21-1 (construcción con el gen *tv-psp1*) en LB-ampicilina a 200 rpm/ 30°C /ON, se centrifugó a 9184 g / 4°C / 15 min, se sembró en medio LB-ampicilina (50 µg/ ml) y se creció a 200 rpm/ 30°C hasta alcanzar una O.D. de 0.7-0.8. La proteína se indujo con 1 µg/ml isopropil-beta-D-tiogalactopiranosido (IPTG) y se cambió la incubación a 200 rpm/ 37°C/ 4 h. Una vez transcurrido el tiempo, se centrifugó a 7348 g /4°C /10 min. La pastilla obtenida se sonicó durante 3 min con un programa 30/30 on/ off, posteriormente se centrifugó a 7348 g /4°C /60 min. La fracción soluble obtenida se filtró con una membrana de 0.22 µ para purificar la proteína rTv-PSP1 utilizando una columna de afinidad a GST (GE Life Sciences).

La cromatografía de afinidad se realizó en el equipo ÄKTA prime plus, primero se lavó la columna de afinidad a GST con 5mL de agua filtrada; se equilibró con amortiguador de unión de GST (10 mL), se inyectó la fracción soluble del extracto bacteriano inducido y filtrado, con un flujo de 0.3 mL/min, posteriormente se lavó la columna con 30 mL de amortiguador de equilibrio y se eluyó con amortiguador de elución (glutatión reducido 10 mM) y se recolectaron fracciones de 1mL, las cuales se analizaron en geles SDS-PAGE al 12% teñidos con azul de Coomassie.

La proteína rTv-PSP1 se cambió a un amortiguador M3 (Tris base 50 mM, NaCl 150 mM, EDTA 1 mM, DTT 1 mM) mediante cromatografía con una columna de desalinización PD10 (GE Healthcare Bio-Sciences AB) mediante método de goteo. La columna se lavó 3 veces con 5 mL de agua, tras lo cual se equilibró con 4 mL de amortiguador M3, posteriormente se agregó 2.5 ml de la proteína rTv-PSP1 y 3.5 ml del amortiguador M3, recuperando en un tubo a la proteína rTvL-PSP. Posteriormente para eliminar la etiqueta de GST se agregó la enzima de corte PPS (Protease Plus) en una concentración de 20 µg/mL y se incubó a 4°C el corte de la proteína se monitoreó cada 24h hasta observar la mayor cantidad de proteína cortada, posteriormente se realizó un cambio al amortiguador afinidad a GST con la columna PD10, utilizando el mismo protocolo previamente descrito.

Mediante una cromatografía de afinidad a GST, se separó la etiqueta de GST y la proteína rTv-PSP1; esta última se concentró utilizando ultracentricones (Amicon®) con un factor de corte de 10 kDa, posteriormente se analizó en geles SDS-PAGE al 15% y se tiñó con azul de Coomassie.

### 6.5 Western blot utilizando anticuerpos rTv-PSP1

El extracto de proteínas totales de *T. vaginalis* se corrió en una electroforesis de 1D en geles SDS-PAGE al 15%. Uno de los cuales se tiñó con Azul de Coomassie R-250 y un espejo de éste se transfirió a una membrana de nitrocelulosa en cámara semiseca a 20 V/ 20 min. Una vez concluida la transferencia se tiñó con Rojo de Ponceau para observar su la eficiencia de la transferencia, la membrana se destiñó con lavados de PBS pH 7.0, se bloqueó con PBS pH 7.0 / 5% de leche a 4°C durante toda la noche (ON). Al día siguiente se realizaron lavados con PBS pH 7.0 durante 10

min cada uno de ellos, posteriormente se incubó con el anticuerpo primario policlonal rTv-PSP1 (dilución 1:3000) a 4°C / ON, la membrana se lavó 5 veces con PBS pH 7.0 en agitación durante 5 min cada lavado, se incubó con el anticuerpo secundario de ratón anti-cabra acoplado a enzima peroxidasa de rábano (HRP) en una dilución 1:3000 (ZYMED, Invitrogen), transcurridas 2h, se realizaron 7 lavados con PBS pH 7.0 durante 5 min, finalmente se reveló por quimioluminiscencia con el reactivo Amersham ECL start Western Blotting Detection Reagent (GE Healthcare) en el equipo ChemiDoc (Bio-Rad).

### 6.6 Obtención de la proteína nativa Tv-PSP1

La proteína TvL-PSP endógena se obtuvo a partir de  $100 \times 10^6$  parásitos, los cuales se centrifugaron a 624 g / 4°C / 5 min, posteriormente se decantó el sobrenadante y la pastilla obtenida se lavó 3 veces con PBS pH 7.0, se resuspendió en amortiguador M3 complementado con inhibidor de proteasas. Los parásitos se sonicaron durante 3 minutos a 80% de amplitud con ciclos de 30 / 30 seg (on / off) y se centrifugó a 12,960 g / 4°C / 60 min. Al sobrenadante se le añadió ácido perclórico (Sigma Aldrich) para obtener una concentración final del 5% (v/v). La muestra se centrifugó a 12,960 g / 4°C / 60 min, la fracción soluble se colectó y precipitó con 20% de sulfato de amonio, tras lo cual se centrifugó a 12,960 g / 4°C / 15 min. Luego, la pastilla se lavó dos veces con 500 µl de acetona fría y se centrifugó a 12,960 g / 4°C / 15 min entre cada lavado. Posteriormente se dejó secar la pastilla y se resuspendió en amortiguador M3, la muestra se analizó en geles SDS-PAGE al 15% y se tiñó con plata.

### 6.7 Tinción en Plata geles de poliacrilamida.

El gel de poliacrilamida se incubó en agitación con amortiguador de fijación ON, posteriormente se realizaron dos lavados con etanol al 5% durante 20 min cada uno, se agregó solución de pretratamiento durante 2 min, se lavó dos veces con agua bidestilada durante 5 min cada lavado, posteriormente se agregó la solución de

impregnación durante 25 min, se lavó dos veces durante 20 seg y agregó la solución de revelado, posteriormente se realizaron dos lavados con agua bidestilada y se agregó la solución de paro.

#### 6.8 Inmunolocalización de Tv-PSP1 en *T. vaginalis*

Para analizar la localización celular de la proteína Tv-PSP1 mediante microscopía electrónica de transmisión, se utilizaron  $40 \times 10^6$  parásitos, los cuales se centrifugaron a 624 g / 4°C / 5 min, se lavaron 3 veces con PBS pH 7.0, la pastilla de parásitos se resuspendió en amortiguador de fijación (4% de paraformaldehído, 0.5% glutaraldehído), se incubó 1h a TA en agitación, una vez transcurrido el tiempo se centrifugó a 624 g / 4°C / 5 min, la pastilla se lavó 3 veces con PBS pH 7.0.

Los parásitos fijados fueron deshidratados mediante una serie de concentraciones de alcohol, posteriormente se agregó LR White (Polysciences) método reportado por Goping (1996), se polimerizó durante 24 h con UV, se realizaron cortes con un ultramicrotomo; los cortes fueron colectados y colocados en rejillas de níquel, se bloquearon con suero fetal bovino (SFB) en PBS pH 7.0 durante 1 h, se lavaron e incubaron con el anticuerpo policlonal anti-rTv-PSP1 (dilución 1:5) a 4°C/ON.

Las rejillas se lavaron 3 veces con PBS pH 7.0, se incubaron durante 1h con el anticuerpo secundario anti-ratón acoplado a una partícula de oro con un diámetro de 30 nm (Ted Pella ING) se lavaron las rejillas y se contrastaron con acetato de uranio y citrato.

Como control positivo se utilizó la proteína TveiF-5A con anticuerpo anti-TveiF-5A (dilución 1:10) y anticuerpo secundario anti-conejo acoplado a una partícula de oro de 15nm. El anticuerpo secundario fue utilizado como un control negativo (dilución 1:200).

#### 6.9 Cromatografía de exclusión molecular

La proteína rTv-PSP1 (sin GST) se utilizó para realizar estos experimentos. Para la cromatografía de exclusión molecular se utilizó una columna Superdex 75 10/300 (GL) siguiendo las recomendaciones del proveedor.

Se utilizaron 80 µg de rTv-PSP1 y proteínas estándar de varios pesos moleculares ya conocidos (Bio-Rad), las cuales fueron utilizadas para la curva de calibración.

El coeficiente de partición ( $K_{av}$ ), el cual representa la fracción de volumen de elución de cada proteína definida, y el logaritmo del peso molecular de las proteínas se obtuvieron mediante las siguientes ecuaciones

$$K_{av} = \frac{V_e - V_o}{V_c - V_o}$$

$V_e$  = volumen de elución de la molécula

$V_o$  = volumen de exclusión.

$V_c$  = volumen total de la columna

$$K_{av} = m * \log PM + b$$

PM = Peso Molecular

$m$  = la pendiente

$b$  = la intersección.

La obtención del radio hidrodinámico se realizó con las proteínas estándares cuyos radios hidrodinámicos eran conocidos.

Fue necesario realizar una gráfica lineal utilizando logaritmo de  $K_{av}$ , para obtener el radio stock ( $R_{st}$ ) de las proteínas. Para ajustar los valores de radio hidrodinámico de todas las proteínas usamos la siguiente ecuación:

$$\sqrt{(-\log K_{av})} = m * R_{st} + b$$

Las curvas de calibración fueron usadas para determinar el radio hidrodinámico de rTv-PSP1. Como control positivo de peso molecular y radio hidrodinámico se utilizó la proteína TYM de levadura (proporcionada por el Departamento de Bioquímica UNAM).

## 6.10 Dispersión de Luz Dinámica.

A partir de 0.1 mg de la proteína rTv-PSP1 en amortiguador de fosfatos (20mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 0.15 M NaCl) pH 7.4 con una fuerza iónica de 0.15, filtrada con una con una

membrana de 0.22  $\mu\text{m}$ , fue utilizada para el análisis de luz dinámica. La dispersión de luz se analizó con el equipo Nano Zetasizer.

### 6.11 Dicroísmo circular

El espectro de dicroísmo circular fue obtenido con el espectropolarímetro JASCO J-715 (Jasco Inc., Easton, MD), equipado con un soporte de célula tipo Peltier PTC-348WI para control de temperatura y agitación magnética. Todas las mediciones se realizaron a 25 ° C.

Para obtener el espectro de dicroísmo la proteína rTv-PSP1 se encontraba en amortiguador de fosfatos a una concentración de 0.1 mg/mL, usando una celda de 0.1 cm. El espectro se obtuvo en un rango de 200 a 260 nm.

Cada espectro fue el promedio de cinco exploraciones repetitivas y fue corregido por la señal del amortiguador. La elipticidad molar ( $\theta$ ) se calculó usando la masa molar de la proteína (13.4 g/mol) entre los residuos de aminoácidos de la proteína (124 aa).

$$[\theta] = \frac{\theta \times 100 \times MRW}{c \left( \frac{\text{mg}}{\text{mL}} \right) \times l (\text{cm})}$$

Para estimar el contenido de estructuras secundarias se utilizó el programa CDpro.

### 6.12 Modelaje por homología

Para la predicción de la estructura terciaria de la secuencia de aminoácidos de la proteína Tv-PSP1 se seleccionó el mejor de los modelos que se obtuvieron (el de mayor valor C) y se envió al servidor I-TISSER. Posteriormente se utilizó la base de datos Chemistry at HARvard Macromolecular Mechanics (CHARMM) c38b2 para minimizar la energía del modelo utilizando los parámetros de CHARMM36. Una vez obtenida la estructura del monómero de la proteína Tv-PSP1 se construyó el modelo del trímero, para lo cual se utilizó como base la estructura cristal de una proteína L-PSP de un organismo no cultivado (PDB ID: 3R0P). Esta estructura fue seleccionada

por haber presentado mayor identidad con la proteína Tv-PSP1. El modelo de energía minimizado se sobrepuso en cada uno de los sitios del trímero de 3R0P utilizando UCSF. Una vez constituido el modelo homotrimérico se realizó nuevamente una minimización de energía.

### 6.13 Dinámica molecular

El servidor CHARMM-GUI se utilizó para realizar la dinámica molecular. El trímero fue solvatado en una caja cúbica de 10 Å alrededor de la proteína con una concentración de 0.15M de NaCl. Una simulación de NAMD del trímero a 100 ns a 303,15 K y 1 atm fue usada para la dinámica.

### 6.14 Fluorescencia intrínseca

Para realizar la fluorescencia se utilizó la proteína Tv-PSP1 en una concentración de 1mg/ml, filtrada previamente mediante una membrana de 0.22 µ. Por otra parte, se utilizaron las sondas de las estructuras tallo y burbuja ERE e IRE (Carvajal-Gamez, et al., 2016) con una concentración de 5.5 µg/ml y 3.7 µg/ml respectivamente.

Los parámetros utilizados fueron 280 nm de excitación y 290-400 nm de emisión. Se realizaron incubaciones de 15 min y se tomaron las lecturas correspondientes agregando mayor concentración de sonda en cada uno de los tiempos

### 6.15 Inmunoprecipitación

A partir de un cultivo de  $120 \times 10^6$  de *T. vaginalis*, se obtuvieron extractos totales de proteínas, los cuales fueron incubados con proteína G para la clarificación de los extractos. Por otra parte, se incubó el anticuerpo anti-Tv-PSP1 proteína G durante 4 h a 4°C. Los extractos clarificados se incubaron con 100 µl de proteína G-anti Tv-PSP1

en agitación constante durante 4 h a 4°C. Una vez transcurrido ese tiempo se agregó 50 mM dithiobis succinimidyl propionate (DSP). Posteriormente se realizaron 3 lavados con amortiguador M3; el resultante de esta interacción se analizó en geles PAGE al 7% teñido con azul de Coomassie. La banda observada se cortó y envió a espectrometría de masas para la identificación de las proteínas de interacción.

#### 6.16 Espectrometría de masas

Las bandas fueron cortadas manualmente, tras lo cual fueron reducidas con DTT 10 mM, alquiladas con Iodoacetamida 100mM y desteñidas con ACN: NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> 50mM (50:50 v/v). La digestión proteica se llevó a cabo durante 18 horas a 37°C con tripsina grado masas (Promega V528A). Se extrajeron los péptidos obtenidos de la digestión (ACN: H<sub>2</sub>O: ácido fórmico 50:45:5 v/v), se disminuyó el volumen de la muestra en un concentrador (Eppendorf 5301) y se desaló la muestra utilizando columna C18 (ZipTipC18). La muestra se colocó por sextuplicado en la placa utilizando como matriz  $\alpha$ -ciano y se analizó en un MALDI TOF/TOF 4800. Se realizó una búsqueda con los espectros MS/MS obtenidos el algoritmo de búsqueda Paragón del software ProteinPilot, con un porcentaje de confianza del 66%.

#### 6.17 Ensayo de RNAsa

El ARN total de *T. vaginalis* se obtuvo mediante el método de TRIzol® (Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, CA, EE. UU.). Para el ensayo de degradación se utilizó 1 µg de ARN total y 0.5 pM de la proteína rTv-PSP1; estos dos elementos se incubaron durante 4 horas a 37 °C en el amortiguador M2 (Tris-HCl 50 mM, KCl 75 mM, MgCl<sub>2</sub> 3 mM, DTT 10 mM). Una vez terminada la incubación las reacciones se cargaron en gel de agarosa al 1,7% y se tiñeron con red gel. Como control positivo se utilizó la RNAsa A (Sigma-Aldrich) y la proteína GST como control negativo de degradación.

Para los ensayos con las sondas IRE y ERE se realizó una transcripción *in vitro* y se utilizó 1 µg de estas sondas, las cuales se incubaron con 100 µg de la proteína

rTv-PSP1. Se realizó una incubación de 30 min a 37 ° C en los amortiguadores M1, M2 y M3. Una vez terminada la incubación las reacciones se cargaron en gel de agarosa al 1,7% y se tiñeron con red gel.

#### 6.18 Estudio *in silico* de acoplamiento de la proteína Tv-PSP1 y la secuencia IRE

Para el análisis de acoplamiento molecular se utilizó el modelo por homología del trímero de Tv-PSP1 previamente descrito. Se realizó una búsqueda en la base de datos PDB de estructuras tipo ERE e IRE previamente cristalizadas; sólo se encontraron tres estructuras tipo ERE, dos de las estructuras fueron obtenidas por Resonancia Magnética Nuclear (NMR) ID: 1AQO y 1NBR y una estructura cristalográfica de *Oryctolagus cuniculus* ID: 3SN2.

A todas las estructuras se les realizaron minimizaciones de energía con 100 pasos de steepest descent con el programa CHARMM c35b2 (Brooks, et al.2009) y con el campo de fuerza CHARMM36 parametrizado para proteínas (Huang and MacKerell, 2013).

El docking se realizó con el servidor HDock (<http://hdock.phys.hust.edu.cn/>) con los parámetros de default (Van Zundert, et al., 2016). Se utilizaron las estructuras de Tv-PSP1 mayormente pobladas determinadas por dinámica molecular cada 20 ns (20, 40, 60, 80 y 100) con las tres estructuras de ARN (1AQO, 1NBR y 3SN2). Cada complejo se minimizó con CHARMM con 100 pasos de steepest descent y se les calculó la energía de interacción entre la proteína y el RNA, obteniendo una energía menor de -300 kcal/mol.

## 6.19 Cálculos de la energía libre de unión Tv-PSP1-ARN:

### Cálculos electrostáticos

Los archivos obtenidos del docking se prepararon para poder correrlos y determinar las contribuciones electrostáticas en un medio continuo utilizando el programa PDB2PQR (Dolinsky, et al., 2004), de acuerdo con la metodología de Nathan Baker (Baker, et al., 2001). Estos archivos “electrostáticos” tienen un formato similar al PDB; se les incorporaron datos de carga y radios atómicos para todo el complejo a través del campo de fuerza CHARMM (MacKerell Jr, et al., 1998).

Los archivos pasan de extensión PDB a PQR. Finalmente, estos archivos se corren en el programa Adaptive Poisson-Boltzmann Solver (APBS) (Baker, et al., 2001), resolviendo la ecuación no lineal de Poisson-Boltzmann.

Para evaluar la energía libre de unión para Tv-PSP1-ARN se determinaron separadamente las contribuciones de tipo electrostático y no polar, como se muestra a continuación:

$$1. \quad \Delta G_u = \Delta G_{u, \text{elec}} + \Delta G_{u, \text{nopol}}$$

Y a su vez

$$1. \quad \Delta G_{u, \text{elec}} = \Delta G_{u, \text{sol}} + \Delta G_{u, \text{coul}}$$

Donde:

$\Delta G_u$  es la energía de unión y está en función de la energía electrostática ( $\Delta G_{u, \text{elec}}$ ) y de la energía no electrostática o no polar ( $\Delta G_{u, \text{nopol}}$ ). A su vez, el  $\Delta G_{u, \text{elec}}$  está en función de la energía de solvatación  $\Delta G_{u, \text{sol}}$  (la energía necesaria para retirar el solvente del sitio activo para que se una el RNA a la proteína Tv-PSP1) y de la energía coulombica,  $\Delta G_{u, \text{coul}}$  (la energía de interacción entre las cargas de Tv-PSP1 y las cargas del ARN).

## Cálculos no electrostáticos o no polares

La contribución al  $\Delta G_u$  por parte de las interacciones no polares ( $\Delta G_u_{\text{nopol}}$ ) se evaluó como la energía liberada al ocultar el área de la interfase al solvente cuando se forma el complejo; dicha energía es proporcional al cambio en el área accesible al solvente y un parámetro semejante a la tensión superficial ( $\gamma$ ), con un valor de  $0.021 \text{ kJ mol}^{-1}\text{Å}^{-2}$  para el agua:  $\Delta G_u_{\text{nopol}} = \gamma \Delta \text{ASA interfase}$ . Se empleó el programa Visual Molecular Dynamics (VMD) (Humphrey, et al., 1996) para calcular el área de la interfase que queda oculta del solvente en el complejo a partir de los archivos PDB del complejo y de las moléculas aisladas:

$$3. \quad \Delta G_u_{\text{nopol}} = \gamma(\text{ASATv-PSP1-ARN} - \text{ASATv-PSP1} - \text{ASAARN})$$

Integrando las contribuciones electrostáticas y no electrostáticas se podrá calcular el  $\Delta G_u$  de acuerdo con la Ecuación 1.

## 7. Resultados

### 7.1 Caracterización bioquímica de la proteína Tv-PSP1.

Los miembros de la familia YER057c/YjgF/UK114 son proteínas pequeñas de alrededor de 130 aminoácidos y se encuentran muy conservadas entre especies. En el 2004 Manjasetty determinó que existe >38% de identidad entre las proteínas PSP. Mediante un alineamiento de 107 secuencias de estas proteínas se identificaron 9 aminoácidos invariantes y por lo tanto característicos de las proteínas PSP, cuya secuencia es la siguiente: P-X<sub>5</sub>-Y-X<sub>13</sub>-G-X<sub>25</sub>-N-X<sub>27</sub>-F-X<sub>3</sub>-N-X<sub>13</sub>-R-X<sub>8</sub>-P-X<sub>5</sub>-E. Entre ellas conservan al menos 7 u 8 aminoácidos correspondientes a esta secuencia.

Las proteínas TvL-PSP de *T. vaginalis* deberían conservar los aminoácidos invariantes de la familia YjgF/YER057c/UK114, por lo que se buscó esta secuencia característica de la familia YER057c/YjgF/UK114 en las tres proteínas tipo PSP de *T. vaginalis* (Tv-PSP1, TvL-PSP2 y TvL-PSP3). Mediante un alineamiento se corroboró la presencia de esta secuencia previamente reportada en proteínas tipo PSP.

Las proteínas PSP de *T. vaginalis* conservan al menos 7 u 8 aminoácidos correspondientes a esta secuencia, los cuales se encuentran distribuidos de la siguiente manera:

Tv-PSP1 -- P<sup>11</sup>, Y<sup>17</sup>, G<sup>31</sup>, F<sup>84</sup>, N<sup>88</sup>, R<sup>102</sup>, P<sup>111</sup>, E<sup>117</sup>

TvL-PSP2 --P<sup>11</sup>, Y<sup>17</sup>, G<sup>31</sup>, F<sup>84</sup>, N<sup>88</sup>, P<sup>111</sup>, E<sup>117</sup>

TvL-PSP3 -- P<sup>11</sup>, Y<sup>17</sup>, G<sup>31</sup>, N<sup>55</sup>, F<sup>83</sup>, N<sup>87</sup>, R<sup>101</sup>, E<sup>116</sup>

La posición de estos aminoácidos invariantes se muestran el siguiente alineamiento de las proteínas PSP de *T. vaginalis* (Fig. 3).

```

                P--X5--Y-----X13----G-----X25-----N---
Tv-PSP2      MSVVVSTPDAPAAIGPYCQARICGNFLYTSGIIGNDPHGGPNPEDIEGQATLIMKSVDAE
Tv-PSP1      MSKVI STPDAPAAIGPYCQARLCDR TLYTSGIIGNDPHGGPNPETVEGQAE LIMKSLDAM
Tv-PSP3      MSVVINLPDAPPPIGPYCLARLCGNTLYTSGNVAQSADG-TVPKTIGEQT TLSLQNMKEV
** *:. ***** ..***** **:*. ***** :.....* . *: : *: * :...:
-----X27-----F-X3-N-----X13-----R---X8---P--X5--E
Tv-PSP2      LKAAGYTKTDVVKITVFLASMDDFQKFNKIYVDYFGEHKPCCTCIEAGRLPANKLVEIDV
Tv-PSP1      LKAAGYEKTDVVKCNCYLADIADFQKFNKIYADYFGDHKPCRCCIQAGKLPAGKLV ELDA
Tv-PSP3      IKAAGMDKTNVVKCNCYLANMDDFAEMNKAYS AFFGDHKPCRCCVQAGKLCDFLFEVEC
:***** **:*** . :**.: ** ::** * :**:* ** :**:* * .**.:

Tv-PSP2      IAYKP
Tv-PSP1      IAYK-
Tv-PSP3      ICYKA
* . **

```

**Figura 7. Motivo característico de la familia YER057c/YjgF/UK114 en las proteínas PSP de *T. vaginalis*.** Alineamiento de la secuencia de aminoácidos de las proteínas PSPs de *T. vaginalis* donde se muestra que contienen el motivo característico de la familia YER057c/YjgF/UK114, en la parte superior del alineamiento se muestra la secuencia P-X<sub>5</sub>-Y-X<sub>13</sub>-G-X<sub>25</sub>-N-X<sub>27</sub>-F-X<sub>3</sub>-N-X<sub>13</sub>-R-X<sub>8</sub>-P-X<sub>5</sub>-E, y en negritas se marcan los aminoácidos correspondientes a esta secuencia en las TvL-PSPs.

Las secuencias de las proteínas Tv-PSP1 y TvL-PSP3 contienen ocho de los nueve aminoácidos, mientras que TvL-PSP2 presenta solo siete aminoácidos característicos; es posible confirmar que estas proteínas pertenecen a la familia YER057c/YjgF/UK114 debido a que, como se mencionó previamente, los miembros de la familia conservan de 7 a 8 aminoácidos de la secuencia consenso.

Por otra parte, al comparar la proteína Tv-PSP1 con otros miembros de la familia YER057c/YjgF/UK114 (Fig.8), mediante un alineamiento con secuencias de aminoácidos de proteínas cristalizadas tipo PSP, se corroboró la presencia de la secuencia característica de la familia YER057c/YjgF/UK114.



Hasta el momento se ha descrito la presencia de tres genes que podrían codificar para proteínas de tipo PSP en *T. vaginalis*: *Tv-PSP1*, *tvl-psp2*, *tvl-psp3*; sin embargo, previamente sólo se ha identificado una de ellas por espectrometría de masas (Villalobos-Osnaya, 2009).

Para determinar si existe algún reporte previo de la expresión de las otras proteínas PSP en el parásito se realizó un análisis de marcadores de secuencias expresadas (expressed sequence tag-EST) registradas en la base de datos TrichDB. De manera interesante, se encontró que la proteína Tv-PSP1 presenta un mayor número de ESTs, con un total de 58 EST registrados, la proteína TvL-PSP3 registra 10 ESTs, y la proteína TvL-PSP2 no tiene registrado ningún ESTs (Tabla 6). Por lo tanto, tenemos evidencia de la expresión de al menos dos de las tres proteínas de tipo PSP en el parásito, los cuales se muestran en la siguiente tabla, la mayoría se los EST se reportaron en condiciones de cultivos no normalizados, sin embargo, la proteína Tv-PSP1 presenta EST en condiciones de baja glucosa y TvL-PSP2 en bajas concentraciones de Hierro.

Tabla 6. Análisis *in silico* de ESTs obtenidos de la base de datos TrichDB.

EST	Length	Library
CV201151	630	HMW C1 cDNA library
CV201404	479	Cot6 normalized T1 cDNA library
CV201405	321	Cot6 normalized T1 cDNA library
CV202004	321	Cot6 normalized T1 cDNA library
CV202005	380	Cot6 normalized T1 cDNA library
CV202493	424	Cot1000 normalized T1 cDNA library
CV202494	479	Cot1000 normalized T1 cDNA library
CV204125	424	non-normalized T1 cDNA library
CV204126	479	non-normalized T1 cDNA library
CV205088	485	non-normalized T1 cDNA library
CV205089	424	non-normalized T1 cDNA library
CV205228	424	non-normalized T1 cDNA library
CV205229	478	non-normalized T1 cDNA library
CV206926	424	non-normalized T1 cDNA library
CV206927	479	non-normalized T1 cDNA library
CV207391	424	non-normalized T1 cDNA library
CV207392	479	non-normalized T1 cDNA library
CV207996	424	non-normalized T1 cDNA library
CV207997	479	non-normalized T1 cDNA library
CV210570	424	non-normalized T1 cDNA library
CV210571	486	non-normalized T1 cDNA library
CV211133	424	non-normalized T1 cDNA library
CV211134	479	non-normalized T1 cDNA library
CV211631	424	non-normalized T1 cDNA library

**TVAG\_035410**  
**(*tv-psp1*).**

**TVAG\_035410**  
(*tv-psp1*).

CV211632	479	non-normalized T1 cDNA library
CV213822	424	non-normalized T1 cDNA library
CV213823	479	non-normalized T1 cDNA library
CV214017	424	non-normalized T1 cDNA library
CV214018	479	non-normalized T1 cDNA library
CV214339	304	non-normalized T1 cDNA library
CV214340	341	non-normalized T1 cDNA library
CV214542	424	non-normalized T1 cDNA library
CV214543	479	non-normalized T1 cDNA library
CV215444	424	non-normalized T1 cDNA library
CV215445	480	non-normalized T1 cDNA library
CV215944	424	non-normalized T1 cDNA library
CV215945	479	non-normalized T1 cDNA library
CV216353	423	non-normalized T1 cDNA library
CV216354	478	non-normalized T1 cDNA library
CV217506	424	non-normalized T1 cDNA library
CV217507	486	non-normalized T1 cDNA library
CV220535	424	non-normalized T1 cDNA library
CV220536	478	non-normalized T1 cDNA library
GT107902	467	non-normalized cDNA library
GT108052	471	non-normalized cDNA library
GT109363	467	normalized cDNA library
LK994306	480	TvC
TvC116C02	480	Cold-induced pseudocyst (TvCS)
TvE109A07	402	Normal unsynchronized culture
TvE159A03	419	Normal unsynchronized culture
TvI144D11	128	Low iron culture (TvLI)
TvL025G08	431	Low glucose culture (TvLG)
TvL028F08	163	Low glucose culture (TvLG)
TvL067A07	449	Low glucose culture (TvLG)
TvL070G02	470	Low glucose culture (TvLG)
TvL102A07	269	Low glucose culture (TvLG)
TvL122A06	454	Low glucose culture (TvLG)
TvL150A09	456	Low glucose culture (TvLG)
CV204397	386	non-normalized T1 cDNA library
CV204398	412	non-normalized T1 cDNA library
CV206146	381	non-normalized T1 cDNA library
CV206147	406	non-normalized T1 cDNA library
CV206420	385	non-normalized T1 cDNA library
CV206421	412	non-normalized T1 cDNA library
CV206436	378	non-normalized T1 cDNA library
CV206437	402	non-normalized T1 cDNA library
TvG014E07	412	G2/M trophozoite (TvG2M)
TvI071D04	503	Low iron culture (TvLI)

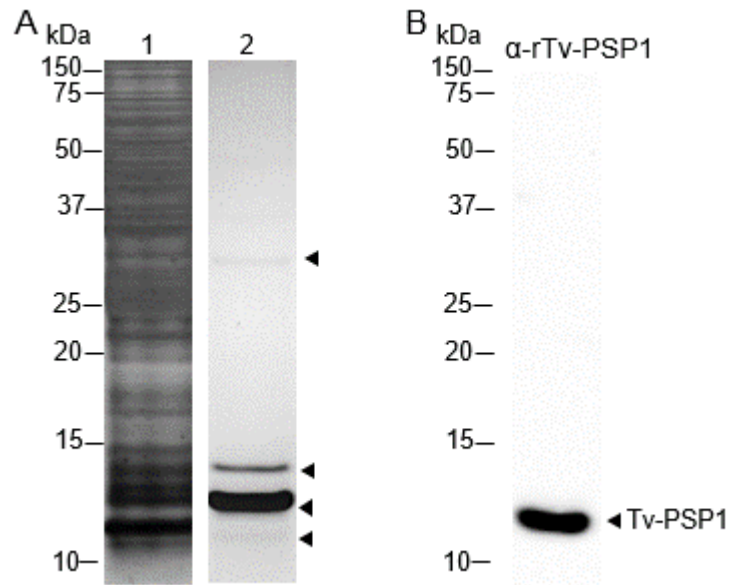
**TVAG\_197820**  
(*tv-psp3*).

El nombre de PSP hace referencia a la característica de solubilidad de las proteínas en ácido perclórico (5%), por lo que nuestro objetivo fue demostrar que la proteína Tv-PSP1 es capaz de ser soluble en ácido perclórico.

Se obtuvieron extractos totales de proteínas de *T. vaginalis*, a los cuales se agregó ácido perclórico a una concentración final del 5%; las proteínas solubles se

precipitaron con sulfato de amonio y se corrieron en una electroforesis de primera dimensión, donde se lograron observar cuatro bandas (Fig. 9A).

Utilizando los anticuerpos anti-Tv-PSP1 recombinante (rTv-PSP1) se inmunodetectó a la proteína Tv-PSP1, demostrándose así que es soluble en ácido perclórico.



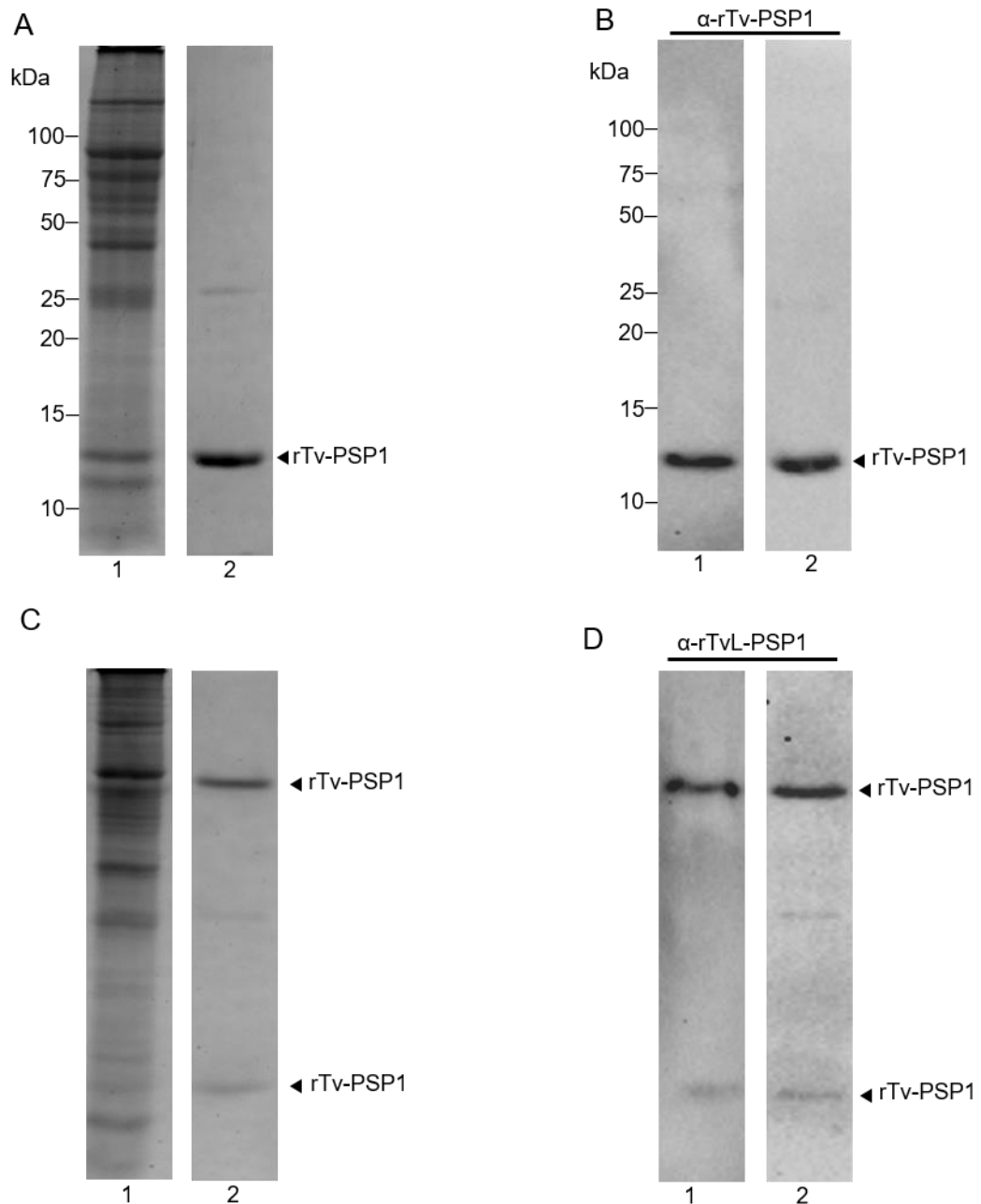
**Figura 9. Proteínas solubles en ácido perclórico.** (A) Gel de poliacrilamida en una dimensión teñido con plata. Línea 1: Extractos de proteínas totales de *T. vaginalis*, de los cuales se obtuvieron las proteínas solubles en ácido perclórico, se muestran en la línea 2, las puntas de flecha marcan las bandas presentes en los extractos solubles en 5% de ácido perclórico. (B) Western blot con anticuerpos anti-rTv-PSP1 de las proteínas solubles en ácido perclórico.

Las proteínas cristalizadas de la familia YER057c/YjgF/UK114 forman estructuras cuaternarias de tipo homotrimérica, por lo tanto, el siguiente paso fue corroborar si la proteína Tv-PSP1 endógena y recombinante es capaz de presentar una estructura cuaternaria. Para ello se analizó la conformación de la proteína Tv-PSP1 a partir de extractos totales de *T. vaginalis* y la proteína rTv-PSP1, mediante electroforesis en condiciones nativas y desnaturizantes.

Como primer paso extractos totales de *T. vaginalis* y la proteína rTv-PSP1 se corrieron en una electroforesis de una dimensión en condiciones desnaturizantes

(Fig. 10 A), mediante WB se inmunodetectó una banda de ~13 kDa con anticuerpos anti-rTv-PSP1 (Fig. 10 B), identificando la proteína Tv-PSP1 en extractos totales y a la proteína rTv-PSP1. Para determinar si la proteína Tv-PSP1 tiene una conformación cuaternaria, se realizó electroforesis de una dimensión en condiciones nativas (sin SDS y 2-mercaptoetanol) de la proteína rTv-PSP1 y los extractos totales de *T. vaginalis*, donde se pudo observar una banda de alto peso en el gel donde se corrió la proteína rTv-PSP1 (Fig. 10 C).

La inmunodetección con anticuerpos anti-rTv-PSP1 mostró dos bandas, tanto en la proteína rTv-PSP1 como en los extractos totales de *T. vaginalis*: una de bajo peso molecular, que podría corresponder a la estructura monomérica de la proteína Tv-PSP1, y otra de alto peso molecular, que podría corresponder a una conformación cuaternaria de esta proteína (Fig. 10 D); por lo tanto, la proteína endógena parece estar formando una estructura cuaternaria en el parásito. Es importante mencionar que la recombinante también presentó esta estructura.



**Figura 10. Estructura cuaternaria de la proteína Tv-PSP1.** (A) Gel de poliacrilamida desnaturizante teñido con azul de coomassie. Línea 1 Extracto proteínas totales de *T. vaginalis*, línea 2 rTv-PSP1. (B) Western blot en condiciones desnaturizantes con anticuerpos anti-rTv-PSP1. Línea 1 Extracto proteínas totales de *T. vaginalis*. Línea 2 rTv-PSP1 (C) Gel de acrilamida condiciones nativas teñido con azul de coomassie. Línea 1 Extracto proteínas totales de *T. vaginalis*. Línea 2 rTv-PSP1. (D) Western blot resueltos en condiciones nativas con anticuerpos anti-rTv-PSP1. Línea 1 Extracto proteínas totales de *T. vaginalis*. Línea 2 rTv-PSP1.

No es posible determinar el peso molecular de la conformación cuaternaria en geles en condiciones nativas, ya que no existe un marcador de peso molecular de referencia para determinar el peso y la conformación de esta estructura; por lo tanto, se realizaron una serie de pruebas bioquímicas utilizando la proteína rTv-PSP1, que previamente se comprobó presenta esta conformación.

Para determinar el peso molecular y la conformación cuaternaria de la proteína rTv-PSP1 se utilizaron dos metodologías: cromatografía de exclusión molecular y dispersión dinámica de luz (DLS).

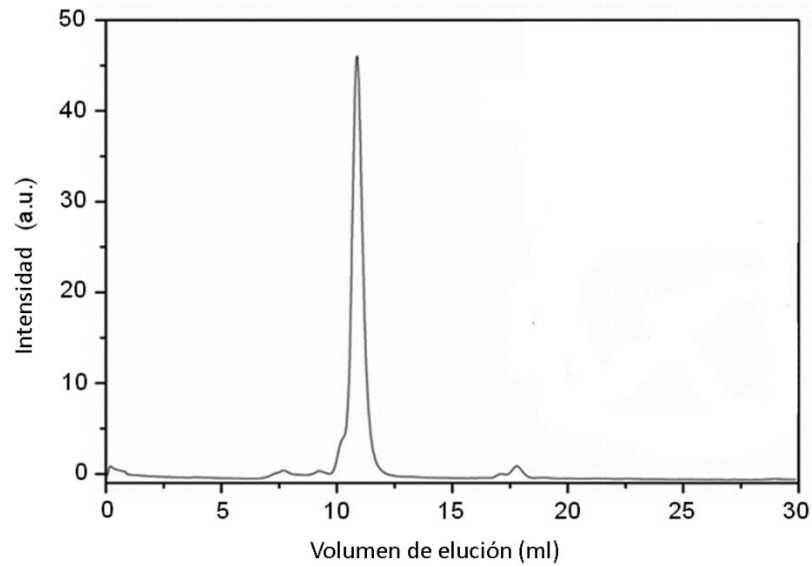
Mediante cromatografía de exclusión molecular se determinó el peso de la conformación cuaternaria de la proteína rTv-PSP1, utilizado como referencia marcadores de peso molecular determinados (Bio-Rad).

El cromatograma de elución de la proteína mostró la presencia de un solo pico de elución a los 10.88 ml (Fig. 11).

Los datos obtenidos del cromatograma de los diferentes volúmenes de elución de los marcadores de peso se utilizaron para determinar el peso molecular de la proteína con la fórmula previamente detallada en la metodología.

Con esos datos se construyó la pendiente para determinar el peso molecular de la proteína Tv-PSP1, obteniendo la siguiente ecuación:  $Y = -0.3487x + 1.758$ .

Una vez que se sustituyeron los datos de la fórmula se determinó que el peso molecular de la estructura cuaternaria que forma la proteína rTv-PSP1 es de 40.5 kDa (Tabla 7), lo que representa una conformación constituida por tres subunidades, por lo que se considera como un homotrímero, calculando que cada monómero tiene un peso molecular de 13.5 kDa. Como control de peso molecular se utilizó la proteína TIM de levadura ( $\gamma$ TIM) con un peso molecular conocido de 52 kDa.



**Figura 11. Cromatograma de elución de la proteína rTv-PSP1.** La grafica representa el cromatograma de elución de la proteína rTv-PSP1 intensidad vs volumen.

Tabla 7. Determinación del peso molecular de TvL-PS1.

	<b>Ve (ml)</b>	<b>Kav</b>	<b>LOG MW</b>	<b>MW (Da)</b>
Tv-PSP1	10.88	0.15136	4.60751362	40505.465
yTIM	10.29	0.1132	4.7169486	52113.311

Otro parámetro de medida que puede brindar información acerca de la estructura cuaternaria de la proteína Tv-PSP1 es el radio hidrodinámico.

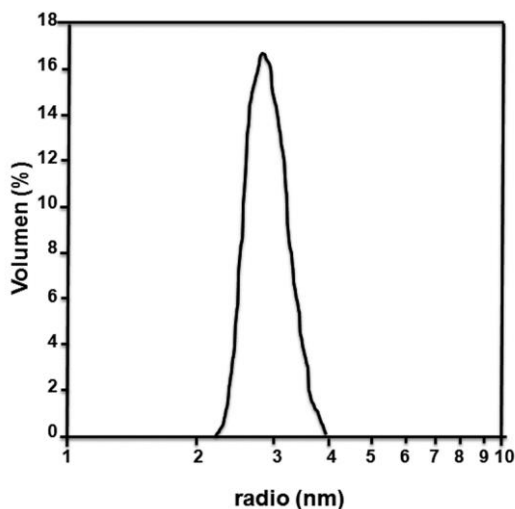
Los datos obtenidos de la cromatografía de exclusión molecular permitieron determinar el radio hidrodinámico de la conformación cuaternaria de la proteína rTv-PSP1. Se construyó la pendiente para determinar el diámetro hidrodinámico de la proteína rTv-PSP1, estableciendo la siguiente ecuación:  $Y = 0.016x + 0.434$ , obteniendo un diámetro hidrodinámico de 29.11 nm (Tabla 8).

**Tabla 8.** Determinación del radio hidrodinámico de TvL-PS1.

	<b>Kav</b>	<b>Log Kav</b>	<b>SQRT</b>	<b>Diámetro</b>
<b>Tv-PSP1</b>	10.15136	0.81999	0.90553	29.11
<b>yTIM</b>	0.1132	0.94617	0.97271	33.27

El análisis mediante dispersión dinámica de luz (DLS) determina el peso molecular de la estructura y su radio hidrodinámico.

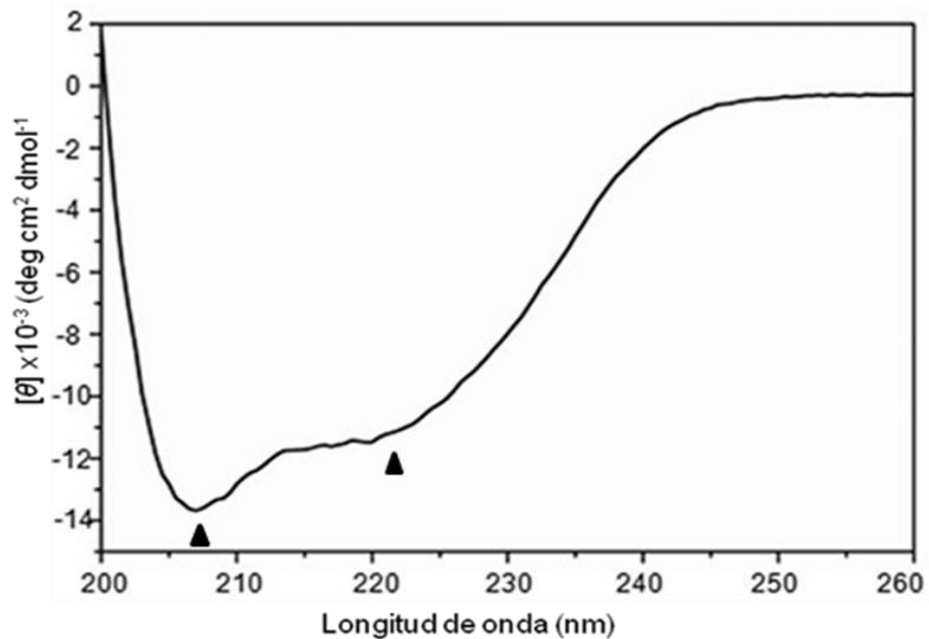
Los resultados de DLS determinaron un peso molecular de  $41.9 \pm 9.4$  kDa y un diámetro hidrodinámico de 29.7 nm (Fig.12).



**Figura 12. Dispersión dinámica de luz.** Cromatograma DLS de rTv-PSP1, se muestra la distribución del tamaño de la partícula.

Los datos obtenidos por cromatografía y DLS determinaron que la proteína Tv-PSP1 tiene una estructura de tipo homotrimérica, lo cual es concordante con lo reportado previamente en proteínas de la familia YER057c/YjgF/UK114, las cuales se ha reportado presentan una estructura secundaria constituida por  $\alpha/\beta$ .

Para el análisis de la estructura secundaria de la proteína Tv-PSP1 se utilizó dicroísmo circular (DC). El análisis realizado determinó que la proteína está conformada por estructuras de tipo  $\alpha$ -hélices y  $\beta$ -plegadas, como se esperaba; además, el patrón en el espectro de DC clasificó a la proteína Tv-PSP1 dentro de la clase estructural  $\alpha+\beta$ , debido a que el espectro far-UV obtenido en el análisis de dicroísmo circular mostró dos bandas negativas alrededor de 208 nm y 222 nm (Fig. 13), lo cual es característico de este tipo de clase estructural.



**Figura 13. Espectro de Dicroísmo Circular de la proteína rTv-PSP1.** Gráfica del espectro de la estructura secundaria de la proteína Tv-PSP1 a temperatura ambiente (25°C), las flechas indican los máximos y mínimos obtenidos en el espectro.

Para determinar el porcentaje de  $\alpha$ -hélices y  $\beta$ -plegadas se analizaron las deconvoluciones utilizando el servidor CDpro (CDSSTR, CONTII, SELCON3) (Tabla 9),

**Tabla 9.** Porcentaje de  $\alpha$ -hélices y hojas  $\beta$  de la proteína Tv-PSP1.

<i>Proteína</i>	<i>Programa</i>	<i>% <math>\alpha</math>-Hélices</i>	<i>% Hojas <math>\beta</math></i>	<i>Giros</i>	<i>RNO</i>	<i>Total</i>
<i>Tv-PSP1</i>	CDSSTR	0.405	0.133	0.202	0.257	0.997
	CONTII	0.374	0.16	0.222	0.244	1
	SELCON3	0.378	0.142	0.232	0.253	1.01
<i>Promedio</i>		0.38566667	0.145	0.21866667	0.253	1.0023333
<i>Desviación estándar</i>		0.016892292	0.01505659	0.01527525	0.00781025	0.00680686

El análisis arrojó que la proteína rTv-PSP1 contiene 38% de  $\alpha$ -hélice y 14% de hojas  $\beta$ ; estos resultados se compararon con otros miembros de la familia YER057c/YjgF/UK114, cuyos datos se obtuvieron de la base de datos PDB de proteínas cristalizadas de miembros de la familia (Tabla 10), donde se puede observar que rTv-PSP1 tiene porcentajes similares a los reportados en otras proteínas tipo PSP.

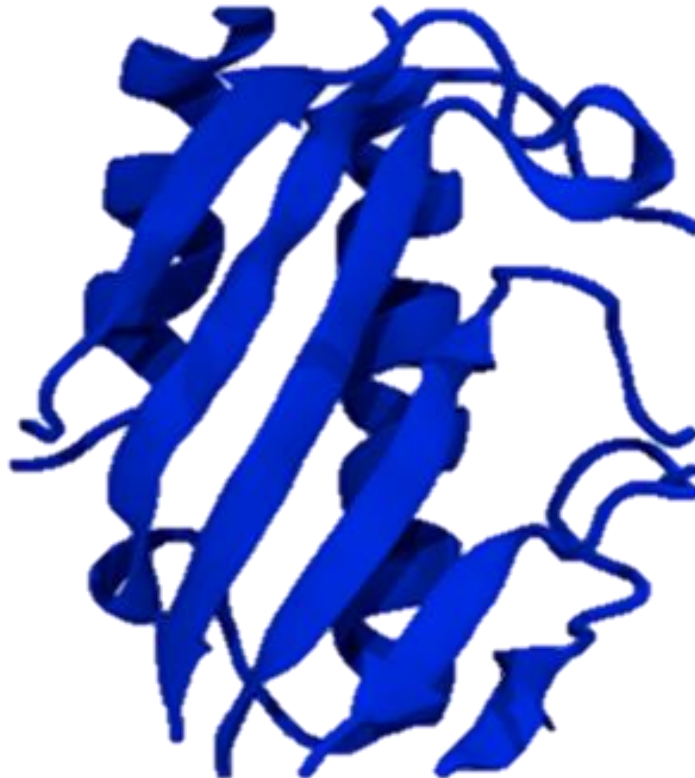
**Tabla 10.** Porcentaje de  $\alpha$ -hélices y hojas  $\beta$  de proteínas cristalizadas de la familia YER057c/YjgF/UK114.

<i>PDB</i>	<i>% <math>\alpha</math>-helices</i>	<i>% hoja <math>\beta</math></i>	<i>PDB</i>	<i>% <math>\alpha</math>-helices</i>	<i>% hojas <math>\beta</math></i>
<b>3K0T</b>	24%	27%	<b>2UYN</b>	31%	26%
<b>2B33</b>	27%	27%	<b>3V4D</b>	26%	29%
<b>1QD9</b>	30%	30%	<b>3KJK</b>	27%	31%
<b>2DYY</b>	26%	31%	<b>1QAH</b>	26%	28%
<b>3GTZ</b>	28%	33%	<b>3L7Q</b>	29%	31%
<b>3MQW</b>	27%	28%	<b>1J7H</b>	30%	23%
<b>2CSL</b>	31%	32%	<b>2CW4</b>	30%	30%
<b>2EWC</b>	26%	33%	<b>2UYP</b>	31%	26%
<b>3D01</b>	40%	29%	<b>1XRG</b>	23%	23%
<b>1ONI</b>	27%	32%	<b>3KJJ</b>	27%	31%
<b>3I7T</b>	28%	24%	<b>3LME</b>	28%	28%
<b>3LYB</b>	32%	21%	<b>3VCZ</b>	26%	22%
<b>1PF5</b>	25%	27%	<b>2CVL</b>	30%	31%
<b>1JD1</b>	29%	31%	<b>1NQ3</b>	27%	33%
<b>1QU9</b>	32%	27%	<b>2UYJ</b>	31%	26%
<b>3MQW</b>	27%	28%	<b>3QUW</b>	24%	25%
<b>3M1X</b>	26%	28%	<b>2UYK</b>	31%	26%
<b>3M4S</b>	26%	29%	<b>3R0P</b>	29%	30%

La mayoría de los miembros de la familia YER057c/YjgF/UK114 que se han cristalizado presentan dos  $\alpha$ -hélices y seis hojas  $\beta$  en un arreglo  $\beta\beta\beta\alpha\beta\beta$  en un orden de 1-2-3-6-4-5-6, donde 4 y 5 se encuentran paralelas al resto.

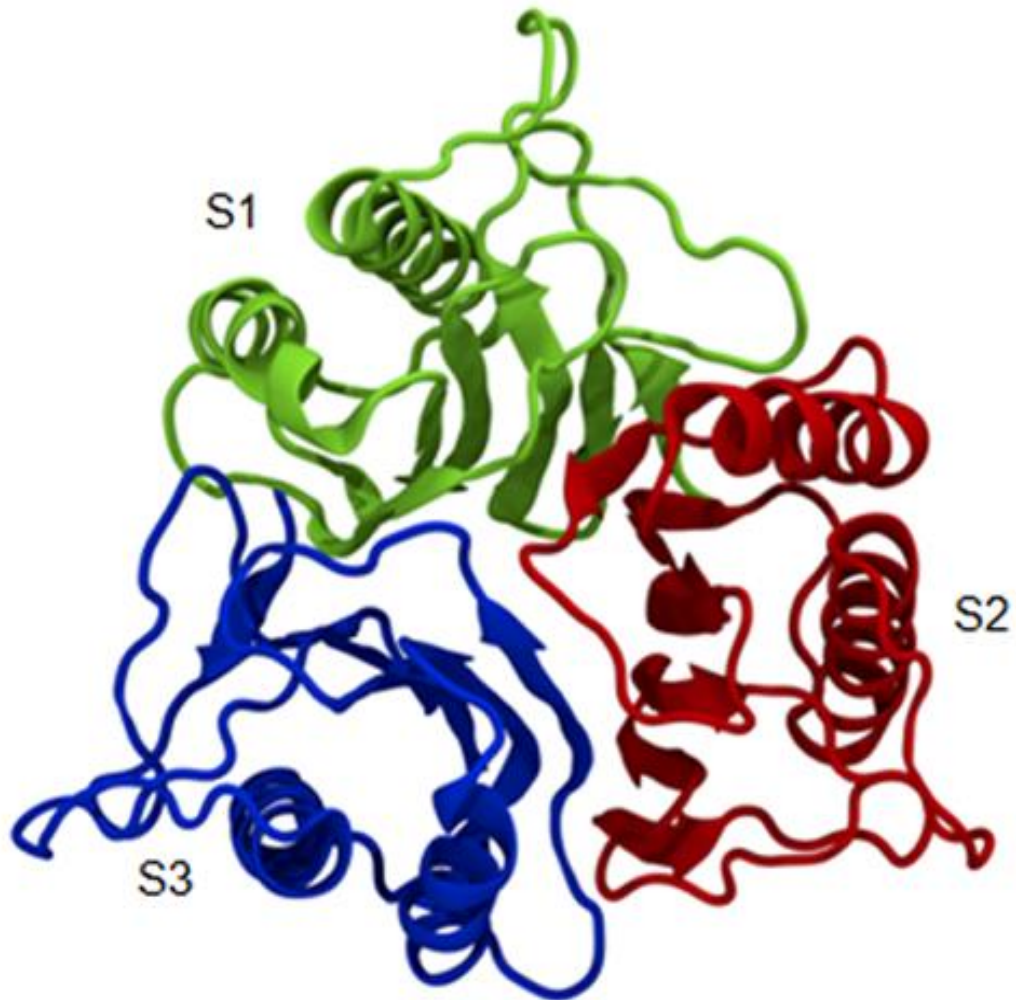
Para determinar si los niveles estructurales de la proteína Tv-PSP1 concuerdan con los datos obtenidos previamente en la caracterización estructural se realizó un modelaje por homología de la proteína, usando como molde la proteína cristalizada 3R0P.

Como resultado del modelo se determinó que el monómero de Tv-PSP1 está constituido por 6 hojas  $\beta$  y 2  $\alpha$ -hélices, las cuales presentaron un reordenamiento de la estructura de la siguiente forma:  $\beta 1$ ,  $\beta 2$ ,  $\beta 3$ ,  $\alpha 1$ ,  $\beta 4$ ,  $\alpha 2$ ,  $\beta 5$ , y  $\beta 6$ , donde  $\beta 2$  y  $\beta 6$  son antiparalelas a las otras hojas  $\beta$  (Fig. 14). Esta conformación es similar a lo previamente reportado para otras proteínas PSP.



**Figura 14. Modelo del monómero de la proteína Tv-PSP1.** Modelo obtenido mediante modelaje por homología, Tv-PSP1 contiene dos  $\alpha$ -hélices ( $\alpha 1$  and  $\alpha 2$ ) y seis hojas  $\beta$  ( $\beta 1$ ,  $\beta 2$ ,  $\beta 3$ ,  $\beta 4$ ,  $\beta 5$ , and  $\beta 6$ ).

Una vez obtenido el monómero se modeló computacionalmente la estructura trimérica propuesta para la proteína Tv-PSP1, donde se pueden observar las tres subunidades formando un barril triangular; las  $\alpha$ -hélices se encuentran en la parte exterior de la estructura y las hojas  $\beta$  en la parte interna formando una cavidad (Fig. 15).



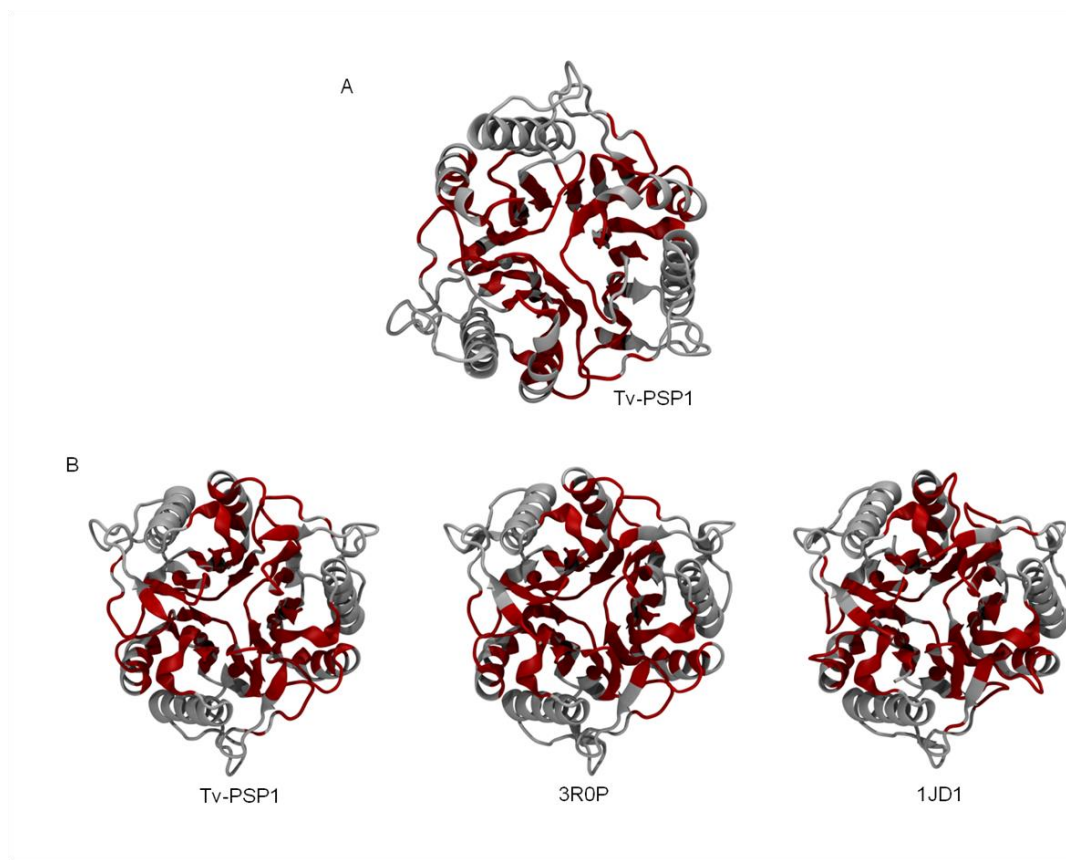
**Figura 15. Modelo homotrimérico de la proteína Tv-PSP1.** Modelo formado por tres subunidades monoméricas de la proteína Tv-PSP1 (S1, S2, and S3).

Computacionalmente se determinaron cuáles aminoácidos se encuentran interactuando para la formación de esta estructura, para lo cual se tomaron en cuenta todos aquellos aminoácidos que se encontraban a una distancia menor a 5 Å. En la tabla 11 se muestran los aminoácidos que posiblemente se encuentren interactuando entre las subunidades monoméricas (S1, S2, S3).

**Tabla 11.** Posibles aminoácidos que interactúan entre las subunidades de la estructura homotrimérica de Tv-PSP1.

<b>S1-S2</b>	<b>S1-S3</b>	<b>S2-S3</b>	<b>S1-S2</b>	<b>S1-S3</b>	<b>S2-S3</b>
<b>ARG 25</b>	MET 1	ARG 25	TYR 91	TYR 28	PHE 95
<b>THR 26</b>	SER 2	THR 26	ALA 92	THR 29	
<b>TYR 28</b>	LYS 3	TYR 28	PHE 95	SER 30	
	VAL 4		ASP 97	GLY 31	ASP 97
	ILE 14	THR 69	HSD 98	LYS 73	HSD 98
	GLY 15	ASP 70	LYS 99	ASN 75	LYS 99
<b>VAL 71</b>	PRO16	VAL 71	PRO100	TYR 77	PRO100
<b>VAL 72</b>	TYR 17	VAL 72	CYS 101	ILE 105	CYS 101
<b>LYS 73</b>	CYS 18	LYS 73	ARG 102	ALA 107	ARG 102
<b>TYR 77</b>	ALA 20	ASN 75	CYS 103	GLY 108	CYS 103
<b>LEU 78</b>	ARG 21	TYR 77	CYS 104	LYS 109	CYS 104
<b>ASP 80</b>		ASP 80	ILE 105	LEU 110	ILE 105
<b>ILE 81</b>	CYS 23	ILE 81	GLN 106	PRO 111	GLN 106
<b>ALA 82</b>	ASP 24		ALA 107	ALA 112	ALA 107
<b>PHE 84</b>		PHE 84	GLY 108	GLY 113	GLY 108
<b>ASN 88</b>		ASN 88	ILE 121	GLU 117	ILE 121
<b>LYS 89</b>	LEU 27	LYS 89	TYR 123		TYR 123
<b>TYR 91</b>	TYR 28	TYR 91	LYS 124	ASP 119	LYS 124
<b>LYS 89</b>	LEU 27	ALA 92		ILE 121	

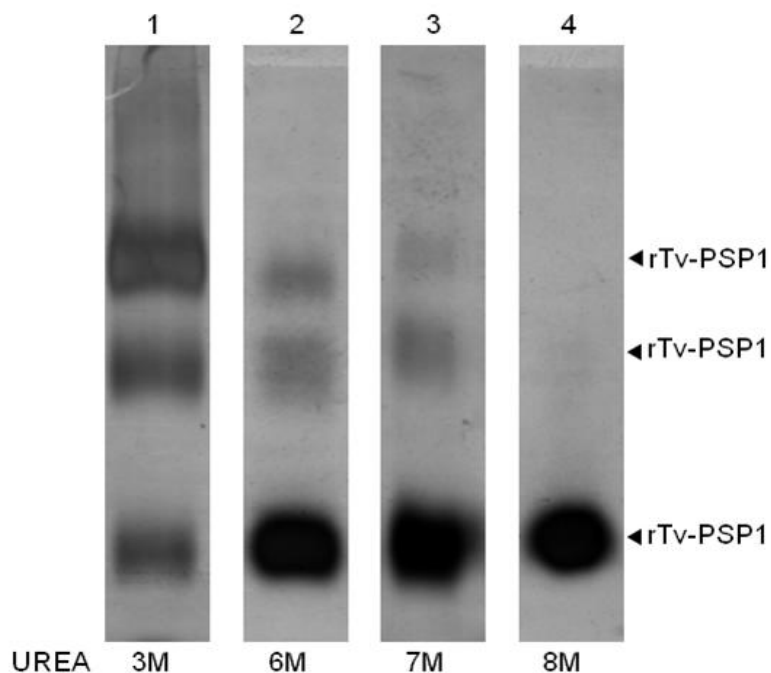
Los aminoácidos que se encuentran en contacto entre las subunidades se mapearon en la estructura trimérica de la proteína Tv-PSP1 (Fig. 16 A) y se mapearon en proteínas cristalizadas de la familia PSP cuyos patrones se observan similares entre miembros de la misma familia (Fig. 16 B).



**Figura 16. Residuos en contacto entre las subunidades de proteínas PSP.** A) Modelo de el homotrímero de Tv-PSP1, en rojo se marcan los aminoácidos que están en contacto entre subunidades B) Modelo de estructuras cristalizadas de proteínas PSP comparadas con la proteína Tv-PSP1, en rojo se marcan los aminoácidos que están en contacto entre subunidades.

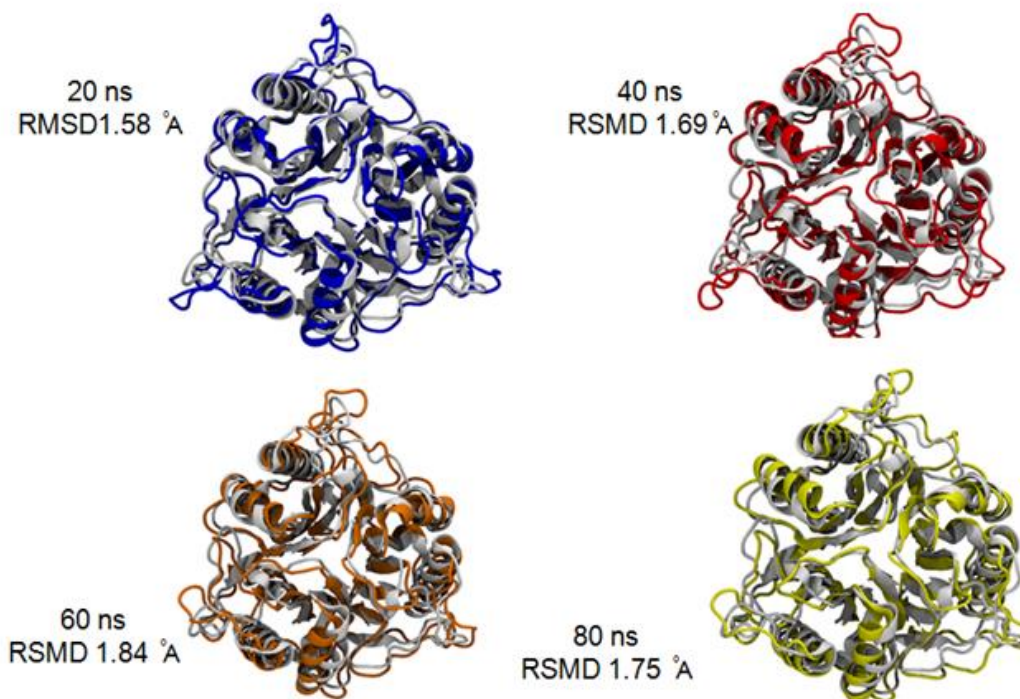
Mediante análisis computacionales se probó la conformación homotrimérica de la proteína Tv-PSP1, para determinar si esta estructura es estable lo abordamos por dos estrategias experimentales: 1) Ver su estabilidad a diferentes concentraciones de un agente caotrópico como la Urea y 2) Realizar una dinámica molecular de hasta 100 ns.

La proteína rTv-PSP1 en su conformación de homotrímero fue incubada con diferentes concentraciones de Urea (3M, 6M, 7M, 8M); posteriormente se analizó mediante electroforesis de una dimensión en condiciones nativas (PAGE), donde se observa una banda de alto peso molecular, misma que corresponde a la estructura trimérica. Esta conformación se encontró presente hasta una concentración de 7M de Urea y desaparece a mayores concentraciones (Fig. 17). Este primer resultado nos permite proponer que la formación de esta estructura es estable.



**Figura 17. Estabilidad de la proteína Tv-PSP1 en presencia de Urea.** Gel de acrilamida teñido con plata carril 1) Tv-PSP1 incubada con 3M de Urea, Carril 2) Tv-PSP1 incubada con 6M de Urea, 3) Tv-PSP1 incubada con 7M de Urea, 4) Tv-PSP1 incubada con 8M de Urea.

La dinámica molecular se realizó en tiempos de 20 hasta 100 ns. Las gráficas de la desviación estándar cuadrática media (RMSD) aportan información acerca de la estabilidad de la estructura, dinámica y la localización del equilibrio de una conformación espacial. Se tomaron lecturas a diferentes tiempos (20, 40, 60, 80, 100 ns) y la distancia obtenida entre el tiempo 0 y los 100 ns fue con un RMSD de 1.7 Å° a los 20 ns fue de 1.58 Å, a 40 ns 1.69 Å, a 60 ns 1.84 Å y a 80 ns 1.68 Å (Fig. 18), por lo que se considera una estructura estable a través del tiempo.

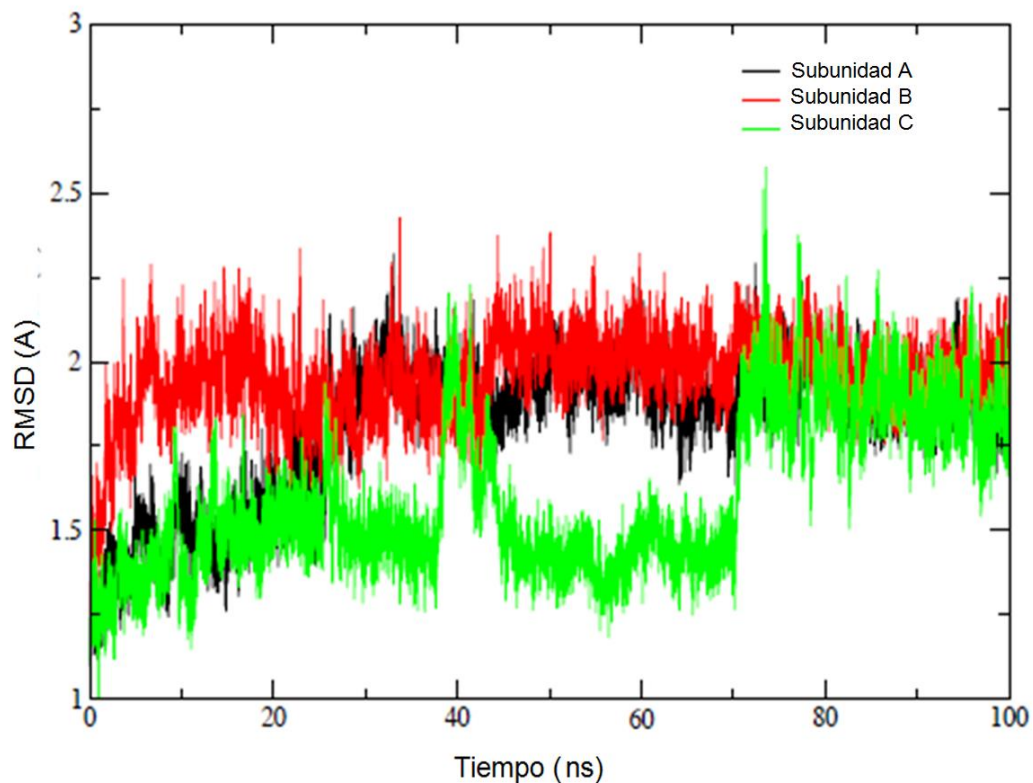


**Figura 18. Dinámica molecular del homotrímero de la proteína Tv-PSP1.** Figuras representativas del movimiento de las moléculas a través del tiempo donde la imagen gris representa el tiempo cero, y las de color los diferentes tiempos. Se muestra el tiempo transcurrido en la dinámica y el valor RMSD de las estructuras.

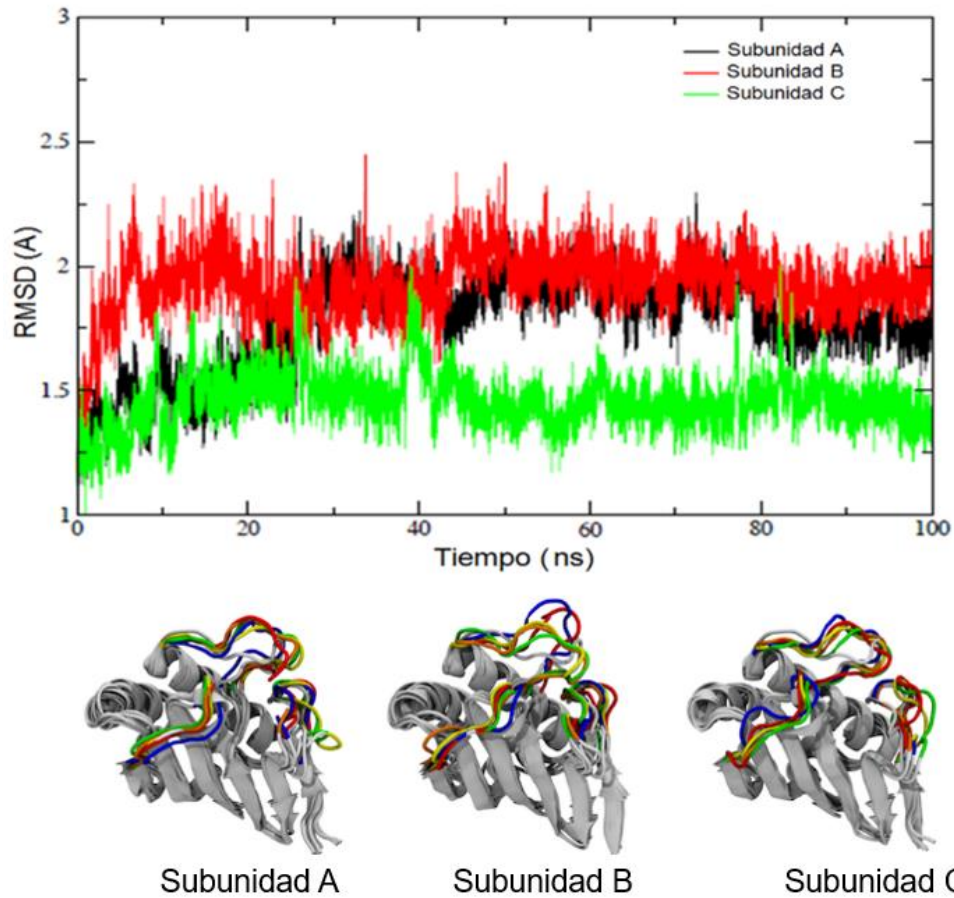
El análisis de la fluctuación de cada subunidad durante la dinámica molecular se muestra en la siguiente grafica (Fig. 19). De manera interesante, se observa que una de las subunidades no presenta la misma estabilidad que las otras dos subunidades durante el transcurso de la dinámica; sugerimos que esta inestabilidad posiblemente esté dada por las regiones desordenadas que presenta la proteína, por lo cual se realizó nuevamente la dinámica molecular, pero sin las regiones desorganizadas presentes en Tv-PSP1. Los resultados muestran una mayor estabilidad en el comportamiento de los aminoácidos a lo largo de la dinámica de los 100 ns de las tres subunidades (Fig. 20 A). Una vez que se demostró que las regiones desordenadas eran las que presentaban este comportamiento se modeló por separado estas regiones de cada subunidad a lo largo de la dinámica (Fig. 20 B)

Con estos resultados determinamos que la estructura homotrimérica de la proteína Tv-PSP1 es estable, a pesar de que las regiones desordenadas de al menos uno de los monómeros presentan mayores fluctuaciones.

Con todos los datos obtenidos a nivel de estructura, solubilidad y secuencia corroboran que la proteína Tv-PSP1 es miembro de la familia YER057c/YjgF/UK114.



**Figura 19. Gráfica de la dinámica molecular de 100 ns de la proteína Tv-PSP1.** Cada color representa una subunidad del homotrímico de la proteína Tv-PSP1 donde se muestran los valores de RMSD a través del tiempo.



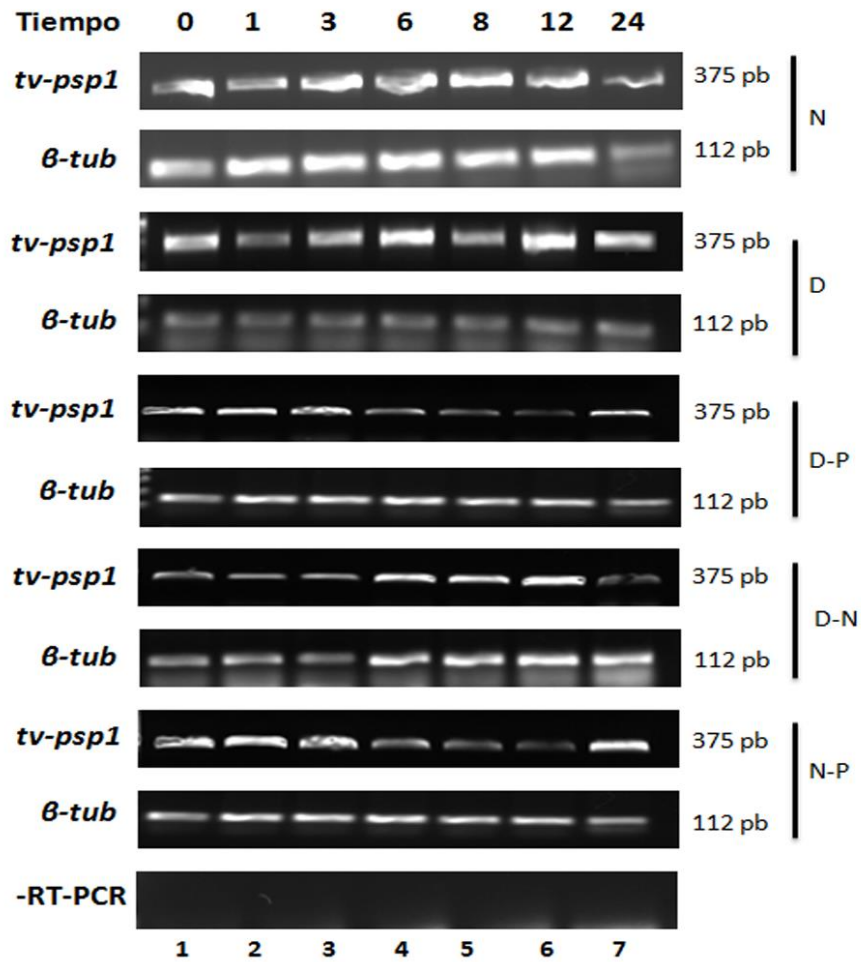
**Figura 20. Gráfica de la dinámica molecular de 100 ns de la proteína Tv-PSP1 sin la presencia de loops.** A) Cada color representa una subunidad del homotrímero de la proteína Tv-PSP1 donde se muestran los valores de RMSD a través del tiempo. B) Representación del movimiento de las subunidades donde se puede observar en colores el movimiento de los loops a los diferentes tiempos.

## 7.2 Estabilidad del ARNm de Tv-PSP1 en presencia y ausencia de poliaminas

Previamente se demostró que las poliaminas regulan negativamente la expresión del gen *tvI-psps1* debido a que se observó una disminución en la expresión del gen cuando se encuentra en un ambiente con putrescina exógena (Villalobos-Osnaya, 2011), esto es interesante debido a que se ha reportado que la actividad de algunas RNAsas pueden ser inhibidas por poliaminas como la espermina y putrescina (Kaspetsky, et al 1977, Isola, et al, 1989); sin embargo, no se ha descrito si estos cationes afectan desde la transcripción, es por ello que decidimos analizar la vida media del transcrito, y determinar si es regulado por cationes como la putrescina como ya se ha reportado en otros genes de *T. vaginalis* (Carvajal-Gamez, et al., 2014).

Para determinar la vida media del transcrito de *tvI-psps1* se realizó una cinética de tiempo (0, 1, 3, 6, 8, 12, 24 h) mediante la adición de Actinomicina D, el cual inhibe síntesis de ARN mediante la formación de un complejo estable con el ADN.

De manera interesante el transcrito del gen *tv-psp1* no desaparece durante la cinética de 24h, en presencia de putrescina exógena manteniéndose constante a través del tiempo (Fig. 21), posiblemente una cinética con tiempos más prolongados permitiría observar algún efecto en la presencia del transcrito.



**Figura 21** Expresión del gen de *tv-psp1* en presencia y ausencia de putrescina. Geles de agarosa al 2% donde se muestra la expresión del transcrito en las diferentes condiciones de poliaminas donde *tv-psp1* presenta un tamaño de 375 pb y como control de carga se utilizó el gen de  $\beta$ -*tubulina* con un tamaño esperado de 112 pb al final del panel se muestra uno de los controles de sin la enzima RT de las condiciones aquí probadas. N: Normal, D: DAB, D-P: DAB-Putrescina, D-N: DAB-Normal, N-P: Normal-Putrescina.

### 7.3 Localización celular de Tv-PSP1

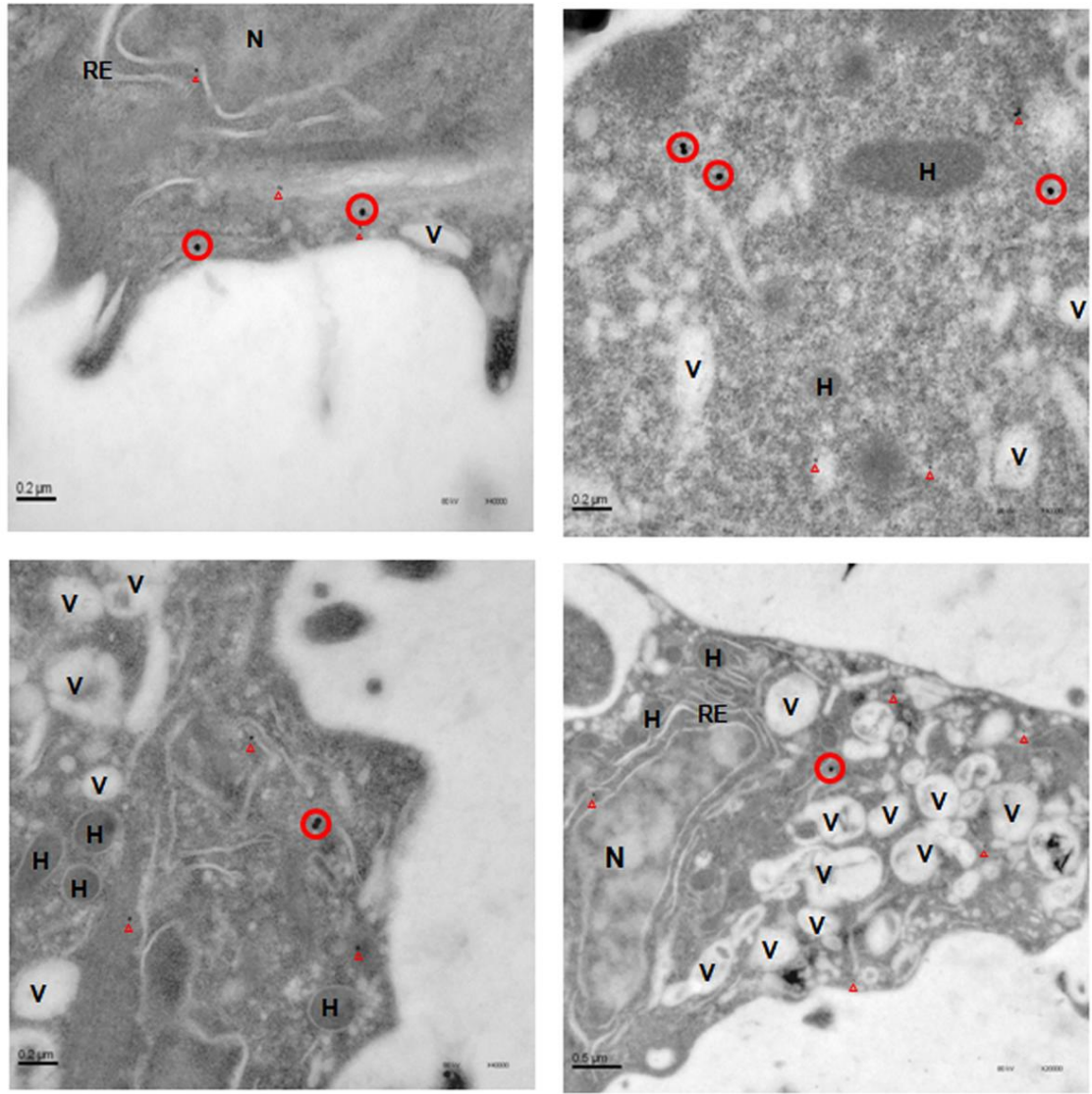
En la célula los organelos tienen funciones muy específicas, a diferentes niveles de regulación celular y/o procesos biológicos para la sobrevivencia de los organismos, por lo que determinar la localización celular de alguna proteína permite proponer la función en la que podría estar participando. Como ya se mencionó antes las proteínas de la familia YER057c/YjgF/UK114 no presentan una localización específica en la célula en los diferentes organismos, así como tampoco se ha reportado una función específica.

Para determinar la localización celular de la proteína Tv-PSP1 utilizamos la técnica de microscopía electrónica de transmisión con un marcaje de partículas de oro, para la proteína Tv-PSP1 (30 nm), y como control utilizamos una proteína citoplasmática previamente reportada en *T. vaginalis* llamada Tv-eIF5a (15 nm).

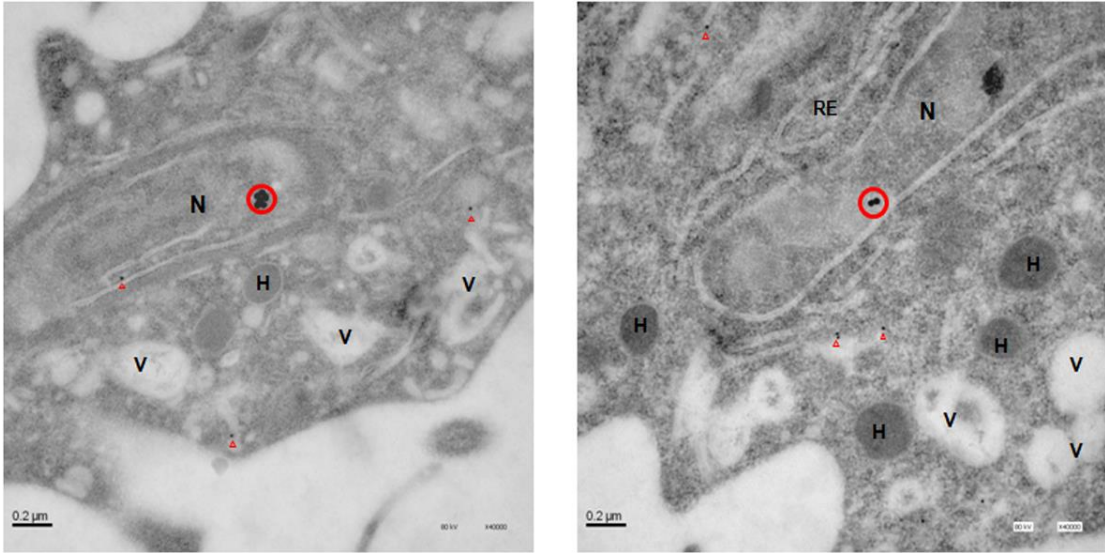
Los resultados de la localización celular de la proteína Tv-PSP1 mostraron a la proteína en citoplasma (Fig. 22), lo cual se esperaba debido a que ya se había visto en otros miembros de la familia YER057c/YjgF/UK114 y en parásitos como *E. histolytica*; sin embargo, no fue el único sitio celular que se determinó, ya que también fue encontrada en núcleo (Fig. 23) y en hidrogenosoma (Fig 24), como control se utilizó el anticuerpo secundario donde no se observa ningún tipo de reacción (Fig.25).

Con estos datos determinamos que la proteína Tv-PSP1 se encontró en más de un compartimento celular, lo cual no es extraño ya que en otros organismos se ha reportado la localización de proteínas de tipo PSP en más de un compartimento celular.

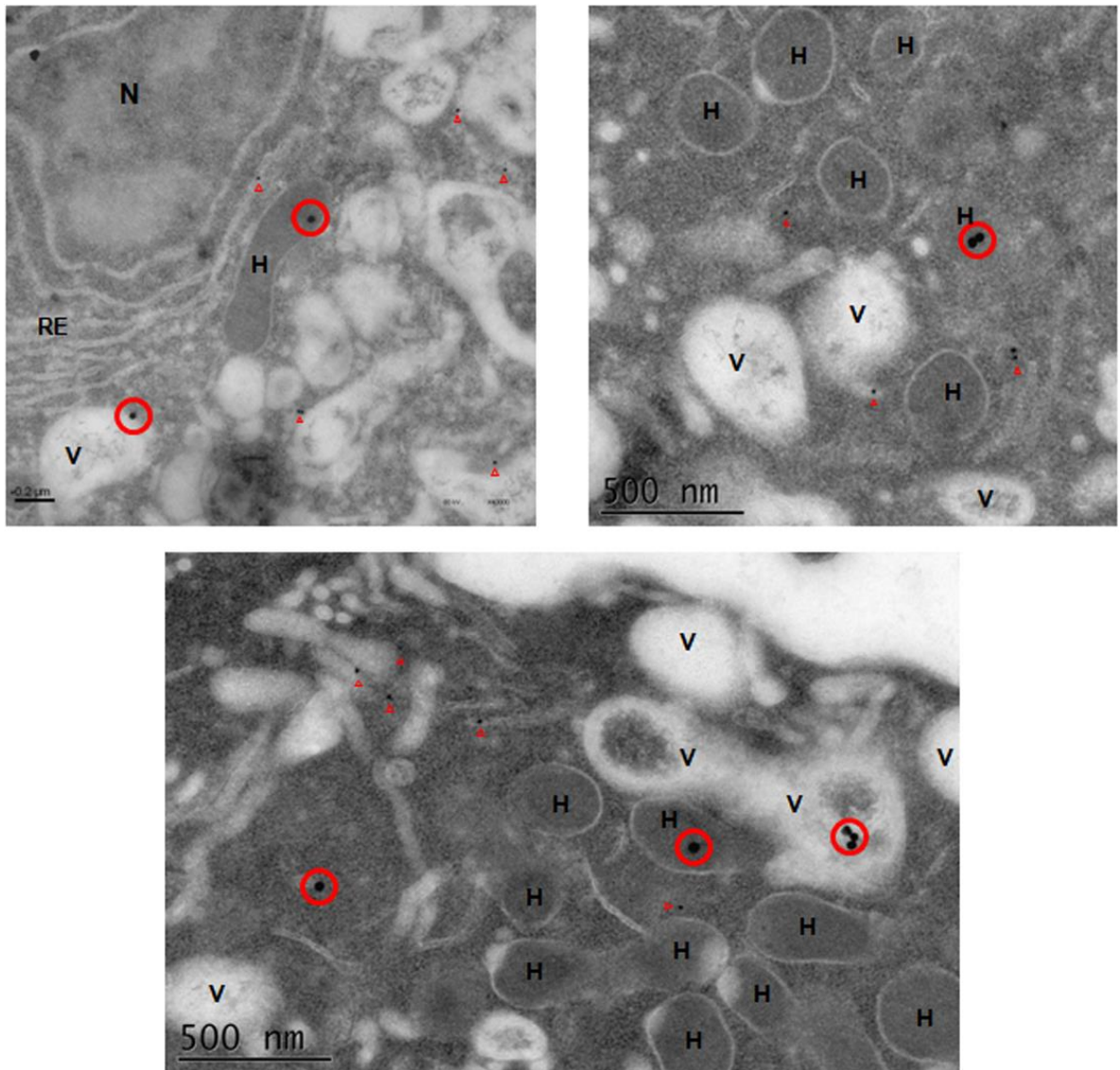
Es importante mencionar que las regiones donde se localizó la proteína Tv-PSP1 concuerdan con datos reportados previamente para otras proteínas de la familia YER057c/YjgF/UK114.



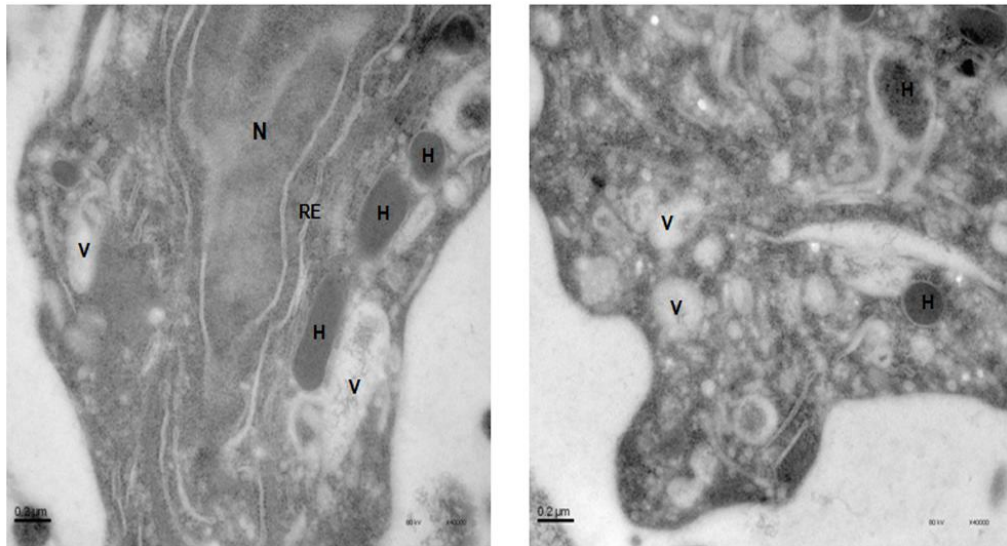
**Figura 22. Localización en citoplasma de la proteína Tv-PSP1 en *T. vaginalis*.** Microscopía electrónica de transmisión que muestra la localización en citoplasma de la proteína Tv-PSP1 marcada dentro de los círculos (30nm) y señalados con una cabeza de flecha el control citoplasmático TveIF-5A. N: núcleo, V: vacuola, RE: retículo endoplásmico, H: hidrogenosoma.



**Figura 23. Localización en núcleo de la proteína Tv-PSP1 en *T. vaginalis*.** Microscopía electrónica de transmisión que muestra la localización en núcleo de la proteína Tv-PSP1 marcada dentro de los círculos (30nm) y señalados con una cabeza de flecha el control citoplasmático TveIF-5A. N: núcleo, V: vacuola, RE: retículo endoplásmico, H: hidrogenosoma.



**Figura 24. Localización en hidrogenosomas de la proteína Tv-PSP1 en *T. vaginalis*.** Microscopía electrónica de transmisión que muestra la localización en hidrogenosoma de la proteína Tv-PSP1 marcada dentro de los círculos (30nm) y señalados con una cabeza de flecha el control citoplasmático TveIF-5A. N: núcleo, V: vacuola, RE: retículo endoplásmico, H: hidrogenosoma.



**Figura 25. Localización celular de la proteína Tv-PSP1 en *T. vaginalis*.** Microscopía electrónica de transmisión que muestra que no se presentó ningún tipo de reacción inespecífica utilizando los anticuerpos secundarios acoplados a la partícula de oro. N: núcleo, V: vacuola, RE: retículo endoplásmico, H: hidrogenosoma.

#### 7.4 Interacción de Tv-PSP1 con otras proteínas de *T. vaginalis*.

Análisis *in silico* previos en la secuencia de la proteína Tv-PSP1 mostraron la presencia de un dominio de endoribonucleasa, esto es interesante debido a que la función de ribonucleasa se ha reportado en otros miembros de la familia YER057c/YjgF/UK114. En el parásito *E. histolytica* se propuso que esta proteína participa en un mecanismo de degradación de ARNm mediante la interacción con otras proteínas, con estos antecedentes proponemos que la proteína Tv-PSP1 podría participar en algún mecanismo de degradación del ARNm, por lo que se determinó el posible interactoma de Tv-PSP1 utilizando dos estrategias: 1) Mediante un análisis *in silico* en la base de datos STRING y 2) Mediante ensayos de inmunoprecipitación.

La base de datos STRING realiza las predicciones de las interacciones entre proteínas utilizando datos experimentales (importados de fuentes primarias como co-purificaciones, co-cristalizaciones, interacciones génicas, ensayos de doble híbrido etc), bases de datos (bases de datos curadas de rutas metabólicas conocidas, complejos proteicos, rutas de traducción de señales etc.), extracción de textos (búsqueda de proteínas que son mencionadas frecuentemente juntas), Neighborhood (grupos de genes que son frecuentemente observados en otros neighborhood genómicos), co-ocurrencia (familias de genes cuyos patrones de ocurrencia a través de los genes muestran similitudes) y co-expresión (proteína cuyo gen se observa que se correlaciona en la expresión, a través de una gran cantidad de experimentos).

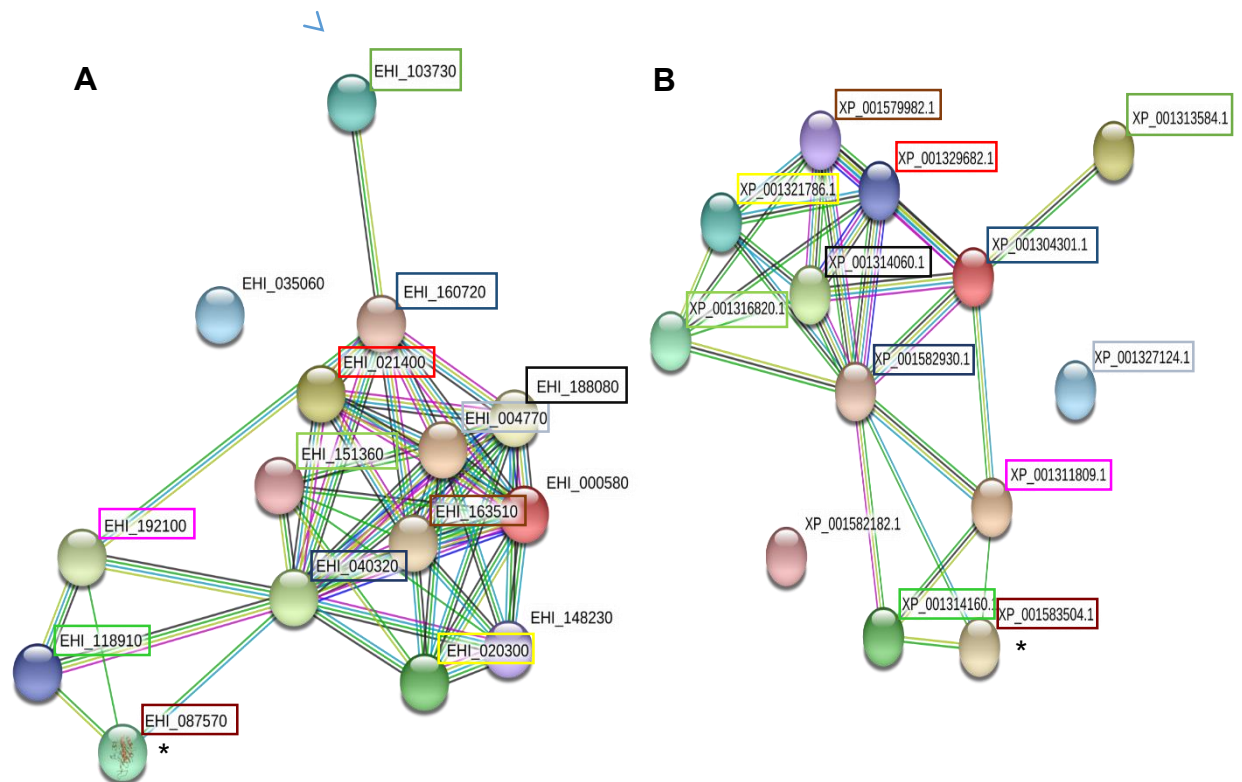
El análisis en la base de datos STRING, se realizó de mediante dos estrategias 1) utilizando como base lo reportado por López-Rosas 2014 basándonos en el complejo exosoma y que interaccionan con EhL-PSP se realizó la búsqueda de las proteínas homólogas en *T. vaginalis* 2) la predicción del posible interactoma de la proteína Tv-PSP1 con los parámetros del programa STRING.

Las proteínas homólogas de *T. vaginalis* del exosoma de *E. histolytica* reportados por López-Rosas se muestran en la tabla 12

**Tabla 12.** Proteínas de *E. histolytica* que interactúan con EhL-PSP y sus homólogas en *T. vaginalis* que posiblemente interactúan con Tv-PSP1.

<i>E. histolytica</i>		Homólogos de <i>T. vaginalis</i>		
ID	Proteína	ID	Proteína	ID TrichDB
<b>EHI_087570</b>	Endoribonucleasa	<b>XP_001583504.1</b>	Proteína Hipotética	TVAG_035410
<b>EHI_118910</b>	Guanilato Quinasa	<b>XP_001314160.1</b>	Guanilato Quinasa	TVAG_344860
<b>EHI_035060</b>	Fumarato Hidratasa	-----	-----	
<b>EHI_103730</b>	Treonil-tRNA sintetasa	<b>XP_001313584.1</b>	Treonil-tRNA sintetasa	TVAG_208470
<b>EHI_192100</b>	Inosina Trifosfato	<b>XP_001311809.1</b>		TVAG_210730
<b>EHI_040320</b>	3´Exoribonucleasa	<b>XP_001582930.1</b>	3´Exoribonucleasa	TVAG_250040
<b>EHI_020300</b>	Proteína Ribosoma L15	<b>XP_001321786.1</b>	Proteína Ribosoma L15 I	TVAG_148950
<b>EHI_151360</b>	Proteína no caracterizada	<b>XP_001316820.1</b>	Proteína hipotética	TVAG_233330
<b>EHI_000580</b>	Exonucleasa del complejo exosoma	<b>XP_001329682.1</b>	Proteína like auto-antígeno nucleolar	TVAG_453750
<b>EHI_188080</b>	3´Exoribonucleasa	<b>XP_001314060.1</b>	Proteína hipotética	TVAG_027130
<b>EHI_163510</b>	Exoribonucleasa RRP4	<b>XP_001579982.1</b>	Exonucleasa	TVAG_246740
<b>EHI_004770</b>	Proteína no caracterizada	<b>XP_001327124.1</b>	Proteína hipotética	TVAG_380110
<b>EHI_160720</b>	Exonucleasa compleja exosoma	<b>XP_001304301.1</b>	Proteína similar RNB	TVAG_311220
<b>EHI_021400</b>	Componente 10 Exosoma	<b>XP_001582182.1</b>	3´5´Exonucleasa	TVAG_283650

Una vez obtenidas las secuencias de las proteínas homólogas de *T. vaginalis* se realizó una predicción de interacción en el programa STRING la cual al compararse con lo previamente reportado por López-Rosas muestra que se conserva la mayoría de las predicciones de interacción reportadas en *E. histolytica* (Fig. 26).



**Figura 26. Análisis comparativo de los interactomas predichos de EhL-PSP y Tv-PSP1 utilizando el programa STRING.** (A) Mapa de predicción de interacción de proteínas de *E. histolytica* (B) Mapa de interacción de proteínas de *T. vaginalis*. Las proteínas PSP de ambos organismos se identifican con un asterisco (\*), los homólogos de cada proteína se encuentran enmarcados en rectángulos cuyo color coincide. Las líneas representan el método mediante el cual fue predicha la interacción: experimental (rosa), bases de datos (azul), extracción de textos (amarillo), neighborhood (verde), co-ocurrencia (azul fuerte), co-expresión (negro).

Por otra parte, se realizó una predicción de interacción de proteínas utilizando solamente la secuencia de aminoácidos de la proteína Tv-PSP1, obteniendo un interactoma con 10 posibles interacciones proteína-proteína (Tabla 13) cuya identidad es principalmente proteínas de tipo hipotéticas; sin embargo, cabe mencionar que algunas de ellas son de la familia de las 3' exoribonucleasa (Fig. 27).

Tabla 13. Proteínas predichas que interactúan con la proteína Tv-PSP1 de *T. vaginalis* utilizando el programa STRING.

***T. vaginalis***

<b>ID Proteína</b>	<b>Nombre de la proteína</b>	<b>ID TrichDB</b>
<b>XP_001277024.1</b>	Proteína hipotética	TVAG_121140
<b>XP_001322588.1</b>	Factor de Elongación TU (unión a GTP)	TVAG_109490
<b>XP_001321791.1</b>	Proteína hipotética	TVAG_276410
<b>XP_001317139.1</b>	Proteína hipotética	TVAG_016880
<b>XP_001582930.1</b>	Familia 3' exoribonucleasa dominio 1	TVAG_250040
<b>XP_001317083.1</b>	Familia 3' exoribonucleasa dominio 1	TVAG_287740
<b>XP_001307267.1</b>	Familia 3' exoribonucleasa dominio 1	TVAG_441569
<b>XP_001316265.1</b>	Proteína hipotética	TVAG_055280
<b>XP_001580923.1</b>	Proteína hipotética	TVAG_113950
<b>XP_001579037.1</b>	Proteína hipotética	TVAG_113950

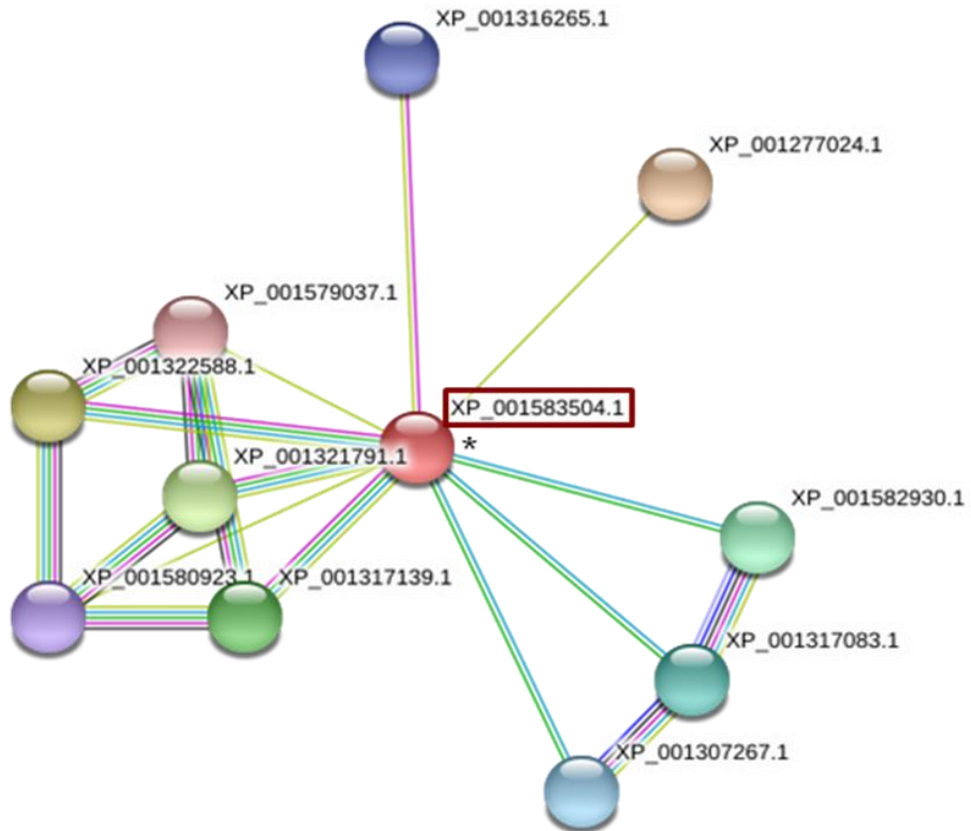


Figura 27. Mapa del interactoma de Tv-PSP1 utilizando la base de datos STRING. La proteína Tv-PSP1 se identifica con un asterisco (\*). Las líneas representan el método mediante el cual fue predicha la interacción: experimental (rosa), bases de datos (azul), extracción de textos (amarillo), neighborhood (verde), co-ocurrencia (azul fuerte), co-expresión (negro).

Con el análisis en STRING encontramos predicciones de interacciones de la proteína Tv-PSP1 con proteínas que podrían estar relacionadas en un mecanismo de degradación del ARNm.

Por otra parte, para el ensayo de inmunoprecipitación se utilizaron anticuerpos anti rTv-PSP1 y extractos totales de *T. vaginalis*, las proteínas resultantes de la interacción se identificaron mediante espectrometría de masas.

Se identificaron 8 proteínas que podrían estar interactuando con la proteína Tv-PSP1 (Tabla 14); sin embargo, 5 de estas proteínas se encuentran anotadas en el genoma de *T. vaginalis* como proteínas hipotéticas.

Tabla 14. Proteínas identificadas por espectrometría de masas

<b>ID</b>	<b>Proteína</b>
TVAG_364900	Posible proteína contiene bromodominio
TVAG_426270	Proteína hipotética conservada
TVAG_296310	Proteína hipotética conservada
TVAG_080140	Proteína hipotética conservada
TVAG_128900	Proteína hipotética conservada
TVAG_350200	Proteína hipotética conservada
TVAG_412960	Proteína atípica de la familia PIKK
TVAG_267870	Posible enzima málica

El gen localizado en TVAG\_296310 codifica para una de las proteínas identificadas, la cual presenta motivos de reconocimiento de ARN (RNA recognition motif (RRM)). Por otra parte, se identificó una proteína málica cuyo gen se localiza en el TVAG\_267870, esto es interesante ya que nosotros localizamos a la proteína Tv-PSP1 en el hidrogenosoma, compartimento en el que se han localizado proteínas tipo málica.

Con los resultados obtenidos mediante predicciones *in silico* y experimentales se sugiere que la proteína Tv-PSP1 podría estar participando en algún mecanismo de degradación del ARNm, al presentar predicciones de interacción con proteínas de tipo exoribonucleasas. Por otra parte, también se identificó una proteína presente en el hidrogenosoma, lo cual es consistente con la previa localización celular de la proteína Tv-PSP1.

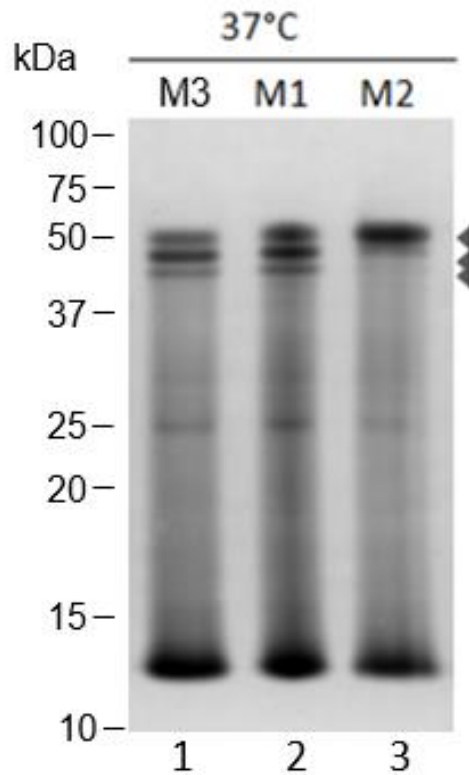
## 7.5 Participación de Tv-PSP1 en la degradación del ARNm de *tvcp39* en *T. vaginalis*.

Ensayos de degradación de ARN total fueron realizados para determinar si la proteína Tv-PSP1 presenta actividad de RNAsa, como primer paso se buscó el amortiguador en el cual la proteína pudiese estar más estable y por lo tanto favorecer la actividad de RNAsa.

Mediante una búsqueda bibliográfica se eligieron dos amortiguadores, los cuales favorecen la actividad de endoribonucleasas y exoribonucleasa y se decidió comparar con el amortiguador donde la proteína forma la estructura trimérica (Tabla 15), se adicionó la proteína rTvL -PSP1 a cada uno de los amortiguadores y se incubó a 37°C, los productos de la incubación se corrieron en un gel de acrilamida en condiciones nativas (Fig. 28), donde se pudo observar la presencia de una sola banda en el amortiguador M2, no así en los amortiguadores M1 y M3, lo que podría representar una estabilidad mayor de la proteína homotrimérica en el amortiguador M2, motivo por el cual se eligió el amortiguador 2 para llevar a cabo los experimentos.

Tabla 15. Amortiguadores candidatos para del ensayo de ribonucleasa

<b>Amortiguador M1</b>	<b>Amortiguador M2</b>	<b>Amortiguador M3</b>
<b>25 mM Tris HCl</b>	50 mM Tris HCl	50 mM Tris HCl
<b>30 mM NaCl</b>	75 mM KCl	150 mM NaCl
<b>0.5 mM EDTA</b>	3 mM MgCl <sub>2</sub>	1 mM EDTA
<b>1mM DTT</b>	10 mM DTT	1mM DTT

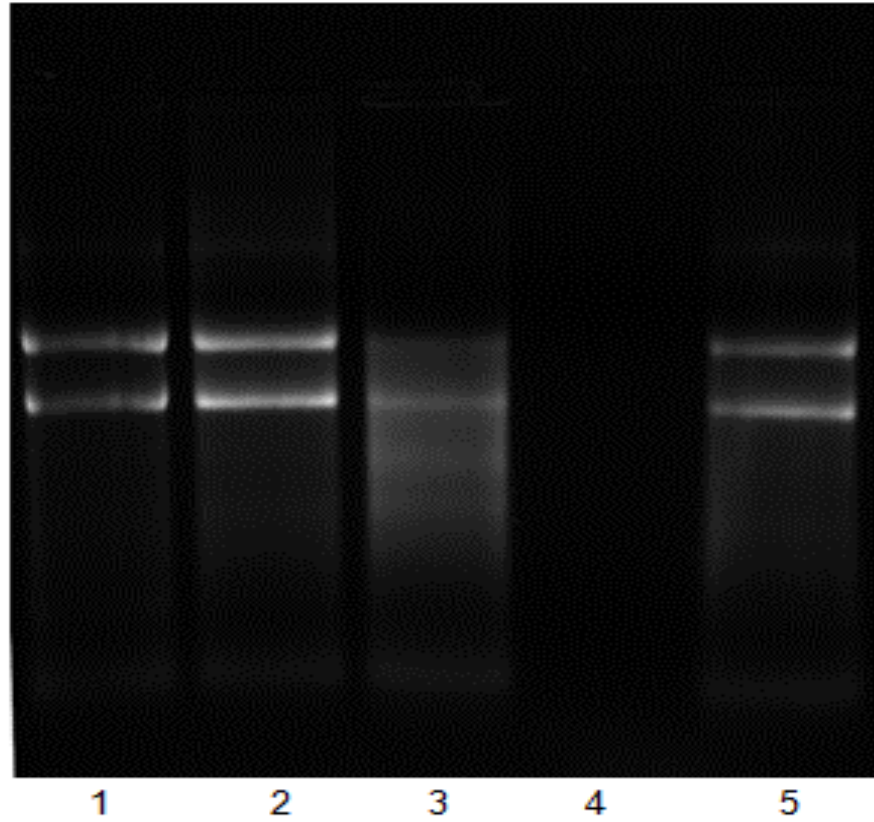


**Figura 28. Estabilidad de la estructura cuaternaria de la proteína Tv-PSP1.** Gel de poliacrilamida al 15% teñido con plata carril 1 Tv-PSP1 en amortiguador M3, carril 2 Tv-PSP1 en amortiguador M1, carril 3 Tv-PSP1 en amortiguador M2 después de 30 min de incubación a 37°C.

Una vez que se observó que la proteína rTv-PSP1 conserva la estructura cuaternaria se analizó si es capaz de degradar ARN total de *T. vaginalis*.

El ensayo de degradación de ARN total se realizó utilizando 0.12 pM de la proteína Tv-PSP1 en el amortiguador M2 y 2 µg de ARN total, los cuales se incubaron a 37°C y se resolvió en un gel de agarosa al 1.7%. Se puede observar una degradación parcial del ARN total en presencia de la proteína rTv-PSP1, no así en aquellos carriles donde no está presente la proteína, como control positivo se utilizó la RNasa A observándose la degradación total del ARN total (Fig. 29).

RNA	+	+	+	+	+
Tv-PSP1	-	-	+	-	-
GST	-	+	-	-	-
RNAse A	-	-	-	+	-
MOCK	-	-	-	-	+



**Figura 29. Ensayo de degradación de ARN total.** Gel al 1.5% teñido con red gel carril 1 ARN-T, carril 2 ARN-T con proteína GST carril 3 ARN-T con Tv-PSP1, carril 4 ARN-T con RNAse A carril 5 ARN-T con MOCK de *E. coli*. Todas las muestras se incubaron en el amortiguador M2 y se corrieron después de incubación a 37°C.

El resultado muestra que la proteína rTv-PSP1 puede degradar el ARN total. Por otra parte, se sabe que las endoribonucleasas pueden ser específicas de secuencia o que actúan mediante la identificación de estructuras secundarias del ARN.

En *T. vaginalis*, se han descrito dos estructuras secundarias presentes en los 3'UTRs de los ARNm, denominadas IRE (de sus siglas en inglés, Elementos de respuesta a hierro) y ERE (de sus siglas en inglés, Elementos de Respuesta a eIF5A) esta última estructura se ha reportado se encuentra presente en un gen *tvcp39*, el cual participa en la citotoxicidad del parásito; por lo tanto la proteína Tv-PSP1 podría reconocer alguna de estas secuencias y degradar el ARNm de genes de proteínas que participan en mecanismos como la citotoxicidad, importantes para la supervivencia del parásito.

Para probar si la proteína rTv-PSP1 es capaz de reconocer estas estructuras de tipo tallo y burbuja en los ARNm para llevar a cabo su degradación se realizaron ensayos de degradación con sondas de estructuras IRE y ERE previamente reportadas (Fig 30) (Torres-Romero and Arroyo 2009, Carvajal-Gamez, et al., 2016).

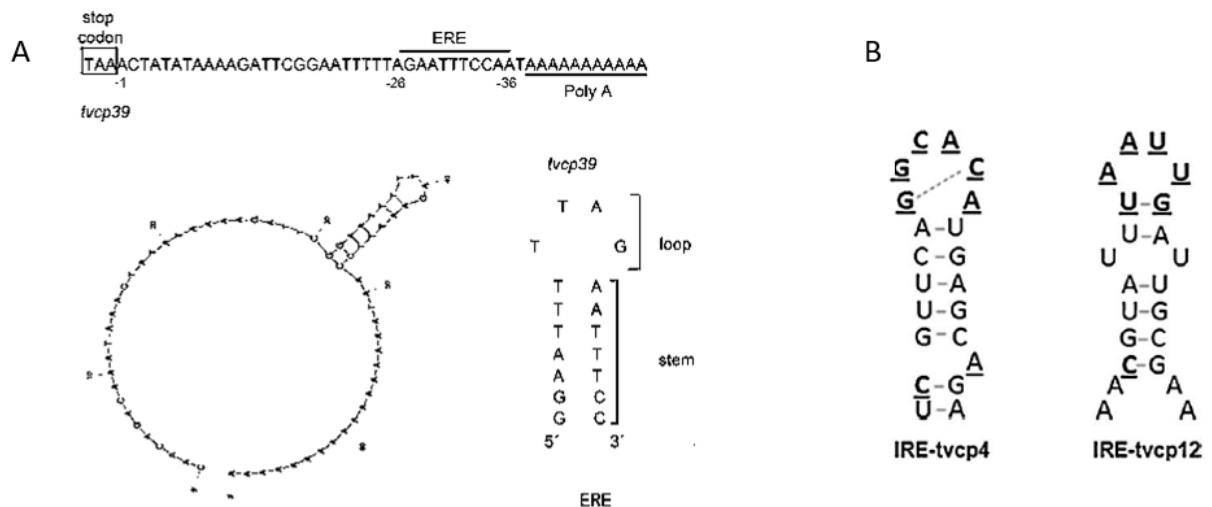
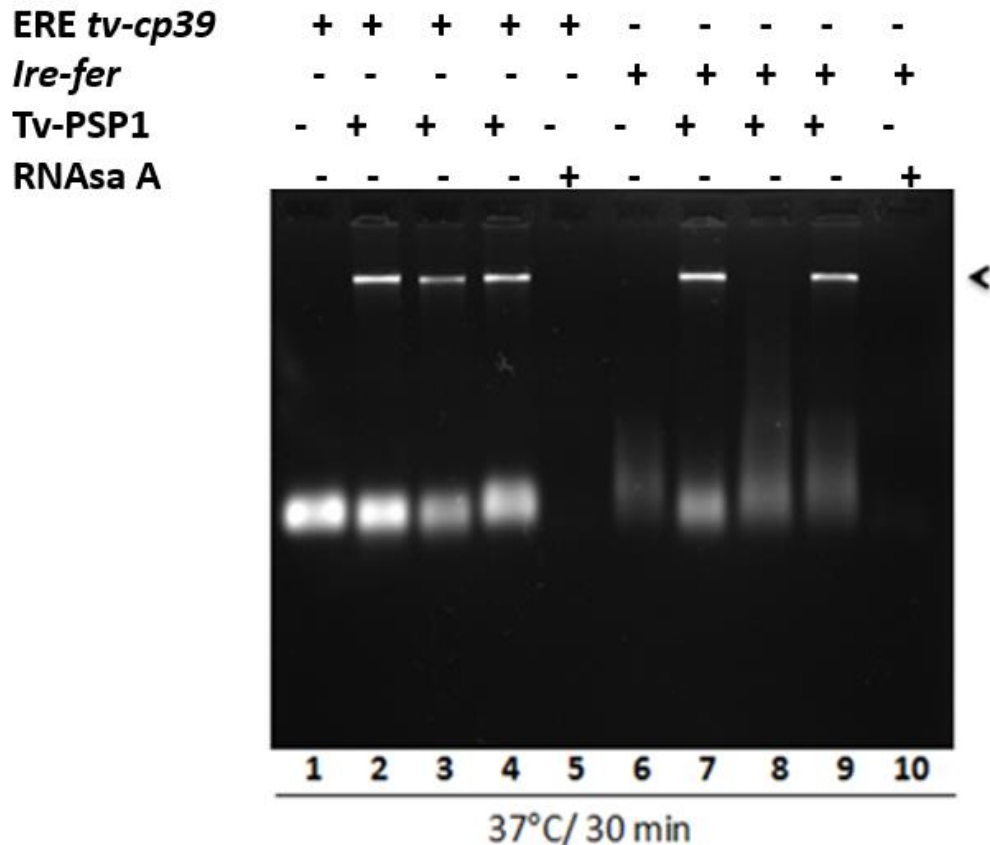


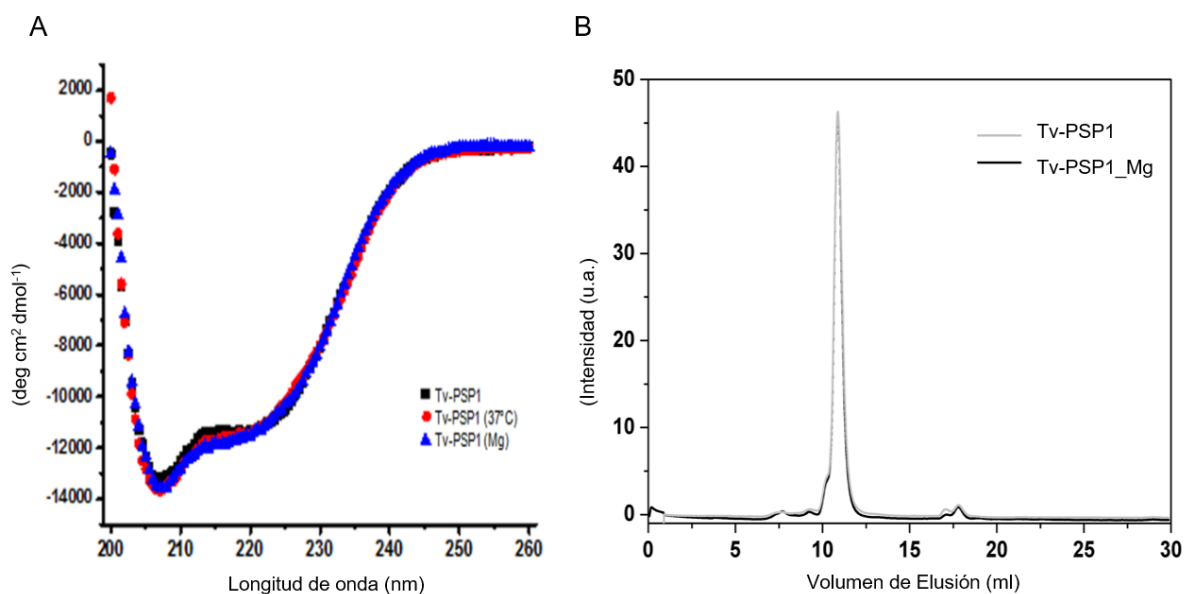
Figura 30 **Estructuras secundarias predichas ERE e IRE de *T. vaginalis*** A) Estructura ERE imagen tomada de Carvajal-Gamez 2016 B) Estructura secundaria IRE tomada de Torres-Romero, 2009)

Para los ensayos de degradación se incubó la proteína y las sondas con los amortiguadores previamente mencionados con el objetivo de determinar cuál de ellos favorecía la actividad de la proteína Tv-PSP1 en el reconocimiento de estructuras de tipo tallo y burbuja del ARN para su posterior degradación, la interacción se incubó a 37°C y se resolvió en un gel de agarosa al 1.7% donde se puede observar que la proteína Tv-PSP1 es capaz de reconocer e interactuar con las dos secuencias; sin embargo, solo fue capaz de degradar el ARN correspondiente a la secuencia del IRE cuando se encuentra en presencia del amortiguador M2 (Fig. 31).



**Figura 31. Ensayo de degradación de IRE y ERE de *T. vaginalis*.** Gel al 1.7% teñido con red gel carril 1 sonda *tvcp39*, carril 2 sonda *tvcp39* con Tv-PSP1 amortiguador M1, carril 3 sonda *tvcp39* con Tv-PSP1 amortiguador M2, carril 4 sonda *tvcp39* con Tv-PSP1 amortiguador M4, carril 5 sonda *tvcp39* con RNAsa A carril 6 sonda *ire-fer*, carril 7 sonda *ire-fer* con Tv-PSP1 amortiguador M1, carril 8 sonda *ire-fer* con Tv-PSP1 amortiguador M2, carril 9 sonda *ire-fer* con Tv-PSP1 amortiguador M4 carril 10 sonda *tvcp39* con RNAsa A se corrieron después de incubación a 37°C.

De manera interesante, en presencia del amortiguador M2 se observa la degradación de la sonda IRE, es importante mencionar que la degradación del ARN-total y la sonda IRE presentaron una degradación parcial en presencia del amortiguador M2 en el cual previamente observamos una banda de la conformación homotrimérica de la proteína (Fig. 28). Este amortiguador contiene el catión  $Mg^{2+}$  por lo que analizamos si la presencia de este catión podría estar estabilizando la estructura oligomérica de la proteína, y de esta manera favoreciendo la actividad de RNAsa de Tv-PSP1. Para determinar si se presentaba algún cambio en su estructura secundaria, nosotros realizamos análisis de DC (Fig. 32A) y cromatografía de exclusión molecular en presencia de Mg (Fig. 32B); sin embargo, no logramos observar diferencias estructurales con las analizadas anteriormente.



**Figura 32. Análisis de la estructura secundaria y cuaternaria de la proteína Tv-PSP1 en presencia de  $Mg^{2+}$ .** A) Sobreposición de los espectros de DC de la proteína Tv-PSP1 a 25°C, 37°C y en presencia de  $Mg^{2+}$ , B) Sobreposición de los cromatogramas obtenidos de la proteína Tv-PSP1 en presencia y ausencia de  $Mg^{2+}$ .

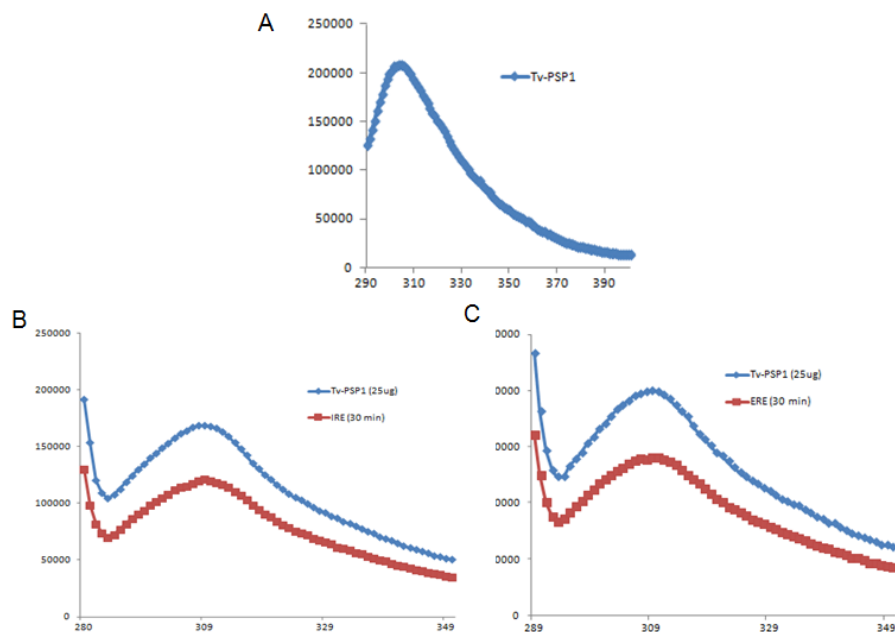
Otras metodologías utilizadas para determinar si existe una interacción entre la proteína Tv-PSP1 y las estructuras tallo y burbuja (IRE y ERE) fueron fluorescencia intrínseca y docking molecular *in silico*.

En las proteínas la fluorescencia intrínseca se mide a partir de la presencia de los aminoácidos aromáticos, la secuencia de la proteína Tv-PSP1 mostró la presencia de siete tirosinas, las cuales fueron funcionales para llevar a cabo este análisis.

Primero se midió el espectro de la proteína Tv-PSP1 sin las sondas (Fig. 33 A), posteriormente se realizaron incubaciones cada 15 min a 37°C con las sondas de las estructuras ERE e IRE.

Cuando se incubó la proteína rTv-PSP1 con ambas sondas se observó una disminución en la emisión de la intensidad la cual es mayor a concentraciones crecientes de las sondas.

La gráfica representa el comportamiento de la emisión de luz durante los primeros 30 min de incubación de la proteína Tv-PSP1 y la sonda IRE (Fig. 33B) y la proteína Tv-PSP1 y la sonda ERE (Fig. 33C), la tendencia de la fluorescencia parece indicar que existe una interacción entre la proteína Tv-PSP1 y las estructuras secundarias de ARNm utilizadas en este estudio.



**Figura 33 Fluorescencia intrínseca de la proteína Tv-PSP1 y estructuras tallo y burbuja de ARNm de *T. vaginalis*.** A) Fluorescencia intrínseca de la proteína Tv-PSP1 B) Fluorescencia intrínseca de la proteína Tv-PSP1 con la estructura tallo y burbuja IRE C) Fluorescencia intrínseca de la proteína Tv-PSP1 con la estructura tallo y burbuja ERE

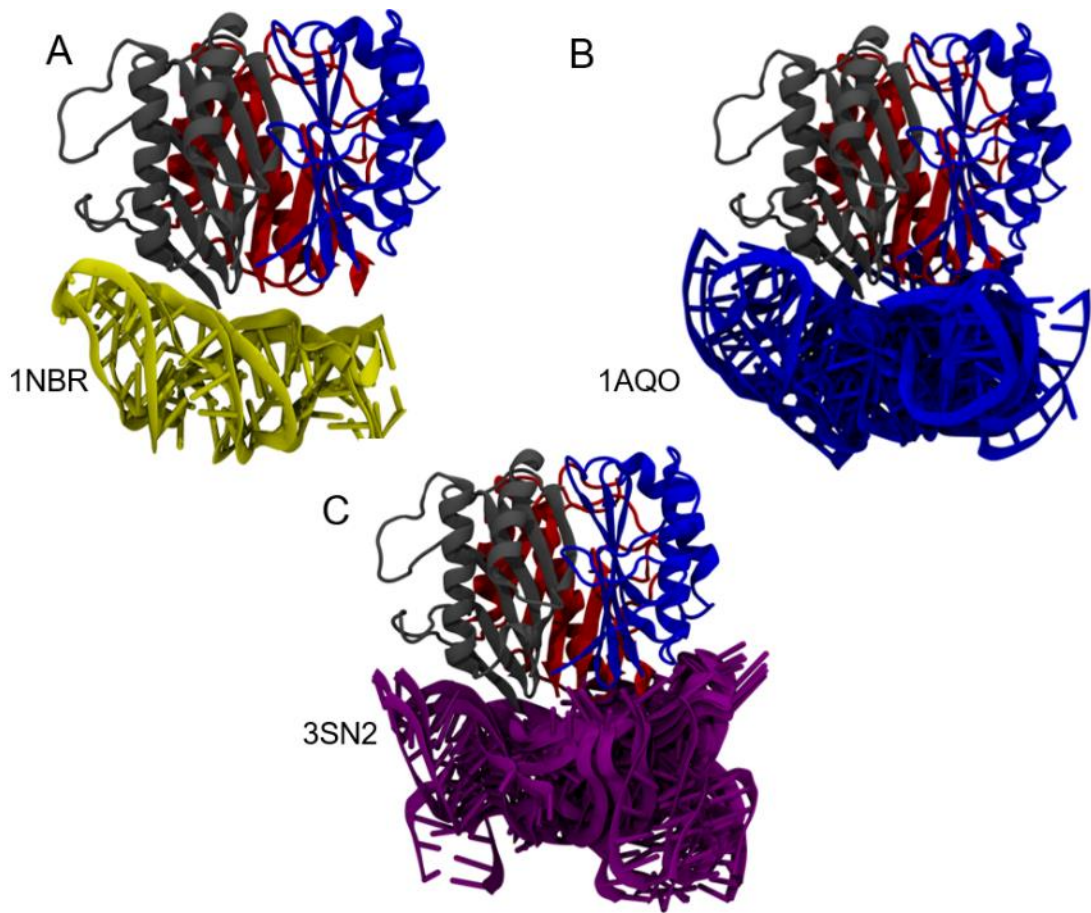
La metodología de docking (acoplamiento molecular) es una predicción teórica (*in silico*) de complejos que podrían formarse entre una proteína y su ligando dependiendo de las estructuras moleculares de cada uno, por lo que en la estructura más probable del complejo se sugerirá la que la energía de la interacción es mínima.

Para el docking molecular se utilizó el modelo homotrimérico previamente diseñado para la proteína Tv-PSP1, para las estructuras tallo y burbuja se utilizaron tres estructuras tallo y burbuja de tipo IRE obtenidas de la base de datos PDB, dos de las cuales fueron obtenidas por Resonancia Magnética Nuclear (NMR) ID: 1AQO y 1NBR de *H. sapiens* y una estructura cristalográfica de *O. cuniculus* ID: 3SN2, es importante mencionar que hasta el momento no existe registro de alguna estructura tipo ERE en la base de datos PDB; por lo tanto la predicción de acoplamiento solo se realizó entre la proteína Tv-PSP1 y la estructura IRE.

El análisis de acoplamiento contempló aquellos complejos que tuvieran una energía de interacción menor a 300 kcal/mol, de cada uno de las diferentes interacciones de la proteína Tv-PSP1 y la estructura IRE 3SN2 (Fig. 34 A), Tv-PSP1 y la estructura IRE 1AQO (Fig. 34 B), Tv-PSP1 y la estructura IRE 1NBR (Fig. 34 C). De manera interesante, la localización espacial de las estructuras IRE en su interacción con la proteína se localizan del mismo lado de la conformación trimétrica de la proteína Tv-PSP1, por lo tanto, se determinaron los posibles sitios de interacción entre las moléculas, para lo cual se consideraron los aminoácidos que se encontraban a menos de 5 Å de distancia entre la proteína Tv-PSP1 y la estructura tallo y burbuja IRE (TABLA 16).

**Tabla 16.** Posibles aminoácidos de la proteína Tv-PSP1 en contacto con las estructuras IRE del ARN.

<b>IRE</b>	<b>Aminoácidos de Tv-PSP1 en contacto con las estructuras IRE</b>
3SN2	1 2 3 4 5 6 7 8 9 21 22 23 24 25 26 27 28 59 61 62 63 64 65 66 67 69 70 98 123 124
1AQO	1 2 3 4 5 6 7 8 9 11 12 13 22 23 24 25 26 58 61 62 63 64 65 66 67 68 94 97 98 99 123 124
1NBR	1 2 3 4 5 6 22 23 24 25 62 63 64 65 123 124

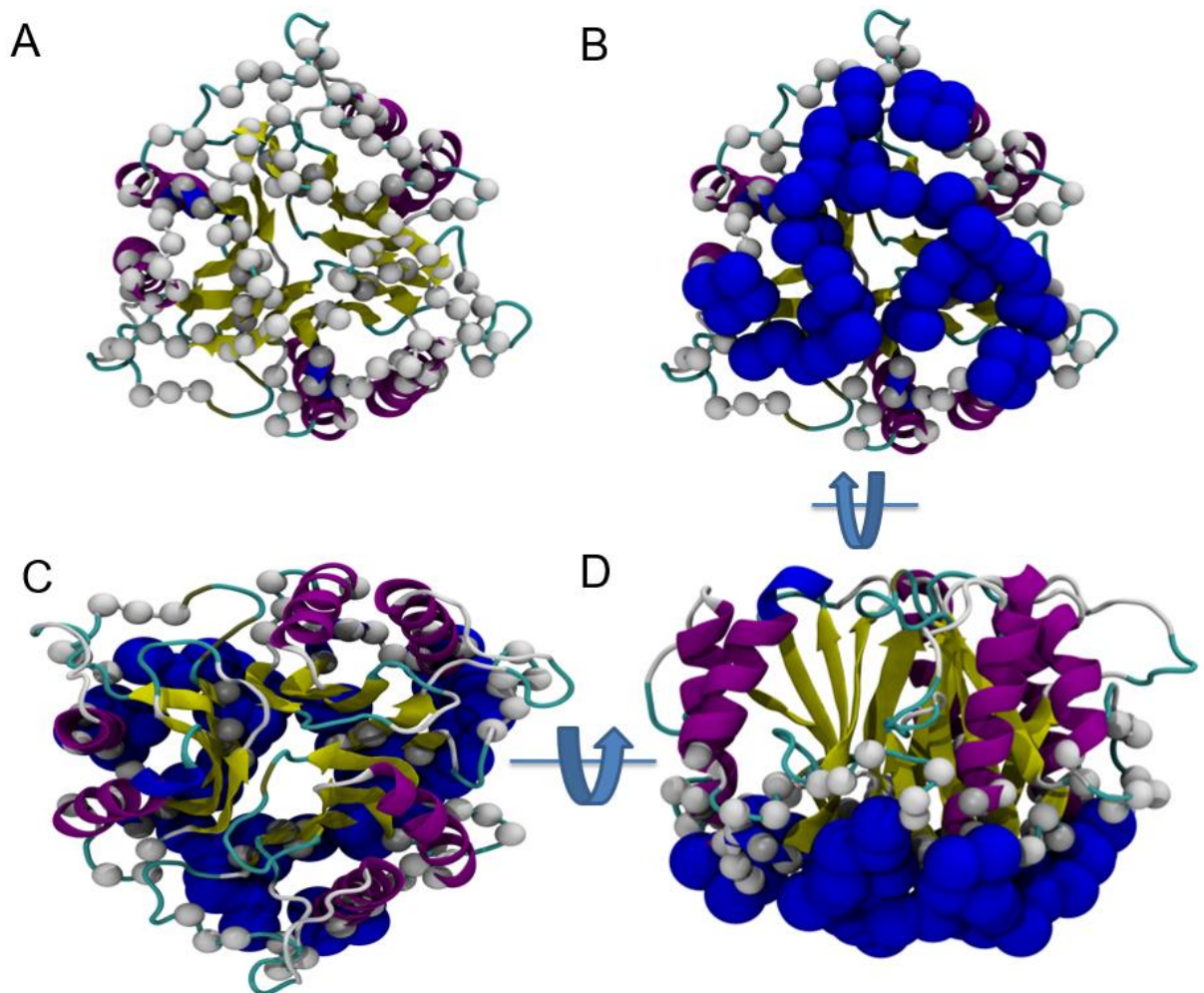


**Figura 34 Acoplamiento molecular de Tv-PSP1 y la estructura IRE.** Docking molecular de la proteína Tv-PSP1 con la estructura ERE A) Interacción de la proteína Tv-PSP1 y estructura IRE 3SN2 de conejo B) Interacción de la proteína Tv-PSP1 y estructura IRE 1AQO de humano C) Interacción de la proteína Tv-PSP1 y estructura IRE 1NBR de humano

La predicción de los aminoácidos que interactúan con la estructura IRE se muestra en la secuencia de la proteína Tv-PSP1, en negritas se muestran aquellos aminoácidos que están en contacto en las tres estructuras de IRE (3SN2, 1AQO, 1NBR), en cursivas los aminoácidos que se conservan en al menos dos estructuras, y se marcan aquellos que se determinaron en la interacción con una estructura.

**MSKVISTPDAPAAIGPYCQAR**LCDR**TLYTSGIIGNDPHGGPNPETVEGQAELI  
 MKSLDAML**KAAG**YEKTDVVKCNCYLADIADFQKFNKIYADYFGDHKPCRCCIQAGK  
 LPAGKLVELDAI**YK****

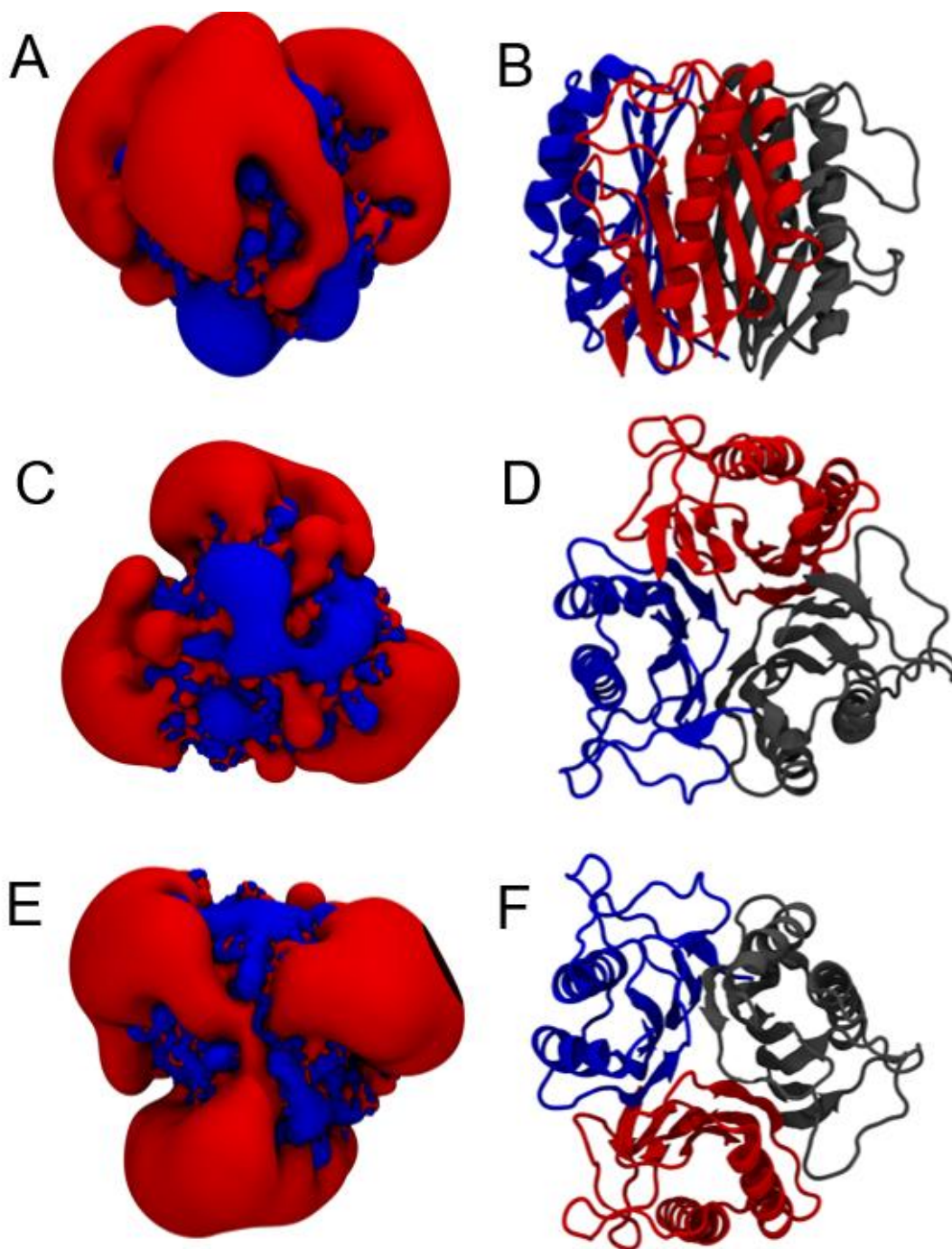
Cada uno de estos aminoácidos se mapearon en la estructura homotrimérica de la proteína Tv-PSP1 representados en la figura 35.



**Figura 35 Aminoácidos de TvL-PSP que interactúan con la secuencia IRE.** Representación gráfica de los aminoácidos que se encuentran en contacto con la estructura IRE A) las bolitas blancas representan todos los aminoácidos que podrían estar en contacto con las tres estructuras IRE B) Las esferas azules representan aquellos aminoácidos que se conservan en las interacciones con las tres estructuras IRE C y D) Representan diferentes vistas de la estructura y los aminoácidos de interacción.

Hasta el momento hemos determinado que la proteína Tv-PSP1 interactúa con estructuras tallo y burbuja que se encuentran en los extremos 3'UTR de los ARNm. Esta proteína parece presentar un reconocimiento por estructura y no un reconocimiento de secuencia específico, por lo que la interacción entre Tv-PSP1 y el ARN podría estar dada por una atracción electrostática, por lo que se mapeó el potencial electrostático de la estructura cuaternaria de la proteína Tv-PSP1, donde se

puede observar que la región donde interactúa la estructura IRE es predominantemente de carga positiva. (Fig. 36)



**Figura 36 Potencial electrostático del homotrímero de Tv-PSP1.** Se muestra el potencial electrostático en diferentes caras del homotrímero donde la parte azul representa cargas positivas y las regiones rojas las cargas negativas.

Computacionalmente fue posible determinar las  $\Delta G$  de unión entre la proteína Tv-PSP1 y la secuencia IRE para determinar si pudiese ser biológicamente favorable la interacción entre estas dos moléculas (Tabla 17). Los cálculos de energía de unión se realizaron para las estructuras más pobladas de Tv-PSP1 a los 20, 40, 60, 80 y 100 ns con las tres estructuras IRE (1AQO, 1NBR y 3SN2) a través de las contribuciones electrostáticas/polares y no electrostáticas/no polares como se describió en la metodología.

**Tabla 17.** Energías de unión ( $\Delta G_{\text{calc}}$ ) para el sistema Tv-PSP1-ARN, determinado por APBS and VMD.

<b>Complejos</b>	<b>ns</b>	<b><math>\Delta G_{\text{solv}}</math> (kJ/mol)</b>	<b><math>\Delta G_{\text{coul}}</math> (kJ/mol)</b>	<b><math>\Delta G_{\text{np}}</math> (kJ/mol)</b>	<b><math>\Delta G_{\text{calc}}^*</math> (kJ/mol)</b>
<i>Tv-PSP1- IRE (1AQO)</i>	20	151	-536	-30	-417
	40	84	-537	-30	-438
	60	204	-460	-36	-292
	80	204	-460	-36	-292
	100	120	-460	-30	-387
	80	227	-302	-38	-113
<i>Tv-PSP1-IRE (1NBR)</i>	100	65	-537	-27	-498
	20	155	-565	-37	-446
	40	182	-436	-35	-289
<i>Tv-PSP1-IRE (3SN2)</i>	60	152	-569	-35	-462
	80	181	-362	-36	-218
	100	139	-471	-34	-364

\*  $\Delta G_{\text{calc}} = \Delta G_{\text{solv}} + \Delta G_{\text{coul}} + \Delta G_{\text{np}}$

El  $\Delta G$  calculado para los tres sistemas entre las secuencias de ARN y la proteína presentaron valores muy similares entre sí, a pesar de que sean estructuras de dos organismos diferentes, lo que podría significar que es una interacción estable.

## 8.0 Discusión

Investigaciones previas en *T. vaginalis* han demostrado que este parásito modula la expresión genética en diferentes condiciones ambientales y es capaz de expresar genes en algunas de estas condiciones (Oyhenart and Breccia 2014); por ejemplo, se ha reportado expresión del gen *mp50* en presencia del catión  $Zn^{2+}$  y no en condiciones normales (Quintas-Granados, et al. 2013), de igual forma sabemos que el parásito presenta eventos de duplicación de genes que le permite desarrollarse y sobrevivir a diferentes ambientes (Carlton, et al. 2007; Cui, et al. 2010), lo que podría justificar la presencia de tres genes muy parecidos entre sí en el parásito. En otros organismos, como *S. cerevisiae* y *R. norvegicus*, también se ha descrito la presencia de más de un gen de la familia PSP (Sasagawa, et al. 1999; Kanouchi, et al. 2000; Oxelmark, et al. 2000; Kim, et al. 2001). Para analizar las posibles condiciones en las cuales se expresan los genes de proteínas PSP en *T. vaginalis* se realizó un análisis de EST de los tres marcos de lectura abiertos de genes de las proteínas TvL-PSPs, el gen principal o mayormente expresado en el parásito es el gen que codifica para la proteína Tv-PSP1, seguida por el gen que expresa a la proteína TvL-PSP3, la cual se podría proponer que se expresa en bajas concentraciones de hierro y en condiciones normales de cultivo, aunque en menor cantidad. En lo que respecta al gen de *tvI-psp2*, no se encontró registro de expresión, posiblemente se deba a que este gen se exprese en una condición ambiental no estudiada aún, ya que no se puede descartar la posibilidad de su expresión en alguna condición a la que sea expuesta el parásito.

Uno de los casos donde se ha reportado la presencia de dos genes de la familia YER057c/Yigf/Uk114 en un mismo organismo, es en *S. cerevisiae*, a cuyos miembros se les conoce como YIL051 y YER057. Estos genes tienen un 70% de identidad entre sus secuencias; sin embargo, difieren en su localización celular y en la función en el organismo, por lo tanto sería interesante determinar si es posible que las proteínas TvL-PSPs que se expresan en *T. vaginalis* pudieran presentar funciones diferentes y si alguna de ellas es más importante en la supervivencia del parásito en alguna condición de cultivo determinada.

Se ha descrito que las proteínas de la familia YER057c/Yigf/Uk114 presentan una serie de aminoácidos conservados invariantes (P-X<sub>5</sub>-Y-X<sub>13</sub>-G-X<sub>25</sub>-N-X<sub>27</sub>-F-X<sub>3</sub>-N-

X<sub>13</sub>-R-X<sub>8</sub>-P-X<sub>5</sub>-E), por lo tanto los resultados del análisis de las secuencias de las tres proteínas mostraron que estos residuos en las proteínas PSPs de *T. vaginalis* se conservan donde Tv-PSP1 y TvL-PSP3 contiene 8 de los 9 aminoácidos invariables de la secuencia consenso; esto es importante ya que se ha propuesto que estos aminoácidos están involucrados en la integridad estructural (Burman, et al. 2007), formando parte del sitio catalítico (Manjasetty, et al. 2004) y en la interacción entre monómeros (Miyakawa, et al. 2006).

Una de las características de las proteínas de la familia YER057c/YjgF/UK114, es que son solubles en 5% de ácido perclórico; sin embargo, es importante mencionar que no son las únicas proteínas que presentan esta característica, también lo hacen las proteínas HGM (significa High Mobility Group); esta puede ser la razón por la cual observamos bandas de diferentes tamaños en la electroforesis de 1D de las proteínas solubles en ácido perclórico de *T. vaginalis*. Tv-PSP1 presenta la característica de solubilidad en ácido perclórico como se ha descrito para otras proteínas de esta familia en organismos como humano, rata, mosca, por lo que podemos concluir que la proteína Tv-PSP1 es soluble en 5% ácido perclórico como el resto de los miembros de la familia YER057c/YjgF/UK114.

Conocer al detalle las conformaciones tridimensionales de una proteína es necesario para comprender la relación que pudiera existir entre las proteínas y su función, por lo tanto, la primera pregunta a responder fue la conformación cuaternaria de la proteína Tv-PSP1, determinar qué tanto se parece la proteína del parásito con lo antes reportado debido a la característica de una familia multifuncional.

Cabe destacar que mediante electroforesis en condiciones nativas y desnaturalizantes, tanto de extractos de proteínas totales del parásito, así como la proteína recombinante, no se observaron comportamientos diferentes, lo que permitió determinar que la proteína Tv-PSP1 presenta una conformación homotrimérica en el parásito y que la proteína recombinante es capaz de reproducir este comportamiento.

En otros miembros de proteínas PSP se ha descrito una conformación trimérica y se propone que esta sea la conformación de una proteína funcional,

por lo cual fue importante determinar si la proteína Tv-PSP1 a igual que otros miembros de la familia presentaba una estructura homotrimérica.

La cromatografía de exclusión molecular permitió determinar el peso molecular de la proteína en su conformación cuaternaria y el radio hidrodinámico de la misma, obteniendo el peso correspondiente a un trímero, lo cual fue corroborado con la técnica de dispersión de luz. Este resultado fue concordante con lo previamente reportado para las proteínas de esta familia, debido a que las estructuras cristal reportadas son homotriméricas constituidas por subunidades de ~13.5 kDa en organismos como *S. cerevisiae* (Pu, et al., 2011), *E. coli* (Burman, et al. 2007), *Sulfolobus tokodaii* (Miyakawa, et al. 2006), *H. sapiens* (Manjasetty, et al. 2004), *B. subtilis* (Sinha, et al. 1999). El radio hidrodinámico que nosotros determinamos fue similar a lo previamente reportado para ST0811 (27 Å) de *S. tokodaii* (Miyakawa, et al. 2006), por lo tanto la proteína Tv-PSP1 presenta una conformación homotrimérica como los otros miembros de la familia YER057c/YjgF/UK114. La presencia de la estructura homotrimérica en los extractos totales de proteínas en condiciones nativas y la confirmación de esta conformación en la proteína recombinante, sugiere que el parásito presenta una organización homotrimérica de manera endógena, esto es interesante debido a que se ha propuesto que esta conformación podría ser la que lleve a cabo las funciones dentro de los organismos y por lo tanto posiblemente esta conformación tenga función dentro del parásito; sin embargo, no podemos descartar la posibilidad de que se pueda presentar otra función como monómero.

Las estructuras cristal que se han reportado presentan una estructura tipo barril (Sinha, et al. 1999; Volz 1999; Deaconescu, et al. 2002; Mistiniene, et al. 2003; Miyakawa, et al. 2006), donde los monómeros presentan 6 hojas  $\beta$  y 2  $\alpha$ -hélices; en el caso de la PSP de humano las dos hélices se encuentran arregladas de manera paralela (Manjasetty, et al. 2004; Miyakawa, et al. 2006), esta constitución de la proteína sugiere una clase estructural  $\alpha + \beta$ .

Uno de los datos experimentales que nos permitieron determinar la clase estructural de la proteína Tv-PSP1 fue el DC cuyo resultado la clasificó dentro de las clase  $\alpha + \beta$ , presentando un patrón similar al que se reportó para DUK114 (Farkas, et al. 2004).

Para entender un poco más por qué se hace esta correlación de manera general dentro de las proteínas se han descrito cuatro clases estructurales

- 1.- Motivos formados en su totalidad por estructuras tipo  $\alpha$ - hélice.
- 2.- Motivos formados en su totalidad por hojas  $\beta$ .
- 3.-  $\alpha$ - hélice / hojas  $\beta$  (en las cuales los segmentos  $\alpha$  y  $\beta$  son inter-espaciados o alternados).
- 4  $\alpha$ - hélice + hojas  $\beta$  (en las cuales las regiones  $\alpha$  y  $\beta$  son segregados) (Manavalan and Johnson Jr 1983).

La relación de los porcentajes de  $\alpha$ -hélices y de  $\beta$ -plegada de la proteína Tv-PSP1 fue concordante con el análisis de porcentajes de estructuras secundarias de las estructuras cristalizadas de otros miembros de la familia YER057c/YjgF/UK114, que abarcan de 23-39% de  $\alpha$ -hélices, 22-33% de  $\beta$ -plegada.

El modelaje por homología permitió determinar el ordenamiento de la proteína Tv-PSP1 utilizando como molde la estructura cristal de una PSP (PDB ID 3R0P) que tuvo mayor porcentaje de identidad con la proteína de *T. vaginalis*. Con este modelo se determinó el arreglo de las estructuras secundarias de la proteína Tv-PSP1 con un reordenamiento de la siguiente forma:  $\beta$ 1,  $\beta$ 2,  $\beta$ 3,  $\alpha$ 1,  $\beta$ 4,  $\alpha$ 2,  $\beta$ 5, y  $\beta$ 6, donde  $\beta$ 2 y  $\beta$ 6 son antiparalelas a las otras hojas  $\beta$ . Este ordenamiento se ha reportado para otras proteínas como Mmf1 y la proteína hp14.5 de humano (Manjasetty, et al. 2004). La proteína Mmf1 es una proteína de matriz mitocondrial que participa en la biosíntesis de isoleucina y el mantenimiento del ADN mitocondrial, por otro lado, la proteína hp14.5 se ha visto que inhibe la síntesis de proteínas en un sistema *in vivo* y, de acuerdo a lo propuesto, lo hace mediante el mecanismo previamente reportado para L-PSP (Oka, et al. 1995), es decir, mediante el corte de los ARNm en un extremo UTR provocando la disgregación de los poliribosomas y por lo tanto inhibiendo la síntesis de proteínas. Se han descrito otros reordenamientos de las estructuras de estas proteínas; por ejemplo, en *S. tokodaii* el reordenamiento es  $\beta$ 1,  $\beta$ 2,  $\beta$ 3,  $\alpha$ 1,  $\beta$ 6,  $\alpha$ 2,  $\beta$ 4, y  $\beta$ 5 donde  $\beta$ 4, y  $\beta$ 5 son antiparalelas al resto de las hojas beta (Miyakawa, et al. 2006).

El modelaje por homología determinó la conformación homotrimérica de la proteína Tv-PSP1 y los aminoácidos que se encontraban en contacto entre las subunidades, las fuerzas que estabilizan la estructura de una proteína se establecen

entre las distintas cadenas laterales de los aminoácidos que la componen. En el caso de la estructura de la proteína Tv-PSP1 los aminoácidos que interaccionaron entre las subunidades en su mayoría son no polares (Valina, Leucina, Isoleucina, Alanina, Fenilalanina, Asparagina, Metionina, Prolina, Cisteina), polares sin carga (Treonina, Tirosina, Serina, Glicina), también algunos con carga positiva (Arginina, Lisina) y con carga negativa (Ac. Aspártico). Es interesante debido a que las asociaciones proteína-proteína que se dan en las estructuras cuaternarias son favorecidas mediante asociaciones hidrofóbicas e interacciones electrostáticas, mientras que con puentes de hidrógeno e interacciones van der Waals son consideradas de segunda importancia en las asociaciones entre proteínas; este tipo de interacciones ayudan a mantener la estructura tridimensional de las proteínas.

La trayectoria de dinámica molecular es una representación estadística del seguimiento de los principales cambios estructurales de la molécula en función del tiempo y el promedio de las variaciones físicas durante el tiempo de simulación, donde se determinaron las representaciones frente al tiempo de RMSD de las estructuras con respecto a la inicial, dando información sobre la estabilidad del complejo dinámico y de la localización de los estados térmicamente favorecidos en el espacio conformacional, donde a mayor valor de RMSD, mayores son las diferencias, cuando menor sea el valor de RMSD de comparación de dos estructuras mayor es la similitud estructural de las mismas.

La conformación homotrimérica que presenta la proteína Tv-PSP1 en condiciones endógenas en el parásito se logró demostrar mediante una electroforesis en condiciones nativas del extracto total de proteínas de *T. vaginalis*, permitiendo reconocer a la proteína Tv-PSP1 en esta conformación como se había reportado para otros miembros de la familia, lo cual fue corroborado mediante cromatografía de exclusión molecular y DSL.

Por lo tanto, posiblemente la estructura funcional de la proteína Tv-PSP1 está conformada por tres subunidades que forman un trímero.

La resistencia que presenta esta conformación a perder su organización debido a factores ambientales que conducen a estados desnaturizantes es lo que se denomina como estabilidad conformacional. Existen sustancias capaces de desnaturizar a las proteínas, como los denominados agentes caotrópicos; éstos

desnaturalizan estas conformaciones bajo condiciones menos agresivas, ya que no rompen los enlaces covalentes presentes en la estructura primaria, pero sí desorganizan las estructuras secundarias, terciarias y cuaternarias. Concentraciones elevadas de agentes caotrópicos como la urea permiten que las moléculas de agua penetren en las proteínas, desorganizando así las interacciones hidrofóbicas que estabilizan la conformación nativa; nosotros demostramos que el trímero de Tv-PSP1 es capaz de resistir hasta 6M de urea.

Con estos antecedentes, determinar la localización de la proteína Tv-PSP1 es un elemento que podría ayudarnos a proponer la función de la proteína en el parásito. Los resultados obtenidos por MET mostraron una localización de la proteína Tv-PSP1 en el citoplasma, esto fue acorde a lo reportado con otras proteínas PSP como Hfm, UK114, p14.5, K-PSP, EhL-PSP de *S. cerevisiae*, de hígado de rata, humano, pulmón de rata, y *E. histolytica*, respectivamente (Kim, Yoshikawa et al. 2001; Mistiniene, Luksa et al. 2003; López-Rosas, Marchat et al. 2014), las cuales se encontraron en citoplasma. Tv-PSP1 también se localizó en núcleo; esto ha sido reportado para Hfm de *S. cerevisiae* (Kim, Yoshikawa et al. 2001). Es interesante, ya que al menos una proteína ha sido encontrada en más de un compartimiento celular, como es el caso de la proteína de *T. vaginalis*; a estas proteínas se les han reportado varias funciones como inhibidor en la síntesis de proteínas, reguladores de la diferenciación celular y se han visto involucradas en el reconocimiento, degradación y estabilidad del ARN (Oka, et al. 1995; Dhawan L 2012; López-Rosas, et al. 2014).

Hay que recalcar que proteínas PSP se han encontrado en otros organelos como retículo endoplásmico, aparato de Golgi, membrana citoplasmática, peroxisomas y mitocondria (Kanouchi, et al. 2000; Kim, et al. 2001; Kanouchi, et al. 2005; Antonenkov, et al. 2007), esto último es importante ya que Tv-PSP1 también fue localizada en un organelo homólogo a la mitocondria llamado hidrogenosoma.

Las funciones que se han reportado de estas PSP están relacionadas con el metabolismo y mantenimiento del ADN mitocondrial (Kim, et al. 2001).

El hidrogenosoma tiene una función muy similar a la de la mitocondria: este organelo se encuentra involucrado con el metabolismo de los lípidos, se han descrito proteínas PSP que son capaces de unir ácidos grasos insaturados (Sasagawa, et al. 1999), como Uk114 y p14.5, que son capaces de unir ácido

palmítico y oléico (Mistiniene, et al. 2003), por lo tanto podría ser una posibilidad que Tv-PSP1 esté involucrado en este proceso; para determinar si Tv-PSP1 es capaz de unir ácidos grasos es necesario realizar otros experimentos.

Otra de las funciones de las proteínas PSPs que ya se habían mencionado es la de ribonucleasas, de manera general son enzimas que cortan el ARN, reconocen distintas formas y cortan los enlaces entre nucleótidos, pueden reconocer moléculas de cadena sencilla o doble, híbridos de ADN/ARN, secuencias específicas de nucleótidos o arreglos estructurales de la molécula de ARN. Si estas enzimas cortan en los extremos se denominan exoribonucleasas, y si cortan enlaces que se encuentran en la parte interna de la molécula se denominan endoribonucleasas.

Con estos antecedentes y sabiendo que la proteína Tv-PSP1 presenta un dominio de endoribonucleasa se decidió probar si es capaz de reconocer una secuencia específica de mensajeros presentes en el parásito. Se han descrito secuencias específicas que participan en la estabilidad de los ARNm de genes que son importantes en el establecimiento de la infección del parásito hacia el hospedero, entre los reportados se encuentra el gen de *tv-cp39* el cual presenta una estructura tallo y burbuja denominada ERE y se sabe que es dependiente de poliaminas; esta secuencia se encuentra en la región 3' UTR del ARNm de *tvcp39* localizadas en el 3'UTR de los ARNm, otra secuencia tallo y burbuja de *T. vaginalis* fue la estructura IRE-Fer (Carvajal-Gamez, et al. 2016).

Nuestros resultados con respecto al reconocimiento y degradación de la secuencia específica de la estructura ERE no fueron los esperados, debido a que la proteína fue capaz de reconocer la estructura ERE pero no degradarla, no así para la estructura IRE ya que esta sí fue reconocida y presentó una degradación parcial, por lo que la proteína Tv-PSP1 podría tener un reconocimiento a nivel de estructura y no de secuencia como se esperaba, esto se ha observado en otras enzimas como la RNAsa III cuyo sustrato es una horquilla de ARN de aproximadamente 12pb (Nicholson, 2001).

Una de las alternativas para predecir esta interacción entra la proteína Tv-PSP1 y la secuencia tallo y burbuja es mediante análisis *in silico* (docking).

Es importante mencionar que una parte fundamental para todos los procesos biológicos es la habilidad de muchas proteínas para formar complejos estables y

específicos con otras moléculas. De manera natural, las proteínas presentan grupos cargados en la estructura favoreciendo la formación del complejo. Mediante métodos de electrostática continua se pueden calcular energías libres de unión de estructuras determinadas experimentalmente generadas por un algoritmo de docking, las cuales presentan la misma probabilidad de estabilizarse o desestabilizarse que las naturales, por lo tanto, la capacidad de predecir la estructura de los complejos proporciona un nivel de comprensión a nivel químico, estructural y físico que determinan la afinidad y especificidad en la formación de estos complejos.

Para determinar si la proteína Tv-PSP1 es capaz de reconocer estructuras tallo y burbuja (IRE y ERE) se debe tener una predicción de la estructura tallo y burbuja con la cual se realizará el acoplamiento; sin embargo, una de las limitantes que tuvimos en este ensayo fue la predicción o modelaje de las moléculas de ARN, por lo que se limitó a estructuras que se encuentran en PDB (3SN2, 1AQO, 1NBR), esta es la razón por la que sólo se predijo la interacción de la proteína Tv-PSP1 con estructuras tipo ERE. La interacción se realizó con estructuras provenientes de dos organismos (conejo y humano); de manera interesante, el sitio de interacción predicho de la proteína con la estructura tallo y burbuja se conserva en todos los casos. Esta interacción está conducida por interacciones electrostáticas y en menor proporción por las interacciones no polares, y la energía de interacción que se predijo en la formación de este complejo es favorable. Dado que la interacción de estas moléculas es muy estable, aumenta la posibilidad de que se pueda presentar en el parásito.

En lo que se refiere a la posible función de la proteína Tv-PSP1 como una endoribonucleasa, los resultados aquí obtenidos muestran un posible reconocimiento de estructuras tallo y burbuja de ARN, por otra parte lo observado en el ensayo de degradación sugiere la posibilidad de que la proteína Tv-PSP1 lleve a cabo un proceso de degradación del ARN del parásito. De manera general existe la posibilidad de que la proteína Tv-PSP1 pueda estar degradando ARNm que presenten la estructura IRE y ERE; esta última se encuentra presente en genes como *tvcp39*, que es importante en la citotoxicidad del parásito hacia el hospedero.

Hasta el momento podemos decir que la proteína Tv-PSP1 es capaz de reconocer las estructuras tallo y burbuja presentes en el extremo UTR de los ARNm y es capaz de degradarlos; sin embargo, muchas RNAsas trabajan en

conjunto con otras proteínas que pueden estar formando una maquinaria que en conjunto lleva a cabo la degradación de los ARNm, donde habrá proteínas que reconozcan el ARNm, proteínas que corten la cadena de nucleótidos en los extremos (exoribonucleasas) y en la parte interna (endoribonucleasa), y proteínas accesorias formando lo que se denomina como exosoma. En parásitos como *E. histolytica* ya se ha descrito este tipo de maquinaria, y en la búsqueda de homólogos en *T. vaginalis* encontramos la presencia de proteínas que podrían estar formando parte de una maquinaria muy similar a la descrita para otros parásitos, y la identificación de proteínas que reconocen secuencias de ARN apoyan la posibilidad de que la proteína Tv-PSP1 participe en algún mecanismo de degradación de genes importantes en la citotoxicidad del parásito.

## 9. Conclusiones

La proteína Tv-PSP1 es soluble en 5% de ácido perclórico, se confirmó que es miembro de la familia YER057c/YjgF/UK114, presentando 8 de los 9 aminoácidos característicos de la familia, presentó más de una localización celular en el parásito.

La proteína rTv-PSP1 presenta una estructura homotrimérica estable, la cual podría ser la unidad funcional de la proteína, ya que se predijo que puede interactuar con estructuras tallo y burbuja del tipo ERE e IRE y es capaz de degradar ARN total.

## 10. Perspectivas

- Determinar la presencia de otra proteína tipo PSP en *T. vaginalis*.
- Determinar si existe alguna otra función de la proteína Tv-PSP1 dependiendo de su localización celular.
- Realizar las predicciones de interacción y dinámicas con la estructura cristal de Tv-PSP1
- Analizar la posible función de la proteína Tv-PSP1 en las secreciones del parásito como una posible proteína que participe en la citotoxicidad a partir de la degradación del ARN de la célula blanco.
- Determinar si existe una función diferente de la proteína Tv-PSP1 en su conformación monomérica

## 11. Referencias

- Alberts, B. (2002). *Molecular Biology of the Cell* 4th.
- Alderete, J. F., Nguyen, J., Mundodi, V., and Leiker, M. W., (2004). Heme-iron increases levels of AP65-mediated adherence by *Trichomonas vaginalis*. *Microb Pathog* 36, 263-271
- Alvarez-Sanchez, M. E., Solano-Gonzalez, E., Yanez-Gomez, C., and Arroyo, R., (2007). Negative iron regulation of the CP65 cysteine proteinase cytotoxicity in *Trichomonas vaginalis*. *Microbes Infect* 9, 1597-1605.
- Allsworth, J. E., Ratner, J. A., and Peipert, J. F., (2009). Trichomoniasis and Other Sexually Transmitted Infections: Results from the 2001–2004 NHANES Surveys. *Sexually transmitted diseases* 36, 738-744.
- Andreini, C., Banci, L., Bertini, I., and Rosato, A., (2006). Counting the zinc-proteins encoded in the human genome. *J Proteome Res* 5, 196-201.
- Antonenkov, V. D., Ohlmeier, S., Sormunen, R. T., and Hiltunen, J. K., (2007). UK114, a YjgF/Yer057p/UK114 family protein highly conserved from bacteria to mammals, is localized in rat liver peroxisomes. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 357, 252-257.
- Apt Baruch, W. L. (2014). *Parasitología humana*, McGraw Hill Mexico.
- Baruch, A., Louis, W. (2014). *Parasitología humana*. McGraw Hill Mexico.
- Baker, S., Matthews, I. (2001, December). Equivalence and efficiency of image alignment algorithms. In *IEEE Computer Society Conference on Computer Vision and Pattern Recognition* (Vol. 1, pp. I-1090). IEEE Computer Society; 1999.
- Borchardt, K. A., al-Haraci, S., and Maida, N., (1995). Prevalence of *Trichomonas vaginalis* in a male sexually transmitted disease clinic population by interview, wet mount microscopy, and the InPouch TV test. *Genitourin Med* 71, 405-406.
- Boyle, D. C. M., Barton, S. E., Uthayakumar, S., Hay, P. E., Pollock, J. W., Steer, P. J., and Smith, J. R., (2003). Is bacterial vaginosis associated with cervical intraepithelial neoplasia *International Journal of Gynecological Cancer* 13, 159-163.

- Brooks, B.R., Brooks, C.L., Mackerell, A.D., Nilsson, L., Petrella, R.J., Roux, B., Won, Y., Archontis, G., Bartels, C., Boresch, S., et al. (2009). CHARMM: the biomolecular simulation program. *J Comput Chem* 30, 1545–1614.
- Burman, J. D., Stevenson, C. E., Sawers, R. G., and Lawson, D. M., (2007). The crystal structure of *Escherichia coli* TdcF, a member of the highly conserved YjgF/YER057c/UK114 family. *BMC structural biology* 7, 30.
- Cadena, D. V., Miranda, N., and Calderón, N., (2006). Tricomoniasis urogenital. *Revista paceña de medicina familiar* 3, 84-89.
- Carlton, J. M., Hirt, R. P., Silva, J. C., Delcher, A. L., Schatz, M., Zhao, Q., Wortman, J. R., Bidwell, S. L., Alsmark, U. C., Besteiro, S., Sicheritz-Ponten, T., Noel, C. J., Dacks, J. B., Foster, P. G., Simillion, C., Van de Peer, Y., Miranda-Saavedra, D., Barton, G. J., Westrop, G. D., Muller, S., Dessi, D., Fiori, P. L., Ren, Q., Paulsen, I., Zhang, H., Bastida-Corcuera, F. D., Simoes-Barbosa, A., Brown, M. T., Hayes, R. D., Mukherjee, M., Okumura, C. Y., Schneider, R., Smith, A. J., Vanacova, S., Villalvazo, M., Haas, B. J., Pertea, M., Feldblyum, T. V., Utterback, T. R., Shu, C. L., Osoegawa, K., de Jong, P. J., Hrdy, I., Horvathova, L., Zubacova, Z., Dolezal, P., Malik, S. B., Logsdon, J. M., Jr., Henze, K., Gupta, A., Wang, C. C., Dunne, R. L., Upcroft, J. A., Upcroft, P., White, O., Salzberg, S. L., Tang, P., Chiu, C. H., Lee, Y. S., Embley, T. M., Coombs, G. H., Mottram, J. C., Tachezy, J., Fraser-Liggett, C. M., and Johnson, P. J., (2007). Draft genome sequence of the sexually transmitted pathogen *Trichomonas vaginalis*. *Science* 315, 207-212.
- Carrillo, L. I. V., Granados, L. I. Q., Arroyo, R., Hernández, G. M., Robles, A. G., Gamez, B. I. C., and Sánchez, M. E. A., (2011). The effect of Zn<sup>2+</sup> on prostatic cell cytotoxicity caused by *Trichomonas vaginalis*.
- Carter, J. E. and K. C. Whithaus (2008). "Neonatal Respiratory Tract Involvement by *Trichomonas vaginalis*: A Case Report and Review of the Literature." *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 78(1): 17-19.
- Carvajal-Gamez, B. I., Carrillo, L. V., Torres-Romero, J. C., Camacho-Nuez, M., Ponce-Regalado, M. D., Camarillo, C. L., and Alvarez-Sánchez, M. E., (2016). Recombinant *Trichomonas vaginalis* eIF-5A protein expressed from a eukaryotic system binds specifically to mammalian and putative trichomonal eIF-5A response elements (EREs). *Parasitology international* 65, 625-631

- Carvajal-Gamez, B. I., Quintas-Granados, L. I., Arroyo, R., Vázquez-Carrillo, L. I., De los Angeles Ramón-Luing, L., Carrillo-Tapia, E., Alvarez-Sánchez, M. E. (2014). Putrescine-dependent re-localization of TvCP39, a cysteine proteinase involved in *Trichomonas vaginalis* cytotoxicity. *PloS one*, 9(9), e107293.
- Carvalho, S. E., Freitas, D., Murad, A. M., Franco, O. L., and Simoes-Barbosa, A., (2005). *Trichomonas vaginalis*: identification of a triacylglycerol acylhydrolase. *Exp Parasitol* 111, 260-263.
- Chong, C.L., Huang, S.F., Hu, C.P., Chen, Y.L., Chou, H.Y., Chau, G.Y., (2008). Decreased expression of UK114 is related to the differentiation status of human hepatocellular carcinoma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 17: 535– 542.
- Conrad MD, Gorman AW, Schillinger JA, Fiori PL, Arroyo R, Malla N, Dubey ML, Gonzalez J, Blank S, Secor WE, Carlton JM, (2012). Extensive genetic diversity, unique population structure and evidence of genetic exchange in the sexually transmitted parasite *Trichomonas vaginalis*. *PLoS Negl Trop Dis* 6: e1573
- Crouch, M. V. and J. F. Alderete (2001). "*Trichomonas vaginalis* has two fibronectin-like iron-regulated genes." *Arch Med Res* 32(2): 102-107.
- Cui, J., Das, S., Smith, T. F., and Samuelson, J., (2010). *Trichomonas* transmembrane cyclases result from massive gene duplication and concomitant development of pseudogenes. *PLoS Negl Trop Dis* 4, e782.
- da Fonseca Pires S, Fialho LC Jr, Silva SO, Melo MN, de Souza CC, Tafuri WL, Romero OB, Andrade HM. (2014). Identification of virulence factors in *leishmania infantum* strains by a proteomic approach. *J Proteome Res* 13: 1860–1872.
- De Jesus, J. B., Cuervo, P., Junqueira, M., Britto, C., Silva-Filho, F. C., Soares, M. J., Cupolillo, E., Fernandes, O., and Domont, G. B., (2007). A further proteomic study on the effect of iron in the human pathogen *Trichomonas vaginalis*. *Proteomics* 7, 1961-1972.
- Deaconescu, A. M., Roll-Mecak, A., Bonanno, J. B., Gerchman, S. E., Kycia, H., Studier, F. W., and Burley, S. K., (2002). X-ray structure of *Saccharomyces cerevisiae* homologous mitochondrial matrix factor 1 (Hmf1). *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics* 48, 431-436.
- Dhawan L, L. B., Pytlak A, Kulshrestha S, Blaxall BC, Taubman MB. *Molecular and Cellular Biology*. (2012). " Y-Box Binding Protein 1 and RNase UK114 Mediate

Monocyte Chemoattractant Protein 1 mRNA Stability in Vascular Smooth Muscle Cells." *Molecular and Cellular Biology* 32(18): 3768-3775.

- Dolinsky, T. J., Nielsen, J. E., McCammon, J. A., & Baker, N. A. (2004). PDB2PQR: an automated pipeline for the setup of Poisson–Boltzmann electrostatics calculations. *Nucleic acids research*, 32(suppl\_2), W665-W667.
- Draper, D., Parker, R., Patterson, E., Jones, W., Beutz, M., French, J., Borchardt, K., and McGregor, J., (1993). Detection of *Trichomonas vaginalis* in pregnant women with the InPouch TV culture system. *Journal of Clinical Microbiology* 31, 1016-1018.
- Dreyfuss, G., Kim, V. N., Kataoka, N. (2002). Messenger-RNA-binding proteins and the messages they carry. *Nature reviews Molecular cell biology*, 3(3), 195.
- D Dunne, R. L., Dunn, L. A., Upcroft, P., O'Donoghue, P. J., and Upcroft, J. A., (2003). Drug resistance in the sexually transmitted protozoan *Trichomonas vaginalis*. *Cell Res* 13, 239-249.
- Farkas, A., Nardai, G., Csermely, P., Tompa, P., and Friedrich, P., (2004). DUK114, the *Drosophila* orthologue of bovine brain calpain activator protein, is a molecular chaperone. *Biochem. J.* 383, 165-170.
- Flores-Paz, R., Rivera-Sánchez, R., Ruix-Pérez, N. J., & Arriaga-Alba, M. (2008). Utilidad del sistema Affirm VPIII y de la prueba L-Pap para el diagnóstico de vaginosis bacteriana. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 26(6), 338-342.
- Garber, G. E., Sibau, L., Ma, R., Proctor, E. M., Shaw, C. E., and Bowie, W. R., (1987). Cell culture compared with broth for detection of *Trichomonas vaginalis*. *Journal of Clinical Microbiology* 25, 1275-1279.
- Ghezzi, F.; Berta, G.N.; Bussolati, B.; Bosio, A.; Corvetti, G.; di Carlo, F.; Bussolati, G.; Guglielmone, R.; Bartorelli, (1999). A. Perchloric acid-soluble proteins from goat liver inhibit chemical carcinogenesis of Syrian hamster cheek-pouch carcinoma. *Br. J. Cancer*, 79, 54–58.
- Gimenes, F., Souza, R. P., Bento, J. C., Teixeira, J. J. V., Maria-Engler, S. S., Bonini, M. G., and Consolaro, M. E. L., (2014). Male infertility: a public health issue caused by sexually transmitted pathogens. *Nat Rev Urol* 11, 672-687.

- Guenther, P. C., Secor, W. E., and 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. *Infection and Immunity* 73, 4155-4160.
- Hardy, P., Nell, E. E., Spence, M., Hardy, J., Graham, D., & Rosenbaum, R. (1984). Prevalence of six sexually transmitted disease agents among pregnant inner-city adolescents and pregnancy outcome. *The Lancet*, 324(8398), 333-337.
- Heine, P. and J. A. McGregor (1993). "*Trichomonas Vaginalis*: A Reemerging Pathogen." *Clinical Obstetrics and Gynecology* 36(1): 137-144.
- Heine, P. and McGregor, J. A., (1993). *Trichomonas Vaginalis*: A Reemerging Pathogen. *Clinical Obstetrics and Gynecology* 36, 137-144.
- Hernández-Gutiérrez, R., Ávila-González, L., Ortega-López, J., Cruz-Talonia, F., Gómez-Gutierrez, G., Arroyo, R. (2004). *Trichomonas vaginalis*: characterization of a 39-kDa cysteine proteinase found in patient vaginal secretions. *Experimental parasitology*, 107(3-4), 125-35.
- Hernandez-Gutierrez, R., Ortega-Lopez, J., and 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 Suppl, 696-698.
- Hirt, R. P. (2013). *Trichomonas vaginalis* virulence factors: an integrative overview. *Sex Transm Infect*, 89(6), 439-443.
- Hirt RP, de Miguel N, Nakjang S, Dessi D, Liu YC, (2011). *Trichomonas vaginalis* pathobiology new insights from the genome sequence. *Adv Parasitol* 77: 87–140.
- Hobbs, M. M., Kazembe, P., Reed, A. W., Miller, W. C., Nakata, E., Zimba, D., Daly, C. C., Chakraborty, H., Cohen, M. S., and Hoffman, I., (1999). *Trichomonas vaginalis* As a Cause of Urethritis in Malawian Men. *Sexually Transmitted Diseases* 26, 381-387.
- Huang, J., MacKerell Jr, A. D. (2013). CHARMM36 all-atom additive protein force field: Validation based on comparison to NMR data. *Journal of computational chemistry*, 34(25), 2135-2145.
- Humphrey, W., Dalke, A., Schulten, K. (1996). VMD: visual molecular dynamics. *Journal of molecular graphics*, 14(1), 33-38.

- Isola, M. C., Franzoni, L. (1989). Inhibition of net synthesis of ribonuclease by polyamines in potato tuber slices. *Plant Science*, 63(1), 39-45
- Kanouchi, H., Matsumoto, M., Taga, M., Yamada, K., Oka, T., Toné, S., and Minatogawa, Y., (2005). Nuclear transfer of perchloric acid-soluble protein by endoplasmic reticulum stressors. *Protein Science* 14, 2344-2349.
- Kanouchi, H., Oka, T., Asagi, K., Tachibana, H., and Yamada\*, K., (2000). Expression and cellular distribution of perchloric acid-soluble protein is dependent on the cell-proliferating states of NRK-52E cells. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS* 57, 1103-1108.
- Karpetsky, T. P., Hieter, P. A., Frank, J. J., & Levy, C. C. (1977). Polyamines, ribonucleases, and the stability of RNA. *Molecular and cellular biochemistry*, 17(2), 89-99.
- Kim, J.-M., Yoshikawa, H., and Shirahige, K., (2001). A member of the YER057c/yjgf/Uk114 family links isoleucine biosynthesis and intact mitochondria maintenance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes to Cells* 6, 507-517.
- Krieger, J. N. (1981). Urologic aspects of trichomoniasis. *Investigative urology*, 18(8), 411.
- Krieger, J. N., Jenny, C., Verdon, M., Siegel, N., Springwater, R., Critchlow, C. W., and Holmes, K. K., (1993). Clinical Manifestations of Trichomoniasis in Men. *Annals of Internal Medicine* 118, 844-849.
- Krieger, J. N., Tam, M. R., Stevens, C. E., Nielsen, I. O., Hale, J., Kiviat, N. B., & Holmes, K. K. (1988). Diagnosis of trichomoniasis: comparison of conventional wet-mount examination with cytologic studies, cultures, and monoclonal antibody staining of direct specimens. *Jama*, 259(8), 1223-1227.
- Kusdian, G., Woehle, C., Martin, W. F., Gould, S. B. (2013). The actin-based machinery of *Trichomonas vaginalis* mediates flagellate-amoeboid transition and migration across host tissue. *Cellular microbiology*, 15(10), 1707-1721.
- Lehker, M. W., Arroyo, R., & Alderete, J. F. (1991). The regulation by iron of the synthesis of adhesins and cytoadherence levels in the protozoan *Trichomonas vaginalis*. *Journal of Experimental Medicine*, 174(2), 311-318.
- Leon-Felix, J., Ortega-Lopez, J., Orozco-Solis, R., and Arroyo, R., (2004). Two novel asparaginyl endopeptidase-like cysteine proteinases from the protist

*Trichomonas vaginalis*: their evolutionary relationship within the clan CD cysteine proteinases. *Gene* 335, 25-35.

- Leon-Sicairos, C. R., Leon-Felix, J., Arroyo, R., (2004). tvcp12: a novel *Trichomonas vaginalis* cathepsin L-like cysteine proteinase-encoding gene. *Microbiology* 150, 1131-1138
- Levi, M. H., Torres, J., Piña, C., and Klein, R. S., (1997). Comparison of the InPouch TV culture system and Diamond's modified medium for detection of *Trichomonas vaginalis*. *Journal of Clinical Microbiology* 35, 3308-3310.
- Levy-Favatier, F., Cuisset, L., Nedelec, B., Tichonicky, L., Kruh, J., and Delpech, M., (1993). Characterization, purification and cDNA cloning of a rat perchloric-acid-soluble 23-kDa protein present only in liver and kidney. *European Journal of Biochemistry* 212, 665-673.
- Liston, D. R., Carrero, J. C., and Johnson, P. J., (1999). Upstream regulatory sequences required for expression of the *Trichomonas vaginalis* alpha-succinyl CoA synthetase gene. *Mol Biochem Parasitol* 104, 323-329.
- López-Camarillo, C., N Hernandez de la Cruz, O., Garcia Vivas, J., Fernandez Retana, J., Pezet Valdez, M., Lopez Rosas, I., A Marchat, L. (2010). Recent Insights in Pre-mRNA 3'-End Processing Signals and Proteins in the Protozoan Parasite *Entamoeba histolytica*. *Infectious Disorders-Drug Targets (Formerly Current Drug Targets-Infectious Disorders)*, 10(4), 258-265.
- López-Rosas, I., Marchat, L. A., Olvera, B. G., Guillen, N., Weber, C., Hernández de la Cruz, O., Ruíz-García, E., Astudillo-de la Vega, H., and López-Camarillo, C., (2014). Proteomic analysis identifies endoribouclease EhL-PSP and EhRRP41 exosome protein as novel interactors of EhCAF1 deadenylase. *Journal of Proteomics* 111, 59-73.
- Lubick, K. J., Burgess, D. E. (2004). Purification and analysis of a phospholipase A2-like lytic factor of *Trichomonas vaginalis*. *Infection and immunity*, 72(3), 1284-1290.
- MacKerell Jr, A. D., Bashford, D., Bellott, M. L. D. R., Dunbrack Jr, R. L., Evanseck, J. D., Field, M. J., Joseph-McCarthy, D. (1998). All-atom empirical potential for molecular modeling and dynamics studies of proteins. *The journal of physical chemistry B*, 102(18), 3586-3616.

- Madico, G., Quinn, T. C., Rompalo, A., McKee, K. T., and Gaydos, C. A., (1998). Diagnosis of *Trichomonas vaginalis* Infection by PCR Using Vaginal Swab Samples. *Journal of Clinical Microbiology* 36, 3205-3210.
- Manavalan, P. and Johnson Jr, W. C., (1983). Sensitivity of circular dichroism to protein tertiary structure class. *Nature* 305, 831.
- Mandell, G. L., Bennett, J. E., and Dolin, R., (2006). *Enfermedades Infecciosas: Principios y Práctica*. Elsevier - Health Sciences Division.
- Manjasetty, B. A., Delbrück, H., Pham, D.-T., Muller, U., Fieber-Erdmann, M., Schiech, C., Sievert, V., Büssow, K., Neisen, F. H., Weihofen, W., Loll, B., Saenger, W., and Heinemann, U., (2004). Crystal Structure of Homo sapiens Protein hp14.5. *PROTEINS: Structure, Funcion, and Bioinformatics* 54, 797-800.
- Maret, W. and Li, Y., (2009). Coordination dynamics of zinc in proteins. *Chem Rev* 109, 4682-4707.
- Mason, P. R. and Gwanzura, L., (1990). Reduced lymphocyte responses to mitogens in natural and experimental trichomoniasis. *Infection and Immunity* 58, 3553-3557.
- Mendoza-López, M. R., Becerril-Garcia, C., Fattel-Facenda, L. V., Avila-Gonzalez, L., Ruíz-Tachiquín, M. E., Ortega-Lopez, J., Arroyo, R. (2000). CP30, a Cysteine Proteinase Involved in *Trichomonas vaginalis* Cytoadherence. *Infection and immunity*, 68(9), 4907-4912.
- Midlejš, V., Benčimol, M. (2010). *Trichomonas vaginalis* kills and eats—evidence for phagocytic activity as a cytopathic effect. *Parasitology*, 137(1), 65-76.
- Mistiniene, E., Lukša, V., Sereikaite, J., and Naktinis, V., (2003). Oligomeric Assembly and Ligand Binding of the Members of Protein Family YER057c/YIL051c/YJGF. *Bioconjugate Chemistry* 14, 1243-1252.
- Miyakawa, T., Lee, W. C., Hataco, K., Kato, Y., Sawano, Y., Miyazono, K. N., and Tonakura, M., (2006). Crystal Structure of the YjgF/YER057c/Uk114 Family Protein from the Hyperthermophilic Archaeon *Sulfolobus tokodaii* Strain. *PROTEINS: Structure, Funcion, and Bioinformatics* 62.
- Moreno-Brito, V., Yanez-Gomez, C., Meza-Cervantez, P., Avila-Gonzalez, L., Rodriguez, M. A., Ortega-Lopez, J., Gonzalez-Robles, A., and 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, 245-258.

- Noël CJ, Diaz N, Sicheritz-Ponten T, Safarikova L, Tachezy J, Tang P, Fiori P, Hirt P. (2010) *Trichomonas vaginalis* vast BspA-like gene family: evidence for functional diversity from structural organisation and transcriptomics. *BMC Genomics* 11: 99.
- Nicholson, A. W. (2001). *Ribonucleases, Part A: Functional Roles and Mechanisms of Action: Functional Roles and Mechanisms of Action*, Elsevier Science.
- Ochsendorf, F. R. (2008). "Sexually transmitted infections: impact on male fertility." *Andrologia* 40(2): 72-75.
- Oka, T., Tsuji, H., Noda, C., Sakai, K., Hongs, Y.-m., Suzuki, I., Muñoz, S., and Natori, Y., (1995). Isolation and Characterization of a ovel Perchloric Acid- soluble Protein Inhibiting Cell-free Protein Synthesis. *The Journal of Biochemical Chemistry* 270, 30060-30067.
- Oxelmark, E., Marchini, A., Malanchi, I., Magherini, F., Jaquet, L., Hajibagheri, M. A., Bright, K. J., Jauniaux, J. C., and Tommasino, M., (2000). Mmf1p, a novel yeast mitochondrial protein conserved throughout evolution and involved in maintenance of the mitochondrial genome. *Mol. Cell. Biol.* 20, 7784-7797.
- Oyhenart, J. and Breccia, J. D., (2014). Evidence for repeated gene duplications in *Trichomonas foetus* supported by EST analysis and comparison with the *Trichomonas vaginalis* genome. *Veterinary parasitology* 206, 267-276.
- Pereira-Neves, A. and Benchimol, M., (2007). Phagocytosis by *Trichomonas vaginalis*: new insights. *Biol Cell* 99, 87-101.
- Perl, G. (1972). Errors in the diagnosis of *Trichomonas vaginalis* infection as observed among 1199 patients. *Obstetrics & Gynecology*, 39(1), 7-9.
- Petrin, D., Delgaty, K., Bhatt, R., and Garber, G., (1998). Clinical and Microbiological Aspects of *Trichomonas vaginalis*. *Clinical Microbiology Reviews* 11, 300-317
- Provenzano, D., & Alderete, J. F. (1995). Analysis of human immunoglobulin-degrading cysteine proteinases of *Trichomonas vaginalis*. *Infection and Immunity*, 63(9), 3388-3395.

- Pu, Y. G., Jiang, Y. L., Ye, X. D., Ma, X. X., Guo, P. C., Lian, F. M., Teng Y.B, Chen Y., Zhou, C. Z. (2011). Crystal structures and putative interface of *Saccharomyces cerevisiae* mitochondrial matrix proteins Mmf1 and Mam33. *Journal of structural biology*, 175(3), 469-474.
- Quintas-Granados, L. I., Villalpando, J. L., Vázquez-Carrillo, L. I., Arroyo, R., Mendoza-Hernández, G., and Álvarez-Sánchez, M. E., (2013). TvMP50 is an immunogenic metalloproteinase during male trichomoniasis. *Molecular & Cellular Proteomics* 12, 1953-1964.
- Reece, E. A. and J. C. Hobbins (2010). *Obstetricia clinica / Clinical Obstetrics*, Editorial Medica Panamericana Sa de.
- Rendón-Maldonado, J. G., Espinosa-Cantellano, M., González-Robles, A., Martínez-Palomo, A. (1998). *Trichomonas vaginalis*: in vitro phagocytosis of lactobacilli, vaginal epithelial cells, leukocytes, and erythrocytes. *Experimental parasitology*, 89(2), 241-250.
- Sasagawa, T., Oka, T., Tokumura, A., Nishimoto, Y., Muñoz, S., Kuwahata, M., Okita, M., Tsuji, H., and Natori, Y., 1999. Analysis of the fatty acid components in a perchloric acid-soluble protein. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids* 1437, 317-324.
- Schwebke, J. R. and D. Burgess (2004). "Trichomoniasis." *Clinical Microbiology Reviews* 17(4): 794-803.
- Sinha, S., Rappu, P., Lange, S., Mäntsälä, P., Zalkin, H., and Smith, J. L., (1999). Crystal structure of *Bacillus subtilis* YabJ, a purine regulatory protein and member of the highly conserved YjgF family. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 96, 13074-13079.
- Solano-Gonzalez, E., E. Burrola-Barraza, et al. (2007). "The trichomonad cysteine proteinase TVCP4 transcript contains an iron-responsive element." *FEBS Lett* 581(16): 2919-2928.
- Su, P., Feng, T., Zhou, X., Zhang, S., Zhang, Y., Cheng, J. e., Luo, Y., Peng, J., Zhang, Z., Lu, X., Zhang, D., and Liu, Y., (2015). Isolation of Rhp-PSP, a member of YER057c/YjgF/UK114 protein family with antiviral properties, from the photosynthetic bacterium *Rhodospseudomonas palustris* strain JSC-3b. *Scientific Reports* 5, 16121.

- Sutcliffe, S., E. Giovannucci, et al. (2006). "Plasma Antibodies against *Trichomonas vaginalis* and Subsequent Risk of Prostate Cancer." *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention* 15(5): 939-945.
- Swapan, K. N. and G. R. Sanjay (2007). *Problem-based Microbiology*, Editorial Elsevier Science Health Science Div
- Swygard, H., Seña, A. C., Hobbs, M. M., and Cohen, M. S., (2004). *Trichomoniasis: clinical manifestations, diagnosis and management*. *Sexually Transmitted Infections* 80, 91-95 Tasca, T., C. D.
- Bonan, et al. (2005). "Heterogeneity in extracellular nucleotide hydrolysis among clinical isolates of *Trichomonas vaginalis*." *Parasitology* 131(Pt 1): 71-78.
- Temesvári, P., Kerekes, A., Tege, A., and Szarka, K., (2002). Demonstration of *Trichomonas vaginalis* in tracheal aspirates in infants with early respiratory failure. *The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine* 11, 347-349.
- Torres-Machorro, A. L., R. Hernandez, et al. (2006). "The 5S ribosomal RNA gene from the early diverging protozoa *Trichomonas vaginalis*." *Mol Biochem Parasitol* 145(2): 269-273.
- Torres-Romero, J. C., Arroyo, R. (2009). Responsiveness of *Trichomonas vaginalis* to iron concentrations: evidence for a post-transcriptional iron regulation by an IRE/IRP-like system. *Infection, Genetics and Evolution*, 9(6), 1065-1074.
- Tourrière, H., Chebli, K., Tazi, J. (2002). mRNA degradation machines in eukaryotic cells. *Biochimie*, 84(8), 821-837.
- Unemo, M., Ballard, R., Ison, C., Lewis, D., Ndowa, F., & Peeling, R. (2014). Diagnóstico de laboratorio de las infecciones de transmisión sexual, incluida la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana. Organización Panamericana de la Salud.
- Van Zundert, G. C. P., Rodrigues, J. P. G. L. M., Trellet, M., Schmitz, C., Kastiris, P. L., Karaca, E., Bonvin, A. M. J. J. (2016). The HADDOCK2. 2 web server: user-friendly integrative modeling of biomolecular complexes. *Journal of molecular biology*, 428(4), 720-725.
- Vargas-Villarreal, J., Mata-Cárdenas, B. D., Palacios-Corona, R., González-Salazar, F., Cortes-Gutierrez, E. I., Martínez-Rodríguez, H. G., Said-Fernández, S. (2005). *Trichomonas vaginalis*: identification of soluble and membrane-

associated phospholipase A1 and A2 activities with direct and indirect hemolytic effects. *Journal of Parasitology*, 91(1), 5-11.

- Vazquez Carrillo, L. I., Quintas Granados, L. I., Arroyo, R., Mendoza Hernández, G., González Robles, A., Carvajal Gamez, B. I., Alvarez Sánchez, M. E. (2011). The effect of Zn<sup>2+</sup> on prostatic cell cytotoxicity caused by *Trichomonas vaginalis*. *Journal of integrated OMICS*, 1(2), 198-210.
- Vázquez, F., José García, M., Pérez, F., and Palacio, V., (2001). *Trichomonas vaginalis*: tratamiento y resistencia a nitroimidazoles. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* 19, 114-124.
- Volz, K. (1999). "A test case for structure-based functional assignment: The 1.2 Å crystal structure of the yjgF gene product from *Escherichia coli*." *Protein Science* 8(11): 2428-2437.
- Villalobos Osnaya AM de la L (2011). Tesis de maestría: Caracterización del posible inhibidor de TvelF-5A de *Trichomonas vaginalis*. Universidas Autónoma de la Ciudad de México
- World Health Organization, un reporte acerca de Infecciones de transmisión sexual. (2019). [https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/sexually-transmitted-infections-\(stis\)](https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/sexually-transmitted-infections-(stis))

## 12. Apéndice

### **SOLUCIONES**

#### **Gel de agarosa al 1.5%**

Agarosa (Gibco BRL)      0.30 gr  
TAE 1X      20 ml  
Bromuro de Etidio    4 $\mu$ l (0.5 mg/ml)

#### **Amortiguador TAE 50X**

Trizma base      242gr  
Ácido acético glacial      57.1 ml  
EDTA 37.2 gr  
Se afora a 1 litro de H<sub>2</sub>O y se ajusta el pH a 8.5.

#### **PBS 1X pH 7.0**

NaCl 8 gr  
KCl 8 gr  
Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.65gr  
KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.2gr  
Se ajusta el pH a 7.0 y se afora a 1 litro de agua destilada.

#### **Etanol al 75%**

Para 100 ml  
Etanol al 100%      75 ml  
H<sub>2</sub>O- DEPC      30 ml

#### **Medio Luria Broth**

Luria Broth (LB)      20 gr  
Se disuelve en 1000 ml y esteriliza por autoclave.

### **Ampicilina (100 µg/ml)**

Se pesan 0.1 gr y disuelve en 1ml de agua inyectable, se filtra 0.22 µm, para esterilizar se cubre de la luz y almacena a -20°C.

### **Preparación de 1,4-damino-2-butanona (DAB) 20 mM**

DAB .35012 gr

Se disuelve en 2 ml de medio TYM frío y se filtra por 22 µm, esta solución se agrega a 90 ml de medio TYM y se guarda a 4°C/ ON.

### **Preparación de putrescina 40 mM**

Putrescina 0.4025 gr

Se disuelve en 2 ml de medio TYM frío y se esteriliza con filtro 0.22 µm, se agrega a 54 ml de medio TYM y se almacena a 4°C/ ON.

### **Acrilamida al 30%/ bisacrilamida al 0.8%**

Acrilamida 29.2 gr

Bisacrilamida 0.8 gr

Se disuelve en 40 ml de agua destilada, una vez disuelto se afora a 100 ml, se filtra con papel filtro "Whatman" No.1 y se almacena a 4°C protegido de la luz.

### **4X Tris-CI/ SDS pH 6.8**

Tris base 6.055 gr

SDS 0.4 gr

Se disuelve en 60 ml de H<sub>2</sub>O destilada, se ajusta el pH a 6.8 y se lleva a 100 ml.

### **4X Tris-CI/ SDS pH 8.8**

Tris base 18.165 gr

SDS 0.4 gr

Se disuelve en 60 ml de H<sub>2</sub>O destilada, se ajusta el pH a 8.8 y se lleva a 100 ml.

### **Persulfato de amonio al 10% (PSA)**

Se pesa 10 mg (0.01gr) de PSA en un mililitro de agua destilada.

### **Solución colorante de proteínas**

Metanol 500 ml

Ácido acético glacial 100 ml

Agua destilada 400 ml

Azul de Comassie 0.5gr

Disolver toda la noche, filtrar con papel filtro "Whatman" no. 1. Almacenar a temperatura ambiente.

### **Solución decolorante de geles de poliacrilamida**

Metanol 165 ml

Ácido acético glacial 50 ml

Agua destilada 785 ml

Disolver y almacenar a temperatura ambiente.

### **4X Tris-Cl/ SDS pH 6.8 (Geles PAGE)**

Tris base 6.055 gr

Se disuelve en 60 ml de H<sub>2</sub>O destilada, se ajusta el pH a 6.8 y se lleva a 100 ml.

### **4X Tris-Cl/ SDS pH 8.8**

Tris base 18.165 gr

Se disuelve en 60 ml de H<sub>2</sub>O destilada, se ajusta el pH a 8.8 y se lleva a 100 ml.

### **Amortiguador de transferencia**

Trizma-base 25 mM

Glicina 190 mM

Metanol 20 %

Disolver primero el Trizma y Glicina. Posteriormente se agrega metanol, se afora con 1 litro de H<sub>2</sub>O destilada. Enfriar a 4°C hasta su uso.

### **Amortiguador de fijación**

Paraformaldehido	4%
Glutaraldehído	0.5%

### **Amortiguador de fosfatos**

NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	20mM
NaCl	0.15 M

### **Amortiguador M3**

Tris base	50 mM
NaCl	150 mM
EDTA	1mM
DTT	1mM

Se ajusta el pH 7.5 y se afora a 1litro, se guarda a 4°C

### **Amortiguador M2**

Tris-HCl	50 mM
KCl	75 mM
MgCl <sub>2</sub>	3 mM
DTT	10 mM

Se ajusta el pH 7.5 y se afora a 1litro, se guarda a 4°C

### **Amortiguador M1**

Tris HCl	25 mM
NaCl	30 mM
EDTA	0.5 mM
DTT	1mM

Se ajusta el pH 7.5 y se afora a 1litro, se guarda a 4°C

## 13. Anexos

### Artículos publicados

ORIGINAL PAPER



# Identification of a perchloric acid-soluble protein (PSP)-like ribonuclease from *Trichomonas vaginalis*

Alma Villalobos-Osnaya<sup>1</sup> & Georgina Garza-Ramos<sup>2</sup> & Iris N. Serratos<sup>3</sup> & César Millán-Pacheco<sup>4</sup> & Arturo González-Robles<sup>5</sup> & Rossana Arroyo<sup>5</sup> & Laura Itzel Quintas-Granados<sup>6</sup> & María Elizabeth Alvarez-Sanchez<sup>1</sup>

Received: 22 June 2018 / Accepted: 23 August 2018

# Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature 2018

#### Abstract

A perchloric acid-soluble protein (PSP), named here *tv-psp1*, was identified in *Trichomonas vaginalis*. It is expressed under normal culture conditions according to expressed sequence tag (EST) analysis. On the other hand, Tv-PSP1 protein was identified by mass spectrometry with a 40% of identity to human PSP (p14.1). Polyclonal antibodies against recombinant Tv-PSP1 (rTv-PSP1) recognized a single band at 13.5 kDa in total protein parasite extract by SDS-PAGE and a high molecular weight band analyzed by native PAGE. Structural analysis of Tv-PSP1, using dynamic light scattering, size exclusion chromatography, and circular dichroism spectroscopy, showed a trimeric structure stable at 7 M urea with 38%  $\alpha$ -helix and 14%  $\beta$ -sheet in solution and a molecular weight of 40.5 kD. Tv-PSP1 models were used to perform dynamic simulations over 100 ns suggesting a stable homotrimeric structure. Tv-PSP1 was located in the nucleus, cytoplasm, and hydrogenosomes of *T. vaginalis*, and the in silico analysis by Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes/Proteins (STRING) showed interactions with RNA binding proteins. The preliminary results of RNA degradation analysis with the recombinant Tv-PSP1 showed RNA partial deterioration suggesting a possible putative ribonuclease function.

**Keywords** *Trichomonas vaginalis* · Perchloric acid-soluble proteins · Molecular dynamic · Cellular localization · Homotrimeric structure · Size exclusion chromatographic

#### Introduction

Perchloric acid-soluble proteins (PSPs) are members of the YER057c/YjgF/UK114 protein family, which possesses a diversity of biological functions and are highly conserved in archaea,

bacteria and eukaryotes. These proteins participate in the oxidative pentose phosphate pathway in bacteria, the regulation of metabolic pathways and cell differentiation in *Saccharomyces cerevisiae* (Enos-Berlage et al. 1998; Kanouchi et al. 2000; Kim et al. 2001), and they might bind to mRNA to regulate its

Handling Editor: Julia Walochnik

Electronic supplementary material The online version of this article (<https://doi.org/10.1007/s00436-018-6065-6>) contains supplementary material, which is available to authorized users.

\* María Elizabeth Alvarez-Sanchez  
elizabeth2@gmail.com; maria.alvarez@uacm.edu.mx

<sup>4</sup> Facultad de Farmacia, Universidad Autónoma del Estado de Morelos, 62209 Cuernavaca, Morelos, Mexico

<sup>1</sup> Posgrado en Ciencias Genómicas, Universidad Autónoma de la Ciudad de México (UACM), San Lorenzo # 290, Col. Del Valle, 03100 Ciudad de Mexico, Mexico

<sup>2</sup> Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, Universidad # 3000, 04510 Ciudad de Mexico, Mexico

<sup>3</sup> Departamento de Química, Universidad Autónoma Metropolitana, Apartado Postal 55-534, Iztapalapa, 09340 Ciudad de Mexico, Mexico

<sup>5</sup> Departamento de Infectómica y Patogénesis Molecular, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV-IPN), Av. IPN # 2508, Col. San Pedro Zacatenco, Delg. Gustavo A. Madero, 07360 Ciudad de Mexico, Mexico

<sup>6</sup> Universidad Mexiquense del Bicentenario, Unidad de Estudios Superiores Tultitlan, Av. Ex Hacienda de Portales s/n, Col. Villa Esmeralda, 54910 Tultitlan, Estado de México, Mexico

function (Dhawan et al. 2012; Miyakawa et al. 2006). In addition, PSPs also have ribonuclease activity in rat liver (Morishita et al. 1999), as molecular chaperones in *Drosophila melanogaster* (Farkas et al. 2004), and are involved in the inhibition of chemical carcinogenesis in Syrian hamster and human cancer cells (Bartorelli et al. 1996; Bussolati et al. 1997; Ghezzi et al. 1999). It has also been described that PSP from *Leishmania infantum* increases the survival of protozoan parasites (da Fonseca Pires et al. 2014). Another PSP from *Entamoeba histolytica* (EhL-PSP) might be part of the exosome complex (López-Rosas et al. 2014). However, the specific role of PSPs in these protozoan parasites is not well known yet.

PSPs have different cellular locations in several organisms; this could be related to the cellular functions of this protein family. In *S. cerevisiae* PSP proteins, Mmf1p and Hmf1p are located in the mitochondria, as well as in the nucleus and cytoplasm, respectively (Kim et al. 2001). Mammalian PSPs UK114 from goat and hp14.5 from human are located in the cytoplasm (Mistiniene et al. 2003), peroxisomes, and endoplasmic reticulum (ER) (Antononkov et al. 2007), whereas K-PSP from rat is located in the cytosol, ER, and Golgi apparatus (Kanouchiet al. 2000) and in parasites, EhL-PSP is located in the cytoplasm and plasmatic membrane of *E. histolytica* (López-Rosas et al. 2014).

PSPs have approximately 130 amino acid residues and contain a short segment of nine invariant amino acids (P-X<sub>5</sub>-Y-X<sub>13</sub>-G-X<sub>25</sub>-N-X<sub>27</sub>-F-X<sub>3</sub>-N-X<sub>13</sub>-R-X<sub>8</sub>-P-X<sub>5</sub>-E) that might be involved in the catalytic binding site of this protein family (Manjasetty et al. 2004). According to the *Mycobacterium tuberculosis* PSP crystal structure, these proteins are homotrimeric, forming a triangular barrel (Thakur et al. 2010) in which each monomer has six-stranded  $\beta$ -sheet and two  $\alpha$ -helices (Manjasetty et al. 2004).

*Trichomonas vaginalis* is the causal agent of trichomoniasis, a sexually transmitted disease (STD), affecting over 276 million people worldwide (WHO 2012). Infection with *T. vaginalis* causes infertility, low birth weight infants (El-Shazly et al. 2001), and preterm delivery and increases susceptibility to cervical neoplasia (Mason and Gwanzura 1990), which emphasizes the need of studying the biology of this parasite. The aim of this study was to identify, isolate, and determine the structural characteristics of Tv-PSP1 from *T. vaginalis*. This is the first report about a putative PSP protein in *T. vaginalis* with a possible putative function as a ribonuclease in this parasite. The PSP biophysical data revealed in this work should shed light on the biology of this parasite.

## Materials and methods

### *T. vaginalis* culture

*T. vaginalis* isolate CNCD147 (Alvarez-Sanchez et al. 2000) was cultured in trypticase-yeast extract-maltose (TYM)

medium at pH 6.2 with 10% heat inactivated horse serum (Gibco, CA, USA). *Trichomonas* harvested at mid-logarithmic phase were used in all assays.

### Isolation of soluble Perchloric acid proteins

*T. vaginalis* ( $1 \times 10^8$ ) were collected by centrifugation at  $300 \times g$  for 5 min at 4 °C and washed three times with PBS at pH 7.0. Pellet was resuspended in a buffer containing 50 mM Tris-Base, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, and 1 mM DTT and supplemented with a protease inhibitor cocktail tablet (Roche). The suspension was sonicated at a cycle of 80% amplitude for 30 s (on/off) and centrifuged at  $10,000 \times g$  for 60 min at 4 °C. Thereafter, perchloric acid (Sigma-Aldrich, Santa Clara, USA) was added to a final concentration of 5% (v/v) and centrifuged at  $10,000 \times g$  for 15 min at 4 °C. The supernatant was collected and precipitated with 20% of ammonium sulfate (Sigma-Aldrich). PSP-pellet was resuspended in the same buffer described above. Concentration of proteins was spectrophotometrically quantified at A<sub>280</sub> using the Nanodrop (Thermo Scientific). The protein patterns were analyzed by SDS-PAGE and visualized by silver staining (Shevchenko et al. 1996).

### 2-DE

For the first dimension, 30  $\mu$ g of perchloric acid-soluble proteins from *T. vaginalis* was resuspended in 120  $\mu$ l of rehydration buffer (7 M urea, 4% CHAPS, 70 mM DTT, 2% IPG buffer pH 4–7, trace bromophenol blue; Bio-Rad) and applied to an IPG strip (7 cm, pH 3–10 linear; Bio-Rad) for passive rehydration for 16 h. The isoelectric focusing experiment was performed on a Protean IEF system (Bio-Rad) as follows: step 1—gradient from 1 to 250 V for 40 min; step 2—4000 V for 3 h; and step 3—voltage gradient from 4000 to 10,000 Vh. Prior to the second dimension, proteins were reduced (10 mg/ml DTT) and alkylated (25 mg/ml of iodoacetamide, Bio-Rad), for 15 min 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 for 15 min. Equilibrated IPG strips were separated on 15% SDS-PAGE gels (7 cm  $\times$  8 cm  $\times$  1.0 mm) using the Mini-Protean II Cell vertical system (Bio-Rad) and standard running buffer (0.25 M Tris, 0.2 M glycine, and 1% SDS). Gels were run at 35 mA/gel at room temperature and stained with Coomassie Brilliant Blue G-250 or transferred to nitrocellulose membranes and used for Western Blot assay.

### Identification of perchloric acid-soluble proteins from *T. vaginalis* by MS

Identification of PSPs was performed by mass spectrometry (MS) coupled to liquid chromatography (LC) (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 nano-Acquity Ultraperformance LC system (Waters Corporations, Milford, MA). Samples were desalted by injection onto a Symmetry C18 UPCL trapping capillary column (180 mm × 20 mm, Waters Corporations, Milford, MA) and washed with 0.1% formic acid for a 60-min period at a flow rate of 0.25 ml/min. The 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 dissociations (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.

For protein identification, the molecular mass of each tryptic fragment was used as a query at the National Center for Biotechnology non-redundant database using the MASCOT search algorithm (Matrix Science, London, UK; available at <http://www.matrixscience.com>).

#### Sequence alignment and homology search of PSPs in *T. vaginalis*

The amino acid sequence from hp14.5, a PSP from *Homo sapiens*, was used as query to perform a BLASTP analysis using the TrichDB database (<http://trichdb.org/trichdb/>) (Aurrecochea et al. 2009). After that, the identified PSP-like sequences of *T. vaginalis* were used to perform the expression sequence analysis using the TrichDB expressed sequence tag (ESTs) database. *T. vaginalis* PSP-like sequences were used to perform a PSI-BLAST analysis (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/sss/psiblast/>) against the sequences from several protozoan parasites (*Entamoeba dispar*, *E. histolytica*), mammals (*Rattus norvegicus*, *Mus musculus*, *Homo sapiens*, *Bos taurus*, *Capra hircus*), fish (*Anoplopoma fimbria* and *Ictalurus punctatus*), plants (*Oryza sativa*, *Arabidopsis thaliana*, *A. lyrata*), bacteria (*Aeromonas salmonicida* and *Anaerostipes caccae*), and amphibians (*Xenopus laevis*, *X. tropicalis*). Several sequences were used to perform the alignment by CLUSTAL-W (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2>) for corroborate characteristic motif of the PSP family in Tv-PSPs and to predict the domains present in the selected proteins ProDom ([prodom.prabi.fr/prodom/current/html/home.php](http://prodom.prabi.fr/prodom/current/html/home.php)) (Servant et al. 2002).

#### RNA isolation and semi-quantitative RT-PCR

Parasites ( $2 \times 10^7$ ) were collected by centrifugation at 624×*g* for 5 min at 4 °C (Allegra X-22R Centrifuge, Beckman

Coulter). The pellet was suspended in 1 ml of TRIzol® reagent (Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), and the total RNA was extracted as recommended by the manufacturer. RNA concentration was determined spectrophotometrically (A260/280). Total RNA (1 µg) was treated with DNase RQ1 (Promega) according to manufacturer's instructions. The treated RNA was reverse-transcribed using the Superscript®III Reverse Transcriptase (Invitrogen) and the oligo-dT (dT20) (10 pmol/µl) primer. PCR was performed with the PCR Master Mix (ROCHE) containing 1 µg of cDNA, the full length (375 pb) *tv-psp1* gene (TVAG\_035410) using sense Tv-PSP1-S: 5'-CCGG ATCCATGTCTAAAGTCATCAGC-3', and antisense Tv-PSP1-AS 5'-CCCTCGAGTACTTGTAAGCGATGGC-3' primers that have the *Bam*HI and *Xho*I restriction sites (underlined), respectively with 10 pmol of forward and reverse oligonucleotides. The reaction was incubated at 94 °C for 1 min, followed by 25 cycles at 94 °C for 1 min, 55 °C for 30 s, and 72 °C for 30 s. The final extension was performed at 72 °C for 7 min. The amplification was carried out in a GeneAmpPCR System 9700 thermal cycler (Applied Biosystems). The products were analyzed in 2% agarose gels and visualized by Red Gel staining (Biotium, Inc.), following the specifications of the manufacturer's protocol.

#### Cloning, expression and purification of rTv-PSP1

The PCR product (375 pb) (*tv-psp1*) was cloned into the TOPO-TA vector (Invitrogen) and analyzed by enzymatic restriction with *Bam*HI and *Xho*I restriction enzymes (Promega), subcloned into the pGEX-6P-1 expression vector (GE Healthcare Life Sciences, USA), according to the manufacturer's instructions and sequenced (3130 Genetic Analyzer, Applied Biosystems, USA). rTv-PSP1 expression was induced using 1 mM Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) and performed in transformed *E. coli* BL21 (DE3) strain). A soluble fraction was loaded into a 1-ml Glutathione S-transferase (GST) precast column (GE) and eluted in elution buffer containing reduced glutathione (10 mM). GST-Tag was removed using PreScission Protease (GE) according to the manufacturer's instructions. Purified recombinant protein (rTv-PSP1) was subjected to gel filtration chromatography using a PD10 column (GE) and eluted in 50 mM Tris-Base, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, and 1 mM DTT. rTv-PSP1 was used to obtain polyclonal antibodies or stored at –20 °C until use.

#### Production of α-rTv-PSP1 polyclonal antibody

Four BALB/c mice were immunized with 50 µg of purified rTv-PSP1 using TiterMax Gold Adjuvant (Sigma, USA) according to the manufacturer's instructions. Five weeks later, the serum was collected and tested by Western Blot against purified rTv-PSP1 and the *T. vaginalis* total protein extract

was obtained by sonication and transferred to a nitrocellulose membrane (Bio-Rad). Pre-immune (PI) normal mouse serum was used as a negative control in all experiments with mouse antibodies.

### Western Blot assays

Total protein extract (100 µg) from *T. vaginalis*, perchloric acid-soluble proteins, (80 µg) or rTv-PSP1 (20 µg) were separated by SDS-PAGE or 2-D-SDS-PAGE and transferred onto a nitrocellulose membrane using a semi-dry transfer electroblotting system (Trans-blot SD Semi-Dry Transfer Cell, BioRad) for 20 min at 20 V. Membranes were blocked with 5% non-fat dry milk in PBS pH 7.0 and incubated overnight with anti-rTv-PSP1 polyclonal mouse sera (1:3000 dilution) at 4 °C. After that, the membranes were washed three times with PBS-Tween 0.1% and incubated with HRP conjugated anti-mouse IgG antibody (Zymed) (1:3000) for 1 h at room temperature. Thereafter, the membranes were washed as described above, developed with enhanced chemiluminescence reagent (ECL Plus Western Blotting Detection System, GE), and exposed to X-ray films or documented with ChemiDoc (Bio-Rad). Pre-immune mouse serum (PI) was used as negative control (1:3000 dilution). Additionally, rTv-PSP1 was immunodetected with anti-GST Tag monoclonal antibody (Santa Cruz) (1:500), as recommended by the manufacturer.

### Size exclusion chromatography of rTv-PSP1

rTv-PSP1 without GST was studied by size-exclusion-chromatography using a Superdex 75 HR 10/30 pre-packed column, equilibrated with phosphate buffer pH 7.4 and connected to an Äkta liquid chromatography system (GE). Before injection, samples were filtered through a 0.22-µm membrane and eluted at a flow rate of 1 ml/min. The protein profile was monitored at 280 nm. Stokes radius ( $R_s$ ) was calculated from elution volumes, and a calibration curve was constructed using well-characterized globular proteins (Bovine gamma-globulin, yeast TIM, ovalbumin, carbonic anhydrase, trypsinogen, horse myoglobin, and cytochrome C).

### Dynamic light scattering

The rTv-PSP1 (0.1 mg/ml) protein was filtered through a 0.22-µm membrane-pore diameter, shortly before acquiring its size distribution. A 500-µl black quartz cuvette with 10 mm light path was used. Data were obtained with a Zetasizer µV DLS instrument equipped with a photodiode laser (830 nm) (Malvern Instruments Ltd.). Dispersant refractive index and viscosity were assumed to be 1.33 and 1.003 cP, respectively. The temperature was maintained at 25 °C during the measurements by a Peltier-type temperature control

system. DLS values are the average of 10 distinct scans for 10 acquisitions for 10 s on a given sample. An instrument software was used to analyze the light scattering data.

### Circular dichroism spectroscopy

Circular dichroism (CD) spectra were obtained at 25 °C with a JASCO J-715 spectropolarimeter (Jasco Inc., Easton, MD) equipped with a Peltier-type temperature control system (Model PTC-423S). A Far-UV CD spectrum (200 to 260 nm) was recorded for solutions of 0.1 mg/ml rTv-PSP1 in quartz cells of 0.1 cm path length. For the determination of the spectra, the protein was equilibrated against 20 mM phosphate buffer pH 7.4 containing 92 mM NaCl. Data were collected at 1.0 nm intervals, a bandwidth of 1.0 nm, and at a scan rate of 50 nm/min. Spectra were averaged out of five scans, and the averaged blank spectra of solvents were subtracted. The observed ellipticities were converted to mean residue ellipticity  $[\theta]$  on the basis of a mean molecular mass per residue of 109.2. To estimate the content of secondary structure, data were analyzed with the deconvolution software CDpro (Greenfield 2006).

### Proposed Tv-PSP1 homotrimeric model by homology search

Full-length amino acid sequence of Tv-PSP1 was uploaded to the I-TASSER server online (<http://zhanglab.cmb.med.umich.edu/I-TASSER/>) for tertiary structure prediction (Roy and Zhang 2010; Yang et al. 2015; Zhang 2008). Energy minimization with the 100 steepest descent steps using CHARMM c38b2 (Brooks et al. 1983) and charmm36 parameters (Huang and MacKerell 2013) was performed to obtain the best model. The trimeric model was built using a crystallographic ribonuclease structure (PDB ID: 3R0P) as a template. Energy-minimized monomer was superposed on each monomer of the 3R0P trimeric using Chimera UCSF (Pettersen et al. 2004). Finally, energy minimization with the 100 steepest descent steps with CHARMM was performed to obtain the Tv-PSP1 trimeric model. Crystal structures of homologous proteins with a resolution less than 2 Å (1QU9, 3M1X, 2UYK, 2UYN, 2CVL, 1JD1, 1QD9, 3QUW, 3MQW, 3VCZ, 1ONI, 3R0P, 3I7T, 1X25), from different species obtained by ClustalW Omega (Sievers et al. 2011), were used to perform the alignment and comparison to validate Tv-PSP1 model.

### Molecular dynamics analysis of Tv-PSP1

Trimeric Tv-PSP1 model was solvated with a cubic box of 10 Å water layer around the protein in 0.15 M NaCl, using the CHARMM-GUI server ([www.charmm-gui.org](http://www.charmm-gui.org)) (Jo et al. 2008). Nanoscale Molecular Dynamics (NAMD) configuration

files obtained from CHARMM-GUI were used for NAMD simulation (Jo et al. 2008) of the trimer for 100 ns at 30 °C and 1 atm.

### Tv-PSP1 immunolocalization by TEM

*T. vaginalis* trophozoites ( $4 \times 10^7$ ) of isolate CNC147 were collected by centrifugation at 4 °C and 624xg for 5 min (Allegra X-22R Centrifuge, Beckman Coulter) and washed three times with PBS at pH 7.0. Pellet was fixed with 4% paraformaldehyde and 0.5% glutaraldehyde and embedded in LR White resins (Polysciences, Warrington, PA) as described previously (Goping et al. 1996). Thin sections were obtained with an ultramicrotome (Ultracut E, Reichert-Jung), placed on nickel grids, blocked with fetal bovine serum (FBS) in PBS at pH 7.0 for 1 h, and incubated with polyclonal anti-body anti-rTv-PSP1 (1:5 dilution) overnight at 4 °C. After that, samples were incubated with gold-labeling secondary antibodies (30 nm diameter, Ted Pella INC) and contrasted with uranium acetate and lead citrate. Polyclonal rabbit anti-TvE1F-5A antibody (Carvajal-Gamez et al. 2010) (1:10 dilution) was used as a 15-nm diameter particle control. The pre-immune serum (1:50 dilution) was used as negative control. The samples were visualized in a JEOL JEM-1011 transmission electron microscope (JEOL Ltd., Tokyo, Japan).

### Ribonuclease assay

Total RNA from *T. vaginalis* was obtained by TRIzol® reagent (Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), and 1 µg was used as a template for the ribonuclease assay. Tv-PSP-1 (0.5 pM) and the template were incubated for 4 h at 37 °C in assay buffer (50 mM Tris-HCl, 75 mM KCl, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM DTT). RNase assay was performed and the reactions were loaded in agarose gel 1.7% and stained with red gel. RNase A (Sigma-Aldrich) and non-related protein recombinant GST were used as positive control of ribonuclease activity and for negative control of degradation respectively.

## Results

### *T. vaginalis* genome encodes three putative PSPs

The protein sequence of hp14.5 human PSP, which inhibits protein synthesis *in vitro*, was used as a query to identify homologous proteins in *T. vaginalis* genome. Three putative protein sequences named here Tv-PSP1, Tv-PSP2, and Tv-PSP3 with 40% identity and 91% coverage to hp14.5 human PSP were found in *T. vaginalis* genome, according to BLASTP analysis. The corresponding genes of PSPs (*tv-psp1*, *tv-psp2*, and *tv-psp3*) were located in different contigs in the parasite genome (Fig.1a). Genes *tv-psp1* (gene ID: TVAG\_035410) and *tv-psp3* (gene ID: TVAG\_197820) have

375 bp, whereas gene *tv-psp2* (gene ID: TVAG\_193660) has 378 bp. In the contig DS113183, *tv-psp1* has positive (+) direction and it is flanked upstream and downstream by genes that encode for a hypothetical protein and an ankyrin repeat-containing protein, respectively. Moreover, *tv-psp2* has negative (-) direction in a different contig DS113509 and it is flanked by genes that encode for a hypothetical protein and a neurobeachin putative protein. Finally, *tv-psp3* has a positive (+) direction; it is located in the contig DS113406 and flanked by genes that encode for hypothetical proteins (Fig. 1a).

*In silico* protein sequence analysis showed that Tv-PSP1 and Tv-PSP3 have 125 amino acids while Tv-PSP2 has 126 amino acids. The theoretical molecular weight is similar in the three proteins, ~ 13.4 kDa, but they have different isoelectric point (pI). Tv-PSP1 has a pI of 6.4, but Tv-PSP2 and Tv-PSP3 have a pI of 4.8 and 5.8, respectively. Tv-PSP1 and Tv-PSP2 have 70% identity, whereas Tv-PSP1 and Tv-PSP3 have 53%. All PSP proteins have endoribonuclease L-PSP domains. Data from alignment of TvPSPs with other PSPs from distinct species suggested that the three proteins share some of the nine invariant amino acids that characterize the YER057c/YjgF/UK114 family. Tv-PSP1 has eight from the nine invariant amino acid residues (P<sup>11</sup>, Y<sup>17</sup>, G<sup>31</sup>, F<sup>84</sup>, N<sup>88</sup>, R<sup>102</sup>, P<sup>111</sup>, and E<sup>117</sup>), Tv-PSP2 has seven (P<sup>11</sup>, Y<sup>17</sup>, G<sup>31</sup>, F<sup>84</sup>, N<sup>88</sup>, P<sup>111</sup>, and E<sup>117</sup>), and Tv-PSP3 has eight (P<sup>11</sup>, Y<sup>17</sup>, G<sup>31</sup>, N<sup>55</sup>, F<sup>83</sup>, N<sup>87</sup>, R<sup>101</sup>, and E<sup>116</sup>). It is important to note that the positions of the amino acids shared by Tv-PSP1, Tv-PSP2, and Tv-PSP3 with the YER057c/YjgF/UK114 family members are also conserved (Fig. 1b)

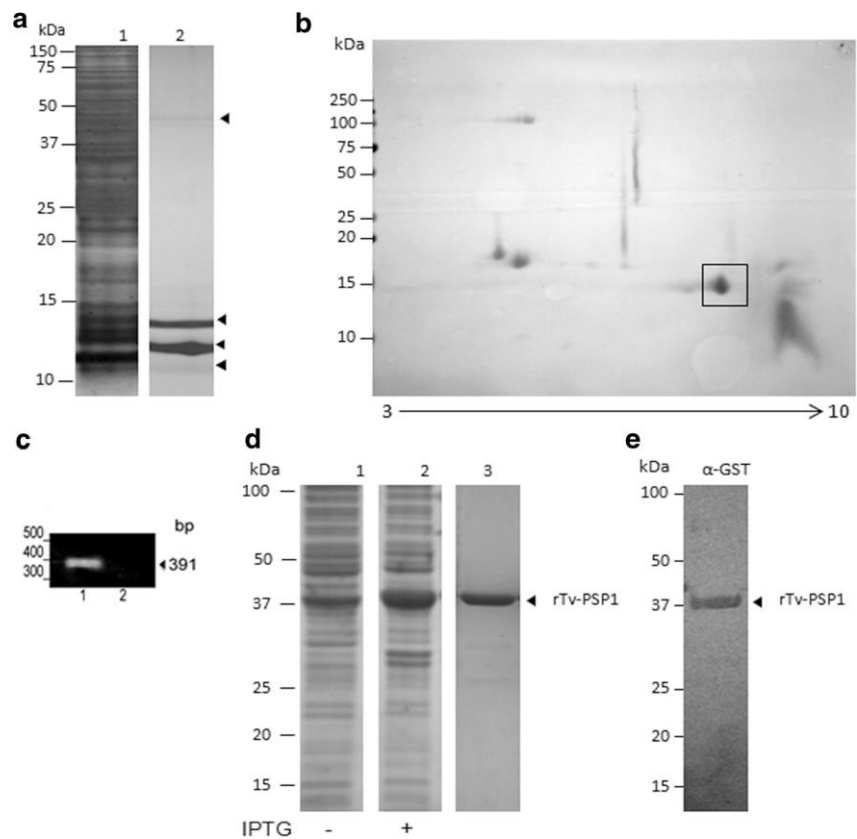
### Identification of Tv-PSP1 from *T. vaginalis*

Total protein *T. vaginalis* extracts (Fig. 2a, lane 1) were precipitated with perchloric acid due the solubility and biochemical characteristics of PSPs; the soluble fraction was precipitated using ammonium sulfate and analyzed by 1-DE (Fig. 2a, lane 2) and two-dimensional gel electrophoresis (2-DE) (Fig. 2b). Two strong bands in 1-DE at ~ 13.5 and 12 kDa (Fig. 2a, lane 2) and four spots ~ 12, 13.5, 17, and 18 kDa in 2-DE gels were observed (Fig. 2b). According to the molecular weight and isoelectric point of the YER057c/YjgF/UK114 protein family members, the spot found at ~ 13 kDa containing the protein focalized in pH 6.2 would correspond to a Tv-PSP1 (Fig. 2b). This spot was analyzed by MS and corresponds to Tv-PSP1 (Table 1). Although 58 ESTs for *tv-psp1* and 10 for *tv-psp3* are available in TrichDB database (Table S1) we did not find the Tv-PSP2 and Tv-PSP3 in the perchloric acid extracts from *T. vaginalis* under the culture conditions assayed here.

Considering the ~ 67% coverage data for Tv-PSP1 obtained by MS, we primers were designed to amplify the *tv-psp1* gene (GenBank ID JQ406681) and a 375-bp RT-PCR product (Fig. 2c) was cloned to obtain the purified recombinant Tv-PSP1 (rTv-PSP1) protein of ~ 39 kDa with high yield after glutathione sepharose chromatography (12 mg/L) (Fig. 2d). Tv-PSP1 was immunorecognized by the anti-GST antibody (Fig. 2e).



Fig. 2 *T. vaginalis* has perchloric acid soluble proteins. a Total protein extract from parasites (lane 1) was solubilized in perchloric acid and precipitated (lane 2). The arrowheads indicate the protein bands corresponding to PSPs. b Trichomonal PSP profile in 2-DE. Perchloric acid-soluble protein extracts (a, lane 2) were loaded into an IPG strip, pH 3–10 range, and resolved by 15% SDS-PAGE. The box encircles the spot identified by MS/MS as a perchloric acid-soluble protein (Tv-PSP1) in *T. vaginalis*. c *tv-psp1* transcript gene expression. d Total protein extract from *E. coli* harboring *tv-psp1* gene expression plasmid before (lane 1) and after (lane 2) IPTG induction. rTv-PSP1 (39 kDa) was purified by affinity chromatography using glutathione sepharose beads (lane 3). e Purified rTv-PSP1 (c, lane 3) was immunodetected using anti-GST antibody. Arrowheads indicate rTv-PSP1 (39 kDa) (c, lane 3 and d)



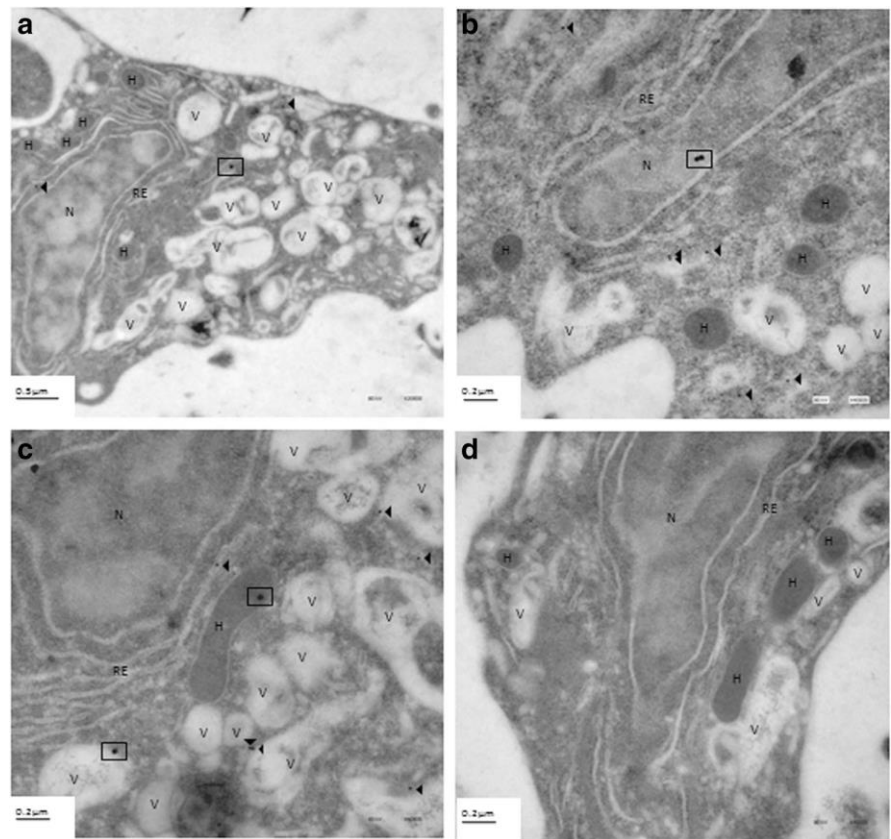
quaternary structure (Fig. S1). Furthermore, its stability was also analyzed *in silico* based on homology modeling and molecular dynamic simulations. The monomeric model of Tv-PSP1 was assembled by I-Tasser server with a C-score value of  $0.94 \pm 0.05$ , suggesting a high confidence level for the model obtained (Fig. 5a). The Tv-PSP1 monomer model showed six-stranded  $\beta$ -sheets and two- $\alpha$ -helices arranged in roughly parallel orientation on one side of the sheet (Fig. 5a). The Tv-PSP1 monomer model was also used for building a trimeric Tv-PSP1 model (subunits A, B, and C) using the PDB ID 3R0P structure as template (Fig. 5b). According to molecular dynamics simulations, the RMSD (root-mean-square deviation) of the Tv-PSP1 backbone, after

100 ns, differed 1.75 Å with respect to the initial models (Fig. 5c). This result suggested that the quaternary structure was stable during the analyzed time. Slight fluctuations were also observed in one of the monomers (subunit C) of the trimeric Tv-PSP1 model (approach RMSD < 2.5 Å) (Fig. S2A). In order to confirm that these fluctuations were due to the presence of loops in the structure, we excluded them from the analysis. The RMSD obtained was completely stable on the chain C of the trimeric Tv-PSP1 model (Fig. S2B). On the other hand, when loops were excluded, the overlapped chains at different times (20, 40, 60, 80, and 100 ns) did not suffer any changes (Fig. S2C). These results indicated that the

Table 1 Fingerprint of peptides obtained by MS/MS of selected spot

Protein	MW/pI	Gene ID	Access number	Mascot score	Matched peptides	(%) coverage	Peptide sequence MS/MS (ion score)
Tv-PSP1	13,826/6.07	TVAG_035410	gi154420980 CNCYLADIADFQK (80) IYADYFGDHKPCR (75) VISTPDAPAAIGPYCQAR (84) ETVEGQAEIIMK (88)	378	6	67	LVELDAIAYK (63)

Fig. 3 Tv-PSP1 subcellular location in *T. vaginalis*. Antibody anti-rTv-PSP (30 nm) was used to detect Tv-PSP1 in fixed parasites. Cytoplasm (a), nuclear (b), and hydrogenosomal location (c) of Tv-PSP1. Boxes and arrowheads indicate the Tv-PSP1 and TvelF-5A respectively, as previously reported. d Pre-immune sera showed no reaction. V vacuoles, N nucleus, H hydrogenosome, ER endoplasmic reticulum. Antibodies anti-rTvelF-5A (15 nm) were used as a control



RSMD fluctuation changes were due to loop movements and not to the stability of the trimeric structure.

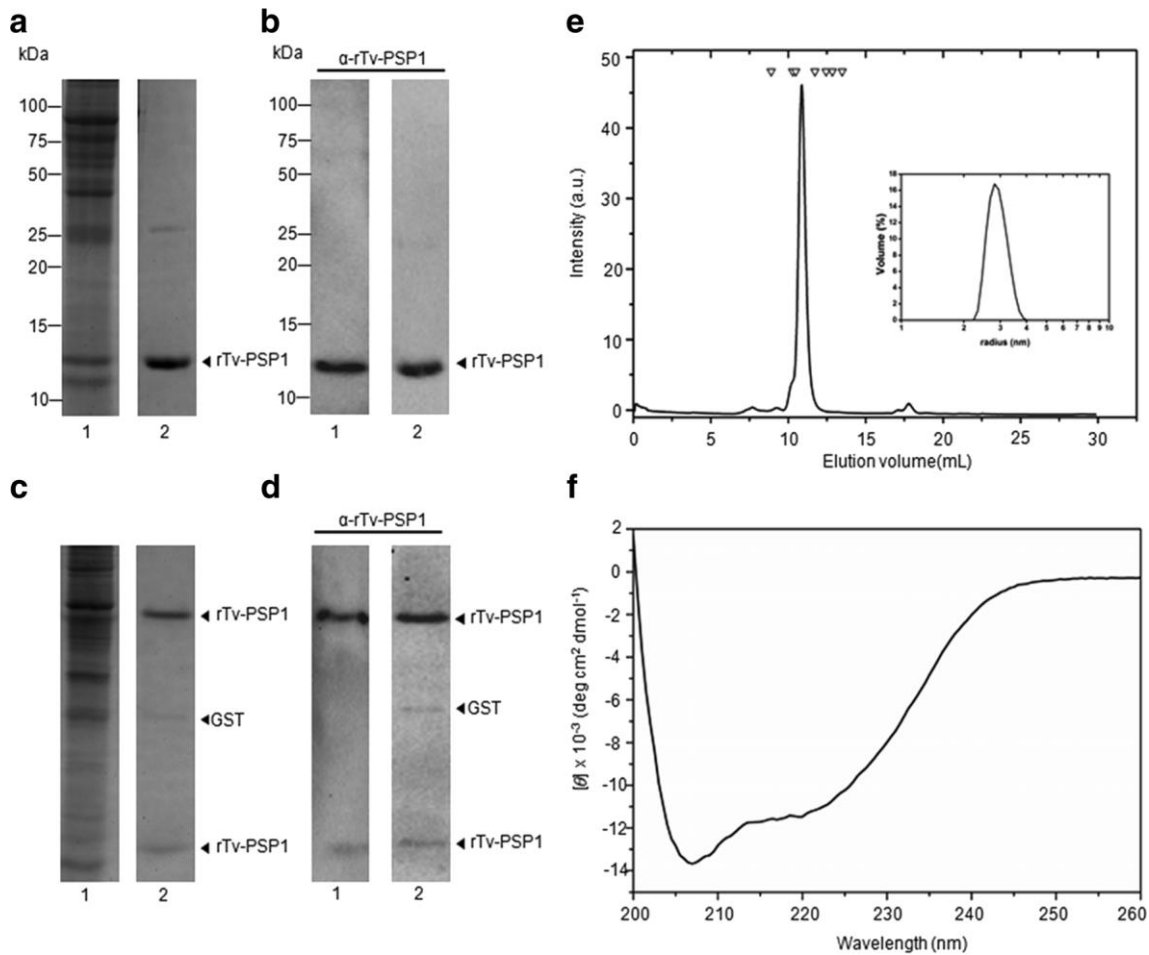
(Fig. 6c). This preliminary result suggests that Tv-PSP1 might have a putative function like a ribonuclease in *T. vaginalis*.

### Putative function of Tv-PSP1 in *T. vaginalis*

According to the previous data, Tv-PSP1 showed an endoribonuclease L-PSP domain and we hypothesized a putative Tv-PSP1 function as ribonuclease just as for other organisms (Morishita et al. 1999). In order to determine the possible participation of Tv-PSP1 into the degradative process of RNA, first, the protein-protein interactions were predicted by the STRING algorithm; the results showed that Tv-PSP1 interacts with proteins that have been described in the exosome of *E. histolytica* as 3' exoribonucleases and endoribonucleases. These proteins had been described in the exosome of the *E. histolytica* as 3' exoribonucleases and endoribonucleases (Fig. 6a) and were used for the search of homologous proteins in *T. vaginalis*, (Fig. 6b). To determine the Tv-PSP1 function, preliminary assays of RNA degradation were carried out in order to analyze the possible ribonuclease activity of Tv-PSP1. The results showed a partial degradation after 4 h when the total trichomonad RNA with rTv-PSP1 was incubated. The RNase A was a positive control

### Discussion

*T. vaginalis* has a large genome (~ 160 Mb), which is also highly redundant, being repetitive in at least 65% of total genes (Carlton et al. 2007). It also contains multiple paralogous gene copies that are expressed differentially under distinct microenvironmental conditions (Oyhenart and Breccia 2014). The gene duplication events in *T. vaginalis* genome might contribute to the parasite adaptation and survival in different environmental conditions (Carlton et al. 2007; Cui et al. 2010). This might also explain why three *tv-psp* genes were found, in comparison with the majority of organisms that only have one copy of the *psp* gene (Antononkov et al. 2007; Ceciliani et al. 1996; Dhawan et al. 2012; Farkas et al. 2004; Oka et al. 1995). However, *S. cerevisiae* and *R. norvegicus* are a few examples of organisms containing more than one gene encoding PSP (Kanouchi et al. 2000; Kim et al. 2001; Oxelmark et al. 2000; Sasagawa et al. 1999). In *T. vaginalis*, according to the EST database



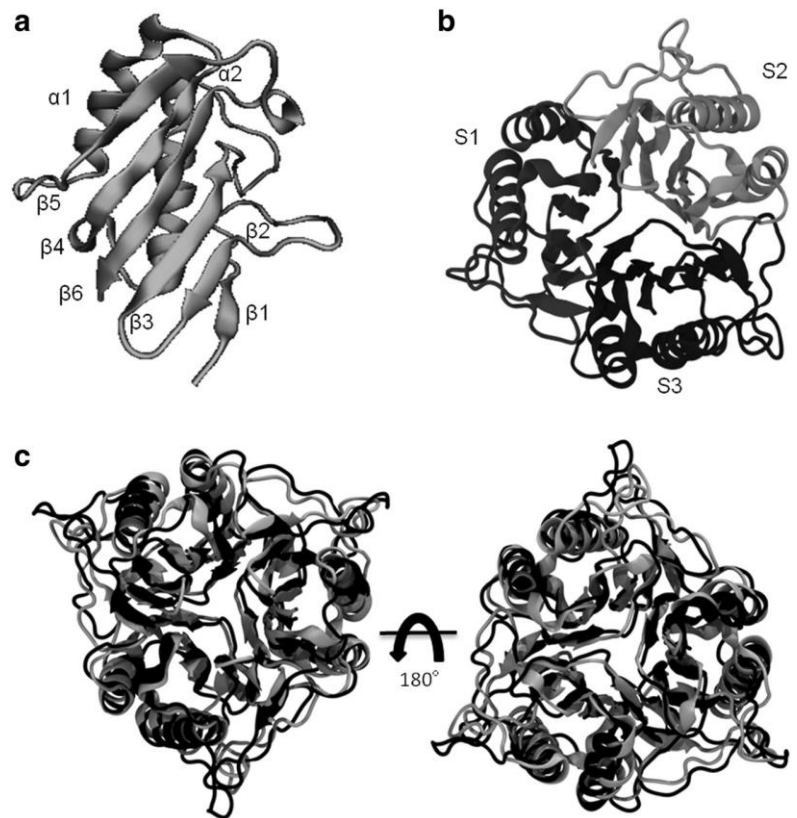
**Fig. 4** Tv-PSP1 structural characterization. **a** Total protein extract from *T. vaginalis* (lane 1) and rTv-PSP1 (lane 2) was resolved in denaturant gels. **b** Immunodetection of Tv-PSP1 in total protein extract from parasites (lane 1) and rTv-PSP1 (lane 2) in denaturant conditions. Arrowhead shows the monomeric Tv-PSP1. Arrowhead in the rTv-PSP1 shows remnants of GST proteins after removal. **c** Total protein extract from *T. vaginalis* (lane 1) and rTv-PSP1 (lane 2) was resolved in PAGE gels. **d** Immunodetection of Tv-PSP1 in total protein extract from parasites (lane 1) and rTv-PSP1 (lane 2) in native conditions.

**e** Arrowhead shows the monomeric and trimeric Tv-PSP1. **e** The positions of molecular-mass standards are indicated by arrows (left to right: Bovine gamma-globulin (150 kDa), yeast TIM (52.2 kDa), ovalbumin (44 kDa), carbonic anhydrase (29 kDa), trypsinogen (24 kDa), horse myoglobin (17 kDa), and cytochrome C (12.4 kDa)). Inset: Hydrodynamic radius distribution plot as determined by DLS measurements of rTv-PSP. Profile is representative of volume-weighted size distribution of protein sample. **f** Far-UV CD spectrum of rTv-PSP1 obtained at 25 °C

analysis, two of the three *tv-psp* genes are expressed (Table S1). Interestingly, two expressed *tv-psp* (1 and 3) genes had a positive direction in the genome, which might be related to their expression. Copies of *T. vaginalis* paralogous genes are not simultaneously expressed (Oyhenart and Breccia 2014) rather they are single expressed in specific culture conditions (Horváthová et al. 2012). Due to *tv-psp2* gene has a negative (-) direction, it probably has not had any EST reported. That *tv-psp2* might be expressed under a very specific microenvironmental condition not studied yet or under particular stress conditions was not discarded. There are several examples of genic regulation mediated by microenvironment in *T. vaginalis*. The *mp50* gene does not express under regular culture conditions, but when parasites are cultured under high  $Zn^{2+}$  levels, the *mp50* gene is expressed as the 50 kDa metalloproteinase TvMP50 (Quintas-Granados et al. 2013).

Tv-PSPs have high identity levels among them, exhibiting Tv-PSP2 and Tv-PSP3 70% and 53% identity with Tv-PSP1, respectively. These results suggested that Tv-PSP proteins are homologous to those belonging to the YER057c/YjgF/UK114 family. According to the results of multiple sequence alignments, Tv-PSPs shared invariant amino acids residues with the YER057c/YjgF/UK114 protein family (Manjasetty et al. 2006). Tv-PSP1 and Tv-PSP3 contained eight totally conserved amino acid residues that were previously reported as possibly involved in structural integrity (Burman et al. 2007), substrate catalytic site (Manjasetty et al. 2004), and the interaction between PSP monomers (Miyakawa et al. 2006). Similarly to the proteins of YER057c/YjgF/UK114 family, Tv-PSP1 was soluble in perchloric acid 5%. However, it is important to note that PSPs are not the only proteins that are soluble in perchloric acid as high mobility group (HMG)

**Fig. 5** Molecular dynamics simulations of Tv-PSP1 trimeric model. **a** Monomeric model of Tv-PSP1 obtained by homology approach. Tv-PSP1 contains two  $\alpha$ -helix ( $\alpha 1$  and  $\alpha 2$ ) and six- $\beta$  sheets ( $\beta 1$ ,  $\beta 2$ ,  $\beta 3$ ,  $\beta 4$ ,  $\beta 5$ , and  $\beta 6$ ). **b** Trimeric model of Tv-PSP1 is formed by three subunits (S1, S2, and S3). **c** Comparison between the initial trimeric model of Tv-PSP1 (gray color) and the final structure after 100 ns by molecular dynamics simulation (black color)



proteins and H1 (Oka et al. 1995). This could explain the several bands and spots resolved after SDS-PAGE analysis of TvPSPs from *T. vaginalis*. The MS data of the identified spot matched a specific PSP sequence with a 67% coverage, indicating that the identified spot corresponded only to Tv-PSP1. Furthermore, experimental *pI* of Tv-PSP1 (6.2) was near to the theoretical *pI* (6.4). Regarding Tv-PSP1 location, this protein was mainly located in the cytoplasm. There are several PSPs found in the cytoplasm, such as Hfm, Uk114, p14.5, K-PSP, and EhL-PSP from *S. cerevisiae*, rat liver, human, rat kidney, and *E. histolytica*, respectively (Kim et al. 2001; López-Rosas et al. 2014; Mistiniene et al. 2003). Tv-PSP1 was also located in the nucleus. This location was also reported for Hfm from

*S. cerevisiae* (Kim et al. 2001). The PSPs present several functions as protein synthesis inhibitors, cellular differentiation regulators, and they are involved in the recognition of RNA and in the decay or stability of this molecule (Dhawan et al. 2012; López-Rosas et al. 2014; Oka et al. 1999). Furthermore, PSPs are also found in other organelles, such as ER, Golgi apparatus, cytoplasmic membrane, peroxisomes, and mitochondria (Antonovkov et al. 2007; Kanouchi et al. 2005; Kanouchi et al. 2000; Kim et al. 2001; López-Rosas et al. 2014). Mitochondrial PSPs might be involved in the isoleucine metabolism and mitochondrial maintenance (Kim et al. 2001).

*T. vaginalis* is lacking mitochondria, but parasites have

hydrogenosomes with a similar function to mitochondria and these organelles might also be involved in the lipids metabolism. PSPs are also capable of binding unsaturated fatty acids (Sasagawa et al. 1999), and Tv-PSP1 might be involved in a biological process related to the metabolism of unsaturated fatty acids as observed in UK114 and p14.5 that are known as fatty acid binding proteins able to bind to oleic and palmitic acids in a stoichiometric manner (Mistiniene et al. 2003).

Another Tv-PSP1 possible function is RNase. This function has been proposed in other PSPs such as Rhp-PSP which has antiviral properties through RNA degradation (Su et al. 2015). To elucidate a similar function of Tv-PSP1 in *T. vaginalis*, ribonuclease assays were performed with rTVPSP-1 and they showed a putative ribonuclease activity. A similar function *in vivo* in the parasite, capable of recognizing and degrading RNA of mRNA, is speculated; other experiments are necessary to clear up the precise mechanism of RNA degradation, but the predicted network showed putative proteins also involved in exosome; this results proposed a relation with other proteins that could be interacting with RNA.

The quaternary structure of Tv-PSP1 showed that the monomeric Tv-PSP1 had a MW of 13.5 kDa under reducing conditions, similar to the one reported for other PSPs (López-Rosas et al. 2014; Oka et al. 1999; Oka et al. 1995; Su et al. 2015). However, under non-reducing native

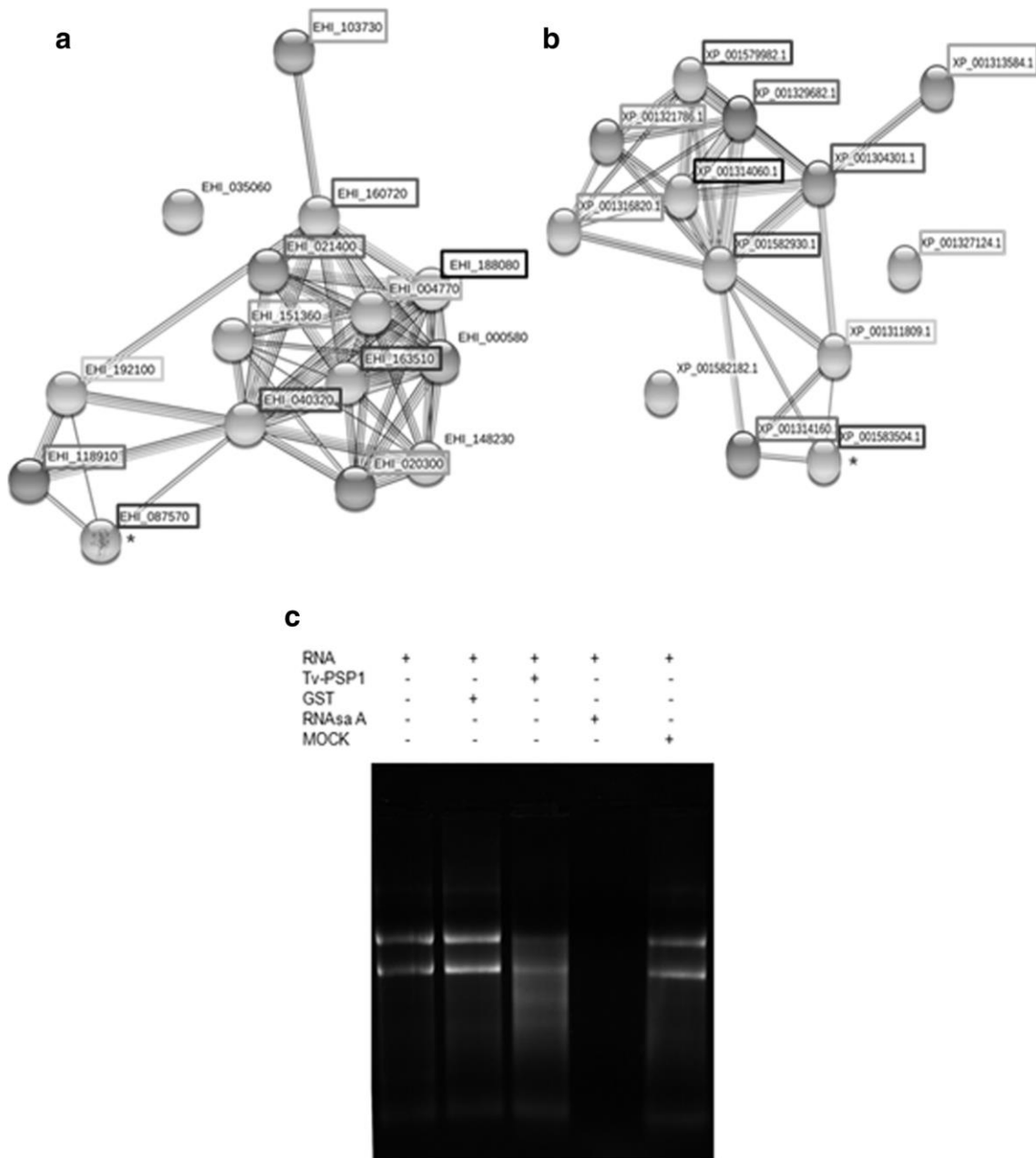


Fig. 6 Putative function of Tv-PSP1 as ribonuclease. a Protein interaction prediction map of *E. histolytica* with the STRING program. b Protein interaction map of *T. vaginalis* with the STRING program. The PSP proteins of both organisms are identified with an asterisk; the homologous of each protein is framed in rectangles. c All samples

contain total RNA (1 $\mu$ g) from *T. vaginalis* and were incubated with GST protein (lane 2) Tv-PSP1 (lane 3), RNase A (lane 4), and MOCK of *E. coli* (lane 5). All samples were incubated at 37 °C and run after incubation in the agarose 1.5% gel stained with red gel

conditions, Tv-PSP1 with MW of 40.5 kDa shows a trimeric conformation. This structure was confirmed by molecular exclusion chromatography analysis and dynamic light scattering. The crystallographic structures of trimeric PSP were formed by three monomers of ~ 13.5 kDa (Mistiniene et al. 2003; Miyakawa et al. 2006; Sinha et al. 1999; Volz 1999). Stokes radius of Tv-PSP1 (28 Å) was consistent with the one reported for crystal structure ST0811 (27 Å) from *Sulfolobus tokodaii* (Miyakawa et al. 2006). Our data suggested that Tv-

PSP1 could be present as a homotrimeric protein inside the parasite, and it might probably be functionally active. Further experiments are in progress to elucidate which of Tv-PSP structures is functional.

Members of YER057c/YjgF/UK114 protein family from *S. cerevisiae*, *E. coli*, *B. subtilis*, *S. tokodaii*, and *H. sapiens* are homotrimeric proteins with a  $\beta$ -barrel-like structure (Deaconescu et al. 2002; Mistiniene et al. 2003; Miyakawa et al. 2006; Sinha et al. 1999; Volz 1999).

Human PSP monomer has six-stranded  $\beta$ -sheets and two- $\alpha$ -helices arranged in roughly parallel orientation on one side of the sheet (Manjasetty et al. 2004), which suggests that they belong to the  $\alpha + \beta$  structural class (Manavalan and Johnson Jr 1983). On the basis of its secondary structure, Tv-PSP1 should belong to  $\alpha + \beta$  structural class protein, also containing 38%  $\alpha$ -helix and 14%  $\beta$ -sheet-rich regions (Manavalan and Johnson Jr 1983). These results are in accordance with the crystal structure of homologous PSPs, which has 23–39%  $\alpha$ -helices and 22–33%  $\beta$ -sheet (Berman et al. 2000). The Tv-PSP1 monomeric model had six- $\beta$ -sheet and two- $\alpha$ -helices with a topology of  $\beta 1, \beta 2, \beta 3, \alpha 1, \beta 4, \alpha 2, \beta 5,$  and  $\beta 6$ , where  $\beta 2$  and  $\beta 6$  were anti-parallel, whereas the other  $\beta$ -sheets were parallel consistent with the homologous proteins (Manjasetty et al. 2004; Miyakawa et al. 2006; Pu et al. 2011).

Our data showed that three Tv-PSP1 subunits formed a trimer shaped as a triangular barrel with a cavity inside. Three  $\alpha$ -helix pairs were located on the outer surface, whereas the  $\beta$ -sheets were positioned in the inner surface of the Tv-PSP1 trimeric model, in a similar arrangement to its homologous PSPs (Manjasetty et al. 2004; Miyakawa et al. 2006; Pu et al. 2011; Sinha et al. 1999).

Previous reports suggested that the active site in Hfm1 is in the grooves found in the binding site between the monomers (Deaconescu et al. 2002). This inner cavity present in some PSPs is important for its functional activity because it works as a binding site for several compounds such as sodium benzoate (Manjasetty et al. 2004), benzoic acid, 1,2-ethanediol, propanoic acid, and serine (Thakur et al. 2010).

The trimeric structure of Tv-PSP1 was highly stable, according to the assay with urea and the results of the molecular dynamic of 100 ns performed with the trimeric model. In addition, Tv-PSP1 trimeric model did not significantly vary by applying temperature or pressure.

The Tv-PSP1 stability was comparable to the one reported for the UK114 and hp14.5 (Mistiniene et al. 2003). The hydrophobic interactions between subunits of UK114 are insignificant, suggesting that electrostatic interactions and an extensive hydrogen-bond network confer to UK114 a high stability. Similar electrostatic interactions in Tv-PSP1 might be involved in its stability. Further studies are necessary to demonstrate if trimeric Tv-PSP1 high stability plays an important role in Tv-PSP1 biological function.

In conclusion, a PSP was identified and characterized in

*T. vaginalis* (Tv-PSP1), which is located in the nucleus, cytoplasm, and hydrogenosomes. Tv-PSP1 has a trimeric structure and a high stability in solution. Parasite genome contains three ORF that encode for PSPs (*tv-psp1, tv-psp2,* and *tv-psp3*), but only two of them have an mRNA according to EST analysis and a putative ribonuclease function in the parasite is proposed. Our findings may contribute to increase the knowledge about this human parasite.

**Acknowledgements** We acknowledge Biol. Anel Edith Lagunes Guillén, M.Sc. Laura Isabel Vazquez Carrillo, QFB Leticia Avila-González, and Brenda Herrera Villalobos for their technical assistance.

**Funding information** This work was supported by UACM and a grant from CONACyT (83808) Mexico (to M.E.A.S.). AVO was supported by a scholarship from ICyTDF (ICyTDF/SRI/70/2011).

## Compliance with ethical standards


**Conflict of interest** The authors declare that they have no conflict of interest.

## References

- Alvarez-Sanchez ME, Avila-Gonzalez L, Becerril-Garcia C, Fattel-Facenda LV, Ortega-Lopez J, Arroyo R (2000) A novel cysteine proteinase (CP65) of *Trichomonas vaginalis* involved in cytotoxicity. *Microb Pathog* 28:193–202. <https://doi.org/10.1006/mpat.1999.0336>
- Antonenkov VD, Ohlmeier S, Sormunen RT, Hiltunen JK (2007) UK114, a YjgF/Yer057p/UK114 family protein highly conserved from bacteria to mammals, is localized in rat liver peroxisomes. *Biochem Biophys Res Commun* 357:252–257. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2007.03.136>
- Aurrecoechea C, Brestelli J, Brunk BP, Carlton JM, Dommer J, Fischer S, Gajria B, Gao X, Gingle A, Grant G, Harb OS, Heiges M, Innamorato F, Iodice J, Kissinger JC, Kraemer E, Li W, Miller JA, Morrison HG, Nayak V, Pennington C, Pinney DF, Roos DS, Ross C, Stoeckert CJ, Sullivan S, Treatman C, Wang H (2009) GiardiaDB and TrichDB: integrated genomic resources for the eukaryotic protist pathogens *Giardia lamblia* and *Trichomonas vaginalis*. *Nucleic Acids Res* 37:D526–D530. <https://doi.org/10.1093/nar/gkn631>
- Bartorelli A, Bussolati B, Millesimo M, Gugliotta P, Bussolati G (1996) Antibody-dependent cytotoxic activity on human cancer cells expressing UK 114 tumor membrane antigen. *Int J Oncol* 8:543–548
- Berman HM, Westbrook J, Feng Z, Gilliland G, Bhat TN, Weissig H, Shindyalov IN, Bourne PE (2000) The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Res* 28:235–242. <https://doi.org/10.1093/nar/28.1.235>
- Brooks BR, Bruccoleri RE, Olafson BD, States DJ, Swaminathan S, Karplus M (1983) CHARMM: a program for macromolecular energy, minimization, and dynamics calculations. *J Comput Chem* 4: 187–217. <https://doi.org/10.1002/jcc.540040211>
- Burman JD, Stevenson CE, Sawers RG, Lawson DM (2007) The crystal structure of *Escherichia coli* TdcF, a member of the highly conserved YjgF/YER057c/UK114 family. *BMC Struct Biol* 7:1
- Bussolati G, Geuna M, Bussolati B, Millesimo M, Botta M, Bartorelli A (1997) Cytolytic and tumor inhibitory antibodies against UK114 protein in the sera of cancer patients. *Int J Oncol* 10:779–785
- Carlton JM, Hirt RP, Silva JC, Delcher AL, Schatz M, Zhao Q, Wortman JR, Bidwell SL, Alsmark UCM, Besteiro S, Sicheritz-Ponten T, Noel CJ, Dacks JB, Foster PG, Simillion C, van de Peer Y, Miranda-Saavedra D, Barton GJ, Westrop GD, Muller S, Dessi D, Fiori PL, Ren Q, Paulsen I, Zhang H, Bastida-Corcuera FD, Simoes-Barbosa A, Brown MT, Hayes RD, Mukherjee M, Okumura CY, Schneider R, Smith AJ, Vanacova S, Villalvazo M, Haas BJ, Perteua M, Feldblyum TV, Utterback TR, Shu CL, Osoegawa K, de Jong PJ, Hrdy I, Horvathova L, Zubacova Z, Dolezal P, Malik SB, Logsdon JM, Henze K, Gupta A, Wang CC, Dunne RL, Upcroft JA, Upcroft P, White O, Salzberg SL, Tang P, Chiu CH, 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* 315:207–212

- Carvajal-Gamez B, Arroyo R, Lira R, López-Camarillo C, Alvarez-Sánchez M (2010) Identification of two novel *Trichomonas vaginalis* 5a genes. *Infect Genet Evol* 10:284–291
- Ceciliani F, Faotto L, Negri A, Colombo I, Berra B, Bartorelli A, Ronchi S (1996) The primary structure of UK 114 tumor antigen. *FEBS Lett* 393:147–150. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(96\)00850-2](https://doi.org/10.1016/0014-5793(96)00850-2)
- Cui J, Das S, Smith TF, Samuelson J (2010) *Trichomonas* transmembrane cyclases result from massive gene duplication and concomitant development of pseudogenes. *PLoS Negl Trop Dis* 4:e782
- Deaconescu AM, Roll-Mecak A, Bonanno JB, Gerchman SE, Kycia H, Studier FW, Burley SK (2002) X-ray structure of *Saccharomyces cerevisiae* homologous mitochondrial matrix factor 1 (Hmf1). *Proteins: Struct, Funct, Bioinf* 48:431–436. <https://doi.org/10.1002/prot.10151>
- Dhawan LLB, Pytlak A, Kulshrestha S, Blaxall BC, Taubman MB (2012) Y-box binding protein 1 and RNase UK114 mediate monocyte chemoattractant protein 1 mRNA stability in vascular smooth muscle cells. *Mol Cell Biol* 32:3768–3775. <https://doi.org/10.1128/MCB.00846-12>
- El-Shazly AM, El-Naggar HM, Soliman M, El-Negeri M, El-Nemr HE, Handousa AE, Morsy TA (2001) A study on *Trichomoniasis vaginalis* and female infertility. *J Egypt Soc Parasitol* 31:545–553
- Enos-Berlage JL, Langendorf MJ, Downs DM (1998) Complex metabolic phenotypes caused by a mutation in *yjgF*, encoding a member of the highly conserved YER057c/YjgF family of proteins. *J Bacteriol* 180:6519–6528
- Farkas A, Nardai G, Csermely P, Tompa P, Friedrich P (2004) DUK114, the *Drosophila* orthologue of bovine brain calpain activator protein, is a molecular chaperone. *Biochem J* 383:165–170
- da Fonseca Pires S, Fialho LC Jr, Silva SO, Melo MN, de Souza CC, Tafuri WL, Bruna Romero O, de Andrade HM (2014) Identification of virulence factors in *Leishmania infantum* strains by a proteomic approach. *J Proteome Res* 13:1860–1872. <https://doi.org/10.1021/pr400923g>
- Ghezzi F, Berta GN, Bussolati B, Bosio A, Corvetto G, di Carlo F, Bussolati G, Guglielmo R, Bartorelli A (1999) Perchloric acid-soluble proteins from goat liver inhibit chemical carcinogenesis of Syrian hamster cheek-pouch carcinoma. *Br J Cancer* 79:54–58. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6690011>
- Goping G, Kuijpers G, Vinet R, Pollard HB (1996) Comparison of LR White and Unicryl as embedding media for light and electron immunomicroscopy of chromaffin cells. *J Histochem Cytochem* 44:289–295
- Greenfield NJ (2006) Using circular dichroism spectra to estimate protein secondary structure. *Nat Protoc* 1:2876–2890. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.202>
- Horváthová L, Šafaříková L, Basler M, Hrdý I, Campo NB, Shin JW, Huang KY, Huang PJ, Lin R, Tang P, Tachezy J (2012) Transcriptomic identification of iron-regulated and iron-independent gene copies within the heavily duplicated *Trichomonas vaginalis* genome. *Genome Biol Evol* 4:1017–1029
- Huang J, MacKerell AD (2013) CHARMM36 all-atom additive protein force field: validation based on comparison to NMR data. *J Comput Chem* 34:2135–2145. <https://doi.org/10.1002/jcc.23354>
- Jo S, Kim T, Iyer VG, Im W (2008) CHARMM-GUI: a web-based graphical user interface for CHARMM. *J Comput Chem* 29:1859–1865. <https://doi.org/10.1002/jcc.20945>
- Kanouchi H, Oka T, Asagi K, Tachibana H, Yamada\* K (2000) Expression and cellular distribution of perchloric acid-soluble protein is dependent on the cell-proliferating states of NRK-52E cells. *Cell Mol Life Sci* 57:1103–1108. <https://doi.org/10.1007/pl00000746>
- Kanouchi H, Matsumoto M, Taga M, Yamada K, Oka T, Toné S, Minatogawa Y (2005) Nuclear transfer of perchloric acid-soluble protein by endoplasmic reticulum stressors. *Protein Sci* 14:2344–2349. <https://doi.org/10.1110/ps.051481105>
- Kim J-M, Yoshikawa H, Shirahige K (2001) A member of the YER057c/yjgF/UK114 family links isoleucine biosynthesis and intact mitochondria maintenance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Cells* 6:507–517. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2443.2001.00443.x>
- López-Rosas I, Marchat LA, Olvera BG, Guillen N, Weber C, Hernández de la Cruz O, Ruíz-García E, Astudillo-de la Vega H, López-Camarillo C (2014) Proteomic analysis identifies endoribonuclease EhL-PSP and EhRRP41 exosome protein as novel interactors of EhCAF1 deadenylase. *J Proteome* 111:59–73. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2014.06.019>
- Manavalan P, Johnson WC Jr (1983) Sensitivity of circular dichroism to protein tertiary structure class. *Nature* 305:831–832. <https://doi.org/10.1038/305831a0>
- Manjasetty BA et al (2004) Crystal structure of Homo sapiens protein hp14.5. *Proteins: Struct, Funct, Bioinf* 54:797–800
- Mason PR, Gwanzura L (1990) Reduced lymphocyte responses to mitogens in natural and experimental trichomoniasis. *Infect Immun* 58:3553–3557
- Melloni E, Michetti M, Salamino F, Pontremoli S (1998) Molecular and functional properties of a Calpain activator protein specific for  $\mu$ -isoforms. *J Biol Chem* 273:12827–12831. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.21.12827>
- Mistiniene E, Luksa V, Sereikaite J, Naktinis V (2003) Oligomeric assembly and ligand binding of the members of protein family YER057c/YIL051c/YJGF. *Bioconjug Chem* 14:1243–1252
- Miyakawa T, Lee WC, Hataco K, Kato Y, Sawano Y, Miyazono KN, Tonakura M (2006) Crystal structure of the YjgF/YER057c/UK114 family protein from the hyperthermophilic archaeon *Sulfolobus tokodaii* strain. *Proteins: Struct, Funct, Bioinf* 62:557–561
- Morishita R, Kawagoshi A, Sawasaki T, Madin K, Ogasawara T, Oka T, Endo Y (1999) Ribonuclease activity of rat liver Perchloric acid-soluble protein, a potent inhibitor of protein synthesis. *J Biol Chem* 274:20688–20692. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.29.20688>
- Oka T et al (1995) Isolation and characterization of a novel perchloric acid-soluble protein inhibiting cell-free protein synthesis. *J Biochem Chem* 270:30060–30067
- Oka T, Nishimoto Y, Sasagawa T, Kanouchi H, Kawasaki Y, Natori Y (1999) Production of functional rat liver PSP protein in *Escherichia coli*. *Cell Mol Life Sci* 55:131–134
- Oxelmark E, Marchini A, Malanchi I, Magherini F, Jaquet L, Hajibagheri MAN, Blight KJ, Jauniaux JC, Tommasino M (2000) Mmf1p, a novel yeast mitochondrial protein conserved throughout evolution and involved in maintenance of the mitochondrial genome. *Mol Cell Biol* 20:7784–7797
- Oyhenart J, Breccia JD (2014) Evidence for repeated gene duplications in *Trichomonas foetus* supported by EST analysis and comparison with the *Trichomonas vaginalis* genome. *Vet Parasitol* 206:267–276
- Pettersen EF, Goddard TD, Huang CC, Couch GS, Greenblatt DM, Meng EC, Ferrin TE (2004) UCSF chimera—a visualization system for exploratory research and analysis. *J Comput Chem* 25:1605–1612. <https://doi.org/10.1002/jcc.20084>
- Pu Y-G, Jiang YL, Ye XD, Ma XX, Guo PC, Lian FM, Teng YB, Chen Y, Zhou CZ (2011) Crystal structures and putative interface of *Saccharomyces cerevisiae* mitochondrial matrix proteins Mmf1 and Mam33. *J Struct Biol* 175:469–474
- Quintas-Granados LI, Villalpando JL, Vázquez-Carrillo LI, Arroyo R, Mendoza-Hernández G, Álvarez-Sánchez ME (2013) TvMP50 is an immunogenic metalloproteinase during male trichomoniasis. *Mol Cell Proteomics* 12:1953–1964
- Roy AKA, Zhang Y (2010) I-TASSER: a unified platform for automated protein structure and function prediction. *Nat Protoc* 5:725–738. <https://doi.org/10.1038/nprot.2010.5>
- Sasagawa T, Oka T, Tokumura A, Nishimoto Y, Muñoz S, Kuwahata M, Okita M, Tsuji H, Natori Y (1999) Analysis of the fatty acid components in a perchloric acid-soluble protein. *Biochim Biophys Acta* 1437:317–

# TvZNF1 is a C<sub>2</sub>H<sub>2</sub> zinc finger protein of *Trichomonas vaginalis*

Jose´ Luis Villalpando · Rodrigo Arreola · Jonathan Puente-Rivera ·  
Elisa Azuara-Liceaga · Jesús Valdés · Lilia López-Canovas · Alma Villalobos-Osnaya ·  
Maria Elizabeth Alvarez-Sánchez 

Received: 8 September 2017 / Accepted: 19 September 2017  
© Springer Science+Business Media, LLC 2017

**Abstract** The zinc fingers proteins (ZNF) are the largest family of DNA binding proteins and can act as transcriptional factors in eukaryotes. ZNF are implicated in activation in response to environmental stimulus by biometals such as Zn<sup>2+</sup>. Many of these proteins have the classical C<sub>2</sub>H<sub>2</sub> zinc finger motifs (C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>-ZNFm) of approximately 30 amino acids, where a Zn<sup>2+</sup> ion is coordinated by two cysteine and two histidine residues. *Trichomonas vaginalis* is a protozoan parasite that responds to environmental changes including Zn<sup>2+</sup>. Until now has not been

described any ZNF that could be involved in the regulation of genic expression of *T. vaginalis*. Here, we characterized in silico and experimentally an annotated ZNF (TvZNF1) from *T. vaginalis* and isolated the gene, *tvznf1* encoding it. TvZNF1 have eight C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>-ZNFm with residues that maybe involved in the structural stability of DNA binding motifs. In this work we confirmed the Zn<sup>2+</sup> upregulation expression of *tvznf1* gene. Recombinant TvZNF1 was able to bind to specific DNA sequences according to EMSA assay. Additionally, we demonstrated that recombinant TvZNF1 bind to MRE signature in vitro, which strongly suggests its role in transcriptional regulation, similar to the one observed for mammalian MTF-1. This result suggested a conserved mechanism of genic regulation mediated by ZNFs in *T. vaginalis*.

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s10534-017-0053-7) contains supplementary material, which is available to authorized users.

J. L. Villalpando · J. Puente-Rivera ·  
E. Azuara-Liceaga · L. López-Canovas ·  
A. Villalobos-Osnaya · M. E. Alvarez-Sánchez (✉)

Posgrado en Ciencias Genómicas, Universidad Autónoma de la Ciudad de México (UACM), San Lorenzo # 290,  
Col. Del Valle, 03100 Mexico City,  
Mexico e-mail:  
maria.alvarez@uacm.edu.mx

R. Arreola

Psychiatric Genetics Department, Clinical Research Branch, National Institute of Psychiatry, "Ramón de la Fuente", Calzada México-Xochimilco 101, Colonia San Lorenzo Huipulco, Tlalpan, 14370 México City, DF, México

**Keywords** *Trichomonas vaginalis* · C<sub>2</sub>H<sub>2</sub> Zinc finger protein · DNA binding protein · TvZNF1

## Abbreviations

ZNF Zinc finger protein

ZNFm Zinc finger protein domain(s)

domai

n C<sub>2</sub>H<sub>2</sub> zinc finger motif(s)

C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>-

ZNFm

## Proteomic profile approach of effect of putrescine depletion over *Trichomonas vaginalis*

María Elizabeth Alvarez-Sánchez<sup>1</sup> & Laura Itzel Quintas-Granados<sup>1</sup> & Laura Isabel Vázquez-Carrillo<sup>1</sup> & Jonathan Puente-Rivera<sup>1</sup> & Alma Villalobos-Osnaya<sup>1</sup> & María Dolores Ponce-Regalado<sup>2</sup> & Minerva Camacho-Nuez<sup>1</sup>

Received: 15 November 2017 / Accepted: 20 February 2018 / Published online: 7 March 2018

# Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature 2018

### Abstract

Infection with *Trichomonas vaginalis* produces a malodorous seropurulent vaginal discharge due to several chemicals, including polyamines. The presence of 1,4-diamino-2-butanone (DAB) reduces the amount of intracellular putrescine by 90%, preventing the cotransport of exogenous spermine. DAB-treated parasites present morphological changes, which are restored by adding exogenous putrescine into the culture medium. However, the effect of polyamines over the trichomonad proteomic profile is unknown. In this study, we used a proteomic approach to analyze the polyamine-depletion and restoration effect by exogenous putrescine on *T. vaginalis* proteome. In the presence of inhibitor DAB, we obtained 369 spots in polyamine-depleted condition and observed 499 spots in the normal culture media. With DAB treatment, the intensity of 43 spots was increased but was found to be reduced in 39 spots, as compared to normal conditions. Interestingly, in DAB-treated parasites restored with a medium with added exogenous putrescine, 472 spots were found, of which 33 were upregulated and 63 were downregulated in protein intensity. Some of these downregulated proteins in DAB-treated parasites are involved in several cellular pathways such as glycolysis, glycolytic fermentation, arginine dihydrolase pathway, redox homeostasis, host cell binding mediated by carbohydrate, chaperone function, and cytoskeletal remodeling. Interestingly, the intensity of some of the proteins was restored by adding exogenous putrescine. In conclusion, the presence of DAB altered the proteomic profile of *T. vaginalis*, resulting in a decrease in the intensity of 130 proteins and an increase in the intensity of 43 proteins that was restored by the addition of putrescine.

**Keywords** *Trichomonas vaginalis* · Putrescine restoration · 2-DE · Mass spectrometry · Proteomic approach

### Introduction

The biologically active polyamines are low molecular weight diamines and triamines, including putrescine, spermidine, and spermine (Agostinelli et al. 2010). These protonated polycations are essential for cell growth, regulating several cellular activities at replication, transcription, translational,

and posttranslational levels (Takahashi and Kakehi 2010). Putrescine is a particularly important factor during trichomoniasis, a sexually transmitted infection caused by the protozoan parasite *Trichomonas vaginalis*. This infection is associated with health problems mainly in women, with symptoms such as vaginitis, cervicitis, infertility, low birth weight infants, pre-term delivery, and a predisposition to cervical neoplasia

(Cotch et al. 1997; El-Shazly et al. 2001;

## Accepted Manuscript

Title: The 50 kDa metalloproteinase TvMP50 is a zinc-mediated *Trichomonas vaginalis* virulence factor

Authors: Jonathan Puente-Rivera, José Luis Villalpando, Alma Villalobos-Osnaya, Laura Isabel Vázquez-Carrillo, Gloria León-Ávila, María Dolores Ponce-Regalado, César López-Camarillo, Jose Miguel Elizalde-Contreras, Eliel Ruiz-May, Rossana Arroyo, María Elizbeth Álvarez-Sánchez

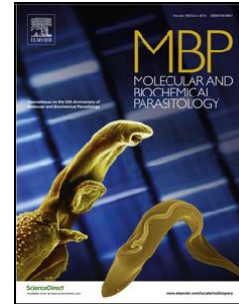
PII: S0166-6851(17)30101-9  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.molbiopara.2017.09.001>  
Reference: MOLBIO 11089

To appear in: *Molecular & Biochemical Parasitology*

Received date: 8-2-2017  
Revised date: 28-8-2017  
Accepted date: 1-9-2017

Please cite this article as: Puente-Rivera Jonathan, Villalpando José Luis, Villalobos-Osnaya Alma, Vázquez-Carrillo Laura Isabel, León-Ávila Gloria, Ponce-Regalado María Dolores, López-Camarillo César, Elizalde-Contreras Jose Miguel, Ruiz-May Eliel, Arroyo Rossana, Álvarez-Sánchez María Elizbeth. The 50kDa metalloproteinase TvMP50 is a zinc-mediated *Trichomonas vaginalis* virulence factor. *Molecular and Biochemical Parasitology* <http://dx.doi.org/10.1016/j.molbiopara.2017.09.001>

This is a PDF file of an unedited manuscript that has been accepted for publication. As a service to our customers we are providing this early version of the manuscript. The manuscript will undergo copyediting, typesetting, and review of the resulting proof before it is published in its final form. Please note that during the production process errors may be discovered which could affect the content, and all legal disclaimers that apply to the journal pertain.



## Transcriptional profile of processing machinery of 3' end of mRNA in *Trichomonas vaginalis*

Miguel Ángel Del-Moral-Stevenel · Alma Villalobos-Osnaya · Mavil López-Casamichana · Laura Itzel Quintas-Granados · César López-Camarillo · José Manuel Fernández Sánchez · Selene Zarate-Guerra · María Elizabeth Alvarez-Sánchez

Received: 30 June 2014 / Accepted: 18 January 2015 / Published online: 30 January 2015

© The Genetics Society of Korea and Springer-Science and Media 2015

**Abstract** *Trichomonas vaginalis* is the causative agent of trichomonosis, a sexually transmitted disease (STD) that affects over 180 million people worldwide. This parasite is capable to infect the urogenital tract of women and men, both microenvironments might affect the expression of key genes that may be involved in the parasite pathogenesis. The processing of 3' end of mRNA promotes mRNA stability in many eukaryotes, however in *T. vaginalis* this molecular machinery is under research. By means of an in silico analysis we identified putative proteins of the 3' end mRNA processing machinery of *T. vaginalis*, and by RT-PCR assays we evaluated the expression of eight of these genes in a female and male *T. vaginalis* isolates. According to the in silico analysis, the *T. vaginalis* 3' end mRNA processing machinery, comprises a similar complex and protein factors that those described in *Homo sapiens*, *Arabidopsis thaliana*, *Saccharomyces cerevisiae* and *Entamoeba histolytica*. The complex contains several sub-complexes, including cleavage and polyadenylation specificity factor (CPSF), cleavage stimulation factor (CstF), cleavage factor I (CFIm) and cleavage factor II (CFIIm). We demonstrated that genes *tvpsf2p*, *tvcfi25*, *tvcpf160*, *tvcpf73*, *tvfip1*, *tvpap1*, *tvpc4* and *tvpabp* are expressed in male or female *T. vaginalis* isolates. Besides we identify

two different isoforms of TvPC4. *T. vaginalis* genome contains most of genes encoding for 3' end mRNA processing, which may be transcriptionally active and could be involved in the capping, splicing, cleavage and polyadenylation of mRNAs in this parasite. Further studies are necessary to elucidate the biological meaning of our findings.

**Keywords** *Trichomonas vaginalis* · 3' End mRNA processing machinery · Transcriptional profile, polyadenylation, genome

### Abbreviations

2DE Double dimensional gel electrophoresis  
WB Western blot  
2DE-WB Double dimensional gel electrophoresis Western blot assay

### Introduction

The trichomonosis is caused by the parasitic protozoan *Trichomonas vaginalis*. Since the draft of *T. vaginalis* genome was released in 2007 (Carlton et al. 2007), ther

# La Sociedad Mexicana de Parasitología



Otorga la presente

## **CONSTANCIA**

*Alma María de la Luz Villalobos-Osnaya, Rossana Arroyo y  
María Elizabeth Álvarez-Sánchez*

Por su participación en trabajo libre modalidad oral

### **CARACTERIZACIÓN DE UN POSIBLE INHIBIDOR DE TVEIF-5A DE *Trichomonas vaginalis***

"XIX Congreso Nacional de Parasitología"

Llevado a cabo del 13 al 17 de septiembre del 2011 en Mazatlán, Sinaloa.

*Dr. Abraham Landa Piedra*

**Secretario**

*Dr. Jorge Morales Montor*

**Presidente**

*Sylvia Paz Díaz Camacho*

**Comité Local**



Ciudad de **vanguardia**



El Gobierno del Distrito Federal  
por medio de su Instituto de Ciencia y Tecnología otorga la presente

# CONSTANCIA

## M. en C. Alma Villalobos Osnaya

Por su participación como expositor en:

**VANGUARDIA  
TECNOLÓGICA** 2012

Del 21 al 23 de marzo de 2012  
en el World Trade Center, Ciudad de México

**Dr. Julio Mendoza Álvarez**  
Director General  
Instituto de Ciencia y Tecnología del Distrito Federal



**Sociedad Mexicana de Bioquímica, A.C.**

FUNDADA EN 1957

AV. OPRESSES SAN JOSÉ, SAN ANTONIO TONCATEPEC,  
C.P. 1400 MÉXICO, D.F. ESTADO TLAXIQUILA  
AV. AMATEO ACOSTA 79 020  
TOL. Y PAX. 5020142  
TEL. 5529-9103  
Ejército y C.P. S.A.  
Correo electrónico: smb@smc.uam.mx

ANUARIO 2010-2011 - 2012

PROGENTE  
DR. JESÚS AGUIRRE LINARES

VICE-PRESIDENTE  
DRA. ALBA GONZÁLEZ MANUWREZ

SECRETARIO TECNICO  
DR. ENRIQUE ROJAS DEL CASTILLO

SUB-SECRETARIO TECNICO  
DRA. MARÍA ELIZABETH GONZÁLEZ  
BOGARTTE

SOCIOS FUNDADORES

Dr. Bárbara Arriaga Linares  
Dr. Edmundo Cabe Cuatrecasas  
Dr. Guillermo Cervantes Sánchez  
Dr. Joaquín García CD  
Dr. Carlos del Río Castro (I)  
Dr. Silvana Frank Freund  
Dr. María Guadalupe Hernández (I)  
Dr. Jesús Guzmán Zavala  
Dr. Jesús Huerta Rodríguez  
Dr. José Laporte García  
Dr. Guillermo Masello Polguera (I)  
Dr. Raúl Gabriela Vázquez  
Dr. Esteban G. Pardo Castro  
Dr. Guillermo Roberto Álvarez

La Sociedad Mexicana de Bioquímica otorga la presente

## CONSTANCIA

a

*Alma Villalobos Osnaya*

Quien asistió y presentó el trabajo

**Caracterización del inhibidor lhTveIF-5A perteneciente a la familia Yjgf/YER057c de *Trichomonas vaginalis*.**

Por:

Alma Villalobos-Osnaya, Laura Itzel Quintas-Granados,  
Guillermo Mendoza-Hernández, Rosana Arroyo,  
Leticia Ávila-González, María Elizabeth Álvarez-Sánchez.

En la modalidad oral durante el XXIX Congreso Nacional de Bioquímica del 11 al 17 de Noviembre de 2012 en Oaxaca, Oax.

Atentamente

Por el Comité Organizador

Dr. Jesús Aguirre Linares



**Sociedad Mexicana de Bioquímica, A.C.**

FUNDADA EN 1957

AV. CIPRESSES SAN JOEL, SAN ANDRÉS COTOLTEPEC  
C.P. 14400 MEXICO, D.F. CASA TIALPANI  
ARMARIBI POTOSI, 77021  
TEL. Y FAX: 5622 5142  
TEL. 89236600  
http://smbq.org.mx  
Correo electrónico: smbq2012@smbq.org.mx

MESADIRECTIVA 2011 - 2013

PRESIDENTE  
DR. JESÚS AGUIRRE LINARES

VICE PRESIDENTE  
DRA. ALIDA GONZÁLEZ MARRAZCO

SECRETARIO TESORERO  
DR. EMILIO ROJAS DEL CASTILLO

SUB SECRETARIO TESORERO  
DRA. MARÍA EUGENIA GONZÁLEZ  
DONARANTE

SOCIOS FUNDADORES

Dr. Bertha Arcega de Lucio  
Dr. Eduardo Cabeza Castañeda  
Dr. Guillermo Canabal Sánchez  
Dr. Joaquín Casavieja (†)  
Dr. Carlos del Río Cervantes (†)  
Dr. Silvestre Fuchs Freund  
Dr. María García Hernández (†)  
Dr. Jesús Guzmán García  
Dr. Jesús Karamia Rodríguez  
Dr. José Laguna García (†)  
Dr. Guillermo Marcano Higuera (†)  
Dr. Raúl Ochoa de Vidaurrá  
Dr. Chaim G. Pedro Colina  
Dr. Guillermo Soler de Arce

La Sociedad Mexicana de Bioquímica otorga la presente

## CONSTANCIA

a

*Miguel Ángel Del Moral Stevenel*

Quien asistió y presentó el trabajo

Identificación de PC4 en *Trichomonas vaginalis*.

Por:

Miguel Ángel Del Moral Stevenel, Alma Villalobos Osnaya,  
Mavil López Casamichana, César López Camarillo,  
María Elizabeth Álvarez Sánchez.

En la modalidad oral durante el XXIX Congreso Nacional de  
Bioquímica del 11 al 17 de Noviembre de 2012 en Oaxaca, Oax.

Atentamente

Por el Comité Organizador

Dr. Jesús Aguirre Linares



## Sociedad Mexicana de Bioquímica, A.C.

FUNDADA EN 1957

AV. CIENFES SIN COL. SAN ANDRÉS TOTOTEPÉL  
C.P. 44160 MÉNCO. D.F. (CASA TLAHYA)  
AVENIDA ROSAL 70 606  
TEL. Y FAX: 5622 0742  
http://smb.org.mx  
Correo electrónico: smb@smb.org.mx

MESA DIRECTIVA 2015 - 2015

PRESIDENTE

**DRA. ALICIA GONZÁLEZ MANJARREZ**

VICE-PRESIDENTE

**DR. MIGUEL LARA FLORES**

SECRETARIO TESORERO

**DRA. MARIA EUGENIA GONZALEZ BONAPARTE**

SUB-SECRETARIO TESORERO

**DRA. ELDA GUADALUPE ESPINOSA CAMPO**

SOCIOS FUNDADORES

Dr. Barbarín Arreguete Lozano  
Dr. Edmundo Calva Cuadrilla  
Dr. Guillermo Carvajal Sandoval (†)  
Dr. Joaquín Cravioto (†)  
Dr. Carlos del Río Estrada (†)  
Dr. Silvestre Frank Freund  
Dr. Mario García Hernández (†)  
Dr. Jesús Guzmán García (†)  
Dr. Jesús Karama Rodríguez  
Dr. José Laguna García (†)  
Dr. Guillermo Masiuku Helguera (†)  
Dr. Raúl Oñoriza Vidaurrre  
Dr. Efraín G. Pardo Codina  
Dr. Guillermo Sobrado Acevedo

La Sociedad Mexicana de Bioquímica otorga la presente

**CONSTANCIA a:**

*Alma Villalobos Osnaya*

Quien asistió y presentó el trabajo:

**Stability analysis of the perchloric acid-soluble protein  
(Tv-PSP) from *Trichomonas vaginalis***

Por:

Alma Villalobos-Osnaya, Laura Itzel Quintas-Granados,  
Laura Isabel Vazquez-Carrillo, María Elizabeth Alvarez-Sanchez

En la modalidad de cartel durante el XXX Congreso Nacional de  
Bioquímica del 2 al 8 de noviembre de 2014 en Guadalajara, Jal.

Atentamente

**Dra. Alicia González Manjarrez**  
Presidente