



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO**

---

---

FACULTAD DE QUIMICA

CLONACION DE UN GEN QUE CODIFICA PARA UNA  
SERIN PROTEASA EN *Trichomonas vaginalis*.

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

**QUIMICO FARMACEUTICO BILOGO**

**P R E S E N T A :**

**PABLO AUGURIO HERNANDEZ ROMANO**



MEXICO, D.F. **EXAMENES PROFESIONALES**  
**FACULTAD DE QUIMICA**

2004



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

**ESTA TESIS NO SALE  
DE LA BIBLIOTECA**

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO  
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES Y ENSEÑANZA EN QUÍMICA

Esta tesis la dedico a mis padres, gracias por todo el cariño y apoyo que siempre me han brindado.



## AGRADECIMIENTOS

A mis hermanos Ulises, Omar, Jesús y Marilú por su paciencia, apoyo y consejos.

A mis tías por todo lo que nos dieron.

A Nayali por su confianza, apoyo y por su amor, que es el impulso que me hace seguir adelante.

A mis amigos Raúl, César, Paúl, José Antonio, Ceci, Manuel, Alex, Gabriel, Juan Manuel, Javier y Saúl por los buenos momentos y las aventuras vividas.

A la Dra. María Imelda López Villaseñor por su incondicional y atento apoyo.

A la Bióloga Lórena López Griego por su tiempo y su valiosa ayuda prestada durante la realización de esta tesis.

A la Dra. Elizabeth Álvarez Sánchez por sus conocimientos brindados.

A mis compañeros de laboratorio Lupita, Ana Lilia, Olivia y Vanessa por hacer tan agradable el trabajo en el laboratorio y a la señora Tere por mantener limpio nuestro lugar de trabajo.

Al Dr. Roberto Hernández Fernández y a su grupo de trabajo por sus críticas y consejos durante la elaboración de esta tesis.

Al PAPIIT por su apoyo al proyecto IN209302-3 y a PROBETEL por la beca otorgada.

Al profesor Abel Gutiérrez Ramos y a la profesora Leda Carolina Torres Maldonado por su tiempo invertido en la revisión de esta tesis.

## **JURADO ASIGNADO**

Presidente	Prof. Abel Gutiérrez Ramos.
Vocal	Prof. Leda Carolina Torres Maldonado.
Secretario	Prof. María Imelda López Villaseñor.
1er Suplente	Prof. Marco Antonio Becerril Flores.
2o. Suplente	Prof. Catalina Machuca Rodríguez.

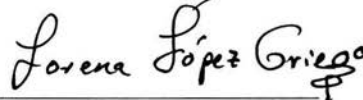
**Sitio donde se desarrolló el tema:** Departamento de Biología Molecular y Biotecnología,  
Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM.

**ASESOR:** Dra. María Imelda López Villaseñor.



Ma. Imelda López Villaseñor

**SUPERVISOR TÉCNICO:** Biol. Lorena López Griego.



Lorena López Griego

**SUSTENTANTE:** Pablo Augurio Hernández Romano.



Pablo Augurio Hernández Romano

## INDICE

Abreviaturas utilizadas.....	5
I. Introducción.....	6
I.1. Generalidades.....	6
I.2. Epidemiología.....	6
I.3. Cuadro clínico.....	7
I.4. Tratamiento y prevención.....	8
I.5. Diagnóstico.....	8
I.6. Biología de <i>Trichomonas vaginalis</i> .....	9
I.7. Regulación de la expresión génica.....	12
I.8. Patogenicidad.....	13
II. Antecedentes.....	16
II.1. Proteasas en <i>Trichomonas vaginalis</i> .....	16
II.2. Proteasas.....	17
II.3. Clasificación de las proteasas.....	18
II.4. Clasificación de proteasas por la reacción que catalizan.....	19
II.5. Clasificación por el tipo catalítico.....	20
II.6. Clasificación por las relaciones evolutivas.....	21
II.7. Serín Proteasas.....	23
II.7.1. Familia de las subtilisinas (S8).....	27
III. Planteamiento del problema.....	31
IV. Objetivos.....	31
V. Metodología.....	32
V.1. Extracción de ADN plasmídico (Minipreparación).....	32
V.2. Secuenciación del extremo 3' de la clona genómica de actina y del fragmento de 1528 pb de la clona genómica 9.2.....	33
V.3. Extracción de ADN genómico.....	34
V.4. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	35
V.5. Clonación del producto de PCR en el vector TOPO.....	37
V.6. Protocolo para preparar la sonda radiactiva.....	38
V.7. Southern blot.....	39
V.8. Extracción de ARN de <i>Trichomonas vaginalis</i> .....	41
V.9. Northern blot.....	43

V.10. Estrategias utilizadas para obtener la secuencia completa de la serín proteasa de <i>Trichomonas vaginalis</i> .....	44
V.10.1. Escrutinio de la biblioteca de cDNA de <i>T. vaginalis</i> .....	44
V.10.2. Amplificación rápida de extremos 3' de cDNA (3'RACE).....	47
V.10.3. Biblioteca genómica parcial <i>Hind</i> III- <i>Bgl</i> II.....	49
V.10.4. Transformación por electroporación.....	50
V.10.5. Hibridación en colonia.....	51
VI. Resultados.....	52
VI.1. Análisis de la clona genómica 8A de <i>Trichomonas vaginalis</i> .....	52
VI.2. Determinación del número de genes que codifican para serín proteasas en <i>Trichomonas vaginalis</i> .....	59
VI.3. Determinación de la expresión del gen de la serín proteasa.....	61
VI.4. Estrategias utilizadas para obtener la secuencia completa del gen de la serín proteasa de <i>Trichomonas vaginalis</i> .....	62
VI.4.1. Resultados del escrutinio de la biblioteca de cDNA de <i>Trichomonas vaginalis</i> .....	62
VI.4.2. Clonación del cDNA de la serín proteasa de <i>Trichomonas vaginalis</i> mediante la amplificación rápida de extremos 3' de cDNA (3' RACE).....	65
VI.4.3. Resultados del escrutinio de la biblioteca genómica parcial ( <i>Hind</i> III/ <i>Bgl</i> II) de <i>Trichomonas vaginalis</i> .....	68
VI.5. Secuenciación de la clona genómica 9.2.....	72
VI.6. Alineamiento de la secuencia parcial de la serín proteasa de <i>Trichomonas vaginalis</i> con serín proteasas reportadas en otros microorganismos.....	78
VI.7. Modelo estructural teórico para la serín proteasa de <i>Trichomonas vaginalis</i> .....	91
VII. Discusión.....	94
VIII. Conclusiones.....	96
IX. Perspectivas.....	97
X. Referencias.....	98
XI. Apéndice.....	105

## ABREVIATURAS.

- ADN: Ácido desoxirribonucleico.
- ARN: Ácido ribonucleico.
- ATP: Adenosin trifosfato.
- cDNA: Ácido desoxirribonucleico complementario al ARNm.
- DEPC: Dietilpirocarbonato.
- dNTP's: Desoxinucleótidos trifosfatados.
- EDTA: Ácido etilendiamin tetra-acético.
- ELISA: Análisis de inmunoabsorción ligado a enzimas.
- IPSL: Inhibidor de proteasas se secreción leucocitaria.
- ORF: Marco de lectura abierto u Open Reading Frame.
- PCR: Reacción en cadena de la polimerasa.
- ARNr: Ácido ribonucleico ribosomal.
- ARNt: Ácido ribonucleico de transferencia.
- VIH: Virus de la inmunodeficiencia humana.
- SDS-PAGE: Electroforesis en gel de poliacrilamida en SDS.

## **I. INTRODUCCIÓN**

### **I.1. GENERALIDADES.**

*Trichomonas vaginalis* es un protozooario flagelado, responsable de una de las infecciones de transmisión sexual más comunes en humanos, la trichomonosis. La sintomatología de este padecimiento puede variar desde el estado de portador asintomático hasta casos de inflamación severa e irritación genital con la presencia de una descarga profusa y de mal olor. La primera descripción de *T. vaginalis* correspondió a Donné en 1836, sin embargo este parásito no fue estudiado a mayor profundidad hasta bien entrado el siglo XX.

*T. vaginalis* solo presenta formas trofozoíticas en su ciclo de vida, no tiene huéspedes intermediarios ni vectores y el único hospedero conocido es el humano. La transmisión de la trichomonosis humana es de persona a persona mediante contacto sexual con personas infectadas. Los trofozoítos miden 10 micras de largo por 7 micras de ancho, poseen con cuatro flagelos anteriores formando un penacho, un flagelo recurrente adosado a la membrana plasmática y un axostilo. La reproducción se lleva a cabo por fisión binaria longitudinal (Programa de actualización continua en infectología, Hoechst).

### **I.2. EPIDEMIOLOGÍA.**

La trichomonosis es la enfermedad de transmisión sexual no viral más común en el mundo. Se calcula que existen 107 millones de casos de trichomonosis, la mayoría reportados en mujeres; esto puede deberse a que la incidencia de la trichomonosis en hombres puede estar subestimada debido a la insensibilidad de las preparaciones en fresco. Utilizando una combinación de preparaciones en fresco y reacción en cadena de la polimerasa (PCR), un estudio reciente encontró una prevalencia de 20.8% y 12.2% en hombres sintomáticos y asintomáticos respectivamente. Estos resultados indican que la trichomonosis no debe ser considerada una causa de enfermedad solo en mujeres (Lehker y Alderete, 2000).

En México, los datos recabados por la Dirección General de Epidemiología/SSA para el año 1997 revelaron 119190 casos diagnosticados, con una tasa de 12.8 casos por cien mil habitantes (Asociación Nacional de Infectología y Microbiología Clínica).

En relación a las mujeres infectadas durante el embarazo, la trichomonosis se ha asociado con la ruptura prematura de membranas, el trabajo de parto pretérmino, bajo peso al nacer del producto, predisposición a la enfermedad inflamatoria pélvica atípica, cáncer cervicouterino e infertilidad (Programa de actualización continua en infectología, Hoechst).

En cuanto a la infección por el VIH hay evidencia epidemiológica que ilustra la mayor transmisibilidad de ese virus en personas que padecen trichomonosis; el incremento en el riesgo parece presentarse solo en el sujeto receptor del contagio. Los mecanismos de este incremento son desconocidos, pero algunos factores que se han sugerido incluyen la erosión de la mucosa por el parásito y/o la respuesta inflamatoria, además del reclutamiento de células blanco para el VIH dentro del área genital. Las trichomonas no solo rompen la barrera epitelial, sino que también parecen reclutar linfocitos T CD4+ en el área genital, incrementando la secreción de citocinas (interleucinas 1, 6, 8 y 10), e incrementando así la susceptibilidad al VIH. Otro importante factor de riesgo para la adquisición del VIH es el incremento de la carga viral en el semen de hombres con uretritis trichomonal (Hobbs y col, 1999).

### I.3. CUADRO CLÍNICO.

En las mujeres los síntomas clásicos de la trichomonosis incluyen leucorrea amarillo-verdosa debido a infiltración leucocítica, la consistencia de la descarga varía de paciente a paciente de delgada y escasa a espesa y abundante, prurito, disuria, dispareunia, eritema de la mucosa vaginal, y lesiones hemorrágicas puntiformes que dan al cérvix apariencia de fresa (Sherrard J., 1999).

En los hombres infectados con *T. vaginalis*, el síntoma más común es la uretritis no gonocócica no clamidial, además se ha reportado la presencia de trichomonas en la próstata. Sin embargo, el papel de la infección en la prostatitis y/o infertilidad todavía no está claro (Gardner y cols, 1986).

#### I.4. TRATAMIENTO Y PREVENCIÓN.

El tratamiento de la tricomonosis es a base de los nitroimidazoles; el metronidazol se administra oralmente en dosis de 250 ó 500 mg, tres veces al día, durante una semana. También se emplea el esquema de una sola dosis oral de 2g, la cual intenta abatir los efectos secundarios del fármaco y la falta de apego del paciente a la terapéutica. Estos fármacos no tienen un efecto citocida directo sobre la trichomona, es el propio parásito el cual primero interna el fármaco por difusión y posteriormente al metabolizarlo en sus hidrogenosomas reduce el grupo nitro del fármaco por medio de la piruvato: ferredoxin oxidoreductasa lo cual genera radicales libres nitro que bloquean la síntesis de ácidos nucleicos, afectando así la división celular y la motilidad del protozooario en cuestión de horas. No obstante se ha reportado que hasta 5% de los aislados clínicos de *T. vaginalis* han demostrado algún grado de resistencia aerobia o anaerobia al metronidazol. En muchos casos, incrementar la dosis de metronidazol puede resolver la infección (Kulda y Cerkasovova, 1993; Quon y Johnson, 1992).

#### I.5. DIAGNÓSTICO.

Tradicionalmente el método para el diagnóstico de *T. vaginalis* más accesible es la observación microscópica directa de la secreción genital tomada con un hisopo y suspendida en solución salina; se utiliza para buscar las células del parásito en forma de pera o redondeadas con un movimiento flagelar distintivo y polimorfonucleares. El diagnóstico mediante cultivo de muestras tiene la desventaja de que los cultivos tardan algunos días de incubación, y durante ese tiempo los pacientes continúan transmitiendo la infección. Desafortunadamente estas técnicas tienen de un 30-80% de sensibilidad (Heine y McGregor, 1993; Heine y Witkin, 1997).

Otras técnicas de diagnóstico como ELISA, hibridación *in situ* y pruebas con anticuerpos fluorescentes tienen entre 70 y 90% de sensibilidad. La reacción en cadena de la polimerasa (PCR), que ha sido probada para la aplicación en el diagnóstico tiene una sensibilidad cercana al 100% (Madico y cols, 1998; Shaio y cols, 1997).



## 1.6. BIOLOGÍA DE *Trichomonas vaginalis*.

El protista amitocndriado *Trichomonas vaginalis* pertenece al *subphylum* de los *Sarcomastigophora* cuyo rasgo característico es la presencia de flagelos en algún estadio de su ciclo biológico, a la clase de los *Zoomastigophorea* que carecen de cromatóforos, presentan una nutrición parasitaria y su reproducción es fundamentalmente asexual por fisión binaria longitudinal, y a la familia *Trichomonadidae*, en la que todos sus miembros poseen hidrogenosomas (Honigberg y Balamuth, 1963) de origen endosimbionte; estos organelos poseen doble membrana, se dividen de manera autónoma por fisión binaria, importan proteínas postraduccionalmente y producen ATP.

Estudios filogenéticos basados en la secuencia de la subunidad pequeña de ARNr muestran que las trichomonas emergieron en la base del árbol de los eucariontes (Katiyar SK y Edlind TD, 1995, Embley TM, 1998, Germot A y Phillippe H, 1999) Recientemente el análisis filogenético de secuencias de ADN de la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (Viscogliosi E, 1998), el factor de elongación alfa-1 (Roger AJ y Phillippe H, 1999), la ADN polimerasa (Edgell DR y Doolittle WF, 1998), la fosfofructocinasa dependiente de pirofosfato (Mertens E y col., 1998), proteínas de choque térmico, y la valil-ARNt sintetasa (Hashimoto T y col., 1998), apoyan un punto de divergencia temprano de las trichomonas en la rama de los eucariontes. Sin embargo, la presencia de proteínas parecidas a las de choque térmico mitocondrial, aunado a la presencia de la valil-ARNt sintetasa codificada nuclearmente, sugieren que el punto de divergencia evolutiva ocurrió después de la adquisición del endosimbionte mitocondrial. Esto implica que la bioquímica de las trichomonas es única y suficientemente diferente a la de los eucariontes superiores de modo que provee amplios blancos para la intervención terapéutica.

*Trichomonas vaginalis* está rodeada por una membrana plasmática de 9-10nm de grosor muy plástica, semejante a las membranas de eucariontes superiores. Dado que este parásito carece de las vías metabólicas para la síntesis y transformación de lípidos y para la síntesis de colesterol, los lípidos los obtiene de las células que lisa y fagocita y los incorpora directamente. Los lípidos de la membrana son de tres tipos: neutros (30%), fosfolípidos (65%) y glicolípidos (5%) (Honigberg, 1988); posee al menos 30 proteínas, la

mayoría de ellas altamente inmunogénicas y algunas de ellas de alto peso molecular como la p270, la p230 y la p115.

*Trichomonas vaginalis* no contiene mitocondrias ni peroxisomas, pero posee aparato de Golgi muy bien definido, retículo endoplásmico, sistema vacuolar rico en fagosomas y fagolisosomas, gránulos paraxostilares y paracostales (hidrogenosomas), gránulos de glucógeno, ribosomas libres y asociados al retículo endoplásmico y un citoesqueleto muy complejo. Mediante la formación de canales pinocíticos en cualquier parte de su superficie, la trichomona es capaz de endocitar pequeñas moléculas; también puede fagocitar microorganismos como *Lactobacillus sp.*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Escherichia coli* y células enteras como polimorfonucleares y eritrocitos así como detritos de las células epiteliales de la vagina y el cérvix (Lehker y col., 1990; Benchimol y de Souza, 1995).

El citoesqueleto consiste en un complicado sistema de microtúbulos clasificados de acuerdo a su posición como axostilares, flagelares o mitóticos, los cuales forman estructuras muy particulares como el axostilo, la costa, la pelta, cuatro flagelos anteriores que se originan del complejo cinetosomal anterior y un flagelo recurrente adosado a la membrana ondulante, que también parte del complejo cinetosomal anterior. El axostilo, los flagelos anteriores y el flagelo recurrente participan en el movimiento del parásito. El complejo pelta-axostilo formado por microtúbulos parece ser una estructura de soporte para el núcleo. La pelta refuerza la pared del canal periflagelar y la costa, el organelo fibrilar estriado más largo se localiza por debajo de la membrana ondulante a la cual sirve de apoyo, aun cuando no existe conexión física entre ellas y está constituida por proteínas contráctiles que participan en el movimiento de los parásitos. Los microtúbulos son estructuras macromoleculares formadas por la polimerización de dos subunidades protéicas, la alfa y la beta-tubulinas.

La actina es una de las proteínas más abundantes del parásito y se concentra en la región cortical de la célula, en donde se emiten pseudopodos. Esta proteína del citoesqueleto presenta propiedades bioquímicas y biofísicas diferentes a las de las actinas musculares. Esta proteína está codificada por una familia multigénica de al menos nueve miembros; (Bricheux y Brugerolle, 1997; Espinosa y López-Villaseñor, datos no publicados) es una proteína muy conservada a través de la evolución, se han reportado las

secuencias de dos genes completos, que codifican para proteínas de 376 aminoácidos, no tienen intrones, la región promotora comprende 10 pb y es semejante al sitio consenso reportado para los promotores de otros genes de *T. vaginalis* (Bricheux y Brugerolle, 1997; Espinosa y López-Villaseñor, 2001).

El núcleo de *T. vaginalis* mide 4X5 µm, piriforme, está limitado por una membrana porosa con doble capa lipídica y contiene gránulos dispersos de cromatina; se localiza en la porción anterior y ventral izquierda de la expansión capitular del axostilo. Típicamente los núcleos contienen un nucleolo esférico pequeño, rodeado de un área libre de cromatina que se distribuye en gránulos relativamente pequeños (Honigberg y King, 1964). El contenido del ADN es rico en A+T, con un contenido de G+C del 36%; se ha estimado que posee 13.3% de secuencias altamente repetitivas, 53.5% de secuencias moderadamente repetidas y 33.3% de secuencias únicas. Estudios realizados con secuencias de genes de actina indican un contenido de G+C más elevado en regiones codificadoras comparados con regiones no codificadoras, lo que hace posible identificar regiones potencialmente codificadoras en el genoma de este parásito (Espinosa y López-Villaseñor, 2001). Se han identificado seis cromosomas de tres tamaños; el tamaño y número de cromosomas de 15 aislados de *T. vaginalis* son idénticos, lo que sugiere que la heterogenicidad genética de las trichomonas no involucra rearrreglos cromosomales mayores. El contenido de ADN por célula es de 81 fg (Wang y Wang, 1985).

El ciclo celular de *T. vaginalis* presenta las fases M, G1, S y G2 con un periodo G2 dominante. Recientemente se encontró una de las cinasas que participan en la regulación del ciclo celular, la proteína p34, la subunidad catalítica de la cinasa de la fase M pertenecientes a la familia de las proteína-cinasas CDC2/28 (Riley y col., 1993). El parásito posee dos centros organizadores de microtúbulos (MTOC) (atractóforos asociados a los cinetosomas), de ahí se forman dos haces de microtúbulos extranucleares, los cuales hacen contacto con la envoltura nuclear y posiblemente con la cromatina. Debido a la presencia de un huso extranuclear y a la conservación de la envoltura nuclear durante la mitosis, *T. vaginalis* lleva a cabo una mitosis extranuclear cerrada también llamada criptopleuromitosis (Brugerolle, 1975; Riley y col., 1994). La mitosis de este parásito es semejante a la de los eucariontes superiores, la cual se divide en seis fases: profase, metafase, anafase temprana,

anafase tardía, telofase temprana y telofase tardía con una duración aproximada de 45 minutos.

### I.7. REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA.

En *T. vaginalis* no se conoce mucho sobre los mecanismos de regulación de la expresión genética y se sabe muy poco sobre la replicación del ADN. Johnson y cols. no encontraron una caja TATA típica en la posición 25 a 30 nucleótidos río arriba del sitio de inicio de la transcripción en los genes que analizaron, pero reportaron la presencia de un elemento iniciador en la región promotora de los genes de *T. vaginalis*, una “secuencia motivo” muy conservada en la región 5’ no traducida que comprende 13 nucleótidos y cuya secuencia consenso es: TCAYTWYTCATTA (Y= T/C, W= T/A), con sitios precisos para el inicio de la transcripción. Además ensayos de transcripción *in vitro*, en mamíferos, demostraron que este elemento promotor consenso de *T. vaginalis* es similar tanto estructural como funcionalmente a los iniciadores encontrados en los promotores de eucariontes superiores (Quon y col., 1994).

Se conoce poco de la región 3’ no traducida, estudios con transcritos de genes de actina sugieren la secuencia UAAA como señal de poliadenilación en los precursores de ARNm y la secuencia Py<sup>1</sup>(A)0-3AAUU como sitio de corte para la poliadenilación de ARNms en *T. vaginalis* (Espinosa y López-Villaseñor, 2002). El análisis de los genes para tres adhesinas de *T. vaginalis* muestra diferencias entre los genes para la misma adhesina en cuanto a la secuencia para la señal de poliadenilación así como el tamaño de la cola de poliA. Dos de ellos presentan un elemento rico en AU (AURE) AUUUA o UUAAUUUAU el cual confiere inestabilidad a los ARNm (O’Brien y col., 1996, Engbring y col., 1998). Es posible que estas diferencias en la región 3’ de los genes para las adhesinas participen en una regulación traduccional mediante la degradación diferencial de los transcritos. La transcripción de los genes codificadores de proteínas en *T. vaginalis* se lleva a cabo por medio de una ARN polimerasa II (RNA pol II).

En cuanto a las modificaciones postraduccionales, todas las proteínas hidrogenosomales de *T. vaginalis* clonadas están codificadas en el núcleo como preproteínas con una secuencia líder de 5-15 aminoácidos. MLSASSNFARN↓, ausente en las proteínas maduras (Lahti y col., 1992). Se postula que esta secuencia líder se utilice para

la traslocación de las proteínas del citoplasma a los hidrogenosomas (Johnson y col., 1990), posiblemente ayudados por las proteínas de choque térmico Hsp 10, Hsp 60 y Hsp 70; estas últimas son responsables del plegamiento correcto de las proteínas, localizadas en los hidrogenosomas (Bozner, 1996).

Utilizando como modelo la molécula de tubulina del axostilo y huso mitótico, se ha demostrado que las principales modificaciones post-traduccionales que se llevan a cabo en *T. vaginalis* son: acetilación y glutaminación pero no glicosilación. Estas modificaciones se llevan a cabo después del ensamblaje de las estructuras microtubulares (Delgado-Viscogliosi y col., 1996).

## 1.8. PATOGENICIDAD.

Los estudios sobre los mecanismos de patogenicidad de *T. vaginalis* se han enfocado en los eventos iniciales de la infección, la notable adherencia del parásito a las células del epitelio vaginal y la producción de factores de virulencia extracelular. Se ha demostrado que la adherencia de *T. vaginalis* tanto a las células HeLa y a las células del epitelio vaginal es mediada a través de la acción de al menos cuatro proteínas de adhesión de 65, 51, 33 y 23 kD (AP65, AP51, AP33 y AP23). Estas adhesinas parecen estar reguladas por hierro y requieren la presencia de una o más cisteín proteasas para facilitar la unión a las células (Engbring JA y Alderete JF 1998; Arroyo R y Alderete JF, 1989). Recientemente se ha observado que la unión inicial de *T. vaginalis* a las células del epitelio vaginal involucra la transformación de la forma ovoide normal del parásito a una morfología ameboide o aplanada que esta acompañada de un incremento en la síntesis de las adhesinas AP33 y AP23 (Arroyo R y Alderete JF, 1993). La capacidad de llevar a cabo este dramático cambio morfológico requiere de un rearrreglo del citoesqueleto, la transformación ameboide resulta en un contacto más íntimo entre el parásito y las células del huésped así como también la extensa interdigitación y formación de microcanales (Arroyo R y Alderete JF, 1993). Utilizando una variedad de técnicas de microscopía electrónica Furtado y Benchimol (Furtado MB, Benchimol M, 1998) han extendido estas observaciones para incluir extensas fusiones de membrana plasmática entre *T. vaginalis* y células del epitelio vaginal. Aunque inducidas a través de diferentes señales, el cambio

morfológico y la inducción de adhesinas puede resultar en una mayor adherencia y por lo tanto proveer al parásito distintas ventajas en un ambiente constantemente bañado en secreciones.

Algunos factores de virulencia secretados por *T. vaginalis* incluyen un factor de separación celular, dos cisteín proteasas (30 y 60 kD) aisladas de filtrados libres de células y una hemolisina (Garber GE y col., 1989, Krieger JN y col., 1983; Dailey DC y Alderete JF, 1990). El factor de separación celular es una glicoproteína de 200 kD ácido lábil que causa la separación de las monocapas celulares y cuya producción se ha correlacionado con la presentación clínica de la enfermedad (Garber GE y Bowie WR, 1989, Garber GE y col., 1990). Aunque los papeles de las citotoxinas contacto-dependientes, proteasas y fosfolipasas, han sido bien establecidos en la lisis de células del huésped, la fusión de membranas puede representar otro mecanismo de daño celular.

La hemólisis de *T. vaginalis* es considerada como resultado del contacto directo del parásito con eritrocitos. Se han identificado cinco adhesinas de *T. vaginalis* que se unen a membranas de eritrocitos (Fiori PL y Capuccinelli P, 1993), tres de estas han mostrado previamente unirse a células del hospedero, pero dos (42 y 140 kD) están involucradas solamente en la adherencia al eritrocito, se ha propuesto un proceso que se lleva a cabo en tres pasos para que ocurra la hemólisis:

- 1.- Reconocimiento específico del eritrocito y unión del parásito.
- 2.- Liberación de la citolisina de *T. vaginalis* lo que causa la formación de un poro en la membrana del eritrocito.
- 3.- Separación del parásito con la subsiguiente lisis del eritrocito.

Pindak y colaboradores (Pindak FF y col., 1993) han demostrado que el filtrado solo de *T. vaginalis* ejerce un efecto hemolítico en eritrocitos. Ellos creen que el grado de hemólisis esta influenciado por tres factores: el pH, la presencia de una fuente de energía y la temperatura. También se ha propuesto la participación de cisteín proteasas (Dailey y Col., 1990) y proteínas formadoras de poros (Fiori y col., 1993).

Otros mecanismos de patogenicidad de *T. vaginalis* que están siendo explorados incluyen la presencia de proteínas de estrés oxidativo, interacciones in vitro entre *T. vaginalis* y la microflora vaginal, y la identificación de un virus de *T. vaginalis*. Las proteínas de estrés oxidativo (Kulda J y Cerkasovova A, 1993), pueden proveer alguna

protección para el parásito contra los productos metabólicos de neutrófilos polimorfonucleares, que son las células reactivas predominantes durante la infección.

Los lactobacilos vaginales pueden conferir alguna protección contra organismos patógenos por la producción de ácido láctico y peróxido de hidrógeno, sin embargo, cuando las mujeres desarrollan trichomonosis, ocurre una disminución en la población de lactobacilos. La respuesta inmune celular y humoral es evidente en pacientes con trichomonosis, pero no es protectora. Aunque no se ha encontrado en todos los pacientes infectados, el incremento en el número de leucocitos polimorfonucleares se puede detectar tempranamente en secreciones. Aún cuando macrófagos y leucocitos aunados a anticuerpos y complemento pueden eliminar a los parásitos, está claro que *T. vaginalis* neutraliza de forma efectiva la respuesta del sistema inmune del hospedero.

Las numerosas cisteín proteasas sintetizadas por *T. vaginalis* contribuyen de manera significativa a la evasión de la respuesta inmune. Las cisteín proteasas son citotóxicas (Fiori PL y Cappuccinelli P, 1997) y hemolíticas (Dailey DC y Alderete JF, 1990). Todas las subclases de inmunoglobulinas son susceptibles a las cisteín proteasas de las trichomonas (Min DY y col., 1998). De manera similar, los parásitos son resistentes a la lisis mediada por complemento por la acción de una de las cisteín proteasas más pequeñas inducida por altas concentraciones de hierro. Las proteasas degradan el C3 depositado en la superficie de *T. vaginalis* (Alderete JF y Lehker MW 1995). El inhibidor de proteasas de secreción leucocitaria (IPSL) es otro factor de protección de las superficies mucosas. Sin embargo las proteasas de las trichomonas son capaces de degradar el IPSL haciéndolo no funcional. El IPSL también ha mostrado ser importante para prevenir la transmisión del VIH, por lo tanto las proteasas de las trichomonas pueden también ser responsables de incrementar el riesgo de la adquisición del VIH en mujeres con trichomonosis.

Frecuentemente se ha observado infiltración leucocitaria en mujeres con trichomonosis. Aunque los leucocitos eliminan rápidamente a las trichomonas *in vitro*, estos no proporcionan efecto protector *in vivo*. Sin embargo, a bajas relaciones parásito:leucocito, el contacto inicial entre el parásito y el leucocito resulta en la formación de pseudopodos fagocíticos, internalización, y finalmente degradación de la célula inmune en las vacuolas fagocíticas del parásito.

## II. ANTECEDENTES.

### II.1. PROTEASAS EN *Trichomonas vaginalis*

*Trichomonas vaginalis* tiene una alta actividad proteolítica debida a múltiples proteasas. El uso de geles SDS-PAGE que contienen gelatina copolimerizada ha sido un método sensible de detección de proteasas permitiendo la caracterización parcial de las enzimas. La mayoría de las proteasas son de tipo cisteín que difieren a su vez en la especificidad de su sustrato. Muchas de estas enzimas, incluyendo las más activas en geles de gelatina, tienen masas moleculares significativamente mayores que las cisteín proteasas bien caracterizadas de eucariontes superiores. Durante un cultivo axénico *in vitro*, *T. vaginalis* libera grandes cantidades de proteasas (aparentemente de tipo cisteín) exclusivamente en el medio de cultivo. Esto también se ha observado *in vivo*, ya que las cisteín proteasas de *T. vaginalis* han sido detectadas en lavados vaginales de mujeres infectadas.

Se han reportado proteasas de tipo cisteín de 69, 49, 35, 32 (Irvine WJ y col., 1997) y 30 kDa. Estudios previos con inhibidores de cisteín proteasas N- $\alpha$ -p-tosil-L-lisina clorometilcetona (TLCK) y leupeptina muestran que es necesaria la acción de las proteasas sobre la superficie del parásito antes de la unión a la célula hospedera. La cisteín proteasa de 30 kDa (CP30), localizada en la superficie de *T. vaginalis* y con alta afinidad por la superficie de las células huésped, se encuentra relacionada con la citoadherencia. La CP30 presenta una actividad óptima en un rango de pH de 4.5 a 7.0, temperatura de 36°C a 45°C y una termoestabilidad menor a 60°C. Está conformada por tres manchas de actividad en un rango de pH de 4.5 y 5.5, las tres presentan afinidad por la superficie de las células HeLa lo cual sugiere que estas proteasas se encuentran activas en la vagina de las pacientes con trichomonosis. La secreción de la CP30 al medio de cultivo es dependiente de las concentraciones de hierro, de suero en el medio y de la presencia de células blanco (Mendoza-López M.R y Arroyo R, 2002). Aparte de la CP30 se ha reportado otra cisteín proteasa de un peso molecular de 30 kDa (Duk-Young y Myung-Hwan, 1998), que es capaz de degradar inmunoglobulinas de tipo IgA séricas, IgA secretorias que inhiben la



adherencia de bacterias y parásitos a la mucosa y a las células epiteliales, e IgG séricas y también es capaz de degradar la hemoglobina. Esta proteasa presenta actividad óptima a pH de 6; se ha propuesto que esta proteasa puede conferir una especie de defensa contra la respuesta inmune humoral del hospedero debido a su capacidad de degradar inmunoglobulinas y además suministrar nutrientes al parásito mediante la degradación de hemoglobina.

También se ha descrito una cisteín proteasa de 65 kDa (Alvarez-Sánchez ME y Arroyo R, 2000) localizada tanto en la membrana plasmática como en el citoplasma de *T. vaginalis* y que tiene una actividad óptima a 37 °C y a pH de 5.5 que son condiciones similares a las que presentan los pacientes con trichomonosis. Además se ha encontrado que esta proteasa degrada algunas de las proteínas encontradas en la vagina como lo son el colágeno IV y la fibronectina presentes en la lámina basal de el epitelio que se encuentra entre la vagina y el cérvix lo cual puede contribuir al parto prematuro. Mediante ensayos de inmunoprecipitación se ha demostrado la presencia de anticuerpos anti CP65 en suero y en lavados vaginales, por lo que se cree que esta proteasa este involucrada como un factor de virulencia en la citotoxicidad.

Además de las proteasas de tipo cisteín, en *T. vaginalis* se han descrito dos proteasas que son inhibidas con EDTA (inhibidor de proteasas de tipo metalo), una proteasa de 142 kDa y la otra de un peso molecular >220 kDa, lo que indica que en *T. vaginalis* las proteasas no son exclusivamente de tipo cisteín (Bozner P y Demes P, 1991; Mallison DJ y North JM, 1994).

## II.2. PROTEASAS.

Las proteasas ó proteasas catalizan el rompimiento de enlaces amido en proteínas y péptidos oligoméricos. Las proteasas han sido identificadas en sistemas biológicos que van desde los virus hasta los vertebrados. Se estima que sin las proteasas como catalizadores biológicos la hidrólisis de un enlace peptídico llevaría cientos de años, en comparación una proteasa puede degradar tantos como un millón de enlaces peptídicos por segundo. El rango del tamaño de las proteasas va desde monómeros de 10 kDa a complejos multiméricos de

varios cientos de kDa. Se ha establecido que muchas proteasas de parásitos son posibles blancos quimioterapéuticos o para la creación de vacunas.

Antes de hidrolizar los enlaces peptídicos, una peptidasa debe unirse a la proteína o al péptido sustrato en su sitio activo. La unión eficiente del sustrato está en función tanto del ambiente químico creado por los subsitios de la proteasa como de la naturaleza química del péptido que interacciona directamente con la ranura del sitio activo. Entre los factores que afectan de manera importante estas interacciones se incluyen: tamaño, polaridad, carga, hidrofobicidad, y accesibilidad. Aunque durante la catálisis un solo enlace peptídico es cortado, los aminoácidos que están a los lados del sitio de corte son críticos para fijar al sustrato y la especificidad de una enzima. Las secuencias que flanquean directamente el sitio activo están altamente conservadas para mantener el registro catalítico y se utilizan para clasificar las proteasas. La especificidad de sustratos puede utilizarse también para la identificación de inhibidores selectivos y en algunos casos para predecir los sustratos naturales (M. Sajid, McKerrow JH, 2002).

### **II.3. CLASIFICACIÓN DE PROTEASAS.**

Los criterios más utilizados para la clasificación de proteasas son:

- 1.- La reacción que catalizan.
- 2.- La naturaleza química del sitio catalítico.
- 3.- Las relaciones evolutivas reveladas por su estructura.

La clasificación y nombramiento de las enzimas tomando como referencia las reacciones que catalizan y el conocimiento del nombre químico sistemático del sustrato permite derivar un nombre sistemático para la enzima y decidir como puede ser clasificada.

## II.4. CLASIFICACIÓN DE PROTEASAS POR LA REACCIÓN QUE CATALIZAN.

Las subclases de proteasas se dividen en dos grupos que comprenden las exopeptidasas y las endopeptidasas. Las exopeptidasas actúan solo cerca del final de la cadena polipeptídica. Aquellas que actúan en los extremos amino (N) terminales pueden liberar un solo residuo de aminoácido, un dipéptido o un tripéptido (aminopeptidasas, dipeptidil peptidasas y tripeptidil peptidasas, respectivamente). Las exopeptidasas que actúan en el grupo carboxilo (C) terminal pueden liberar un solo residuo de aminoácido o un dipéptido (carboxipeptidasas y peptidil-dipeptidasas, respectivamente). Otras exopeptidasas son específicas para dipeptidos (dipeptidasas), o remueven residuos terminales que son sustituidos, ciclisados, o unidos por enlaces isopeptídicos (uniones peptídicas diferentes a los grupos  $\alpha$ -carboxilo y  $\alpha$ -amino) (peptidasas omega).

Las endopeptidasas actúan preferencialmente en las regiones internas de las cadenas peptídicas, lejos de los extremos, y la presencia de grupos libres  $\alpha$ -amino y  $\alpha$ -carboxilo tienen un efecto negativo en la actividad de estas enzimas.

Las omega peptidasas hidrolizan residuos terminales, pero algunas de ellas actúan en residuos atípicos que no están cerca de los grupos  $\alpha$ -amino ó  $\alpha$ -carboxilo.

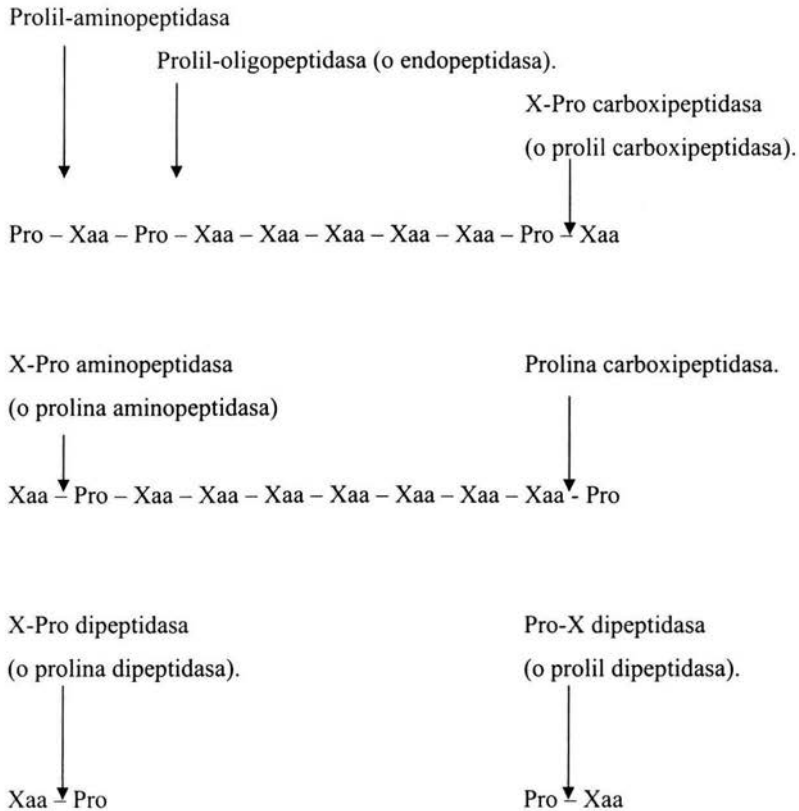
La información acerca de la reacción catalizada por una peptidasa individual puede formar las bases para su nombramiento y su correcta clasificación, cuando la especificidad claramente depende de la identidad de uno, o dos aminoácidos a lo más.

Una exopeptidasa es comúnmente nombrada por la referencia al tipo de reacción que cataliza, cuando la enzima muestra una marcada preferencia por un residuo particular de aminoácido en la posición P1 ó P1', el nombre de este puede formar un calificativo (tabla I).

Para la mayoría de las endopeptidasas, la especificidad es demasiado compleja para proveer la base para un nombre. En estos casos, nombres triviales como "tripsina", "papaina", "termopsina" y "pitirilisina" pueden servir muy bien. Aunque estos llevan poca o ninguna información acerca de ellas, ya que se relacionan con su precursor, más que con la reacción enzimática.

TABLA I.

Nombres semisistemáticos para Exopeptidasas.



## II.5. CLASIFICACIÓN DE PROTEASAS POR EL TIPO CATALÍTICO.

Las carboxipeptidasas y las endopeptidasas son divididas en sub-subclases en base al mecanismo catalítico (Figura 1). Las peptidasas de tipo serín tienen un centro activo de serina involucrado en el proceso catalítico, las peptidasas de tipo cisteín tienen un residuo de cisteína en su centro activo, las endopeptidasas de tipo aspártico dependen de dos residuos de ácido aspártico para su actividad catalítica, y las metalopeptidasas utilizan un ión metálico (comúnmente zinc) en el mecanismo catalítico.



Figura 1.- Subdivisión de carboxipeptidasas y endopeptidasas de acuerdo al tipo catalítico.

Los efectos de inhibidores han proporcionado información acerca del tipo catalítico de las peptidasas. Existen amplias variaciones en la susceptibilidad de las peptidasas frente a inhibidores, incluso dentro de un mismo tipo catalítico. Algunas veces estas variaciones reflejan el hecho de que estas enzimas son miembros de familias evolutivas diferentes, y por lo tanto muy diferentes estructuralmente, aunque utilicen el mismo tipo de mecanismo catalítico.

## II.6. CLASIFICACIÓN DE PROTEASAS CON BASE EN RELACIONES EVOLUTIVAS.

Ahora que las secuencias de aminoácidos se han determinado para muchas de las peptidasas conocidas, se puede obtener información acerca de las relaciones evolutivas y estructurales de las enzimas comparando su secuencia. Esto provee una tercera forma de clasificación para las peptidasas, debido a que las similitudes estructurales dentro de una familia de peptidasas comúnmente reflejan similitudes importantes en el mecanismo catalítico y otras propiedades, que pueden extenderse a otras funciones biológicas.

El término “clan” describe un grupo de familias que tienen un ancestro común. Los indicadores de relaciones distantes vienen principalmente del orden lineal de los residuos del sitio catalítico, grupos de aminoácidos conservados alrededor de los residuos catalíticos, y las estructuras terciarias de las proteínas. Algunos de los pliegues de las proteínas en diferentes familias son similares lo que indica la relación a nivel del clan.

El término “familia” es utilizado para describir a un grupo de peptidasas que están evolutivamente relacionadas en su estructura primaria por el orden de los residuos de la triada catalítica (Tabla II). Se cree que todos los miembros de una determinada familia evolucionaron a partir de una proteína ancestral.

Los miembros de las familias son reconocidos por el hecho de que cada uno muestra una relación estadísticamente significativa en secuencia de aminoácidos con otro miembro, en toda su secuencia o en el dominio responsable de la actividad catalítica.

No se ha encontrado un método que sea enteramente satisfactorio para nombrar a las familias de peptidasas; un término del tipo “familia de la quimiotripsina” es adoptado por convención, ya que la quimiotripsina fue el primer miembro de esa familia para el cual se determinó la secuencia, pero esta no es la razón por la cual la “familia de la tripsina” o la “familia de la elastasa” no puedan ser consideradas igualmente correctas. Para proveer el nombre de la familia, el miembro fundador tiene que suministrar el sistema para la numeración de los residuos de aminoácidos que es esencial en las comparaciones posteriores de estructuras moleculares dentro de la familia. Como una alternativa opcional a este nombramiento de las familias se estableció un sistema de numeración en el cual a cada familia de peptidasas le fue asignado un código constructor de una letra denotando el tipo catalítico (S, C, A, M, o U, para serín, cisteín, aspártico, metalo o desconocido (unknown)), seguido por un número asignado arbitrariamente.

El sistema de familias propuesto con base en la estructura primaria descrito anteriormente contiene algunos grupos de familias que representan líneas evolutivas, es decir, todas las proteínas en estos grupos de familias divergieron de una proteína ancestral, pero ellos divergieron tan tempranamente que no es posible establecer una relación por comparación de las estructuras primarias.

## II.7. SERÍN PROTEASAS.

Las proteasas que dependen de un residuo de serina para su actividad catalítica están distribuidas ampliamente y son muy numerosas. Las serín proteasas se encuentran en virus, bacterias y eucariontes, y ellas incluyen exopeptidasas, endopeptidasas, oligopeptidasas, y omegapeptidasas.

Cerca de 20 familias de serín proteasas han sido identificadas (Tabla II), en base a sus estructuras tridimensionales y a evidencia menos directa. Muchas de estas familias pueden ser agrupadas dentro de aproximadamente seis clanes que tienen ancestros comunes. Se han encontrado similitudes en los mecanismos de reacción para algunas de las proteasas con diferentes orígenes evolutivos. De este modo, las proteasas de los clanes de la quimi tripsina, subtilisina, y carboxipeptidasa C tienen en común una “triada catalítica” conformada por los aminoácidos: serina (S) (nucleófilo), aspartato (D) (electrófilo), e histidina (H) (base); las orientaciones geométricas de estos residuos son similares entre estas familias, a pesar del hecho de que los pliegues de las proteínas son diferentes. Este ejemplo contradictorio de convergencia evolutiva, ha llevado a observar los mismos residuos catalíticos en otras serín proteasas. La conservación de residuos de glicina en las vecindades del residuo catalítico de serina en las primeras serín proteasas secuenciadas, para formar el motivo Gly-Xaa-Ser-Yaa-Gly lleva a especular que este motivo se debe encontrar en todas las serín proteasas. Aunque es verdad que muchas de las familias muestran residuos de glicina conservados cerca de la serina esencial, las posiciones de estas son variables (Tabla III).

Tabla II.

Clanes y familias de serín proteasas\*.

Clan.	Familia.	Enzima representativa.	Residuos catalíticos conocidos.
SA	S1	Quimi tripsina.	-----H-----D-----S-----
SA	S2	Endopeptidasa $\alpha$ -lítica.	-----H-----D-----S-----
SA	S3	Endopeptidasa de envoltura del virus Sindbis.	-----H-----D-----S-----
SA	S5	Lisil endopeptidasa.	-----H-----D-----S-----
SA	S6	Serín endopeptidasa IgA específica.	-----S-----

SA	S30	Endopeptidasa del virus del tabaco de 35kDa.	.....H-D--S.....
SA	S7	Endopeptidasa NS3 del virus de la fiebre amarilla.	.....HD--S.....
SA	S29	Endopeptidasa NS3 del virus de la hepatitis C.	.....S.....
SA	S31	Endopeptidasa p80 del virus de la diarrea del ganado.	.....S.....
SA	S32	Endopeptidasa putativa del virus de la artritis equina.	.....
SB	S8	Subtilisina.	.....D---H-----S.....
SC	S9	Profil oligopeptidasa.	.....S---D-H-
?	S10	Carboxipeptidasa C.	.....S-----D---H-
?	S28	Carboxipeptidasa lisosomal X-Pro.	.....
?	S15	<i>Lactococcus</i> peptidasa X-Pro.	.....S.....
SE	S11	<i>Escherichia</i> D-Ala-D-Ala peptidasa A.	.....SK.....
SE	S12	<i>Streptomyces</i> R61 D-Ala-D-Ala peptidasa.	.....SK.....
SE	S13	<i>Actinomadura</i> R39 D-Ala-D-Ala peptidasa.	.....SK.....
SF	S24	Represor Lex-A	.....S-----K.....
SF	S26	Peptidasa guía.	.....S-----K.....
SF	S27	Peptidasa señal eucarionte.	.....
SG	S14	Endopeptidasa Clp (subunidad clpP).	.....S---H.....
?	S16	Endopeptidasa La.	.....S.....
?	S25	Complejo de endopeptidasas multicatalítico.	.....
-	S18	Ompin.	.....



-	S19	<i>Coccidioides</i> endopeptidasa.	-----
-	S21	Assemblin.	-----H-----S-----
-	S17	<i>Bacteroides</i> endopeptidasa extracelular.	-----
-	S23	<i>Escherichia</i> proteasa I.	-----

\*El arreglo de los residuos catalíticos en las enzimas representativas es ilustrado diagramáticamente utilizando líneas para describir las cadenas polipeptídicas, aunque en realidad las cadenas varían considerablemente en longitud. Para algunas de las familias, los residuos catalíticos no se han definido.

Tabla III

Residuos de glicina conservados en la vecindad de la serina catalítica.

Clan.	Familia.	
SA	S1	..G.SG....
	S2	..G.SG....
	S3	..G.SG....
	S5	..G.SG....
	S6	..G.SG....
	S30	..G.SG....
	S7	..G.SG....
	S29	..G.SGG...
	S31	..G.SG....
SB	S8	..G.S.....
SC	S9	..G.S.GG..
	S10	..G.S..G..
	S15	..G.S..G..
SE	S11	....S..K..
	S12	....S..K..
	S13	....S..K..
SF	S24	..G.S....G
	S26	....S.....

SG	S14	G...S.....
	S16	..G.S.G...
-	S21	....S.....

Los puntos representan residuos de aminoácidos que pueden variar entre una familia y otra.

Las serín proteasas son enzimas involucradas en un amplio rango de procesos biológicos que incluyen el metabolismo de proteínas tanto intra como extracelularmente, digestión, coagulación sanguínea, disolución de coágulos, respuesta inmune y fertilización. La estructura tridimensional de las serín proteasas, junto con los estudios biofísicos, de biología molecular y enzimática, provee modelos útiles para entender el mecanismo de acción enzimático, la base de la especificidad del sustrato y la evolución molecular de las enzimas.

Aparte de su papel en la fisiología y metabolismo de los organismos, las serín proteasas están implicadas en la patogénesis de numerosas enfermedades infecciosas. Entre algunas de las enfermedades parasitarias más prevalentes se encuentran la esquistosomiasis y la oncocercosis. Las proteasas de éstos parásitos pueden facilitar la invasión de los tejidos del hospedero, el metabolismo de las proteínas del hospedero y la evasión de la respuesta inmune. En la anisakiasis, causada por la ingestión de la larva del nematodo *Anisakis* que se encuentra en platillos de mariscos como el sushi y el sashimi, el parásito puede invadir y penetrar la pared del estómago o el intestino. Se ha encontrado que las secreciones de la larva tejido-invasiva contienen una serín proteasa parecida a la tripsina que puede facilitar la invasión de los tejidos del hospedero (Sakanari JA y McKerrow JH, 1989). Por otra parte se ha especulado que miembros del género *Acanthamoeba*, causantes de la queratitis ameboide y la encefalitis granulomatosa ameboide (EGA), registrada principalmente a pacientes débiles o inmunodeprimidos, la patogénesis de la infección por *Acanthamoeba* puede ser un proceso que consta de varias etapas como adhesión, degradación e invasión. La secreción de una serín proteasa con una fuerte actividad frente a proteínas de la matriz extracelular puede facilitar la invasión de tejidos (Hong Y y Chung D, 2000).

Otro padecimiento en el cual las serín proteasas tienen gran importancia es en la infección por el parásito *Schistosoma mansoni* que empieza con la invasión de la piel

intacta por la larva acuática, la cercaria, secretada por el caracol de agua dulce *Biomphalaria glabrata*. La cercaria de *S. mansoni* mide alrededor de ~150 µm de largo y 70µm de ancho por lo que requiere de la lisis de los tejidos de la piel para migrar a los vasos sanguíneos. Se sabe que las secreciones de la cercaria poseen actividad proteolítica ya que las macromoléculas del hospedero representan barreras a la invasión de la cercaria; entre estas se incluyen la elastina, keratina, fibronectina, laminina, y colagenos IV y VIII. Se ha reportado una serín proteasa en extractos de cercaria o en secreciones de cercaria inducidas por el contacto con lípidos de la piel, esta proteasa es parecida a la quimi tripsina, con actividad contra muchas de las barreras macromoleculares (Salter JP y McKerrow JH, 2000).

### II.7.1. FAMILIA DE LAS SUBTILISINAS (S8).

La familia de las subtilisinas es la segunda familia más grande de serín proteasas que se ha identificado después de la familia de la quimi tripsina y está ampliamente extendida, sus miembros se encuentran en eubacterias, arqueobacterias, eucariontes y virus. La gran mayoría de las enzimas son endopeptidasas, pero también hay tripeptidil-peptidasas. Se han determinado las estructuras cristalográficas para algunos miembros de esta familia y estas muestran una triada catalítica compuesta de los mismos residuos que se encuentran en las peptidasas del clan de la quimi tripsina. Sin embargo el orden de estos residuos es diferente en la familia de las subtilisinas (Asp/His/Ser) y las estructuras tridimensionales no muestran semejanza con la quimi tripsina, ya que la subtilisina y la quimi tripsina no están relacionadas evolutivamente.

La mayoría de las subtilisinas son sintetizadas como pre-pro-enzimas y subsecuentemente son translocadas al exterior de la membrana celular vía el pre-péptido ó péptido señal, y finalmente activadas por el rompimiento del pro-péptido, aunque hay numerosas excepciones en las cuales los pro-péptidos están ausentes y un pequeño número de subtilisinas que son intracelulares (Siezen et al., 1995). Se sabe que las endopeptidasas kexina, furina, y enzimas relacionadas hasta ahora conocidas de levaduras y animales, se rompen en el extremo C terminal hasta un par de aminoácidos básicos. En las subtilisinas el

oxianión es formado por la Serina del sitio activo y la Asparagina 262 (numeración de acuerdo a la subtilisina Bacillus Protease N' (BPN')).

		↓		↓		↓
1	<b>GSNVK-VAVIDSGIDSSHPDL</b>		<b>NNSHGTHVAGTVAA</b>		<b>NGTSMASPHVAGAA</b>	
2	<b>GANVK-VAVLDTGIQASHPDL</b>		<b>GNGHGTHVAGTVAA</b>		<b>NGTSMASPHVAGAA</b>	
3	<b>GSGAK-IAIVDTGVQSNHPDL</b>		<b>GNGHGTHCAGIAAA</b>		<b>SGTSMATPHVAGVA</b>	
4	<b>GTGVT-AYVIDTGVVNAHVEF</b>		<b>CNGHGTHVAGTIGG</b>		<b>SGTSMATPHVAGVA</b>	
5	<b>GKHPTVSyvVDSGIRTHSEF</b>		<b>LLGHGTHVAGTVGG</b>		<b>SGTSMACPHVAGLA</b>	
6	<b>GQGSC-VYVIDTGIASHPEF</b>		<b>GNGHGTHCAGTVGS</b>		<b>SGTSMATPHVAGLA</b>	
7	<b>GRGVT-SYVIDTGVNINHKDF</b>		<b>GNGHGTHCAGTIAA</b>		<b>SGTSMASPHVAGLL</b>	
8	<b>GAGVV-AAIVDDGLDYENEDL</b>		<b>DDYHGTRCAGEIAA</b>		<b>GGTSAAPLAAGVY</b>	
9	<b>GKGVV-IGIMDDGIDYLHPDL</b>		<b>FNSHGTRCAGEVSA</b>		<b>SGTSAAPEAAGVF</b>	
10	<b>GHGIV-VSILDDGIEKNHPDL</b>		<b>DNRHGTRCAGEVAA</b>		<b>TGTSASAPLAAGII</b>	
11	<b>HDGEVWRACIDSNEGDLSKS</b>		<b>GGAHGTHVASIAAG</b>		<b>NGTSMSSPNACGGI</b>	
12	<b>GDPGVTISVVDQGIQYDHEDL</b>		<b>SENHGTHVGGIAAG</b>		<b>SGTSMASPHVAGVA</b>	
13	<b>DGTGTIIAIIIDGVDIDHEEF</b>		<b>RDNHGTCAGVACG</b>		<b>GGTSSACPGAAGVA</b>	

Figura 2.- Secuencias conservadas alrededor de los residuos de la triada catalítica en la familia de las subtilisinas. Los residuos idénticos en la subtilisina BPN' se muestran en negritas. Las flechas indican los residuos de la triada catalítica. 1.-Subtilisina BPN'; 2.-Subtilisina Carlsberg; 3.-Termitasa; 4.-Serin exopeptidasa A dependiente de calcio *Vibrio alginolyticus*; 5.-Endopeptidasa extracelular *Yarrowia lipolytica*; 6.-Endopeptidasa K; 7.-Cerevisina; 8.-Kexina; 9.-Convertasa PC2 pituitaria humana; 10.-Furina de rata; 11.-Tripeptidil peptidasa II humana; 12.-Halolisina; 13.-Endopeptidasa dependiente de calcio *Anabaena variabilis*.

Algunos miembros de las subtilisinas tienen algún requerimiento por activación de un grupo tiol. Esta dependencia del tiol es atribuible a la Cys-173 cerca de la histidina del sitio activo.

La familia de las subtilisinas contiene algunas proteínas mosaico. La endopeptidasa secretada de *Vibrio alginolyticus* (conocida como "exo-peptidasa A") y *Xanthomonas campestris* contienen dominios homólogos carboxilo terminal similares a algunos encontrados en metalopeptidasas, incluyendo una aminopeptidasa de *Vibrio proteolyticus* (familia M28) y endopeptidasas de la familia de termolisinas (M4). Por otra parte las subtilisinas que están localizadas en la membrana celular de *Lactococcus* muestran un dominio homólogo con otras proteínas de membrana bacterianas como es la proteína de unión al fibrinógeno e inmunoglobulinas de *Streptococcus*.



En general, la especificidad de la subtilasa está determinada por las interacciones de las cadenas laterales de los residuos P4-P1 del sustrato y los residuos de los sitios de la enzima S1-S4, respectivamente, con los sitios S4 y S1 dominando la preferencia por el sustrato.

Estos sitios de unión en las subtilasas tienen las siguientes características (numeración en base a la subtilisina BPN’):

S2’: Es un bolsillo hidrofóbico de tamaño variable dependiendo de la orientación de la cadena aromática lateral del residuo 189.

S1: Es una hendidura larga y elongada, rodeada a los lados por el esqueleto de los segmentos 125-128 y 152-155, el residuo 166 en el fondo y con los residuos 156 y 129 en los bordes.

S2: Es una pequeña hendidura unida en ambos lados por el residuo 100 y el residuo del sitio activo H64, en el fondo por el residuo hidrofóbico 96, el residuo del sitio activo D32 y el residuo 33.

S4: Es un bolsillo situado entre los segmentos 101-104 y 126-130, el cual parece tener dos subsitios que pueden tener diferentes características. El sitio 4a tiene a los lados y en el fondo los residuos 96, 107, 126 y en borde al residuo 102. El sitio 4b tiene a los lados y en el fondo los residuos 104, 135 y en el borde los residuos 128 y 130. Las cadenas laterales de estos residuos determinan el tamaño del bolsillo S4.

### **III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.**

Estudios realizados por nuestro grupo de trabajo con clonas genómicas que contienen genes de actina de *Trichomonas vaginalis*, han demostrado la presencia de un mayor contenido de G+C en las regiones codificadoras comparadas con las regiones no codificadoras. Se analizaron las regiones adyacentes a los genes de actina de varias de estas clonas; en particular, en el extremo 3' de la clona genómica 8A se detectó una región con un elevado contenido de G+C, la cual poseía homología con serín proteasas. Estas proteasas se han reportadas en otros microorganismos y parásitos y han sido consideradas un factor de virulencia. En *Trichomonas vaginalis* únicamente se han descrito proteasas de tipo cisteín y metalo y hasta ahora no se han descrito proteasas de tipo serín. Por lo tanto consideramos que la presencia de una serín proteinasa en *T. vaginalis* podría ser un factor de virulencia no descrito anteriormente en este parásito.

### **IV. OBJETIVOS.**

1. Analizar el marco de lectura abierto incompleto contiguo a un gen de actina de *T. vaginalis*
2. Determinar el número de genes y la expresión de una serín proteasa de *T. vaginalis*.
3. Obtener la secuencia nucleotídica completa del gen que codifica para una serín proteasa en *T. vaginalis*.
4. Deducir y analizar la secuencia de aminoácidos de una serín proteasa en *T. vaginalis*.
5. Proponer un modelo estructural teórico para la serín proteasa de *T. vaginalis*.

## V. METODOLOGÍA

### V.1. EXTRACCIÓN DE ADN PLASMÍDICO (MINIPREPARACIÓN).

- 1.- Crecer un cultivo de la cepa de *Escherichia coli* que contiene el plásmido durante toda la noche a 37 °C en un baño con agitación constante en 3 ml de LB + ampicilina (USB) (100 µg/ml) ó el antibiótico adecuado según el plásmido.
- 2.- Colocar 1.5 ml del cultivo en un tubo eppendorf.
- 3.- Centrifugar a 12,000 rpm por 30 seg.
- 4.- Descartar el sobrenadante. Agitar en vortex para suavizar la pastilla celular.
- 5.- Resuspender la pastilla en 100 µl de solución I enfriada en hielo agitando en vortex.
- 6.- Adicionar 200 µl de solución II preparada recientemente, mezclar el contenido por inversión del tubo por lo menos 5 veces. No agitar en vortex. Mantener en hielo.
- 7.- Adicionar 150 µl de solución III enfriada en hielo. Agitar en vortex suavemente por 10 segundos, para dispersar la solución a través del lisado celular.
- 8.- Incubar en hielo de 3-5 minutos.
- 9.- Centrifugar a 12,000 rpm por 5 minutos en microfuga y transferir el sobrenadante a un tubo limpio (en la pastilla se encuentra el ADN genómico).
- 10.- Adicionar volúmenes iguales de Fenol (GIBCO) (250 µl): Cloroformo (SIGMA) (250 µl), agitar en vortex. Centrifugar a 14,000 rpm por 3 minutos. Pasar la fase acuosa a un tubo limpio con 500 µl de cloroformo, agitar en vortex, centrifugar 3 minutos a 14,000 rpm y transferir el sobrenadante a un tubo limpio.
- 11.- Precipitar el ADN con 2 volúmenes de etanol (1000 µl) a temperatura ambiente. Mezclar en el vortex, dejar reposar la mezcla por 10 minutos a temperatura ambiente.
- 12.- Centrifugar a 12,000 rpm por 10 minutos.
- 13.- Remover el sobrenadante por aspiración. Colocar el tubo en posición invertida sobre una toalla de papel, remover cualquier gota de fluido a las paredes del tubo.
- 14.- Enjuagar la pastilla con 1 ml de etanol al 70 % a 4 °C, remover el sobrenadante y dejar secar la pastilla por 10 minutos.



15.- Redisolver los ácidos nucleicos en 50 µl de TE conteniendo RNAsa pancreática libre de DNAsa (GIBCO) (20 µg/ml). Agitar brevemente en vortex, incubar a 37 °C por 20 minutos y almacenar a -20 °C.

## V.2. SECUENCIACIÓN DEL EXTREMO 3' DE LA CLONA GENÓMICA 8A y DEL FRAGMENTO DE 1528 PB DELA CLONA GENÓMICA 9.2.

La secuenciación del extremo de la clona genómica 8A se llevo a cabo en un secuenciador automático ABI-PRISM (Instituto de Fisiología Celular, UNAM), utilizando como templado la clona 8A a una concentración de 0.5 µg/µl y los siguientes oligonucleótidos\* llevados a una concentración de 20 picomoles/µl:

Tabla IV

Oligonucleótidos utilizados para secuenciar la región 3' de la clona 8A y la clona pSP9.2.

Nombre del oligonucleótido* (Sentido) (Tm).	Secuencia (5'-3').	Nombre del oligonucleótido* (Antisentido) (Tm)	Secuencia (5'-3').
8Agact20 (49°C)	CTCGCTACATTCCCACAG	8Agact13 (38°C)	GTTGCAATCTGGTAATGA
8Agact21 (47°C)	GTTACGCACGAGCCAAGG	8Agact14 (52°C)	TGTGTGCCGTGGCCTGGG
8Agact22 (38°C)	AAGTAGATATCCTGATTCAA	8Agact15 (38°C)	TGGCCATCTTTGATCTTT
8Agact23 (45°C)	ACGATGGTATTGCACCTGAA	8Agact16 (43°C)	TAGATGTCCAATGTGCGG
8Agact24 (38°C)	TCATTACCAGATTGCAAC	Reverse primer (44°C)	GGAAACAGCTATGACCATG
9.2sepr21 (50°C)	CCATTACTTGCAGATTTATC		

\*Todos los oligonucleótidos fueron sintetizados por la casa comercial INVITROGEN.

### V.3. EXTRACCIÓN DE ADN GENÓMICO.

#### CULTIVO DE *Trichomonas vaginalis*.

- 1.- En un tubo de ensayo con tapa de rosca (estéril) poner 6 ml de medio de cultivo TYM, 0.6 ml de suero de caballo inactivado (GIBCO) (10% del volumen de medio de cultivo) y el volumen correspondiente a  $0.5 \times 10^6$  células por ml.
- 2.- Cuando el cultivo tenga una cantidad aproximada de 1.6 a  $2 \times 10^6$  células por ml, se puede utilizar para inocular una caja de cultivo Nunc de 260 ml. Se ponen 50 ml de medio de cultivo TYM, 5 ml de suero de caballo inactivado y el volumen total del tubo que se vaya a utilizar como inóculo (7 ml aproximadamente), al día siguiente este cultivo ya estará lo suficientemente crecido como para preparar ADN del parásito. El cultivo para la extracción de ADN debe tener de 2 a  $2.5 \times 10^6$  células/ml aproximadamente.
- 3.- El volumen total del cultivo se separa en dos tubos Nalgene de 50 ml. Se procesa primero un tubo y luego el otro tubo para evitar la degradación del ADN.
- 4.- Se centrifuga el tubo Nalgene con el medio de cultivo a 3000 rpm durante 10 minutos, a 4 °C en un rotor Sorvall SS34.
- 5.- Se decanta el sobrenadante cuidadosamente y se coloca en un recipiente de desechos que será esterilizado posteriormente.
- 6.- Se lava el botón de células con 20 ml de PBS pH 7.4 las cuales se resuspenden y se vuelven a centrifugar en la misma forma que en el inciso 4.
- 7.- Se decanta la solución de lavado y el botón de células se resuspende en 2 ml de PBS.
- 8.- En dos tubos eppendorf de 1.5 ml, poner 1ml de células resuspendidas en el inciso anterior y centrifugar a 14000 rpm durante 1 minuto en una microcentrífuga.
- 9.- Decantar el sobrenadante y resuspender el botón con el líquido que sobra (20 µl).
- 10.- Agregar 300 µl de buffer de extracción (ver apéndice) y 300 µl de fenol (GIBCO). Agitar en vortex a velocidad de 3 durante 30 segundos y centrifugar a velocidad máxima durante 3 minutos. A partir de este paso realizar la extracción en forma rápida, ya que debido a la gran cantidad de nucleasas de este parásito se puede degradar el ADN.
- 11.- Colocar la fase superior cuidadosamente (sin tomar la interfase) en otro tubo eppendorf con 300 µl de fenol y 300 µl de cloroformo (SIGMA), se agita y se centrifuga igual que en el paso anterior.

- 12.- Se transfiere la fase superior cuidadosamente a otro tubo eppendorf con 500 µl de cloroformo, se agita y se centrifuga en la misma forma.
- 13.- Se coloca la fase superior cuidadosamente en otro tubo eppendorf limpio y se precipita con 1 ml de etanol absoluto y 40 µl de acetato de sodio 3M. Se deja a -20 °C por lo menos 2 hrs, o a -80 °C por ½ hora.
- 14.- Centrifugar el tubo eppendorf con el ADN precipitado en una microcentrifuga a velocidad máxima durante 15 minutos.
- 15.- Se elimina el sobrenadante y el botón se lava con 1 ml de etanol al 70% frío, se decanta y se centrifuga durante 15 minutos.
- 16.- Se quita el exceso de etanol con una micropipeta y se deja secar el botón de ADN durante 15 minutos aproximadamente, hasta que el botón quede transparente.
- 17.- El botón de ADN se resuspende en 50 µl de TE.
- 18.- Se agregan 0.5 µl de RNAsa (GIBCO) (20 µg/ml) y se deja a 37 °C durante 30 minutos.
- 19.- El ADN se guarda a -20 °C.

#### V.4. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR).

Oligonucleótidos utilizados en la Reacción de PCR:

Oligonucleótido.	Secuencia.	T <sub>m</sub> (°C).
Reverse (antisentido).	5'GGAAACAGCTATGACCATG3'	44
8Agact22 (sentido).	5'AAGTAGATATCCTGATTCAA3'	38

PROGRAMA.

Paso.	Tiempo.	Temperatura.
1	10'	92°C
2	1'	92°C
3	1'	42°C
4	2'	72°C

5	30 ciclos (pasos 2-4).	
6	1'	92°C
7	1'	42°C
8	5'	72°C
9	END.	

La reacción se lleva a cabo en un volumen total de 50  $\mu\text{l}$  para el problema y 25  $\mu\text{l}$  para el control adicionando los reactivos en el siguiente orden y en las cantidades indicadas.

Solución.	Muestra.	Control.
1.- H <sub>2</sub> Obd Estéril para PCR.	32.5 $\mu\text{l}$	16.5 $\mu\text{l}$
2.- Buffer para PCR 10X.	5 $\mu\text{l}$	2.5 $\mu\text{l}$
3.- MgCl <sub>2</sub> 50Mm (3mM final).	3	1.5 $\mu\text{l}$
4.- dNTP's 100mM (10mM c/u).	3 $\mu\text{l}$	1.5 $\mu\text{l}$
5.- Plásmido gactin8A (200 ng/ $\mu\text{l}$ ).	0.5 $\mu\text{l}$	-
6.- Oligo 8Agact22 (200 ng/ $\mu\text{l}$ ).	3 $\mu\text{l}$	1.5 $\mu\text{l}$
7.- Oligo Reverse (200 ng/ $\mu\text{l}$ ).	3 $\mu\text{l}$	1.5 $\mu\text{l}$
Total	50 $\mu\text{l}$	25 $\mu\text{l}$
Aceite mineral	100 $\mu\text{l}$	100 $\mu\text{l}$

En el minuto 9 del primer ciclo adicionar 1  $\mu\text{l}$  a muestra y 0.5  $\mu\text{l}$  al control de la enzima Taq DNA polimerasa (GIBCO).

Para reducir la posibilidad de contaminación, todo el material (puntas de micropipeta, tubos de PCR, y micropipetas) debe ser esterilizado previamente en la cámara de luz UV, además se deben utilizar guantes de látex nuevos y cubrebocas, la enzima se saca del congelador en el momento preciso en el que se va a utilizar. El producto de PCR se clonó en el vector TOPO (INVITROGEN) para eliminar el fragmento del vector amplificado con el extremo 3'.

## V.5. CLONACIÓN DEL PRODUCTO DE PCR EN EL VECTOR TOPO.

- 1.- Amplificación por PCR del fragmento que va a ser clonado.
- 2.- Correr un gel preparativo (agarosa al 0.8%) del producto de PCR y purificar la banda de interés.

Clonación del producto de PCR en el vector TOPO.

- 1.- Preparar la mezcla de reacción para ligar el producto de PCR en el vector TOPO.
  - 2  $\mu$ l de producto de PCR purificado (500 ng)
  - 0.5  $\mu$ l de Diluite Salt Solution (5  $\mu$ l de Salt solution (INVITROGEN)+15  $\mu$ l de agua bidestilada estéril).
  - 0.5  $\mu$ l de vector TOPO (INVITROGEN).
- 2.- Mezclar ligeramente la reacción de ligación e incubar 15 minutos a temperatura ambiente.
- 3.- Adicionar 2  $\mu$ l de reacción de ligación a un tubo de células electrocompetentes (50  $\mu$ l de células) y mezclar.
- 4.- Electroporar las células a 2.46 kV colocándolas en una celda o cubeta para electroporar (GIBCO).
- 5.- Inmediatamente después de electroporar, añadir 250  $\mu$ l de de medio SOC a temperatura ambiente.
- 6.- Transferir las células electroporadas (300  $\mu$ l) a un tubo eppendorf estéril.
- 7.- Incubar las células a 37 °C por 1 hora para permitir la expresión de los genes de resistencia al antibiótico.
- 8.- Platar 1/10 y 9/10 del volumen total en cajas de LB+kanamicina.
- 9.- Incubar las cajas durante toda la noche a 37 °C.
- 10.- Las clonas obtenidas se cultivan en medio LB+kanamicina (USB) líquido para hacer minipreparaciones del plásmido.

## V.6. PROTOCOLO PARA PREPARAR LA SONDA RADIATIVA.

- 1.- Diluir el ADN que va a ser marcado a una concentración de 50 ng en 45  $\mu$ l de agua estéril o 10mM TrisHCl pH 8.0, 1mM EDTA (TE Buffer) (el volumen no debe exceder los 45  $\mu$ l.)
- 2.- Desnaturalizar la muestra de ADN en agua hirviendo (95-100 °C) por 5 minutos. Pasar el tubo inmediatamente a hielo.
- 3.- Centrifugar brevemente para bajar el contenido.
- 4.- Adicionar el ADN desnaturalizado a la mezcla de marcaje (Amersham) y mezclar brevemente hasta que el color azul este uniformemente distribuido. (No mezclar con pipeta ya que la mezcla de marcaje puede quedarse en la punta y la reacción no procede eficientemente).
- 5.- Centrifugar brevemente para bajar el contenido.
- 6.- Adicionar 5  $\mu$ l de Redivue [<sup>32</sup>P] dCTP (Amersham) y mezclar subiendo y bajando con la pipeta de 4 a 5 veces. (La mezcla de reacción puede cambiar de azul a púrpura después de la adición del isótopo radiactivo).
- 7.- Incubar a 37 °C por 10 minutos.
- 8.- Parar la reacción adicionando 5  $\mu$ l de 0.2M EDTA.
- 9.- Adicionar 50  $\mu$ l de T.E. 10-0.2mM.
- 10.- Pasar la reacción por la columna de Sephadex G50, para eliminar la marca radiactiva no incorporada.
- 11.- Desnaturalización de la sonda:
  - Agregar a la sonda 0.1 volúmenes de NaOH 3N (10  $\mu$ l).
  - Incubar 5' a temperatura ambiente.
  - Transferir a hielo+agua.
  - Agregar 0.1 volúmenes de HCl 3N (10  $\mu$ l).
  - Agregar 0.05 volúmenes de Tris 1M pH 7.4 (5  $\mu$ l).
  - Mantener en hielo.
- 13.- Agregar la sonda desnaturalizada a la solución de hibridación.

## V.7. SOUTHERN BLOT.

### I.- Digestión del ADN con enzimas de restricción:

- 1.- Para cada digestión se utilizaron 15 µg de ADN genómico de *T. vaginalis*.
- 2.- El ADN se digirió con las siguientes las enzimas de restricción *Eco* RI, *Eco* RV, *Bgl* II, *Hind* III, *Pst* I, *Bam* HI (GIBCO) y *Cla* I (New England Biolabs). Realizar dobles digestiones con *Pst* I/*Bgl* II, *Bam* HI/*Bgl* II y *Hind* III/*Bgl* II con un exceso de enzima (10X). Las reacciones se llevaron a cabo en un volumen de 200 µl a 37 °C durante toda la noche.
- 3.- Para las dobles digestiones de *Hind* III/*Bgl* II y *Pst* I/*Bgl* II fue necesario realizar una extracción fenol/cloroformo. Después de la primera digestión , precipitar el ADN y posteriormente llevar a cabo la digestión con *Bgl* II.
- 4.- A la mañana siguiente se adicionaron 10 unidades más de enzima de restricción a cada reacción y se incubaron 3 horas más para completar la reacción.
- 5.- El ADN se precipitó con 1/10 de volumen de acetato de sodio 3 M y 2.5 volúmenes de etanol (a -70°C por 1 hora).
- 6.- Centrifugar a 14,000 rpm por 20 minutos.
- 7.- La pastilla se lavó con etanol al 70% frío y se dejó secar durante aproximadamente 5 minutos.
- 8.- El ADN se resuspendió en 10 µl de TE (pH 7.4). (Puede calentarse a 56° C para facilitar la resuspensión).

### II.- Preparación y corrida del gel.

- 1.- Preparar un gel de agarosa al 0.8% en buffer TAE 1X. Gel: 11X14 cm, de un grosor aproximado de 6 mm.
- 2.- Cargar los marcadores de peso molecular y las muestras.
- 3.- Correr el gel a 80 volts hasta que el colorante más rápido corra aproximadamente ¾ partes (aproximadamente 3 horas). Utilizar como marcador de peso molecular ADN del bacteriófago Lambda cortado con *Hind* III (GIBCO).

- 4.- Teñir el gel con bromuro de etidio por 20 minutos. (Stock 1000X: 10 mg/ml).
- 5.- Lavar el gel 10 minutos en agua destilada.(opcional).
- 6.- Tomar una fotografía asegurándose de poner una regla fluorescente en luz UV alineada al gel.
- 7.- Cortar el exceso de gel. Hacer una muesca en la parte superior derecha del gel, cuidando de no exponer demasiado el gel a la luz UV.
- 8.- Transferir a un recipiente apropiado para los pasos de depurinización, desnaturalización y neutralización.

### III.-Preparación del ADN contenido en el gel para la transferencia a una membrana.

- 1.- Incubar el gel en 350 ml de HCl 0.25N durante 7 minutos. Mover muy suavemente la charola para mezclar. Descartar la solución y repetir este paso.
- 2.- Incubar el gel en 250 ml de solución desnaturalizante durante 15 minutos. Descartar la solución y repetir este paso.
- 3.-Incubar el gel en 250 ml de solución de neutralización, durante 30 minutos. Descartar la solución y repetir este paso.

### IV.-Transferencia del ADN a una membrana de nylon.

- 1.- La transferencia se preparó en la campana de extracción.
- 2.- El gel se transfirió a la membrana Zeta probe GT (Bio Rad), durante toda la noche.
- 3.- Después de la transferencia, se marcaron los pozos del gel en la membrana con tinta, y se cortó la esquina correspondiente que ha sido marcada en el gel. La membrana se lavó con agitación suave en solución SSC 2X durante 10 minutos y se dejó secar al aire 1 hora.
- 4.- Una vez seca, la membrana se fijó en el horno UV a 12000  $\mu$ J.

### V.- Pre-hibridación de la membrana.

- Después de hornear la membrana se prehibrida por lo menos 2 horas en aproximadamente 15 ml de solución de prehibridación, a 42° C en el horno de hibridación.



## VI.-Hibridación.

- 1.- Medir cuanta solución de prehibridación absorbió la membrana y desechar el resto.
- 2.- Agregar al tubo con la membrana 10-15 ml de la solución de hibridación fresca conteniendo la sonda radiactiva desnaturalizada.
- 3.-La sonda se hibridó durante 2 Cot ½ a 42 °C.

$$\text{Cot } \frac{1}{2} = 2(1/X)(Y/5)(Z/10)$$

Donde:

X= Peso de la sonda en µg.

Y= Tamaño de la sonda en Kb.

Z= Volumen de hibridación.

## VII.-Lavado del filtro.

- 1.- Lavar la membrana con 2X SSC/0.5% de SDS, hacer los lavados a temperatura ambiente y después aumentar la temperatura paulatinamente revisando la membrana tras cada lavado.
- 2.- Envolver la membrana en plástico Egga Pack y exponer a película de rayos X (Hyperfilm, Amersham) con pantalla intensificadora.

## V.8. EXTRACCIÓN DE ARN DE *Trichomonas vaginalis*.

Técnica de extracción de ARN total utilizando el reactivo TRIZOL (GIBCO).

Pasos de la técnica: 1.- Homogenización.

2.- Fase de separación.

3.- Precipitación de ARN.

4.- Lavado de ARN.

5.- Obtención del ARN.

- 1.- El cultivo de *T. vaginalis* de 50 ml creciendo en fase logarítmica se cuantifica (Se han contado 600,000 parásitos por mililitro y se han tomado 14.16ml para ajustar a  $8.5 \times 10^6$  parásitos para hacer la extracción), centrifugar a 3,000 rpm durante 10 minutos a 4 °C.
- 2.- Resuspender en 1 ml de PBS/DEPC estéril y transferir a un tubo eppendorf de 1.5 ml, centrifugar a 14,000 rpm 1 minuto a 4 °C.
- 3.- Desechar la solución de lavado y resuspender los parásitos en 1 ml de TRIZOL y por pipeteo repetitivo lisar las células con el trizol.
- 4.- Incubar la muestra durante 5 minutos a temperatura ambiente para permitir la disociación completa de complejos nucleoprotéicos.
- 5.- Agregar 0.2 ml de cloroformo (USB) y mezclar por medio de inversión durante 15 segundos e incubar a temperatura ambiente de 2 a 3 minutos. Centrifugar las muestras a 14,000 rpm, (12, 000xg), durante 15 minutos a 4 °C. (No debe excederse esta cantidad).
- 6.- Transferir la fase acuosa (superior sin color, aproximadamente 1ml de trizol) donde se encuentra el ARN a un tubo limpio y precipitar con 0.5 ml de alcohol isopropílico (USB).
- 7.- Incubar la muestra a temperatura ambiente por 10 minutos.
- 8.- Centrifugar a 14, 000 rpm durante 10 minutos a 4 °C, (2-8 °C) (El precipitado de ARN frecuentemente es invisible antes de centrifugar; se forma un botón parecido a un gel.)
- 9.- Quitar el sobrenadante y lavar el botón de ARN con 1 ml de etanol/agua al 75% en agua DEPC (SIGMA).
- 10.- Mezclar la muestra en vortex y centrifugar a no mas de 10, 000 rpm,(7, 500 xg), durante 5 minutos a 4 °C, (2-8 °C).
- 11.- Eliminar el sobrenadante y secar al botón de ARN. Disolver el ARN en 10 µl de agua DEPC (agua bidestilada tratada con DEPC).
- 12.- Checar y cuantificar el ARN obtenido mediante un gel de agarosa 0.8%.
- 13.- Al descongelar el ARN no se debe agitar en vortex y para resuspender la pastilla de ARN se calienta durante 10 minutos a 60 °C antes de tomar la alícuota para identificar en el gel (siempre se calienta toda la muestra).
- 14.- Se mezclan de 1-2 µl de la muestra de ARN + 4 µl de H<sub>2</sub>O + 2 µl de buffer de carga 6X para RNA, se calientan a 75 °C durante 10 minutos y se colocan en hielo de 5-10 minutos se carga en el gel no olvidando poner marcadores de peso molecular específicos para ARN (hay marcadores de alto peso molecular y de bajo peso molecular).

## V.9. NORTHERN BLOT.

Preparación del Gel de agarosa al 1% (14X11 cm) con formaldehído.

Para preparar el gel se utiliza el material horneado y esterilizado. Se pesa 1 gr de agarosa y se coloca en el vaso de precipitados, se adicionan 73 ml de H<sub>2</sub>O-DEPC. Una vez que se ha fundido la agarosa, se deja enfriar hasta aproximadamente 60 °C y bajo la campana de extracción se le agregan al gel con una pipeta de vidrio 16.2 ml de formaldehído y 10ml de buffer MOPS/EDTA 10X. Se mezcla muy bien y se vacía en la cámara de electroforesis.

El gel se deja solidificar de 2.5 a 3 horas dentro de la campana de extracción.

Preparación de las muestras.

La preparación de las muestras se hace 30 minutos antes de cargar el gel.

-Mezcla por tubo:

- 0.76 µl de MOPS/EDTA 10X.
- 0.78 µl de H<sub>2</sub>O-DEPC.
- 2.72 µl de Formaldehído.
- 6.8 µl de Formamida.
- 3 µl de RNA + 0.5 µl de H<sub>2</sub>O-DEPC.

Las muestras y los marcadores de de peso molecular altos (0.24-9.5Kb) y bajos (0.16-1.77Kb) (GIBCO) se calientan a 65 °C por 15 minutos y después se colocan en hielo durante 2 minutos.

A cada muestra se le adicionan 4.5 µl de buffer de carga para ARN 6X y 4 µl a los marcadores de peso molecular. En el gel se cargaron 8 µl de marcadores de peso molecular y 20 µl de cada muestra, por duplicado ya que la mitad del gel se teñirá y la otra mitad se utilizará para hacer la transferencia.

El gel se corre a durante 3 horas a 80 volts con buffer MOPS/EDTA 10X.

Una vez que se terminó de correr el gel se colocó en el molde pyrex y se corta por la mitad. Una mitad se tiñe con bromuro de etidio durante 5 minutos y se destiñe en agua-DEPC.

Una vez teñido, se procede a tomarle una fotografía para lo cual se coloca una regla haciendo coincidir el cero con el inicio de los pozos del gel.

El resto del gel se transfiere a membrana de NITRAN (S&S NC) durante un tiempo mínimo de 17 horas para asegurar una transferencia completa, utilizando 120 ml de buffer de transferencia.

Realizada la transferencia, en la membrana se marcan cada uno de los pozos del gel, se lava en agua-DEPC, se deja secar por 1 hora sobre papel wattman a temperatura ambiente y luego se fija en una cámara UV a 12,000  $\mu$ J. Esta membrana está lista para ser hibridada con una sonda radiactiva, como se describió en el inciso VI de protocolo IV.7.

## **V.10. ESTRATEGIAS UTILIZADAS PARA OBTENER LA SECUENCIA COMPLETA DE LA SERÍN PROTEASA DE *Trichomonas vaginalis*.**

### **V.10.1. Escrutinio de la biblioteca de cDNA de *Trichomonas vaginalis*.**

La biblioteca de cDNA con la que se trabajó se había construido con anterioridad en el laboratorio donde se desarrolló el presente trabajo. Esta biblioteca constaba de dos poblaciones: una de fragmentos grandes y otra con fragmentos pequeños de cDNA, se mezclaron alicuotas de ambas poblaciones y esto se utilizó para realizar el escrutinio.

#### *Titulación de la biblioteca:*

Para determinar el número de unidades formadoras de placas (pfu) por ml, se realizó lo siguiente:

- 1.- Inocular 50 ml de LB suplementado con 0.2 % de maltosa y  $MgSO_4$  10 mM en un matraz Erlenmeyer estéril. Con una colonia de la cepa de *E. coli* XL1-Blue MRF'.
- 2.- Crecer con agitación a 30 °C, durante toda la noche.
- 3.- Centrifugar las células en un tubo nalgene por 10 minutos a 2000 rpm en un rotor Sorvall SS34.
- 4.- Cuidadosamente descartar el medio y resuspender la pastilla en 15 ml de  $MgSO_4$  10 mM. No Vortexear.
- 5.- Diluir las células hasta una  $DO_{600} = 0.5$  con  $MgSO_4$  10 mM.

- 6.- Hacer diluciones seriales del fago con buffer SM.
- 7.- Adicionar 200  $\mu$ l de células (a una  $DO_{600} = 0.5$ ) a un tubo falcon e inocular con el fago diluido.
- 8.- Incubar los tubos que contienen las células y los fagos por 15 minutos a 37 °C.
- 9.- Adicionar 3 ml de top agar (asegurarse que el top agar esta a 48°C antes de adicionarlo) y platear en cajas de agar LB o NZY. No adicionar antibiótico a los cultivos O/N o a las cajas de titulación. Dejar solidificar las cajas por 10 minutos e incubar a 37 °C durante toda la noche.
- 10.- Contar el número de placas y determinar el título (en pfu's por mililitro) de la biblioteca.

*Levantamiento de las placas.*

- 1.- Platear en cajas de agar de 150 mm 50,000 pfu/caja; se utilizan 600  $\mu$ l de un cultivo de la cepa de *E. coli* XL1-Blue MRF' a una  $DO_{600} = 0.5$ /caja y 6.5 ml de top agar/caja. Preparar 20 cajas para hacer el escrutinio en  $1 \times 10^6$  pfu.
- 2.- Incubar las cajas a 37 °C por 8 horas aproximadamente, hasta que las placas tengan un tamaño aproximado de 0.5 mm.
- 3.- Enfriar las placas por 2 horas a 4 °C para prevenir que el top agar se pegue a las membranas de nitrocelulosa.
- 4.- Cortar una muesca en las membranas de nitrocelulosa (Amersham).
- 5.- Dejar transfiriendo las placas a la membrana por 2 minutos, marcar la membrana y la caja con una aguja hipodérmica embebida en tinta china. Si se hacen duplicados estos se deben de transferir durante 4 minutos.
  - a.- Desnaturalizar la membrana de nitrocelulosa después de levantar colocando la membrana en solución desnaturalizante por 2 minutos.
  - b.- Neutralizar la membrana en solución de neutralización por 5 minutos.
  - c.- Lavar la membrana no más de 30 seg en solución de lavado.
- 6.- Dejar secar las membranas durante 1 hora.
- 7.- Fijar en el horno de UV a 12000  $\mu$ J.
- 8.- Almacenar las cajas de agar a 4 °C para que se utilizen después del escrutinio.
- 9.- Hibridar las membranas con la sonda adecuada, como se describió en el inciso VI de protocolo IV.7.

10.- Alinear las placas positivas con las cajas para su posterior escisión.

*Escisión de las clonas seleccionadas:*

- 1.- Con la punta de una micropipeta separar la placa de interés de la caja de agar y transferirla a un tubo eppendorf estéril conteniendo 500  $\mu$ l de buffer SM y 20  $\mu$ l de cloroformo, agitar en vortex para liberar las partículas de fago en el buffer SM e incubar de 1-2 horas a temperatura ambiente.
- 2.- Crecer por separado durante la noche cultivos de células *E. coli* XL1-Blue MRF', suplementados con maltosa al 0.2% y MgSO<sub>4</sub> 10mM, y de células de *E. coli* XL0LR en medio NZY líquido a 30 °C, hasta alcanzar una DO<sub>600</sub>= 1.
- 3.- Centrifugar brevemente las células XL1-Blue y XL0LR y resuspenderlas en MgSO<sub>4</sub> 10mM a una DO<sub>600</sub>= 1.0.
- 4.- En un tubo falcon de 15 ml, combinar los siguientes componentes:
  - 200  $\mu$ l de células XL1-Blue MRF'.
  - 250  $\mu$ l del stock de fagos (conteniendo  $>1 \times 10^5$  partículas de fagos).
  - 1  $\mu$ l de fago cooperador ExAssist ( $>1 \times 10^6$  pfu/ $\mu$ l).
- 5.- Incubar el tubo falcon a 37 °C por 15 minutos.
- 6.- Adicionar 3 ml de medio NZY e incubar por 2.5-3 horas a 37 °C con agitación.
- 7.- Calentar el tubo falcon por 20 minutos a 65-70 °C. Después centrifugar a 1000xg por 15 minutos.
- 8.- Decantar el sobrenadante en otro tubo falcon estéril. Este stock contiene el fagémido escindido y empaçado como partículas de fago filamentoso.
- 9.- Para platear los fagémidos escindidos, adicionar 200  $\mu$ l de un cultivo fresco de células XL0LR a una DO<sub>600</sub>= 1.0 a dos tubos eppendorf. Adicionar 100  $\mu$ l del sobrenadante de fagos del paso 8 a un tubo y al otro adicionarle 10  $\mu$ l del sobrenadante de fagos.
- 10.- Incubar los tubos a 37 °C por 15 minutos.
- 11.- Adicionar 300  $\mu$ l de medio NZY a cada uno de los tubos e incubar a 37 °C por 45 minutos.
- 12.- Platear 200  $\mu$ l de la mezcla de células de cada uno de los tubos en cajas de agar LB+kanamicina (50  $\mu$ g/ml) e incubar a 37 °C durante toda la noche.

### V.10.2. Amplificación rápida de extremos 3' de cDNA (3' RACE).

La técnica de 3' RACE consta de los siguientes pasos:

a) Síntesis de cDNA a partir de ARN poli A+ de *T. vaginalis*.

El cDNA utilizado para llevar a cabo esta técnica fue elaborado con anterioridad en nuestro laboratorio por la QFB Guadalupe Barrera y por la Doctora Norma Espinosa.

b) Amplificación por medio de PCR del gen de interés utilizando como templado el cDNA sintetizado.

En la primera amplificación se llevaron a cabo 4 reacciones, ya que se utilizaron 2 muestras de cDNA diferentes y 2 oligonucleótidos distintos:

Muestras de cDNA:

-cDNA 1.

-cDNA 2.

Oligonucleótidos utilizados la primera amplificación:

Oligonucleótido.	Secuencia.	Concentración.	Tm.
AUAPB	5'GGATCCGGCCACGCGTCTGACTAGTAC3'	40 picomoles/ $\mu$ l	61 °C
8Agact23	5'ACGATGGTATTGCACCTGAA3'	20 picomoles/ $\mu$ l	45 °C
8Agact24	5'TCATTACCAGATTGCAAC3'	20 picomoles/ $\mu$ l	38 °C

El volumen de reacción en el que se llevo cada una de las reacciones fue de 50  $\mu$ l adicionando los reactivos en el siguiente orden:

Solución.	Muestra.	Control.
1.- H <sub>2</sub> O bidestilada estéril.	30.5 $\mu$ l	31.5 $\mu$ l
2.- Amortiguador Expand HF 10X	5 $\mu$ l	5 $\mu$ l
3.- MgCl <sub>2</sub> 25mM.	6 $\mu$ l	6 $\mu$ l
4.- dNTP's 100mM (10mM c/u).	3 $\mu$ l	3 $\mu$
5.- cDNA de <i>T. vaginalis</i> .	1 $\mu$ l	-
6.- Oligonucleótido AUAPB.	2 $\mu$ l	2 $\mu$ l
7.- Oligonucleótido específico (8Agact23 ó 8Agact24).	2 $\mu$ l	2 $\mu$ l

8.- Enzima Expand High Fidelity PCR System.	0.5 $\mu$ l	0.5 $\mu$ l
Total.	50 $\mu$ l	50 $\mu$ l
Aceite mineral.	100 $\mu$ l	100 $\mu$ l

El programa para realizar la primera amplificación con el oligonucleótido 8Agact23 fue el siguiente:

Paso.	Tiempo.	Temperatura.
1	10'	92 °C
2	1'	92 °C
3	2'	42 °C
4	2'	72 °C
5	30 ciclos (pasos 2-4)	
6	1'	92°C
7	2'	42 °C
8	5'	72 °C
9	END.	

El programa para realizar la primera amplificación con el oligonucleótido 8Agact24 fue el siguiente:

Paso.	Tiempo.	Temperatura.
1	10'	92 °C
2	1'	92 °C
3	2'	36 °C
4	2'	72 °C
5	35 ciclos (pasos 2-4)	
6	1'	92°C
7	2'	36 °C
8	5'	72 °C
9	END.	

c) Clonación del producto de PCR purificado.

Debido a que se obtuvo una amplificación inespecífica no se clono el producto de amplificación.



### V.10.3. Biblioteca genómica parcial *Hind* III-*Bgl* II de *Trichomonas vaginalis*.

- 1.- Se extrajo ADN genómico de *T. vaginalis* como se indica en protocolo II.4.
- 2.- Se digirieron 10 µg de ADN genómico con 150 unidades de la enzima de restricción *Hind* III durante 8 horas a 37 °C.
- 3.- Al finalizar la primera digestión se llevó a cabo una segunda digestión con 150 unidades de la enzima *Bgl* II durante 8 horas a 37 °C.
- 4.- El ADN digerido se extrajo con fenol/cloroformo, se precipitó con etanol/acetato de sodio y se resuspendió en 20 µl de H<sub>2</sub>O bidestilada estéril.
- 5.- Los fragmentos genómicos se clonaron en el vector pBluescript KS. Este vector se preparó de la siguiente manera: se digirieron 12.5 µg con 80 unidades de las enzimas *Hind* III y *Bam* HI. La digestión se llevó a cabo a 37 °C por 10 horas. Una vez digerido se extrajo con fenol/ cloroformo, se precipitó con etanol/acetato de sodio y se resuspendió en 20 µl de H<sub>2</sub>O bidestilada estéril.
- 6.- El ADN genómico se ligó con el vector digerido en un volumen de 40 µl durante 24 horas a 25 °C y en relación 1:1 (500 ng: 500 ng) entre ADN genómico y vector de la siguiente manera:

Solución.	Ligación	Control
1.- H <sub>2</sub> O bidestilada estéril.	33.37 µl	25.5 µl
2.- Buffer 5X ligasa.	8 µl	8 µl
3.- Vector (pBluescript KS) / <i>Hind</i> III/ <i>Bgl</i> II (1 µg/µl).	0.5 µl	0.5 µl
4.- ADN genómico de <i>T. vaginalis</i> / <i>Hind</i> III/ <i>Bam</i> HI (0.16 µg/µl).	3.13 µl	-
5.- T4 ADN ligasa (1 U/µl).	2 µl	2 µl
ATP 100 µM.	4 µl	4 µl
Total.	40 µl	40 µl

- 7.- La ligación se precipitó con etanol y ARNt como acarreador y se resuspendió en 20  $\mu$ l de TE.
- 8.- Células electrocompetentes se transformaron por electroporación de acuerdo al protocolo III.12.4 con el volumen total de la ligación.
- 9.- Las células electroporadas se platearon en cajas de LB + Ampicilina (USB) (50  $\mu$ g/ml), y se realizó una hibridación en colonia de acuerdo al protocolo III.12.5 para seleccionar clonas que contuvieran el gen de interés.

#### **V.10.4. Transformación por electroporación.**

- 1.- Colocar la cámara y las celdas de electroporación en hielo.
- 2.- Colocar la reacción de ligación en baño de hielo y descongelar las células electrocompetentes en hielo.
- 3.- Mezclar las células electrocompetentes y la ligación por pipeteo.
- 4.- Depositar la mezcla de la ligación y las células electrocompetentes en una celda de electroporación fría, asegurándose de tocar los dos electrodos.
- 5.- Colocar la celda en la cámara de electroporación y conectarla a la fuente de poder.
- 6.- Cargar la fuente de poder a 2.46 kV.
- 7.- Electroporar las células electrocompetentes.
- 8.- Inmediatamente después de llevar a cabo la electroporación adicionar 1 ml de medio SOC y mezclar por pipeteo.
- 9.- Incubar las células por 1 hora a 37 °C para su recuperación y expresión de genes de resistencia al antibiótico.
- 10.- Platear en cajas de LB+Ampicilina 1/10 de la ligación.
- 11.- Incubar O/N las cajas de LB+Ampicilina.

### V.10.5. Hibridación en colonia.

- 1.- Se preparan 5 cajas petri de vidrio con papel wattman en su interior.
- 2.- Cada una de las cajas se humedece con una de las siguientes soluciones.
  - Caja #1: SDS 10%.
  - Caja #2: NaOH 0.5M NaCl 1.5M.
  - Caja #3: Tris 0.5M pH 7.4 NaCl 1.5M.
  - Caja #4: Tris 0.5M pH 7.4 NaCl 1.5M.
  - Caja #5: SSC 2X.
- 3.- Las cajas de petri con las células transformantes resultantes de la electroporación se abren bajo la campana y se les coloca la membrana de nylon numeradas con lápiz. Se dejan transferir por un minuto se orientan perforando la membrana con una aguja impregnada con tinta china y haciendo un corte en forma de triángulo, el cual también se marca en la caja.
- 4.- Una vez transferidas las células a la membrana de nylon, ésta se levanta con mucho cuidado y se coloca de manera consecutiva en cada una de las 5 soluciones anteriores por 5 minutos en cada una, cuidando que las células queden hacia arriba.
- 5.- Al finalizar las membranas se dejan secar por 1 hora a temperatura ambiente.
- 7.- Ya secas, las membranas se fijan en la cámara de luz UV a 12,000  $\mu$ J.
- 8.- Después de fijarlas se procede a lavar las membranas con una solución de SSC 5X; SDS 0.5% y EDTA 1 mM, frotandolas suavemente para quitar los desechos celulares.
- 9.- Una vez fijadas y lavadas, se prehibridan e hibridan con la sonda adecuada para realizar el escrutinio de las clonas positivas.

\* Para la preparación y composición de las soluciones utilizadas en la metodología ver el apéndice.

## VI. RESULTADOS.

### VI.1. ANÁLISIS DE LA CLONA GENÓMICA 8A DE *Trichomonas vaginalis*.

En *T. vaginalis* existe evidencia que las regiones codificadoras tienen un nivel más alto de contenido de G+C que las regiones no codificadoras (Espinosa y López-Villaseñor, 2001). En el laboratorio de la Dra. Imelda López se han aislado y secuenciado varias clonas genómicas que contienen genes de actina. Estas clonas fueron obtenidas de una biblioteca genómica construida a partir de ADN genómico de *T. vaginalis* digerido con *Eco* RI. El análisis del contenido de G+C de una de estas clonas (Clona 8A) muestra que la región que codifica para el gen de actina tiene un mayor contenido de G+C que las secuencias no codificadoras que lo flanquean (Figura 4). En la segunda mitad de la secuencia de esta clona (región 3') se observa un aumento en el contenido de G+C lo que sugiere la presencia de una región codificadora.

Este proyecto inició con la búsqueda de un marco de lectura abierto en la región 3' de la clona 8A. Es importante mencionar que esta región de la clona 8A había sido secuenciada en una sola dirección (una sola cadena) y existían varias posiciones poco claras en la secuencia. El análisis inicial de la secuencia preliminar no mostró un marco de lectura abierto (datos no mostrados). Se decidió por lo tanto secuenciar las dos cadenas de esta región, para lo cual se diseñaron los oligonucleótidos apropiados (Tabla IV). La región secuenciada con cada uno de estos oligonucleótidos se esquematiza en la figura 5. De esta manera se obtuvo la secuencia completa de la clona 8A que consta de 5608 pb, leída en ambas cadenas (Figura 6). Los sitios de restricción se mapearon con el programa DNAMAN (Lynnon Biosoft) y algunos de ellos se verificaron experimentalmente (datos no mostrados).

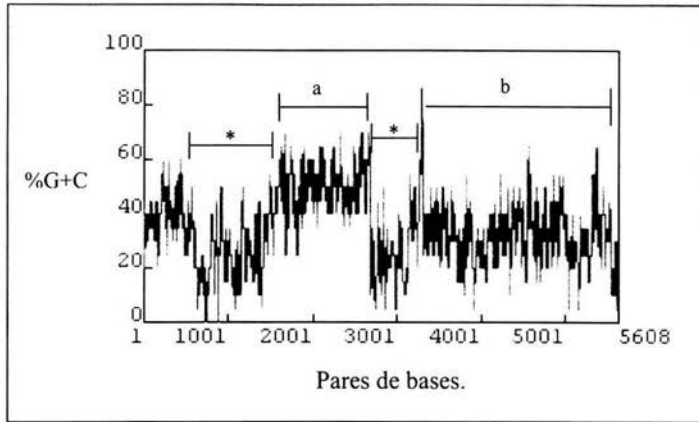


Figura 4.- Gráfica de contenido de G+C de la clona 8A realizada con el programa DNAsis (Hitachi Software) con una ventana de 20 nucleótidos; a: gen de actina, \*: regiones intergénicas, b: región con alto contenido de G+C que sugiere la presencia de una región codificadora.

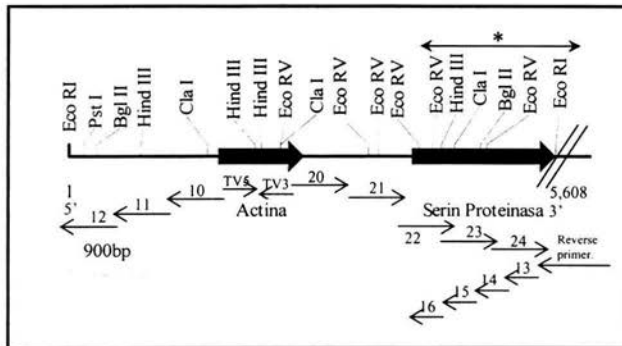


Figura 5.- Mapa de restricción de la clona genómica 8A. Las flechas inferiores indican la región secuenciada con los distintos oligonucleótidos. La región marcada con un asterisco(\*) indica la secuencia amplificada por PCR y utilizada como sonda para realizar los análisis de Southern blot y northern blot. Las dos líneas diagonales indican que el gen está incompleto.

La región 3' de la clona 8A se analizó mediante el programa BLAST X ([www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/)) para buscar una similitud con secuencias reportadas. Este análisis mostró homología con varias serín proteasas reportadas de otros microorganismos (Tabla V).

Tabla V

Microorganismo.	Homología.	E*.
<i>Dictyostelium discoideum</i> .	Serín proteasa.	5e-25.
<i>Bacillus sp.</i>	Proteasa NV1.	1e-9.
<i>Bacillus anthracis</i> .	Peptidasa S8	3e-9
<i>Bacillus cereus</i> .	Proteasa extracelular menor VPR (precursor).	3e-9
<i>Bacillus sp.</i>	Proteasa SD521.	6e-9
<i>Bacillus sp.</i>	Proteasa D6.	1e-8
<i>Bacillus sp.</i>	Proteasa KSM-9865.	1e-8
<i>Bacillus sp.</i>	Proteasa KSM-KP43.	1e-8
<i>Oceanobacillus iheyensis</i>	Serín proteasa microbiana.	1e-8
<i>Geobacter metallireducens</i>	Subtilisina parecida a serín proteasa.	2e-8
<i>Aquifex pyrophilus</i>	Serín proteasa.	9e-8
<i>Geobacter sulfurreducens</i>	Subtilisina.	1e-6

Resultados de la búsqueda de similitud (BLAST X) de la secuencia del extremo 3' de la clona genómica 8A de *Trichomonas vaginalis*.

\*A un valor más pequeño de E corresponde una homología mayor.

Secuencia de la clona genómica 8A.

1      GAATTCGCTA CTTACGATGC ATTTAAGCAA TTCTTCAATT CTCAGTCTAA AAGAGACGAA  
 61      TCCAAAGAGA TTTCTTACTT TGGGACCAAA TACCATCACA TTTGACCGAA TCCAAAGAAG  
 121     GTTTGGATGT TTCTTTGACA TGGTTCAAAA CAATTTCCGC TGCAGAAGTT CATTTAGAGA  
 181     TGATTTTGAT TTTGGTATCA TCAGAACTGA GAAATCTCAC AGGAGGTGCT GAAATGAAAG  
 241     GCGCCTTTGC ACAACAAGCA CTTGCAAGAG CTGTTTCTAA AGCTACAACA TTAGAAACGT  
 301     TCGCGAGATG CAAGCACCAT AGATCTCTTG AAAAGTGTCT ATGACATAGC AAACATCATT  
 361     TCTGAAGGAA CTGTTGGTGT CGAGATGTTG AAGAATGCAA TGAAACTGTT CCCAGGAGCA  
 421     ACAGATTTCA TTGACGCATT GATGAGGAAG GCTTTGCTCA GGCAAATGGA GATGCAAGAC  
 481     AAAAATTGGC TGATGTTGTA AATGGAAAAG ATGGAATTA AATTGCAACA TCAATTTCTG  
 541     TGACTGTTTC TGGTAAAAAG AAGGATAAGA AAGTGAGAGT GTTCATGGGA ACTGAAAGAA  
 601     AGAAAACGTG TATTGGAGTA ACAAATGTTG AATCAAATCA TTCTTTTAA AATATAAAT  
 661     TGTTAGTTTT AAATTAACAT GTTTTAAAAC ATTCTGTTTC ATTCTAATTA CATCACTTAT  
 721     TTATAATAGA ATCTTTTTCG TAAAAATAA AAATTATATT AAAATGTATG ATTAATAACA  
 781     TAAAATCATC ATCAATAAAC TTTATTACAG TTCACATAAG AAGTTTACA AACCATATTT  
 841     GGAAATTCAA ATAATTTTAT GATGTGAAGA GTTTGAATTG TCCGCTAAAT AAAAATTAAG  
 901     TATTAGTTCA TGCTTGTTAG GGTGCGAAAT GGAAAGGTTG GACCAAMCAT ATATGTATAG  
 961     TATGATTTTA TGCATATGGT GTAAGGAAAT TTTATTTGTT CAAATGTGTA TCAAAATTTG  
 1021    GTTGATTCAA AGCGAATAA TTACTTGTA AGATGATAAT ATTTAGATTG AACTTCTTGA  
 1081    AATTTTTGTT AAATTATTTT TACCGAAATT TATTGTTAGT TTTAAAAGGA TTTTAATGTG  
 1141    AAATTAGAAAT TGTTATATAA AATGAAAATG TCCTGTGCAC ATTGTGAAAC GATCCTTCTC  
 1201    TCTGAATTC CAAAACCTTC AAAATTTGAT AAGAGGACAA TAAATTTTCC GTACGTTCTT  
 1261    AAAAAGTTCA AGCTGTAATT TTTGCTTTAT ATGCTCTATA TTAGTTTACA AACCATATTT  
 1321    TTCTTGACAC TCCTTTCAAA ACTTTCCAAT TTTTTGAAAA CATAATTTTC CTCAGTTTAA  
 1381    ACCGGAGAAAT ATAATAATAT GAACAAAATT AAACAAAATT TTTTCAAATA GGACATCAT  
 1441    CACTCTGTAT TTAGTATGCA AACGCTTTTG AGATTTTCAT GTTTGAAAAA CCCACAAGTC  
 1501    CACTTCAGT TTGCCCTATT TCTGAGGGAA CTGAAATGTA CTTACATTT ACTTCTCATG  
 1561    GCTGAAGAAG ACGTTCAGAC ACTCGTTATC GATAACGGCT CTGGTATGTG CAAGGCTGAC  
 1621    TGCACTTACC TCTCCGTGAT GAAGCCCCAC GCTCTGTTTT TCCATCCGTT GTCGGCCGTC  
 1681    CAAAGTACAA ACAACAATTA GTTGGTGGCA ATGCCAAGTA TGTTTTCGTT GGTGATGAAG  
 1741    CCTGCTCCAA GGCTGGTGT CTCATCCTCA AGTACCCAAT TGAACACGGT ATCGTCAACA  
 1801    ACTGGGATAA ATGAGAAAAG ATTTGGCACC ACACATTTTA CACGAAATTT GTGGTTGACC  
 1861    CAACAGAGCA CCCAGTTCTT TTTACAGAAG CCCCCTCAA CCCCAGGCG TAACCGTGAG  
 1921    AAAATGATCC CCTCATGTT GACACGTTCA ACGTCCCCAT CCTTCTATGT CGGCATCCAG  
 1981    GCTGTCTTTC TCTCTACTCC TCTGGCCGTA CAACAGGTAT CGTTTTCGAT GCTGGTGATG  
 2041    GTGTTTCCCA CACAGTTCCA ATTTACGAAG GCTACTCCCT TCCACACGCC ATCATGAGAC  
 2101    TTAACCTCGC TGGCCGTGAT CTCACAGCCT GGATGGTCAA GCTTCTCACA GAGCGTGGCA  
 2161    ATGCTTTCAA CACAACAGCC GAAAAGGAAA TCGTTCGTGA CATCAAGGAG AAGCTTTGCT  
 2221    ATGTCGCCCT CGACTTCGAT GCTGAAATGG AGAAGGCCGC TACAGACTCC TCCATCAACG  
 2281    TCAACTACAC ACTTCCAGAT GGCAACGTCA TCACAATCGG CAATGAGCGC TTCCGCTGCC  
 2341    CAGAAATGCT CTTCAAGCCA TACTTCGATG GTATGGAATA CGATGGTATC GACAAGACAC  
 2401    CTTTCGACTC CATCATGAAG TGCGATATCG ATGTTCTGTA GGATCTCTAC GCTAACATCG  
 2461    TTCTTTCTGG TGGCACAACA ATGGTTCAAG GGCATCGCCG AACGCTTTGA CAAGGAAATC  
 2521    ACAGCTCTTG CTCCACCAAC AATGAAGGTC AAGATCGTCG CCCAGAAGA GCGTAAGTAC  
 2581    GCCGTTTGGG TCGGTGGCTC CATCCTTGCT TCCCTCGCTA CATTCCCACA GATGGTTATC  
 2641    ACCAAGGAGG AATACGACGA GGCTGGCCCA TCCATCGTTC ACGCAAGTG CTTCTAAACT  
 2701    ATATTTTATT AGCTTCCCAG TTAACAAATT TAATCAGTTT TTTAAAATAT TTTTCAATAT  
 2761    TTTGAAATTA ATCATTCTCT CAACTGGCCA ATTACTATTT ACTAATCATT ATTTTATCCA  
 2821    ACTCATTATG ATTTTAACTA ATATGGCTGC CGTTGTCTAA ATTAAAATTC ATTAATTTTT  
 2881    ATTAATCTCC TTTAATGTGA TTTTCCATAT TTTTCCATAT GAATTTGATT AAACCAATG TTACATAAGT  
 2941    CATTCCAAAA TAGTCAATAA CCATCTTTTA TGTTCTTATT GAATTATTTT TTCATATTTA  
 3001    TAAAGAATTG TGTTTTTTAC AAGATTGCCC TTCATATAAC TAGCTAGTTT TTAGTTTCAT  
 3061    CTGGTGATAT GTTGTAATAA AGAAGTTTAA ATTTGAAAAA TAGATAAAAG ATTTTATGAT  
 3121    AACAAAAAAC AATCTATAAC ATGAGAATTT CTCTCTGAAG GTCTTCCAAT GCTGTGACGT

3181 ATTTCTCCTT TGGTAAGAAA AGTGGTTTTG TTCCGCACAT TGGACATCTA TCAACGCCAT  
3241 TTAAGCATT TCTATGTAAG TAATGACCAC ACGTTGTTAC GCACGAGCCA AGGTCAACAG  
3301 GACGGCCGCA TCTGGCGCAT CTTGGTTTTA ATTCAACTTC GGCTTTTGTGTA ATATCTTTTGA  
3361 CAGTCAGTTT AAACAGAGAT TCACTAACCT GTAAACCATT TTCGTACATC AGCTTTTGGC  
3421 AGTAAACAAT AACTCTGTAG ATATCTCTTG GCAAAAGATA TATATCGACG ACTGAAAGGA  
3481 TGATACCCAT ACTAACTTTG CCAAAATAGC AGGCATTTAA GTTCAGAAAA TGGATAATAA  
3541 TCAGGGCAAA CGCTTTGATA TCGAATGGAG TGTTCCGGAGT ATAAACAAAA TGCGTGAAAA  
3601 GAATAGCTGG TATGATAATT ACGTATCTTT TGATTTCAAA GTAAAAGGTT GACGAATCTA  
3661 AACGGTGTGG ACGATAATTA ACTTGCGATT GAGACAAAAT CATGAGGAGT AATGATTTGA  
3721 TAAGTATTAA AGGTGGTTTT TTTGTTGATA TACTATGAAT TATTGTAACA ATAATACCTG  
3781 CATTATTATA TTTTGCTTTT GTGCGAGTAA AGTAATATAT TAATAAGCCG AATGGGATCA  
3841 TGGCAATCCT TCTGTTTTGT TCATCTTCCA AAAACGTAAG GAGCATCCCT AAAAGATCAA  
3901 AGATGGCCAT TTTTAAATTT TTTTTCTAA ATTGTTTTGA CAAAAATGTT TTTTCTCTGT  
3961 TTTCTCTTCA TTGAAGCAAT TTCACTTGAA ATTTCTAAGG AAGATATACG TAAATCAAGA  
4021 TATGAAAGTA GATATCCTGA TTCAAATCAA TATTCAATG GTTATTACAA AGATTTACT  
4081 TCGAAAACGA ATATGCATGA TAGAACATCA AGTGAATCC GACAAATCAC AGACATTTCT  
4141 AACTATATAA TCCACACAAC ACAAGAGTTT CAATTTCCAA AAGATATCAC ATTTTCAAAA  
4201 CTGCATGGAA CATATTATTT CATTACGAC GCTTCAAAAG CCCAAATCAA TTCAATTCAA  
4261 AGCAACTCCA ATGTGATTTT AGTTGAAAAA GCTTCACAAA TCCGTTTTTGA TACAAGATT  
4321 GAAGCCGGT TATGAGAAA TGGGAATTTA GATTAACAT ATAAAAATGG CTACTTATGG  
4381 TCATTACGTT CGACAAACCT TACAGGAAAA GGTGAAATTA TTGCTTTGGC AGATTCAGGA  
4441 ATCGATTATA GGCATCCAAT GCTCAATGAC TCATCACGAC CATTAATTA TAACACTCTT  
4501 GACCTCAAT AACGAAAAAT CGTTTATTAT GATTCATGGA AAGATTTTTA TGACTATATC  
4561 CCAGGCCAGC ATATCATATG CAACCTCGCA TATAATAACC CAGACATTTT ATTTGTTTTT  
4621 TTACCTCTTT ACGATGGTAT TGCACCTGAA TCAAAATTTT ATTTCTTAGA TATGGCCAAA  
4681 GGTGACAATA AAATGCTTTT TGACGACTTT GATAAAGATA AATTTGTTCA GTCGTTGAAA  
4741 GATCTCAATA TTGGCATCAG TTCGAACAGT TGGGGTTCAA ATGAAATAGA TTACACATCT  
4801 ACAATGACAG ATATCTATGA CAACCTCGCA TATAATAACC CAGACATTTT ATTTGTTTTT  
4861 GCAGCCGAA ACAGCGAAAA ATCATGGACA ATTGACAGTC CTCTTTCAGG AAAAAACATT  
4921 TTTTGTGTTG GAGCAACTGA TGGAACTCCA GGTCAAATGA TGGGAGAAGC ATCAACACCA  
4981 CAGATCGAAA TATCAGGTAC AAAGATTGAT TTGTTGCAAT CTCTTTCAGG AACAAATTTA  
5041 TTTAATCAAT TAAATAAGGA AGAACCATTA TTTAATGTTG CAAAGCTGT TTAGTTTACA  
5101 TCTAATGATA ATACATGTGA TTCTATCAAA CAAATCCTTG AAAATGAACA AACAAAAATA  
5161 TTAATTTTGA AATCATTACC AGATTGCAAC AAAATGAGTA AAACAGTACT TGCAACATTA  
5221 TCTGATGATG ATTTCCAGTT AATTTCTCAA TCTTCATCTG CAAATTTTAC AATGAAATTA  
5281 AGTGATTTTT CATATGAAAA AGCAAATTTT GCAAGTGCTG GTCCAGCATA TTCAGGAATC  
5341 TTGAAACCAG ACATATCAGC ACCAGGCGTC ATCACAGGTG CTCTTTCATA TGGAAATTC  
5401 GAAACAGCAG AAAGAAAATG TGATTTTCCA AGTCTTTCAC AGTTTACAGG AACATCAGAG  
5461 TCAACACCAA TTATTTTCAGG ATTTTCAAGT CTTTTACGTG AACATTTTCG ATCAAAAGGA  
5521 GTTACTCCTT CATCTCTTT ACTTAAATCA TTAATTATTT CATCAACAAA ATCAAAATAA  
5581 AGAGATTTAA ATACAGGTTT TGGAAATTC

Figura 6.- Secuencia nucleotídica de la clona genómica 8A. En cursivas se indica el gen de actina; en negritas la secuencia que contiene un marco de lectura abierto con homología para serin proteasas con los dos posibles ATG iniciadores subrayados; los dos posibles promotores (YYAWWYY, donde Y= T/C y W= T/A Johnson y col, 1994) encerrados en rectángulos; los sitios *Eco* RI que delimitan la clona se indican en cursivas y subrayados.



La secuencia nucleotídica leída en los dos sentidos se tradujo con ayuda del programa DNAMAN (Lynnon Biosoft). De esta manera se identificó un marco de lectura abierto (ORF) truncado en el extremo 3', ya que no se encontró un codón de término de la traducción (Figura 7). En la secuencia deducida de aminoácidos se identificaron las secuencias DSG, HGTH y GTS las cuales son secuencias conservadas en las serín proteasas pertenecientes a la familia de las subtilisinas en donde se encuentran localizados los residuos de aminoácidos Asp 32, His 64 y Ser 221 que conforman la triada catalítica (numeración de acuerdo a la secuencia de la subtilisina BPN'). También se identificaron dos posibles secuencias promotoras de acuerdo con las propuestas por Johnson y col (YYAWWYY, donde Y= T/C y W= T/A) y dos codones de inicio de la traducción (ATG) en fase.

```

3901 AGATGGCCATTTTTTAATTTTTTTTTCTAAATTTGTTTGACAAAAATGTTTTTCATCTGT
1301 R W P F F N F F F * I C L T K M F F I C
3961 TTTCTCTTCATTGAAGCAATTTCACTTGAAATTTCTAAGGAAGATATACGTAATCAAGA
1321 F L F I E A I S L E I S K E D I R K S R
4021 TATGAAAGTAGATATCTGATTCAATCAATATTTCAATGGTTATTACAAAGATTTTACT
1341 Y E S R Y P D S N Q Y F N G Y Y K D F T
4081 TCGAAAACGAATATGCATGATAGAACATCAAGTAAATCCGACAAATCACAGACATTTCT
1361 S K T N M H D R T S S E I R Q I T D I S
4141 AACTATATAATCCACACAACACAAGAGTTTCAATTTCCAAAAGATATCACATTTTCAAAA
1381 N Y I I H T T Q E F Q F P K D I T F S K
4201 CTGCATGGAACATATTATTTTCATTCACGACGCTTCAAAGCCCAAATCAATCAATCAA
1401 L H G T Y Y F I H D A S K A Q I N S I Q
4261 AGCAACTCCAATGTGATTTCAAGTTGAAAAAGCTTACAAATCCGTTTTGATACAAGATTT
1421 S N S N V I S V E K A S Q I R F D T R F
4321 GAAGCCGGATTCATGGAAAATGGGAATTTAGATTTAACATATAAAAATGGCTACTTATGG
1441 E A G F M E N G N L D L T Y K N G Y L W
4381 TCATTACGTTGACAAACCTTACAGGAAAAGGTGAAATATTGCTTTGGCAGATTCAGGA
1461 S L R S T N L T G K G E I I A L A D S G
4441 ATCGATTATAGGCATCCAATGCTCAATGACTCATCACGACCATTAATTAATAACACTCTT
1481 I D Y R H P M L N D S S R P L I N N T L
4501 GACCTCAATCAACGAAAAATCGTTTATTATGATTCATGGAAAGATTTTATGACTATATC
1501 D L N Q R K I V Y Y D S W K D F Y D Y I
4561 CCAGGCCACGGCACACATACAGCAGGTATTATAGCAGGGAATCAGAATGCGGTAATATT

```

1521 P G **H G T H** T A G I I A G K S E C G N I  
4621 TTACCTCTTTACGATGGTATTGCACCTGAATCAAAATTATATTTCTAGATATGGCCAAA  
1541 L P L Y D G I A P E S K L Y F L D M A K  
4681 GGTGACAATAAAATGCTTTTTGACGACTTTGATAAAGATAAAATTTGTTCAAGTCGTTGAAA  
1561 G D N K M L F D D F D K D K F V Q S L K  
4741 GATCTCAATATTGGCAGTCAGTTGCAACAGTTGGGGTTCAAATGAAATAGATTACACATCT  
1581 D L N I G I S S N S W G S N E I D Y T S  
4801 ACAATGACAGATATCTATGACAACCTCGCATATAATAACCCAGACATTTTATTTGTTTTT  
1601 T M T D I Y D N L A Y N N P D I L F V F  
4861 GCAGCCGGAACAGCGAAAAATCATGGACAATTGACAGTCCTTCTTCAGGAAAAAACATT  
1621 A A G N S E K S W T I D S P S S G K N I  
4921 TTTTGTGTGGAGCAACTGATGGAAGTCCAGGTCAAATGATGGGAGAAGCATCAACACCA  
1641 F C V G A T D G T P G Q M M G E A S T P  
4981 CAGATCGAAATATCAGGTACAAGATTGATTGTTGCAATCTTCTTGGTCAACAAATTTA  
1661 Q I E I S G T K I D L L Q S S W S T N L  
5041 TTTAATCAATTAATAAGGAAGAACCATTATTTAATGTTGCAAGCCTGTTTATGTTACA  
1681 F N Q L N K E E P L F N V A K P V Y V T  
5101 TCTAATGATAATACATGTGATTCTATCAAACAAATCCTTGAAAAATGAACAAACAAAAATA  
1701 S N D N T C D S I K Q I L E N E Q T K I  
5161 TTAATTTTGAATCATTACCAGATTGCAACAAAATGAGTAAACAGTACTTGAACATTA  
1721 L I L K S L P D C N K M S K T V L A T L  
5221 TCTGATGATGATTTCCAGTTAATTTCTCAATCTTCATCTGCAAAATTCACAATGAAATTA  
1741 S D D D F Q L I S Q S S S A N F T M K L  
5281 AGTGATTTTTCATATGAAAAAGCAAATTTTGCAAGTGCTGGTCCAGCATATTCAGGAATC  
1761 S D F S Y E K A N F A S A G P A Y S G I  
5341 TTGAAACCAGACATATCAGCACCAGGCGTCATCACAGGTGCTCTTTCATATGAAATTC  
1781 L K P D I S A P G V I T G A L S Y G N S  
5401 GAAACAGCAGAAAGAAAATGTGATTTTCAAGTCTTTCACAGTTCAC**AGGAACATCAGAG**  
1801 E T A E R K C D F S S L S Q F T **G T S E**  
5461 TCAACCAATTATTTCAAGTCTTTTACGTGAACATTTTCGATCAAAAAGGA  
1821 S T P I I S G F S S L L R E H F R S K G  
5521 GTTACTCTTCATCTTCTTTACTTAAATCATAATTATTTTCATCAACAAAATCAAATAAA  
1841 V T P S S S L L K S L I I S S T K S N K  
5581 AGAGATTTAAATACAGGTTTTGGAATTC  
1861 R D L N T G F G I

Figura 7-. Secuencia traducida del extremo 3' de la clona 8A de *Trichomonas vaginalis*. En rectángulos se indican los dos posibles ATG iniciadores, subrayados los dos posibles promotores, y en

negritas se muestran las secuencias consenso DSG, HGTH y GTS en donde se encuentra los aminoácidos que conforman la triada catalítica (Asp, His y Ser) y que dan homología con serín proteasas.

## VI.2. DETERMINACIÓN DEL NÚMERO DE GENES QUE CODIFICAN PARA SERÍN PROTEASAS EN *Trichomonas vaginalis*.

Para determinar si el gen de la serín proteasa identificado en la clona genómica 8A de *T. vaginalis* es único o pertenece a una familia multigénica, se realizó un análisis tipo Southern blot. Se utilizó ADN genómico de *T. vaginalis* digerido con varias enzimas de restricción y se usó como sonda una región de 1657 pb del extremo 3' de la clona genómica 8A, que contiene el ORF de la serín proteasa. La sonda es un producto de PCR amplificado con los oligonucleótidos 8Agactin 22 (sentido) y Reverse primer (Antisentido) (ver figura 5 y Tabla IV). El resultado del Southern blot se muestra en la figura 8.

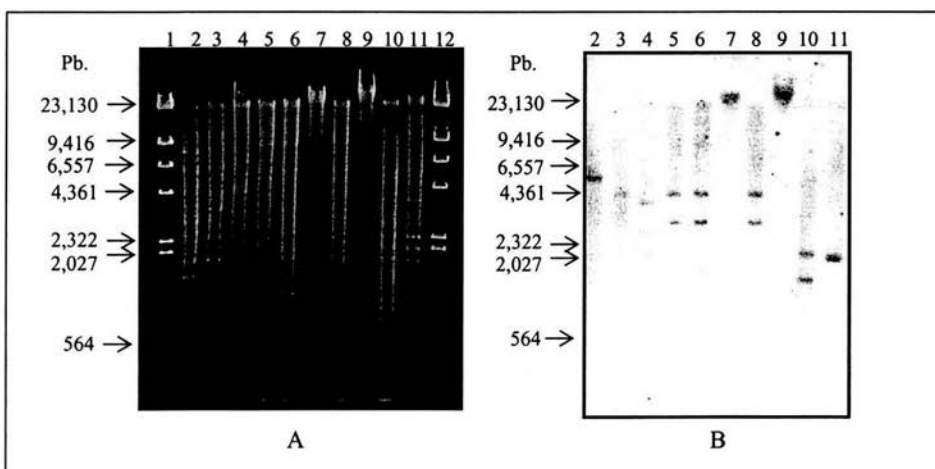


Figura 8.- Panel A: Gel de agarosa al 0.8 % en TAE 1X teñido con bromuro de etidio, utilizado para llevar a cabo el análisis de Southern blot. 1: Marcadores de peso molecular de ADN de  $\lambda$  Hind III, 2: ADN genómico de *T. vaginalis*/ Eco RI, 3: ADN genómico de *T. vaginalis*/ Eco RV, 4: ADN genómico de *T. vaginalis*/ Cla I, 5: ADN genómico de *T. vaginalis*/ Bgl II, 6: ADN genómico de *T. vaginalis*/ Bgl II/ Pst I, 7: ADN genómico de *T. vaginalis*/ Pst I, 8: ADN genómico de *T. vaginalis*/ Bgl II/ Bam HI, 9: ADN genómico de *T. vaginalis*/ Bam HI, 10: ADN genómico de *T. vaginalis* / Bgl II/ Hind III, 11: ADN genómico de *T. vaginalis*/ Hind III, 12: marcadores de peso molecular de ADN de  $\lambda$  Hind III. Panel B: El ADN en el gel del

panel A se transfirió a una membrana de nylon y se hibridó con la sonda de la serín proteasa. Se muestra la autorradiografía de la membrana.

El análisis por Southern blot indica que el gen de la serín proteasa en *T. vaginalis* es un gen único. En el carril 2 (digestión con *Eco* RI) se observa una sola banda de 5608 pb que corresponde al tamaño del inserto de la clona 8A. En el carril 3 (digestión con *Eco* RV) se observan dos bandas de 4600 pb y 600 pb. En el carril 4 (digestión con *Cla* I) se observan dos bandas de 4000 pb y 2000 pb. En los carriles 5, 6 y 8 (digestiones con *Bgl* II, *Bgl* II/*Pst* I y *Bgl* II *Bam* HI respectivamente) se observan 2 bandas de 4000 pb y 3200 pb producto de la digestión con *Bgl* II. En los carriles 7 y 9 se observan señales a la altura del ADN no digerido debido a que las enzimas *Pst* I y *Bam* HI cortan con poca frecuencia el ADN genómico. En el carril 10 (digestión con *Bgl* II/*Hind* III) se observan tres bandas de 1700 pb, 450 pb y 2100 pb. En carril 11 (digestión con *Hind* III) se observan dos bandas de tamaño similar de 2200 pb y 2100 pb (Figura. 8 panel B). La hibridación de la sonda con estas bandas no indican que haya más de un gen, sino que el gen de la serín proteasa tiene sitios internos para estas enzimas (Figura 9) y la sonda hibrida con los fragmentos resultantes de la digestión con cada una de estas enzimas.

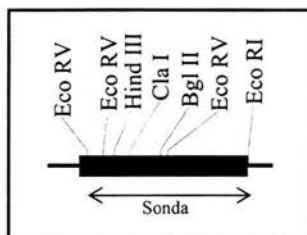


Figura 9.- Mapa de restricción de la secuencia nucleotídica parcial del gen de la serín proteasa de *T. vaginalis* utilizada como sonda para el Southern blot. Los sitios de restricción mapeados explican la aparición de más de una banda en las digestiones del ADN genómico con las enzimas *Eco* RV, *Hind* III, *Cla* I, y *Bgl* II en el análisis por Southern blot.

### VI.3. DETERMINACIÓN DE LA EXPRESIÓN DEL GEN DE LA SERÍN PROTEASA.

Para conocer la expresión de este gen, se extrajo ARN total de *T. vaginalis*, y se realizó un análisis de northern blot, utilizando como sonda el mismo fragmento utilizado en el Southern blot. El resultado se muestra en la figura 10.

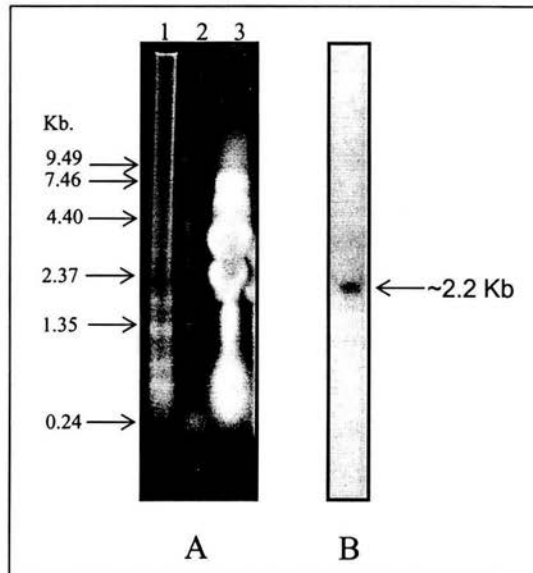


Figura 10.- Análisis por northern blot de la expresión del gen de la serín proteasa de *T. vaginalis*. Panel A: Gel de agarosa/formaldehído al 1% teñido con bromuro de etidio. Carril 1: Marcadores de peso molecular bajo; Carril 2: Marcadores de peso molecular alto; Carril 3: ARN total de *T. vaginalis* (9 µg). Panel B: El ARN se transfirió a nitrocelulosa y se hibridó con la sonda de la serín proteasa descrita en la figura 9. La flecha indica al transcrito del gen de la serín proteasa con un tamaño aproximado de 2.2 Kb.

Se observa una banda de hibridación que corresponde a un transcrito de aproximadamente 2.2 Kb. Este dato quiere decir que el gen de la serín proteasa de *T. vaginalis* si se expresa y que su ARNm tiene un tamaño de aproximadamente 2.2 Kb. Como en *T. vaginalis* no se ha reportado la presencia de intrones se puede deducir que la secuencia del gen completo tiene un tamaño similar al transcrito. Como ya se tienen

secuenciadas 1662 pb a partir de la primera metionina, para tener la secuencia del gen completo harían falta aproximadamente 550 pb.

#### **VI.4. ESTRATEGIAS UTILIZADAS PARA OBTENER LA SECUENCIA COMPLETA DEL GEN DE LA SERÍN PROTEASA DE *Trichomonas vaginalis*.**

Con el propósito de obtener la secuencia completa del gen de la serín proteasa de *T. vaginalis* se probaron las siguientes estrategias:

- Buscar la secuencia de cDNA de la serín proteasa en una biblioteca de cDNA de *T. vaginalis* elaborada con anterioridad en nuestro laboratorio.
- Realizar una amplificación rápida de extremos 3' de cDNA de *T. vaginalis* (3' RACE) específicos para la serín proteasa.
- Llevar a cabo la construcción de una biblioteca genómica parcial de *T. vaginalis* con las enzimas de restricción *Hind* III/*Bgl* II.

##### **VI.4.1. Resultados del escrutinio de la biblioteca de cDNA de *Trichomonas vaginalis*.**

Dado que el análisis por northern blot mostró que el gen de la serín proteasa si se expresaba, se procedió a realizar el escrutinio de una biblioteca de cDNA de *T. vaginalis* para buscar el DNA complementario al ARNm de la serín proteasa. Esta secuencia debería contener la región faltante del gen. La biblioteca de cDNA constaba de dos fracciones, una conteniendo fragmentos cortos y otra conteniendo fragmentos grandes de cDNA; se mezclaron alícuotas de ambas fracciones y esto se utilizó para realizar el escrutinio. El título de las dos bibliotecas fue de  $5.5 \times 10^7$  unidades formadoras de placas por mililitro (pfu/ml). La búsqueda en esta biblioteca se hizo por duplicado, la primera ocasión con 500,000 pfu's y la segunda con 1,000,000 de pfu's, ambos se realizaron a una densidad de 50,000 pfu's/caja en 10 y 20 cajas respectivamente. Se obtuvieron los siguientes resultados.

VI.4.1.1. Escrutinio con 500,000 pfu's de la biblioteca de cDNA de *T. vaginalis*.

La sonda que se utilizó para el escrutinio de la biblioteca fue la misma utilizada para realizar el Southern blot y el northern blot. En la primera ronda se obtuvo una placa positiva con señal débil, la cual se seleccionó para eluir los fagos y realizar la segunda ronda del escrutinio.

En la segunda ronda (a baja densidad) se seleccionaron 13 placas positivas con señales débiles (datos no mostrados). De cada una de estas placas se crecieron colonias en LB+Kanamicina. De estas clonas se realizó la extracción de ADN plasmídico.

Los plásmidos extraídos se digirieron con las enzimas *Xho* I y *Eco* RI para liberar el inserto y realizar un análisis de Southern blot utilizando como sonda el fragmento de la clona 8A que tiene homología con serín proteasas (Figura 11).

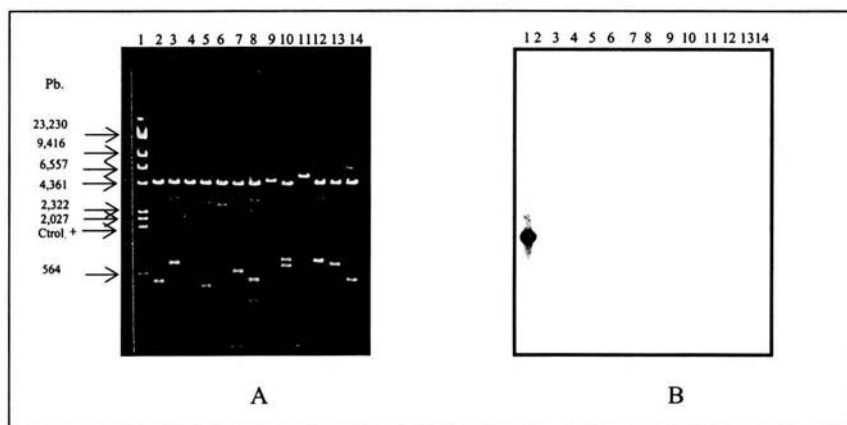


Figura 11.- Panel A: Carril 1: ADN de  $\lambda$ Hind III + producto de PCR de la serín proteasa usado como sonda (control positivo de hibridación); Carriles 2-14: plásmidos extraídos de las 13 clonas de cDNA digeridos con *Xho* I y *Eco* RI para liberar el inserto (Gel de agarosa al 0.8 % en TAE 1X teñido con bromuro de etidio). Panel B: El ADN plasmídico de las 13 clonas del gel mostrado en el panel A se transfirió a una membrana de nylon y se hibridó con la sonda de la serín proteasa. Se muestra la autorradiografía de la membrana.

En el gel teñido con bromuro de etidio se observa que las trece clonas aisladas de la biblioteca de cDNA tienen insertos de tamaños diferentes. En el análisis por Southern blot se observa una señal de hibridación intensa con la banda correspondiente al control positivo (carril 1). En los trece carriles siguientes se observan bandas de hibridación débiles a la altura del vector, sin embargo no se observa ninguna señal positiva proveniente de algún inserto. Esto indica que ninguna de las clonas contiene un inserto relacionado con la serín proteasa, y en cambio si muestra una ligera interferencia de la sonda con el vector. Hay que hacer notar que el producto amplificado de PCR utilizado como sonda tiene 125 pb provenientes del vector, lo que seguramente produjo la señal de fondo en el Southern blot.

#### VI.4.1.2. Escrutinio con 1,000,000 de pfu's de la biblioteca de cDNA de *T. vaginalis*.

Para tratar de eliminar la interferencia de la sonda con el vector, en este segundo escrutinio se utilizó como sonda el producto de PCR descrito anteriormente (Figura 5) pero esta vez clonado en el vector TOPO (INVITROGEN). Una vez que el producto de PCR fue clonado en el vector TOPO, el plásmido se digirió con la enzima de restricción *Eco* RI, eliminando así el fragmento del vector y obteniendo así un fragmento de 1532 pb para ser usado como sonda.

En la primera ronda se seleccionaron 15 placas positivas con señales poco intensas, las cuales se utilizaron para eluir los fagos y realizar la segunda ronda del escrutinio.

En la segunda ronda (a baja densidad) solo se observaron señales positivas débiles en 8 de las 15 placas seleccionadas en la ronda inicial.

De estas 8 clonas se produjo ADN plasmídico, el inserto se liberó con *Xho* I y *Eco* RI y se realizó un Southern blot (Figura 12).



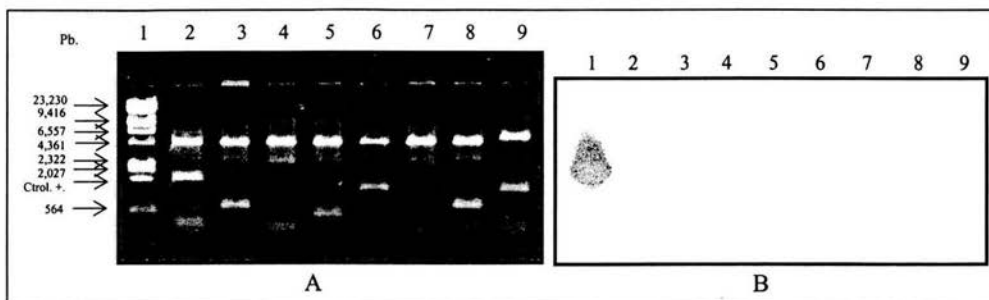


Figura 12.- Panel A: Carril 1: ADN de  $\lambda$ Hind III + producto de PCR de la serín proteasa usado como control positivo de hibridación. Carriles 2-9: plásmidos de las 8 clonas seleccionadas de la biblioteca de cDNA de *T. vaginalis* digeridos con *Xho* I y *Eco* RI para liberar el inserto (Gel de Agarosa al 1% en TAE 1X teñido con bromuro de etidio). Panel B: Southern blot del gel mostrado en el panel A, la membrana se hibridó con el producto de PCR de la serín proteasa clonada en el vector TOPO digerido con *Eco* RI.

En el gel teñido con bromuro de etidio se observa una banda de aproximadamente 2900 pb correspondiente al vector (pBluescript) e insertos de diferentes tamaños. En el análisis por Southern blot realizado con la sonda de la serín proteasa clonada en el vector TOPO no se observan señales positivas provenientes de los insertos: al igual que en el escrutinio con 500,000 pfu's solo se observa señal en el control positivo y señales más débiles a la altura del vector.

#### VI.4.2. Clonación del cDNA de la serín proteasa de *Trichomonas vaginalis* mediante la amplificación rápida de extremos 3' de cDNA (3' RACE).

La segunda estrategia que utilizamos para clonar el extremo 3' de la serín proteasa de *T. vaginalis* fue el ensayo de 3' RACE. Como se mencionó en la metodología, para llevar a cabo este experimento se utilizaron dos poblaciones de cDNA's elaborados con anterioridad en nuestro laboratorio por la QFB Guadalupe Barrera y la Dra. Norma Espinosa. Los oligonucleótidos utilizados fueron el 8Agact23 y el 8Agact24 (Tabla IV). Las reacciones de amplificación fueron las siguientes:

- 1.- Muestra de cDNA 1 + el oligonucleótido 8Agact23.
- 2.- Muestra de cDNA 1 + el oligonucleótido 8Agact24.

3.- Muestra de cDNA 2 + el oligonucleótido 8Agact23.

4.- Muestra de cDNA 2 + el oligonucleótido 8Agact24.

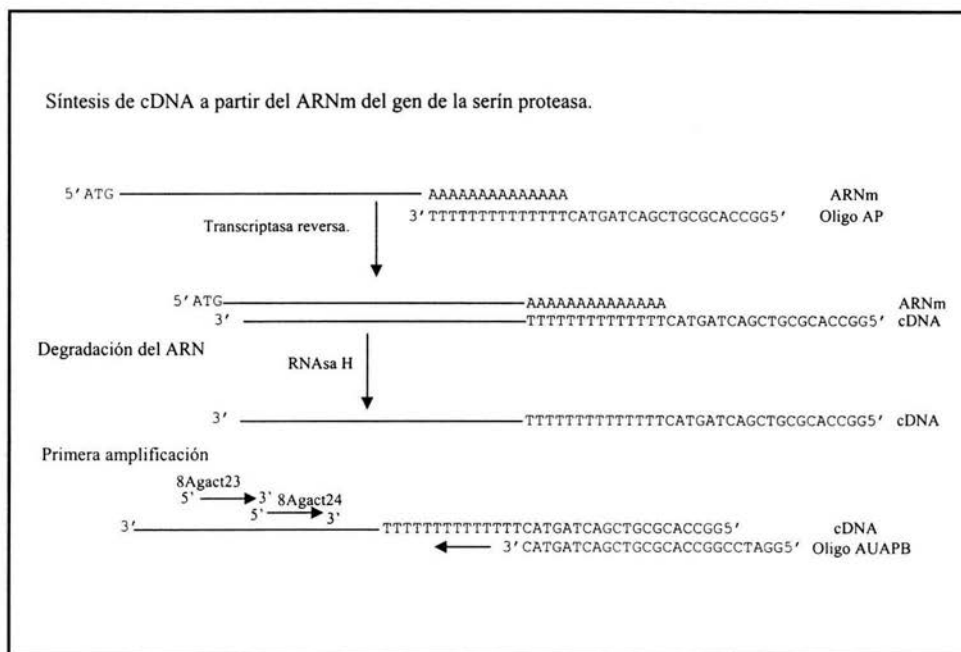


Figura 13.- Representación esquemática de los sitios de unión en el cDNA de los oligonucleótidos 8Agact23 y 8Agact24 utilizados para realizar el ensayo por 3' RACE (en reacciones independientes).

En la reacción control se incluyeron todos los reactivos que se utilizaron en la reacción de amplificación excepto el cDNA. El resultado de las amplificaciones se muestra en la figura 14.



Figura 14.- Gel de agarosa teñido con bromuro de etidio en el que se corrieron muestras de las cuatro reacciones de la primera amplificación por 3'RACE. Carril 1: ADN de  $\lambda$ Hind III; Carril 2: 2 $\mu$ l del control de amplificación; Carril 3: 2 $\mu$ l de la reacción de amplificación realizada con la muestra de cDNA 2 y el oligo 8Agact23; Carril 4: 2 $\mu$ l de la reacción de amplificación realizada con la muestra de cDNA 1 y el oligonucleótido 8Agact23; Carril 5: 2 $\mu$ l de la reacción de amplificación realizada con la muestra de cDNA 2 y el oligo 8Agact24; Carril 6: 2 $\mu$ l de la reacción de amplificación realizada con la muestra de cDNA 1 y el oligo 8Agact24.

Como se observa en el carril 5 de la figura 13, la única reacción con la que se obtuvo amplificación fue con la muestra de cDNA 2 amplificado con el oligonucleótido específico 8Agact24. Para verificar que se tratara de la secuencia de cDNA de interés y no de una amplificación inespecífica se realizó un análisis por Southern blot de este amplificado, los resultados se muestran en la figura 15. En el Southern blot se observa una señal intensa en el carril 3 a la altura del control positivo de hibridación (clona 8A), sin embargo no se observa ninguna señal a la altura del producto de amplificación del 3' RACE lo que indica que se obtuvo una amplificación inespecífica, no relacionada con la secuencia de la serín proteasa.

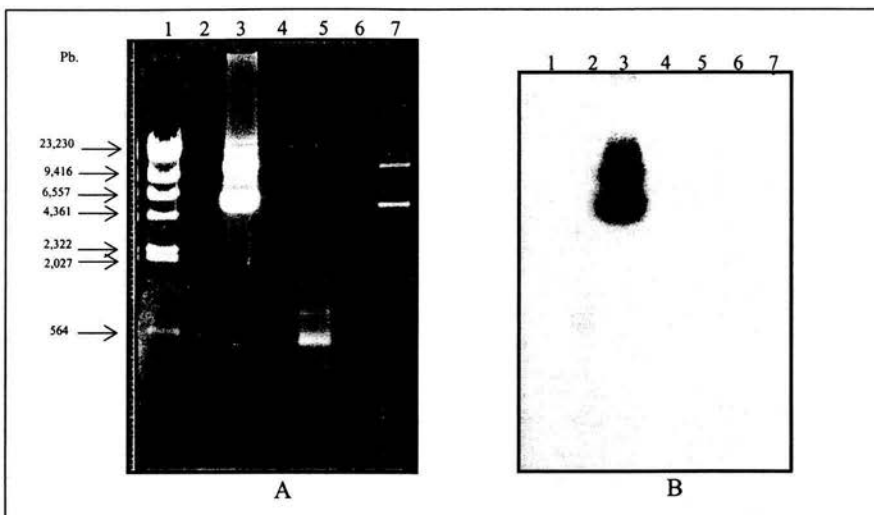


Figura 15.- Panel A: Gel de agarosa al 0.8% en TAE 1X teñido con bromuro de etidio. Carril 1: ADN de  $\lambda$ Hind III; Carril 3: 2  $\mu$ g de la clona genómica 8A como control positivo de hibridación; Carril 5: 4  $\mu$ l ( $\approx$ 0.5  $\mu$ g) de la reacción de 3'RACE con la muestra de cDNA 2 y el oligonucleótido 8Agact24; Carril 7: 0.25  $\mu$ g del plásmido gactin5 como control negativo de hibridación. Panel B: Southern blot del gel del panel A. La membrana se hibridó con la sonda de la serín proteasa usada en la sección V.4.1.2.

#### VI.4.3. Resultados del escrutinio de la biblioteca genómica parcial (*Hind* III/*Bgl* II) de *Trichomonas vaginalis*.

Debido a que mediante el escrutinio de la biblioteca de cDNA de *T. vaginalis* y el ensayo de 3' RACE no se logró clonar el extremo 3' del gen de la serín proteasa de *T. vaginalis*, se procedió a construir una biblioteca genómica parcial (*Hind* III/*Bgl* II) de *T. vaginalis*. Estas enzimas se eligieron debido a que una doble digestión del ADN genómico con estas enzimas genera un fragmento de aproximadamente 1700 pb (Figura 16 y Figura 8 panel B, carril 10) que contendría las 550 pb del gen de la serín proteasa que supuestamente harían falta de acuerdo al tamaño calculado del mensajero.

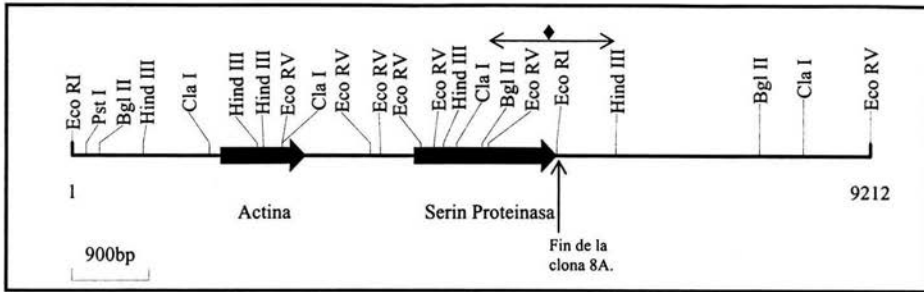


Figura 16.- Mapa de restricción construido a partir del análisis de restricción de la figura 8 (panel B). ◆: indica el fragmento que se desea clonar.

En la primera ronda del escrutinio de la biblioteca parcial *Hind III/Bgl II* de *T. vaginalis*, se obtuvo una señal positiva intensa proveniente del filtro 9 (Figura 17 panel A) y otras dos señales más débiles provenientes de los filtros 5 y 3 (datos no mostrados). Se realizó una la segunda ronda de hibridación a baja densidad. En la segunda ronda, solo se obtuvieron clonas positivas en aquellas provenientes de la señal #9 (Fig 17 panel B).

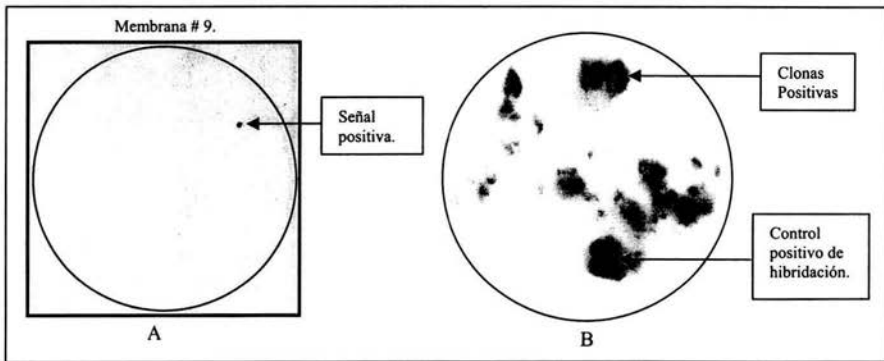


Figura 17.- Panel A: Señal positiva proveniente de la membrana #9 del escrutinio de la biblioteca genómica parcial *Hind III/Bgl II*; Panel B: clonas positivas resultantes la segunda ronda provenientes de la señal #9. Como control positivo de hibridación se utilizó el plásmido que contiene el inserto de la clona 8A. Las membranas se hibridaron con la sonda de la serín proteasa usada en la sección V.4.1.2.

De las clonas que dieron señal positiva en la segunda ronda de hibridación (Figura 17 panel B) se seleccionaron 6, de las cuales se preparó ADN plasmídico. Para liberar el inserto contenido en los plásmidos se hicieron digestiones con *Hind* III y *Sst* I. En todas las clonas se observa el mismo patrón de digestión: una banda de aproximadamente 2800 pb que corresponde al vector; se observan también otras cuatro bandas de aproximadamente 4700, 1700, 400 y 200 pb (Fig. 18) lo que indica que las clonas son iguales entre sí y que el inserto contiene sitios de restricción para estas enzimas.

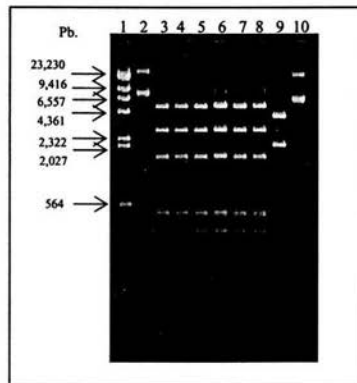


Figura 18.- Gel de agarosa teñido con bromuro de etidio correspondiente al análisis de los plásmidos de las 6 clonas seleccionadas en la segunda ronda del escrutinio de la biblioteca genómica parcial *Hind* III/*Bgl* II. Carril 1: ADN de  $\lambda$ *Hind* III; Carril 2: Clona 9.1 sin digerir; Carriles 3-8: Clonas 9.1, 9.2, 9.3, 9.4, 9.5, 9.6 digeridas con *Hind* III y *Sst* I; Carril 9: Clona negativa digerida con *Hind* III y *Sst* I; Carril 10: Clona 8A sin digerir. Todas las clonas que dieron señales positivas muestran el mismo patrón de bandas debido a que todas provienen de la señal positiva de la membrana # 9.

De las seis colonias seleccionadas se escogió la clona 9.2 para realizar un análisis de Southern blot. Los resultados se muestran en la figura 19.

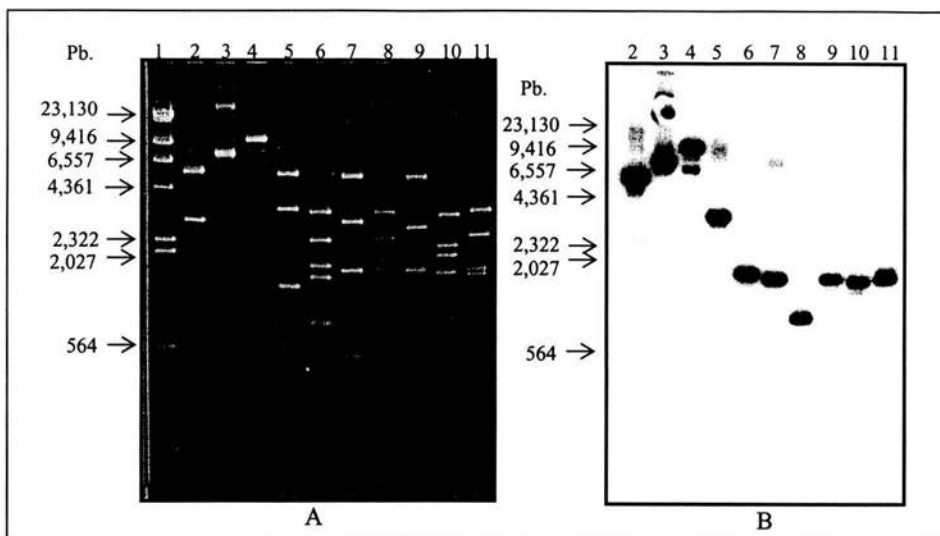


Figura 19.- Panel A: Gel de agarosa a 0.8% teñido con bromuro de etidio. Carril 1: ADN  $\lambda$  *Hind* III; Carril 2: Clona 8A/*Eco* RI como control positivo de hibridación; Carril 3: Clona 9.2 sin digerir; Carril 4: Clona 9.2/*Sst* I; Carril 5: Clona 9.2/*Bgl* II; Carril 6: Clona 9.2/*Eco* RI; Carril 7: Clona 9.2/*Hind* III; Carril 8: Clona 9.2/*Eco* RI y *Hind* III; Carril 9: Clona 9.2/*Sst* I y *Hind* III; Carril 10: Clona 9.2/*Bgl* II y *Hind* III; Carril 11: Clona 9.2/*Sst* I y *Eco* RI. Panel B: Southern blot del gel del panel A, la membrana se hibridó con la sonda de la serín proteasa utilizada en la sección V.4.1.2.

En el análisis por Southern blot de la clona 9.2 (Figura 19 panel A y B), se observa que la clona linearizada con *Sst* I tiene un tamaño aproximado de 9800 pb (carril 4); si a esto le restamos 2937 pb del vector, se deduce que el tamaño del inserto es de aproximadamente 6800 pb. En el carril 7 (digestión con *Hind* III) se observa una señal a la altura de 1700 pb. En el carril 9 (digestión *Sst* I/*Hind* III) se observa una señal a la altura de 1700 pb y en el carril 10 (digestión *Bgl* II/*Hind* III) se observa una señal a la altura de 1600 pb. Las señales de los carriles 7,9 y 10 poseen un tamaño aproximado al del fragmento que se desea clonar, por lo que la probabilidad de que contuvieran la secuencia de 1700 pb flanqueado por los sitios *Hind* III-*Bgl* II que contiene la región 3' de la serín proteasa era muy alta. Como el tamaño de la clona completa es de aproximadamente 6800 pb, en un principio se pensó que la digestión del ADN genómico había sido parcial y que el fragmento clonado tenía un tamaño mayor a lo esperado y contenía parte de la secuencia de

la clona 8A. Por lo tanto se decidió secuenciar los dos extremos de la clona 9.2 con ayuda de los oligonucleótidos Reverse primer y M13-20 que se anclan en el vector. Las secuencias resultantes no alinearon con la secuencia de la clona 8A, por lo que se dedujo que la clona 9.2 estaba formada por varios fragmentos de ADN genómico entre los cuales se encontraba el fragmento de 1700 pb que se deseaba clonar. Hay que mencionar que estos fragmentos no necesariamente son contiguos en el genoma, ya que se unieron al realizarse la reacción de ligación del ADN genómico con el vector. Debido a esto, al secuenciar el fragmento de interés (1700 pb), se debe tener cuidado al encontrar sitios *Hind* III y *Bgl* II, ya que estos sitios indicarían el final del fragmento de interés y la secuencia posterior no representaría necesariamente una secuencia contigua en el genoma.

#### VI.5. SECUENCIACIÓN DE LA CLONA GENÓMICA 9.2.

Una vez que se identificó en la clona 9.2 un fragmento acotado por sitios de restricción *Bgl* II-*Hind* III de aproximadamente 1700 pb que hibridaba con la sonda homóloga de la serín proteasa, se procedió a secuenciar este fragmento con el oligonucleótido 8Agact24, el cual se ancla en las últimas pares de bases conocidas del gen de la serín proteasa en la clona 8A (Figura 5). La secuencia obtenida con el oligonucleótido 8Agact24 de la clona 9.2 se ensambló con la secuencia del extremo 3' de la clona 8A obteniéndose un empalme perfecto de 402 pb, lo que indica que se trata del mismo fragmento genómico. Como en la secuencia no se había identificado ningún sitio *Bgl* II ó *Hind* III que indicarían el fin del fragmento de 1700 pb, se diseñó el oligonucleótido 9.2sepr21 (ver tabla IV) para continuar con la secuenciación del gen de la serín proteasa. En la secuencia obtenida de la clona 9.2 con el oligonucleótido 9.2sepr21 se identificó un sitio *Hind* III que indicaba el final de la secuencia de este fragmento.

En la figura 20 se muestra la secuencia parcial del gen de la serín proteasa obtenida del ensamble de las secuencias del gen de la serín proteasa proveniente de la clona 8A y del fragmento *Bgl* II-*Hind* III clonado, que forma parte de la clona 9.2 obtenida con los oligonucleótidos 8Agact24 y 9.2sepr21; encerrados en rectángulos se indican los sitios *Bgl* II (AGATCT) en la posición 814 que señala el principio del fragmento clonado, el sitio *Eco* RI (GAATTC) que señala el fin de la clona 8A en la posición 1677 y otro sitio *Eco* RI en la



clona 9.2 en la posición 1895 y el sitio *Hind* III (AAGCTT) en la posición 2342 que señala el final del fragmento clonado que tiene un tamaño de 1528 pb.

```

1      CTAAATTTGT TTGACAAAAA TGTTTTTCAT CTGTTTTCTC TTCATTGAAG CAATTTCACT
61     TGAAATTTCT AAGGAAGATA TACGTAATC AAGATATGAA AGTAGATATC CTGATTCAAA
121    TCAATATTTC AATGGTTATT ACAAAGATT TACTTCGAAA ACGAATATGC ATGATAGAAC
181    ATCAAGTGAA ATCCGACAAA TCACAGACAT TTCTAACTAT ATAATCCACA CAACACAAGA
241    GTTTC AATTT CCAAAAAGATA TCACATTTTC AAAACTGCAT GGAACATATT ATTTTCATTCA
301    CGACGCTTCA AAAGCCCAAA TCAATTCAAT TCAAAGCAAC TCCAATGTGA TTTCAGTTGA
361    AAAAGCTTCA CAAATCCGTT TTGATACAAG ATTTGAAGCC GGATTCATGG AAAATGGGAA
421    TTTAGATTTA ACATATAAAA ATGGCTACTT ATGGTCATTA CGTTCGACAA ACCTTACAGG
481    AAAAGGTGAA ATTATTGCTT TGGCAGATTC AGGAATCGAT TATAGGCATC CAATGCTCAA
541    TGACTCATCA CGACCATTAA TTAATAACAC TCTTGACCTC AATCAACGAA AAATCGTTTA
601    TTATGATTTA TGGAAAGATT TTTATGACTA TATCCCAGGC CACGGCACAC ATACAGCAGG
661    TATTATAGCA GGGAAATCAG AATGCGGTAA TATTTTACCT CTTTACGATG GTATTGCACC
721    TGAATCAAAA TTATATTTCC TAGATATGGC CAAAGGTGAC AATAAAATGC TTTTGTACGA
781    CTTTGATAAA GATAAATTTG TTCAGTCGTT GAAAGATCTC AATATTGGCA TCAGTTCGAA
841    CAGTTGGGGT TCAAATGAAA TAGATTACAC ATCTACAATG ACAGATATCT ATGACAACCT
901    CGCATATAAT AACCCAGACA TTTTATTTGT TTTTGCAGCC GGAAACAGCG AAAAATCATG
961    GACAATTGAC AGTCCTTCTT CAGGAAAAAA CTTTTTTTGT GTTGAGCAA CTGATGGAAC
1021   TCCAGGTCAA ATGATGGGAG AAGCATCAAC ACCACAGATC GAAATATCAG GTACAAAGAT
1081   TGATTTGTTG CAATCTTCTT GGTCAACAAA TTTATTTAAT CAATTAATA AGGAAGAACC
1141   ATTATTTAAT GTTGCAAAGC CTGTTTATGT TACATCTAAT GATAATACAT GTGATTCTAT
1201   CAAACAAATC CTGAAAATG AACAAACAAA AATATTAATT TTGAAATCAT TACCAGATTG
1261   CAACAAAATG AGTAAACAG TACTTGCAAC ATTATCTGAT GATGATTTC AGTTAATTTT
1321   TCAATCTTCA TCTGCAAATT TCACAATGAA ATTAAGTGAT TTTTCATATG AAAAAGCAAA
1381   TTTTGCAAGT GCTGGTCCAG CATATTCAGG AATCTTGAAA CCAGACATAT CAGCACCAGG
1441   CGTCATCACA GGTGCTCTTT CATATGGAAA TTCAGAAACA GCAGAAAGAA AATGTGATTT
1501   TTCAAGTCTT TCACAGTTCA CAGGAACATC AGAGTCAACA CCAATTATTT CAGGATTTTC
1561   AAGTCTTTTA CGTGAACATT TTCGATCAAA AGGAGTACT CCTTCATCTT CTTTACTTAA
1621   ATCATTAAAT ATTTTCATCA CAAAATCAAA TAAAAGAGAT TTAATACAG GTTTTGGAAT
1681   TCACAGGATTA GATTGTGCAA TTAAATCATC ATATTCAGAT CGTGTTTTAA TCAAAGGAAA
1741   TCAACATTTA TATTGTGAAT TTTCTAGTCA AACAGGAGAC ATATCAGCAT CAATTTTCATG
1801   GTTAGATCCA TTGTTATCAC GTGATATTGC TTATCCATTA CTTGCAGATT TATCTATTTT
1861   CATTGAATCA CCAACAGGAA AAGTTTATCA AGAAGAATTC GAAATTCCTA TTTTGACAAC
1921   AAACAAAAG ATCAGTGTTA CAAGTGAAC TTATGAAGGT ACATGGAAC TTCATGTTAT

```

```

1981  CAGTTCCTCGT  TTCGAAGGTA  ATGTTTCATT  TTCATGTTCT  ATTTCTAATT  ACATGTCAGA
2041  AAAACTTGAA  TTTGTTGAAG  AAACCGAAAA  ATGTTTATCC  GATTGTTTAT  GCAACAAAGG
2101  TATCTGTGAA  TGTCCATCAG  ATAAGACAGA  TCATCTTTGT  TCAACAAATT  CAAGAGATAT
2161  TTCTAATTCA  GGTACATTTG  TTGGTCAAGG  CAAATATGTT  TTTCGTGCAC  GAGTTCCTAA
2221  TATTGACAAA  CCACGAATTG  ATGTTTCATT  CAAAGGATAT  TCTAATGTTT  ATCTTATCAA
2281  AGGTATTCT  AATCAACCAA  GTGACAGTTT  CACATCACTT  TTATTCCGAA  ACAAAGAGAC
2341  AAAGCTT

```

Figura 20.- Secuencia del gen de la serín proteasa ensamblado con la secuencia del fragmento *Hind* III-*Bgl* II clonado, que forma parte de la clona 9.2. Subrayados se muestran los dos posibles promotores y los dos posibles ATG iniciadores, en negritas se indican las 402 pb que se empalman en las secuencias de las clonas 8A y 9.2. En cursivas se indican las 664 pb adicionales que se obtuvieron con secuencia de la clona 9.2. Encerrados en rectángulos se indican los sitios de restricción: el sitio *Bgl* II (AGATCT) en la posición 814, el sitio *Eco* RI (GAATTC) del fin de la clona 8A en la posición 1677 y otro sitio *Eco* RI (GAATTC) perteneciente al fragmento clonado en la clona 9.2 en la posición 1895 y el sitio *Hind* III (AAGCTT) en la posición 2342 que señala el final del fragmento *Bgl* II-*Hind* III de la clona 9.2 que tiene un tamaño de 1528 pb.

Con la secuencia ensamblada se hizo un nuevo análisis de contenido de G+C (Figura 21), en donde se observa que el contenido de G+C en los últimos 1528 pb se mantiene igual a la secuencia previa, lo que sugiere que la región codificadora no se ha clonado por completo.

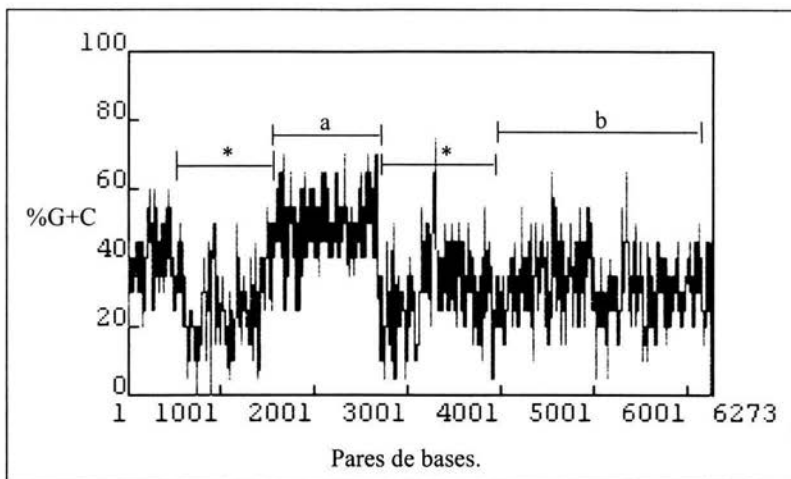


Figura 21.- Gráfica de contenido de G+C de la clona 8A ensamblada con la secuencia del fragmento de 1,528 pb perteneciente a la clona 9.2 realizada con el programa DNAsis (Hitachi Software) con una ventana de 20; a: gen de actina, \*: regiones intergénicas, b: ORF del gen de la serín proteasa.

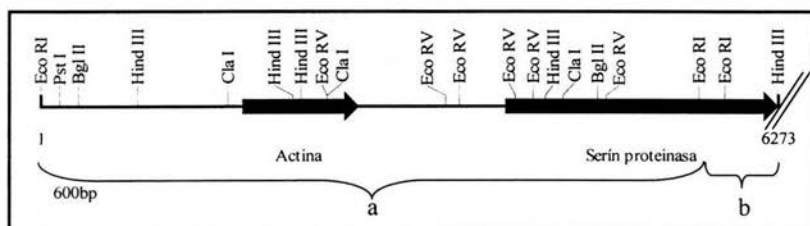


Figura 22.- Mapa de restricción de la clona 8A (a) ensamblada con la secuencia del fragmento de 1,528 pb perteneciente a la clona 9.2 (b). Las dos líneas diagonales indican que el gen está incompleto.

Al traducir la secuencia ensamblada del gen de la serín proteasa, se obtienen 220 residuos de aminoácidos adicionales a los ya conocidos (Figura 23), pero el ORF aun sigue abierto ya que no se encontró un codón de término de la traducción en fase.

1 C T A A A T T T G T T T G A C A A A A A T G T T T T T C A T C T G T T T T C T C T T C A T T G A A G C A A T T T C A C T  
 1 \* I C L T K M F F I C F L F I E A I S L

61 TGA A A T T T C T A A G G A A G A T A T A C G T A A A T C A A G A T A T G A A A G T A G A T A T C C T G A T T C A A A  
21 E I S K E D I R K S R Y E S R Y P D S N  
121 T C A A T A T T T C A A T G G T T A T T A C A A A G A T T T T A C T T C G A A A C G A A T A T G C A T G A T A G A A C  
41 Q Y F N G Y Y K D F T S K T N M H D R T  
181 A T C A A G T G A A A T C C G A C A A A T C A C A G A C A T T T T C T A A C T A T A T A A T C C A C A C A A C A C A A G A  
61 S S E I R Q I T D I S N Y I I H T T Q E  
241 G T T T C A A T T T C C A A A A G A T A T C A C A T T T T C A A A A C T G C A T G G A A C A T A T T A T T T C A T T C A  
81 F Q F P K D I T F S K L H G T Y Y F I H  
301 C G A C G C T T C A A A A G C C C A A A T C A A T T C A A T T C A A A G C A A C T C C A A T G T G A T T T C A G T T G A  
101 D A S K A Q I N S I Q S N S N V I S V E  
361 A A A A G C T T C A C A A A T C C G T T T T G A T A C A A G A T T T G A A G C C G A T T C A T G G A A A A T G G G A A  
121 K A S Q I R F D T R F E A G F M E N G N  
421 T T T A G A T T T A A C A T A T A A A A A T G G C T A C T T A T G G T C A T T A C G T T C G A C A A A C C T T A C A G G  
141 L D L T Y K N G Y L W S L R S T N L T G  
481 A A A A G G T G A A A T T A T T G C T T T G G C A G A T T C A G G A A T C G A T T A T A G G C A T C C A A T G C T C A A  
161 K G E I I A L A D S G I D Y R H P M L N  
541 T G A C T C A T C A C G A C C A T T A A T T A A T A A C A C T C T T G A C C T C A A T C A A C G A A A A A T C G T T T A  
181 D S S R P L I N N T L D L N Q R K I V Y  
601 T T A T G A T T C A T G G A A A G A T T T T T A T G A C T A T A T C C C A G G C C A C G G C A C A C A T A C A G C A G G  
201 Y D S W K D F Y D Y I P G H G T H T A G  
661 T A T T A T A G C A G G G A A A T C A G A A T G C G G T A A T A T T T T A C C T C T T T A C G A T G G T A T T G C A C C  
221 I I A G K S E C G N I L P L Y D G I A P  
721 T G A A T C A A A A T T A T A T T T C C T A G A T A T G G C C A A A G G T G A C A T A A A A A T G C T T T T T G A C G A  
241 E S K L Y F L D M A K G D N K M L F D D  
781 C T T T G A T A A A G A T A A A T T T G T T C A G T C G T T G A A A G A T C T C A A T A T T G G C A T C A G T T C G A A  
261 F D K D K F V Q S L K D L N I G I S S N  
841 C A G T T G G G G T T C A A A T G A A A T A G A T T A C A C A T C T A C A A T G A C A G A T A T C T A T G A C A A C C T  
281 S W G S N E I D Y T S T M T D I Y D N L  
901 C G C A T A T A A T A A C C C A G A C A T T T T A T T T G T T T T T G C A G C C G A A A C A G C G A A A A A T C A T G  
301 A Y N N P D I L F V F A A G N S E K S W  
961 G A C A A T T G A C A G T C C T T C T T C A G G A A A A A C A T T T T T T G T G T T G G A G C A A C T G A T G G A A C  
321 T I D S P S S G K N I F C V G A T D G T  
1021 T C C A G G T C A A A T G A T G G G A G A A G C A T C A A C C A C A G A T C G A A A A T A T C A G G T A C A A A G A T  
341 P G Q M M G E A S T P Q I E I S G T K I  
1081 T G A T T T G T T G C A A T C T T C T T G G T C A C A A A T T T A T T T A A T C A A T T A A A T A A G G A A G A A C C  
361 D L L Q S S W S T N L F N Q L N K E E P  
1141 A T T A T T T A A T G T T G C A A A G C C T G T T T A T G T T A C A T C T A A T G A T A A T A C A T G T G A T T C T A T  
381 L F N V A K P V Y V T S N D N T C D S I

1201 CAAACAAATCCTTGAAATGAACAAACAAAAATATTAATTTTGAATCATTACCAGATTG  
401 K Q I L E N E Q T K I L I L K S L P D C  
1261 CAACAAAATGAGTAAAACAGTACTTGCAACATTATCTGATGATGATTTCCAGTTAATTTTC  
421 N K M S K T V L A T L S D D D F Q L I S  
1321 TCAATCTTCATCTGCAAATTTCACAATGAAATTAAGTGATTTTTCATATGAAAAAGCAAA  
441 Q S S S A N F T M K L S D F S Y E K A N  
1381 TTTTGCAAGTGTGGTCCAGCATATTCAGGAATCTTGAAACCAGACATATCAGCACCAGG  
461 F A S A G P A Y S G I L K P D I S A P G  
1441 CGTCATCACAGGTGCTCTTTTCATATGGAAATTCAGAAACAGCAGAAAGAAAATGTGATTT  
481 V I T G A L S Y G N S E T A E R K C D F  
1501 TTCAAGTCTTTCACAGTTCACAGGAACATCAGAGTCAACACCAATTATTTTCAGGATTTTC  
501 S S L S Q F T G T S E S T P I I S G F S  
1561 AAGTCTTTTACGTGAACATTTTCGATCAAAGGAGTTACTCCTTCATCTTCTTACTTAA  
521 S L L R E H F R S K G V T P S S S L L K  
1621 ATCATTAAATTTTCATCAACAAAATCAAATAAAAGAGATTTAAATACAGGTTTTGGAAAT  
541 S L I I S S T K S N K R D L N T G F G I  
1681 TCCACGATTAGATTGTGCAATTAATCATCATATTCAGATCGTGTTTTAATCAAAGGAAA  
561 P R L D C A I K S S Y S D R V L I K G N  
1741 TCAACATTTATATTGTGAATTTTCTAGTCAAACAGGAGACATATCAGCATCAATTTTCATG  
581 Q H L Y C E F S S Q T G D I S A S I S W  
1801 GTTAGATCCATTGTTATCACGTGATATTGCTTATCCATTACTTGCAGATTTATCTATTTT  
601 L D P L L S R D I A Y P L L A D L S I F  
1861 CATTGAATCACCAACAGGAAAAGTTTATCAAGAAGAATTCGGAAATTCATTTTGACAAC  
621 I E S P T G K V Y Q E E F G N S I L T T  
1921 AAACAAAAGATCAGTGTACAAGTAAACTTATGAAGGTACATGGAAACTTCATGTTAT  
641 N K K I S V T S E T Y E G T W K L H V I  
1981 CAGTTCTCGTTTCGAAGTAATGTTTCATTTTCATGTTCTATTCTAATTACATGTCAGA  
661 S S R F E G N V S F S C S I S N Y M S E  
2041 AAAACTTGAATTTGTTGAAGAAACCGAAAAATGTTTATCCGATTGTTTCATGCAACAAAGG  
681 K L E F V E E T E K C L S D C S C N K G  
2101 TATCTGTGAATGTCCATCAGATAAGACAGATCATCTTTGTTCAACAAATTCAGAGATAT  
701 I C E C P S D K T D H L C S T N S R D I  
2161 TTCTAATTCAGGTACATTTGTTGGTCAAGGCAAATATGTTTTTCGTGCACGAGTTCCTAA  
721 S N S G T F V G Q G K Y V F R A R V P N  
2221 TATTGACAAACCACGAATTGATGTTTCATTCAAAGGATATTCTAATGTTTATCTTATCAA  
741 I D K P R I D V S F K G Y S N V Y L I K  
2281 AGGTATTTCTAATCAACCAAGTGACAGTTTCACATCACTTTTATTCCGAAACAAAGAGAC  
761 G I S N Q P S D S F T S L L F R N K E T

2341 AAAGCTT  
781 K L

Figura 23.- Secuencia traducida del gen de la serín proteasa ensamblada con la secuencia del fragmento clonado 1,528 pb. En rectángulos se indican los dos posibles ATG iniciadores, subrayados los dos posibles promotores, y en negritas se muestran las secuencias consenso DSG, HGTH y GTS en donde se encuentra los aminoácidos que conforman la triada catalítica (Asp, His y Ser) y que dan homología con serín proteasas. En cursivas se indican los aminoácidos adicionales que se obtuvieron de la secuencia de la clona 9.2.

#### **VI.6. ALINEAMIENTO DE LA SECUENCIA PARCIAL DE LA SERÍN PROTEASA DE *Trichomonas vaginalis* CON SERÍN PROTEASAS REPORTADAS EN OTROS MICROORGANISMOS.**

La secuencia parcial de aminoácidos de la serín proteasa de *T. vaginalis* se alineó con varias secuencias de serín proteasas identificadas por el programa BLAST X ([www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/)). También se alineó con las secuencias de las subtilisinas BPN', subtilisina de Carlsberg, termitasa y subtilisina BL, accesadas en la base de datos del Protein Data Bank ([www.rcsb.org/pdb/index.html](http://www.rcsb.org/pdb/index.html)) a las que se les llama subtilisinas verdaderas debido a que fueron las primeras reportadas. Se ha descrito la estructura secundaria de estas últimas por medio de cristalografía.

El alineamiento se llevó a cabo con el programa DNAsis MAX (Hitachi Software). El análisis de la secuencia parcial de la serín proteasa de *T. vaginalis* se hizo a partir de la primera de las dos posibles metioninas iniciadoras identificadas (ver sección V.1, Figura 7).

	10	20	30	40	50	60
TVAG						
AHEALYI						
AQPHY						
ARTHAI						LV
BACER		MKKT	STLLSMALVF	SSFGALSAHA	ESLQKEKQFS	PQLKTTIEQW
BASUB						
BL						
BPN						
CARLS						
DYCDIS	MKSNTNIRVL	LVSGLILIFI	FLGIKFEFIN	KNNNDKIGIN	RKLEFSYFTK	NNNNNNNNNF
KABAYASHI						
STRCOE						
TERMIT						

	70	80	90	100	110	120
TVAG						
AHEALYI						
AQPHY						
ARTHAI						
BACER						
BASUB						
BL						
BPN						
CARLS						
DYCDIS	KQDQLKNKKD	KRILLKNEII	DTNIKKNIKK	NNQKNNNEEI	FPNFISRLK	SNDDMEIQQF
KABAYASHI						
STRCOE						
TERMIT						

	130	140	150	160	170	180
TVAG						
AHEALYI						
AQPHY						
ARTHAI						
BACER						
BASUB						
BL						
BPN						
CARLS						
DYCDIS	TYRKSHYIVQ	FKDHINDETR	EQFKOFLINT	DIVLDEQPYQ	SHIVNYIPHD	SFLVLMNDEQ
KABAYASHI						
STRCOE						
TERMIT						

	190	200	210	220	230	240
TVAG	VISVEKASQI	RFDTRFEAG-				
AHEALYI	VVSISSAQN	LSQSGAIWN-				
AQPHY	YIALPMKYSP					
ARTHAI	FLGLEHN---					
BACER	NEEAPNIGG-					
BASUB	--LIPYVTN-	--EQIMDVN	ELPEG---			
BL	GQSVPWG---					
BPN	---GPYG---					
CARLS	AQTVPYG---					
DYCDIS	SNLLSSKEW	SWIGEFPSN	KIHLNYNEKS	IGLPVYIKLS	DSTNSLIQRW	ENTLNSILTS
KABAYASHI	FDSAPFIG---					
STRCOE	DEALPYLRDG	SLDERLFDVG	ALLEQGLADS	E-----		TGELPLIVTY
TERMIT	YFSSRQYGP-					

	250	260	270	280	290	300
TVAG						---FMENGN
AHEALYI						
AQPHY						---ILDK
ARTHAI						
BACER						
BASUB						
BL						
BPN						
CARLS						
DYCDIS	YNSKVKLLI	NQKKLSIVY	CNDESSQSS	CSLVSSEKLV	YQWISEQSES	NYIERSEKFO
KABAYASHI						
STRCOE	GKGVRAATPR	GAERTRSLPS	VRGAAVEADK	GRAFUREFTR	RGAGVEGVWL	DGRVTADMAE
TERMIT						

	310	320	330	340	350	360
TVAG	LDLTYKNGYL	WSLRSTN---	----LTGK	GEIIALDSG	IDVRHPMLND	SS-----
AHEALYI	-LORINAQAI	SGMDGKYTY-	----GTEAA	DVDAYIVDTG	ILTTHQEFDN	
AQPHY	VALYTRLTDL	MQDTN--IS-	----EYKGR	GVIIGIADSG	IDYTHPAFRG	
ARTHAI	--SYVPSSSI	WRKAR-----	----FGE	DTIIANIDTG	VWPESKSFDR	EGLGPIPSRW
BACER	--PTIGAPEA	WNLKDPFGK-	----PLDGG	GMKIAIIDSG	VDYTHPDLKA	
BASUB	-IKVIKAPEM	WAKG-----	----VKGK	NIKVAVIDTG	CDTSHPDLN	
BL	-ISRVOAPAA	HNRG-----	----LTGS	GVKVAVIDTG	IS-THPDLN	
BPN	-VSQIKAPAL	HSQG-----	----YTGS	NVKVAVIDSG	IDSSHPAK-	
CARLS	-IPLIKADKV	QAQG-----	----FKGA	NVKVAVIDTG	IQASHPDLN	
DYCDIS	TANRLSPKAI	FGTKDTLVNN	DRIDIPLRGK	GQILSIADTG	LDGSHCFPSD	SN-----
KABAYASHI	-----ANDA	WDLG-----	----FTGK	GVKVAVIDTG	VDYTHPDLAP	
STRCOE	SNAQIGTPEA	WEAG-----	----LTGK	GVTVAVIDSG	VDAGHPDLAG	
TERMIT	--QKIQAPOA	WDIAE-----	----GS	GAKIAIVDTG	VQSNHPDLAG	



	370	380	390	400	410	420
TVAG	-----	---RPLINN	TLDLNQRKIV	YYDS---WKD	FYDYIPGHT	HTAGIIAGKS
AHEALYI	-----	---G-RALW	GANFADSQD-	-----	--TDCNCHGT	HVAGTVGG--
AQPHY	-----	---RILE	IHDLTGTEVC	YKEEIEKGNC	NQRDTDGHGT	HVAGIAAG--
ARTHAI	KGICQNKDA	TFHCNRKLG	ARYFNKGYAA	AVGHLNSSF	SPRDLDCGHS	HTLSTAAGDF
BACER	-----	---NY--IG	GYDTVDEDND	PMDG-----	---NVHGT	HVAGIIAGNG
BASUB	-----	---QIIG	GKNFTDDDDG	KEDAI-----	---SDYNGHT	HVAGTIAAN-
BL	-----	---IRG	GASFVPGE--	-PST-----	---QDGNCHGT	HVAGTIAAL-
BPN	-----	---VAG	GASFVPSE--	-TNP-----	---QDNNSHGT	HVAGT-----
CARLS	-----	---VVG	GASFVAGE--	-AYN-----	---TDGNCHGT	HVAGTVAAL-
DYCDIS	-----	---NPIPYN	SVNLNHRKVV	TYIG--SLHD	NEDYVDCHGT	HVCGSAAGAP
KABAYASHI	-----	---NFGEYL	GWDFVDNDND	POETP--RGD	PRGAETHGHS	HVAGTIAANG
STRCOE	-----	---RIAQ	SRSFIPGE--	---EV-----	---ADRHCHGT	HVTSTVGGSG
TERMIT	-----	---KV--VG	GWDFVDNDST	PONG-----	---NCHGT	HCAGIAAAVT

	430	440	450	460	470	480
TVAG	ECC-----NI	LPLYDGIAP	SKLYFLDMAK	G--DNKMLFD	DFDKDKFVQS	LKDLN----I
AHEALYI	-----	--KTVGIARG	VTLYAVKVLG	C--DG--SGTT	NGVISGIQVV	AENARKRGRK
AQPHY	-----	---D	HEVVRGIAPE	AELIVVKIGN	E-----EFRE	DKIIEALDIL
ARTHAI	VPGVSIFGQG	NGTAKGSSPR	ARVAAYKVCW	PPVKGNCEVD	ADVLAAFDAA	IHDG-----A
BACER	K-----	---IKGVAPN	ASILAYRVMN	D--GG--TGTT	DDIIQGIERA	IQDG-----A
BASUB	-D-----	---S	NGGIAGVAPE	ASLLIVKVLG	G--ENGSGQY	EWIINGINYA
BL	-N-----	---N	SIGVLGVAPS	AELYAVKVLG	A--DG--RGAI	SSIAQGLEWA
BPN	-----	---VLAVAPS	ASLYAVKVLG	A--DG--SGQY	SWIINGIEWA	IANN-----M
CARLS	-D-----	---N	TTGVLGVAPS	VSLYAVKVLN	S--SG--SGSY	SGIVSGIEWA
DYCDIS	EDS-----	---SLA	ISSFGLATD	AKIAFFDLAS	DPSNNEPVP	EDYSQLYOPL
KABAYASHI	Q-----	---IKGVAPD	ATLLAYRVLG	P--GG--SGST	ENVVAAIERA	VQDG-----A
STRCOE	AA-----	---S	DGKEKGVAPG	ATLAVGVKLD	D--EGFGSES	EIIAGMEWAA
TERMIT	NN-----	---S	T-GIAGTAPK	ASILAVRVL	N--SG--SGTW	TAVANGITYA

	490	500	510	520	530	540
TVAG	GISSISIGS	---NEIDYTS	TMTDIYDNLA	YNNPDILFVF	AAGNSE----	KSWTIDSPSS
AHEALYI	SVANMSIG	-----	GGYS	SSLNRAVASV	VDA-GVPPFAV	AAGNED----
AQPHY	GVINISIGTP	---LGPHDGT	DPISRFIESI	VNTYKIPVVV	AAGNUGN-EP	IHDKLNLFQE
ARTHAI	DVISVSIIGGE	PTSFNDNSVA	IGSFHAAKK-	RIVVVCASGN	SG---PADST	VSNVAPWQIT
BACER	DVLNISIG	---QDLNVDP	QPVTLLERA	AKL-GVTAVV	SNGNDGP---	KPNSVDAPGN
BASUB	DIISMISIG	---GPSD-V	PELKEAVKNA	VKN-GVLVVC	AAGNEGDDGE	RTEELSYPA
BL	HVANISIG	---SPSP-S	ATLEQAVNSA	TSR-GVLVVA	ASGNSG----	S--SISYPAR
BPN	DVINMSIG	---GPSG-S	AALKAADVKA	VAS-GVVVVA	AAGNE-----	-----
CARLS	DVINMSIG	---GASG-S	TAMQAVDNA	YAR-GVVVVA	AAGNSGN-SG	STNTIGYPAK
DYCDIS	RVHGISIGSL	SIQGYLGSYS	DDAGSIDDFL	YTHPDFIILR	AAGNNE----	QYSSLLSQAT
KABAYASHI	DVMNISIG	---NSLNAPD	WATSIALDOA	MAE-GVVAVT	SNGNSGP---	NNUTVGSPT
STRCOE	DIVSMISIGS	---TEPSDGT	DPMAEAVNTL	SRETGALFVI	AAGNTG----	APSSIGSPGA
TERMIT	KVISISIG	---GTVGN	NSG	--IQAVNYA	WNK-GSVVVA	AAGNAG----

	550	560	570	580	590	600
<b>TVAG</b>	GKNIFCVGAT	DGTPGQMMGE	ASTPQIEISG	-----	-----	-----T
<b>AHEALYI</b>	EAKAITVGAT	YVSGNFAQDI	RAS-----	-----	-----	-----
<b>AQPHY</b>	NTSSFVIGS	WAYVDIWMG	TDSVELTINS	PCQAVSIREG	DTKLIDLGNL	GTIAVSFSGR
<b>ARTHAI</b>	VGASTMDREF	ASNLVLGNKG	HYKGQSLST	ALPHAKFYPI	MASVNAKAKN	ASALDAQLCK
<b>BACER</b>	ASSVISVGAS	TVSIPPTFQ	VTGS-----	SKTYQGLPLS	KSDFPIENDS	-PLVYVGYGN
<b>BASUB</b>	YNEVIAVGSV	SVARELSEFS	NAN-----	-----	-----	-----
<b>BL</b>	YANAMAVGAT	DQNNNRASFS	QYG-----	-----	-----	-----
<b>BPN</b>	-----	-----	-----	-----	-----	-----
<b>CARLS</b>	YDSVIAVGAV	DSNSNRASFS	SVG-----	-----	-----	-----
<b>DYCDIS</b>	AKNVITVGAE	QTTHESYTTD	ALEYSNFETV	AKSTLNSLQ	SFDDKYCTYT	TAQCCTEYST
<b>KABAYASHI</b>	SREAISVGAT	QLPYNVFTAA	TTSSDGVSYA	SSAVQGFPE	EELSLNGQA	FELVDVGFGA
<b>STRCOE</b>	ADAALTVGAV	DSADQAAWFT	SAGP-----	-----	-----	-----
<b>TERMIT</b>	YSHAIIVAST	DQDNKSSFS	TYGS-----	-----	-----	-----

	610	620	630	640	650	660
<b>TVAG</b>	KIDLLQSSWS	TNLFNQLNKE	EPLFNVAKPV	VVTSNDNTCD	SIKQILENEQ	TKILILKSLP
<b>AHEALYI</b>	-----	-----	-----	-----	-----	-----
<b>AQPHY</b>	NPLNGDKNVF	IKIDNVNENF	RNGWSVSFTP	IDVKDGEVHL	WGENVAFASP	DYSYTISSLA
<b>ARTHAI</b>	LGSLDPIKTK	GKILVCLRGO	NGRVEKGRAV	ALGGGIGHVL	ENTVVTGNDL	LADPHVLPST
<b>BACER</b>	PSDYAKQDVK	GKFALILQGT	SSTLV-KAEQ	AKOAGALGVL	LISSEKEINM	MPEYFSREHL
<b>BASUB</b>	-----	-----	-----	-----	-----	-----
<b>BL</b>	-----	-----	-----	-----	-----	-----
<b>BPN</b>	-----	-----	-----	-----	-----	-----
<b>CARLS</b>	-----	-----	-----	-----	-----	-----
<b>DYCDIS</b>	VKGLSG---	-----	-----	-----	-----	-----
<b>KABAYASHI</b>	PADFAGKDLT	GKIALISRGA	GIAFVDKATE	AAKAGAEGAI	LYNN--VAGA	MPLIPG---M
<b>STRCOE</b>	-----	-----	-----	-----	-----	-----
<b>TERMIT</b>	-----	-----	-----	-----	-----	-----

	670	680	690	700	710	720
<b>TVAG</b>	DCNKMSKTVL	ATLSDDDFQL	ISQSSSANFT	MKLSDFSEKA	NFASAGPAYS	GILKPDISAP
<b>AHEALYI</b>	-----	-----	-----	-----	-----FSN	WGTCVDILAP
<b>AQPHY</b>	SSSSVISVGS	FTSKVNWNIN	PYSILGSISN	FSSIGPSRRC	SYGCKENLKP	-----DIVAP
<b>ARTHAI</b>	QLTSKDSFAV	SRYM-TQTKK	PIAHITPSRT	DLGLKPAPVM	ASFSSKGPSI	VAPQILKPGI
<b>BACER</b>	AVPVMQLSNT	NHEELKTLIT	KRKKNIKIGQ	PKQT-ELIGN	FSSRGPSSQS	WLKPDVVAP
<b>BASUB</b>	-----	-----	-----	-----	-----	---KEIDLVP
<b>BL</b>	-----	-----	-----	-----	-----	---AGLDIVAP
<b>BPN</b>	-----	-----	-----	-----	-----	-----
<b>CARLS</b>	-----	-----	-----	-----	-----	---AELEVMAP
<b>DYCDIS</b>	-----	---CCTSYIK	NSYASIFSSQ	PELYNENNIC	SFSSKGPTHG	GRKPDIVAP
<b>KABAYASHI</b>	AVPTIMLNQA	DGEALKAKAA	TVTVSFNAAF	DKAVGETMAD	FSSRGPVIDT	WNIKPDVSAP
<b>STRCOE</b>	-----	-----	-----	-----	---RYGD	NALKPDLSAP
<b>TERMIT</b>	-----	-----	-----	-----	-----	---UVDVAAP

	730	740	750	760	770	780	
TVAG	GVITGALSYG	NSETA-----	ERKCDFSSLS	QFTGTSSTP	IISGFSSLLR	EHFRSKGVTP	
AHEALYI	GQSISAWIG	-----	---SNSAYN	TISGTSMASP	HVCGVAALTF	SANPS-----	
AQPHY	GELVCSAYPL	NIKPLIDLCF	-----	YEGFN	WMOGTSMSAP	AVTGAVALLL	QVEHTLTPSE
ARTHAI	TAPGVSVIAA	YTGAVSPNE	QFDPRLLLFN	AISGTSMSCP	HISGIAGLLK	TRYPSPWSPA	
BACER	GVQITSTVP-	-----	---RGGYE	SHGTSMAAP	QVAGAVALLR	QMHPD-----	
BASUB	GENILSTLP-	-----	---NKKYG	KLTGTSMAAP	HVSGALALIK	SYE-----	
BL	GVNVQSTYP-	-----	---GSTYA	SLMGTSMATP	HVAGAAALVK	QKNPS-----	
BPN	-----	-----	-----	---GTSSSS	TVGYPGKYPS	VIAVGAVDSS	
CARLS	GAGVYSTYP-	-----	---TNTYA	TLMGTSMASP	HVAGAAALIL	SKHPN-----	
DYCDIS	GQVITSARSN	GANTTDQCGD	GSLPNTNALL	SESGTSMATP	LATAATTILR	QVLVDGYVPT	
KABAYASHI	GVNIVSTVPT	FN-----	---PDAPHGIG	AKOGTSMASP	HVAGAAAVIL	EANPS-----	
STRCOE	GVGILAARSR	L-----	---AEGSGDYT	SMDGTSMATP	HIAGVAALLA	EEHPD-----	
TERMIT	GSSIYSTYP-	-----	---TSTYA	SLSGTSMATP	HVAGVAGLLA	SQG-----	

	790	800	810	820	830	840
TVAG	SSSLKSLII	SSTKSNKRD	NTGFGIPR-	-----	-----	-----
AHEALYI	---YSA---	---ADVKSIL	ADSTDNVID-	-----	-----	-----
AQPHY	VKEILINNAY	KDSFTTQKPN	NVYGHGKLDI	YKSVSSLEE	REGFSDRNTT	ERETLNVSSG
ARTHAI	IRSAIMTTAT	TMDDIPGPIQ	NATNMKATPF	SFGAGHVQPN	LAVNPLVVD	LGIKDYLNFL
BACER	---WT---	---TEQLKAAL	ANNAKTLHD-	---VNEN---	-----	-----
BASUB	-----E	ESFORKLS	EVFAQLIRR-	---TLPL---	-----	-----
BL	---WSN---	---VQIRNHL	KNTATSIGS-	-----	-----	-----
BPN	NQRASFSSVG	-----	-----	-----	-----	-----
CARLS	---ISA---	---SQVRNRL	SSTATYLG-	-----	-----	-----
DYCDIS	GSIVESNKIQ	PTGSLKALM	INNAQLLNGT	FPLSSTNTNP	SNAVFDTFAG	ANFVQGWGSL
KABAYASHI	---WG---	---VYEVKSAL	MNTAEKMNVP	---ATGE---	-----	-----
STRCOE	---WSGARLK	DALMSTSKEL	DVSAYQLGAG	RVSVPA---	-----	-----
TERMIT	---RS---	---ASNIRAAI	ENTADKISG-	-----	-----	-----

	850	860	870	880	890	900
TVAG	-----L	DCAIKSSYSD	RVLKIGNOHL	YCEFSSOTGD	ISASISWLDP	LLSRDIAVPL
AHEALYI	-----	---LRC---	TRSG	-----	-----	-----
AQPHY	GGGCTSQGQV	SIIYLITFAL	FLKVIRFLYR	FLF-----	-----	-----
ARTHAI	CSLGYNASQI	SVFSGNFTC	SSPKISLVNL	NYPSITVPLN	TSSKVTVSRT	VKNVGRPSMY
BACER	-----	---TYPVMA	QSGS	-----	-----	---LI---
BASUB	-----	---DIAKTL	AGHG	-----	-----	---FL---
BL	-----	---TNL---	YGSG	-----	-----	-----
BPN	-----	-----	-----	-----	-----	-----
CARLS	-----	---SFY---	YGKG	-----	-----	-----
DYCDIS	RMSEWLYVES	SGVKPKPSRW	VGIGELGKDK	KASNUKEYSL	STGQNVSYCF	TYKPSSSGSN
KABAYASHI	-----	---EYPHNT	QGAG	-----	-----	---SI---
STRCOE	-----	---AVGADV	TATGSADLGF	YSWPYEADPEP	VTRTVAYTNS	SDTDVELKLS
TERMIT	-----	---TGTY---	WAKG	-----	-----	---RV---

	910	920	930	940	950	960
TVAG	LADLSIFIES	PTGKVYQEEF	GNSILTTNKK	ISVTSETYEG	TWKLHVISSR	FEGNVSFSCS
AHEALYI	CSSTPNKLLV	SARC-----	-----	-----	-----	-----
AQPHY	-----	-----	-----	-----	-----	-----
ARTHAI	TVKVVNPHGV	YVALKPTSLN	-----	-----	-----	-----FTKVG
BACER	NIPKAAQTNV	LVKPNNVSFG	-----	----L-IKPN	SGKVKLTONV	TLQNLSSKKK
BASUB	YLTAPDELAE	KAEQSHLLTL	-----	-----	-----	-----
BL	-LVNAEAATR	-----	-----	-----	-----	-----
BPN	-----	-----	-----	-----P	ELDVHAPGVS	IWSTLP----
CARLS	-LINVEAAAQ	-----	-----	-----	-----	-----
DYCDIS	SGGIPRIVAT	LVWTDPPSYS	GAKLNLVNNL	DLTMTNTESE	FIFYSNSGGG	SYNGTKGTTL
KABAYASHI	RVVDALKAET	LVNPGSYSFG	-----	----T-FEKP	KGKQVERQQF	EIQNLSSKAK
STRCOE	VRGAPEGVAT	LADTSLTSPA	HGTASTTVTG	DGSKA-PVGD	TSGQVVAADA	SGKPLAHTAF
TERMIT	NAYKAVQY--	-----	-----	-----	-----	-----

	970	980	990	1000	1010	1020
TVAG	ISNYMSEKLE	FVEETEKCLS	DCSCNKGICE	CPSDKTDHLC	STNSRDISNS	GTFVGQGGYV
AHEALYI	-----	-----	-----	-----	-----	-----
AQPHY	-----	-----	-----	-----	-----	-----
ARTHAI	ELKT-----	----FKVILV	KSKGNVAKGY	MFGELVWSAK	KHRVRSPIVV	KL-----
BACER	SFSTRVELLD	ANTKT--KVK	ASVPSSISIQ	PNSSTTEKPT	ITVDSS----	-----
BASUB	-----	-----	-----	-----	-----	-----
BL	-----	-----	-----	-----	-----	-----
BPN	-----	--GNKYGAKS	GTXMASPHVA	GAAALILSKH	PN-----	WTN-----
CARLS	-----	-----	-----	-----	-----	-----
DYCDIS	PLQDSINNVE	GIIYTPINTK	SEISFRFIIA	GTNIPIGPQN	FSFVFHGENG	EFDWADSCMQ
KABAYASHI	KYSHEFTFKN	EVGK--HVK	VTTSKHLKVN	PGKTQKVNVN	VQVDASK----	-----
STRCOE	GLVKEGERYT	LTVHVKDRSG	AATPADLTVO	RLTEGVDPFP	AHVGDSTG--	-----
TERMIT	-----	-----	-----	-----	-----	-----

	1030	1040	1050	1060	1070	1080
TVAG	FRARVPN--	-----	-----	----IDKPRI	DVSFKG----	-----YSNV
AHEALYI	-----	-----	-----	-----	-----	-----
AQPHY	-----	-----	-----	-----	-----	-----
ARTHAI	-----	-----	-----	-----	-----	-----
BACER	-----	-----	-----	--LQGGVYTG	NVYVKEQG--	-----
BASUB	-----	-----	-----	-----	-----	-----
BL	-----	-----	-----	-----	-----	-----
BPN	TQVRSSLENT	TTKLGD----	-----	-----	-----	-----
CARLS	-----	-----	-----	-----	-----	-----
DYCDIS	CNPDDTQPCF	IENGVSQTC	GDDYLWGRCL	VQSCNNYNY	NSISDKCSKF	LSYNYIVIIV
KABAYASHI	-----	-----	-----	--LAAGYYEG	HLTVSE----	-----
STRCOE	-----	-----	-----LK	LRLEPGTVSL	SSFLDVRGSH	GADSLGLGFL
TERMIT	-----	-----	-----	-----	-----	-----

	1090	1100	1110	1120	1130	1140
TVAG	YLIKGISNQP	SDSFTSLFR	NKETKL----	-----	-----	-----
AHEALYI	-----	-----	-----	-----	-----	-----
AQPHY	-----	-----	-----	-----	-----	-----
ARTHAI	-----	-----	-----	-----	-----	-----
BACER	--AKEEIRIP	FTFSIDPKDY	KRIDGLEIIN	STFSPNGDHW	-LDDNLINVY	LVAPVDDITL
BASUB	-----	-----	-----	-----	-----	-----
BL	-----	-----	-----	-----	-----	-----
BPN	----SFYYGK	G-----	-----	-----	-----LI	NVEAAAQ---
CARLS	-----	-----	-----	-----	-----	-----
DYCDIS	AGGTMSLIIT	VLILIKYMEY	KENGNKFSLK	EFFSGVLGTG	KNVSGGGKGG	SGGSGSGSGT
KABAYASHI	--GDTVIEVP	TILFIGEPDY	PRVT----HF	GFTALGG---	--NEFEFYSY	LPGGAEELQV
STRCOE	AAPEVVVDRD	REITLDGREL	REIG--ADVG	RRTETROLLM	-EYDRGANGS	DLFGAVQVPL
TERMIT	-----	-----	-----	-----	-----	-----

	1150	1160	1170	1180	1190	1200
TVAG	-----	-----	-----	-----	-----	-----
AHEALYI	-----	-----	-----	-----	-----	-----
AQPHY	-----	-----	-----	-----	-----	-----
ARTHAI	-----	-----	-----	-----	-----	-----
BACER	HANLVTKER-	-VTYQGIHQ	AKNATPGYKP	FKWN----GT	KADGTPLTDG	LYQIEAVASN
BASUB	-----	-----	-----	-----	-----	-----
BL	-----	-----	-----	-----	-----	-----
BPN	-----	-----	-----	-----	-----	-----
CARLS	-----	-----	-----	-----	-----	-----
DYCDIS	LKDGTTDDGT	GIHVRPKPKD	APVTPPDLYS	LLSPFIIIEIT	ISTACSLVAT	AASILQPYII
KABAYASHI	WVYKATATGG	LGTYVGDALY	AGDLGKGYNY	HNWN----GT	LVDGTVLPAG	KYRVAVYAKK
STRCOE	TYDSVFAAPT	KKVAQGDFFEY	RTVWRLGKPL	LEVKGIDEAT	VQSGGTLTEG	RTRLPLVDVG
TERMIT	-----	-----	-----	-----	-----	-----

	1210	1220	1230	1240	1250	1260
TVAG	-----	-----	-----	-----	-----	-----
AHEALYI	-----	-----	-----	-----	-----	-----
AQPHY	-----	-----	-----	-----	-----	-----
ARTHAI	-----	-----	-----	-----	-----	-----
BACER	SGGETKQTAA	VFLDRTAPKL	THEVDQENLV	IRGKVDDILL	DWMSSEGWIA	PGIPVRMQYE
BASUB	-----	-----	-----	-----	-----	-----
BL	-----	-----	-----	-----	-----	-----
BPN	-----	-----	-----	-----	-----	-----
CARLS	-----	-----	-----	-----	-----	-----
DYCDIS	GQIIQDIPTT	KGIGDLRQDF	IIIFLLALLE	FVFSTISSWI	SGIVNEKMVM	RLQNKVFRAL
KABAYASHI	-G-----	-----	-----	-----	-----	-----E-
STRCOE	AVGAGPFPDG	VRGKAVLARL	TEGTEPAALA	QAAQDAGVKV	LFVTDAPG-	-RLMSWUGTD
TERMIT	-----	-----	-----	-----	-----	-----

	1270	1280	1290	1300	1310	1320
TVAG						
AHEALYI						
AQPHY						
ARTHAI						
BACER	INGHG-----	-----VWEQA	FLNPWEKSYD	IYFDRTQLQE	GKNTIHIVAT	DAAGNTSNLT
BASUB						
BL						
BPN						
CARLS						
DYCDIS	IAQDMGFFOK	NSAAVLMNVL	IVDTPMLRSS	LTGILLSVSV	GICKFVGSIV	FIFTISVKLS
KABAYASHI			-L-----	---DRAILGA	DVLTIE---	
STRCOE	DNADR-----	-----PLQIA	TVSAADARRL	HRAGRVDMTG	TRNTPYVVDL	SEGHEGAVPD
TERMIT						

	1330	1340	1350	1360	1370	1380
TVAG						
AHEALYI						
AQPHY						
ARTHAI						
BACER	VNLEVK-----					
BASUB						
BL						
BPN						
CARLS						
DYCDIS	LAFFATVPVL	AIVTQVQSKF	TKRLTRRLLE	HNSKASQHGQ	ESMVMHVVS	NYCKQDREIA
KABAYASHI						
STRCOE	RDLTYEPGHR	DLAVLRTRYH	AAEPSSGGEF	RYSLTDTFPI	GLGFRERIDY	PVERTEYVST
TERMIT						

	1390	1400	1410	1420	1430	1440
TVAG						
AHEALYI						
AQPHY						
ARTHAI						
BACER						
BASUB						
BL						
BPN						
CARLS						
DYCDIS	KYSEQLMMVF	QISRRLIINN	TFAASIKWLM	VESLAFIILY	FGAYLAIQKQ	FTVGLLVSFS
KABAYASHI						
STRCOE	GPGQLWHTV	TSAGEALEER	GGLSRVYRGS	RAELNWFKPV	WHPYLGTLG	WGQQRAGNRL
TERMIT						

	1450	1460	1470	1480	1490	1500
TVAG						
AHEALYI						
AQPHY						
ARTHAI						
BACER						
BASUB						
BL						
BPN						
CARLS						
DYCDIS	LYIGYVIDSS	TTLEGVYSSY	VQCLASATRV	FLILRSAPRK	RTTLEEEELD	NIIDTNQDNN
KABAYASHI						
STRCOE	QFNAPGWGDS	GPDHTGFGDV	WSESGMSQT	TSVYLDGEPV	DQGPSSAAYV	WDAPADEHTY
TERMIT						

	1510	1520	1530	1540	1550	1560
TVAG						
AHEALYI						
AQPHY						
ARTHAI						
BACER						
BASUB						
BL						
BPN						
CARLS						
DYCDIS	NNNNDDISD	SSSDDDDDNN	NNKNSKNNKT	KSGESDDSS	EDAEYKKNKN	KRNNGKMTTK
KABAYASHI						
STRCOE	RLVTDALDA	ARWPLATKGH	AEWTFRSAAT	PDDRWTFLPL	INLSFDVDTD	LAGKVRAGKK
TERMIT						

	1570	1580	1590	1600	1610	1620
TVAG						
AHEALYI						
AQPHY						
ARTHAI						
BACER						
BASUB						
BL						
BPN						
CARLS						
DYCDIS	LSNSPPLVGE	GIDNNNNNNN	DNNINDDNNQ	QDPNNNNNEI	DDGDGDDGDD	DDEGEDENNN
KABAYASHI						
STRCOE	LRIGLGAAYV	AGAPDTGKLG	GGKLEASYDG	GTTWHQVRLR	GGDGEASWYG	TLVPRDAEH
TERMIT						



	1630	1640	1650	1660	1670	1680
TVAG						
AHEALYI						
AQPHY						
ARTHAI						
BACER						
BASUB						
BL						
BPN						
CARLS						
DYCDIS	NNNNDDPNDN	NGIEHLTEKQ	LRKRKRQMKK	EFYKKTGISC	LELNLIPSAY	TELTECRGEI
KABAYASHI						
STRCOE	VSLRASARDD	RGGSVTQEIV	RAVAVR			
TERMIT						

	1690	1700	1710	1720	1730	1740
TVAG						
AHEALYI						
AQPHY						
ARTHAI						
BACER						
BASUB						
BL						
BPN						
CARLS						
DYCDIS	EFKNVFCYP	SRADVGVLVN	IDLKFESGKC	YGLVGPSGSG	KSTLLELISR	FYSLHPSGGK
KABAYASHI						
STRCOE						
TERMIT						

	1750	1760	1770	1780	1790	1800
TVAG						
AHEALYI						
AQPHY						
ARTHAI						
BACER						
BASUB						
BL						
BPN						
CARLS						
DYCDIS	IYMDGIDIAK	IRPSNLRSEV	TNVHQHPFLF	DATISENIGY	ALDNPTQEDI	IEAAKLANAH
KABAYASHI						
STRCOE						
TERMIT						



	1810	1820	1830	1840	1850	1860
TVAG						
AHEALYI						
AQPHY						
ARTHAI						
BACER						
BASUB						
BL						
BPN						
CARLS						
DYCDIS	EFIQSLPKQY	DTMLTDGGNL	SGGQKKRIAV	ARAICAKRRI	MLLDEITAEI	DPESEEAINK
KABAYASHI						
STRCOE						
TERMIT						

	1870	1880	1890	1900	1910	1920
TVAG						
AHEALYI						
AQPHY						
ARTHAI						
BACER						
BASUB						
BL						
BPN						
CARLS						
DYCDIS	SIKVLTRGHT	VVMVAHKVAA	VRDCDKIFVL	DKGOIVEQGT	HNQLMAKKGK	YYRMFAFSED
KABAYASHI						
STRCOE						
TERMIT						

	1930	1940	1950	1960	1970	1980
TVAG						
AHEALYI						
AQPHY						
ARTHAI						
BACER						
BASUB						
BL						
BPN						
CARLS						
DYCDIS	DDYAPLLVL					
KABAYASHI						
STRCOE						
TERMIT						

Figura 24.- Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de serín proteasas de la familia de las subtilisinas reportadas con la secuencia parcial de aminoácidos deducida de la serín proteasa de *Trichomonas vaginalis*. Las regiones conservadas para las subtilisinas se muestran encerradas en rectángulos, ● indica los aminoácidos conservados de la triada catalítica (Asp 338, Hist 408 y Ser 756, numeración de acuerdo a la subtilisina de *Dictyostelium discoideum*). Las abreviaturas utilizadas corresponden a los siguientes microorganismos: TVAG: *Trichomonas vaginalis*, AHEALYI: *Acanthamoeba healyi*, AQPHY: *Aquifex pyrophilus*, ARTHAI: *Arabidopsis thailiana*, BACER: *Bacillus cereus*, BASUB: *Bacillus subtilis*, BL: Subtilisina BL de *Bacillus lentus*, BPN: Subtilisina BPN' de *Bacillus amyloliquefaciens*, CARLS: Subtilisina de Carlsberg de *Bacillus licheniformis*, DYCDIS: *Dictyostelium discoideum*, KOBAYASHI: Subtilisina alcalina de *Bacillus subtilis* descubierta por Kobayashi y col., STRCOE: *Streptomyces coelicolor*, TERMIT: Termitasa de *Thermoactinomyces vulgaris*. Los guiones indican huecos o gaps y los puntos indican el final del alineamiento.

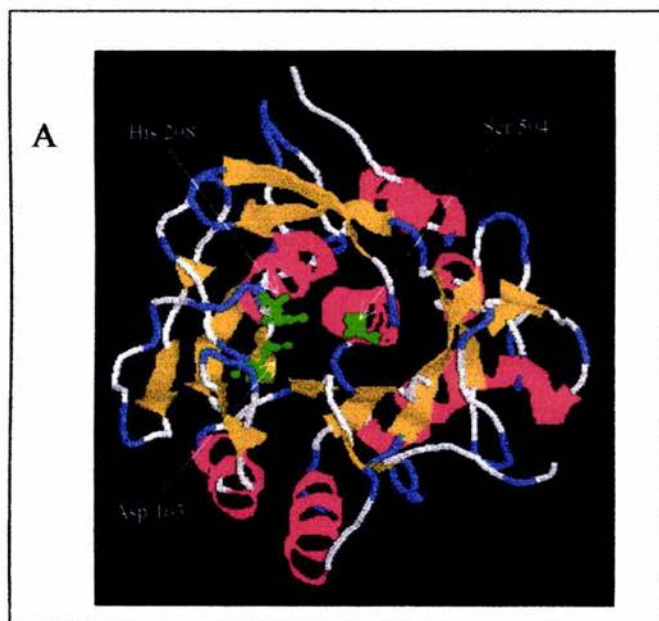
La secuencia parcial de aminoácidos de la serín proteasa de *T. vaginalis* posee los dominios consenso DSG, HGTH y GTS de todas las serín proteasas de la familia de las subtilisinas por lo que podemos decir que la serín proteasa de *T. vaginalis* pertenece a la familia de las subtilisinas.

Al comparar las posiciones de los aminoácidos de la triada catalítica de las serín proteasas, observamos que la mayoría de estas tienen el Aspartato (D) del dominio DSG, alrededor de la posición 32, la Histidina (H) del dominio HGTH, alrededor de la posición 64 y la Serina (S) del dominio GTS, alrededor de la posición 221, aunque se han reportado serín proteasas cuya triada catalítica no está necesariamente en estas posiciones (Ogawa y Susumo, 2003; Siezen y Leunissen, 1996). En la serín proteasa de *T. vaginalis* el Aspartato se encuentra en la posición 163, la Histidina en la posición 208 y la Serina en la posición 504.

## VI.7. MODELO ESTRUCTURAL TEÓRICO PARA LA SERÍN PROTEASA DE *Trichomonas vaginalis*.

Con la secuencia parcial de la serín proteasa de *T. vaginalis* se obtuvo un modelo estructural teórico en tercera dimensión (Figura 25) mediante el programa 3D PSSM Protein Fold Recognition ([www.sbg.bio.ic.ac.uk/~3dpssm/](http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/~3dpssm/)).

Comparando la posición de los residuos catalíticos en la serín proteasa de *T. vaginalis* con los residuos de la subtilisina BPN<sup>7</sup> en los modelos de listones (Fig. 25), se observa que el Asp 163, la His 208 y la Ser 504 de la serín proteasa de *T. vaginalis* están dispuestos de manera similar que el Asp 32, la His 64 y la Ser 221 de la subtilisina BPN<sup>7</sup>.



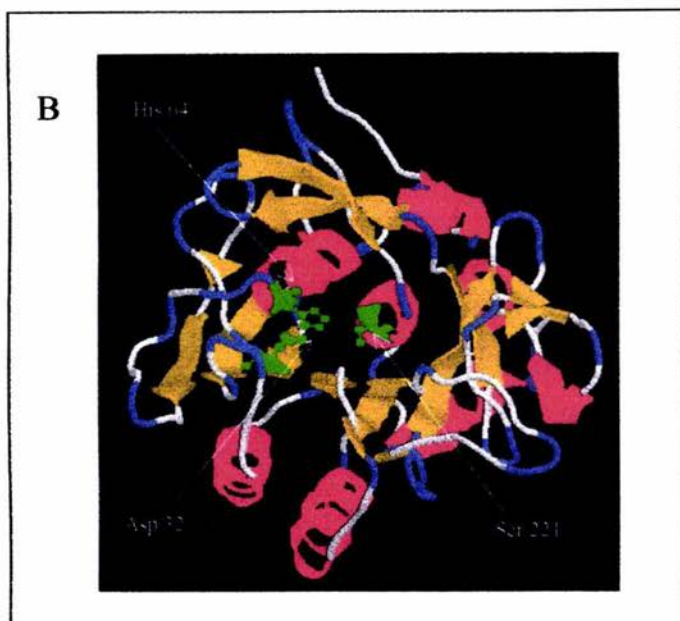


Figura 25.- Representación de listones de la estructura secundaria y terciaria de la serín proteasa de *T. vaginalis* modelada con el programa 3D PSSM (A) y de la estructura deducida por cristalografía de la subtilisina BPN' (B). los residuos catalíticos están representados con esferas y bastones (en verde).

Al comparar el potencial de carga en la superficie del sitio activo de la serín proteasa de *T. vaginalis* con el potencial de carga en la superficie de la subtilisina BPN' (Figura 26), observamos que ambas enzimas tienen una densidad de carga negativa en el sitio activo. Este puede ser un factor determinante para la unión adecuada del sustrato, ya que se ha demostrado que las interacciones electrostáticas son más dominantes que las interacciones hidrofóbicas, ya que son aquellas las que restringen la especificidad para ciertos sustratos (Van de Ven y col., 1990; Creemers y col., 1993; Lipkind y col, 1995; Siezen y col., 1994; Perona y Craik, 1995). Se puede ver que la conformación del sitio activo no es idéntica en las dos enzimas debido a que cada una tiene diferentes residuos de aminoácidos alrededor de las secuencias consenso que caracterizan a las subtilisinas; esta diferencia conformacional podría sugerir una especificidad de sustrato particular de la serín proteasa de *T. vaginalis*. Sin embargo, los aminoácidos de la triada catalítica parecen estar en la posición correcta para llevar a cabo la catálisis.

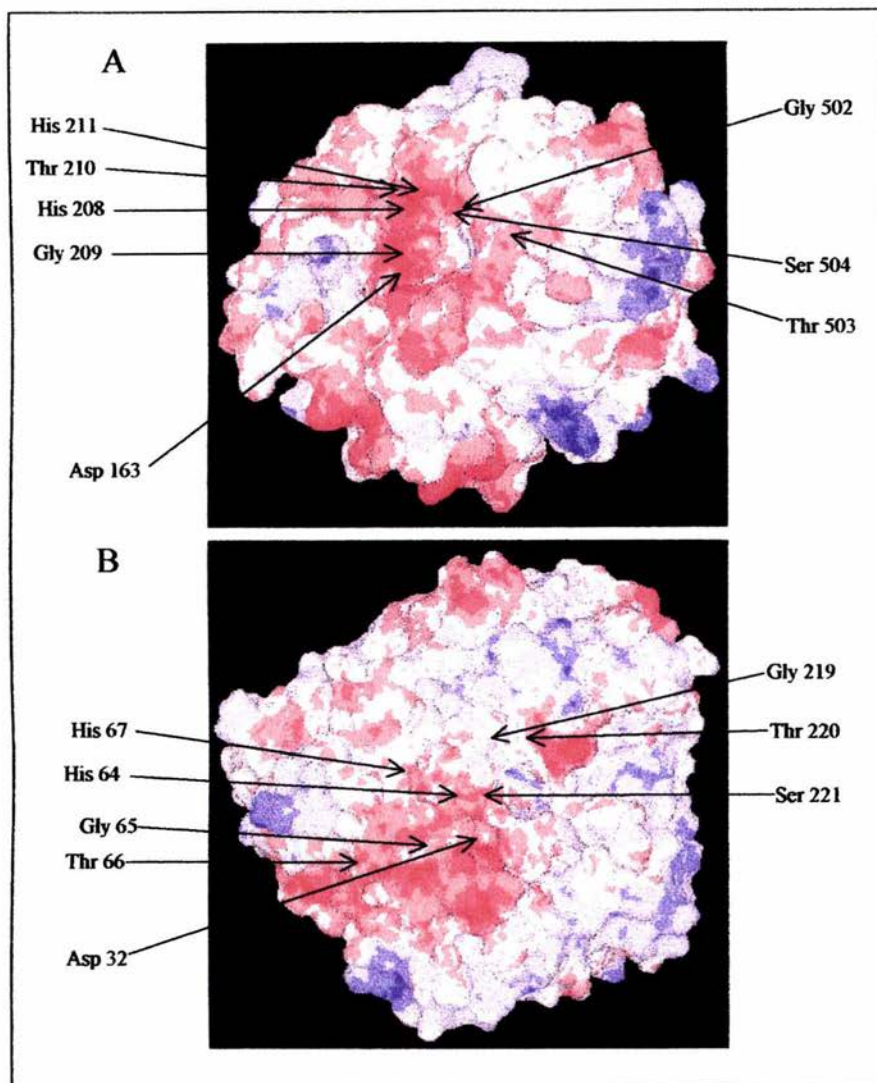


Figura 26.- Modelado de la superficie molecular de la serín proteasa de *T. vaginalis* (A) y de la subtilisina BPN' (B). Las flechas indican los residuos de Aspartato (Asp 163 en *T. vaginalis* y Asp 32 en la subtilisina BPN') y los residuos de las cajas HGTH (His 208, Gly 209, Thr 210, His 211 en *T. vaginalis*; His 64, Gly 65, Thr 66, His 67 en la subtilisina BPN') y GTS (Gly 502, Thr 503, Ser 504 en *T. vaginalis*; Gly 219, Thr 220, Ser 221 en la subtilisina BPN'). El potencia eléctrico de la superficie molecular tiene el siguiente código de colores: rojo negativo, azul positivo y blanco no polar.

## VII. DISCUSIÓN.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo indican que la región rica en G+C localizada en extremo 3' de la clona genómica 8ª corresponde a un gen que codifica para una serín proteasa, lo cual confirma la aseveración de que en el genoma de *T. vaginalis* las regiones codificadoras tienen un contenido mayor que las regiones no codificadoras.

Este es el primer gen que codifica para una serín proteasa que se ha reportado en *Trichomonas vaginalis*; en este parásito solamente se han reportado proteasas de tipo metalo y cisteín proteasas. Esta serín proteasa podría ser importante para la invasividad y para la evasión de la respuesta inmune por parte del parásito, debido a que en otras enfermedades parasitarias se ha reportado que las proteasas de tipo serín son capaces de degradar proteínas presentes en la matriz extracelular y evadir la respuesta inmune por medio de la degradación de inmunoglobulinas. Las proteasas reportadas de *T. vaginalis* han sido detectadas por medio de su actividad en geles de sustrato y posteriormente se han buscado los genes en bibliotecas de cDNA y bibliotecas genómicas con ayuda de oligonucleótidos degenerados diseñados a partir de las secuencias de aminoácidos conservadas en las proteasas. En contraste, en el presente trabajo se identificó un gen que codifica para una proteasa y queda pendiente la identificación bioquímica de la actividad de esta enzima en extractos de *T. vaginalis*.

El gen de la serín proteasa de *T. vaginalis* es un gen único. Al inicio de este proyecto se tenían secuenciadas 1662 pb contenidas en la clona genómica 8A. Este gen se expresa dando un transcrito de aproximadamente 2.2 Kb. Con base en el tamaño aproximado del transcrito, se estimó que el gen completo de la serín proteasa de *Trichomonas vaginalis* tendría un tamaño similar debido a la ausencia de intrones en el genoma de este parásito, por lo que en teoría, faltarían de secuenciar alrededor de 550 pb aproximadamente para tener secuenciado el gen completo.

Como una primera aproximación para encontrar la secuencia faltante, se realizó, por una parte, un escrutinio de una biblioteca de cDNA de *T. vaginalis* y por otra la amplificación rápida de extremos 3' de cDNA (3'RACE); los datos negativos que resultaron de estos dos ensayos podrían indicar que este gen se transcribe poco o bien que



este gen se expresa en una determinada etapa del crecimiento del parásito o bajo condiciones de crecimiento específicas.

Con base en el mapa de restricción construido a partir del análisis de Southern blot hecho con ADN genómico de *Trichomonas vaginalis* (Figura 16), se decidió hacer una biblioteca genómica parcial con las enzimas de restricción *Hind* III y *Bgl* II para clonar un fragmento de aproximadamente 1700 pb que contendría la secuencia faltante. De esta biblioteca se obtuvo la clona positiva 9.2 con un tamaño de aproximadamente 6800 pb formada por un mosaico de fragmentos *Hind* III-*Bgl* II de ADN genómico, dentro de los cuales estaba clonado un fragmento de aproximadamente 1700 pb que hibridaba con la sonda homóloga de la serín proteasa. Ya secuenciado, este fragmento tiene un tamaño de 1528 pb; la secuencia de este fragmento se ensambló con la secuencia parcial del gen de la serín proteasa contenida en la clona 8A de *T. vaginalis* resultando un empalme perfecto de 402 pb. De la secuencia del fragmento de 1528 pb se obtuvieron 664 pb y se dedujeron 220 residuos de aminoácidos adicionales a los ya conocidos que siguen formando parte del ORF de la serín proteasa. Este ORF sigue abierto, ya que no se encontró un codón de término de la traducción en fase. Con los datos que se tienen del northern blot, estimamos que la secuencia faltante para completar el ORF es muy poca.

Aunque todavía no se tiene la secuencia completa para este gen, al hacer el alineamiento de la secuencia de aminoácidos de la serín proteasa de *T. vaginalis* con las secuencias de aminoácidos de otras serín proteasas pertenecientes a la familia de subtilisinas ya reportadas (Figura 24), se observa que los dominios consenso DSG, HGTH y GTS alinean perfectamente, por lo que la serín proteasa de *T. vaginalis* pertenece a la familia de las subtilisinas. Cabe mencionar que la homología esta serín proteasa con las subtilisinas de bacterias podría apoyar la divergencia evolutiva temprana de *T. vaginalis*.

En cuanto a que los residuos catalíticos Asp, His y Ser de la proteasa de *T. vaginalis* no se encuentran en las mismas posiciones que en la mayoría de las subtilisinas reportadas, podemos decir que este no es un requisito indispensable ya que se han reportado serín proteasas cuya triada catalítica no está necesariamente en estas posiciones debido a las secuencias adicionales insertadas entre estos (Ogawa y Susumo, 2003; Siezen y Leunissen, 1996), las cuales determinan la especificidad por su sustrato. Al comparar los modelos estructurales (Figura 25) de la proteasa de *T. vaginalis* con la subtilisina BPN', se observa

que los residuos de la triada catalítica y las estructuras secundarias  $\alpha$  hélice y hoja  $\beta$  están dispuestos de manera similar; por otra parte la densidad de carga negativa en la superficie del sitio activo de ambos modelos es igual (Figura 26). Esta densidad de carga juega un papel determinante tanto en la unión como en la especificidad del sustrato (Van de Ven y col., 1990; Creemers y col., 1993; Lipkind y col., 1995; Siezen y col., 1994; Perona y Craik, 1995). Aunque la conformación del sitio activo no es idéntica en las dos enzimas, debido a que cada una tiene diferentes residuos de aminoácidos alrededor de las secuencias consenso, esta diferencia conformacional podría sugerir una especificidad de sustrato particular de la serín proteasa de *T. vaginalis* pero no un impedimento para llevar a cabo la catálisis, ya que los aminoácidos de la triada catalítica parecen estar en la posición correcta.

### **VIII. CONCLUSIONES.**

- Esta es la primera proteasa de tipo serín que se reporta en *Trichomonas vaginalis*.
- El marco lectura abierto contiguo al gen de actina encontrado en la clona genómica 8A, corresponde a una serín proteasa.
- El gen que codifica para una serín proteasa en *Trichomonas vaginalis* es un gen único.
- Este gen se expresa dando un transcrito de aproximadamente 2.2 Kb.
- Hasta ahora el ORF incompleto de la serín proteasa de *Trichomonas vaginalis* tiene una longitud de 2,326 pb y codifica para 776 residuos de aminoácidos.
- La secuencia de aminoácidos parcial deducida de la serín proteasa de *Trichomonas vaginalis* pertenece a la familia de las subtilisinas ya que las secuencias consenso donde se encuentran los aminoácidos de la triada catalítica alinean con las secuencias conservadas de subtilisinas ya reportadas.
- No se obtuvo la secuencia nucleotídica completa del gen de la serín proteasa de *T. vaginalis* pero se lograron secuenciar 664 pb adicionales y conocer 220 residuos de aminoácidos.
- Se propuso un modelo estructural en el cual se observa el mismo potencial eléctrico en el sitio activo y los residuos de la triada catalítica en conformación similar que en la estructura cristalográfica de la subtilisina BPN'.



## **IX. PERSPECTIVAS.**

1. Realizar el escrutinio de la biblioteca genómica de *T. vaginalis* hecha con la enzima de restricción Eco RI para encontrar la secuencia del extremo 3' del gen de la serín proteasa.
2. Determinar la expresión del gen de la serín proteasa en distintas condiciones de cultivo.
3. Determinar el sitio de inicio de la transcripción para el gen de la serín proteasa.
4. Caracterizar bioquímicamente a la serín proteasa de *T. vaginalis*.
5. Determinar el papel de la serín proteasa en la patogénesis de la trichomonosis.

## X. REFERENCIAS.

- 1.- Alderete JF, Provenzano D, Leher MW. Iron mediates *Trichomonas vaginalis* resistance to complement lysis. *Microb Pathog* 1995; 19:93-103.
- 2.- Alvarez-Sánchez, (et al). A novel cysteine proteinase (CP65) of *Trichomonas vaginalis* involved in cytotoxicity. *Microbial Pathogenesis* 2000; 28: 193-202.
- 3.- Arroyo R, Gonzalez Robles A, Martinez-Palomo A., Alderete JF. Signalling of *Trichomonas vaginalis* for ameboid transformation and adhesin synthesis follows cytoadherence. *Mol Microbiol* 1993, 7:299-309.
- 4.- Arroyo R., Alderete JF: *Trichomonas vaginalis* surface proteinase activity is necessary for parasite adherence to epithelial cells. *Infect Imm* 1989, 57:2991-2997.
- 5.- Asociación Nacional de Infectología y Microbiología Clínica. Programa de actualización continua en infectología. Hoechst.
- 6.- Benchimol M, de Souza W. Carbohydrate involvement in the association of a prokariotic cell with *Trichomonas vaginalis* and *Tritrichomonas foetus*. *Parasitol Res* 1995; 81 (6): 459-64.
- 7.- Bóznér P, Demes P: Proteinases en *Trichomonas vaginalis* and *Tritrichomonas mobilensis* are not exclusively of cysteine type; *Parasitology*;1991; 102:113-115.
- 8.- Bozner P. Immunological detection and subcellular localization of Hsp70 and Hsp60 homologs in *Trichomonas vaginalis*. *J Parasitol.* 1997 Apr;83(2):224-9.
- 9.- Bozner P. The heat shock response and major heat shock proteins of *Tritrichomonas mobilensis* and *Tritrichomonas augusta*. *J Parasitol.* 1996 Feb;82(1):103-11.
- 10.- Bricheux G. Brugerolle G., Molecular cloning of actin genes in *Trichomonas vaginalis* and phylogeny inferred from actin sequences. *FEMS Microbiol Lett* 1997; 153: 205-213.
- 11.- Brugerolle G. Ultrastructure of the genus *Enteromonas da fonseca* (*Zoomastigophorea*) and revision of the order of *Diplomonadida* Wenyon. *J Protozool* 1975 Nov; 22(4): 468-75.
- 12.- Creemers JWM, Siezen RJ, Roebroek AJM, Ayoubi TAY, Heylebroek D, Van de Ven WJM. Modulation of furin-mediated proprotein processing activity by site-directed mutagenesis. *J Biol Chem* 1993; 268: 21826-21834.
- 13.- Dailey DC, Chang TH, Alderete JF: Characterization of *Trichomonas vaginalis* haemolysis. *Parasitology* 1990; 101: 171-175.

- 14.- Dailey DC, Te-Hung C, Alderete JF: Characterization of *Trichomonas vaginalis* hemolysis. Parasitol 1990 101:171-175.
- 15.- Delgado-Viscogliosi P, Brugerolle G, Viscogliosi E. Tubulin post-translational modifications in the primitive protist *Trichomonas vaginalis*. Cell Motil Cytoskeleton. 1996;33(4):288-97.
- 16.- Duk-Young MIN, et al. Degradations of human immunoglobulins and hemoglobin by a 60 kDa cysteine proteinase of *Trichomonas vaginalis*. The Korean journal of parasitology. 1998, 36(4): 261-68.
- 17.- Edgell DR, Malik SB, Doolittle WF. Evidence of independent gene duplications during the evolution of archeal and eukaryotic family B DNA polymerases. Mol Biol Evol 1998; 15: 1207-1217.
- 18.- Embley TM, Hirt RP. Early branching eukaryotes? Curr Opin Genet Dev 1998; 8:624-629.
- 19.- Engbring JA, Alderete JF. Characterization of *Trichomonas vaginalis* AP33 adhesin and cell surface interactive domains. Microbiology. 1998 Nov;144 ( Pt 11):3011-8.
- 20.- Engbring JA, O'Brien JL, Alderete JF. *Trichomonas vaginalis* adhesin proteins display molecular mimicry to metabolic enzymes. Adv Exp Med Biol. 1996;408:207-23
- 21.- Fiori PL, Rapelli P, Addis MF, Mannu F, Cappuccinelli P. : Caontact.dependent disruption of the host cell membrane skeleton induced by *Trichomonas vaginalis*. Infect Immun. 1997; 65:5142-5148.
- 22.- Fiori PL, Rappelli P, Rocchigiani AM, Capuccinelli P: *Trichomonas vaginalis* haemolysis: evidence of functional pores formation on red cells membranes. FEMS Microbiol Lett 1993, 109:13-18.
- 23.- Furtado MB, Benchimol M.: Observation of membrane fusion on the interaction of *Trichomonas vaginalis* with human vaginal epithelial cells. Parasitol Res. 1998; 84:213-220.
- 24.- Garber (et al): Association of production of cell-detaching factor with the clinical presentation of *Trichomonas vaginalis*. J Clin Microbiol 1990, 28:2415-2417.
- 25.- Garber GE (et al): Characterization and purification of extracellular proteases of *Trichomonas vaginalis*. Can J Microbiol 1989, 35:903-909.

- 26.- Garber GE (et al): Isolation of cell detaching factor of *Trichomonas vaginalis*. J Clin Microbiol 1989, 27:1548-1553.
- 27.- Garber GE, Lemchuk-Favel LT, Bowie WR: Isolation of a cell detaching factor of *Trichomonas vaginalis*. J Clin Microbiol 1989, 27:1548-1553.
- 28.- Gardner WA, Culberson DE, Bennett BD. *Trichomonas vaginalis* in the prostate gland. Arc Pathol Lab Meb 1986; 110:430-432.
- 29.- Germot A, Phillippe H. Critical analysis of eukaryotic phylogeny: a case study based on the HSP70 family. J Eukaryot Microbiol 1999; 46:116-124.
- 30.- Gros P, Betzel Ch, Dauter Z, Wilson KS, Hol WGJ. Molecular dynamics refinement of a thermitase-eglin-c complex at 1.98 Å resolution and comparison of two crystal forms that differ in calcium content. J Mol Biol 1989; 210: 347-367.
- 31.- Hashimoto T, Sanchez LB, Shirakura T, Muller M, Hashegawa M. Secondary absence of mitochondria in *Giardia lamblia* and *Trichomonas vaginalis* revealed by valyl-RNAt synthetase phylogeny. Proc Natl Acad Sci USA 1998; 95:6860-6865.
- 32.- Heine P. McGregor JA. *Trichomonas vaginalis*; a reemerging pathogen. Clin Obstet Gynecol 1993; 36:137-144.
- 33.- Heine RP, Wiesenfeld HC, Sweet RL, Witkin SS. Polymerase chain reaction analysis of distal vaginal specimens: a less invasive strategy for detection of *Trichomonas vaginalis*. Clin Infect Dis 1997; 24:985-987.
- 34.- Heinz DW, Priestle JP, Rahuel J, Wilson KS, Gruter MG. Refined crystal structures of subtilisin Novo in complex with wild-type and two mutant eglins: Comparison with other serine proteinase inhibitor complexes. J Mol Biol 1991; 217: 353-371.
- 35.- Hobbs MM, Kazembe P, Reed AW, Miller WC, Nkata E, Zimba D, et al. *Trichomonas vaginalis* as a cause of urethritis in Malawian men. Sex Trasm Dis 1999; 26: 381-387.
- 36.- Hong Y, Kong H, Ock M, Kim I, Chung D: Isolation and characterization of a cDNA encoding a subtilisin-like serin proteinase (AhSUB) from *Acanthamoeba healyi*. Molecular and Biochemical Parasitology; 2000; 111:441-446.
- 37.- Honigberg BM, King VM. Structure of *Trichomonas* Donn'e. J Parasitol 1964 Jun; 50: 345-64.
- 38.- Honigberg BM, Nadler SA. Genetic differentiation and biochemical polymorphism among *trichomonads*. J Parasitol 1988 Oct; 74(5): 797-804.

- 39.- Honigberg BM. Evolutionary and systematic relationship in teh flagellate order *Trichomonadida* kirby. J Protozool 1963 Feb; 10: 20-63.
- 40.- Irvine WJ, North MJ, Coombs GH: Use of inhibitors to identify essential cysteine proteinases of *Trichomonas vaginalis*. FEMS Microbiology Letters. 1997, 149:45-50.
- 41.- Johnson PJ, d'Oliveira CE, Gorrell TE, Muller M. Molecular analysis of the hydrogenosomal ferredoxin of the anaerobic protist *Trichomonas vaginalis*. Proc Natl Acad Sci U S A. 1990 Aug;87(16):6097-101.
- 42.- Karen Meysick, Gary E. Garber: *Trichomonas vaginalis*. Current Opinion in Infectious Diseases 1995, 8:22-25.
- 43.- Katiyar SK, Visvesvara GS, Edlind TD. Comparisions of ribosomal RNA sequences from amitochondrial protozoa: implications for processing, mRNA binding and paromomycin susceptibility. Gene 1995; 152:27-33.
- 44.- Krieger JN (et al): Beta-hemolytic activity of *Trichomonas vaginalis* correlates with virulence. Infect Immun 1983, 41:1291-1295.
- 45.- Kulda J, Tachezy J, Cerkasovova A: In-vitro induced anaerobic resistance to metronidazole in *Trichomonas vaginalis*. J Eukariot Microbiol 1993, 40:262-269.
- 46.- Lathi CJ, d'Oliveira CE, Johnson PJ. Beta-succinyl-coenzyme A synthetase from *Trichomonas vaginalis* is a soluble hydrogenosomal protein with an amino-terminal sequence that resembles mitochondrial presequences. J Bacteriol. 1992 Nov;174(21):6822-30.
- 47.- Lheker MW and Alderete JF: Biology of trichomonosis. Current Opinion of Infectious Diseases 2000, 13:37-45.
- 48.- Lehker MW, Alderete JF: Iron regulates growth of *Trichomonas vaginalis* and the expression of immunogenic Trichomonad proteins. Mol Microbiol 1992, 6:123-132.
- 49.- Lehker MW, Chang TH, Dailey DC, Alderete JF. Specific erythrocyte binding is an additional nutrient acquisition system for *Trichomonas vaginalis*. J Exp Med. 1990 Jun 1;171(6):2165-70.
- 50.- Lehker MW, Chang TH, Daitey DC, Alderete JF. Specific erithrocyte binding is an additional nutrient acquisition system for *Trichomonas vaginalis*. J Exp Med 1990 Jun 1; 171(6): 2165-70.

- 51.- Lipkind G, Gong Q, Steiner DF. Molecular modeling of the substrate specificity of prohormone convertases SPC2 and SPC3. *J Biol Chem* 1995; 270: 13277-13284.
- 52.- M. Sajid, McKerrow JH: Cysteine proteases of parasitic organisms. *Molecular and Biochemical Parasitology*; 2002; 120:1-21.
- 53.- Madico G, Quinn TC, Rompalo A, McKee KT Jr, Gaydos CA. Diagnosis of *Trichomonas vaginalis* infection by PCR using vaginal swab samples. *J Clin Microbiol* 1998; 36: 3205-3210.
- 54.- Mallison DJ, Lockwood BC, Coombs GH, North JM: Identification and molecular cloning of four cysteine proteinase genes from the pathogenic protozoon *Trichomonas vaginalis*. *Microbiology*. 1994, 140:2725-2735.
- 55.- McPhalen CA, James MNG. Structural comparison of two serine proteinase-protein inhibitor complexes: Eglin-C-subtilisin Carlsberg and CI-2-subtilisin Novo. *Biochemistry* 1998; 27: 6582-6598.
- 56.- Mendoza-López M.R, Rossana Arroyo, et al: CP30, a cysteine proteinase involved in *Trichomonas vaginalis* cytoadherence. *Infection and Immunity*. Sept. 2002:4907-4912.
- 57.- Mertens E, Ladrer US, Lee JA, Miretsky A, Morris A, Rozario C, et al. The pyrophosphate-dependent phosphofructokinase of the protist, *Trichomonas vaginalis*, and the evolutionary relationship of protist phosphofructokinases. *J Biol Evol* 1998; 47:739-750.
- 58.- Min DY, Hyun KH, Ryu KS, Ahn MH, Cho MH: Degradations of human immunoglobulins and hemoglobin by 60 KDa cysteine proteinase of *Trichomonas vaginalis*. *Korean J Parasitol* 1998; 36:261-268.
- 59.- Norma Espinosa, Roberto Hernández, Lorena López Griego, Imelda Lopez-Villaseñor. Separable putative polyadenylation and cleavage motifs in *Trichomonas vaginalis* mRNAs. *Gene* 2002.
- 60.- Norma Espinosa, Roberto Hernández, Lorena López Griego, Rossana Arroyo, Imelda Lopez-Villaseñor. Differences between coding and non coding regions in the *Trichomonas vaginalis* genome: an actin gene as a locus model. *Acta Tropica* 2001; 78: 147-154.
- 61.- O'Brien JL, et al. Molecular characterization of a third malic enzyme-like AP65adhesine gen in *Trichomonas vaginalis*. *Microb Pathog* 1996 Jun; 20(6): 335-49.

- 62.- Ogawa A, (et al). Nucleotide and deduced amino acid sequences of a high-molecular-mass subtilisin from an alkaliphilic *Bacillus* isolate. *Biochemica Et Biophysica Acta* 2003; 1624:109-114.
- 63.- Perona JJ, Craik CS. 1995. Structural basis of the substrate specificity in the serine proteases. *Prot Sci* 1995; 4: 337-360.
- 64.- Pindak FF (et al): Contact-independent cytotoxicity of *Trichomonas vaginalis*. *Genitourin Med* 1993, 69:35-40.
- 65.- Provenzano D, Alderete JF. Analysis of human immunoglobulin-degrading cysteine proteinases of *Trichomonas vaginalis*. *Infect Immun*. 1995 Sep;63(9):3388-95.
- 66.- Provenzano D, Khoshnan A, Alderete JF. Involvement of RNA virus in the protein composition and growth kinetics of host *Trichomonas vaginalis*. *Arch Virol* 1997; 142(5): 939-52.
- 67.- Quon DVK, D'Oliveira CE, Johnson PJ: Reduced transcription of the ferredoxin gene in metroimidazole-resistant *Trichomonas vaginalis*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992, 89:4402-4406.
- 68.- Quon VK Doris, Delgadillo G María, Kachi Anita, Smale T Stephen, Johnson Patricia. Similarity between a ubiquitous promoter element in an ancient eukaryote and mammalian initiator elements. *Biochemistry* 1994; 91: 4579-4583.
- 69.- Rawlings ND, Barret AJ. 1994. Families of serine peptidases. *Methods Enzymol* 244: 19-61.
- 70.- Riley DE, et al. *Trichomonas vaginalis* and early involving DNA and protein sequences of the CDC2/28 protein kinase family. *Mol Microbiol* 1993 May; 8(3): 517-9.
- 71.- Riley DE, Krieger JN, Miner D, Pauinovitch PS. *Trichomonas vaginalis* dominant G2 period and G2 phase arrest in a representative of an early branching eukaryote lineage. *J Eukaryot Microbiol*. 1994 Jul-Aug; 41(4): 408-14.
- 72.- Roger AJ, Sandblom O, Doolittle WF, Phillippe H. An evaluation of elongation factor 1 alpha as a phylogenetic marker for eukariotes. *Mol Biol Evol* 1999; 16:218-223.
- 73.- Rossana Arroyo. *Biología molecular de la trichomonosis*. Departamento de Patología Experimental. IPN: 287-301.

- 74.- Sajid M, McKerrow JH. Cysteine proteases of parasitic organisms. *Mol Biochem Parasitol*. 2002 Mar;120(1):1-21. Review. Erratum in: *Mol Biochem Parasitol* 2002 Apr 30;121(1):159.
- 75.- Sakanari JA, Staunton CE, Eakin AE, Craik SC, McKerrow JH: Serine proteases from nematode and protozoan parasites: Isolation of sequence homologs using generic molecular probes. *Biochemistry* 1989; 86:4863-4867.
- 76.- Salter JP, Lim KC, Hansell E, Hsie I, McKerrow JH: *Schistosoma* invasion of human skin and degradation of dermal elastin are mediated by a single serine protease. *The Journal of Biological Chemistry*; 2000; 275:38667-38673.
- 77.- Sherrard J. National guidelines for the management of *Trichomonas vaginalis* Sex Transm Inf 1999; 75:S21-S23.
- 78.- Shiao MF, Lin PR, Liu JY. Colorimetric one tube nested PCR for detection of *Trichomonas vaginalis* in vaginal discharge. *J Clin Microbiol* 1997; 35:132-138.
- 79.- Siezen RJ, Creemers JWM, van de Ven WJM. Homology modelling of the catalytic domain of human furin. A model for the eukaryotic subtilisin like proprotein convertases. *Eur J Biochem*. 1994; 222: 255-226.
- 80.- Siezen RJ, Leunissen JAM. Subtilases: The superfamily of subtilisin-like serine proteases. *Protein Science* 1997; 6:501-523.
- 81.- Siezen RJ, Rollema HS, Kuipers OP, Vos WM. Homology modelling of the *Lactococcus lactis* leader peptidase NisP and its interaction with the precursor of the lantibiotic nisin. *Protein Eng* 1995; 8:117-125.
- 82.- Takeuchi Y et al. Molecular recognition at the active site of subtilisin BPN': Crystallographic studies using genetically engineered proteinaceous inhibitor SSI (*Streptomyces* subtilisin inhibitor). *Protein Eng* 1991a; 4: 501-508.
- 83.- Takeuchi Y et al. Refined crystal structure of the complex of subtilisin BPN' and *Streptomyces* subtilisin inhibitor at 1.8 Å resolution. *J Mol Biol* 1991b; 221: 309-325.
- 84.- Van den Ven WJM, Voorberg J, Fontijn R, Pannekoek H, Ouweland AMW van den, et al. Furin in a subtilisin-like proprotein processing enzyme in higher eukaryotes. *Mol Biol Rep*. 1990; 14: 265-275.



- 85.- Viscogliosi E. Muller M. Phylogenetic relationships of the glycolytic enzyme, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, from parabasalid flagellates. J Mol Evol 1998; 47:190-199.
- 86.- Wang AL, Wang CC, Alderete JF: *Trichomonas vaginalis* phenotypic variation occurs only among trichomonads infected with the double-stranded RNA virus. J Exp Med 1987, 166:142-150.
- 87.- Wang AL, Wang CC. Isolation and characterization of DNA from *Tritrichomonas foetus* and *Trichomonas vaginalis*. Mol Biochem Parasitol. 1985 Mar, 14(3): 323-25.

## **XI. APÉNDICE.**

### **- AGAROSA AL 1%.**

Para 100ml.  
1g de Agarosa  
Llevar a 100ml con TAE 1X.

### **- AGAROSA AL 0.8%**

0.8g de Agarosa  
Llevar a 100ml con TAE 1X.

### **- TRIS 1M pH=7.4.**

Para 100ml.  
12.114g de Tris base  
100ml de H<sub>2</sub>O bidestilada.  
Ajustar el pH a 7.4 con HCl.  
Esterilizar.

### **- EDTA 0.5M pH=7.4.**

Para 50ml.  
10.405g de EDTA.  
50ml de H<sub>2</sub>O bidestilada.  
Ajustar el pH a 7.4 con HCl.  
Esterilizar.

### **- SDS 10%.**

Para 100ml.  
10g de SDS.  
Llevar a 100ml con H<sub>2</sub>O bidestilada.  
Esterilizar.

### **- NaOH 10M.**

Para 20ml.

8g de NaOH.  
Llevar a 20 ml con H<sub>2</sub>O bidestilada.

**- T.E. (Tris 10mM+EDTA 0.2mM).**

Para 50ml.  
0.5ml de Tris 1M pH 7.4.  
0.02ml de EDTA 0.5M pH 7.4.  
Llevar a 50ml con H<sub>2</sub>O bidestilada.  
Esterilizar.

**- TAE 50X.**

Para 500ml.  
121.0g de tris base.  
28.55ml de Ac. Acético glacial.  
50 ml de EDTA 0.5M pH=8.

**- TRIS 1M pH=8.**

Para 100ml.  
12.114g de Tris base  
100ml de H<sub>2</sub>O bidestilada.  
Ajustar el pH a 8.  
Esterilizar.

**- MEDIO LB LÍQUIDO(100 ml).**

10g de Peptona.  
5g de extracto de levadura.  
5g de NaCl.  
0.3ml de NaOH 10M.  
10 ml de Tris pH=8 1M.

Nota: Para el sólido se le adicionan 15g de agar a 1000ml de medio líquido.

**- SOLUCIONES PARA LA EXTRACCIÓN DE ADN PLASMÍDICO.**

**Solución I**

Glucosa 50mM .  
Tris pH 8 25mM  
EDTA pH 8 10mM.  
H<sub>2</sub>O cbp. 100ml.  
Se preparan 100ml, y se esterilizan.

**Solución II**

	5mls
-NaOH 0.2N.	0.1ml de NaOH 10M
-SDS 1%.	0.5ml de SDS 10%
	4.4ml deH <sub>2</sub> O

**Solución III**

Acetato de potasio 5M	60ml.
-----------------------	-------

Acido acético glacial 11.5ml  
Agua destilada 28.5ml.

**- MEDIO DE CULTIVO TYM.**

Preparar 500ml.

-Bacto tryptone 10g.  
-Extracto de levadura 5g.  
-Maltosa 2.5g.  
-L-cisteína 0.5g.  
-Acido ascórbico 0.1g.  
-KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.4g.  
-K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.4g.  
-H<sub>2</sub>O<sub>bd</sub> 450ml.

Se ajusta a pH de 6.2 con HCl.

Se ajusta a 500ml en H<sub>2</sub>O<sub>d</sub>

Alicuotar y esterilizar.

Antes de usar agregar 10% de suero de caballo.

**- PBS pH 7.4(1000ml).**

NaCl 8g.  
KCl 0.2g.  
Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1.44g.  
KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.24g.

Llevar a 1000ml con agua bidestilada.

**- BUFFER DE EXTRACCIÓN(100ml),**

-SDS 10% 2ml.  
-NaCl 5M 2ml.  
-EDTA 0.5M pH8 2ml.  
-Tris 1M pH 8 1ml.  
-H<sub>2</sub>O 93ml

**- NaCl 5M(50ml).**

-NaCl 14.61g.  
-Llevar a 50 ml con H<sub>2</sub>O<sub>d</sub>.

**- ACETATO DE SODIO 3M(50ml).**

-CH<sub>3</sub>COONa 12.305g  
-Llevar a 50 ml con H<sub>2</sub>O<sub>d</sub>.

**- SOLUCIÓN DE TRANSFERENCIA (1M NH<sub>4</sub>CH<sub>3</sub>CO<sub>2</sub>, 1M NH<sub>4</sub>OH, 0.02N NAOH)..**

-57.5 ml de ácido acético concentrado.  
-140.8ml de hidróxido de amonio concentrado.  
-2ml de hidróxido de sodio 10 N.  
-Llevar a 1L con agua bidestilada.

**- SOLUCIÓN DE HIBRIDACIÓN:**

<b>Concentración final.</b>	<b>Stock.</b>	<b>Para 9.5ml.</b>
Tris 50mM pH 7.4	1M	0.5ml
Denhardt's 5X	100X	0.5ml
Formamida 50%	100%	5ml
SDS 1%	10%	1ml
SSC 5X	20X	2.5ml

**- SOLUCIÓN DESNATURALIZANTE.**

-4.83 g de NaCl.

-25 ml de NaOH 10 N.

Llevar a 500 ml con agua bidestilada.

**- SOLUCIÓN DE NEUTRALIZACIÓN.**

-125 ml de Tris/HCl 2 M pH= 7.5.

-87.66 g de NaCl

Llevar a 500 ml con agua bidestilada.

**- REACTIVOS Y SOLUCIONES NECESARIAS PARA EL ANÁLISIS DE NORTHERN-BLOT.**

**AGUA DEPC.**

Adicionar 5 gotas de dietilpirocarbonato por cada litro de agua.

Agitar toda la noche.

Esterilizar junto con todo el material utilizado.

**GEL DE AGAROSA 1%(DE 14X11cm)**

-1 g de agarosa.

-16.2ml de formaldehído al 37% (Concentración final).

-73ml de H<sub>2</sub>O DEPC.

-10ml de buffer MOPS/EDTA 10X a Temperatura ambiente.

-Dejar el gel solidificando de 2 ½ a 3 horas (Todo el material debe estar estéril).

**BUFFER DE ELECTROFORESIS.**

Para 800ml de MOPS/EDTA 1X:

-80ml de MOPS/EDTA 1X.

-720ml de H<sub>2</sub>O DEPC

**BUFFER DE TRANSFERENCIA.**

-SSC 10X en agua-DEPC.

**BUFFER DE FOSFATOS 1.2M:**

-8.51g de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> disolver en 100ml de agua DEPC y esterilizar.

**BUFFER A:**

-294µl de buffer 10X MOPS/EDTA pH 7.0.

-706µl de agua DEPC

BROMURO DE ETIDIO EN AGUA-DEPC-  
-250ml de agua-DEPC  
-5ml de solución stock de bromuro de etidio.

#### COLORANTES

-322µl de buffer A.  
-5mg de xilen-cianol.  
-5mg de azul de bromofenol.  
-400mg de sacarosa.

#### BUFFER DE CARGA

-2µL de formaldehído(37%, 12.3M),  
-5µl de formamida recién desionizada.  
-7µl de colorantes.  
-Desionización de la formamida: En una jeringa de 10ml colocar la resina intercambiadora de iones BIO-RAD hasta la línea que indica 7ml. Adicionar a la columna preparada 10ml de formamida, permitir que eluya y posteriormente lo eluido se coloca en tubos de 2ml y se almacena a -20°C.

#### BUFFER DE ELECTROFORESIS (Northern):

Para 800ml de MOPS/EDTA 1X:  
-80ml de MOPS/EDTA 1X.  
-720ml de H<sub>2</sub>O DEPC

#### BUFFER DE CARGA PARA RNA 6X (5ML).

-3gr de urea.  
-1ml de TBR 5X.  
-Azul de bromofenol cbp.  
-Xilen cianol cbp.  
-Aforar a 5ml.

#### - SOLUCIONES PARA LA HIBRIDACIÓN EN COLONIA.

NaOH 0.5N; NaCl 1.5N  
5ml de NaOH 10N.  
30ml de NaCl 5N  
Llevar a 100 ml con H<sub>2</sub>O bidestilada.

TRIS 0.5M pH 7.4; NaCl 1.5M.  
30 ml de NaCl 5M  
50 ml de Tris 0.5M pH 7.4  
Llevar a 100 ml con H<sub>2</sub>O bidestilada.

SOLUCIÓN DE LAVADO (5X SSC; 0.5% SDS; 1mM EDTA).  
125 ml de SSC 20X

25 ml de SDS 10%  
1 ml de EDTA 0.5M  
Llevar a 500 ml con H<sub>2</sub>O bidestilada.

**- MEDIO SOC.**

Para 10 ml.  
10 ml de medio SOB.  
200 µl de glucosa 1M.